บทที่ 3
อุปกรณ์และวิธีการทดลอง

3.1 การสำรวจและรวบรวมเชื้อราสาเหตุโรคชอล์คบรูดจากฟาร์มผึ้ง (เมษายน 2554 – ตุลาคม 2554)

3.1.1 เตรียมอุปกรณ์ในการเก็บตัวอย่างซากตัวหนอนผึ้งที่เป็นโรคชอล์คบรูดหรือซากมัมมี่ได้แก่ ขวดเก็บตัวอย่าง คีม ปากกาเขียนแก้ว ไฟแช็ก ที่พ่นควัน และขวดบรรจุแอลกอฮอล์

3.1.2 ทำการสำรวจหาตัวอย่างผึ้งจากฟาร์มผึ้งที่อำเภอแม่สรวย จังหวัดเชียงราย อำเภอเชียงดาว และอำเภอเมืองเชียงใหม่ จังหวัดเชียงใหม่

3.1.3 ทำการสำรวจบริเวณหน้ารังผึ้งเพื่อตรวจหาการระบาดของโรคเบื้องต้น เมื่อพบซากมัมมี่ตกอยู่บริเวณหน้ารังผึ้ง เก็บซากมัมมี่ใส่ในขวดเก็บตัวอย่าง แล้วเขียนบันทึกสถานที่ตำแหน่ง และวันที่เก็บที่ขวดเก็บตัวอย่าง เก็บคีมในขวดบรรจุแอลกอฮอล์ เพื่อเป็นการฆ่าเชื้อเบื้องต้น ทำการสำรวจภายในรังผึ้ง และเก็บซากมัมมี่ที่หล่นอยู่บนพื้นภายในรังด้วยวิธีการเดียวกัน หลังจากนั้นจึงทำการสำรวจตัวหนอนผึ้งในหลอดรวง เพื่อเก็บตัวอย่างตัวหนอนผึ้งที่เป็นโรคชอล์คบรูดจากภายในหลอดรวง

3.2 การเพาะเลี้ยงเชื้อรา

การเพาะเลี้ยงเชื้อราในการทดลองนี้ ใช้อาหาร PDAY (Potato Dextrose Agar + 0.4 % yeast extract) (Aronstein and Murray, 2010)

3.2.1 จัดเตรียมตัวอย่างซากตัวหนอนผึ้งที่เป็นโรค และตัวหนอนผึ้งที่ไม่เป็นโรคจากรังผึ้ง

3.2.2 ทำการฆ่าเชื้อที่ผิวนอกของตัวอย่าง โดยการแช่ตัวอย่างในสารละลายโซเดียมไฮโปคลอไรต์เข้มข้น 0.5 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 3 นาที และล้างน้ำกลั่น 1 ครั้ง จากนั้นแช่ตัวอย่างในแอลกอฮอล์ 70 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 1 นาที และล้างด้วยน้ำกลั่น 3 ครั้ง วางตัวอย่างลงบนกระดาษกรองปลอดเชื้อจนกระทั่งตัวอย่างแห้ง

3.2.3 วางซากตัวหนอนแห้งที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้วบนผิวหน้าอาหาร นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส จนกว่าจะมีเส้นใยเจริญออกมาจากซากดังกล่าว

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

3.2.4 เขี่ยเส้นใยที่เจริญออกมาจากซากตัวหนอนไปวางบนผิวหน้าอาหารเลี้ยงเชื้อในจานใหม่ แล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส โดยให้เชื้อราที่แยกมาจากตัวหนอนแต่ละตัวเป็นเชื้อราแต่ละไอโซเลท

3.3 การจำแนกชนิดเชื้อรา

นำเชื้อราที่ได้จากการเพาะเลี้ยงมาตรวจสอบชนิดของเชื้อราภายใต้กล้องจุลทรรศน์ เพื่อทำการจำแนกชนิดเบื้องต้น โดยการสังเกตรูปร่างลักษณะและขนาดของสปอร์และเส้นใยของเชื้อรา โดยใช้คู่มือการจัดจำแนก (Key) จาก Bissett (1988) และเปรียบเทียบกับเชื้อราตัวอย่างของศูนย์วิจัยและพัฒนาการสัตวแพทย์ภาคเหนือตอนบน จังหวัดลำปาง (ศวพ.ลำปาง)

3.4 การคัดเลือกเชื้อราสาเหตุโรคชอล์คบรูดในตัวหนอนผึ้งพันธุ์

3.4.1 เตรียมผึ้งเพื่อใช้ในการทดลอง

เตรียมอาหารเลี้ยงผึ้งโดยใช้น้ำผึ้ง 40 เปอร์เซ็นต์ผสมเกสรจากรังผึ้ง 8 เปอร์เซ็นต์ จากนั้นนำอาหารใส่ในหลอดเพาะนางพญาหลอดละ 4 ไมโครลิตร และทำการย้ายตัวหนอนวัยที่ 3 หรือ วัยที่ 4 จากรังผึ้งวางในหลอดเพาะนางพญาที่เตรียมไว้หลอดละ 1 ตัว ทำซ้ำกรรมวิธีละ 15 ตัว

3.4.2 การเตรียมเชื้อเพื่อใช้ในการทดลอง

คัดเลือกเชื้อราไอโซเลทที่สร้างสปอร์ในปริมาณมากที่สุด 4 ไอโซเลท เพื่อนำมาใช้ในการทดลอง เตรียมสารแขวนลอยสปอร์ของเชื้อราโดยการผสมสปอร์ของเชื้อราลงในสารละลายน้ำผึ้ง 40 เปอร์เซ็นต์ ทำการปรับความเข้มข้นของสปอร์ให้ได้เท่ากับ 10^8 สปอร์ต่อมิลลิลิตร และให้สารละลายน้ำผึ้ง 40 เปอร์เซ็นต์เป็นกรรมวิธีควบคุม

3.4.3 การเลี้ยงดูตัวหนอนในระหว่างการทดลองประยุกต์จาก Silva *et al.* (2009) และการทดสอบการก่อโรคในตัวหนอนผึ้งประยุกต์จาก Geremew (2006)

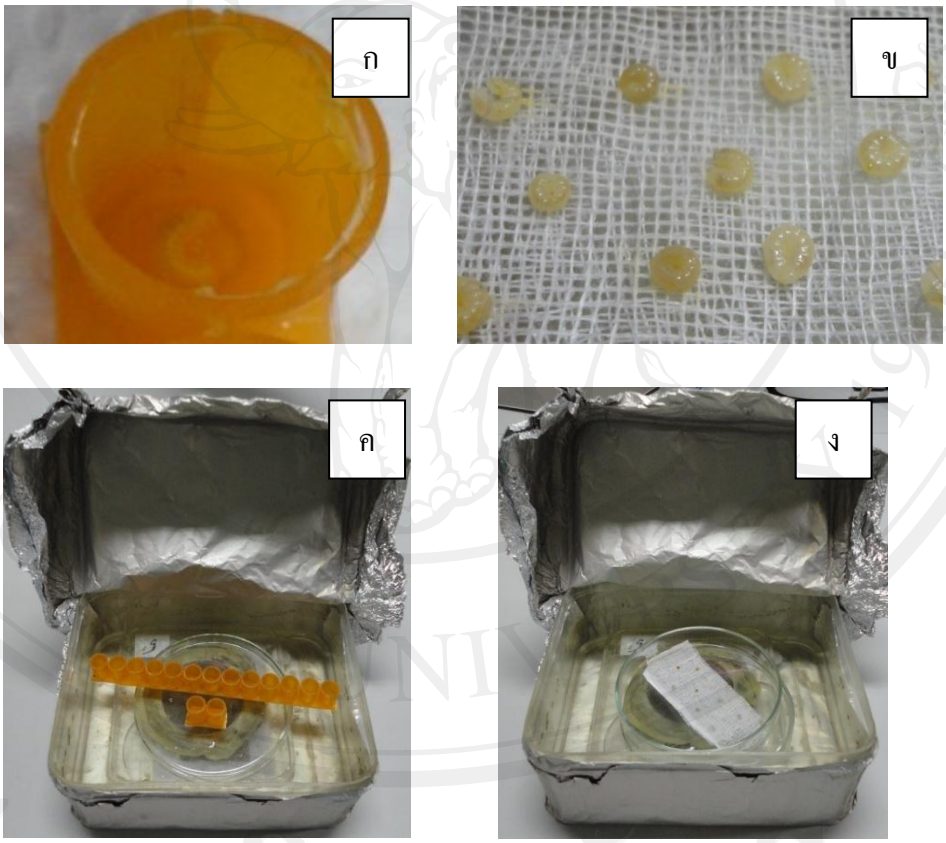
เตรียมอุปกรณ์ในการพักตัวหนอน โดยตัดผ้าก๊อซให้มีขนาด 9 x 3 เซนติเมตร แล้วนำไปวางไว้ในจานอาหารเลี้ยงเชื้อ โดยแต่ละจานวางผ้าก๊อซซ้อนกัน 2 ชั้น จากนั้นนำไปนึ่งฆ่าเชื้อโดยใช้หม้อนึ่งความดันเป็นเวลา 20 นาที

การเลี้ยงดูตัวหนอนในระหว่างการทดลอง เริ่มจากการป้อนอาหาร โดยการหยดอาหารลงในถ้วยเพาะนางพญาที่สะอาด จากนั้นย้ายตัวหนอนมาวางบนอาหารในแต่ละถ้วยอย่างระมัดระวัง (ภาพ 1ก) ทิ้งไว้ประมาณ 2-3 ชั่วโมง จึงย้ายตัวหนอนไปวางบนผ้าก๊อซในจานพักตัวหนอน (ภาพ 1ข) จากนั้นเก็บตัวหนอนไว้ในกล่องเลี้ยงตัวหนอนที่ปรับความชื้น 96 เปอร์เซ็นต์ โดยใช้สารละลาย

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

กลีเซอร์รีนความเข้มข้น 15.5 เปอร์เซ็นต์โดยปริมาตร (ภาพ 1ค-ง) และเก็บกล่องเลี้ยงตัวหนอนไว้ที่อุณหภูมิ 34 องศาเซลเซียส

ทำการทดสอบการก่อโรคในตัวหนอนผึ้งในวันที่สองหลังจากย้ายตัวหนอนมาจากรังผึ้ง โดยการนำสารแขวนลอยสปอร์เชื้อราในแต่ละกรรมวิธี ให้ตัวหนอนกินแทนอาหารปกติที่เตรียมไว้ และให้อาหารปกติในกรรมวิธีควบคุม โดยใช้ไมโครปิเปตดูดอาหารใส่ในหลอดเพาะนางพญาหลุมละ 4 ไมโครลิตร บันทึกผลโดยการสังเกตการเกิดเส้นใยบนตัวหนอนของผึ้งพันธุ์ทุกวัน เป็นเวลา 7 วัน จากนั้นนำซากมัมมี่ที่ได้ในแต่ละกรรมวิธีไปเลี้ยงในห้องปฏิบัติการเพื่อตรวจสอบชนิดของเชื้ออีกครั้ง และเพิ่มปริมาณเชื้อเพื่อใช้ในการทดลองต่อไป



ภาพ 1 การเลี้ยงดูตัวหนอนระหว่างการทดลอง (ก) ตัวหนอนผึ้งพันธุ์ (*Apis mellifera*) ในหลอดเพาะนางพญาในช่วงเวลากินอาหาร (ข) ตัวหนอนผึ้งพันธุ์ (*A. mellifera*) ในหลอดเพาะนางพญาหลังช่วงเวลากินอาหาร (ค-ง) ตัวหนอนผึ้งพันธุ์ (*A. mellifera*) ถูกเก็บไว้ในกล่องรักษาความชื้น 96 เปอร์เซ็นต์

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

3.5 การคัดกรองสารสกัดที่สามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อรา

3.5.1 เตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อรา

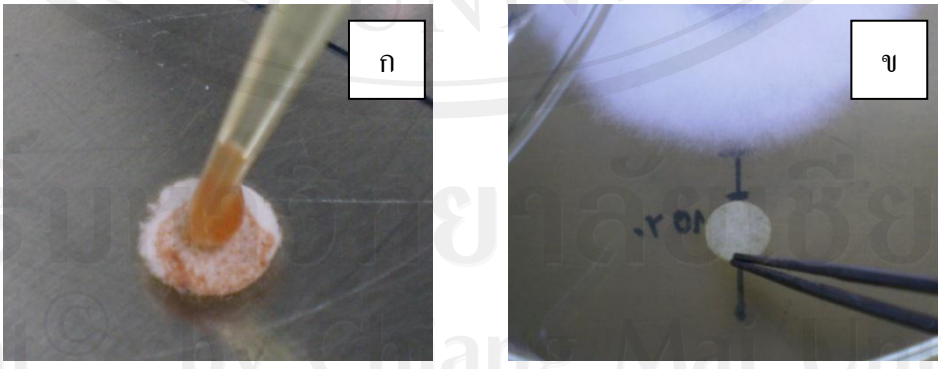
เทอาหารเลี้ยงเชื้อ PDAY ลงในจานเลี้ยงเชื้อขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 9 เซนติเมตร ในปริมาตรจานละ 20 มิลลิลิตร

3.5.2 สารสกัดหยาบจากพืชสกัดด้วยแอลกอฮอล์ 95 เปอร์เซ็นต์

สารสกัดหยาบจากพืชจำนวน 10 ชนิด ที่ใช้ในการทดลองประกอบไปด้วย แมะพะปิโต๊ะ (พืชท้องถิ่นของชาวเขา) ดาวกระจาย หนอนตายหยาก ใบพลู ยาสูบ มะเนียงน้ำ สาบแร้ง กานพลู ยูคาลิปตัส และอบเชย จากสถาบันวิจัยเทคโนโลยีเกษตร มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลล้านนา

วิธีที่1 หยดสารสกัดหยาบจากพืชลงบนกระดาษกรอง

ทำการตรวจสอบความสามารถของสารสกัดหยาบในการยับยั้งการเจริญเติบโตของเส้นใยเชื้อราโดยการใช้ cork borer ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 5 มิลลิเมตร เจาะปลายเส้นใยของเชื้อราไปวางไว้ตรงจุดกึ่งกลางของจานอาหารที่เตรียมไว้ แล้วนำไปบ่มที่ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 วัน หยดสารสกัดหยาบจากพืชความเข้มข้น 100 เปอร์เซ็นต์ ลงบนกระดาษกรองขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 6 มิลลิเมตร ครั้งละ 10 ไมโครลิตร จำนวน 3 ครั้ง ทำซ้ำกรรมวิธีละ 3 ซ้ำ เมื่อกระดาษกรองแห้งหมาด แล้วนำมาวางบนผิวหน้าอาหารให้ห่างจากปลายของเส้นใยประมาณ 5 มิลลิเมตร แล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส การทดลองนี้ใช้ยาต้านเชื้อราเป็นตัวเปรียบเทียบผลของการทดลอง และใช้แอลกอฮอล์ 95 เปอร์เซ็นต์เป็นกรรมวิธีควบคุม สังเกตการเจริญเติบโตของเส้นใย และบันทึกผล (ภาพ 2)

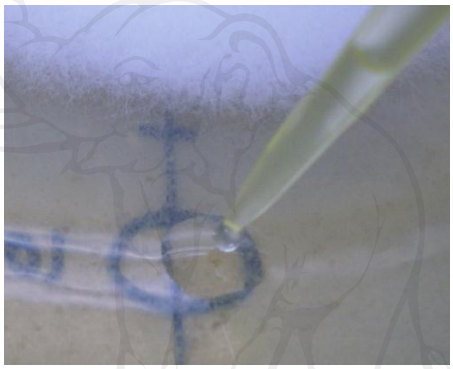


ภาพ 2 การคัดกรองสารสกัดหยาบจากพืชโดยวิธีการหยดสารสกัดลงบนกระดาษกรอง (ก) การหยดสารสกัดหยาบบนกระดาษกรองขนาด 6 มิลลิเมตร (ข) วางกระดาษกรองที่มีสารสกัดหยาบห่างจากปลายเส้นใยเชื้อรา 5 มิลลิเมตร

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

วิธีที่ 2 หยดสารสกัดหยาบจากพืชลงบนผิวหน้าอาหารเลี้ยงเชื้อ

ทำการทดลองโดยการใช้ cork borer ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 5 มิลลิเมตร เจาะปลายเส้นใยของเชื้อราไปวางไว้ตรงจุดกึ่งกลางของจานอาหารที่เตรียมไว้ แล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 วัน หยดสารสกัดความเข้มข้น 100 เปอร์เซ็นต์ ลงบนผิวหน้าอาหารเลี้ยงเชื้อปริมาตร 10 ไมโครลิตร โดยหยดห่างจากปลายของเส้นใยประมาณ 5 มิลลิเมตร (ภาพ 3) แล้วนำไปบ่มต่อที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส การทดลองนี้ใช้ยาต้านเชื้อราเป็นตัวเปรียบเทียบผลของการทดลอง และใช้แอลกอฮอล์ 95 เปอร์เซ็นต์ เป็นกรรมวิธีควบคุม สังเกตการเจริญเติบโตของเส้นใย และบันทึกผล

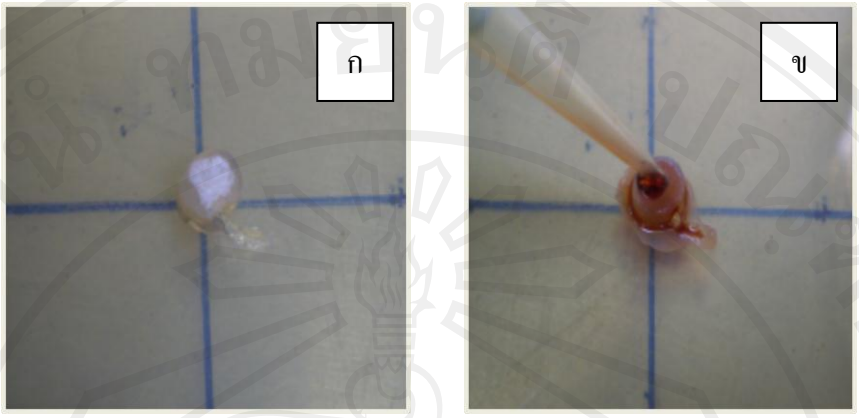


ภาพ 3 การคัดกรองความสามารถของสารสกัดด้วยวิธีหยดสารสกัดหยาบจากพืชความเข้มข้น 100 เปอร์เซ็นต์ ปริมาตร 10 ไมโครลิตร ลงบนผิวหน้าอาหารเลี้ยงเชื้อห่างจากปลายเส้นใย 5 มิลลิเมตร

วิธีที่ 3 หยดสารสกัดหยาบจากพืชลงบนเส้นใยโดยตรง

ทำการทดลองโดยการใช้ cork borer ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 2 มิลลิเมตร เจาะปลายเส้นใยของเชื้อราไปวางบนผิวหน้าอาหารในจานใหม่ โดยวางให้เส้นใยหงายขึ้น จากนั้นใช้ไมโครปิเปตดูดสารสกัดในปริมาตร 10 ไมโครลิตร หยดลงบนเส้นใยของเชื้อราโดยตรง (ภาพ 4) จากนั้นนำไปบ่มไว้ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส โดยใช้ยาต้านเชื้อราและแอลกอฮอล์ 95 เปอร์เซ็นต์ เป็นกรรมวิธีควบคุม สังเกตการเจริญเติบโตของเส้นใยเชื้อราในแต่ละกรรมวิธี พร้อมทั้งบันทึกผล

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved



ภาพ 4 การคัดกรองความสามารถของสารสกัดด้วยวิธีหยดสารสกัดหยาบจากพืชความเข้มข้น 100 เปอร์เซ็นต์ ปริมาตร 10 ไมโครลิตร ลงบนเส้นใยโดยตรง (ก) การวางเส้นใยในลักษณะที่หงายขึ้น (ข) การหยดสารสกัดลงบนเส้นใยโดยตรง

3.5.3 น้ำมันหอมระเหยจากพืช

น้ำมันหอมระเหยจำนวน 9 ชนิด ที่ใช้ในการทดลองประกอบไปด้วยน้ำมันหอมระเหยจากโรสแมรี่ ตะไคร้หอม เจอราเนียม ส้ม ยูคาลิปตัส ลาเวนเดอร์ สะระแหน่ สเปียร์มินต์ และหญ้าแฝก

ทำการตรวจสอบความสามารถในการยับยั้งการเจริญเติบโตของเส้นใยเชื้อราของน้ำมันหอมระเหยจากพืชทั้ง 9 ชนิด โดยการหยดน้ำมันหอมระเหยลงบนเส้นใยโดยตรง โดยการใช้ cork borer ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 2 มิลลิเมตร เจาะปลายเส้นใยของเชื้อราไปวางบนผิวหน้าอาหารในจานใหม่ โดยวางให้เส้นใยหงายขึ้น หยดน้ำมันหอมระเหยความเข้มข้น 100 เปอร์เซ็นต์ ปริมาตร 10 ไมโครลิตร ลงบนเส้นใยของเชื้อราโดยตรง จากนั้นนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ใช้ยาต้านเชื้อราเป็นกรรมวิธีเปรียบเทียบความสามารถในการยับยั้งการเจริญเติบโตของเส้นใย สังเกตการเจริญเติบโตของเส้นใยเชื้อราในแต่ละกรรมวิธีแล้วบันทึกผล

3.5.4 น้ำคั้นจากพืชสมุนไพร

พืชสมุนไพรจำนวน 6 ชนิดประกอบไปด้วย ข่า พริก ขมิ้น ตะไคร้ หอมแดง และมะนาว เตรียมน้ำคั้นโดยการบดคั้นสมุนไพรในโกร่งบดสารจนมีของเหลวซึมออกมาจากพืช

ทำการตรวจสอบความสามารถของน้ำคั้นจากพืชสมุนไพร โดยการใช้ cork borer ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 2 มิลลิเมตร เจาะปลายเส้นใยของเชื้อราไปวางบนผิวหน้าอาหารในจานใหม่ โดยวางให้เส้นใยหงายขึ้น หยดน้ำคั้นจากพืชปริมาตร 10 ไมโครลิตร ลงบนเส้นใยของเชื้อราโดยตรง จากนั้นนำไปบ่มไว้ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส โดยใช้ยาต้านเชื้อราเป็นกรรมวิธี

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

เปรียบเทียบความสามารถในการยับยั้งการเจริญเติบโตของเส้นใย สังเกตการเจริญเติบโตของเส้นใยเชื้อราในแต่ละกรรมวิธี และบันทึกผล

3.6 การศึกษาความเข้มข้นของสารสกัด

คัดเลือกสารสกัดที่ให้ผลในการยับยั้งการเจริญของเส้นใยเชื้อรา เพื่อนำไปทดสอบหาความเข้มข้นที่เหมาะสมที่สามารถออกฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของเส้นใยเชื้อรา

3.6.1 สารสกัดหยาบจากพืช

ทำการปรับความเข้มข้นของสารสกัดหยาบจากพืชที่ถูกคัดเลือก โดยใช้น้ำกลั่นให้มีความเข้มข้นเท่ากับ 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80 และ 90 เปอร์เซ็นต์ และใช้น้ำกลั่นในชุดควบคุม

3.6.2 น้ำมันหอมระเหย

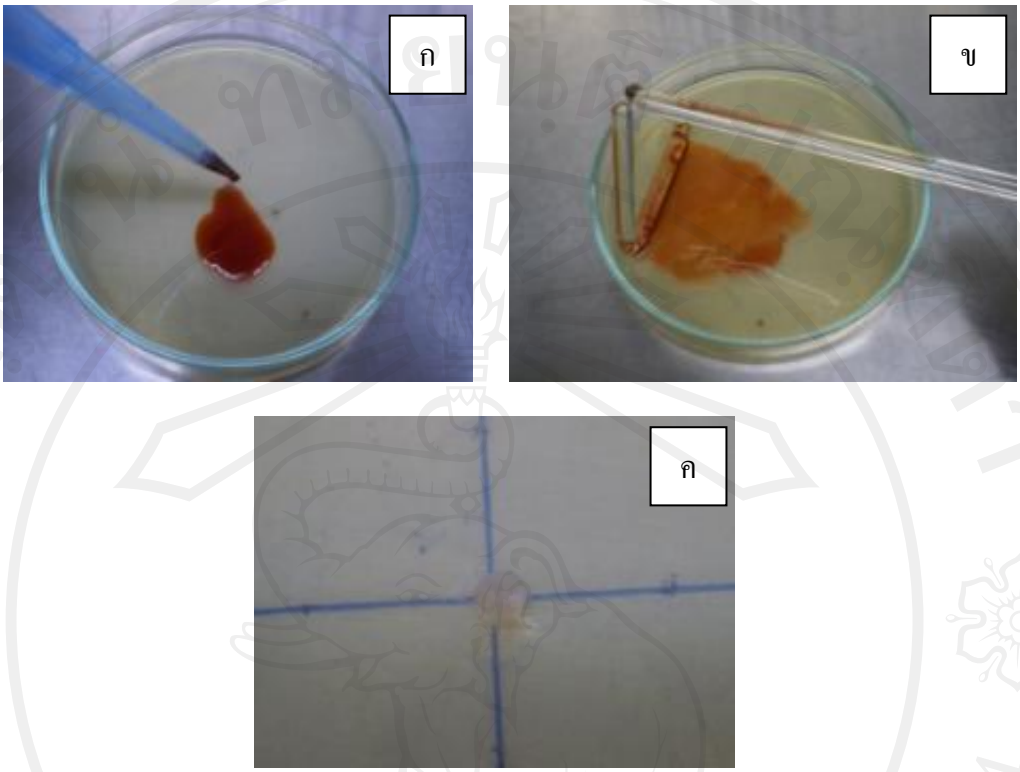
ทำการปรับความเข้มข้นของน้ำมันหอมระเหยโดยใช้ Tween 80 ความเข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์ ให้ได้ความเข้มข้นเท่ากับ 1, 2, 4, 6, 8 และ 10 เปอร์เซ็นต์ และใช้ Tween 80 ความเข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์เป็นกรรมวิธีควบคุม

3.6.3 การทดสอบ

หยดสารสกัดจากพืชแต่ละความเข้มข้นในปริมาตร 200 ไมโครลิตร ลงบนผิวหน้าอาหาร จากนั้นใช้แท่งแก้วปลายงอเกลี่ยสารให้ทั่วผิวหน้าอาหาร เมื่อผิวหน้าอาหารแห้ง ใช้ cork borer ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 5 มิลลิเมตร เจาะปลายเส้นใยของเชื้อรา วางตรงจุดกึ่งกลางของแต่ละจาน (ภาพ 5-6) นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส แต่ละการทดลองทำทั้งหมด 3 ซ้ำ วัดผลการทดลองเมื่อเส้นใยในชุดควบคุมมีขนาด 3 ใน 4 ของจานเลี้ยงเชื้อ

ภาพ 5 การตัดส่วนปลายของเส้นใยเชื้อรา *A. apis* ด้วย cork borer ขนาด 5 มิลลิเมตร

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved



ภาพ 6 การศึกษาผลของสารสกัดจากพืชในการยับยั้งการเจริญเติบโตของเส้นใยเชื้อรา *A. apis* ที่ระดับความเข้มข้นต่าง ๆ (ก) หยดสารสกัดที่ปรับความเข้มข้นแล้วลงบนผิวหน้าอาหารเลี้ยงเชื้อปริมาตร 200 ไมโครลิตร (ข) เกลี่ยสารสกัดให้ทั่วผิวหน้าอาหารเลี้ยงเชื้อด้วยแท่งแก้วปลายงอ (ค) วางเส้นใยเชื้อรา *A. apis* ในลักษณะที่คว่ำเส้นใยลง

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved