LIBRARY AND INFORMATION CENTER
MAHIDOL UNIVERSITY

11 MAY 1992

TOXICITY OF *BACILLUS THURINGIENSIS* SUBSP. *KURSTAKI* STRAIN *HD-1* AGAINST INSECT LARVAE

SUKON TANTIPAIBULVUT

A THESIS SUBMITTED IN PARTAIL FULFILLMENT OF
THE REQUIREMENTS FOR THE DEGREE OF
MASTER OF SCIENCE
(MICROBIOLOGY)

ได้รับวิทยานิพนธ์
จาก
บัณฑิตวิทยาลัย มหิดล

IN
FACULTY OF GRADUATE STUDIES
MAHIDOL UNIVERSITY
1991

Copyright by Mahidol University

18824

ชื่อวิทยานิพนธ์ ความเป็นพิษของเชื้อแบคทีเรีย Bacillus thuringiensis สายพันธุ์ kurstaki HD-1 ต่อหนอนศัตรูพืช

ผู้วิจัย สุคนธ์ ตันติไพบูลย์วุฒิ

ปริญญา วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต (จุลชีววิทยา)

คณะกรรมการควบคุมวิทยานิพนธ์

สมศักดิ์ พันธุวัฒนา, Ph.D.

อมเรศ ภูมิรัตน, Ph.D.

วัฒนาลัย ปานบ้านเกร็ด, Dr.Eng.

อุทัย เกตุนุติ, M.Sc.

วันที่สำเร็จการศึกษา 3 ตุลาคม พ. ศ. 2534

บทคัดย่อ

เชื้อจุลินทรีย์ B. thuringiensis subsp. kurstaki HD-1 มีผลึกโปรตีนอยู่ 2 ชนิด คือ ชนิดที่มีรูปทรงสี่เหลี่ยมขนมเปียกปูน (bipyramidal) และชนิดที่มีรูปทรงสี่เหลี่ยมจตุรัส (cuboidal) ซึ่งมีน้ำหนักโมเลกุลสัมพันธ์ (M_r) เท่ากับ 135 กิโลดาลตัน (kDa) และ 65 กิโลดาลตัน ตามลำดับ ชนิดแรกมีคุณสมบัติในการฆ่าหนอนศัตรูพืชและชนิดหลังมีคุณสมบัติในการฆ่าลูกน้ำยุง เพื่อที่จะศึกษาประสิทธิภาพในการฆ่าตัวอ่อนของแมลงของผลึกโปรตีนทั้งสองชนิด จึงจำเป็นต้องทำให้ผลึกนี้สะอาดปราศจากสปอร์ (spore) และสิ่งปนเปื้อนอื่นๆ ด้วยการเขย่าเชื้อจุลินทรีย์ที่ได้ทำการล้างแล้วหลังจากเลี้ยงในอาหารเหลวเป็นเวลา 2 วัน อย่างแรงในสารละลาย 0.2 M sodium chloride (NaCl) จะได้ผลึกโปรตีนที่มีสปอร์ปนเปื้อนอยู่ 1.3% เพื่อทำการทดสอบประสิทธิภาพในการฆ่าของผลึกโปรตีนนี้ ต่อหนอนกระทู้หอม (Spodoptera exigua) และลูกน้ำยุงลาย (Aedes aegypti) ควบคู่ไปกับเชื้อจุลินทรีย์ที่ได้จากการล้างด้วยน้ำกลั่น หรือเชื้อจุลินทรีย์ที่ได้จากการล้างด้วย 1 M NaCl ผลปรากฏว่า เชื้อจุลินทรีย์ที่ได้จากการล้างด้วย 1 M NaCl จะมีประสิทธิภาพในการฆ่าหนอนกระทู้หอมดีที่สุด เมื่อเปรียบเทียบกับอีกสองชนิด โดยความเข้มข้นที่ใช้ในการฆ่าหนอนให้ตาย 50% (LC_{50}) ตั้งแต่ 62 ผลึก/ตารางมิลลิเมตรของพื้นที่อาหารในหนอนกระทู้หอมวัยที่หนึ่ง และเท่ากับ 1291 ผลึก/ตารางมิลลิเมตรของพื้นที่อาหารในหนอนวัยที่ห้า แต่ผลึกโปรตีนนี้มีประสิทธิภาพในการฆ่าต่ำที่สุด โดยมีค่า LC_{50} เท่ากับ 207 ผลึก/ตารางมิลลิเมตรของพื้นที่

Copyright by Mahidol University

อาหารในการฆ่าหนอนวัยที่หนึ่ง และ 32,734 ผลึก/ตารางมิลลิเมตรของพื้นที่อาหารในการฆ่าหนอนวัยที่ห้า เมื่อทำการทดสอบในลูกน้ำยุงลาย ผลปรากฏว่า ผลึกโปรตีนมีประสิทธิภาพในการฆ่าสูงที่สุด โดยมีค่า LC_{50} เท่ากับ 3,682 ผลึก/มิลลิลิตรของน้ำในลูกน้ำวัยที่ 1และ 2 และมีค่า LC_{50} เท่ากับ 23,550 ผลึก/มิลลิลิตรของน้ำ ในลูกน้ำวัยที่ 3 และ 4 เมื่อทำการละลายผลึกโปรตีนนี้ใน 2% 2-mercaptoethanol ที่มีpH 10 โปรตีนที่มี M_r = 134 kDa จะถูกละลายออกมาก่อน หลังจากนั้น โปรตีนที่มี M_r = 65 kDa จะถูกละลายออกมาด้วย 0.1 M NaOH เมื่อทำการทดสอบความเป็นพิษของโปรตีนทั้งสองชนิดนี้ โดยใช้หนอนกระทู้หอมวัยที่สามและลูกน้ำยุงลายวัยที่สอง พบว่าโปรตีนชนิดแรกมีความสามารถในการฆ่าหนอนกระทู้หอมได้ดีกว่าผลึกโปรตีน ประมาณ 2 เท่า และโปรตีนชนิดที่สองมีความสามารถในการฆ่าลูกน้ำยุงลายได้ดีกว่าผลึกโปรตีน 10 เท่า อย่างไรก็ตาม โปรตีนชนิดหลังนี้ไม่สามารถฆ่าหนอนกระทู้หอมได้ วิทยานิพนธ์ฉบับนี้แสดงให้เห็นว่า หนึ่ง การปราศจากการปนเปื้อนของสปอร์ในผลึกโปรตีนของเชื้อจุลินทรีย์ชนิดนี้ อาจลดประสิทธิภาพในการฆ่าหนอนของผลึกโปรตีนนี้ และสอง การล้างเอนไซม์ protease ออกจากผลึกโปรตีนโดยใช้ 1 M NaCl จะเพิ่มประสิทธิภาพในการฆ่าหนอนกระทู้หอมของผลึกโปรตีนนี้ และสาม ผลึกโปรตีนรูปทรงสี่เหลี่ยมจตุรัสไม่สามารถฆ่าหนอนกระทู้หอมได้

Copyright by Mahidol University

Thesis Title	Toxicity of *Bacillus thuringiensis* Subsp. *kurstaki* Strain HD-1 against Insect Larvae.
Name	Sukon Tantipaibulvut
Degree	Master of Science (Microbiology)
Thesis Supervisory Committee	Somsak Pantuwatana, Ph.D. Amaret Bhumiratana, Ph.D. Watanalai Panbangred, Dr.Eng. Uthai Ketunuti, M.Sc.
Date of Graduation	3 October B.E. 2534 (1991)

ABSTRACT

B. thuringiensis subsp. *kurstaki* HD-1 contains two types of proteinaceous crystals, that is a bipyramidal crystal (M_r = 134 kDa), which is toxic to lepidopteran larvae, and a cuboidal crystal (M_r = 65 kDa), which is toxic to dipteran larvae. In order to study the toxicities of these toxin, the purified crytals must be obtained. Vigorous shaking in 0.2 M NaCl was used to produce purified crystals containing impurities of 1.3% spores from cultures of *B. thuringiensis* subsp. *kurstaki* HD-1. Bioassays of these crystals were done against *Spodoptera exigua* and *Aedes aegypti* larvae in parallel with the sample derived from cultures washing in distilled water and/or the sample derived from cultures washing in 1 M. NaCl. When *S. exigua* larvae were used, the sample derived from cultures washing in 1 M NaCl gave highest toxicity than others. This sample gave LC_{50} = 62 crystals/mm^2 diet surface in

Copyright by Mahidol University

first instar larvae to 1291 crystals/mm^2 diet surface in fifth instar larvae. While the purified crystals gave the least toxicity, it gave LC_{50} = 207 crystals/mm^2 diet surface against first instar larvae to 32,734 crystals/mm^2 diet surface in fifth instar larvae. When mosquito larvae were used to test all of these specimens the purified crystals was the most effective one when it was compared with the crude preparations. The LC_{50} was 3,682 crystals/ml against early instar larvae and 23,550 crystals/ml against late instar larvae. When the intact crystals were solubilized in 2% 2-mercaptoethanol at pH 10, the 134-kDa protein was recovered. After this protein was removed, the residue was solubilized in 0.1 M NaOH and the 65-kDa protein was obtained. The toxicity of these proteins were tested against third instar larvae of *S. exigua* and second instar larvae of *Ae. aegypti*. The 134-kDa protein could kill *S. exigua* larvae with 2 folds higher activity than that of the intact crystal. The 65-kDa protein could kill *Ae. aegypti* larvae with 10 folds higher activity than those of the intact crystals. However, this protein could not kill *S. exigua* larvae. This study indicated that : first, the absence of spores may impair the control of *S. exigua* larvae feeding on spore-free products; second, the removal of proteases from the surface of the crystals by using 1 M NaCl could improve the toxicity of the proteinaceous crystal of this strain; and third, the 65-kDa protein alone could not kill *S. exigua* larvae.

Copyright by Mahidol University