ผลของการติดเชื้อ *Nosema ceranae* ต่อสัดส่วนจุลินทรีย์ในระบบทางเดินอาหารของผึ้งโพรง

Effect of *Nosema ceranae* infection affect microbial gut proportion in *Apis cerana*

สุภาวดี ชมภูพันธ์[1], สุดารัตน์ ตรีเพชรกุล[2], มนัญญา เพียรเจริญ[3], ธัญญารัตน์ คงขุนเทียน[3*]
[1]นักศึกษาระดับปริญญาโท สาขาวิชาการจัดการทรัพยากรฐานชุมชน
มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีพระจอมเกล้าธนบุรี
[2]คณะทรัพยากรชีวภาพและเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีพระจอมเกล้าธนบุรี
[3]ศูนย์บริการทางการศึกษาราชบุรี มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีพระจอมเกล้าธนบุรี

บทคัดย่อ

ผึ้งเป็นแมลงเศรษฐกิจสำคัญที่ให้ผลิตภัณฑ์ผึ้งหลายชนิดสร้างรายได้ให้กับประเทศ หากผึ้งมีสภาพรังที่ไม่แข็งแรงจะทำให้ผลผลิตลดลง หนึ่งในสาเหตุที่ทำให้ผึ้งอ่อนแอคือโรคโนซีมา ที่เกิดจากการติดเชื้อ *Nosema ceranae* เชื้อชนิดนี้จะทำลายระบบทางเดินอาหารของผึ้งส่งผลให้ผึ้งตายยกรังได้ ทำให้เกิดการสูญเสียทางเศรษฐกิจ ในระบบทางเดินอาหารของผึ้งมีจุลินทรีย์เชิงบวกซึ่งมีบทบาทในการป้องกันโรค ดังนั้นจึงศึกษาผลของจุลินทรีย์ในระบบทางเดินอาหารของผึ้งโพรงต่อการติดเชื้อ *N. ceranae* จากการศึกษาความสัมพันธ์ของความหลากหลายและการเปลี่ยนแปลงปริมาณของจุลินทรีย์ระดับสกุลในทางเดินอาหารของผึ้งโพรงที่ไม่ได้รับเชื้อ (กลุ่มควบคุม; n=50 ตัว) และได้รับเชื้อ *N. ceranae* (กลุ่มทดลอง; n =50 ตัว) ที่มีอายุ 3 6 10 และ 14 วัน โดยนำทางเดินอาหารของผึ้งแต่ละช่วงอายุกลุ่มการทดลองละ 3 ตัว มาทำการศึกษาจำนวนจุลินทรีย์ที่เจริญบนอาหารเลี้ยงเชื้อ 4 ชนิด ได้แก่ MRS, SDA, PDA และ ¼ x BCA ทำการตรวจนับจำนวนและบันทึกลักษณะโคโลนี จากการทดลองจำนวน 2 รัง โดยใช้ผึ้งที่มาจากแหล่งเลี้ยงใน จ.ชุมพร และเคลื่อนย้ายมาทำการเลี้ยงในพื้นที่ทดลอง ในรังที่ 1 ผึ้งที่ใช้เป็นผึ้งที่ผ่านการเลี้ยงในพื้นที่ทดลองเป็นเวลา 3 สัปดาห์ แต่ในรังที่ 2 ผ่านการเลี้ยง 1 สัปดาห์ก่อนทำการทำการทดลอง ผึ้งกลุ่มควบคุมรังที่ 1 มีอัตราการตาย 26.83% และซ้ำที่ 2 9.76% ที่ระยะเวลา 10 วัน ผลการเปรียบเทียบจำนวนและลักษณะโคโลนีจุลินทรีย์พบว่า *N. ceranae* มีผลต่อการเปลี่ยนแปลงสัดส่วนของปริมาณและกลุ่มของจุลินทรีย์ โดยในกลุ่มทดลองจะมีการเปลี่ยนแปลงสัดส่วนของปริมาณจุลินทรีย์สูงกว่ากลุ่มควบคุม และจุลินทรีย์ที่เจริญบนอาหาร MRS มีการเปลี่ยนแปลงสัดส่วนของปริมาณมากที่สุด การเปลี่ยนแปลงบนอาหารเลี้ยงเชื้อทั้ง 4 ชนิด ในกลุ่มควบคุมทั้งสองรังพบจุลินทรีย์ที่เจริญบนอาหาร MRS มีการเปลี่ยนแปลงสัดส่วนมากขึ้นเมื่อผึ้งมีอายุมากขึ้น BCA SDA และ PDA ในขณะที่มีการเปลี่ยนแปลงสัดส่วนลดลง ในกลุ่มทดลองพบการเปลี่ยนแปลงสัดส่วนที่ไม่สม่ำเสมอโดยการเปลี่ยนแปลงสัดส่วนของจุลินทรีย์ในทางเดินอาหารที่เลี้ยงได้บนอาหารเลี้ยงเชื้อ 4 ชนิด ในรังที่ 1 มีมากกว่ารังที่ 2

สอดคล้องกับอัตราการตายของผึ้งในกลุ่มควบคุมที่ในรังที่ 1 มากกว่ารังที่ 2 ผลการทดลองชี้ให้เห็นว่าแม้จะเป็นผึ้งที่มาจากแหล่งเดียวกันเมื่อนำมาเลี้ยงในพื้นที่ต่างกันในช่วงก่อนเริ่มการทดลองส่งผลทำให้ผึ้งได้สภาพแวดล้อมที่แตกต่างกันก่อนนำมาทดลองในระยะเวลาสั้นๆ สามารถส่งผลให้จุลินทรีย์ในทางเดินอาหารตั้งต้นก่อนการทดลองต่างกันและอาจส่งผลต่อสุขภาพผึ้งในการทดลอง

คำสำคัญ ผึ้งโพรง, *Nosema ceranae*, จุลินทรีย์ในระบบทางเดินอาหาร

Abstract

Bees are a major economic insect which their products are parts of country's income. If the bee hives are unheatlhy, the yield will be reduced. One of the causes to weaken bees is Nosema disease caused by the *Nosema ceranae* infection. This microsporidian will disrupt bee gut system, resulting in bee colony collapse and economic loss. Positive microbes in honeybee gut can prevent disease, therefore, the effect of microbial gut during *N. ceranae* infection was investigated. From this study, the diversity and number of microbes in uninfected bee gut (control group n=50) and those receiving *N. ceranae* gut (experiment group n=50) at 3, 6, 10, and 14days. The gut of three bees at designated ages from each group were sampled to study the diversity and number of microbes, cultured on four media, MRS, SDA, PDA, and ¼ x BCA. Then counting number of microbial colonies and record all colony characteristics. From two bee colony experiment, both using the bees from Chumporn Province and transported to rear in the area for experiments. In the first colony, the bees were reared for three weeks before experiment, but in the second colony, the bees were reared only for a week. in the control group, death rate of the first colony was 26.83% and 9.76% for the second colony. The results of comparing numbers and identify colony characteristics showed that *N. ceranae* affected the change in the proportion of microbial numbers and groups of microbes. Moreover, in the experimental groups found that proportion of microbe group was higher than the control group, and MRS culture had change proportion the most. On four types of media, the control group was found that the proportion in MRS culture were significantly higher when the bees were getting older, but BCA, SDA, and PDA culture were found to have lesser proportion. In the experimental groups the change of microbe proportion was fluctuated. The change from all four media of the first

colony was higher than the second colony. These results are consonant with death rate of bees found in the control group which was higher in the first colony. The results from the experiment indicated that even if the bees were from the same source but reared in different areas during the pre-trial period, resulting a short different environment exposure; hence, it can result in different initial microbial gut before having the experiment, and it may affect the health of the bees of this experiment.

Keywords Asian honey bee (*Apis cerana*), *Nosema ceranae*, microbial gut

บทนำ

ปัจจุบันผลิตภัณฑ์ผึ้งได้รับความนิยมในการบริโภคและอุปโภคเพิ่มขึ้น ผึ้งจึงเป็นแมลงเศรษฐกิจสำคัญที่สร้างรายได้ให้กับประเทศ ผึ้งที่นำมาเลี้ยงในระดับอุตสาหกรรมมี 2 ชนิด คือ ผึ้งพันธุ์ (*Apis mellifera*) เป็นผึ้งนำเข้า และผึ้งโพรง (*Apis cerana*) เป็นผึ้งพื้นเมืองของไทย ผึ้ง 2 ชนิดนี้มีข้อดีและข้อเสียแตกต่างกัน พบว่าผึ้งพันธุ์ผลิตน้ำผึ้ง 30 กิโลกรัมต่อรัง ไม่ทิ้งรังง่าย แต่ไม่ทนทานต่อศัตรูผึ้ง จึงมีต้นทุนในการเลี้ยงสูง สำหรับผึ้งโพรงถึงแม้ว่าผลผลิตน้ำผึ้งจะน้อยกว่าผึ้งพันธุ์คือให้ผลผลิตเพียง 15 กิโลกรัมต่อรัง แต่มีความทนทานต่อศัตรูผึ้ง ที่สำคัญสามารถจับผึ้งโพรงในธรรมชาติที่มีอยู่ในท้องถิ่นมาเลี้ยงในกล่องได้จึงทำให้ต้นทุนในการเลี้ยงต่ำ (สิริวัฒน์ วงษ์สิริและสุรีรัตน์ เดี่ยววาณิชย์, 2555; ศูนย์ปฏิบัติการกรมส่งเสริมการเกษตร, 2558(a-b)) การเลี้ยงผึ้งเพื่อให้ได้ผลผลิตในสูงนั้นต้องมาจากรังผึ้งที่มีสภาพรังแข็งแรงหากรังผึ้งอ่อนแอจะทำให้ได้ผลผลิตน้อยลงหรือไม่ได้ผลผลิตเลยทำให้สูญเสียรายได้ การที่ผึ้งมีสภาพอ่อนแอเกิดจากอาหารไม่เพียงพอ มีศัตรูผึ้ง ไรผึ้ง และโรคผึ้ง ซึ่งหนึ่งในโรคผึ้งที่ส่งผลให้ผลผลิตในระดับอุตสาหกรรมเสียหายมากคือโรคโนซีมา (Nosema disease) ที่เกิดจากเชื้อ *Nosema ceranae* การติดเชื้อจะทำให้ต่อมไฮโปฟาลิงค์ (hypopharyngeal) สร้างปริมาณโปรตีนที่เป็นส่วนประกอบของหลักของนมผึ้งที่ใช้เลี้ยงตัวอ่อนและผึ้งนางพญาลดลง (Suwannapong et al., 2010) เมื่อเชื้อเข้าสู่ระบบทางเดินอาหารทำให้เซลล์เยื่อบุทางเดินอาหารถูกทำลาย อาหารไม่สามารถถูกย่อย ไม่ถูกดูดซึมและมีอาการท้องร่วง ผลของการติดเชื้อโนซีมาส่งผลให้ผึ้งมีอายุสั้นลง ประชากรผึ้งลดลง และหากมีระดับการติดเชื้ออย่างรุนแรงทำให้ผึ้งตายยกรังได้ (Higes et al., 2007) ก่อให้เกิดการสูญเสียทางเศรษฐกิจด้านผลผลิตผึ้งในระดับอุตสาหกรรม

โรคโนซีมาในผึ้งเกิดจากเชื้อรากลุ่มไมโครสปอร์ (Microsporidia) มีอยู่ 2 ชนิดคือ *Nosema apis* และ *Nosema ceranae* เมื่อผึ้งหาอาหารติดเชื้อ *N. ceranae* จากแหล่งน้ำและอาหารที่มีการปนเปื้อน เชื้อเข้าสู่ร่างกายผึ้งผ่านทางปากและเข้าสู่ระบบทางเดินอาหาร สปอร์ของ *N.ceranae* เมื่อเข้าสู่ทางเดินอาหารส่วนกลางในระยะ mature spore จะใช้ระยะเวลาในการพัฒนา 3 วัน เพื่อยื่นส่วนที่เป็นท่อสำหรับส่งถ่าย

sporoplasms เข้าสู่เซลล์เยื่อบุผิว (Higes et al., 2012) หลังจากนั้นสปอร์จะแบ่งตัวเพิ่มจำนวนทวีคูณในวันที่ 6 ถึง 10 และเพิ่มจำนวนได้มากกว่า 1 ล้านสปอร์ ภายหลังติดเชื้อ 14 วัน (Bailay and Ball.,1991 ; Goodman, 2007) ซึ่งทำให้เชื้อแพร่กระจายอย่างรวดเร็ว ความสามารถในการแพร่ระบาดของเชื้อก่อโรคในผึ้งทำให้มีความจำเป็นในการทำความเข้าใจด้านกลไกในการปรับตัวเพื่อให้ผึ้งอยู่รอด เช่น การมีระบบภูมิคุ้มกันที่ดี ซึ่งหนึ่งในปัจจัยสร้างระบบภูมิคุ้มกันนั้นคือจุลินทรีย์ที่อยู่ในระบบทางเดินอาหารผึ้งที่มีความแตกต่างกันทั้งชนิด หน้าที่ ตำแหน่งที่อยู่ และองค์ประกอบโดยรวม (Martinson ,Moy and Moran 2012) อย่างไรก็ตาม จุลินทรีย์ที่มีอยู่ในผึ้งยังไม่ได้รับการสำรวจอย่างครอบคลุมซึ่งบางชนิดอาจมีส่วนร่วมในการป้องกันเชื้อก่อโรค (Engel, Martinson and Moran,2012)

จุลินทรีย์ในระบบทางเดินอาหารของผึ้งอาจมีการเปลี่ยนแปลงเมื่อผึ้งได้รับเชื้อก่อโรค จึงมีความสนใจศึกษาการเปลี่ยนแปลงสัดส่วนปริมาณของจุลินทรีย์ในทางเดินอาหารของผึ้งโพรงเมื่อผึ้งได้รับเชื้อก่อโรคโนซีมา โดยคาดว่าผลการศึกษาที่ได้จะเป็นข้อมูลพื้นฐาน เพื่อนำไปเป็นประโยชน์ต่องานวิจัยทางด้านโรคโนซีมา และอาจนำไปประยุกต์ใช้เพื่อเป็นการหาวิธีป้องกันหรือลดความรุนแรงของการติดเชื้อ *N. ceranae* ในผึ้งโพรง ซึ่งจะเป็นประโยชน์ต่ออุตสาหกรรมการเลี้ยงผึ้งในอนาคต

วัตถุประสงค์ของการวิจัย

เพื่อศึกษาการเปลี่ยนแปลงปริมาณและสัดส่วนของจุลินทรีย์ในทางเดินอาหารของผึ้งโพรงที่ติดเชื้อและไม่ติดเชื้อ *N. ceranae* ในวันที่ 3 6 10 และ 14

ขอบเขตการวิจัย

1. ขอบเขตด้านพื้นที่ศึกษา

   1) พื้นที่สำหรับดำเนินงานวิจัย มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีพระจอมเกล้าธนบุรี ราชบุรี ตำบลรางบัว อำเภอจอมบึง จังหวัดราชบุรี

   2) แหล่งของผึ้งโพรงจาก จังหวัดชุมพร

   3) แหล่งของเชื้อ *N. ceranae* จากรังผึ้งที่มีการติดเชื้อจากจังหวัดสมุทรสงคราม

2. ขอบเขตด้านเนื้อหาการศึกษา

สิ่งมีชีวิตที่ทำการศึกษา

1) ผึ้งโพรง (*A. cerana*) วรรณะผึ้งงาน ที่ออกมาเป็นตัวเต็มวัยอายุไม่เกิน 24 ชั่วโมงและต้องไม่มีการติดเชื้อ *N. ceranae*

2) เชื้อ *N. ceranae* ระดับความเข้มข้น 40,000 สปอร์ในสารละลายซูโครส 50% ปริมาตร 2 ไมโครลิตร (Suwannapong et al., 2011)

วิธีดำเนินการวิจัย

1. การเตรียมสิ่งมีชีวิตสำหรับใช้ในการทดลอง

การเตรียมผึ้ง

1) การทดลองซ้ำที่ 1 ใช้ผึ้งที่ผ่านการเลี้ยงในพื้นที่ทดลองเป็นเวลา 3 สัปดาห์ ในซ้ำที่ 2 ใช้ผึ้งที่ผ่านการเลี้ยงเป็นเวลา 1 สัปดาห์

2) ตรวจสอบรังผึ้งโพรงที่จะนำมาใช้ ต้องไม่มีการติดเชื้อ *N. ceranae* ก่อนนำมาทำการทดลอง โดยการสุ่มเลือกผึ้งในรังมาดึงระบบทางเดินอาหารของผึ้งเพื่อตรวจหาสปอร์ภายใต้กล้องจุลทรรศน์กำลังขยาย 400X

3) ทำการดึงคอนผึ้งที่มีตัวอ่อนระยะดักแด้ของผึ้งงานที่ใกล้ออกเป็นตัวเต็มวัยจากในรังที่ผ่านการทดสอบว่าไม่มีการติดเชื้อ *N.ceranae* มาเก็บไว้ในตู้ควบคุมอุณหภูมิ เพื่อให้ผึ้งออกมาเป็นตัวเต็มวัยสำหรับใช้ในการทดลอง และเลี้ยงผึ้งตามวิธีการของ Suwannapong et al. (2011)

การเตรียมสปอร์ *N. ceranae* ดัดแปลงวิธีการจาก Standard method ของ Fries et al. (2013) โดยเตรียมสปอร์ให้มีความเข้มข้น 20,000 สปอร์ต่อ 1 ไมโครลิตร

2. วิธีการทดลอง

การศึกษาศึกษาการเปลี่ยนแปลงสัดส่วนปริมาณของจุลินทรีย์ในทางเดินอาหารของผึ้งโพรงที่ติดเชื้อและไม่ติดเชื้อ *N. ceranae* ในวันที่ 3 6 10 และ 14 มีรายละเอียด ดังนี้

1) กำหนดกลุ่มการศึกษา ดังนี้

กลุ่มควบคุม: ผึ้งไม่ได้เชื้อ *N. ceranae*

กลุ่มทดลอง : ผึ้งได้รับเชื้อ *N. ceranae* ความเข้มข้น 40,000 สปอร์ต่อตัวโดยวิธีการป้อนเข้าสู่ผึ้งโดยตรง (force feeding)

ในแต่ละกลุ่มการทดลองใช้ผึ้งโพรงจำนวน 50 ตัว

2) บันทึกอัตราการตายของผึ้งทุกวัน

3) นำผึ้งกลุ่มควบคุมและกลุ่มทดลอง (N = 3) ในวันที่ 3 6 10 และ 14 ของการทดลอง มาตรวจหาจุลินทรีย์ในทางเดินโดยเลี้ยงบนอาหารเลี้ยงเชื้อ 4 ชนิด คือ Man Rogosa Sharpe medium (MRS),Bacillus growth media เจือจาง 4 เท่า, Sabouraud Dextrose Agar (SDA), Potato Dextrose Agar (PDA) บ่มเชื้อตามวิธีการของ (Vojvodic, et al, 2013)

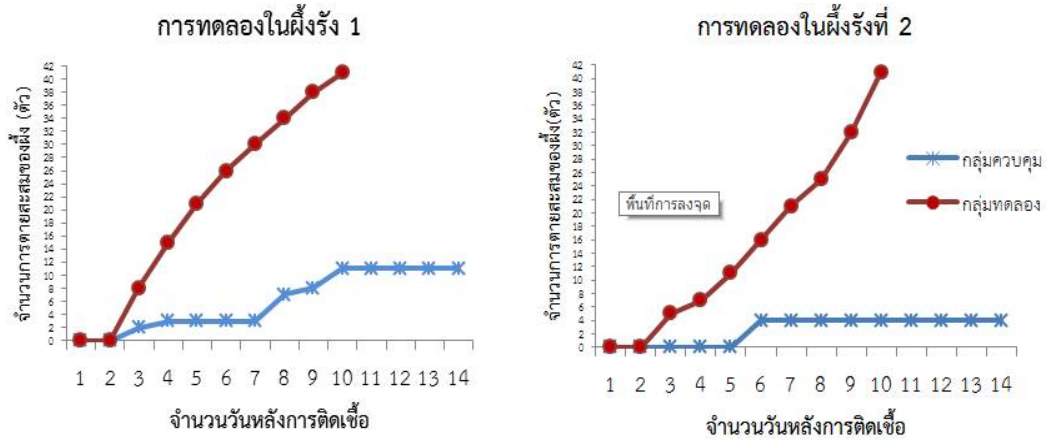
4) บันทึกปริมาณของจุลินทรีย์ที่ขึ้นบนอาหารเลี้ยงเชื้อแต่ละชนิด คำนวนกลับเพื่อหาปริมาณจุลินทรีย์ขั้นต่ำในระบบทางเดินอาหารของผึ้ง (CFU/ml) นำปริมาณจุลินทรีย์ที่ได้มาทำการเปรียบเทียบจำนวน ดังนี้ คือ เปรียบเทียบจำนวนจุลินทรีย์ภายในกลุ่มการทดลองเดียวกัน และระหว่างกลุ่มการทดลอง

5) บันทึกลักษณะจุลินทรีย์และจัดกลุ่มตามลักษณะที่บันทึกได้ นำจำนวนของลักษณะจุลินทรีย์ที่จัดกลุ่มได้มาเปรียบเทียบสัดส่วนลักษณะของจุลินทรีย์ที่เจริญบนอาหารเลี้ยงเชื้อแต่ละชนิด

ผลการวิจัย

จากการศึกษาผลของจุลินทรีย์ในระบบทางเดินอาหารของผึ้งโพรงต่อการติดเชื้อ *N. ceranae* มีผลดังนี้

1. อัตราการตายของผึ้ง



รูปที่ 1 แสดงการเปรียบเทียบการตายของผึ้งในกลุ่มควบคุมและกลุ่มทดลอง

ผลอัตราการตายของผึ้งที่ได้รับเชื้อ *N. ceranae* (กลุ่มทดลอง) คือ 100 % หลังจากที่ผึ้งได้รับเชื้อ *N. ceranae* ในวันที่ 10 ของการทำการทดลองทั้งสองรัง ซึ่งจะแตกต่างจากผึ้งที่ไม่ได้รับเชื้อ *N. ceranae* (กลุ่มควบคุม) พบว่ามีอัตราการตายเพียง 26.83% (รังที่ 1) และ 9.76% (รังที่ 2) ในวันที่ 10 ของการทำการทดลอง

2. ปริมาณจุลินทรีย์ที่ปรากฏอยู่บนอาหารเลี้ยงเชื้อ 4 ชนิด

จากการนับปริมาณจุลินทรีย์ที่ปรากฏบนอาหารเลี้ยงเชื้อ 4 ชนิด แสดงผลการศึกษาดังตารางที่ 1

ตารางที่ 1 ปริมาณจุลินทรีย์ที่ปรากฏอยู่บนอาหารเลี้ยงเชื้อ 4 ชนิด

การทดลองในผึ้งรังที่ 1

กลุ่มการทดลอง	อายุผึ้ง (วัน)	ปริมาณจุลินทรีย์ที่ปรากฏอยู่บนอาหารเลี้ยงเชื้อแต่ละชนิด (x 10^5 CFU / ml)			
		MRS	BCA	SDA	PDA
กลุ่มควบคุม	3	278.50 ± 84.87	258.83 ± 196.44	224.08 ± 164.71	155.50 ± 121.26
	6	106.17 ± 89.65	100.00 ± 59.77	117.67 ± 247.14	76.33 ± 47.13
	10	13.42 ± 3.47	4.00 ± 2.76	5.25 ± 3.98	2.83 ± 2.31
	14	3.77 ± 1.59	2.10 ± 1.19	2.00 ± 1.11	1.90 ± 1.24
กลุ่มทดลอง	3	92.17±53.83	95.00 ± 30.82	80.5± 33.87	107.08 ± 41.32
	6	905 ± 406.98	1,145.00 ± 366.09	821.66±287.34	500.00 ± 214.52
	10	171.16 ± 191.95	30.00 ± 10.49	241.5 ± 185.21	79.5 ±51.55
	14	N/A	N/A	N/A	N/A

การทดลองในผึ้งรังที่ 2

กลุ่มการทดลอง	อายุผึ้ง (วัน)	ปริมาณจุลินทรีย์ที่ปรากฏอยู่บนอาหารเลี้ยงเชื้อแต่ละชนิด (x 10^5 CFU / ml)			
		MRS	BCA	SDA	PDA
กลุ่มควบคุม	3	115.66± 65.13	13.5±3.70	24.5± 9.13	11.41± 7.01
	6	43.00 ± 23.36	30.33 ± 15.27	23.58 ± 12.82	25.58 ±17.31
	10	111.50 ± 16.03	100.83 ± 7.84	86.83 ±8.82	73.83 ± 19.89
	14	111.50 ± 16.03	100.83 ± 7.84	86.83 ±8.82	73.83 ± 19.89
กลุ่มทดลอง	3	7.75 ± 2.86	2.08 ±1.39	8.08 ± 2.95	0.91 ± 0.64
	6	52.33± 15.52	37.83±8.42	48.66± 8.03	8.16± 4.60
	10	172.41 ± 102.94	103.33 ± 74.18	93.00 ±64.28	23.25 ± 7.86
	14	N/A	N/A	N/A	N/A

ผลการเปลี่ยนแปลงปริมาณเชื้อจุลินทรีย์ที่เจริญบนอาหารเลี้ยงเชื้อ 4 ชนิด

จากการเปรียบเทียบในผึ้งกลุ่มเดียวกันที่มีอายุเท่ากัน พบว่า ปริมาณจุลินทรีย์ที่เจริญบนอาหารเลี้ยงเชื้อ 4 ชนิดภายในกลุ่มการทดลองเดียวกันในผึ้งอายุเท่ากัน มีปริมาณใกล้เคียงกันในผึ้งทั้ง 2 รัง แต่ผลในรังที่ 1 พบว่าปริมาณจุลินทรีย์ที่เจริญบนอาหารเลี้ยงเชื้อทั้ง 4 ชนิดมีปริมาณมากกว่ารังที่ 2

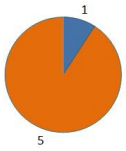
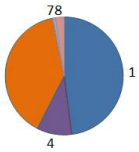
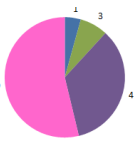
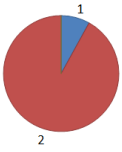
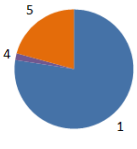
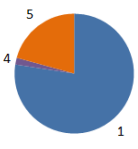
การเปรียบเทียบผึ้งกลุ่มเดียวกันที่มีอายุต่างกัน พบว่า ในกลุ่มควบคุม รังที่ 1 มีปริมาณจุลินทรีย์ที่เจริญบนอาหารเลี้ยงเชื้อทั้ง 4 ชนิดลดลงเมื่อผึ้งมีอายุเพิ่มขึ้น แต่พบว่าในรังที่ 2 มีปริมาณจุลินทรีย์ใกล้เคียงกัน สำหรับในกลุ่มทดลอง พบว่า รังที่ 1 มีปริมาณจุลินทรีย์เจริญบนอาหารเลี้ยงเชื้อทั้ง 4 ชนิดเพิ่มมากขึ้นเมื่อผึ้งอายุ 6 วันและลดลงเมื่อผึ้งอายุ 10 วัน แต่ในรังที่ 2 มีปริมาณจุลินทรีย์ที่เจริญบนอาหารเลี้ยง BCA เพิ่มขึ้นเมื่อผึ้งมีอายุเพิ่มขึ้น และ PDA มีปริมาณลดลงเมื่อผึ้งอายุ 6 วัน และเพิ่มมากขึ้นเมื่อผึ้งมีอายุ 10 วัน

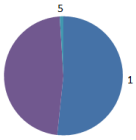
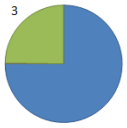
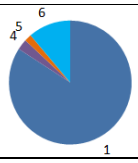
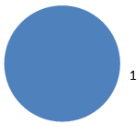
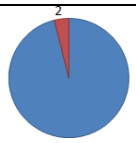
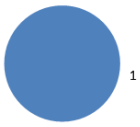
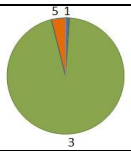
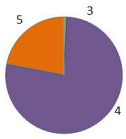
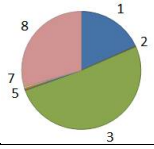
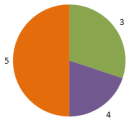
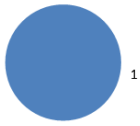
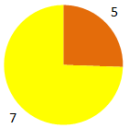
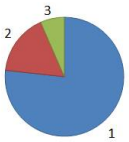
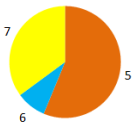
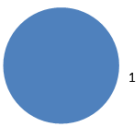
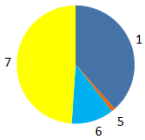
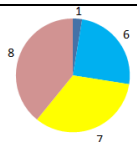
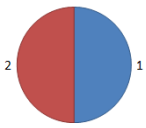
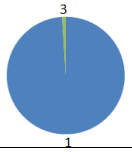
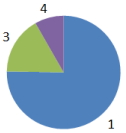
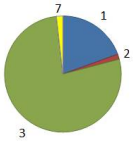
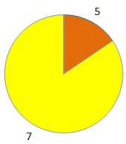
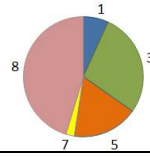
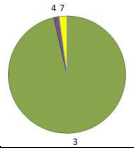
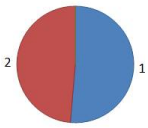
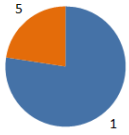
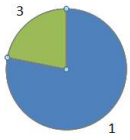
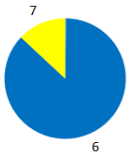
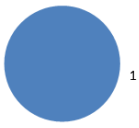
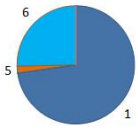
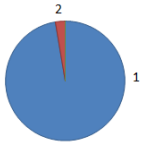
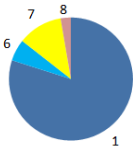
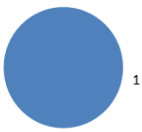
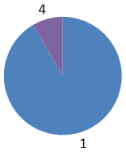
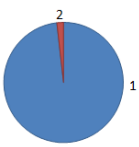
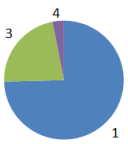
การเปรียบเทียบระหว่างกลุ่มควบคุมและกลุ่มทดลองในผึ้งที่มีอายุเท่ากัน พบว่าผึ้งที่มีอายุ 3 วัน ของการทดลองรังที่ 1 มีความใกล้เคียงกัน สำหรับการทดลองในรังที่ 2 พบว่ามีปริมาณจุลินทรีย์ที่เจริญบนอาหารเลี้ยงเชื้อ MRS ในกลุ่มควบคุมมากกว่าในกลุ่มทดลองอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (P=0.05) ในผึ้งที่มีอายุ 6 วัน รังที่ 1 พบว่า PDA กลุ่มควบคุมมีน้อยกว่ากลุ่มทดลองอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (P=0.05) แต่ผึ้งที่มีอายุ 10 วัน พบว่า ปริมาณจุลินทรีย์ที่เจริญบนอาหารเลี้ยงเชื้อ BCA มีปริมาณจุลินทรีย์ในกลุ่มควบคุมน้อยกว่ากลุ่มทดลองอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (P=0.05) สำหรับการทดลองในรังที่ 2 พบว่า ในผึ้งที่มีอายุ 6 และ 10 วัน มีปริมาณจุลินทรีย์ที่เจริญบนอาหารเลี้ยงเชื้อทั้ง 4 ชนิด ในกลุ่มควบคุมและกลุ่มทดลองใกล้เคียงกัน

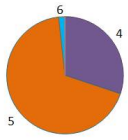
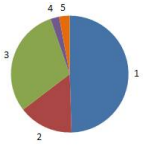
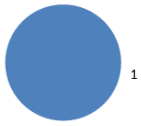
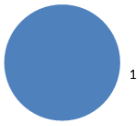
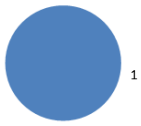
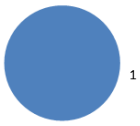
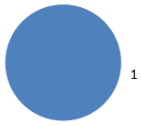
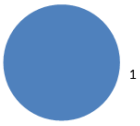
3. สัดส่วนจุลินทรีย์ที่เจริญบนอาหารเลี้ยงเชื้อ 4 ชนิด

จากการนำลักษณะจุลินทรีย์ที่จำแนกได้มาเปรียบเทียบสัดส่วนของจุลินทรีย์ที่เจริญบนอาหารเลี้ยงเชื้อแต่ละชนิด แสดงผลการศึกษาดังตารางที่ 2

ตารางที่ 2 สัดส่วนลักษณะของจุลินทรีย์ที่เจริญบนอาหารเลี้ยงเชื้อ 4 ชนิด

อายุผึ้ง (วัน)	อาหารเลี้ยงเชื้อ	กลุ่มควบคุม		กลุ่มทดลอง	
		รังที่ 1	รังที่ 2	รังที่ 1	รังที่ 2
3	MRS				
	BCA				

อายุผึ้ง (วัน)	อาหารเลี้ยงเชื้อ	กลุ่มควบคุม		กลุ่มทดลอง	
		รังที่ 1	รังที่ 2	รังที่ 1	รังที่ 2
6	SDA				
	PDA				
	MRS				
	BCA				
	SDA				
	PDA				
10	MRS				
	BCA				
	SDA				
	PDA				

อายุผึ้ง (วัน)	อาหารเลี้ยงเชื้อ	กลุ่มควบคุม		กลุ่มทดลอง	
		รังที่ 1	รังที่ 2	รังที่ 1	รังที่ 2
14	MRS			N/A	N/A
	BCA			N/A	N/A
	SDA			N/A	N/A
	PDA			N/A	N/A

ลักษณะที่ 1 ลักษณะที่ 2 ลักษณะที่ 3 ลักษณะที่ 4
ลักษณะที่ 5 ลักษณะที่ 6 ลักษณะที่ 7 ลักษณะที่ 8

หมายเหตุ : การกำหนดสีแทนลักษณะของจุลินทรีย์แต่ละกลุ่ม
โดยจุลินทรีย์ที่ปรากฏบนอาหารเลี้ยงเชื้อ MRS ที่จำแนกได้มี 11 กลุ่ม (ลักษณะที่ 1 – 11),
จุลินทรีย์ที่ปรากฏบนอาหารเลี้ยงเชื้อ BCA ที่จำแนกได้มี 7 ลักษณะ (ลักษณะที่ 1 – 7) ,
จุลินทรีย์ที่ปรากฏบนอาหารเลี้ยงเชื้อ SDA ที่จำแนกได้มี 7 ลักษณะ (ลักษณะที่ 1 – 8) และจุลินทรีย์ที่ปรากฏบนอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA ที่จำแนกได้มี 4 ลักษณะ (ลักษณะที่ 1- 4)

การศึกษาการเปลี่ยนแปลงสัดส่วนลักษณะของจุลินทรีย์ที่เจริญบนอาหารเลี้ยงเชื้อ 4 ชนิด พบว่าจุลินทรีย์ที่เจริญบนอาหารเลี้ยงเชื้อทั้ง 4 ชนิดมีลักษณะแตกต่างกันและมีสัดส่วนไม่เท่ากัน การเปลี่ยนแปลงสัดส่วนของจุลินทรีย์ที่เจริญบนอาหารเลี้ยงเชื้อ MRS มีจำนวนมากที่สุด โดยในกลุ่มควบคุมมีการเปลี่ยนแปลงสัดส่วนมากขึ้นเมื่อผึ้งมีอายุมากขึ้น ส่วนในกลุ่มทดลองการเปลี่ยนแปลงสัดส่วนลดลงในวันที่ 6 และเพิ่มขึ้นในวันที่ 10 ส่วนใน BCA SDA และ PDA การเปลี่ยนแปลงสัดส่วนของจุลินทรีย์ในกลุ่มทดลองมีมากกว่าในกลุ่มควบคุม

อภิปรายผลการวิจัย

N. ceranae มีผลต่อการเปลี่ยนแปลงปริมาณและสัดส่วนของจุลินทรีย์ในระบบทางเดินอาหารของผึ้งที่เลี้ยงได้บนอาหารเลี้ยงเชื้อ 4 ชนิดโดยระยะเวลาที่ผึ้งได้รับเชื้อ *N. ceranae* มีผลต่อการเปลี่ยนแปลงสัดส่วนของปริมาณและกลุ่มของจุลินทรีย์ อย่างไรก็ตามการเปลี่ยนแปลงสัดส่วนขึ้นอยู่กับอาหาร โดยพบว่าจุลินทรีย์ที่เจริญบนอาหาร MRS มีการเปลี่ยนแปลงสัดส่วนมากที่สุดรองลงมา คือ BCA SDA และ PDA

ในการทดลอง มีข้อสังเกตว่าการใช้ผึ้งที่มาจากแหล่งเดียวกันแต่ได้รับการเตรียมรังแตกต่างกัน คือ ใช้เวลาในการเตรียมความพร้อมของรังไม่เท่ากันและได้รับอาหารจากต่างแหล่งกัน อาจจะมีผลต่อปริมาณจุลินทรีย์ตั้งต้น ซึ่งสอดคล้องกับรายงานของ Hroncova et al. (2015) ที่พบปริมาณจุลินทรียตั้งต้นตั้งแต่ผึ้งเป็นตัวอ่อนไม่เท่ากัน จุลินทรีย์ที่อยู่ในตัวอ่อนผึ้งพันธุ์ระยะตัวหนอนในแต่ละอายุของแต่ละรังที่มาจากต่างสถานที่มีสัดส่วนไม่เท่ากัน ซึ่งผลจากการทดลองในครั้งนี้ยังชี้ให้เห็นว่าสภาวะแวดล้อมและอาหารมีผลต่อปริมาณจุลินทรีย์ในระบบทางเดินของผึ้งแม้ว่าจะมาจากแหล่งเดียวกัน

ข้อเสนอแนะ

1. งานวิจัยนี้สามารถใช้เป็นข้อมูลพื้นฐานในการศึกษาเกี่ยวกับเชื้อก่อโรคโนซีมา ที่มีความสัมพันธ์กับการเปลี่ยนแปลงของจุลินทรีย์ในระบบทางเดินอาหารของผึ้งเมื่อเกิดการติดเชื้อ เพื่อประโยชน์สำหรับการเลี้ยงผึ้งต่อไปในอนาคต
2. ควรมีการหาปัจจัยอื่นที่เกี่ยวข้องกับปริมาณจุลินทรีย์ เช่น อาจจะต้องทำการศึกษาจุลินทรีย์ตั้งต้นที่กำเนิดมาพร้อมกับผึ้งระยะตั้งแต่ตัวหนอนไปจนถึงดักแด้ เพื่อทราบจำนวนจุลินทรีย์แรกเริ่มของผึ้ง

กิตติกรรมประกาศ

งานวิจัยนี้ได้รับสนับสนุนงบประมาณจาก สำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ (วช.) และ The National Research University Project of Thailand's Office of the Higher Education Commission

เอกสารอ้างอิง

ศูนย์ปฏิบัติการกรมส่งเสริมการเกษตร(a). (2558). ผึ้งพันธุ์. สืบค้นเมื่อ สิงหาคม 18, 2559, จาก http://ssnet.doae.go. th/wp-content/uploads/2015/04/042_breed-bees.pdf

ศูนย์ปฏิบัติการกรมส่งเสริมการเกษตร(b). (2558). ผึ้งโพรง. สืบค้นเมื่อ สิงหาคม 18, 2559, จาก http://ssnet.doae.go.th/wp-content/uploads/2015/04/043_hole-bees.pdf

สิริวัฒน์ วงษ์สิริ. (2555). ชีววิทยาของผึ้ง. พิมพ์ครั้งที่ 3. กรุงเทพฯ : บริษัท วี.พริ้นท์ (1991) จำกัด.

Bailay, L., and Ball, B., (1991). Honey Bee Pathology. London: Academic.

Engel, P., Martinson, V.G., and Moran, NA. (2012). Functional diversity within the simple gut microbiota of the honey bee. Proc Natl Acad Sci U S A. (vol. 109, pp.11002–11007).

Higes, M., Palencia, P.G., Hernandez, R.M., and Meana, A. (2007), Experiment infection of *Apis mellifera* honey bee with *Nosema ceranae* (Microsporidia**)**. Journal of Invertebrate Pathology. (Vol. 94, pp. 211-217).

Higes, M., Hernández, R.M., Botías, C., Bailón E.G., González-Porto, A.V., Barrios, L,. DelNozal M.J., Bernal, J.L., Jiménez, J.J., Palencia, P.G,. and Meana A. (2008), How natural infection by Nosema ceranae causes honeybee colony collapse. Environ Microbiol, (Vol 10, pp. 2659-69).

Hroncova, Z., Havlik, J., Killer, J., Doskocil, I., Tyl, J., Kamler, M., Titera, D., Hakl, J., Mrazek, J., and Bunesova, V. (2015). Variation in honey bee gut microbial diversity affected by ontogenetic stage, age and geographic location. PLoS ONE. (10(3) : e0118707).

Martinson, V.G., Moy, J., and Moran, N.A. **(**2012). Establishment of characteristic gut bacteria during development of the honeybee worker. Appl Environ Microbiol. (Vol. 78, pp. 2830–2840.

Suwannapong, G., Chaiwnogwattanakul, S., and Benbow, M. E., (2010). Histochemical cpmparison of the hypopharyngeal gland in *Apis cerana* Fabricius, 1793 workers and *Apis mellifera* Linnaeus, 1758 workers. Phyche: A jounal of Entomology. 7P.

Suwannapong, G., T. Yemor, C. Boonpakdee, and M. E. Benbow. (2011). *Nosema ceranae*, a new parasite in Thai honeybees: J InvertebrPathol, (Vol. 106, pp. 236-41).

Vojvodic, S., Rehan, S.M., and Anderson, K.E. (2013) Microbial gut diversity of Africanized and European honey bee larval instars, PLoS ONE (8**:** e72106).