



รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

โครงการ ความหลากหลายของเชื้อจุลินทรีย์ประจำ
ถิ่นที่อาศัยร่วมกับผึ้งและการใช้ประโยชน์

โดย ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. ภาณุวรรณ จันทวรรณกูร

กรกฎาคม 2552

สัญญาเลขที่ RMU 4980010

รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

โครงการ ความหลากหลายของเชื้อจุลินทรีย์ประจำ
ถิ่นที่อาศัยร่วมกับผึ้งและการใช้ประโยชน์

ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ภาณุวรรณ จันทวรรณกุล
ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่

สนับสนุนโดยสำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย
และสำนักงานคณะกรรมการการอุดมศึกษา

(ความเห็นในรายงานนี้เป็นของผู้วิจัย สกว. ไม่จำเป็นต้องเห็นด้วยเสมอไป)

Abstract

Project Code	RMU4980010
Project Title	Diversity of microflora associated with bees and their applications
Investigator	Assistant Professor Dr Panuwan Chantawannakul Department of Biology, Faculty of Science, Chiang Mai University
E-mail Address	panuwan@gmail.com
Project Period	July 1 st , 2006- June 30 th , 2009

We have been investigated the microorganisms associated with bees both parasites and microflora. Objectives are (1) to analyze the viral genomes to elucidate the host-parasite relationship between virus and the honey bee (*Apis mellifera*) (2) survey the viruses parasitized in our Thai bees in the Northern Thailand (3) to study the lytic enzymes from the fungus causing Chalkbrood diseases in honey bee and to compare the enzymatic patterns from isolates of different geographic origins (4) to study the diversity of microflora of honey bees and stingless bees found in Northern Thailand and secondary metabolites produced by the microflora. Results were (1) by using bioinformatics tools, the co-evolution of codon usage of six bee viruses towards that of the honey bee was clarified. This suggested that small host specific viral genomes had the freedom to quickly optimize codon usage to successfully parasitize their preferred host (2) six bee viruses were surveyed and found that the most prevalent virus was deformed wing virus and the acute bee paralysis virus (3) enzymatic patterns were similar between strains of the Chalkbrood pathogen found in Thailand. Protease and N-acetylglucosaminidase from the fungal pathogen were purified and studied. (4) Actinomycetes were isolated and identified. Most were belong to genus *Streptomyces*. Yeasts and bacteria were identified and described. The future application by using yeast capable of using xylose and some bee microflora producing antimicrobial activities against bee pathogen were demonstrated.

Keywords: Insect microflora, Honey bee, Stingless bee, Bee viruses

บทคัดย่อ

รหัสโครงการ	RMU4980010
ชื่อโครงการ	ความหลากหลายของเชื้อจุลินทรีย์ประจำถิ่นที่อาศัยร่วมกับผึ้งและการใช้ประโยชน์
ชื่อนักวิจัย	ภาณุวรรณ จันทวรรณกุล ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
ระยะเวลาโครงการ	1 กรกฎาคม 2549 – 30 มิถุนายน 2552

ในการศึกษาจุลินทรีย์ที่มีความสัมพันธ์กับผึ้งทั้งที่เป็นแบบอยู่ร่วมกันและปรสิต ได้มีวัตถุประสงค์เพื่อ 1) ศึกษาจีโนมของไวรัสที่อาศัยร่วมกับผึ้งและหาความสัมพันธ์กับผึ้งพันธุ์ (*Apis mellifera*) 2) เพื่อสำรวจชนิดของไวรัสที่เป็นปรสิตกับผึ้งเลี้ยงในภาคเหนือของไทย 3) เพื่อศึกษาความหลากหลายของสายพันธุ์ราที่ก่อโรคซอส์คอบรูตในผึ้งโดยการเปรียบเทียบรูปแบบของเอนไซม์ที่ผลิต 4) เพื่อศึกษาความหลากหลายของจุลินทรีย์ในผึ้งและชันโรงที่พบในเขตภาคเหนือและความสามารถในการผลิตสารทุติยภูมิ จากผลการทดลองพบว่า 1) จากการศึกษาจีโนมของไวรัสและผึ้งพบความสัมพันธ์ที่ใกล้ชิดมากจากข้อมูลของรหัสพันธุกรรมหรือการใช้รหัสพันธุกรรม (codon usage) ทำให้ไวรัสมีความจำเพาะเจาะจงสูง 2) ไวรัสทั้ง 6 ชนิดเมื่อสำรวจชนิดของไวรัสในผึ้งที่เลี้ยงในภาคเหนือของไทย พบเชื้อ deformed wing virus และ acute bee paralysis virus มากที่สุด (3) สายพันธุ์ของเชื้อราก่อโรคซอส์คอบรูตที่พบในไทยมีรูปแบบของเอนไซม์ที่ผลิตที่คล้ายกัน โดยไดยแบกบริสซูร์และศึกษาเอนไซม์ย่อยโปรตีนและ N-acetylglucosaminidase 4) ความหลากหลายของเชื้อจุลินทรีย์ที่ไม่ก่อโรค ได้แก่ เชื้อแอคติโนมัยซิส โดยส่วนมากพบเป็นเชื้อในจีนัส *Streptomyces* และยังจำแนกชนิดยีสต์และแบคทีเรีย นอกจากนี้ได้ศึกษาการใช้น้ำตาลไซโลสของยีสต์ และความสามารถของการต้านเชื้อจุลินทรีย์ก่อโรคของจุลินทรีย์ที่พบ

คำหลัก: จุลินทรีย์ประจำถิ่นของแมลง, ผึ้ง, ชันโรง, ไวรัสผึ้ง

กิตติกรรมประกาศ

รายงานเล่มนี้สำเร็จลงได้ด้วยการสนับสนุนจากสำนักงานคณะกรรมการอุดมศึกษา และสำนักงานกองทุนสนับสนุนงานวิจัยสัญญาเลขที่RMU 4980010 ทำให้งานวิจัยสำเร็จลุล่วงไปด้วยดี

ขอขอบคุณผู้อุปเคราะห์ตัวอย่างและให้ความช่วยเหลือในการเก็บตัวอย่างเพื่อใช้ในการวิจัยครั้งนี้

ขอขอบคุณภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ ที่ให้ความอุปเคราะห์ด้านเครื่องมือ อุปกรณ์ และสถานที่ ปฏิบัติงานให้ดำเนินไปด้วยดี

ขอขอบคุณนักศึกษา ห้องปฏิบัติการ 2704 ที่ให้ความร่วมมือในการทำวิจัยให้สำเร็จลุล่วงไปด้วยดี

ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. ภาณุวรรณ จันทวรรณกูร

สารบัญ

บทที่ 1 แบคทีเรีย	1-1 - 1-25
บทที่ 2 แอคติโนมัยซีส	2-1 - 2-10
บทที่ 3 ไวรัส	3-1 - 3-18
บทที่ 4 รา	4-1 - 4-38
บทที่ 5 ยีสต์	5-1 - 5-19
บทที่ 6 ผลลัพธ์จากโครงการวิจัยและข้อเสนอแนะ	6-1 - 6-4
ภาคผนวก ก การคำนวณหาปริมาณแบคทีเรีย	
ภาคผนวก ข อาหารเลี้ยงเชื้อที่ใช้สำหรับแยกและเพาะเลี้ยงเชื้อ	
ภาคผนวก ค สารเคมีที่ใช้ทดสอบ	
ภาคผนวก ง ผลงานตีพิมพ์	
เอกสารอ้างอิง	

บทที่ 1

แบคทีเรีย

บทนำ

แบคทีเรียมีมากมายหลายชนิด มีทั้งกลุ่มที่มีประโยชน์ ไม่ก่อให้เกิดโรค และกลุ่มที่ก่อโรคต่อสิ่งมีชีวิตที่อาศัยอยู่ แบคทีเรียทั้งสองกลุ่มนี้สามารถพบได้ทั่วไปในธรรมชาติและในสิ่งมีชีวิตทุกชนิด แต่ในงานวิจัยนี้ได้ทำการศึกษาแบคทีเรียที่มีประโยชน์และไม่ก่อโรคต่อสิ่งมีชีวิตที่อาศัยอยู่ ที่สามารถพบได้ในระบบทางเดินอาหารส่วนกลางในสัตว์จำพวกแมลงต่างๆเป็นหลัก โดยเฉพาะผึ้ง เนื่องจากระบบทางเดินอาหารส่วนกลางของแมลงซึ่งมีสภาวะที่เหมาะสมต่อการเจริญของจุลินทรีย์มาก เช่น มีความเหมาะสมของอุณหภูมิ และก๊าซออกซิเจน มีความอุดมสมบูรณ์ของอาหาร มี pH ที่เหมาะสม และยังมีความซับซ้อนในเรื่องของโครงสร้างจึงทำให้ระบบทางเดินอาหารส่วนกลางของแมลงเป็นที่อยู่อาศัยที่สำคัญของจุลินทรีย์ได้หลากหลายชนิด (Dillon and Dillon, 2004) เชื้อจุลินทรีย์ประจำถิ่นที่ไม่ก่อโรคในผึ้งนั้นถือว่าเป็นบทบาทสำคัญต่อผึ้งเป็นอย่างมากโดยเฉพาะในส่วนที่เป็นระบบทางเดินอาหารส่วนกลางของผึ้ง (midgut) จะมีจุลินทรีย์ประจำถิ่นที่อาศัยอยู่แบบพึ่งพาอาศัยโดยจุลินทรีย์เหล่านี้จะได้รับสารอาหารจากระบบทางเดินอาหารของผึ้ง ขณะเดียวกันยังช่วยย่อยอาหารในระบบทางเดินอาหารของผึ้งและยังช่วยต่อต้านและป้องกันจุลินทรีย์ที่ก่อโรคให้แก่ผึ้งได้ (Evans and Armstrong, 2006) นอกจากนี้จุลินทรีย์ที่ไม่ก่อโรคในผึ้ง ยังมีบทบาททางด้านชีวเคมี (biochemical) เกี่ยวข้องกับการรักษาอาหารที่เก็บในรัง และต้านทานต่อโรค โดยจุลินทรีย์ที่พบปกติในลำไส้เล็ก (intestinal) ของผึ้งงาน คือ แบคทีเรีย (Gram variable pleomorphic bacteria, *Bacillus* spp. และ *Enterobacteriaceae*) เชื้อรา (molds) และยีสต์ (Yeasts) เป็นส่วนใหญ่ ตัวอย่างของ Gram variable pleomorphic bacteria เช่น *Achromobacter Eurydice*, *Lactobacillus*, *Corynebacterium* และ *Bifidobacterium* แบคทีเรียในกลุ่มนี้ต่างมีบทบาทในด้านเมตาบอไลต์ (metabolites) เช่น ช่วยสร้างเอนไซม์ในลำไส้ (Gilliam, 1997)

ในปัจจุบันนี้การศึกษาในเรื่องความหลากหลายของผึ้งนั้นได้ทำการศึกษากันอย่างแพร่หลาย แต่ในการศึกษาทางด้านความหลากหลายของจุลินทรีย์กลุ่มแบคทีเรียในตัวผึ้ง โดยเฉพาะในระบบทางเดินอาหารส่วนกลางของผึ้งนั้นยังมีอยู่น้อย ดังนั้นในงานวิจัยนี้จึงได้ทำการศึกษาคความหลากหลายของแบคทีเรียที่เป็นแบคทีเรียประจำถิ่นในระบบทางเดินอาหารของผึ้งพื้นเมืองสี่สายพันธุ์คือ ผึ้งหลวง (*Apis dorsata*) ผึ้งมิม (*Apis florea*) และคัดเลือกแบคทีเรียที่มีคุณสมบัติในการยับยั้งเชื้อก่อโรคในผึ้ง นอกจากนี้ทำการศึกษผึ้งเลี้ยงคือ ผึ้งพันธุ์ (*Apis mellifera*) และ ผึ้งโพรง (*Apis cerana*) เพื่อแยกแบคทีเรียประจำถิ่นที่อาศัยอยู่ในทางเดินอาหารส่วนกลางในระยะการเจริญต่างๆของผึ้ง

วัตถุประสงค์

เพื่อศึกษาเชื้อแบคทีเรียที่อยู่ร่วมกับผึ้งเลี้ยงและผึ้งป่าและคัดกรองหาสารต้านเชื้อก่อโรคในผึ้ง

วิธีการทดลอง

1.การเก็บตัวอย่างผึ้งป่าและผึ้งเลี้ยง

1.1. เก็บตัวอย่างผึ้งงานของผึ้งป่า คือ ผึ้งหลวง และ ผึ้งมีม อย่างละ 5 รัง โดยเก็บรังละ 10 ตัว และเก็บตัวอย่างผึ้งเลี้ยง คือ ผึ้งพันธุ์ และ ผึ้งโพรง ในระยะตัวอ่อน (larvae) ระยะดักแด้ (pupae) ระยะตัวเต็มวัย ทั้งตัวผู้ (drone) และผึ้งงาน (worker) ตัวอย่างผึ้งระยะละ 5 ตัว

1.2. ทำ Surface sterile ดังนี้ นำตัวผึ้งแช่ใน แอลกอฮอล์ 70% เป็นเวลา 1 นาที หลังจากนั้นแช่ใน sodium hypochlorite 5.25% เป็นเวลา 1 นาที แล้วนำมาแช่ใน แอลกอฮอล์ 95% เป็นเวลา 30 วินาที แล้วล้างด้วยน้ำกลั่นปราศจากเชื้อ นาน 1 นาที ตามลำดับ วางบนกระดาษทิชชูที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว

1.3. ใช้เข็มตึงปล้องตั้งแต่ปล้องสุดท้ายของบริเวณส่วนท้องมาจนถึงบริเวณทางเดินอาหารส่วนกลาง (ventriculus) ตึงระบบทางเดินอาหารส่วนกลาง ภายใต้กล้องสเตอริโอ เก็บไว้ใน phosphate-buffered saline โดยเทคนิคปลอดเชื้อ

1.4 บดลำไส้ผึ้งที่แช่อยู่ในสารละลายบัฟเฟอร์ให้ลำไส้ของผึ้งแตกกระจายโดยใช้เทคนิคปลอดเชื้อ

2.การหาปริมาณประชากรของแโรบิคแบคทีเรียจากระบบทางเดินอาหารส่วนกลางของผึ้งโดยใช้เทคนิค Dilution spread plate

2.1 ทำการเจือจางลำดับส่วนของสารละลายลำไส้ผึ้งแบบ 10 เท่า จนถึงความเจือจางที่ $1:10^5$ โดยให้ centrifuge tube แรกเป็นสารละลาย suspension

2.2 ทำการ spread plate ตัวอย่าง ปริมาตร 100 μ l จากทุกความเจือจางแล้วบนอาหารฐานทดสอบทั้ง 5 ชนิด คือ nutrient agar, gluconobacter Agar (ภาคผนวก ข), trypticase soy agar medium (บริษัทMerck), brain heart infusion medium (บริษัทMerck), eosin methylene-blue medium (บริษัทMerck), (Vries *et al.*, 2001)

2.3 บ่มที่อุณหภูมิ 30°C นาน 24-48 ชั่วโมง

2.4 บันทึกผลปฏิบัติการ โดยการนับจำนวนโคโลนีของแโรบิคแบคทีเรียที่เกิดขึ้นบนอาหารทดสอบทั้ง 5 ชนิด และนำจำนวนโคโลนีของแโรบิคแบคทีเรียที่อยู่ระหว่าง 30 -300โคโลนี/plate มาคำนวณปริมาณประชากรของแโรบิคแบคทีเรีย (ภาคผนวก ก)

3.วิธีการแยกเชื้อและทำให้บริสุทธิ์

3.1 แยกเชื้อแโรบิคแบคทีเรียที่มีลักษณะของโคโลนีที่แตกต่างกันจากอาหารแต่ละชนิดให้บริสุทธิ์โดยการ streak plate ลงบนอาหารชนิดเดิม

3.2. ที่อุณหภูมิ 30°C นาน 24-48 ชั่วโมง

3.3 เก็บเชื้อให้บริสุทธิ์ในอาหารวุ้นเอียง และเก็บในกลีเซอรอล 50%

4. การจำแนกชนิดและลักษณะของแบคทีเรีย

4.1 ตรวจสอบลักษณะทางสัณฐานวิทยา

4.1.1 สังเกตลักษณะและสีของโคโลนี บนที่กผล

4.1.2 ย้อมสีแกรม และ ดูลักษณะทางสัณฐานวิทยา ภายใต้กล้องจุลทรรศน์

4.1.3 ดูการเคลื่อนที่ของแบคทีเรียที่ได้โดยการทำ motility test

เพาะเชื้อโดยใช้วิธีการแทง (stap) ลงไปในอาหารสำหรับทำ motility test ตรง ๆ บ่มที่อุณหภูมิ 30 °C เป็นเวลา 48 ชั่วโมง

ผลการทดสอบ - ผลบวก เชื้อเจริญออกรอบ ๆ บริเวณที่แทงลงไป

- ผลลบ เชื้อเจริญอยู่ในแนวที่แทงลงไป

4.1.4 ย้อมสีสปอร์ เพื่อดูการสร้างสปอร์ของแบคทีเรียแกรมบวก รูปแท่ง

4.2 ทดสอบคุณสมบัติทางชีวเคมี

นำแบคทีเรียที่แยกได้มาตรวจสอบดูลักษณะทางสัณฐานวิทยาและทำการทดสอบทางชีวเคมี เทียบกับ Bergey's, Manual ของ Determinative Bacteriology (Buchanan, 1974)

5. การคัดเลือกแบคทีเรียที่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อก่อโรคในผึ้ง

5.1 การทดสอบการยับยั้งการเจริญของเชื้อทดสอบด้วยวิธี paper disc diffusion สำหรับเชื้อที่ทำให้เกิดโรคซัลโมเนลลา โดยเชื้อรา *Ascosphaera apis*

5.1.1. เลี้ยงเชื้อรา *A. apis* ในอาหาร SBD บ่มที่อุณหภูมิ 30 °C เป็นเวลา 5 วัน

5.1.2. นำปลาย Pasteur pipette ที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้วขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 0.5 cm เจาะที่ปลายโคโลนีของเชื้อรา มาวางไว้บนจานของอาหารเลี้ยงเชื้อ SBD (ภาคผนวก ข) บ่มที่อุณหภูมิ 30 °C เป็นเวลา 3 วัน

5.1.3. นำน้ำเลี้ยงเชื้อแบคทีเรียหยดลงบน paper disc ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 6 mm ที่ฆ่าเชื้อแล้ว 10 µl ทิ้งไว้ 10-15 นาที ให้แห้งพอสมควร จากนั้นนำ paper disc ที่มีน้ำเลี้ยงเชื้อแบคทีเรียมาวางให้ห่างจากเส้นใยของเชื้อรา 0.5 cm นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 30 °C เป็นเวลา 3 วัน ดูการเกิด clear zone และทำการทดลอง 3 ซ้ำ โดยมี positive control คือ Nystatin ความเข้มข้น 1/100 ml

5.2 การทดสอบการยับยั้งการเจริญของเชื้อทดสอบด้วยวิธี paper disc diffusion สำหรับเชื้อที่ทำให้เกิดโรคยูโรเปียนฟาล์วบรูต โดยเชื้อแบคทีเรีย *Melissococcus plutonius*

5.2.1. เลี้ยงเชื้อก่อโรคยูโรเปียนฟาล์วบรูตในอาหารเหลว (SYPG) (ภาคผนวก ข) บ่มที่อุณหภูมิ 37 °C นาน 3 วัน ในสภาพไร้ออกซิเจน

5.2.2.ทำการ spread เชื้อก่อโรค บนอาหารแข็ง SYPG และ positive control คือ Gentamycin ความเข้มข้น 1 /100 ml

5.2.3.ศึกษาการยับยั้งด้วยวิธี paper disc diffusion บ่มที่อุณหภูมิ 30 °C นาน 3 วัน ในสภาพไร้ออกซิเจน โดยบ่มใน Anarobic jar โดยใช้ Gas pack (Microbiologie anaerocult A, บริษัท Merck) และวัดวงใสที่เกิดขึ้น

5.3 การทดสอบการยับยั้งการเจริญของเชื้อทดสอบด้วยวิธี paper disc diffusion สำหรับเชื้อที่ทำให้เกิดโรคอเมริกันฟาล์วบรูต โดยเชื้อแบคทีเรีย *Paenibacillus larvae*

5.3.1 ลิ้นเชื้อก่อโรคอเมริกันฟาล์วบรูตในอาหารเหลว (Tris-YPG) (ภาคผนวก ข) บ่มที่อุณหภูมิ 30 °C นาน 3 วัน

5.3.2 ทำการ spread เชื้อก่อโรค บนอาหารแข็ง SYPG และ positive control คือ Gentamycin ความเข้มข้น 1 /100 ml

5.3.3 ศึกษาการยับยั้งด้วยวิธี paper disc diffusion บ่มที่อุณหภูมิ 30 °C นาน 3 วัน และวัดวงใสที่เกิดขึ้น

ผลการวิจัย

1. แอโรบิคแบคทีเรียในทางเดินอาหารส่วนกลางของผึ้งป่า (ผึ้งหลวงและผึ้งมิม)

1.1 ลักษณะทางกายภาพของผึ้งป่า (ผึ้งหลวงและผึ้งมิม)

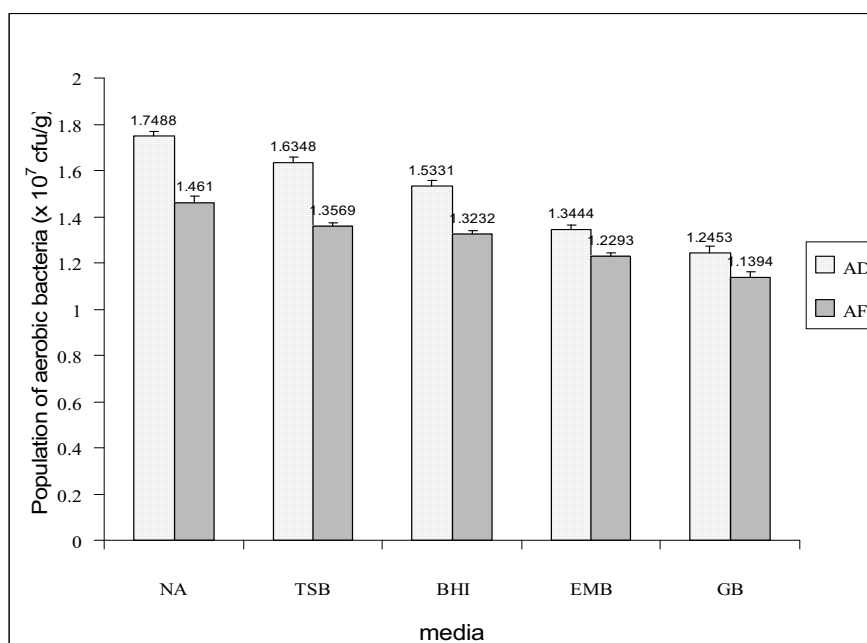
ผึ้งหลวงจะมีขนาดใหญ่กว่าผึ้งมิม สามารถเห็นลักษณะทางกายภาพของลำตัวได้ดี และแยกทางเดินอาหารส่วนกลางออกมาได้ง่าย ทางเดินอาหารส่วนกลาง ของผึ้งหลวงจะมีน้ำหนักเฉลี่ย 0.0148 กรัม ในผึ้งมิมมีน้ำหนัก 0.0068 กรัม ซึ่งค่าที่ได้นี้มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญที่ $P < 0.05$



รูปที่ 1.1 แสดงลักษณะทางกายภาพของระบบทางเดินอาหารส่วนกลาง (midgut)

1.2 จำนวนของแบคทีเรีย (CFU/g) ในทางเดินอาหารส่วนกลางของผึ้งหลวงและผึ้งมัม

ในการนับจำนวนของแบคทีเรียในทางเดินอาหารส่วนกลางของผึ้งหลวงและผึ้งมัมจำนวนทั้งหมด 6 รัง พบว่าจำนวนแบคทีเรียทั้งหมดของผึ้งหลวงจะมีมากกว่าผึ้งมัม จำนวนแบคทีเรียในอาหารเลี้ยงเชื้อ NA มีจำนวนมากที่สุด ดังนี้ $1.7488 \pm 0.02055 \times 10^7$ CFU/g ในผึ้งหลวง และ $1.4610 \pm 0.02758 \times 10^7$ CFU/g ในผึ้งมัมซึ่งค่าที่ได้มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญที่ $P < 0.05$ ดังแสดง ในรูปที่ 1.2



รูปที่ 1.2 กราฟเปรียบเทียบจำนวนของแบคทีเรียทางเดินอาหารส่วนกลางของผึ้งหลวงและผึ้งมัม (CFU/g)

1.3 ลักษณะสัณฐานวิทยาของโคโลนีและเชลล์ และผลการทดสอบทางชีวเคมี

1.3.1 ลักษณะสัณฐานวิทยาของโคโลนีและเชลล์

การศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเชลล์ศึกษาจากการย้อมสีแกรม และดูลักษณะภายใต้กล้องจุลทรรศน์เลนส์ประกอบ และสังเกตลักษณะของโคโลนีที่เจริญบนอาหารเลี้ยงเชื้อ จากการศึกษา พบลักษณะโคโลนีอยู่ 4 แบบคือ violet colony entire convex circular metallic sheen, violet colony entire convex circular smooth, pink colony entire convex circular smooth และ red colony entire convex circular smooth ในอาหารเลี้ยงเชื้อชนิด EMB ส่วนในอาหารเลี้ยงเชื้ออีก 4 ชนิด พบลักษณะโคโลนี 4 แบบคือ white colony entire convex circular smooth, yellow colony entire convex circular smooth, white colony undulate convex circular smooth และ

white colony entire convex lenticular, smooth ซึ่งลักษณะโคโลนีที่พบมากที่สุดคือ โคโลนีสีขาว ในกลุ่มนี้จะรวมถึงสีขาวครีม สีขาว และสีขาวนวล อยู่ด้วย ส่วนผลการย้อมสีแกรมพบว่า แกรมลบ รูปแท่ง, แกรมลบ รูปกลม, แกรมบวก รูปแท่ง และ แกรมบวก รูปกลม

1.3.2 ผลการทดสอบทางชีวเคมีและการจัดจำแนกแอโรบิกแบคทีเรีย

นำแบคทีเรีย 366 ไอโซเลท ที่ได้จากการจัดจำแนกแบคทีเรียเป็น 4 กลุ่มตามการย้อมสี แกรมและรูปร่างของเซลล์ มาทดสอบลักษณะทางชีวเคมีที่จำเป็นในการใช้ระบุชนิดของแบคทีเรียได้ โดย ในแบคทีเรียกลุ่มแกรมบวก รูปร่างกลม การจัดจำแนกพบแบคทีเรียในกลุ่มของ *Streptococcus faecalis* และ *Staphylococcus epidermidis* แบคทีเรียแกรมบวก รูปแท่ง พบแบคทีเรียในกลุ่ม *Bacillus* sp., *Lactobacillus* sp. และ *Corynebacterium* sp. แบคทีเรียแกรมลบ รูปกลม ผลจากการทดสอบไม่สามารถระบุจำแนกได้ แบคทีเรียแกรมลบ รูปแท่ง พบแบคทีเรียชนิด *Pseudomonas aeruginosa*, *Serratia marcescens*, *Proteus vulgaris*, *Gluconobacter* sp. *Enterobacter gergoviae*, *Enterobacter cloaca*, *Enterobacter aerogenes*, *Enterobacter aerogenes*, *Enterobacter taylorae* และ *Escherichia coli* โดยแบคทีเรียในทางเดินอาหาร ส่วนกลางของผึ้งหลวงและผึ้งมี้มจะพบ *Pseudomonas aeruginosa* มากที่สุด และในทางเดินอาหาร ส่วนกลางของผึ้งหลวงไม่พบเชื้อแบคทีเรีย *Corynebacterium* sp. ส่วนในทางเดินอาหารส่วนกลางของผึ้งมี้มไม่พบเชื้อแบคทีเรีย *Lactobacillus* sp. ดังตารางที่ 1.1

ตารางที่ 1.1 การจัดจำแนกชนิดเชื้อแบคทีเรียในทางเดินอาหารส่วนกลางของผึ้งหลวงและผึ้งมี้ม

ชนิดของเชื้อแอโรบิก แบคทีเรียจาก ผึ้ง หลวง (<i>Apis dorsata</i>)	isolate	แอโรบิก แบคทีเรียจาก aerobic bacteria	ชนิดของเชื้อแอ โรบิกแบคทีเรียจาก ผึ้งมี้ม (<i>Apis florea</i>)	isolate	% isolate แอ โรบิก แบคทีเรียจาก
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	33	19.2	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	59	32.1
<i>Bacillus</i> sp.	11	6.4	<i>Bacillus</i> sp	3	1.6
<i>Streptococcus faecalis</i>	25	14.5	<i>Streptococcus faecalis</i>	7	3.8
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	10	5.8	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	16	8.7
<i>Serratia marcescens</i>	6	3.5	<i>Serratia marcescens</i>	9	4.9
<i>Proteus vulgaris</i>	7	4.1	<i>Proteus vulgaris</i>	1	0.5
<i>Enterobacter</i>	12	7.0	<i>Enterobacter</i>	4	2.2

<i>gergoviae</i>			<i>gergoviae</i>		
<i>Enterobacter cloacae</i>	6	3.5	<i>Enterobacter cloacae</i>	20	10.9
<i>Enterobacter aerogenes</i>	10	5.8	<i>Enterobacter aerogenes</i>	22	12
<i>Enterobacter taylorae</i>	7	4.1	<i>Enterobacter taylorae</i>	6	3.3
<i>Escherichia coli</i>	13	7.6	<i>Escherichia coli</i>	2	1.1
<i>Gluconobacter sp.</i>	5	3.0	<i>Gluconobacter sp.</i>	15	8.2
<i>Lactobacillus sp.</i>	2	1.2	<i>Corynebacterium sp.</i>	1	0.5
<i>Unknown</i>	25	14.5	<i>Unknown</i>	19	10.3

1.4 ผลการคัดเลือกเชื้อแอโรบิคแบคทีเรียที่มีความสามารถของในการยับยั้งเชื้อก่อโรคในผึ้ง

จากการคัดเลือกเชื้อแอโรบิคแบคทีเรียที่มีความสามารถของในการยับยั้งเชื้อก่อโรคในผึ้ง จำนวน 366 ไอโซเลท พบว่าเชื้อแบคทีเรียในกลุ่ม *Bacillus sp.* สามารถยับยั้งเชื้อก่อโรคในผึ้ง ทั้ง 3 ชนิดได้ ดังตารางที่ 1.2

ตารางที่ 1.2 การทดสอบความสามารถของแบคทีเรียในการยับยั้งก่อโรคในผึ้ง

เชื้อก่อโรคในผึ้ง	Isolate	Clear zone (cm)	แอโรบิคแบคทีเรีย
<i>Paenibacillus larvae</i>	TSAAD1-C	0.75	<i>Bacillus sp.</i>
	NAAD1-A1	0.8	<i>Bacillus sp.</i>
	NAAD4-C	0.9	<i>Bacillus sp.</i>
	NAAF4-A1	0.8	<i>Bacillus sp.</i>
	NAAF5-C	0.95	<i>Bacillus sp.</i>
<i>Melissococcus plutonius</i>	NAAD4-C	0.85	<i>Bacillus sp.</i>
	NAAF4-A1	0.8	<i>Bacillus sp.</i>
	NAAF5-C	0.85	<i>Bacillus sp.</i>
<i>Ascosphaera apis</i>	NAAD4-C	0.8	<i>Bacillus sp.</i>
	NAAF4-A1	0.75	<i>Bacillus sp.</i>
	NAAF5-C	0.75	<i>Bacillus sp.</i>

2. แอโรบิคแบคทีเรียในทางเดินอาหารส่วนกลางของผึ้งเลี้ยง (ผึ้งพันธุ์และผึ้งโพรง)

2.1 การเตรียมลำไส้ของผึ้งพันธุ์และผึ้งโพรง

จากการแยกตัวอย่างผึ้งทั้ง 4 ช่วงระยะการเจริญ คือ ระยะตัวอ่อน ดักแด่ ระยะตัวเต็มวัยตัวผู้ และผึ้งงาน ออกจากรังผึ้งทั้ง 6 รัง คือ ผึ้งพันธุ์ 3 รังและผึ้งโพรง 3 รัง พบว่า ทั้งผึ้งพันธุ์และผึ้งโพรง ในช่วงระยะตัวอ่อน จะมีลักษณะคล้ายตัวหนอนสีขาว ยังเห็นส่วนหัวและส่วนท้องของตัวผึ้งได้ไม่ชัดเจน เห็นเพียงแค่ส่วนหัวของผึ้งจะมีลักษณะเป็นปลายเรียวกว่าส่วนท้องของผึ้ง ขั้นตอนการแยกเอาตัวอ่อนออกจากรังต้องทำอย่างระมัดระวัง เพราะในบริเวณนี้จะเกิดรอยชำไต้่ง่ายมาก ส่วนผึ้งในระยะดักแด่ ตัวผึ้งยังคงมีสีขาวทั้งตัว แต่ในระยะนี้เริ่มเห็นส่วนหัว ส่วนอก และส่วนท้องของผึ้งได้อย่างชัดเจน และขั้นตอนการแยกผึ้งจะทำได้ง่ายกว่าผึ้งในระยะตัวอ่อน และในระยะตัวเต็มวัยทั้งผึ้งตัวผู้และผึ้งงาน จะมีสีน้ำตาล จากการสังเกต พบว่าผึ้งตัวผู้มีขนาดของตัวใหญ่กว่าตัวเมีย และสามารถแยกออกจากรังได้ง่าย เพราะในระยะนี้ผึ้งมีความแข็งแรงมากที่สุด รูปที่ 1.3 และจากการสังเกตยังพบอีกว่า ผึ้งงานของผึ้งพันธุ์ มีขนาดของลำตัวใหญ่กว่าผึ้งงานของผึ้งโพรงเล็กน้อย(ในงานวิจัยนี้ไม่มีตัวอย่างผึ้งตัวผู้ของผึ้งโพรง)



ก



ข.



ค



ง

รูปที่ 1.3 แสดงการเจริญในช่วงระยะต่าง ๆ ของผึ้ง ก. ระยะตัวอ่อน ข. ระยะดักแด่ ค. ระยะตัวเต็มวัยตัวผู้ และ ง. ผึ้งงาน

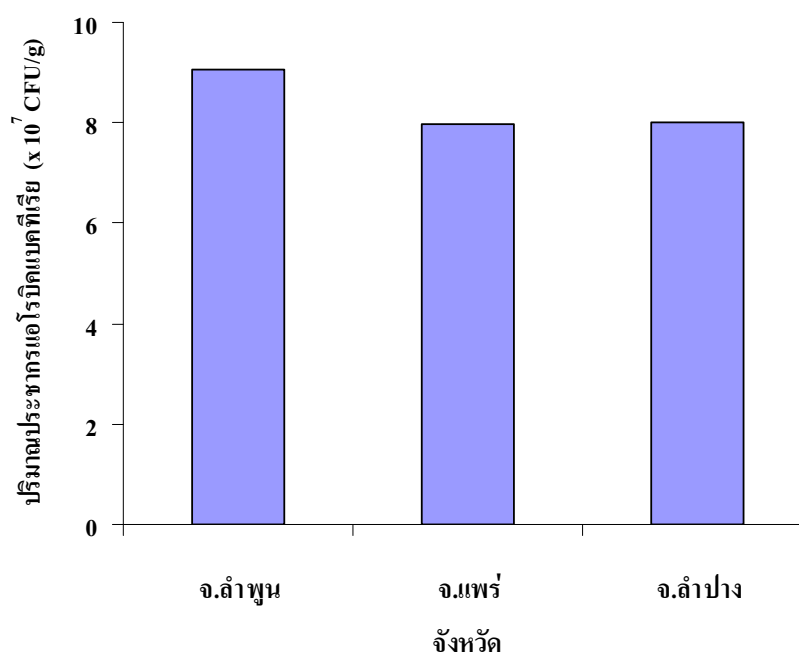
จากการวิจัยเมื่อนำตัวอย่างของฝั้่งทุกช่วงระยะการเจริญมาแยกระบบทางเดินอาหารส่วนกลาง (midgut) เพื่อศึกษาความหลากหลายของแอโรบิคแบคทีเรีย พบว่าทั้งฝั้่งพันธุ์และฝั้่งโพรงมีขนาดของระบบทางเดินอาหารส่วนกลางไม่ต่างกัน คือ ในระยะตัวอ่อนจะมีขนาดของระบบทางเดินอาหารส่วนกลางใหญ่ที่สุด คือมีน้ำหนักโดยเฉลี่ย 0.10 g รองลงมา คือ ฝั้่งในระยะดักแด้ คือมีน้ำหนักโดยเฉลี่ย 0.06 g และในระยะตัวเต็มวัย คือมีน้ำหนักโดยเฉลี่ย 0.03 g ตามลำดับ

2.2 การหาปริมาณประชากรของแอโรบิคแบคทีเรียจากระบบทางเดินอาหารส่วนกลางของฝั้่งโดยใช้เทคนิค Dilution spread plate

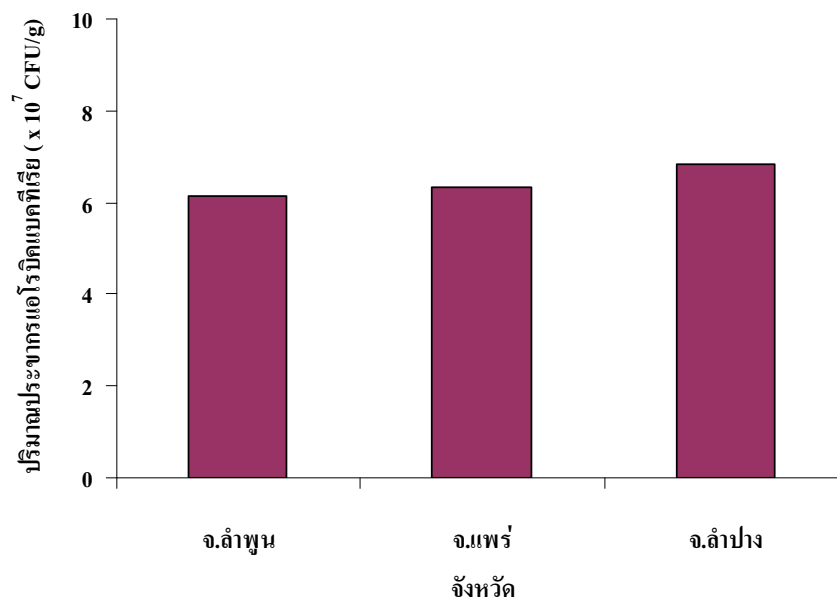
จากการวิจัยนี้ได้ทำการเปรียบเทียบปริมาณประชากรของแอโรบิคแบคทีเรีย (CFU/g) ในฝั้่งทุกช่วงระยะการเจริญทั้งฝั้่งพันธุ์และฝั้่งโพรง โดยการทำให้ Dilution spread plate ลงบนอาหารทดสอบทั้ง 5 ชนิด คือ อาหาร NA, TSA, BHI, EMB และ GB พบว่า สามารถนับปริมาณประชากรของแอโรบิคแบคทีเรียที่ได้จากฝั้่งงานของทั้งฝั้่งพันธุ์และฝั้่งโพรงบนอาหาร NA ได้ปริมาณมากที่สุด และปริมาณประชากรแอโรบิคแบคทีเรียที่คำนวณได้ในฝั้่งพันธุ์ คือ 8.34×10^7 CFU/g และฝั้่งโพรง คือ 6.45×10^7 CFU/g ดังตารางที่ 1.3 และจากการนำปริมาณประชากรของแอโรบิคแบคทีเรียในฝั้่งงานบนอาหาร NA ทั้งฝั้่งพันธุ์และฝั้่งโพรงที่ได้มาจาก 3 จังหวัด คือ จ. ลำพูน จ. แพร่ และ จ. ลำปาง มาเปรียบเทียบกัน พบว่า ฝั้่งพันธุ์ที่ได้มาจากจังหวัดต่างกันมีปริมาณประชากรแอโรบิคแบคทีเรียที่ไม่แตกต่างกัน คือ 9.06×10^7 CFU/g, 7.98×10^7 CFU/g และ 7.99×10^7 CFU/g ตามลำดับ ดังรูปที่ 1.4 และฝั้่งโพรงที่ได้มาจากจังหวัดต่างกันมีปริมาณประชากรแอโรบิคแบคทีเรียที่ไม่แตกต่างกัน คือ 6.15×10^7 CFU/g, 6.35×10^7 CFU/g และ 6.85×10^7 CFU/g ตามลำดับ ดังรูปที่ 1.5 เมื่อเปรียบเทียบปริมาณประชากรแอโรบิคแบคทีเรียทั้งฝั้่งพันธุ์และฝั้่งโพรงที่เก็บมาจากจังหวัดเดียวกัน พบว่า ปริมาณประชากรของแอโรบิคแบคทีเรียที่ได้ไม่มีความแตกต่างกันดังรูปที่ 1.6

ตารางที่ 1.3 ปริมาณประชากรของแอโรบิคแบคทีเรียในทุกช่วงระยะการเจริญของผึ้งพันธุ์ และผึ้งโพรง

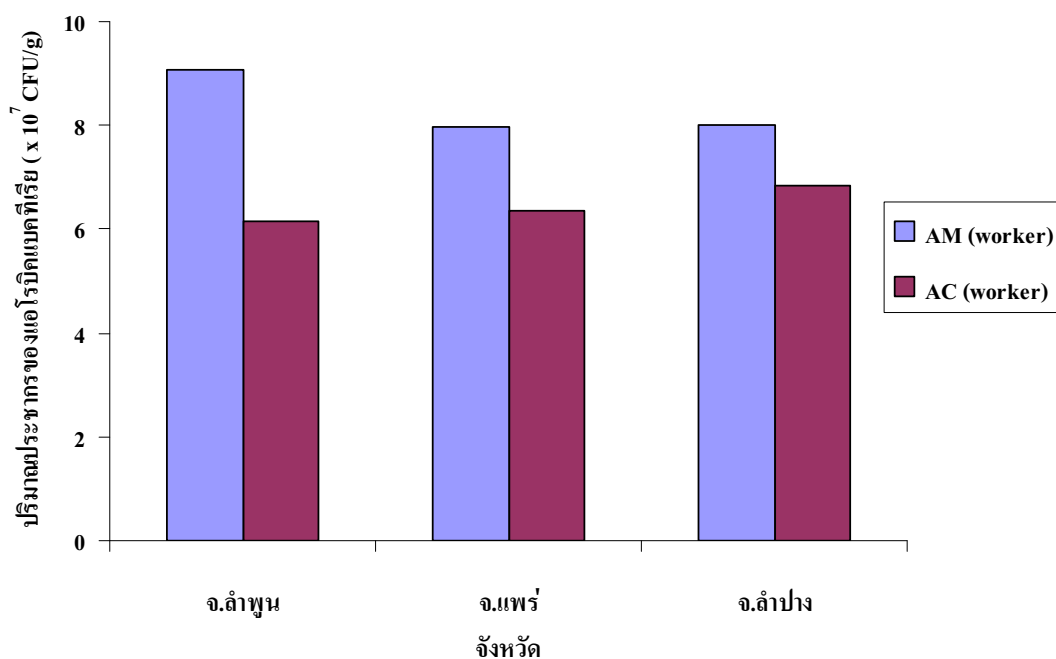
Type & state/media	ผึ้งพันธุ์				ผึ้งโพรง		
	larvae	pupae	drone	worker	larvae	pupae	worker
NA	1.18 x 10^7	2.87 x 10^7	5.54 x 10^7	8.34 x 10^7	1.22 x 10^7	4.00 x 10^7	6.45 x 10^7
TSA	8.10 x 10^6	1.45 x 10^7	4.10 x 10^7	5.67 x 10^7	9.20 x 10^6	1.35 x 10^7	5.20x 10^7
BHI	7.90 x 10^6	1.71 x 10^7	3.89 x 10^7	6.52 x 10^7	1.03 x 10^7	2.32 x 10^7	5.51 x 10^7
EMB	6.90 x 10^5	1.50 x 10^5	1.60 x 10^6	3.30 x 10^6	1.20 x 10^6	1.90 x 10^6	5.40 x 10^6
GB	5.00 x 10^4	3.40 x 10^5	4.50 x 10^5	7.50 x 10^5	1.20 x 10^4	3.10 x 10^5	4.80 x 10^5



รูปที่ 1.4 ปริมาณประชากรแอโรบิกแบคทีเรียที่นับได้บนอาหาร NA ในระยะฝังงานของฝังพันธุ์ที่เก็บมาจาก จ. ลำพูน จ. แพร่ และ จ. ลำปาง ($p < 0.05$)

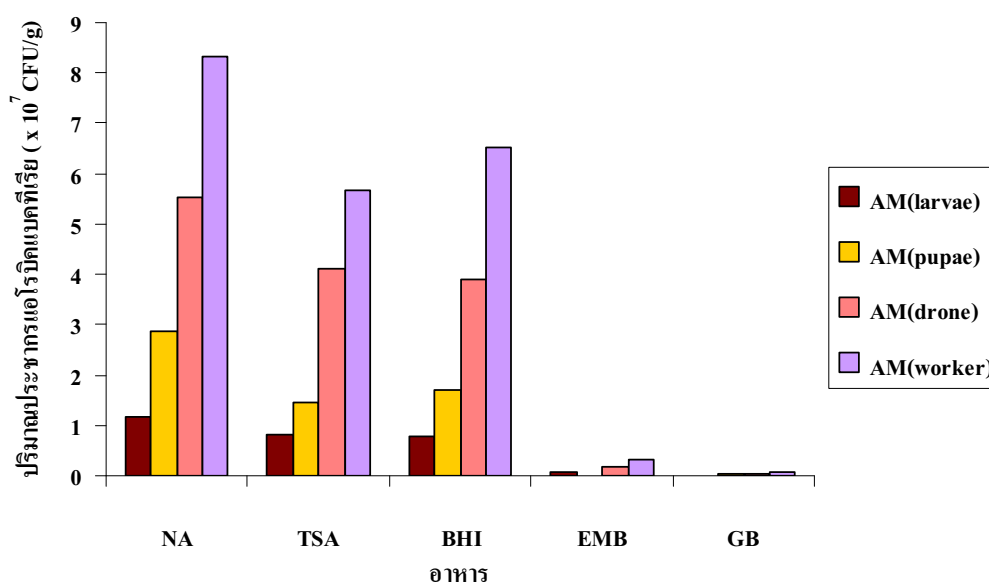


รูปที่ 1.5 ปริมาณประชากรแอโรบิกแบคทีเรียที่นับได้บนอาหาร NA ในระยะฝังงานของฝังโพรงที่เก็บมาจาก จ. ลำพูน จ. แพร่ และ จ. ลำปาง ($p < 0.05$)

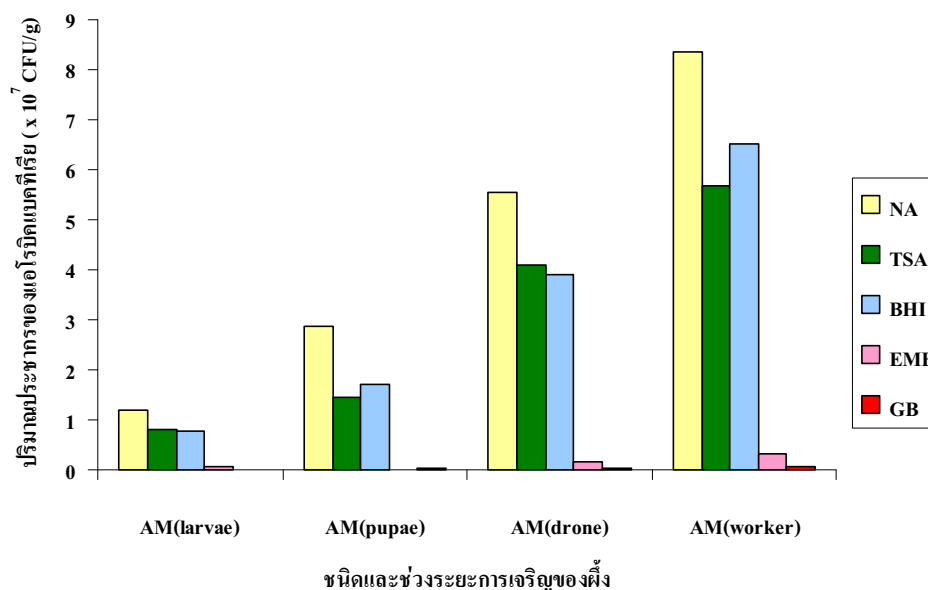


รูปที่ 1.6 ปริมาณประชากรแอโรบิกแบคทีเรียที่นับได้บนอาหาร NA ในระยะฝังงานของฝังพันธุ์และฝังโพรงที่เก็บมาจาก จ. ลำพูน จ. แพร่ และ จ. ลำปาง ($p < 0.05$)

จากการวิจัย พบว่า ในผึ้งพันธุ์เมื่อนำอาหารแต่ละชนิดมาเปรียบเทียบปริมาณประชากรของแอโรบิคแบคทีเรีย (CFU/g) ที่ได้จากทุกช่วงระยะการเจริญ พบว่า อาหารเลี้ยงเชื้อทั้ง 5 ชนิดมีผลทำให้ปริมาณประชากรของแอโรบิคแบคทีเรีย (CFU/g) ที่ได้มีความแตกต่างกันดังนี้ คือ บนทดสอบอาหาร NA มีปริมาณประชากรของแอโรบิคแบคทีเรียมากที่สุดคือ 8.34×10^7 CFU/g รองลงมาคืออาหาร BHI, TSA ในปริมาณที่ไม่ต่างกันคือ 6.52×10^7 และ 5.67×10^7 CFU/g ตามลำดับ อาหาร EMB, GB ในปริมาณเท่า ๆ คือ 3.30×10^6 และ 7.50×10^5 CFU/g ตามลำดับ ดังรูปที่ 1.7 และเมื่อเปรียบเทียบปริมาณประชากรของแอโรบิคแบคทีเรียทุกช่วงระยะการเจริญของผึ้งพันธุ์ พบว่า ในช่วงระยะการเจริญต่าง ๆ ของผึ้งมีผลทำให้ได้ปริมาณประชากรของแอโรบิคแบคทีเรียต่างกัน ดังภาคผนวก ข คือ ในผึ้งงานมีจำนวนประชากรของแอโรบิคแบคทีเรียปริมาณมากที่สุดคือ 8.34×10^7 CFU/g รองลงมาคือ ผึ้งตัวผู้ระยะตัวเต็มวัย คือ 5.54×10^7 CFU/g ผึ้งในระยะดักแด้ คือ 2.87×10^7 CFU/g และผึ้งในระยะตัวอ่อน คือ 1.18×10^7 CFU/g ตามลำดับ ดังรูปที่ 1.8

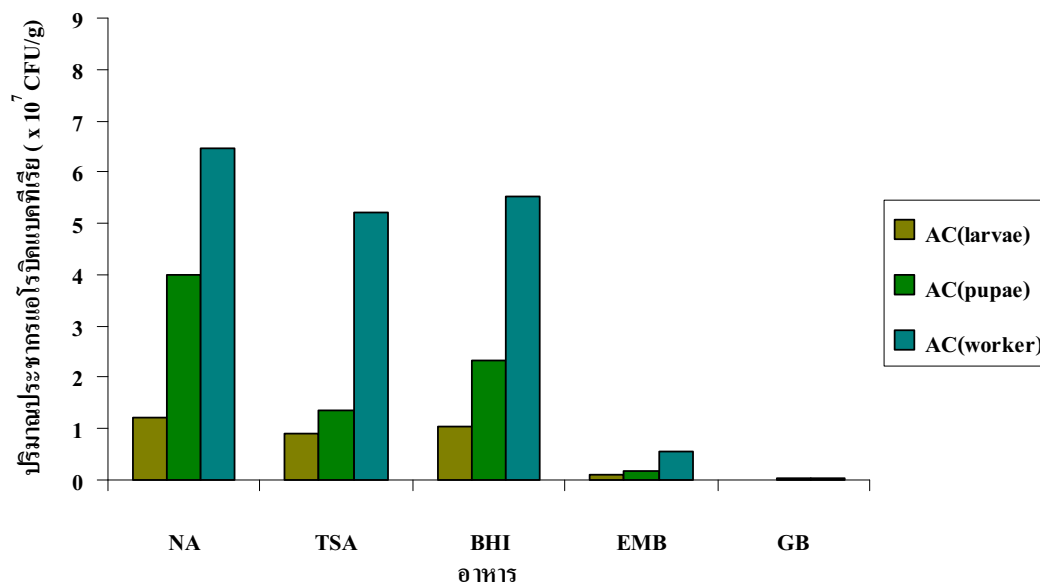


รูปที่ 1.7 ปริมาณประชากรแอโรบิคแบคทีเรียในทุกช่วงระยะการเจริญของผึ้งพันธุ์ที่นับได้แตกต่างกันบนอาหารทั้ง 5 ชนิด ($p < 0.05$)

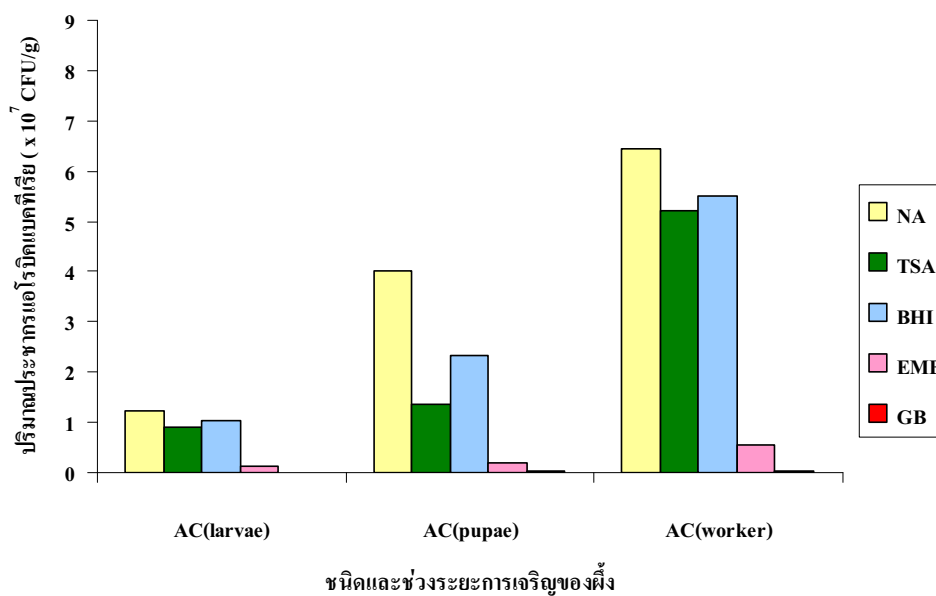


รูปที่ 1.8 ปริมาณประชากรแอโรบิคแบคทีเรียที่นับได้บนอาหารทั้ง 5 ชนิด ในทุกช่วงระยะการเจริญของผึ้งพันธุ์ ($p < 0.05$)

จากการวิจัย พบว่า ในผึ้งโพรงเมื่อนำอาหารแต่ละชนิดมาเปรียบเทียบปริมาณประชากรของแอโรบิคแบคทีเรีย (CFU/g) ที่ได้ในทุกช่วงระยะการเจริญ พบว่า ในอาหารเลี้ยงเชื้อทั้ง 5 ชนิดมีผลทำให้ปริมาณประชากรของแอโรบิคแบคทีเรีย (CFU/g) ที่ได้มีความแตกต่างกันดังนี้คือ ในอาหาร NA, BHI และ TSA มีปริมาณแอโรบิคแบคทีเรียมากที่สุดคือ 6.45×10^7 , 5.51×10^7 และ 5.20×10^7 CFU/g ตามลำดับ รองลงมาคือ อาหาร EMB และ GB ในปริมาณ 5.40×10^6 และ 4.80×10^6 CFU/g ตามลำดับ ดังรูปที่ 1.9 และเมื่อเปรียบเทียบปริมาณประชากรของแอโรบิคแบคทีเรียในช่วงระยะการเจริญต่าง ๆ ของผึ้งโพรง พบว่า ในช่วงระยะการเจริญต่าง ๆ ของผึ้งมีผลทำให้ได้ปริมาณประชากรของแอโรบิคแบคทีเรียต่างกัน คือ ในผึ้งงานมีปริมาณประชากรแอโรบิคแบคทีเรียมากที่สุดคือ 6.45×10^7 CFU/g รองลงมาคือผึ้งในระยะดักแด้ คือ 4.00×10^7 CFU/g และผึ้งในระยะตัวอ่อน คือ 1.22×10^7 CFU/g ตามลำดับ ดังรูปที่ 1.10



รูปที่ 1.9 ปริมาณประชากรแอโรบิคแบคทีเรียในทุกช่วงระยะการเจริญของฝัังโพรงที่นับได้แตกต่างกันบนอาหารทั้ง 5 ชนิด ($p < 0.05$)



รูปที่ 1.10 ปริมาณประชากรแอโรบิคแบคทีเรียที่นับได้บนอาหารทั้ง 5 ชนิด ในทุกช่วงระยะการเจริญของฝัังโพรง ($p < 0.05$)

3. การแยกเชื้อแอโรบิคแบคทีเรียจากระบบทางเดินอาหารส่วนกลางของผึ้ง โดยใช้เทคนิคการแยกเชื้อให้บริสุทธิ์

จากการวิจัย พบว่า สามารถแยกเชื้อแอโรบิคแบคทีเรียบริสุทธิ์จากระบบทางเดินอาหารส่วนกลาง (midgut) ในช่วงการเจริญต่าง ๆ ของผึ้งบนอาหารทดสอบทั้ง 5 ชนิด พบว่า ได้ทั้งหมด 373 ไอโซเลท คือ ได้จากผึ้งพันธุ์ (AM) 223 ไอโซเลท และได้จากผึ้งโพรง (AC) 150 ไอโซเลท จากการวิจัยพบว่า ทั้งในผึ้งพันธุ์ (AM) และผึ้งโพรง (AC) เมื่อเปรียบเทียบจำนวนแอโรบิคแบคทีเรียที่แยกได้ในแต่ละอาหารที่นำมาใช้ทดสอบ พบว่า ในอาหารทดสอบ EMB มีจำนวนแอโรบิคแบคทีเรียมากที่สุด คือ 109 ไอโซเลทและในขณะอาหารทดสอบ NA, TSA และ BHI มีจำนวนแอโรบิคแบคทีเรียไม่แตกต่างกันคือ 68, 71 และ 70 ไอโซเลท ตามลำดับ และอาหารทดสอบ GB มีจำนวนแอโรบิคแบคทีเรียน้อยที่สุดคือ มีเพียงแค่ 55 ไอโซเลท ดังตารางที่ 1.4 และเมื่อเปรียบเทียบจำนวนแอโรบิคแบคทีเรียที่แยกได้ในแต่ละช่วงระยะการเจริญของผึ้ง พบว่า ผึ้งงานทั้งผึ้งพันธุ์และผึ้งโพรงมีจำนวนแอโรบิคแบคทีเรียมากที่สุด รองลงมาคือ ผึ้งพันธุ์ตัวผู้ในระยะตัวเต็มวัย ผึ้งในระยะดักแด้ และผึ้งในระยะตัวอ่อน ตามลำดับ ดังตารางที่ 1.5

ตารางที่ 1.4 จำนวนแอโรบิคแบคทีเรียที่แยกได้จากผึ้งพันธุ์และผึ้งโพรงบนอาหารทดสอบทั้ง

5 ชนิด

อาหารเลี้ยงเชื้อ	จำนวนไอโซเลท		รวม
	ผึ้งพันธุ์	ผึ้งโพรง	
NA	43	25	68
TSA	46	25	71
BHI	41	29	70
GB	33	22	55
EMB	60	49	109
รวม	223	150	373

ตารางที่ 1.5 จำนวนแอโรบิคแบคทีเรียที่แยกได้จากระบบทางเดินอาหารส่วนกลางในทุกช่วงการเจริญของผึ้งพันธุ์และผึ้งโพรง

ช่วงระยะการเจริญ	จำนวนไอโซเลท		รวม
	ผึ้งพันธุ์	ผึ้งโพรง	
ตัวอ่อน (larvae)	52	47	99
ดักแด้ (pupae)	48	50	98
ผึ้งตัวผู้ (drone)	56	-	56
ผึ้งงาน (worker)	67	53	120
รวม	223	150	373

- คือ ไม่มีตัวอย่างของผึ้งโพรงตัวผู้

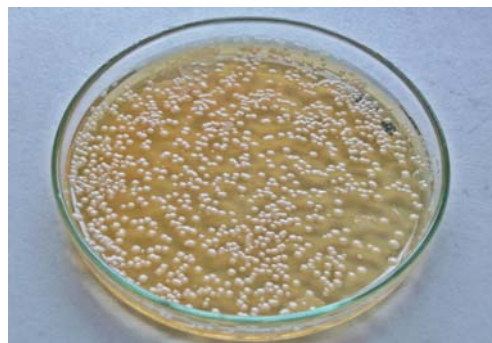
4. การทำบ่งชนิดของเชื้อแอโรบิคแบคทีเรีย

1. การทดสอบคุณสมบัติทางสัณฐานวิทยา (Morphological characteristic)

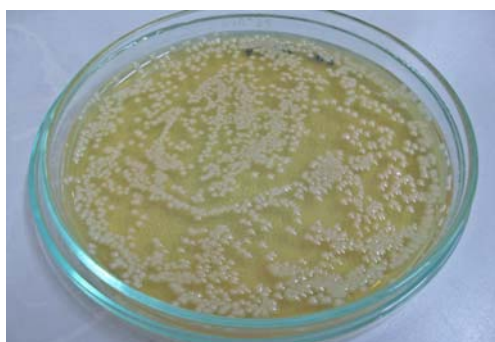
จากงานวิจัยในการทดสอบคุณสมบัติทางสัณฐานวิทยา พบว่า สีของโคโลนี และลักษณะโคโลนีของแบคทีเรียที่แยกได้จาก midgut ของผึ้งพันธุ์และผึ้งโพรง ที่เกิดขึ้นบนอาหารเลี้ยงเชื้อทั้ง 5 ชนิด คือ อาหาร NA BHI TSA GB และ EMB จะมีความแตกต่างกัน ดังรูปที่ 1.11



ก.



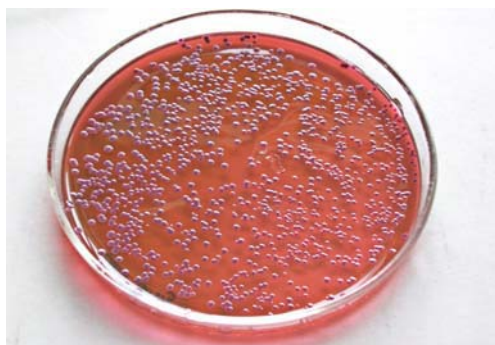
ข.



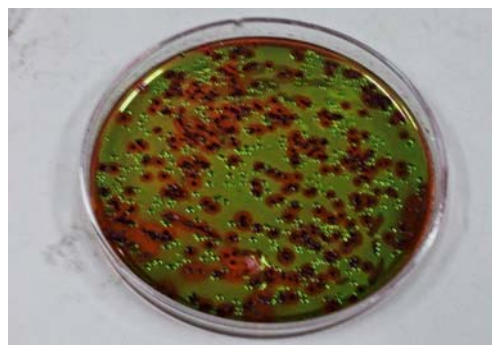
ค.



ง.



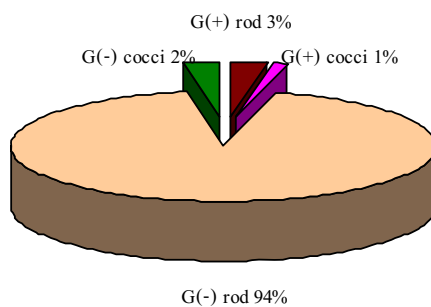
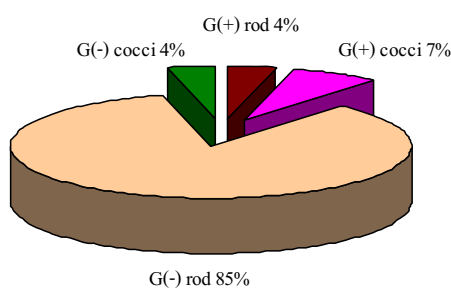
จ.



ฉ.

รูปที่ 1.11 ลักษณะโคโลนีแอโรบิคแบคทีเรียที่แยกได้จาก midgut ของผึ้งพันธุ์และผึ้งโพรง ที่เกิดขึ้นบนอาหารเลี้ยงเชื้อทั้ง 5 ชนิด ก. อาหาร NA ข. อาหาร TSA ค. อาหาร BHI ง. อาหาร GB จ. และ ฉ. อาหาร EMB

และผลจากการนำเชื้อแอโรบิคแบคทีเรียที่แยกได้จากระบบทางเดินอาหารส่วนกลางของผึ้ง มาทำการย้อมสีแกรม พบว่า ในผึ้งพันธุ์และผึ้งโพรงพบแบคทีเรียแกรมลบรูปแท่งมากที่สุด คือ 85% และ 94% ตามลำดับ รองลงมาคือ แกรมบวกรูปแท่ง ดังรูปที่ 1.12



ข

รูปที่ 1.12 แสดงแกรมของแอโรบิคแบคทีเรียที่พบในผึ้งพันธุ์ (ก) และผึ้งโพรง (ข)

2. การทดสอบคุณสมบัติทางชีวเคมี (Biochemical test)

จากการวิจัยสามารถแยกจำนวนแอโรบิกแบคทีเรียได้ทั้งหมด 373 ไอโซเลท คือได้จากผิ้วพันธุ์ 223 ไอโซเลท คือ ได้จาก ผิ้วพันธุ์รังที่ 1 (จ. ลำพูน) จำนวน 83 ไอโซเลท ผิ้วพันธุ์รังที่ 2 (จ. แพร่) จำนวน 69 ไอโซเลท และผิ้วพันธุ์รังที่ 3 (จ. ลำปาง) จำนวน 71 ไอโซเลท และและได้จากผิ้วโพรง 150 ไอโซเลท คือ ได้จาก ผิ้วโพรงรังที่ 1 (จ. ลำพูน) จำนวน 47 ไอโซเลท ผิ้วโพรงรังที่ 2 (จ. แพร่) จำนวน 43 ไอโซเลท และผิ้วโพรงรังที่ 3 (จ. ลำปาง) จำนวน 60 ไอโซเลท ดังตารางที่ 1.6 และ 1.7 จากการวิจัยยังพบว่า ทั้งผิ้วพันธุ์และผิ้วโพรงสามารถแยกเชื้อแอโรบิกแบคทีเรียจากระบบทางเดินอาหารส่วนกลางของผิ้วงานได้มากที่สุด คือ 67 และ 53 ไอโซเลท ตามลำดับ ดังตารางที่ 1.8 และ 1.9 และเมื่อนำเชื้อแอโรบิกแบคทีเรียที่แยกได้ไปทดสอบคุณสมบัติทั้งทางสัณฐานวิทยาและคุณสมบัติทางชีวเคมี แล้วนำไปเทียบกับหนังสือ Bergey's Manual of Determinative Bacteriology Volume 9 พบว่าในผิ้วพันธุ์ สามารถบ่งชนิดของเชื้อแอโรบิกแบคทีเรียได้ทั้งหมด 170 ไอโซเลทและไม่สามารถบ่งชนิดได้จำนวน 53 ไอโซเลท ส่วนในผิ้วโพรงสามารถบ่งชนิดของเชื้อแอโรบิกแบคทีเรียได้ 116 ไอโซเลทและไม่สามารถบ่งชนิดได้เป็นจำนวน 34 ไอโซเลท และกลุ่มของแอโรบิกแบคทีเรียที่พบมากที่สุดทั้งในผิ้วพันธุ์และผิ้วโพรง คือ กลุ่ม *Gramma* – *proteobacteria* ได้แก่ *Pseudomonas*, *Enterobacter* และ *Escherichia* และจากการวิจัยพบว่าทั้งในผิ้วพันธุ์และผิ้วโพรงพบ *Pseudomonas* ในผิ้วงานบนอาหาร BHI มากที่สุด ส่วน *Enterobacter* และ *Escherichia* พบในผิ้วงานบนอาหาร EMB มากที่สุด ดังตารางที่ 1.10 และ 1.11 จากการวิจัยยังพบกลุ่มของแอโรบิกแบคทีเรียที่พบในผิ้วพันธุ์แต่ไม่พบในผิ้วโพรง คือ *Lactobacillus* และ *Streptococcus* และเมื่อเปรียบเทียบการบ่งชนิดของไอโซเลทที่แยกได้จากผิ้วพันธุ์และผิ้วโพรงที่นำมาจากจังหวัดเดียวกันพบว่า ได้กลุ่มของแอโรบิกแบคทีเรียที่ไม่แตกต่างกัน

ตารางที่ 1.6 จำนวนแอโรบิคแบคทีเรียที่แยกได้จากผิ้วพันธุ์ที่ได้จากจังหวัดต่าง ๆ

Genus	จำนวนไอโซเลท			รวม
	จ.ลำพูน (AM1)	จ.แพร่ (AM2)	จ.ลำปาง (AM3)	
<i>Pseudomonas</i>	14	31	27	72
<i>Enterobacter</i>	19	18	10	47
<i>Escherichia</i>	2	2	7	11
<i>Staphylococcus</i>	9	1	0	10
<i>Gluconobacter</i>	2	3	4	9
<i>Serratia</i>	6	0	1	7
<i>Streptococcus</i>	5	0	0	5
<i>Bacillus</i>	2	1	1	4
<i>Lactobacillus</i>	0	4	0	4
<i>Proteus</i>	1	0	0	1
Unknown	9	23	21	53
รวม	69	83	71	223

ตารางที่ 1.7 จำนวนแอโรบิคแบคทีเรียที่แยกได้จากผิ้วโพรงที่ได้จากจังหวัดต่าง ๆ

Genus	จำนวนไอโซเลท			รวม
	จ.ลำพูน (AC1)	จ.แพร่ (AC2)	จ.ลำปาง (AC3)	
<i>Pseudomonas</i>	17	6	21	44
<i>Enterobacter</i>	11	9	7	27
<i>Escherichia</i>	6	4	12	22
<i>Gluconobacter</i>	4	5	4	13
<i>Serratia</i>	5	1	0	6
<i>Bacillus</i>	2	0	0	2
<i>Staphylococcus</i>	1	0	0	1
<i>Proteus</i>	1	0	0	1
<i>Streptococcus</i>	0	0	0	0
<i>Lactobacillus</i>	0	0	0	0
Unknown	1	17	16	34
รวม	47	43	60	150

ตารางที่ 1.8 จำนวนแอโรบิคแบคทีเรียที่แยกได้จากผึ้งพันธุ์ในระยะเวลาเจริญต่าง ๆ

Genus	จำนวนไอโซเลท				รวม
	larvae	pupae	drone	worker	
<i>Pseudomonas</i>	11	18	14	29	72
<i>Enterobacter</i>	11	10	11	15	47
<i>Escherichia</i>	2	4	3	2	11
<i>Staphylococcus</i>	5	0	3	2	10
<i>Gluconobacter</i>	2	3	3	1	9
<i>Serratia</i>	1	2	1	3	7
<i>Streptococcus</i>	2	1	1	1	5
<i>Lactobacillus</i>	0	1	2	1	4
<i>Bacillus</i>	0	0	3	1	4
<i>Proteus</i>	0	1	0	0	1
Unknown	18	8	15	12	53
รวม	52	48	56	67	223

ตารางที่ 1.9 จำนวนแอโรบิคแบคทีเรียที่แยกได้จากผึ้งโพรงในระยะเวลาเจริญต่าง ๆ

Genus	จำนวนไอโซเลท			รวม
	larvae	pupae	worker	
<i>Pseudomonas</i>	12	15	17	44
<i>Enterobacter</i>	11	9	7	27
<i>Escherichia</i>	6	7	9	22
<i>Gluconobacter</i>	1	4	8	13
<i>Serratia</i>	1	4	1	6
<i>Bacillus</i>	0	2	0	2
<i>Proteus</i>	1	0	0	1
<i>Staphylococcus</i>	0	0	1	1
<i>Streptococcus</i>	0	0	0	0
<i>Lactobacillus</i>	0	0	0	0
Unknown	15	9	10	34
รวม	47	50	53	150

ตารางที่ 1.10 จำนวนแอโรบิคแบคทีเรียที่แยกได้จากผิ้วพันธุ์ที่ได้จากอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดต่าง ๆ

Genus	จำนวนไอโซเลท					รวม
	NA	TSA	BHI	GB	EMB	
<i>Pseudomonas</i>	12	21	39	0	0	72
<i>Enterobacter</i>	0	0	0	0	47	47
<i>Escherichia</i>	0	0	0	0	11	11
<i>Gluconobacter</i>	0	0	0	9	0	10
<i>Serratia</i>	2	4	1	0	0	9
<i>Bacillus</i>	2	2	0	0	0	7
<i>Staphylococcus</i>	3	7	0	0	0	5
<i>Proteus</i>	0	0	1	0	0	4
<i>Streptococcus</i>	1	3	1	0	0	4
<i>Lactobacillus</i>	4	0	0	0	0	1
Unknown	19	8	0	24	2	53
รวม	43	45	42	33	60	223

ตารางที่ 1. 11 จำนวนแอโรบิคแบคทีเรียที่แยกได้จากผิ้วโพรงที่ได้จากอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดต่าง ๆ

Genus	จำนวนไอโซเลท					รวม
	NA	TSA	BHI	GB	EMB	
<i>Pseudomonas</i>	7	15	22	0	0	44
<i>Enterobacter</i>	0	0	0	0	27	27
<i>Escherichia</i>	0	0	0	0	22	22
<i>Gluconobacter</i>	0	0	0	13	0	13
<i>Serratia</i>	4	0	2	0	0	6
<i>Bacillus</i>	0	2	0	0	0	2
<i>Staphylococcus</i>	1	0	0	0	0	1
<i>Proteus</i>	0	0	1	0	0	1
<i>Streptococcus</i>	0	0	0	0	0	0
<i>Lactobacillus</i>	0	0	0	0	0	0
Unknown	13	8	0	9	0	34
รวม	25	25	29	22	49	150

วิจารณ์ผลการทดลอง

จากการวิจัยได้ทำการศึกษาความหลากหลายของแอโรบิคแบคทีเรียในระบบทางเดินอาหาร ส่วนกลางของผีงป่า คือ ผีงหลวง และ ผีงมีม ศึกษา และ ผีงเลี้ยง คือ ผีงพันธุ์และผีงโพรงโดยการแยก แบคทีเรียลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ 5 ชนิดคือ NA, TSA, BHI, EMB และ GB นับจำนวนแบคทีเรียโดยวิธี Standard plate count และ จัดจำแนกชนิดของแบคทีเรียในระดับจิ้นส์ โดยใช้วิธีการทางชีวเคมี (Buchanan *et al.*, 1974) ผลจากการศึกษาพบว่าจำนวนแบคทีเรียในทางเดินอาหารส่วนกลางของ ผีงป่า โดย ผีงหลวงมีมากกว่าผีงมีมซึ่งมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญที่ $P < 0.05$ และในอาหารเลี้ยงเชื้อชนิด nutrient agar จะมีปริมาณของแบคทีเรียมากที่สุดเมื่อเปรียบเทียบกับอาหารเลี้ยงเชื้อ อีก 4 ชนิด เนื่องจาก nutrient agar เป็นอาหารพื้นฐานที่แบคทีเรียทุกชนิดสามารถเจริญได้จึงทำให้มีจำนวนแบคทีเรียมากที่สุด เมื่อพิจารณาจากน้ำหนักของตัวอย่าง (mid gut) ซึ่งในผีงหลวงที่มีน้ำหนักมากกว่าผีงมีมแล้วแสดงให้เห็นว่าน้ำหนักของระบบทางเดินอาหารส่วนกลาง ไม่ส่งผลต่อจำนวนของแบคทีเรีย และ จากผลการวิจัยการเปรียบเทียบปริมาณประชากรของแอโรบิคแบคทีเรีย (CFU/g) ใน ผีงเลี้ยงไทย ทุกช่วงระยะการเจริญของผีง ชนิดอาหารเลี้ยงเชื้อ ในผีงเลี้ยงไทยพบว่า ผีงพันธุ์ คือ 8.34×10^7 CFU/g และผีงโพรง คือ 6.45×10^7 CFU/g ดังผลงานการวิจัยของ Broderick ในปี ค.ศ. 2003 ซึ่งได้ทำการประเมินประชากรแบคทีเรียในระบบทางเดินอาหาร ส่วนกลาง (midgut) Gypsy moth larvae ด้วยอาหารเลี้ยงเชื้อหลายชนิด พบว่ามีปริมาณประชากรแบคทีเรียประมาณ 4×10^8 CFU/g เนื่องจากขนาดของระบบทางเดินอาหารส่วนกลางของ ผีงพันธุ์ มีขนาดเท่า ๆ กับผีงโพรง (สิริวัฒน์, 2529) และจากการวิจัยช่วงน้ำหนัก midgut ของผีงพันธุ์ยังมีน้ำหนักเท่ากับผีงโพรงอีกด้วย แอโรบิคแบคทีเรียจึงมีพื้นที่อาศัยใน midgut ผีงไม่แตกต่างกัน ช่วงระยะการเจริญของผีง ชนิดอาหารเลี้ยงเชื้อแบคทีเรีย และสถานที่ในการเลี้ยงผีง มีผลต่อปริมาณประชากรของแอโรบิคแบคทีเรียในผีงเลี้ยงในแต่ละชนิด โดยในการศึกษาปัจจัยทางอาหารเลี้ยงเชื้อ นั้นพบว่า อาหาร Nutrient Agar มีปริมาณประชากรแอโรบิคแบคทีเรียมากที่สุด รองลงมาคืออาหาร Brain Hart Infusion และ Tryptic Soy Agar ในผีงพันธุ์ ส่วนในผีงโพรงทั้งสามชนิดให้ปริมาณประชากรแอโรบิคแบคทีเรียมากที่สุดโดยที่ไม่ต่างกันทางสถิติที่ $p < 0.05$ สำหรับประชากรของแอโรบิคแบคทีเรียบนอาหาร Eosin metylene blue Agar และ Gluconobacter Agar นั้นเป็นอาหารในกลุ่ม selective bacteria media จึงได้ประชากรแอโรบิคแบคทีเรียที่จำเพาะกลุ่ม ทำให้มีปริมาณประชากรแอโรบิคแบคทีเรียน้อยกว่าอาหารในกลุ่ม universal bacteria media แต่เนื่องจากอาหาร Eosin metylene blue Agar เป็นอาหารในกลุ่ม selective bacteria media มีสารยับยั้งการเจริญของกลุ่มแบคทีเรียแกรมบวก ส่งเสริมการเจริญของกลุ่มแบคทีเรียแกรมลบ จุลินทรีย์ชนิดอื่นเจริญได้ยาก

ระยะการเจริญมีผลต่อปริมาณประชากรของแอโรบิคแบคทีเรียตัวหนอนเช่นกัน ในฝั่เลี้ยงทั้งสองชนิดนั้น ช่วงระยะตัวเต็มวัยในวรรณะฝั่งาน มีจำนวนประชากรของแอโรบิคแบคทีเรียมากที่สุด เนื่องจากฝั่ตัวเต็มวัยในระยะนี้เป็นกลุ่มที่ออกหาอาหาร จึงมีแบคทีเรียในกลุ่มต่าง ๆ ที่อยู่ติดอกไม้ น้ำหวาน เกสรดอกไม้ เมื่อแบคทีเรียเหล่านี้สัมผัสกับกับ และเข้าไปในตัวของฝั่งาน จึงส่งผลให้ฝั่ตัวเต็มวัยวรรณะฝั่งานของฝั่เลี้ยงทั้งสองชนิดมีในปริมาณประชากรของแอโรบิคแบคทีเรียมากที่สุด สำหรับฝั่ตัวเต็มวัยในวรรณะตัวผู้ (ฝั่โพรงไม่มีตัวอย่างในวรรณะตัวผู้) ไม่ได้มีหน้าที่ในการหาอาหาร จะมีหน้าที่เพียงแค่การผสมพันธุ์ และรับอาหารจากฝั่งาน จึงทำให้มีปริมาณของแอโรบิคแบคทีเรียที่มากเช่นกัน แต่มีน้อยกว่าฝั่งาน ส่วนฝั่ในระยะดักแด้ จะได้รับสารอาหารที่ป้อนจากฝั่งานเท่านั้น อีกทั้งไม่ได้สัมผัสกับสิ่งแวดล้อมอื่น โดยอาศัยเพียงแค่เซลล์เพื่อพักตัวช่วงระยะตัวเต็มวัย จึงทำให้ปริมาณประชากรของแอโรบิคแบคทีเรียน้อยกว่าฝั่ในช่วงระยะตัวเต็มวัย ส่วนฝั่ในระยะตัวอ่อนนั้นเป็นระยะที่ฝั่งานเริ่มต้นให้อาหาร และเริ่มมีการเจริญของระบบทางเดินอาหาร จึงทำให้ฝั่ในระยะตัวอ่อนนี้มีปริมาณประชากรของแอโรบิคแบคทีเรียน้อยที่สุดในช่วงระยะการเจริญเติบโตของฝั่

เมื่อจำแนกชนิดของแอโรบิคแบคทีเรีย โดยนำไปทดสอบทางชีวเคมีโดยจำแนกตามหนังสือ Bergey's Manual of Determinative Bacteriology Volume 9 ใน ฝั่ป่า คือฝั่หลวงและฝั่มิมพบแบคทีเรียในกลุ่ม *Pseudomonas aeruginosa*, *Streptococcus faecalis*, *Staphylococcus epidermidis*, *Serratia marcescens*, *Proteus vulgaris*, *Gluconobacter* sp., *Enterobacter gergoviae*, *Enterobacter cloaca*, *Enterobacter aerogenes*, *Enterobacter aerogenes*, *Enterobacter taylorae*, *Escherichia coli*, *Bacillus* sp., *Lactobacillus* sp. และ *Corynebacterium* sp. จากผลที่ได้สอดคล้องกับการศึกษาของ Jeyaprakash (2003) และคณะ ที่ได้ศึกษาความหลากหลายของแบคทีเรียในฝั่งานโดยใช้ 16S rRNA พบแบคทีเรียในจีโนส *Lactobacillus* sp., *Bifidobacterium* sp., *Gluconobacter* sp., *Serratia* sp., *Corynebacterium* sp. ในรายงานของ Gilliam (1997) ได้ศึกษาบทบาทของจุลินทรีย์ที่ไม่ก่อโรคในฝั่ พบ แบคทีเรียในจีโนส *Bacillus* sp., *Enterobacter* sp. เป็นส่วนใหญ่ นอกจากนี้ยังพบแบคทีเรียในจีโนส *Lactobacillus*, *Corynebacterium* และ *Bifidobacterium* และ เมื่อจำแนกชนิดของแอโรบิคแบคทีเรีย ในฝั่เลี้ยง คือ ฝั่พันธุ์และฝั่โพรง พบแอโรบิคแบคทีเรียในดิวิชัน *Gamma* – proteobacteria โดยแบ่งเป็นจีโนสที่พบมากที่สุดได้ดังนี้คือ แบคทีเรียกลุ่ม *Pseudomonas*, *Enterobacter* และ *Escherichia* ดังการศึกษาของ Broderick ในปี ค.ศ. 2003 ที่ศึกษาประชากรแบคทีเรียใน midgut ของ Gypsy moth larvae midgut ในสหรัฐอเมริกาซึ่งพบว่าแบคทีเรียที่พบมากที่สุด คือ แบคทีเรียกลุ่ม *Gamma* – proteobacteria ซึ่งสอดคล้องกับการศึกษาของ More และ Tebbe ในปี ค.ศ. 2006 ที่ได้ศึกษาความหลากหลายของแบคทีเรียใน midgut ของฝั่ทั้งสามชนิดในทุ่ง rape seed oil ในประเทศเยอรมัน พบว่ากลุ่มแบคทีเรียที่พบมากที่สุด คือ *Alpha*, *Beta* และ *Gamma* – proteobacteria ตลอดจนการศึกษาคความหลากหลายของแบคทีเรียใน midgut ของ Longhorn beetle ในประเทศเกาหลี ซึ่งพบแบคทีเรียในกลุ่ม *Gamma* – proteobacteria และ *Actinobacterium* มากที่สุด

ปัจจัยที่ทำให้มีจำนวนและชนิดของแบคทีเรียแตกต่างกันขึ้นอยู่กับแหล่งที่อยู่อาศัย แหล่งอาหารของผึ้ง ซึ่งโดยทั่วไปแล้วผึ้งทั้งสองชนิดนี้จะมีพฤติกรรมที่แตกต่างกันคือ ผึ้งหลวงเป็นผึ้งที่มีขนาดใหญ่ จึงสามารถบินไปหาอาหารได้ไกล พฤติกรรมของผึ้งหลวงจะชอบทำรังในที่โล่งแจ้งและอยู่ที่สูง ส่วนผึ้งมีมมีรังรังทำติดอยู่กับกิ่งไม้ ในพุ่มไม้เตี้ย ๆ เช่น ในกอไผ่ การบินไปหาแหล่งอาหารและการส่งภาษาผึ้งจะกระทำอยู่บนส่วนของรวง เนื่องจากเป็นผึ้งขนาดเล็กและบินหาอาหารได้ไม่ไกลนัก โดยทั่วไปแล้วแบคทีเรียที่พบในระบบทางเดินอาหารส่วนกลางของผึ้งนั้นมักเกี่ยวข้องกับชนิดอาหารของผึ้ง เช่น ในรายงานของ Inglis และคณะ (1993) ได้ศึกษากลุ่มของจุลินทรีย์ที่มีความสัมพันธ์กับผึ้ง โดยศึกษาจาก น้ำหวานดอกไม้ เกสรดอกไม้ ระบบทางเดินอาหารของผึ้ง และของเสียจากตัวผึ้ง จากการศึกษาแบคทีเรียในจีส *Bacillus* sp., *Corynebacterium* sp., *Micrococcus* sp. และ แอกติโนมัยซีส (Actinomycetes) จีส *Streptomyces* sp. จะพบทั่วไปในเกสรดอกไม้ จากงานวิจัยนี้สามารถนำไปพัฒนาต่อยอดในการทดสอบคุณสมบัติในการสร้างสารปฏิชีวนะ (antibiotic) เพื่อยับยั้งจุลินทรีย์ก่อโรคผึ้งและทำเป็นอาหารเสริมเพื่อช่วยให้ผึ้งมีความต้านทานต่อโรคได้ต่อไป

จากการคัดเลือกแอโรบิกแบคทีเรียที่มีความสามารถในการยับยั้งเชื้อก่อโรคในผึ้ง ทางเดินอาหารส่วนกลางของผึ้งป่า คือ ผึ้งหลวงและผึ้งมีม ได้ 366 ไอโซเลท พบ 5 ไอโซเลท ที่มีความสามารถการสร้างสารยับยั้งเชื้อก่อโรคผึ้งทั้ง 3 ชนิด ได้ คือเชื้อแบคทีเรียในกลุ่ม *Bacillus* sp. ซึ่งสอดคล้องกับการศึกษาของ Alippi ในปี ค.ศ. 2005 ที่ได้มีการศึกษาการยับยั้ง *Paenibacillus larvae* ที่ก่อโรคอเมริกันฟาวบรูตของ Aerobic spore - forming bacteria ที่แยกได้จากแหล่งเลี้ยงผึ้งในประเทศอาร์เจนตินา พบว่า เชื้อในกลุ่ม *Bacillus* 10 ไอโซเลทสามารถยับยั้งเชื้อก่อโรคนี้ได้ จึงเป็นที่สนใจในการศึกษาแบคทีเรียที่มีความสัมพันธ์กับผึ้ง เพื่อประโยชน์ในการประยุกต์ใช้ในอุตสาหกรรมการเลี้ยงผึ้งที่สร้างรายได้สูงให้แก่ประเทศต่อไปในอนาคต

สรุปผลการทดลอง

จากการศึกษาการหาปริมาณประชากรของแอโรบิกแบคทีเรียที่แยกได้จากระบบทางเดินอาหารส่วนกลางของผึ้งป่าคือ ผึ้งหลวงและผึ้งมีม โดยวิธี standard plate count จำนวนประชากรแบคทีเรียในอาหารเลี้ยงเชื้อ nutrient agar มากที่สุด ดังนี้ $1.7488 \pm 0.02055 \times 10^7$ CFU/g และ $1.4610 \pm 0.02758 \times 10^7$ CFU/g ในผึ้งหลวงและผึ้งมีมตามลำดับ และปริมาณประชากรของแอโรบิกแบคทีเรียในระบบทางเดินอาหารส่วนกลางของผึ้งเลี้ยง คือ ผึ้งพันธุ์ และผึ้งโพรง สามารถนับปริมาณประชากรแอโรบิกแบคทีเรียของผึ้งงานบนอาหาร Nutrient agar ได้มากที่สุด และจำนวนประชากรของแอโรบิกแบคทีเรียที่ได้ในผึ้งพันธุ์ คือ 8.34×10^7 CFU/g และผึ้งโพรง คือ 6.40×10^7 CFU/g และผลการศึกษาการเปรียบเทียบปริมาณประชากรของแอโรบิกแบคทีเรีย (CFU/g) สามารถบอกได้ว่าช่วงระยะการเจริญต่าง ๆ ของผึ้งและอาหารที่ใช้เลี้ยงเชื้อที่ต่างชนิดกันมีผลทำให้

ได้ปริมาณประชากรของแอโรบิกแบคทีเรีย (CFU/g) ที่แตกต่างกัน ส่วนแหล่งที่เลี้ยงไม่มีผลต่อปริมาณประชากรของแอโรบิกแบคทีเรียในระบบทางเดินอาหารส่วนกลาง ของผึ้งทั้งสองชนิด

จากการแยกเชื้อแบคทีเรียในผึ้งป่า คือ ผึ้งหลวงและผึ้งมิม ได้จำนวนไอโซเลททั้งหมดคือ 182 และ 184 ไอโซเลท ตามลำดับ ส่วนผลการบ่งชี้แอโรบิกแบคทีเรียตามชีวเคมี พบ *Pseudomonas aeruginosa*, *Streptococcus faecalis*, *Staphylococcus epidermidis*, *Serratia marcescens*, *Proteus vulgaris*, *Gluconobacter* sp. *Enterobacter gergoviae*, *Enterobacter cloaca*, *Enterobacter aerogenes*, *Enterobacter aerogenes*, *Enterobacter taylorae*, *Escherichia coli*, *Bacillus* sp., *Lactobacillus* sp. และ *Corynebacterium* sp. จากการบ่งชี้ของเชื้อแอโรบิกแบคทีเรียของผึ้งเลี้ยง คือ ผึ้งพันธุ์และผึ้งโพรง พบแกรมลบรูปแท่งมากที่สุด ในผึ้งพันธุ์พบแอโรบิกแบคทีเรียทั้งหมด 223 ไอโซเลท และผึ้งโพรง 150 ไอโซเลท กลุ่มของแอโรบิกแบคทีเรียที่พบมากที่สุดทั้งในผึ้งพันธุ์และผึ้งโพรง คือ กลุ่ม γ -proteobacteria โดยแบ่งเป็นกลุ่ม 3 จินัสที่พบมากที่สุด คือ กลุ่ม *Pseudomonas* กลุ่ม *Enterobacter* และ *Escherichai* ตามลำดับ และจากการคัดเลือกเชื้อแอโรบิกแบคทีเรียของผึ้งป่าที่มีความสามารถในการยับยั้งเชื้อก่อโรคในผึ้ง พบว่าเชื้อแบคทีเรียในกลุ่ม *Bacillus* sp. สามารถยับยั้งเชื้อก่อโรคในผึ้งได้เช่นกัน

บทที่ 2

แอกติโนมัยซีท¹

บทนำ

ในรังของแมลงสังคม เช่น มด ตัวต่อ ผึ้ง และปลวก มักเป็นแหล่งที่มีความหลากหลายทางจุลินทรีย์ ปัจจุบันนี้ได้มีการศึกษาจุลินทรีย์ที่อาศัยอยู่ร่วมกับผึ้ง อาหารและวัสดุภายในรังผึ้ง โดยมักพบจุลินทรีย์ในกลุ่มของแบคทีเรีย รา และยีสต์และเชื่อว่าจุลินทรีย์เหล่านี้มีส่วนช่วยในกระบวนการเปลี่ยนแปลงทางชีวเคมีในลำไส้ของผึ้ง การเก็บรักษาเกสรในรังผึ้ง รวมไปถึงการสร้างสารยับยั้งการเจริญของราที่ก่อโรคในผึ้ง แต่ยังไม่มีการรายงานถึงการแยกเชื้อแอกติโนมัยซีทจากรังผึ้ง นอกจากนี้ มีผู้ศึกษาและแยกเชื้อแอกติโนมัยซีทที่อาศัยอยู่ร่วมกับมดซึ่งอยู่ในจีนัส *Pseudonocardia* และสามารถสร้างสารยับยั้งการเจริญของราในจีนัส *Escovopsis* ซึ่งเป็นปรสิตของมด

แอกติโนมัยซีทจัดเป็นแบคทีเรียที่มีลักษณะเป็นเส้นใยคล้ายฟางใจแต่มีขนาดเล็กกว่า คือมีขนาดประมาณ 0.5-1.5 ไมโครเมตร ประกอบด้วยส่วนที่เรียกว่า apical region และ intercalary region สร้างผนังกันเส้นใยแบบต่างขึ้นอยู่กับชนิดของเชื้อ การแตกสาขาเส้นใยเป็นแบบ monopodial เป็นแบบที่พบได้บ่อยที่สุด พบใน *Streptomyces* แบบ dichotomous พบใน *Actinobifida* และแบบ verticillate พบใน *Streptoverticillium* แอกติโนมัยซีทส่วนใหญ่มีการสร้างเส้นใย 2 ชนิด คือ primary (substrate) mycelium และ second (aerial) mycelium

มีงานวิจัยที่มีการรายงานถึงการแยกและการบ่งชี้ชนิดของแอกติโนมัยซีทที่อาศัยร่วมกับแมลงสังคมเช่น มด โดย Curie และคณะ (1999) ได้ทำการแยกเชื้อแอกติโนมัยซีทจากตัวมด 4 จีนัส คือ *Myrmicrocryta*, *Apterostigma*, *Acromyrmex* และ *Atta* โดยในมดกลุ่มดังกล่าวมีการเพาะเลี้ยงราไว้เป็นอาหาร จากลักษณะทางสัณฐานวิทยาและการทดสอบทางด้านชีวเคมีพบว่าเชื้อแอกติโนมัยซีทที่อยู่บนตัวมดนั้นอยู่ในจีนัส *Streptomyces* โดยเชื้อ *Streptomyces* ดังกล่าวสามารถสร้างสารส่งเสริมการเจริญของราที่มดเพาะเลี้ยงและ สร้างสารยับยั้งการเจริญของรา *Escovopsis* ที่เป็นปรสิตอย่างจำเพาะเจาะจง และจากงานวิจัยต่อมาของ Curie (2005) ใช้การวิเคราะห์ทาง Phylogenetic ในการบ่งชี้ชนิดของเชื้อดังกล่าวใหม่ (re-identify) พบว่าลำดับเบสของแอกติโนมัยซีทดังกล่าวจัดอยู่ใน Family *Pseudonocardiaceae* (Actinomycetales) Genus *Pseudonocardia* ปัจจุบันนี้จุลินทรีย์ที่อาศัยร่วมกับผึ้งได้รับความสนใจเป็นอย่างมาก จากการศึกษาของ Inglis และคณะ (1993) บ่งชี้ชนิดของเชื้อจุลินทรีย์ที่อาศัยอยู่ร่วมกับ leafcutter bee (*Megachile rotundata*) จากตัวอย่าง น้ำผึ้ง เกสร อาหาร ลำไส้ และสารคัดหลั่งเพื่อที่จะศึกษาความหลากหลายจุลินทรีย์ โดยพบจุลินทรีย์ที่จัดอยู่ในกลุ่มของยีสต์มากที่สุดจากตัวอย่างของ น้ำหวาน เกสร อาหาร แต่พบน้อยในลำไส้หรือสารคัดหลั่ง โดยยีสต์ที่พบคือ *Candida bombicola*, *Cryptococcus albidus*, *Metschnikowia reukaufii*, และ *Rhodotorula glutinis*. นอกจากนี้ยังพบจุลินทรีย์ในกลุ่มของราคือ *Alternaria alternate*, *Cladosporium cladosporioides*, *C. herbarum*, *Epicoccum nigrum*, and

¹ ตีพิมพ์ในวารสาร World Journal of Microbiology Biotechnology

Penicillium chrysogenum และ แอคติโนมัยซีทที่พบอยู่ในจีนัส *Streptomyces* โดยทั่วไปความหลากหลายของจุลินทรีย์ที่พบในทางเดินอาหารและสารคัดหลั่งจะน้อยกว่าที่พบจากน้ำหวานอาหาร และเกสร โดยแบคทีเรียที่พบได้แก่ *Bacillus firmus*, *B. licheniformis*, *B. megaterium*, *B. pumilus*, and *Streptomyces* spp. และราได้แก่ *Trichosporonoides megachiliensis* โดยจุลินทรีย์ดังกล่าวคาดว่าจะจะเป็นจุลินทรีย์ที่อาศัยอยู่ในทางเดินอาหารของผึ้ง จากการศึกษากของ Gillium (1997) ได้รวบรวมข้อมูลของจุลินทรีย์ที่อาศัยอยู่ร่วมกับผึ้ง *Apis mellifera* และอาหาร โดยพบแบคทีเรีย เช่น Gram-variable pleomorphic bacteria, *Bacillus* spp., และ Enterobacteriaceae, ราในกลุ่มของ primarily aspergilli และ penicillia และ yeasts ส่วนใหญ่คือ *Torulopsis* spp. ในไข่และตัวอ่อนมักไม่พบจุลินทรีย์แต่มักจะได้รับมาโดยทางการกินอาหารที่มีเชื้อจุลินทรีย์ปนเปื้อน ในตัวเต็มวัยนั้นได้รับเชื้อจุลินทรีย์จากการแลกเปลี่ยนอาหารและเกสรระหว่างผึ้งในรังเดียวกัน จุลินทรีย์ที่อาศัยอยู่ร่วมกับผึ้งมีส่วนช่วยในกระบวนการทางชีวเคมี เช่น ช่วยในการเปลี่ยนแปลงทางชีวเคมีในลำไส้ผึ้ง การเก็บรักษาเกสรในรังผึ้ง และเชื้อในกลุ่มของ *Bacillus* spp. สร้างสารปฏิชีวนะยับยั้งการเจริญของเชื้อราที่ก่อโรคในผึ้ง เช่น โรค Chalkbrood และจากงานวิจัยของ Cano และคณะ (1995) พบว่าจุลินทรีย์ในกลุ่มของ spore-forming bacteria ในผึ้งชันโรง (stingless bees) มีอายุนานกว่า 25-40 ล้านปี ซึ่งบ่งชี้ว่าการอยู่ร่วมกันของผึ้งและ spore-forming bacteria มาตั้งแต่สมัยโบราณ จากการศึกษากของ Piccini และคณะ (2003) ได้ทำการบ่งชี้ชนิดของเชื้อแบคทีเรียที่อาศัยอยู่ในรังผึ้ง (*Apis mellifera*) โดยเก็บตัวอย่างรังตัวอ่อน และเศษขยะบนพื้นรังในช่วงเดือนพฤศจิกายน (ฤดูใบไม้ผลิ) ปี 2000, กรกฎาคม (ฤดูหนาว) ปี 2001 และ มกราคม (ฤดูร้อน) ปี 2002 จาก National Institute for Agricultural Research (INIA) ประเทศอาร์เจนตินา เพื่อศึกษาจำนวนของแบคทีเรียจากส่วนประกอบของรังผึ้ง 2 ส่วน คือ ส่วนที่เป็นรังตัวอ่อน และพื้นรังโดยแบคทีเรียที่แยกได้จากรังตัวอ่อนมีจำนวนน้อยกว่าจำนวนแบคทีเรียที่แยกได้จากพื้นรัง เนื่องจากในเกสรและน้ำผึ้งมีสารยับยั้งการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์และผึ้งมีการรักษาความสะอาดที่ดีจึงทำให้จำนวนแบคทีเรียที่พบน้อยกว่าบนพื้นรังและจุลินทรีย์ทั้งหมดที่พบจัดอยู่ในจีนัส *Bacillus* และ *Corynebacterium* ผึ้ง โดยเฉพาะ *Apis mellifera* ต้องเผชิญทั้งเชื้อก่อโรคและปรสิต โดยผึ้งจะใช้จุลินทรีย์ที่อาศัยอยู่ร่วมกันเป็นตัวช่วยในการต่อสู้กับเชื้อก่อโรสดังกล่าวโดยจุลินทรีย์ที่อาศัยอยู่ร่วมกับผึ้งนั้นมีมากมายแต่น้อยชนิดที่ก่อโรคผึ้ง จากการศึกษากของ Evans และ Armstrong (2006) ได้แยกแบคทีเรียจากตัวอ่อนของผึ้งและนำไปทดสอบการยับยั้งการเจริญของเชื้อ *Paenibacillus larvae* ซึ่งเป็นเชื้อก่อโรคในผึ้งพบว่า 61 ไอโซเลตสามารถยับยั้งเชื้อ *Paenibacillus larvae* ซึ่งเป็นเชื้อก่อโรคผึ้งได้และเมื่อนำไปสกัด DNA , เพิ่มจำนวนยีน 16S rRNA, หาลำดับเบส , วิเคราะห์ลำดับเบสและนำไปเปรียบเทียบกับยีน 16S rRNA ทั้งหมดที่เก็บอยู่ใน GenBank โดยใช้ BLASTN พบว่าจัดอยู่ในจีนัส *Acetobacter*, *Bacillus*, *Brevibacillus* และ *Stenotrophomonas* ดังนั้นความหลากหลายของแอคติโนมัยซีทที่ได้จากรังผึ้งมีความน่าสนใจและค้นหาสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพตัวใหม่ที่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อก่อโรคผึ้งและคน โดยส่วนใหญ่สารดังกล่าวนั้นจัดอยู่ในกลุ่มที่เรียกกันอย่างกว้างๆว่า “Polyketides” โดยเอนไซม์หลักที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการสังเคราะห์สารดัง

กล่าวคือ Polyketide syntase (PKS) (Colombo *et al.*, 2001) โดยเชื้อกลุ่ม actinomycetes ส่วนใหญ่จะมี PKS gene clusters ดังนั้นจึงน่าเชื่อที่แยกได้จาก รังผึ้งจำนวน 34 โซเลทมาตรวจหาขึ้นดังกล่าวเพื่อจะนำไปศึกษาต่อไป

วัตถุประสงค์

เพื่อศึกษาเชื้อแอคติโนมัยซีส์ที่อาศัยร่วมกับผึ้งและการสร้างสารทุติยภูมิ

วิธีการทดลอง

1. การเก็บตัวอย่าง

ทำการเก็บตัวอย่างผึ้ง ตัวอ่อน เกสร และรังผึ้งจากฟาร์มผึ้งและจากแหล่งธรรมชาติในภาคเหนือของประเทศไทย (เชียงใหม่ เชียงราย ลำพูน ลำปาง แพร่ น่านและพะเยา) โดยเก็บตัวอย่างที่ได้มาทั้งหมดไว้ที่อุณหภูมิ -20 °C

2. การแยกเชื้อแอคติโนมัยซีส์จากรังผึ้ง

นำตัวอย่างมาทำเจือจางลำดับส่วน (dilution plate technique) บนอาหาร starch-casein agar (Küster and Williams, 1964) โดยมี nystatin และ nalidixic acid ความเข้มข้น 25 µg/ml เพื่อยับยั้งการเจริญของราและแบคทีเรียแกรมลบตามลำดับ จากนั้นนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 30 °C นาน 4-8 สัปดาห์ เมื่อพบการเจริญของเชื้อแอคติโนมัยซีส์แล้วนำมาทำให้เป็นเชื้อบริสุทธิ์โดยการ re-streak ลงบนอาหารชนิดเดิม แล้วเก็บเชื้อไว้บนอาหาร Oatmeal (ISP3) หรือ Glucose-yeast extract (GYE) agar slant

3. การวิเคราะห์หาชนิดไอโซเมอร์ของ aminodipimelic acid ในผนังเซลล์

ทำการเลี้ยงของเชื้อแอคติโนมัยซีส์ในอาหารเหลว ISP2 medium นาน 1-2 สัปดาห์ จากนั้นทำการเก็บเซลล์ของเชื้อแอคติโนมัยซีส์โดยการนำไปปั่นด้วยเครื่อง centrifuge แล้วนำเซลล์ที่ได้มาวิเคราะห์หาชนิด isomer ของ diaminopimelic acid โดยทำตามวิธีของ Staneck and Robert (1974)

4. การศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาและสรีรวิทยาบางประการของเชื้อแอคติโนมัยซีส์ (Morphological and Physiological Characterizations) ทำการศึกษาตามวิธีการของ Shirling and Gottlieb (1966) โดยทำการศึกษาดังต่อไปนี้

4.1 การศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยา (Morphological Characterizations)

ศึกษาลักษณะและสีของ aerial spore mass, reverse color และการสร้าง spore chain โดยทำการเลี้ยงเชื้อแอคติโนมัยซีส์บนอาหาร yeast extract-malt extract agar (ISP2), oatmeal agar (ISP3), inorganic salt-starch agar (ISP4) และ glycerol-asparagine agar (ISP5) นำไปบ่ม

ที่อุณหภูมิ 30 °C นาน 14 วันแล้วมาส่องดูภายใต้กล้องจุลทรรศน์และเทียบสีของเชื้อแอคติโนมัยซีท โดยใช้ The Color Harmony Manual (Jacobson *et al.*, 1948)

4.2 ความสามารถในการใช้น้ำตาลเป็นแหล่งคาร์บอน (Carbon source utilization)

เลี้ยงเชื้อบนอาหาร carbon utilization medium (ISP9) ซึ่งเติมแหล่งคาร์บอนชนิดต่างๆ ให้มีความเข้มข้นสุดท้ายเท่ากับ 1% นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 30 °C นาน 14-20 วัน

4.3 การทดสอบการสร้างเมลานิน (Melanoid pigment production)

เลี้ยงเชื้อบนอาหาร peptone-yeast extract iron agar (ISP6) and tyrosine agar (ISP7) ซึ่งเป็นอาหารวันเอียง นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 30 °C ทำการดูผลทุก 2 และ 4 วัน

5. การบ่งบอกชนิดของเชื้อแอคติโนมัยซีทโดยใช้ลำดับเบสของยีน 16S rRNA gene

ทำการสกัด Genomic DNA, เพิ่มจำนวนยีน 16S rRNA gene โดยใช้เทคนิค PCR และหาลำดับเบสของยีน 16S rRNA gene ตามวิธีของ Nakajima *et al.* (1999) ทำการเปรียบเทียบลำดับเบสของยีน 16S rRNA gene โดยนำไปเปรียบเทียบ (Blast) กับลำดับเบสที่เก็บอยู่ในฐานข้อมูล Genbank/EMBL/DDBJ database โดยใช้โปรแกรม CLUSTAL W version 1.81 (Thompson *et al.*, 1997)

6. การคัดกรองหาสารทุติยภูมิต้านเชื้อก่อโรคอเมริกันฟาวบรูตและยูโรเปียนฟาวบรูต

นำอาหารเลี้ยงเชื้อแอคติโนมัยซีทมาทดสอบการออกฤทธิ์ต้านเชื้อก่อโรคในผึ้งสองชนิดคือ เชื้อก่อโรคตัวอ่อนเน่าอเมริกัน *Paenibacillus larvae*, เชื้อก่อโรคตัวอ่อนเน่ายูโรเปียน *Melissococcus pluton* โดยวิธี agar diffusion assay

7. การคัดกรองหายีน PKS-II ของเชื้อ actinomycetes ที่แยกได้จากรังผึ้ง

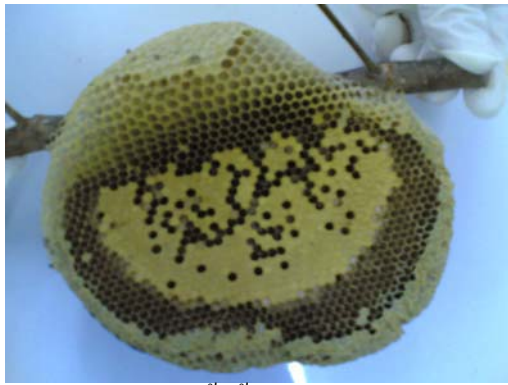
ทำการสกัด DNA จากเชื้อ actinomycetes แล้วเพิ่มจำนวนชิ้นส่วนของยีน PKS-II โดยใช้เทคนิค PCR โดยส่วนผสม (PCR mixtures) และ อุณหภูมิที่ใช้ (PCR temperature profile) ปรับปรุงมาจาก Ketela *et al.* (1999)

ผลการทดลอง

จากตัวอย่างรังผึ้ง (*Apis mellifera*, *Apis cerana* และ *Apis florae*) และชันโรง (*Trigona laeviceps* และ *Trigona fuscobalteata*) (รูป 2.1) ทั้งหมดรวม 83 รังในบริเวณภาคเหนือของประเทศไทย (ตาราง 2.1) นำตัวอย่างรังผึ้งมาแยกเชื้อแอคติโนมัยซีทได้ทั้งหมด 34 ไอโซเลท

เมื่อทำการบ่งบอกชนิดของเชื้อแอคติโนมัยซีทโดยใช้ลำดับเบสของยีน 16S rRNA gene และเทียบกับลักษณะทางเคมี สัณฐานวิทยา (รูปที่ 2.2) และสรีรวิทยาของเชื้อแอคติโนมัยซีท ผลการบ่งบอกชนิดและลักษณะบางประการของเชื้อแอคติโนมัยซีทแสดงโดยเชื้อแอคติโนมัยซีทที่แยกได้จำนวน 30 จัดอยู่ในจีนัส *Streptomyces* ส่วนอีก 4 ไอโซเลทที่เหลือจัดอยู่ในจีนัส *Norcardiopsis*, *Nonomuraea* และ *Actinomadura* ซึ่งเป็นกลุ่มแอคติโนมัยซีทหายาก (rare actinomycetes) (ตารางที่ 2.2) โดยมีเชื้อที่ยับยั้งเชื้อตัวอ่อนเน่าอเมริกันได้ 5 ไอโซเลท คือ IM1-2, IM1-3, IM7-2, IM17-1, และ IT26 และมีเชื้อที่สามารถยับยั้งเชื้อก่อโรคตัวอ่อนเน่ายุโรปได้คือ IM1-3, IF3, IM22-2, IT1, IT3, IT26, และ IT28

เชื้อในกลุ่ม *Streptomyces* นั้นมีทั้งยีน PKS-I และ PKS-II เมื่อทำการคัดกรองหายีน polyketide synthase gene type II (PKS-II) จากเชื้อ actinomycetes ที่แยกได้จากรังผึ้งทั้งหมดจำนวน 34 ไอโซเลทพบว่ามียีน PKS-II ทั้งหมด 30 ไอโซเลท ซึ่งเป็น actinomycetes ที่จัดอยู่ในจีนัส *Streptomyces* ส่วนอีก 4 ไอโซเลทไม่พบยีน PKS-II ซึ่งเป็น actinomycetes ในกลุ่มที่เป็น non-*Streptomyces* หรือ rare actinomycetes (ตารางที่ 2.3)



ผึ้งมิม (*Apis florea*)



รังผึ้งพันธุ์ (*Apis mellifera*)



รังผึ้งหลวง (*Apis dorsata*)

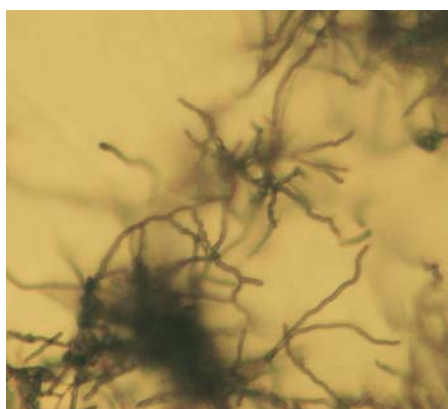


รังผึ้งหลวง (*Apis dorsata*)

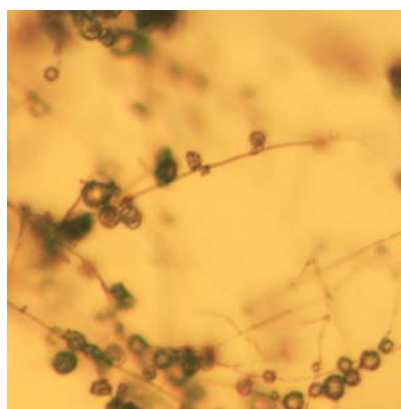


รังผึ้งโพรง (*Apis cerana*)

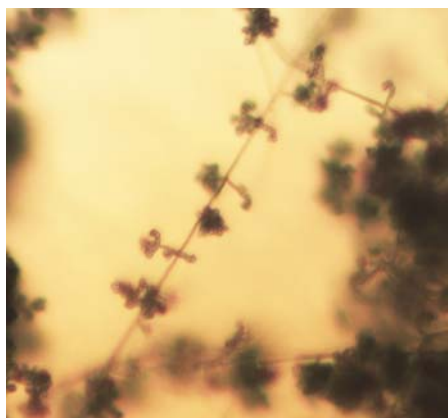
รูปที่ 2.1 รังผึ้งสปีชีส์ต่างๆที่เก็บตัวอย่างในการทดลอง



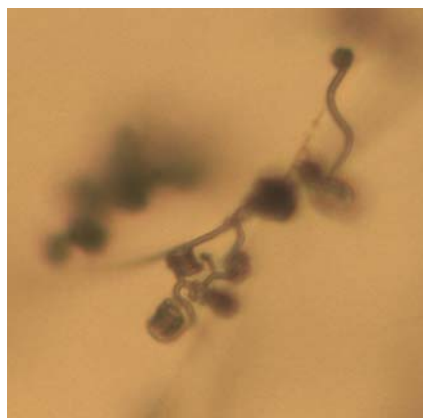
(a)



(b)



(c)



(d)

รูปที่ 2.2 ลักษณะของ spore-bearing hyphae ของเชื้อ actinomycetes บางไอโซเลทที่แยกได้จากรังผึ้งพันธุ์ (*A. mellifera*) ; (a) *Nocardiosis alba* (IM1-3), (b) *Nonomuraea roseoviolacea* (IM 7-2), (c) *Actinomadura* sp.(IM17-1) and (d) *Streptomyces aurantiogriseus* (IM22-1)

ตารางที่ 2.1 จำนวนเชื้อแอคติโนมัยซีทที่แยกได้จากรังผึ้ง species ต่างๆ

ชนิดของผึ้ง	จำนวนรังที่เก็บ	จำนวนไอโซเลท
<i>Apis mellifera</i>	67	9
<i>Apis cerana</i>	13	4
<i>Apis florae</i>	10	5
<i>Trigona laeviceps</i>	2	10
<i>Trigona fuscobalteata</i>	1	6

ตาราง 2.2 ผลการบ่งบอกชนิดและลักษณะบางประการของเชื้อแอคติโนมัยซีทที่แยกได้

Isolate No.	Species Identification	Spore Chain	Isomers of A ₂ pm [*]	Sources (Brood cells)
IF1	<i>Streptomyces fradiae</i>	Spiral	LL	<i>Apis florea</i>
IF2	<i>Streptomyces fradiae</i>	Spiral	LL	<i>Apis florea</i>
IF3	<i>Streptomyces fradiae</i>	Spiral	LL	<i>Apis florea</i>
IF4	<i>Streptomyces fradiae</i>	Spiral	LL	<i>Apis florea</i>
IF5	<i>Streptomyces fradiae</i>	Spiral	LL	<i>Apis florea</i>
IC1	<i>Streptomyces drozdowiczii</i>	Spiral	LL	<i>Apis cerana</i>
IC2	<i>Streptomyces badius</i>	Spiral	LL	<i>Apis cerana</i>
IC5	<i>Streptomyces badius</i>	spiral	LL	<i>Apis cerana</i> (Mid gut)
IC6	<i>Streptomyces albidoflavus</i>	spiral	LL	<i>Apis cerana</i> (Mid gut)
IM1-2	<i>Streptomyces lanatus</i>	Spiral	LL	<i>Apis mellifera</i>
IM1-3	<i>Nocardopsis alba</i>	Straight to flexuous	meso	<i>Apis mellifera</i>
IM4-1	<i>Nonomuraea roseoviolacea</i>	Pseudo-sporangium	meso	<i>Apis mellifera</i>
IM7-2	<i>Nonomuraea roseoviolacea</i>	Pseudo-sporangium	meso	<i>Apis mellifera</i>
IM17-1	<i>Actinomadura</i> sp.	Short branch	meso	<i>Apis mellifera</i>
IM21-1	<i>Streptomyces misawanensis</i>	Spiral	LL	<i>Apis mellifera</i>
IM21-2	<i>Streptomyces olivaceus</i>	Spiral	LL	<i>Apis mellifera</i>
IM22-1	<i>Streptomyces aurantiogriseus</i>	Spiral	LL	<i>Apis mellifera</i>
IM22-2	<i>Streptomyces scabiei</i>	Spiral	LL	<i>Apis mellifera</i>
IT1	<i>Streptomyces pseudogriseolus</i>	Spiral	LL	<i>Trigona laeviceps</i>
IT2	<i>Streptomyces rochei</i>	Spiral	LL	<i>Trigona laeviceps</i>
IT3	<i>Streptomyces drozdowiczii</i>	Spiral	LL	<i>Trigona laeviceps</i>
IT4	<i>Streptomyces mutabilis</i>	Spiral	LL	<i>Trigona laeviceps</i>
IT5	<i>Streptomyces mutabilis</i>	Spiral	LL	<i>Trigona laeviceps</i>
IT6	<i>Streptomyces minutiscleroticus</i>	Spiral	LL	<i>Trigona laeviceps</i>
IT7	<i>Streptomyces albus</i>	Spiral	LL	<i>Trigona laeviceps</i>
IT8	<i>Streptomyces tosaensis</i>	Spiral	LL	<i>Trigona laeviceps</i>
IT11	<i>Streptomyces albus</i>	Spiral	LL	<i>Trigona laeviceps</i>
IT12	<i>Streptomyces malaysiensis</i>	Spiral	LL	<i>Trigona laeviceps</i>
IT21	<i>Streptomyces ambofaciens</i>	Spiral	LL	<i>Trigona fuscobalteata</i>
IT24	<i>Streptomyces mutabilis</i>	Spiral	LL	<i>Trigona fuscobalteata</i>
IT25	<i>Streptomyces coalescens</i>	Spiral	LL	<i>Trigona fuscobalteata</i>
IT26	<i>Streptomyces ambofaciens</i>	Spiral	LL	<i>Trigona fuscobalteata</i>
IT27	<i>Streptomyces ambofaciens</i>	Spiral	LL	<i>Trigona fuscobalteata</i>
IT28	<i>Streptomyces violaceoruber</i>	Spiral	LL	<i>Trigona fuscobalteata</i>

หมายเหตุ: * ชนิดไอโซเมอร์ของ diaminopimelic acid (A₂pm) ในผนังเซลล์โดยวิเคราะห์ตามวิธีของ Stanek and Roberts (1974)

ตาราง 2.3 ผลการ screening หาป็น PKS-II ของเชื้อ actinomycetes ที่แยกได้จากรังผึ้ง

ไอโซเลท	ชนิดเชื้อ	PKS-II
IF1	<i>Streptomyces fradiae</i>	+
IF2	<i>Streptomyces fradiae</i>	+
IF3	<i>Streptomyces fradiae</i>	+
IF4	<i>Streptomyces fradiae</i>	+
IF5	<i>Streptomyces fradiae</i>	+
IC1	<i>Streptomyces drozdowiczii</i>	+
IC2	<i>Streptomyces badius</i>	+
IC5	<i>Streptomyces badius</i>	+
IC6	<i>Streptomyces albidoflavus</i>	+
IM1-2	<i>Streptomyces lanatus</i>	+
IM1-3	<i>Nocardiosis alba</i>	ND
IM4-1	<i>Nonomuraea roseoviolacea</i>	ND
IM7-2	<i>Nonomuraea roseoviolacea</i>	ND
IM17-1	<i>Actinomadura</i> sp.	ND
IM21-1	<i>Streptomyces misawanensis</i>	+
IM21-2	<i>Streptomyces olivaceus</i>	+
IM22-1	<i>Streptomyces aurantiogriseus</i>	+
IM22-2	<i>Streptomyces scabiei</i>	+
IT1	<i>Streptomyces pseudogriseolus</i>	+
IT2	<i>Streptomyces rochei</i>	+
IT3	<i>Streptomyces drozdowiczii</i>	+
IT4	<i>Streptomyces mutabilis</i>	+
IT5	<i>Streptomyces mutabilis</i>	+
IT6	<i>Streptomyces minutiscleroticus</i>	+
IT7	<i>Streptomyces albus</i>	+
IT8	<i>Streptomyces tosaensis</i>	+
IT11	<i>Streptomyces albus</i>	+
IT12	<i>Streptomyces malaysiensis</i>	+
IT21	<i>Streptomyces ambofaciens</i>	+
IT24	<i>Streptomyces mutabilis</i>	+
IT25	<i>Streptomyces coalescens</i>	+

ตาราง 2.3 ผลการ screening หาเอ็น PKS-II ของเชื้อ actinomycetes ที่แยกได้จากรังผึ้ง (ต่อ)

ไอโซเลท	ชนิดเชื้อ	PKS-II
IT26	<i>Streptomyces ambofaciens</i>	+
IT27	<i>Streptomyces ambofaciens</i>	+
IT28	<i>Streptomyces violaceoruber</i>	+

หมายเหตุ +: ตรวจพบเอ็น PKS-II; ND: ตรวจไม่พบเอ็น PKS-II

วิจารณ์และสรุปผลการทดลอง

จากงานวิจัยพบว่ามีเชื้อแอคติโนมัยซีทในกลุ่ม *Streptomyces* มากที่สุด และ rare actinomycetes คือ *Nocardiosis*, *Nonomuraea* และ *Actinomadura* ซึ่งการมีเชื้อแอคติโนมัยซีทที่มักพบในดิน ในกรณีนี้อาจเกิดจากปนเปื้อนจากเกสร แหล่งอาหารของผึ้ง ในการวิจัยเกี่ยวกับแมลง เช่น European beewolf ได้พบ *Streptomyces* เช่นกัน (Kaltenpoth *et al.*, 2005)

นอกจากนี้ยังเป็นที่น่าสนใจที่จะพบเชื้อแอคติโนมัยซีทที่แตกต่างกันระหว่างสปิชีส์ของผึ้ง และแอคติโนมัยซีทบางไอโซเลทที่พบสามารถสร้างสารต้านเชื้อก่อโรคในผึ้งได้ และมีเอ็น polyketide synthase เกือบทุกไอโซเลท ซึ่งเป็นตัวบ่งชี้ความสามารถในการสร้างสารปฏิชีวนะ

บทที่ 3

ไวรัส¹

บทนำ

ไวรัสเป็นสิ่งมีชีวิตขนาดเล็กที่มีลักษณะเป็นอนุภาค มีสารพันธุกรรมเป็นดีเอ็นเอหรืออาร์เอ็นเออย่างใดอย่างหนึ่ง และมีแคปซิดโปรตีนห่อหุ้มสารพันธุกรรม ไวรัสบางชนิดอาจมีชั้น envelope ห่อหุ้มภายนอกอีกชั้นหนึ่ง ไวรัสไม่สามารถสืบพันธุ์หรือทวีจำนวนเป็นอิสระได้ด้วยตนเอง ในการทวีจำนวนจึงต้องอาศัยขบวนการเมตาบอลิซึมและสารประกอบต่าง ๆ ภายในเซลล์ผู้ให้อาศัย การเพิ่มจำนวนไวรัสภายในเซลล์ผู้ให้อาศัยจะไม่แสดงออกให้เห็นการเปลี่ยนแปลงภายนอกตราบเท่าที่เซลล์ผู้ให้อาศัยยังคงมีส่วนประกอบในการสังเคราะห์ไวรัสเพียงพอ ภายหลังเมื่อเซลล์ติดเชื้อเซลล์จะถูกทำลายและตายในที่สุด และมีการปล่อยอนุภาคไวรัสออกมา สำหรับในผึ้งนั้น มีการค้นพบไวรัสที่ติดเชื้อในผึ้งถึง 18 ชนิด (Allen and Ball, 1996) แต่มีรายงานการศึกษาลำดับเบสของสิ่งมีชีวิตของไวรัสในผึ้งเพียง 8 ชนิด และข้อมูลลำดับเบสที่สมบูรณ์มีเพียง 4 ชนิดในฐานข้อมูลของ EMBL เท่านั้น ได้แก่ Varroa destructor virus 1, Acute bee paralysis virus (APV), Kashmir bee virus (KBV) และ Sacbrood virus (SBV)

Deformed wing virus (DWV) เป็นเชื้อก่อโรคในผึ้งที่ทำให้ปีกของผึ้งเกิดลักษณะที่ผิดปกติไป เนื่องจากการเปลี่ยนรูปร่างไม่สมบูรณ์จากการติดเชื้อ การตรวจสอบไวรัสชนิดนี้สามารถใช้วิธีทางภูมิคุ้มกันวิทยา (ELISA test) ในผึ้งโตเต็มวัยและในไร โดยผลการวิจัยพบว่าผึ้งที่มีลักษณะของปีกผิดปกติจะพบ DWV มากกว่าผึ้งที่ปกติ (Bowen-Walker *et al.*, 1999) ต่อมา Tentcheva *et al.* (2004a) ทำการทดลองโดยใช้วิธี RT-PCR ตรวจสอบไวรัสชนิดนี้ในผึ้งพันธุ์และในไร โดยใช้ primer ที่จำเพาะ เพื่อตรวจหา DWV ในประเทศฝรั่งเศส พบว่าตรวจพบปริมาณของ DWV ในผึ้งและไรวาร์วามากขึ้นในช่วงฤดูใบไม้ร่วง นอกจากนั้น Nordström (2003) ได้ทำการศึกษาการกระจายของ DWV ในไรวาร์วเพศเมียที่โตเต็มวัยและในไรวาร์วที่เป็นรุ่นลูกหลาน ผลจากการศึกษาแสดงให้เห็นว่าไรวาร์วรุ่นลูกได้รับ DWV มาจากผึ้งที่ติดเชื้อไวรัส DWV ไม่ได้มาจากไรวาร์วที่เป็นแม่

Kashmir bee virus (KBV) เป็นไวรัสที่แยกได้ครั้งแรกจากผึ้งโพรง (*Apis cerana*) ที่ถูกส่งไปยัง Rothamsted จากแคว้น Kashmir (Bailey and Woods, 1977) ต่อมามีการติดเชื้อในผึ้งพันธุ์ตัวเต็มวัยซึ่งทำให้ผึ้งที่ได้รับเชื้อตายภายหลังจากการที่ได้รับเชื้อ 3 วัน ได้มีการศึกษา KBV ที่แยกจากผึ้งพันธุ์ที่ติดเชื้อในประเทศแคนาดาและสเปน เมื่อทำการตรวจสอบ 5 ไอโซเลตที่แยกได้ด้วยวิธี Immunodiffusion และ Western blot แล้วพบว่า KBV มีความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมกับ Acute bee paralysis virus (Allen and Ball, 1995) นอกจากนี้ Chen *et al.* (2004) ได้ทำการศึกษาพบว่าไร

¹ ตีพิมพ์ในวารสาร Journal of Invertebrate Pathology

วาร์วี่ที่ไม่มี KBV จะกลายเป็นไรที่มี KBV เมื่ออยู่กับไรที่มีเชื้อ เมื่อคำนวณทางสถิติพบว่าอัตราการติดต่อไวรัสจากไรสู่ไรสูงถึง 51 %

Acute bee paralysis virus (ABPV) ถูกค้นพบครั้งแรกจากการทดลองในห้องปฏิบัติการ ซึ่งไม่ปรากฏอาการติดเชื้อให้ทราบ (Bailey *et al.*, 1963) การกระจายของ ABPV เกิดจากการส่งผ่านทางน้ำลายของผึ้งตัวเต็มวัยสู่อาหารของผึ้ง (Ball, 1985) Benjeddou *et al.* (2001) ทำการออกแบบ primer ที่จำเพาะกับ ABPV ภายหลังการทำ RT-PCR ได้ amplicon ที่มีขนาด 900 bp ซึ่งสามารถใช้ในการตรวจสอบตัวอย่างผึ้งที่ไม่พบอาการของการติดเชื้อ ABPV ได้

Black Queen-cell virus (BQCV) เป็นไวรัสที่ตั้งชื่อตามลักษณะอาการของการติดเชื้อ คือ ตัวผึ้งนางพญาเมื่อเกิดการติดเชื้อจะเปลี่ยนจากสีน้ำตาลเป็นสีดำ และก่อให้เกิดการตายมากที่สุดของผึ้งนางพญาในออสเตรเลีย (Anderson, 1993)

Chronic bee paralysis virus (CBPV) ไวรัสนี้แบ่งออกเป็น 2 ประเภทตามอาการของโรค ชนิดแรก (type 1) ผึ้งที่ติดเชื้อจะมีอาการตัวและปีกสั้นในระยะแรก จนกระทั่งไม่สามารถบินได้ มักมีอาการท้องบวมเนื่องจากการป้องกันของกระเพาะเก็บน้ำหวาน ในประเทศยุโรปจะรู้จักในชื่อว่า Waldtrachkrankheit ส่วนชนิดที่สอง (type 2) เรียกว่า “black robber” หรือ “litter black” ผึ้งที่เป็นโรคจะกลายเป็นสีดำและมีขนาดท้องที่ใหญ่ขึ้น หลังจากนั้นจะไม่สามารถบินได้และตายในที่สุด

Sacbrood virus (SBV) เมื่อเกิดการติดเชื้อ สามารถเพิ่มจำนวนในเนื้อเยื่อของตัวอ่อนผึ้ง และทำลายต่อมผีวน้ำผึ้งทำให้เกิดความผิดปกติในกระบวนการสังเคราะห์เอนไซม์ไคติเนส เอนไซม์นี้มีหน้าที่ย่อยเปลือกหุ้มตัวอ่อนในกระบวนการลอกคราบ ตัวอ่อนจึงไม่สามารถลอกคราบได้ และตายในลักษณะคล้ายถุง (Bailey, 1976) นอกจากนี้ยังพบว่าไวรัสสามารถเพิ่มจำนวนในบริเวณต่อมไฮโปฟารินจ์ (hypopharyngeal gland) ซึ่งอยู่ในส่วนหัวของตัวเต็มวัยของผึ้งงานและผึ้งตัวผู้ โดยจะทำให้ผึ้งงานหยุดเก็บเกสร ผึ้งจึงมีอายุสั้นกว่าผึ้งที่ไม่ติดเชื้อ (Bailey and Ball, 1991; Warhurst, 2000)

เนื่องจากเชื้อไวรัสมีลักษณะการเข้าทำลายที่แตกต่างจากเชื้อชนิดอื่น ทำให้การตรวจสอบการติดเชื้อทำได้ค่อนข้างยาก ต้องสังเกตอาการที่แสดงออกของผึ้งภายหลังจากการติดเชื้อแล้วเท่านั้น ทำให้การรักษาโรคเกิดความล่าช้าและสูญเสียผลผลิตที่ควรได้รับไปปริมาณมากแล้ว การตรวจสอบหาโรคและสาเหตุของการเกิดโรคจึงเป็นสิ่งที่สำคัญ เพื่อการรักษาอย่างทันทั่วทั้งที่ ปัจจุบันมีการนำเอาเทคนิคทางอณูชีววิทยาามาเพื่อช่วยตรวจหาการติดเชื้อของไวรัสได้ โดยเฉพาะเทคนิค reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR) ที่มีความจำเพาะสูงและสามารถตรวจสอบการติดเชื้อได้ แม้ผึ้งไม่มีการแสดงอาการเลยก็ตาม ในการศึกษาครั้งนี้จึงมีการนำเทคนิคนี้เข้ามาเกี่ยวข้อง และจากการที่ในประเทศไทยยังไม่พบรายงานการสำรวจการติดเชื้อไวรัส Acute bee paralysis virus, Black queen cell virus, Chronic bee paralysis virus, Deformed wing virus, Kashmir bee virus และ Sacbrood virus ในผึ้งพันธุ์และในไรวาร์วี่ จึงคาดว่าการศึกษาครั้งนี้จะสามารถแสดงการกระจายการติดเชื้อของเชื้อไวรัสในผึ้งและไร เพื่ออธิบายความสัมพันธ์ระหว่าง

ไวรัสรื้อและการเกิดโรคจากเชื้อไวรัสบางชนิดในผึ้งพันธุ์ พร้อมทั้งเก็บเป็นข้อมูลสำหรับการนำไปใช้ประโยชน์ในการป้องกันการกระจายของเชื้อไวรัสต่อไปได้

วัตถุประสงค์

เพื่อศึกษาการกระจายตัวของไวรัสก่อโรคในผึ้งและความสัมพันธ์ระดับโมเลกุลระหว่างผึ้งและไวรัส

วิธีการทดลอง

1. การเก็บตัวอย่าง

ทำการเก็บตัวอย่างผึ้งพันธุ์ (*Apis mellifera*) ในช่วงระหว่างเดือนมิถุนายนปี พ.ศ. 2549 ถึงเดือนสิงหาคมปี พ.ศ. 2550 จากฟาร์มต่าง ๆ ทางภาคเหนือของประเทศไทย 7 จังหวัด คือ จังหวัดลำพูน ลำปาง เชียงราย พะเยา น่าน แพร่ เชียงใหม่ จำนวน 9, 9, 5, 8, 6, 5 และ 4 ฟาร์มตามลำดับ และทำการเก็บไรโดยการแช่ตัวเต็มวัยใน 70% ethanol ทิ้งไว้ 15 นาที ตัวไรจะหลุดจากตัวผึ้งพันธุ์ แยกชนิดของไรพร้อมนับปริมาณไรแต่ละชนิด และบันทึกการเกิดโรคในฟาร์มว่ามีการติดโรคจากเชื้อชนิดอื่นหรือไม่ แล้วเก็บตัวอย่างทั้งหมดที่อุณหภูมิ -20°C

2. การสกัด RNA จากตัวอย่างผึ้ง

นำตัวอย่างผึ้งพันธุ์ในระยะตัวอ่อน ตัวเต็มวัยและไวรัสรื้ออย่างละ 10 ตัว มาบดเพื่อสกัด RNA โดยในการสกัดจากผึ้งพันธุ์ใช้สาร TRIzol Reagent และในไวรัสรื้อใช้สาร chelex (Tangjingjai *et al.*, 2003) เก็บ RNA ที่ได้ไว้ที่ -80°C องศาเซลเซียส เพื่อทำในขั้นตอนต่อไป

3. การสังเคราะห์ complementary DNA โดยการใช้น M-MuLV reverse transcriptase และ random hexamer

สังเคราะห์ cDNA โดยใช้ RevertAidTM M-MLV Reverse Transcriptase และ random hexamer และเก็บ cDNA ปริมาณ 20 μl เก็บไว้ที่ -20°C องศาเซลเซียสเพื่อนำไปทำ PCR ในขั้นตอนต่อไป

4. การเพิ่มปริมาณ DNA โดยเทคนิค Polymerase Chain Reaction (PCR)

ทำการเพิ่มจำนวน DNA โดยการใช้นไพรเมอร์ที่จำเพาะต่อเชื้อแต่ละชนิดและแสดงผลโดยการใช้ agarose gel 1.5% เพื่อดูแถบของการเกิด amplicon สำหรับ forward primer และ reverse primer ที่จำเพาะกับเชื้อไวรัสแต่ละชนิดนั้น มีลำดับ DNA ดังตาราง 3.1

ตาราง 3.1 forward primer และ reverse primer ที่ใช้ในการตรวจสอบการติดเชื้อไวรัสแต่ละชนิด

Virus	Forward primer	Reverse primer	Lengt h (bp) ^a	เอกสาร อ้างอิง
ABPV	TGAGAACACCTGTAATG TGG	ACCAGAGGGTTGACTGTG TG	452	Tentcheva <i>et al.</i> , 2004b
BQCV	GGACGAAAGGAAGCCT AAAC	ACTAGGAAGAGACTTGCA CC	424	Tentcheva <i>et al.</i> , 2004b
CBPV	AGTTGTCATGGTTAACA GGATACGAG	TCTAATCTTAGCACGAAA GCCGAG	455	Ribière <i>et al.</i> , 2002
DWV	TTTGCAAGATGCTGTAT GTGG	GTCGTGCAGCTCGATAGG AT	395	Tentcheva <i>et al.</i> , 2004a
KBV	GATGAACGTCGACCTA TTGA	TGTGGGTTGGCTATGAGT CA	393	Stoltz <i>et al.</i> , 1995
SBV	GGATGAAAGGAAATTA CCAG	CCACTAGGTGATCCACAC T	426	Tentcheva <i>et al.</i> , 2004b

^a ความยาวของ PCR product

5. การวิเคราะห์ลำดับเบสของ RT-PCR product

ส่งตัวอย่างผล RT-PCR product ที่ได้เพื่อตรวจหาลำดับเบส (DNA sequencing) ที่บริษัท MacroGen ประเทศเกาหลี จากนั้นนำผลลำดับเบสที่ได้จากการทดลองมาเปรียบเทียบกับความเหมือนกับข้อมูลลำดับเบสของเชื้อไวรัสในฐานข้อมูลของ NCBI GenBank โดยวิธีการทำ BLAST search เพื่อยืนยันผลที่ได้ว่าเป็นเชื้อไวรัสชนิดนั้นจริง

6. การวิเคราะห์จีโนมผึ้ง แมลง และไวรัสผึ้ง

นำข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์จาก

- honey bee genome (NW_622482 NW_662937)
- mosquito genome (accession numbers NC_004818, NC_009071, NC_009071)
- fruit fly (Oct-2006 release accession numbers NT_033777-79, NC_037346, NC_004353-54)
- red flour beetle (Apr-2006 release accession numbers NW_001092 [762,773,783,788,820,837,842, 865, 870,888])

- Acute bee paralysis virus (NC_002548)
- Israel acute paralysis virus (NC_009025)
- Kashmir bee virus (NC_004807)
- Kakugo virus (NC_005876)
- Sacbrood virus (NC_002066)
- Varroa destructor virus 1 (NC_006494).

นำมาวิเคราะห์ความถี่ของนิวคลีโอไทด์ด้วยโปรแกรม Pearl Algorithms

ผลการทดลอง

เก็บตัวอย่างผึ้งพันธุ์จากฟาร์มผึ้งทางภาคเหนือของประเทศไทยจำนวน 46 แห่ง โดยเก็บตัวอย่างจากจังหวัดลำพูน ลำปาง เชียงราย พะเยา น่าน แพร่ และเชียงใหม่ จำนวน 9, 9, 5, 8, 6, 5 และ 4 แห่งตามลำดับ สำหรับจังหวัดแม่ฮ่องสอนนั้นไม่มีการเก็บตัวอย่าง เนื่องจากไม่มีรายงานการเลี้ยงผึ้งพันธุ์ ณ จังหวัดนี้ โดยการเก็บตัวอย่างได้เก็บตัวอย่างบริเวณต่าง ๆ ของจังหวัดดังรูปที่ 3.1



รูปที่ 3.1 บริเวณที่ทำการเก็บตัวอย่างจากฟาร์มผึ้งพันธุ์ทางภาคเหนือของประเทศไทย

และจากการสกัด RNA จากผึ้งพันธุ์เพื่อตรวจหาเชื้อไวรัสชนิดต่าง ๆ และทำการตรวจสอบในระยะเวลาเจริญของผึ้ง ผลที่ได้จากการทดลองพบการติดเชื้อ Acute bee paralysis virus (ABPV), Deformed wing virus (DWV), Kashmir bee virus (KBV) และ Sacbrood virus (SBV) แต่ไม่พบเชื้อ Black Queen-cell virus (BQCV) และ Chronic bee paralysis virus (CBPV) ในทุกตัวอย่างที่ทำการตรวจสอบ โดยเชื้อไวรัสที่พบการติดเชื้อมากที่สุดทั้งในผึ้งพันธุ์ตัวเต็มวัยและตัวอ่อนคือ DWV รองลงมาคือ ABPV, SBV และ KBV ตามลำดับ (ตาราง 3.2) และมีเปอร์เซ็นต์การติดเชื้อรวมในผึ้งพันธุ์ของตัวอย่างทั้งหมดที่ทำการสำรวจคือ DWV 48 %, ABPV 33 %, SBV 8 % และ KBV 3 % ซึ่งสามารถแสดงผลของความถี่ของการติดเชื้อร่วมกันของไวรัสหลายชนิดในตัวอย่างเดียวกันได้ดังตาราง 3.3

ตาราง 3.2 การตรวจหาเชื้อไวรัส ABPV, BQCV, CBPV, DWV, KBV และ SBV ในตัวอย่างผึ้งพันธุ์ 46 แห่ง

[illegible]

ตาราง 3.2 (ต่อ)

แหล่ง	เวลาเก็บ ตัวอย่าง	ABPV		BQCV		CBPV		DWV		KBV		SBV	
		ตัวเต็มวัย	ตัวอ่อน	ตัวเต็มวัย	ตัวอ่อน	ตัวเต็มวัย	ตัวอ่อน	ตัวเต็มวัย	ตัวอ่อน	ตัวเต็มวัย	ตัวอ่อน	ตัวเต็มวัย	ตัวอ่อน
PY 5	ก.ค. 49	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
PY 6	ก.ค. 49	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
PY 7	ก.ค. 49	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
PY 8	ก.ค. 49	-	+	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-
NAN 1	ก.ค. 49	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-
NAN 2	ก.ค. 49	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-
NAN 3	ก.ค. 49	-	+	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-
NAN 4	ก.ค. 49	+	+	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-
NAN 5	ก.ค. 49	-	+	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-
NAN 6	ก.ค. 49	+	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-
PH 1	ก.ค. 49	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
PH 2	ก.ค. 49	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-
PH 3	ก.ค. 49	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-
PH 4	ก.ค. 49	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-
PH 5	ก.ค. 49	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
CM 1	มิ.ย. 50	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
CM 2	มิ.ย. 50	-	+	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-
CM 3	ส.ค. 50	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
CM 4	ส.ค. 50	+	+	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-

* อักษรย่อแทนชื่อจังหวัดที่เก็บตัวอย่างผึ้งพันธุ์

LPU : จังหวัดลำพูน

LPA : จังหวัดลำปาง

CR : จังหวัดเชียงราย

PY : จังหวัดพะเยา

NAN : จังหวัดน่าน

PH : จังหวัดแพร่

CM : จังหวัดเชียงใหม่

ตาราง 3.3 ความถี่ของการตรวจพบเชื้อไวรัสหลายชนิดร่วมกันในตัวอย่างเดียวกันของผึ้งพันธุ์

จำนวน ไวรัส	ชนิดของไวรัส	จำนวนของ ตัวอย่าง	เปอร์เซ็นต์	จำนวนแหล่งที่พบ
0		8	17	1LPU, 3LPA, 1PY, 2PH, 1CM
1	ABPV	7	15	6PY, 1CM
	DWV	15	33	8LPU, 2LPA, 2NAN, 3PH
2	ABPV,DWV	8	17	1CR, 1PY, 4NAN, 2CM
3	ABPV, DWV, KBV	1	2	1LPA
	ABPV, DWV, SBV	5	11	1LPA, 4CR
4	ABPV, DWV, KBV, SBV	2	4	2LPA

จากการเก็บตัวอย่างไรวาร์วโดยการแช่ผึ้งพันธุ์ตัวเต็มวัยในแอลกอฮอล์ แล้วทำการแยกไรแต่ละชนิดเพื่อนับจำนวนและบันทึกผลจำนวนไรที่ตกลงมา รวมถึงบันทึกการเกิดโรคในฟาร์มว่ามีการติดโรคจากเชื้อชนิดอื่นหรือไม่ (ตาราง 3.4) พบว่ามีฟาร์มจำนวน 12 แหล่ง ที่สามารถทำการทดลองโดยการสกัด RNA ได้ ส่วนแหล่งอื่น ๆ พบจำนวนไรวาร์วน้อยกว่า 10 ตัว ดังนั้นจึงไม่ได้ทำการตรวจสอบ และเมื่อได้นำไรวาร์วจากทั้ง 12 แหล่งนั้นมาทดลองตรวจหาเชื้อไวรัสในไรวาร์วตามวิธีของ Tangjingjai *et al.* (2003) แล้วทำการเพิ่มปริมาณ DNA และตรวจดูผลโดยการแสดงบน agarose gel แล้ว ผลที่ได้แสดงให้เห็นว่าในไรวาร์วมีการติดเชื้อ Deformed wing virus (DWV) เพียงชนิดเดียว โดยพบการติดเชื้อจำนวน 7 แหล่งคิดเป็น 58 % ของตัวอย่างที่ทำการตรวจสอบ

ตาราง 3.4 การพบไรของฝั้ว โรค EFB และชอล์คบุตร และการตรวจพบเชื้อไวรัส DWV ในไร วาร์ริว

แหล่ง	ไร (%)		โรคอื่น ๆ		ไวรัสในไรวาร์ริว
	วาร์ริว	ทรอพิสแลปส์	EFB	ชอล์คบุตร	DWV
LPU 1	5.2	-	-	-	+
LPU 2	-	-	-	-	NA
LPU 3	-	0.8	-	-	NA
LPU 4	-	-	-	-	NA
LPU 5	-	-	-	-	NA
LPU 6	-	-	-	-	NA
LPU 7	-	-	-	-	NA
LPU 8	7.6	-	-	-	-
LPU 9	-	-	-	-	NA
LPA 1	4.7	-	-	-	NA
LPA 2	5	1.5	-	-	-
LPA 3	4	-	-	-	-
LPA 4	5.5	0.5	-	-	+
LPA 5	8	0.4	-	-	+
LPA 6	11.5	1	-	-	+
LPA 7	8.4	1.2	-	-	-
LPA 8	11.6	2.4	-	-	+
LPA 9	8	-	-	+	-
CR 1	-	0.5	-	-	NA
CR 2	-	-	-	-	NA
CR 3	-	1.2	-	-	NA
CR 4	-	9.2	-	-	NA
CR 5	-	1.6	-	-	NA
PY 1	2	-	-	-	NA
PY 2	-	1.3	-	-	NA
PY 3	-	-	-	-	NA
PY 4	1	-	-	-	NA
PY 5	-	-	-	-	NA
PY 6	-	-	-	+	NA

ตาราง 3.4 (ต่อ)

แหล่ง	ไวรัส (%)		โรคอื่น ๆ		ไวรัสในไรวาร์ว
	วาร์ว	ทรอปิลีแลปส์	EFB	ซอลส์คบุตร	DWV
PY 7	1	2	-	-	NA
PY 8	0.5	-	-	-	NA
NAN 1	4	15.6	-	-	+
NAN 2	1	-	-	-	NA
NAN 3	2	10	-	-	NA
NAN 4	1	-	-	-	NA
NAN 5	10	37	+	-	+
NAN 6	2	11	-	-	NA
PH 1	0.4	0.4	+	-	NA
PH 2	-	0.7	-	-	NA
PH 3	3.3	8.7	-	-	NA
PH 4	-	11.5	+	-	NA
PH 5	-	-	-	-	NA
CM 1	3	14	-	-	NA
CM 2	1.5	6	-	-	NA
CM 3	-	0.8	-	-	NA
CM 4	-	20	-	-	NA
จำนวน (%)			3	2	7
ของแหล่งที่พบ			(6.5)	(4.3)	(58)

* - : negative

+ : positive

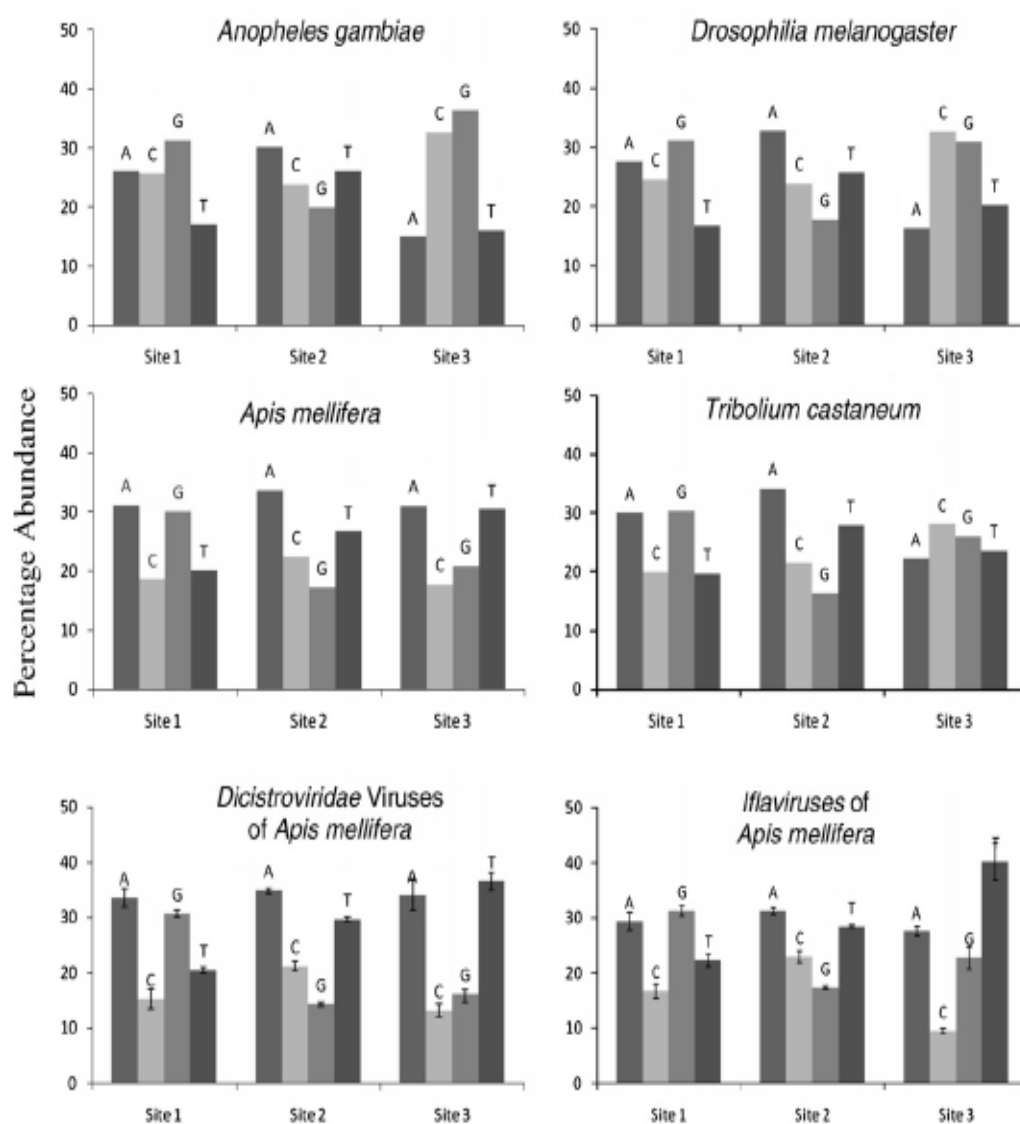
NA : sample not available

การวิเคราะห์หาลำดับเบสจากตัวอย่างเชื้อไวรัส โดยการส่งวิเคราะห์ที่บริษัท MacroGen ประเทศเกาหลี และทำการเปรียบเทียบความเหมือนของลำดับเบสของ RT-PCR product กับข้อมูลที่มีอยู่ในฐานข้อมูล ที่มีรายงานและถูกเก็บไว้ใน National Center for Biotechnology Information (NCBI) โดยวิธีการ BLAST search พบว่าลำดับเบสของตัวอย่างมีความเหมือนกับลำดับเบสในฐานข้อมูลดังตาราง 3.5

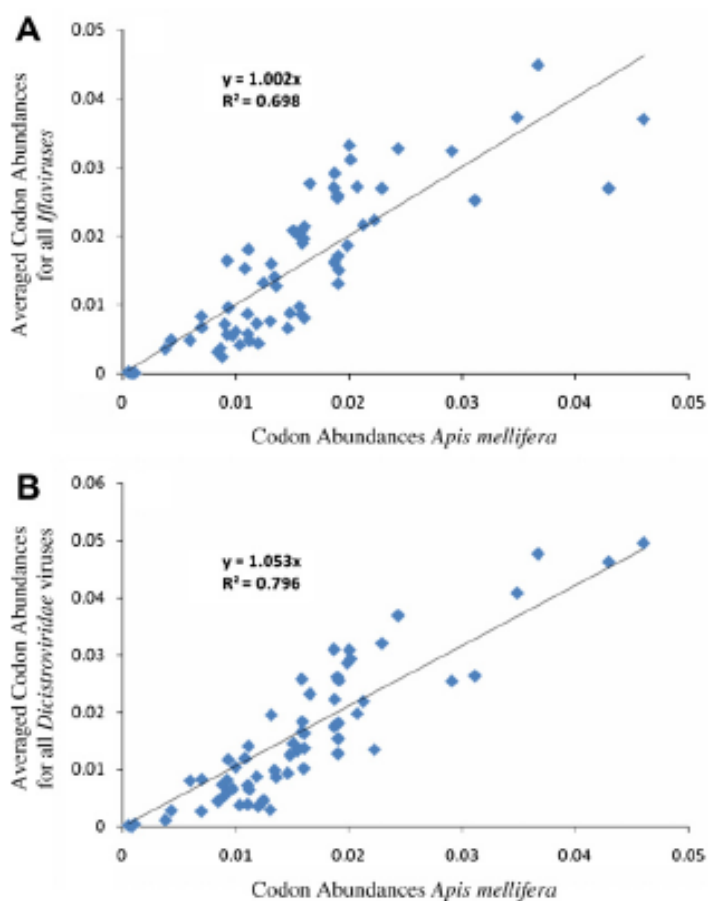
ตาราง 3.5 ค่าความเหมือนของลำดับเบสของเชื้อไวรัสจากการทดลองเปรียบเทียบกับข้อมูลใน NCBI

เชื้อไวรัส	Accession no. ของ ตัวอย่างที่เหมือนสูงสุด	บริเวณที่เหมือน	% ความเหมือน
Acute bee paralysis virus	EF219380	RNA polymerase gene	97
Deformed wing virus	AJ489744	gene for polyprotein	94
Kashmir bee virus	AF197908	RNA polymerase gene	96
Sacbrood virus	AF092924	polyprotein	91

ส่วนผลการทดลองการวิเคราะห์จีโนมได้พบว่า ความถี่ของนิวคลีโอไทด์ทั้งสามตำแหน่งในรหัสพันธุกรรม (codon) มีความแตกต่างกันระหว่าง สปีชีส์ของแมลง แต่พบว่าไวรัสปรสิตรหัสพันธุกรรม (codon) มีรูปแบบความถี่ของนิวคลีโอไทด์ดังรูปที่ 3.2 และ ความถี่ของรหัสพันธุกรรม (codon usage) ของไวรัสปรสิตรหัสพันธุกรรมมีความสัมพันธ์กับผึ้ง แต่มีความแตกต่างกับแมลงชนิดอื่นๆ ที่ทดสอบดังรูปที่ 3.3



รูปที่ 3.2 ความถี่ของชนิดนิวคลีโอไทด์ในตำแหน่งต่าง ๆ ของรหัสพันธุกรรม



รูปที่ 3.3 แสดงความสัมพันธ์ระหว่างไวรัสปรสิตในผึ้งกับผึ้ง A) ไวรัสในกลุ่ม *Iflavirus* B) ไวรัสในกลุ่ม *Dicistroviridae*

วิจารณ์และสรุปผลการทดลอง

การสำรวจการติดเชื้อไวรัส Acute bee paralysis virus (ABPV), Black queen cell virus (BQCV), Chronic bee paralysis virus (CBPV), Deformed wing virus (DWV), Kashmir bee virus (KBV) และ Sacbrood virus (SBV) โดยใช้เทคนิค Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction (RT-PCR) เข้ามาช่วยในการตรวจสอบตัวอย่างผึ้งพันธุ์จากทางภาคเหนือของประเทศไทยที่เก็บช่วงระหว่างเดือนมิถุนายนปี พ.ศ. 2549 ถึงเดือนสิงหาคมปี พ.ศ. 2550 จำนวน 46 ฟาร์ม พบการติดเชื้อไวรัส 4 ชนิด คือ DWV, ABPV, SBV และ KBV

Deformed wing virus (DWV) เป็นเชื้อไวรัสที่ทำให้แสดงอาการอย่างชัดเจน คือ ปีกของผึ้งตัวเต็มวัยจะมีลักษณะที่ผิดปกติไป นอกจากผึ้งพันธุ์แล้วยังมีรายงานการศึกษา DWV ในผึ้งชนิดอื่น

ด้วย (Genersch *et al.*, 2006) และผลที่ได้จากการทดลองนี้พบว่าตรวจพบ DWV มากที่สุดจากในจำนวนเชื้อไวรัส 6 ชนิดที่ทำการตรวจสอบทั้งในผึ้งพันธุ์ตัวเต็มวัยและตัวอ่อน และเป็นเชื้อไวรัสชนิดเดียวที่พบในทุกจังหวัด แต่พบปริมาณที่ไม่สูงมากต่างจากผลการศึกษาจากประเทศอื่น (Tentcheva *et al.*, 2004b; Berényi *et al.*, 2006) ซึ่งพบ DWV มากถึง 90% ส่วนผลจากการทดลองพบการติดเชื้อไวรัสในผึ้งพันธุ์ตัวเต็มวัยจำนวน 15 ฟาร์ม คิดเป็น 33% ของจำนวนฟาร์มทั้งหมด และพบการติดเชื้อในผึ้งพันธุ์ตัวอ่อนจำนวน 29 ฟาร์มคิดเป็น 63% ของจำนวนฟาร์มทั้งหมด และเมื่อนำผลลำดับเบสที่ได้จากการทดลองมาเปรียบเทียบกับลำดับในฐานข้อมูลพบว่ามีความเหมือนกับ DWV โดยเปอร์เซ็นต์ความเหมือนมีค่า 94% การตรวจพบการติดเชื้อ DWV ในระยะตัวอ่อนมากกว่าตัวเต็มวัยนี้แตกต่างจากผลการศึกษาของ Tentcheva *et al.* (2004a) ที่พบในระยะตัวเต็มวัยมากกว่าในตัวอ่อน แต่ผลการศึกษาที่ได้สอดคล้องกับการศึกษาก่อนหน้านี้ที่แสดงให้เห็นว่าเชื้อไวรัสเพิ่มจำนวนได้ดีในระยะตัวอ่อน (Bailey and Woods, 1974) คล้ายกับเชื้อไวรัสชนิดอื่น เชื้อไวรัส DWV สามารถก่อโรคได้ในทุกระยะของการเจริญของผึ้งแต่เพิ่มจำนวนในระยะดักแด้มากที่สุด (Chen *et al.*, 2005) อย่างไรก็ตามเซลล์เจ้าบ้าน (host) มักสูญเสียความแข็งแรงก่อนเชื้อไวรัสจะเพิ่มจำนวนให้เพียงพอต่อการติดเชื้อไปยังเซลล์อื่น และเนื่องจากการที่อัตราการเพิ่มจำนวนของเชื้อก่อโรคสูงส่งผลให้เกิดความรุนแรงของโรคมามากขึ้นจึงนำไปสู่การตายของเซลล์เจ้าบ้านได้ (Chen *et al.*, 2006a) ดังนั้นตัวอ่อนจึงอาจตายก่อนการเจริญเป็นตัวเต็มวัยดังผลที่ได้จากการทดลองซึ่งพบการติดเชื้อในระยะตัวอ่อนมากกว่าในระยะตัวเต็มวัย นอกจากนั้นผลที่ได้ยังมีความแตกต่างกันโดยบางจังหวัดพบถึง 90% (จังหวัดเชียงราย) ในขณะที่บางจังหวัดพบเพียง 12% (จังหวัดพะเยา) และสำหรับในจังหวัดลำพูนและแพร่ นั้น DWV เป็นเชื้อไวรัสชนิดเดียวที่มีการตรวจพบอีกด้วย อาจเป็นไปได้ว่าลักษณะทางสภาวะแวดล้อมส่งผลต่อการติดเชื้อไวรัส โดยบริเวณจังหวัดเชียงรายขณะเก็บตัวอย่างเป็นช่วงที่มีฝนตก ทำให้มีลักษณะอากาศและพื้นดินเปียกชื้น ซึ่งอาจเป็นตัวกระตุ้นให้เกิดการระบาดของโรคต่าง ๆ ได้ดีขึ้น

Acute bee paralysis virus (ABPV) ตรวจพบมากเป็นลำดับสองรองลงมาจาก DWV พบการติดเชื้อไวรัสในผึ้งพันธุ์ตัวเต็มวัยจำนวน 9 ฟาร์ม คิดเป็น 20% ของจำนวนฟาร์มทั้งหมด และพบการติดเชื้อในผึ้งพันธุ์ตัวอ่อนจำนวน 21 ฟาร์มคิดเป็น 46% ของจำนวนฟาร์มทั้งหมด และเมื่อนำผลลำดับเบสที่ได้จากการทดลองมาเปรียบเทียบกับลำดับในฐานข้อมูลพบว่ามีความเหมือนกับ Israel acute paralysis virus และเปอร์เซ็นต์ความเหมือนมีค่า 97% โดยทั่วไปเชื้อไวรัสชนิดนี้มักตรวจพบในผึ้งที่ไม่แสดงอาการ (Berényi *et al.*, 2006) จากผลการทดลองพบว่าในจังหวัดเชียงรายมีการตรวจพบ ABPV ในผึ้งพันธุ์ระยะตัวอ่อนของทุกฟาร์ม และบางจังหวัดไม่พบการติดเชื้อไวรัส (จังหวัดลำพูนและแพร่) คล้ายกับผลจากการตรวจสอบเชื้อไวรัส DWV ดังนั้นข้อมูลนี้จึงอาจสนับสนุนผลของลักษณะสภาพแวดล้อมที่แตกต่างกันในแต่ละพื้นที่ต่อการติดเชื้อหรือแพร่ระบาดของไวรัสได้

Sacbrood virus (SBV) ถูกตรวจพบเป็นลำดับที่สามรองลงมา จากการศึกษาก่อนหน้านี้มีการตรวจสอบการติดเชื้อของผึ้งพันธุ์ระยะตัวอ่อนในแถบแอฟริกาใต้ (Topley *et al.*, 2005) พบการ

ติดเชื้อในตัวอย่างที่ไม่แสดงอาการได้ โดยใช้เทคนิค single multiplex RT-PCR สำหรับในประเทศไทยนั้นมียางานการพบเชื้อไวรัสชนิดนี้ในผึ้งโพรงที่เลี้ยงบนดอปปุและอ่างขาง (Areekul *et al.*, 1980) โดยเชื้อไวรัสที่ทำให้เกิดโรคแซคครูดในผึ้งโพรงเป็นสายพันธุ์ที่ค่อนข้างแตกต่างจากเชื้อที่ก่อโรคในผึ้งพันธุ์ จึงได้มีการตั้งชื่อเชื้อไวรัสสายพันธุ์ใหม่ซึ่งก่อโรคในผึ้งโพรงว่า “ไทยแซคครูดไวรัส” (Thai Sacbrood Virus, TSBV) (ทิพย์วดี, 2526) สำหรับในผึ้งพันธุ์นั้นมียางานเกี่ยวกับการสำรวจโรคจากเชื้อไวรัสชนิดนี้ค่อนข้างน้อย และผลจากการศึกษานี้พบการติดเชื้อไวรัสในผึ้งพันธุ์ตัวเต็มวัยจำนวน 2 ฟาร์ม คิดเป็น 4% ของจำนวนฟาร์มทั้งหมด และพบการติดเชื้อในผึ้งพันธุ์ตัวอ่อนจำนวน 5 ฟาร์มคิดเป็น 11% ของจำนวนฟาร์มทั้งหมด และเมื่อนำผลลำดับเบสที่ได้จากการทดลองมาเปรียบเทียบกับลำดับในฐานข้อมูลพบมีความเหมือนกับ SBV และมีเปอร์เซ็นต์ความเหมือน 91% โดยการติดเชื้อมีเฉพาะใน 2 จังหวัด คือ จังหวัดลำปางและเชียงรายจากผลที่ได้แสดงให้เห็นว่าการระบาดของเชื้อไวรัสชนิดนี้ในช่วงของสำรวจมีค่อนข้างน้อย อาจเนื่องจากลักษณะอาการเฉพาะตัวของโรคไวรัสชนิดนี้ ที่ค่อนข้างแสดงอาการให้เห็นอย่างชัดเจน ทำให้ผึ้งงานและเกษตรกรผู้เลี้ยงผึ้งสามารถพบและรักษาโรคแซคครูดได้อย่างทัน่วงที โดยการแยกผึ้งที่เป็นโรคออกจากรังเพื่อทำลายทิ้ง จึงไม่เกิดการกระจายของโรคมานัก

สำหรับ Kashmir bee virus (KBV) นั้น พบการติดเชื้อไวรัสในผึ้งพันธุ์ตัวเต็มวัยจำนวน 1 ฟาร์ม คิดเป็น 2% ของจำนวนฟาร์มทั้งหมด และพบการติดเชื้อในผึ้งพันธุ์ตัวอ่อนจำนวน 2 ฟาร์ม คิดเป็น 4% ของจำนวนฟาร์มทั้งหมด และเมื่อนำผลลำดับเบสที่ได้จากการทดลองมาเปรียบเทียบกับลำดับในฐานข้อมูลพบมีความเหมือนกับ KBV และเปอร์เซ็นต์ความเหมือนมีค่า 96% จากการศึกษาทางลำดับเบสพบว่า KBV และ ABPV มีความคล้ายคลึงกันค่อนข้างสูง (de Miranda *et al.*, 2004) นอกจากนั้นมีการศึกษาเกี่ยวกับการแพร่กระจายของไวรัสชนิดนี้ และคาดว่าเกี่ยวข้องกับไรวาร์ว (Varroa destructor) (Chen *et al.*, 2004) เนื่องจากพบการติดเชื้อไวรัส KBV มากขึ้นเมื่อมีการตรวจพบจำนวนไรมากขึ้นด้วย และผลการทดลองที่ได้จากการศึกษานี้พบว่า ตรวจพบการติดเชื้อของไวรัส KBV ในจังหวัดลำปางในฟาร์มที่มีจำนวนไรวาร์วค่อนข้างสูงเช่นกันเมื่อเปรียบเทียบกับจำนวนไรของจังหวัดหรือฟาร์มอื่นที่ไม่พบการติดเชื้อ แต่เมื่อทำการตรวจหาเชื้อไวรัส KBV ในไรวาร์วแต่ไม่พบการติดเชื้อไวรัสชนิดนี้ ซึ่งผลที่ได้แสดงให้เห็นถึงการถ่ายทอดไวรัสจากผึ้งสู่ผึ้งด้วยกันเอง และเป็นหลักฐานที่ช่วยสนับสนุนการวิจัยก่อนหน้านี้ (Chen *et al.*, 2006a; 2006b)

ด้านการศึกษาเกี่ยวกับ Chronic bee paralysis virus (CBPV) นั้น จากการวิจัยก่อนหน้านี้ แสดงผลให้เห็นว่า CBPV เป็นเชื้อไวรัสที่พบได้น้อยในบางประเทศ เช่น ในประเทศฝรั่งเศสและออสเตรียมีการตรวจพบน้อยกว่า 10% ของตัวอย่างที่ตรวจสอบ (Berényi *et al.*, 2006; Tentcheva *et al.*, 2004b) ในขณะที่บางประเทศ ได้แก่ ประเทศอูรุกวัยมีการพบอย่างกว้างขวางถึง 60% ของตัวอย่างที่ตรวจสอบ (Antúnez *et al.*, 2005) สำหรับในประเทศไทยทางภาคเหนือจากการศึกษานี้ทำให้ทราบว่าไม่พบการติดเชื้อ CBPV ในทุกตัวอย่างที่ทำการตรวจสอบ รวมถึงจากการศึกษาก่อนหน้านี้ด้วยเทคนิค real time PCR ในไรวาร์วที่เก็บจากจังหวัดลำพูนในปีพ.ศ. 2548 พบการ

ติดเชื้อไวรัสมากกว่า 1 ชนิด แต่ไม่พบ CBPV ในไรวาร์วีวเช่นกัน (Chantawannakul *et al.*, 2006) ดังนั้นอาจเป็นไปได้ว่าจังหวัดในบริเวณนี้ไม่มีการแพร่กระจายของไวรัสชนิดนี้

Black queen cell virus (BQCV) เป็นเชื้อไวรัสที่ทราบกันว่ามีความสัมพันธ์กับ *Nosema apis* (Bailey and Ball, 1991) และมีลักษณะเฉพาะตัวคือแสดงอาการทำให้ผนังเซลล์เกิดสีดำ จึงมีการตั้งชื่อตามลักษณะการก่อโรค สำหรับการทดลองนี้เมื่อทำการศึกษาแล้ว พบว่าไม่พบการติดเชื้อ BQCV เช่นเดียวกับ CBPV ซึ่งผลที่ได้แตกต่างจากการศึกษาในประเทศอื่น ๆ ที่พบการติดเชื้อบ้าง ประปราย (Antúnez *et al.*, 2006; Berényi *et al.*, 2006; Tentcheva *et al.*, 2004b)

และจากการศึกษาการติดเชื้อร่วมกันของเชื้อไวรัสหลายชนิดพบว่ามีการติดเชื้อร่วมกันของไวรัสสองชนิด คือ DWV และ ABPV ปริมาณ 17% ของตัวอย่าง การติดเชื้อร่วมกันของไวรัสสามชนิด 13% ของตัวอย่างและเชื้อไวรัสสี่ชนิด 4% ของตัวอย่าง โดยเชื้อไวรัสทั้งสี่ชนิดนี้ได้แก่ DWV, ABPV, SBV และ KBV พบทั้งสิ้นในตัวอย่างผึ้งพันธุ์ที่เก็บจากจังหวัดลำปางซึ่งเป็นแหล่งที่มีการถูกรบกวนโดยไรวาร์วีวในปริมาณสูงประมาณ 4.7 - 11.6% ซึ่งผลที่ได้แตกต่างจากการศึกษาในประเทศออสเตรียที่พบการติดเชื้อร่วมกันของไวรัสห้าชนิดคือ DWV, ABPV, BQCV, SBV และ CBPV แต่ไม่พบการติดเชื้อของไวรัส KBV ในตัวอย่างที่ทำการตรวจสอบ (Berényi *et al.*, 2006) สำหรับการสำรวจไรทั้งสองชนิดนั้น พบว่ามีการกระจายตัวของไรชนิดใดชนิดหนึ่งในทุกจังหวัดและพบมากในจังหวัดลำปางและน่าน ส่วนในจังหวัดเชียงรายไม่พบไรวาร์วีวเลยขณะที่ทำการสำรวจจากผลการทดลองแสดงให้เห็นว่ามีตัวอย่างผึ้งพันธุ์จำนวน 20 ฟาร์มจาก 46 ฟาร์ม หรือคิดเป็น 43% ที่ถูกรบกวนโดยไรวาร์วีวหรือไรทรอปิสิแลปส์และมี 15 ฟาร์มหรือคิดเป็น 33% ที่ถูกรบกวนจากไรทั้งสองชนิด และมีตัวอย่างผึ้งพันธุ์จำนวน 9 ฟาร์มที่ไม่พบไรแต่เมื่อทำการตรวจสอบในผึ้งพันธุ์พบการติดเชื้อไวรัส DWV หรือ ABPV หรือทั้งสองชนิด สำหรับการสำรวจในประเทศฝรั่งเศสนั้นตัวอย่างผึ้งพันธุ์ที่ไม่มีไรจะไม่พบการติดเชื้อไวรัสด้วย (Tentcheva *et al.*, 2004b) ดังนั้นผลการทดลองที่ได้จึงแสดงให้เห็นถึงการถ่ายทอดของเชื้อไวสนอกเหนือจากการมีไรเป็นพาหะได้ (Chen *et al.*, 2006a; 2006b) นอกจากนั้นมีตัวอย่างผึ้งพันธุ์จำนวน 8 ฟาร์มที่ไม่พบการติดเชื้อไวรัสเมื่อทำการทดสอบด้วยเทคนิค RT-PCR และมีตัวอย่างผึ้งพันธุ์จำนวน 2 ฟาร์มจากจังหวัดลำพูนและแพร่ที่ไม่พบไรและการติดเชื้อไวรัส สำหรับฟาร์มที่พบการติดเชื้อโรคตัวอ่อนเน่ายุโรเปียนและโรคซอล์คบุตรซึ่งมีรายงานการตรวจพบเล็กน้อยก่อนหน้านี้ (Theantana and Chantawannakul, 2008) แต่ไม่พบความสัมพันธ์ที่เกี่ยวกับการเกิดโรคไวรัสในการทดลองนี้ และเมื่อนำตัวอย่างไรวาร์วีวมาตรวจหาการติดเชื้อไวรัสทั้ง 6 ชนิดเช่นเดียวกับผึ้งพันธุ์ โดยมีตัวอย่างที่สามารถนำมาทดสอบได้ 12 ตัวอย่าง เนื่องจากฟาร์มที่เหลือมีจำนวนไรวาร์วีวไม่เพียงพอต่อการทดสอบ พบการติดเชื้อเฉพาะ DWV โดยพบการติดเชื้อจำนวน 7 ตัวอย่าง คิดเป็น 58% ของตัวอย่างทั้งหมด

ในด้านความสัมพันธ์ของรหัสพันธุกรรมของไวรัสสปิตและผึ้ง หรือเจ้าภาพ (host) ทำให้สามารถอธิบายวิวัฒนาการของจุลินทรีย์ก่อโรคกับสิ่งมีชีวิตเจ้าภาพได้ และ แสดงความจำเพาะ (specificity) ของไวรัสต่อการก่อโรคในผึ้ง เนื่องมาจากว่าการที่ไวรัสมี codon usage คล้ายกับในผึ้ง

ทำให้ไวรัสสามารถใช้กระบวนการสร้างจำลองสารพันธุกรรมและการแสดงออกของยีนในสิ่งมีชีวิต
เจ้าภาพ หรือ Host ได้อย่างมีประสิทธิภาพ

บทที่ 4

รา¹

บทนำ

โรคซอลค์บรูตเป็นโรคที่ระบาดได้ง่ายและพบได้ทั่วโลก เช่น สหรัฐอเมริกา สหราชอาณาจักร ยุโรป ออสเตรเลีย โดยเฉพาะประเทศเม็กซิโก ซึ่งให้สมญานามเชื่อนี้ว่าเป็นเชื้อก่อโรคที่รุนแรงและทำให้เกิดความเสียหายที่สุดในประเทศ (Heath, 1982; Hornitzky, 2001) ในไทยได้พบเชื้อนี้ระบาดในปี พ.ศ. 2530 ในจังหวัดเชียงใหม่ลงมาถึงพิษณุโลก (Chantawannakul, *et al.*, 2003) เชื้อรา *Ascosphaera apis* เป็นเชื้อราก่อโรคซอลค์บรูตในตัวอ่อนผึ้งที่พบในศตวรรษที่ 19 และได้มีการจัดกลุ่มโดยใช้หลักของสัณฐานวิทยา (Bissett, 1988) ในปี ค.ศ 1998 เพิ่งจะมีการใช้เทคนิคทางชีวโมเลกุลในการใช้เพื่อบ่งชนิดเชื้อดังกล่าว (Anderson *et al.*, 1998) การศึกษาในเชื้อราชนิดนี้ยังมีน้อยมากทั้งในและต่างประเทศ

ในวงจรชีวิตของราชินีในการเกิดโรคเริ่มจากสปอร์ของราที่ปนเปื้อนไปกับอาหารของตัวอ่อนผึ้ง เมื่อเข้าไปในระบบทางเดินอาหาร พบว่าจะมีการงอกของสปอร์ และเริ่มมีการเจริญของเส้นใย หลังจากนั้นพบว่าเชื้อราชินีจะแทงทะลุตัวอ่อนและเจริญทำให้ตัวอ่อนของผึ้งมีลักษณะ สีขาวหุ้มทั้งตัว หรือ เรียกว่า Mumification (Bailey and Ball, 1991) การเกิดโรคชนิดนี้ในตัวอ่อนผึ้งทำให้รังผึ้งอ่อนแอและลดปริมาณการ เก็บน้ำหวานถึง ประมาณ 50 เปอร์เซ็นต์ (Heath, 1982) ขบวนการเกิดโรคหรือกลไกก่อโรคของเชื้อดังกล่าวยังไม่มีรายงานการค้นพบ ในวงจรชีวิตของราชินีในการเกิดโรคเริ่มจากสปอร์ของราที่ปนเปื้อนไปกับอาหารของตัวอ่อนผึ้ง เมื่อเข้าไปในระบบทางเดินอาหาร พบว่าจะมีการงอกของสปอร์ และเริ่มมีการเจริญของเส้นใย หลังจากนั้นพบว่าเชื้อราชินีจะแทงทะลุตัวอ่อนและเจริญทำให้ตัวอ่อนของผึ้งมีลักษณะ สีขาวหุ้มทั้งตัว เชื้อราก่อโรคในแมลงหลายชนิดเช่น *Metarhizium anisopliae* สร้างเอนไซม์ subtilisin VCP1 และ Pr1 ซึ่งเป็น virulence factor ของเชื้อรา ในเชื้อ *Paenibacillus larvae* subsp *larvae* สร้างเอนไซม์ metalloprotease PLPA ที่ทำมีคุณสมบัติเป็น elastase และสามารถทำลาย Apidaecin และ Abaecin ที่ทำหน้าที่เป็น antibacterial peptide ใน hymenolymph ของผึ้ง (Chantawannakul and Dancer, 2001) เอนไซม์ metalloprotease ดังกล่าวมีส่วนเกี่ยวข้องและเป็นปัจจัยสำคัญของการก่อโรค (pathogenicity factor) และความรุนแรงของโรคซึ่งแตกต่างกันแต่ละสายพันธุ์ งานวิจัยนี้ นอกจากทำให้ทราบกลไกการก่อโรคยังทำให้สามารถทราบแหล่งที่มาของโรค บริเวณที่เป็นแหล่งแพร่เชื้อ การวิจัยนี้จึงมีจุดประสงค์ในการหาเอนไซม์ที่สร้างจากเชื้อดังกล่าวซึ่งสามารถทำให้ทราบกลไกการแทงผ่านเนื้อเยื่อทางเดินอาหารของตัวอ่อนผึ้งของ *Ascosphaera apis* ซึ่งอาจจะนำไปเป็นแนวทางในการป้องกันโรคต่อไป และศึกษาการผลิตเอนไซม์ของเชื้อราที่แยกได้จากประเทศไทย โดยเปรียบเทียบกับจุลินทรีย์สายพันธุ์อื่นๆ เช่น เยอร์มัน และ สายพันธุ์อ้างอิงจากศูนย์เก็บเชื้อ

¹ ตีพิมพ์ในวารสาร Journal of Apicultural Research

วัตถุประสงค์

เพื่อศึกษาความหลากหลายของราก่อโรคซอล์คบริดด้วยรูปแบบเอนไซม์ที่ผลิตและคุณสมบัติของเอนไซม์บางประการ

วิธีการทดลอง

1. การแยกและการตรวจสอบเชื้อรา *Ascosphaera apis*

1.1 นำซากตัวอ่อนผึ้งที่มีลักษณะแห้งตายอยู่ภายในหลอดรวงมาทำการวางบนอาหาร Sabouraud agar + 0.2% yeast extract (SabY) (ที่ผสม 1% streptomycin ให้มีความเข้มข้นสุดท้ายที่ 0.1 g/l) นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 30 °C จนกระทั่งมีเส้นใยของเชื้อราเจริญออกมาจากซากตัวอ่อนผึ้ง เชื้อเส้นใยของเชื้อราทำการเลี้ยงบนอาหาร SabY ที่ผสม 1% streptomycin (0.1 g/l) และทำการต่ออายุเชื้อทุกๆ 14-15 วัน

1.2 ทำการตรวจสอบลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเชื้อ *Ascosphaera apis* ที่แยกได้ภายใต้กล้องจุลทรรศน์เลนส์ประกอบและกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด (SEM) เพื่อสำรวจลักษณะเฉพาะของโครงสร้างสืบพันธุ์ของเชื้อรา *A. apis* ที่เรียกว่า spore cyst ซึ่งภายในจะบรรจุ spore ball หลายๆอันที่แต่ละ spore ball จะมี ascospores

2. การทดสอบการสร้างเอนไซม์ที่หลั่งภายนอกเซลล์ (extracellular enzyme) เพื่อทำการสร้างแบบแผนเอนไซม์ (enzymatic pattern) ของเชื้อรา *Ascosphaera apis*

2.1 ทำการตรวจสอบการสร้างเอนไซม์ที่หลั่งภายนอกเซลล์ของเชื้อรา *A. apis* โดยใช้ชุดตรวจ API ZYM kit และในการทดลองได้มีการทำ 2 ซ้ำ ในทุกๆไอโซเลท (BioMerieux, 2004)

2.2 ทำการทดสอบการสร้างเอนไซม์โปรติเอสด้วยวิธี agar plate method

3. การตรวจสอบชนิดของเอนไซม์โปรติเอสที่ผลิตจากเชื้อรา *Ascosphaera apis*

ทำการทดสอบชนิดของเอนไซม์โปรติเอส โดยการนำ crude enzyme ที่ได้จากการเพาะเลี้ยง *A. apis* G4 ในอาหาร Sabouraud dextrose broth + 0.2% yeast extract ที่อุณหภูมิ 30 °C 120 rpm เป็นเวลา 11 วัน มาทดสอบโดยการบ่มพร้อมกับตัวยับยั้งชนิดต่างๆ ดังตารางที่ 4.1 ประมาณ 30 นาที

ตารางที่ 4.1 สารยับยั้งชนิดต่างๆที่มีผลต่อการทำงานของเอนไซม์โปรติเอส (Chantawannakul, 1999)

ตัวยับยั้ง	ปริมาณความเข้มข้นที่เตรียม	ปริมาณความเข้มข้นที่ใช้	โปรติเอสกลุ่มเป้าหมาย
PMSF	100 mM ใน DMSO	0.5 mM	Serine protease
E64	10 mM ใน water	0.1 mM	Cysteine protease
Pepstatin	100 µg/ml ใน DMSO	0.5 µg/ml	Some pepsin-like aspartyl protease
1,10-Phenanthroline	100 mM ใน DMSO	1 mM	Metalloprotease
Phosphoramidon	1 mM ใน water	10 µM	Thermolysin-like Zn ²⁺ metalloprotease

จากนั้นนำมาทำการวัดค่าการทำงานของเอนไซม์โปรติเอส ด้วยวิธีการ Hide azure powder assay (Chantawannakul, 1999) โดยมี reaction mixture ดังตารางที่ 4.2

ตารางที่ 4.2 ปริมาณและชนิดของสารใน reaction mixture

	Hide azure powder	Water	Buffer	Enzyme	Inhibitor	DMSO
[water]	0.003 g	215 µl	1300 µl	-	-	-
[DMSO]	0.003 g	200 µl	1300 µl	-	-	15 µl
PMSF	0.003 g	-	1300 µl	200 µl	15 µl	-
E64	0.003 g	-	1300 µl	200 µl	15 µl	-
1,10-phenanthroline	0.003 g	-	1300 µl	200 µl	15 µl	-
Pepstatin	0.003 g	-	1300 µl	200 µl	15 µl	-
No inhibitor	0.003 g		15 µl	1300 µl	200µl	-
-						
DMSO	0.003 g	-	1300 µl	200 µl	-	15 µl

ทำการปมแต่ละ reaction mixture ที่อุณหภูมิ 37 °C เป็นเวลา 2 ชั่วโมง จากนั้นนำไปปั่นที่ความเร็ว 10,000 rpm ดูดเอาส่วนใสมาวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 595 nm

4. การศึกษาสภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์ที่ได้ทำการคัดเลือก

4.1 ทำการศึกษาสภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์โปรติเอส

ทำการเพาะเลี้ยงเชื้อรา *A. apis* ในอาหารชนิดเหลวต่างๆ ได้แก่

- Sterile germination medium
- Yeast glucose phosphate medium
- Potato dextrose broth (PDB)
- PDB + 0.4% yeast extract
- PDB + 0.5% malt extract
- Sabouraud medium (Sab)
- Sab + 0.2% yeast extract

นำไปบ่มพร้อมเขย่าที่อุณหภูมิ 30 °C ที่ความเร็ว 120 rpm เป็นเวลา 7 วัน และ 11 วัน จากนั้นนำอาหารเหลวที่มีเชื้อเจริญอยู่ไปเหวี่ยงแยกที่ความเร็ว 6,000 rpm อุณหภูมิ 4 °C เป็นเวลา 10 นาที จากนั้นดูดเอาส่วนใสไปทดสอบค่าการทำงานของโปรติเอสด้วยวิธี azocasein method การวัดกิจกรรมของเอนไซม์โปรติเอสด้วยวิธี azocasein method

4.2 การศึกษาหาค่าพีเอชที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์โปรติเอส

ทำการเพาะเลี้ยงเชื้อรา *A. apis* ในอาหารที่เหมาะสมและทำการปรับพีเอชของอาหารเป็น 6.0, 7.0, 8.0, 9.0 และ 10.0 นำไปบ่มพร้อมเขย่าที่อุณหภูมิ 30 °C ที่ความเร็ว 120 rpm เป็นเวลา 7 วัน จากนั้นนำอาหารเหลวที่มีเชื้อเจริญอยู่ไปเหวี่ยงแยกที่ความเร็ว 6,000 rpm อุณหภูมิ 4 °C เป็นเวลา 10 นาที จากนั้นดูดเอาส่วนใสไปทดสอบค่าการทำงานของโปรติเอส

4.3 การศึกษาผลของสภาวะความเป็นกรดและด่างในอาหารในระหว่างการเพาะเลี้ยงต่อการผลิตเอนไซม์โปรติเอส

ทำการเพาะเลี้ยงเชื้อรา *A. apis* ในอาหารเหลว และอาหารแข็งที่มี 0.1% bromophenol blue เป็น indicator ในอาหารที่มีสารอาหารชนิดต่างๆ โดยมีพีเอช เริ่มต้นที่ 5.2 จากนั้นนำไปบ่มพร้อมเขย่าที่อุณหภูมิ 30 °C ที่ความเร็ว 120 rpm เป็นเวลา 7 วัน โดยอาหารชนิดต่างๆ ได้แก่

- 0.1% yeast extract
- 0.1% yeast extract + 1.35% K₂HPO₄
- 0.1% yeast extract + 1% glucose
- 0.1% yeast extract + 1% glucose + 1.35% K₂HPO₄
- 1% yeast extract + 1% glucose
- 1% yeast extract + 1% glucose 1.35% K₂HPO₄

จากนั้นนำอาหารเหลวที่มีเชื้อเจริญอยู่ไปเหวี่ยงแยกที่ความเร็ว 6,000 rpm อุณหภูมิ 4 °C เป็นเวลา 10 นาที จากนั้นดูดเอาส่วนใสไปทดสอบค่าการทำงานของโปรติเอส และทำการวัดค่าพีเอชที่ได้จากอาหารแต่ละชนิดในแต่ละไอโซเลท

5. การศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการผลิตเอนไซม์ β -N-acetylglucosaminidase

5.1 การศึกษาหาอาหารที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์ β -N-acetylglucosaminidase

ทำการเพาะเลี้ยงเชื้อรา *A. apis* ในอาหารชนิดต่างๆ ได้แก่ basal salt + 2% colloidal chitin และ enrichment culture ที่ความเข้มข้น colloidal chitin ต่างๆ (0.2, 0.5, 1, 1.5, 2 และ 2.5%) นำไปบ่มพร้อมเขย่าที่อุณหภูมิ 30 °C ที่ความเร็ว 120 rpm เป็นเวลา 14 วัน จากนั้นนำอาหารเหลวที่มีเชื้อเจริญอยู่ไปเหวี่ยงแยกที่ความเร็ว 6,000 rpm อุณหภูมิ 4 °C เป็นเวลา 10 นาที จากนั้นดูดเอาส่วนใสไปทดสอบค่าการทำงานของ β -N-acetylglucosaminidase ตามวิธีการของ Tsujibo และคณะ (1998) การวัดกิจกรรมของเอนไซม์ β -N-acetylglucosaminidase โดย reaction mixture ประกอบไปด้วย reaction tube: 200 μ l 1.0mM *p*-nitrophenyl- β -N-acetylglucosamine (PNP- β -GlcNAc) ในสารละลาย 50 mM Tris-HCl buffer (pH 7.5) และ 100 μ l crude enzyme

Control tube: 200 μ l 1.0 mM (PNP- β -GlcNAc) ในสารละลาย 50 mM Tris-HCl buffer (pH 7.5) และ 100 μ l Tris-HCl buffer (pH 7.5) จากนั้นนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 °C เป็นเวลา 2 ชั่วโมง และทำการหยุดปฏิกิริยาด้วย 0.2 M Na₂CO₃ จากนั้นนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 420 nm ด้วยเครื่อง spectrophotometer นำค่าการดูดกลืนแสงที่ได้ไปเปรียบเทียบกับปริมาณ *p*-nitrophenol จากกราฟมาตรฐานสารละลาย *p*-nitrophenol และกำหนดให้ค่า 1 unit ของ β -N-acetylglucosaminidase มีค่าเท่ากับปริมาณของ 1 μ mol ของ *p*-nitrophenol ที่ถูกปลดปล่อยภายในเวลา 1 นาทีภายใต้สภาวะที่ทำการทดลอง

6. การหาค่า specific activity

หาค่า specific activity ได้จากการวัดปริมาณโปรตีนโดยใช้ modified Lowry's method (Lowry, 1951)

7. การทำบริสุทธิ์เอนไซม์ β -N-acetylglucosaminidase

7.1 การตกตะกอนโปรตีนด้วยเกลือแอมโมเนียมซัลเฟต (protein salting out) นำ crude enzyme ที่ได้มาทำการตกตะกอนด้วยแอมโมเนียมซัลเฟตที่ความเข้มข้นต่างๆตามลำดับดังนี้ 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80 และ 90% saturation ตามลำดับ เมื่อเกลือแอมโมเนียมซัลเฟตละลายจนหมด นำไปเหวี่ยงแยกส่วนใสที่ความเร็ว 6,000 rpm อุณหภูมิ 4 °C เป็นเวลา 30 นาที แยกส่วนใสและตะกอน แล้วทำการละลายตะกอนด้วย Tris-HCl buffer ที่พีเอชที่เหมาะสมต่อการทำบริสุทธิ์เอนไซม์ขั้นต่อไป วัดค่าการทำงานของ β -N-acetylglucosaminidase และความเข้มข้นของโปรตีนในส่วนตะกอนที่ได้แล้วนำมาสร้างกราฟเพื่อวิเคราะห์หาช่วงการตกตะกอนที่เหมาะสมต่อไป

7.2 การกำจัดเกลือด้วยวิธี ultrafiltration ใส่ตัวอย่างโปรตีนปริมาตร 15 ml ในหลอด ultrafiltration ชนิด 10 kDa cutoff (Pall, USA) จากนั้นนำไปเหวี่ยงที่ความเร็ว 1,800 x g เป็นเวลา 1 ชั่วโมง จากนั้นนำตัวอย่างโปรตีนที่ถูกทำให้เข้มข้นขึ้นพร้อมกับการเหวี่ยงเอาเกลือออกไปแล้วมา

ทำการปรับปริมาตรด้วย 20mM Tris-HCl buffer, pH 8.0 ให้ได้ปริมาตร 15 ml แล้วนำไปเหวี่ยงอีกครั้งหนึ่งและทำซ้ำขั้นตอนนี้อีก 1 ครั้ง เพื่อให้สามารถกำจัดเกลือออกไปให้ได้มากที่สุด

7.3 การทำบริสุทธิ์เอนไซม์ด้วยวิธีโครมาโทกราฟีแบบแลกเปลี่ยนประจุ (ion-exchange chromatography)

7.4 การทำบริสุทธิ์ด้วยวิธีโครมาโทกราฟีแบบ gel filtration column chromatography

8. การศึกษาลักษณะเฉพาะบางประการของเอนไซม์ β -N-acetylglucosaminidase ที่แยกบริสุทธิ์

8.1 การศึกษา พีเอช ที่เหมาะสมต่อการทำงานของ β -N-acetylglucosaminidase

นำสารตั้งต้น (substrate) ที่ใช้ในการวัดค่าการทำงานของเอนไซม์ β -N-acetylglucosaminidase ได้แก่ *p*-nitrophenyl- β -N-acetylglucosamine มาละลายให้มีความเข้มข้น 1 mM ในบัฟเฟอร์ที่มีค่า พีเอช ต่างๆ ตั้งแต่ 2.0, 3.0, 4.0, 5.0, 6.0, 7.0, 8.0, 9.0 และ 10.0 แล้วทำการวัดค่าการทำงานของเอนไซม์

8.2 การศึกษาอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการทำงานของ β -N-acetylglucosaminidase

ทำการวัดค่าการทำงานของเอนไซม์โดยใช้ *p*-nitrophenyl- β -N-acetylglucosamine ที่ละลายในบัฟเฟอร์ที่เหมาะสม จากนั้นทำการวัดค่าการทำงานของเอนไซม์ โดยทำการบ่มที่อุณหภูมิต่างๆ ที่ 0, 10, 20, 30, 35, 40, 45, 50, 55 และ 60 °C

8.3 การศึกษาผลของแคทไอออนต่อการทำงานของเอนไซม์ β -N-acetylglucosaminidase

นำสารละลายเอนไซม์มาเติมแคทไอออนชนิดต่างๆ ได้แก่ Ca^{2+} , Mg^{2+} , K^+ , Na^+ , Cu^{2+} , Zn^{2+} และ Li^+ ให้มีความเข้มข้นสุดท้ายที่ 1 mM จากนั้นนำไปทำการวัดค่าการทำงานของเอนไซม์ที่ละลายในบัฟเฟอร์ที่เหมาะสม จากนั้นนำบ่มที่อุณหภูมิที่เหมาะสม ผลที่ได้เทียบกับค่าการทำงานของ 100 เปอร์เซ็นต์จากการทำงานของเอนไซม์ในขณะที่ไม่ได้เติมแคทไอออนที่พีเอชและอุณหภูมิที่เหมาะสม

8.4 การศึกษาความเสถียรของเอนไซม์ β -N-acetylglucosaminidase ต่ออุณหภูมิ

ทำการทดลองเช่นเดียวกับการวัดค่าการทำงานของเอนไซม์ แต่ก่อนนำเอนไซม์มาทำการวัดค่าการทำงาน นำเอนไซม์ไปแช่ที่อุณหภูมิต่างๆ ที่ 30, 35, 37, 40, 45, 50, 55 และ 60 เป็นเวลา 60 นาที ผลที่ได้เทียบกับค่าการทำงานของ 100 เปอร์เซ็นต์ จากการดำเนินงานของเอนไซม์ที่พีเอชและอุณหภูมิที่เหมาะสมที่ไม่มีการบ่มที่อุณหภูมิใดๆ ก่อนนำมาทำการวัดค่าการทำงาน

8.5 การศึกษาความเสถียรของเอนไซม์ β -N-acetylglucosaminidase ต่อ พีเอช

ทำการทดลองเช่นเดียวกับการวัดค่าการทำงานของเอนไซม์ แต่ก่อนนำเอนไซม์มาทำการวัดค่าการทำงาน นำเอนไซม์ไปแช่ในบัฟเฟอร์ที่ พีเอช ต่างๆ ได้แก่ 5.0, 6.0, 7.0, 8.0, 9.0 และ 10.0 เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ผลที่ได้เทียบกับค่าการทำงานของ 100 เปอร์เซ็นต์ จากการดำเนินงานของเอนไซม์ที่พีเอชและอุณหภูมิที่เหมาะสมที่ไม่มีการบ่มที่พีเอชใดๆ ก่อนนำมาทำการวัดค่าการทำงาน

9. การตรวจสอบความบริสุทธิ์ของเอนไซม์ด้วยวิธี SDS-PAGE (Sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel)

9.1 ผสมสารละลายในส่วน resolving gel ซึ่งประกอบด้วย 40% acrylamide 2.5 ml, 2% bis-acrylamide 1.33 ml, resolving gel buffer 2.5 ml, 10% SDS 0.1 ml, น้ำกลั่น 3.46 ml และ 10% ammonium persulphate 0.1 ml ผสมคนให้เข้ากันประมาณ 30 วินาที จากนั้นใส่ TEMED 0.01 ml ผสมให้เข้ากันและดูดใส่ในช่องว่างของแผ่นกระจกประมาณ 7 ml ดูดน้ำกลั่นใส่ด้านบนของผิวเจลประมาณ 1 ml จากนั้นปล่อยให้เกิดการ polymerization ประมาณ 1 ชั่วโมง

9.2 ผสมสารละลายในส่วน stacking gel ซึ่งประกอบด้วย 40% acrylamide 0.33 ml, 2% bis-acrylamide 0.30 ml, stacking gel buffer 0.83 ml, 10% SDS 0.03 ml, น้ำกลั่น 1.81 ml และ 10% ammonium persulphate 0.03 ml ผสมคนให้เข้ากันประมาณ 30 วินาที จากนั้นใส่ TEMED 0.003 ml ผสมให้เข้ากันและดูดใส่ต่อจากชั้น resolving gel ประมาณ 2 ml จากนั้นใช้ comb เสียบบนผิวเจลทันทีโดยระวังไม่ให้เกิดฟองอากาศระหว่างผิวสัมผัสของเจลและ comb จากนั้นปล่อยให้เกิดการ polymerization ประมาณ 30 นาที

9.3 เติม running buffer สำหรับการทำให้ SDS-PAGE ลงในอ่างที่ใช้ในการทำ electrophoresis ให้เกินเครื่องหมาย บ่งบอกปริมาณ buffer ต่ำสุดที่ใช้ในการทำ electrophoresis มาพอประมาณ จากนั้นทำการถอด comb ออกจากผิวเจล stacking gel และใส่ running buffer ลงใน upper buffer reservoir ให้ท่วมผิวด้านบนของ stacking gel

9.4 เตรียมตัวอย่างโปรตีน โดยผสมตัวอย่างโปรตีนใน loading buffer สำหรับการทำให้ SDS-PAGE ในอัตราส่วน 1:1 และนำไปทำการต้มในน้ำเดือดที่มีอุณหภูมิประมาณ 95 °C ประมาณ 3 นาที

9.5 ทำการโหลดตัวอย่างโปรตีนลงไปบนหลุมบนผิว stacking gel ปริมาตร 5-10 μ l และโหลด pagerulerTM prestained protein ladder (Fermentas) เพื่อใช้เป็น marker บอกถึงมวลโมเลกุลในตำแหน่งต่างๆ บนผิวเจล

9.6 ต่อขั้วไฟฟ้าลบและบวกบนฝาปิดอ่าง electrophoresis เข้ากับ power supply และทำการ run โดยใช้กระแสไฟฟ้า 200 โวลต์ รอจนกระทั่งเห็นแถบสีของ bromophenol blue เคลื่อนที่ลงไปจนถึงปลายด้านล่างของแผ่นเจล

10. การตรวจสอบแถบโปรตีนบนเจลด้วยการย้อมแบบ silver staining

หลังจากการทำบริสุทธิ์เอนไซม์นำเอนไซม์ที่ได้มาทำการตรวจสอบความบริสุทธิ์ด้วยการทำให้ SDS-PAGE จากนั้นนำเจลมาทำการย้อมด้วยชุด Plusone silver staining kit, Protein (Amersham Biosciences, Sweden)

ผลการทดลอง

1. การแยกและตรวจสอบเชื้อรา *Ascosphaera apis*

จากการแยกเชื้อรา *A. apis* จากตัวอย่าง ตัวอ่อนผึ้งที่ตายจากโรคชอล์คบรูต (chalkbrood disease) บนอาหาร Sabouraud agar + 0.2% yeast extract (SabY) ที่ผสม 1% streptomycin สามารถแยกเชื้อราได้ทั้งหมด 7 ไอโซเลท และได้รับความอนุเคราะห์จาก Department of Technology, National Institute of Technology and Evaluation, Japan อีก 2 ไอโซเลท ดังตารางที่ 4.3

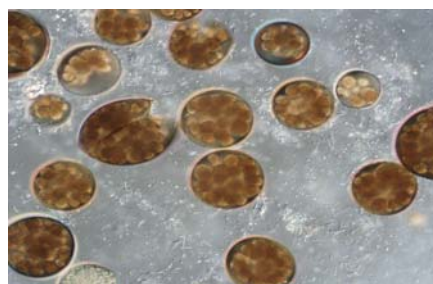
ตารางที่ 4.3 แหล่งที่มาของเชื้อรา *A. apis* แต่ละไอโซเลท

ไอโซเลทเชื้อรา <i>A. apis</i>	แหล่งที่ได้รับ / แหล่งที่ทำการแยก
IFO 31608 และ NBRC 9831	ได้รับจาก Department of Technology, National Institute of Technology and Evaluation, Japan
HL-5-2, HL-8-3 และ MR6	แยกได้จากฟาร์มผึ้งใน จ.เชียงใหม่ ประเทศไทย
G1, G2, G3 และ G4	แยกได้จากตัวอ่อนผึ้งที่ตายจากประเทศเยอรมัน

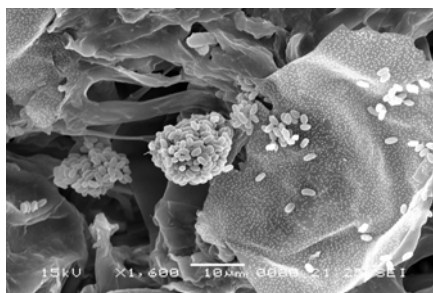
การตรวจสอบลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเชื้อรา *A. apis* ภายใต้กล้องจุลทรรศน์เลนส์ประกอบและกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด (Scanning electron microscope, SEM) ได้ผลการทดลองดังนี้ ลักษณะเส้นใยของเชื้อรา *A. apis* ที่ทำการสำรวจภายใต้กล้องจุลทรรศน์เลนส์ประกอบที่กำลังขยาย 40 เท่า แสดงให้เห็นว่ามีการสร้าง septum กันภายในเส้นใยของเชื้อรา จัดเป็นเชื้อราที่มีเส้นใยแบบ septate hyphae นอกจากนี้ลักษณะผิวภายนอกของเส้นใยมีลักษณะผิวเรียบ (รูปที่ 4.1 (1)) และพบการสร้างโครงสร้างสืบพันธุ์ที่เรียกว่าสปอร์ซิสต์ โดยภายในสปอร์ซิสต์จะบรรจุสปอร์บอลหลายอันไว้ภายใน (รูปที่ 4.1 (2)) และเมื่อทำการตรวจสอบลักษณะของเชื้อรา *A. apis* ภายใต้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราดสามารถสำรวจเห็น ascospores ที่บรรจุอยู่ภายในสปอร์บอลที่แตกออกมาแล้ว (รูปที่ 4.1 (3))



(1)



(2)



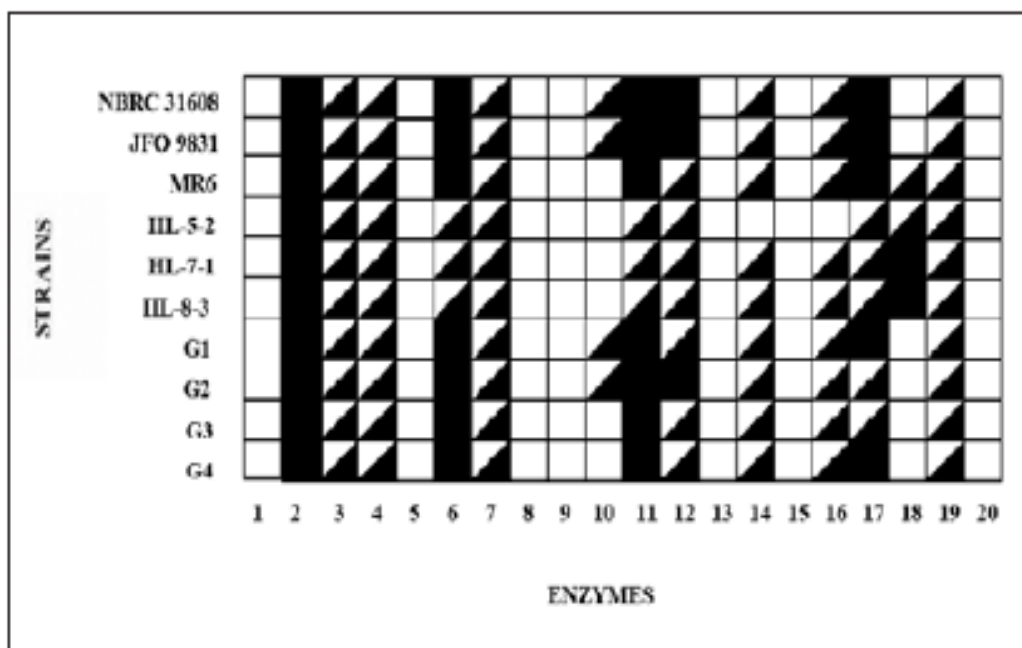
(3)

รูปที่ 4.1 (1) ลักษณะเส้นใยของเชื้อรา *Ascospaera apis* ที่แยกได้, (2) ลักษณะของสปอร์ซิสต์ (spore cyst) ที่ห่อหุ้มสปอร์บอล (spore ball) ของเชื้อรา *A. apis* ภายใต้กล้องจุลทรรศน์เลนส์ประกอบ, (3) ลักษณะสปอร์บอล (spore ball) ที่แตก ภายในบรรจุ ascospores อยู่ของเชื้อรา *A. apis* ภายใต้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด

2. ทดสอบการสร้างเอนไซม์ที่หลั่งภายนอกเซลล์ (extracellular enzyme) เพื่อทำการสร้างแบบแผนเอนไซม์ (enzymatic pattern) ของเชื้อรา *Ascospaera apis*

2.1 จากการทดสอบเชื้อรา *Ascospaera apis* 9 ไอโซเลท กับชุดตรวจ API ZYM kit

Ascospaera apis เป็นราก่อโรคขอล์คบริดในผึ้ง เมื่อทดสอบรูปแบบเอนไซม์ที่หลั่งจากเชื้อราก่อโรคชนิดนี้ จาก 9 สายพันธุ์พบว่าการสร้างเอนไซม์ทั้งหมด 11 ชนิด คือ เอนไซม์ protease, β -N-acetylglucosidase, alkaline phosphatase, esterase, esterase lipase, leucine arylamidase, valine arylamidase, acid phosphatase, naphthol-AS-BI-phosphohydrolase, β glucosidase และ β -mannosidase) ดังรูปที่ 4.2



รูปที่ 4.2 รูปแบบของเอนไซม์ของเชื้อรา *Ascosphaera apis* ทั้ง 10 ไอโซเลทโดยใช้ชุด kit API ZYM กล่องที่บแสดงปฏิกิริยาเท่ากับ 20 - 40 nmol ส่วนกล่องที่บครึ่งส่วนแสดงปฏิกิริยาเท่ากับ 5 - 20 nmol (NBRC 31608 และ JFO 9831 เป็นสายพันธุ์อ้างอิง MR6, HL 5-2, HL 7-1, HL 8-3 เป็นสายพันธุ์จากตัวอย่างในประเทศไทย G1-4 เป็นสายพันธุ์จากประเทศเยอรมัน)

1 = control; 2 = alkaline phosphatase; 3 = esterase; 4 = esterase lipase; 5 = lipase; 6 = leucine arylamidase; 7 = valine arylamidase; 8 = cystine arylamidase; 9 = trypsin; 10 = α -chymotrypsin; 11 = acid phosphatase; 12 = naphthol-AS-BI-phosphohydrolase; 13 = α -galactosidase; 14 = β -galactosidase; 15 = β -glucuronidase; 16 = α -glucosidase; 17 = β -glucosidase; 18 = N-acetyl- β -glucosaminidase; 19 = α -mannosidase and 20 = α -fucosidase

ตารางที่ 4.4 ค่าความเข้มข้นของเอนไซม์ชนิดต่างๆที่เชื้อรา *A. apis* หลังภายนอกเซลล์

เอนไซม์	<i>A. apis</i> ไอโซเลทต่างๆ									
	NBRC	IFO	MR6	HL5	HL8	G1	G2	G3	G4	
	9831	31608								
Alkaline phosphatase	5	5	5	5	5	5	4	5	5	
Esterase	3	2	2	2	2	2	2	2	3	
Esterase lipase	2	2	3	1	1	2	1	2	2	
Lipase	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
Leucine arylamidase	4	4	4	3	2	4	4	4	4	
Valine arylamidase	2	2	2	1	1	2	2	1	1	
Cystine arylamidase	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
Trypsin	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
□-chymotrypsin	1	1	-	-	-	1	1	-	-	
Acid phosphatase	4	5	4	3	3	4	4	4	4	
Naphthol-AS-BI-phosphohydrolase	4	4	3	1	1	3	4	3	3	
□-galactosidase		-	-	-	-	-	-	-		
-										
β-galactosidase	2	2	2	-	1	1	1	1	2	
β-glucoronidase	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
□-glucosidase	2	2	1	-	1	1	1	1	1	
β-glucosidase	5	5	5	2	2	5	2	3	5	
N-acetyl-β-glucosaminidase	-	-	1	2	4	-	-	-	-	
□-mannosidase	2	3	2	1	1	1	1	2	1	
□-fucosidase	-	-	-	-	-	-	-	-	-	

หมายเหตุ : 1 = 5 nmol, 2 = 5-10 nmol, 3 = 10-20 nmol, 4 = 20-30 nmol, 5 = 40 nmol หรือมากกว่า

2.2 การทดสอบด้วยวิธี agar plate method

จากการทดสอบการสร้างเอนไซม์โปรติเอส (protease), ไคติเนส (chitinase) และอะไมเลส (amylase) ของเชื้อรา *A. apis* ทุกไอโซเลท พบว่าเมื่อทำการทดสอบการผลิตเอนไซม์โปรติเอส บนอาหารแข็ง skim milk agar พบว่าไม่เกิดวงใสรอบโคโลนีได้และเมื่อทำการทดสอบการผลิตเอนไซม์ไคติเนส บนอาหารแข็ง colloidal agar พบว่าไม่มีการเปลี่ยนสีของอาหารเป็นสีเหลืองรอบโคโลนีสุดท้ายเชื้อรา *A. apis* ทุกไอโซเลทเมื่อทำการทดสอบการผลิตเอนไซม์อะไมเลส บนอาหารแข็ง starch agar พบว่าไม่เกิดวงใสรอบโคโลนีเมื่อทำการทดสอบด้วยไอโอดีนรอบโคโลนีของเชื้อรา

3. การตรวจสอบชนิดของเอนไซม์โปรติเอสที่ผลิตจากเชื้อรา *Ascosphaera apis*

หลังจากบ่ม crude enzyme พร้อมกับตัวยับยั้งชนิดต่างๆ พบว่าค่าการทำงานของเอนไซม์จะถูกยับยั้งมากที่สุดเมื่อทำการบ่ม crude enzyme กับ PMSF ก่อนนำไปวัดค่าการทำงาน โดยเหลือค่าการทำงานของเอนไซม์โปรติเอส เพียง 6.5% นอกจากนี้ 1,10-phenanthroline สามารถยับยั้งค่าการทำงานของเอนไซม์โปรติเอสได้เช่นกัน โดยเหลือค่าการทำงาน 54.3% ดังนั้นโปรติเอสที่ผลิตจากเชื้อรา *A. apis* ควรเป็นเอนไซม์โปรติเอส ในกลุ่ม serine protease และ metalloprotease และผลจากการบ่ม crude enzyme กับตัวยับยั้งที่เหลือ มีผลดังตารางที่ 4.5

ตารางที่ 4.5 ค่าการทำงานของ crude enzyme หลังการบ่มพร้อมกับตัวยับยั้งชนิดต่าง ๆ

สารทดสอบ	ค่า O.D. 595 nm	ค่า O.D. 595 nm ที่ลบค่า O.D. 595 ของตัวควบคุม (-) และ (%) ค่าการทำงานที่เหลือ
PMSF	0.021	0.003 (6.5%)
E64	0.062	0.047 (102.2%)
1,10-phenanthroline	0.043	0.025 (54.3%)
Pepstatin	0.066	0.048 (104.3%)
[water] (-)	0.015	
[DMSO] (-)	0.018	
Water (+)	0.049	0.034
DMSO (+)	0.064	0.046 (100%)

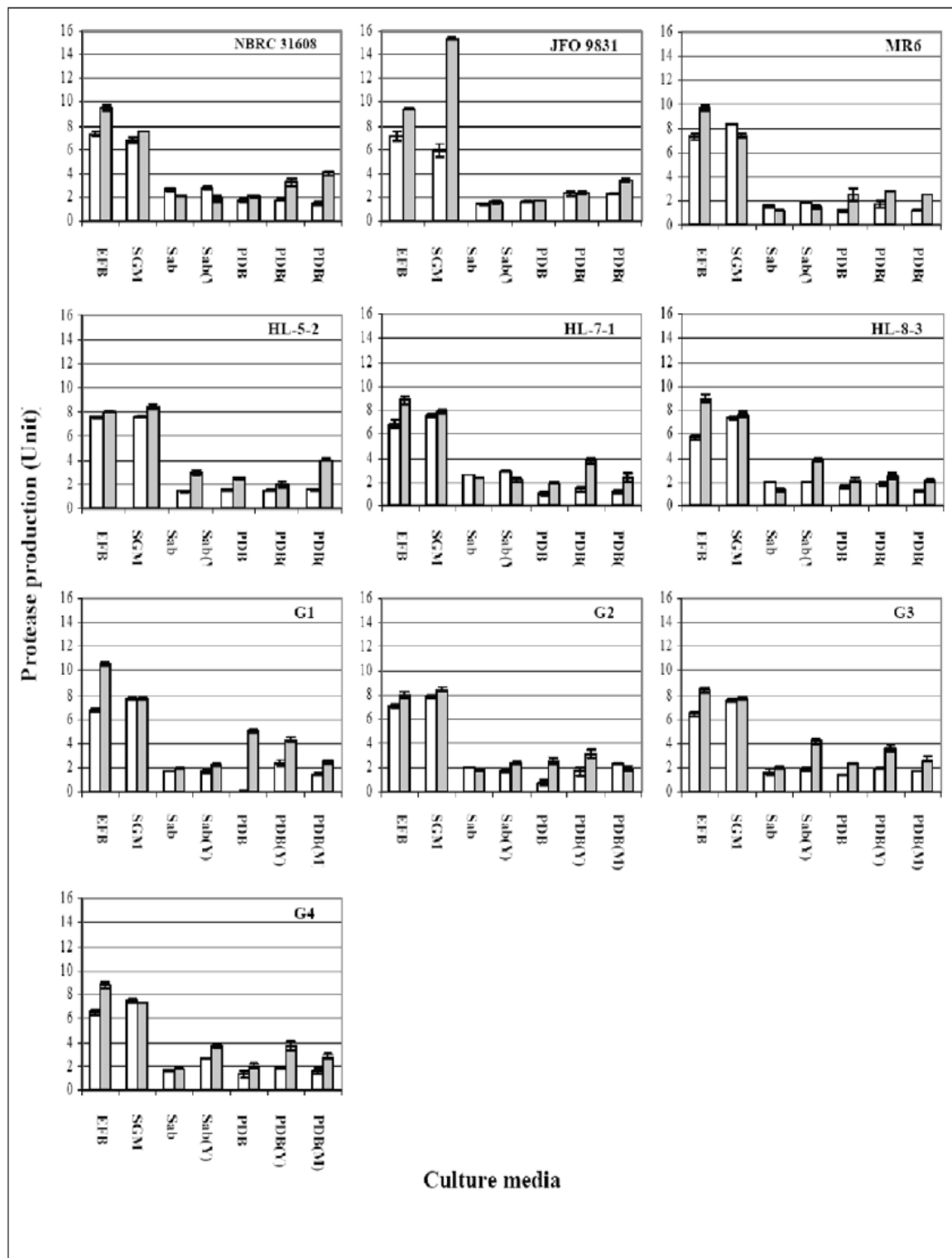
หมายเหตุ: [water] (-) = negative control ใน reaction mixture ใช้ น้ำแทนเอนไซม์
 [DMSO] (-) = negative control ใน reaction mixture ใช้ DMSO แทนเอนไซม์
 [water] (+) = positive control ใน reaction mixture โดยมี น้ำและเอนไซม์
 [DMSO] (+) = positive control ใน reaction mixture โดยมี DMSO และเอนไซม์

4. การหาสภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์ที่ได้ทำการคัดเลือก

4.1 การศึกษาหาอาหารที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์โปรติเอส

เอนไซม์หลักที่ศึกษาคือ เอนไซม์ protease และ β -N-acetylglucosaminidase ที่คาดว่าจะมีส่วนเกี่ยวข้องกับการเจาะผ่านผนังของช่องท้องของตัวอ่อนผึ้งและการก่อโรค *A. apis* จะสร้างเอนไซม์โปรติเอส มากที่สุดในอาหารชนิด sterile germination medium เมื่อเลี้ยงเป็นเวลา 11 วัน (รูปที่ 4.3) และบ่มที่ 30°C เอนไซม์proteases ที่สร้างจัดอยู่ในกลุ่ม serine protease เชื้อราก่อโรคนี้สร้าง

เอนไซม์ β -N-acetylglucosaminidase มากที่สุดเมื่อเลี้ยงใน enrichment culture medium ประกอบด้วย 0.2% colloidal chitin เป็นเวลา 14 วันที่ อุณหภูมิ 30°C



รูปที่ 4.3 แสดงการผลิตเอนไซม์โปรติเอสในอาหารที่แตกต่างกัน (□ 7 วัน ■ 11 วัน)

เมื่อทำการแยกบริสุทธิ์เอนไซม์ β -N-acetylglucosaminidase พบว่าเอนไซม์ สภาวะของพีเอชที่มีผลต่อการทำงานของเอนไซม์อย่างชัดเจนคือ พีเอช 6.0 โดยทำให้เอนไซม์มีค่าการทำงานสูงสุดถึง 75.264 unit/ml มากกว่าที่ พีเอช 9.0 ซึ่งเป็นพีเอชที่ทำให้เอนไซม์ทำงานได้ต่ำที่สุดถึง 313.6 เท่า และให้ค่าการทำงานมากกว่าพีเอชที่เป็นกลางประมาณ 2 เท่า แสดงให้เห็นถึงความสำคัญของสภาวะพีเอชที่มีต่อการทำงานของเอนไซม์ได้เป็นอย่างดี พบว่าในเชื้อก่อโรคในแมลง เช่น *Metarhizium anisopliae* มีค่าพีเอชที่เหมาะสมต่อการทำงานของเอนไซม์ β -N-acetylglucosaminidase ที่ช่วงพีเอชที่เป็นกรดอ่อนๆเช่นเดียวกัน โดยมีค่าพีเอชเหมาะสมที่ 5.0 ซึ่งให้ค่าการทำงานมากกว่าพีเอชที่เป็นกลาง 2 เท่า และอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการทำงานของเอนไซม์คือ 37 °C แต่เป็นที่น่าสังเกตว่าอุณหภูมิไม่ได้เป็นปัจจัยสำคัญที่มีอิทธิพลต่อการเปลี่ยนแปลงค่าการทำงานของเอนไซม์ให้แตกต่างกันอย่างชัดเจนดังเช่นสภาวะของพีเอช โดยพบว่าค่าการทำงานของเอนไซม์ที่ได้ไม่แตกต่างกันมากนักในช่วงอุณหภูมิตั้งแต่ 30 ถึง 45 °C โดยมีค่าการทำงานในช่วง 70-75 unit/ml เนื่องจากถ้าคำนึงถึงอุณหภูมิในตัวอ่อนผึ้งซึ่งไม่ได้มีเปลี่ยนแปลงอย่างผันผวนหรือเพิ่มสูงขึ้นถึง 45 °C แต่อย่างใด โดยที่อุณหภูมิตั้งแต่ 40 °C ขึ้นไปเป็นอุณหภูมิที่ไม่เหมาะสมต่อการทำให้เกิดขั้นตอนต่างๆของการพัฒนาของสปอร์คือ การกระตุ้น, การขยายขนาด และการเกิด germ tube ก่อนเกิดการงอกเป็นเส้นใย (germination) ซึ่งเชื้อรา *A. apis* ไม่มีความจำเป็นที่จะต้องปรับตัวให้สามารถทำงานได้ที่อุณหภูมิที่สูงกว่าอุณหภูมิร่างกายของตัวอ่อนผึ้งแต่อย่างใด นอกจากนี้ในการศึกษาอิทธิพลของแคทไอออนต่อการทำงานของเอนไซม์ β -N-acetylglucosaminidase พบว่าแคทไอออนชนิดต่างๆที่ทำการศึกษาได้แก่ Ca^{2+} , Mg^{2+} , K^{+} , Na^{+} และ Li^{+} ไม่มีผลต่อการช่วยทำให้เอนไซม์ทำงานได้ดีขึ้นแต่ทำให้ค่าการทำงานลดต่ำลงเล็กน้อยโดยเหลือค่าการทำงานประมาณ 97-99 % และพบว่า Cu^{2+} และ Zn^{2+} ทำให้ค่าการทำงานลดลงอย่างชัดเจนโดยเหลือค่าการทำงานเพียง 49.69 และ 8.92 % ตามลำดับ ในส่วนการศึกษาคความเสถียรของเอนไซม์ต่ออุณหภูมิและพีเอช พบว่าแนวโน้มของความเสถียรของเอนไซม์มีการลดลงตามค่าอุณหภูมิที่เพิ่มสูงขึ้นเป็นลำดับ โดยความเสถียรต่อค่าพีเอชก็มีแนวโน้มเดียวกัน

5. การศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการผลิตเอนไซม์ β -N-acetylglucosaminidase

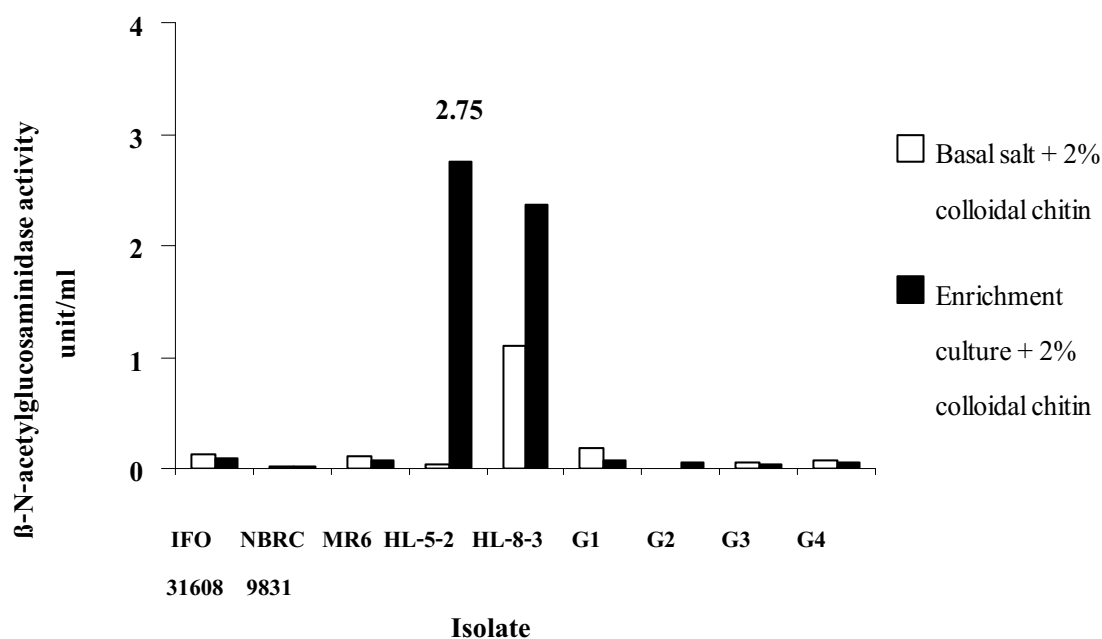
5.1 การศึกษาหาสภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์ β -N-acetylglucosaminidase

พบว่าเมื่อเปรียบเทียบค่าการทำงานของ β -N-acetylglucosaminidase ระหว่างอาหาร basal salt + 2% w/v colloidal chitin กับ enrichment culture + 2% w/v colloidal chitin เชื้อรา *A. apis* เกือบทุกไอโซเลท ให้ค่าการทำงานของ β -N-acetylglucosaminidase ที่ไม่แตกต่างกันมากนัก ยกเว้นไอโซเลท HL-5-2 และ HL-8-3 โดยพบว่าในอาหาร enrichment culture + 2% w/v colloidal chitin ทั้ง 2 ไอโซเลทนี้ให้ค่าการทำงานที่สูงกว่าในอาหาร basal salt + 2% w/v colloidal chitin อย่างชัดเจน (รูปที่ 4.4)

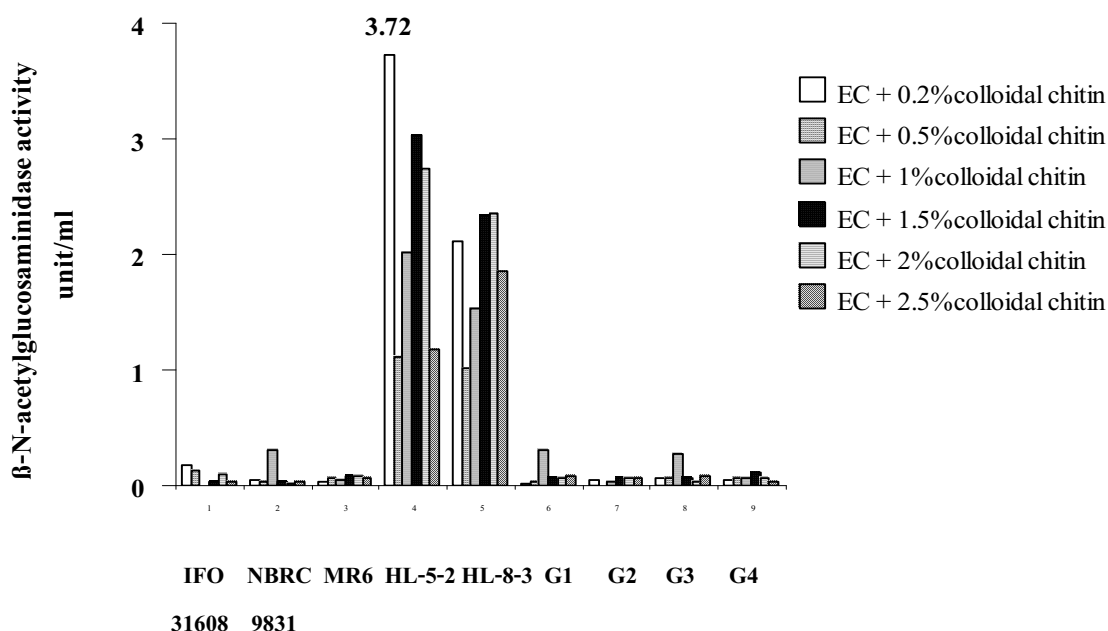
ในอาหารที่เหมาะสมคือ enrichment culture ที่มีความเข้มข้นต่างๆของ colloidal chitin พบว่าค่าการทำงานของ β -N-acetylglucosaminidase ที่ได้จาก *A. apis* NBRC 9831, JFO 31608,

MR6, G1, G2, G3 และ G4 ไม่มีความแตกต่างกันมากนักและมีค่าการทำงานที่ต่ำ ยกเว้นในไอโซเลท HL-5-2 และ HL-8-3 ที่ให้ค่าการทำงานของ β -N-acetylglucosaminidase ที่สูงกว่าอย่างชัดเจนในทุกๆ ความเข้มข้นของ colloidal chitin โดยที่ความเข้มข้น 0.2, 0.5, 1.0, 1.5 และ 2.0% w/v colloidal chitin พบว่า *A. apis* HL5-2 ให้ค่าการทำงานของ β -N-acetylglucosaminidase สูงที่สุด โดยเฉพาะในอาหาร enrichment culture ที่มี 0.2% w/v colloidal chitin พบว่าไอโซเลท HL-5-2 ให้ค่าการทำงานของ β -N-acetylglucosaminidase สูงสุดที่ 3.72 unit/ml ทั้งนี้ที่ความเข้มข้น 2.5% w/v colloidal chitin พบว่า *A. apis* HL-8-3 ให้ค่าการทำงานของ β -N-acetylglucosaminidase สูงสุดที่ 1.85 unit/ml (รูปที่ 4.5) ดังนั้นอาหารที่เหมาะสมในการนำไปทดลองในขั้นต่อไปคือ อาหาร enrichment culture + 0.2% w/v colloidal chitin

จากการทดสอบเอนไซม์ที่หลั่งภายนอกเซลล์ (extracellular enzyme) ด้วยชุดตรวจ API ZYM kit และวิธี agar plate method เอนไซม์ที่ได้ทำการคัดเลือกเพื่อใช้ในการทดลองขั้นต่อไปในการทำบริสุทธิ์เอนไซม์ได้แก่ เอนไซม์ β -N-acetylglucosaminidase



รูปที่ 4.4 ค่าการทำงานของ β -N-acetylglucosaminidase ที่ได้จากการบ่มเชื้อ *A. apis* ในอาหาร basal salt + 2% (w/v) colloidal chitin และ อาหาร enrichment culture + 2% (w/v) colloidal chitin



รูปที่ 4.5 ค่าการทำงานของ β-N-acetylglucosaminidase ที่ได้จากการบ่มเชื้อ *A. apis* ในอาหาร enrichment culture (EC) ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ ของ colloidal chitin (0.2, 0.5, 1, 1.5, 2.0 และ 2.5% (w/v))

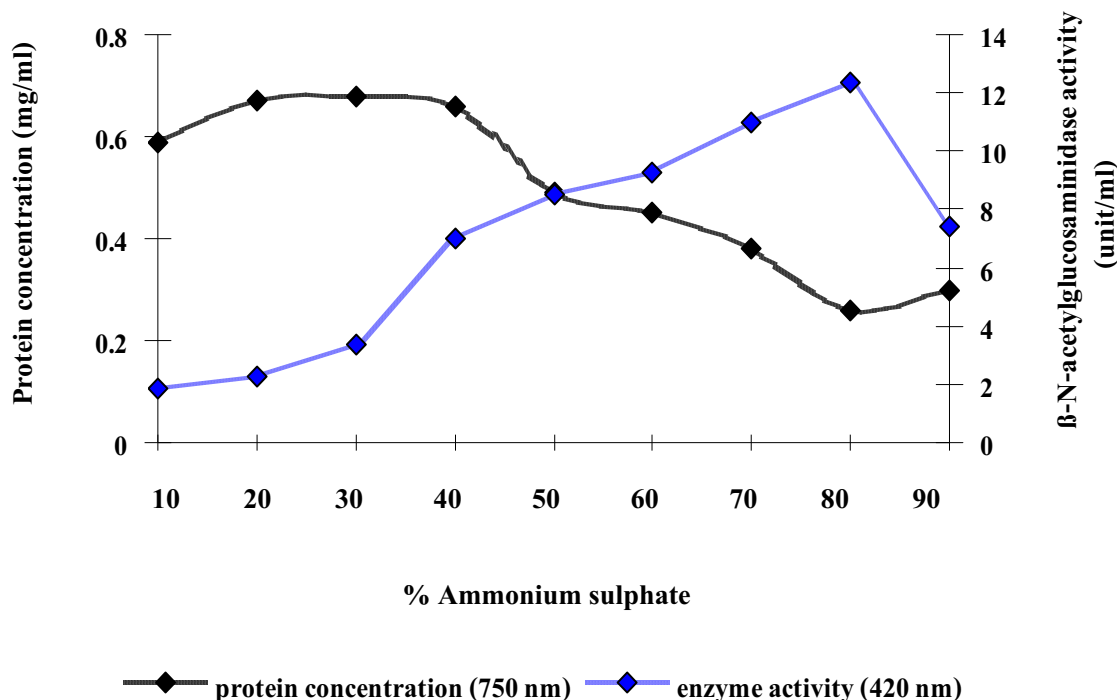
6. การทำบริสุทธิ์เอนไซม์ β-N-acetylglucosaminidase

6.1 การตกตะกอนโปรตีนด้วยเกลือแอมโมเนียมซัลเฟต (protein salting out)

จากตารางที่ 4.6 ได้แสดงค่าการทำงานของ β-N-acetylglucosaminidase และความเข้มข้นของโปรตีนจากตะกอนโปรตีนที่ได้จากการตกตะกอนโปรตีนด้วยเกลือแอมโมเนียมซัลเฟตที่ความเข้มข้นตั้งแต่ 10-90 % จากนั้นได้นำค่ามาวาดกราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างค่าการทำงานของ β-N-acetylglucosaminidase และความเข้มข้นของโปรตีน พบว่าที่ความเข้มข้น 80% เกลือแอมโมเนียมซัลเฟตสามารถทำให้เอนไซม์ตกตะกอนได้มากที่สุดโดยมีค่าการทำงานของเอนไซม์สูงสุดที่ 12.37 unit/ml และได้ช่วงการตกตะกอนที่เหมาะสมหรือ % cut off ที่ 30 ซึ่งเป็นช่วงที่เส้นกราฟค่าการทำงานของเอนไซม์เริ่มชันขึ้นและที่ 90% ซึ่งเป็นช่วงที่เส้นกราฟเริ่มตกลง รูปที่ 4.6

ตารางที่ 4.6 ค่าการทำงานของ β -N-acetylglucosaminidase และความเข้มข้นของโปรตีน ที่ได้จากตะกอนโปรตีนที่ช่วงเข้มข้นตั้งแต่ 10-90 % Saturation เกลือแอมโมเนียมซัลเฟต

%เกลือแอมโมเนียมซัลเฟต โปรตีน	ค่าการทำงานของเอนไซม์ (unit/ml)	ความเข้มข้นของ (mg/ml)
10	1.87	0.59
20	2.26	0.67
30	3.39	0.68
40	7.03	0.66
50	8.54	0.49
60	9.25	0.45
70	10.98	0.38
80	12.37	0.26
90	7.44	0.30

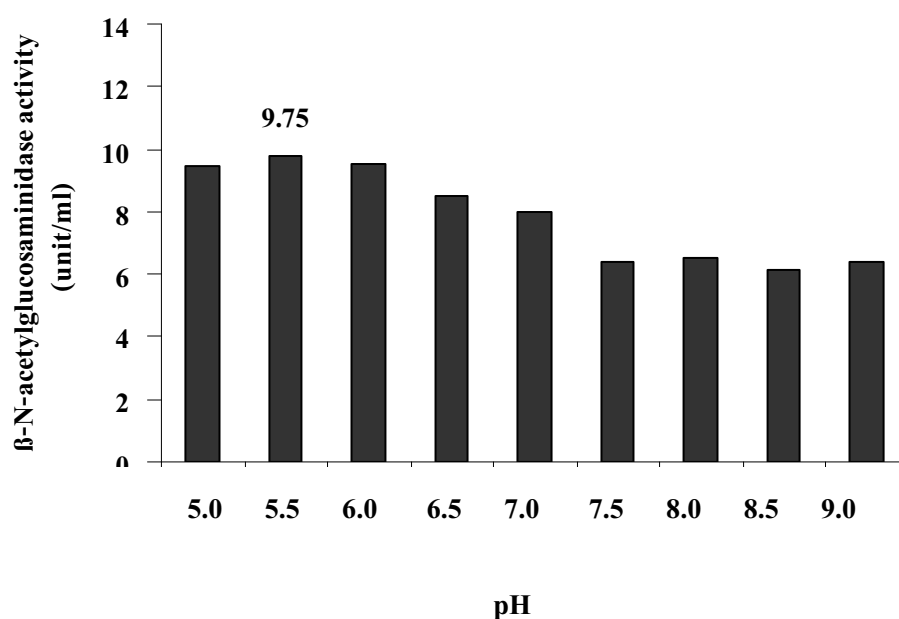


รูปที่ 4.6 ความสัมพันธ์ระหว่างค่าการทำงานของ β -N-acetylglucosaminidase และ ความเข้มข้นของโปรตีนจากตะกอนโปรตีนที่ได้จากการทำการตกตะกอนด้วยเกลือแอมโมเนียมซัลเฟต

6.2 การทำบริสุทธิ์เอนไซม์ด้วยวิธีโครมาโทกราฟีแบบแลกเปลี่ยนประจุ (ion-exchange chromatography)

6.2.1 การทดสอบค่าความเสถียรของเอนไซม์ต่อความเป็นกรด-ด่าง

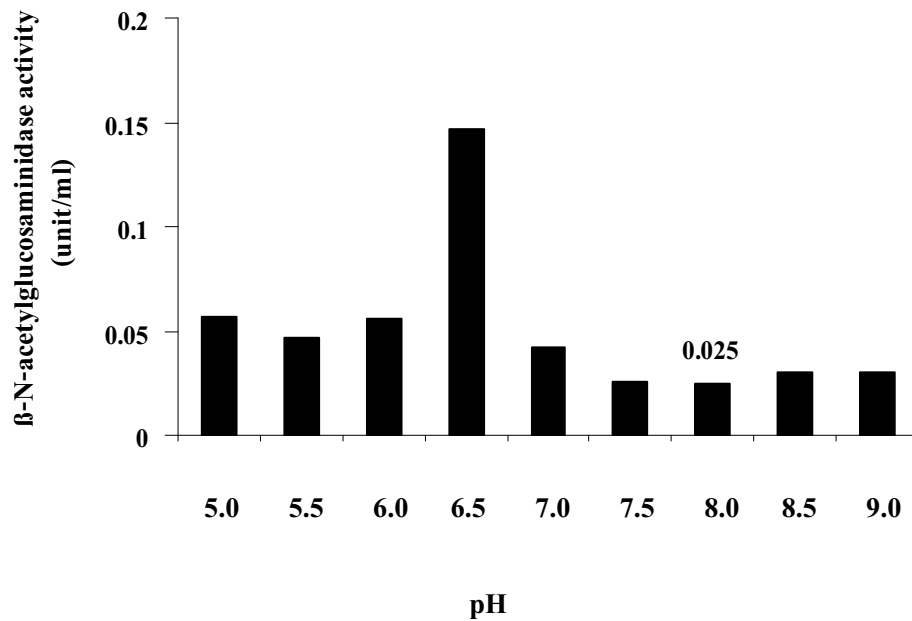
หลังจากนำเอนไซม์ผสมกับบัฟเฟอร์ที่พีเอชต่างๆ ที่ 5.0, 5.5, 6.0, 6.5, 7.0, 7.5, 8.0, 8.5 และ 9.0 พบว่าพีเอชที่เอนไซม์เสถียรมากที่สุดคือ 20 mM TES buffer, pH 5.5 โดยมีค่าการทำงานของเอนไซม์ β -N-acetylglucosaminidase มากที่สุดคือ 9.75 unit/ml (รูปที่ 4.7) ส่วนผลการทดลองค่าความเสถียรของเอนไซม์ที่พีเอชที่เหลือได้ผลดังต่อไปนี้ ที่พีเอช 5.0 พบค่าการทำงานของเอนไซม์ 9.45 unit/ml, ที่พีเอช 6.0 พบค่าการทำงานของเอนไซม์ 9.54 unit/ml, ที่พีเอช 6.5 พบค่าการทำงานของเอนไซม์ 8.52 unit/ml, ที่พีเอช 7.0 พบค่าการทำงานของเอนไซม์ 7.97 unit/ml, ที่พีเอช 7.5 พบค่าการทำงานของเอนไซม์ 6.38 unit/ml, ที่พีเอช 8.0 พบค่าการทำงานของเอนไซม์ 6.51 unit/ml, ที่พีเอช 8.5 พบค่าการทำงานของเอนไซม์ 6.16 unit/ml และ ที่พีเอช 9.0 พบค่าการทำงานของเอนไซม์ 6.41 unit/ml



รูปที่ 4.7 ค่าความเสถียรของเอนไซม์ β -N-acetylglucosaminidase ต่อความเป็นกรด-ด่าง

6.2.2 การทดสอบพีเอชที่เหมาะสมต่อการจับกันระหว่างเอนไซม์และเรซิน

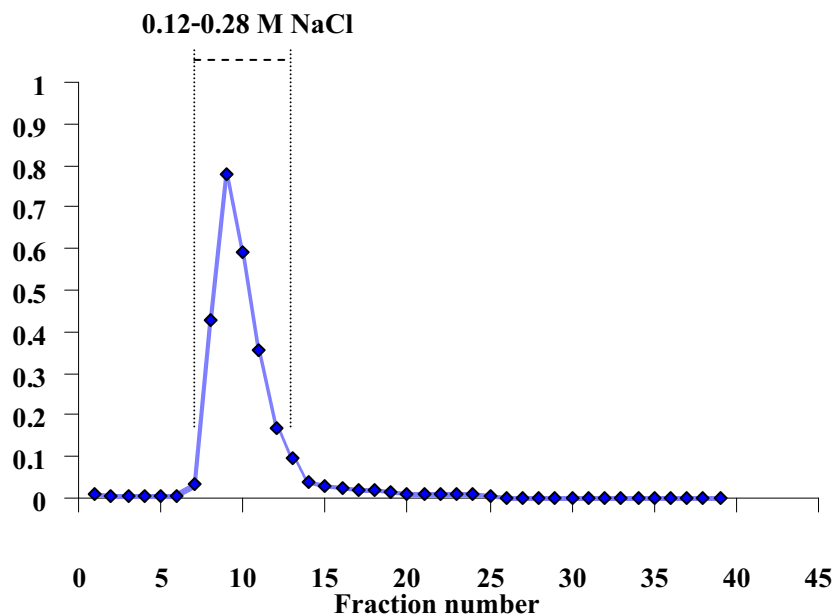
หลังจากโหลดเอนไซม์ผ่าน DEAE-sepharose fast flow column kit แล้วชะด้วยบัฟเฟอร์ที่พีเอชต่างๆพบว่าสภาวะที่คอลัมน์อิ่มตัวด้วย Tris-HCl buffer, pH 8.0 นั้นสามารถทำให้เอนไซม์จับกับเรซินได้ดีที่สุดโดยตรวจสอบพบค่าการทำงานของ β -N-acetylglucosaminidase ที่หลุดผ่านคอลัมน์ออกมาอย่างน้อยที่สุดคือ 0.025 unit/ml (รูปที่ 4.8) ส่วนผลการทดลองการจับกันของเรซินและเอนไซม์ ได้ผลดังต่อไปนี้ ที่พีเอช 5.0 พบค่าการทำงานของ β -N-acetylglucosaminidase ที่หลุดผ่านคอลัมน์ 0.057 unit/ml, ที่พีเอช 5.5 พบค่าการทำงานของเอนไซม์ 0.047 unit/ml, ที่พีเอช 6.0 พบค่าการทำงานของเอนไซม์ 0.056 unit/ml, ที่พีเอช 6.5 พบค่าการทำงานของเอนไซม์ 0.147 unit/ml, ที่พีเอช 7.0 พบค่าการทำงานของเอนไซม์ 0.042, ที่พีเอช 7.5 พบค่าการทำงานของเอนไซม์ 0.026 unit/ml และ ที่พีเอช 8.5 และ 9.0 พบค่าการทำงานของเอนไซม์ 0.030 unit/ml



รูปที่ 4.8 อิทธิพลของพีเอชภายในคอลัมน์ต่อการจับกันระหว่างเอนไซม์และเรซิน

6.2.3 การตรวจสอบค่า ionic strength เริ่มต้นที่เหมาะสมในการชะไล่เอนไซม์

จากผลการทดลองพบว่าเอนไซม์ β-N-acetylglucosaminidase ส่วนใหญ่ถูกชะออกจากคอลัมน์ในช่วงความเข้มข้น 0.12 M – 0.28 M NaCl ใน fraction ที่ 7-14 ดังรูปที่ 4.9

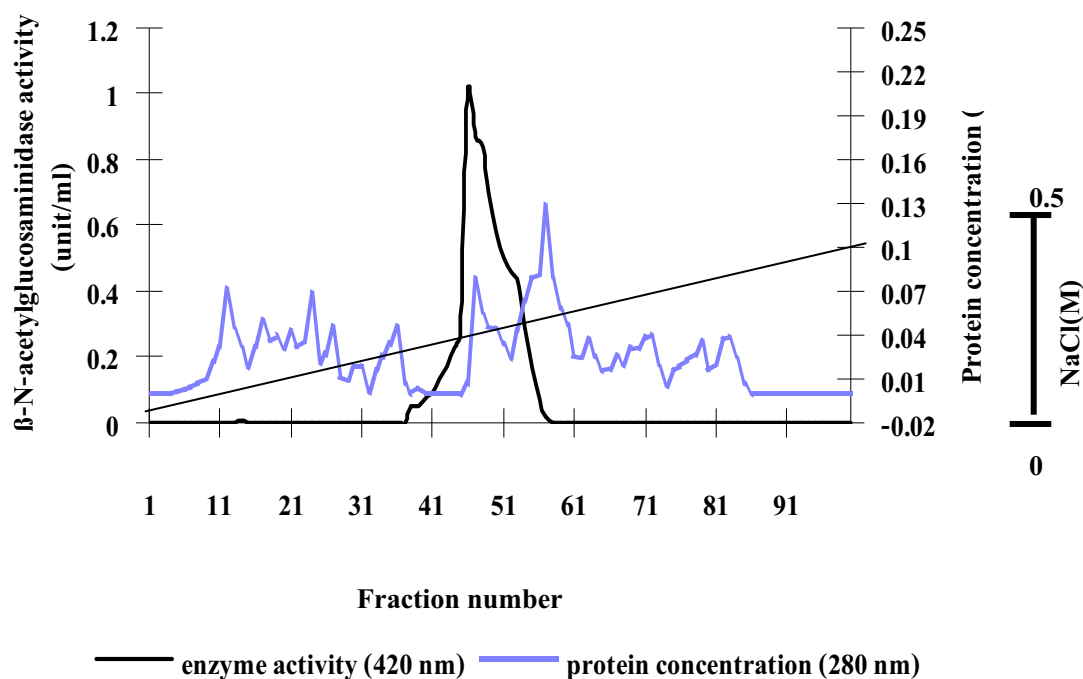


รูปที่ 4.9 ค่าการทำงานของ β-N-acetylglucosaminidase ทั้ง 40 fraction ที่ผ่าน DEAE-sepharose fast flow column chromatography kit

6.2.4 การทำบริสุทธิ์ด้วยวิธีโครมาโทกราฟีแบบแลกเปลี่ยนประจุ ion-exchange column chromatography (large scale)

ในการทำ ion-exchange ของเอนไซม์ที่ได้หลังจากทำการกำจัดเกล็ดด้วยวิธี ultrafiltration แล้วนั้น ผลที่ได้จากวัดค่าการทำงานของ β -N-acetylglucosaminidase ทั้ง 100 fraction พบว่า เอนไซม์ β -N-acetylglucosaminidase ได้ถูกชะออกจากคอลัมน์ในช่วงความเข้มข้นของเกล็ดตั้งแต่ 0.104 M ถึง 0.153 M ในช่วง fraction ที่ 38-55 (รูปที่ 4.10)

จากรูปที่ 4.11 เมื่อทำการเปรียบเทียบค่าการทำงานของ β -N-acetylglucosaminidase กับค่าการดูดกลืนแสงที่ 280 nm ทั้ง 100 fraction พบว่าช่วงที่เหมาะสมต่อการเก็บ fraction คือ fraction ที่ 43-48 เพื่อนำไปทำการศึกษาด้วยวิธี gel filtration chromatography ต่อไป

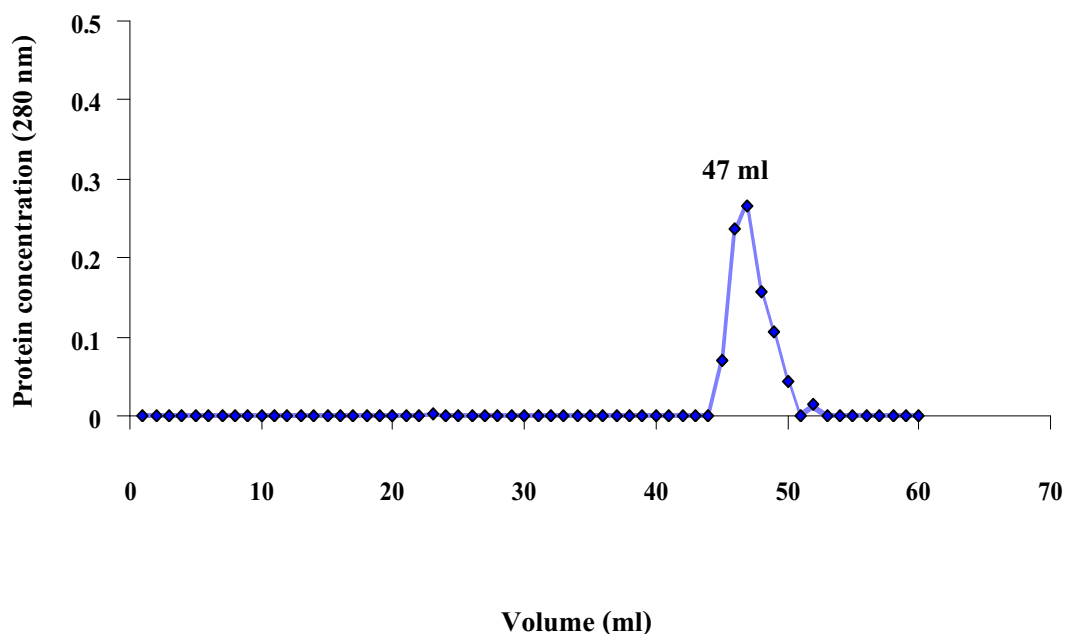


รูปที่ 4.10 ค่าการทำงานของ β -N-acetylglucosaminidase (unit/ml) และค่าการดูดกลืนแสงที่ 280 nm ในแต่ละ fraction ที่ผ่านการทำ ion-exchange column chromatography

6.3 การทำบริสุทธิ์ด้วยวิธีโครมาโทกราฟีแบบ gel filtration column chromatography

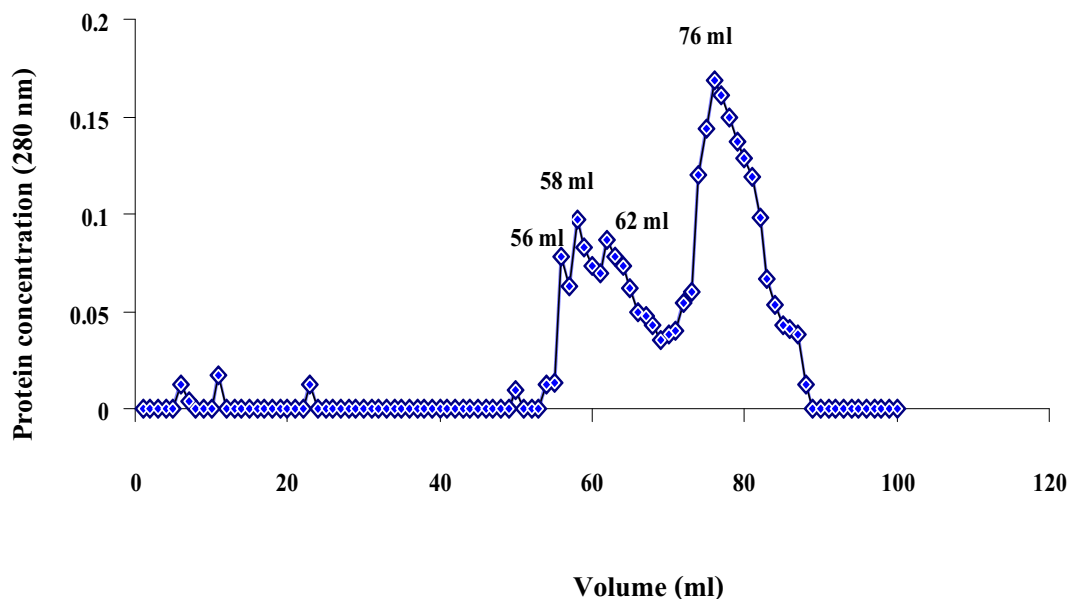
6.3.1 การหาค่า Void volume (V_0) ของ Sephacryl S200 HR เมื่อทำการโหลด blue dextran 2000 ที่มีความเข้มข้น 1 mg/ml ปริมาตร 1% ของ gel bed volume (V_t) ผ่านคอลัมน์ลงมาจนสารละลาย blue dextran 2000 ออกจากคอลัมน์หมดแล้ว เมื่อนำสารละลายมาวาดกราฟ

ความสัมพันธ์ระหว่างค่า A_{280} ที่อ่านได้ในแต่ละ fraction กับปริมาตร (ml) ของแต่ละ fraction พบว่าค่า void volume (V_0) มีค่าเท่ากับ 47 ml ดังรูปที่ 4.11



รูปที่ 4.11 ความสัมพันธ์ระหว่างค่าดูดกลืนแสงที่ 280 nm กับปริมาตรของสารละลายในแต่ละ fraction ที่ชะ blue dextran 2000 ออกจากคอลัมน์

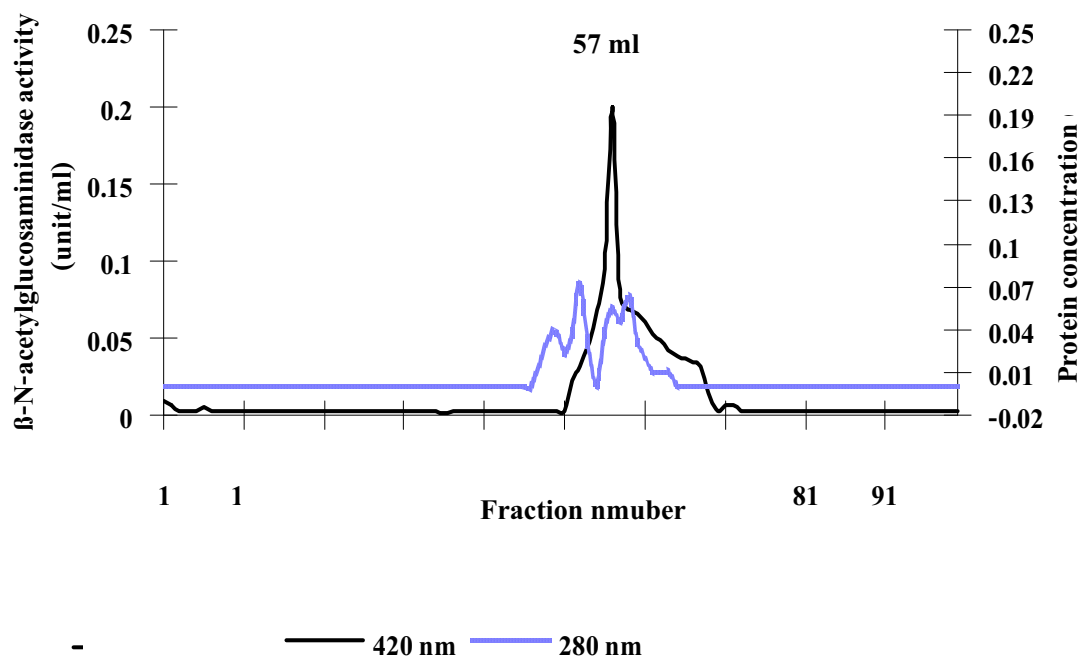
6.3.2 การเตรียมกราฟมาตรฐานมวลโมเลกุลของโปรตีน เมื่อทำการผ่านสารละลายโปรตีนมาตรฐาน calibration kits protein ชนิด low molecular weight 4 ชนิด ได้แก่ Ribonuclease A (M_r 13,700), Chymotrypsinogen A (M_r 25,000), Ovalbumin (M_r 43,000), Albumin (M_r 67,000) ที่มีความเข้มข้น 5 mg/ml ปริมาตร 1-2% total gel bed volume (V_t) ผ่านคอลัมน์ออกมาและทำการเก็บ 100 fraction นำแต่ละ fraction มาทำการวาดกราฟหาความสัมพันธ์ระหว่างค่า A_{280} ที่อ่านได้ในแต่ละ fraction กับปริมาตร (ml) ของแต่ละ fraction ดังรูปที่ 4.12 จากกราฟจะได้ค่า elution volume (V_e) ของโปรตีนมาตรฐาน แต่ละตัวคือ Ribonuclease A (M_r 13,700) มีค่า V_e เท่ากับ 76 ml, Chymotrypsinogen A (M_r 25,000) มีค่า V_e เท่ากับ 62 ml, Ovalbumin (M_r 43,000) มีค่า V_e เท่ากับ 58 ml, Albumin (M_r 67,000) มีค่า V_e เท่ากับ 56 ml และเมื่อนำมาคำนวณหาค่า K_{av} จากนั้นนำค่า K_{av} ที่ได้มาทำการวาดกราฟกับค่า log molecular weight



รูปที่ 4.12 ความสัมพันธ์ระหว่างค่าการดูดกลืนแสงที่ 280 nm กับปริมาตรของสารละลายในแต่ละ fraction ที่หะ albumin, ovalalbumin, chymotrypsinogen A และ ribonuclease A ออกจากคอลัมน์

6.3.3 การทำบริสุทธิ์ด้วยวิธีโครมาโทกราฟีแบบ gel filtration column chromatography

ในการทำ gel filtration ทั้ง 2 ครั้ง จาก active fraction (fraction ที่ 43-48) ของ ion-exchange พบว่าทั้งสองส่วนมีจุดสูงสุดของพีคของค่าการทำงานของเอนไซม์ β -N-acetylglucosaminidase ที่มีลิตรที่ 57 เหมือนกันทั้ง 2 ครั้ง รูปที่ 4.13 เมื่อนำมาคำนวณหาค่า K_{av} แล้วนำไปหาจากกราฟที่วาดระหว่างค่า K_{av} และ log molecular weight พบว่าเอนไซม์มีค่ามวลโมเลกุลประมาณ 55,042 Da

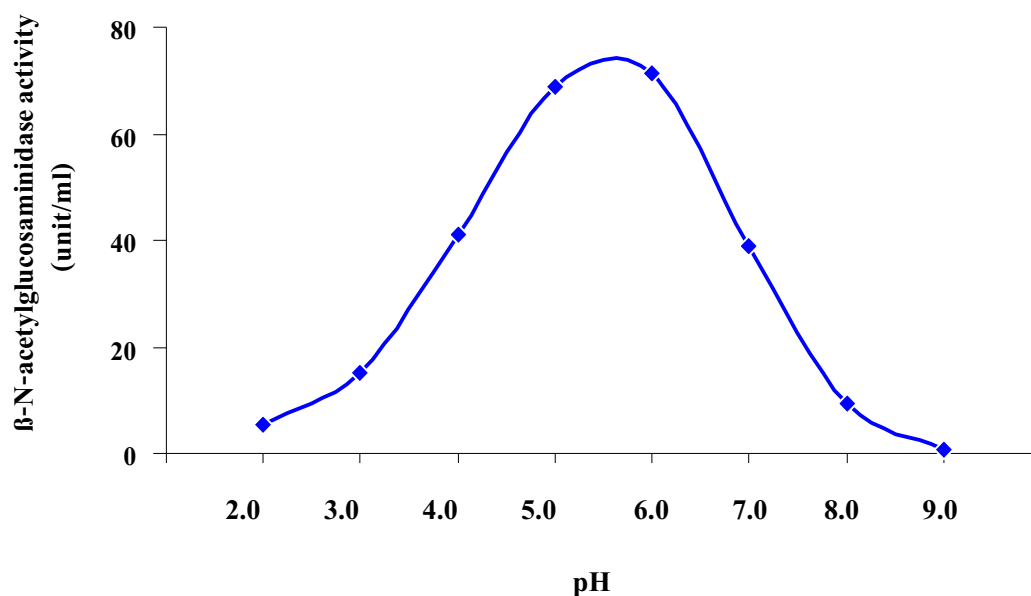


รูปที่ 4.13 ค่าการทำงานของ β -N-acetylglucosaminidase (unit/ml) และค่าการดูดกลืนแสงที่ 280 nm จากการทำ gel filtration chromatography

7.การศึกษาลักษณะเฉพาะของเอนไซม์ β -N-acetylglucosaminidase ที่แยกบริสุทธิ์บางส่วน

7.1 การศึกษาพีเอชที่เหมาะสมต่อการทำงานของ β -N-acetylglucosaminidase

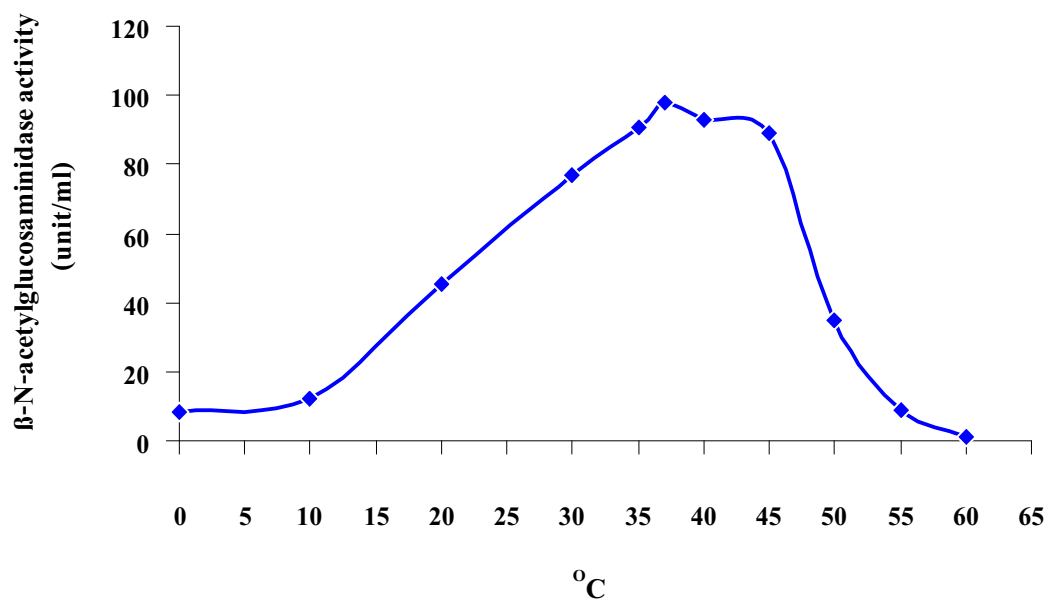
พบว่าเอนไซม์ที่ผ่านการทำบริสุทธิ์บางส่วนมี พีเอช ที่เหมาะสมในการทำงานคือ ช่วงพีเอช 5.0 ถึง 6.0 โดยมีค่าการทำงานของ β -N-acetylglucosaminidase 73.260 และ 75.264 unit/ml ตามลำดับและที่พีเอชอื่น ดังรูปที่ 4.14



รูปที่ 4.14 ค่าการทำงานของเอนไซม์ β-N-acetylglucosaminidase ที่แยกบริสุทธิ์บางส่วนที่พีเอชต่างๆ

7.2 การศึกษาอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการทำงานของ β-N-acetylglucosaminidase

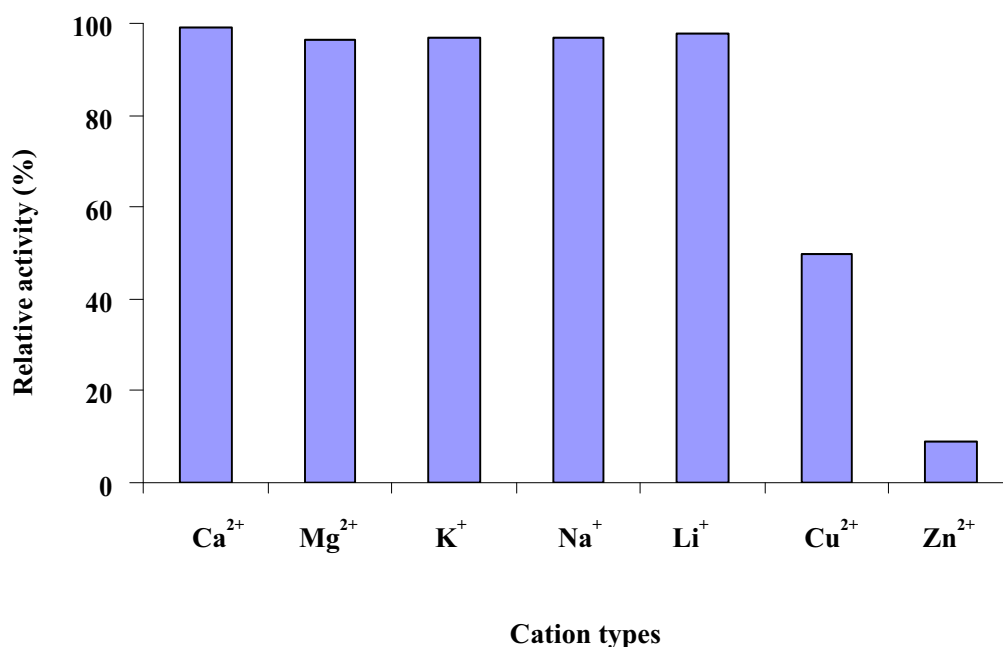
อุณหภูมิที่เหมาะสมในการทำงานคือช่วงอุณหภูมิ 35 ถึง 45 °C โดยมีค่าการทำงานของ β-N-acetylglucosaminidase ได้ผลดังรูปที่ 4.15



รูปที่ 4.15 ค่าการทำงานของเอนไซม์ β-N-acetylglucosaminidase ที่แยกบริสุทธิ์บางส่วนที่อุณหภูมิต่างๆ

7.3 การศึกษาผลของแคทไอออนต่อการทำงานของเอนไซม์ β -N-acetylglucosaminidase

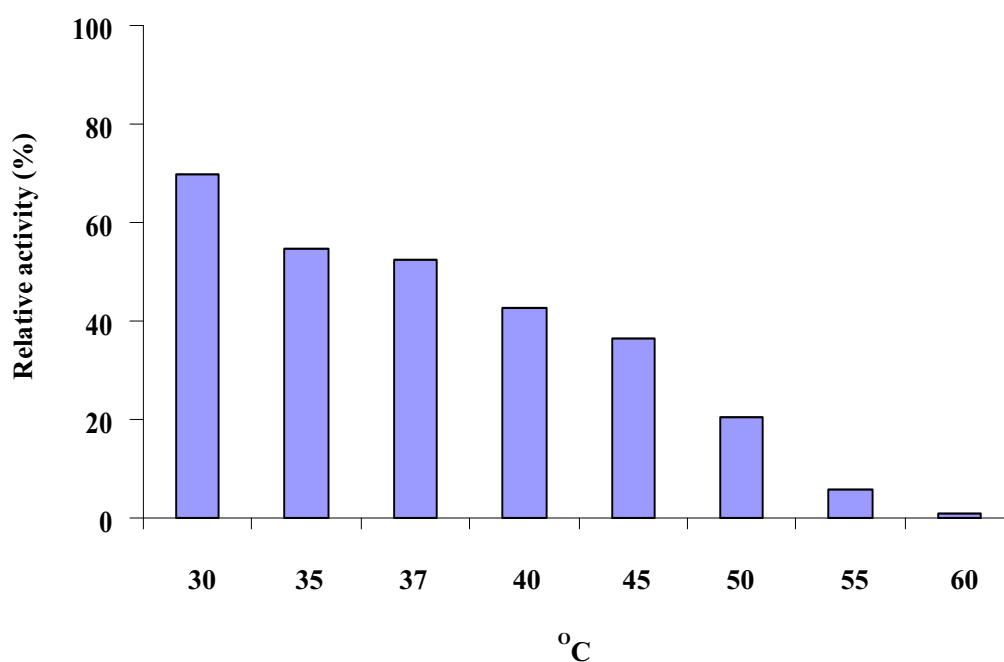
พบว่าแคทไอออนไม่มีอิทธิพลต่อการทำงานในการช่วยเพิ่มค่าการทำงานของเอนไซม์ กลับพบว่าค่าการทำงานของเอนไซม์มีการลดลงเล็กน้อย เช่น Ca^{2+} , Mg^{2+} , K^+ , Na^+ และ Li^+ และลดลงอย่างชัดเจนเมื่อเอนไซม์ทำงานในสภาวะที่มี Cu^{2+} และ Zn^{2+} ได้ผลดัง รูปที่ 4.16



รูปที่ 4.16 เปอร์เซ็นต์การทำงานของเอนไซม์ β -N-acetylglucosaminidase ที่เหลืออยู่ในสภาวะที่มีแคทไอออนชนิดต่างๆ

7.4 การศึกษาความเสถียรของเอนไซม์ β -N-acetylglucosaminidase ต่ออุณหภูมิ

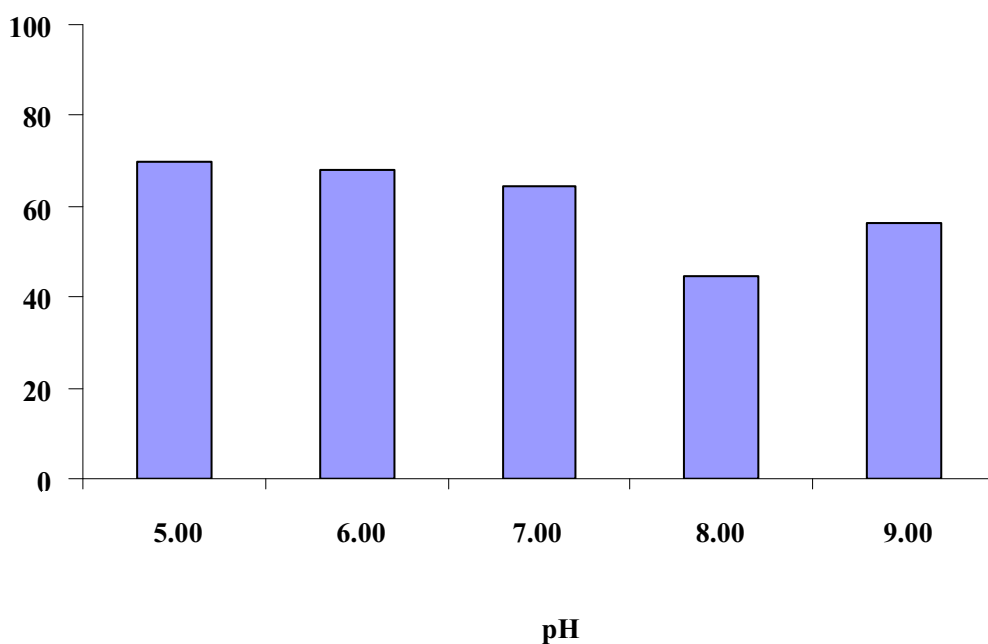
พบว่าเอนไซม์ที่ผ่านการทำบริสุทธิ์บางส่วนมีความเสถียรในสภาวะที่อุณหภูมิที่ไม่สูง โดยพบว่าที่อุณหภูมิ 30°C เป็นสภาวะที่เอนไซม์เสถียรมากที่สุดโดยมีเปอร์เซ็นต์ค่าการทำงานที่เหลือมากที่สุดที่ และมีแนวโน้มค่าการทำงานลดลงตามอุณหภูมิมากขึ้น ได้ผลดัง รูปที่ 4.17



รูปที่ 4.17 เปอร์เซนต์การทำงานของเอนไซม์ β -N-acetylglucosaminidase ที่เหลืออยู่หลังจากบ่มเอนไซม์ที่อุณหภูมิต่างๆ 60 นาที

7.5 การศึกษาความเสถียรของเอนไซม์ β -N-acetylglucosaminidase ต่อพีเอช

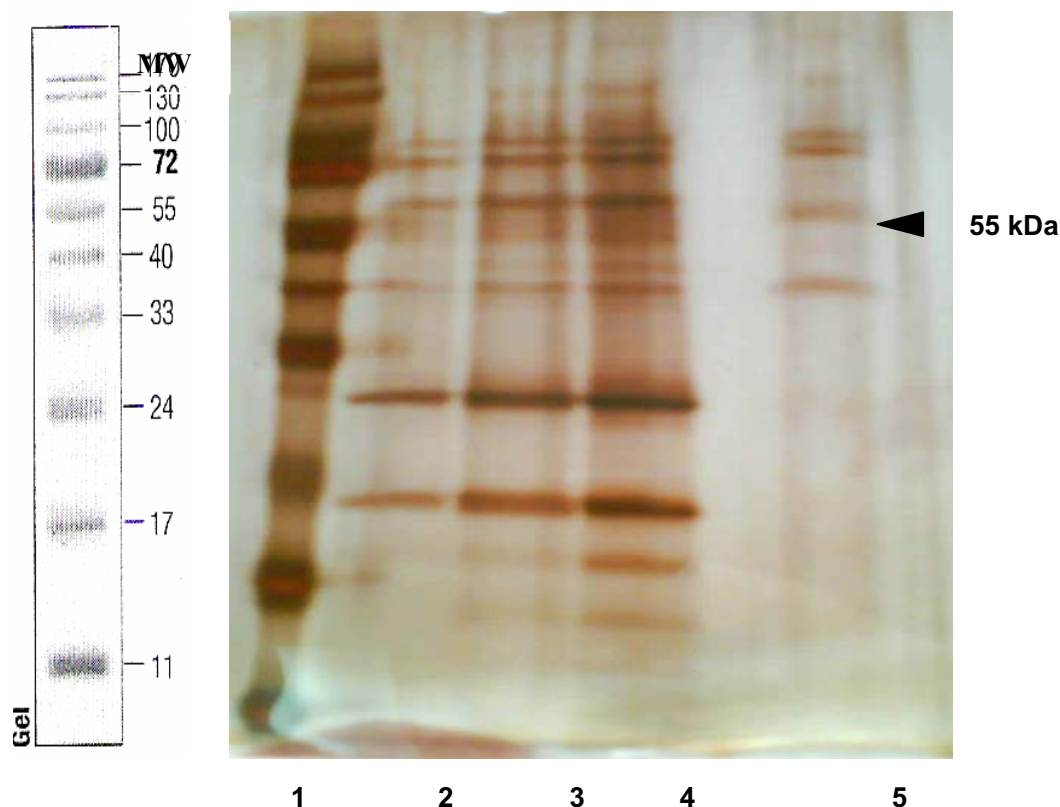
พบว่าเอนไซม์ที่ผ่านการทำบริสุทธิ์บางส่วนมีความเสถียรในสภาวะที่เป็นกรด โดยพบว่าที่พีเอช 5.00 เป็นสภาวะที่เอนไซม์เสถียรมากที่สุดโดยมีเปอร์เซนต์ค่าการทำงานที่เหลือมากที่สุดที่ 69.98 % และมีแนวโน้มค่าการทำงานลดลงตามค่าพีเอชที่เพิ่มมากขึ้น ได้ผลดังรูปที่ 4.18



รูปที่ 4.18 เปอร์เซนต์การทำงานของเอนไซม์ β -N-acetylglucosaminidase ที่เหลืออยู่หลังจากบ่มเอนไซม์ที่พีเอชต่างๆ 24 ชั่วโมง

8. การตรวจสอบความบริสุทธิ์ของเอนไซม์ด้วยวิธี SDS-PAGE (Sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel)

8.1 แถบโปรตีนที่ได้จากการทำบริสุทธิ์เอนไซม์ β -N-acetylglucosaminidase ในแต่ละขั้นตอน



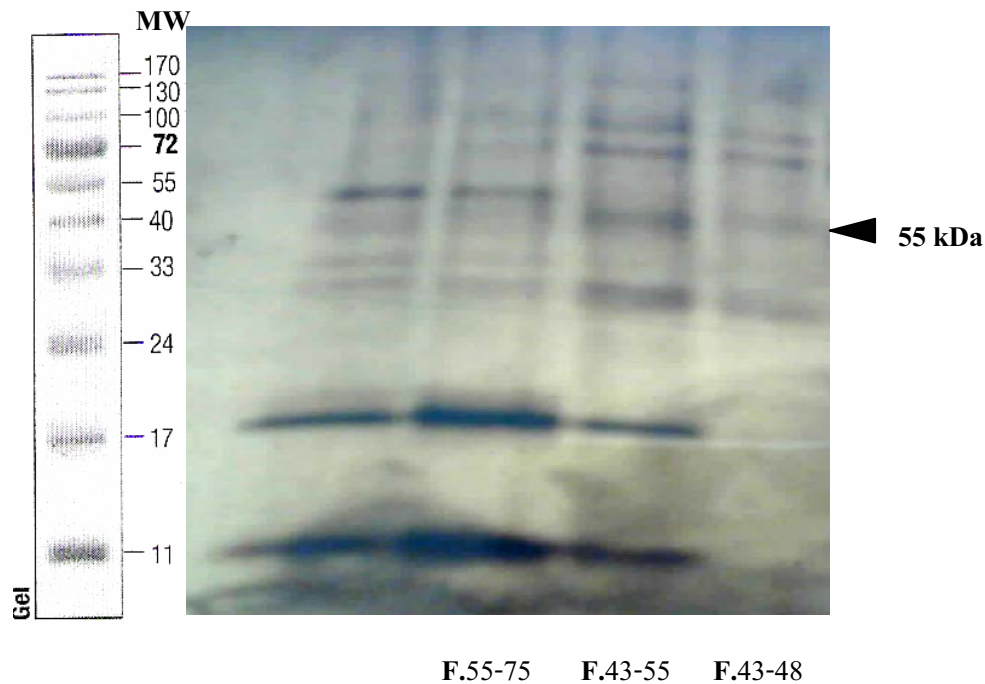
รูปที่ 4.19 แถบโปรตีนในการทำบริสุทธิ์เอนไซม์ β -N-acetylglucosaminidase; 1-โปรตีนมาตรฐาน, 2-น้ำเลี้ยงเชื้อ, 3- ตะกอนโปรตีน, 4-เอนไซม์ที่กำจัดเกล็ดออกแล้ว, 5-fraction ที่มีค่าทำงานของเอนไซม์จาก ion-exchange (fraction ที่ 43-48)

4.8.2 การเปรียบเทียบแถบโปรตีนที่ได้จากการทำ ion-exchange chromatography

จากรูปที่ 4.20 จะเห็นได้ว่า แถบโปรตีนจาก active fraction ในการทำ ion-exchange chromatography ที่มีการแบ่งออกเป็น 3 ส่วน คือ fraction ที่ 43-48, 43-55 และ 55-75 โดยทั้ง 3 ส่วน มีรูปแบบแถบโปรตีน ดังนี้ ใน fraction ที่ 43-48 มีแถบโปรตีนทั้งหมด 4 แถบ, fraction ที่ 43-55 มีทั้งหมด 7 แถบ และ fraction ที่ 55-75 มีแถบโปรตีนทั้งหมด 9 แถบ

ค่าการทำงานของเอนไซม์ β -N-acetylglucosaminidase ที่ได้ทั้ง 3 ส่วน คือ ใน fraction ที่ 43-48 มีค่าการทำงานของเอนไซม์สูงสุด คือ 9.149 unit/ml, fraction 43-55 มีค่าการทำงานของเอนไซม์ 3.961 unit/ml และ fraction 55-75 มีค่าการทำงานของเอนไซม์ 0.550 unit/ml และผลที่ได้

จากการทำ gel filtration พบว่าเอนไซม์ออกจากคอลัมน์ที่มีลลิตรที่ 57 เมื่อนำไปหาค่า K_{av} และเทียบกับกราฟมาตรฐาน พบว่าเอนไซม์ β -N-acetylglucosaminidase มีมวลโมเลกุลประมาณ 55.042 KDa ทั้งนี้สามารถพบแถบมวลโมเลกุลประมาณ 55 KDa ได้ในทั้ง 3 ส่วน แต่จะค่อนข้างเข้มที่ fraction 43-55 และรองลงมาคือ fraction 43-48 และ fraction 55-75 ตามลำดับ จากผลการทดลองที่ได้จะเห็นว่า fraction 43-48 จะมีความบริสุทธิ์ของเอนไซม์สูงที่สุดโดยดูแถบโปรตีนชนิดอื่นที่ปนเปื้อน



ภาพที่ 4.20 แถบโปรตีนที่ได้จาก ion-exchange fraction โดยการทำให้ SDS-PAGE

ตารางที่ 4.7 ค่าการทำปฏิกิริยาเอ็นไซม์ β -N-acetylglucosaminidase ในระหว่างขั้นตอนต่างๆของการทำปฏิกิริยาเอ็นไซม์

ขั้นตอน	ปริมาตร (ml)	enzyme activity / total activity Unit/ml Units	Protein concentration mg/ml / mg	specific activity	purification fold U/mg	%yield
Culture broth	230	5.51 / 1,267	0.90 / 206.40	6.14	1.00	100
ammonium sulphate precipitation	13	65.00 / 845	3.10 / 40.30	20.97	3.41	66.69
DEAE Sepharose (fraction 43-48)	15	7.12 / 107	0.17 / 2.48	43.06	7.00	8.34

วิจารณ์และสรุปผลการทดลอง

ในการทดลอง ได้ทำการทดสอบกับเชื้อรา *Ascosphaera apis* จำนวน 9 ไอโซเลท ได้แก่ HL-5-2, HL-8-3 และ MR6 ทำการแยกได้จากฟาร์มผึ้งในภาคเหนือ ไอโซเลท G1, G2, G3 และ G4 แยกจากตัวอย่างตัวอ่อนผึ้งที่ตายจากโรคซอล์คบริดจากประเทศเยอรมนี ไอโซเลท IFO 31608 และ NBRC 9831 ได้รับจาก Department of Technology, National Institute of Technology and Evaluation, Japan ทุกๆไอโซเลทถูกเลี้ยงบนอาหาร SabY ที่อุณหภูมิ 30 °C ซึ่งเป็นอุณหภูมิที่เหมาะสมในการเจริญของเชื้อรา *A. apis* (Ruffinengo *et al.*, 2000) จากนั้นเชื้อราจะถูกนำไปตรวจสอบลักษณะทางสัณฐานวิทยาด้วยกล้องจุลทรรศน์เลนส์ประกอบและกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราดเพื่อดูลักษณะของเส้นใยและรูปร่างของสปอร์เชื้อรา พบว่าเส้นใยของเชื้อรามีลักษณะผนังเรียบและมีผนังกัน (septate hyphae) และมีการสร้างสปอร์อยู่ภายในโครงสร้างที่เรียกว่าสปอร์บอล (spore ball) โดยสปอร์บอลทั้งหมดจะถูกห่อหุ้มไว้ภายในสปอร์ซิสต์ (spore cyst) พบว่าบางส่วนสปอร์ซิสต์ยังไม่แตกแต่บางซิสต์ก็เกิดการแตกแล้ว ขั้นตอนในการแยกเชื้อจากตัวอ่อนผึ้งที่เป็นโรคแล้วนำมาทำการตรวจสอบทางสัณฐานวิทยาเพื่อดูสปอร์ซิสต์เป็นวิธีการขั้นต้นในการจำแนกเชื้อรา *A. apis* (Bissett *et al.*, 1996) แต่ทั้งนี้ในส่วน of เชื้อรา *A. apis* ที่ไม่มีการสร้างสปอร์ก็สามารถอาศัยลักษณะทางชีวเคมีมาตรวจสอบร่วมได้โดยทำการสำรวจการสร้างเอนไซม์ชนิดต่างๆ (Chorbinski, 2003)

เมื่อนำ *A. apis* ทั้ง 9 ไอโซเลท มาทดสอบการสร้างเอนไซม์ชนิดต่าง ๆ เพื่อตรวจสอบรูปแบบของเอนไซม์ชนิดหลังภายนอกเซลล์ที่เชื้อราสามารถผลิตได้ เมื่อทดสอบการสร้างเอนไซม์ 19 ชนิด ด้วยชุดตรวจ API ZYM kit พบว่าเชื้อรา *A. apis* สามารถผลิตเอนไซม์ได้ 9 ชนิด จากทุก

ไอโซเลท ซึ่งผลการทดลองที่ได้มีความคล้ายคลึงกับการทดลอง ของ Gillium และ Lorenz (1993) โดยพบว่า *A. apis* unmated strains ทุกไอโซเลท สามารถผลิตเอนไซม์ได้ 8 ชนิด โดยเมื่อวิเคราะห์ผลที่ได้จากการวิจัยร่วมกันแล้วพบว่า มีเพียง esterase lipase และ $\square$ -mannosidase เท่านั้นที่เชื้อรา unmated strains ทุกไอโซเลท ที่ใช้ในการทดลองของ Gillium และ Lorenz ไม่สามารถผลิตได้เหมือนกันทั้งหมดเช่นเดียวกับการทำวิจัยในครั้งนี้ โดยเชื้อรา *A. apis* ที่ Gillium และ Lorenz ใช้ในการทดลองมีเพียงไอโซเลทเดียวเท่านั้นที่ไม่สร้าง esterase lipase และ 3 ไอโซเลท ที่ไม่ผลิต $\square$ -mannosidase

แบบแผนของเอนไซม์ที่เชื้อรา *A. apis* ไม่สามารถผลิตได้ทั้ง 9 ไอโซเลท มีทั้งหมด 6 ชนิด โดยผลการทดลองที่ได้พบว่ามี ความคล้ายคลึงกับการทดลอง ของ Gillium และ Lorenz ในปี 1993 โดยพบว่าเชื้อรา *A. apis* ชนิด unmated strains ทุกไอโซเลทที่ใช้ทำการทดลองมีแบบแผนของเอนไซม์ที่ไม่สามารถผลิตได้ในทุกไอโซเลท 6 ชนิด เช่นเดียวกัน ในส่วนนี้ถือว่าผลการทดลองที่ได้เหมือนกับผลการทดลองที่ได้จากการทำวิจัยครั้งนี้ทุกประการ

นอกจากนี้เอนไซม์ที่มีการผลิตในบางไอโซเลท ได้แก่ $\square$ -chymotrypsin พบว่าสามารถผลิตจากไอโซเลท NBRC 9831, IFO 31608, G1 G2 เอนไซม์ β -galactosidase และ $\square$ -glucosidase สามารถผลิตได้จากทุกไอโซเลทยกเว้น HL-5-2 และในส่วนของผลการทดลองของเอนไซม์ β -N-acetylglucosaminidase ซึ่งเป็นเอนไซม์ที่มีส่วนสำคัญในการเข้าก่อโรคของเชื้อรา *A. apis* ในกระบวนการย่อยสลายผ่านคิวติเคิลของตัวอ่อนผึ้ง (Chorbinski, 2003; Gochner and Margetts, 1979) พบว่าสามารถผลิตในบางไอโซเลทได้แก่ HL-5-2, HL-8-3 และ MR6 ซึ่งเป็นไอโซเลทที่แยกได้จากฟาร์มผึ้งทางภาคเหนือ ส่วนไอโซเลทที่เหลือไม่มีการผลิตทั้งจากไอโซเลทที่แยกได้จากตัวอ่อนผึ้งที่ตายจากประเทศเยอรมันและไอโซเลทที่ได้รับจากญี่ปุ่นซึ่งเป็น reference strain จากผลการทดลองที่ได้พบว่าแบบแผนการผลิตเอนไซม์ β -N-acetylglucosaminidase จากเชื้อรา *A. apis* ทั้ง 9 ไอโซเลท มีความคล้ายคลึงกับการทดลองของ Gillium และ Lorenz ในปี 1993 โดยพบว่า *A. apis* ชนิด unmated strains ทั้ง 9 ไอโซเลทที่ใช้ในการทดลองเมื่อทดสอบด้วยชุด API ZYM kit พบว่ามีการผลิตเอนไซม์ β -N-acetylglucosaminidase ในบางไอโซเลทเท่านั้น นอกจากการทดสอบแบบแผนของเอนไซม์ด้วยชุดตรวจ API ZYM แล้วยังได้ทำการทดสอบการผลิตเอนไซม์ด้วยวิธี agar plate method พบว่า *A. apis* ทุกไอโซเลทไม่สามารถผลิตเอนไซม์โปรติเอส (protease), เอนไซม์ไคตินเนส (chitinase) และอะไมเลส (amylase) ได้ แต่ทั้งนี้เมื่อทำการทดสอบเอนไซม์โปรติเอสด้วยวิธี spectrophotometry (Dancer and Chantawannakul, 1997) พบว่ามีการผลิตโปรติเอสในทุกๆ ไอโซเลทในระดับที่ต่ำ และในส่วนของกลุ่มเอนไซม์ย่อยไคตินนั้นได้มีการรายงานถึงการขาดความสามารถในการผลิตเอนไซม์ไคตินเนสของเชื้อรา *A. apis* (Chorbinski, 2003) และเอนไซม์ที่คาดว่าจะเข้ามาทำหน้าที่แทนเอนไซม์ไคตินเนสในการจัดการกับคิวติเคิลของตัวอ่อนผึ้งคือเอนไซม์ในกลุ่ม exochitinase ได้แก่ เอนไซม์ β -N-acetylglucosaminidase (Alonso *et al.*, 1993; Bamford and Heath, 1989 (a))

ดังนั้นในส่วนของการทดสอบรูปแบบของการสร้างเอนไซม์ทั้ง 22 ชนิดจากเชื้อรา *A. apis* โดยการใช้ API ZYM kit และวิธี agar plate method พบว่า *A. apis* ที่แยกได้จากแหล่งภูมิประเทศที่แตกต่างกันในระดับของจังหวัด, ประเทศ หรือแม้แต่ทวีป ก็ยังมีรูปแบบของเอนไซม์ที่สามารถผลิตและไม่สามารถผลิตได้ที่เป็นไปในทิศทางเดียวกันไม่มีความแตกต่างกันมากนัก เช่นเดียวกับการทดลองของ Gillium ที่พบว่า *A. apis* ไอโซเลทที่แยกได้จากผึ้งโพรง (*Apis cerana*) ที่เป็นโรคในประเทศเกาหลีใต้มีรูปแบบของการสร้างเอนไซม์ในรูปแบบเดียวกันกับ *A. apis* ไอโซเลทที่แยกได้จากผึ้งพันธุ์ (*Apis mellifera*) ที่เป็นโรคในสหราชอาณาจักร (Gillium *et al.*, 1993) นอกจากนี้ *A. apis* จำเป็นที่จะต้องมียีนเอนไซม์ที่สำคัญในการปรับตัวของมันเองให้พร้อมในการเข้ารุกรานเจ้าบ้านตั้งแต่เริ่มต้นจนจบกระบวนการของการติดเชื้อคือการแทงทะลุผ่านตัวอ่อนออกมาได้แก่เอนไซม์ในกลุ่มย่อยไขมัน (lipolytic) เช่น esterase และ esterase lipase กลุ่มย่อยโปรตีน (proteolytic) เช่น cysteine arylamidase และ valine arylamidase (Chorbinski, 2003) ซึ่งเอนไซม์ทั้งหมดดังที่กล่าวมานี้เป็นเอนไซม์ที่มีการผลิตจากเชื้อรา *A. apis* ทั้ง 9 ไอโซเลทที่นำมาทำการทดลอง แสดงให้เห็นถึงความสามารถพื้นฐานของทุกไอโซเลทในการเข้าก่อโรคซอลด์บรูตในตัวอ่อนผึ้ง

ในการสำรวจรูปแบบของการสร้างเอนไซม์ของเชื้อรา *A. apis* นอกจากสามารถใช้ประโยชน์ในด้านการสำรวจบทบาทหน้าที่ของเอนไซม์ชนิดหลังภายนอกเซลล์ที่อาจเป็นปัจจัยในการก่อโรคของเชื้อราแล้วยังอาจใช้ในการช่วยตรวจสอบชนิดของไอโซเลทของเชื้อรา *A. apis* ว่าเป็น unmated หรือ mated strains โดยมีการพบว่าเอนไซม์ valine arylamidase, naphthol-AS-BI-phosphohydrolase และ β -N-acetylglucosaminidase นั้นมีการสร้างเฉพาะใน *A. apis* ไอโซเลทแบบ unmated strains (Gillium *et al.*, 1993; Gillium and Lorenz 1993) และที่สำคัญสามารถนำข้อมูลรูปแบบในการสร้างเอนไซม์มาช่วยในงานด้านการจัดจำแนกเนื่องจากการรายงานว่ามีเชื้อราที่เข้ามาเกี่ยวข้องกับผึ้งน้อยชนิดที่สามารถผลิตเอนไซม์ valine arylamidase, β -galactosidase และ α -mannosidase ได้ (Gillium *et al.*, 1989) ดังนั้นจึงอาจใช้ข้อมูลเหล่านี้ในการวิเคราะห์เบื้องต้นในการบ่งชี้เชื้อราที่แยกได้จากตัวอ่อนผึ้งในกรณีที่เชื้อราที่แยกได้ไม่มีการสร้างสปอร์ชีสต์ว่าเป็นเชื้อรา *A. apis*

เมื่อได้รูปแบบของการสร้างเอนไซม์จากเชื้อรา *A. apis* ทั้ง 9 ไอโซเลทแล้ว จากนั้นได้เลือกเอนไซม์ที่จะนำมาทำการทดลองต่อไป ได้แก่ เอนไซม์โปรติเอส ซึ่งเป็นเอนไซม์ที่มีการศึกษากันอย่างแพร่หลายในเชื้อราก่อโรคในแมลง (entomopathogenic fungi) หลายๆชนิด โดยได้ทำการทดสอบถึงชนิดของเอนไซม์โปรติเอส ที่ผลิตจากเชื้อรา *A. apis* พบว่าเมื่อบ่มเอนไซม์โปรติเอสพร้อมกับ phenylmethanesulphonyl fluoride (PMSF) เอนไซม์จะถูกยับยั้งการทำงานโดยเหลือค่าการทำงานเพียง 6.5% จึงสามารถบ่งชี้ชนิดของโปรติเอสที่ผลิตจากเชื้อรา *A. apis* ได้ว่าควรจะเป็น serine protease ซึ่ง serine protease โปรตีนกลุ่มนี้มักเป็นโปรติเอสที่มีการผลิตจากเชื้อราก่อโรคในแมลงหลายๆชนิด เช่น *Metarizium anisopliae* มีการผลิตโปรติเอสหลายกลุ่ม เช่น serine protease subtilisin subclass (*Pr1*) , trypsin-like serine protease (*Pr2*), cysteine protease (*Pr3,4*) และ metalloprotease ทั้งนี้พบว่า *Pr1* เท่านั้นที่มีหน้าที่หลักในการย่อยผ่านคิวติเคิลของ

แมลง และ *Pr2* ทำหน้าที่เป็นตัวควบคุมการเปลี่ยนแปลงทางโครงสร้างของเชื้อรา โดยมีผลยืนยันจากการที่ *Pr1* และ *Pr2* ถูกตรวจพบบน appressoria หลังจากทำการเพาะเชื้อ 10 ถึง 24 ชั่วโมง และถูกตรวจพบในคิวติเคิลของแมลง *Mandula sexta* หลังจากทำการเพาะเชื้อรา *M. anisopliae* 16 ชั่วโมง โดย โปรติเอสชนิดอื่นๆ ที่เหลือทำหน้าที่เพียงเป็นตัวเสริมการทำงานของ *Pr1* เท่านั้น (Boucias and Pendland, 1998) และที่สำคัญ serine protease ทั้ง *Pr1* และ *Pr2* มีพีเอชที่เหมาะสมในการผลิตที่ พีเอช 8.00 (St Leger, 1998) คือมีคุณสมบัติเป็น alkaline protease เช่นเดียวกับ serine protease ที่ผลิตจากเชื้อรา *A. apis* นอกจากนี้ *Beauveria bassiana* เป็นเชื้อราก่อโรคในแมลงหลายชนิดที่มีการพิสูจน์พบว่าโปรติเอสที่ผลิตจากเชื้อรามีเพียงชนิดเดียวคือ serine protease (Bidochka and Khachatourians, 1987) ราก่อโรคในแมลง *Paecilomyces farinosus* ก็สามารถผลิต โปรติเอส ในกลุ่ม serine protease ที่เป็น alkaline protease โดยมี พีเอชที่เหมาะสมในการผลิตที่ 8.5 (Llorca et al., 2002) เช่นเดียวกันกับเชื้อรา *A. apis* นอกจากนี้แล้วโปรติเอสที่ผลิตจากเชื้อรา *A. apis* ยังถูกยับยั้งการทำงานจาก 1,10-phenantroline (metalloprotease) โดยเหลือค่าการทำงาน 54.3 % ดังนั้น โปรติเอสที่มีการผลิตจากเชื้อรา *A. apis* น่าจะมีถึง 2 ชนิด คือ serine protease และ metalloprotease

จากนั้นได้มีการศึกษาถึงสภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์โปรติเอส พบว่าในอาหาร 2 ชนิด ที่ทำให้ *A. apis* สามารถผลิตเอนไซม์โปรติเอสได้ดี ให้ผลการทดลองที่แตกต่างจากอาหารอื่นๆ ได้แก่ อาหาร Yeast glucose phosphate medium (YGPM) และอาหาร Sterile germination medium (SGM) ซึ่งทั้งสองมีส่วนผสมของอาหารที่เหมือนกันคือ yeast extract, glucose และ phosphate buffer ต่างกันเพียง YGPM มีการเพิ่ม soluble starch และ cysteine ซึ่งค่าการทำงานของโปรติเอส ที่ได้จากอาหารทั้ง 2 ชนิดอยู่ในช่วง 6-15 units enzyme เมื่อนำอาหารทั้ง 2 ชนิดมาทำการเปรียบเทียบกับอาหารที่เหลืออีก 5 ชนิด พบว่า YGPM และ SGM ให้ค่าการทำงานของโปรติเอสที่สูงกว่าอย่างชัดเจน 3-4 เท่า โดยที่อาหาร 5 ชนิดนั้นได้แก่ Potato dextrose broth (PDB), PDB + 0.4% yeast extract, PDB + 0.5% malt extract, Sabouraud medium (Sab) และ Sab + 0.2% yeast extract อาหารเหล่านี้ให้ค่าการทำงานของ โปรติเอสในระดับที่ต่ำใกล้เคียงกัน คืออยู่ในช่วง 1-5 units enzyme เมื่อทำการเปรียบเทียบอาหารทั้ง 6 ชนิด แล้วพบว่าอาหารเพียง 2 ชนิดที่เหมาะสม คือ YGPM และ SGM เมื่อนำอาหารทั้ง 2 ชนิดเปรียบเทียบกับ พบว่า อาหารชนิดแรก YGPM ให้ค่าการทำงานของโปรติเอส ที่ต่ำสุดคือ 5.71 จากไอโซเลท HL-8-3 ที่น้ำเลี้ยงวันที่ 7 และสูงสุดคือ 8.37 จากไอโซเลท G1 ที่น้ำเลี้ยงวันที่ 11 อาหารที่สอง SGM ให้ค่าการทำงานของโปรติเอส ที่ต่ำสุดคือ 5.98 จากไอโซเลท NBRC 9831 ที่น้ำเลี้ยงวันที่ 7 และสูงสุดคือ 15.40 จาก ไอโซเลท NBRC 9831ที่น้ำเลี้ยงวันที่ 11 ดังนั้นจึงทำการเลือกอาหาร SGM เป็นอาหารที่เหมาะสมในการทดลองขั้นต่อไป

การสำรวจค่าพีเอชในอาหาร SGM ที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์โปรติเอส พบว่า ในช่วงพีเอช 6.0-10.0 พีเอชที่เหมาะสมคือที่พีเอช 8.0 โดยค่าการทำงานของโปรติเอสมีการเพิ่มขึ้นเป็นลำดับตามค่าพีเอชที่เพิ่มขึ้น คือเริ่มต้นที่ พีเอช 6.0 จากนั้นที่ พีเอช 7.0 ยังมีค่าที่เพิ่มสูงขึ้นจนสูงสุด

ที่พีเอช 8.0 จากนั้น พีเอชที่สูงขึ้นอีกคือ พีเอช 9.0 ยังคงมีการผลิตเอนไซม์โปรติเอส แต่มีค่าการทำงานของเอนไซม์ที่ต่ำกว่า พีเอช 8.0 แต่สูงกว่า พีเอช 7.0 และที่ พีเอช สุดท้ายคือ 10.0 พบว่าเชื้อรา *A. apis* ทุกไอโซเลทไม่มีการผลิตเอนไซม์โปรติเอส ดังนั้นพีเอชที่เหมาะสมที่ได้จากการทดลองคือ พีเอช 8.0 ซึ่งมีค่าใกล้เคียงกับค่า พีเอช ในระบบทางเดินอาหารในตัวอ่อนผึ้ง (larval midgut) ซึ่งมีค่าพีเอชอยู่ที่ 7.5 (Bignell and Heath, 1985) ผลการทดลองที่ได้ทำให้สามารถประเมินได้ว่า การผลิตเอนไซม์โปรติเอสจากเชื้อรา *A. apis* ในสภาวะ *in vitro* ที่มีการปรับสภาวะในอาหารให้มีความเป็นด่างซึ่งเป็นสภาวะที่ใกล้เคียงกับค่าพีเอช ในระบบทางเดินอาหารของตัวอ่อนผึ้ง ที่มีสภาวะเป็นด่างเล็กน้อยนั้น น่าจะเป็นส่วนช่วยให้เชื้อราสามารถผลิตเอนไซม์ได้ดีที่สุด ดังนั้นเมื่อตัวอ่อนผึ้งได้รับ ascospores เข้าไปแล้ว ส่วนแรกที่สปอร์เริ่มมีการงอกคือในทางเดินอาหารของตัวอ่อนผึ้ง (midgut lumen, pH 7.5) ซึ่งจุดนี้เชื่อกันว่าจะมีการผลิตเอนไซม์กลุ่มย่อยโปรตีน proteolytic ออกมาในสภาวะที่เป็นด่างเพื่อทำการผ่านชั้นเพริโทรฟิก (peritrophic membrane) ซึ่งมีส่วนประกอบเป็น ไกลโคโปรตีน (glycoprotein) และ ไกลโคซามิโนไกลแคน (glycosaminoglycans) ทำหน้าที่ในการป้องกันจุลินทรีย์ที่เข้ามาบุกรุก (Eisemann and Binnigton, 1994) ก่อนจะเข้าไปสู่ส่วนเอพิทีเลียเซลล์ (epithelium cells) ต่อไป

เพื่อเสริมความเข้าใจในระบบของพีเอชที่มีผลต่อการผลิตเอนไซม์โปรติเอสจึงได้ทำการทดลองเพื่อหาสภาวะความเป็น กรด-ด่าง ที่เกิดจากการปรับเปลี่ยนของเชื้อเองว่ามีผลต่อการผลิตเอนไซม์หรือไม่ โดยการใช้อาหาร 2 แบบ คืออาหารที่มีสารอาหารอย่างจำกัดและอาหารที่มีสารอาหารระดับที่ปกติและมีการปรับพีเอช เริ่มต้นที่ 5.2 ในทุกๆชนิดอาหาร เพื่อดูการเปลี่ยนแปลงของค่าพีเอชหลังจากเชื้อรา *A. apis* มีการเจริญในอาหารนั้น โดยพบว่าในอาหาร 0.1% yeast extract + 1% glucose ซึ่งมีปริมาณ glucose มากกว่า yeast extract ถึง 10 เท่า นั้น หลังจากทำการเพาะเลี้ยงเชื้อรา พบว่าอาหารจะถูกเปลี่ยนแปลงให้มีสภาพเป็นกรดและสามารถตรวจพบค่าการทำงานของโปรติเอสเพียง 2 ไอโซเลทเท่านั้นและยังมีระดับของค่าการทำงานของโปรติเอสที่ต่ำอีกด้วย แต่เมื่อเปรียบเทียบกับอาหารชนิดเดียวกันที่มีการควบคุมพีเอชด้วยการใช้ phosphate buffer พบว่าค่าการทำงานของโปรติเอส ที่ได้รับเพิ่มสูงขึ้นใน 2 ไอโซเลทดังกล่าว และยังเริ่มมีการสร้างโปรติเอสในอีก 4 ไอโซเลทอีกด้วย แสดงให้เห็นว่าสภาวะที่เป็นกรดนั้นเป็นส่วนหนึ่งของปัจจัยที่ไม่เหมาะสมต่อการผลิตโปรติเอส เช่นเดียวกับการวิจัยของ St Leger และคณะในปี 1999 พบว่า เชื้อราก่อโรคในแมลง *Metarhizium anisopliae* สายพันธุ์ Acid (+) mutant มีการสร้างกรดในอาหารและไม่พบการสร้างโปรติเอส ในอาหารนั้น แต่ในอาหารที่มี buffer กลับพบว่าการสร้างเอนไซม์โปรติเอส ในระดับเดียวกับสายพันธุ์ wild type (St Leger *et al.*, 1999) ทำให้สามารถบ่งชี้ได้ว่าการผลิตกรดในอาหารเป็นสภาวะที่ไม่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์โปรติเอส นอกจากการสำรวจความสัมพันธ์ระหว่างสภาวะความเป็น กรด-ด่าง ต่อการผลิตเอนไซม์โปรติเอสแล้วยังสามารถสำรวจถึงความสัมพันธ์ระหว่างการเจริญของเชื้อและการผลิตเอนไซม์ได้อีกด้วย เช่น ในการเจริญของเชื้อราในอาหาร 0.1% yeast extract เป็นสารอาหารเพียงอย่างเดียว พบว่าลักษณะเส้นใยบนอาหารแข็งจะมีลักษณะลีบเล็กกลุ่มของเส้นใยไม่ฟูตามปกติและรอบโคโลนีของเชื้อราที่มีลักษณะเป็นสี

น้ำเงิน (blue zone) บ่งถึงสภาวะที่เป็นต่าง มีค่าพีเอช ในช่วง 7.1-7.9 ซึ่งเป็นสภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์โปรติเอส แต่กลับไม่พบการผลิตเอนไซม์ในทุกๆ ไอโซเลท ส่วนในอาหารเดียวกัน คือ 0.1% yeast extract แต่มีการเพิ่ม phosphate buffer พบว่า พีเอช หลังจากการเพาะเลี้ยงไม่ต่างไปจากเดิมมากนัก คืออยู่ในช่วง 5.2-5.7 เนื่องจากมีบัฟเฟอร์อยู่ ลักษณะเส้นใยยังคงลีบเล็ก เช่นเดิมและไม่มีการผลิตเอนไซม์โปรติเอสเช่นเดียวกัน เมื่อทำการเปรียบเทียบผลของการผลิตเอนไซม์โปรติเอสที่ได้จากอาหาร 2 ชนิดที่กล่าวมากับอาหารที่มีเพิ่มแหล่งคาร์บอน (C-source) ที่เหมาะสม เช่น 0.1% yeast extract + 1% glucose และ 0.1% yeast extract + 1% glucose ที่มีบัฟเฟอร์ พบว่า เชื้อรา *A. apis* มีการเจริญบนอาหารแข็งได้เป็นอย่างดีและมีลักษณะของเส้นใยฟูตามปกติและเริ่มมีการผลิตเอนไซม์โปรติเอส ใน 2 และ 6 ไอโซเลทตามลำดับ ผลที่ได้แสดงให้เห็นว่า แม้เชื้อจะเจริญในสภาวะที่เป็นต่างที่ใกล้เคียงกับค่าพีเอชที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์โปรติเอสหรืออยู่ในสภาวะที่พีเอชไม่ต่างไปจากพีเอชเริ่มต้นนั้นแต่เมื่อเชื้อมีสภาวะการเจริญที่ไม่สมบูรณ์จากการขาดแคลนสารอาหารก็ส่งผลทำให้เชื้อไม่สามารถผลิตเอนไซม์โปรติเอสได้ ดังนั้นแหล่งคาร์บอนที่เหมาะสมต่อการเจริญของเชื้อราก็เป็นอีกปัจจัยหนึ่งที่มีผลต่อการผลิตเอนไซม์โปรติเอส ดังนั้นในภาพรวมสามารถกล่าวได้ว่าสภาวะที่เป็นต่างคือสภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์โปรติเอส และสภาวะที่เป็นกรดคือสภาวะที่ไม่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์ แต่ในสภาวะต่างที่มีปริมาณสารอาหารไม่เหมาะสมก็ไม่สามารถทำให้มีการผลิตเอนไซม์ได้ ดังนั้น สภาวะที่เป็นต่างน่าจะมีบทบาทในการเอื้อให้เชื้อรามีการใช้ประโยชน์จากสารอาหารในขณะนั้นได้มากกว่า เพราะเมื่อเปรียบเทียบในอาหาร 0.1% yeast extract + 1% glucose ที่มีสารอาหารเพียงพอแต่มีสภาวะเปลี่ยนเป็นกรดเกิดขึ้นจากการใช้สารอาหารของเชื้อ โดยมีค่าพีเอช 3.9-4.1 ซึ่งพบว่าไม่มีการสร้างโปรติเอสถึง 7 ไอโซเลท แต่ในอาหารเดียวกันที่มีบัฟเฟอร์คอยพยุงค่าพีเอชไม่ให้ต่ำลงมากเกินไป โดยมีค่าพีเอช 4.7-5.2 ทำให้เชื้อสามารถใช้สารอาหารในการผลิตเอนไซม์โปรติเอสได้ดีขึ้น หรืออาหารที่ไม่มีบัฟเฟอร์แต่มีการเพิ่มความเข้มข้นของแหล่งไนโตรเจน (N-source) และมีแหล่งคาร์บอน (C-source) ที่เหมาะสม คืออาหาร 1% yeast extract + 1% glucose พบว่าอาหารมีการปรับเปลี่ยนเป็นต่างมากขึ้นจากการใช้สารอาหารของเชื้อราเอง โดยมีค่าพีเอช 5.5-6.4 ทำให้เชื้อมีการผลิตโปรติเอสในทุกๆ ไอโซเลทและในระดับที่สูงกว่าอาหารอื่นๆ

จากนั้นได้ทำการศึกษาเอนไซม์ชนิดต่อไปที่มีความสำคัญเช่นเดียวกันในระบบของกระบวนการย่อยสลายผ่านคิวติเคิลของตัวอ่อนผึ้ง ได้แก่ เอนไซม์ β -N-acetylglucosaminidase ซึ่งเอนไซม์ชนิดนี้จัดเป็นเอนไซม์กลุ่มย่อยไคติน (chitinolytic) ซึ่งมีความสำคัญต่อความสามารถในการเข้าก่อโรคของเชื้อราที่ก่อโรคในแมลง เช่นเดียวกับเอนไซม์ในกลุ่มย่อยโปรตีน (proteolytic) และพบว่าเอนไซม์ ทั้ง 2 กลุ่มนี้จะมีการทำงานในการย่อยสลายผ่านคิวติเคิลของแมลงด้วยการออกฤทธิ์เสริมการทำงานซึ่งกันและกัน (Bogo *et al.*, 1998) จากการทดสอบเอนไซม์ชนิดนี้ใน API ZYM kit พบว่ามีการสร้างเอนไซม์ชนิดนี้เพียง 3 ไอโซเลท แต่เมื่อนำมาศึกษาด้วยวิธีทาง spectrophotometry โดยใช้ chromogenic substrate (p-nitrophenyl- β -N-acetylglucosamine) ในการทดลอง พบว่าทุก ไอโซเลทมีการสร้างเอนไซม์ β -N-acetylglucosaminidase ในระดับ

ต่าง ๆ กัน โดยทำการทดสอบอาหารที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์จากอาหาร 2 ชนิด คือ basal salt และ enrichment culture โดยอาหารทั้ง 2 ชนิดมีการเติม 2% colloidal chitin ลงไปด้วยพบว่า เชื้อรา *A. apis* หลายไอโซเลทที่เจริญในอาหาร basal salt + 2% colloidal chitin ให้ค่าการทำงานของเอนไซม์ β -N-acetylglucosaminidase ในระดับที่ต่ำ ประมาณ 0.02-0.20 unit/ml เท่านั้น มีเพียงไอโซเลท HL-8-3 ที่ผลิตได้ถึง 1.11 unit/ml เมื่อนำมาเปรียบเทียบกับอาหาร enrichment culture + 2% colloidal chitin พบว่าในหลายไอโซเลทยังคงผลิตเอนไซม์ได้ในปริมาณที่ต่ำ เช่นเดียวกัน แต่ทั้งนี้ มี 1 ไอโซเลทที่มีค่าการทำงานของ β -N-acetylglucosaminidase สูงขึ้นอย่างชัดเจนถึง 93 เท่า คือ ไอโซเลท HL-5-2 ส่วน ไอโซเลท HL-8-3 สามารถผลิตเอนไซม์ได้มากขึ้นเพียง 2 เท่า ดังนั้นจึงเลือกอาหาร enrichment culture มาทำการปรับสัดส่วนของ colloidal chitin ในอาหารให้มีความเข้มข้นในระดับต่าง ๆ กัน พบว่าความเข้มข้นของ colloidal chitin ที่สูงไม่ได้เป็นตัวแปรที่ทำให้มีอัตราการผลิตเอนไซม์ที่สูงขึ้น ทั้งนี้สามารถเปรียบเทียบได้จากไอโซเลท HL-5-2 ที่มีการผลิตเอนไซม์ β -N-acetylglucosaminidase ได้สูงโดยสามารถผลิตเอนไซม์ได้ดีที่สุดที่ 0.2% colloidal chitin และมีการผลิตในระดับที่ต่ำลงถึง 2.9 และ 2.8 ที่ 0.5% และ 2.5% colloidal chitin ตามลำดับ การผลิตเอนไซม์พวก chitinolytic ที่ลดลงอันเนื่องมาจากเพิ่มความเข้มข้นของ N-acetylglucosamine (colloidal chitin) สามารถพบได้ใน เชื้อรา *G. rostrupii* ในแมลง ชนิดอื่น เช่น *Metarhizium anisopliae* ที่ถูกพบว่ามีการผลิตเอนไซม์ลดลงเมื่อเพิ่มความเข้มข้นของ N-acetylglucosamine จาก 90 μ M เป็น 360 μ M (St Leger *et al.*, 1986)

ได้ทำการคัดเลือกไอโซเลทที่ผลิตเอนไซม์ β -N-acetylglucosaminidase ได้ดีที่สุด 2 ไอโซเลท คือ HL-5-2 และ HL-8-3 มาทำการเปรียบเทียบค่าการทำงานของ β -N-acetylglucosaminidase ที่ได้จากอาหารที่เหมาะสมสำหรับแต่ละไอโซเลท พบว่า *A. apis* HL-5-2 สามารถผลิตเอนไซม์ได้ดีกว่าไอโซเลท HL-8-3 ถึง 1.4 เท่า จึงเลือกไอโซเลท HL-5-2 มาทำการผลิตเอนไซม์ β -N-acetylglucosaminidase เพื่อใช้ในการทำบริสุทธิ์เอนไซม์สำหรับตรวจสอบคุณสมบัติต่าง ๆ ของเอนไซม์ต่อไป

ในการกำจัดเกลือได้ใช้เทคนิค ultrafiltration ซึ่งเป็นเทคนิคที่จะทำการกำจัดโมเลกุลที่มีขนาดเล็กกว่า pore size ของเมมเบรนออกไป จากการทดลองพบว่า ultrafiltration เป็นเทคนิคที่มีประสิทธิภาพสูงในการกำจัดเกลือ โดยสังเกตได้จากเปอร์เซ็นต์ผลิตภัณฑ์เอนไซม์ที่เหลือเมื่อเทียบกับ 100% ของเอนไซม์ทั้งหมดในอาหารเลี้ยงเชื้อ โดยเปอร์เซ็นต์ผลิตภัณฑ์เอนไซม์ที่เหลือจากการใช้เทคนิค ultrafiltration ในการกำจัดเกลือมีค่าเท่ากับ 66.69% ซึ่งสามารถลดการสูญเสียเอนไซม์ได้เป็นอย่างดี จากนั้นเมื่อนำเอาเอนไซม์ที่ทำการกำจัดเกลือแล้วมาทำบริสุทธิ์ด้วยวิธีคอลัมน์โครมาโทกราฟีแบบแลกเปลี่ยนประจุลบ โดยใช้ DEAE-sepharose เป็น ion-exchange resin พบว่าเอนไซม์ถูกชะออกจากคอลัมน์ในช่วงความเข้มข้นของเกลือ NaCl ประมาณ 0.10-0.15 M จากนั้นในการเก็บ fraction เมื่อประเมินจากกราฟค่าการทำงานของเอนไซม์และค่าการดูดกลืนแสงที่ 280 nm จึงทำการเก็บ active fraction ที่แตกต่างกัน 3 แบบ คือ ในส่วนครึ่งปีดแรก, แบบเต็มปีดและเก็บในส่วน fraction ที่ 55-75 การเก็บในรูปแบบนี้อันเนื่องมาจากเมื่อช้อนกราฟค่าการทำงานของ

เอนไซม์ และค่าการดูดกลืนแสงที่ 280 nm จะเห็นได้ว่าพื้นที่ใต้กราฟของ fraction ที่ตรวจพบค่าการทำงานของเอนไซม์ (OD. 420) จะพบพีคของปริมาณโปรตีนที่ได้จากการวัดค่าการดูดกลืนแสง (OD 280) 1 พีคเต็ม และอีกครั้งพีคที่มีค่าการดูดกลืนแสงที่ 280 nm สูงสุด และเมื่อนำ active fraction ที่เก็บในช่วงครึ่งพีคแรกของการดูดกลืนแสงที่ 420 nm มาทำ SDS-PAGE จะเกิดแถบโปรตีนเพียง 4 แถบ ส่วนเอนไซม์ที่เก็บแบบเต็มพีค จะพบแถบโปรตีนทั้งหมด 7 แถบ และส่วนสุดท้ายจาก fraction ที่ 55-75 พบแถบโปรตีนมากที่สุดถึง 9 แถบ จากนั้นได้ใช้เทคนิค gel filtration ในการวิเคราะห์มวลโมเลกุลตามธรรมชาติของเอนไซม์ พบว่าเอนไซม์ β -N-acetylglucosaminidase มีมวลโมเลกุล (Native-form protein) ที่ 55.042 KDa โดยเมื่อวิเคราะห์ร่วมกับการทำ SDS-PAGE แล้ว พบว่าเอนไซม์ β -N-acetylglucosaminidase ที่ผลิตจากเชื้อรา *A. apis* มีเพียง 1 subunit

เมื่อทำการวิเคราะห์ผลจากการทำ ion-exchange ที่มีการเก็บ fraction เป็น 3 ส่วน พบว่า ส่วนที่ 1 ที่มีการเก็บเพียงครึ่งพีค (fraction 43-48) มีค่าการทำงานของเอนไซม์ β -N-acetylglucosaminidase มากกว่าส่วนที่ 2 ที่มีการเก็บ active fraction ทั้งหมด (fraction 43-55) ถึง 2.31 เท่าและเมื่อตรวจสอบผลจากการทำ SDS-PAGE จะเห็นได้ว่าแถบที่อยู่ในช่วง 55 KDa ในเลนที่โหลดครึ่งพีคแรกของ active fraction (fraction 43-48) มีความเข้มของแถบน้อยกว่า แถบที่ได้จากพีคของ active fraction (fraction 43-55) อย่างชัดเจน เห็นได้ว่าตามผลการทดลองที่ได้ ถ้าเอนไซม์ส่วนที่ 2 (fraction 43-55) มีการทำงานตามปกติควรจะมีค่าการทำงานมากกว่าส่วนที่ 1 (fraction 43-48) ทั้งนี้อาจเป็นไปได้ว่ามีโปรตีนที่เป็นตัวควบคุมการทำงานของเอนไซม์อยู่ร่วมด้วย หรืออยู่ในภาวะที่ถูกรบกวนการทำงานจากโปรตีนปนเปื้อนอื่นๆซึ่งในส่วนที่ 2 มีจำนวนแถบโปรตีนมากกว่าส่วนที่ 1 ถึง 3 แถบ

เมื่อได้เอนไซม์ β -N-acetylglucosaminidase ที่ผ่านการทำบริสุทธิ์บางส่วนแล้วหา ลักษณะเฉพาะบางประการของเอนไซม์ พบว่า สภาวะของพีเอชที่มีผลต่อการทำงานของเอนไซม์ อย่างชัดเจนคือ พีเอช 6.0 โดยทำให้เอนไซม์มีค่าการทำงานสูงสุดถึง 75.264 unit/ml มากกว่าที่พีเอช 9.0 ซึ่งเป็นพีเอชที่ทำให้เอนไซม์ทำงานได้ต่ำที่สุดถึง 313.6 เท่า และให้ค่าการทำงานมากกว่าพีเอชที่เป็นกลางประมาณ 2 เท่า แสดงให้เห็นถึงความสำคัญของสภาวะพีเอชที่มีต่อการทำงานของเอนไซม์ได้เป็นอย่างดี พบว่าในเชื้อก่อโรคในแมลง เช่น *Metarhizium anisopliae* มีค่าพีเอชที่เหมาะสมต่อการทำงานของเอนไซม์ β -N-acetylglucosaminidase ที่ช่วงพีเอชที่เป็นกรดอ่อนๆเช่นเดียวกัน โดยมีค่าพีเอชเหมาะสมที่ 5.0 ซึ่งให้ค่าการทำงานมากกว่าพีเอชที่เป็นกลาง 2 เท่า (St leger *et al.*, 1998) และอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการทำงานของเอนไซม์ คือ 37 °C แต่เป็นที่น่าสังเกตว่าอุณหภูมิไม่ได้เป็นปัจจัยสำคัญที่มีอิทธิพลต่อการเปลี่ยนแปลงค่าการทำงานของเอนไซม์ ให้แตกต่างกันอย่างชัดเจนดังเช่นสภาวะของพีเอช โดยพบว่าค่าการทำงานของเอนไซม์ที่ได้ไม่แตกต่างกันมากนักในช่วงอุณหภูมิตั้งแต่ 30 ถึง 45 °C โดยมีค่าการทำงานในช่วง 70-75 unit/ml เนื่องจากถ้านิ่งถึงอุณหภูมิในตัวอ่อนผึ้งซึ่งไม่ได้มีเปลี่ยนแปลงอย่างผันผวนหรือเพิ่มสูงขึ้นถึง 45 °C แต่อย่างใด โดยที่อุณหภูมิตั้งแต่ 40 °C ขึ้นไปเป็นอุณหภูมิที่ไม่เหมาะสมต่อการทำให้เกิดขั้นตอนต่างๆของการพัฒนาของสปอร์คือ การกระตุ้น, การขยายขนาด และการเกิด germ tube

ก่อนเกิดการงอกเป็นเส้นใย (germination) (Bamford and Heath, 1989 (b)) ซึ่งเชื้อรา *A. apis* ไม่มีความจำเป็นที่จะต้องปรับตัวให้สามารถทำงานได้ที่อุณหภูมิที่สูงกว่าอุณหภูมิร่างกายของตัวอ่อนผึ้งแต่อย่างใด นอกจากนี้ในการศึกษาอิทธิพลของแคโทไอออนต่อการทำงานของเอนไซม์ β -N-acetylglucosaminidase พบว่าแคโทไอออนชนิดต่างๆ ที่ทำการศึกษาคือ Ca^{2+} , Mg^{2+} , K^+ , Na^+ และ Li^+ ไม่มีผลต่อการช่วยทำให้เอนไซม์ทำงานได้ดีขึ้นแต่ทำให้ค่าการทำงานลดลงเล็กน้อยโดยเหลือค่าการทำงานประมาณ 97-99 % และพบว่า Cu^{2+} และ Zn^{2+} ทำให้ค่าการทำงานลดลงอย่างชัดเจนโดยเหลือค่าการทำงานเพียง 49.69 และ 8.92 % ตามลำดับ ในส่วนการศึกษาความเสถียรของเอนไซม์ต่ออุณหภูมิและพีเอช พบว่าแนวโน้มของความเสถียรของเอนไซม์มีการลดลงตามค่าอุณหภูมิที่เพิ่มสูงขึ้นเป็นลำดับ โดยความเสถียรต่อค่าพีเอชก็มีแนวโน้มเดียวกัน

โปรติเอส และ β -N-acetylglucosaminidase ได้รับการรายงานว่าเป็นหนึ่งในเอนไซม์กลุ่มย่อยสลายคิวติเคิล (cuticle degrading enzyme) ที่มีความสำคัญต่อการทำให้เชื้อรามีความสามารถในการเข้าก่อโรค (fungal pathogenicity) (Boucias and Pendland, 1998) โดยได้มีการรายงานถึงหน้าที่ของเอนไซม์กลุ่มย่อยสลายคิวติเคิลถึงการเข้าทำลายคิวติเคิลของแมลงที่ทำหน้าที่เปรียบเสมือนกำแพงป้องกันตัวของแมลงเองโดยเอนไซม์กลุ่มนี้จะเข้าทำลายระบบป้องกันตัวของแมลงและมักเป็นปัจจัยที่ทำให้เกิดความรุนแรงของโรคมายิ่งขึ้น โดยในการทบทวนในครั้งนี้ได้มีการศึกษาการทำให้เอนไซม์กลุ่มย่อยสลายคิวติเคิล ได้แก่ β -N-acetylglucosaminidase เพื่อที่จะเข้าใจถึงสภาวะที่เหมาะสมในการทำงานของเอนไซม์ชนิดนี้ก่อนที่จะทำวิจัยต่อไปในอนาคต คือการศึกษาถึง N-terminal sequencing ของเอนไซม์เพื่อใช้ในการทำ overexpression ของเอนไซม์ชนิดนี้ เพื่อศึกษาถึงความเป็นไปได้ของเอนไซม์ที่ศึกษาต่อการเป็นปัจจัยที่ทำให้เกิดความรุนแรงของโรคได้ ดังเช่นงานวิจัยของ St Leger และคณะ (1996) โดยได้มีการทำ overexpression ของ subtilisin-like protease gene (*Pr1A*) ใน *Metarhizium anisopliae* ซึ่งพบว่าการเพิ่มการแสดงออกของ cuticle degrading enzyme ชนิดนี้สามารถทำให้ *M. anisopliae* แสดงความสามารถในการก่อโรคที่รุนแรงขึ้น เช่นเดียวกับ Fang และคณะ (2005) ซึ่งได้ทำโปรตีนเอนไซม์ไคตินเนสจากเชื้อราก่อโรคในแมลง *Beauveria bassiana* เพื่อทำการออกแบบ primer จาก amino acid sequencing ของไคตินเนส และจากการทำโปรตีนพบว่าไคตินเนส ที่มีการผลิตจากเชื้อรา *B. bassiana* มีมวลโมเลกุลประมาณ 33 kDa และมีค่า pi ที่ 5.4 และเมื่อทำให้ยีนไคตินเนส (*Bbchit1*) มีคุณสมบัติในการ overexpression แล้วทำการใส่กลับสู่ *B. bassiana* เพื่อเปรียบเทียบกับ *B. bassiana* สายพันธุ์ wide-type ที่มีการผลิตเอนไซม์ตามระดับปกติ พบว่า *B. bassiana* ที่มีการทำ overexpression ของยีนไคตินเนส จะมีความรุนแรงในการก่อโรคมายิ่งกว่า wide-type ในเอนไซม์กลุ่มเดียวกันนี้แต่ในเชื้อราก่อโรคที่ต่างกัน ในกลุ่มเอนไซม์ย่อยสลายคิวติเคิลที่มีการผลิตจากเชื้อราก่อโรคในแมลงนั้นสามารถที่จะเป็นปัจจัยหนึ่งในการทำให้เกิดความรุนแรงของโรคได้

บทที่ 5

ยีสต์¹

บทนำ

ยีสต์เป็นราเซลล์เดี่ยว แบ่งเป็น 2 กลุ่มตามความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการคือ teleomorphic และ anamorphic ascomycetes และ teleomorphic และ anamorphic basidiomycetes (Kurtzman and Fell, 1998) โดยทั่วไปการจัดหมวดหมู่ยีสต์จะใช้ลักษณะทางสัณฐานวิทยา สรีรวิทยา และชีวเคมี เทคนิคนี้ค่อนข้างยุ่งยาก ใช้เวลาและแรงงานมาก อีกทั้งยังอาจให้ผลการทดสอบที่ผิดพลาด จึงมีการคิดค้นชุดทดสอบสำหรับใช้จำแนกยีสต์ เทคนิคนี้เหมาะสำหรับการตรวจวินิจฉัยทางการแพทย์ เมื่อความรู้ทางอนุชีววิทยามีความก้าวหน้า ได้มีการพัฒนาเทคนิคใหม่สำหรับใช้จำแนกยีสต์ โดยอาศัยพื้นฐานด้านความเหมือนหรือความต่างของ DNA, RNA และโปรตีน เทคนิคนี้ไม่เหมาะสำหรับใช้จำแนกยีสต์ปริมาณมาก เนื่องจากเป็นการวิเคราะห์ในระดับสปีชีส์ จึงอาจมีฐานข้อมูลไม่เพียงพอสำหรับยีสต์สายพันธุ์ใหม่ (Esteve-Zarzoso *et al.*, 1999)

น้ำผึ้ง คือ น้ำหวานจากพืชที่ผ่านกระบวนการย่อยของผึ้งในวงศ์ Apinae องค์ประกอบของน้ำผึ้งแต่ละชนิดจะแตกต่างกันตามชนิดของพืช สภาพอากาศ สภาพแวดล้อม และการจัดการของผู้เลี้ยงผึ้ง (Küçük *et al.*, 2007) การศึกษาเกี่ยวกับยีสต์ที่อยู่ร่วมกับผึ้งและชันโรงแสดงให้เห็นว่า ยีสต์ส่วนใหญ่ที่พบอยู่ในสกุล *Candida* (Gilliam, 1997; Rosa *et al.*, 2003; Brysch-Herzberg, 2004) มีรายงานว่า Gilliam (1979) สามารถแยกยีสต์ *Candida magnoliae* จาก *Apis mellifera* และมีรายงานว่า *Candida bombicola* (หรือ *Starmerella bombicola*) เป็นยีสต์ที่พบได้บ่อยในน้ำหวานเกสร และอาหารของ *Megachile rotundata* อีกทั้งยังสามารถแยกยีสต์ชนิดนี้ได้จากผึ้งและน้ำผึ้งของ bumblebee (Inglis *et al.*, 1993; Brysch-Herzberg and Lachance, 2004) Rosa และคณะ (1999) รายงานว่าพบยีสต์ *Candida batistae* ในอาหารและตัวอ่อนของ *Diadasina distincta* และ *Ptilotrix plumata* นอกจากนี้ยังมีรายงานว่าพบยีสต์ *Starmerella meliponinorum*, *Candida riodecensis* และ *Candida cellae* ในรังของ *Tetragonisca angustula*, *Megachile* sp. และ *Centris tarsata* ตามลำดับ (Teixeira และคณะ, 2003; Pimentel และคณะ, 2005)

Xylitol เป็นน้ำตาลแอลกอฮอล์ธรรมชาติที่นิยมใช้เป็นสารให้ความหวานแทนน้ำตาลเนื่องจาก xylitol ไม่ทำให้ฟันผุ ให้พลังงานต่ำ และต้านการติดเชื้อ จึงปลอดภัยต่อผู้ป่วยโรคเบาหวาน xylitol ผลิตจากปฏิกิริยา hydrogenation ของ D-xylose ที่ได้จาก hemicellulose hydrolysates อีกทั้งยังพบ xylitol เป็น intermediate ใน xylose metabolism ของจุลินทรีย์บางชนิด การผลิต xylitol จากจุลินทรีย์มีความเป็นไปได้ในทางอุตสาหกรรม เนื่องจากไม่ต้องทำบริสุทธิ์ xylose และไม่ต้องทำที่อุณหภูมิและแรงดันสูง จุลินทรีย์ที่มีความสามารถในการใช้ xylose ได้แก่

¹ กำลังเตรียม Manuscript เรื่อง Yeast communities associated with the stingless bees *Trigona* spp.

ยีสต์ แบคทีเรีย และราเส้นใย เป็นที่รู้กันดีว่ายีสต์ในยีสต์ *Candida* มีความสามารถในการผลิต xylitol และมีศักยภาพในการนำมาประยุกต์ใช้ในระดับอุตสาหกรรม (Guo *et al.*, 2006)

วัตถุประสงค์

เพื่อศึกษาความหลากหลายของยีสต์ในน้ำผึ้งและความสามารถในการใช้น้ำตาลไซโลสเพื่อผลิต น้ำตาลไซลิทอล

วิธีการทดลอง

1. การเก็บตัวอย่างและการแยกยีสต์จากน้ำผึ้ง

ในปี พ.ศ. 2549 และ พ.ศ. 2550 เก็บตัวอย่างน้ำผึ้งของชันโรง *Trigona* (ได้แก่ *T. collina*, *T. doipaensis*, *T. fimbriata*, *T. fuscobalteata*, *T. laeviceps*, *T. pagdeni*, *T. terminata* และ unidentified *Trigona*) จำนวน 18 รัง และน้ำผึ้งของผึ้ง *Apis* (ได้แก่ *A. cerana*, *A. dorsata*, *A. florea* และ *A. mellifera*) จำนวน 18 รัง จากจังหวัดจันทบุรี เชียงใหม่ น่าน ลำปาง ลำพูน และ สุโขทัย

นำน้ำผึ้งมาทำ serial dilution แล้ว spread ลงบน Yeast extract-Malt extract (YM) agar ซึ่งเสริมด้วย chloramphenicol 100 mg l^{-1} บ่มที่อุณหภูมิ 25°C เป็นเวลา 2-5 วัน (restreak 3 ครั้ง) แล้วเก็บเป็น stock culture ใน 30% glycerol ที่อุณหภูมิ -20°C

2. การแบ่งกลุ่มยีสต์ด้วย morphological และ physiological characteristics

2.1 การย้อมนิวเคลียสด้วย toluidine blue

เกลี่ย single colony บนแผ่นสไลด์ ตั้งทิ้งไว้ให้แห้ง แล้วตรึงด้วยความร้อน จากนั้นหยด 40% ethanol จนท่วมแผ่นสไลด์ ตั้งทิ้งไว้ 1 นาที แล้วล้างออกด้วยน้ำประปา หยด 0.1 M KOH จนท่วมแผ่นสไลด์ ตั้งทิ้งไว้ 1 ชั่วโมง จากนั้นล้างออกด้วยน้ำประปา หยด 0.1% toluidine blue ใน 10% ethanol จนท่วมแผ่นสไลด์ ตั้งทิ้งไว้ 2 นาที แล้วล้างออกด้วย 10% ethanol จากนั้นนำไปส่องดูด้วยกล้องจุลทรรศน์

2.2 ความสามารถในการใช้ xylose เป็นแหล่งคาร์บอน (Guo *et al.*, 2006)

2.2.1 การเจริญใน Yeast extract-Peptone-Xylose (YPX) broth

ถ่ายเชื้อ 50 μl ลงใน Yeast extract-Peptone-Dextrose (YPD) broth 5 ml บ่มที่อุณหภูมิ 25°C ความเร็วรอบ 220 rpm เป็นเวลา 15 ชั่วโมง แล้วดูด cell culture 50 μl ใส่ลงใน YPX broth 5 ml บ่มที่อุณหภูมิ 25°C ความเร็วรอบ 220 rpm เป็นเวลา 3 วัน จากนั้นนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 600 nm

2.2.2 การเจริญบน YPX agar plate

ถ่ายเชื้อ 50 μ l ลงใน YPD broth 5 ml บ่มที่อุณหภูมิ 25°C ความเร็วรอบ 220 rpm เป็นเวลา 15 ชั่วโมง นำ cell culture มาทำ serial dilution แล้ว spread ลงบน YPX agar plate บ่มที่อุณหภูมิ 25°C เป็นเวลา 3 วัน

2.2.3 การเจริญบน YM agar slant (Yarrow, 1994)

ถ่ายเชื้อลงบนอาหารโดยการลากเป็นเส้นตรง บ่มที่อุณหภูมิ 17°C เป็นเวลา 1 เดือน

2.2.4 การเจริญบน 50% glucose agar slant (Yarrow, 1994)

ถ่ายเชื้อลงบนอาหารโดยการลากเป็นเส้นตรง บ่มที่อุณหภูมิ 25°C เป็นเวลา 21 วัน

3. การทำ D1/D2 และ ITS amplification

3.1 การทำ D1/D2 amplification

นำ single colony มา suspend ในน้ำกลั่นปลอดเชื้อ 100 μ l บ่มที่อุณหภูมิ 100°C เป็นเวลา 10 นาที แล้ว centrifuge ที่ 10,000 rpm เป็นเวลา 2 นาที (Lachance *et al.*, 1999) เก็บส่วนใสเป็น DNA template สำหรับทำ D1/D2 amplification (ตารางที่ 1 และ 2)

3.2 การทำ ITS amplification

นำ fresh cell 1 loop (1 μ l) มา suspend ใน YD Digestion Buffer 120 μ l และ R-Zymolyase 5 μ l เขย่าให้เข้ากัน บ่มที่อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 1 ชั่วโมง แล้วเติม YD Lysis Buffer 120 μ l เขย่าให้เข้ากัน จากนั้นเติม chloroform 250 μ l เขย่าเป็นเวลา 1 นาที นำไป centrifuge ที่ 14,000 rpm เป็นเวลา 2 นาที แล้วถ่ายของเหลวชั้นบนใส่ใน Zymo-spin III column นำไป centrifuge ที่ 14,000 rpm เป็นเวลา 1 นาที เติม DNA Wash Buffer 300 μ l แล้ว centrifuge ที่ 14,000 rpm เป็นเวลา 1 นาที (ทำซ้ำ 2 ครั้ง) เติมน้ำกลั่นปลอดเชื้อ 60 μ l ตั้งทิ้งไว้ 1 นาที แล้ว centrifuge ที่ 14,000 rpm เป็นเวลา 10 วินาที (Zymo Research, USA) เก็บส่วนใสเป็น DNA template สำหรับทำ ITS amplification (ตารางที่ 5.1 และ 5.2)

4. การจำแนกยีสต์ด้วย molecular และ physiological characteristics

4.1 Molecular characteristic

นำ DNA ที่ sequence ได้ (Macrogen, Korea) มาแก้ไขด้วยโปรแกรม BioEdit (Isis Pharmaceutical, USA) และ BLAST เปรียบเทียบกับ DNA sequences ของยีสต์ที่มีอยู่ใน GenBank

4.2 Physiological characteristic

นำ fresh cells มา suspend ในน้ำกลั่นปลอดเชื้อ 2 ml จนกระทั่งมีความขุ่นเท่ากับ 2 McFarland เขย่าให้เข้ากัน แล้วดูด cell suspension 250 μ l ใส่ลงใน API C medium 7 ml จากนั้นดูด cell suspension 135 μ l ใส่ลงในแต่ละหลุมของ ID 32C strip (Biomérieux, France) บ่มที่อุณหภูมิ 25°C เป็นเวลา 3-5 วัน

ตารางที่ 5.1 ส่วนผสมของ PCR ที่ใช้ทำ D1/D2 และ ITS amplification

องค์ประกอบ	ปริมาตรที่ใช้ (μl)	
	D1/D2 amplification	ITS amplification
10X reaction buffer	2.5	5
25 mM MgCl ₂	1.5	-
10 mM dNTP	0.5	4
ITS1 primer (5'- TCCGTAGGTGAACCTGCGG-3')	-	2.5
ITS4 primer (5'-TCCTCCGCTTATTGATATG-3')	-	2.5
10 μM NL1 primer (5'-GCATATCAATAAGCGGAGGAAAAG-3')	2	-
10 μM NL4 primer (5'-GGTCCGTGTTTCAAGACGG-3')	2	-
5U/ml <i>Taq</i> polymerase	0.5	0.5
Sterile H ₂ O	16.5	30.5
DNA template	5	5
ปริมาตรทั้งหมด	30.5	50

ตารางที่ 5.2 สภาวะของ PCR ที่ใช้ทำ D1/D2 และ ITS amplification

ขั้นตอน	อุณหภูมิ, เวลา	
	D1/D2 amplification	ITS amplification
1. Predenaturation	94°C, 5 min	94°C, 3 min
2. 30 cycles of		
- Denaturation	94°C, 30 s	94°C, 30 s
- Annealing	55°C, 30 s	57°C, 30 s
- Extension	72°C, 30 s	72°C, 1.20 min
3. Final extension	72°C, 7 min	72°C, 10 min
4. Holding	4°C, α	4°C, α

ผลการทดลอง

จากน้ำผึ้ง 36 ตัวอย่าง สามารถแยกยีสต์ได้ทั้งหมด 193 isolates (น้ำผึ้งของชันโรง *Trigona* 83 isolates และน้ำผึ้งของผึ้งกลุ่ม *Apis* 110 isolates) เมื่อนำยีสต์มาศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยา และสรีรวิทยา (ตารางที่ 5.3 และ 5.4) สามารถแบ่งยีสต์ออกเป็นกลุ่ม แล้วคัดเลือกตัวแทนยีสต์มาจำแนกด้วย molecular และ physiological characteristics (ตารางที่ 5.5 และ 5.6)

ตารางที่ 5.3 ลักษณะทางสัณฐานวิทยาและสรีรวิทยาของยีสต์ที่แยกได้จากน้ำผึ้งของชันโรง
(*Trigona* spp.)

Hive no.	Isolate no.	Bee species *	Locality **	Xylose assimilation	Osmophile/ Osmotolerant	Colony morphology Color/Edge/Surface/Side view
1	SB9	<i>pag</i>	จป	Y	Y	White/Undulate/Smooth/Flat
	SB11			Y	<i>nd</i>	White/Undulate/Smooth/Flat
2	SB16	<i>pag</i>	ชม	Y	Y	White/Undulate/Smooth/Flat
	SB17			Y	Y	White/Undulate/Smooth/Flat
	SB19			Y	Y	White/Undulate/Smooth/Flat
	SB21			Y	Y	White/Undulate/Smooth/Flat
3	SB22	<i>pag</i>	ชม	Y	Y	White/Undulate/Smooth/Flat
	SB23			Y	Y	White/Undulate/Smooth/Flat
	SB25			Y	Y	White/Undulate/Smooth/Flat
4	SB26	<i>pag</i>	ชม	Y	Y	White/Undulate/Smooth/Flat
	SB27			Y	Y	White/Undulate/Smooth/Flat
	SB28			Y	Y	White/Undulate/Smooth/Flat
	SB29			Y	<i>nd</i>	White/Undulate/Smooth/Flat
	SB30			Y	<i>nd</i>	White/Undulate/Smooth/Flat
	SB31			Y	Y	White/Undulate/Smooth/Flat
	SB32			Y	Y	White/Undulate/Smooth/Flat
5	SB40	<i>Lae</i>	ชม	Y	<i>nd</i>	Cream/Undulate/Smooth/Flat
	SB41			Y	Y	Cream/Undulate/Smooth/Flat
	SB43			N	Y	Cream/Undulate/Smooth/Flat
6	SB45	<i>Ter</i>	ชม	Y	Y	White/Undulate/Smooth/Flat

* *col* = *T. collina*, *doi* = *T. doipaensis*, *fim* = *T. fimbriata*, *fus* = *T. fuscobalteata*, *lae* = *T.*

laeviceps, *pag* = *T. pagdeni*, *ter* = *T. terminata* และ un = unidentified *Trigona*

** จป = จันทบุรี, ชม = เชียงใหม่, นน = น่าน, ลป = ลำปาง, ลพ = ลำพูน และ สท = สุโขทัย

N = No, Y = Yes, *nd* = Not determine

ตารางที่ 5.3 (continued)

Hive no.	Isolate no.	Bee species *	Locality **	Xylose assimilation	Osmophile/ Osmotolerant	Colony morphology Color/Edge/Surface/Side view
7	SB47	<i>pag</i>	ชม	N	Y	White/Undulate/Smooth/Flat
	SB50			Y	<i>nd</i>	Cream/Undulate/Smooth/Flat
	SB51			Y	<i>nd</i>	Cream/Undulate/Smooth/Flat
	SB52			Y	<i>nd</i>	Cream/Undulate/Smooth/Flat
	SB54			Y	<i>nd</i>	Cream/Undulate/Smooth/Flat
	SB55			Y	<i>nd</i>	Cream/Undulate/Smooth/Flat
	SB57			Y	<i>nd</i>	Cream/Undulate/Smooth/Flat
	SB58			Y	<i>nd</i>	Cream/Undulate/Smooth/Flat
	SB60			Y	Y	White/Undulate/Smooth/Flat
8	SB64	<i>Lae</i>	ชม	N	Y	Cream/Undulate/Smooth/Flat
	SB65			N	<i>nd</i>	Cream/Undulate/Smooth/Flat
	SB67			N	<i>nd</i>	Cream/Undulate/Smooth/Flat
	SB68			N	<i>nd</i>	Cream/Undulate/Smooth/Flat
	SB69			N	<i>nd</i>	Cream/Undulate/Smooth/Flat
	SB70			N	<i>nd</i>	Cream/Undulate/Smooth/Flat
	SB71			N	<i>nd</i>	Cream/Undulate/Smooth/Flat
	SB73			Y	<i>nd</i>	Cream/Undulate/Smooth/Flat
	SB74			N	<i>nd</i>	Cream/Undulate/Smooth/Flat
9	SB76	Un	ชม	Y	Y	White/Undulate/Smooth/Flat
	SB77			Y	<i>nd</i>	White/Undulate/Smooth/Flat
	SB78			Y	<i>nd</i>	White/Undulate/Smooth/Flat

* *col* = *T. collina*, *doi* = *T. doipaensis*, *fim* = *T. fimbriata*, *fus* = *T. fuscobalteata*, *lae* = *T.*

laeviceps, *pag* = *T. pagdeni*, *ter* = *T. terminata* และ un = unidentified *Trigona*

** จบ = จันทบุรี, ชม = เชียงใหม่, นน = น่าน, ลป = ลำปาง, ลพ = ลำพูน และ สท = สุโขทัย

N = No, Y = Yes, *nd* = Not determine

ตารางที่ 5.3 (continued)

Hive no.	Isolate no.	Bee species*	Locality**	Xylose assimilation	Osmophile/Osmotolerant	Colony morphology Color/Edge/Surface/Side view
10	SB85	<i>doi</i>	ชม	Y	Y	Cream/Undulate/Smooth/Flat
	SB86			Y	nd	Cream/Undulate/Smooth/Flat
11	SB91	<i>fim</i>	ชม	Y	Y	Brown/Undulate/Smooth/Flat
	SB92			Y	Y	Brown/Undulate/Smooth/Flat
	SB97			Y	nd	White/Erose/Rugose/Convex
	SB98			N	N	Cream/Undulate/Smooth/Flat
12	SB99-1	<i>lae</i>	ชม	Y	Y	Cream/Undulate/Smooth/Flat
	SB99-2			Y	nd	Cream/Undulate/Smooth/Flat
	SB100			Y	nd	Cream/Undulate/Smooth/Flat
	SB101			Y	nd	Cream/Undulate/Smooth/Flat
	SB103			Y	nd	Cream/Undulate/Smooth/Flat
13	SB104	<i>col</i>	ชม	N	nd	Cream/Undulate/Smooth/Flat
	SB107			N	nd	Cream/Undulate/Smooth/Flat
	SB110			N	nd	Cream/Undulate/Smooth/Flat
	SB111			N	nd	Cream/Undulate/Smooth/Flat
14	SB112-1	<i>fus</i>	ชม	Y	Y	White/Undulate/Smooth/Flat
				N	nd	White/Undulate/Smooth/Flat
	SB112-2			Y	Y	White/Undulate/Smooth/Flat
				Y	nd	White/Undulate/Smooth/Flat
	SB113			Y	Y	White/Undulate/Smooth/Flat
	SB115					
	SB125					

* *col* = *T. collina*, *doi* = *T. doipaensis*, *fim* = *T. fimbriata*, *fus* = *T. fuscobalteata*, *lae* = *T. laeviceps*, *pag* = *T. pagdeni*, *ter* = *T. terminata* และ un = unidentified *Trigona*

** จบ = จันทบุรี, ชม = เชียงใหม่, นน = น่าน, ลป = ลำปาง, ลพ = ลำพูน และ สท = สุโขทัย

N = No, Y = Yes, nd = Not determine

ตารางที่ 5.3 (continued)

Hive no.	Isolate no.	Bee species*	Locality**	Xylose assimilation	Osmophile/Osmotolerant	Colony morphology Color/Edge/Surface/Side view
15	SB132-1	<i>lae</i>	ชม	N	<i>nd</i>	Cream/Undulate/Smooth/Flat
				N	<i>nd</i>	Cream/Undulate/Smooth/Flat
	SB132-2			N	<i>nd</i>	Cream/Undulate/Smooth/Flat
	SB133					
16	SB139	<i>pag</i>	ชม	N	Y	Brown/Filamentous/ Smooth/Flat
	SB140			N	Y	White/Undulate/Punctate/Convex
	SB142			N	<i>nd</i>	White/Undulate/Punctate/Convex
	SB143			N	<i>nd</i>	White/Undulate/Punctate/Convex
	SB144			N	<i>nd</i>	White/Undulate/Punctate/Convex
	SB145			N	<i>nd</i>	White/Undulate/Punctate/Convex
17	SB146	<i>pag</i>	ชม	Y	Y	White/Undulate/Smooth/Flat
18	SB147	un	ชม	<i>nd</i>	<i>nd</i>	Cream/Undulate/Smooth/Flat
	SB148			<i>nd</i>	<i>nd</i>	Cream/Undulate/Smooth/Flat
	SB149			<i>nd</i>	<i>nd</i>	Cream/Undulate/Smooth/Flat
	SB150			<i>nd</i>	<i>nd</i>	White/Filamentous/Smooth/Raised
	SB151			<i>nd</i>	<i>nd</i>	White/Filamentous/Smooth/Raised
	SB152			<i>nd</i>	<i>nd</i>	White/Filamentous/Smooth/Raised
	SB153			<i>nd</i>	<i>nd</i>	Cream/Undulate/Smooth/Flat
	SB154			<i>nd</i>	<i>nd</i>	White/Filamentous/Smooth/Raised
	SB155			<i>nd</i>	<i>nd</i>	Cream/Undulate/Smooth/Flat
	SB156			<i>nd</i>	<i>nd</i>	White/Filamentous/Smooth/Raised
	SB157			<i>nd</i>	<i>nd</i>	Cream/Undulate/Smooth/Flat
	SB158			<i>nd</i>	<i>nd</i>	White/Filamentous/Smooth/Raised

* *col* = *T. collina*, *doi* = *T. doipaensis*, *fim* = *T. fimbriata*, *fus* = *T. fuscobalteata*, *lae* = *T.*

laeviceps, *pag* = *T. pagdeni*, *ter* = *T. terminata* และ un = unidentified *Trigona*

** จบ = จันทบุรี, ชม = เชียงใหม่, นน = น่าน, ลป = ลำปาง, ลพ = ลำพูน และ สท = สุโขทัย

= No, Y = Yes, *nd* = Not determine

ตารางที่ 5.4 ลักษณะทางสัณฐานวิทยาและสรีรวิทยาของยีสต์ที่แยกได้จากน้ำผึ้งของผึ้ง

Hive no.	Isolate no.	Bee species*	Locality**	Xylose assimilation	Osmophile/Osmotolerant	Colony morphology Color/Edge/Surface/Side view
1	HB1	<i>flo</i>	นน	N	Y	White/Undulate/Rugose/Raised
	HB2			N	<i>nd</i>	White/Undulate/Rugose/Raised
	HB3			N	<i>nd</i>	White/Undulate/Rugose/Raised
	HB4			N	<i>nd</i>	White/Undulate/Rugose/Raised
	HB5			N	<i>nd</i>	White/Undulate/Rugose/Raised
2	HB6-1	<i>flo</i>	ลป	Y	Y	White/Undulate/Smooth/Flat
	HB6-2			Y	<i>nd</i>	White/Undulate/Smooth/Flat
	HB7-1			Y	Y	White/Undulate/Smooth/Flat
	HB7-2			Y	<i>nd</i>	White/Undulate/Smooth/Flat
	HB9			Y	<i>nd</i>	White/Undulate/Smooth/Flat
	HB10			N	Y	Cream/Undulate/Smooth/Flat
	HB12			Y	<i>nd</i>	White/Undulate/Smooth/Flat
3	HB15	<i>mel</i>	ลป	Y	Y	White/Undulate/Smooth/Flat
	HB17			Y	Y	White/Undulate/Smooth/Flat
	HB18			Y	Y	White/Undulate/Smooth/Flat
	HB19			Y	<i>nd</i>	White/Undulate/Smooth/Flat
	HB20			N	<i>nd</i>	White/Undulate/Smooth/Flat
	HB21			N	<i>nd</i>	White/Undulate/Smooth/Flat
4	HB22	<i>flo</i>	ลพ	N	Y	Cream/Undulate/Smooth/Flat
	HB24			N	<i>nd</i>	Cream/Undulate/Smooth/Flat
	HB25-1			N	<i>nd</i>	Cream/Undulate/Smooth/Flat
	HB25-2			Y	Y	White/Undulate/Smooth/Flat
	HB26			Y	<i>nd</i>	White/Undulate/Smooth/Flat

* *cer* = *A. cerana*, *dor* = *A. dorsata*, *flo* = *A. florea* และ *mel* = *A. mellifera*

** จบ = จันทบุรี, ชม = เชียงใหม่, นน = น่าน, ลป = ลำปาง, ลพ = ลำพูน และ สท = สุโขทัย

N = No, Y = Yes, *nd* = Not determine

ตารางที่ 5.4 (continued)

Hive no.	Isolate no.	Bee species*	Locality**	Xylose assimilation	Osmophile/Osmotolerant	Colony morphology Color/Edge/Surface/Side view
5	HB31-1	<i>flo</i>	สท	Y	<i>nd</i>	White/Undulate/Smooth/Flat
				Y	<i>nd</i>	White/Undulate/Smooth/Flat
	HB31-2			Y	N	Red/Entire/Smooth/Flat
				N	<i>nd</i>	Red/Entire/Smooth/Flat
	HB32			Y	Y	White/Undulate/Smooth/Flat
	HB33 HB43					
6	HB45	<i>cer</i>	ชม	Y	Y	White/Undulate/Smooth/Flat
	HB46			Y	<i>nd</i>	White/Undulate/Smooth/Flat
	HB48			N	Y	White/Undulate/Smooth/Flat
7	HB50	<i>cer</i>	ชม	Y	Y	White/Undulate/Smooth/Flat
	HB51			Y	<i>nd</i>	White/Undulate/Smooth/Flat
8	HB55	<i>mel</i>	จป	N	Y	White/Undulate/Smooth/Flat
	HB56			N	<i>nd</i>	White/Undulate/Smooth/Flat
	HB57-1			N	<i>nd</i>	White/Undulate/Smooth/Flat
				N	<i>nd</i>	White/Undulate/Smooth/Flat
	HB57-2			N	Y	White/Undulate/Smooth/Flat
				N	<i>nd</i>	White/Undulate/Smooth/Flat
	HB58			N	<i>nd</i>	White/Undulate/Smooth/Flat
	HB59			N	<i>nd</i>	White/Undulate/Smooth/Flat
	HB60-1					
	HB60-2					

* *cer* = *A. cerana*, *dor* = *A. dorsata*, *flo* = *A. florea* และ *mel* = *A. mellifera*

** จป = จันทบุรี, ชม = เชียงใหม่, นน = น่าน, ลป = ลำปาง, ลพ = ลำพูน และ สท = สุโขทัย

N = No, Y = Yes, *nd* = Not determine

ตารางที่ 5.4 (continued)

Hive no.	Isolate no.	Bee species*	Locality**	Xylose assimilation	Osmophile/Osmotolerant	Colony morphology Color/Edge/Surface/Side view
9	HB61	<i>mel</i>	จป	N	Y	White/Undulate/Punctate/Convex
	HB62			N	<i>nd</i>	White/Undulate/Punctate/Convex
	HB63			N	<i>nd</i>	White/Undulate/Punctate/Convex
	HB64			N	<i>nd</i>	White/Undulate/Punctate/Convex
	HB65			N	<i>nd</i>	White/Undulate/Punctate/Convex
	HB66			N	<i>nd</i>	White/Undulate/Punctate/Convex
10	HB67	<i>mel</i>	จป	N	Y	White/Undulate/Punctate/Convex
	HB68			N	<i>nd</i>	White/Undulate/Punctate/Convex
	HB69			N	Y	White/Undulate/Punctate/Convex
	HB70			N	<i>nd</i>	White/Undulate/Punctate/Convex
	HB71			N	<i>nd</i>	White/Undulate/Punctate/Convex
	HB72			N	<i>nd</i>	White/Undulate/Punctate/Convex
11	HB73	<i>mel</i>	จป	N	Y	White/Undulate/Punctate/Convex
12	HB74	<i>mel</i>	ชม	<i>nd</i>	<i>nd</i>	Cream/Undulate/Smooth/Raised
	HB75			<i>nd</i>	<i>nd</i>	White/Undulate/Smooth/Raised
	HB76			<i>nd</i>	<i>nd</i>	Cream/Undulate/Smooth/Raised
	HB77			<i>nd</i>	<i>nd</i>	Cream/Undulate/Smooth/Raised
13	HB78	<i>mel</i>	ชม	<i>nd</i>	<i>nd</i>	Cream/Undulate/Smooth/Flat

* *cer* = *A. cerana*, *dor* = *A. dorsata*, *flo* = *A. florea* และ *mel* = *A. mellifera*

** จป = จันทบุรี, ชม = เชียงใหม่, นน = น่าน, ลป = ลำปาง, ลพ = ลำพูน และ สท = สุโขทัย

N = No, Y = Yes, *nd* = Not determine

ตารางที่ 5.4 (continued)

Hive no.	Isolate no.	Bee species*	Locality**	Xylose assimilation	Osmophile/Osmotolerant	Colony morphology Color/Edge/Surface/Side view
14	HB79	cer	ชม	nd	nd	White/Lobate/Verruculose/Convex
	HB80			nd	nd	White/Lobate/Verruculose/Convex
	HB81			nd	nd	White/Lobate/Verruculose/Convex
	HB82			nd	nd	White/Lobate/Verruculose/Convex
	HB83			nd	nd	White/Lobate/Verruculose/Convex
	HB84			nd	nd	White/Lobate/Verruculose/Convex
	HB85			nd	nd	White/Lobate/Verruculose/Convex
	HB86			nd	nd	Pink/Erose/Rugose/Convex
	HB87			nd	nd	White/Lobate/Verruculose/Convex
	HB88			nd	nd	White/Lobate/Verruculose/Convex
	HB89			nd	nd	White/Lobate/Verruculose/Convex
	HB90			nd	nd	White/Lobate/Verruculose/Convex
	HB91			nd	nd	White/Lobate/Verruculose/Convex

* cer = *A. cerana*, dor = *A. dorsata*, flo = *A. florea* และ mel = *A. mellifera*

** จบ = จันทบุรี, ชม = เชียงใหม่, นน = น่าน, ลป = ลำปาง, ลพ = ลำพูน และ สท = สุโขทัย

N = No, Y = Yes, nd = Not determine

ตารางที่ 5.4 (continued)

Hive no.	Isolate no.	Bee species *	Locality **	Xylose assimilation	Osmophile/ Osmotolerant	Colony morphology Color/Edge/Surface/Side view
15	HB92	<i>cer</i>	ชม	<i>nd</i>	<i>nd</i>	White/Lobate/Verruculose/Convex
	HB93			<i>nd</i>	<i>nd</i>	White/Lobate/Verruculose/Convex
	HB94			<i>nd</i>	<i>nd</i>	White/Lobate/Verruculose/Convex
	HB95			<i>nd</i>	<i>nd</i>	Red/Undulate/Smooth/Flat
	HB96			<i>nd</i>	<i>nd</i>	Red/Undulate/Smooth/Flat
	HB97			<i>nd</i>	<i>nd</i>	White/Lobate/Verruculose/Convex
	HB98			<i>nd</i>	<i>nd</i>	Cream/Erose/Rugose/Convex
	HB99			<i>nd</i>	<i>nd</i>	Cream/Erose/Rugose/Convex
	HB100			<i>nd</i>	<i>nd</i>	White/Lobate/Verruculose/Convex
	HB101			<i>nd</i>	<i>nd</i>	Red/Undulate/Smooth/Flat
	HB102			<i>nd</i>	<i>nd</i>	White/Lobate/Verruculose/Convex
	HB103			<i>nd</i>	<i>nd</i>	White/Lobate/Verruculose/Convex
	HB104			<i>nd</i>	<i>nd</i>	Cream/Filamentous/Granulate/Convex
	HB105			<i>nd</i>	<i>nd</i>	White/Lobate/Verruculose/Convex
	HB106			<i>nd</i>	<i>nd</i>	White/Lobate/Verruculose/Convex
	HB107			<i>nd</i>	<i>nd</i>	White/Lobate/Verruculose/Convex
16	HB108	<i>dor</i>	ชม	<i>nd</i>	<i>nd</i>	Cream/Undulate/Smooth/Flat
	HB109			<i>nd</i>	<i>nd</i>	Cream/Entire/Smooth/Flat
	HB110			<i>nd</i>	<i>nd</i>	Brown/Filamentous/Smooth/Flat
	HB111			<i>nd</i>	<i>nd</i>	Cream/Undulate/Smooth/Flat
	HB112			<i>nd</i>	<i>nd</i>	Cream/Undulate/Smooth/Flat
	HB113			<i>nd</i>	<i>nd</i>	Cream/Undulate/Smooth/Flat
	HB137			<i>nd</i>	<i>nd</i>	-

* *cer* = *A. cerana*, *dor* = *A. dorsata*, *flo* = *A. florea* และ *mel* = *A. mellifera*

** จบ = จันทบุรี, ชม = เชียงใหม่, นน = น่าน, ลป = ลำปาง, ลพ = ลำพูน และ สท = สุโขทัย

N = No, Y = Yes, *nd* = Not determine

ตารางที่ 5.4 (continued)

Hive no.	Isolate no.	Bee species*	Locality**	Xylose assimilation	Osmophile/Osmotolerant	Colony morphology Color/Edge/Surface/Side view
17	HB114	<i>flo</i>	ชม	<i>nd</i>	<i>nd</i>	Cream/Undulate/Smooth/Flat
	HB115			<i>nd</i>	<i>nd</i>	Cream/Undulate/Smooth/Flat
	HB116			<i>nd</i>	<i>nd</i>	Cream/Undulate/Smooth/Flat
	HB117			<i>nd</i>	<i>nd</i>	Cream/Undulate/Smooth/Flat
	HB118			<i>nd</i>	<i>nd</i>	Cream/Undulate/Smooth/Flat
	HB119			<i>nd</i>	<i>nd</i>	White/Undulate/Rugose/Flat
	HB120			<i>nd</i>	<i>nd</i>	Cream/Undulate/Smooth/Flat
	HB121			<i>nd</i>	<i>nd</i>	Cream/Undulate/Smooth/Flat
18	HB122	<i>mel</i>	ชม	<i>nd</i>	<i>nd</i>	Brown/Undulate/Smooth/Flat
	HB123			<i>nd</i>	<i>nd</i>	Brown/Undulate/Smooth/Flat
	HB124			<i>nd</i>	<i>nd</i>	Brown/Undulate/Smooth/Flat
	HB125			<i>nd</i>	<i>nd</i>	Brown/Filamentous/Smooth/Flat
	HB126			<i>nd</i>	<i>nd</i>	White/Undulate/Smooth/Flat
	HB127			<i>nd</i>	<i>nd</i>	Cream/Undulate/Smooth/Flat
	HB128			<i>nd</i>	<i>nd</i>	Brown/Undulate/Smooth/Flat

* *cer* = *A. cerana*, *dor* = *A. dorsata*, *flo* = *A. florea* และ *mel* = *A. mellifera*

** จบ = จันทบุรี, ชม = เชียงใหม่, นน = น่าน, ลป = ลำปาง, ลพ = ลำพูน และ สท = สุโขทัย

N = No, Y = Yes, *nd* = Not determine

ตารางที่ 5.5 ผลการทดสอบ xylose assimilation ของยีสต์ที่แยกได้จากน้ำผึ้ง

ไอโซเลท	แหล่งของน้ำผึ้ง	OD ₆₀₀	CFU/ml
HB6-1	<i>Apis florea</i>	26.98±0.03	(3.80±0.39)×10 ⁸
HB6-2	<i>Apis florea</i>	21.32±0.06	(3.00±0.78)×10 ⁸
HB7-1	<i>Apis florea</i>	2.76±0.01	(1.30±0.23)×10 ⁸
HB7-2	<i>Apis florea</i>	3.44±0.01	(1.20±0.14)×10 ⁸
HB9	<i>Apis florea</i>	4.11±0.04	(1.42±0.13)×10 ⁸
HB12	<i>Apis florea</i>	21.92±0.17	(4.40±0.78)×10 ⁸
HB15	<i>Apis mellifera</i>	1.98±0	(2.68±0.83)×10 ⁷
HB17	<i>Apis mellifera</i>	16.76±0.28	(3.15±0.52)×10 ⁸
HB19	<i>Apis mellifera</i>	18.80±0.23	(3.23±0.66)×10 ⁸
HB25	<i>Apis florea</i>	10.61±0.07	(6.40±0.42)×10 ⁷
HB26	<i>Apis florea</i>	8.92±0.06	(6.58±1.63)×10 ⁷
HB31-1	<i>Apis florea</i>	9.19±0.10	(1.44±0.12)×10 ⁸
HB31-2	<i>Apis florea</i>	5.82±0	(1.59±0.11)×10 ⁸
HB32	<i>Apis florea</i>	4.91±0.01	(3.07±0.20)×10 ⁷
HB43	<i>Apis florea</i>	4.20±0.01	(3.90±1.27)×10 ⁷
HB45	<i>Apis cerana</i>	4.48±0.05	(9.90±0.71)×10 ⁷
HB46	<i>Apis cerana</i>	4.95±0.01	(8.25±0.66)×10 ⁷
HB50	<i>Apis cerana</i>	3.14±0.03	(1.34±0.28)×10 ⁸
HB51	<i>Apis cerana</i>	4.35±0.03	(1.18±0.07)×10 ⁸

ตารางที่ 5.6 ผลการทดสอบ xylose assimilation ของยีสต์ที่แยกได้จากน้ำผึ้งของชันโรง

ไอโซเลท	แหล่งของน้ำผึ้ง	OD ₆₀₀	CFU/ml
SB9	<i>Trigona pagdeni</i>	17.26±0.08	(8.83±0.75)×10 ⁸
SB11	<i>Trigona pagdeni</i>	16.42±0.20	(8.90±0.78)×10 ⁸
SB31	<i>Trigona pagdeni</i>	8.43±0.01	(9.93±0.73)×10 ⁸
SB40	<i>Trigona laeviceps</i>	4.54±0.01	(1.53±0.36)×10 ^{7*}
SB45	<i>Trigona terminata</i>	8.85±0.10	(1.46±0.05)×10 ⁹
SB60	<i>Trigona pagdeni</i>	15.66±0.03	(7.40±1.92)×10 ⁸
SB76	unknown	23.84±0.17	(1.53±0.30)×10 ⁹
SB77	unknown	14.44±0.06	(1.46±0.11)×10 ⁹
SB78	unknown	19.18±0.03	(1.95±0.11)×10 ⁹
SB91	<i>Trigona fimbriata</i>	11.01±0.07	(2.45±0.47)×10 ⁷
SB92	<i>Trigona fimbriata</i>	9.45±0.04	(2.45±0.83)×10 ⁷
SB97	<i>Trigona fimbriata</i>	10.12±0.08	(3.21±0.90)×10 ⁹
SB99-1	<i>Trigona laeviceps</i>	2.00±0	na ^{**}
SB99-2	<i>Trigona laeviceps</i>	2.33±0.03	na ^{**}
SB100	<i>Trigona laeviceps</i>	2.13±0.01	na ^{**}
SB101	<i>Trigona laeviceps</i>	2.42±0.02	na ^{**}
SB103	<i>Trigona laeviceps</i>	2.29±0	na ^{**}
SB113	<i>Trigona fuscobalteata</i>	11.89±0.24	(4.70±0.48)×10 ⁷
SB115	<i>Trigona fuscobalteata</i>	10.01±0.04	(5.78±0.57)×10 ⁷
SB125	<i>Trigona fuscobalteata</i>	9.37±0.01	(2.38±0.33)×10 ⁸
SB146	<i>Trigona pagdeni</i>	6.01±0.01	(1.03±0.11)×10 ⁸

จากการนำยีสต์ 153 ไอโซเลทไปทดสอบ xylose assimilation ในอาหารเหลวและบนอาหารแข็งที่มี xylose เป็นแหล่งคาร์บอนเพียงชนิดเดียวพบว่า มียีสต์ 40 ไอโซเลท (จากผึ้ง 19 ไอโซเลทและชันโรง 21 ไอโซเลท) สามารถใช้ xylose ได้ โดยไอโซเลท SB99-1, SB99-2, SB100, SB101 และ SB103 มีปัญหาเรื่อง cell clump จึงทำให้ไม่สามารถวัดการเจริญบนอาหารแข็งได้

ตารางที่ 5.7 การกระจายตัวของยีสต์ในน้ำผึ้งของชันโรงและผึ้ง

Locality *	ชม	ชม	ชม	ชม	ชม	จท, ชม	ชม	ชม	ชม, ลพ	ชม	ชม, นน, ลป, ลพ	จป, ชม, ลป
Yeast species (no. of isolates)	Stingless bee species								Honeybee species			
	<i>T. collina</i>	<i>T. doipaensis</i>	<i>T. fimbriata</i>	<i>T. fuscobalteata</i>	<i>T. laeviceps</i>	<i>T. pagdeni</i>	<i>T. terminata</i>	Unidentified <i>Trigona</i>	<i>A. cerana</i>	<i>A. dorsata</i>	<i>A. florea</i>	<i>A. mellifera</i>
<i>A. pullulans</i> (1)						1						
<i>C. apicola</i> (2)		1									1	
<i>C. apis</i> (1)											1	
<i>C. etchellsii</i> (2)				1					1			
<i>C. metapsilosis</i> (9)						8					1	
<i>C. parapsilosis</i> (4)						3						1
<i>C. sorbosivorans</i> (3)												3
<i>Candida</i> sp. (1)					1							
<i>D. hansenii</i> (2)			2									
<i>K. ohmeri</i> (1)											1	
<i>P. guilliermondii</i> (14)				2		4	1	1	2		3	1
<i>R. nymphaeae</i> (1)											1	
<i>S. japonicus</i> (1)			1									
<i>S. meliponinorum</i> (3)					3							
<i>Z. mellis</i> (5)						1						4
In progress (32)	1		1		2	2		2	7	5	5	7
No. of sample (each bee species)	1	1	4	3	6	19	1	3	10	5	13	16

* จป = จันทบุรี, ชม = เชียงใหม่, นน = น่าน, ลป = ลำปาง, ลพ = ลำพูน และ สท = สุโขทัย

วิจารณ์และสรุปผลการทดลอง

P. guilliermondii เป็นยีสต์ที่พบได้บ่อยในน้ำผึ้งของชันโรงและผึ้ง (ตารางที่ 5.7) สอดคล้องกับรายงานของ Spencer และ Spencer (1997) ที่กล่าวว่า สามารถพบ *P. guilliermondii* ได้ทั่วไปทุกหนแห่ง จึงดูเหมือนว่ายีสต์ชนิดนี้ไม่มีความจำเพาะต่อแมลงเจ้าบ้าน (Zacchi และ Vaughan-Martini, 2002) ยีสต์ที่พบรองลงมาคือ *C. metapsilosis*, *Z. mellis* และ *C. parapsilosis* ตามลำดับ โดย *C. parapsilosis* และ *C. metapsilosis* (ซึ่งเป็นสายพันธุ์ที่มีความสัมพันธ์กัน) เป็นยีสต์ที่แยกได้บ่อยจากผิวหนังและเล็บของมนุษย์ ตลอดจนแมลงต่างๆ เช่น ผึ้ง และแมลงปีกแข็ง (Gilliam, 1997; Kurtzman และ Fell, 1998; Suh *et al.*, 2008) สำหรับ *Z. mellis* ซึ่งเป็นยีสต์ที่ทนแรงดันออสโมติกได้สูง มักเป็นสาเหตุให้เกิดการเน่าเสียของน้ำผึ้ง (Rosa และคณะ, 2003)

ยีสต์ที่แยกได้จากน้ำผึ้ง 26.1% สามารถใช้ xylose เป็นแหล่งคาร์บอนได้ ผลการทดสอบดังกล่าวมีค่าสูงกว่าของ Guo และคณะ (2006) ซึ่งรายงานไว้ว่า ยีสต์ 45 ไอโซเลทจาก 274 ไอโซเลท (16.4%) สามารถใช้ xylose เป็นแหล่งคาร์บอนได้

ยีสต์หลายชนิด เช่น *A. pullulans*, *C. apis*, *D. hansenii*, *K. ohmeri*, *R. nymphaeae* และ *S. japonicus* เป็นยีสต์ที่พบได้ไม่บ่อยในน้ำผึ้งของชันโรงและผึ้ง โดยสีโคโลนีของ *A. pullulans* และ *D. hansenii* จะเปลี่ยนเป็นสีดำและสีน้ำตาล ตามลำดับ เมื่อมีการสร้างสปอร์ แต่ในการทดลองนี้ไม่พบการเปลี่ยนสีโคโลนีของ *A. pullulans* เนื่องจากอาหารที่ใช้ทดสอบ (YM agar) อาจมีความสมบูรณ์มากเกินไป จึงไม่ชักนำให้เกิดการสร้างสปอร์ของยีสต์ดังกล่าว สำหรับ *R. nymphaeae* เป็นยีสต์ที่มีสีแดง ส่วน *S. japonicus* เป็น fission yeast (Kurtzman และ Fell, 1998)

บทที่ 6

Output จากโครงการวิจัยที่ได้รับทุนจาก สกอ. และ สกว.

1. ผลงานที่ตีพิมพ์ในวารสารวิชาการระดับนานาชาติ

- 1.1 Ward, L., Waite, R. Boonham, N., Fisher, T., Pescod, K., Thompson H., **Chantawannakul, P** and Brown, M. 2007. First detection of Kashmir bee virus using real-time PCR. *Apidologie* 38: 181-190. Impact factor 1.906
- 1.2 Cutler, R. and **Chantawannakul, P.** 2007 The effect of local nucleotide correlations on synonymous codon usage in the honeybee (*Apis mellifera* L.) genome. *Journal of Molecular Evolution* 64:637-645. Impact factor 3.234
- 1.3 Theantana, T. and **Chantawannakul, P.** (2008): Protease and β -N-acetylglucosaminidase of honey bee Chalkbrood pathogen *Ascosphaera apis*: *Journal of Apicultural Research*. 47 (1): 68-72. Impact factor : 0.745
- 1.4 **Chantawannakul, P.** and Cutler, R (2008): Convergent host-parasite codon usage between honey bee and bee associated viral genomes. *Journal of Invertebrate Pathology*. 98: 206-210. Impact factor: 2.005
- 1.5 Sanpa, S. and **Chantawannakul, P** (2008) Survey of six bee viruses by using RT-PCR in Northern Thailand, submitted to *Journal of Invertebrate Pathology*, 100 (2) 116-119. Impact factor: 2.005
- 1.6 Promnuan, Y, Kudo, T., and **Chantawannakul P.** (2009) Actinomycetes isolated from beehives in Thailand. *World Journal of Microbiology Biotechnology*. DOI 10.1007/s11274-009-0051-1 Online first. Impact factor 0.745

In preparation

1. *Assessing the efficacy of control measures for European foulbrood (Melissococcus plutonius) of the European honey bee (Apis mellifera)* submitted to *Environmental Microbiology*
2. Diversity of bacteria associated with midgut of Thai native bees (in preparation)
3. Yeast communities associated with the stingless bees *Trigona* spp. (in preparation)

2 กิจกรรมที่เกี่ยวข้องกับการนำผลจากโครงการไปใช้ประโยชน์

2.1 เชิงนโยบาย

- เป็นผู้ร่างและผู้ทรงคุณวุฒิยกร่างมาตรฐานการชันสูตรโรคผึ้ง มกอช. ฉบับภาษาไทย
- เป็นผู้ร่างมาตรฐานการชันสูตรโรคผึ้ง มกอช. ฉบับภาษาอังกฤษ

Diagnosis of European foulbrood in Bee. Thai Agricultural Commodity and Food Standard. 15 pp. TACFS 10350-2007

Diagnosis of American foulbrood in Bee. Thai Agricultural Commodity and Food Standard. 16 pp. TACFS 10351-2007

2.2 เชิงวิชาการ

- ร่วมเขียนหนังสือเกี่ยวกับผึ้ง เพื่อจำหน่ายที่ศูนย์หนังสือจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย (ตามเอกสารแนบ)

Chantawannakul, P. (2008): Bee diseases. Chulalongkorn publishing house: Bangkok, Thailand (In thai, *In press*) (ISBN in process)

- บรรยายเรื่องโรคผึ้ง ณ Honey bee research center, Tamagawa University, Tokyo, Japan

- วิทยากรในงานประชุมผึ้ง มหาวิทยาลัยมหาสารคาม

2.3 เชิงสาธารณะ

- ร่วมทำรายการเรื่อง โลกผึ้ง ตอน1 และ ตอน2 ในรายการความรู้คือประทับใจ ออกอากาศวันที่ 17 กุมภาพันธ์ 2551 และ 24 ก.ค. 2551 ทาง สทท 11 (ตั้ง CD เทปบันทึกโทรทัศน์)

3. กิจกรรมอื่นๆที่เกี่ยวข้อง ได้แก่

3.1 ผลงานเสนอในงานประชุมระดับนานาชาติ

3.1.1 Promnuan Y, Pathomaree W, and **Chantawannakul P.** 2007. Diversity of Actinomycetes Associated with Honey Bee (*Apis mellifera*) Hives in Northern Thailand. APIMONDIA, Melbourne, Australia (9-14 September, 2007)

3.1.2 **Chantawannakul P** and Wanjai, C. 2007 Antimicrobial Activity of Honey and Microflora in Bee Brood of Stingless Bee (*Trigona laeviceps*) APIMONDIA, Melbourne, Australia (9-14 September, 2007)

3.1.3 Sanpa S., Trakoolpua Y., and **Chantawannakul P.** 2007 Survey of Bee Viruses in Honey bee (*Apis mellifera*) in Upper Northern Thailand APIMONDIA, Melbourne, Australia (9-14 September, 2007)

3.1.4 Cutler R.W. and **Chantawannakul P.** 2007 Bee bioinformatics. APIMONDIA, Melbourne, Australia (9-14 September, 2007)

3.1.5 **Chantawannakul, P.** and Cutler, R. (2007): Bee bioinformatics. 40th Apimondia International Apicultural Congress. Melbourne, Australia (September, 9th -14th, 2007), page 104

3.1.6 **Chantawannakul, P.** and Promnuan Y. (2007) Diversity of actinomycetes associated with honey bees in Northern Thailand. 40th Apimondia International Apicultural Congress. Melbourne, Australia (September, 9th -14th, 2007), page 104

3.1.7 **Chantawannakul, P.** and Sanpa, S. (2007): Survey of bee viruses in honey bee in Upper Northern Thailand. 40th Apimondia International Apicultural Congress. Melbourne, Australia (September, 9th -14th, 2007), page 105

3.1.8 **Chantawannakul, P.** and Wanjai, C (2007): Antimicrobial activity of honey and microflora in bee brood of stingless bee (*Trigona laviceps*). 40th Apimondia International Apicultural Congress. Melbourne, Australia (September, 9th -14th, 2007), page 106

3.1.9 Saksinchai, S., **Chantawannakul, P.**, Wangspa, R., and Lumyong, S (2007) Screening and production of xylitol by yeasts isolated from honey. Educational Research Exchange Joint Symposium, Chiang Mai University, Thailand (December 13-14, 2007), page 66.

3.1.10 Promnuan, Y., Kudo, T., and **Chantawannakul, P.** (2008) Diversity of actinomycetes associated with honey bees (*Apis mellifera*) in Northern Thailand. AAA the 9th Asian Apiculture Conference and Exhibition Association (AAA), Hangzhou, China, 1-4th November, 2008

3.1.11 **Chantawannakul, P.** (2008) Honey bee and microbes in Thailand the 9th Asian Apiculture Conference and Exhibition Association (AAA), Hangzhou, China, 1-4th November, 2008

3.1.12 Saksinchai, S., Wongputtisin, P., **Chantawannakul, P.**, and Lumyoung, S. (2008) the 9th Asian Apiculture Conference and Exhibition Association (AAA), Hangzhou, China, 1-4th November, 2008

3.1.13 **Chantawannakul, P.** (2008) Bee viruses in Thailand and their genome analyses. OIE conference, Freiburg, Germany 26-28th August, 2008

3.2 ได้รับเชิญเป็น Chairman

- Session Bee pests and Diseases ในงาน the 9th Asian Apiculture Conference and Exhibition Association (AAA), Hangzhou, China, 1-4th November, 2008

4. ความเชื่อมโยงวิชาการกับนักวิชาการอื่นๆ ทั้งในและต่างประเทศ

- 4.1 ร่วมมือกับนักวิจัยในประเทศคือหน่วยวิจัยผึ้ง จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
- 4.2 ได้สร้างความร่วมมือทางวิชาการกับ National Bee Unit, Central Science Laboratory, UK และ Bard College, New York, USA ในงานวิจัยเกี่ยวกับผึ้งและจุลินทรีย์ในผึ้ง
- 4.3 ได้ดำเนินการติดต่อ Culture Collection, Sataima, Japan เพื่อเทียบเชื้อใน culture collection, Raiken และติดต่อ Chinese Academy of Science Institute, Hainan, China เพื่อแยกเชื้อจุลินทรีย์ประจำถิ่นในผึ้งจีนเพื่อเป็นการเปรียบเทียบเชื้อ
- 4.4 National Bee Unit, Central Science Laboratory, UK
- 4.5 Bard College, New York, USA
- 4.6 Japan Collection of Microorganisms, RIKEN, Tokyo, Japan
- 4.7 University of York, UK
- 4.8 Department of Entomology, Cornell University, USA
- 4.9 USDA, USA
- 4.10 ร่วมกับหน่วยวิจัยผึ้ง จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัยในการจัดทำหนังสือเรื่อง ผึ้ง

ข้อเสนอแนะสำหรับงานวิจัยในอนาคต

จากการศึกษาจุลินทรีย์ที่มีความสัมพันธ์กับผึ้ง เป็นเชื้อจุลินทรีย์ที่สามารถเพาะเลี้ยงได้ในห้องปฏิบัติการ ดังนั้นจึงมีความสนใจที่จะศึกษาเชื้อจุลินทรีย์ที่ไม่สามารถเพาะเลี้ยงได้ โดยสามารถศึกษาความหลากหลายทางชีวภาพของจุลินทรีย์ได้จากสารพันธุกรรม และนำมาเปรียบเทียบกับเชื้อที่เพาะได้จากการวิจัยนี้

ภาคผนวก ก

การคำนวณหาปริมาณแบคทีเรีย

$$1 \text{ Isolation prevalence (\%)} = \frac{\text{Total number of sampling yielding at least 1 isolate} \times 100}{\text{Total number of samples in that trial}}$$

$$2. \text{ Intensity} = \frac{\text{Total number of samples yielding isolates in a given trial}}{\text{Total number of samples in that trial}}$$

ภาคผนวก ข
อาหารเลี้ยงเชื้อที่ใช้สำหรับแยกและเพาะเลี้ยงเชื้อ

1. Arginine broth

Tryptone	5	กรัม
K ₂ HPO ₄	2	กรัม
Yeast extract	5	กรัม
L-arginine monohydrochloride	3	กรัม
Glucose	0.5	กรัม
น้ำกลั่น	1000	มิลลิลิตร

ผสมทั้งหมดให้เข้ากันแล้วปรับ pH ให้เป็น 6.8-7.0 ขำเชื้อที่อุณหภูมิ 121 °C ความดัน 15 ปอนด์/ตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที

2. Carbohydrate medium for fermentation

Beef extract	3	กรัม
Peptone	5	กรัม
น้ำตาล	10	กรัม
Bromthymol blue 1.6%	4	มิลลิลิตร
น้ำกลั่น	1000	มิลลิลิตร

การเตรียมน้ำตาลแต่ละชนิด ควรเตรียมหลอดทดสอบที่ใส่หลอดดัดแก้วไว้แล้วนำไปอบที่ 181 °C 2 ชั่วโมง จากนั้นจึงเตรียมสารละลายที่มีน้ำตาลเป็นส่วนผสมใส่หลอดประมาณ 6 มิลลิลิตร แล้วนึ่งฆ่าเชื้อที่ความดันไอละเพียง 10 ปอนด์ เป็นเวลา 10 นาที รีบยกออกมาแช่ในน้ำเย็น ทั้งนี้เพื่อป้องกันน้ำตาลแตกตัว เพราะจะเสียคุณสมบัติของน้ำตาลแต่ละชนิด

3. Christensen's urea medium

Peptone	1	กรัม
Glucose	1	กรัม
KH ₂ PO ₄	2	กรัม
NaCl	5	กรัม
Distilled water	1,000	มิลลิลิตร

ต้มส่วนผสมทั้งหมดจนละลายปรับ pH ให้เป็น 6.8 – 6.9 เติมน้ำ phenolred 0.04% ปริมาณ 20 มิลลิลิตร นำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 °C ความดัน 15 ปอนด์/ตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที ทิ้งให้ อุณหภูมิลดลงเหลือประมาณ 52 °C แล้วเติมสารละลายยูเรียที่มีความเข้มข้น 20% ลงไป

ปริมาณ 10 มิลลิลิตร ซึ่งทำให้ปราศจากเชื้อโดยการกรองเขย่าให้เข้ากันแล้วใช้ปิเปตต์ที่ฆ่าเชื้อแล้ว
ดูอาหารดังกล่าวใส่หลอดทดลองที่ปราศจากเชื้อและนำไปวางเอียงทำเป็น slant

4. Gelatin Liquefaction medium

Beef extract	3	กรัม
Peptone	5	กรัม
Gelatin	120	กรัม
น้ำกลั่น	1000	มิลลิลิตร

ละลายส่วนผสมทั้งหมดให้เข้ากัน ถ่ายใส่หลอดทดลอง หลอดละ 10 ml นำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่
อุณหภูมิ 121 °C ความดัน 15 ปอนด์/ตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที

5. Gluconobacter broth

Glucose	100	กรัม
Yeast extract	10	กรัม
CaCO ₃	20	กรัม
น้ำกลั่น	1,000	มิลลิลิตร

แบ่งสารละลายออกเป็น 2 ส่วน ละลายส่วนผสมทั้งหมดให้เข้ากัน ฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121°C
ความดัน 15 ปอนด์/ตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที และแยกฆ่าเชื้อสารละลาย glucose ที่อุณหภูมิ
110°C ความดัน 15 ปอนด์/ตารางนิ้ว เป็นเวลา 10 นาที แล้วนำสารละลายมาผสมให้เข้ากัน

6. Gluconobacter agar

Glucose	100	กรัม
Yeast extract	10	กรัม
CaCO ₃	20	กรัม
Agar	15	กรัม
น้ำกลั่น	1,000	มิลลิลิตร

แบ่งสารละลายออกเป็น 2 ส่วน ละลายส่วนผสมทั้งหมดให้เข้ากัน ฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121°C
ความดัน 15 ปอนด์/ตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที และแยกฆ่าเชื้อสารละลาย glucose ที่อุณหภูมิ
110°C ความดัน 10 ปอนด์/ตารางนิ้ว เป็นเวลา 10 นาที แล้วนำสารละลายมาผสมให้เข้ากัน

7. Motility test medium

Beef extract	3	กรัม
Peptone	10	กรัม
Sodium chloride	5	กรัม

Agar	4	กรัม
น้ำกลั่น	1,000	มิลลิลิตร

ละลายส่วนผสมทั้งหมดให้เข้ากันจากนั้นถ่ายใส่หลอดทดลอง ปรับ pH เป็น 7.4 ± 0.2 ฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 °C ความดัน 15 ปอนด์/ตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที

8. Nitrate reduction test medium

Potassium nitrate	1	กรัม
Beef extract	10	กรัม
Peptone	10	กรัม
น้ำกลั่น	1,000	มิลลิลิตร

ละลายส่วนผสมทั้งหมดให้เข้ากันจากนั้นถ่ายใส่หลอดทดลอง ปรับ pH เป็น 7.0-7.2 ฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 °C ความดัน 15 ปอนด์/ตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที

9. Nutrient broth

Beef extract	3	กรัม
Peptone	5	กรัม
น้ำกลั่น	1,000	มิลลิลิตร

ละลายส่วนผสมทั้งหมดให้เข้ากัน ปรับ pH เป็น 7.4 ± 0.2 ฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 °C ความดัน 15 ปอนด์/ตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที

10. Nutrient agar

Beef extract	3	กรัม
Peptone	5	กรัม
Agar	15	กรัม
น้ำกลั่น	1,000	มิลลิลิตร

ละลายส่วนผสมทั้งหมดให้เข้ากัน ปรับ pH เป็น 7.4 ± 0.2 ฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 °C ความดัน 15 ปอนด์/ตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที

11. Saboroud dextrose (SBD) agar

Saboroud dextrose	30	กรัม
Yeast extract	2	กรัม
Agar	20	กรัม
น้ำกลั่น	1,000	มิลลิลิตร

ละลายส่วนผสมทั้งหมดให้เข้ากัน ฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 °C ความดัน 15 ปอนด์/ตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที

12. SYPG

Soluble starch	10	กรัม
Yeast extract	10	กรัม
Cysteine	1	กรัม
KH ₂ PO ₄	20	กรัม
น้ำกลั่น	1,000	มิลลิลิตร

ละลายส่วนผสมทั้งหมดให้เข้ากัน ปรับ pH เป็น 6.6 ± 0.2 ฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 °C ความดัน 15 ปอนด์/ตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที เติม glucose 20 ml ที่ความเข้มข้น 50%

13. Tris – HCL YPG

Tris	2.42	กรัม
Yeast extract	10	กรัม
Sodium pyruvate	1	กรัม
Glucose	4	กรัม
Agar	20	กรัม
น้ำกลั่น	1,000	มิลลิลิตร

ละลายส่วนผสมทั้งหมดให้เข้ากัน ปรับ pH เป็น 7 ± 0.2 ฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 °C ความดัน 15 ปอนด์/ตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที

11. Tryptone Broth

Tryptose	10	กรัม
น้ำกลั่น	1,000	มิลลิลิตร

ละลายส่วนผสมทั้งหมดให้เข้ากัน ปรับ pH เป็น 7.4 ± 0.2 ฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 °C ความดัน 15 ปอนด์/ตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที

12. Phosphate – Buffer Saline (PBS)

Na ₂ HPO ₄	81	mM
NaH ₂ PO ₄	19	mM
NaCl	150	mM
pH 7.4		

ละลายส่วนผสมทั้งหมดใน Ethanol (70%) ให้เข้ากันแล้วฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 °C ความดัน 15 ปอนด์/ตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที

ภาคผนวก ค
สารเคมีที่ใช้ทดสอบ

1. ชุดย้อมสีแกรม

1.1 Crystal violet stain

Crystal violet	5	กรัม
น้ำกลั่น	100	มิลลิลิตร

1.2 Iodine solution

Iodine	1	กรัม
Potassium iodide	2	กรัม
น้ำกลั่น	300	มิลลิลิตร

1.3 Decolorizer

95% ethanol	250	มิลลิลิตร
Acetone	250	มิลลิลิตร

1.4 Safranin O solution

Safranin O	2.5	กรัม
95% ethanol	100	มิลลิลิตร

2. Bromthymol blue solution 1.6%

Bromthymol blue	1.6	กรัม
Ethyl alcohol	100	มิลลิลิตร

3. 3% Hydrogen peroxide solution

H ₂ O ₂	3	กรัม
น้ำกลั่น	100	มิลลิลิตร

4. Kovac's solution

Para – dimethyl – amino benzaldehyde	5	กรัม
Amylo or butyl alcohol	75	มิลลิลิตร
HCl, concentrate	25	มิลลิลิตร

ผสม para – dimethyl – amino benzaldehyde กับ alcohol ใน water bath อุณหภูมิ 30 – 60°C นาน 5 นาที ขณะที่ปล่อยให้อุณหภูมิลดลงให้ริน HCl ลงไปในสารละลาย แล้วเขย่าให้เข้ากัน ใส่ในขวดสีชาเก็บไว้ในตู้เย็น

5. Methyl red solution

Methyl red	0.8	กรัม
Ethanol 95%	300	มิลลิลิตร
น้ำกลั่น	200	มิลลิลิตร

ละลาย methyl red ใน 95% ethanol แล้วจึงเติมน้ำกลั่น

6. Nessler' s reagent

Potassium iodide	70	กรัม
Mercuric iodide	100	กรัม
Potassium hydroxide	100	กรัม
น้ำกลั่น	1000	มิลลิลิตร

ละลาย Potassium iodide และ Mercuric iodide ในน้ำกลั่น 400 ml ละลาย Potassium hydroxide ในน้ำกลั่น 500 ml และทำให้เย็น ผสมสารละลายทั้ง 2 ชนิด เข้าด้วยกัน แล้วเติมให้ครบ 1 L จากนั้นปล่อยให้ตกตะกอน หลังจากตกตะกอนแล้วให้เทน้ำใสๆ ข้างบนลงในขวดเก็บ reagent

7. Sulfalinic acid solution

Sulfalinic acid	8	กรัม
5 N acetic acid	1	ลิตร

ละลาย Sulfalinic acid ใน 5 N acetic acid โดยใช้ความร้อนช่วย

8. α -naphthylamine solution

α -naphthylamine	5	กรัม
5 N acetic acid	1	ลิตร

ละลาย α -naphthylamine ใน 5 N acetic acid

9. Tetramethyl –p- phenylenediamine dihydrochloride solution, 1%

Tetramethyl –p- phenylenediamine dihydrochloride	10	กรัม
น้ำกลั่น	100	มิลลิลิตร

10. Voges – Proskauer test solution

Solution A :

Alpha naphthol	10	กรัม
Ethanol 95%	100	มิลลิลิตร

ละลาย alpha naphthol ใน 95% ethanol เก็บในขวดสีชา

Solution B :

KOH

20 กรัม

น้ำกลั่น

100 มิลลิลิตร

ละลาย KOH ในน้ำกลั่น เก็บใส่ขวดสีชา

เอกสารอ้างอิง

- ทิพย์วดี อรรถธรรม. 2526. เชื้อไวรัสสายพันธุ์ใหม่ของโรคออกถุงในผึ้งโพรง. บทคัดย่อการประชุมทางวิชาการสาขาพืช ครั้งที่ 21 มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์. 22.
- นงลักษณ์ สุวรรณพินิจ และ ปรีชา สุวรรณพินิจ. 2548. จุลชีววิทยาทั่วไป. สำนักพิมพ์แห่งจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย. กรุงเทพมหานคร.
- สิริวัฒน์ วงษ์ศิริ. 2529. ชีววิทยาของผึ้ง. แสงศิลป์การพิมพ์. กรุงเทพมหานคร.
- Alippi, A. M. and Reynaldi, F.J. 2006. Inhibition of the growth of *Paenibacillus larvae*. Journal of Invertebrate Pathology. 91: 141-146.
- Allen, M. F. and Ball, B. V. 1995. Characterization and serological relationships of strains of Kashmir bee virus. Annals of Applied Biology. 126: 471-484.
- Allen, M. F. and Ball, B. V. 1996. The incidence and world distribution of honey bee viruses. Bee World. 77: 141-162.
- Alonso, J. M., Rey, J., Puerta, F., Hermoso de Mendoza, J., Hermoso de Mendoza, M. and Flores, J. M. 1993. Enzymatic equipment of *Ascosphaera apis* and the development of infection by this fungus in *Apis mellifera*. Apidologie. 24: 383-390.
- Anderson, D. L. 1993. Pathogens and queen bees. Australasian Beekeeper. 94: 292-296.
- Anderson, D. L., Gibbs, A. J. and Gibson, N. L. 1998. Identification and phylogeny of spore-cyst fungi (*Ascosphaera* spp.) using ribosomal DNA sequences. Mycological Research. 102: 541-547.
- Antúnez, K., Alessandro, B. D., Corbella, E. and Zunino, P. 2005. Detection of chronic bee paralysis virus and acute bee paralysis virus in Uruguayan honey bees. Journal of Invertebrate Pathology. 90: 69-72.
- Areekul, S., Rojanavongse, V., Anlamogn, A. and Intorn, C. 1980. Research on Apiculture and Insect Pollinations in the Highland of Northern Thailand. Kasetsart University. Bangkok.
- Bailey, L. 1976. Viruses attacking the honey bee. Advances in Virus Research. 20: 271-304.
- Bailey, L. and Ball, B. V. 1991. Honey bee pathology. Academic Press. London.
- Bailey, L., Gibbs, A. J. and Woods, R. D. 1963. Two viruses from adult honeybees (*Apis mellifera* Linnaeus). Virology. 21: 390-395.
- Bailey, L. and Woods, R. D. 1974. Three previously undescribed viruses from the honey bees. Journal of General Virology. 2: 175-186.
- Bailey, L. and Woods, R. D. 1977. Two more small RNA viruses from honey bees and

- further observations on sacbrood and acute bee paralysis viruses. *Journal of General Virology*. 37: 175-182.
- Ball, B. V. 1985. Acute paralysis virus isolates from honeybee colonies infested with *Varroa jacobsoni*. *Journal of Apicultural Research*. 24: 115–119.
- Bamford, S. and Heath, L. A. F. 1989. The infection of *Apis mellifera* by *Ascosphaera apis*. *Journal of Apicultural Research*. 28: 30-35.
- Benjeddou, M., Leat, N., Allsopp, M. and Davison, S. 2001. Detection of acute bee paralysis virus and black queen cell virus from honeybees by reverse transcriptase PCR. *Applied and Environmental Microbiology*. 67: 2384–2387.
- Berényi, O., Bakonyi, T., Derakhshifar, I., Köglberger, H. and Nowotny, N. 2006. Occurrence of six honeybee viruses in diseased Austrian apiaries. *Applied and Environmental Microbiology*. 72: 2414-2420.
- Bidochka, M. J. and Khachatourians, G. G. 1987. Purification and properties of and extracellular protease produced by entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana*. *Applied and Environmental Microbiology*. 53 (7): 1679-1684.
- Bignell, D. E. and Heath, L. A. F. 1985. Electropositive redox state of the fifth instar larval gut of *Apis mellifera*. *Journal of Apicultural Research*. 24: 211-213.
- BioMerieux. 2004. APIZYM system for the research of enzyme activity. France. 2-3 pp.
- Bissett, J. 1988. Contribution towards a monograph of the genus *Ascosphaera*. *Canadian Journal of Botany*. 66: 2541-2560.
- Bissett, J., Duke, G. and Goettel, M. 1996. *Ascosphaera acerosa* sp. nov. isolate from the alfalfa leaf cutting bee, with a key to the species of *Ascosphaera*. *Mycologia*. 88: 797-803.
- Bogo, M. R., Rota, C. A., Pinto, H. Jr., Ocampus, M., Correa, C. T., Vianstein, M. H. and Schrank, A. 1998. A chitinase encoding gene (*chitl gene*) from the entomopathogen *Metarhizium anisopliae*: isolation and characterization of genomic and full length cDNA. *Current Microbiology*. 37(4): 221-225.
- Boucias, D. G. and Pendland, J. C. 1998. *Principles of Insect Pathology*. Kluwer Academic Publishers. United states of America. 259-359 pp.
- Bowen-Walker, P. L., Martin, S. J. and Gunn, A. 1999. The transmission of deformed wing virus between honeybees (*Apis mellifera* L.) by the ectoparasitic mite *Varroa jacobsoni* Oud. . *Journal of Invertebrate Pathology*. 73: 101–106.
- Broderick, N. A., Goodman, R. M., Handelsman J. and Raffa, K. F. 2003. Effect of Host

- Diet and Insect Source on Synergy of Gypsy Moth (Lepidoptera: Lymantriidae) Mortality to *Bacillus thuringiensis* subsp. *kurstaki* by Zwittermicin A. Environ. Entomol. 32(2): 387 - 391
- Buchanan, R. E., Gibbons, N. E., Cowan, S. T., Holt, J. G., Liston, J., Murray, R. G. E., Ravin, A. W. and Stanier R. Y. 1974. Bergey's, Manual of determinative Bacteriology. 9th ed. Baltimore. The Williams and Wilkins Co.
- Cafaro, M. and Currie, C. 2005. Phylogenetic analysis of mutualistic filamentous bacteria associated with fungus-growing ants. Canadian Journal of Microbiology. 51: 441-446.
- Cano, R. J. and Borucki, M. K. 1995. Revival and identification of bacterial spores in 25- to 40-million-year-old Dominican amber. Journal of Science. 268: 1060-1064.
- Chantawannakul, P. 1999. The protease of American foulbrood. Ph.D. Thesis. School of Biosciences. Cardiff University. United Kingdom.
- Chantawannakul, P., Chaiham, M., Nanndakwang, P. and Wongsiri, S. 2003. Microbial diseases of honey bee in Thailand. August 24-29, XXXVIIIth Apimondia. Ljubljana. Slovenia.
- Chantawannakul, P. and Dancer, B. N. 2001. American foulbrood in honey bees. Bee World. 82 (4): 168-180.
- Chantawannakul, P., Ward, L., Boonham, N. and Brown, M. 2006. A scientific note on the detection of honeybee viruses using real-time PCR (TaqMan) in varroa mites collected from a Thai honeybee (*Apis mellifera*) apiary. Journal of Invertebrate Pathology. 91: 69-73.
- Chen, Y. P., Evans, J. D. and Feldlaufer, M. F. 2006a. Horizontal and vertical transmission of viruses in the honey bee, *Apis mellifera*. Journal of Invertebrate Pathology. 92: 152-159.
- Chen, Y. P., Higgins, J. A. and Feldlaufer, M. F. 2005. Quantitative real-time reverse transcription-PCR analysis of Deformed wing virus infection in the honeybee (*Apis mellifera* L.). Applied and Environmental Microbiology. 71: 436-441.
- Chen, Y. P., Pettis, J. S., Collins, A. and Feldlaufer, M. F. 2006. Prevalence and transmission routes of honey bee viruses. Applied and Environmental Microbiology. 72: 606-611.
- Chen, Y. P., Pettis, J. S., Evans, J. D., Kramer M. and Feldlaufer, M. F. 2004. Transmission of Kashmir bee virus by the ectoparasitic mite *Varroa destructor*. Apidologie. 35: 441-448.

- Chorbinskin, P. 2003. Enzymatic activity of strains of *Ascosphaera apis*. *Medycyna Weterynaryjna*. 59: 1019-1022.
- Colombo, V., Fernandez-de-Heredia, M. and Malpartida, F. 2001. A polyketide biosynthetic gene cluster from *Streptomyces antibioticus* includes a LysR-type transcriptional regulator. *Microbiology*. 147:3083-3092.
- Currie, C. R., Scott, J. A., Summerbell, R. C. and Malloch, D. 1999. Fungus-growing ants use antibiotic-producing bacteria to control the garden parasites. *Nature*. 398: 701-704.
- Dancer, B. N. and Chantawannakul, P. 1997. The protease of American foulbrood scales. *Journal of Invertebrate Pathology*. 70: 79-87.
- de Miranda, J. R., Drebot, M., Tyler, S., Shen, M., Cameron, C. E., Stoltz, D. B. and Camazine, S. M. 2004. Complete nucleotide sequence of Kashmir bee virus and comparison with acute bee paralysis virus. *Journal of General Virology*. 85: 2263-2270.
- Dillon, V. M. and Dillon, R.J. 2004. The Gut Bacteria of Insects: Nonpathogenic Interactions. *Annual Review of Entomology*. 49: 71-92.
- Eisemann, C. H. and Binnington, K. C. 1994. The peritrophic membrane: its formation, structure, chemical composition and permeability in relation to vaccination against ectoparasitic arthropods. *International Journal of Parasitology*. 24 (1): 15-26.
- Evans, J. D., and Armstrong, T. N. 2006. Antagonistic interaction between honey bee bacterial symbionts and implications for disease. *BMC Ecology*. 6: 4.
- Fang, W., Leng, B., Xiao, Y., Jin, K., Ma, J., Fan, Y., Feng, J., Yang, X., Zhang, Y. and Pei, Y. 2005. Cloning of *Beauveria bassiana* chitinase gene *Bbchit1* and its application to improve fungal strain virulence. *Applied and Environmental Microbiology*. 71(1): 363-370.
- Genersch, E., Yue, C., Fries, I. and de Miranda, J. R. 2006. Detection of deformed wing virus, a honey bee viral pathogen, in bumble bees (*Bombus terrestris* and *Bombus pascuorum*) with wing deformities. *Journal of Invertebrate Pathology*. 91: 61-63.
- Gilliam, M. 1997. Identification and role of non-pathogenic microflora associated with honey bees. *FEMS Microbiology Letters*. 155: 1-10.
- Gilliam, M. and Lorenz, B. J. 1993. Enzymatic activity of strains of *Ascosphaera apis*, an entomopathogenic fungus of the honey bee, *Apis mellifera*. *Apidologie*. 24: 19-23.
- Gilliam, M., Lorenz, B. J., Prest, D. B. and Camazine, S. 1993. *Ascosphaera apis* from *Apis cerana* from South Korea. *Journal of Invertebrate Pathology*. 61: 111-112.

- Gilliam, M., Prest, D. B. and Lorenz, B. J. 1989. Microbiology of pollen and bee bread: taxonomy and enzymology of molds. *Apidologie*. 20: 53-68.
- Gouchnauer, T. A. and Margetts, V. J. 1979. Properties of honeybee larvae killed by chalkbrood disease. *Journal of Apicultural Research*. 18: 212-216.
- Heath, L. A. F. 1982. Development of chalkbrood in a honey bee colony: a review. *Bee world*. 63 (3): 119-131.
- Hornitzky, M. 2001. A review of chalkbrood; a fungus disease in honey bee. NSW Agriculture. pp.1-22.
- Inglis, G. D., Sigler, L. and Goettel, M. S. 1993. Aerobic microorganisms associated with alfalfa leafcutter bees (*Megachile rotundata*). *Microbial Ecology*. 26: 125-143.
- Jacobson, E., Granville, W. C. and Foss, C. E. 1948. Color harmony manual, 4th Edition. Container Corporation of America, Chicago.
- Jeyaprakash, A., Hoy, M. A., and Allsopp, M. H. 2003. Bacterial diversity in worker adults of *Apis mellifera capensis* and *Apis mellifera scutellata* (Insecta: Hymenoptera) assessed using 16S rRNA sequences. *Journal of Invertebrate Pathology*. 84: 96-103.
- Kaltenpoth, M., Göttler W., Herzner G. and Strohm, E. 2005. Symbiotic Bacteria Protect Wasp Larvae from Fungal Infestation. *Current Biology*. 5: 475–479.
- Ketela, M. M., Virpi, S., Halo, L., Hakala, J., Mantsala, P. and Ylihonko, K. 1999. An efficient approach of screening minimal PKS genes from *Streptomyces*. *FEMS Microbiology Letters*. 180:1-6.
- Kurtzman, C.P., Fell, J.W. 1998. The yeasts, a taxonomic study, 4th edn. Elsevier Science, Amsterdam.
- Küster, E. and Williams, S. T. 1964. Selection of media for isolation of streptomycetes, *Nature*. 202: 928-929.
- Llorca, L. V. L., Carbonell, T. and Vidal, S. G. 2002. Degradation of insect cuticle by *Paecilomyces farinosus* protease. *Mycological Progress*. 1 (3): 249-256.
- Lowry, O. H., Rosenbrough, N. J., Farr, A. L. and Randall, R. J. 1951. Prote in measurement with the folin-phenol reagent. *Journal of Biology and Chemistry*. 193: 256-275.
- Mohr, K. I. and Tebbe, C. C. 2006. Diversity and phylotype consistency of bacteria in the gut of three bee species (Apoidea) at an oilseed rape field. *Environmental Microbiology*. 8 (2): 258-272.
- Nakajima, Y., Kitpreechavanich, V., Suzuki, K. and Kudo, T. 1999. *Microbispora coralline* sp.

- nov., a new species of the genus *Microbispora* isolated from Thai soil. International Journal of Systematic Bacteriology. 49: 1761-1767.
- Nordstrom, S. 2003. Distribution of deformed wing virus within honey bee (*Apis mellifera*) brood cells infested with the ectoparasitic mite *Varroa destructor*. Experimental and Applied Acarology. 29: 293–302.
- Piccini, C., Antunez, K. and Zunino, P. 2004. An approach to the characterization of the honey bee hive bacterial flora. Journal of Apicultural Research. 43: 101-104.
- Ribi re, M., Triboulot, C., Mathieu, T., Auri res, C., Faucon, J. P. and P pin, M. 2002. Molecular diagnosis of Chronic bee paralysis virus infection. Apidologie. 33: 339-351.
- Rosa C. A., Lachance M. A., Silva, J. O. C., Teixeira, A. C. P., Marini, M. M, Antonini, Y. and Martins, R.P. 2003. Yeast communities associated with stingless bees. FEMS Yeast Research. 4:271-275
- Ruffinengo, S., Pena, N. I., Clemente, G., Palacio, M. A. and Escande, A. 2000. Suitability of culture media for the production of ascospores and maintenance of *Ascosphaera apis*. Journal of Apicultural Research. 39 (3-4): 143-148.
- Shirling, E. B. and Gottlieb, D. 1966. Methods for characterization of *Streptomyces* species. International Journal of Systematic Bacteriology. 16: 313-340.
- Spencer, J. F. T. and Spencer, D. M. 1997. Ecology: where yeasts live. In: Spencer JFT, Spencer DM (eds) Yeasts in natural and artificial habitats. Springer-Verlag, Berlin. 33-58 pp.
- Staneck, J. L. and Roberts, G. D. 1974. Simplified approach to identification of aerobic actinomycetes by thin-layer chromatography. Journal of Applied Microbiology. 28: 226-231.
- St Leger, R. J., Joshi, L., Bidochka, M. J. and Roberts, D. W. 1996. Construction of an improved mycoinsecticide overexpressing a toxic protease. Proceedings of the National Academy of Science. United States of America. 93: 6349-6354.
- St Leger, R. J., Joshi, L. and Roberts, D. 1998. Ambient pH is a major determinant in the expression of cuticle- degrading enzymes and hydrophobin by *Metarhizium anisopliae*. Applied and Environmental Microbiology. 64 (2): 709-713.
- St Leger, R. J., Nelson, J. O. and Srenn, S. E. 1999. The entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae* alters ambient pH, allowing extracellular protease production and activity. Microbiology. 145: 2691-2699.
- Stoltz, D., Shen, X. R., Boggis, C. and Sisson, G. 1995. Molecular diagnosis of Kashmir

- bee virus infection. *Journal of Apicultural Research*. 34: 153-165.
- Suh, S. O., Nguyen N. H. and Blackwell, M. 2008. Yeasts isolated from plant-associated beetles and other insects: seven novel *Candida* species near *Candida albicans*. *FEMS Yeast Research*. 8: 88-102.
- Tangjingjai, W., Verakalasa, P., Sittipraneed, S., Klinbunga, S. and Lekprayoon, C. 2003. Genetic differences between *Tropilaelaps clareae* and *Tropilaelaps koenigerum* in Thailand based on ITS and RAPD analyses. *Apidologie*. 34: 513–524.
- Tentcheva, D., Gauthier, L., Jouve, S., Canabady-Rochelle, L., Dainat, B., Cousserans, F., Colin, M. E., Ball, B. V. and Bergoin, M. 2004a. Polymerase chain reaction detection of deformed wing virus (DWV) in *Apis mellifera* L. and *Varroa destructor*. *Apidologie*. 35: 431–439.
- Tentcheva, D., Gauthier, L., Zappulla, N., Dainat, B., Cousserans, F., Colin, M.E. and Bergoin, M. 2004b. Prevalence and seasonal variations of six bee viruses in *Apis mellifera* L. and *Varroa destructor* Mite Populations in France. *Applied and Environmental Microbiology*. 70: 7185-7191.
- Theantana, T. and Chantawannakul, P. 2008. Protease and β -N-acetylglucosaminidase of honey bee chalkbrood pathogen *Ascosphaera apis*. *Journal of Apicultural Research*. 47: 68-72.
- Thompson, J. D., Gibson, T. J., Plewniak, F., Jeanmougin, F. and Higgins, D. G. 1997. The CLUSTAL _X windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. *Nucleic Acids Research*. 25: 4876-4882.
- Topley, E., Davison, S., Leat, N. and Benjeddou, M. 2005. Detection of three honeybee viruses simultaneously by a single Multiplex Reverse Transcriptase PCR. *African Journal of Biotechnology*. 4: 763-767.
- Tsujibo, H., Hatano, N., Mikami, T., Hirasawa, A., Miyamoto, K. and Inamori, Y. 1998. A novel β -N-acetylglucosaminidase from *Streptomyces thermoviolaceus* OPC-520: gene cloning, expression, and assignment to family 3 of the glycosyl hydrolase. *Applied and Environmental Microbiology*. 64 (8): 2920-2924.
- Vries, E. J. D., Breeuwer, J. A. J., Jacobs, G. and Mollema, C. 2001. The Association of western Flower Thrips, *Frankliniella occidentalis*, with a near *Erwinia* Species Gut Bacteria: Transient or Permanent?. *Journal of Invertebrate Pathology*. 77: 120-128.
- Warhurst, P. 2000. Beekeeping-Disease Sacbrood. DPI notes. Department of Primary Industry. Queensland government, Australia. 1-2 pp.

Zacchi, L. and Vaughan-Martini, A. 2002. Yeasts associated with insects in agricultural areas of Perugia, Italy. *Annals of Microbiology*. 52: 237-24.