คุณสมบัติของเฮลิโคสปอริเดียมจากยุงลายในประเทศไทย ภายหลังการเก็บด้วยวิธีต่าง ๆ

นางสาว บุญเกื้อ วิถีธรรม

001358

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต
แผนกวิชาชีววิทยา
บัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
พ.ศ. 2520

I 16012380

THE STORAGE PROPERTIES OF HELICOSPORIDIUM SP. FROM AEDES AEGYPTI IN THAILAND

Miss Boongeua Witethom

A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements

for the Degree of Master of Science

Department of Biology

Graduate School

Chulalongkorn University

1977

Accepted by the Graduate School, Chulalongkorn University in partial fulfillment of the requirements for the degree of Master of Science.

.....

(Professor Dr. Visid Prachuabmoh)

Dean

Thesis committee .....Chairman

(Dr. Siriwat Wongsiri)

.....Advisor

(Assistant Professor Dr. Pensri Vaivanijkul)

.....Member

(Major Stephen C. Hembree, Ph.D.)

Thesis Advisor: Assistant Professor Dr. Pensri Vaivanijkul

Copyright 1977

by

The Graduate School

Chulalongkorn University

Thesis Title: The Storage Properties of Helicosporidium sp. from Aedes aegypti in Thailand

By : Miss Boongeua Witethom

Department : Biology

หัวข้อวิทยานิพนธ์ คุณสมบัติของเฮลิโคสปอริเดียมจากยุงลายในประเทศไทย
ภายหลังการเก็บด้วยวิธีต่าง ๆ

ชื่อ นางสาว บุญเกื้อ วิถีธรรม แผนกชีววิทยา

ปีการศึกษา 2520

บทคัดย่อ

Helicosporidium parasiticum Keilin,1921 เป็นโปรโตซัวชนิดหนึ่งที่ทำให้แมลงเกิดโรค พบครั้งแรกในลูกน้ำยุงลาย *Aedes aegypti* และลูกน้ำยุงรำคาญ *Culex pipiens quinquefasciatus* ในประเทศไทยในปี พ.ศ. 2517 เนื่องจากโปรโตซัวชนิดนี้สามารถทำให้ลูกน้ำของยุงเหล่านี้เกิดโรค และยังสามารถแพร่กระจายโรคได้อีกด้วย โปรโตซัวชนิดนี้ จึงน่าจะนำมาใช้เป็น biological control agent ได้อย่างมีประสิทธิภาพ

ในการวิจัยครั้งนี้มีจุดประสงค์เพื่อศึกษาเปรียบเทียบคุณสมบัติสปอร์ของ *Helicosporidium* ภายหลังการเก็บด้วยวิธีต่าง ๆ เนื่องจากการเก็บรักษา *Helicosporidium* ให้อยู่ในสภาพที่ดีนั้นเป็นวิธีการที่สำคัญอย่างหนึ่ง ที่จะนำมาใช้ใน biological control

ได้ทำการเลี้ยง *Helicosporidium* ใน natural host คือลูกน้ำยุงลาย หลังจากนั้นก็นำ *Helicosporidium* ที่อยู่ในลูกน้ำโดยตรง (intact larvae) และที่อยู่ในรูปของ spore suspension มาเก็บด้วยวิธีดังต่อไปนี้คือ *Helicosporidium* ใน intact host แบ่งออกเป็น 3 กลุ่ม กลุ่มแรกจะถูกนำมาทำให้เย็นจัดในไนโตรเจนเหลว ที่ -196°C แล้วนำไปเก็บไว้ใน ไนโตรเจนเหลวต่อไป หรือนำไปเก็บไว้ในตู้ทำความเย็นที่ควบคุมอุณหภูมิได้ (REVCO freezer) ที่ -70°C กลุ่มที่สอง นำมาทำให้เย็นจัดและทำให้แห้งในสุญญากาศ (lyophilization) กลุ่มสุดท้ายนำมาทำให้แห้งในสุญญากาศ โดยไม่ต้องทำให้เย็นจัด (vacuum drying) แล้วนำไปเก็บไว้ที่ -70°C

หรือที่อุณหภูมิห้อง (25°C) Helicosporidium ที่อยู่ในรูปของ spore suspension จะแบ่งออกเป็น 3 กลุ่มเช่นกัน สองกลุ่มแรกจะถูกนำไปทำให้เย็นจัดในไนโตรเจนเหลว โดยใช้สารที่ช่วยป้องกันอันตรายจากความเย็นจัด (protectants) 2 ชนิดคือ dimethyl sulfoxide และ glycerine กับไข่แดง หลังจากนั้นนำไปเก็บไว้ที่ -70°C หรือเก็บในไนโตรเจนเหลว ส่วน spore suspension อีกกลุ่มหนึ่ง จะถูกนำไปทำให้เย็นจัดและทำให้แห้ง (lyophilization) โดยใช้glycerine และไข่แดงเป็นสารช่วยป้องกันอันตรายจากความเย็นจัด แล้วนำมาเก็บไว้ที่อุณหภูมิห้อง ภายหลังการเก็บเป็นเวลานาน 4, 8, 12 และ 16 สัปดาห์ตามลำดับ Helicosporidium ที่ถูกเก็บไว้ด้วยวิธีต่าง ๆ จะถูกนำมาทดสอบ infectivity กับลูกน้ำยุงลายที่มีอายุ 48 ชม โดยการให้ลูกน้ำกินสปอร์ของ Helicosporidium ที่มีความเข้มข้นต่าง ๆ กัน (spores/ml) แล้วหาเปอร์เซ็นinfection ที่เกิดขึ้น หาค่าของ IC_{50} (spores/ml) จาก log-dose-infection curve แล้วนำไปเปรียบเทียบกับค่าของ IC_{50} ของสปอร์ที่ได้จากการเลี้ยงในลูกน้ำยุงลายโดยตรง (fresh spores)

จากผลการวิจัย พบว่า สปอร์ของ Helicosporidium ยังคงมี infectivity อยู่ภายหลังการเก็บด้วยวิธีต่าง ๆ เป็นเวลานาน 4 สัปดาห์ ยกเว้นสปอร์ของ Helicosporidium ที่อยู่ในรูปของ spore suspension ซึ่งไม่มี infectivity เหลืออยู่เลย หลังจากนำมาทำให้เย็นจัดและทำให้แห้งในสุญญากาศ (lyophilization) แล้วเก็บไว้ที่อุณหภูมิห้อง จากผลการวิจัยพอสรุปได้ว่าสปอร์ของ Helicosporidium ไม่สามารถเก็บโดยการทำให้แห้ง(desiccation) แต่จะถูกเก็บไว้ได้ดีโดยการทำให้เย็นจัด เนื่องจากการเก็บโดยวิธีนี้ ทำให้สปอร์มี infectivity อยู่ได้นานถึง 4 เดือน การลดลงของ IC_{50} ภายหลังการเก็บ อาจเนื่องมาจากการเปลี่ยนแปลงของอุณหภูมิห้องในขณะที่เลี้ยงลูกน้ำก่อนที่จะนำมาทดสอบ infectivity ของ Helicosporidium เนื่องจากไม่สามารถควบคุมอุณหภูมิในห้องปฏิบัติการได้

Thesis Title The Storage Properties of Helicosporidium sp. from Aedes aegypti in Thailand

Name Miss Boongeua Witethom

Department of Biology

Academic Year 1977

ABSTRACT

Helicosporidium parasiticum Keilin, 1921, a protozoan pathogen of insects, was found in Aedes aegypti and Culex pipiens quinquefasciatus in Thailand in 1974. Because of its transmissability to these medically important mosquitoes and its virulence, it was considered to have potential as a biological control agent. As part of an evaluation of this biological control potential, studies were undertaken to determine its storage characteristics. The pathogen was produced in A. aegypti larvae and preserved either in the intact host or as a spore suspension. Material in the intact host was preserved by freezing in liquid nitrogen, followed by storage either in liquid nitrogen or in a REVCO freezer at -70°C, or by lyophilization or vacuum drying, followed by storage either at -70°C or at room temperature. Suspensions of Helicosporidium spores were preserved by freezing in liquid nitrogen with two protectants, one based on dimethyl sulfoxide and one based on glycerine and egg yolk, and preserved either at -70°C or in liquid nitrogen. Spore suspension in the protectant based on glycerine and egg yolk was lyophilized and stored at room temperature. At intervals of 4, 8, 12 and 16 weeks the infectivity

of stored material for 48 hr old A. aegypti larvae was evaluated, dose-response curves were constructed, and IC_{50}'s were estimated. Dose-response data with fresh spores served as a standard.

Infectivity was preserved for at least four weeks by all methods except lyophilization as spore suspensions and storage at room temperature. However, all methods based on desiccation gave relatively poor results. Through 16 weeks of storage, material preserved and stored by freezing remained highly infectious. Results were aberrant in that in many instances IC_{50}'s decreased with storage. Temperature variation during the 48 hr pre-exposure incubation period of the larvae in non-temperature controlled insectaries appeared to explain this.

ACKNOWLEDGEMENTS

The author would like to express her appreciation to Major Stephen C. Hembree, Ph.D., Chief, Department of Medical Entomology, U.S. Component, SEATO Medical Research Laboratory for his helpful suggestions, for kindly providing all of the facilities used in this study and for valuable comments on and corrections to this manuscript.

She is indebted to Assistant Professor Dr. Pensri Vaivanijkul, Department of Biology, Faculty of Science, Chulalongkorn University, for her recommendation, encouragement and approval. She would also like to thank Dr. Siriwat Wongsiri, Department of Biology, Faculty of Science, Chulalongkorn University for his valuable guidance and approval.

She also thanks the staff members of the Medical Entomology Department, SEATO Medical Research Laboratory, especially Mr. Larp and Mrs. Prachong Panthusiri for their helpful assistance throughout this investigation.

Appreciation is also due the University Development Commission, National Education Commission for their scholarship which was provided throughout this research program.

CONTENTS

	Page
ABSTRACT (THAI)	i
ABSTRACT (ENGLISH)	iii
ACKNOWLEDGEMENTS	v
LIST OF TABLES	vi
LIST OF FIGURES	viii
INTRODUCTION	1
MATERIALS AND METHODS	12
RESULTS	20
DISCUSSION	71
CONCLUSION AND RECOMMENDATION	75
BIBLIOGRAPHY	76
APPENDIX	82
VITA	85

LIST OF TABLES

Table — Page

1. Class numbers of different methods of treatment and storage 24
2. Percentages of infection of 48 hr old Aedes aegypti larvae exposed to fresh Helicosporidium spores at various dosages and the IC_{50} estimated from a graph of the data 25
3. Percentages of infection of 48 hr old Aedes aegypti larvae exposed to various dosages of Helicosporidium spores after 4 weeks of storage and the IC_{50}'s estimated from graphs of the data..... 26
4. Percentages of infection of 48 hr old Aedes aegypti larvae exposed to various dosages of Helicosporidium spores after 8 weeks of storage and the IC_{50}'s estimated from graphs of the data 27
5. Percentages of infection of 48 hr old Aedes aegypti larvae exposed to various dosages of Helicosporidium spores after 12 weeks of storage and the IC_{50}'s estimated from graphs of the data 28
6. Percentages of infection of 48 hr old Aedes aegypti larvae exposed to various dosages of Helicosporidium spores after 16 weeks of storage and the IC_{50}'s estimated from graphs of the data 29

Table Page

7. Relationship between IC_{50} (spores/ml) and duration of storage 30

8. Percentages of mortality of Aedes aegypti larvae which were exposed to various dosages of fresh Helicosporidium spores at 48 hr of age..... 31

9. Percentages of mortality of Aedes aegypti larvae which were exposed to Helicosporidium spores after 4 weeks of storage 32

10. Percentages of mortality of Aedes aegypti larvae which were exposed to Helicosporidium spores after 8 weeks of storage 33

11. Percentages of mortality of Aedes aegypti larvae which were exposed to Helicosporidium spores after 12 weeks of storage 34

12. Percentages of mortality of Aedes aegypti larvae which were exposed to Helicosporidium spores after 16 weeks of storage 35

13. Relationships between IC_{50} (spores/ml) and mean temperature (°C) of incubation days, the 2 days before infectivity tests of Helicosporidium spores after storage of various duration (weeks)..... 36

LIST OF FIGURES

Figure — Page

1. Dose-response curve of fresh spores 37
2. Dose-response curves of several classes, 4 weeks after storage 38
3. Dose-response curves of several classes, 8 weeks after storage 45
4. Dose-response curves of several classes, 12 weeks after storage 51
5. Dose-response curves of several classes, 16 weeks after storage 56
6. Relationship between IC_{50} (spores/ml) and duration of storage (weeks) 62
7. Mean temperature (°C) of incubation days, the 2 days before infectivity tests of Helicosporidium spores, preserved in intact infected larvae (IL) and in form of spore suspension (SS), after storage of various duration (weeks) 63
8. Diagram illustrating the probable development of Helicosporidium 64
9. Giemsa stained smear of infected Aedes aegypti larva, showing several developmental stages of Helicosporidium 65

Figure Page

10. Giemsa stained smear of infected Aedes aegypti larva, showing melanin encapsulation (E) and sporonts (O) of Helicosporidium 66

11. Giemsa stained smear of Helicosporidium infected Aedes aegypti larva, showing spore germination 67

12. The developmental stages of Helicosporidium. Some were found in the host cell (H), and some were found in the hemolymph (C) of a giemsa stained smear of an infected Aedes aegypti larva 68

13. Giemsa stained smear of Aedes aegypti larva which was infected by several microorganisms including Helicosporidium, bacteria (B) and possibly commensal algae (A) 69

14. Giemsa stained smear of uninfected Aedes aegypti larva as a control 70