

## บทที่ 5

### วิจารณ์ผลการทดลอง

#### 5.1 การสำรวจและรวบรวมเชื้อราสาเหตุโรคขอล้ครบรูจากฟาร์มผึ้ง

ชาวมัมมี่ที่ได้จากการเก็บตัวอย่างมีทั้งมัมมี่ที่มีสีดำ และสีขาว โดยสังเกตการเกิดโรคในระยะแรกพบว่าชาวมัมมี่ไม่มีความแตกต่างกัน เพราะพบว่าการสร้างเส้นใยสีขาวในลักษณะเดียวกัน ซึ่งเมื่อเส้นใยเชื้อราห่อหุ้มลำตัวแล้ว ชาวมัมมี่บางตัวเริ่มกลายเป็นสีดำ แต่บางตัวไม่มีการเปลี่ยนแปลงของสีแต่อย่างใด เมื่อนำชาวมัมมี่ไปตรวจดูภายใต้กล้อง พบว่าสีดำที่เกิดขึ้นเป็นสีของสปอร์ของเชื้อราซึ่งมีสีน้ำตาล เมื่ออยู่กันอย่างหนาแน่น จึงทำให้มองเห็นเป็นสีดำ ส่วนชาวมัมมี่สีขาวไม่พบสปอร์แต่อย่างใด ซึ่ง Aronstein and Murray (2010) ได้อธิบายว่าการที่ชาวมัมมี่มีทั้งที่สร้างสปอร์และไม่สร้างสปอร์อาจมีผลเนื่องมาจากหลายสาเหตุ เช่น เส้นใยที่เจริญขึ้นบนตัวหนอนมีเพียงเพศเดียว ทำให้ไม่สามารถสร้างเซลล์สืบพันธุ์ได้ จึงมองเห็นเป็นตัวมัมมี่สีขาวซึ่งเป็นสีของเส้นใย ส่วนมัมมี่สีดำเกิดจากการที่มีเส้นใยต่างเพศในตัวหนอนตัวเดียวกัน เมื่อเส้นใยต่างเพศผสมส่วนที่สร้างเซลล์สืบพันธุ์ ทำให้เกิดการสืบพันธุ์แบบอาศัยเพศ และสร้างเซลล์สืบพันธุ์ที่มองเห็นด้วยตาเปล่าเป็นสีดำ ซากตัวหนอนที่พบที่บริเวณพื้นรังและหน้ารัง มักเป็นซากที่มีการสร้างสปอร์แล้ว ส่วนซากตัวหนอนที่พบในหลอดรวง ส่วนใหญ่พบเป็นซากตัวหนอนสีขาว เนื่องจากระยะเวลาเกิดโรคของตัวหนอนอยู่ในช่วงของการสร้างเส้นใยเจริญภายนอกลำตัว และบางตัวเปลี่ยนสีดำเมื่อเวลาผ่านไป และยังอธิบายเพิ่มเติมว่า ตัวหนอนสิ่งที่ถูกปกคลุมด้วยเส้นใยมีการยืดตัวออกไปในสภาพที่เหยียดตรง และตัวหนอนจะบวมจนเต็มหลอดรวง และตัวหนอนตายเนื่องจากเชื้อราดูดกินสารอาหารในร่างกาย ซากตัวหนอนสิ่งที่ถูกปกคลุมด้วยเส้นใยเชื้อราในช่วงแรกลำตัวยังอ่อนนุ่ม แต่หลังจากนั้นไม่นาน ตัวหนอนจะแห้ง แข็ง และตัวหดสั้นลง ทำให้ตัวหนอนมีลักษณะเป็นมัมมี่ ดังนั้นจึงสอดคล้องกับผลที่ได้ คือ ซากตัวหนอนที่พบในหลอดรวงจะมีลักษณะลำตัวยังอ่อนนุ่ม มักมีสีขาว หรือ เทา ส่วนซากตัวหนอนที่พบบริเวณพื้นภายในรังมักมีลักษณะที่แห้งและเหี่ยวมากกว่ากว่าซากที่พบในหลอดรวง แต่ยังไม่แข็งมากนัก และมีส่วนหนึ่งที่มีลักษณะเดียวกับที่พบภายนอก รัง คือซากตัวหนอนมีลักษณะแห้ง เหี่ยว และแข็งมาก

## 5.2 การเพาะเลี้ยงเชื้อรา

ก่อนการเพาะเลี้ยงเชื้อราบนอาหารวุ้น จำเป็นที่จะต้องทำการล้างทำความสะอาดผิวนอกของตัวอย่างก่อนเสมอ เพื่อป้องกันเชื้อปนเปื้อนอื่น ๆ ที่อยู่บนผิวนอกของตัวอย่าง ซึ่งในการทดลองได้ทำการเปรียบเทียบกับตัวหนอนฝั่สุขภาพดี พบว่าเมื่อล้างด้วยวิธีเดียวกันแล้ว พบว่ามีการเจริญเติบโตของเส้นใยบนซากตัวหนอนฝั่ที่เป็นโรคชอล์คบรูดเท่านั้น

หลังจากการแยกเส้นใยจากตัวอย่างฝั่ไปเลี้ยงบนอาหารเลี้ยงเชื้อ PDAY พบว่ามีการเจริญเติบโตของเส้นใยในลักษณะต่าง ๆ และพบว่าบางโคโลนีไม่สร้างเซลล์สืบพันธุ์ซึ่งทราบได้โดยการสังเกตสีของโคโลนี คือ ไม่มีเม็ดสีดำเกิดขึ้นบนโคโลนีของเชื้อรา จึงทำการทดสอบความสัมพันธ์ของเชื้อรา ไอโซเลทต่าง ๆ ที่แยกได้จากตัวอย่าง โดยการวางเส้นใยของแต่ละไอโซเลท ลงบนอาหารเลี้ยงเชื้อในจานเดียวกัน โดยจัดให้เชื้อราแต่ละไอโซเลทมีโอกาสสร้างเส้นใยขึ้นมาสัมผัสกันได้ จากการทดลองพบว่า ที่ระหว่างรอยต่อของเส้นใยแต่ละไอโซเลท มีแถบสีดำปรากฏขึ้น ซึ่งเมื่อตรวจดูภายใต้กล้องจุลทรรศน์พบว่า แถบสีดำเกิดจากการรวมตัวกันของแอสโคมา ที่เชื้อราแต่ละไอโซเลทสร้างเส้นใยมาสัมผัสกัน และเกิดการสืบพันธุ์ขึ้น ในบางคู่ไอโซเลทไม่พบการสร้างแถบสปอร์สีดำ แต่เมื่อสังเกตดูรอยต่อระหว่างเชื้อราไอโซเลทดังกล่าวกับเชื้อราไอโซเลทอื่นแล้ว พบว่ามีการสร้างสปอร์เกิดขึ้น จึงสามารถยืนยันได้ว่าเชื้อราเหล่านี้เป็นเชื้อราชนิดเดียวกัน ซึ่งการทดสอบดังกล่าวสอดคล้องกับการรายงานของ Geremew (2006) ที่อธิบายว่าเชื้อราสาเหตุโรคชอล์คบรูดนั้น สามารถตรวจยืนยันเชื้อราชนิดเดียวกันได้ โดยการทดสอบการสืบพันธุ์แบบอาศัยเพศ และพบว่าการทดสอบแบบเดียวกันในรายงานของ Aronstein and Murray (2010), Yakobson (2005) และ Christensen and Gilliam (1983)

## 5.3 การจำแนกชนิดเชื้อรา

จากการจัดจำแนกเชื้อราที่ได้จากการเพาะเลี้ยงในห้องปฏิบัติการนั้น ทำได้ง่ายเนื่องจากรูปร่างลักษณะของเชื้อราก่อโรคชอล์คบรูดนั้น มีความแตกต่างจากเชื้อราชนิดอื่น ๆ อย่างชัดเจน โดยทั่วไปนิยมใช้เซลล์สืบพันธุ์ในการจำแนกชนิด ซึ่งลักษณะของเชื้อราแต่ละไอโซเลทที่แยกได้นั้น มีลักษณะสอดคล้องกับคู่มือวินิจฉัยจากรายงานของ Bissett (1988) และเมื่อเปรียบเทียบกับตัวอย่างเชื้อราสาเหตุโรคชอล์คบรูดจาก ศวพ.ลำปาง พบว่ามีลักษณะของโครงสร้างเซลล์สืบพันธุ์ที่เหมือนกัน

#### 5.4 การคัดเลือกเชื้อราสาเหตุโรคขอล้คบุตรในตัวหนอนฝัองพันธุ์

การทดสอบการก่อโรคในตัวหนอนฝัองพันธุ์นั้น ในเบื้องต้นได้ทำการทดลองโดยใช้สารละลายน้ำฝัอง 40 เปอร์เซ็นต์ เป็นอาหาร ซึ่งอ้างอิงจากรายงานของ Geremew (2006) และทำการเลี้ยงดูตัวอ่อนโดยอ้างอิงจากรายงานของ Yakobson (2005) และเริ่มทำการทดลองโดยการป้อนอาหารที่ปนเปื้อนเชื้อราทันทีที่ย้ายตัวหนอนมาจากหลอดรวง พบว่า เมื่อผ่านไปเพียงหนึ่งวัน มีตัวหนอนตายในลักษณะซากตัวหนอนเป็นแผลสีดำ ซึ่งเกิดจากการบาดเจ็บเนื่องจากการเคลื่อนย้ายตัวหนอนจากรังฝัอง ทำให้ในแต่ละกรรมวิธีมีตัวหนอนไม่เท่ากัน ต่อมาพบว่าเกิดปัญหาตัวหนอนตายขณะลอกคราบ และคงเหลือตัวหนอนที่เกิดโรคขอล้คบุตรในปริมาณน้อย เนื่องจากตัวหนอนตายก่อนแสดงอาการของโรคขอล้คบุตร เมื่อประยุกต์การทดลอง โดยอ้างอิงจากรายงานของ Silva *et al.* (2009) พบว่าตัวหนอนสามารถรอดชีวิตได้ และทำให้ผลการทดลองเป็นไปตามที่คาดหว้ง

#### 5.5 การคัดกรองสารสกัดที่สามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อรา

##### สารสกัดหยาบจากพืช

สารสกัดหยาบจากพืชที่ใช้ในการทดลองสกัดโดยใช้ แอลกอฮอล์ 95 เปอร์เซ็นต์ แบ่งออกเป็น 2 กลุ่ม คือกลุ่มที่ได้ผ่านการระเหยตัวทำละลายออก 50 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งได้แก่ มะพะปิโต๊ะดาวกระจาย สาบแร้งสาบกา หนอนตายอยาก ใบพลู ยาสูบ และมะเนียงน้ำ และกลุ่มที่ไม่ผ่านการระเหยตัวทำละลาย ซึ่งได้แก่ กานพลู ยูคาลิปตัส และอบเชย การสกัดด้วยแอลกอฮอล์ 95 เปอร์เซ็นต์ สามารถสกัดสารออกมาได้บางส่วน ซึ่งเมื่อเปรียบเทียบกับรายงานของ ภาณุวรรณ และคณะ (2547) พบว่าตัวทำละลายที่สามารถสกัดสารออกฤทธิ์ออกมาได้ดีที่สุดคือ เฮกเซน และในรายงานฉบับเดียวกัน พบว่ามีความสอดคล้องกับผลการทดลองที่ได้ คือ สารสกัดหยาบจากกานพลู ใบพลู และอบเชย ที่สกัดด้วยตัวทำละลาย แอลกอฮอล์ 95 เปอร์เซ็นต์ ให้ผลการยับยั้งการเจริญเติบโตได้ดีใน ความเข้มข้นที่แตกต่างกันออกไป ในการทดลองนี้ ได้ศึกษาเฉพาะสารสกัดหยาบที่ใช้แอลกอฮอล์ 95 เปอร์เซ็นต์ และคัดกรองสารสกัดหยาบโดยพิจารณาจากผลการยับยั้งการเจริญเติบโต 3 วิธีการ ซึ่งพบว่า สารสกัดที่สามารถออกฤทธิ์ยับยั้งการเจริญเติบโตของเส้นใยเชื้อราได้ทั้ง 3 วิธีการ มีเพียง 2 ชนิดคือ สารสกัดหยาบจากกานพลูและอบเชย จึงนำสารสกัดทั้ง 2 ชนิดไปศึกษาทดลองในขั้นตอนต่อไป

##### น้ำมันหอมระเหย

จากการทดสอบความสามารถในการยับยั้งการเจริญเติบโตของเส้นใยเชื้อราสาเหตุโรคขอล้คบุตรด้วยการหยดน้ำมันหอมระเหยความเข้มข้น 100 เปอร์เซ็นต์ลงบนเส้นใยของเชื้อราโดยตรง พบว่า น้ำมันหอมระเหย 7 ชนิด จาก 9 ชนิด สามารถยับยั้งการเจริญเติบโตได้ 100

เปอร์เซ็นต์ ซึ่งได้แก่ น้ำมันหอมระเหยจากเจอร์ราเนียม ลาเวนเดอร์ ตะไคร้หอม เปปเปอร์มินต์ สเปียร์มินต์ ยูคาลิปตัส และ โรสแมรี่ ซึ่งพบว่าไม่มีการเจริญเติบโตของเส้นใยเพิ่มขึ้นจากเดิม เมื่อเปรียบเทียบกับเส้นใยที่หยดน้ำมันหอมระเหยจากหญ้าแฝก และ ส้ม และเส้นใยในชุดควบคุมที่ไม่สามารถควบคุมเชื้อราก่อโรคชอล์คบรูคได้ พบว่ามีการเจริญเติบโตของเส้นใยจนเต็มผิวหน้าอาหารเลี้ยงเชื้อ จึงทำการคัดเลือกน้ำมันหอมระเหยที่มีศักยภาพทั้ง 7 ชนิด ไปศึกษาถึงระดับความเข้มข้นที่สามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของเส้นใยเชื้อราสาเหตุโรคชอล์คบรูค

### น้ำคั้นจากพืช

จากการทดลองพบว่าน้ำที่ได้จากการบีบคั้นจากพืช ในปริมาณ 10 ไมโครลิตรนั้น ไม่สามารถออกฤทธิ์ยับยั้งการเจริญเติบโตของเส้นใยเชื้อรา *A. apis* ได้ อาจเพราะว่าในน้ำคั้นที่ได้มีสารออกฤทธิ์อยู่ในระดับต่ำ จึงทำให้ไม่เกิดผล หรืออาจเป็นเพราะว่าสารที่ออกฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อราที่มีในพืชเหล่านี้ ไม่สามารถละลายได้ในน้ำ จึงทำให้ของเหลวที่ได้จากการบีบคั้นนั้นไม่สามารถออกฤทธิ์ยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อราได้ ซึ่งจากรายงานของ ภานุวรรณ และคณะ (2547) ที่รายงานผลเปรียบเทียบประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อรา *A. apis* ซึ่งในรายงานได้ให้ข้อมูลว่าสารสกัดที่ใช้ น้ำกลั่นเป็นตัวทำละลายนั้น ไม่สามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของเส้นใยเชื้อราก่อโรคชอล์คบรูคได้

## 5.6 การศึกษาความเข้มข้นของสารสกัด

### สารสกัดหยาบจากพืช

จากการวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติพบว่าความสามารถในการยับยั้งการเจริญเติบโตของเส้นใยเชื้อราของสารสกัดหยาบจากกานพลูและอบเชย กานพลูให้ผลในการยับยั้งได้มากกว่าอบเชย โดยเมื่อเปรียบเทียบในช่วงความเข้มข้นเดียวกันพบว่า กานพลูให้ผลการยับยั้งได้ดีกว่าอบเชย โดยเมื่อความเข้มข้นสูงขึ้น ความสามารถในการยับยั้งการเจริญเติบโตสูงขึ้นตามไปด้วย ซึ่งถึงแม้อบเชยจะให้ผลการควบคุมได้ 100 เปอร์เซ็นต์ ที่ความเข้มข้น 100 เปอร์เซ็นต์ แต่เมื่อเปรียบเทียบกันแล้วพบว่าที่ความเข้มข้น 100 เปอร์เซ็นต์ สารสกัดทั้งสองชนิดไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ Calderone *et al.* (1994) ได้รายงานผลการทดลองการใช้ น้ำมันหอมระเหยจากอบเชยและกานพลู พบว่า น้ำมันอบเชยความเข้มข้นเพียง 100 ppm สามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อราสาเหตุโรคชอล์คบรูคได้ถึง 168 ชั่วโมง ซึ่งที่ค่าความสามารถเดียวกัน ต้องใช้น้ำมันกานพลูที่มีความเข้มข้นถึง 1,000 ppm ซึ่งผลการทดลองที่แตกต่างกันนี้อาจเนื่องมาจากกรรมวิธีในการสกัดที่แตกต่างกัน ทำให้ได้สารที่ออกฤทธิ์ในปริมาณที่แตกต่างกัน ผลการทดลองที่ได้จึงมีความแตกต่าง

กันตามไปด้วย ซึ่งในการทดลองนี้ใช้สารสกัดที่ใช้แอลกอฮอล์ 95 เปอร์เซ็นต์เป็นตัวทำละลาย และ สารสกัดหยาบจากทั้งกานพลูและอบเชยนั้น ไม่ได้มีการระเหยเอาตัวกลางออกก่อนที่จะนำทดสอบ กับเชื้อรา จึงทำให้ผลการทดสอบให้ผลการยับยั้งที่ความเข้มข้นสูงกว่าในรายงานอื่น ๆ

#### น้ำมันหอมระเหย

จากการวิเคราะห์ผลข้อมูลทางสถิติได้ว่า น้ำมันหอมระเหยจากตะไคร้หอม และเจอรานิยม ให้ผลการยับยั้งได้ดีกว่าน้ำมันหอมระเหยจากพืชชนิดอื่น ๆ สอดคล้องกับรายงานของ Calderone *et al.* (1994) ซึ่งรายงานผลการใช้ citronellal และ camphor (องค์ประกอบหนึ่งของน้ำมันตะไคร้หอม) ในการยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อราก่อโรคชอล์คบรูดไว้ว่า สารทั้ง 2 ชนิดสามารถยับยั้งการเจริญเติบโตได้ 72 ชั่วโมง ที่ความเข้มข้น 100 ppm สำหรับ camphor ที่ระดับความเข้มข้น 10,000 ppm และ citronellal ที่ความเข้มข้น 1,000 ppm สามารถยับยั้งได้นานถึง 168 ชั่วโมง

น้ำมันตะไคร้หอมให้ผลการยับยั้งการเจริญเติบโตของเส้นใยเชื้อราสาเหตุโรคชอล์คบรูด ในฟัซงพันธุ์ได้ดีที่สุด โดยสามารถยับยั้งการเจริญเติบโตได้ 100 เปอร์เซ็นต์ ที่ความเข้มข้น 8 เปอร์เซ็นต์ขึ้นไป พบว่าที่ระดับความเข้มข้น 6 เปอร์เซ็นต์ น้ำมันเจอรานิยมและสเปียร์มินต์ สามารถยับยั้งได้มากกว่าตะไคร้หอม แต่ไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ เมื่อพิจารณาความสามารถในการยับยั้งการเจริญเติบโตในทุกระดับความเข้มข้นแล้ว พบว่า น้ำมันตะไคร้หอม สามารถยับยั้งการเจริญเติบโตได้ดีที่สุด โดยไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติกับน้ำมันเจอรานิยม Aronstein and Murray (2010) รายงานว่าสารออกฤทธิ์สำคัญที่สามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อราได้ดีที่สุดประกอบไปด้วย citral, geraniol และ citronellal ซึ่งพบว่า สารทั้ง 3 ชนิดเป็นส่วนประกอบสำคัญในน้ำมันตะไคร้หอม และพบ geraniol และ citronellol ใน น้ำมันเจอรานิยมด้วย (สำนักงานข้อมูลสมุนไพร, 2555; สำนักงานเทศบาลตำบลบางวัว, 2555) และพบรายงานว่าสเปียร์มินต์มีความสามารถในการยับยั้งการเจริญเติบโตของเส้นใยเชื้อรา *Ascosphaera apis* คิวย (Chantawannakul *et al.*, 2005)

ในการศึกษาครั้งนี้ใช้น้ำมันหอมระเหยที่มีจำหน่ายทั่วไปซึ่งอาจมีการผสมตัวทำละลาย ชนิดอื่น ๆ เข้าไปเพื่อวัตถุประสงค์ทางการค้า จึงทำให้ผลการทดลองที่ได้ มีความแตกต่างกับ รายงานของ Davis and Ward (2003) ซึ่งได้รายงานอัตราความเข้มข้นต่ำสุดของน้ำมันหอมระเหยที่ สามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อราสาเหตุโรคชอล์คบรูดได้ 100 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งได้แก่ น้ำมันหอมระเหยจาก *Eucalyptus citrodora* สามารถยับยั้งการเจริญเติบโตได้ที่ความเข้มข้น 250 ppm (0.025 % (v/v)) น้ำมันหอมระเหยจากลาเวนเดอร์ สามารถยับยั้งการเจริญเติบโตที่ความเข้มข้น 500 ppm (0.05 % (v/v)) ส่วนน้ำมันหอมระเหยจาก *Eucalyptus globulus* โรสแมรี่ และเปปเปอร์มินต์ สามารถยับยั้งการเจริญเติบโตที่ความเข้มข้นมากกว่า 1,000 ppm (0.1 % (v/v)) ตามลำดับ