

II

Thesis Title Isolation of Fungi from Mosquito Larvae in the Northern Thailand and Studies of their Ability in Killing Mosquito Larvae and Growth Characteristics.

Author Miss Kunyaluk Chaicumpar

M.Sc. Microbiology

Examining Committee:

Assoc.Prof.Dr.Parimondh Khanjanasthiti Chairman

Assist.Prof. Wej Choochote Member

Assoc.Prof.Dr.Somsak Pantuwatana Member

Assist.Prof.Dr.Nongnuch Vanittanakom Member

ABSTRACT

Mosquitoes cause annoyance and are vectors of many medically important diseases. Thus, mosquito controls are needed to reduce numbers of mosquitoes. At present, we begin to pay attention to the biological control because we faced the problem that mosquitoes have developed resistance to chemical agents. This research project was the preliminary study on the isolation of fungi from mosquito larvae collected from aquatic habitats in the northern Thailand, the larvicidal activity of these fungal isolates in laboratory and their growth characteristics. Mosquito larvae samples were collected from

III

100 aquatic habitats. Thirty two isolates of fungi were isolated from 49 infected cadavers. After the larvicidal activity against laboratory colonies was tested, only 10 isolates exhibited more than 50% mortality. Three isolates were selected according to their high killing ability and obvious sign of fungal infection. The isolate No. 12A-6 appeared to be *Trichoderma viride* had LC₅₀ values against *Culex quinquefasciatus*, *Aedes aegypti*, *Anopheles dirus*, and *Anopheles minimus* at concentration of 7.16×10^5 , 1.29×10^6 , 1.40×10^6 , and 1.71×10^6 spores/ml, respectively. The optimal conditions for growth was at 20-25° C and at pH 5-6. This fungus could assimilate all the carbon and nitrogen sources tested. The isolate No. 10A-15W which was identified as *Beauveria sp.* demonstrated larvicidal activity against all 4 species of mosquito larvae with LC₅₀ values at 2.43×10^6 , 2.92×10^6 , 1.18×10^6 , and 3.96×10^6 spores/ml, respectively. The optimal conditions for growth of this fungus was at 20-25° C and at pH ranges 6-8. This fungal isolate could assimilate all the carbon and nitrogen sources tested. The isolate No. 29B-5W which was identified as *Aspergillus niveus* could kill those 4 species of mosquito larvae with LC₅₀ values at 1.79×10^4 , 1.59×10^5 , 6.73×10^4 , and 3.86×10^5 spores/ml, respectively. It was believed that the toxin of these two fungal isolates (No. 10A-15W & 29B-5W) might contribute to this larvicidal activity. The optimal conditions for growth of isolate No. 29B-5W was at 25-37° C and at pH range of 5-8. This fungus could also assimilate all the carbon and nitrogen sources

tested. Moreover, there were two interesting isolates of fungi which, one was isolate No. 35C-1 which was identified as *Aphanomyces* sp. and the another one was isolate No. 36A-LK which was identified as *Leptolegnia* sp. Both isolates were aquatic fungi which infected mosquito larvae and obviously showed sign of fungal infection in mosquito larvae. The isolate No. 35C-1, *Aphanomyces* sp., grew well at 20-37 °C and at pH 5-8. Peptone and glucose were used as the sole sources of nitrogen and carbon for growth. Whereas the isolate No. 36A-LK, *Leptolegnia* sp., grew well at 20-25 °C and at pH 6-8. Peptone was used as the sole source of nitrogen; glucose and maltose were equally excellent as carbon sources.

ชื่อเรื่องวิทยานิพนธ์ การตรวจสอบแยกเชื้อราสาหร่ายน้ำจืดในภาคเหนือของประเทศไทย และศึกษาความสามารถในการฆ่าสปอร์น้ำและคุณลักษณะการเจริญของเชื้อราที่แยกได้

ชื่อผู้เขียน นางสาวกัญฉฎ์กษม รัชคามา
ศึกษาศาสตร์มหาบัณฑิต สาขาวิชา จุลชีววิทยา

คณะกรรมการตรวจสอบวิทยานิพนธ์:

รองศาสตราจารย์ ดร.ปริมณฑ์	กาญจนาเชษฐา	ประธานกรรมการ
ผู้ช่วยศาสตราจารย์ เวช	ชูชาติ	กรรมการ
รองศาสตราจารย์ ดร.อุทิศศักดิ์	พิชญ์วัฒนา	กรรมการ
ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.นงนุช	ฉวีรัตน์สนาคม	กรรมการ

บทคัดย่อ

ยุงนกกากสะ เป็นสาเหตุทำให้เกิดความรำคาญแล้วยังเป็นพาหะนำโรคที่สำคัญทาง การแพทย์หลายโรค ดังนั้นวิธีควบคุมและกำจัดยุงจึงมีความสำคัญเป็นอย่างยิ่งเพื่อลดความ รบกวนของ ยุง นกกากสะ เรา เริ่มหันมาสนใจวิธีในการควบคุมและกำจัดยุง เนื่องจากพบปัญหาว่ายุงเริ่มคือส่งต่อ สารเคมี ดังนั้นการค้นคว้าวิจัย เรื่องนี้จึงเป็นการศึกษาเบื้องต้นเกี่ยวกับการแยกเชื้อราสาหร่ายน้ำจืด ซึ่งเก็บจากแหล่งน้ำจืดในเขตภาคเหนือของประเทศไทย ความสามารถในการฆ่าสปอร์น้ำของเชื้อราที่ แยกได้ในห้องปฏิบัติการ และศึกษาคุณลักษณะการเจริญของเชื้อราเหล่านี้ สาหร่ายน้ำจืดอย่างสปอร์น้ำซึ่ง เก็บจากแหล่งน้ำ 100 แหล่ง มีเชื้อรา 32 สายพันธุ์ที่สามารถแยกได้สาหร่ายน้ำจืดที่คิดเชื้อรา สาหร่ายน้ำ 49 ตัว ทดลองทดสอบความสามารถในการฆ่าสปอร์น้ำในห้องปฏิบัติการแล้ว พบว่ามี เพียง 10 สายพันธุ์ที่มีคุณสมบัติในการฆ่าสปอร์น้ำได้ และ 3 สายพันธุ์ถูกคัดเลือกเนื่องจากมีความ สามารถในการฆ่าสปอร์น้ำได้สูง และพบลักษณะการติดเชื้อราได้ชัดเจน เชื้อราสายพันธุ์ที่

12A-6 ซึ่งเป็นชนิด *Trichoderma viride* สามารถฆ่าลูกน้ำยุงชนิด *Culex quinquefasciatus*, *Aedes aegypti*, *Anopheles dirus* และ *Anopheles minimus* และมีค่า LC_{50} ที่ความเข้มข้น 7.16×10^5 , 1.29×10^6 , 1.40×10^6 และ 1.71×10^6 สปอร์/มล. ตามลำดับ อุณหภูมิที่เหมาะสมในการเจริญของเชื้อคือ ที่อุณหภูมิ $20-25^{\circ}\text{C}$ และที่ pH 5-6 เชื้อราชนิดนี้สามารถฆ่าตัวอ่อนและในไตรเสนลากแห้งตัวอ่อนและในไตรเสนที่ใช้น้ำในการทดสอบได้ทุกชนิด เชื้อราสายพันธุ์ที่ 10A-15W ซึ่งเป็นชนิด *Beauveria* sp. มีคุณสมบัติในการฆ่าตัวอ่อนทั้ง 4 ชนิดได้และมีค่า LC_{50} ที่ความเข้มข้น 2.43×10^6 , 2.92×10^6 , 1.18×10^6 และ 3.96×10^6 สปอร์/มล. ตามลำดับ การพิษของเชื้อราชนิดนี้ไม่เหมาะในการฆ่าตัวอ่อน อุณหภูมิที่เหมาะสมในการเจริญของเชื้อนี้คือ ที่อุณหภูมิระหว่าง $20-25^{\circ}\text{C}$. และที่ pH 6-8 เชื้อราชนิดนี้สามารถฆ่าตัวอ่อนและในไตรเสนที่ใช้น้ำในการทดสอบได้ทุกชนิด เชื้อราสายพันธุ์ที่ 29B-5W ซึ่งเป็นชนิด *Aspergillus niveus* สามารถฆ่าตัวอ่อนทั้ง 4 ชนิดได้และมีค่า LC_{50} ที่ความเข้มข้น 1.79×10^4 , 1.59×10^5 , 6.73×10^4 , และ 3.86×10^5 สปอร์/มล. ตามลำดับ การพิษของเชื้อราชนิดนี้สามารถฆ่าตัวอ่อนได้เช่นกัน อุณหภูมิที่เหมาะสมในการเจริญของเชื้อราชนิดนี้คือ ที่อุณหภูมิ $25-37^{\circ}\text{C}$ และที่ pH 5-8 เชื้อราชนิดนี้สามารถฆ่าตัวอ่อนและในไตรเสนที่ใช้น้ำในการทดสอบได้ทุกชนิด นอกจากนี้ยังพบเชื้อราที่น้ำดื่มอีก 2 สายพันธุ์ คือ ชนิด *Aphanomyces* sp. สายพันธุ์ที่ 35C-1 และชนิด *Leptolegnia* sp. สายพันธุ์ที่ 36A-LK ซึ่งทั้ง 2 ชนิดนี้เป็นราที่ก่อให้เกิดโรคในลูกน้ำ และแสดงลักษณะการติดเชื้อราในลูกน้ำได้ชัดเจน *Aphanomyces* sp. สายพันธุ์ที่ 35C-1 เจริญได้ดีที่อุณหภูมิ $20-37^{\circ}\text{C}$. และที่ pH 5-8 สามารถใช้น้ำในไตรเสนลากแบบแทนที่น้ำและใช้คาร์บอนลากน้ำจากสาหร่ายและที่ชนิด *Leptolegnia* sp. สายพันธุ์ที่ 36A-LK เจริญได้ดีที่อุณหภูมิ $20-25^{\circ}\text{C}$. และที่ pH 6-8 เชื้อราชนิดนี้สามารถใช้น้ำในไตรเสนลากแบบแทนที่น้ำและคาร์บอนลากน้ำจากสาหร่ายและมอลต์