บทที่ 4

ผลการทดลอง

4.1 การสำรวจและรวบรวมเชื้อราสาเหตุโรคชอล์คบรูดจากฟาร์มผึ้ง

จากการสำรวจฟาร์มผึ้งของเกษตรกรเพื่อเก็บตัวอย่างผึ้งที่เป็นโรคชอล์คบรูดจากฟาร์มผึ้งของเกษตรกรในพื้นที่อำเภอเชียงดาว จำนวน 3 พื้นที่ และอำเภอเมืองจังหวัดเชียงใหม่ จำนวน 3 พื้นที่ ไม่พบการระบาดของโรคชอล์คบรูด ส่วนฟาร์มผึ้งในเขตอำเภอแม่สรวยจำนวน 2 พื้นที่ พบว่ามีการระบาดของโรคชอล์คบรูด โดยเกษตรกรได้ทำการแยกรังผึ้งที่พบการระบาดของโรคออกห่างจากรังอื่น ๆ เพื่อป้องกันการระบาดที่รุนแรงขึ้น

จากการเก็บตัวอย่างซากหนอนผึ้งที่ตายเนื่องจากการติดเชื้อราก่อโรคชอล์คบรูดจากรังผึ้ง พบว่าซากตัวหนอนผึ้งมีความแตกต่างกันเล็กน้อย ดังนี้

1. ตัวหนอนผึ้งที่เก็บได้บริเวณหน้ารังมีลักษณะเหี่ยว แห้ง และแข็ง พบกระจัดกระจายอยู่ทั่วหน้ารังผึ้งที่มีการระบาดของโรคชอล์คบรูด (ภาพ 7)

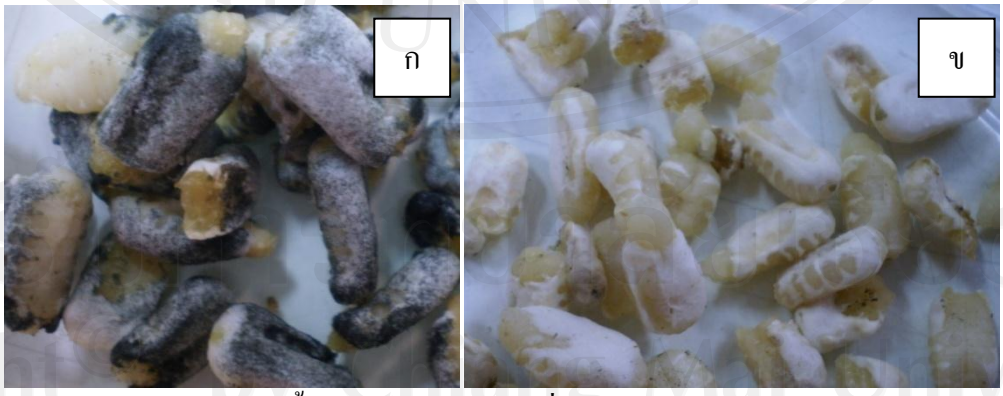
2. ซากมัมมี่ที่พบภายในรังผึ้ง มีทั้งซากที่แห้งแข็งแล้วเหมือนที่พบภายนอกรัง และมีทั้งซากที่ยังไม่แห้งแข็ง ซึ่งเมื่อใช้คีมคีบซากมัมมี่ที่ยังไม่แข็งนั้น พบว่ามีรอยบุ๋มที่เกิดจากการคีบ ทำให้ซากมัมมี่ผิดรูปร่างไปจากเดิมตามแรงบีบของคีม (ภาพ 8)

3. ซากตัวหนอนผึ้งที่พบอยู่ภายในหลอดรวง มีลักษณะบวมพองเต็มหลอดรวง และมีเส้นใยสีขาวห่อหุ้มลำตัว โดยพบว่าในระยะเริ่มต้น ซากตัวหนอนผึ้งจะมีสีขาวขุ่น และมีเส้นใยสีขาวเจริญออกมาจากภายในลำตัว บริเวณปล้องข้างลำตัว ในส่วนกลางถึงส่วนท้ายของลำตัวก่อน จากนั้นเส้นใยค่อย ๆ เจริญไปหุ้มทั่วลำตัว ซากตัวหนอนบวมใหญ่จนเต็มหลอดรวงในช่วงระยะเวลาหนึ่ง จากนั้นค่อย ๆ เหี่ยวแห้งลง และพบซากมัมมี่ที่บริเวณก้นหลอดรวง (ภาพ 9)

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ภาพ 7 ตัวอย่างซากตัวหนอนผึ้งพันธุ์ (*A. mellifera*) ที่แสดงอาการของโรคชอล์คบรูดที่พบบริเวณหน้ารังผึ้ง มีลักษณะเหี่ยว แห้ง และแข็ง

ภาพ 8 ตัวอย่างซากตัวหนอนผึ้งพันธุ์ (*A. mellifera*) ที่แสดงอาการของโรคชอล์คบรูดที่พบบริเวณพื้นภายในรังผึ้ง



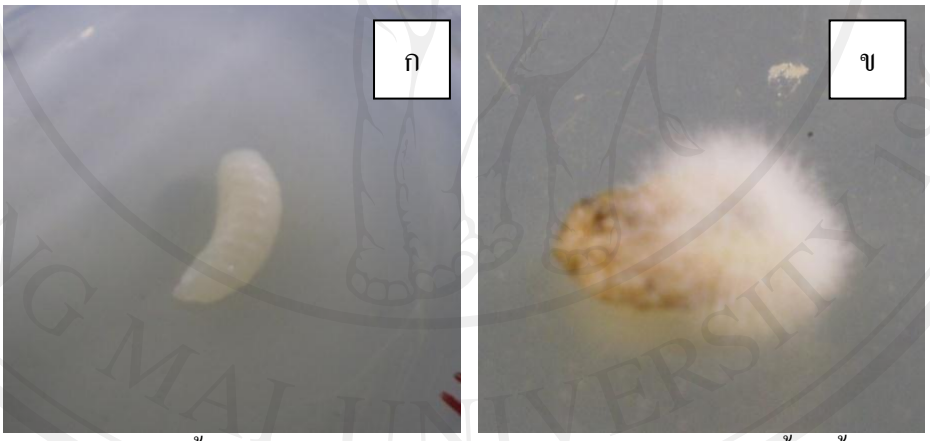
ภาพ 9 ตัวอย่างซากตัวหนอนผึ้งพันธุ์ (*A. mellifera*) ที่แสดงอาการของโรคชอล์คบรูดจากหลอดรวงในรังผึ้ง (ก) ซากตัวหนอนผึ้งพันธุ์สีดำและสีเทา (ข) ซากตัวหนอนผึ้งพันธุ์สีขาว

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ซากมัมมี่ที่ได้จากการเก็บตัวอย่างมีทั้งมัมมี่ที่มีสีดำ และสีขาว โดยเมื่อสังเกตการเกิดโรคในระยะแรกพบว่าซากมัมมี่ไม่มีความแตกต่างกัน เพราะพบว่ามีการสร้างเส้นใยสีขาวในลักษณะเดียวกัน ซึ่งเมื่อเส้นใยเชื้อราห่อหุ้มลำตัวแล้ว ซากมัมมี่บางตัวเริ่มกลายเป็นสีดำ เมื่อนำซากมัมมี่ไปตรวจดูภายใต้กล้อง พบว่าสีดำที่เกิดขึ้นเป็นสีของสปอร์ของเชื้อราซึ่งมีสีน้ำตาล เมื่ออยู่กันอย่างหนาแน่น จึงทำให้มองเห็นเป็นสีดำ ส่วนซากมัมมี่สีขาวคือสีของซากมัมมี่ที่มีเฉพาะเส้นใย

4.2 การเพาะเลี้ยงเชื้อรา

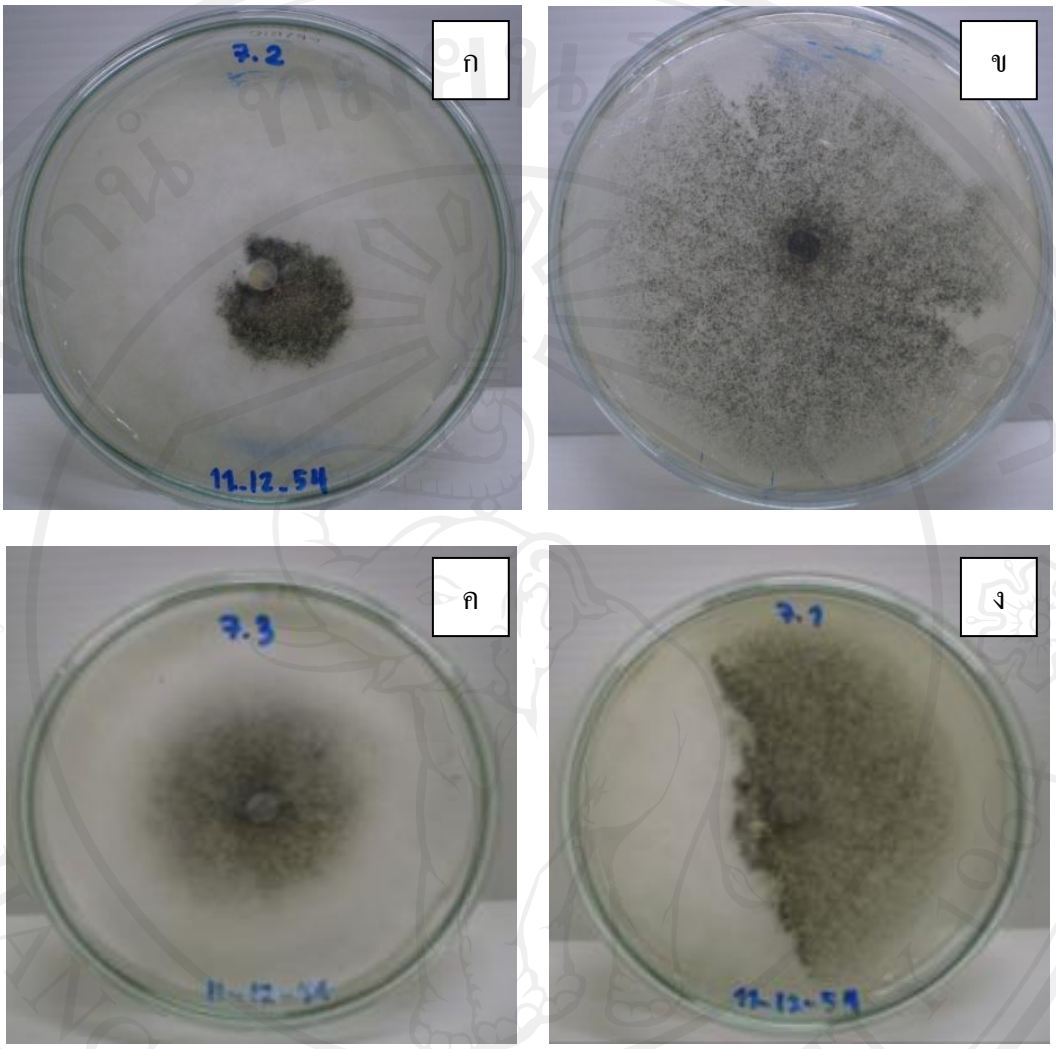
ทำการเปรียบเทียบผลของการฆ่าเชื้อที่ผิวนอกของตัวหนอน ด้วยการทำความสะอาดที่ผิวนอกของตัวหนอนสุขภาพดีด้วยกรรมวิธีเดียวกัน พบว่าตัวหนอนปกติ ไม่มีการเจริญเติบโตของเชื้อใด ๆ ออกมาจากซากตัวหนอนบนผิวหน้าอาหารเลี้ยงเชื้อ ส่วนในจานอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีซากตัวหนอนผึ้งที่เป็นโรคชอล์คบรูด พบว่าเริ่มมีเส้นใยสีขาวของเชื้อราเจริญออกมาจากซากตัวหนอนหลังจากนำมาวางบนอาหารเลี้ยงเชื้อ 1 วัน (ภาพ 10)



ภาพ 10 ภาพตัวหนอนผึ้งพันธุ์ (*A. mellifera*) หลังจากนำมาวางบนอาหารเลี้ยงเชื้อ 1 วัน (ก) ตัวหนอนผึ้งพันธุ์ปกติไม่มีเส้นใยของเชื้อราเจริญออกมาจากซากตัวหนอน (ข) ตัวหนอนผึ้งพันธุ์ที่เป็นโรคชอล์คบรูดปรากฏเส้นใยสีขาวเจริญออกมาจากซากของตัวหนอน

จากการเพาะเลี้ยงเชื้อราพบว่าลักษณะของเชื้อราแต่ละไอโซเลทมีความแตกต่างกัน (ตาราง 1) เส้นใยของเชื้อรามีลักษณะเป็นเส้นใยสีขาว เชื้อราที่เพาะเลี้ยงได้บางไอโซเลทมีลักษณะของเส้นใยที่ฟูเล็กน้อย บางไอโซเลทเส้นใยเจริญเติบโตเป็นแผ่นไม่ฟู เชื้อราบางไอโซเลทมีการสร้างเซลล์สืบพันธุ์เกิดเป็นกลุ่มสีดำที่บริเวณกลางจานเลี้ยงเชื้อแพร่ออกไปจนถึงขอบจาน ในบางไอโซเลทพบว่าเกิดสปอร์เฉพาะส่วนกลางของจานอาหารเลี้ยงเชื้อ (ภาพ 11)

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved



ภาพ 11 ลักษณะการเจริญเติบโตที่แตกต่างกันของเชื้อรา *Ascosphaera apis* แต่ละไอโซเลท (ก) ลักษณะของเชื้อรา *A. apis* ไอโซเลท M2H2I2 ที่สร้างแอสโคมาจำนวนมาก อัดแน่นรวมกันอยู่ที่ส่วนกลางของโคโลนี (ข) ลักษณะของเชื้อรา *A. apis* ไอโซเลท M2H2C3 ที่สร้างแอสโคมากระจายทั่วโคโลนี (ค) ลักษณะของเชื้อรา *A. apis* ไอโซเลท M2H2I3 ที่สร้างแอสโคมากระจายทั่วโคโลนี ภายใต้เส้นใยสีขาว (ง) ลักษณะของเชื้อรา *A. apis* ไอโซเลท M2H2I1 ที่สร้างแอสโคมากระจายอยู่กึ่งหนึ่งของโคโลนี

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ตาราง 1 ลักษณะของเชื้อรา *Ascosphaera apis* แต่ละไอโซเลท

ไอโซเลท	ลักษณะการเจริญเติบโตบนอาหารเลี้ยงเชื้อ
M2H1C1	เส้นใยสีขาวหม่น ไม่ฟู เส้นใยเจริญเป็นแผ่น มีสปอร์สีน้ำตาลเข้ม[1] กระจายทั่ว
M2H1C2	เส้นใยสีขาว ไม่ฟู เส้นใยเจริญสานกันเป็นแผ่น ไม่สร้างสปอร์
M2H1C3	เส้นใยสีขาว ไม่ฟู เส้นใยเจริญสานกันเป็นแผ่น ไม่สร้างสปอร์
M1H1O1	เส้นใยสีขาว ฟูเล็กน้อย สร้างสปอร์สีน้ำตาลเข้มจากส่วนกลางของโคโลนี
M2H1I1	เส้นใยสีขาวหม่น เจริญเป็นแผ่น สร้างสปอร์สีน้ำตาลเข้มกระจายทั่วโคโลนี
M2H2C1	เส้นใยสีขาวฟู มีสปอร์อยู่ใต้เส้นใยบริเวณส่วนกลางของโคโลนี
M2H2C2	เส้นใยสีขาวฟู มีสปอร์อยู่ใต้เส้นใย กระจายทั่วโคโลนีจากส่วนกลาง
M2H2C3[2]	เส้นใยสีขาว ไม่ฟู มีสปอร์สีน้ำตาลเข้มกระจายทั่วทั้งโคโลนี
M2H2I1[3]	เส้นใยสีขาวฟูเล็กน้อย มีสปอร์สีน้ำตาลเข้มกระจายอยู่กึ่งหนึ่งของโคโลนี
M2H2I2[4]	เส้นใยสีขาวฟู เจริญอย่างหนาแน่น สปอร์สีน้ำตาลเข้มอัดแน่นอยู่กลางโคโลนี
M2H2I3[5]	เส้นใยสีขาวฟู มีสปอร์สีน้ำตาลเข้มอยู่ใต้เส้นใยกระจายจากส่วนกลางโคโลนี
M1H1O2	เส้นใยสีขาวฟูเล็กน้อย สร้างสปอร์สีน้ำตาล การกระจายของสปอร์ไม่สม่ำเสมอ
M1H1C1	เส้นใยสีขาวฟูเล็กน้อย ไม่สร้างสปอร์
M1H1C2	เส้นใยสีขาวฟูเล็กน้อย ไม่สร้างสปอร์
M1H1C3	เส้นใยสีขาวฟูเล็กน้อย ไม่สร้างสปอร์
M1H1C4	เส้นใยสีขาวฟูเล็กน้อย สร้างสปอร์ทั่วโคโลนี
M1H1C5	เส้นใยสีขาวฟูเล็กน้อย สร้างสปอร์สีน้ำตาลเข้มหนาแน่นที่กลางโคโลนี
M1H1C6	เส้นใยสีขาวฟูเล็กน้อย ไม่สร้างสปอร์
M1H1C7	เส้นใยสีขาวฟูเล็กน้อย สร้างสปอร์สีน้ำตาลเข้มทั่วโคโลนี แต่ปริมาณไม่มาก
M1H1C8	เส้นใยสีขาวฟูเล็กน้อย สร้างสปอร์สีน้ำตาลเข้มหนาแน่นจากกลางโคโลนี
M1H1C9	เส้นใยสีขาวฟูเล็กน้อย ไม่สร้างสปอร์
M1H1C10	เส้นใยสีขาวไม่ฟู สร้างสปอร์สีน้ำตาลเข้มเล็กน้อย
M1H1C12	เส้นใยสีขาวฟูเล็กน้อย สร้างสปอร์สีน้ำตาลเข้มเล็กน้อย
M1H1C13	เส้นใยสีขาว ฟูเล็กน้อย ไม่สร้างสปอร์
M1H1C14	เส้นใยสีขาว ฟูเล็กน้อย สร้างสปอร์สีน้ำตาลเข้มเล็กน้อย
M1H1C15	เส้นใยสีขาว ฟูเล็กน้อย ไม่สร้างสปอร์
M1H1C16	เส้นใยสีขาว ไม่ฟู สร้างเส้นใยบาง ๆ สร้างสปอร์เล็กน้อย กระจายทั่วโคโลนี

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

[1] สีของสปอร์ที่ตรวจดูภายใต้กล้องจุลทรรศน์

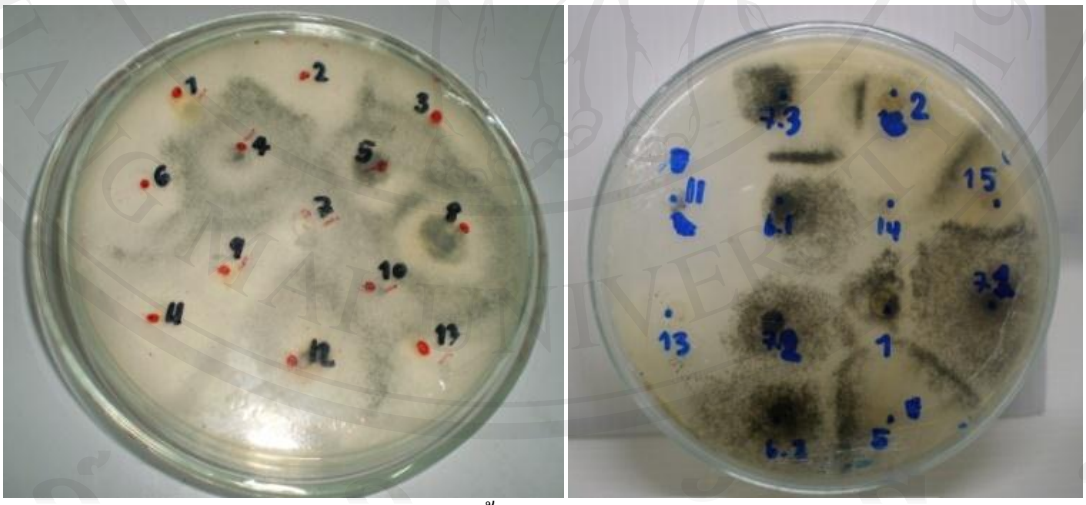
[2] เชื้อรา *A. apis* ไอโซเลท M2H2C3 ที่ถูกเลือกใช้ในการทดสอบความสามารถในการก่อโรคในตัวหนอนผึ้งพันธุ์ (กรรมวิธีที่ 1)

[3] เชื้อรา *A. apis* ไอโซเลท M2H2I1 ที่ถูกเลือกใช้ในการทดสอบความสามารถในการก่อโรคในตัวหนอนผึ้งพันธุ์ (กรรมวิธีที่ 2)

[4] เชื้อรา *A. apis* ไอโซเลท M2H2I2 ที่ถูกเลือกใช้ในการทดสอบความสามารถในการก่อโรคในตัวหนอนผึ้งพันธุ์ (กรรมวิธีที่ 3)

[5] เชื้อรา *A. apis* ไอโซเลท M2H2I3 ที่ถูกเลือกใช้ในการทดสอบความสามารถในการก่อโรคในตัวหนอนผึ้งพันธุ์ (กรรมวิธีที่ 4)

การตรวจยืนยันว่าเชื้อราที่ได้จากการเพาะเลี้ยงเป็นเชื้อราชนิดเดียวกัน ทำได้โดยการทดสอบการสืบพันธุ์แบบอาศัยเพศ โดยทำการตัดส่วนปลายของเส้นใยแต่ละไอโซเลทไปวางบนผิวหน้าอาหารเลี้ยงเชื้อในจานเดียวกัน เพื่อตรวจสอบความสัมพันธ์ของเชื้อราแต่ละคู่ไอโซเลท พบว่าบริเวณรอยต่อระหว่างเส้นใยในบางคู่ไอโซเลทมีแถบสีดำเกิดขึ้น (ภาพ 12)



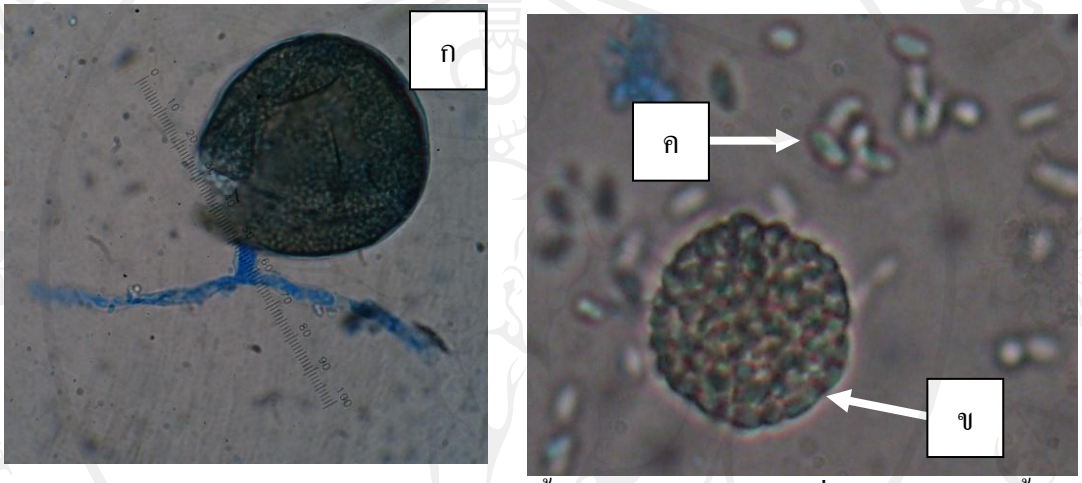
ภาพ 12 ลักษณะการเกิดแถบสีดำระหว่างเชื้อรา *A. apis* แต่ละไอโซเลท

4.3 การจำแนกชนิดเชื้อรา

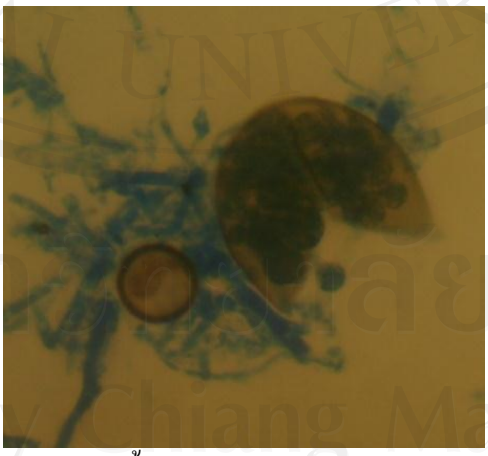
จากการตรวจสอบลักษณะรูปร่างของเชื้อราภายใต้กล้องจุลทรรศน์โดยเปรียบเทียบกับคู่มือการจำแนก พบว่าเชื้อราสาเหตุโรคชอล์คบรูดที่ได้จากการเพาะเลี้ยง มีลักษณะตรงตามการจัดจำแนก ซึ่งลักษณะตามข้อบ่งชี้จากคู่มือคือ เชื้อรา *A. apis* มีแอสโคมาสีน้ำตาลแดง ผนังเปราะบาง

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ขนาดน้อยกว่า 150 ไมโครเมตร ภายในบรรจุสปอร์บอลมากกว่าแปดหน่วย แต่ละหน่วยมีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางประมาณ 20 ไมโครเมตร มีผนังใสมองเห็นแอสโคสปอร์ได้ชัดเจน แอสโคสปอร์รูปทรงกลมรีขนาดกว้าง 1.2-2 ไมโครเมตร (ภาพ 13) และเมื่อเปรียบเทียบรูปร่างลักษณะที่สังเกตุเห็นภายใต้กล้องจุลทรรศน์ระหว่างเชื้อราที่ได้จากการเพาะเลี้ยงและตัวอย่างของเชื้อรา *A. apis* จาก ศวพ.ลำปาง (ภาพ 14) พบว่าเชื้อราจากทั้งสองแหล่งมีลักษณะเหมือนกัน



ภาพ 13 ภาพหน่วยสืบพันธุ์แบบอาศัยเพศของเชื้อรา *Ascosphaera apis* ที่ได้จากการเพาะเลี้ยงในห้องปฏิบัติการ (ก) ลักษณะของแอสโคมาภายใต้กล้องจุลทรรศน์กำลังขยาย 40 เท่า (ข) ลักษณะของสปอร์บอล หรือแอสคัส ภายใต้กล้องจุลทรรศน์กำลังขยาย 100 เท่า (ค) ลักษณะของแอสโคสปอร์ของเชื้อรา ภายใต้กล้องจุลทรรศน์กำลังขยาย 100 เท่า



ภาพ 14 ลักษณะของแอสโคมาจากเชื้อต้นแบบจากศูนย์วิจัยและพัฒนาการสัตวแพทย์ภาคเหนือตอนบน จังหวัดลำปาง (ศวพ. ลำปาง) กำลังขยาย 40 เท่า

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

4.4 การคัดเลือกเชื้อราสาเหตุโรคชอล์คบรูดในตัวหนอนผึ้งพันธุ์

ทำการย้ายตัวหนอนผึ้งจากรังผึ้งมาเลี้ยงในห้องปฏิบัติการก่อนการทดลอง 1 วัน เพื่อเป็นการคัดเลือกตัวหนอนที่ได้รับบาดเจ็บจากการเคลื่อนย้ายออกไปจากการทดลอง จากนั้นจึงทำการทดลองตามกรรมวิธี และดูแลอย่างระมัดระวัง ซึ่งจากการทดลองพบว่าหลังจากที่ย้ายตัวหนอนจากรังผึ้ง ผ่านไป 1 คืน จะพบตัวหนอนตายเนื่องจากได้รับบาดเจ็บจากการเคลื่อนย้าย จำนวนหนึ่ง และเหลือตัวหนอนที่ไม่ได้รับบาดเจ็บจากการเคลื่อนย้าย จึงเริ่มทำการทดลองในวันที่สอง

หลังจากที่ทำการทดลองตามกรรมวิธีแล้ว พบการเจริญของเส้นใยภายนอกลำตัวตั้งแต่วันที่ 4 หลังจากที่ตัวหนอนผึ้งได้รับเชื้อ และการตายเพิ่มขึ้นในวันที่ 5 และ 6 และไม่มีการตายเพิ่มขึ้นหลังจากวันที่ 6 จากตารางที่ 2 แสดงให้เห็นว่าเชื้อรา *A. apis* ไอโซเลท M2H2C3 สามารถทำให้ตัวหนอนตายได้มากที่สุดคือ 13 ตัว จากตัวหนอนทั้งหมด 15 ตัว รองลงมาคือ เชื้อรา *A. apis* ไอโซเลท M2H2I2 และ M2H2I3 ซึ่งสามารถทำให้ตัวหนอนตายได้ 12 และ 10 ตัว ตามลำดับ ส่วนเชื้อรา ไอ-โซเลท M2H2I1 สามารถทำให้ตัวหนอนตายได้เพียง 3 ตัว เมื่อทำการเปรียบเทียบข้อมูลโดยวิธี least significant difference (LSD) ที่ค่าความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์ พบว่าค่าความสามารถในการก่อโรคของเชื้อรา *A. apis* ไอโซเลท M2H2C3, M2H2I2 และ M2H2I3 ไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (ตาราง 2)

ลักษณะการเกิดโรคในขั้นแรกพบเส้นใยสีขาวเจริญออกมาจากผนังลำตัวของตัวหนอน เมื่อผ่านไป 1 วันพบว่าเส้นใยสีขาวได้เจริญเติบโตปกคลุมตัวหนอน และสร้างแอสโคมาบนเส้นใยนั้น ลักษณะการเกิดโรคแตกต่างจากการเกิดโรคในธรรมชาติ เนื่องจากในธรรมชาติตัวหนอนผึ้งอาศัยอยู่ในหลอดรวงที่มีพื้นที่จำกัด เมื่อเส้นใยเจริญออกมาจากตัวหนอนแล้ว เส้นใยเจริญล้อมรอบตัวหนอนทำให้ตัวหนอนตายเป็นแท่งคล้ายแท่งชอล์ค ซึ่งในการทดลอง ตัวหนอนผึ้งถูกวางไว้บนผ้าก๊อซ ทำให้เส้นใยที่เจริญออกมา สามารถเจริญเติบโตภายนอกตัวหนอนได้อย่างอิสระ ทำให้ซากตัวหนอนไม่มีลักษณะเป็นแท่งชอล์คดังที่พบเห็นได้ตามธรรมชาติ (ภาพ 15-16)

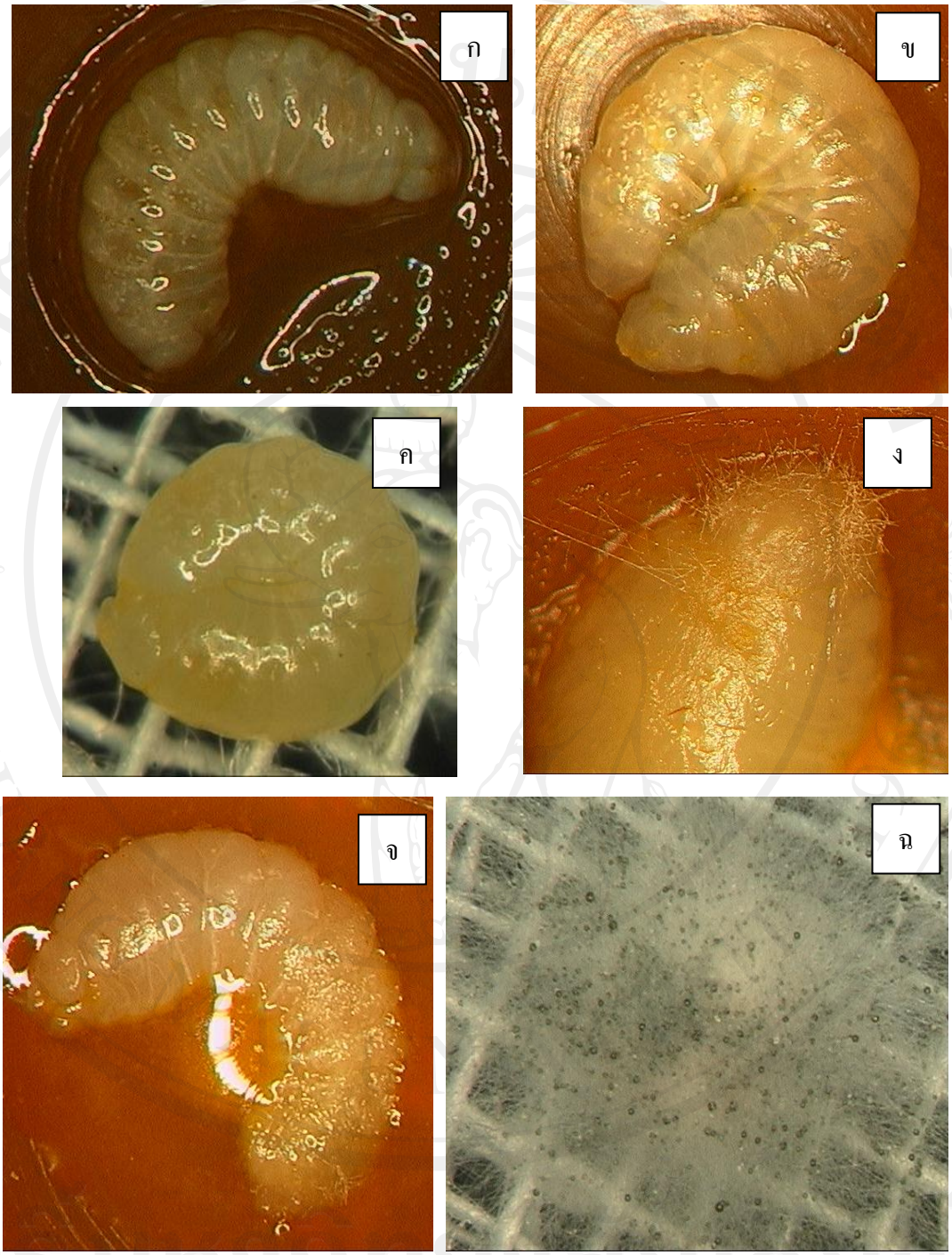
ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ตาราง 2 ปริมาณตัวหนอนที่ตายในแต่ละกรรมวิธี หลังจากตัวหนอนได้รับเชื้อ 7 วัน

ไอโซเลท	จำนวนตัวหนอนที่ตายจากทั้งหมด 15 ตัว (ตัว)	เปอร์เซ็นต์การตาย[1]
M2H2C3	13	86.67[a]
M2H2I1	3	20[b]
M2H2I2	12	80[a]
M2H2I3	10	66.67[a]
ควบคุม	0	0

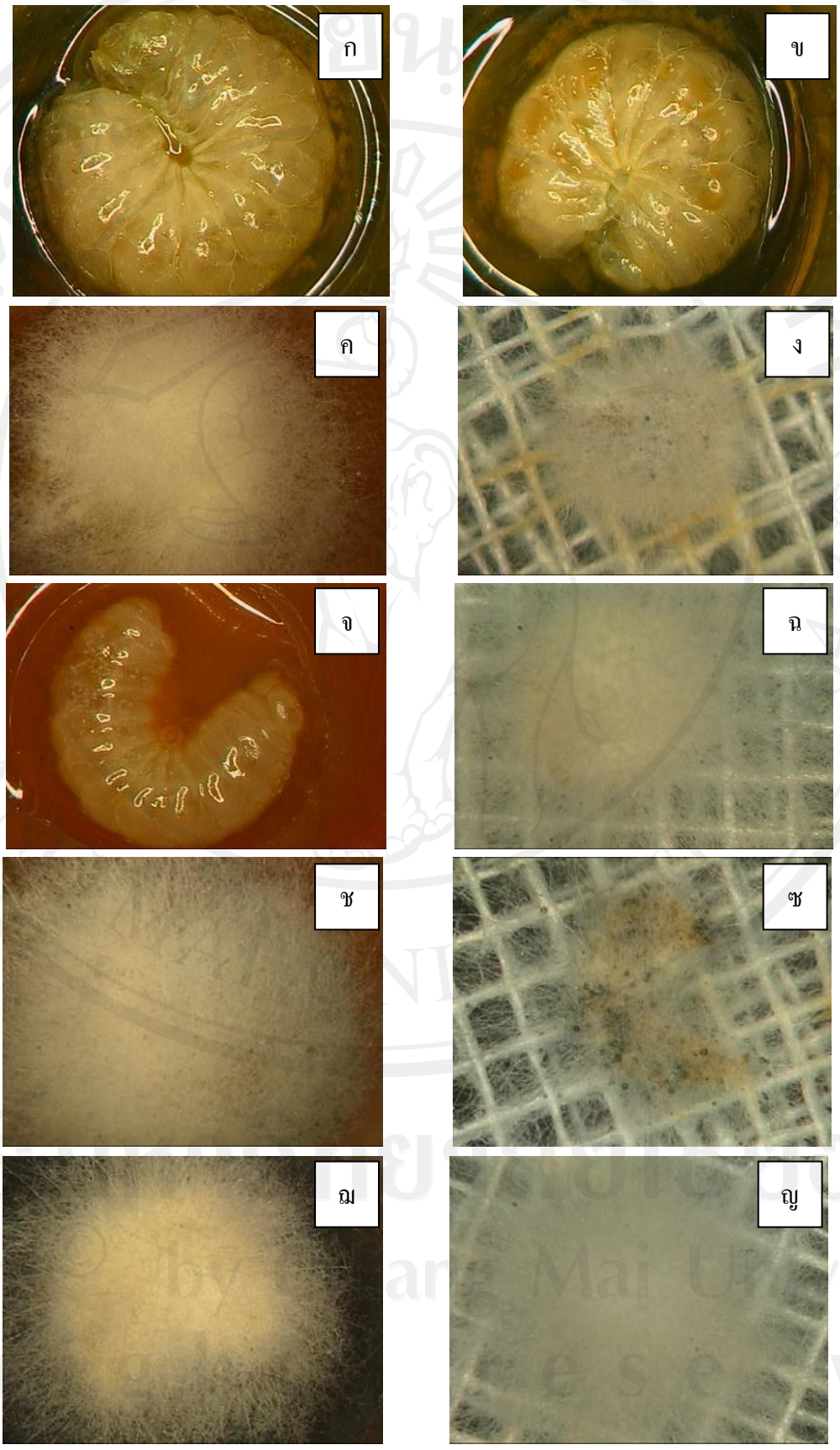
[1] เปอร์เซ็นต์การตายของตัวหนอนผึ้งที่ตามด้วยตัวอักษรที่เหมือนกันในสดมภ์เดียวกันไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเปรียบเทียบโดยวิธี least significant difference ที่ค่าความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved



ภาพ 15 ลักษณะของตัวหนอนผึ้งพันธุ์ (*A. mellifera*) ระหว่างการทดลอง (ก) ตัวหนอนผึ้งพันธุ์ขณะกินอาหารในถ้วยเพาะนางพญา (ข) ตัวหนอนผึ้งพันธุ์หลังจากกินอาหาร (ค) ตัวหนอนผึ้งบนผ้าก๊อซ (ง) การงอกของเส้นใยเชื้อราออกจากส่วนท้ายของลำตัว (จ) เส้นใยของเชื้อราเริ่มเจริญเติบโตภายนอกลำตัวของตัวหนอนผึ้ง (ฉ) ลักษณะการเกิดโรคของตัวหนอนผึ้งในการทดลอง โดยพบเส้นใยสีขาวและแอสโคมาปกคลุมลำตัวของหนอนผึ้ง

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved



ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ภาพ 16 ลักษณะของตัวหนอนผึ้งพันธุ์ (*Apis mellifera*) ในแต่ละกรรมวิธี เมื่อสิ้นสุดการทดลอง (ก-ข) ตัวหนอนผึ้งพันธุ์ (*Apis mellifera*)ในชุดควบคุมที่ไม่ได้รับอาหารที่ปนเปื้อนสปอร์ของเชื้อรา *A. apis* (ค-ง) ตัวหนอนผึ้งพันธุ์ (*Apis mellifera*) ที่ได้รับอาหารที่ปนเปื้อนสปอร์ของเชื้อรา *A. apis* ไอโซเลท M2H2C3 (จ-ฉ) ตัวหนอนผึ้งพันธุ์ (*Apis mellifera*) ที่ได้รับอาหารที่ปนเปื้อนสปอร์ของเชื้อรา *A. apis* ไอโซเลท M2H2I1 (ช-ซ) ตัวหนอนผึ้งพันธุ์ (*Apis mellifera*) ที่ได้รับอาหารที่ปนเปื้อนสปอร์ของเชื้อรา *A. apis* ไอโซเลท M2H2I2 (ฌ-ญ) ตัวหนอนผึ้งพันธุ์ (*Apis mellifera*) ที่ได้รับอาหารที่ปนเปื้อนสปอร์ของเชื้อรา *A. apis* ไอโซเลท M2H2I3

จากการทดลองพบว่า เชื้อรา *A. apis* ไอโซเลท M2H2C3 สามารถทำให้ตัวหนอนผึ้งตายได้มากที่สุด จากนั้นจึงขยายปริมาณเชื้อเพื่อใช้ในการทดลองขั้นต่อไป

4.5 การคัดกรองสารสกัดที่สามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อรา

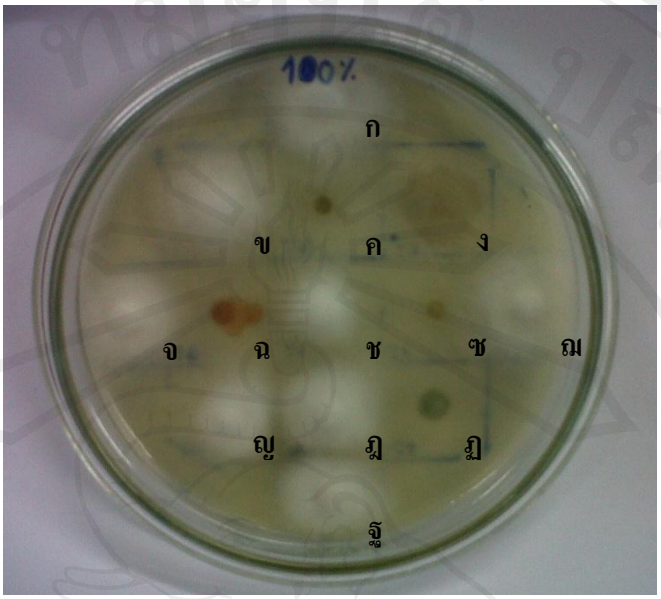
จากการทดลองได้มีการนำเอาสารสกัดจากพืชทั้งหมดสามกระบวนการ ได้แก่ สารสกัดหยาบโดยใช้แอลกอฮอล์ 95 เปอร์เซ็นต์ น้ำมันหอมระเหยและน้ำคั้นสดโดยพืชที่ถูกนำมาทดลองให้ผลการทดลองแตกต่างกัน

สารสกัดหยาบจากพืช

จากการทดสอบความสามารถในการยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อรา *A. apis* โดยใช้สารสกัดหยาบจากพืชทั้ง 10 ชนิด ใน 3 กรรมวิธี ได้แก่การหยดสารสกัดหยาบความเข้มข้น 100 เปอร์เซ็นต์ ลงบนกระดาษกรอง และนำไปวางบนผิวหน้าอาหารเลี้ยงเชื้อห่างจากปลายเส้นใย 5 มิลลิเมตร วิธีที่ 2 คือการหยดสารสกัดหยาบความเข้มข้น 100 เปอร์เซ็นต์ ลงบนผิวหน้าอาหารเลี้ยงเชื้อห่างจากปลายเส้นใย 5 มิลลิเมตร วิธีที่ 3 คือการหยดสารสกัดหยาบความเข้มข้น 100 เปอร์เซ็นต์ ลงบนเส้นใยของเชื้อรา *A. apis* โดยตรง พบว่า สารสกัดที่สามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อรา *A. apis* ได้ทั้ง 3 วิธีการ (ตาราง 3) คือ สารสกัดหยาบจากกานพลูและอบเชย

จากภาพที่ 17 พบว่าสารสกัดหยาบจากสาบแร้งสาบกาและใบพลู สามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของเส้นใยเชื้อราได้ 100 เปอร์เซ็นต์เช่นกัน แต่ไม่สามารถออกฤทธิ์ชะลอหรือยับยั้งการเจริญเติบโตของเส้นใยเชื้อราได้เมื่อทำการทดสอบด้วยวิธีการวางกระดาษกรองที่หยดสารสกัดและการหยดสารสกัดให้ห่างจากปลายเส้นใย 5 มิลลิเมตร ดังนั้นสารสกัดหยาบจากกานพลูและอบเชยจึงถูกคัดเลือกไปศึกษาถึงระดับความเข้มข้นต่อไป

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved



ภาพ 17 ผลการทดสอบความสามารถของสารสกัดหยาบจากพืช 10 ชนิด ในการยับยั้งการเจริญเติบโตของเส้นใยเชื้อรา โดยวิธีการหยดสารสกัดหยาบความเข้มข้น 100 เปอร์เซ็นต์ลงบนเส้นใยโดยตรง (ก) ผลการยับยั้งฯ ของสารสกัดหยาบจากแมะพะปิโด๊ะ (ข) ผลการยับยั้งฯ ของสารสกัดหยาบจากดาวกระจาย (ค) ผลการยับยั้งฯ ของสารสกัดหยาบจากสาบแร้งสาบกา (ง) ผลการยับยั้งฯของสารสกัดหยาบจากกานพลู (จ) ผลการยับยั้งฯ ของสารสกัดหยาบจากยูคาลิปตัส (ฉ) ผลการยับยั้งฯ ของสารสกัดหยาบจากอบเชย (ช) ผลการยับยั้งฯ ของสารสกัดหยาบจากหนอนตายหยาก (ซ) ผลการยับยั้งฯ ของสารสกัดหยาบจากใบพลู (ฌ) ผลการยับยั้งฯ ของสารสกัดหยาบจากยาสูบ (ญ) ผลการยับยั้งฯ ของสารสกัดหยาบจากมะเนียงน้ำ (ฎ) ผลการยับยั้งฯ ของแอลกอฮอล์ 95 เปอร์เซ็นต์ (ฏ) ผลการยับยั้งฯ ของยาต้านเชื้อรา (ฐ) ผลการยับยั้งฯ ของน้ำกลั่น

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ตาราง 3 ผลการทดสอบความสามารถของสารสกัดหยาบความเข้มข้น 100 เปอร์เซ็นต์ ในการยับยั้งการเจริญเติบโตของเส้นใยเชื้อรา *A. apis*

	ผลการยับยั้งการเจริญเติบโตของเส้นใยเชื้อรา *A. apis*		
	หยดสารบนกระดาษกรอง	หยดสารลงบนผิวหน้าอาหาร	หยดลงบนเส้นใยโดยตรง
แมะพะปิโด๊ะ	-	-	++
ดาวกระจาย	-	-	++
สาบแร้ง	-	-	+++
กานพลู	+	+	+++
ยูคาลิปตัส	-	-	-
อบเชย	+	+	+++
หนอนตายหยาก	-	-	-
ใบพลู	-	-	+++
ยาสูบ	-	-	-
มะเนียงน้ำ	-	-	-

– ไม่สามารถยับยั้งการเจริญเติบโตได้ เส้นใยของเชื้อราเจริญเติบโตอย่างปกติ

+ สามารถออกฤทธิ์ชะลอการเจริญเติบโตของเส้นใยได้ และเส้นใยเชื้อราสามารถเจริญข้ามผ่านจุดที่มีสารสกัดไปได้

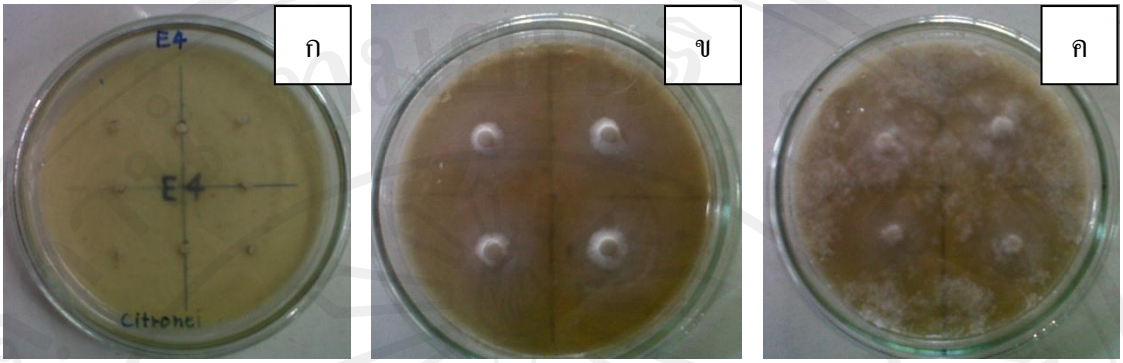
++ สามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของเส้นใยเชื้อราได้บางส่วน เส้นใยเชื้อราสามารถเจริญเติบโตได้อย่างช้า ๆ

+++ สามารถยับยั้งการเจริญเติบโตได้อย่างสมบูรณ์ ไม่พบเส้นใยของเชื้อราเจริญเติบโตได้

น้ำมันหอมระเหยจากพืช

จากการทดสอบความสามารถของน้ำมันหอมระเหยจากพืชทั้ง 9 ชนิด ในการยับยั้งการเจริญเติบโตของเส้นใยเชื้อรา *A. apis* โดยการหยดน้ำมันหอมระเหยความเข้มข้น 100 เปอร์เซ็นต์ ลงบนเส้นใยโดยตรง พบว่ามีน้ำมันหอมระเหย 7 ชนิด สามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อรา *A. apis* ได้ 100 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งได้แก่ น้ำมันหอมระเหยจากโรสแมรี่ ตะไคร้หอม เจอราเนียม ยูคาลิปตัส ลาเวนเดอร์ สะระแหน่ และสเปียร์มินต์ (ภาพ 18)

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved



ภาพ 18 ผลการทดสอบความสามารถการยับยั้งการเจริญเติบโตของเส้นใยเชื้อรา *A. apis* ด้วยวิธีการหยดน้ำมันหอมระเหยเข้มข้น 100 เปอร์เซ็นต์ลงบนเส้นใยโดยตรง (ก) ผลของการหยดน้ำมันตะไคร้หอมลงบนเส้นใย ทำให้เกิดการยับยั้งการเจริญเติบโตของเส้นใยเชื้อรา *A. apis* ได้ 100 เปอร์เซ็นต์ (ข) ผลของการหยดน้ำมันหอมระเหยจากส้มลงบนเส้นใย พบว่าไม่สามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของเส้นใยเชื้อรา *A. apis* ได้ (ค) การเจริญเติบโตของเส้นใยเชื้อรา *A. apis* ในชุดควบคุมที่ไม่มีการหยดสารใด ๆ ลงบนเส้นใย

น้ำคั้นสดจากพืชสมุนไพร

จากการทดสอบความสามารถในการยับยั้งการเจริญเติบโตของเส้นใยเชื้อรา *A. apis* โดยการหยดน้ำคั้นสดจากพืชสมุนไพรเข้มข้น 100 เปอร์เซ็นต์ ลงบนเส้นใยโดยตรง พบว่าไม่มีสารใดที่สามารถออกฤทธิ์ยับยั้งการเจริญเติบโตของเส้นใยเชื้อราได้ จึงไม่มีการศึกษาถึงระดับความเข้มข้นของน้ำคั้นสดจากพืช

4.6 การศึกษาความเข้มข้นของสารสกัดจากพืช

สารสกัดหยาบจากพืช

จากการทดสอบความสามารถในการยับยั้งการเจริญเติบโตของเส้นใยเชื้อรา *A. apis* ของสารสกัดหยาบจากกานพลูและอบเชยที่ระดับความเข้มข้นต่าง ๆ พบว่า ค่าเปอร์เซ็นต์การยับยั้งการเจริญเติบโตของเส้นใยเชื้อราที่ระดับความเข้มข้น 10 เปอร์เซ็นต์ถึง 90 เปอร์เซ็นต์ โดยปริมาตร สารสกัดหยาบจากกานพลูมีค่าเปอร์เซ็นต์การยับยั้งฯ ได้ดีกว่าอบเชย (ตาราง 4) และพบว่าที่ระดับความเข้มข้น 100 เปอร์เซ็นต์โดยปริมาตร สารสกัดหยาบจากอบเชยสามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของเส้นใยเชื้อรา *A. apis* ได้ 100 เปอร์เซ็นต์

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ตาราง 4 ผลของความเข้มข้นต่าง ๆ ของสารสกัดหยาบจากกานพลูและอบเชย

ความเข้มข้น (เปอร์เซ็นต์)	ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางโดยเฉลี่ยของเชื้อรา (ซม.)		ผลการยับยั้งการเจริญเติบโต (เปอร์เซ็นต์)[1/]	
	กานพลู	อบเชย	กานพลู	อบเชย
10	6.80±0.31	7.58±0.26	19.53^{e}	10.36^{e}
20	6.68±0.47	6.80±0.21	21.01^{e}	19.53^{de}
30	5.55±0.55	6.58±0.55	34.32^{de}	22.19^{cde}
40	5.25±0.18	6.40±0.10	37.87^{de}	24.26^{cde}
50	4.28±0.45	5.45±0.11	49.41^{cd}	35.50^{cde}
60	3.85±0.29	5.30±0.37	54.44^{cd}	37.28^{cde}
70	3.18±0.11	5.13±0.18	62.43^{bc}	39.35^{cd}
80	1.30±1.30	4.22±0.08	84.62^{ab}	50.00^{bc}
90	0.85±0.86	2.30±2.31	89.94^{a}	72.78^{ab}
100	0.83±0.84	0	90.24^{a}	100.00^{a}
ยาต้านเชื้อรา	0		100	
แอลกอฮอล์ 95%	7.55		10.65	
น้ำกลั่น	8.45		0	

[1] เปอร์เซ็นต์การยับยั้งการเจริญเติบโตที่ตามด้วยตัวอักษรที่เหมือนกันในสดมภ์เดียวกันไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเปรียบเทียบโดยวิธี least significant difference ที่ค่าความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์

น้ำมันหอมระเหย

จากการทดสอบความสามารถในการยับยั้งการเจริญเติบโตของน้ำมันหอมระเหยที่ระดับความเข้มข้นต่าง ๆ พบว่าผลการการทดสอบการยับยั้งการเจริญเติบโตที่ระดับความเข้มข้น 1 ถึง 6 เปอร์เซ็นต์ น้ำมันตะไคร้หอมให้ผลในการยับยั้งได้ดีกว่าน้ำมันหอมระเหยชนิดอื่น ๆ อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ที่ระดับความเข้มข้น 6 เปอร์เซ็นต์ พบว่า น้ำมันเจอราเนียม สเปียร์มินต์ สามารถยับยั้งการเจริญเติบโตได้ดีกว่าน้ำมันตะไคร้หอม คือ 95.08, 92.62 และ 90.98 เปอร์เซ็นต์ตามลำดับ และน้ำมันหอมระเหยที่สามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อราได้ 100 เปอร์เซ็นต์ที่ความเข้มข้น 8 เปอร์เซ็นต์ ได้แก่ น้ำมันเจอราเนียม ลาเวนเดอร์ ตะไคร้หอม สเปียร์มินต์ และเปปเปอร์มินต์ ส่วนที่ระดับความเข้มข้น 10 เปอร์เซ็นต์ พบว่าเปอร์เซ็นต์การยับยั้งการเจริญเติบโตของลาเวนเดอร์ลดลง

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

จาก 100 เปอร์เซ็นต์ เป็น 97.54 เปอร์เซ็นต์ ส่วนน้ำมันยูคาลิปตัสและโรสแมรี่ ต้องใช้ที่ความเข้มข้นสูงกว่า 10 เปอร์เซ็นต์ จึงจะสามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อราได้ 100 เปอร์เซ็นต์ ดังตารางที่ 5

ตาราง 5 เปอร์เซ็นต์การยับยั้งของน้ำมันหอมระเหยแต่ละชนิดที่ระดับความเข้มข้นต่าง ๆ

น้ำมันหอมระเหย	การจัดกลุ่ม[1/]	เปอร์เซ็นต์การยับยั้งที่ระดับความเข้มข้นต่าง ๆ (%)					
		1%(v/v	2%(v/v)	4%(v/v)	6%(v/v)	8%(v/v)	10%(v/v)
Geranium	**AB**	**27.05**	**59.84**	**62.30**	**95.08**	**100**	**100**
Lavender	B	22.95	28.69	70.49	68.03	100	97.54
Citronella	**A**	**64.75**	**77.05**	**82.79**	**90.98**	**100**	**100**
Spearmint	B	20.49	29.51	59.84	92.62	100	100
Peppermint	BC	34.43	33.61	42.62	56.56	100	100
Rosemary	D	29.51	30.33	34.43	34.43	35.25	39.34
Eucalyptus	CD	20.49	34.43	49.18	42.62	73.77	69.67

[1] ตัวอักษรที่เหมือนกันในสดมภ์เดียวกันไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเปรียบเทียบโดยวิธี least significant difference ที่ค่าความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved