

Table 9. Comparison the means [$\bar{X} \pm (SE)$] of percent inhibition to the Prathum-Thanee mycelium growth affected by the *Bacillus* isolated from mummified honey bee at different incubation times

Bacterial Incubation time (hr.)	control	Species of <i>Bacillus</i>											
		B. licheniformis		B. pumilus		B. stearothermophilus		B. subtilis		B. thuringiensis 65			
		C	S	C	S	C	S	C	S	C	S		
6	I ^a 0	II 29.43 (0.37)	III 45.09 ^c (0.62)	IV 54.35 ^b (0.74)	IV 53.29 ^b (0.87)	IV 47.12 ^b (0.62)	III 52.11 ^c (0.74)	III 50.93 ^c (0.67)	I 33.17 ^b (0.42)	III 18.27 ^b (0.14)	I 26.08 ^c (0.36)		
12	I ^a 0	IV 60.15 ^c (0.72)	III 51.16 ^b (0.71)	IV 59.42 ^b (0.79)	IV 58.04 ^b (0.72)	IV 51.15 ^b (0.71)	IV 56.94 ^b (0.79)	IV 75.16 ^c (0.72)	II 60.51 ^b (0.71)	III 20.14 ^b (0.29)	III 35.03 ^c (0.49)		
24	I ^a 0	VI 78.59 ^c (0.85)	IV 55.48 ^b (0.68)	VI 83.15 ^c (0.92)	II 26.17 ^b (0.35)	V 73.01 ^c (0.68)	IV 63.42 ^b (0.82)	IV 84.58 ^c (0.85)	IV 81.13 ^b (0.98)	II 13.11 ^b (0.12)	III 22.67 ^c (0.22)		
48	I ^a 0	III 40.71 ^c (0.54)	II 31.40 ^b (0.42)	II 38.64 ^c (0.48)	II 32.02 ^b (0.44)	II 28.19 ^b (0.32)	II 36.49 ^c (0.48)	II 46.16 ^b (0.34)	II 54.68 ^c (0.52)	III 19.52 ^b (0.18)	III 30.48 ^c (0.28)		
72	I ^a 0	IV 56.56 ^c (0.61)	II 36.02 ^b (0.57)	III 46.25 ^b (0.46)	III 43.13 ^b (0.41)	III 34.91 ^b (0.57)	II 43.58 ^c (0.46)	II 52.25 ^b (0.61)	II 57.09 ^c (0.67)	II 10.81 ^b (0.16)	III 25.41 ^c (0.26)		
120	I ^a 0	IV 52.11 ^c (0.65)	III 46.18 ^b (0.63)	V 78.92 ^b (0.86)	V 80.56 ^b (0.95)	III 38.65 ^b (0.33)	III 45.06 ^c (0.56)	III 68.50 ^b (0.65)	III 62.16 ^b (0.73)	II 13.85 ^b (0.16)	IV 37.53 ^c (0.36)		
168	I ^a 0	V 65.52 ^c (0.74)	IV 50.86 ^b (0.85)	V 73.46 ^c (0.74)	IV 66.09 ^b (0.74)	VI 80.16 ^b (0.85)	V 77.10 ^b (0.74)	II 54.43 ^b (0.74)	II 59.08 ^c (0.55)	II 8.57 ^b (0.04)	II 16.35 ^c (0.14)		

Note: 1. Means in columns followed by different Roman figures, at the upper left handed-side of the cells, were significantly different ($p \leq 0.05$) by the same bacteria but from the different bacterial incubation times (ANOVA ANALYSIS, and LSD was used for means comparisons).

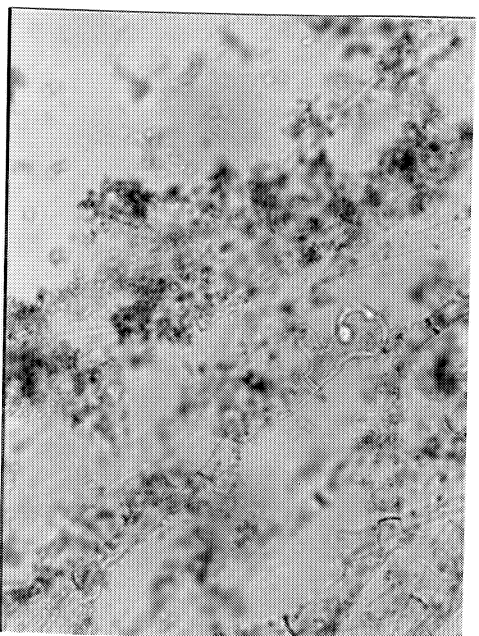
2. Means in rows followed by different letters, at the upper right handed-side of the cells, were significantly different ($p \leq 0.05$) by the same bacterial incubation times but at different fraction of cells.

3. Means were the inhibition (%) average of 5 replications from coinoculation bacteria with mycelium for 48 hr.

สรุปผลจากตารางที่ 7-9

ผลการเปรียบเทียบประสิทธิภาพส่วนของ intact cells และ supermatant จาก *B. licheniformis*, *B. pumilus*, *B. stearothermophilus*, *B. subtilis* และ *Bt. 65* พบว่า

1. โดยทั่วไปส่วน intact cells ของ *B. licheniformis* และ *B. pumilus* สามารถชะลอการเจริญของเส้นใยได้ดีอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P \leq 0.05$) กว่าส่วน supermatant (เปรียบเทียบ intact cells และ supermatant ของเชื้อชนิดเดียวกันตาม อักษรภาษาอังกฤษตามแนวระนาบ) สำหรับ *B. stearothermophilus* ทั้ง 2 ส่วน ให้ผลไม่ต่างกัน แต่ supermatant ของ *B. subtilis* และ *Bt. 65* กลับสามารถชะลอการเจริญของเส้นใยได้ดีกว่าในส่วนของ intact cells ทำให้คาดคะเนว่าสารออกฤทธิ์ของ *B. licheniformis* และ *B. pumilus* อาจจะเป็น membrane bound หรือเกิดจากการที่ cells ไปล้อมรอบเส้นใย (รูป 5.1) และอาจมีกลไกบางชนิดที่ชะลอการเจริญของเส้นใย แต่สารออกฤทธิ์ของ *B. subtilis* และ *Bt. 65* ส่วนใหญ่ถูกขับออกมาใน supermatant จึงเป็นแบบกรณีที่เรย์ที่สนใจจะนำไปใช้งาน เนื่องจากการใช้ส่วนของ supermatant สามารถนำไปใช้ได้ง่ายกว่าการนำเซลล์ไปใช้ เพราะการทำให้เซลล์แตก เป็นการเพิ่มขั้นตอน เพิ่มความยุ่งยากและค่าใช้จ่ายมากขึ้น



รูปที่ 5.1 แสดงแบบคิเรย์เซลล์ล้อมรอบเส้นใยภายหลัง 6 ชม. ของการเลี้ยงร่วมกัน



รูปที่ 5.2 แสดงการเจริญของเส้นใยราในชุดความเข้มข้นบางส่วน (ครีซี) พัฒนาไปเป็น oögonium

2. โดยทั่วไป culture broth ทั้งจาก ส่วนที่เป็น intact cells และ supernatant ของแบคทีเรีย ที่บ่มนาน 24 ชม. มีประสิทธิภาพสูงสุดในการชะลอการเจริญของเส้นใยรา รองมาคือ culture broth ที่ บ่มนาน 168 ชม. (7 วัน), 12 ชม., 6 ชม., 120 ชม. (5 วัน) 72 ชม. (3 วัน) และ 48 ชม. (2 วัน) ตาม ลำดับ (เปรียบเทียบสถิติโดยดูจากอักษรโรมันตามแนวจลันน์) เมื่อเปรียบเทียบกับ growth curve พบว่า ถึงแม้ว่าแบคทีเรียที่เชื้อทดสอบจะมี growth curve ที่ต่างกันแต่ไม่มากนัก แบคทีเรียส่วนมากจะ เริ่มเข้าสู่ระยะ early stationary phase ภายหลัง 12 ชม. จากนั้นจะดำรงอยู่ในภาวะ stationary phase นาน 3-4 วัน เชลล์จะเริ่มแตกและปล่อย endospore ออกในวันที่ 3 และจะแตกมากกว่า 80% ในวันที่ 7 จึงเป็นนัยว่า แบคทีเรียมีผลชะลอการเจริญของเส้นใยราได้ทุกระยะ แต่เชลล์ที่อยู่ในระยะ early stationary phase และระยะที่เชลล์แตกปล่อย endospores รวมทั้งสารภายในเชลล์ออกสู่ culture broth เป็นระยะที่แบคทีเรียมีประสิทธิภาพสูงสุด แต่ไม่สามารถอธิบายถึงกลไกหรืออันตรกิริยาร่วมที่เกิดขึ้นได้ สารออกฤทธิ์ในช่วง early stationary phase อาจแตกต่างจากสารออกฤทธิ์ที่เป็น intracellular หรือ membrane bound ที่ถูกปล่อยสู่ culture broth ในช่วงที่เชลล์แตก (168 ชม.) การทดลองขั้นต่อไปคือ จะนำ culture broth จากช่วงการบ่มที่มีประสิทธิภาพสูงสุดไปแยก fraction บน thin layer chromatography (TLC) และจะพยายามทำการ characterize สารออกฤทธิ์ในเบื้องต้นว่าเป็นกลุ่มโมเลกุลประเภทใดต่อไป

3. โดยทั่วไป แบคทีเรียส่วนใหญ่สามารถชะลอการเจริญของเส้นใยราสายพันธุ์จากจังหวัด ปทุมธานีได้ดีกว่าสายพันธุ์จากจังหวัดเชียงใหม่และสายพันธุ์จากจังหวัดนครราชสีมาลำดับ ผล จากการที่เชื้อราตอบสนองต่อ culture broth ของแบคทีเรียชนิดเดียวกันได้แตกต่างกัน น่าจะแสดง เป็นนัยว่า เชื้อราจาก 3 จังหวัดควรจะเป็นเชื้อราต่างสายพันธุ์กัน แต่ผลการจำแนกด้วย isozyme โดย ใช้ test kit API-ZYM ไม่สามารถจำแนกความแตกต่างของราทั้ง 3 สายพันธุ์ ทั้งนี้อาจเกิดจาก

sensitivity ของการทดสอบด้วย isozyme อาจไม่เพียงพอ การจำแนกโดยเทคนิคทางอณูโมเลกุล หรือตรวจสอบพื้นฐานด้วย scanning electron microscope เป็นวิธีที่ดีกว่าจะดำเนินการในขั้นต่อไป

4. ผลการศึกษาพบว่า *B. subtilis* และ *B. pumilus* น่าจะมีประสิทธิภาพในการชะลอการเจริญของเส้นใยราสูงกว่าแบบที่เรียที่เหลืออีก 3 ชนิด แต่ส่วน supernatant ของ *B. subtilis* มีประสิทธิภาพสูงกว่า *B. pumilus* *B. subtilis* จึงอาจเป็นแบบที่เรี่ยที่นำเสนอมากที่สุดในการนำไปตรวจสอบความเป็นพิษต่อผึ้ง สิ่งมีชีวิตนอกเป้าหมาย ฯลฯ เพื่อการพัฒนาไปใช้ควบคุมโรคของผึ้งต่อไป

6. การทดลองประสิทธิภาพของ extracellular และ intracellular substances ของแบคทีเรียในช่วง log phase ของ *Bacillus* 5 ชนิด ในการชะลอการเจริญของเส้นใย

ตาราง 3 แห่ง

- การทำให้เซลล์ในระยะ log phase (ระยะก่อนสร้างสปอร์) ของ *Bacillus* แตกเป็นร่องก่อนข้างยาก เนื่องจากผนังเซลล์ในระยะดังกล่าวค่อนข้างหนามาก จำเป็นต้องใช้วิธี French Press จึงจะได้ intracellular substances จากนั้นนำสารดังกล่าว 1 มล. ไป coinoculation ร่วมกับเชื้อราเช่นเดียวกับวิธีการที่ใช้ดำเนินการในหัวข้อที่ 5

- การทำ break cell ด้วยเครื่อง French Press เพื่อต้องการตรวจหาตำแหน่งของสารออกฤทธิ์ว่าอยู่ภายในเซลล์หรือนอกเซลล์ แต่ไม่สามารถระบุว่าเป็น membrane bound substances ได้หรือไม่

- เลือก break เฉพาะในช่วง log phase เนื่องจาก *Bacillus* หลังจากสร้างสปอร์ (stationary phase) มีผนังบางและเซลล์แตกปล่อยสารภายในออกสู่ culture broth พร้อม endospores (หลังจากวันที่ 3 ของการเลี้ยงและแตกเกือบ 100% ในวันที่ 7)

Table 10. Comparison the means [$\bar{X} \pm (SE)$] of efficacy in inhibiting the Chiang-Mai mycelium growth by the intracellular (I) and extracellular (E) substances of the potential bacteria

bacterial incubation time (hr.)	control	species of <i>Bacillus</i>									
		<i>B. licheniformis</i>		<i>B. pumilus</i>		<i>B. stearothermophilus</i>		<i>B. subtilis</i>		<i>B. thuringiensis</i> 65	
		E	I	E	I	E	I	E	I	E	I
6	^I 0 ^A	^{II} 53.99 ^B (0.67)	^{II} 65.41 ^C (0.62)	^{II} 52.09 ^B (0.54)	^{II} 58.23 ^C (0.77)	^{II} 55.08 ^B (0.62)	^{II} 68.08 ^C (0.74)	^{II} 48.03 ^B (0.57)	^{II} 51.18 ^B (0.62)	^{II} 15.35 ^B (0.14)	^{II} 25.43 ^C (0.36)
12	^I 0 ^A	^{II} 58.43 ^B (0.72)	^{III} 67.53 ^C (0.71)	^{II} 57.38 ^B (0.69)	^{III} 70.18 ^C (0.72)	^{II} 52.07 ^B (0.71)	^{III} 75.19 ^C (0.79)	^{III} 75.01 ^C (0.72)	^{III} 73.96 ^B (0.71)	^{II} 18.96 ^B (0.29)	^{III} 35.64 ^C (0.49)

Note:

1. Means in columns followed by different Roman figures, at the upper left handed-side of the cells, were significantly different ($p \leq 0.05$) by the same species of bacteria but from the different bacterial incubation times (ANOVA ANALYSIS, and LSD was used for means comparisons).
2. Means in rows followed by different letters, at the upper right handed-side of the cells, were significantly different ($p \leq 0.05$) by the same bacterial incubation times but from different fractions of bacterial cells.
3. Means were the inhibition (%) average of 5 replications from coinoculation bacteria with mycelium for 48 hr.

Table 11. Comparison the means [$\bar{X} \pm (SE)$] of efficacy in inhibiting the Nakorn-Ratchaseema mycelium growth by the intracellular (I) and extracellular (E) substances of the potential bacteria

bacterial incubation time (hr.)	control	species of <i>Bacillus</i>									
		<i>B. licheniformis</i>		<i>B. pumilus</i>		<i>B. stearothermophilus</i>		<i>B. subtilis</i>		<i>B. thuringiensis</i> 65	
		E	I	E	I	E	I	E	I	E	I
6	^I 0 ^A	^{II} 48.24 ^B (0.67)	^{III} 55.05 ^C (0.62)	^{II} 47.19 ^B (0.54)	^{II} 52.53 ^B (0.77)	^{II} 40.27 ^B (0.62)	^{II} 53.85 ^C (0.74)	^{II} 43.51 ^B (0.57)	^{II} 50.08 ^C (0.62)	^{II} 14.51 ^B (0.14)	^{II} 25.48 ^B (0.36)
12	^I 0 ^A	^{II} 50.11 ^B (0.72)	^{III} 63.74 ^C (0.71)	^{II} 50.26 ^B (0.69)	^{II} 58.19 ^C (0.72)	^{II} 44.03 ^B (0.71)	^{III} 59.48 ^C (0.79)	^{III} 68.52 ^C (0.72)	^{III} 64.93 ^B (0.71)	^{II} 15.27 ^B (0.29)	^{II} 30.66 ^C (0.49)

Note:

1. Means in columns followed by different Roman figures, at the upper left handed-side of the cells, were significantly different ($p \leq 0.05$) by the same species of bacteria but from the different bacterial incubation times (ANOVA ANALYSIS, and LSD was used for means comparisons).
2. Means in rows followed by different letters, at the upper right handed-side of the cells, were significantly different ($p \leq 0.05$) by the same bacterial incubation times but from different fractions of bacterial cells.
3. Means were the inhibition (%) average of 5 replications from coinoculation bacteria with mycelium for 48 hr.

Table 12. Comparison the means [$\bar{X} \pm (SE)$] of efficacy in inhibiting the Prathum-Thanee mycelium growth by the intracellular (I) and extracellular (E) substances of the potential bacteria

bacterial incubation time (hr.)	control	species of <i>Bacillus</i>									
		<i>B. licheniformis</i>		<i>B. pumilus</i>		<i>B. stearothermophilus</i>		<i>B. subtilis</i>		<i>B. thuringiensis</i> 65	
		E	I	E	I	E	I	E	I	E	I
6	^I 0 ^A	"29.43 ^B (0.37)	"69.16 ^C (0.62)	"54.35 ^B (0.54)	"65.48 ^C (0.77)	"47.12 ^B (0.52)	"70.16 ^C (0.74)	"50.93 ^B (0.67)	"58.19 ^C (0.62)	"18.27 ^B (0.14)	"29.54 ^C (0.36)
12	^I 0 ^A	"60.15 ^B (0.72)	"73.58 ^C (0.71)	"59.42 ^B (0.69)	"71.56 ^C (0.72)	"51.15 ^B (0.71)	"81.56 ^C (0.89)	"75.16 ^B (0.72)	"79.56 ^B (0.71)	"20.14 ^B (0.29)	"36.88 ^C (0.45)

Note:

1. Means in columns followed by different Roman figures, at the upper left handed-side of the cells, were significantly different ($p \leq 0.05$) by the same species of bacteria but from the different bacterial incubation times (ANOVA ANALYSIS, and LSD was used for means comparisons).
2. Means in rows followed by different letters, at the upper right handed-side of the cells, were significantly different ($p \leq 0.05$) by the same bacterial incubation times but from different fractions of bacterial cells.
3. Means were the inhibition (%) average of 5 replications from coinoculation bacteria with mycelium for 48 hr.

สรุปผลจากตารางที่ 10-12

1. ผลการเปรียบเทียบประสิทธิภาพของ extracellular และ intracellular substances (จากการทำให้เซลล์ที่บ่มนาน 6 และ ก่อน 12 ชม. ซึ่งเป็นระยะ log phase ซึ่งเป็นระยะก่อนสร้าง endospores แตกโดยวิธี French Press) พบว่า intracellular substances จากแบคทีเรีย 4 ชนิด (ยกเว้น *B. subtilis*) มีประสิทธิภาพในการชะลอการเจริญของเส้นใยว่าได้ดีอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P \leq 0.05$) แตกต่างจาก extracellular substances แสดงเป็นนัยว่า สารออกฤทธิ์ส่วนใหญ่จะอยู่ภายในเซลล์หรือเป็น membrane bound เมื่อทำให้เซลล์แตก สารเหล่านี้จะถูกปล่อยออกสู่ culture broth ดังนั้นในการนำเซลล์ไปใช้งาน อาจรอให้ถึงระยะที่เซลล์แตก ปล่อย endospores และสารภายในเซลล์สู่ culture broth เนื่องจากการจะนำเซลล์ในระยะ 6-12 ชม. ไปทำให้แตกเป็นชิ้นตอนที่ยังยากและเพิ่มค่าใช้จ่ายจะไม่เหมาะสมในการนำระยะดังกล่าวไปใช้งานในภาคสนาม

2. โดยทั่วไป culture broth จากการบ่มแบบคทีเรียนาน 12 ชม. (ทั้งจากส่วนที่เป็น extracellular และ intracellular substances) จะมีประสิทธิภาพในการชะลอการเจริญของเส้นใยว่าดีกว่าการบ่มที่ 6 ชม. ทั้งนี้อาจแสดงว่า สารออกฤทธิ์ส่วนมากถูกสร้างขึ้นระยะ early stationary phase มากกว่าในระยะ log phase

3. สารออกฤทธิ์ที่เป็น intracellular substances สามารถชะลอการเจริญของเส้นใยสาสายพันธุ์จากจังหวัดปทุมธานีได้ดีกว่าสายพันธุ์จากจังหวัดเชียงใหม่ และสายพันธุ์จากจังหวัดนครราชสีมา ตามลำดับ ซึ่งผลการทดลองนี้สอดคล้องกับสารออกฤทธิ์จาก extracellular substances และสอดคล้องกับการทดลองหัวข้อที่ 5 ในตารางที่ 7-9

7. การเปรียบเทียบประสิทธิภาพของแบคทีเรียพวก *B. licheniformis* และ *B. stearothermophilus* ที่แยกจากพันธุ์ติดโรครักกับ type strain ของแบคทีเรียชนิดเดียวกันและเปรียบเทียบประสิทธิภาพของความสามารถของแบคทีเรียความเข้มข้นระหว่าง 10^4 และ 10^8 cells/ml.

- ดำเนินการ coinoculation เชื้อราและแบคทีเรียเช่นเดียวกับการทดลองในหัวข้อที่ 5 สำหรับ type strain ของ *B. licheniformis* (JCM 2505) ได้จาก Japan Collection of Microorganisms และ *B. stearothermophilus* (9A2) ได้จาก Bacillus Genetic Stock Center. Ohio University. USA. โดยจัดเตรียมแบคทีเรียให้มีความเข้มข้น 10^4 cells/ml.

- นำผลการทดลองไปเปรียบเทียบทางสถิติกับเชื้อทั้งสองชนิดดังกล่าวที่แยกได้จากฝั่ง (จากการทดลองในตารางที่ 7-9) แต่ใช้แบคทีเรียที่มีความเข้มข้น 10^8 cells/ml.

Table 13. Comparison the means means [$\bar{X} \pm (SE)$] of mycelium growth inhibition causing by *Bacillus licheniformis* isolated from diseased honey bees and the type strains at concentration of 10^4 and 10^8 cells/ml by coinoculation with 3 isolates of chalkbrood disease mycelium.

bacteria	control (with out effect from bacteria)	bacterial concentration 10^4 cells/ml						bacterial concentration 10^8 cells/ml					
		isolated from honey bee			type strain			isolated from honey bee			type strain		
		CM	NR	PT	CM	NR	PT	CM	NR	PT	CM	NR	PT
6	I ⁰ A	IV ^{53.79} D (0.67)	III ^{46.53} D (0.52)	III ^{52.24} D (0.64)	II ^{29.43} C (0.32)	II ^{24.75} C (0.33)	II ^{31.51} C (0.32)	II ^{23.53} C (0.29)	II ^{18.75} B (0.22)	II ^{24.12} C (0.33)	II ^{15.74} B (0.19)	II ^{13.71} B (0.15)	II ^{18.59} B (0.38)
12	I ⁰ A	IV ^{56.43} E (0.72)	IV ^{50.11} E (0.69)	IV ^{62.15} E (0.78)	II ^{32.15} C (0.44)	III ^{32.26} C (0.45)	III ^{40.93} D (0.46)	III ^{31.58} C (0.38)	II ^{25.46} C (0.35)	IV ^{34.73} D (0.45)	III ^{25.63} C (0.34)	II ^{14.58} B (0.21)	II ^{20.12} B (0.43)
24	I ⁰ A	V ^{71.06} E (0.98)	V ^{65.52} E (0.84)	V ^{78.59} F (0.98)	III ^{47.31} C (0.67)	IV ^{43.92} C (0.56)	IV ^{54.79} D (0.59)	IV ^{53.07} D (0.64)	IV ^{40.51} C (0.56)	IV ^{56.65} D (0.62)	IV ^{39.58} C (0.38)	III ^{29.15} B (0.38)	III ^{34.17} B (0.56)
48	I ⁰ A	II ^{35.56} D (0.46)	II ^{30.62} C (0.41)	II ^{40.17} D (0.52)	II ^{25.06} C (0.32)	II ^{21.54} B (0.39)	II ^{30.17} C (0.38)	II ^{24.51} C (0.31)	II ^{21.38} B (0.30)	II ^{27.43} C (0.41)	II ^{15.59} B (0.21)	II ^{13.61} B (0.20)	II ^{19.19} B (0.23)
72	I ⁰ A	III ^{43.04} E (0.53)	II ^{36.45} D (0.55)	II ^{46.56} E (0.60)	II ^{28.49} C (0.35)	II ^{24.08} C (0.45)	II ^{30.42} D (0.42)	II ^{24.55} C (0.33)	II ^{20.46} B (0.28)	II ^{25.06} C (0.31)	II ^{18.52} B (0.29)	II ^{14.75} B (0.29)	II ^{19.43} B (0.26)
120	I ⁰ A	III ^{46.58} D (0.54)	III ^{40.12} D (0.63)	III ^{52.11} E (0.67)	II ^{30.53} C (0.41)	II ^{28.61} C (0.53)	II ^{34.19} D (0.47)	II ^{24.58} C (0.37)	II ^{20.12} B (0.25)	II ^{26.73} C (0.35)	II ^{18.51} B (0.26)	II ^{15.05} B (0.35)	II ^{20.74} B (0.33)
168	I ⁰ A	V ^{67.73} E (0.85)	IV ^{50.02} D (0.66)	IV ^{65.52} E (0.85)	III ^{45.14} D (0.59)	III ^{34.65} C (0.61)	III ^{47.92} D (0.58)	III ^{30.54} C (0.41)	III ^{28.76} C (0.38)	III ^{34.42} D (0.44)	III ^{25.18} C (0.33)	II ^{16.23} B (0.38)	III ^{29.12} C (0.41)

- Note:
1. Means in columns followed by different Roman figures, at the upper left handed-side of the cells, were significantly different ($p \leq 0.05$) by the same isolate of fungus but from the different bacterial incubation times (ANOVA ANALYSIS, and LSD was used for means comparisons).
 2. Means in rows followed by different letter, at the upper right handed-side of the cells, were significantly different ($p \leq 0.05$) by the same bacterial incubation time but from different isolates of fungi.
 3. Means were the inhibition (%) average of 5 replications from coinoculation bacteria with mycelium for 48 hr.

Table 14. Comparison the means [$\bar{X} \pm (SE)$] of mycelium growth inhibition causing by *Bacillus stearothersophilus* isolated from diseased honey bees and the type strains at concentration of 10^4 and 10^8 cells/ml by coinoculation with 3 strains of chalkbrood disease.

bacteria incubation time (hr.)	control (with out effect from bacteria)	bacterial concentration 10^4 cells/ml						bacterial concentration 10^8 cells/ml					
		isolated from honey bee			type strain			isolated from honey bee			type strain		
		CM	NR	PT	CM	NR	PT	CM	NR	PT	CM	NR	PT
6	I ⁰ A	III ^{55.08} E (0.68)	II ^{42.27} D (0.53)	III ^{47.12} D (0.57)	IV ^{41.51} D (0.54)	III ^{32.19} C (0.42)	II ^{36.42} C (0.46)	IV ^{59.36} D (0.67)	II ^{32.57} C (0.36)	II ^{34.73} C (0.39)	II ^{30.55} B (0.35)	II ^{22.83} B (0.29)	II ^{24.74} B (0.28)
12	I ⁰ A	III ^{62.07} E (0.77)	II ^{44.03} C (0.56)	III ^{51.15} D (0.61)	IV ^{44.16} C (0.55)	IV ^{35.07} B (0.47)	III ^{40.16} C (0.53)	III ^{45.75} C (0.57)	II ^{32.29} B (0.38)	II ^{39.55} C (0.42)	II ^{30.72} B (0.36)	II ^{26.15} B (0.38)	III ^{29.51} B (0.31)
24	I ⁰ A	IV ^{80.18} E (0.98)	III ^{62.36} D (0.71)	IV ^{74.01} E (0.78)	IV ^{51.82} C (0.59)	IV ^{43.16} B (0.56)	III ^{46.19} B (0.58)	III ^{50.56} C (0.63)	III ^{45.73} B (0.52)	III ^{50.61} C (0.64)	III ^{45.57} B (0.56)	III ^{40.16} B (0.48)	IV ^{40.65} B (0.44)
48	I ⁰ A	II ^{30.12} D (0.44)	II ^{25.31} C (0.32)	II ^{28.19} D (0.34)	II ^{21.52} C (0.30)	II ^{15.74} B (0.21)	I ^{20.27} C (0.37)	II ^{17.18} C (0.21)	I ^{13.56} B (0.22)	I ^{15.75} C (0.26)	I ^{13.61} B (0.23)	I ^{10.74} B (0.17)	I ^{11.97} B (0.21)
72	I ⁰ A	II ^{39.13} C (0.48)	II ^{29.57} B (0.35)	II ^{34.11} C (0.46)	II ^{26.95} C (0.35)	II ^{18.73} B (0.26)	I ^{20.55} B (0.38)	II ^{32.53} C (0.35)	II ^{25.61} B (0.28)	II ^{30.47} C (0.36)	I ^{19.55} B (0.26)	I ^{15.64} B (0.28)	I ^{15.53} B (0.28)
120	I ⁰ A	II ^{40.83} D (0.51)	II ^{32.27} C (0.39)	II ^{38.65} D (0.49)	III ^{33.58} C (0.45)	III ^{25.61} B (0.33)	II ^{30.65} C (0.42)	II ^{36.51} C (0.38)	II ^{30.22} C (0.42)	II ^{32.74} C (0.39)	II ^{26.79} B (0.32)	II ^{20.54} B (0.37)	II ^{22.61} B (0.27)
168	I ⁰ A	IV ^{81.56} E (0.99)	IV ^{76.38} E (0.88)	IV ^{80.16} E (0.96)	III ^{30.92} C (0.41)	III ^{24.24} B (0.29)	II ^{29.84} C (0.41)	IV ^{64.09} D (0.74)	IV ^{60.77} D (0.73)	IV ^{69.51} D (0.76)	II ^{25.71} B (0.30)	II ^{19.53} B (0.34)	II ^{20.56} B (0.23)

- Note: 1. Means in columns followed by different Roman figures, at the upper left handed-side of the cells, were significantly different ($p \leq 0.05$) by the same isolate of fungus but from the different bacterial incubation times (ANOVA ANALYSIS, and LSD was used for means comparisons).
2. Means in rows followed by different letter, at the upper right handed-side of the cells, were significantly different ($p \leq 0.05$) by the same bacterial incubation time but from different isolates of fungi.
3. Means were the inhibition (%) average of 5 replications from coinoculation bacteria with mycelium for 48 hr.

สรุปผลการทดลองจากตารางที่ 13 และ 14

ผลจากการเปรียบเทียบประสิทธิภาพของ *B. licheniformis* และ *B. stearothermophilus* ที่แยกจากสิ่งมีชีวิตดีโรกับ type strain ของแบคทีเรียชนิดเดียวกัน และเปรียบเทียบประสิทธิภาพของแบคทีเรียความเข้มข้นระหว่าง 10^4 และ 10^8 cells/ml ในการชะลอการเจริญของเส้นใยจาก 3 แห่ง พบว่า

1. โดยทั่วไป *Bacillus* ที่แยกจากสิ่งมีชีวิตดีโรสามารถชะลอการเจริญของเส้นใยได้ดีกว่าอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P \leq 0.05$) จาก type strains ทั้งนี้อาจเกิดจากการที่แบคทีเรียมีวิวัฒนาการร่วมกับเชื้อรา จึงมีประสิทธิภาพในการควบคุมการระบาดของเชื้อราเพื่อไม่ให้เกิดการสูญเสียสมตุลทางธรรมชาติ
2. โดยทั่วไป *Bacillus* ที่ความเข้มข้น 10^4 cells/ml มีประสิทธิภาพมากกว่าที่ความเข้มข้น 10^8 cells/ml ทั้งนี้อาจแสดงว่า ความเข้มข้นของเซลล์ที่มากเกินไป มีผลทำให้เซลล์สร้าง antifungal metabolites ได้น้อยลง เนื่องจากเกิดภาวะแย่งอาหารหรือเกิดภาวะบางประการที่ไม่เหมาะสมขึ้น
3. Culture broth ของแบคทีเรียจาก type strains ที่บ่มนาน 24 ชม. มักมีประสิทธิภาพสูงสุดในการชะลอการเจริญของเส้นใยรา รองลงมาคือ culture broth ที่บ่มนาน 168, 12, 6, 120, 72 และ 48 ชม. ตามลำดับ ซึ่งสอดคล้องกับประสิทธิภาพที่ได้จากแบคทีเรียที่แยกจากซากผงตายด้วยโรคซอล์คิบรูต เป็นการยืนยันว่าระยะเวลาการบ่มหรือระยะ (อายุ) ของเซลล์แบคทีเรียมีผลต่อการสร้าง antifungal metabolites การจำแนกเพื่อใช้ตรวจสอบปริมาณของสารดังกล่าวจึงเป็นสิ่งจำเป็นขั้นพื้นฐาน (แต่การทดลองในครั้งนี้ยังไม่สามารถหาวิธีการที่เหมาะสมในการตรวจสอบหรือศึกษาคุณสมบัติบางประการของสารดังกล่าวได้)

8. วิธีการทดลองการชักนำให้เชื้อ *B. thuringiensis* ทิ้ง 3 สายพันธุ์สร้าง chitinase เพื่อช่วยชะลอการเจริญของเส้นราด้วยสารโคติน

ก. วิธีเตรียม colloidal chitin

1. ชั่ง chitin 20 ก. ผสมกับการดไฮโดรคลอริกเข้มข้น 300 มล. กวนในขวดรูปชมพู่ 1,000 มล. ที่ 4 °ซ ด้วย magnetic stirrer ใน hood จน chitin ละลายเป็นเนื้อเดียวกัน
2. เตรียม 95% ethanol ที่เย็น -20 °ซ ปริมาตร 200 มล. แช่ข้ามคืน
3. นำสารในข้อ 1. ค่อย ๆ ผสมกับสารในข้อ 2 กวนให้เข้ากัน เก็บที่ -20 °ซ แช่ข้ามคืน
4. นำสารในข้อ 3 มาปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็วรอบที่ 5,000 rpm เป็นเวลา 10-20 นาที เทส่วนที่เป็น supernatantทิ้ง
5. ล้างตะกอนด้วยน้ำกลั่นด้วยการปั่นเหวี่ยงที่ 5,000 rpm หลาย ๆ ครั้ง จนได้ pH เป็นกลาง
6. เมื่อได้ colloidal chitin (pH 7) อาจเก็บในรูปของ wet slurry หรือนำไปทำ lyophilization เพื่อเก็บที่ 4 °ซ

2. การเตรียมสารทดสอบ

เตรียมสารทดสอบ 7 ชุด คือ

- 2.1 ชุดควบคุม (negative control group) เป็นชุดที่บ่มเฉพาะเชื้อราใน SDB และ NB สัดส่วน 1:1 มล. ต่อ 1 หลุมของ 24 well tissue culture plate
- 2.2 ชุดควบคุม (positive control group) เป็นชุดที่เลี้ยงแบคทีเรียใน NB ที่ไม่ได้อินดิวซ์ด้วย chitin โดยแบ่งเป็น 2 ชุด คือ
 - ก. ใช้ intact cells coinoculate กับเชื้อราด้วยวิธีการเช่นเดียวกับข้อ 2.1
 - ข. ใช้ supernatant coinoculate กับเชื้อราด้วยวิธีการเช่นเดียวกับข้อ 2.1
- 2.3 ชุดทดสอบ (treatment group) เป็นชุดที่เลี้ยงแบคทีเรียใน NB ที่ induce การสร้าง chitinase ด้วย chitin แบ่งเป็น 4 ชุด คือ
 - ก. ชุดที่ induce ด้วย chitin 0.1% แบ่งเป็น 2 ชุด คือ ใช้ส่วนที่เป็น intact cells และ supernatant กับเชื้อราด้วยวิธีการเช่นเดียวกับข้อ 2.1
 - ข. ชุดที่ induce ด้วย chitin 1% แบ่งเป็น 2 ชุด คือ ใช้ส่วนที่เป็น intact cells และ supernatant coinoculate กับเชื้อราด้วยวิธีการเช่นเดียวกับข้อ 2.1

Table 15. Comparison the means [$\bar{X} \pm (SE)$] of percent inhibition of the growth of mycelium causing by *Bacillus thuringiensis* 65

bacterial incubation time (day)	product from Incubated culture	% inhibition					
		Chiang-Mai			Prathum-Thanee		
		colloidal chitin (%)			colloidal chitin (%)		
		0	0.1	1.0	0	0.1	1.0
1	control	^I 0 ^A	^I 0 ^A	^I 0 ^A	^I 0 ^A	^I 0 ^A	^I 0 ^A
	intact cells	^{II} 12.67 ^B $\pm$ 0.13	^I 20.91 ^C $\pm$ 0.23	^{II} 16.66 ^C $\pm$ 0.13	^{II} 13.11 ^B $\pm$ 0.11	^{II} 18.33 ^C $\pm$ 0.25	^{II} 19.93 ^C $\pm$ 0.17
	control	^I 0 ^A	^I 0 ^A	^I 0 ^A	^I 0 ^A	^I 0 ^A	^I 0 ^A
	supernatant	^{III} 24.08 ^B $\pm$ 0.35	^{II} 33.02 ^C $\pm$ 0.55	^{III} 35.33 ^C $\pm$ 0.47	^{III} 22.67 ^B $\pm$ 0.31	^{III} 36.89 ^C $\pm$ 0.42	^{III} 36.26 ^C $\pm$ 0.54
3	control	^I 0 ^A	^I 0 ^A	^I 0 ^A	^I 0 ^A	^I 0 ^A	^I 0 ^A
	intact cells	^{II} 8.65 ^B $\pm$ 0.09	^{II} 12.94 ^B $\pm$ 0.11	^{II} 15.29 ^C $\pm$ 0.24	^{II} 10.81 ^B $\pm$ 0.07	^{II} 13.51 ^B $\pm$ 0.08	^{II} 17.35 ^C $\pm$ 0.16
	control	^I 0 ^A	^I 0 ^A	^I 0 ^A	^I 0 ^A	^I 0 ^A	^I 0 ^A
	supernatant	^{III} 32.59 ^C $\pm$ 0.41	^{III} 36.53 ^C $\pm$ 0.35	^{III} 38.30 ^B $\pm$ 0.41	^{III} 25.14 ^B $\pm$ 0.22	^{III} 38.32 ^C $\pm$ 0.44	^{III} 40.12 ^C $\pm$ 0.39
5	control	^I 0 ^A	^I 0 ^A	^I 0 ^A	^I 0 ^A	^I 0 ^A	^I 0 ^A
	intact cells	^{II} 14.73 ^B $\pm$ 0.13	^{II} 20.43 ^C $\pm$ 0.26	^{II} 22.55 ^C $\pm$ 0.31	^{II} 13.85 ^B $\pm$ 0.06	^{II} 19.80 ^C $\pm$ 0.18	^{II} 19.54 ^C $\pm$ 0.23
	control	^I 0 ^A	^I 0 ^A	^I 0 ^A	^I 0 ^A	^I 0 ^A	^I 0 ^A
	supernatant	^{III} 44.19 ^B $\pm$ 0.37	^{III} 46.78 ^B $\pm$ 0.58	^{III} 48.73 ^B $\pm$ 0.56	^{III} 37.53 ^B $\pm$ 0.43	^{III} 55.73 ^C $\pm$ 0.65	^{III} 54.03 ^C $\pm$ 0.64
7	control	^I 0 ^A	^I 0 ^A	^I 0 ^A	^I 0 ^A	^I 0 ^A	^I 0 ^A
	intact cells	^{II} 10.02 ^B $\pm$ 0.08	^{II} 11.57 ^B $\pm$ 0.09	^{II} 14.32 ^B $\pm$ 0.17	^{II} 8.57 ^B $\pm$ 0.05	^{II} 15.73 ^C $\pm$ 0.13	^{II} 16.33 ^C $\pm$ 0.21
	control	^I 0 ^A	^I 0 ^A	^I 0 ^A	^I 0 ^A	^I 0 ^A	^I 0 ^A
	supernatant	^{III} 18.40 ^B $\pm$ 0.19	^{III} 24.32 ^B $\pm$ 0.32	^{III} 29.82 ^C $\pm$ 0.34	^{III} 11.35 ^B $\pm$ 0.19	^{III} 27.30 ^C $\pm$ 0.37	^{III} 22.61 ^C $\pm$ 0.33

- Note:
1. Means in column followed by different Roman figures, at the upper leaf handed-side of the cells, were significantly different ($P \leq 0.05$) by the different fractions of cells from the same of colloidal chitin and the same incubation time.
 2. Means in row followed by different letters, at the upper right handed-side of the cells, were significantly different ($P \leq 0.05$) by the different colloidal chitin at the same isolate of fungus and the same fraction of cells.
 3. Each mean value based on the average of 5 replications.

Table 16. Comparison the means of percent inhibition of the growth of mycelium causing by *Bacillus thuringiensis ostrinae*

bacterial incubation time (day)	product from incubated culture	% inhibition					
		Chiang-Mai			Prathum-Thanee		
		colloidal chitin (%)			colloidal chitin (%)		
		0	0.1	1.0	0	0.1	1.0
1	control	^I 0 ^A	^I 0 ^A	^I 0 ^A	^I 0 ^A	^I 0 ^A	^I 0 ^A
	intact cells	^{II} 8.15 ^B ± 0.13	^{II} 12.54 ^C ± 0.23	^{II} 11.27 ^C ± 0.13	^{II} 9.17 ^B ± 0.18	^{II} 14.52 ^C ± 0.25	^{II} 13.19 ^C ± 0.27
	control	^I 0 ^A	^I 0 ^A	^I 0 ^A	^I 0 ^A	^I 0 ^A	^I 0 ^A
	supernatant	^{III} 15.17 ^B ± 0.35	^{III} 25.11 ^C ± 0.55	^{III} 24.16 ^C ± 0.47	^{III} 17.21 ^B ± 0.31	^{III} 28.75 ^C ± 0.42	^{III} 25.82 ^C ± 0.54
3	control	^I 0 ^A	^I 0 ^A	^I 0 ^A	^I 0 ^A	^I 0 ^A	^I 0 ^A
	intact cells	^{II} 6.18 ^B ± 0.09	^{II} 8.15 ^B ± 0.11	^{II} 9.14 ^B ± 0.14	^{II} 7.51 ^B ± 0.07	^{II} 13.55 ^C ± 0.38	^{II} 14.48 ^C ± 0.26
	control	^I 0 ^A	^I 0 ^A	^I 0 ^A	^I 0 ^A	^I 0 ^A	^I 0 ^A
	supernatant	^{III} 23.11 ^B ± 0.41	^{III} 24.22 ^B ± 0.35	^{III} 25.59 ^B ± 0.41	^{III} 24.76 ^B ± 0.22	^{III} 28.61 ^B ± 0.44	^{III} 26.03 ^B ± 0.39
5	control	^I 0 ^A	^I 0 ^A	^I 0 ^A	^I 0 ^A	^I 0 ^A	^I 0 ^A
	intact cells	^{II} 7.61 ^B ± 0.13	^{II} 9.15 ^B ± 0.16	^{II} 11.02 ^B ± 0.21	^{II} 9.71 ^B ± 0.06	^{II} 11.54 ^B ± 0.18	^{II} 10.83 ^B ± 0.23
	control	^I 0 ^A	^I 0 ^A	^I 0 ^A	^I 0 ^A	^I 0 ^A	^I 0 ^A
	supernatant	^{III} 24.13 ^B ± 0.37	^{III} 30.59 ^C ± 0.58	^{III} 29.74 ^C ± 0.56	^{III} 26.76 ^B ± 0.43	^{III} 35.78 ^C ± 0.65	^{III} 31.43 ^C ± 0.64
7	control	^I 0 ^A	^I 0 ^A	^I 0 ^A	^I 0 ^A	^I 0 ^A	^I 0 ^A
	intact cells	^{II} 5.12 ^B ± 0.08	^{II} 7.26 ^B ± 0.09	^{II} 5.43 ^B ± 0.17	^{II} 6.74 ^B ± 0.05	^{II} 8.51 ^B ± 0.13	^{II} 9.54 ^B ± 0.210
	control	^I 0 ^A	^I 0 ^A	^I 0 ^A	^I 0 ^A	^I 0 ^A	^I 0 ^A
	supernatant	^{III} 10.03 ^B ± 0.19	^{III} 14.77 ^C ± 0.32	^{III} 13.57 ^C ± 0.34	^{III} 12.63 ^B ± 0.19	^{III} 17.35 ^C ± 0.37	^{III} 16.53 ^C ± 0.33

- Note:
1. Means in column followed by different Roman figures, at the upper leaf handed-side of the cells, were significantly different ($P \leq 0.05$) by the different fractions of cells from the same of colloidal chitin and the same incubation time.
 2. Means in row followed by different letters, at the upper right handed-side of the cells, were significantly different ($P \leq 0.05$) by the different colloidal chitin at the same isolate of fungus and the same fraction of cells
 3. Each mean value based on the average of 5 replications.

Table 17. Comparison the means of percent inhibition of the growth of mycelium causing by *Bacillus thuringiensis pakistani*

bacterial incubation time (day)	product from incubated culture	% inhibition					
		Chiang-Mai			Prathum-Thanee		
		colloidal chitin (%)			colloidal chitin (%)		
		0	0.1	1.0	0	0.1	1.0
1	control	^I 0 ^A	^I 0 ^A	^I 0 ^A	^I 0 ^A	^I 0 ^A	^I 0 ^A
	intact cells	^I 10.33 ^B ± 0.13	^{II} 15.43 ^B ± 0.23	^{II} 12.41 ^B ± 0.13	^{II} 12.11 ^B ± 0.11	^{II} 16.54 ^C ± 0.25	^{II} 13.42 ^B ± 0.17
	control supernatant	^I 20.16 ^B ± 0.35	^{III} 30.16 ^C ± 0.55	^{III} 32.15 ^C ± 0.47	^{III} 23.29 ^B ± 0.31	^{III} 30.33 ^C ± 0.42	^{III} 35.48 ^C ± 0.54
3	control	^I 0 ^A	^I 0 ^A	^I 0 ^A	^I 0 ^A	^I 0 ^A	^I 0 ^A
	intact cells	^{II} 8.43 ^B ± 0.09	^{II} 10.56 ^B ± 0.11	^{II} 11.16 ^B ± 0.24	^{II} 8.67 ^B ± 0.07	^{II} 12.81 ^B ± 0.18	^{II} 14.20 ^C ± 0.16
	control supernatant	^{III} 26.43 ^B ± 0.41	^{III} 30.51 ^B ± 0.35	^{III} 31.44 ^B ± 0.41	^{III} 21.52 ^B ± 0.22	^{III} 33.43 ^C ± 0.44	^{III} 34.65 ^C ± 0.39
5	control	^I 0 ^A	^I 0 ^A	^I 0 ^A	^I 0 ^A	^I 0 ^A	^I 0 ^A
	intact cells	^{II} 10.56 ^B ± 0.13	^{II} 12.43 ^B ± 0.26	^{II} 14.11 ^B ± 0.21	^{II} 10.16 ^B ± 0.16	^{II} 16.23 ^C ± 0.18	^{II} 14.90 ^C ± 0.23
	control supernatant	^{III} 30.61 ^B ± 0.37	^{III} 33.48 ^B ± 0.58	^{III} 35.40 ^B ± 0.56	^{III} 34.11 ^B ± 0.43	^{III} 36.52 ^B ± 0.65	^{III} 38.19 ^C ± 0.64
7	control	^I 0 ^A	^I 0 ^A	^I 0 ^A	^I 0 ^A	^I 0 ^A	^I 0 ^A
	intact cells	^{II} 7.12 ^B ± 0.08	^{II} 9.15 ^B ± 0.09	^{II} 11.79 ^C ± 0.17	^{II} 7.16 ^B ± 0.05	^{II} 10.51 ^B ± 0.13	^{II} 9.74 ^B ± 0.21
	control supernatant	^{III} 15.11 ^B ± 0.29	^{III} 18.13 ^C ± 0.32	^{III} 16.42 ^B ± 0.34	^{III} 17.42 ^B ± 0.19	^{III} 19.51 ^C ± 0.37	^{III} 18.63 ^C ± 0.33

- Note:
1. Means in column followed by different Roman figures, at the upper leaf handed-side of the cells, were significantly different ($P \leq 0.05$) by the different fractions of cells from the same of colloidal chitin and the same incubation time.
 2. Means in row followed by different letters, at the upper right handed-side of the cells, were significantly different ($P \leq 0.05$) by the different colloidal chitin at the same isolate of fungus and the same fraction of cells
 3. Each mean value based on the average of 5 replications.

สรุปผลการทดลองจากตารางที่ 15-17

1. ผลจากตารางที่ 15 ถึง 18 พบว่า *Bt. 65*, *Bt. ostringiae* และ *Bt. pakistani* ที่ทุก incubation times ส่วนของ supernatant สามารถชะลอการเจริญของเส้นใยได้ตั้งแต่แตกต่างกันเล็กน้อยสำคัญทางสถิติจากส่วนของ intact cells ซึ่งผลสอดคล้องกับการวัดกิจกรรมของ enzyme chitinase โดยการตรวจวัด N-acetylglucosamine จากการวัดค่าความดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 585 nm. พบว่าใน supernatant ที่ culture broth ถูก induce ด้วย chitin 0.1 และ 1% มี N-acetylglucosamine สูงกว่าใน fraction อื่น ๆ
2. ทั้ง intact cells และ supernatant ที่ได้จาก bacterial incubation time ในวันที่ 5 (120 ชม.) มีผลชะลอการเจริญของเส้นใยได้ดีกว่าวันอื่น ๆ
3. *Bt.* ทั้ง 3 สายพันธุ์ที่ถูก induce ด้วย chitin ทั้ง 0.1 และ 1% สามารถชะลอการเจริญของเชื้อราได้ดีกว่าอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติจากชุดของ *Bt.* ที่ไม่ได้ผสม chitin ในอาหารเลี้ยงเชื้อ
4. โดยทั่วไปปริมาณของ chitin 0.1 และ 1% ที่ใช้ในการชักนำให้ *Bt.* สร้าง chitinase เพื่อชะลอการเจริญของเส้นใยไม่มีผลแตกต่างกัน ดังนั้นหาก *Bt.* ได้ผ่านการทดสอบในขั้นตอนต่าง ๆ จนน่าจะสามารถนำไปใช้ควบคุมโรคของหลอด การ induce ให้ *Bt.* สร้าง chitinase ด้วย chitin 0.1% จะเป็นการช่วยประหยัดต้นทุนได้

5. โดยทั่วไป *Bt.* ทั้ง 3 สายพันธุ์สามารถชะลอการเจริญของเส้นใยจากจังหวัดปทุมธานีได้ดีกว่าจากจังหวัดเชียงใหม่ ตัวอย่างเช่น

- *Bt. 65* จากการบ่มเชื้อ 5 วัน ส่วนที่เป็น intact cells ที่เลี้ยงใน chitin 0.1 และ 1% สามารถชะลอการเจริญของเส้นใยจากจังหวัดปทุมธานีได้ 55.73 และ 54.03% แต่สามารถชะลอการเจริญของเส้นใยจากจังหวัดเชียงใหม่ได้เพียง 46.78 และ 48.73% ตามลำดับ
- *Bt. ostringiae* จากการบ่มเชื้อ 5 วัน ส่วนที่เป็น intact cells ที่เลี้ยงใน chitin 0.1 และ 1% สามารถชะลอการเจริญของเส้นใยจากจังหวัดปทุมธานีได้ 35.78 และ 31.43% แต่สามารถชะลอการเจริญของเส้นใยจากจังหวัดเชียงใหม่ได้เพียง 30.59 และ 29.74% ตามลำดับ
- *Bt. pakistani* จากการบ่มเชื้อ 5 วัน ส่วนที่เป็น intact cells ที่เลี้ยงใน chitin 0.1 และ 1% สามารถชะลอการเจริญของเส้นใยจากจังหวัดปทุมธานีได้ 36.52 และ 38.19% แต่สามารถชะลอการเจริญของเส้นใยจากจังหวัดเชียงใหม่ได้เพียง 33.48 และ 35.40% ตามลำดับ

9. เปรียบเทียบประสิทธิภาพของ *Bacillus* ในการชะลอการเจริญของเส้นใยราที่สุอายุต่างกัน

- ดำเนินการเลี้ยงแบคทีเรียและเชื้อราเช่นเดียวกับการทดลองในหัวข้อที่ 5
- ใช้แบบที่เลี้ยงที่บ่มนาน 24 ชม. เลี้ยงร่วมกับเชื้อราสายพันธุ์จากเชียงใหม่ โดยใช้ราที่มีอายุ 1, 2, 3, 4 และ 5 วัน ตามลำดับ
- ดำเนินการเก็บผลและเปรียบเทียบผลทางสถิติเช่นเดียวกับหัวข้อที่ 5

Table 18. Comparison the means of efficacy in percent inhibition (control group=0) chalkbrood mycelium growth from Chiang-Mai by the extracellular substances from 24 hr. incubation culture broth of the potential bacteria.

Location of mycelium	age of fungus (day)	extracellular substances from species of <i>Bacillus</i>				
		<i>B. licheniformis</i>	<i>B. pumilus</i>	<i>B. stearothermophilus</i>	<i>B. subtilis</i>	<i>B. thuringiensis</i> 65
Chiang-Mai	control	^I 0 ^A	^I 0 ^A	^I 0 ^A	^I 0 ^A	^I 0 ^A
	1	^V 52.04 ^C ± 0.68	^{IV} 26.36 ^B ± 0.34	^V 60.18 ^D ± 0.69	^{VI} 80.58 ^E ± 0.78	^{IV} 24.08 ^B ± 0.23
	control	^I 0 ^A	^I 0 ^A	^I 0 ^A	^I 0 ^A	^I 0 ^A
	2	^{IV} 43.58 ^C ± 0.53	^{III} 22.56 ^B ± 0.29	^V 55.38 ^D ± 0.61	^V 76.09 ^E ± 0.69	^{III} 18.06 ^B ± 0.21
	control	^I 0 ^A	^I 0 ^A	^I 0 ^A	^I 0 ^A	^I 0 ^A
	3	^{III} 34.19 ^C ± 0.42	^{III} 20.16 ^B ± 0.25	^{IV} 46.49 ^D ± 0.57	^{IV} 68.12 ^E ± 0.57	^{III} 16.43 ^B ± 0.19
	control	^I 0 ^A	^I 0 ^A	^I 0 ^A	^I 0 ^A	^I 0 ^A
	4	^{II} 26.51 ^C ± 0.28	^{II} 15.29 ^B ± 0.17	^{III} 38.55 ^D ± 0.41	^{III} 50.93 ^E ± 0.53	^{II} 12.45 ^B ± 0.13
	control	^I 0 ^A	^I 0 ^A	^I 0 ^A	^I 0 ^A	^I 0 ^A
	5	^{II} 23.48 ^C ± 0.24	^{II} 12.00 ^B ± 0.14	^{II} 30.12 ^D ± 0.35	^{II} 41.49 ^E ± 0.51	^{II} 9.58 ^B ± 0.11

Note:

1. Means in column followed by different Roman figures, at the upper leaf handed-side of the cell, were significantly different ($P \leq 0.05$) by the different age of mycelium from the same species of *Bacillus*.
2. Means in row followed by different letter, at the upper right handed-side of the cell, were significantly different ($P \leq 0.05$) by the different species of *Bacillus* from the same age of mycelium.
3. Each mean value based on 5 replications.

สรุปผลจากตารางที่ 18

ผลการเปรียบเทียบประสิทธิภาพของ extracellular substances ที่ได้จาการบ่มแบคทีเรีย *B. licheniformis*, *B. pumilus*, *B. stearothermophilus*, *B. subtilis* และ *Bt. 65* ในการชะลอการเจริญของเส้นใยรา จากจังหวัดเชียงใหม่ที่มีอายุต่างกันตั้งแต่ 1 วัน ถึง 5 วัน พบว่า

1. *Bacillus* ส่วนใหญ่สามารถชะลอการเจริญของเส้นใยที่มีอายุน้อยได้ตัวอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P \leq 0.05$) ต่างจากราที่มีอายุมาก ทั้งนี้อาจเกิดจากเชื้อราที่มีอายุน้อยจำเป็นต้องใช้สารและพลังงานเพื่อการเจริญ จึงมีความสามารถในการต้านทานต่อการทำลายของแบคทีเรียได้น้อยกว่าเชื้อราที่มีอายุมากกว่า หรืออาจเกิดจากสาเหตุที่เชื้อราที่มีอายุน้อยมีผนังเส้นใยที่ยังไม่สมบูรณ์หรือบางกว่าเส้นใยที่มีอายุมาก จึงง่ายต่อการเข้าทำลายของแบคทีเรีย

2. เมื่อเปรียบเทียบประสิทธิภาพของ extracellular substances ที่ผลิตจาก *Bacillus* ทั้ง 5 ชนิดในการชะลอการเจริญของเส้นใยราจากเชียงใหม่ พบว่า *B. subtilis* มีประสิทธิภาพดีอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P \leq 0.05$) ต่างจาก *B. stearothermophilus*, *B. licheniformis*, *B. pumilus* และ *Bt. 65* ตามลำดับ

ดังนั้น ผลการทดลองนี้จึงสนับสนุนผลการทดลองในตารางที่ 7-9 และตารางที่ 12-14 ว่า *B. subtilis* น่าจะได้รับความสนใจเพื่อศึกษาคุณสมบัติในด้านอื่น ๆ ที่จำเป็นเพื่อพัฒนาไปใช้ทดลองในภาคสนามต่อไป

10. การจำแนกสายพันธุ์ของเชื้อราที่ก่อให้เกิดโรคซอส์คอบรูตาโดยชุดทดสอบ API ZYM

จากผลการทดสอบของ Gilliam และ Lorenz (1992) สามารถจำแนกสายพันธุ์ของเชื้อรา *Ascosphaera apis* ชนิด unmatd+, unmatd และ mated พบว่า valine aminopeptidase ใช้เป็น marker ของเชื้อราที่ไม่ matd (พวก unmatd) ไม่ผลิตเอนไซม์ชนิดนี้) สำหรับ β -galactosidase และ α -mannosidase ใช้เป็น marker enzyme ของ mated และ unmatd ของเชื้อราโรคซอส์คอบรูตาได้ และอาจใช้จำแนกสายพันธุ์ของโรคซอส์คอบรูตาบางสายพันธุ์ได้ การทดลองนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อจำแนกตัวอย่างของสายพันธุ์ของโรคซอส์คอบรูตาที่เก็บมาจากจังหวัดต่าง ๆ คือ จังหวัดเชียงใหม่ จังหวัดนตรราชสีมา จังหวัดปทุมธานี เปรียบเทียบกับสายพันธุ์มาตรฐานจากประเทศสหรัฐอเมริกา

ก. ชุดทดสอบ API ZYM (ดูภาพประกอบ)

แผง (strip) ของ API ZYM ประกอบด้วย 20 หลุม (cupules) ที่กำหนดแต่ละหลุมถูกฉาบน้ำด้วย enzymatic substrate และ buffer หากเส้นใยามี enzyme ที่จะทำให้ปฏิกิริยากับ substrate โดยยีสสารละลาย ZYM A และ ZYM B ซึ่งเป็นสารช่วยให้เกิดสี จะเกิดสีตามภาพ และความเข้มข้นของสีสามารถระบุความเข้มข้นหรือค่าการทำงาน (nanomole) ได้ แต่หากเส้นใยไม่มีเอนไซม์ที่จะไปทำปฏิกิริยากับ substrate ก็จะไม่เกิดสี โดยทั่วไป มักต้องใช้เส้นใยที่บดจนเซลล์แตกปล่อยเอนไซม์ออกมาจนทำให้สารแขวนลอยมีความเข้มข้นเท่ากับ Mc-Farland No.5-6 และต้องบ่มให้ enzyme ทำปฏิกิริยากับ substrate ใน incubation box อย่างน้อย 4 ชั่วโมงที่ 37^oซ แปรผลที่ได้จากการเกิดสีของปฏิกิริยาเทียบกับตารางที่ 1 (reading scale-ตามภาพ) และตารางที่ 2 (reading table) (Humble et. al., 1997., Tharugonet et. al., 1997)

ข. ประโยชน์ของชุดทดสอบ API ZYM

- เป็นเทคนิคที่สามารถนำไปใช้ได้กับตัวอย่างที่มีจำนวนน้อยได้หลายประเภท เช่น tissues cells, biological fluids, microorganisms, soils. oils และอื่น ๆ
- เป็นเทคนิคที่ใช้ศึกษาการเกิดปฏิกิริยาของเอนไซม์ 19 ชนิด ดังแสดงไว้ในตาราง reading table ได้อย่างรวดเร็ว โดยใช้ปริมาณตัวอย่างเพียงเล็กน้อยเท่านั้น

- เป็นเทคนิคที่อาจสามารถใช้อุปกรณ์ในการค้นหาการหาค่าการทำงานของเอนไซม์จากตัวอย่างโดยวิธี spectrophotometric และวิธี electrophoretic ทำได้ยาก

ค. การเตรียมตัวอย่างเชื้อราเพื่อใช้ทดสอบ

ใช้ปากคีบคีบเส้นใยจากตะเกียบให้เอนไซม์เพียงพอที่จะทำปฏิกิริยากับ substrate ที่ฉาบน้ำอยู่ในหลุมของ API-ZYM (active stage) ใส่ใน cryotube ที่มีน้ำกลั่นปลอดเชื้อ 1 มล. นำ tube ไปแช่ที่ 80^oซ 15 นาที เพื่อให้ทำให้น้ำแข็งเซลล์ของเส้นใยกรอบ จากนั้นใช้แท่งแก้วบดให้น้ำแข็งเซลล์แตกเพื่อให้เซลล์ปล่อยเอนไซม์ออกสู่สารละลาย พยายามบดให้เซลล์แตกมากที่สุด นำสารแขวนลอยตัวอย่างที่เตรียมไปใส่ในขวดแก้วที่มีฝาปิดแล้วปรับความเข้มข้นให้เทียบความเข้มข้นของสารตัวอย่างโดยปรับให้เจือจางด้วยน้ำกลั่นจนมองเห็นเส้นตรงบนกระดาษขาวที่เป็นฉาก ปรับความคมชัดหรือความขุ่นให้เท่ากับสารละลาย Mc-Farland No. 5-6 ในที่มีแสงสว่างส่องผ่าน

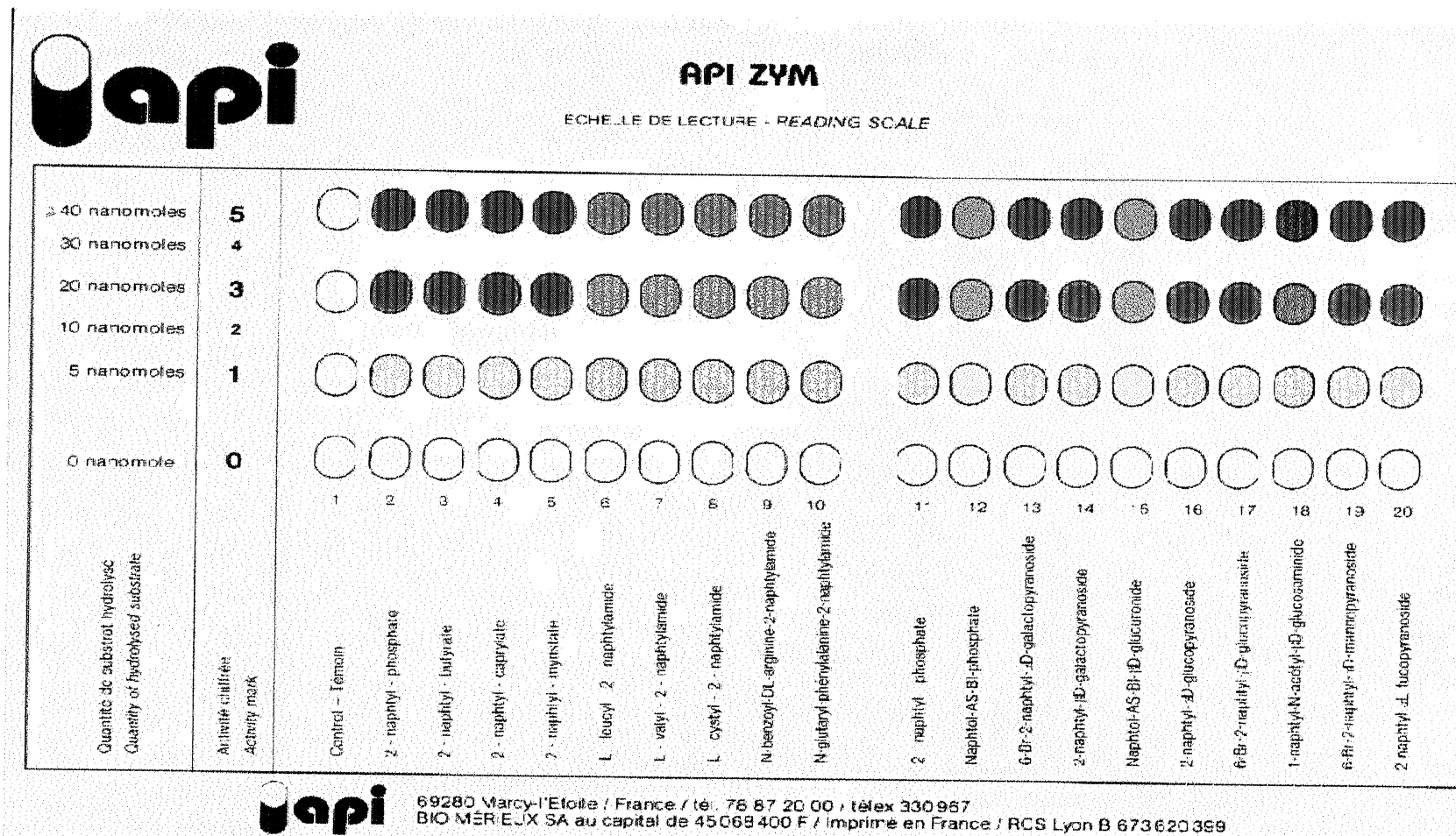
ง. การทดสอบโดยใช้ชุดทดสอบ API-ZYM

ใช้น้ำกลั่นปลอดเชื้อ 5 มล. หยดลงในหลุมของ honeycombed wells เพื่อให้ทุกหลุมมีความชื้นเพียงพอสำหรับการทำงานของเอนไซม์ จากนั้นนำ strip ดังกล่าววางลงบนภาต ใช้ pasture pipette ดูดสารละลายตัวอย่างใส่ในยรา หยดลงในหลุมของ strip หลุมละ 2 หยด จนครบ 19 หลุม (ยกเว้นหลุมแรกที่เป็นหลุมควบคุม) ปิดฝาภาคนำไปบ่มในตู้บ่มที่ 37°C นานประมาณ 4-5 ชม. หยด 1 หยดของสารละลาย ZYM A (ประกอบด้วย tri-hydroxymethyl-aminomethane 25 ก. HCl (37%) 11 มล., sodium lauryl sulfate 10 ก., H₂O 100 มล.) และ 1 หยดของสารละลาย ZYM B (ประกอบด้วย fast blue BB 0.35 ก., α-methoxyethanol 100 มล.) ที่นาน 5 นาที จากนั้นอ่านและบันทึกผลจากสีของปฏิกิริยาที่เกิดขึ้นเทียบกับตาราง reading scale และวิเคราะห์ชนิดของเอนไซม์ที่มีกิจกรรมเทียบกับ reading table

จ. การเตรียม Mc-Farland Scale

Mc-Farland scale	1% BaCl ₂ (ml)	1% H ₂ SO ₄ (ml)	จำนวนแบคทีเรียโดย ประมาณ (X 10 ⁶ /ml)
1	0.1	9.9	300
2	0.2	9.8	600
3	0.3	9.7	900
4	0.4	9.6	1,200
5	0.5	9.5	1,500
6	0.6	9.4	1,800
7	0.7	9.3	2,100
8	0.8	9.2	2,400
9	0.9	9.1	2,700
10	1.0	9.0	3,000

ตารางที่ 1 แสดง READING SCALE ของ API-ZYM



ตารางที่ 2 ชนิดของเอนไซม์ ค่า pH และผลการทดสอบในแต่ละกลุ่มของชุดทดสอบ API ZYM

READING TABLE

NO.	SUBSTRATE	ENZYME ASSAYED FOR	pH	RESULT	
				POSITIVE	NEGATIVE
1.		Control		Colorless	COLORLESS
2.	2-naphthyl phosphate	Alkaline phosphatase	8.5	Violet	
3.	2-naphthyl butyrate	Esterase (C4)	6.5	Violet	
4.	2-naphthyl caprylate	Esterase Lipase (C8)	7.5	Violet	
5.	2-naphthyl myristate	Lipase (C14)	7.5	Violet	
6.	L-leucyl-2-naphthylamide	Leucine arylamidase	7.5	Orange	
7.	L-valyl-2-naphthylamide	Valine arylamidase	7.5	Orange	
8.	L-cystyl-2-naphthylamide	Cystine arylamidase	7.5	Orange	
9.	N-benzoyl-DL-arginine-2-naphthylamide	Trypsin	8.5	Orange	
10.	N-glutaryl-phenylalanine-2-naphthylamide	α -chymotrypsin	7.5	Orange	
11.	2-naphthyl phosphate	Acid phosphatase	5.4	Violet	
12.	Naphthol-AS-bi-phosphate	Naphthol-AS-bi-phosphohydrolase	5.4	Violet	
13.	6-Br-2-naphthyl- α -D-galactopyranoside	α -galactosidase (melbiase)	5.4	Violet	
14.	2-naphthyl- β -D-galactopyranoside	β -galactosidase (lactase)	5.4	Violet	
15.	Naphthol-AS-bi- β -D-glucuronide	β -glucuronidase (hyaluronidase)	5.4	Blue	
16.	2-naphthyl- α -D-glucopyranoside	α -glucosidase (maltase)	5.4	Violet	
17.	6-Br-2-naphthyl- β -D-glucopyranoside	β -glucosidase (cellulase)	5.4	Violet	
18.	1-naphthyl-N-acetyl- β -D-glucosaminide	N-acetyl- β -glucosaminidase (chitinase)	5.4	Brown	
19.	6-Br-2-naphthyl- α -D-mannopyranoside	α -mannosidase	5.4	Violet	
20.	2-naphthyl- α -L-fucopyranoside	α -fucosidase	5.4	Violet	

(ที่มา : Scientific promotion, 1996)

สรุปผลการทดลองโดยใช้ API-ZYM

1. จากการทดสอบเชื้อรา *Ascosphaera apis* จากแหล่งต่าง ๆ 5 แหล่ง โดยใช้ชุดทดสอบ API-ZYM ตรวจพบเอนไซม์หลัก ๆ ที่เหมือนกัน 7 ชนิดดังนี้ คือ เอนไซม์ที่พบค่าการทำงานของเอนไซม์สูงคือ เอนไซม์ alkaline phosphatase, leucine arylamidase, acid phosphatase, naphthol-AS-bi-phosphohydrolase และเอนไซม์ที่พบค่าการทำงานของเอนไซม์ต่ำคือ เอนไซม์ esterase, valine arylamidase และ β -glucosidase

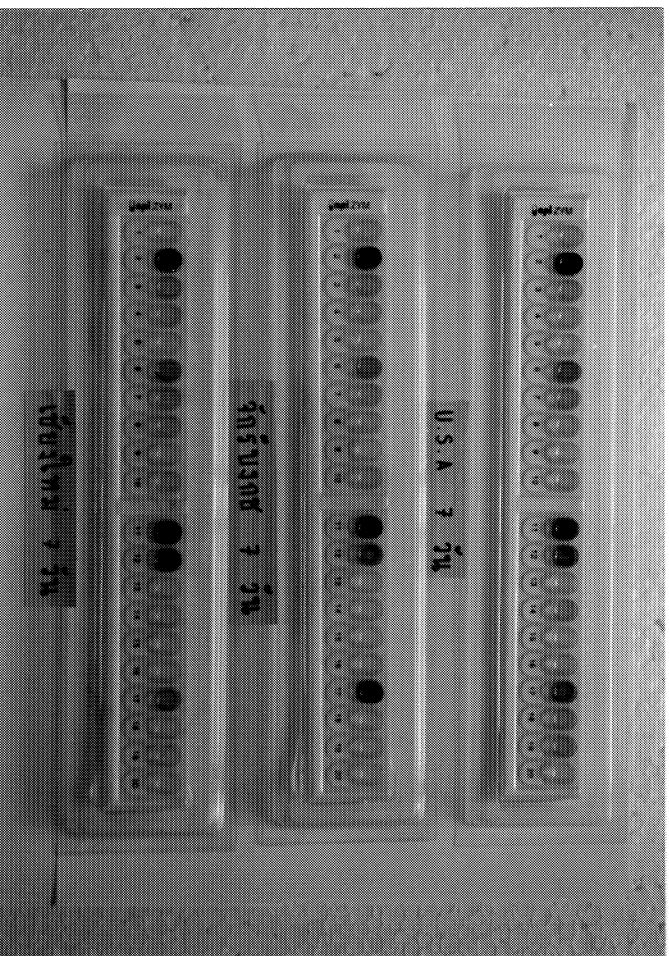
นอกจากนี้เชื้อรา *A. apis* ที่มาจากสถาบัน USDA. และจากวังจักษ์บึงกษัยยังพบเอนไซม์ esterase lipase, cystine arylamidase และ α -mannosidase เพิ่มจากเอนไซม์หลัก ส่วนเชื้อรา *A. apis* ที่มาจาก ปากช่องและจากเขียงใหม่ (อ.แม่แตง) ยังพบเอนไซม์ cystine arylamidase, α -chymotrypsin และ α -mannosidase เพิ่มจากเอนไซม์หลัก ส่วนเชื้อรา *A. apis* ที่มาจากเขียงใหม่ (อ.หางดง) ไม่พบเอนไซม์ชนิดอื่นเพิ่มจากเอนไซม์หลัก

เอนไซม์ในชุดทดสอบ API ZYM ที่ไม่มีการตรวจพบเลย คือเอนไซม์ lipase, trypsin, β -galactosidase, β -galactosidase, β -glucuronidase, α -glucosidase, N-acetyl- β -glucosaminidase และ fucosidase เนื่องจากเอนไซม์เหล่านี้เป็นเอนไซม์สำหรับย่อยโมเลกุลขนาดใหญ่แต่เชื้อรา *A. apis* ในนี้จะมีอยู่ในกระแสเลือดมีโมเลกุลขนาดเล็ก จึงไม่จำเป็นต้องใช้เอนไซม์สำหรับย่อยโมเลกุลขนาดใหญ่จึงไม่พบเอนไซม์เหล่านี้ในการทดลอง

จากการทดลองจำแนกสายพันธุ์ของเชื้อราที่มาจากแหล่งต่าง ๆ โดยใช้ชุดทดสอบ API ZYM เชื้อราทั้ง 5 แหล่ง ตรวจพบเอนไซม์ชนิดเดียวกันเป็นส่วนใหญ่ ทำให้ไม่สามารถบ่งชี้ความแตกต่างของเชื้อราแต่ละสายพันธุ์ได้

2. จากการทดสอบเชื้อรา *A. apis* จากแหล่ง จังหวัดเขียงใหม่ (อ.แม่แตง) และ(อ.หางดง) ตามความแตกต่างกันในด้านอายุของเชื้อราบนอาหาร SDA คืออายุ 2 วันและ 8 วัน พบว่ามีการทำงานของเอนไซม์หลักเหมือนกัน ยกเว้นค่าการทำงานของเอนไซม์ α -chymotrypsin พบในเชื้อรา *A. apis* ที่มีอายุ 2 วัน แต่ไม่พบค่าการทำงานของเอนไซม์ชนิดนี้ในเชื้อรา *A. apis* ที่มีอายุ 8 วัน แสดงว่าอายุของเชื้อรา *A. apis* มีผลต่อค่าการทำงานของเอนไซม์ และสามารถใช้ในการทำงานของเอนไซม์ α -chymotrypsin เป็น marker enzyme ได้

3. การที่ปริมาณของเอนไซม์ที่ตรวจพบในแต่ละครั้งมีปริมาณไม่เท่ากัน อาจมีสาเหตุมาจากความเข้มข้นของเชื้อราที่ใช้ในแต่ละครั้งไม่เท่ากัน เนื่องจากวิธีการเตรียมความเข้มข้นเป็นการทำให้มีความเข้มข้นอยู่ในช่วงหนึ่งเท่านั้น (McFarland No. 5-6) รวมทั้งวิธีการทำให้เซลล์แตกให้ปริมาณเอนไซม์ในแต่ละครั้งไม่เท่ากันเนื่องจากแรงกดที่ใช้ในการทำให้เซลล์แตกแต่ละครั้งไม่สามารถควบคุมให้เท่ากันได้



แสดงตัวอย่างผลจากการจำแนกเส้นใยสาหร่ายพันธุ์ต่าง ๆ ด้วยวิธี API-ZYM

11. การศึกษาความผิดปกติของสัญญาณวิทยาของราที่เลี้ยงร่วมกับแบคทีเรีย

ก. การเตรียมตัวอย่างรา ทำตามวิธีการของหิตติยา จิตติहरษา และคณะ (2540) ใช้เชื้อมัยยาค่อย ๆ แยกเส้นใยราที่เลี้ยงร่วมกับแบคทีเรียในภาดเลี้ยงเนื้อเยื่อ 24 หลุม วางเส้นใยบนกระจกสไลด์ที่มีสีย้อม lactophenol cotton blue ค่อย ๆ เกลี่ยเส้นใยให้กระจายทั่ว ๆ ปิดตัวอย่างด้วยกระจกปิดสไลด์และเคลือบด้วยน้ำยาเคลิอบเล็บ นำไปตรวจสัญญาณวิทยาภายใต้กล้องจุลทรรศน์ เปรียบเทียบกับเส้นใยราชุดควบคุม (ไม่ได้เลี้ยงร่วมกับแบคทีเรีย)

ข. ระยะเวลาที่เก็บตัวอย่างรา เก็บตัวอย่างราที่เลี้ยงร่วมกับแบคทีเรียนาน 6, 12, 24, 48 และ 120 ชม. เพื่อตรวจการเปลี่ยนแปลงทางสัญญาณวิทยาโดยเปรียบเทียบกับชุดควบคุม

ผลการศึกษา

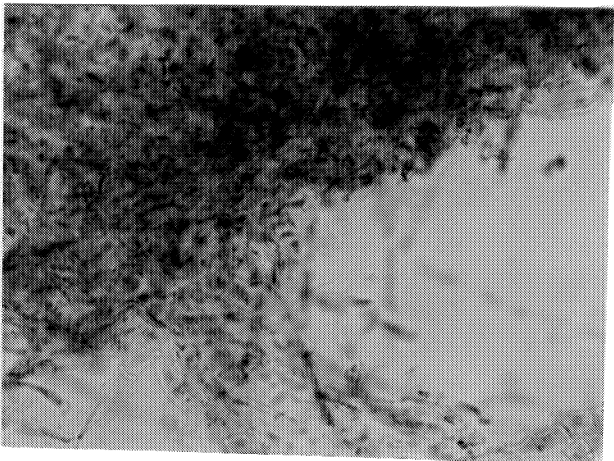
ผลการตรวจภายใต้กล้องจุลทรรศน์กำลังขยาย 400x พบว่า เชื้อราจากชุดควบคุมมีสัญญาณวิทยาตามปกติ กล่าวคือ มีไฮฟาพลาสมิซึมภายในเส้นใย และเมื่อปนนาน 120 ชม. พบเส้นใยบางส่วนสร้างส่วนที่คาดว่าเป็นไฮโอโกเนียม ซึ่งจะเจริญกลายเป็นเซลล์สืบพันธุ์แบบมีเพศต่อไปตาม

รูปที่ 11.1

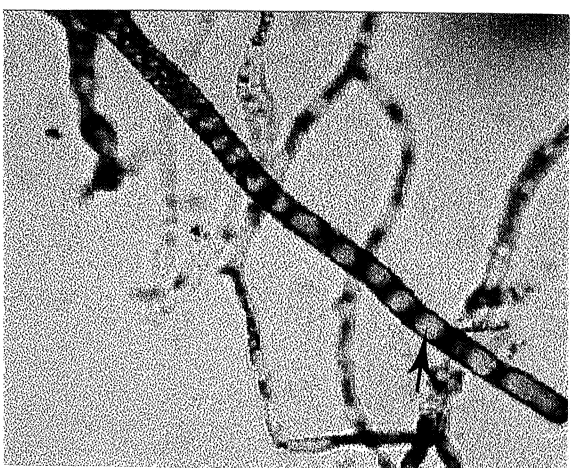


รูปที่ 11.1 แสดงเส้นใยราจากชุดควบคุมที่มีไฮโทพลาสซึมอยู่ภายใน และบางส่วนเจริญเป็นไฮโอโกเนียม

สำหรับเชื้อราที่บ่มร่วมกับแบคทีเรียที่ 6 ชม. พบว่า มีแบคทีเรียจำนวนมากเข้าสู่ล้อมรอบเส้นใย ทำให้เส้นใยไม่สามารถเจริญได้ตามปกติ (รูปที่ 11.2) และเส้นใยเกิดแอกูโอลจำนวนมาก (รูปที่ 11.3)



รูปที่ 11.2 แสดงแบคทีเรีย
เข้าสู่ล้อมรอบเส้นใย

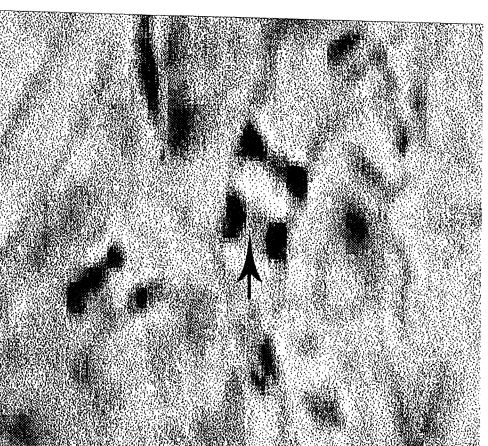


รูปที่ 11.3 แสดงแอกูโอลจำนวนมาก
ภายในเส้นใย

เมื่อบ่มเส้นใยกับแบคทีเรียร่วมกันนานมากกว่า 48 ชม. จะไม่พบไซโตพลาสซึมในเส้นใย (รูปที่ 11.4) และเมื่อตรวจเส้นใยหลังจากบ่มเลี้ยงร่วมกับแบคทีเรียนาน 120 ชม. พบว่าเส้นใยขาดสั้นลง จนมองเห็นระหว่างเซลล์ (septum) หดเข้าชิดกันมาก (รูปที่ 11.5)



รูปที่ 11.4 แสดงเส้นใยที่ปราศจาก
ไซโตพลาสซึม



รูปที่ 11.5 แสดงเส้นใยขาดสั้นจน
septum หดเข้าชิดกัน

ผลการศึกษานี้ แสดงว่า สารต้านเชื้อจากแบคทีเรียน่าจะมีผลต่อผนังเซลล์ด้วยกลไกใดกลไกหนึ่งที่ทำให้เส้นใยราสูญเสียสภาพในการรักษาสมดุล จึงเกิดการไหลออกของไฮโดรลาลิซึม ซึ่งสารต้านเชื้อราหลายชนิดมีผลต่อผนังเส้นใยราและทำให้เกิดเหตุการณ์ดังกล่าว เช่น สารในกลุ่มของสารปฏิชีวนะหรือสารพวเกนไธม chitinase, β -glucanase ฯลฯ (Debono and Gordee, 1994., Glassby, 1976)

สรุปและวิจารณ์ผลการทดลอง

1. ผลการสำรวจโรคซอส์คอบรูตในภาคสนาม สามารถแยกเชื้อราสาเหตุของโรคจาก 3 จังหวัด คือ จังหวัดเชียงใหม่ จังหวัดนครราชสีมา และจังหวัดปทุมธานี เส้นใยเจริญได้บนอาหาร Sabourand dextrose agar (SDA) หรือ broth (SDB) ที่ 30°ซ ในที่มีดมออกซิเจน แต่เจริญได้ช้าเมื่อเลี้ยงบน basal mineral media หรือ potato dextrose agar ทั้งนี้อาจเนื่องจากการเป็นราชนิดที่ก่อโรคในผึ้ง จึงต้องการธาตุอาหารที่สมบูรณ์มากกว่าราพวกแชนโปไปเฟต์ ซึ่งสอดคล้องกับการทดลองของ Bissett และคณะ (1996) การ subculture เชื้อหลาย ๆ ครั้ง มีผลทำให้เชื้อราสูญเสียความสามารถในการสร้างเซลล์สืบพันธุ์แบบมีเพศ ซึ่งสอดคล้องกับการทดลองของ Youseff (1998) การเลี้ยงราบนอาหาร SDA ผสม egg yolk สามารถชะลอการสูญเสียความสามารถในการสร้างเซลล์สืบพันธุ์แบบมีเพศได้ แต่วิธีการเตรียมอาหารดังกล่าวค่อนข้างยุ่งยาก โดยทั่วไปจะเลี้ยงเชื้อราบน SDA ในภาวะที่กล่าวแล้วข้างต้น

2. ผลการตัดกรอง *Bacillus* 30 ไอโซเลทจากท้องถื่นโดยวิธี agar diffusion พบ *Bacillus* 9 ชนิด หรือ 11 สายพันธุ์ที่มีประสิทธิภาพในการชะลอการเจริญของเส้นใยคือ *B. aleoli*, *B. atrophaeus*, *B. circuran*, *B. licheniformis*, *B. megaterium*, *B. pumilus*, *B. subtilis*, *B. stearothermophilus*, *B. thuringiensis ostiniae*, *Bt. pakistani* และ *Bt. 65* ตารางที่ 1-6 แต่การทดสอบโดย agar diffusion นี้มีปัญหาในการวัดขนาดของบริเวณยับยั้ง (inhibition zone) และยังมีปัจจัยหลายประการที่อาจก่อให้เกิดความคลาดเคลื่อนต่อผลการทดลอง การทดสอบโดยวิธีเลี้ยงเชื้อาร่วมกับแบบที่เรียบแล้วหาหน้าหนักแห่งของเชื้อราเทียบกับชุดควบคุมเป็นค่าเปอร์เซ็นต์ของความสามารถในการยับยั้งหรือชะลอการเจริญของเส้นใย (% inhibition) เป็นวิธีการที่ควรกระทำเพื่อตรวจสอบความแม่นยำของผลที่ได้จาก agar diffusion

3. จากการตรวจสอบผลจาก agar diffusion โดยวิธีเลี้ยงเชื้อร่วมกับแบคทีเรีย (coinoculation) พบว่ามี *Bacillus* 5 ชนิดที่มีประสิทธิภาพสูงในการชะลอการเจริญของเส้นใย คือ *B. licheniformis*, *B. pumilus*, *B. stearothermophilus*, *B. subtilis* และ *B. thuringiensis* 65 (ตารางที่ 7-9) จากการตรวจสอบเอกสารพบว่า *Bacillus* กลุ่มดังกล่าว (ยกเว้น *B. stearothermophilus*) สามารถสร้างสารต้านเชื้อราได้หลายชนิด ตัวอย่างเช่น *B. subtilis* สร้างสารพวก iturin A, surfactin และ plipastatin A, *B. และ* สารอีกหลายชนิด (McKeen et.al., 1985., Leifert et.al., 1995) Munimabazi และ Bullerman (1998) ก็รายงานว่า *B. pumilus* สร้างสารต้านเชื้อราได้หลายชนิด

อ่ำเพทิพย์, 2534 รายงานว่าระยะเวลาของการบ่มเชื้อแบคทีเรียมีผลต่อการสร้างสารต้านเชื้อรา ผลการทดลองพบว่า แบคทีเรียที่บ่มนาน 24 ชม. มีประสิทธิภาพในการชะลอเส้นใยราได้ดีที่สุด หลังจากเวลาดังกล่าวเป็นเวลาที่แบคทีเรียส่วนมากมีการสร้าง endospore ซึ่งในการสร้าง endospore นี้อาจมีการดึงเอาบางส่วนของสารต้านเชื้อราไปสร้างเป็นส่วนประกอบของสปอร์ หรืออาจเกิดจากกลไกอื่น ๆ ที่ทำให้สารต้านเชื้อรามีประสิทธิภาพลดลง (อ่ำเพทิพย์, 2534) และเมื่อบ่มนาน 168 ชม. ซึ่งจะเป็นระยะเวลาที่เซลล์ส่วนมากจะแตกพร้อมปล่อย endosporeสู่ culture broth สารภายในเซลล์น่าจะมีส่วนชะลอการเจริญของเส้นใยได้ดี ทำให้ประสิทธิภาพของแบคทีเรียที่บ่มนาน 168 ชม. มีประสิทธิภาพรองลงมาจากการบ่มที่ 24 ชม. ซึ่งผลสอดคล้องกับการนำเซลล์ไปทำในเตาโดย French Press ซึ่งพบว่า สารภายในเซลล์มีประสิทธิภาพในการชะลอการเจริญของเส้นใยมากกว่าอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P \leq 0.05$) กว่าสารที่อยู่ใน culture broth (ตารางที่ 10 -12)

เนื่องจากการทดลองนี้ไม่สามารถหาวิธีสกัดสารต้านเชื้อราออกมาตรวจสอบว่าเป็นสารชนิดใด และสารนั้นมีความสามารถในการชะลอการเจริญของเส้นใยราต่ำสุด (minimal inhibition concentration :MIC) ได้เพียงใด จึงยังไม่สามารถอธิบายยากไถ่ต่าง ๆ ที่ชัดเจนได้มากกว่านี้

ผลการเปรียบเทียบประสิทธิภาพ *B. licheniformis* และ *B. stearohermophilus* ที่แยกจากผึ้งที่ตายด้วยโรคชอลด์บรูตเปรียบเทียบกับ type strain ของแบคทีเรียชนิดเดียวกัน พบว่า แบคทีเรียที่เป็น type strain ก็สามารถชะลอการเจริญของเส้นใยราได้แต่มีประสิทธิภาพต่ำกว่าแบคทีเรียที่แยกจากผึ้งติดโรค (ตารางที่ 13, 14) แสดงว่า แบคทีเรียที่แยกจากซากผึ้งมีวิวัฒนาการร่วมกับโรคชอลด์บรูตและอาจมีหน้าที่ป้องกันโรคนี้ไม่ให้เกิดการระบาดจนเสียสมดุลธรรมชาติ ซึ่งผลสอดคล้องกับรายงานของ Shinanuki และคณะ (1992).

5. การทดลองพบว่า ความเข้มข้นของเซลล์แบคทีเรียที่ 10^4 เซลล์/มล. มีประสิทธิภาพในการชะลอการเจริญของเส้นใยรา (ที่เลี้ยงร่วมกันเป็นเวลา 48 ชม.) ได้ดีอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติว่าการใช้เซลล์แบคทีเรียที่ความเข้มข้น 10^8 เซลล์/มล. ทั้งนี้อาจเกิดจากความเข้มข้นของเซลล์ที่มากเกินไป เกิด การแย่งแย่งอาหารหรือมีการสร้างสารบางชนิดที่ทำให้สภาวะไม่เหมาะต่อการทำงานของสารต้านเชื้อรา (ตารางที่ 13, 14) ซึ่งผลนี้ไม่สอดคล้องกับรายงานของ Heath (1982 a,b)

6. เนื่องจาก *B. thuringiensis* ทั้ง 3 สายพันธุ์ คือ *Bt. 65*, *Bt. oestrinae*, *Bt. pakistani* สามารถสร้างเอนไซม์ไคตินเนสได้สูงเมื่อถูกชักนำด้วยคอลอยเจลไคติน (Tamivanic et.al., 1997) และกลุ่มของแบคทีเรียที่สร้างไคตินเนสสามารถชะลอการเจริญของเส้นใยราอย่างมากกว่าอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P \leq 0.05$) ต่างจากพวกที่ไม่สร้างไคตินเนส (ตารางที่ 15-17) แสดงว่าไคตินเนสมีบทบาทเข้าไปย่อยสลายไคติน ซึ่งเป็นส่วนประกอบของผนังเซลล์ของเชื้อรา ทำให้ผนังเซลล์บางส่วนถูกย่อยสลายและอาจสูญเสียสภาพ แต่เนื่องจาก *Bt.* ที่ไม่ถูกชักนำให้สร้างไคตินเนสก็ยังสามารถชะลอการเจริญของเส้นใยได้ดี จึงแสดงว่าแบคทีเรียกลุ่มนี้สร้างสารต้านเชื้อราประเภทอื่น ๆ ได้ด้วย แต่เมื่อชักนำให้สร้างไคตินเนสจะทำให้มีประสิทธิภาพสูงขึ้น

7. ผลการทดสอบแบบ coinoculation จากแบคทีเรีย 5 ชนิดกับเชื้อราที่มีอายุตั้งแต่ 1 ถึง 5 วัน พบว่า แบคทีเรียสามารถชะลอการเจริญของเส้นใยราที่มีอายุน้อยได้มากกว่าเส้นใยราที่มีอายุมาก

(ตารางที่ 18) ซึ่งผลสอดคล้องกับการทดลองของ Podile และ Prakarh (1996) ซึ่งอาจเกิดจากเส้นใยราที่มีอายุน้อยยังมีผนังเซลล์ไม่สมบูรณ์ เนื่องจากเส้นใยใช้สารอาหารและพลังงานไปเพื่อการเจริญ จึงต่อต้านการเข้าทำลายเส้นใยจากการต้านเชื้อราได้น้อยกว่าเส้นใยราพวกที่มีอายุมาก

8. การที่ API-ZYM ไม่สามารถจำแนกสายพันธุ์ของเชื้อราจาก 3 จังหวัดให้แตกต่างกัน อาจเนื่องจากสายพันธุ์ทั้งหมดที่นำมาศึกษาไม่มีความแตกต่างกัน หรืออาจเนื่องจากการตั้งกลุ่มมีความไวไม่เพียงพอที่จะจำแนกสายพันธุ์ของเชื้อราได้ การทดลองครั้งนี้ได้ทดลองใช้วิธี random amplified polymorphic DNA-polymerase chain reaction (RAPD-PCR) ตามวิธีการของ Lu และคณะ (1996) โดยทดลองใช้ primer 5'-CGTCGGGCGCT-3' (No.425), 5'-ACGGCCACCC-3' (No.421) ต่อด random ด้วย primers ต่าง ๆ ดังต่อไปนี้อีก 19 ตัว คือ

primer number	primer sequence
1. AB01	5'-CCGTCGGTAG-3'
2. AB04	5'-GGCACGCGTT-3'
3. AB05	5'-CCCGAAGCGA-3'
4. AB09	5'-GGGCGACTAC-3'
5. *AB13	5'-CCTACCGTGG-3'
6. AB16	5'-CCCGGATGGT-3'
7. AB18	5'-CTGGCGTGTG-3'
8. AC03	5'-CACTGGGCCA-3'
9. *AC04	5'-ACGGGACCTG-3'
10. *AC07	5'-GTGGCCGATG-3'
11. *AC10	5'-AGCAGCGAGG-3'
12. AC11	5'-CCTGGGTCAG-3'
13. AC12	5'-GGCGAGTGTG-3'
14. *AC13	5'-GACCCGATTG-3'
15. AC19	5'-AGTCCGCCCTG-3'
16. AD05	5'-ACCGCATGGG-3'
17. AD08	5'-GGCAGGCAAG-3'
18. AD16	5'-AACGGGCGTC-3'
19. AE01	5'-TGAGGGCCGT-3'

* = primers ที่สามารถ amplified ได้ band ของ DNA ของโรคขอรีบนรุต แต่รูปแบบ (pattern) ที่ได้จากการทดลองของเชื้อราจาก 3 จังหวัดก็ไม่สามารถต่างกันได้อย่างชัดเจน

9. การศึกษาสัญญาณวิทยาของเส้นใยหลังจากเลี้ยงร่วมกับแบคทีเรียเป็นเวลา 6 ชม. พบว่า แบคทีเรียเข้าล้อมรอบเส้นใยรา จนเส้นใยไม่สามารถเจริญเติบโตได้ตามปกติ เริ่มพบแวคิวโอลภายในเส้นใยราหลังจากเลี้ยงร่วมกับแบคทีเรียนาน 24 ชม. และพบการไหลออกของไฮโดรพลาสซึมภายใน 48 ชม. หลังจากนั้นเส้นใยรามีอาการหดสั้นจนผนังกันระหว่างเซลล์ (septum) หดตัวเกือบชิดติดกัน แสดงว่า สารต้านเชื้อราส่วนใหญ่มีผลต่อผนังเซลล์ โดยทำให้ผนังเซลล์ฉีก破 อาจเกิดรอยร้าวทำให้ไฮโดรพลาสซึมไหลออก ซึ่งเป็นกลไกที่อาจเกิดจากสารปฏิชีวนะหลายประเภท หรืออาจเกิดจากเอนไซม์ที่มีผลย่อยสลายสารประกอบที่สำคัญในผนังเซลล์

10. ในส่วนที่เกี่ยวกับการจำแนกและวิเคราะห์คุณสมบัติของสารนั้น ได้พยายามสกัด crude antifungal metabolites และแยกสารโดย thin layer chromatography (TLC) ตามวิธีของ McKeon และคณะ (1985) และวิธีการของ อ่ำไพฑิพย์ สุขหอม (2534) แต่ไม่สามารถพบแถบของสารที่มีผลยับยั้งหรือชะลอการเจริญของเส้นใยรา ทั้งนี้อาจเนื่องมาจากสารออกฤทธิ์มีผลเป็น synergism ซึ่งกันและกัน เมื่อแยกสารออกจากกันจึงไม่แสดงผลในการชะลอการเจริญของเส้นใยรา แม้แต่ crude antimetabolites ที่แยกได้ก็ไม่ทำก่อให้เกิด inhibition zone บน agar diffusion มากนัก ซึ่งเป็นผลที่แตกต่างจากการทำ coinoculation มาก จึงคาดคะเนว่า การที่แบคทีเรียทดสอบสามารถชะลอการเจริญของเส้นใยราได้ดีโดยวิธี coinoculation ส่วนหนึ่งอาจเกิดจากการเลี้ยงร่วมกับเชื้อราที่มีผลชักนำให้แบคทีเรียสร้างสารต้านเชื้อรา ซึ่งเสมือนกลไกการป้องกันตัวเอง (defense mechanism) หรืออาจเนื่องจากแบคทีเรียเจริญได้เร็วกว่าเชื้อรา จึงสามารถแย่งอาหารจากเชื้อรามาใช้ในการแบ่งตัว อย่างไรก็ตาม การทดลองนี้ยังไม่สามารถหาวิธีการที่เหมาะสมในการจำแนกและวิเคราะห์คุณสมบัติของสารออกฤทธิ์ตามวัตถุประสงค์เดิม

เอกสารอ้างอิง

- ทิตติยา จิตติहरรษา ปารวี ภูมิณรัตน์ วิริยาพร ปานเกษม เอกพันธ์ บางยี่ขัน นูติรัตน์ พรประยูทธ.
2540.ผลของสารสกัดหยาบจากพืชและสารปฏิชีวนะบางชนิดต่อการเจริญของเส้นใยรา
Ascosphaera apis. สาเหตุของโรคชอลักใบรูดในผึ้งพันธุ์ ว.วิชาการเกษตร. 15(3):194-206.
- อำไพทิพย์ สุขหอม. 2534. ลักษณะบางประการของสารปฏิชีวนะจาก *Bacillus* sp. ที่มีฤทธิ์ต้านโรคเห็ด
ของมดฝรั่ง. วิทยานิพนธ์ปริญญาโท ภาควิชาจุลชีววิทยา จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย. 1-116.
- Bissett, J., Duke, G. and Goettel, M., 1996. *Ascosphaera acerosa* sp. nov. isolated from the alfalfa
leafcutting bee with a key to the species of *Ascosphaera*. *Mycobiol.* 88 (5) : 797-803.
- Debono, M. and Gordee, R.S. 1994. Antibiotics that inhibit fungal cell wall development. *Annu. Rev.*
Microbiol. 48; pp. 471-497.
- Gillium, M. and Lorence, B.J. 1992. Enzymatic activity of strains of *Ascosphaera apis*, and
entomopathogenic fungus of the honey bee, *Apis mellifera*. *Apidologie*. 24:19-23.
- Glassby, J.S. 1976. Encyclopedea of Antibiotics. pp: 31, 185-186, 246. John Wiley & Sons, Ltd.
Press. London.
- Heath, L.A.F. 1982a. Development of chalkbrood in a honey bee colony : a review. *Bee world*. 63:
119 -130.
- Heath, L.A.F. 1982b. Chalkbrood pathogens : a review. *Bee World*. 63:130-135.
- Humble, M.W., King, A. and Phillips, I. 1997. API ZYM : a simple rapid system for the detection of
bacterial enzymes. *J. Clin Pathol.* 5(44): 275-277.
- Leifert, C., Li, H., Chidburee, S., Hampson, S., Workman, S., Sige, D., Epton, H.A.S. and Harbour, A.
1995. Antibiotic production and biocontrol activity by *Bacillus subtilis* CL27 and *Bacillus*
pumilus CL45. *J. Appl. Bacteriol.* 78(2):97-108.

- Lu, R., Goerzen, D.W. and Rank, G.H. 1996. Use of RAPD analysis for in situ identification of *Ascosphaera aggregata* and *Ascosphaera larvis* in larval cadavers of the alfalfa leafcutting bee, *Megachile rotundata*. *J. Invertebr. Pathol.* 68:78-83.
- McKeen C.D. Reilly, C.C. and Pusey P.L. 1985. Production and partial characterization of antifungal substances antagonistic to *Monilinia fructicola* from *Bacillus subtilis*. *Ecol. and Epidemiol.* 76:136-139.
- Munimbazi, C. and Bullerman, L.B. 1998. Isolation and partial characterization of antifungal metabolites of *Bacillus pumilus*. *J. Appl. Microbiol.* 84(6):959-968.
- Podile, R.A. and Prakash, A.P. 1996. Lysis and biological control of *Aspergillus niger* by *Bacillus subtilis* AF 1. *Can. J. Microbiol.* 4(42):533-538.
- Shimanuki, H., Knox, D.A. and Feldlaufer, F. 1992. Honey bee disease interactions : the impact of chalkbrood on other honey bee brood disease. *Apicult. Res.* 133(1):735-736.
- Tamivanich, S., Pantuwatana, S., Bhuniratanana, A. and Panbangred, W. 1997. Cloning of chitinase gene into *Bacillus thuringiensis* subsp. *aizawai* for enhanced insecticidal activity. *J. Gen. Appl. Microbiol.* 43:341-347.
- Thargonnet, D., Sisson, P.R., Roxby, C.M., Ingham, H.R. and Selkon, J.B. 1997. The API-ZYM system in the identification of Gram-negative anaerobes. *J. Clin. Pathol.* 30:505-509.
- Youssef, N.N. and Knoblett, J. 1998. Culture filtrate of *Bacillus atrophaeus* induced abnormalities in *Ascosphaera apis*. *Mycol.* 90(6): 937-946.