Received: April 8, 2020 **Revised:** May 7, 2020 **Accepted:** May 11, 2020

การรอดชีวิตของแบคทีเรียกรดแลคติกในเรณูผึ้งสำหรับเลี้ยงผึ้งพันธุ์
SURVIVAL OF LACTIC ACID BACTERIA IN BEE POLLEN FOR BEEKEEPING (*APIS MELLIFERA L.*)

วนิดา ชื่นชัน[1,*] บุญมี กวินเสกสรรค์[1] สมบัติ ทีฆทรัพย์[1] วรรณกร กิจจะ[1]
รัชนู เมยดง[1] สมศักดิ์ อยู่บริบูรณ์[1] และ ธนพงศ์ สำเภาลอย[2]
[1]สาขาวิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยราชภัฏบ้านสมเด็จเจ้าพระยา
[2] ศูนย์ส่งเสริมเทคโนโลยีการเกษตรด้านแมลงเศรษฐกิจ จังหวัดเชียงใหม่
Wanida Chuenchan[1], Boonmee Kavinseksan[1], Sombat Teekasap[1], Wannakorn Kitcha[1],
Ratchanu Meidong[1], Somsak Yooboriboon[1] and Thanaphong Sumpaoloi[2]
[1]Department of Biology, Faculty of Science and Technology, Bansomdejchaopraya Rajabhat University
[2]Agricultural Technology Promotion Center (Economic insects) Chiangmai Province
E-mail: wanida.ch@bsru.ac.th

บทคัดย่อ

งานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาการรอดชีวิตของแบคทีเรียกรดแลคติกในเรณูผึ้ง และในทางเดินอาหารของผึ้งพันธุ์ที่ได้รับเรณูผึ้งผสมแบคทีเรียกรดแลคติก โดยใช้เชื้อ 4 สายพันธุ์ ได้แก่ *Lactobacillus casei* TISTR 390, *L. plantarum* TISTR 541, *L. curvatus* TISTR 938 และ *L. acidophilus* TISTR 2365 ปริมาณเชื้อเริ่มต้นเท่ากับ 10^8 ซีเอฟยูต่อกรัม ผสมในอาหารผึ้งที่มีส่วนผสมของเรณูผึ้ง 500 กรัม แป้งถั่วเหลือง 1,250 กรัม และน้ำผึ้ง 2,000 กรัม (ความเข้มข้นเท่ากับ 80 บริกซ์) สุ่มเก็บตัวอย่างอาหารผึ้งเป็นระยะเวลา 7 วัน และสุ่มเก็บทางเดินอาหารผึ้งเป็นระยะเวลา 28 วัน ศึกษาการรอดชีวิตของแบคทีเรียกรดแลคติกด้วยวิธี spread plate บนอาหารแข็ง De Man, Rogosa and Sharpe (MRS) ที่เติมแคลเซียมคาร์บอเนต 1.0 เปอร์เซ็นต์ (น้ำหนักต่อปริมาตร) สุ่มเก็บโคโลนีที่มีโซนใสมาย้อมแกรมและทดสอบการสร้างเอนไซม์แคทาเลส (catalase test) ผลการวิจัยพบว่าแบคทีเรียกรดแลคติกทุกสายพันธุ์สามารถมีชีวิตรอดทั้งในเรณูผึ้ง และในทางเดินอาหารของผึ้ง โดยในเรณูผึ้งพบว่า *L. casei* มีอัตราการรอดชีวิตสูงสุด (89.81±6.90 %) รองลงมาคือ *L. plantarum* (84.71±1.90 %) *L. curvatus* (82.49±4.13 %) และ *L. acidophilus* (71.58±0.86 %) ตามลำดับ ส่วนในทางเดินอาหารของผึ้งพันธุ์ที่ได้รับเรณูผึ้งผสมโพรไบโอติกส์ พบว่า *L. plantarum* (5.21±0.01 logCFU/g) มีปริมาณมากที่สุด รองลงมาคือ *L. acidophilus* (5.06±0.01 logCFU/g), *L. casei* (5.06±0.01 logCFU/g) และ *L. curvatus* (5.05±0.01 logCFU/g) ตามลำดับ ($p \leq 0.05$) ผลการทดลองนี้บ่งชี้ว่าเชื้อทั้ง 4 สายพันธุ์สามารถนำไปพัฒนาเป็นส่วนผสมในอาหารสำหรับเลี้ยงผึ้งพันธุ์ได้

คำสำคัญ: การรอดชีวิต แบคทีเรียกรดแลคติก โพรไบโอติกส์ เรณูผึ้ง ผึ้งพันธุ์

Abstract

The objective of this research was to study the survival of lactic acid bacteria in bee pollen and midgut of *Apis mellifera* fed with bee pollen mixed with probiotics. Four species of the lactic acid bacteria

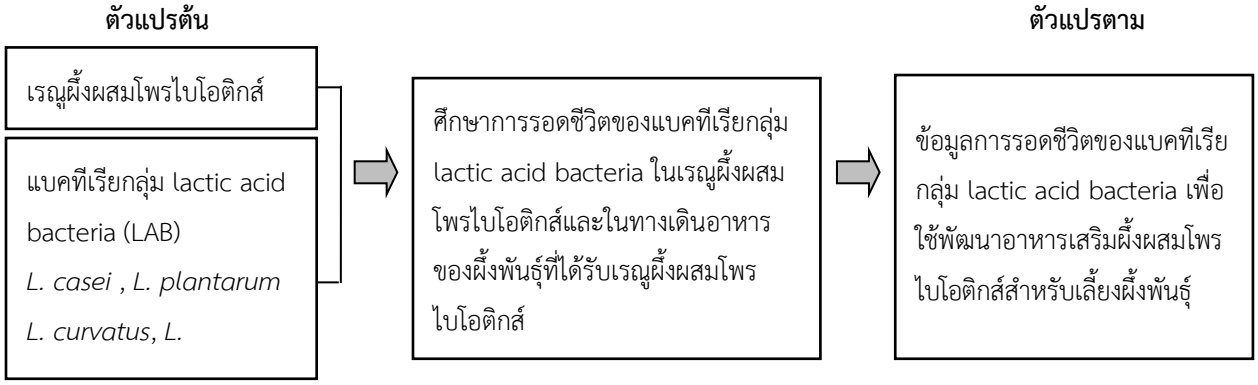
(LAB) were *Lactobacillus casei* TISTR 390, *L. plantarum* TISTR 541, *L. curvatus* TISTR 938 and *L. acidophilus* TISTR 2365 were starter culture as 10^8 CFU/g mixed with 500g of pollen, 1250g of soy bean flour and 2000g of honey (^{o}Brix = 80), by taking a random sample of bee pollen for 7 days and bee midgut for 28 days. After the study of the survival of LAB by spread plate on MRS agar added 1% $CaCO_3$ (weight/volume) and by taking a random sample of the clear zone colony with gram staining and catalase test. The research indicates that all species of LAB can survive in both bee pollen and the bee midgut. In accordance with the research, it' s found that the rate of survival of LAB in bee pollen from the highest to the lowest is the rate of *L. casei* (89.81±6.90 %), *L. plantarum* (84.71±1.90 %), *L. curvatus* (82.49±4.13 %) and *L. acidophilus* (71.58±0.86 %) respectively and that the rate of survival of LAB in the bee midgut from the highest to the lowest is the rate of *L. plantarum* (5.21±0.01 log CFU/g), *L. acidophilus* (5.06±0.01 log CFU/g), *L. casei* (5.06±0.01 log CFU/g) and *L. curvatus* (5.05±0.01 log CFU/g) respectively ($p \leq 0.05$). The result showed that all the four species can be progressively developed to be mixture of bee food for *Apis mellifera*.

Keywords: Survival, Lactic acid bacteria, Probiotics, Bee pollen, *Apis mellifera*

บทนำ

ประเทศไทยอุดมสมบูรณ์ไปด้วยพันธุ์ไม้นานาชนิดเหมาะสมต่อการเลี้ยงผึ้งทั้งในระดับครัวเรือนและระดับอุตสาหกรรม จึงมีการส่งเสริมและพัฒนาอาชีพให้กับเกษตรกร ซึ่งผึ้งที่นิยมเลี้ยงมากที่สุดคือผึ้งพันธุ์ (*Apis mellifera*) (บุญมี กวินเสกสรรค์, 2558) มีเกษตรกรที่เลี้ยงผึ้งพันธุ์ไม่น้อยกว่า 1,100 ฟาร์ม ได้ผลผลิตน้ำผึ้งมากกว่า 10,000 ตัน ทำให้เกิดรายได้กับเกษตรกรทั้งที่บริโภคในประเทศและส่งออกไปต่างประเทศ มูลค่ารวมทั้งปีประมาณ 148 ล้านบาท คิดเป็นกำไรสุทธิต่อรายประมาณ 3.5 แสนบาทต่อปี (ทะนุพงศ์ กุสุมา ณ อยุธยา, 2562) แต่ปัจจุบันเกษตรกรผู้เลี้ยงผึ้งทั่วโลก รวมถึงประเทศไทยกำลังประสบปัญหาฝูงผึ้งล่มสลายอันเนื่องมาจากหลายปัจจัย เช่น โรคและศัตรูผึ้ง การใช้ยาฆ่าแมลงในภาคการเกษตร ต้นทุนที่สูงขึ้น และขาดการช่วยเหลืออย่างเป็นรูปธรรมจากภาครัฐ ประกอบกับราคาน้ำผึ้งในตลาดโลกปรับตัวลดลงอย่างต่อเนื่อง (ภาณุวรรณ จันทวรรณกูร และจักราวุธ ไม้ทิพย์, 2560) อีกหนึ่งในปัญหาสำคัญของการเลี้ยงผึ้งคือความหนาแน่นของพืชอาหารที่มีอยู่อย่างจำกัด สภาพดินฟ้าอากาศที่เปลี่ยนแปลง ความแห้งแล้งที่ส่งผลกระทบต่อการออกดอกของพืช ซึ่งล้วนแล้วแต่ส่งผลให้เกิดปัญหาทั้งด้านปริมาณและคุณภาพของพืชอาหาร เมื่อขาดแคลนอาหาร ผึ้งจะอ่อนแอ ไม่ออกหาอาหาร วางไข่ลดลง ภูมิต้านทานต่อโรคและศัตรูผึ้งต่ำ จนทำให้จำนวนประชากรของผึ้งลดลง และอาจเกิดการทิ้งรังในที่สุด เกษตรกรหลายรายแก้ปัญหาด้วยวิธีการเลี้ยงผึ้งแบบเคลื่อนย้ายไปตามสถานที่ต่าง ๆ ทำให้ต้นทุนการเลี้ยงผึ้งสูงขึ้น เกษตรกรจึงเลี่ยงไม่ได้ที่ต้องให้อาหารเสริมแก่ผึ้ง ซึ่งเป็นผลิตภัณฑ์ที่ใช้ทดแทนอาหารธรรมชาติ แต่คุณภาพยังไม่ดีเท่าที่ควรเนื่องจากขาดจุลินทรีย์ตามธรรมชาติที่มีคุณสมบัติเป็นโพรไบโอติกส์ (probiotics) ซึ่งเป็นจุลินทรีย์ที่ช่วยปรับให้เกิดความสมดุลของจุลินทรีย์ในระบบทางเดินอาหาร มีคุณสมบัติทนต่อกรดและด่าง โดยเข้าจับที่บริเวณผิวของระบบทางเดินอาหาร ผลิตสารต่อต้านหรือกำจัดเชื้อจุลินทรีย์ชนิดอื่น ก่อให้เกิดประโยชน์ต่อสุขภาพ และสามารถแข่งขันกับจุลินทรีย์ก่อโรค รวมทั้งสามารถกระตุ้นให้เกิดระบบภูมิคุ้มกันในสัตว์ (ชัยวัฒน์ ไชยสุด, 2554 : Mountzouris et al., 2010) จากความสำคัญของปัญหาดังกล่าว ผู้วิจัยจึงมีแนวคิดในการพัฒนาผลิตภัณฑ์อาหารเสริมสำหรับเลี้ยงผึ้ง เพื่อเสริมสร้างสุขภาพของผึ้งพันธุ์ การวิจัยในครั้งนี้จึงเป็นข้อมูลพื้นฐานสำคัญเพื่อใช้ในการพัฒนาผลิตภัณฑ์เรณูผึ้งผสมโพรไบโอติกส์ ซึ่งจะเป็นนวัตกรรมที่สามารถส่งให้กับเกษตรผู้เลี้ยงผึ้งได้ใช้ประโยชน์ในการส่งเสริมสุขภาพผึ้งพันธุ์ต่อไป

กรอบแนวคิด



วัตถุประสงค์ของการวิจัย

เพื่อศึกษาการรอดชีวิตของแบคทีเรียกรดแลคติก (lactic acid bacteria) ในเรณูผึ้งผสมโพรไบโอติกส์และในทางเดินอาหารของผึ้งพันธุ์ที่ได้รับเรณูผึ้งผสมโพรไบโอติกส์

อุปกรณ์และวิธีดำเนินการวิจัย

1. การเตรียมสัตว์ที่ใช้ดำเนินการวิจัย

ผึ้งพันธุ์ (*A. mellifera*) จำนวน 30 รัง ได้ความอนุเคราะห์จากศูนย์ส่งเสริมเทคโนโลยีการเกษตรด้านแมลงเศรษฐกิจ จังหวัดเชียงใหม่ กระทรวงเกษตรและสหกรณ์ เป็นรังชั้นเดียวมีจำนวนคอน 4 คอน ทำการติดลำดับหมายเลขคอนตั้งแต่ลำดับที่ 1 จนถึงลำดับที่ 4 และติดฉลากคอน เพื่อบ่งบอกชนิดของคอนในรังที่ทำการทดลอง ได้แก่ คอนเกสร คอนน้ำหวาน คอนไข่ คอนหนอน คอนตัวอ่อน และคอนดักแด้ (ภาพที่ 1 ก) เลือกบริเวณที่ตั้งรังให้ห่างจากแหล่งอาหาร และวางกับดักเกสรที่ปากทางเข้ารัง เพื่อป้องกันอาหารจากภายนอกเข้ามาในรังผึ้งพันธุ์ที่ทำการทดลอง

2. การเตรียมจุลินทรีย์ที่ใช้ดำเนินการวิจัย

2.1 การเตรียมแบคทีเรีย *Lactobacillus casei* TISTR 390, *L. plantarum* TISTR 541, *L. curvatus* TISTR 938 และ *L. acidophilus* TISTR 2365 โดยการเพาะแบคทีเรียจากหลอดเชื้อแบบผง (lyophilized form) แต่ละสายพันธุ์ในอาหารเหลว De Man, Rogosa and Sharpe (MRS) บ่มที่อุณหภูมิ 35-37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง ในสภาวะไร้อากาศ ทำการถ่ายเชื้ออย่างน้อย 3 ครั้ง เพื่อกระตุ้นการเจริญเติบโต จากนั้นเลี้ยงเชื้อแต่ละสายพันธุ์ในอาหารแข็ง MRS บ่มที่อุณหภูมิ 35-37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ในสภาวะไร้อากาศ เก็บรักษาเชื้อเพื่อใช้เป็นเชื้อใช้งาน

2.2 นำเชื้อบริสุทธิ์จากอาหารแข็ง MRS เลี้ยงในอาหารเหลว MRS ปริมาตร 200 มิลลิลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 35-37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง ในสภาวะไร้อากาศ จากนั้นนำมาหมุนเหวี่ยงที่ความเร็ว 6,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที ล้างเซลล์ด้วยสารละลายโซเดียมคลอไรด์ 0.85 เปอร์เซ็นต์ (น้ำหนักต่อปริมาตร) 3 ครั้ง แล้วนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร ปรับความขุ่นของเชื้อเปรียบเทียบกับความขุ่นมาตรฐานแมกซ์ฟาร์แลนด์ (McFarland) เบอร์ 0.5 จะได้เชื้อที่มีความขุ่นเท่ากับ 0.1 ซึ่งจะทำให้มีปริมาณเชื้อประมาณ 1.0×10^8 CFU/mL (Meidong et al., 2017)

3. ศึกษาการรอดชีวิตของแบคทีเรียกรดแลคติกที่ใช้เป็นโพรไบโอติกส์ในเรณูผึ้ง

3.1 การเตรียมเรณูผึ้งผสมโพรไบโอติกส์

นำเรณูผึ้งดอกดาวกระจายไต้หวัน 500 กรัม ผสมกับแป้งถั่วเหลือง 1,250 กรัม คลุกเคล้าให้เข้ากัน เติมน้ำผึ้ง (ความเข้มข้นเท่ากับ 80 บริกซ์) 2,000 กรัม นวดให้เข้ากันจนเป็นก้อนไม่ติดมือ แบ่งออกเป็น 5 ส่วน ส่วนละ 750 กรัม จากนั้นเติมแบคทีเรียกรดแลคติกที่เตรียมไว้จากข้อ 2.2 ลงในอาหารแต่ละส่วนที่แยกไว้ให้ได้ปริมาณแบคทีเรียเริ่มต้นเท่ากับ 10^8 CFU/g แบ่งแต่ละส่วนเป็นก้อนกลมแบนขนาด 150 กรัม จะได้เรณูผึ้งผสมโพรไบโอติกส์จำนวน 5 ก้อนต่อเชื้อ (ภาพที่ 1 ข)

(ก) (ข)

ภาพที่ 1 (ก) การติดฉลากรังผึ้งพันธุ์ที่ใช้ในการทดลอง
(ข) เรณูผึ้งผสมเกสรและโพรไบโอติกส์ (วนิดา ชื่นชัน, 2562)

3.2 การให้เรณูผึ้งผสมโพรไบโอติกส์สำหรับเลี้ยงผึ้งพันธุ์

นำเรณูผึ้งผสมโพรไบโอติกส์ที่เตรียมไว้จากข้อ 3.1 วางบนหลังคอนภายในรังของแต่ละชุดการทดลอง โดยทำการให้อาหารใหม่ทุก 7 วัน

3.3 ศึกษาการรอดชีวิตของแบคทีเรียกรดแลคติกในเรณูผึ้งผสมโพรไบโอติกส์

ดำเนินการทดลอง โดยวางแผนการทดลองแบบสุ่มสมบูรณ์ (completely randomized design : CRD) แบ่งเป็น 6 ชุดการทดลอง ชุดละ 5 รัง ทำการทดลองรังละ 5 ซ้ำ โดยให้เรณูผึ้งผสมโพรไบโอติกส์ในแต่ละรัง เป็นน้ำหนัก 150 กรัม ประกอบด้วย

- ชุดที่ 1 เรณูผึ้งผสม *L. casei*
- ชุดที่ 2 เรณูผึ้งผสม *L. plantarum*
- ชุดที่ 3 เรณูผึ้งผสม *L. curvatus*
- ชุดที่ 4 เรณูผึ้งผสม *L. acidophilus*
- ชุดที่ 5 เรณูผึ้งไม่ใส่โพรไบโอติกส์
- ชุดที่ 6 อาหารธรรมชาติ (ชุดควบคุม) ปล่อยให้ผึ้งหาเรณูจากธรรมชาติโดยไม่ติดกับดักเกสรไว้หน้ารัง

นำเรณูผึ้งผสมโพรไบโอติกส์ชุดการทดลองที่ 1-5 ไปไว้ที่รังผึ้งตามสภาวะจริงของการเลี้ยงผึ้งพันธุ์ ทำการเก็บตัวอย่างเรณูผึ้งผสมโพรไบโอติกส์ 1 กรัม ด้วยเทคนิคปลอดเชื้อ และตรวจวิเคราะห์หาการรอดชีวิตของแบคทีเรียจากตัวอย่างในวันที่ 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6 และ 7 ของการทดลอง (เนื่องจากเกษตรกรต้องตรวจเช็คสภาพรังทุก 7 วัน) โดยนำตัวอย่างเรณูผึ้งผสมโพรไบโอติกส์มาเจือจางลำดับส่วนสิบเท่า (serial ten-fold dilution) ในสารละลายโซเดียมคลอไรด์ 0.85 เปอร์เซ็นต์ (น้ำหนักต่อปริมาตร) และใช้การตรวจนับเซลล์จุลินทรีย์ที่มีชีวิตทั้งหมด (viable plate count) ด้วยวิธีการ spread plate บนอาหารแข็ง MRS ที่เติมแคลเซียมคาร์บอเนต 1.0 เปอร์เซ็นต์ (น้ำหนักต่อปริมาตร) (Swetwiwathana et al., 2007) บ่มที่อุณหภูมิ 35-37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง ในสภาวะไร้อากาศ ทำการตรวจนับจำนวนโคโลนีของแบคทีเรียที่มีโซนใสรอบโคโลนี ซึ่งเป็นลักษณะเฉพาะของแบคทีเรียที่สร้างกรด และสุ่มตรวจดูลักษณะของแบคทีเรียด้วยการย้อมสีแกรม และทำการทดสอบการสร้างเอนไซม์แคทาเลสพร้อมทั้งบันทึกผลการทดลอง

4. ศึกษาการรอดชีวิตของแบคทีเรียกรดแลคติกในทาง เดินอาหารของผึ้งพันธุ์ที่ได้รับเรณูผึ้งผสมโพรไบโอติกส์

ดำเนินการทดลอง โดยวางแผนการทดลองแบบสุ่มสมบูรณ์ แบ่งเป็น 6 ชุดการทดลอง ชุดละ 5 รัง (ตามข้อ 3) โดยนำเรณูผึ้งผสมโพรไบโอติกส์ชุดการทดลองที่ 1-5 ไปใส่ไว้ในรังผึ้งตามสภาวะจริงของการเลี้ยงผึ้งพันธุ์ ชุดการทดลองละ 5 รัง พร้อมติดกับดักเกสรบริเวณหน้ารังเพื่อป้องกันไม่ให้ผึ้งได้รับอาหารจากภายนอก ส่วนชุดการทดลองที่ 6 ไม่ต้องติดกับดักเกสร ปล่อยให้ผึ้งได้รับอาหารจากธรรมชาติ เพื่อใช้เป็นชุดควบคุมเปรียบเทียบ จากนั้นศึกษาการรอดชีวิตของแบคทีเรียกรดแลคติกในทางเดินอาหารผึ้งพันธุ์ที่ได้รับเรณูผึ้งผสมโพรไบโอติกส์ ทำการสุ่มเก็บตัวอย่างทางเดินอาหารผึ้งงานตัวเต็มวัยที่ได้รับเรณูผึ้งผสมโพรไบโอติกส์ในทุกชุดการทดลอง โดยเริ่มเก็บตัวอย่างผึ้งตั้งแต่ระยะตัวอ่อนหลังจากออกจากดักแด้ในวันที่ 0, 7, 14, 21, และ 28 ของการทดลอง ทำการทดลองรังละ 5 ซ้ำ

เก็บตัวอย่างผึ้งพันธุ์ (ผึ้งงาน) ทั้ง 6 ชุด ชุดการทดลองละ 5 ตัว ทำการฆ่าเชื้อบริเวณพื้นผิวลำตัวของผึ้งพันธุ์เพื่อป้องกันไม่ให้มีการปนเปื้อนแบคทีเรียจากภายนอกเข้าสู่บริเวณทางเดินอาหารส่วนกลางของผึ้ง ด้วยการแช่ใน 1) เอทานอล 70 เปอร์เซ็นต์ (ปริมาตรต่อปริมาตร) เป็นเวลา 1 นาที 2) โซเดียมไฮโปคลอไรท์ 5.25 เปอร์เซ็นต์ (น้ำหนักต่อปริมาตร) เป็นเวลา 1 นาที 3) เอทานอล 95 เปอร์เซ็นต์ (ปริมาตรต่อปริมาตร) เป็นเวลา 30 วินาที และ 4) น้ำกลั่นที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว เป็นเวลา 1 นาที ตามลำดับ (Gusmao et al., 2007) แล้ววางตัวผึ้งบนกระดาษกรองที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว จากนั้นใช้คีมดึงตัวผึ้งงานทั้งสองข้างจากส่วนหัวและปล้องสุดท้ายของบริเวณส่วนท้อง โดยดึงทางเดินอาหารส่วนกลางภายใต้กล้องสเตอริโอ (ภาพที่ 2) เก็บไว้ในฟอสเฟตบัฟเฟอร์ซาไลน์ 0.01 โมลต่อลิตร พีเอช 7.4 ที่มีโซเดียมเอไซด์ 0.1 เปอร์เซ็นต์ ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ลงในหลอดไมโครเซนติฟิว ด้วยเทคนิคปลอดเชื้อ ใช้ไม้ปลายแหลมที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้วปั่นตัวอย่างในหลอดทดลอง จากนั้นผสมให้เข้ากันโดยใช้เครื่องเขย่าสารแบบสั่น ทำการเจือจางลำดับส่วนสิบเท่า จนได้ระดับความเจือจางที่ 10^{-5} และใช้การตรวจนับเซลล์จุลินทรีย์ที่มีชีวิตทั้งหมดด้วยวิธีการ spread plate บนอาหารแข็ง MRS ที่เติมแคลเซียมคาร์บอเนต 1.0 เปอร์เซ็นต์ (น้ำหนักต่อปริมาตร) บ่มที่อุณหภูมิ 35-37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง ในสภาวะไร้อากาศ ทำการตรวจนับจำนวนโคโลนีของแบคทีเรียที่มีโซนใสรอบโคโลนี และสุ่มตรวจดูลักษณะของแบคทีเรียด้วยการย้อมสีแกรม และทำการทดสอบการสร้างเอนไซม์แคทาเลสพร้อมทั้งบันทึกผลการทดลอง

ภาพที่ 2 ทางเดินอาหารส่วนกลางของผึ้งพันธุ์ (วนิดา ชื่นชัน, 2562)

5. การวางแผนการทดลองและการวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ

วิเคราะห์หาค่าความแปรปรวนของค่าเฉลี่ยด้วยวิธีการวิเคราะห์ความแปรปรวนที่มีตัวแปรอิสระเพียงตัวเดียว (one way analysis of variance) และเปรียบเทียบความแตกต่างค่าเฉลี่ยระหว่างชุดการทดลองด้วยวิธีของ Duncan (Duncan's new multiple range test) ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์

ผลการวิจัยและอภิปรายผล

1. ผลการศึกษาการรอดชีวิตของแบคทีเรียกรดแลคติกในเรณูผึ้งผสมโพรไบโอติกส์

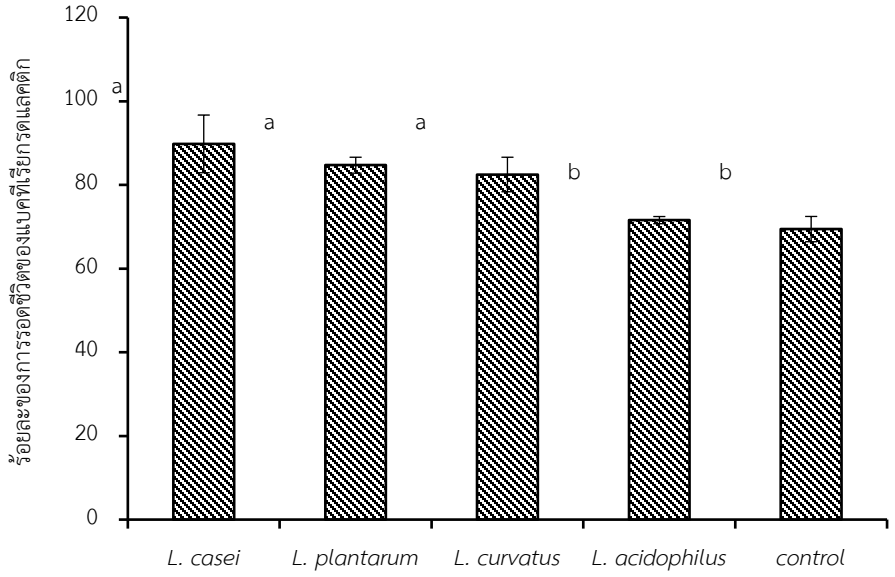
จากการศึกษาการรอดชีวิตของแบคทีเรียกรดแลคติกในเรณูผึ้งผสมโพรไบโอติกส์ โดยสุ่มเก็บตัวอย่างหลังนำไปไว้ในรังผึ้งตามสภาวะการเลี้ยงจริงเป็นระยะเวลา 7 วัน พบว่าเชื้อทดสอบทั้ง 4 สายพันธุ์ สามารถรอดชีวิตในเรณูผึ้งตลอดระยะเวลาของการทดลอง แสดงดังตารางที่ 1

ตารางที่ 1 ปริมาณแบคทีเรียกรดแลคติกที่รอดชีวิตในเรณูผึ้งผสมโพรไบโอติกส์ ตามสภาวะจริงในวันที่ 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6 และ 7 ของการทดลอง

เวลาทดสอบ (วัน)	แบคทีเรียกรดแลคติกที่รอดชีวิตในเรณูผึ้งผสมโพรไบโอติกส์ (log CFU/g)				
	L. casei	*L. plantarum*	*L. curvatus*	*L. acidophilus*	control
0	8.15±0.11 [a]	7.93±0.08 [b]	6.98±0.05 [a]	4.87±0.05 [a]	4.63±0.04 [a]
1	7.22±0.11 [bc]	7.55±0.10 [c]	6.18±0.07 [b]	4.64±0.19 [b]	4.35±0.13 [b]
2	6.87±0.21 [cd]	6.70±0.07 [e]	5.94±0.02 [c]	4.03±0.05 [c]	4.18±0.06 [bc]
3	6.71±0.10 [d]	8.28±0.01 [a]	5.65±0.07 [d]	3.95±0.05 [c]	4.18±0.07 [bc]
4	7.18±0.04 [bc]	8.21±0.02 [a]	6.27±0.06 [b]	3.49±0.03 [d]	4.10±0.01 [c]
5	6.87±0.02 [cd]	7.08±0.06 [d]	6.33±0.05 [b]	4.06±0.06 [c]	4.17±0.06 [bc]
6	7.28±0.07 [b]	6.68±0.21 [e]	6.23±0.06 [b]	3.22±0.03 [e]	3.69±0.21 [d]
7	7.32±0.51 [b]	6.72±0.10 [e]	5.76±0.25 [d]	3.48±0.02 [d]	3.22±0.16 [e]

หมายเหตุ : ตัวอักษรตัวยกที่แตกต่างกันในแต่ละคอลัมน์แสดงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p \leq 0.05$)

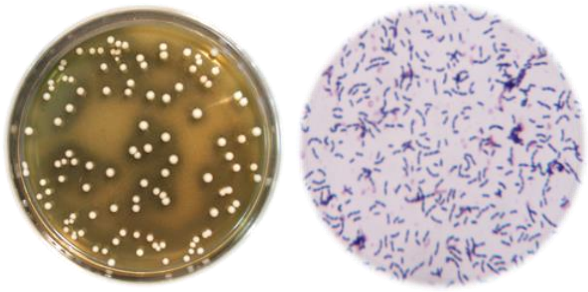
เมื่อนำปริมาณเชื้อแบคทีเรียกรดแลคติกที่รอดชีวิตในเรณูผึ้งผสมโพรไบโอติกส์ที่วางไว้ในรังผึ้งตามสภาวะจริงเป็นระยะเวลา 7 วัน มาคำนวณหาร้อยละของอัตราการรอดชีวิต โดยเปรียบเทียบระหว่างปริมาณเชื้อตั้งต้น (วันที่ 0) และปริมาณเชื้อที่เหลือในวันสุดท้ายของการทดลอง (วันที่ 7) พบว่าเชื้อ 3 สายพันธุ์ ได้แก่ *L. casei* (89.81±6.90), *L. plantarum* (84.71±1.90) และ *L. curvatus* (82.49±4.13) มีร้อยละของอัตราการรอดชีวิตสูงสุดตามลำดับ โดยไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ($p \leq 0.05$) แต่อัตราการรอดชีวิตของทั้ง 3 สายพันธุ์แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ($p \leq 0.05$) กับเชื้อ *L. acidophilus* (71.58±0.86) และชุดควบคุม (69.44±3.02) (ภาพที่ 3)



ภาพที่ 3 อัตราการรอดชีวิตของแบคทีเรียกรดแลคติกทุกสายพันธุ์ในเรณูผึ้งผสมโพรไบโอติกส์ หลังวันที่ 7 เมื่อนำไปไว้ตามสภาวะจริง (ตัวอักษรตัวยกที่แตกต่างกันในแต่ละคอลัมน์แสดงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ, $p \leq 0.05$)

ผลการทดลองดังกล่าวแสดงให้เห็นว่าสามารถพบโพรไบโอติกส์ได้ตามธรรมชาติถึงแม้จะไม่ใส่โพรไบโอติกส์เพิ่มลงในอาหารผึ้งก็ตาม แต่ปริมาณที่ตรวจพบน้อยกว่ากลุ่มทดสอบที่เติมโพรไบโอติกส์อย่างมีนัยสำคัญ ซึ่งอาจส่งผลโดยตรงต่อสุขภาพของผึ้งได้ สอดคล้องกับงานวิจัยของ Mathialagan et al. (2018) ที่ทำการสำรวจแบคทีเรียกรดแลคติก (LAB) ซึ่งเป็นโพรไบโอติกส์ตามธรรมชาติที่มีความสัมพันธ์กับผึ้ง โดยแยก LAB จากกระเพาะอาหารผึ้ง อาหารผึ้ง เกสรผึ้ง และนมผึ้ง ในผึ้งสายพันธุ์ที่แตกต่างกัน พบแบคทีเรียสกุล *Lactobacillus* ประมาณ 10 เปอร์เซ็นต์ นอกจากนี้ Hekmat and McMahon (1992) ยังได้ทำการศึกษาการอยู่รอดของ *L. acidophilus* ในไอศกรีมเพื่อใช้เป็นอาหารเสริมโพรไบโอติกส์ พบว่าเมื่อเวลาผ่านไป 17 สัปดาห์ของการเก็บรักษา ไอศกรีมผสมเชื้อ *L. acidophilus* ที่อุณหภูมิ -29 องศาเซลเซียส จากเชื้อเริ่มต้น 1.5 x 10^8 ซีเอฟยูต่อมิลลิลิตร สามารถมีอัตราการรอดชีวิตอยู่ 4 x 10^6 ซีเอฟยูต่อมิลลิลิตร และงานวิจัยของ Ptaszynska et al. (2016) ได้ทำการศึกษาผลของโพรไบโอติกส์และพรีไบโอติกส์ต่ออัตราการรอดชีวิตของผึ้งที่ติดเชื้อ *Nosema ceranae* เพื่อพัฒนาการรักษาและป้องกันโรค Nosemosis โดยพบว่า *L. rhamnosus* ที่ใช้เป็นโพรไบโอติกส์มีอัตราการรอดชีวิตสูงในน้ำเชื่อมสำหรับใช้เลี้ยงผึ้งที่มีความเข้มข้น 56.56 เปอร์เซ็นต์ แสดงให้เห็นว่ามีความเป็นไปได้ที่จะนำแบคทีเรียกรดแลคติกผสมในอาหารผึ้งที่มีส่วนประกอบของน้ำผึ้งหรือน้ำเชื่อมที่มีความเข้มข้นสูง เพื่อพัฒนาเป็นอาหารเสริมสำหรับเลี้ยงผึ้ง

จากการสุ่มแบคทีเรียที่โคโลนีที่มีลักษณะโซนใสบนอาหารแข็ง MRS ในทุกชุดทดสอบของเรณูผึ้งที่ผสมโพรไบโอติกส์ เมื่อนำมาย้อมสีแกรมและตรวจดูลักษณะภายใต้กล้องจุลทรรศน์ พบว่าย้อมติดสีแกรมบวก มีลักษณะเป็นรูปท่อน เรียงต่อกันเป็นสาย (ภาพที่ 4) ส่วนแบคทีเรียในชุดทดสอบที่ไม่ได้ผสมโพรไบโอติกส์มีทั้งโคโลนีที่สร้างโซนใส และไม่สร้างโซนใส เมื่อสุ่มมาย้อมสีแกรม พบว่า ย้อมติดสีแกรมบวก มีทั้งลักษณะรูปท่อน และรูปกลม และเมื่อสุ่มโคโลนีของแบคทีเรียในทุกชุดทดสอบของเรณูผึ้งที่ผสมโพรไบโอติกส์เพื่อนำมาทดสอบการสร้างเอนไซม์แคทาเลส พบว่าแบคทีเรียทั้งหมดให้ผลการทดสอบเป็นลบ ส่วนแบคทีเรียที่สุ่มจากชุดทดสอบที่ไม่ได้ผสมโพรไบโอติกส์ให้ผลการทดสอบทั้งลบ และบวก



(ก) (ข)

ภาพที่ 4 (ก) โคโลนีโซนใสของแบคทีเรียกรดแลคติกบนอาหาร MRS agar ที่เติม 1.0 เปอร์เซ็นต์ แคลเซียมคาร์บอเนต (ข) ลักษณะของแบคทีเรียกรดแลคติกด้วยวิธีการย้อมสีแกรม ภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสง ที่กำลังขยาย 1,000 เท่า (วนิดา ชื่นชัน, 2562)

2. ผลการศึกษาการรอดชีวิตของแบคทีเรียกรดแลคติกในทางเดินอาหารผึ้งพันธุ์ที่เลี้ยงด้วยเรณูผึ้งผสมโพรไบติกส์

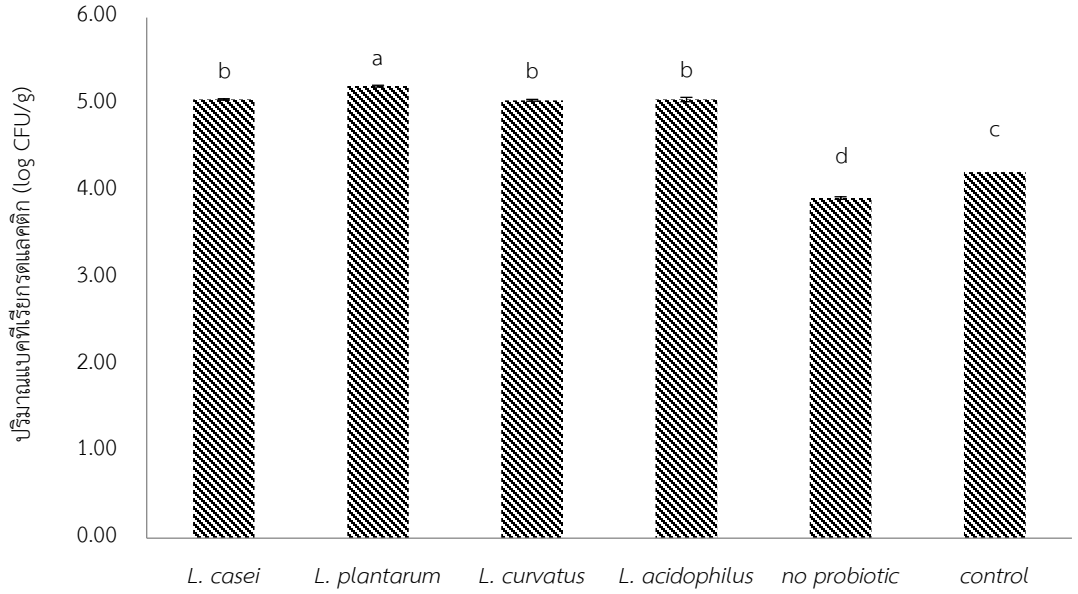
จากการศึกษาการรอดชีวิตของแบคทีเรียกรดแลคติกในทางเดินอาหารของผึ้งพันธุ์ที่เลี้ยงด้วยเรณูผึ้งผสมโพรไบโอติกส์ โดยสุ่มเก็บตัวอย่าง (ผึ้งงาน) ตั้งแต่ผึ้งตัวอ่อนเริ่มออกจากหลอดรวงในวันที่ 0, 7, 14, 21 และ 28 ของการทดลอง พบว่าเชื้อทดสอบทั้ง 4 สายพันธุ์ มีปริมาณเชื้อสูงสุดในวันที่ 28 รองลงมาคือวันที่ 21, 14, 7 และ 0 ตามลำดับ และเมื่อเปรียบเทียบปริมาณเชื้อในแต่ละวันพบว่ามีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ($p \leq 0.05$) แสดงดังตารางที่ 2

ตารางที่ 2 ปริมาณแบคทีเรียกรดแลคติกในทางเดินอาหารผึ้งงานหลังเลี้ยงด้วยเรณูผึ้งผสมโพรไบโอติกส์ในวันที่ 0, 7, 14, 21 และ 28 ของการทดลอง

ชุดทดสอบ	แบคทีเรียกรดแลคติกในทางเดินอาหารผึ้งหลังเลี้ยงด้วยเรณูผึ้งผสมโพรไบโอติกส์ (log CFU/g)				
	วันที่ 0	วันที่ 7	วันที่ 14	วันที่ 21	วันที่ 28
L. casei	3.89±0.02 ^{e}	4.74±0.04 ^{d}	4.89±0.01 ^{c}	4.96±0.01 ^{b}	5.06±0.01 ^{a}
L. plantarum	3.94±0.04 ^{e}	4.78±0.02 ^{d}	4.95±0.02 ^{c}	5.04±0.01 ^{b}	5.21±0.01 ^{a}
L. curvatus	3.93±0.01 ^{e}	4.73±0.03 ^{d}	4.90±0.01 ^{c}	4.94±0.01 ^{b}	5.05±0.01 ^{a}
L. acidophilus	3.77±0.09 ^{e}	4.76±0.01 ^{d}	4.89±0.01 ^{c}	4.95±0.01 ^{b}	5.06±0.01 ^{a}
No probiotic	3.49±0.04 ^{c}	3.53±0.08 ^{c}	3.82±0.06 ^{b}	3.92±0.03 ^{a}	3.92±0.02 ^{a}
control	3.78±0.04 ^{e}	3.83±0.05 ^{d}	3.98±0.03 ^{c}	4.12±0.01 ^{b}	4.22±0.01 ^{a}

หมายเหตุ : ตัวอักษรตัวยกที่แตกต่างกันในแต่ละแถวแสดงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p \leq 0.05$)

เมื่อเปรียบเทียบปริมาณเชื้อในระบบทางเดินอาหารที่พบในผึ้งแต่ละชุดทดสอบในวันที่ 28 พบว่าชุดการทดลองทั้ง 6 กลุ่มมีปริมาณเชื้อ LAB ที่ตรวจพบในทางเดินอาหารแตกต่างกัน โดยกลุ่มที่ได้รับโพรไบโอติกส์ทั้ง 4 สายพันธุ์จะพบปริมาณ LAB สูงอย่างมีนัยสำคัญ ($p \leq 0.05$) กว่าอีก 2 กลุ่มที่ไม่ได้รับโพรไบโอติกส์ โดยกลุ่มที่ได้รับเรณูผึ้งผสมเชื้อ *L. plantarum* จะมีปริมาณโพรไบโอติกส์สูงกว่ากลุ่มที่ได้รับ *L. casei*, *L. acidophilus*, และ *L. curvatus* ตามลำดับ (ภาพที่ 5)



ภาพที่ 5 ปริมาณแบคทีเรียกรดแลคติกในทางเดินอาหารผึ้งหลังเลี้ยงด้วยเรณูผึ้งผสมโพรไบโอติกส์ เป็นเวลา 28 วัน (ตัวอักษรตัวยกที่แตกต่างกันในแต่ละคอลัมน์แสดงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ, $p < 0.05$)

แบคทีเรียกรดแลคติกที่ใช้ทดสอบ ได้แก่ *L. casei*, *L. plantarum*, *L. curvatus* และ *L. acidophilus* สามารถมีชีวิตรอดในเรณูผึ้งผสมโพรไบโอติกส์ตลอดระยะ 7 วัน ของการทดสอบ และสามารถมีชีวิตรอดในทางเดินอาหารของผึ้งงานที่เลี้ยงด้วยเรณูผึ้งผสมโพรไบโอติกส์ตลอดระยะเวลาของการทดสอบ 28 วัน หลังจากผึ้งงานตัวอ่อนเริ่มออกจากหลอดรวง อาจบ่งชี้ได้ว่าในระบบทางเดินอาหารส่วนกลางของผึ้งมีสภาวะที่เหมาะสมต่อการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์ที่ใช้ทดสอบ อีกทั้งยังมีความซับซ้อนในเรื่องโครงสร้าง จึงทำให้ระบบทางเดินอาหารของผึ้งเป็นที่อยู่อาศัยของจุลินทรีย์ได้หลากหลายชนิด [Dillon & Dillon, 2004] โดยเฉพาะแบคทีเรียกลุ่มที่สามารถผลิตกรดแลคติก เช่น *Lactobacillus* spp. ที่อาศัยอยู่ในระบบทางเดินอาหารส่วนกลางของผึ้งจะมีความสัมพันธ์กับผึ้งแบบพึ่งพา (mutualism) นอกจากจะใช้ทางเดินอาหารเป็นที่อยู่อาศัยแล้ว ยังได้รับสารอาหารจากผึ้งตลอดจนได้สภาวะที่เหมาะสมในการเพิ่มจำนวน (Gillium, 1997) ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยในครั้งนี้ที่พบว่าเชื้อ LAB ในทางเดินอาหารส่วนกลางของผึ้งมีปริมาณเพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญตลอดระยะเวลาของการทดลอง ในขณะเดียวกันแบคทีเรียเหล่านี้ก็มีศักยภาพเป็นโพรไบโอติกส์ช่วยเสริมสร้างภูมิคุ้มกันของผึ้ง ช่วยเพิ่มการย่อยสารอาหารต่าง ๆ ให้แก่ผึ้ง ส่งเสริมการได้รับสารอาหาร และยังสามารถสร้างสารปฏิชีวนะซึ่งมีประสิทธิภาพในการยับยั้งกลุ่มจุลินทรีย์ที่ก่อโรคให้แก่ผึ้งได้ (Pattabhiramaiah et al., 2012 : Sammataro, 2014) นอกจากนี้ Evans and Lopez (2004) ยังได้ทำการตรวจวัดการตอบสนองทางระบบภูมิคุ้มกันในผึ้งโดยการให้สปอร์เชื้อก่อโรค และโพรไบโอติกส์ในตัวอ่อนผึ้ง และตรวจสอบการแสดงออกของยีน abaecin และ defensin พบว่าเชื้อก่อโรคและโพรไบโอติกส์สามารถกระตุ้นการแสดงออกของยีน abaecin ซึ่งมีความสัมพันธ์กับการตอบสนองต่อระบบภูมิคุ้มกันของผึ้ง ช่วยให้ตัวอ่อนและผึ้งในช่วงวัยต่าง ๆ รอดชีวิตจากการโจมตีของเชื้อโรค ป้องกันเชื้อจุลินทรีย์ที่ก่อโรคได้

การที่แบคทีเรียกรดแลคติกทั้ง 4 สายพันธุ์ ในทางเดินอาหารส่วนกลางของผึ้งพันธุ์มีปริมาณสูงสุดในวันที่ 28 รองลงมา คือ 21, 14, 7 และ 0 ตามลำดับ อาจเนื่องจากแบคทีเรียกรดแลคติกมีผลต่อการเปลี่ยนแปลงทางสัณฐานวิทยาของเยื่อบุทางเดินอาหารของผึ้ง ทำให้ปริมาณเยื่อบุทางเดินอาหารเพิ่มขึ้น (Szymas et al., 2012) จึงส่งผลให้แบคทีเรียกรดแลคติกซึ่งมีคุณสมบัติในการยึดเกาะทางเดินอาหารมีอัตราการรอดชีวิตสูงขึ้นตามลำดับตลอดระยะเวลาที่ใช้ทดสอบ และทุกวันมีปริมาณเชื้อแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ($p \leq 0.05$) เมื่อเปรียบเทียบปริมาณเชื้อทั้ง 4 สายพันธุ์ ในทางเดินอาหารของผึ้งงานของวันที่ 28 หลังจากผึ้งงานออกจากหลอดรวง พบว่า *L. plantarum* มีปริมาณเชื้อสูงสุดในทางเดินอาหารผึ้งงาน ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยของ Chandran and Raghavan (2018) ที่ทดสอบคุณสมบัติของโพรไบโอติกส์ *L. plantarum* KX519413 และ KX519414 พบว่าสามารถมีชีวิตรอดในสภาวะที่พีเอชเป็นกรด ในเกลือน้ำดี และในน้ำย่อย ช่วยให้ทนต่อสภาพในระบบทางเดินอาหารได้ดี นอกจากนี้ยังสามารถผลิตไบโอฟิล์ม (biofilm) ที่มีประสิทธิภาพช่วยเพิ่มการยึดเกาะของแบคทีเรียในทางเดินอาหาร ส่วนปริมาณเชื้อในทางเดินอาหารของผึ้งงานที่ตรวจพบรองลงมา ได้แก่ *L. casei*, *L. acidophilus* และ *L. curvatus* ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยของ Patruica and Hutu (2013) ได้ศึกษาผลของผลิตภัณฑ์พรีไบโอติกส์และโพรไบโอติกส์ที่เติมในอาหารเสริมเพื่อกระตุ้นลำไส้ของผึ้งงาน *Apis mellifera* พบว่าลำไส้ของผึ้งมีพัฒนาการในการดูดซึมสารอาหาร และมีความสัมพันธ์กับพัฒนาการที่ดีของรังผึ้ง และยังพบว่าเชื้อ *L. acidophilus* LA-14 เอนเทอโรไบโอติกส์ (Enterobiotics) กับ *L. casei* เอนเทอโรแลคติกพลัส (Enterolactis Plus) หลังจากใช้ผลิตภัณฑ์โพรไบโอติกส์ทั้ง 2 ชนิดเป็นเวลา 3 สัปดาห์ บ่งชี้ให้เห็นว่าแบคทีเรียกรดแลคติกที่ผสมในเรณูผึ้งสามารถรอดชีวิตในทางเดินอาหารผึ้งงานของผึ้งพันธุ์ที่เลี้ยงด้วยเรณูผึ้งผสมโพรไบโอติกส์ ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยของ Jeyaprakash et al. (2003) ได้ศึกษาความหลากหลายของแบคทีเรียในผึ้งงานของผึ้งพันธุ์ *A. mellifera carpensis* และผึ้งพันธุ์ *A. mellifera scutellata* โดยใช้ลำดับยีน 16S rRNA พบว่าเป็นจีนัส *Lactobacillus* ส่วน Mohr and Tebbe (2006) ได้ศึกษาความหลากหลายของแบคทีเรียในทางเดินอาหารส่วนกลางของผึ้งพันธุ์ *A. mellifera carpensis* พบแบคทีเรียจีนัส *Lactobacillus* และ Raghavan et al. (2013) ได้ทำการแยกเชื้อแบคทีเรียผลิตกรดแลคติกจากทางเดินอาหารผึ้งโพรง (*Apis cerena indica*) พบว่าแบคทีเรียกรดแลคติกมีอัตราการรอดชีวิตในทางเดินอาหารได้

สรุปผลการวิจัย

แบคทีเรียกรดแลคติกที่ใช้ทดสอบ ได้แก่ *L. casei*, *L. plantarum*, *L. curvatus* และ *L. acidophilus* สามารถมีชีวิตรอดในเรณูผึ้งผสมโพรไบโอติกส์ตลอดระยะ 7 วัน ของการทดสอบ และสามารถมีชีวิตรอดในทางเดินอาหารของผึ้งงานที่เลี้ยงด้วยเรณูผึ้งผสมโพรไบโอติกส์ตลอดระยะเวลาของการทดสอบ 28 วัน หลังจากผึ้งงานออกจากหลอดรวง จากผลการทดลองดังกล่าวบ่งชี้ได้ว่าเชื้อทั้ง 4 สายพันธุ์ที่ใช้ทดสอบสามารถนำไปพัฒนาเป็นส่วนผสมในอาหารสำหรับเลี้ยงผึ้งพันธุ์ได้ ดังนั้นจึงควรศึกษาผลของเชื้อทั้งหมดต่อสุขภาพของผึ้งพันธุ์ ทั้งด้านความหนาแน่นของประชากรภายในรัง อายุผึ้ง น้ำหนักผึ้ง ปริมาณน้ำเชื้อของผึ้งตัวผู้ ความต้านทานต่อโรค และสภาพรังโดยรวม เพื่อคัดเลือกเชื้อที่เหมาะสมที่สุดในการพัฒนาเป็นอาหารผึ้งเพื่อส่งเสริมสุขภาพของผึ้งพันธุ์ต่อไป

กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบคุณศูนย์ส่งเสริมเทคโนโลยีการเกษตรด้านแมลงเศรษฐกิจ จังหวัดเชียงใหม่ ที่ให้ความอนุเคราะห์วัสดุอุปกรณ์และสถานที่ทำวิจัย

เอกสารอ้างอิง

[1] บุญมี กวินเสกสรรค์. (2558). โรคและศัตรูของผึ้งและชันโรง, เชียงใหม่: สำนักบริหารและพัฒนาวิชาการ มหาวิทยาลัยแม่โจ้.

[2] ทะนุพงศ์ กุสุมา ณ อยุธยา. (2562, 1 ธันวาคม). ผึ้งได้งาน คนเลี้ยงได้เงิน. เทคโนโลยีชาวบ้าน, สืบค้นจาก https://www.technologychaoban.com/bullet-news-today/article_132602.

[3] ภาณุวรรณ จันทวรรณกูร และจักราวุธ ไม้ทิพย์. (2560). การพัฒนาเทคโนโลยีสำหรับการเลี้ยงผึ้ง และผลิตภัณฑ์ผึ้ง : ผลงานวิจัยสู่การใช้ประโยชน์, จดหมายข่าว วช., 12 (77), หน้า 5-7.

[4] ชัยวัฒน์ ไชยสุด. (2554). โพรไบโอติก: จุลินทรีย์เพื่อชีวิต, กรุงเทพมหานคร: อินฟินิตี้ คัลเลอร์ พริ้นติ้ง.

[5] Mountzouris, K., Tsitrsikos, P., Palamidi, I., Arvaniti, A., Mohnl, M., Schatzmayr, G. & Fegeros, K. (2010). Effects of probiotic inclusion levels in broiler nutrition on growth performance, nutrient digestibility, plasma immunoglobulins, and cecal microflora composition, Poult. Sci., 89(1), pp. 58-67.

[6] Meidong, R., Khotchanalekha, K., Doolgindachbaporn, S., Nagasawa, T., Nakao, M., Sakai, K. & Tongpim, S. (2017). Evaluation of probiotic Bacillus aerius B81e isolated from healthy hybrid catfish on growth, disease resistance and innate immunity of Pla-mong Pangasius bocourti. Fish Shellfish Immunol., 73, pp. 1-10.

[7] Swetwiwathana, A., Zendo, T., Nakayama, J. & Sonomoto, K. (2007). Screening of bacteriocin-producing lactic acid bacteria associated with Thai fermented meat-rice sausage, In G. Zu (Ed.), Proceeding, 53rd International Congress of Meat Science and Technology, pp. 59-60.

[8] Gusmao, A.S., Santos, A.V., Marini, D.C., Russo, E.S., Peixoto, A.M.D., Junior, M.B., Molina, M.A. & Lemos, F.J.A. (2007). Frist isoaltion of microoraganisms from the gut diverticulum of Aedes aegypti, Diptera: Culicidae: new perspectives for an insect-bacteria association. Mem. Inst. Oswaldo Cruz., 102(8), pp. 919-924.

[9] Mathialagan, M., Johnson Thangaraj Edward, Y.S., David, P.M.M., Senthilkumar, M., Srinivasan, M.R. & Mohankumar, S. (2018). Isolation, characterization and identification of probiotic lactic acid bacteria (LAB) from honey bees, Int. J. Curr. Microbiol. App. Sci., 7(4), pp. 894-906.

[10] Hekmat, S. & McMahon, D.J. (1992). Survival of Lactobacillus acidophilus and Bifidobacterium bifidum in ice cream for use as a probiotic food, J. Dairy Sci., 75(6), pp. 1415-1422.

[11] Ptaszynska, A.A., Borsuk, G., Zdybicka-Barabas, A., Cytryriska, M. & Malek, W. (2016). Are commercial probiotics and prebiotics effective in the treatment and prevention of honeybee nosemosis C. Parasitol Res., 115(1), pp. 397-406.

[12] Dillon, R.J. & Dillon, V.M. (2004). The gut bacteria of insects: Nonpathogenic interaction, Annu. Rev. Entomol., 49, pp. 71-92.

[13] Gillium, M. (1997). Identification and role of non-pathogenic microflora associate of honey bees, FEMS Microbiol. Lett., 155(1), pp. 1-10.

[14] Pattabhiramaiah, M., Reddy, M.S.& Brueckner, D. (2012). Detection of novel probiotic bacterium Lactobacillus spp. in the workers of Indian honeybee, Apis cerana indica. Int. J. Environ. Sci., 2(3), pp. 1135-1143.

[15] Sammataro, D. (2014). Beneficial microflora in honey bee colonies, USDA-ARS Carl Hayden Bee, Research Center Tucson, AZ, from http://gears.tucson.ars.ag.gov.

[16] Evans, J. & Lopez, D.L. (2004). Bacterial probiotics induce an immune response in the honey bee, (Hymenoptera: Apidae). J. Econ. Entomol., 97(3), pp. 752-756.

[17] Szymas, B., Langowska, A. & Kazimierczak-Baryczko, M. (2012). Histological structure of the midgut of honey bees (Apis mellifera L.) fed pollen substitutes fortified with probiotics, J. Apic. Sci., 56(1), pp. 5-12.

[18] Chandran, H. & Raghavan, K.T. (2018). Probiotic potency of Lactobacillus plantarum KX519413 and KX519414 isolated from honey bee gut, FEMS Microbiol. Lett., 365(4), pp. 1-8.

[19] Patruica, S. & Hutu, I. (2013). Economic benefits of using prebiotic and probiotic products as supplements in stimulation feeds administered to bee colonies, Turk. J. Vet. Anim. Sci., 37, pp. 259-263.

[20] Jeyaprakash, A., Hoy, M.A. & Allsopp, M.H. (2003). Bacterial diversity in worker adults of Apis mellifera capensis and Apis mellifera scutellata (Insecta : Hymenoptera) assessed using 16S rRNA sequence, J. Invertebr. Pathol., 84(2), pp. 96-103.

[21] Mohr, K.I. & Tebbe, C.C. (2006). Diversity and phylotype consistency of bacteria in the guts of three bee species (Apoidea) at an oilseed rape field, Environ. Microbiol., 8(2), pp. 258-272.

[22] Raghavan, K.T., Jacob, A.A., & Chandran, H. (2013). Honey bee gut flora as a source of LAB (lactic acid bacteria) with probiotic capabilities, J. Food Tech., Photon 105, pp. 126-134.