

บทที่ 2

บทสอบสวนเอกสารและงานที่เกี่ยวข้อง (Literature reviews)

2.1 เชื้อโนซีมา (Nosema)

Nosema จัดเป็น Microsporidia ซึ่งถือเป็นปรสิตภายในเซลล์กลุ่มใหญ่ที่แพร่กระจายอยู่ในธรรมชาติและพบได้ทั่วโลก (Matheson, 1996) ซึ่งปัจจุบันมีมากกว่า 150 ชนิด (species) เป็นเชื้อที่ก่อให้เกิดโรคในสัตว์ที่ไม่มีกระดูกสันหลัง (invertebrates) รวมถึงแมลง (insects) อย่างน้อย 12 อันดับ (orders) มักจะพบบ่อยในแมลงที่อยู่ในอันดับ Lepidoptera และ Hymenoptera (Higes, 2007a) โดยก่อให้เกิดโรคที่มีชื่อว่า Nosema disease (Bailey and Ball, 1991; Fries, 1989) เชื้อชนิดนี้จะทำให้ระบบทางเดินอาหารส่วนกลางของเจ้าบ้าน (hosts) เสียหาย ทำให้เกิดอาการท้องร่วงและ เชื้อมีความสามารถต้านทานต่อระบบภูมิคุ้มกันของตัวเจ้าบ้านที่เชื้อเข้าไปอาศัยอยู่ (de Graaf et al., 1994; Higes et al., 2006) สำหรับ *Nosema* ที่ก่อให้เกิดโรคในผึ้ง (honeybees) ที่รายงานมี 2 ชนิด คือ *N. apis* (Zander, 1909) และ *N. ceranae* (Fries et al., 1996) โดย *N. apis* เป็นปรสิตในผึ้งพันธุ์ (*Apis mellifera*) ซึ่งเป็นผึ้งพื้นเมืองของยุโรปปัจจุบันถูกนำมาเลี้ยงเป็นอุตสาหกรรมทั่วโลก ถูกค้นพบครั้งแรกโดย Zander ในปี 1909 ในผึ้งพันธุ์ โดยเชื้อชนิดนี้จะติดเชื้อในเนื้อเยื่อผนังของทางเดินอาหารส่วนกลาง (midgut) ของผึ้งงานตัวเต็มวัยเป็นสาเหตุทำให้ระบบย่อยอาหารผิดปกติ อาหารไม่ย่อยและเกิดอาการท้องเสียทำให้ผึ้งมีอายุสั้นและส่งผลให้จำนวนประชากรภายในรังลดลงอย่างรวดเร็ว (Anderson and Giaccon, 1992; Hassanein, 1953; Rinderer and Elliott, 1977; Higes et al., 2007a) ในอดีตพบโรคโนซีมาเฉพาะในยุโรปและเกิดจากเชื้อ *N. apis* เท่านั้น (Chen et al., 2008; Ellis and Munn, 2005) ต่อมาได้มีผู้ศึกษาพบว่าโรคโนซีมาเกิดการระบาดทั้งในภูมิภาคเอเชียและยุโรป โดยพบ *Nosema* ในผึ้งโพรง (*A. cerana*) ซึ่งเกิดจากเชื้อ *N. ceranae* ถูกค้นพบครั้งแรกโดย Fries และคณะ ในปี 1996 (Fries et al., 1996; Higes et al., 2006) ซึ่งเชื้อทั้งสองชนิดนี้มีความแตกต่างกันหลายประการเช่น SSUrRNA sequences (โดยใช้เทคนิค PCR เพื่อแยกความแตกต่างของ 16S rRNA ของทั้งสองชนิด) (Fries et al., 1996; Higes et al., 2006; Huang et al., 2007; Williams et al., 2007) ขนาดของสปอร์ ซึ่งพบว่าสปอร์ของ *N. ceranae* สั้นกว่าสปอร์ของ *N. apis* (Williams et al., 2007) จำนวน polar filament coils ของ *N. ceranae* มีจำนวน 20-23 filaments ในขณะที่ *N. apis* มีจำนวน 30-44 filaments (Fries, 1989) โดยเชื้อชนิดนี้เข้าไปติดและทำความเสียหายบริเวณกระเพาะอาหาร (ventriculus) ของผึ้งโพรง ทำให้บริเวณดังกล่าวมีลักษณะสีขาวขุ่นและบวมโป่งออก (Fries et al., 1996) นอกจากนี้มีรายงานการแพร่กระจายของเชื้อ *N. ceranae* จากผึ้งโพรง (*A. cerana*) สู่ผึ้งพันธุ์ (*A. mellifera*) ที่อยู่ในเอเชีย ยุโรป อเมริกา

เหนือ อเมริกากลาง และอเมริกาใต้ (Higes et al., 2006; Huang et al., 2007; Klee et al., 2007; Martin et al., 2007; Williams et al., 2008)

2.2 วงชีวิตของ *Nosema* (Life cycle of *Nosema*) และการแพร่เชื้อ (Spread)

การติดต่อของโรคหรือการติดเชื้อ เกิดได้โดยการป้อนอาหารโดยส่งต่อจากปากของผึ้งงานตัวหนึ่งสู่ผึ้งอีกตัวหนึ่งที่เรียกว่า trophallaxis (Webster, 1993) รวมทั้งการนำเอาส่วนของรวงรังที่มีสปอร์ของเชื้อปนอยู่เข้าปาก (ingestion of infected comb) หรือมาจากแหล่งน้ำที่ผึ้งนำเข้ามาใช้ในรัง (Bailey and Ball, 1991) เมื่อสปอร์ของเชื้อ *Nosema* เข้าสู่ร่างกายทางปาก สปอร์จะเริ่มพัฒนาภายใน 30 นาที ในกระเพาะอาหาร (ventriculus) และทางเดินอาหารส่วนกลาง (mid gut) โดยเฉพาะที่บริเวณเยื่อบุผิว (epithelium) ของ ventricular fold โดยการยื่น polar tube ที่เป็นตัวนำเอา sporoplasm ของเชื้อ เข้าไปในเซลล์เยื่อบุผิวของทางเดินอาหารส่วนกลาง โดยเชื้อจะเพิ่มจำนวนอย่างรวดเร็ว ภายในเวลา 6-10 วัน (Bailey and Ball, 1991) สปอร์ของโนซีมาสามารถเจาะผ่านทะลุระหว่างเซลล์ไปยังเซลล์ข้างเคียงทำให้เซลล์ปกติติดเชื้อได้ (Bailey and Ball, 1991; de Graaf et al., 1994; Goodman, 2007) เชื้อที่แพร่พันธุ์และเพิ่มจำนวนในร่างกายจะบ่มและพักตัวในร่างกายของผึ้งงานที่ยังมีชีวิตอยู่ นอกจากนี้สปอร์ของเชื้อยังอาจอยู่ที่ไขผึ้งที่เป็นส่วนประกอบของรัง ปนอยู่ในน้ำผึ้ง และส่วนอื่น ๆ ในรังผึ้ง (Canwell and Shimanuki, 1970) สปอร์ที่อยู่ที่เซลล์เยื่อบุผิวของทางเดินอาหารส่วนกลางจะถูกกำจัดออกจากทางเดินอาหาร โดยการขจัดเนื้อเยื่อผิวของทางเดินอาหารปกติ พร้อมกับการขับน้ำย่อยออกอยู่แล้ว ทำให้สปอร์สามารถเข้าสู่เซลล์อื่น ๆ ของทางเดินอาหารได้และมีสปอร์บางส่วนผ่านต่อไปยังลำไส้ (intestine) และหลุดออกมากับอุจจาระ (feces) ของผึ้งสู่สิ่งแวดล้อมภายนอกและสามารถเข้าสู่ผึ้งตัวต่อไปได้ใหม่ เมื่อผึ้งมาสัมผัสบริเวณที่มีอุจจาระที่มีสปอร์ปนต่อไป (Goodman, 2007; Malone et al., 1995; Matheson, 1993) พบการระบาดของโรคโนซีมาในฤดูหนาวและฤดูใบไม้ร่วง มักมีการระบาดน้อยในฤดูร้อน (summer) ช่วงฤดูนี้ผึ้งจะมีสปอร์อยู่ภายในร่างกายเล็กน้อย ทำให้ไม่แสดงอาการของโรคและไม่ก่อให้เกิดความเสียหายต่อประชากรภายในรังผึ้ง นอกจากนี้สปอร์บางส่วนยังติดอยู่ที่รวงรังและจะแพร่พันธุ์ใหม่อย่างรวดเร็วอีกครั้งเมื่อเริ่มเข้าสู่ฤดูใบไม้ร่วง (autumn) ซึ่งส่งผลให้สูญเสียประชากรผึ้งเป็นจำนวนมากอย่างรวดเร็ว (Goodman, 2007; Malone et al., 1995) และเสียหายหนักมากในฤดูหนาว (winter) และจะลดลงอีกครั้งเมื่ออุณหภูมิอุ่นขึ้นในช่วงหน้าร้อน

ปัจจุบันมีรายงานการแพร่ระบาดของเชื้อชนิดนี้ในผึ้ง พันธุ์ ผึ้งโพรง ผึ้งมิม ผึ้งหลวง โดยเฉพาะในผึ้งพันธุ์ที่เลี้ยงกันเป็นอุตสาหกรรมทั่วโลกและมีรายงานการได้รับความเสียหายอย่างมาก ในทั่วโลกเนื่องจากเป็นสาเหตุหลักในการทำให้ผึ้งตายที่ละมาก ๆ ประชากรภายในรังลดลงอย่างกระทันหัน ส่งผลเสียหายหนักกับรังที่ได้รับเชื้อ และส่งผลต่อเนื่องต่อผู้เลี้ยง ตลอดจนพืชที่อาศัยผึ้งเป็นตัวช่วยถ่ายละอองเรณู

2.3 ผลของเชื้อโนซีมาต่อผึ้ง (Effect of *Nosema* on bees)

ไม่พบการติดเชื้อในผึ้งระยะตัวหนอน (larvae) แต่สามารถพบได้ในผึ้งตัวเต็มวัย (adult) บางครั้งผึ้งที่ติดเชื้อจะไม่แสดงอาการเฉพาะของโรคแต่สามารถตรวจสอบได้โดยการตรวจดูทางเดินอาหารส่วนกลางของผึ้งโดยจะพบสปอร์ของ *Nosema* ในกรณีที่ได้รับเชื้อปริมาณมาก ๆ ทำให้ ผึ้งที่ได้รับเชื้อเกิดอาการท้องร่วงและตายในที่สุดเนื่องจากเชื้อเข้าไปทำลายเซลล์ ทำให้เซลล์เยื่อบุผิวของทางเดินอาหารส่วนกลางเสียหาย ไม่สามารถผลิตเอนไซม์มาย่อยเกสรที่กินเข้าไปได้ (de Graaf et al., 1994; Goodman, 2007; Malone et al., 1995; Matheson, 1993) ตัวอย่างในผึ้งหาอาหารของผึ้งพันธุ์ เมื่อได้รับเชื้อจำนวน 100,000 สปอร์ต่อตัว โดยป้อนปนกับสารละลายน้ำตาลปริมาตร 1 ไมโครลิตร จะมีผลทำให้ทางเดินอาหารส่วนกลางผลิตโปรติโอไลติกเอนไซม์ (proteolytic enzyme) ได้น้อยลง (Malone and Gatehouse, 1997) และส่งผลให้ผึ้งมีอายุสั้นลง (Ritter, 2001) ส่งผลให้ลดจำนวนประชากรภายในรังอย่างรวดเร็ว (Hassanein, 1953; Rinderer and Sylvester, 1978; Malone et al., 1995) การติดเชื้อในผึ้งงานกลุ่มหาอาหาร (foragers) จะทำให้การเก็บเกสรดอกไม้และน้ำหวานลดลง ทำให้รังขาดแคลนอาหาร สุขภาพโดยรวมของประชากรภายในรังอ่อนแอและทำให้ผึ้งเกิดอาการท้องเสีย ตายในที่สุดประชากรภายในรังลดลงอย่างรวดเร็ว ทำให้ผลผลิตภายในรัง (bee products) ลดลงรวมทั้งผลผลิตทางการเกษตร (crop production) เนื่องจากขาดแมลงถ่ายละอองเรณู (Anderson and Giaccon, 1992; Fries et al., 19984; Goodwin et al., 1990) หากผึ้งพยาบาล (nurse bees) ได้รับเชื้อชนิดนี้ ส่งผลให้การเจริญของต่อมไฮโปฟาริงค์ (hypopharyngeal glands) ลดลง หรือหยุดชะงัก ซึ่งมีผลต่อการผลิตนมผึ้ง (royal jelly) ได้ไม่เต็มที่ ส่งผลทำให้ผึ้งพยาบาลสูญเสียความสามารถในการเลี้ยงดูตัวอ่อน (Clark, 1980) จากการศึกษาการใช้เชื้อ *Nosema apis* จำนวน 5,000 สปอร์ ต่อตัว แก่ผึ้งงานของผึ้งพันธุ์อายุ 1 วัน พบว่าต่อมไฮโปฟาริงค์ไม่เจริญและฝ่อไปในที่สุด (Wang and Moeller, 1971) ส่งผลต่อเนื่องถึงคุณภาพของประชากรผึ้งภายในรังเนื่องจากได้โปรตีนคุณภาพต่ำและไม่เพียงพอต่อการเจริญเติบโต (Anderson and Giaccon, 1992; Clark, 1980; Fries et al., 19984; Goodwin et al., 1994) จากการศึกษาการใช้เชื้อ *Nosema apis* จำนวน 5,000 สปอร์ ต่อตัว แก่ผึ้งงานของผึ้งพันธุ์อายุ 1 วัน พบว่าต่อมไฮโปฟาริงค์ไม่เจริญและฝ่อไปในที่สุด (Wang and Moeller, 1971) ส่งผลต่อเนื่องถึงคุณภาพของประชากรผึ้งภายในรัง และหากผึ้งนางพญา (queen) ติดเชื้อจะมีผลทำให้การวางไข่ลดลงและตายภายใน 2-3 สัปดาห์ (Goodman, 2007; Hassanein, 1953; Malone et al., 1995; Rinderer and Sylvester, 1978; Webster et al., 2004) ผลเสียหายโดยรวมทำให้ประชากรผึ้งลดน้อยลงและไม่มีคุณภาพ ผลคือให้ผลิตภัณฑ์ผึ้งชนิดต่าง ๆ ลดลงอย่างมาก หรืออาจตายยกรัง นอกจากนี้ทำให้ระบบนิเวศน์ขาดแคลน แมลงถ่ายละอองเรณูที่สำคัญ โดยเฉพาะในพืชเศรษฐกิจทั้งหลาย ส่งผลให้การติดผลลดลง ตลอดจนทำให้ความหลากหลายของชนิดพืชลดลงไปด้วย โดยเฉพาะถ้าหากมีการระบาดต่อเนื่องและยาวนาน (Wang and Moeller, 1969, 1971)

2.4 ต่อมไฮโปฟาริงค์ (Hypopharyngeal glands)

ต่อมไฮโปฟาริงค์ (hypopharyngeal glands) เป็นต่อมมีท่อ (exocrine glands) มีอยู่หนึ่งคู่ตั้งอยู่บนส่วนหัว เรียงตัวเป็นสายยาว ข้างตาประกอบ (compound eyes) ทั้งสองข้าง โครงสร้างต่อมมีลักษณะเป็นกระเปาะที่แตกแขนงซับซ้อน (compound alveolar glands) ทำหน้าที่ผลิตนมผึ้ง (royal jelly) ที่มีองค์ประกอบหลักเป็นสารอาหารประเภทโปรตีนและคาร์โบไฮเดรต เพื่อเลี้ยงดูตัวอ่อนของผึ้งงาน (workers) อายุ 1-3 วันและนางพญา (queen) ตลอดอายุขัย (Brouwers, 1982) ถ้าต่อมเจริญดีจะสามารถผลิตนมผึ้งที่มีคุณภาพดี คือมีคุณค่าทางอาหารสูงโดยเฉพาะพวกโปรตีนและกรดอะมิโน ส่งผลให้ตัวอ่อนมีความแข็งแรงและเมื่อได้อาหารที่สมบูรณ์ จะได้ผึ้งงานตัวเต็มวัยที่แข็งแรง ทำให้รังแข็งแรง (strong colony) นอกจากนี้จะทำให้นางพญาได้รับอาหารที่ดี มีคุณภาพสูง ทำให้นางพญามีสุขภาพดี วางไข่ได้มาก ผลิตเฟอรโมนควบคุมรังได้ดี ทำให้ควบคุมกิจกรรมต่าง ๆ ภายในรังได้ปกติ (Graham, 1992; Otani et al., 1985; Otis, 1991; Seeley, 1985)

ต่อมไฮโปฟาริงค์ในผึ้งที่อายุน้อยจะยังไม่เจริญดีและจะเจริญเต็มที่เมื่อผึ้งเข้าสู่ระยะผึ้งพยาบาล (nurse bees) และยังคงเจริญดีในระยะผึ้งงานระยะหาอาหารซึ่งเป็นกลุ่มผึ้งที่มีอายุมากกว่าผึ้งพยาบาล ต่อมานี้จะเปลี่ยนไปทำหน้าที่ผลิตเอนไซม์อินเวอร์เทส (invertase) และกลูโคซิเดส (glucosidase) แทนซึ่งมีบทบาทสำคัญต่อการผลิตน้ำผึ้ง (honey) จากน้ำหวาน (nectar) จากดอกไม้ และต่อมานี้จะเริ่มเสื่อมสลายเมื่อผึ้งเข้าสู่ระยะผึ้งทหาร (guardian bees) (Brouwers, 1982; Huang and Otis, 1989; Otani et al., 1985; Simpson, 1968; Suwannapong et al., 2007; 2010a) และเนื่องจากผึ้งเป็นแมลงสังคมแท้ชั้นสูง (highly eusocial insect) ที่แบ่งหน้าที่การทำงานออกเป็นวรรณะต่าง ๆ ซึ่งได้แก่ วรรณะผึ้งงาน (workers) ผึ้งนางพญา (queen) และผึ้งตัวผู้ (drones) ในขณะเดียวกันในกลุ่มของวรรณะผึ้งงานยังแบ่งหน้าที่การทำงานออกเป็นกลุ่มย่อยอีกได้แก่ ผึ้งทำความสะอาดรัง (house cleansing bees) มีอายุตั้งแต่โผล่ออกมาจากเซลล์ของดักแด่ถึง 3 วัน ผึ้งพยาบาลมีอายุในช่วง 3-16 วัน มีหน้าที่ผลิตนมผึ้งเพื่อเลี้ยงดูตัวอ่อนและนางพญา ผึ้งงานกลุ่มหาอาหารมีอายุ 16-28 วัน มีหน้าที่หาอาหาร เช่นการเก็บเกสรจากดอกไม้เพื่อผลิตน้ำผึ้ง และกลุ่มผึ้งป้องกันรัง เป็นผึ้งที่มีอายุมากที่สุด (Seeley, 1985)

ทอกซิน (toxin) หรือสารพิษจากเชื้อ *Nosema* สามารถทำลายโครงสร้างของเซลล์หน่วยสร้างสาร (secretory cells) ของต่อมไฮโปฟาริงค์ ส่งผลให้ผึ้งพยาบาลผึ้งพันธุ์สามารถผลิตนมผึ้งได้ลดลง (Hassanein, 1952; Wand and Muller, 1969; 1979; 1971) หากผึ้งที่มีอายุน้อยได้รับเชื้อจะทำให้ต่อมดังกล่าวไม่เจริญและไม่สามารถผลิตนมผึ้งได้ (Wand and Muller, 1969).

จากเหตุผลข้างต้นทำให้คณะผู้วิจัยสนใจศึกษาการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างทางจุลกายวิภาค อัลตราสตรัคเจอร์และอัตราร้อยละการติดเชื้อ ปริมาณโปรตีนของต่อมนี้ ระหว่างผึ้งได้รับเชื้อของ *N. ceranae* ความเข้มข้นที่กำหนดระดับต่าง ๆ กับผึ้งปกติ ในผึ้งทั้ง 5 ชนิดที่มีในประเทศไทย

2.5 ทางเดินอาหารส่วนกลางของผึ้ง (Honeybee midgut)

ผึ้งประกอบด้วยท่อทางเดินอาหาร (digestive tract) ซึ่งแบ่งออกเป็น 3 ส่วนคือ ทางเดินอาหารส่วนต้น (foregut) ทางเดินอาหารส่วนกลาง (midgut) และทางเดินอาหารส่วนท้าย (hindgut) โดย **ทางเดินอาหารส่วนต้น (foregut)** เริ่มจากช่องปาก (cibarium) ถัดลงไปเป็นส่วนที่แคบเข้าและมีกล้ามเนื้อหนาเรียกบริเวณนี้ว่า คอหอย (pharynx) ซึ่งถัดจากคอหอยไปเป็นท่อยาวแคบเรียกหลอดอาหาร (esophagus) ซึ่งเริ่มจากส่วนนอกยาวไปจนถึงส่วนหน้าของช่องท้องเชื่อมติดต่อกับกระเพาะเก็บน้ำผึ้ง (honey ที่มีการพัฒนาขยายใหญ่ พบในผึ้งงานเท่านั้น กระเพาะเก็บน้ำผึ้งยังทำหน้าที่เปลี่ยนน้ำหวานจากดอกไม้ให้เป็นน้ำผึ้ง ได้ด้วยการปล่อยเอนไซม์อินเวอร์เตส (invertase) จากต่อมน้ำลาย มาเพื่อย่อย ซูโครส (sucrose) ให้ได้เป็นกลูโคส (glucose) และฟรุคโตส (fructose) ขณะที่ผึ้งบินกลับรัง (สิริวัฒน์, 2532; Snodgrass, 1935) ทางเดินอาหารส่วนนี้เป็นทางผ่านของเชื้อ *Nosema* เพื่อลำเลียงเชื้อส่งต่อไปที่ทางเดินอาหารส่วนถัดไป ยังไม่มีรายงานการแพร่กระจายหรือความเสียหายของทางเดินอาหารส่วนนี้จากโรค *Nosema* **ทางเดินอาหารส่วนกลาง (midgut)** เริ่มต้นจากส่วนโพรเวนทริคิวลัส (proventriculus) ซึ่งเชื่อมต่อจากกระเพาะเก็บน้ำผึ้งเป็นท่อนสั้น และแคบ ท่อนี้ยื่นเข้าไปในกระเพาะเก็บน้ำหวานมีลิ้นเปิดปิด ประกอบด้วยเนื้อเยื่อรูปสามเหลี่ยม 4 อัน ทำหน้าที่ป้องกันไม่ให้มน้ำผึ้งในกระเพาะเก็บน้ำหวานไหลไปรวมกับอาหารในทางเดินอาหารส่วนกลางหรือเวนทริคิวลัส (ventriculus) และเชื่อว่าทำหน้าที่ในการแยกเกสรดอกไม้ออกจากน้ำหวานที่ผ่านมาจากกระเพาะเก็บน้ำผึ้ง ท่อเวนทริคิวลัสเป็นท่อกลมยาวขนาดใหญ่ขดเป็นรูปตัวยู (U-shape) มีขนาดยาวที่สุดของทางเดินอาหาร ภายในเวนทริคิวลัสเคลือบด้วยเยื่อเมือก (gelatinous mass) ซึ่งเอนไซม์ถูกสร้างขึ้นมาจากเซลล์บุผิว (epithelial cells) และจะหลั่งออกมาจากเยื่อเมือกเมื่อมีอาหารอยู่ภายในเวนทริคิวลัส โดยเฉพาะอาหารประเภทโปรตีน ที่สำคัญคือพวกละอองเรณู (pollen grains) และทำหน้าที่ดูดซึมอาหารที่ย่อยแล้วทั้งหมดเข้าสู่เซลล์ (สิริวัฒน์, 2532; Snodgrass, 1935) ผึ้งที่ได้รับเชื้อ *Nosema* จะทำให้เซลล์ของเยื่อบุผิวบริเวณนี้เสียหาย ไม่สามารถผลิตเอนไซม์ ไม่สามารถย่อยพวกเรณูที่ผึ้งกินเข้าไปได้ ผลคือพบเกสรผึ้งหรือเรณูจำนวนมากในผึ้งที่ติดเชื้อ เมื่อติดเชื้อจำนวนมากจะทำให้ผึ้งท้องเสียและตายในที่สุดเนื่องจากเซลล์บริเวณนี้ถูกทำลายเสียหายหนัก (Anderson and Giacon, 1992; Hassanein, 1953; Rinderer and Elliott, 1977; Higes et al., 2007a) **ทางเดินอาหารส่วนท้าย (hindgut)** เริ่มต้นจากลำไส้เล็ก (intestine) ซึ่งเชื่อมต่ออยู่กับเวนทริคิวลัส บริเวณที่เชื่อมต่อกันนี้จะมีท่อขับถ่าย มัลพีเจียลทิวบูล (Malpighian tubules) เป็นท่อเล็กๆ ยาวจำนวนมาก ทำหน้าที่ขับถ่ายดูดซึมของเสีย เช่น กรดยูริก (uric acid) และเกลือต่างๆ จากเลือดไปยังลำไส้ใหญ่ถัดจากลำไส้เล็กเป็นไส้ตรง (rectum) ทำหน้าที่ดูดซึมสารอาหารและน้ำที่ย่อย ขับกากอาหารออกสู่ภายนอก ร่างกายทางทวารหนัก (anus) (สิริวัฒน์, 2532; Snodgrass, 1935) พบว่าผึ้งที่ได้รับเชื้อ *N. apis* ทางเดินอาหารส่วนนี้จะประกอบด้วยเกสร (pollen grains) ที่ไม่ถูกย่อยกระจายอยู่เต็มทางเดินอาหารส่วนท้ายนี้ ทำให้บวม โป่งออกและมีสีน้ำตาลเข้ม (de Graaf et al., 1994; Higes et al., 2006)

2.6 ผึ้งในประเทศไทย (Honeybees of Thailand)

ผึ้งเป็นแมลงสังคมแท้นสูง (highly eusocial insects) จัดอยู่ในอันดับไฮมีโนพเทอร่า (Order Hymenoptera) สกุลเอปิส (Genus *Apis*) ในประเทศไทยพบจำนวน 5 ชนิด โดยแบ่งออกเป็น 2 กลุ่ม คือ ผึ้งพื้นเมืองของประเทศไทย (native species) ได้แก่ (*Apis dorsata* Fabricius, 1793) ผึ้งมิม (*A. florea* Fabricius, 1787) ผึ้งมิมดำ (*A. andreniformis* Smith, 1858) และผึ้งโพรง (*A. cerana* Fabricius, 1793) และผึ้งที่นำเข้ามาจากต่างประเทศ (introduced species) คือผึ้งพันธุ์ (*A. mellifera* Linnaeus, 1758) (Suwannapong, 2000; Wongsiri et al., 1990; 1996) ผึ้งแต่ละรังประกอบด้วย 3 วรรณะ คือ ผึ้งนางพญา (queen) ผึ้งตัวผู้ (drones) และผึ้งงาน (workers) โดยแต่ละวรรณะมีหน้าที่ภายในรังแตกต่างกัน โดยผึ้งนางพญามีหน้าที่วางไข่ เพียงตัวเดียวภายในรัง โดยผลิตสารเฟอโรโมนที่เรียกว่า queen pheromone โดยปล่อยออกมาเพื่อควบคุมพฤติกรรมของผึ้งวรรณะอื่น ๆ ให้ทำงานและกิจกรรมต่าง ๆ ที่สำคัญต่อการดำรงชีวิต ส่วนวรรณะผึ้งงาน ซึ่งมีจำนวนสมาชิกหลายพันหรือหลายหมื่นตัว ขึ้นอยู่กับชนิดของผึ้ง ในวรรณะนี้ประกอบด้วยผึ้งงานที่ทำหน้าที่แตกต่างกันหลายกลุ่มได้แก่ ผึ้งงานกลุ่มหาอาหาร (foraging bees) ทำหน้าที่หาน้ำหวานและเกสรเพื่อมาใช้และเก็บสะสมภายในรัง ผึ้งงานกลุ่มป้องกันรัง (guardian bees) ทำหน้าที่ป้องกันรังเมื่อมีศัตรูมารบกวน ผึ้งพยาบาล (nurse bees) ทำหน้าที่ผลิตนมผึ้งเพื่อมาเลี้ยงดูตัวอ่อน ที่มีอายุ 1-3 วัน และนางพญาตลอดอายุขัย ผึ้งงานกลุ่มทำความสะอาดรัง (house cleansing bees) เป็นต้น ส่วนวรรณะผึ้งตัวผู้มีประมาณ 200-300 ตัวต่อรัง มีหน้าที่เพียงอย่างเดียวคือผสมพันธุ์กับผึ้งนางพญา เมื่อรังไม่ต้องการจะถูกจำกัดทิ้งออกนอกรัง (Ruttner, 1988; Otis, 1991) ซึ่งกิจกรรมต่าง ๆ ที่เกิดขึ้นภายในรังผึ้งจะใช้สารที่เรียกว่าเฟอโรโมน ในการสื่อสารระหว่างวรรณะ หรือแม้กระทั่งในวรรณะเดียวกัน ในกรณีที่ผึ้งมีการติดเชื้อหรือมีพยาธิสภาพ ในร่างกายทำให้สูญเสียการทำงานภายในรังและส่งผลโดยรวมต่อสมาชิกทุกตัวภายในรัง เนื่องจากผึ้งใช้เฟอโรโมนในการสื่อสารกันกับสมาชิกทุกตัวภายในรัง ดังนั้นเมื่อผึ้งชนิดต่าง ๆ ทั้ง 5 ชนิดที่มีในประเทศไทย ซึ่งมีลักษณะชีววิทยาย่างประการ ที่แตกต่างกันเช่น สันฐานวิทยา การสร้างรัง พฤติกรรมต่าง ๆ การใช้เฟอโรโมนการสร้างพรอพอลิส ถิ่นอาศัย เมื่อผึ้งชนิดต่าง ๆ ได้รับเชื้อ *Nosema* ที่ระดับต่าง ๆ ที่กำหนด น่าจะส่งผลต่อการทำกิจกรรมต่าง ๆ ภายในเซลล์ซึ่งอาจก่อให้เกิดความเสียหายอาจถึงขั้นร้ายแรง ที่น่าจะมี ความแตกต่างกัน ซึ่งข้อมูลเหล่านี้จะเป็นประโยชน์ในการศึกษาในระดับลึกต่อไป ซึ่งข้อมูลดังกล่าวจะนำไปสู่การพัฒนาการวิจัยเพื่อนำข้อมูลของความแตกต่างจากความหลากหลายของสิ่งมีชีวิตมาใช้ประโยชน์ให้สูงสุด ไม่ว่าจะเป็นเรื่ององค์ความรู้ เกษตรกรรมและอุตสาหกรรมที่เกี่ยวข้อง

2.7 พรอพอลิส (Propolis)

พรอพอลิส เป็นผลิตภัณฑ์ผึ้งที่ได้จากยางไม้ (resins) ประกอบด้วย ยางไม้ (50-70%), ไขผึ้ง (30-50%), เกสรผึ้ง (10%) และน้ำมันหอมระเหย (5-10%) นอกจากนี้ยังประกอบด้วยสารต่าง ๆ

มากกว่า 180 ชนิด ทั้งนี้ขึ้นอยู่กับชนิดของพืชและถิ่นที่อยู่อาศัย ตลอดจนฤดูกาลที่ผึ้งไปเก็บมา ผึ้งที่พบการสร้างพรอพอลิสได้แก่ ผึ้งพันธุ์ (*Apis mellifera*) ผึ้งมัมเล็ก (*A. andreniformis*) ผึ้งมัม (*A. florea*) ผึ้งหลวง (*A. dorsata*) ส่วนผึ้งโพรงไม่พบการสร้างพรอพอลิส จึงเป็นที่น่าสนใจเป็นอย่างยิ่งว่าผึ้งโพรงน่าจะมีวิธีการหรือผลิตภัณฑ์ผสมอยู่ในไขผึ้งหรือผลิตภัณฑ์อื่นที่สามารถทำให้สามารถกำจัดเชื้อโรคหรือพวกแบคทีเรียที่เซลล์ของรวงรังแก้ตัวอ่อนได้ ดังนั้นการศึกษาด้านการติดเชื้อ *Nosema* ของผึ้งโพรง น่าข้อมูลที่เป็นประโยชน์อย่างยิ่ง โดยเฉพาะการทดสอบการยับยั้งด้วย พรอพอลิส ในผึ้งชนิดนี้น่าจะให้ผลที่แตกต่างจากผึ้งชนิดอื่นในประเทศไทย รวมทั้งน่าจะให้ผลแตกต่างจากผึ้งต่างประเทศด้วยเช่นกัน พรอพอลิสประกอบด้วย phenolic compounds ที่สำคัญหลายชนิด เช่น quercetin , caffeic acid และ ferulic acid ฟลาโวนอยด์ (flavonoid) เอสเทอร์ (ester) กรดฟีโนอิก (phenolic acid) เทอร์ปีน (terpenes) กรดเบนโซอิก (benzoic acid) กรดซินนามิก (cinnamic acid) กรดคาฟอิก (caffeic acid) กรดซินนาปิก (sinapic acid) กรดไอโซเฟอรูลิก (isoferulic acid) และคริสซิน (chrysin) (Usami et al., 2004) นอกจากนี้ยังประกอบด้วยสารอื่นๆ เช่น แมกนีเซียม ทองแดง แคลเซียม ธาตุเหล็ก สังกะสี และ วิตามินต่าง ๆ เช่น วิตามินเอ วิตามินบี วิตามินบีหนึ่ง วิตามินบีสอง วิตามินบีหก วิตามินซี และวิตามินอี เป็นต้น (Castaldo and Capasso, 2002) พรอพอลิสมีสีน้ำตาลจนเกือบดำ หรือบางพื้นที่มีสีเขียวหรือขาวทั้งนี้ขึ้นอยู่กับชนิดของยางไม้ และฤดูกาล ดังนั้นชนิดของสาร สัดส่วนของสารที่เป็นองค์ประกอบของพรอพอลิส จะแตกต่างกันในผึ้งแต่ละชนิดด้วยเช่นกัน (Bankova, Castro and Marcucci, 2000) ผึ้งใช้พรอพอลิส ในการอุดรอยต่อ (sealing) ต่าง ๆ และยึดรวงรัง บางทีจึงถูกเรียกว่า “กาวผึ้ง” (bee glue) ใช้ในการซ่อมแซมรังหรือใช้อุดหน้าทางเข้ารัง เพื่อลดขนาดรูเปิดเข้ารังให้พอดีเพื่อสะดวกในการดูแล และป้องกันรังผึ้งจากศัตรูไม่ให้เข้ามาในรัง ตลอดจนรักษาความสะอาด และป้องกันการระบาดของเชื้อโรคภายในรังด้วย ใช้หุ้มซากของศัตรูที่มีขนาดใหญ่และตายอยู่ในรังไม่สามารถจะนำออกไปทิ้งนอกรังได้เพื่อไม่ให้เชื้อโรคเจริญและแพร่เข้ามาในรังได้ นอกจากนี้ยังใช้เคลือบรวงรังเพื่อให้แต่ละเซลล์ที่นางพญาจะวางไข่มีสภาพสะอาดปลอดจากเชื้อและปกป้องรังจากศัตรูไม่ให้เข้ามาในรัง (Russo, Longo & Vanella, 2008) สารสกัดจากพรอพอลิส สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรียในช่องปาก ได้มากกว่า 15 ชนิด จากการใช้พรอพอลิสทดสอบการยับยั้งเชื้อ *Staphylococcus aureus* ที่เลี้ยงในห้องปฏิบัติการสามารถยับยั้งได้ดีเมื่อเทียบกับ คลอแรมเฟนิคอล(chloramphenicol) เซฟราดิน (cefradine) และ โพลีมิกซิน บี (polymyxin B) (Castaldo and Capasso, 2002) นอกจากนี้ยังมีรายงานการทดสอบคุณสมบัติการต้านอนุมูลอิสระของพรอพอลิสซึ่งสารประกอบในการต้านอนุมูลอิสระของ โดยเฉพาะสารในกลุ่ม flavonoids ที่พบในพรอพอลิสนั้นช่วยป้องกันการเสื่อมสภาพของวิตามินชนิดต่าง ๆ รวมถึงกรดไขมันที่จำเป็นบางชนิดอีกด้วย (Sroka, 2006) สารสกัดจากพรอพอลิสมีผลต่อการยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็งโดยสารที่มีบทบาทสำคัญในพรอพอลิสที่มีฤทธิ์ในการยับยั้งเซลล์ มะเร็งคือ quercetin, caffeic acid, cleerodane diterpendoid โดย cleerodane และ diterpendoid มีฤทธิ์ในการยับยั้งการแพร่กระจายของเซลล์มะเร็ง

มากที่สุด สารอพิจีนิน (apigenin) ซึ่งเป็นสารประกอบที่มีอยู่ในน้ำผึ้ง และพรอพอลิส สามารถยับยั้งเชื้องอกได้ (Munoz et al., 2007; Saforcin, 2007; Yaghoubi et al., 2007)

งานวิจัยในครั้งนี้สนใจนำเอาพรอพอลิสของผึ้งในประเทศไทยมาเพื่อใช้ในการยับยั้งการเจริญของเชื้อ *Nosema* ในผึ้ง 5 ชนิดของประเทศไทย เนื่องจากในพรอพอลิสมีสารที่มีคุณสมบัติในการยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์และเชื้อราได้หลายชนิด ดังนั้นอาจเป็นไปได้ว่าพรอพอลิสของผึ้งในประเทศไทยบางชนิดอาจสามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อ *Nosema* ในผึ้งบางชนิดได้