

K 45401203 : สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ

คำสำคัญ : โรคอเมริกันฟาวล์บรูค / เอนโดสปอร์ / อีคิทีเอ / ไฮโครเจนเปอร์ออกไซด์

วาสนา นิยมแสวง : การประเมินสารเคมียับยั้งสปอร์และกลไกการออกฤทธิ์ควบคุมโรคอเมริกันฟาวล์บรูค (ASSESSMENT OF SPORICIDAL AGENT AND MECHANISM OF ITS CONTROLLING AMERICAN FOULBROOD) อาจารย์ผู้ควบคุมวิทยานิพนธ์ : รศ. ดร.กัญญาณี จิรศรีพงศ์พันธ์, ผศ. ดร.พิทยา หลิวเสรี และ ผศ. ดร.ทิตติยา จิตติहरรษา. 88 หน้า. ISBN 974-464-975-5

การวิจัยนี้ได้มีการศึกษาขั้นการเป็น *P. l. larvae* ของแบคทีเรียที่ก่อโรคอเมริกันฟาวล์บรูค ด้วยวิธีทางชีวเคมีร่วมกับลักษณะการก่อโรคในตัวอย่างสิ่ง จากการศึกษาตรวจสอบทางชีวเคมี พบว่าเชื้อแบคทีเรียนี้มีการสร้าง proteolytic enzyme สามารถรีดิวซ์ไนเตรทไปเป็นไนไตรท์ ผลึกกรดโดยใช้ mannitol และ glucose เจริญในอาหาร NB ได้น้อย ไม่ให้ฟอง O_2 เมื่อทำ catalase test ไม่สามารถสังเคราะห์ acetoin และไม่สามารถย่อยแป้งได้ และเมื่อนำสปอร์ 10^8 สปอร์ต่อมิลลิลิตร ไปผสมกับนมผงให้ตัวอย่างอายุ 7 วันกิน พบว่าหลังจากบ่มนาน 14 วัน ตัวอย่างมีสีน้ำตาลเข้มค่อนข้างดำและมีกลิ่นเหม็นคาว เมื่อเชื้อตัวอย่างที่ติดโรค เห็นลักษณะเป็นขางอึกยาวประมาณ 1 เซนติเมตร และนำไป smear บนแผ่นสไลด์ทำ wet mount พบสปอร์ เซลล์แท่งและเส้นลักษณะคล้าย giant whips ในเนื้อเยื่อ ซึ่งผลทั้งหมดสามารถสรุปได้ว่าแบคทีเรียนี้มีแนวโน้มที่จะเป็น *P. l. larvae* สูง จากนั้นจึงเพาะเลี้ยง *P. l. larvae* เพื่อนำสปอร์มาศึกษาหาสารยับยั้งสปอร์ ซึ่งในงานวิจัยนี้ได้ประเมินสารเคมียับยั้งสปอร์ 2 กลุ่ม คือ สารกันเสีย และสารเคมีอื่นทั่วไป ผลพบว่าสารกันเสีย ได้แก่ EDTA 20 mM และ Na_2EDTA 50 mM ที่ pH 5, 6 และ 7 และสารเคมีอื่นทั่วไป ได้แก่ sodium hypochlorite 0.05% w/v, phenol 5% w/v, H_2O_2 6% w/v และ Mg EDTA 50 mM ที่ pH 5, 6 และ 7 รวมทั้ง $FeCl_2 \cdot 4H_2O$ 50 mM ที่ pH 1.1 มีฤทธิ์ให้การยับยั้งสปอร์ *P. l. larvae* ได้ โดย Na_2EDTA 50 mM จะให้ผลการยับยั้งสูงสุดในกลุ่มของสารกันเสีย และให้เส้นผ่านศูนย์กลางวงใสการยับยั้ง เท่ากับ 2.41 เซนติเมตร ที่ pH 7 ขณะที่ H_2O_2 6% w/v ให้ผลการยับยั้งสูงสุดในกลุ่มสารเคมีอื่นทั่วไป และให้วงใสการยับยั้ง เท่ากับ 3.53 เซนติเมตร ที่ pH 7 จากนั้นจึงศึกษาความเสถียรของ Na_2EDTA โดยการผสม Na_2EDTA 50 mM กับอาหารเลี้ยงเชื้อ pH 6.6 ที่ระดับความเข้มข้นต่างๆ พบว่าเมื่อ Na_2EDTA ถูกผสมกับอาหารเลี้ยงเชื้อมากขึ้น ทำให้ฤทธิ์การยับยั้งสปอร์ถูกเจือจางให้ลดลง และเมื่อทดสอบกับสารละลายขกดูโคส ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส พบว่าฤทธิ์การยับยั้งสปอร์ค่อย ๆ ลดลงตามระยะเวลาการบ่มสาร โดยมีการลดลงค่อนข้างน้อยมาก แสดงว่า Na_2EDTA มีความเสถียรดี ส่วน H_2O_2 6% w/v pH 6.6 ได้นำมาศึกษาในลักษณะเดียวกัน พบว่าฤทธิ์การยับยั้งสปอร์สามารถรักษาได้ในภาชนะระบบปิด และเมื่อศึกษากลไกการยับยั้งสปอร์ *P. l. larvae* พบว่า Na_2EDTA นำจะออกฤทธิ์ทำลายสปอร์ (sporicidal agent) ส่วน H_2O_2 นำจะออกฤทธิ์การยับยั้งสปอร์ (sporistatic agent) เมื่อบ่มด้วยระยะเวลาสั้น และออกฤทธิ์ทำลายสปอร์เมื่อบ่มด้วยเวลานานขึ้น

K 45401203 : MAJOR : BIOTECHNOLOGY

KEY WORD : AMERICAN FOULBROOD / ENDOSPORE / EDTA / HYDROGENPEROXIDE

WASANA NAIUMSAWNG : ASSESSMENT OF SPORICIDAL AGENT AND
MECHANISM OF ITS CONTROLLING AMERICAN FOULBROOD. THESIS ADVISORS :
ASSOC. PROF. KALYANEE JIRASRIPONGPUN, Ph.D., ASST. PROF. PITTAYA
LIEWSAREE, Ph.D., AND ASST. PROF. TITIYA CHITTIHUNSA, Ph.D. 88 pp. ISBN 974-
464-975-5

In this research, the study of *P. l. larvae* (USDA) stock culture was confirmed its identify using biochemical test. The tests showed positive result on Holst milk test, reduction NO_3 test as well as acid production test, while giving negative result on catalase test, V-P reduction test, starch hydrolysis and slightly growth in NB. The symptom of honey bee larvae aged 7 days which was infected with spore *P. l. larvae* by feeding with spore contaminated royal jelly in 24 well plate showed that the bee larvae turned from brown and black within 14 days. The corpse showed ropy sign when tested with needle, Its tissues under microscopy revealed numerous of spore and rod with few giant whips. With all above evidents the organism was confirmed as *P. l. larvae*, and its spore was used for spore plate preparation in order to assess the chemicals for spore controlling. Two groups of chemical as food preservatives and disinfectants were used. For the food preservatives results revealed that 20 mM EDTA and 50 mM Na_2EDTA with pH 5, 6 and 7 provide good potency for spore inhibition, while the disinfectants which showed positive results were 0.05% sodium hypochlorite, 5%phenol and 6% H_2O_2 . Among the promising agent, the stability and mechanism of spore inhibition of 50 mM Na_2EDTA and 6% H_2O_2 which gave highest clear zone were studied. Results showed that 50 mM Na_2EDTA was stable sporicidal agent at 30°C with slightly decreased activity after 60 days storage. While inhibition activity of 6% H_2O_2 was also stable within a closed system, but showed sporistatic inhibition when treated with short time, and sporicidal activity when treated long term.