

บทที่ 3

อุปกรณ์และวิธีการทดลอง

Materials and Methods

3.1 อุปกรณ์ (Instruments)

- Camera (Nikon, Japan)
- Freezer (Krungthai, Thailand)
- Incubator (Thermotek, Thailand)
- Incubator (WET binder, US)
- LKB Ultramicrotome Ultratome V (LKB, Sweden)
- Light Microscope (Nikon, Japan)
- Microcentrifuge
- Microsyrinx 1 μ l (Varian, USA)
- Microsyrinx 10 μ l (Hewlett-packard, USA)
- Stereo Microscope (Nikon, Japan)
- Transmission Electron Microscope TEM (Phillip, Netherlands)
- Stereomicroscope (Nikon, Japan)
- Spectrophotometer (Shimadzu, Australia)
- Rotary microtome (Leica, Germany)
- Magnetic stirrer and magnetic bars (Heidolph, Germany)
- Microtome blades (Feather, Japan)
- Warmplate (Fisher, USA)

3.2 วัสดุ (Inventory supplies)

- Beakers 5, 25, 80, 125, 500 and 1,000 ml (Pyrex, Germany)
- Cuvets (VWR international)
- Capsules; Embedding, Size 00, 8 mm I.D (EMS, USA)
- Copper Grid 200 mesh (EMS, USA)
- Bee cages (80 x130x135 mm³)
- Dissecting Scissors CV scissors, 4" (EMS, USA)

- Embedding Capsule Holder (EMS, USA)
- Eppendorf 1 ml
- Filter paper Whatmann No. 4 (Whatmann International Ltd., England)
- Forcep No. 4 INOX (Dumont & Fils, Switzerland)
- Glass Knife Boats (EMS, USA)
- Glass Knife Strips Size 6.4 mm × 25 mm × 400 mm (EMS, USA)
- Micropipette 10, 200 and 1,000 p (Gilson, France)
- Mixer Vortex Genies 2 (EMS, USA)
- Parafilm M and Dispenser (EMS, USA)
- Pasteur Pipettes
- Petri Dish (Pyrex, Germany)
- Pipette Tips 10, 200 and 1,000 µl (Axygen-Hayward, USA)
- Sectioning set (Chiron Stainless, Germany)
- Specimen Forceps 4.5" (EMS, USA)
- Staining jars
- Test tube 12 × 75 mm²



3.3 สารเคมี (Chemicals)

3.3.1 สารเคมีสำหรับศึกษาภายใต้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องผ่าน (Chemicals for transmission Electron Microscopy)

- Absolute Ethyl Alcohol (Merk, Germany)
- Dodecenyl Succinic Anhydride (Sigma Chemical Company, USA)
- DMP 30 (2, 4, 6 Tridimethyl Amionmethyl Phenol) (EMS, USA)
- Epon 812 (EMS, USA)
- Glutaraldehyde (Sigma Chemical Company, USA)
- Hydrochloric Acid (Merk, Germany)
- Lead Citrate (Sigma Chemical Company, USA)
- Methyl Nadic Anhydride (EMS, USA)
- Osmium Tetroxide, Crystalline, Highest Purity, 99.95% (EMS, USA)
- Paraformaldehyde, EM Grade, Purified (EMS, USA)

- Phosphotungstic acid (Fluka, Switzerland)
- Propylene Oxide, EM grade (EMS, USA)
- Sodiumborate (Fluka, Switzerland)
- Sodium Cacodylate (Sigma Chemical Company, USA)
- Sodium Hydroxide (Fluka, Switzerland)
- Methylene Blue (Fluka, Switzerland)
- Uranyl Acetate (Fluka, Switzerland)

3.3.2 สารเคมีสำหรับศึกษาภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบให้แสง

(Chemicals for Light Electron Microscopy)

- Activated charcoal
- Absoluted Ethyl Alcohol (J.T Baker, Malaysia)
- Basic Fuchsin (Labchem, Australia)
- Distilled water
- Formaldehyde Solution (Univar, Australis)
- Glacial Acetic Acid (Analar, England)
- Hydrochloric Acid (J.K Baker, USA)
- Light Green (Fluka, Switzerland)
- Picric Acid (Labchem, Australia)
- Periodic Acid (Merck Chemical,)
- Permunt (Fisher Chemical, USA)
- Sodium Bisulfite
- Toluidine blue
- Xylene (Panreac, England)

3.3.3 สารเคมีสำหรับวัดค่าโปรตีนวิธีแบรดฟอร์ด (Chemicals for Bradford Protein Assay)

- BSA (Bovine Serum Albumin; Sigma Chemical Company, USA)
- Coomassie Blue 250 G (C.1# 42655) (Sigma Chemical Company, USA)
- Distilled water
- Glycerine jelly (Ajax, Australia)

- Methanol (Sigma Chemical Company, USA)
- Phosphoric acid (Merck KGaA, Germany)
- Sodium Hydroxide (NSW 2147, Australia)

3.4 ตัวอย่างที่ใช้ศึกษา (Specimens)

- ผึ้งมิม (*Apis florea*) วรรณะผึ้งงาน (workers)
- ผึ้งโพรง (*A. cerana*) วรรณะผึ้งงาน (workers)
- *Nosema ceranae*

3.5 สถานที่ศึกษา (Study site)

3.5.1 บริเวณที่ศึกษาการกระจายตัว (การแพร่ระบาดของเชื้อ)

- 3.5.1.1 ภาคเหนือ
- 3.5.1.2 ภาคตะวันออก
- 3.5.1.3 ภาคตะวันออกเฉียงเหนือ

3.5.2 บริเวณที่เก็บตัวอย่างเชื้อเพื่อศึกษาอัตราการติดเชื้อในห้องปฏิบัติการ

ตัวอย่างที่ใช้ในการศึกษาค้างนี้เก็บรวบรวมจากฟาร์มเลี้ยงผึ้งในจังหวัด สมุทรสงคราม

3.5.3 ศึกษาอัตราการติดเชื้อในห้องปฏิบัติการ

การศึกษาดูผลเกี่ยวกับการติดเชื้อโนซีมาในผึ้งทั้งสองชนิด ทำการศึกษาดูผล ณ ห้องทดลองของภาควิชาชีววิทยา ห้อง BS3108 อาคารวิทยาศาสตร์ชีวภาพ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา ประเทศไทย

3.6 วิธีการศึกษาทดลอง (Methodology)

3.6.1 ขั้นตอนการศึกษาการแพร่ระบาดของเชื้อ *Nosema ceranae* และการเพิ่มจำนวนเชื้อในห้องปฏิบัติการ

1. สุ่มเก็บตัวอย่างผึ้งงานระยะตัวเต็มวัย ของผึ้งทั้ง 2 ชนิด ในประเทศไทย คือ ผึ้งโพรง (*Apis cerana*) และ ผึ้งมิม (*A. florea*) จากภาคเหนือ ตะวันออกเฉียงเหนือ ภาคกลางและภาคตะวันออก
2. โดยสุ่มเก็บผึ้งจำนวน 50 ตัว/รัง/ชนิด/บริเวณ

3. นำผิ้วตัวอย่างใส่ลงในสารละลายกลูโคสความเข้มข้นร้อยละ 50 (W/W) ที่บรรจุอยู่ในขวดที่มีฝาปิดสนิท เพื่อนำกลับไปตรวจนับหาเชื้อละนับจำนวนสปอร์ในห้องปฏิบัติการ (โดยใช้ Haemocytometer)
4. นำตัวอย่างผิ้วมาตัดเอาทางเดินอาหารส่วนกลาง (mid gut) ออก โดยใช้ปากคีบปลายแหลมขนาดเล็ก
5. นำทางเดินอาหารส่วนกลางใส่ลงใน microcentrifuge tube ขนาด 1.5 ml./ทางเดินอาหาร ของ ผิ้ว 20 ตัว ที่ภายในบรรจุน้ำกลั่นปริมาตร 200 ไมโครลิตร
6. บดด้วย homogenizer ขนาดเล็ก
7. นำไปปั่นด้วยเครื่อง centrifuge ที่ 6,000 g เป็นเวลา 5 นาที
8. ใช้ pasture pipette ดูดเอาส่วนที่เป็นตะกอนสีขาวออกมาแล้วใส่ลงใน microcentrifuge tube ขนาด 1.5 ml อีกอันหนึ่งที่ภายในบรรจุน้ำกลั่นปริมาตร 200 ไมโครลิตร
9. นำเอา microcentrifuge tube ในข้อ 8 ไป vortex ให้เป็นเนื้อเดียวกันแล้วนำไปนับเซลล์ด้วยเครื่อง Hemocytometer (ในกรณีที่พบสปอร์ของโนซีมา)
10. บันทึกจำนวนสปอร์ต่อ 1 ไมโครลิตร
11. ทำเช่นเดียวกันในผิ้วทุกชนิด และทุกบริเวณศึกษา จนได้จำนวนสปอร์เพียงพอต่อความต้องการ
12. นำสปอร์ที่ได้ไปป้อนให้กับผิ้วงานของผิ้วพันธ์อายุ 1 วัน โดยใช้ 5,000 สปอร์ต่อผิ้ว 1 ตัว แล้วเลี้ยงใน incubator ที่อุณหภูมิ 34 องศาเซลเซียส ความชื้นสัมพัทธ์ 50 % นำผิ้วที่ตายในแต่ละวันมาตรวจนับ โนซีมาเพื่อเก็บไว้สำหรับการทดลองต่อไป

3.6.2 การทดลองให้ติดเชื้อ (Experimental Infection)

3.6.2.1 การเตรียมสปอร์ (Spore preparation)

1. สปอร์ของโนซีมาที่ใช้ในการศึกษาครั้งนี้เตรียมจากรังของผิ้วโพรงในจังหวัดสมุทรสงคราม ที่พบว่าการติดเชื้อโนซีมาอย่างรุนแรง
2. นำผิ้วที่ติดเชื้อมาผ่าแยกเดินอาหารส่วนกลางออก นำทางเดินอาหารส่วนกลางที่ได้ใส่ลงใน microcentrifuge tube ขนาด 1.5 ml ที่มีน้ำกลั่นบรรจุอยู่ 200 μ l จากนั้นทำการบดทางเดินอาหารส่วนกลางให้ละเอียด แล้วนำไปปั่นเหวี่ยงด้วยเครื่อง microcentrifuge ที่ 6,000 g เป็นเวลา 10 นาที
3. แยกเอาส่วนของเหลวที่อยู่ด้านบนทิ้ง เก็บตะกอนที่มีลักษณะสีขาวขุ่นที่อยู่บริเวณด้านบนสุดของตะกอนซึ่งเป็นส่วนของสปอร์โนซีมา จากนั้นนำเอาสปอร์ที่ได้มาใส่ในสารละลายซูโครส ความเข้มข้นร้อยละ 50 และทำการนับภายใต้กล้องโดยใช้ hemocytometer เพื่อเตรียมระดับความเข้มข้นของสปอร์ ระดับต่างๆ คือ 5,000 10,000 และ 20,000 สปอร์ต่อไมโครลิตร

3.6.2.2 ศึกษาอัตราการติดเชื้อขั้นต้นโดยใช้ปริมาณสปอร์คือ 5,000 8,000 และ 10,000 สปอร์ต่อตัว

1. นำคอนมดที่มีตัวอ่อนในระยะดักแด้จากรังที่แข็งแรงและตรวจดูแล้วว่าไม่มีการติดเชื้อโนซีมา จากฟาร์มเลี้ยงผึ้งในจังหวัดสมุทรสงครามมาชนิดละ 3 รัง (ผึ้งโพรง 3 รัง และผึ้งมีมอีก 3 รัง) ทำการศึกษาขั้นตอนต่อไปเหมือนกันในผึ้งทั้งสองชนิด
2. นำคอนมดที่ได้มาบ่มในตู้บ่ม ที่อุณหภูมิ $34\pm 2^{\circ}\text{C}$ ความชื้นสัมพัทธ์ 50-55% เพื่อให้ผึ้งฟักออกมาเป็นตัวเต็มวัย
3. นำผึ้งที่ออกมาใหม่จากข้อ 2 ย้ายใส่ในกรงที่เตรียมไว้อย่างระมัดระวัง โดยแบ่งใส่กรงละ 50 ตัว จากนั้นนำกลับไปใส่ในตู้บ่มทิ้งไว้เป็นระยะเวลา 2 วัน โดยไม่ให้อาหาร
4. แบ่งผึ้งจากข้อ 3 ออกเป็น 5 กลุ่มๆ ละ 3 ขี้ (กรง) นำผึ้งแต่ละตัวจากแต่ละกลุ่มไปฉีดด้วยสารละลายซูโครส 50% ที่มีสปอร์ของโนซีมาละลายอยู่ด้วย โดยฉีดด้วยปริมาตร 2 μl ต่อตัว โดยในกลุ่มที่ 1 ให้เป็นกลุ่มควบคุมฉีดด้วยสารละลายซูโครสที่ไม่มีสปอร์ของโนซีมา กลุ่มที่ 2 ฉีดด้วยความเข้มข้น 5,000 สปอร์ต่อตัว กลุ่มที่ 3 ฉีดด้วยความเข้มข้น 8,000 และกลุ่มที่ 4 ฉีดด้วยความเข้มข้น 10,000 สปอร์ต่อตัว
5. หลังจากฉีดเสร็จแล้วนำขวดที่บรรจุน้ำ และสารละลายซูโครส 50% มาติดกับแต่ละกรงเพื่อเป็นแหล่งน้ำและพลังงานให้กับผึ้ง เปลี่ยนขวดน้ำและน้ำตาลทุกๆ 5 วัน
6. จากนั้นเตรียมอาหารให้ผึ้งโดยนำเกสรอบแห้ง 60g มาผสมกับสารละลายซูโครส 50% ปริมาตร 17 ml (w/v) คนให้เข้าเป็นเนื้อเดียวกัน จากนั้นแบ่งใส่จานและนำไปให้กับผึ้งแต่ละกรง
7. ตรวจสอบอัตราการตายของผึ้งในแต่ละวัน ทำการบันทึกจำนวนผึ้งที่ตายในแต่ละวันต่อแต่ละกรง ศึกษาอัตราการตาย (mortality) อัตราการติดเชื้อ (infection ratio) และปริมาณโปรตีนของต่อมไฮโปฟาริงคินผึ้งทั้งสองชนิด

3.6.2.3 การทำให้ผึ้งติดเชื้อโดยใช้ปริมาณสปอร์คือ 10,000 20,000 และ 40,000 สปอร์ต่อตัว

1. ทำการทดลองเช่นเดียวกับข้อ 3.6.2.2.1 โดยเปลี่ยนปริมาณเป็น 10,000 20,000 และ 40,000 สปอร์ต่อตัว
2. ศึกษาอัตราการตาย อัตราการติดเชื้อ ร้อยละของเซลล์ที่ติดเชื้อมีเซลล์ที่ไม่ติดเชื้อของทางเดินอาหารส่วนกลางของผึ้งภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสง (light microscope) และกล้องจุลทรรศน์แบบส่องผ่าน (transmission electron microscope) จำนวนสปอร์ที่ติดในทางเดินอาหารส่วนกลางของผึ้งต่อตัว และปริมาณโปรตีนของต่อมไฮโปฟาริงคินผึ้งทั้งสองชนิด

3.6.2.3.1 ศึกษาอัตราการติดเชื้อต่อผืนหนึ่งตัว (Infectivity)

1. ผ่าแยกเอาทางเดินอาหารส่วนกลางจากผึ้งที่ตายในแต่ละวันจากแต่ละกรงมาใส่ใน microcentrifuge tube ขนาด 1.5 ml ที่มีน้ำกลั่นบรรจุอยู่ 100 μ l
2. บดให้ละเอียด แล้วนำของเหลวที่ได้ไปนับจำนวนสปอร์ภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสง โดยใช้ hemocytometer
3. บันทึกผลที่นับได้เป็นจำนวนสปอร์ต่อตัว ทำจนกระทั่งทดลองเสร็จสิ้นหรือจนกว่าผึ้งในแต่ละกรงจะตายหมด

3.6.2.3.2 ศึกษาอัตราการรอดชีวิต (Survival analysis)

1. ตรวจสอบอัตราการตายของผึ้งในแต่ละกรงเป็นระยะเวลา 30 วัน บันทึกจำนวนผึ้งที่ตายในแต่ละวันต่อกรง นำผึ้งที่ตายออกมาเก็บแช่ในตู้เย็นเพื่อทำการศึกษในขั้นต่อไป
2. หลังจากทำการตรวจสอบอัตราการตายของผึ้งและบันทึกผลครบ 30 วันแล้ว นำผลที่ได้มาเขียนเป็นกราฟโดยใช้วิธี Kaplan-Meier survival curves

3.6.2.3.3 ศึกษาอัตราของเซลล์ที่ติดเชื้อมีชีวิตกับไม่ติดเชื้อภายในเซลล์เยื่อบุทางเดินอาหารส่วนกลางของผึ้ง (Infection ratio between infected cells and non-infected cells)

1. นำผึ้งที่ยังมีชีวิตจากแต่ละกรงๆ 3 ตัว ทุกวันที่ 6 10 และวันที่ 14 หลังจากทำการป้อนเชื้อไปแล้วออกมาศึกษาอัตราของเซลล์ที่ติดเชื้อมีชีวิตกับไม่ติดเชื้อ
2. ผ่าแยกทางเดินอาหารส่วนกลางออก นำเนื้อเยื่อบางส่วนไปศึกษาภายใต้กล้องจุลทรรศน์เพื่อตรวจสอบว่าผึ้งที่นำมาศึกษาติดเชื้อจริงหรือไม่ หลังจากตรวจสอบแล้วถ้าพบว่าติดเชื้อนำเนื้อเยื่อที่ได้มาเตรียมในขั้นต่อไปโดยใช้เทคนิคการเตรียมตัวอย่างเพื่อศึกษาภายใต้กล้องจุลทรรศน์

ขั้นตอนสำหรับการเตรียมการศึกษาภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสง (LM) (Protocol for studying by light microscopy)

1. นำทางเดินอาหารส่วนกลางของผึ้ง แช่ใน Bouin's fluid solution 24 ชั่วโมง
2. จากนั้นนำเนื้อเยื่อมาล้างในสารละลายแอลกอฮอล์ 70% สามรอบหรือจนกว่าตัวอย่างใส
3. นำเนื้อเยื่อแช่ในแอลกอฮอล์ 70-95% ขั้นละ 6 ชั่วโมง
4. แช่ในแอลกอฮอล์ 100% 1 ชั่วโมง
5. แช่ใน xylene 1 ชั่วโมง
6. แช่ใน ส่วนผสมระหว่าง xylene: melt paraplast อัตราส่วน 2: 1, 1: 1 และ 1: 2 ขั้นละ 1 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิ 58 °C
7. หลังจากนั้นนำชิ้นตัวอย่างมาฝังในพาราฟาสต์เหลว
8. ตัดตัวอย่างโดยใช้เครื่อง rotary microtome ความหนา 6 μ m



9. ย้อมด้วยสี Periodic Acid Schiff's reagent (PAS) นำไปศึกษาภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสง
10. ศึกษาอัตราการติดเนื้อระหว่าง เซลล์ที่ติดเนื้อกับไม่ติดเนื้อและบันทึกผลและถ่ายรูป

ขั้นตอนสำหรับการเตรียมการศึกษาภายใต้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด (Protocol for studying by Transmission electron microscopy (TEM))

1. นำชิ้นจากแต่ละกลุ่มการทดลองหลังจากบ่มเนื้อไปแล้ว 14 วัน มาผ่าแยกระบบทางเดินอาหารส่วนกลางออก
2. ล้างเนื้อเยื่อในบัฟเฟอร์ให้สะอาด แล้วแช่ในน้ำยารักษาสภาพ Karnowsky fixative ที่อุณหภูมิ 4°C แช่ทิ้งไว้เป็นเวลา 3 ชั่วโมง
3. ล้างด้วย 0.27 M fixing buffer pH 7.4 ที่อุณหภูมิห้อง 2 ครั้ง ๆ ละ 10 นาที
4. แช่ ชิ้นตัวอย่างใน 2% osmium tetroxide ที่ละลายใน 0.27 M fixing buffer pH 7.4 เป็นเวลา 1 ชั่วโมง
5. จุ่ม ตัวอย่าง ใน แอลกอฮอล์ ความเข้มข้นต่าง ๆ ตั้งแต่ 30% 50% 70% 90% จนถึง 100% ชั้นละ 10 นาที
6. แช่ชิ้นตัวอย่างในสารละลาย propylene oxide นาน 1 ชั่วโมง
7. แช่ชิ้นตัวอย่างในสารละลาย propylene oxide (ที่มี uranyl acetate และ phosphotungstic acid ละลายอยู่) นาน 12 ชั่วโมง
8. แช่ชิ้นตัวอย่างในส่วนผสมระหว่าง propylene oxide และ embedding media สัดส่วน 2:1, 1:1 และ 1:2 ตามลำดับชั้นละ 1 ชั่วโมง
9. ผึ่งลงใน พลาสติกผสม Epon 812-aradite 502 ใน capsules.
10. นำเนื้อเยื่อที่ผึ่งอยู่ใน capsules ใส่ในตูบ่ม ที่อุณหภูมิ 35°C 24 ชั่วโมง 45°C 48 ชั่วโมง และ 65°C เป็นเวลา 72 ชั่วโมง
11. ตัด Semi-thin ให้มีความหนาประมาณ $1\mu\text{m}$ โดยใช้ KB ultramicrotome และย้อมด้วยสี 1% toluidine blue ใน sodium borate solution.
12. ตัด Ultra-thin sections ให้มีความหนา 90 nm
11. เก็บตัวอย่างเนื้อเยื่อที่ลอยในน้ำกลั่นด้วย 200 mesh grids ย้อมสีตัวอย่างด้วย uranyl acetate และเพิ่มความชัดด้วย lead citrate.
12. จากนั้นนำตัวอย่างที่ได้มาศึกษาภายใต้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องผ่าน Jeol 200SX (Tokyo, Japan)

3.6.2.3.4 ศึกษาปริมาณโปรตีนจากต่อมไฮโปฟาริงค์ (Hypopharyngeal gland protein contents: Bradford assay)

1. นำผึ้งที่ยังมีชีวิตอยู่จากแต่ละกรงๆ ละ 3 ตัว ในวันที่ 6 10 และวันที่ 14 หลังจากการ ป้อนเชื้อแล้ว แปะแท่งในตู้เย็นจนกว่าจะทำการวัดปริมาณโปรตีน
2. จากนั้นนำผึ้งที่แช่ไว้มาผ่าแยกเอาต่อมไฮโปฟาริงค์
3. นำต่อมไฮโปฟาริงค์จากผึ้งแต่ละตัวใส่ใน 1.5 ml microcentrifuge tubes ที่มีสารละลาย phosphate buffer pH.7.8 ปริมาตร 50 μ l บรรจุอยู่
4. บดให้ละเอียดแล้วนำไปปั่นด้วยเครื่อง microcentrifuge ที่ 1,000 g เป็นเวลา 2 นาที
5. ดูดเอา Supernatant เพื่อนำไปวิเคราะห์ปริมาณโปรตีนจากต่อมไฮโปฟาริงค์ของผึ้งแต่ละตัว โดยใช้วิธี Bradford protein assay (Bradford, 1976).
6. เตรียมกราฟมาตรฐานจาก bovine serum albumin (BSA) ทำการวัดค่าการดูดกลืนแสงของโปรตีนที่ช่วงคลื่น 595 nm โดยใช้เครื่อง Shimadzu uv-visible spectrophotometer (UV-1610).
7. นำค่าการดูดกลืนแสงที่ได้มาคำนวณหาความเข้มข้นของโปรตีน โดยเปรียบจากกราฟมาตรฐานที่เตรียมไว้ วิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติโดยให้โปรแกรม SAS ด้วยวิธี one way ANOVA

3.6.2.4 ผลของพรอปอลิสที่มีต่ออัตราการตาย อัตราการติดเชื้อ ร้อยละการติดเชื้อภายในเซลล์ปริมาณโปรตีนของต่อมไฮโปฟาริงค์ (Effect of propolis on honeybee mortality, infectivity and protein contents of hypopharyngeal glands)

3.6.2.4.1 การสกัดพรอปอลิส (Propolis extraction)

1. พรอปอลิสที่นำมาศึกษาครั้งนี้ เป็นพรอปอลิสที่ได้จากชันโรงชนิด *Trigona apicalis* ซึ่งได้มาจากฟาร์มเลี้ยงผึ้งในจังหวัด จันทบุรี นำพรอปอลิสที่ได้มาอบให้แห้งในตู้อบที่อุณหภูมิ 80°C จนกว่าจะแห้ง จากนั้นนำมาสกัดด้วยสารละลายเอทานอล 70% (w/v) โดยชั่งพรอปอลิส 60 มาละลายใน 100 ml ของ 70% เอทานอล นำไปใส่ในขวดรูปชมพู่ ปิดปากขวดด้วยพาราฟินให้สนิท จากนั้นนำไปแช่ยาโดยใช้เครื่องแช่เป็นเวลา 2 วัน โดยสารสกัดที่ได้จะคิดเป็นความเข้มข้นของพรอปอลิสเป็น 200%
2. นำสารสกัดที่ได้มาเตรียมให้ได้ความเข้มข้นสามระดับคือ 10% 20% และ 50% โดยนำสารสกัดที่ได้มาละลายในน้ำกลั่น

3.6.2.4.2 ศึกษาการติดเชื้อ (Experimental infection)

1. แบ่งผึ้งที่แข็งแรงและไม่มีเชื้อในชีมาออกเป็น 5 กลุ่มดังนี้ คือ
กลุ่มที่ 1: ป้อนด้วย 50% (w/v) สารละลายชูโครสที่ละลายในน้ำกลั่น และให้ pollen mix (โดยผสม 60 g เกสรกับ 17 ml สารละลายชูโครส 50% (w/v)) โดยให้กลุ่มนี้เป็นกลุ่ม positive control

กลุ่มที่ 2: กลุ่มควบคุมที่เป็น Negative control โดยป้อนผึ้งด้วย 50% (w/v) 50% (w/v) สารละลายชูโครสที่ละลายในน้ำกลั่น และมีสปอร์ของโนซีมาผสมอยู่ด้วย โดยป้อนด้วยความเข้มข้นของสปอร์ 40,000 สปอร์ต่อผึ้งหนึ่งตัว และให้ pollen mix ที่ผสม 60 g ของเกสรกับ 17 ml ของสารละลายชูโครส 50% (w/v) ที่ละลายในเอทานอล 17.5% (v/v)

กลุ่มที่ 3: ป้อนด้วยสารละลายชูโครส 50% (w/v) ที่ละลายในน้ำกลั่นและมีสปอร์ของโนซีมา 40,000 สปอร์ต่อผึ้งหนึ่งตัว จากนั้นให้ pollen mix ที่ผสม 60 g ของเกสรกับ 17 ml ของสารละลายชูโครส 50% (w/v) ที่ละลายใน 10% propolis (v/v)

กลุ่มที่ 4: ป้อนด้วยสารละลายชูโครส 50% (w/v) ที่ละลายในน้ำกลั่นและมีสปอร์ของโนซีมา 40,000 สปอร์ต่อผึ้งหนึ่งตัว จากนั้นให้ pollen mix ที่ผสม 60 g ของเกสรกับ 17 ml ของสารละลายชูโครส 50% (w/v) ที่ละลายใน 20% propolis (v/v)

กลุ่มที่ 5: ป้อนด้วยสารละลายชูโครส 50% (w/v) ที่ละลายในน้ำกลั่นและมีสปอร์ของโนซีมา 40,000 สปอร์ต่อผึ้งหนึ่งตัว จากนั้นให้ pollen mix ที่ผสม 60 g ของเกสรกับ 17 ml ของสารละลายชูโครส 50% (w/v) ที่ละลายใน 50% propolis (v/v)

2. ทำการศึกษาทดลองตามข้อที่ 3.6.1.2

3. ตรวจสอบอัตราการตายของผึ้งในแต่ละวัน ทำการบันทึกจำนวนผึ้งที่ตายในแต่ละวันต่อแต่ละกรง

4. ศึกษาอัตราการตาย อัตราการติดเชื้อ ร้อยละของเซลล์ที่ติดเชื้อมีไม่ติดเชื้อและปริมาณโปรตีนของต่อมไฮโปฟาริงค์ตามขั้นตอนที่กล่าวไว้ขั้นตอน

5. ทำเช่นเดียวกันในผึ้งทั้ง 2 ชนิด คือผึ้ง *A. Florea* และ *A. cerana*

3.7 ผลของพรอพอลิสจากจังหวัดจันทบุรีที่มีต่ออัตราการตาย อัตราการติดเชื้อ ร้อยละการติดเชื้อภายในเซลล์ ปริมาณโปรตีนของต่อมไฮโปฟาริงค์ของผึ้งมัมและผึ้งโพรง

สารละลายพรอพอลิสที่ใช้ในการทดลองจะใช้เอทานอลเป็นตัวทำละลายและปรับความเข้มข้นโดยใช้น้ำให้ได้ 50% และ 70% โดยเก็บพรอพอลิสจากผึ้งพันธุ์ (*Apis. mellifera* Linneaus, 1758) และชันโรง (*Trigona. apicalis* Smith, 1875) จากจังหวัดจันทบุรี หลังจากนั้นทำการทดลองดังนี้

3.7.1. นำคอนผึ้งที่ไม่มีการติดเชื้อประกอบด้วยดักแด้ที่กำลังจะออกมาเป็นตัวเต็มวัย ใส่ในกรงผึ้งแล้วนำมาใส่ใน incubator ที่ตั้งอุณหภูมิที่ 34 องศาเซลเซียส ความชื้นสัมพัทธ์ 50 % เพื่อให้ผึ้งฟักออกมาเป็นตัวเต็มวัย โดยใช้เวลาประมาณ 24-30 ชั่วโมง

3.7.2 นำผึ้งตัวเต็มวัยที่ฟักออกมา (ซึ่งถือว่าเป็นผึ้งงานอายุ 1 วัน) จาก incubator แบ่งเป็นกลุ่ม 6 กลุ่ม โดยทำการทดลองกลุ่มละ 3 ข้างดังนี้



กลุ่มที่ 1 ป้อนสารละลายชูโครส 50% (น้ำตาลละลายในน้ำ) และให้อาหาร คือ สารละลายชูโครส 50% (น้ำตาลละลายในน้ำ) น้ำกลั่น และ pollen mix เตรียมโดยการชั่งเกสรผึ้ง 60 กรัม ผสมกับสารละลายชูโครส 50% (น้ำตาลละลายในน้ำ) ปริมาตร 17 มิลลิลิตร ให้เป็นกลุ่มควบคุม (CO)

กลุ่มที่ 2 ป้อนสารละลายชูโครส 50% (น้ำตาลละลายในน้ำ) และให้อาหาร คือ สารละลายชูโครส 50% (น้ำตาลละลายในน้ำ) น้ำกลั่น และ pollen mix เตรียมโดยการชั่งเกสรผึ้ง 60 กรัม ผสมกับสารละลายชูโครส 50% (น้ำตาลละลายในสารละลายฟลอพอลิส 70%) ปริมาตร 17 มิลลิลิตร ให้เป็น Negative control (CP)

กลุ่มที่ 3 ป้อนสารละลายชูโครส 50% (น้ำตาลละลายในน้ำ) ประกอบด้วยสปอร์ของโนซี มาปริมาณ 80,000 สปอร์/ตัว และให้อาหาร คือ สารละลายชูโครส 50% (น้ำตาลละลายในน้ำ) น้ำ กลั่น และ pollen mix เตรียมโดยการชั่งเกสรผึ้ง 60 กรัม ผสมกับสารละลายชูโครส 50% (น้ำตาล ละลายในเอทานอล) ปริมาตร 17 มิลลิลิตร ให้เป็น Positive control (CE)

กลุ่มที่ 4 ป้อนสารละลายชูโครส 50% (น้ำตาลละลายในน้ำ) ประกอบด้วยสปอร์ของโนซี มาปริมาณ 80,000 สปอร์/ตัว และให้อาหาร คือ สารละลายชูโครส 50% (น้ำตาลละลายในน้ำ) น้ำ กลั่น และ pollen mix เตรียมโดยการชั่งเกสรผึ้ง 60 กรัม ผสมกับสารละลายชูโครส 50% (น้ำตาล ละลายในน้ำ) ปริมาตร 17 มิลลิลิตร (OP)

กลุ่มที่ 5 ป้อนสารละลายชูโครส 50% (น้ำตาลละลายในน้ำ) ประกอบด้วยสปอร์ของโนซี มาปริมาณ 80,000 สปอร์/ตัว และให้อาหาร คือ สารละลายชูโครส 50% (น้ำตาลละลายในน้ำ) น้ำ กลั่น และ pollen mix เตรียมโดยการชั่งเกสรผึ้ง 60 กรัม ผสมกับสารละลายชูโครส 50% (น้ำตาล ละลายในสารละลายฟลอพอลิส 50%) ปริมาตร 17 มิลลิลิตร (50P)

กลุ่มที่ 6 ป้อนสารละลายชูโครส 50% (น้ำตาลละลายในน้ำ) ประกอบด้วยสปอร์ของโนซี มาปริมาณ 80,000 สปอร์/ตัว และให้อาหาร คือ สารละลายชูโครส 50% (น้ำตาลละลายในน้ำ) น้ำ กลั่น และ pollen mix เตรียมโดยการชั่งเกสรผึ้ง 60 กรัม ผสมกับสารละลายชูโครส 50% (น้ำตาล ละลายในสารละลายฟลอพอลิส 50%) ปริมาตร 17 มิลลิลิตร (70P)

3.7.3. นำผึ้งแต่ละกลุ่มในข้อ 3.7.2 ใส่ในกรงเลี้ยงขนาดเล็ก (bee cage) ขนาด 80x135x130 mm³ (ผาด้านหน้ามีแผ่นเลื่อนเพื่อสะดวกต่อการนำเอาผึ้งออก ผังด้านหลังในกรง บรรจุ queen pheromone ที่ยึดติดกับกระดาษแข็งยึดไว้แน่นกับกรง) โดยแยกใส่กรงละ 50 ตัว/ treatment นำกรงผึ้งทั้งหมด ใส่ใน incubator ที่ตั้งอุณหภูมิที่ 34 °C ความชื้นสัมพัทธ์ 50%

3.7.4 ศึกษาอัตราการตาย (bee mortality) โดยตรวจนับอัตราการตายของผึ้งแต่ละกลุ่ม ทุกวัน จนกระทั่งครบ 30 วัน อัตราการติดเชื้อ (infection rate) โดยการตรวจหาเชื้อและนับจำนวน สปอร์ของผึ้งแต่ละตัวโดยใช้ Hemocytometer และศึกษาร้อยละของการติดเชื้อของเซลล์ที่ติดเชื้อ

(infected cells) กับเซลล์ที่ไม่ติดเชื้อ (non infected cells) ของเซลล์เยื่อบุทางเดินอาหารส่วนกลาง ตลอดจนศึกษาการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างของเซลล์ของต่อมไฮโปฟาริงค์ (hypopharyngeal glands) และเยื่อบุผิวของทางเดินอาหารส่วนกลาง (midgut) ของผึ้งในกลุ่มต่างๆ ภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสง (LM) รวมทั้งศึกษาผลของเชื้อต่อการผลิตปริมาณโปรตีนของต่อมไฮโปฟาริงค์