INTRODUCED FUNGUS, *LAGENIDIUM GIGANTEUM*, FOR CONTROLLING POPULATIONS OF MOSQUITO LARVAE; LABORATORY INVESTIGATIONS

Miss Siripat Limchitti

A Thesis Submitted in Partial Fulfilment of the Requirements

for the Degree of Master of Science

Department of Environmental Science

Graduate School

Chulalongkorn University

1987

ISBN 974-567-769-8

I 10293243

การใช้รา แลคลินิเดียม ไลแกนเดียม ควบคุมประชากรลูกน้ำยุง ในระดับห้องปฏิบัติการ

นางสาวลีรพัชร ลิมจิตติ

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต

สาขาวิชาวิทยาศาสตร์สิ่งแวดล้อม

บัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

พ.ศ. 2530

ISBN 974-567-769-8

ลิขสิทธิ์ของบัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

012614

Thesis Title	Introduced Fungus, Lagenidium giganteum, for Controlling Populations of Mosquito Larvae; Laboratory Investigations
By	Miss Siripat Limchitti
Department	Environmental Science
Thesis Advisor	Associate Professor Sumalee Pichyangkura, Ph.D.
	LtC. Richard G. Andre, Ph.D.

Accepted by the Graduate School, Chulalongkorn University in Partial Fulfillment of the Requirements for the Master's Degree

Thavorn Vajrabhaya ..... Dean of Graduate School

(Professor Thavorn Vajrabhaya, Ph.D.)

Thesis Committee

T. Rochanaburanon ..... Chairman

(Associate Professor Thamanoon Rochanaburanon, Ph.D.

Sumalee Pichyangkura ..... ~~Thesis~~ Advisor

(Associate Professor Sumalee Pichyangkura, Ph.D.)

Richard G. Andre ..... Co-Advisor

(LtC. Richard G. Andre, Ph.D.)

C. Prasittisuk ..... Member

(Mr. Chusak Prasittisuk, Ph.D.)

หัวข้อวิทยานิพนธ์ การใช้รา แลคลินิเดียม ไจแกนเตียม ควบคุมประชากรลูกน้ำยุง ในระดับห้องปฏิบัติการ

ชื่อนิสิต นางสาวลิริพัชร ลิมลิตติ

อาจารย์ที่ปรึกษา รองศาสตราจารย์ ดร.สุมาลี พิชญางกูร

อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม พันโท ริชาร์ด จี. อังเดร

สหสาขาวิชา วิทยาศาสตร์สิ่งแวดล้อม

ปีการศึกษา 2529

หอสมุดกลาง สถาบันวิทยบริการ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บทคัดย่อ

เชื้อรา แลคลินิเดียม ไจแกนเตียม ATCC 36942 ได้ใช้ในการศึกษาความเป็นไปได้ในการใช้ควบคุมประชากรลูกน้ำยุง ศึกษาการขยายปริมาณราโดยวิธีเลี้ยงบนเยื่อเซลล์มียุงลาย Aedes albopictus (C6/36) พบว่าเซลล์ของยุงจะลดจำนวนลงและสลายตัวไปในที่สุด แต่ไม่พบการสร้างซูโอสปอร์ของรา จากผลการทดลองไม่สามารถขยายพันธุ์ราในเยื่อเซลล์ของยุงได้ เมื่อนำมาศึกษาอวัยวะที่ติดเชื้อเริ่มแรกของยุงโดยวิธีทางพยาธิสภาพ พบว่าราเข้าไปเจริญเติบโตภายในและภายนอกของตัวลูกน้ำ สร้างซูโอสปอร์และโอโอสปอร์จำนวนมากอยู่ที่บริเวณส่วนหัว, อก และบริเวณทางเดินอาหาร

เมื่อนำยุงพาหะของไทย 3 ชนิด คือ Anopheles dirus, Aedes aegypti และ Culex quinquefasciatus มาทำการทดลองการติดเชื้อรา พบว่าเชื้อราชนิดนี้สามารถฆ่าลูกน้ำยุง Ae. aegypti และ Cx. quinquefasciatus ได้ดีกว่า An. dirus จากการทดลองลดระดับน้ำที่ใช้ในการทดลอง 3 ระดับ ต่อเปอร์เซ็นต์การติดเชื้อของ An. dirus คือ ระดับน้ำที่ 1.8 ซม., 5.4 ซม. และ 9.0 ซม. พบว่าที่ระดับน้ำ 1.8 ซม. นั้นราสามารถฆ่าลูกน้ำยุง An. dirus ได้ดีที่สุด เมื่อนำเชื้อรามาเลี้ยงบนอาหารเลี้ยงเชื้อ ชนิด PYG, HS, WGYG, Z และ SFE ปรากฏว่า เชื้อราที่เลี้ยงบนอาหารชนิด SFE สามารถฆ่าลูกน้ำยุงได้สูงสุด และเมื่อเลี้ยงราบน SFE เป็นเวลา 5 วัน สามารถผลิตซูโอสปอร์จำนวน 6.0×10^6 ตัวต่อมิลลิลิตร โดยมีปริมาณเชื้อที่ยืนบนอาหารแข็งที่เหมาะสมในการฆ่าลูกน้ำยุง เท่ากับ

23.4 ตารางเซนติเมตรของพื้นที่อาหารแข็ง ในน้ำที่ใช้เลี้ยง 500 มิลลิลิตร คิดเป็นเปอร์-เซนต์การใส่หัวเชื้อเท่ากับ 0.4 ตารางเซนติเมตรต่อมิลลิลิตร

เมื่อนำข้อมูลที่ได้มาเป็นเกณฑ์ในการทดสอบกับลูกน้ำยุง Ae. aegypti พบว่าเชื้อราจะฆ่าลูกน้ำยุงอายุ 1 - 2 วันได้ดีที่สุด โดยประสิทธิภาพของการฆ่าลูกน้ำยุงจะแปรไปตามสภาพแวดล้อม สำหรับสภาพแวดล้อมที่เหมาะสมสำหรับการติดเชื้อ คือ ความเป็นกรดของน้ำระหว่าง 6.0 - 7.5 อุณหภูมิระหว่าง 20 - 28 องศาเซลเซียส และเมื่อนำเชื้อรามาทำการทดลองกับลูกน้ำยุงอายุ 2 วัน ในน้ำจากแหล่งต่าง ๆ กัน พบว่าน้ำขึ้นจากแม่น้ำเจ้าพระยาซึ่งมีความเป็นกรดเท่ากับ 6.82 บีโอดีเท่ากับ 3.63 มก./ลิตร และซีโอดี เท่ากับ 16.0 มิลลิกรัม/ลิตร และน้ำฝนมีความเป็นกรด เท่ากับ 6.42 บีโอดี เท่ากับ 2.407 มิลลิกรัม/ลิตร และซีโอดี เท่ากับ 12.936 มิลลิกรัม/ลิตร ราสามารถฆ่าลูกน้ำยุงได้ดีที่สุด คือ 84.5 เปอร์เซนต์ และ 60.5 เปอร์เซนต์ ตามลำดับ

Thesis Title	Introduced Fungus, Lagenidium giganteum, for Controlling Populations of Mosquito Larvae; Laboratory Investigations
Name	Miss Siripat Limchitti
Thesis Advisor	Associated Professor Sumalee Pichyangkura, Ph.D. LtC. Richard G. Andre, Ph.D.
Departmen	Environmental Science
Academic Year	1986

ABSTRACT

Lagenidium giganteum, ATCC 36942, was tested for its potential for infection of mosquito larvae in the laboratory. To studies on fungal propagation were done by culturing the fungus on Aedes albopictus cell lines (C6/36). It was found that the number of mosquito cells were reduced and appeared degenerate. No zoospores were found. After studying the target organs of larvae by histopathology, it was found that the fungus spread over both the inside and outside of the body of the infected larva. Many zoospores and oospores occurred in the head, thorax and digestive tract.

Lagenidium giganteum was tested against Anopheles dirus, Aedes aegypti, and Culex quinquefasciatus, vectors of human disease in Thailand. It seemed that L. giganteum plays a more important role in the infection of culicine mosquitoes than of anophelines. When the fungus was tested for infection of An. dirus in various depths of water, i.e., 1.8 cm., 5.4 cm., and 9.0 cm., the results showed that

the infection rate at the 1.8 cm. depth was better than at higher depths, but was still less than the infection rate obtained in culicines. Five kinds of media were tested for fungal infection, i.e., PYG, HS, WGYG, Z, and SFE. The best medium was Sunflower seed extract (SFE). L. giganteum cultured on Sunflower seed extract produced 6.0×10^6 zoospores/ml, at a fungal rate of 23.4 cm^2 area of SFE agar culture for 5 days. This fungal inoculum and Ae. aegypti were used in most tests.

Mosquito larvae were infected most easily when 1 - 2 days old. The effectiveness of infectivity of L. giganteum varied considerably according to environmental conditions. The optimal conditions for infecting larvae by L. giganteum were; pH of water between 6.0 - 7.5 and a range of temperatures 20 - 28 ^{o}C. High organic polluted water limited the infection rate of L. giganteum. When treating the larvae in different types of water, high tide water from Chao Praya river at Sathupradid, (pH of 6.82, BOD of 3.43 mg/l and COD of 19.920 mg/l) and rain water from a home reservior (pH of 6.42, BOD of 2.403 mg/l, and COD of 12.943 mg/l) were good for mosquito control, with percentages of mortality of 84.0% and 60.5% respectively.

หอสมุดกลาง สถาบันวิทยบริการ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ACKNOWLEDGEMENTS

I am very proud to say that this thesis was completed with the valuable advice, continuous guidance, constructive criticism and encouragement of my advisor, Assoc. Prof. Dr. Sumalee Pichyangkura and LTC. Richard G. Andre, throughout the course of my study. Their kindness and generosity will always be remembered.

I do greatly appreciate the members of advisory committee, Assoc. Prof. Dr. Thamanoon Rochanaburanon and Dr. Chusak Prasittisuk, for their valuable comments and suggestions in the completion of this thesis.

Sincere thanks are extended to all my fellows Mr. Jaturaporn Pornsilptip, Mr. Thanit Singhaboonpong, the Department of Microbiology, Miss Kanittha Thamanon and Mr. Sahaporn Limsaiprom for their help and for providing facilitres during my study.

I would like to extend my thanks to Dr. C.J. Leake and Mrs. Pudpong of Virology Department, Maj. R. Elwell, Maj. W.B. Baze and Mr. Chalerm Jecksaeng of Pathology Department and staffs of Department of Medical Entomology, AFRIMS for their cooperation. Without their cooperation, these studies would not have been possible.

Many thanks are also expressed to Mr. Visuth Achanan for his sincere helps.

Finally, I greatly appreciate my parents for their understanding encouragement and financial support throughout my study.

TABLE OF CONTENTS

		Page
ABSTRACT (THAI)		iv
ABSTRACT (ENGLISH)		vi
ACKNOWLEDGEMENTS		viii
TABLE OF CONTENTS		ix
LIST OF FIGURES		x
LIST OF ABBREVIATIONS		xiv
LIST OF DIAGRAMS		xvi
CHAPTER		
1	INTRODUCTION	1
2	MATERIALS AND METHODS	23
3	RESULTS	44
4	DISCUSSIONS	81
5	CONCLUSIONS AND RECOMMENDATIONS	97
BIBLIOGRAPHY		101
APPENDICES		111
BIOGRAPHY		115

LIST OF FIGURES

Figure		Page
1	Growth of Lagenidium giganteum on mosquito cell line (C6/36) for 3 days	45
2	Growth of normal cell line (C6/36) after incubation for 3 days	46
3	Growth of the infected cells with clump of L. giganteum after inoculation for 3 days, density of cells were decreased	46
4	Mycelium of L. giganteum growing after inoculation in mosquito cell line, the cell debris were seen around fungal mycelium	47
5	Aseptate mycelium of L. giganteum when growing on PYG medium	49
6	Mycelium of L. giganteum when cultured in SFE broth medium. Density of cytoplasm was increased when compared the culture in PYG	50
7	Kidney shape of secondary zoospores	51
8	Germination of zoospores of L. giganteum in cultured water	51
9	Long-section of a normal larva when stained with Hematoxylin and Eosin	52

Figure | Page

10 Fungal infection at the head region of the infected larva 53

11 Fungal infection at the thorax region of the infected larva 54

12 The zoospores of L. giganteum inside the mosquito larva. The walls of zoosporangium were seen 55

13 Zoospore and Oospore formation inside the infected larva 56

14 Normal digestive tract on top view of the mosquito larva 58

15 Digestive tract of the infected larva. The mycelium were growing inside and zoospores were seen at the hypha terminal 59

16 Mycelium of L. giganteum protruded out around the siphon of an infected Ae. aegypti larva (whole mount) 60

17 Mycelium of L. giganteum infection Ae. aegypti larva (whole mount) 61

18 Oospores of L. giganteum spread over the siphon of an infected Ae. aegypti larva 62

19 Percentage of mortality of three species of mosquitoes infected by L. giganteum 64

Figure		Page
20	Percentage of mortality of An. dirus after infected by L. giganteum in various depths of water	65
21	Percentage of mortality of Ae. aegypti larvae on the infection of L. giganteum which were cultured on various media	67
22	Number of zoospores of L. giganteum per ml after incubation at various days	68
23	Percentage of mortality of Ae. aegypti which were inoculated with various percentages of inoculum for 5 days	70
24	Percentage of mortality of Ae. aegypti various ages which were susceptible to various inoculum sizes of L. giganteum	72
25	Percentrage of mortality of 2-day-old, Ae. aegypti larvae which were treated with L. giganteum in different pHs of water	73
26	Percentage of mortality of 2-day-old Ae. aegypti infected by 6.0×10^6 zoospores per ml of L. giganteum cultured on SFE agar for 5 days in various temperatures	75
27	Shows pH, BOD, COD of various types of water which were used for infections	76

Figure | Page

28 Percentage of mortality of Ae. aegypi on infection by L. giganteum in various types of BOD 78

29 Percentage of mortality of Ae. aegypti on infection by L. giganteum in various types of COD 79

หอสมุดกลาง สถาบันวิทยบริการ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

LIST OF ABBREVIATIONS

DDT	=	Dichloro Diethyl Trichloroethane
µm	=	micrometer
Ae.	=	Aedes
An.	=	Anopheles
Cx.	=	Culex
NC	=	North Carolina
LA	=	Louisiana
^{o}C	=	^{o} celsius
ppt	=	parts per thousand
NaCl	=	Sodium chloride
ca	=	circa (= approximately)
g/l	=	grams per liter
LD	=	Lethal dose
mg	=	milligrams
mM	=	milli molar
TDL	=	Technical Development Laboratories
ppm	=	part per million
IC	=	Initial concentration
et. al.	=	and others
L. giganteum	=	Lagenidium giganteum
r.p.m.	=	revolutions per minute
CDC	=	Centers for Disease Control, Georgia, USA.
PYG	=	Peptone-Yeast extract-Glucose
PYGA	=	Peptone Yeast extract Glucose Agar

WGYG	=	Wheat germ Yeast extract-Glucose
WGYGA	=	Wheat germ-Yeast extract-Glucose Agar
HS	=	Hemp seed extract
HSA	=	Hemp seed extract agar
Z	=	'Z' medium
ZA	=	'Z' agar medium
SFE	=	Sunflower seed extract
SFEA	=	Sunflower seed extract agar

LIST OF DIAGRAMS

Diagrams		Page
1	Life cycle of *Lagenidium giganteum*	5
2	Life cycle of mosquitoes	24
3	Zoospore production of *L. giganteum*	33