ฤทธิ์ต้านแบคทีเรียของจุลินทรีย์จากน้ำผึ้ง

ANTIBACTERIAL ACTIVITY OF MICROBES ISOLATED FROM HONEY

กนกวรรณ คันทรง
กรรณิกา แตงขาว
ฉันชนก ฉิมเอียด

โครงงานพิเศษนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตร
ปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต (จุลชีววิทยาอุตสาหกรรม)
ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์
สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง
ปีการศึกษา 2558

ฤทธิ์ต้านแบคทีเรียของจุลินทรีย์จากน้ำผึ้ง

ANTIBACTERIAL ACTIVITY OF MICROBES ISOLATED FROM HONEY

กนกวรรณ คันทรง

กรรณิกา แตงขาว

ฉันชนก ฉิมเอียด

โครงงานพิเศษนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตร
ปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต (จุลชีววิทยาอุตสาหกรรม)
ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์
สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง
ปีการศึกษา 2558

ANTIBACTERIAL ACTIVITY OF MICROBES ISOLATED FROM HONEY

KANOKWON KANSONG

KANNIKA TANGKHAOW

CHANCHANOK CHIM-EIAD

A SPECIAL PROJECT SUBMITTED IN PARTIAL FULFILLMENT OF
THE REQUIREMENTS FOR
THE DEGREE OF BACHELOR OF SCIENCE
(INDUSTRIAL MICROBIOLOGY)
DEPARTMENT OF BIOLOGY, FACULTY OF SCIENCE
KING MONGKUT'S INSTITUTE OF TECHNOLOGY LADKRABANG
ACADEMIC YEAR 2015

หัวข้อโครงงานพิเศษ	ฤทธิ์ต้านแบคทีเรียของจุลินทรีย์จากน้ำผึ้ง Antibacterial Activity of Microbes Isolated from Honey
ชื่อนักศึกษา	นางสาวกนกวรรณ คันทรง รหัสนักศึกษา 55051223 นางสาวกรรณิกา แตงขาว รหัสนักศึกษา 55051228 นางสาวฉันชนก ฉิมเอียด รหัสนักศึกษา 55051253
ปริญญา	วิทยาศาสตรบัณฑิต (จุลชีววิทยาอุตสาหกรรม)
ภาควิชา	ชีววิทยา
ปีการศึกษา	2558
อาจารย์ที่ปรึกษา	ดร.ณัฐวุฒิ รุ่งจินดามัย

คณะวิทยาศาสตร์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง (สจล.) อนุมัติให้โครงงานพิเศษนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต (จุลชีววิทยาอุตสาหกรรม) ประจำปีการศึกษา 2558

คณะกรรมการสอบ	ลายมือชื่อ
รศ.ดร.จิตติ ท่าไว ประธานกรรมการ	
ดร.คนึงกานต์ กลั่นบุศย์ กรรมการ	
ดร.ณัฐวุฒิ รุ่งจินดามัย กรรมการและอาจารย์ที่ปรึกษา	

ลิขสิทธิ์ของคณะวิทยาศาสตร์
สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

หัวข้อโครงงานพิเศษ	ฤทธิ์ต้านแบคทีเรียของจุลินทรีย์จากน้ำผึ้ง
ชื่อนักศึกษา	นางสาวกนกวรรณ คันทรง รหัส 55051223
	นางสาวกรรณิกา แตงขาว รหัส 55051228
	นางสาวฉันชนก ฉิมเอียด รหัส 55051253
ปริญญา	วิทยาศาสตรบัณฑิต (จุลชีววิทยาอุตสาหกรรม)
ภาควิชา	ชีววิทยา
คณะ	วิทยาศาสตร์
มหาวิทยาลัย	สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง (สจล.)
ปีการศึกษา	2558
อาจารย์ที่ปรึกษา	ดร.ณัฐวุฒิ รุ่งจินดามัย

บทคัดย่อ

งานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาการออกฤทธิ์ต้านแบคทีเรียของจุลินทรีย์ในน้ำผึ้ง โดยทำการเก็บรวบรวมรังผึ้งทั้งหมด 15 ตัวอย่าง จาก 4 จังหวัดในประเทศไทย ได้แก่ จันทบุรี นครสวรรค์ สระบุรีและพัทลุง จากนั้นจึงทำการคัดแยกเชื้อยีสต์และราโดยใช้เทคนิคสเปรดเพลทบนอาหาร MY30G และ PDA ที่ใส่ยาปฏิชีวนะยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย พบเชื้อยีสต์และราทั้งหมด 143 ไอโซเลต ประกอบด้วย ยีสต์ 59 ไอโซเลต และรา 84 ไอโซเลต จากนั้นทำการเลี้ยงในอาหารเหลว PDB เป็นเวลา 4 สัปดาห์ ที่อุณหภูมิห้อง เพื่อนำน้ำเลี้ยงเชื้อมาทดสอบฤทธิ์ต้านแบคทีเรีย ได้แก่ *S. aureus* ATCC 25923, MRSA SK1, *E. coli* ATCC 25922 และ *P. aeruginosa* ATCC 27853 โดยวิธี agar well diffusion พบว่ามี 4 ไอโซเลต ที่มีฤทธิ์ต้านแบคทีเรีย จากนั้นนำเชื้อทั้ง 4 ไอโซเลต มาเลี้ยงเพิ่มปริมาณในอาหารเหลว PDB เพื่อนำมาสกัดสาร โดยใช้เอทิลอะซิเตตในการสกัด และนำมาทดสอบโดยวิธี agar disk diffusion (100 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร) พบว่าเชื้อทั้ง 4 ไอโซเลต ไม่มีฤทธิ์ในการยับยั้งเชื้อก่อโรค เมื่อทำการจัดจำแนกเชื้อที่พบ ปรากฏว่ามี 3 ไอโซเลต (A, C, D) ที่มีลักษณะคล้ายกับ *Aureobasidium pullulans* และอีก 1 ไอโซเลต (B) ไม่สามารถจำแนกกลุ่มได้จำแนกกลุ่มได้

คำสำคัญ : น้ำผึ้ง รา ฤทธิ์ต้านแบคทีเรีย ฤทธิ์ทางชีวภาพ สารทุติยภูมิ สารออกฤทธิ์ทางชีวภาพ

Title	Antibacterial Activity of Microbes of Microbes Isolated from Honey
Students	Miss Kanokwon Kansong Student ID 55051223
	Miss Kannika Tangkhaow Student ID 55051228
	Miss Chanchanok Chim-eiad Student ID 55051253
Degree	Bachelor of Science (Industrial Microbiology)
Department	Biology
Faculty	Science
University	King Mongkut's Institute of Technology Ladkrabang (KMITL)
Academic Year	2015
Advisor	Dr. Nattawut Rungjindamai

Abstract

The objectives of this research were to determine the antibacterial activity of microbes isolated from honey and to identify the potential microbes. Fifteen sample of Honey hives and bees were collected from four provinces in Thailand including Chantaburee, Nakorn Sawan, Saraburee and Patthalung. Yeasts and filamentous fungi were isolated from the samples using a spread plate method on malt yeast 30% glucose agar (MY30G) and potato dextrose agar (PDA) amended with antibiotics. A total of 143 isolates of microbes which were recovered from the honey samples consists of 59 and 84 isolates of yeasts and filamentous fungi, respectively. All isolates were cultured in potato dextrose broth (PDB) for 4 weeks at room temperature. The culture broth were tested for antimicrobial activity against four bacteria including *S. aureus* ATCC 25923, MRSA SK1, *E. coli* ATCC 25922 and *P. aeruginosa* ATCC 27853 by agar well diffusion method. There were four isolates which were able to inhibit the test bacteria. These four isolates were cultured in PDB for 4 L and the culture broth was extracted using ethyl acetate (EtOH). The extracts were tested for inhibitory activity against the bacteria using agar disk diffusion

method (100 mg/ml). The extracts however, showed no sign of inhibition against the bacteria. These four potential fungi were identified based on their morphological characteristics. Three isolates (A, C, D) are identified as *Aureobasidium pullulans* while isolate B is sterile mycelium so that it is assigned to unknown fungus isolate B.

Keywords : Antibacterial activity, Bioactivity, Bioactive compounds, Fungi, Honey, Secondary metabolite

กิตติกรรมประกาศ

การศึกษางานวิจัยนี้สำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยนี้เกิดได้จากความอนุเคราะห์จากหลาย ๆ ฝ่ายที่ให้ความรู้คำแนะนำตลอดจนการอำนวยความสะดวกในการให้ยืมอุปกรณ์ในการทำการทดลองต่าง ๆ ซึ่งเป็นประโยชน์ต่องานวิจัยอย่างยิ่ง

ขอขอบพระคุณดร. ณัฐวุฒิ รุ่งจินดามัย อาจารย์ที่ปรึกษา รศ.ดร.จิตติ ท่าไวและ ดร.คนึงกานต์ กลั่นบุศย์ ที่กรุณาให้คำแนะนำที่เป็นประโยชน์ รวมทั้งให้คำปรึกษาต่อการทำงานวิจัยฉบับนี้ และช่วยตรวจสอบงานวิจัยให้มีความสมบูรณ์ยิ่งขึ้น

ขอขอบพระคุณเจ้าหน้าที่ห้องปฏิบัติการอาคารจุฬาภรณ์ 1 ที่ให้ความอนุเคราะห์สถานที่ในการทำการทดลองและการเบิกอุปกรณ์ต่าง ๆ

ขอขอบพระคุณเจ้าหน้าที่สำนักหอสมุดกลางที่ให้ความอนุเคราะห์ในการให้ยืม-คืนหนังสือภายในหอสมุดกลาง ทำให้งานวิจัยสำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยดี

ขอขอบพระคุณ บิดา มารดา สมาชิกในครอบครัว ทุกท่านที่ให้การสนับสนุนกับคณะผู้จัดทำ รวมทั้งขอบคุณเพื่อน ๆ ที่ให้การช่วยเหลือและคอยให้กำลังใจ

สุดท้ายนี้หวังว่างานวิจัยฉบับนี้จะก่อให้เกิดประโยชน์ต่อผู้ที่สนใจทางด้านการออกฤทธิ์ต้านแบคทีเรียของจุลินทรีย์ของน้ำผึ้ง นับเป็นความปิติอย่างยิ่งที่ได้ทำงานวิจัยนี้ขึ้น

กนกวรรณ คันทรง
กรรณิกา แตงขาว
ฉันชนก ฉิมเอียด

สารบัญ

หน้า

บทคัดย่อ ..... ก

Abstract ..... ข

กิตติกรรมประกาศ ..... ง

สารบัญ ..... จ

สารบัญตาราง ..... ช

สารบัญรูปภาพ ..... ฌ

คำย่อ/สัญลักษณ์ ..... ญ

บทที่ 1 บทนำ 1

1.1 ความสำคัญ/ที่มาของโครงงานพิเศษ 1

1.2 วัตถุประสงค์ของโครงงานพิเศษ 2

1.3 ขอบเขตของโครงงานพิเศษ 2

1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ 2

บทที่ 2 ทฤษฎีและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง 3

2.1 น้ำผึ้ง 3

2.1.1 ส่วนประกอบของน้ำผึ้ง 3

2.1.2 ประโยชน์ของน้ำผึ้ง 4

2.1.3 การใช้น้ำผึ้งเป็นยารักษาโรค 5

2.1.4 การใช้น้ำผึ้งในการรักษาแผลและยับยั้งจุลินทรีย์ที่ผิวหนัง 5

2.1.5 จุลินทรีย์ที่พบในน้ำผึ้ง 6

2.2 วิธีการแยกและเก็บรักษาเชื้อ 7
2.2.1 วิธีการ spread plate 7
2.2.2 เก็บรักษาเชื้อจุลินทรีย์ 7
2.2.3 การศึกษาทางสัณฐานวิทยาของรา 8
2.3 การทดสอบฤทธิ์ต้านเชื้อก่อโรคของสารทุติยภูมิจากเชื้อที่แยกได้ 9
2.3.1 ที่มาและความสำคัญของสารทุติยภูมิจากจุลินทรีย์ 9
2.3.2 ชีววิทยาของเชื้อแบคทีเรียที่นำมาทดสอบ 9
2.4 งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง 11
2.4.1 ความหลากหลายทางชีวภาพของจุลินทรีย์ที่แยกได้จากน้ำผึ้ง 11
2.4.2 คุณสมบัติการต้านจุลินทรีย์ของน้ำผึ้ง 12
2.4.3 การค้นพบยาที่เกี่ยวข้องกับน้ำผึ้ง 12
2.4.4 เชื้อแบคทีเรียดื้อยาที่ก่อให้เกิดโรคของมนุษย์ 13
บทที่ 3 วิธีการดำเนินงานวิจัย 14
3.1 จุลินทรีย์ที่ใช้ในการทดลองที่ใช้ในการทดสอบ 14
3.1.1 จุลินทรีย์ที่ใช้ในการทดลอง 14
3.1.2 ตัวอย่างรังผึ้ง 14
3.2 อุปกรณ์และสารเคมีที่ใช้ในการทำโครงงานพิเศษ 14
3.2.1 อุปกรณ์ 14
3.2.2 สารเคมี 15
3.2.3 อาหารเลี้ยงเชื้อ 16
3.3 วิธีการดำเนินงานวิจัย 16
3.3.1 การเตรียมตัวอย่างน้ำผึ้งและการคัดแยกเชื้อ 16
3.3.2 การทดสอบฤทธิ์ต้านแบคทีเรียด้วยวิธี agar well diffusion 17
3.3.3 การทดสอบฤทธิ์ต้านแบคทีเรียของสารสกัดจากรา ด้วยวิธี agar disk diffusion 18

3.3.4 การจัดจำแนกราที่มีฤทธิ์ต้านแบคทีเรีย 20
บทที่ 4 ผลการวิจัยและอภิปรายผล 21
4.1 ผลการแยกเชื้อจากตัวอ่อนของผึ้งและตัวอย่างน้ำผึ้ง 21
4.2 ผลการทดสอบการยับยั้งแบคทีเรียก่อโรคด้วยวิธี agar well diffusion 27
4.3 ผลการทดสอบฤทธิ์ต้านแบคทีเรียของสารสกัดจากรา ด้วยวิธี agar disk diffusion 32
4.4 การจัดจำแนกจุลินทรีย์ที่มีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ก่อโรค 34
4.4.1 กลุ่มที่มีลักษณะคล้ายคลึงกับ *Aureobasidium pullulans* 35
4.4.2 กลุ่มที่ยังไม่สามารถจัดจำแนกได้ 40
บทที่ 5 สรุปผลการวิจัยและข้อเสนอแนะ 42
5.1 สรุปผลการวิจัย 42
5.2 ข้อเสนอแนะ 42
อ้างอิง 44
ภาคผนวก 51
ภาคผนวก ก 52
ภาคผนวก ข 54
ภาคผนวก ค 55
ภาคผนวก ง 56

สารบัญตาราง

ตารางที่ หน้า

ตาราง 3.1 ที่มาของตัวอย่างรังผึ้ง ซึ่งประกอบด้วย ตัวอ่อนและน้ำผึ้ง 14

ตาราง 4.2 จำนวนเชื้อที่แยกจากตัวอย่างน้ำผึ้งและตัวอ่อนของผึ้งบนอาหาร PDA และ MY30G 21

ตาราง 4.3 ผลการทดสอบฤทธิ์ต้านแบคทีเรียด้วยวิธี agar well diffusion 29

ตาราง 4.4 ผลการทดสอบฤทธิ์ต้านแบคทีเรียของสารสกัดจากรา ด้วยวิธี agar disk diffusion..... 33

สารบัญรูปภาพ

รูปที่ หน้า

4.1 ความแตกต่างของเชื้อจุลินทรีย์ที่แยกได้จากตัวอ่อนของผึ้งกับน้ำผึ้ง 21
4.2 ตัวอย่างเชื้อยีสต์ที่แยกได้จากแหล่งต่าง ๆ 22
4.3 ตัวอย่างเชื้อราที่แยกได้จากรังผึ้งในจังหวัดนครสวรรค์ 23
4.4 ตัวอย่างเชื้อราที่แยกได้จากรังผึ้งในจังหวัดจันทบุรี 23
4.5 ตัวอย่างเชื้อราที่แยกได้จากรังผึ้งในจังหวัดพัทลุง 24
4.6 ตัวอย่างเชื้อราที่แยกได้จากรังผึ้งในจังหวัดสระบุรี 25
4.7 ผลการทดสอบฤทธิ์ต้านแบคทีเรียก่อโรคด้วยวิธี agar well diffusion 31
4.8 ผลการทดสอบฤทธิ์ต้านแบคทีเรียของสารสกัดจากรา ด้วยวิธี agar disk diffusion 32
4.9 ลักษณะโคโลนีบนอาหารแข็ง PDA และ MEA 36
4.10 ลักษณะภายใต้กล้องจุลทรรศน์ 38
4.11 ลักษณะโคโลนีบนอาหารแข็ง 40
4.12 ลักษณะภายใต้กล้องจุลทรรศน์ 41

คำย่อ/สัญลักษณ์

คำย่อ/สัญลักษณ์	คำอธิบาย
A_w	Water activity
CFU	Colony forming unit
DMSO	Dimethyl sulfoxide
Mg	Milligram
MEA	Malt Extract agar
MHA	Mueller Hinton agar
MRSA	Methicillin Resistant *Staphylococcus aureus*
MY30G	Malt Extract Yeast Extract 30% Glucose agar
NA	Nutrient agar
NB	Nutrient broth
PDA	Potato dextrose agar
PDB	Potato dextrose broth

บทที่ 1

บทนำ

1.1 ความสำคัญ/ที่มาของโครงงานพิเศษ

ในอดีตถึงปัจจุบัน มีการใช้ผลิตภัณฑ์ที่เกี่ยวข้องกับผึ้งกันอย่างแพร่หลาย ไม่ว่าจะเป็น นมผึ้ง ขี้ผึ้ง โดยเฉพาะอย่างยิ่ง น้ำผึ้ง ซึ่งเป็นผลผลิตที่เกิดจากการที่ผึ้งเก็บน้ำตาลจากแหล่งต่างๆ เช่น เกสรดอกไม้ ผ่านกระบวนการย่อยภายในตัว แล้วนำมาเก็บไว้ในรวงผึ้ง จากนั้นจะเกิดการบ่มของน้ำผึ้งเพื่อให้น้ำระเหยออกไป เมื่อได้ความเข้มข้นที่เหมาะสมจะทำการปิดฝารวงเรียกว่าน้ำผึ้งสุก (สุภาภรณ์, 2555) คุณลักษณะของน้ำผึ้งได้แก่ ใส มีกลิ่นเฉพาะตัว (ธิษณา, 2556) ซึ่งน้ำผึ้งที่ได้จากดอกไม้ของพืชชนิดต่างๆ จะได้คุณสมบัติ สี กลิ่น รสชาติแตกต่างกันไป โดยองค์ประกอบหลักของน้ำผึ้งได้แก่ น้ำส่งผลให้น้ำผึ้งมีความชื้นต่ำประมาณ 15-17% ทำให้มีอายุเก็บรักษานาน และมีน้ำตาลชนิดต่างๆ เช่น ฟรุกโตส กลูโคส มอลโตส และยังกรดต่าง ๆ เช่น กรดกลูโคนิก รวมถึงมีวิตามินและแร่ธาตุ เช่น โพแทสเซียม แคลเซียม ซัลเฟอร์ คลอไรด์ เป็นต้น นอกจากนี้ ยังมีเอนไซม์หลากหลายชนิด เช่น กลูโคสออกซิเดส อินเวอร์เทส ไดแอสเตส (พิชญาดา, 2555)

ในด้านการบำรุงสุขภาพและความงาม พบว่าในน้ำผึ้งนั้นมีสารต้านอนุมูลอิสระเช่นเดียวกับผักใบเขียว มีวิตามินบีรวมที่มีส่วนช่วยในกระบวนการเมตาบอลิซึมของร่างกาย การทำงานของระบบประสาทและสมอง รวมถึงกล้ามเนื้อในระบบทางเดินอาหารให้ทำงานเป็นปกติ วิตามิบีสองช่วยเรื่องบำรุงผิวพรรณ เส้นผมและเล็บ วิตามินซีช่วยให้ผิวหน้าสดใส ดูอ่อนเยาว์ ชุ่มชื่นและนุ่มนวลขึ้น (สุภาภรณ์, 2555)

นอกจากนี้ สารจากน้ำผึ้งสามารถให้พลังงาน รวมถึงการนำมาใช้ในวงการแพทย์เพื่อทำลายหรือยับยั้งการเจริญของแบคทีเรีย เนื่องจากมีความเข้มข้นสูง ทำให้ดึงน้ำออกจากเซลล์แบคทีเรีย และมีความเป็นกรดสูง (pH ประมาณ 3.9) (กลุ่มส่งเสริมการเลี้ยงผึ้งและแมลงเศรษฐกิจ, 2555) มีการรายงานว่า ในน้ำผึ้งมีสารที่มีคุณสมบัติในการยั้บยั้งเชื้อก่อโรคอยู่ 2 ชนิด ได้แก่ peroxide activity และ non-peroxide activity โดย peroxide activity คือพวกที่โครงสร้างถูกทำลายจากแสงและความร้อน ส่วน non-peroxide activity ซึ่งทนต่อความร้อนและแสง ทำให้สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์ที่บริเวณบาดแผลได้ (Bogdanov, 2008) ซึ่งคุณสมบัติดังกล่าวแสดงให้

เห็นว่าสามารถนำวิธีทางชีวภาพมาใช้ในการรักษาบาดแผลได้ โดยไม่ต้องใช้สารเคมีเนื่องจากสารเคมีในน้ำยาฆ่าเชื้อทำให้ทำลายเนื้อเยื่อที่ไม่มีความเสียหาย ส่งผลให้แผลหายช้า (สุวิสา, 2550) ซึ่งน้ำผึ้งที่สมบูรณ์นั้น เป็นผลมาจากผึ้งและรังผึ้งด้วย

จากเหตุผลดังกล่าวข้างต้น คณะผู้จัดทำจึงแลเห็นความสำคัญของการศึกษาฤทธิ์ทางชีวภาพของผลิตภัณฑ์และจุลินทรีย์ที่เกี่ยวข้องกับน้ำผึ้ง โดยเน้นศึกษาการควบคุมเชื้อแบคทีเรียก่อโรคในคน โดยใช้ตัวอย่างเป็นน้ำผึ้งและตัวอ่อนของผึ้ง มาทำการคัดแยกเชื้อ ตรวจสอบคุณสมบัติการต้านเชื้อแบคทีเรียก่อโรคและจัดจำแนกเชื้อที่มีฤทธิ์ต้านเชื้อแบคทีเรีย

1.2 วัตถุประสงค์ของโครงงานพิเศษ

1) เพื่อคัดแยกจุลินทรีย์บริสุทธิ์ซึ่งประกอบด้วยยีสต์และราประมาณ 100-150 ไอโซเลต
2) เพื่อตรวจสอบคุณสมบัติของจุลินทรีย์ที่คัดแยกได้ โดยการตรวจสอบฤทธิ์ต้านแบคทีเรีย
3) เพื่อจัดจำแนกชนิดจุลินทรีย์ที่มีฤทธิ์ต้านแบคทีเรีย

1.3 ขอบเขตของโครงงานพิเศษ

1) ทำการแยกเชื้อจุลินทรีย์ในกลุ่มยีสต์และราในน้ำผึ้งและตัวอ่อนของผึ้ง โดยใช้วิธี spread plate
2) ทำการคัดเลือกเชื้อที่มีความสามารถในการออกฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ก่อโรคโดยใช้วิธี agar well diffusion
3) ทดสอบฤทธิ์ต้านแบคทีเรียจากสารสกัดของน้ำเลี้ยงเชื้อรา ด้วยวิธี agar disk diffusion
4) จัดจำแนกจุลินทรีย์ที่มีฤทธิ์ด้านแบคทีเรีย โดยใช้ข้อมูลทางสัณฐานวิทยา

1.4ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

1) สามารถคัดแยกจุลินทรีย์บริสุทธิ์ให้ได้ประมาณ 100-150 ไอโซเลต
2) เพื่อทราบคุณสมบัติของจุลินทรีย์ที่คัดแยกได้
3) ระบุชนิดจุลินทรีย์ที่มีคุณสมบัติในการต้านเชื้อจุลินทรีย์ก่อโรค
4) เพื่อนำผลที่ได้จากการศึกษาไปเป็นส่วนต่อยอดในการพัฒนาผลิตภัณฑ์ยา ผลิตภัณฑ์เสริมความงาม หรือสารต้านเชื้อจุลินทรีย์ที่มีความปลอดภัยและมีผลข้างเคียงน้อย

บทที่ 2

ทฤษฎีและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

น้ำผึ้งเป็นผลิตภัณฑ์ที่ได้จากธรรมชาติ มีรสชาติหวาน จึงนำมาใช้ในการบริโภคเนื่องจากมีคุณค่าทางโภชนาการสูงและมีผลต่อสุขภาพของมนุษย์ ดังนั้นในสมัยก่อนน้ำผึ้งจึงได้ถูกนำมาใช้เป็นผลิตภัณฑ์ทางการแพทย์ ซึ่งได้แพร่หลายไปในหลายวัฒนธรรม โดยนำน้ำผึ้งมาใช้เป็นสมุนไพรรักษาแผลอาการไฟไหม้ แผลจากต้อกระจก (Suarez. *et al.*, 2014) การทดสอบในห้องปฏิบัติการ พบว่าน้ำผึ้งสามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อที่ทำให้อาหารเป็นพิษ (*E. coli* และ *Salmonella*) และเชื้อที่ก่อโรคในโรงพยาบาล (*S. aureus* และ *P. aeruginosa*) ในปี ค.ศ.2007 องค์การอาหารและยาแห่งสหรัฐอเมริกาได้อนุมัติให้มีการนำน้ำผึ้ง Munuka นิวซีแลนด์จากพืช *Leptospermum scoparium* ในการรักษาแผลที่ผิวหนัง (Martin, 2010)

2.1 น้ำผึ้ง

น้ำผึ้งเกิดจากการที่ผึ้งเก็บน้ำหวานมาจากต่อมน้ำหวานของดอกไม้ ผึ้งจะกลืนน้ำหวานลงสู่กระเพาะ โดยจะมีเอนไซม์ช่วยย่อยน้ำหวานแล้วนำมาเก็บไว้ในหลอดรวงผึ้ง จากนั้นน้ำผึ้งจะค่อย ๆ บ่มตัวเองโดยการระเหยน้ำออกจนน้ำผึ้งมีปริมาณความเข้มข้นขึ้นในระดับที่เหมาะสมกับการเก็บรักษา หลังจากนั้นผึ้งงานจะปิดฝาหลอดรวง เรียกน้ำผึ้งนี้ว่าน้ำผึ้งสุก เป็นน้ำผึ้งที่ได้มาตรฐาน คือมีน้ำอยู่ไม่เกิน 15-17% (สุภาภรณ์, 2555)

2.1.1 ส่วนประกอบของน้ำผึ้ง

องค์ประกอบหลักของน้ำผึ้งคือคาร์โบไฮเดรตมีปริมาณ 80-85% เป็นน้ำตาลรีดิวซ์ที่คือน้ำตาลที่มีหมู่แอลดีไฮด์หรือคีโตนที่เป็นอิสระอยู่ในโมเลกุล ถูกออกซิไดส์ได้ง่ายด้วยตัวออกซิไดส์อย่างอ่อน เป็นตัวให้อิเล็คตรอนแก่โมเลกุลอื่นๆ สามารถทำปฏิกิริยากับส่วนอื่น ๆ ในอาหาร เช่น กรดอะมิโน ทำให้สีหรือรสชาติของอาหารเปลี่ยนไป (Rizzo, 2015) ตัวอย่างน้ำตาลรีดิวซ์ เช่น น้ำตาลฟรุกโตสและน้ำตาลกลูโคส องค์ประกอบอื่น ๆ ได้แก่ น้ำ 15-17% โปรตีน 0.1-0.4% และมีปริมาณเถ้าเพียงเล็กน้อย (Buba. *et al.*, 2013) รวมถึงวิตามินและเกลือแร่ ในปริมาณที่เหมาะสม

ที่สุดในการบำรุงร่างกาย ซึ่งปริมาณวิตามินในน้ำผึ้งแท้ แต่ละชนิดจะแตกต่างกัน ขึ้นอยู่กับที่มาของเกสรดอกไม้ (วีระพันธ์, 2527)

2.1.2 ประโยชน์ของน้ำผึ้ง

ในน้ำผึ้งมีวิตามินหลากหลายชนิด ซึ่งวิตามิน คือสารอินทรีย์ช่วยในการเจริญเติบโตของร่างกาย และช่วยในการสร้างพลังงานของทุกเซลล์ โดยที่วิตามินไม่ใช่อาหารและไม่สามารถใช้ทดแทนอาหารได้ รวมถึงไม่สามารถให้พลังงานโดยตรงกับร่างกาย แต่จำเป็นสำหรับร่างกายเพื่อทำหน้าที่เปลี่ยนอาหารให้เป็นพลังงาน (พิมลพรรณ, 2556) รวมทั้งยังมีเอนไซม์ต่าง ๆ ที่เป็นประโยชน์ต่อร่างกาย โดยที่เอนไซม์ จัดเป็นโปรตีนที่ทำหน้าที่เร่งปฏิกิริยาเคมีในสิ่งที่มีชีวิต เกิดจากการที่เซลล์สร้างขึ้นมาและเกี่ยวข้องกับระบบเมตาบอลิซึมของเซลล์นั้นเป็นส่วนใหญ่ (จิระพันธ์, 2554) หากรับประทานน้ำผึ้งในปริมาณที่เหมาะสมสามารถช่วยปรับสมดุลร่างกาย คลายความเหน็ดเหนื่อยอ่อนเพลียจากการทำงานหรือเล่นกีฬา คลายความเครียด บำรุงประสาทและสมอง ซึ่งเป็นผลมาจากวิตามินบีรวมในน้ำผึ้ง น้ำผึ้งมีน้ำตาลฟรุกโตสและกลูโคสซึ่งเป็นน้ำตาลโมเลกุลเดี่ยว ทำให้ร่างกายสามารถดูดซึมและนำไปใช้เป็นพลังงานได้ทันที เป็นการลดกรดในกระเพาะและช่วยให้ย่อยอาหารได้ดีขึ้น นอกจากนี้ยังช่วยบรรเทาอาการหวัด อาการที่เกิดจากบริเวณทางเดินหายใจส่วนบนและอาการไอ เนื่องจากน้ำผึ้งช่วยต้านการติดเชื้อในระบบหายใจและบรรเทาอาการเยื่อบุอักเสบได้ (Kumar. *et al.*, 2010)

จากคุณประโยชน์ของน้ำผึ้งที่มีกลิ่นเฉพาะตัวและมีรสหวานซึ่งสามารถใช้เป็นสารให้ความหวานแทนน้ำตาลได้ จึงนิยมนำน้ำผึ้งมาเป็นส่วนผสมในอาหารต่าง ๆ เพื่อเพิ่มคุณค่าและกลิ่นรส เช่น ผสมในเครื่องดื่มต่าง ๆ ได้แก่ ชา นม โยเกิร์ต น้ำมะนาว หรือในต่างประเทศจะนำไปใช้ทำเบียร์หรือไวน์ ผสมในขนมอบ ขนมหวาน ผลิตภัณฑ์จากธัญพืชหรืออาหารเด็กอ่อน นอกจากนี้ยังใช้เป็นส่วนผสมในยาเพื่อเพิ่มความคงตัวและทำให้มีรสหวาน รับประทานง่าย อีกทั้งน้ำผึ้งเป็นผลิตภัณฑ์ที่ถูกใช้เพื่อความงามมาตั้งแต่โบราณและยังคงใช้อยู่ในปัจจุบันในผลิตภัณฑ์สำหรับดูแลผิวพรรณและเส้นผม น้ำผึ้งสามารถดึงและเก็บความชุ่มชื้นไว้ได้จึงทำให้ผิวอ่อนนุ่มและยืดหยุ่น เหมาะที่จะเป็นส่วนผสมในผลิตภัณฑ์ที่ให้ความชุ่มชื้น เช่น ครีมบำรุง แชมพู ครีมนวดผม และเครื่องสำอาง (Singh. *et al.*, 2012) และเนื่องจากน้ำผึ้งไม่ระคายเคืองผิวหนังจึงเหมาะสำหรับผิวที่บอบบางและสามารถใช้ในผลิตภัณฑ์สำหรับเด็กได้ น้ำผึ้งเป็นสารต้านอนุมูลอิสระ ซึ่งมีบทบาทในการป้องกันผิวจากการทำลายของแสงแดดและช่วยในการเสริมสร้างเซลล์ผิวหนังใหม่ น้ำผึ้งมีคุณสมบัติในการต่อต้าน

จุลินทรีย์และยับยั้งการเจริญเติบโตของแบคทีเรีย ซึ่งทำให้ลดปัญหาการเกิดสิวจากแบคทีเรียได้ (Vallianou. *et al.*, 2014)

2.1.3 การใช้น้ำผึ้งเป็นยารักษาโรค

น้ำผึ้งบริสุทธิ์และยาที่มีส่วนผสมของน้ำผึ้ง สามารถนำมาใช้รักษาอาการต่างๆ ของร่างกาย โดยสามารถรักษาความผิดปกติทางระบบทางเดินหายใจ รักษาอาการไอ เจ็บคอ หลอดลมอักเสบ ไข้หวัดใหญ่ ความผิดปกติของระบบสืบพันธุ์ (Kujawska. *et al.*, 2011) รวมถึงมีการทำยาจากพืชท้องถิ่นโดยผสมน้ำผึ้งลงไป เพื่อใช้ในการรักษาอาการต่างๆ เช่น อาการไอ อาการปวดท้องหลังคลอด อาการตกเลือด ประจำเดือนมาไม่ปกติ เชื้อราในช่องคลอด ไข้หวัดใหญ่ อาหารไม่ย่อย แก้ท้องเสีย หรือท้องอืด เป็นต้น (Hilgert, 2001) นอกจากนี้ ในอดีต ได้มีการนำน้ำผึ้งมาใช้รักษาแผลในกระเพาะอาหารและโรคกระเพาะ ซึ่งปัจจุบันพบแล้วว่าน้ำผึ้งอาจช่วยในการซ่อมแซมเยื่อบุลำไส้ที่เกิดการเสียหายและกระตุ้นการเจริญของเนื้อเยื่อใหม่ รวมถึงทำหน้าที่ต้านการอักเสบ เนื่องจากในธรรมชาติของน้ำผึ้งนั้น มีสารต่าง ๆ เช่น ฟลาโวนอยด์และสารพอลีฟีนอล (Mandal, 2011) โดย ฟลาโวนอยด์มีคุณสมบัติเป็นสารต้านอนุมูลอิสระ ช่วยลดระดับโคเลสเตอรอลในกระแสเลือด ช่วยให้เม็ดเลือดไม่จับตัวเป็นก้อนอุดตัน ป้องกันการเกิดมะเร็ง เป็นสารต้านจุลินทรีย์ นอกจากนี้ยังเป็นสารต้านอาการแพ้ ต้านไวรัส ต้านการอักเสบ (Tataya, 2011) ส่วนพอลีฟีนอล ทำหน้าที่ลดอัตราเสี่ยงการเกิดโรคเรื้อรังเนื่องจากฤทธิ์ทางชีวภาพ โดยเกิดปฏิกิริยาเคมีกับโปรตีนประเภทต่างๆ เช่น โปรตีนจากอาหารและเอนไซม์ในร่างกาย ส่งผลให้มีการควบคุมปฏิกิริยาทางชีวเคมีในร่างกาย (มณฑนา, 2556)

2.1.4 การใช้น้ำผึ้งในการรักษาแผลและยับยั้งจุลินทรีย์ที่ผิวหนัง

ในอดีตเมื่อ 2000 ปีก่อนคริสตกาล มีการนำน้ำผึ้งมาใช้ในการรักษาบาดแผล จากการจดบันทึกโดยชาวสุเมเรียน ต่อมาน้ำผึ้งถูกนำมาใช้ทางการแพทย์ทั้งการรักษาภายในและภายนอก ในช่วงศตวรรษที่ 20 น้ำผึ้งถูกนำมาใช้ในการรักษากันในชีวิตประจำวัน ต่อมามีการค้นพบยาปฏิชีวนะจึงมีการใช้น้ำผึ้งในการรักษาโรคลดลง แต่การใช้ยาปฏิชีวนะทำให้เกิดการดื้อยาของจุลินทรีย์จึงมีการเริ่มนำน้ำผึ้งกลับมาใช้อีกครั้งเนื่องจากไม่ทำให้เชื้อดื้อยาและไม่เป็นพิษต่อร่างกายมนุษย์ (Bogdanov, 2016) นอกจากนี้ ยังมีการรักษาแผลเบาหวานจากการใช้น้ำผึ้ง พบว่าได้ผล เนื่องจากน้ำผึ้งเป็นสารต้านอนุมูลอิสระจึงมีผลต่อแผลเบาหวานในการกำจัดเชื้อจุลินทรีย์ในบาดแผลและลดการติดเชื้อ ช่วยลดสารอนุมูลอิสระหรือสารประกอบที่มีออกซิเจนในโมเลกุล (reactive oxygen species : ROS) ลดการอักเสบและช่วยในกระบวนการรักษา (Alam. *et al.*, 2014)

เมื่อพิจารณาถึงความสามารถในการยับยั้งจุลินทรีย์ที่ผิวหนัง เนื่องจากในน้ำผึ้ง มีเอนไซม์อินเวอร์เทส (invertase) ทำหน้าที่เปลี่ยนน้ำตาลซูโครส ซึ่งเป็นน้ำตาลโมเลกุลคู่ให้เป็นน้ำตาลกลูโคสและน้ำตาลฟรุกโตส ซึ่งเป็นน้ำตาลโมเลกุลเดี่ยวและส่วนหนึ่งของกลูโคสที่มีอยู่ในน้ำหวานจากดอกไม้จะเกิดปฏิกิริยาเคมีกับเอนไซม์กลูโคสออกซิเดส (glucose oxidase) ที่สร้างจากผึ้ง จากนั้นเอนไซม์กลูโคสออกซิเดสจะเปลี่ยนกลูโคสไปเป็นกรดกลูโคนิค (gluconic acid) และไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ (hydrogen peroxide) โดยกรดกลูโคนิคจะส่งผลให้น้ำผึ้งมีความเป็นกรดสูงขึ้น ซึ่งเป็นสภาวะที่ไม่เหมาะต่อการเจริญเติบโตของเชื้อจุลินทรีย์หลายชนิด ในขณะเดียวกันไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ก็มีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อจุลินทรีย์บางชนิดได้เช่นกัน นอกจากนี้ความหนืดของน้ำผึ้ง ซึ่งเกิดจากการระเหยของน้ำที่เป็นส่วนประกอบในน้ำหวานจากดอกไม้ ออกจากช่องเก็บน้ำผึ้งในรังผึ้ง จากการกระพือปีกของผึ้งภายในรังซึ่งช่วยเร่งน้ำให้ระเหยออกจากน้ำหวานได้เร็วขึ้น ส่งผลให้น้ำผึ้งมีความเข้มข้นมาก ซึ่งสภาวะดังกล่าวจะไม่เหมาะกับการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์ชนิดต่างๆ (สุทธิพงษ์, 2553)

2.1.5 จุลินทรีย์ที่พบในน้ำผึ้ง

จุลินทรีย์ในน้ำผึ้งมีความสามารถในการทนต่อความเข้มข้นน้ำตาล กรด การปนเปื้อนของจุลินทรีย์โดยส่วนมากมีแนวโน้มมาจากละอองเกสร ระบบการย่อยของผึ้ง ดิน ฝุ่น อากาศและดอกไม้ ในส่วนของตัวอ่อนอาจจะปลอดเชื้อในระยะแรก แต่เมื่อได้รับน้ำหวานและละอองเกสรโดยผึ้งงานทำให้เกิดการปนเปื้อนและเพิ่มจำนวนของเชื้อ เช่น *Bacillus*, *Micrococcus* และ *Saccharomyces* spp. ซึ่งแยกได้จากรังผึ้งและผึ้งตัวเต็มวัย จำนวนของจุลินทรีย์ที่แยกได้ส่วนใหญ่มาจากของเสียของตัวอ่อนผึ้งโดย *Bacillus* เป็นสปีชีส์ที่พบบ่อยที่สุด รองลงมาเป็นราและแอคติโนมัยสีท (actinomycete) รวมถึงแบคทีเรียแกรมลบรูปท่อนและยีสต์ ขณะที่ *Streptomyces* spp. ถูกพบในตัวอ่อนมากกว่า ในลำไส้ของผึ้งพบว่ามียีสต์อยู่ 1 เปอร์เซ็นต์ แบคทีเรียแกรมบวก 27 เปอร์เซ็นต์ ประกอบไปด้วย *Bacillus*, *Bacteridium*, *Streptococcus* และ *Clostridium* spp. และอีก 70 เปอร์เซ็นต์คือแบคทีเรียแกรมลบหรือแบคทีเรียที่ติดสีแกรมทั้ง 2 สี แหล่งที่มาของยีสต์ที่ทนต่อน้ำตาลสูงคือดอกไม้และดิน การปนเปื้อนของจุลินทรีย์รองลงมา คือมนุษย์ เครื่องมืออุปกรณ์ ภาชนะบรรจุ ลม ฝุ่น และอื่น ๆ ยีสต์สามารถแยกได้จากเครื่องมืออุปกรณ์ การปนเปื้อนนี้เป็นการเพิ่มจำนวนยีสต์ในน้ำผึ้งที่สะอาด บางครั้งการแพร่เชื้อในน้ำผึ้งอาจจะเป็นอากาศและผึ้งที่ลำเลียงอาหาร เกิดจากการปนเปื้อนจากผิวหนังหรืออุจจาระ (Olaitan. *et al.*, 2007) และจากการศึกษาโดยแจกแจงจำนวนเชื้อราและยีสต์ในตัวอย่างน้ำผึ้งที่ผลิตโดยใช้กระบวนการทาง GMP และไม่ใช้กระบวนการทาง GMP พบว่าตัวอย่างน้ำผึ้งที่ผลิตโดยใช้กระบวนการทาง GMP มีจำนวนเชื้อราและยีสต์น้อยกว่า ซึ่งแสดงให้เห็นว่าเชื้อราและยีสต์ตอบสนองต่อการเปลี่ยนแปลงของสารเคมีและสภาพแวดล้อมในน้ำผึ้ง

นอกจากนี้ ในน้ำผึ้งมีปริมาณน้ำอิสระเรียกว่า a_w มีการรายงานว่าในน้ำผึ้งมีค่า a_w ประมาณ 0.56-0.62 ในขณะที่แบคทีเรียหลายสปีชีส์จะถูกยับยั้งเมื่อมีค่า a_w อยู่ในช่วง 0.94-0.99 รวมถึงค่าความเป็นกรดที่ pH 3.2-4.5 อยู่ในระดับต่ำพอที่จะสามารถยับยั้งเชื้อก่อโรคในสัตว์ได้จำนวนมาก (Seraia. *et al.*, 2010) และจากการศึกษาพบว่าในน้ำผึ้งมีเพียงยีสต์และราเท่านั้นที่สามารถทนต่อสภาพแวดล้อมที่มีค่า a_w ต่ำถึง 0.6 และค่า pH สูง คุณสมบัตินี้ของยีสต์และราจึงสามารถเป็นตัวบ่งชี้คุณภาพของน้ำผึ้งได้ (Gradvol. *et al.*, 2015)

2.2 วิธีการแยกและเก็บรักษาเชื้อ

2.2.1 วิธีการ spread plate

โดยใช้แท่งแก้ว (spreader) ทำให้ปราศจากเชื้อโดยการจุ่มแอลกอฮอล์ 95% และลนไฟ จากนั้นใช้แท่งแก้วเกลี่ยเชื้อให้ทั่วจานอาหารวุ้น เพื่อทำให้เซลล์ต่าง ๆ กระจายแยกออกจากกัน ในกรณีที่เชื้อมีความเข้มข้นมาก ต้องทำการกระจายเชื้อหลายจาน โดยใช้แท่งแก้วอันเดิมกระจายบนวุ้นอาหารใหม่ เพื่อทำให้เชื้อเจือจาง หรืออาจทำการเจือจางเชื้อก่อนนำมากระจายบนอาหารก็ได้ (นงลักษณ์และปรีชา, 2550)

2.2.2 เก็บรักษาเชื้อจุลินทรีย์

การเก็บรักษาเชื้อจุลินทรีย์มีจุดประสงค์เพื่อการรักษาให้จุลินทรีย์มีชีวิตรอด ไม่มีเชื้ออื่นปนเปื้อนและไม่เปลี่ยนแปลงลักษณะ การเก็บรักษาเชื้อจุลินทรีย์ของศูนย์รวบรวมเชื้อจุลินทรีย์เพื่อเป็นการยืดอายุเชื้อมีความสำคัญทางวิทยาศาสตร์ สามารถทำได้หลายวิธีขึ้นอยู่กับความแตกต่างและลักษณะทางชีววิทยาของจุลินทรีย์ (สมบูรณ์, 2539) นอกจากนี้การเก็บรักษาเชื้อจุลินทรีย์เป็นการลดกระบวนการเมทาบอลิซึมของจุลินทรีย์ให้ต่ำลง โดยเป็นการจำกัดสารอาหาร ปริมาณน้ำและออกซิเจน หรือลดอุณหภูมิที่ใช้ในการเก็บรักษา (ดุษณี, 2555) ตัวอย่างวิธีการเก็บรักษาเชื้อจุลินทรีย์โดยการแช่แข็ง วิธีที่ง่ายและนิยมใช้กันทั่วไปในการเก็บรักษาจุลินทรีย์

การแช่แข็งแบบธรรมดาไม่ต้องอาศัยอุปกรณ์พิเศษในการเก็บรักษา โดยนำจุลินทรีย์ในอาหารเหลว หรือเซลล์ที่เก็บได้ในอาหารแข็งมาใส่ในหลอดหรือขวดแก้วขนาดเล็ก (vial) และแช่แข็งในตู้เย็นหรือตู้แช่ที่อุณหภูมิ -5 ถึง -20 องศาเซลเซียส สามารถเก็บรักษาเชื้อจุลินทรีย์ได้นาน 1-2 ปี จึงควรเติมสารป้องกันเซลล์จุลินทรีย์ (cryoprotective agent หรือ cryoprotectant) เพื่อประสิทธิภาพในการเก็บรักษาเชื้อ

การแช่แข็งแบบ ultracold-temperature ปัจจุบันการเก็บรักษาเชื้อจุลินทรีย์ที่อุณหภูมิต่ำในไนโตรเจนเหลวเป็นวิธีที่ดีที่สุด สามารถเก็บรักษาจุลินทรีย์ได้หลายชนิด มีเปอร์เซ็นต์การอยู่รอดของจุลินทรีย์สูง อุณหภูมิที่ใช้ในการเก็บรักษาคือ -196 องศาเซลเซียส หรือ -156 องศาเซลเซียสในรูปของไอไนโตรเจน นอกจากนี้ยังสามารถใช้เก็บรักษาชีววัตถุ เช่น กระจกตา เลือด เซลล์พืชและเซลล์สัตว์ รวมทั้งเชื้อจุลินทรีย์ที่เป็นสาเหตุของโรคพืชและไวรัส

อายุในการเก็บรักษาเชื้อเป็นสิ่งสำคัญ พบว่าที่ช่วง stationary phase จะเป็นช่วงที่เซลล์สามารถทนต่อความเสียหายได้ดีกว่าในช่วงการเจริญอื่น ในการที่จะทำให้เซลล์แข็งตัวหรือการนำเซลล์ที่แข็งตัวมาทำละลายจะมีผลทำให้เซลล์แตกและการเกิดผลึกน้ำแข็งได้ การใช้อัตราการทำความเย็นให้ต่ำลงอย่างช้า ๆ จะช่วยป้องกันความเสียหายที่เกิดกับเซลล์ได้ สำหรับอาหารเลี้ยงเชื้อที่ใช้เก็บเกี่ยวเซลล์เพื่อนำมาแช่แข็งจะต้องเติมสารป้องกันเซลล์ สารที่ใช้แบ่งเป็น 2 กลุ่ม กลุ่มแรกคือ endocellular protectant เช่น กลีเซอรอล 10% (ปริมาตร/ปริมาตร) เมื่อใส่สารลงในอาหารที่มีเซลล์ต้องทิ้งไว้ 2-3 ชั่วโมง เพื่อให้สารซึมเข้าไปในเซลล์และจะช่วยป้องเซลล์ได้ดียิ่งขึ้น สารกลุ่มที่สองคือ extracellular protectant เช่น พอลิไวนิลไพรโรลิดีน (polyvinylpyrrolidine, PVP)

2.2.3 การศึกษาทางสัณฐานวิทยาของรา

การตรวจสอบด้วยกล้องจุลทรรศน์โดยตรง วิธีนี้ทำได้โดยการเขี่ยเชื้อราที่เจริญบนผิวหน้าอาหารเลี้ยงเชื้อในจานเพาะเชื้อมาโดยใช้ลวดเขี่ยเชื้อ (needle) หรือ hook มาศึกษาโดยสังเกตด้วยตาเปล่าและด้วยกล้องจุลทรรศน์ โดยจะศึกษาโครงสร้างต่าง ๆ ของราเส้นใย ได้แก่ เส้นใยรา ฟรุตติ้งบอดี้ (fruiting body) และโครงสร้างที่เกี่ยวกับการสร้างสปอร์ของเชื้อรา การเขี่ยเชื้อราต้องปฏิบัติอย่างระมัดระวังและหลีกเลี่ยงการสูดดมสปอร์รวมทั้งสารระเหยต่าง ๆ ที่เชื้อราสร้างขึ้น รวมถึงแผ่นสไลด์และแผ่นปิดสไลด์ที่ใช้ในการศึกษาต้องสะอาด จากนั้นจึงใช้เข็มเขี่ยเชื้อที่เผาไฟจนร้อนแดงแล้วเขี่ยเชื้อจากอาหารเลี้ยงเชื้อมาวางบนสไลด์ที่มีหยดน้ำกลั่นหรือเมาน์ติงฟลูอิด (mounting fluids) แล้วปิดทับด้วยแผ่นปิดสไลด์ (cover glass)

2.3 การทดสอบฤทธิ์ต้านเชื้อก่อโรคของสารทุติยภูมิจากเชื้อที่แยกได้

2.3.1 ที่มาและความสำคัญของสารทุติยภูมิจากจุลินทรีย์

การเจริญเติบโตของจุลินทรีย์ ส่งผลให้เกิดการสร้างสารประกอบขึ้น สารเหล่านี้คือ สารที่ได้จากกระบวนการสร้างและสลาย ได้แก่ สารปฐมภูมิ (primary metabolite) และสารทุติยภูมิ (secondary metabolite) โดยที่สารปฐมภูมิเกิดจากกระบวนการเมตาบอลิซึมของเซลล์ มีความเกี่ยวข้องกับการเจริญของจุลินทรีย์ ส่วนสารทุติยภูมิ เป็นสารที่จุลินทรีย์สังเคราะห์ขึ้นในช่วงปลายการเจริญเติบโต ไม่มีผลต่อการเจริญเติบโต ส่วนใหญ่เกิดจากเชื้อ *Actinomyces* และเชื้อรา (Gonzalez. *et al*., 2003) ซึ่งสารที่ได้มีความสำคัญทางเทคโนโลยีชีวภาพ เนื่องจากมีคุณสมบัติทางด้านเภสัชวิทยา ชีววิทยาและสามารถใช้เป็นยา สารเหล่านี้ได้แก่ ยาปฏิชีวนะ เม็ดสี สารพิษ ฮอร์โมนพืช และสารปราบศัตรูพืช เอนไซม์ ซึ่งเป็นผลผลิตที่ได้จากกระบวนการเมทาบอลิซึมในทางอุตสาหกรรมการหมักบางชนิดผลิตผลที่ต้องการคือเอนไซม์ เอนไซม์ที่ได้ส่วนใหญ่ผลิตขึ้นและปล่อยออกมานอกเซลล์ แต่มีเอนไซม์บางชนิดที่จุลินทรีย์ผลิตขึ้นและอยู่ภายในเซลล์ เอนไซม์เหล่านี้ยากต่อการนำมาผลิต (ดุษณี, 2555)

2.3.2 ชีววิทยาของเชื้อแบคทีเรียที่นำมาทดสอบ

2.3.2.1 *Pseudomonas aeruginosa*

เป็นเชื้อแบคทีเรียที่ต้องการอากาศ (obligate aerobe) รูปท่อน แกรมลบ เคลื่อนที่ได้ พบลักษณะเป็นเซลล์เดี่ยว เป็นคู่ และบางครั้งพบเป็นเส้นสายสั้นๆ สามารถเจริญได้ที่อุณหภูมิ 37-42 องศาเซลเซียส โดยการเจริญที่อุณหภูมิ 42 องศาเซลเซียส จะสามารถช่วยให้แยก *P. aeruginosa* ออกจาก *Pseudomonas* สปีชีส์อื่นได้ มักพบเป็นเชื้อประจำถิ่นที่บนผิวหนังและลำไส้ของมนุษย์

เชื้อ *P. aeruginosa* สามารถทำให้เกิดการติดเชื้อที่แผลหรือแผลไฟไหม้ โดยจะเกิดเป็นหนองสีเขียวหรือสีน้ำเงิน ถ้าเกิดการติดเชื้อที่ระบบประสาทส่วนกลางจะเกิดโรคเยื่อหุ้มสมองอักเสบ ถ้าติดเชื้อจากสายหรือท่อสวนจะทำให้เกิดโรคในระบบทางเดินปัสสาวะ และถ้าเกิดการติดเชื้อทางระบบทางเดินหายใจ จากเครื่องช่วยหายใจจะทำให้เกิดโรคปอดบวม โดย *Pseudomonas* จะดำรงชีวิตในสภาวะที่ชื้น ดังนั้นจึงควรระวังในบริเวณอ่างอาบน้ำ อ่างล้างหน้า ฝักบัว หรือบริเวณเปียกชื้นบริเวณอื่น มีการให้วัคซีนโดยจะฉีดให้จำเพาะต่อผู้ป่วยที่มีความเสี่ยงในการติดเชื้อสูงเพื่อป้องกันการติดเชื้อในกระแสเลือดหรือในผู้ป่วยที่เป็นมะเร็งเม็ดเลือดขาว แผลไฟไหม้ และผู้ป่วยภูมิคุ้มกันบกพร่อง

2.3.2.2 *Escherichia coli*

เชื้อ *E. coli* เป็นแบคทีเรียแกรมลบ ท่อนตรง มีแฟลกเจลลายื่นออกมารอบ ๆ เซลล์ (peritrichous flagella) สามารถย่อยแลกโตสได้อย่างรวดเร็ว มักพบเป็นจุลินทรีย์ประจำถิ่นในลำไส้ แหล่งที่อยู่อาศัยของเชื้อ *E. coli* คือระบบทางเดินอาหารของมนุษย์และสัตว์ จึงได้นิยมใช้เชื้อนี้เป็นจุลินทรีย์บ่งชี้ (indicator organism) สำหรับการตรวจสอบการปนเปื้อนของอุจจาระในน้ำและอาหาร *E. coli* จึงจัดเป็นเชื้อก่อโรคที่ทำให้เกิดการติดเชื้อที่พบบ่อยในมนุษย์

การก่อโรคของเชื้อ *E. coli* เช่น การติดเชื้อที่ระบบทางเดินปัสสาวะ (urinary tract infection) เชื้อ *E. coli* จัดเป็นสาเหตุหลักของการติดเชื้อทางเดินปัสสาวะของเพศหญิง การติดเชื้อบริเวณทางเดินปัสสาวะจากเชื้อ *E. coli* อาจเป็นสาเหตุของการติดเชื้อแบคทีเรียในกระแสเลือดได้ ก่อให้เกิดโรคท้องเสีย การแพร่ระบาดของการติดเชื้อในลำไส้จะเกิดทางอ้อมจากอาหาร น้ำดื่ม และน้ำใช้ (อรอนงค์, 2555)

2.3.2.3 *Staphylococcus aureus*

เชื้อ *Staphylococcus* มีรูปร่างกลม ติดสีแกรมบวก เรียงตัวเป็นกลุ่ม ๆ ทำให้ดูเหมือนพวงองุ่น แต่จะพบเป็นเซลล์เดี่ยว เป็นคู่ และเป็นสายสั้นๆ ไม่เกิน 4 เซลล์ เชื้อนี้ไม่สร้างสปอร์ ไม่เคลื่อนที่ ส่วนใหญ่ไม่มีแคปซูล

อาหารที่มีเชื้อและสารพิษปนเปื้อนอยู่จะไม่มีกลิ่น สี หรือ รสผิดปกติไป ผู้ป่วยจะเกิดอาการของอาหารเป็นพิษขึ้น หลังจากรับประทานอาหารที่มีเชื้อปนเปื้อนเข้าไปประมาณ 1-6 ชั่วโมง เนื่องจากสารพิษไปออกฤทธิ์ที่เยื่อบุลำไส้เล็ก ทำให้เกิดอาการคลื่นไส้ อาเจียน ปวดท้องและท้องร่วง ส่วนมากไม่มีไข้ ในรายที่รุนแรงอาจเกิดอาการช็อคได้ (ประภาวดี, 2559)

2.3.2.4 Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* หรือ MRSA

MRSA เป็นสายพันธุ์หนึ่งของแบคทีเรีย *Staphylococcus aureus* ที่สามารถทนหรือดื้อยาปฏิชีวนะในกลุ่มเมธิซิลินได้ เป็นเชื้อโรคชนิดหนึ่งที่มีความสำคัญทางการแพทย์และสัตวแพทย์ เนื่องจากมีความสามารถในการแพร่จากสัตว์สู่คน โดยการติดเชื้อ *Staphylococcus* การติดต่อของโรค ผ่านการสัมผัสโดยตรงหรือสัมผัสวัตถุที่เป็นพาหะนำเชื้อโรค โดยเชื้อ MRSA มักทำให้เกิดการติดเชื้อที่ผิวหนัง ทำให้มีลักษณะคล้ายตุ่ม อาจแดง บวม ปวด และอาจมีหนองหรือของเหลวไหลออกมา

นอกจากนี้เชื้อสามารถทำให้เกิดปอดบวมหรือการติดเชื้อทั่วร่างกาย (หน่วยปฏิบัติการวิจัยโรคอุบัติใหม่และอุบัติซ้ำในสัตว์, 2016)

2.4 งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

2.4.1 ความหลากหลายทางชีวภาพของจุลินทรีย์ที่แยกได้จากน้ำผึ้ง

นักวิจัยหลายท่าน ได้ทำการคัดแยกเชื้อจากน้ำผึ้ง เช่น งานวิจัยของ Ananias. *et al.* (2013) ศึกษาจำนวนของยีสต์และราในน้ำผึ้งโดยพิจารณาความสัมพันธ์ระหว่างความชื้นและความเป็นกรดในน้ำผึ้ง ซึ่งพบว่ามีเชื้อยีสต์และราในตัวอย่างปริมาณ $1.0x10^1$ ถึง $5.0x10^2$ CFU/g ถึงแม้ว่าจะไม่สัมพันธ์ต่อความชื้นและความเป็นกรดของน้ำผึ้ง เช่นเดียวกับ Erkan. *et al.* (2015) ทำการทดลองและพบว่ามียีสต์ 23% และเชื้อรา 13% ในตัวอย่างน้ำผึ้งจำนวน 50 ตัวอย่างจากเมือง Sırnak ประเทศตุรกีระหว่างปีค.ศ. 2011-2012

Martins. *et al.* (2003) ทำการทดลองสุ่มหาปริมาณสปอร์ของ Bacillaceae ฟังไจ และสารอะฟลาทอกซินในน้ำผึ้งจากตลาดในเมืองลิสบอน ประเทศโปตุเกศ โดยน้ำผึ้ง 46 ตัวอย่าง จากทั้งหมด 80 ตัวอย่างพบการปนเปื้อนของเชื้อราและยีสต์ และมี 25 ตัวอย่างที่พบการปนเปื้อนของยีสต์เพียงอย่างเดียว เชื้อราที่พบ เช่น *Aspergillus* sp., *Mucor* sp. และ *Penicillium* spp. และยีสต์ที่พบมากได้แก่ *Candida humicola* และ *Saccharomyces* sp.

Kacaninova. *et al.* (2009) ได้ทำการทดลองหาจุลินทรีย์จากส่วนต่าง ๆ ของผึ้งตัวเต็มวัยและในน้ำผึ้งจากพื้นที่ต่างๆ ของประเทศสโลวาเกีย พบว่ามีเชื้อราและยีสต์จากทุกตัวอย่างของน้ำผึ้ง โดยจะพบเชื้อรา *Penicillium* และ *Mucor* มากที่สุด ในขณะที่เชื้อยีสต์ที่พบมากที่สุดได้แก่ *Saccharomyces*, *Schizosaccharomyces* และ *Torula*

Nasser (2004) ทำการวิจัยเพื่อแยกจุลินทรีย์ในอาณาจักรฟังไจที่พบในน้ำผึ้งจากเมือง Riyadh ประเทศซาอุดิอาราเบียทั้งหมด 45 ตัวอย่าง ผลปรากฏว่าพบเชื้อราในน้ำผึ้ง 41 ตัวอย่างและพบทั้งเชื้อราและยีสต์ 9 ตัวอย่าง โดยเชื้อราที่พบมากที่สุดคือ *Aspergillus* ซึ่งนับเป็นจำนวน 91.6% ของเชื้อราทั้งหมด อีก 8.4% คือเชื้อ *Acremonium strictum, Botryotrichum atrogriseum, Cladosporium cladosporioides, Emericella nidulans, Fusarium oxysporum, Humicola grisea, Penicillium corylophilum, P. funiculosum* และ *Trichoderma hamatum*

2.4.2 คุณสมบัติการต้านจุลินทรีย์ของน้ำผึ้ง

จากการศึกษาของ Mcloone. *et al.* (2015) รายงานว่า คุณสมบัติการต้านเชื้อจุลินทรีย์ของน้ำผึ้ง เกิดจากองค์ประกอบหลาย ๆ อย่าง เช่น ความเข้มข้นของน้ำตาลที่มีค่าสูง ค่า pH ต่ำ ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ (H_2O_2) รวมถึงสารประกอบอื่น ๆ เช่น โพลีฟีน และ Bee Defensin-1

เนื่องจากในน้ำผึ้ง มีความเข้มข้นของน้ำตาลสูงและความชื้นต่ำ เป็นสาเหตุที่ทำให้เกิดแรงดันออสโมติก รวมถึงค่า pH ต่ำ ส่งผลต่อการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์ นอกจากนี้ในน้ำผึ้งยังมีเอนไซม์ที่เรียกว่า กลูโคสออกซิเดส เกิดจากกระบวนการผลิตน้ำผึ้ง มีหน้าที่เปลี่ยนกลูโคสในน้ำผึ้งเป็นไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์และกรดกลูโคนิก โดยที่ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์เป็นพิษต่อหลายจุลินทรีย์หลายชนิด สามารถทำลายเชื้อแบคทีเรียแกรมบวก แกรมลบ วัณโรค และราได้ เนื่องจากอนุมูลอิสระไปมีผลต่อไขมันที่เยื่อหุ้มเซลล์และที่องค์ประกอบอื่นของเซลล์ (วรรณพร, 2558) และกรดกลูโคนิกจะทำให้ค่า pH ต่ำลง ส่วนโพลีฟีนที่ได้จากน้ำหวานของพืช เป็นสารอินทรีย์ธรรมชาติ มีฟีนอลเป็นโครงสร้าง เช่น ฟลาโวนอยด์ มีคุณสมบัติต้านเชื้อแบคทีเรียโดยยับยั้งการเผาผลาญอาหารของแบคทีเรีย ยับยั้งเอนไซม์ DNA gyrase ที่มีส่วนช่วยในกระบวนการจำลองโมเลกุลของ DNA และยังขัดขวางการทำงานของเยื่อหุ้มเซลล์อีกด้วย นอกจากนี้ยังมี Bee Defensin-1 จากรายงานของ Chirico (2012) เป็นโปรตีนที่มีคุณสมบัติในการต้านเชื้อแบคทีเรีย เช่น *S. aureus* โดยไปทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงสมบัติของเยื่อหุ้มเซลล์ ส่งผลให้เกิดการต้านจุลินทรีย์และมีความเป็นพิษต่อเซลล์ รวมถึงไปยับยั้งการสังเคราะห์ DNA RNA และโปรตีน

2.4.3 การค้นพบยาที่เกี่ยวข้องกับน้ำผึ้ง

จากงานวิจัยของ McLoone. *et al.* (2015) รายงานว่าการต้านทานของเชื้อจุลินทรีย์ก่อโรคต่อยาปฏิชีวนะ ส่งผลให้เกิดความเป็นกังวลไปทั่วโลก จึงได้มีการศึกษาคุณสมบัติการต้านเชื้อจุลินทรีย์ที่ก่อโรคบนผิวหนังของน้ำผึ้ง ผลการศึกษาพบว่ามีฤทธิ์ต่อต้านเชื้อแบคทีเรียที่ก่อโรคบนผิวหนัง ชาวกรีกและชาวอียิปต์โบราณมีการนำน้ำผึ้งมาใช้ในการรักษาบาดแผลและอาการไหม้ที่ผิวหนัง นอกจากนี้ยังมีเอกสารทางการแพทย์ของชาวเปอร์เซียรายงานว่าน้ำผึ้งมีประสิทธิภาพในการรักษาแผล กลาก และการอักเสบ มีการทดลองนำน้ำผึ้งจากแหล่งต่าง ๆทั่วโลกมาทำการทดสอบกับเชื้อจุลินทรีย์ที่เกี่ยวข้องกับบริเวณผิวหนัง (MRSA, *S. aureus, P. aeruginosa* และ *E. coli*) ซึ่งค้นพบว่าน้ำผึ้งมีคุณสมบัติในการต้านจุลินทรีย์ได้หลากหลายชนิด

รายงานของ Bogdanov (2016) พบว่าเมื่อนำน้ำผึ้งมาใช้ในการรักษาบาดแผลของผู้ป่วยแผลกดทับเมื่อเวลาผ่านไป 5 วัน เนื้อเยื่อใหม่ถูกสร้างและอาการอักเสบลดลง หลังจากผ่านไป 2 เดือน แผลปิดสนิท สอดคล้องกับรายงานของ Nerverman (2015) โดยที่น้ำผึ้งจะไปช่วยปิดปากแผลจากการปนเปื้อนภายนอก มีความเป็นกรดและปริมาณน้ำต่ำช่วยยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียได้

นอกจากนี้ ยังใช้ในการรักษาผู้ป่วยเบาหวานเพศชาย วัย 55 ปี จนกระทั่งแผลหายดีในเวลา 4 สัปดาห์ของ Mohamed. *et al.* (2014) ซึ่งเป็นแผลผ่าตัด เช่นเดียวกับหญิงคนหนึ่งอายุ 48 ปี ได้รักษาโดยใช้เจลที่มีน้ำผึ้งเป็นองค์ประกอบเป็นเวลา 2 สัปดาห์จาก Makhdoom. *et al.* (2009) และ Mohamed. *et al.* (2012) ได้ทำการรักษาผู้ป่วยที่มีแผลเบาหวานบริเวณเท้าด้วยน้ำผึ้ง

2.4.4 เชื้อแบคทีเรียดื้อยาที่ก่อให้เกิดโรคของมนุษย์

Appelbaum. *et al.* (2016) รายงานว่าในปีค.ศ.1942 มีการพบสายพันธุ์ของเชื้อ *S. aureus* ที่ดื้อต่อยาปฏิชีวนะ penicillin ส่วนใหญ่มักตรวจพบในโรงพยาบาล ต่อมาในปีค.ศ.1961 มีการรายงานว่า *S. aureus* มีความดื้อยา methicillin ซึ่งในปัจจุบันสามารถพบว่าเป็นสายพันธุ์ MRSA และได้แพร่กระจายไปทั่วโลก ต่อมามีการค้นพบยา vacomicin ว่ามีประสิทธิภาพในการยับยั้งการสังเคราะห์ผนังเซลล์ของเชื้อ MRSA โดยที่จะต้องมีปัจจัยอื่นมาเกี่ยวข้อง ได้แก่ ยีนควบคุม (accessory gene regulator operon) และ Lowy. *et al.* (2003) ได้มีการศึกษาว่าปีค.ศ. 1960 มีการพบเชื้อ MRSA เป็นครั้งแรก การติดเชื้อพบมีอัตราการเสียชีวิตสูง จึงมีการนำยา β-lactams มาใช้ในการรักษาเป็นชนิดแรก ต่อมามีการใช้ยา vancomycin เพื่อรักษาโรคติดเชื้อ MRSA, *C. difficile* และ *Enterococcal* รวมถึง Tadesse. *et al.* (2012) รายงานว่ายาต้านจุลินทรีย์มีบทบาทสำคัญในการรักษาอาการเจ็บป่วยและลดอัตราการเสียชีวิตจากโรคติดต่อในคนและสัตว์ จึงได้ทำการศึกษาเชื้อ *E. coli* ที่แยกได้จากมนุษย์และตัวอย่างอาหารสัตว์ เพื่อทำการประเมินการดื้อยาปฏิชีวนะของเชื้อ จากตัวอย่าง 1,729 ไอโซเลต ได้ทำการตรวจสอบความไวต่อยาปฏิชีวนะ 15 ชนิด ซึ่งมี 11 ชนิดที่มีแนวโน้มเพื่อสูงขึ้นอย่างมีนัยสำคัญ รวมถึง ampicillin, sulfonamide และ gentamycin การต้านทานต่อยาปฏิชีวนะเพิ่มขึ้นจาก 7.2% ในปีค.ศ.1950 เพิ่มเป็น 63.6% และการศึกษาของ Bryan. *et al.* (1974) รายงานผลการทดสอบ disk diffusion ต่อเชื้อ *P. aeruginosa* พบว่ามี 11% จาก 313 สายพันธุ์มีการต้านทานต่อยา gentamycin อีก 31% ต้านทานต่อยาปานกลาง (6.25 ถึง 12.5 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร)

บทที่ 3

วิธีการดำเนินงานวิจัย

3.1 จุลินทรีย์ที่ใช้ในการทดลองที่ใช้ในการทดสอบ

3.1.1 จุลินทรีย์ที่ใช้ในการทดลอง

- *Staphylococcus aureus* ATCC 25923
- Methicillin Resistant *Staphylococcus aureus* SK1
- *Escherichia coli* ATCC 25922
- *Psuedomonas aeruginosa* ATCC 27853

เชื้อแบคทีเรียทั้งหมด ได้รับความอนุเคราะห์จาก รศ.ดร.เสาวลักษณ์ พงษ์ไพจิตร ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ และเชื้อ MRSA SK1 เป็นสายพันธุ์ของเชื้อที่แยกได้จากผู้ป่วยโรงพยาบาลสงขลานครินทร์

3.1.2 ตัวอย่างรังผึ้ง

จากตัวอย่างรังผึ้ง ซึ่งประกอบด้วย ตัวอ่อนและน้ำผึ้ง จากแหล่งต่าง ๆ จำนวน 15 ตัวอย่าง ดังตารางที่ 3.1

ตาราง 3.1 ที่มาของตัวอย่างรังผึ้ง ซึ่งประกอบด้วย ตัวอ่อนและน้ำผึ้ง

แหล่งที่มา	จำนวนตัวอย่าง
อำเภอนายายอาม จังหวัดจันทบุรี	5 ตัวอย่าง
อำเภอตากฟ้า จังหวัดนครสวรรค์	5 ตัวอย่าง
อำเภอพระพุทธบาท จังหวัดสระบุรี	2 ตัวอย่าง
อำเภอบางแก้ว จังหวัดพัทลุง	3 ตัวอย่าง

3.2 อุปกรณ์และสารเคมีที่ใช้ในการทำโครงงานพิเศษ

3.2.1 อุปกรณ์

- หม้อนึ่งฆ่าเชื้อความดันไอ (Autoclave)
- ตู้เขี่ยเชื้อ (Laminar air flow)

- ตู้อบลมร้อนอุณหภูมิ 180 องศาเซลเซียส (Hot air oven)
- เครื่องชั่งละเอียด 3 ตำแหน่ง และ 4 ตำแหน่ง
- เครื่องเขย่าผสม (Vortex mixer)
- เครื่องเขย่าสาร (Vortex)
- ไมโครปิเปต (Micropipette) และทิป (Tip)
- ตู้บ่มเชื้อ (Incubator)
- กล้องจุลทรรศน์ (Microscope)
- ลวดเขี่ยเชื้อ (Loop)
- ปิเปต (Pipette) พร้อมจุกยาง
- จานอาหารเพาะเชื้อ (Plate)
- หลอดทดลอง (Test tube)
- แท่งแก้วคนสาร
- ขวดใส่สาร (Duran) ขนาด 500 มิลลิลิตร
- ช้อนตักสาร (Spatula)
- ที่วางหลอดทดลอง (Test tube rack)
- กรรไกร
- ขวดรูปชมพู่
- ตะเกียงแอลกอฮอล์
- สำลีพันก้าน
- โกร่งบดสาร
- คีมคีบ (Forceps)
- ขวดใส่แบนขนาดเล็ก ปริมาตร 120 มิลลิลิตร
- ขวดกลมใสขนาดใหญ่ ปริมาตร 700 มิลลิลิตร
- เครื่อง sonicator
- Eppendorf

3.2.2 สารเคมี

- NaCl
- Peptone 0.1 %

- แผ่นยา gentamycin GEN10 ความเข้มข้น 10 mcg/disk และ vancomycin VA30 ความเข้มข้น 30 mcg/disk บริษัท HiMedia Laboratories Pvt. Ltd.
- ยาปฏิชีวนะ ได้แก่ Penicillin และ Streptomycin บริษัท M & H Manufacturing Co.,Ltd.
- Alcohol 70 % และ 95 %
- Ethyl acetate
- Dimethyl sulfoxide

3.2.3 อาหารเลี้ยงเชื้อ

- Potato dextrose agar (PDA)
- Potato dextrose broth (PDB)
- Malt extract yeast extract 30% glucose agar (MY30G)
- Nutrient agar (NA)
- Nutrient broth (NB)
- Malt Extract Agar (MEA)
- Mueller Hinton agar (MHA)

3.3 วิธีการดำเนินงานวิจัย

3.3.1 การเตรียมตัวอย่างน้ำผึ้งและการคัดแยกเชื้อ

แยกตัวอ่อนผึ้งและน้ำผึ้งใส่ในภาชนะที่เตรียมไว้ ทำการล้างส่วนตัวอ่อนผึ้งในขวดรูปชมพู่ขนาด 250 มิลลิลิตร โดยเติม peptone 0.1% ปริมาตร 100 มิลลิลิตร เขย่าที่ความเร็วรอบ 150 รอบต่อนาที เป็นเวลา 15 นาที จากนั้นนำตัวอ่อนผึ้งมาบดในโกร่งที่ผ่านการฆ่าเชื้อโดยการเติม peptone 0.1% ปริมาตร 5 มิลลิลิตร บดจนละเอียดนำสารละลายที่ได้จากตัวอ่อนผึ้งและน้ำผึ้งใส่หลอดทดลองทำการเจือจางตัวอย่างด้วย peptone 0.1% ที่ความเจือจาง 10^{-1} และ 10^{-2} ทำการคัดแยกเชื้อโดยเทคนิค spread plate ในอาหาร PDA ที่ผสม penicillin และ streptomycin และอาหาร MY30G สำหรับสารละลายที่ได้จากตัวอย่างน้ำผึ้ง บ่มที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส สังเกตการเจริญเติบโต แยกเชื้อราและเชื้อยีสต์ให้ได้โคโลนีเดี่ยว จากนั้นทำการเก็บเชื้อที่แยกได้เป็น stock culture ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

3.3.2 การทดสอบฤทธิ์ต้านแบคทีเรียด้วยวิธี agar well diffusion

3.3.2.1 การเพาะเลี้ยงเชื้อจุลินทรีย์ที่แยกได้

เลี้ยงเชื้อที่แยกได้ในอาหารเหลว โดยใช้มีดที่ผ่านการฆ่าเชื้อ ตัดชิ้นวุ้นที่มีเส้นใยของราเจริญอยู่ประมาณ 5-10 ชิ้น ใส่ในอาหาร PDB ปริมาตร 30 มิลลิลิตร ในขวดแก้วปริมาตร 120 มิลลิลิตร วางขวดในแนวนอนที่อุณหภูมิห้องและมีการอากาศถ่ายเทสะดวก เป็นเวลา 4 สัปดาห์ นำส่วนของน้ำเลี้ยงเชื้อไปทดสอบ

3.3.2.2 การเตรียมหัวเชื้อแบคทีเรีย

ถ่ายเชื้อ *S. aureus* ATCC 25923, MRSA SK1, *E. coli* ATCC 25922 และ *P. aeruginosa* ATCC 27853 จากหลอดลงจานเพาะเชื้อที่มีอาหาร NA โดยใช้เทคนิค streak plate บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 18-24 ชั่วโมง เพื่อให้ได้เชื้อบริสุทธิ์ จากนั้นเลือกโคโลนีเดี่ยว 3-5 โคโลนี มาเลี้ยงในอาหารเหลว NB เขย่าด้วย shaker ความเร็ว 200 รอบต่อนาที ใช้เวลา 3-6 ชั่วโมง และปรับความขุ่นด้วยสารละลายน้ำเกลือ (normal saline solution) ของเชื้อให้ได้ความขุ่นเท่ากับ 0.5 McFarland standards ซึ่งจะมีจำนวนเซลล์โดยประมาณเท่ากับ $1.5x10^8$ CFU/มิลลิลิตร

3.3.2.3 การทดสอบฤทธิ์การต้านแบคทีเรียก่อโรค โดยใช้วิธี agar well diffusion

ใช้สำลีพันก้านที่ผ่านการฆ่าเชื้อ (sterile cotton swab) จุ่มลงในสารละลายที่ได้จากข้อ 3.3.2.2 บิดหมาด ๆ แล้วเกลี่ยเชื้อ (swab) ให้ทั่วจานเพาะเชื้อที่มีอาหาร MHA แล้วใช้ Cork Borer หมายเลข 1 (เส้นผ่านศูนย์กลาง 5 มิลลิเมตร) ที่ผ่านการฆ่าเชื้อเจาะอาหาร MHA ได้ 12-16 หลุม ต่อหนึ่งจานเพาะเชื้อ จากนั้นหยอดน้ำเลี้ยงเชื้อรา ปริมาณ 30 ไมโครลิตร ที่ได้จากข้อ 3.3.2.1 ใส่ในหลุม นำจานเพาะเชื้อไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 18 ชั่วโมง ส่วนชุดควบคุมเชิงบวก ใช้ยา vancomycin 30 ไมโครกรัม /แผ่น สำหรับเชื้อ *S. aureus* ATCC 25923 และ MRSA SK1 และใช้ยา gentamycin 10 ไมโครกรัม/แผ่น สำหรับเชื้อ *E. coil* ATCC 25922 และ *P. aeruginosa* ATCC 27853 ส่วนชุดควบคุมเชิงลบ จะใช้ NB หยอดใส่ในหลุม ทำการตรวจผลการทดลองโดยวัดขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของบริเวณใส (clear zone)

3.3.3 การทดสอบฤทธิ์ต้านแบคทีเรียของสารสกัดจากรา ด้วยวิธี agar disk diffusion

จากการทดสอบการยับยั้งแบคทีเรียโดยใช้วิธี agar well diffusion ซึ่งเป็นการทดสอบเบื้องต้น จากนั้นจึงนำเชื้อที่มีความสามารถในการยับยั้งเชื้อแบคทีเรียมาทดสอบอย่างละเอียดโดยใช้วิธี agar disk diffusion

การสกัดน้ำเลี้ยงเชื้อราใช้วิธี วิธี liquid-liquid extraction เป็นการแยกสารและทำให้บริสุทธิ์ โดยการใช้ตัวทำละลายที่เหมาะสมในการละลายสารที่ต้องการออกจากสารผสม ในการศึกษาครั้งนี้เลือกใช้ตัวทำละลายคือ เอทิลอะซิเตต เนื่องจากมีความสามารถในการสกัดสารได้ดี จุดเดือดไม่สูง ง่ายต่อการระเหยหลังการสกัด และไม่ทำปฏิกิริยากับสารอื่นๆที่ใช้ร่วมกัน โดยสารอินทรีย์ที่ต้องการสกัดอาจจะละลายหรือแขวนลอยอยู่ในน้ำ และใช้ตัวทำละลายอินทรีย์ที่ไม่รวมเป็นเนื้อเดียวกับน้ำ หลังการผสมจะเกิดการแยกชั้น ซึ่งสารจะลายอยู่ในชั้นของตัวทำละลายอินทรีย์หรือชั้นน้ำ ขึ้นอยู่กับความสามารถในการละลายของสารนั้นๆ โดยทั่วไปแล้ว สารที่แตกตัวเป็นไอออนหรือสารที่มีพันธะไฮโดรเจนกับน้ำ จะละลายอยู่ในชั้นน้ำได้มาก ในขณะที่สารที่ไม่ขั้วจะละลายอยู่ในชั้นตัวทำละลายสารอินทรีย์ ซึ่งส่วนใหญ่จะเป็นสารที่มีขั้วน้อย นอกจากนี้ การสกัดสารจะต้องทำให้ได้สารที่ต้องการมากที่สุด ในทางกลับกันจะต้องใช้ปริมาณตัวทำละลายน้อยที่สุด ในกรณีที่ใช้ตัวทำลายในปริมาตรเท่าๆกัน การสกัดที่ใช้ตัวทำละลายครั้งละไม่มาก แต่ทำหลายๆครั้ง จะมีประสิทธิภาพดีกว่าการใช้ตัวทำละลายครั้งละมากๆ แต่สกัดไม่กี่ครั้ง (ธีรยุทธ และคณะ, 2551)

3.3.3.1 การเพาะเลี้ยงเชื้อจุลินทรีย์ที่แยกได้

เลี้ยงเชื้อที่แยกได้ในอาหารเหลว โดยใช้มีดที่ผ่านการฆ่าเชื้อ ตัดชิ้นวุ้นที่มีเส้นใยของราเจริญอยู่ ประมาณ 10-20 ชิ้น ใส่ในอาหาร PDB ปริมาตร 4000 มิลลิลิตร โดยแยกใส่ในขวดแก้วปริมาตร 700 มิลลิลิตร จำนวน 10 ขวด วางขวดในแนวนอนที่อุณหภูมิห้องและมีการอากาศถ่ายเทสะดวก เป็นเวลา 4 สัปดาห์ นำส่วนของน้ำเลี้ยงเชื้อไปทดสอบ

ทำการสกัดสารทุติยภูมิที่ผลิตโดยเชื้อรา โดยใช้ตัวทำละลายคือเอทิลอะซิเตต 2 ครั้ง โดยใช้สำลีกรองเส้นใยเชื้อราออก แล้วเทน้ำเลี้ยงเชื้อปริมาตร 350 มิลลิลิตร ลงในกรวยแยกขนาด 1000 มิลลิลิตร จากนั้นเทเอทิลอะซิเตตลงในขวดที่หมักเลี้ยงเชื้อ เพื่อกลั้วน้ำเลี้ยงเชื้อที่เหลือ แล้วเทเอทิลอะซิเตตลงในกรวยแยก ซึ่งจะใช้เอทิลอะซิเตต ปริมาตร 350 มิลลิลิตร เขย่าแรง ๆ ประมาณ 20 ครั้ง เพื่อให้น้ำหมักเชื้อและเอทิลอะซิเตตผสมกัน เปิดจุกด้านบนกรวยเพื่อไล่แก๊สและความดันที่เกิดขึ้นจากการเขย่า ตั้งทิ้งไว้ให้เกิดการแยกชั้นของน้ำหมักและเอทิลอะซิเตต โดยน้ำหมักอยู่ชั้นล่างและเอทิลอะซิเตตอยู่ชั้นบน จากนั้นไขส่วนน้ำเลี้ยงเชื้อใส่ลงภาชนะเดิมที่ใช้เลี้ยงเชื้อและไขส่วนใสใส่ภาชนะใบใหม่ พร้อมทั้งระบุรหัสเชื้อให้ชัดเจน แล้วจึงนำน้ำเลี้ยงเชื้อดังกล่าวมาสกัดด้วย

เอทิลอะซิเตตครั้งที่ 2 โดยทำวิธีการเดียวกัน เมื่อได้ส่วนใสของชั้นเอทิลอะซิเตต จากการสกัดทั้งสองรอบแล้ว นำส่วนใสดังกล่าวมาระเหยเอทิลอะซิเตตออกด้วยเครื่องระเหยสารระบบสุญญากาศ (rotary evaporator) ภายใต้ความดันต่ำ เพื่อให้ได้สารสกัดหยาบละลายในชั้นเอทิลอะซิเตต แล้วทำให้แห้งโดยใส่ในโถดูดความชื้น (desiccator) จากนั้นชั่งน้ำหนักของสารสกัดหยาบของเชื้อที่ได้ แล้วทำการเจือจางโดยชั่งน้ำหนักของสารสกัด 0.015 กรัม ละลายด้วยสารละลาย DMSO 150 ไมโครลิตร เพื่อให้ได้ความเข้มข้นสุดท้ายเป็น 100 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร จากนั้นจึงทำการผสมสารให้ละลายเข้ากันโดยใช้เครื่อง sonicate เมื่อสารละลายเข้ากันแล้ว จึงทำการหยดสารละลายของสารสกัดหยาบปริมาตร 10 ไมโครลิตร ลงบนแผ่นกระดาษทดสอบที่วางอยู่ในจานเพาะเชื้อเปล่าที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว

3.3.3.2 การเตรียมหัวเชื้อแบคทีเรีย

ทำตามขั้นตอน 3.3.2.2

3.3.3.3 การทดสอบฤทธิ์การต้านแบคทีเรียก่อโรค โดยใช้วิธี agar disk diffusion

ใช้สำลีพันก้านที่ผ่านการฆ่าเชื้อ (sterile cotton swab) จุ่มลงในสารละลายที่ได้จากข้อ 3.3.3.2 บิดหมาด ๆ แล้วเกลี่ยเชื้อ (swab) ให้ทั่วจานเพาะเชื้อที่มีอาหาร MHA แล้วคีบแผ่นกระดาษทดสอบที่แห้งแล้วจากข้อ 3.3.3.1 มาวาง จากนั้นนำจานเพาะเชื้อไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 18 ชั่วโมง ชุดควบคุมเชิงบวก ใช้ยา vancomycin 30 ไมโครกรัม /แผ่น สำหรับเชื้อ *S. aureus* ATCC 25923 และ MRSA SK1 และใช้ยา gentamycin 10 ไมโครกรัม/แผ่น สำหรับเชื้อ *E. coil* ATCC 25922 และ *P. aeruginosa* ATCC 27853 ส่วนชุดควบคุมเชิงลบใช้กระดาษที่มี DMSO และรอจนแห้งแล้ว จากนั้นทำการตรวจผลการทดลองโดยวัดขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของบริเวณใส (clear zone)

3.3.4 การจัดจำแนกราที่มีฤทธิ์ต้านแบคทีเรีย

โดยการศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยา

3.3.4.1 การศึกษาลักษณะด้วยตาเปล่า

เลี้ยงเชื้อบนอาหาร MEA และ PDA บ่มในที่มืด อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 วัน สังเกตการเจริญบนอาหารแข็งและบันทึกผล

3.3.4.2 การศึกษาลักษณะภายใต้กล้องจุลทรรศน์

สังเกตลักษณะของเส้นใยและสปอร์ผ่านกล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสง และสามารถเตรียม slide culture ได้โดยการนำกระดาษทิชชู แท่งแก้วงอรูปตัววี และสไลด์ที่สะอาดวางบนแท่งแก้ว จากนั้นนำไปฆ่าเชื้อ เตรียมวุ้นโดยเทอาหาร MEA บนจานเพาะเชื้อซึ่งเทหนากว่าปกติ รอให้แข็งแล้วตัดวุ้นเป็นรูปสี่เหลี่ยมจัตุรัสขนาด 1x1 เซนติเมตร โดยใช้ใบมีดจุ่มแอลกอฮอล์และนำมาผ่านเปลวไฟ นำวุ้นที่ตัดเป็นรูปสี่เหลี่ยมจัตุรัสวางลงบนสไลด์ จากนั้นเขี่ยเชื้อที่ต้องการตรวจลงด้านข้างของชิ้นอาหารเลี้ยงเชื้อทั้งสี่ด้าน ปิดด้วยกระจกปิดสไลด์ที่ปราศจากเชื้อ หยดน้ำกลั่นที่ปราศจากเชื้อลงบนกระดาษทิชชูเพื่อให้เกิดความชื้นแล้วนำไปบ่มในที่มืด อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส ประมาณ 7 วัน ตรวจผลการทดลองโดยหยด lactophenol cotton blue บนสไลด์สะอาดแล้วปิดตามด้วยกระจกปิดสไลด์

บทที่ 4

ผลการวิจัยและอภิปรายผล

4.1 ผลการแยกเชื้อจากตัวอ่อนของผึ้งและตัวอย่างน้ำผึ้ง

จากการแยกเชื้อจุลินทรีย์จากตัวอย่างรังผึ้ง ซึ่งประกอบด้วย ตัวอ่อนและน้ำผึ้ง จากแหล่งต่าง ๆ คือ อำเภอนายายอาม จังหวัดจันทบุรี จำนวน 5 ตัวอย่าง อำเภอตากฟ้า จังหวัดนครสวรรค์ จำนวน 5 ตัวอย่าง อำเภอพระพุทธบาท จังหวัดสระบุรี จำนวน 2 ตัวอย่าง และอำเภอบางแก้ว จังหวัดพัทลุง จำนวน 3 ตัวอย่าง โดยใช้อาหาร 2 ชนิด คือ MY30G และ PDA พบว่าเชื้อจุลินทรีย์ที่แยกได้มีจำนวน 143 ไอโซเลต โดยแบ่งเป็นจากตัวอย่างตัวอ่อนของผึ้ง 17 ไอโซเลต เป็นเชื้อยีสต์ 8 ไอโซเลต เชื้อรา 9 ไอโซเลต และจากตัวอย่างน้ำผึ้ง 129 ไอโซเลต เป็นเชื้อยีสต์ 51 ไอโซเลต เชื้อรา 75 ไอโซเลต แสดงผลการทดลองดังตารางที่ 4.1

ตาราง 4.2 จำนวนเชื้อที่แยกจากตัวอย่างน้ำผึ้งและตัวอ่อนของผึ้งบนอาหาร PDA และ MY30G

แหล่งที่มา	ตัวอย่างที่	วันที่เก็บตัวอย่าง	ที่มาของเชื้อ			
			ตัวอ่อนผึ้ง		น้ำผึ้ง	
			ยีสต์	รา	ยีสต์	รา
จันทบุรี	1	10 ตุลาคม 2558	-	-	3	-
	2	10 ตุลาคม 2558	1	-	3	2
	3	10 ตุลาคม 2558	-	-	5	5
	4	29 มกราคม 2559	-	-	10	10
	5	29 มกราคม 2559	-	1	2	8
นครสวรรค์	1	16 ตุลาคม 2558	4	2	1	9
	2	4 ธันวาคม 2558	-	-	5	9
	3	19 มกราคม 2559	-	-	3	-
	4	3 กุมภาพันธ์ 2559	-	3	1	1
	5	3 กุมภาพันธ์ 2559	-	2	1	9
สระบุรี	1	2 มกราคม 2559	-	-	2	6
	2	2 มกราคม 2559	3	-	3	3

ตาราง 4.2 จำนวนเชื้อที่แยกจากตัวอย่างน้ำผึ้งและตัวอ่อนของผึ้งบนอาหาร PDA และ MY30G (ต่อ)

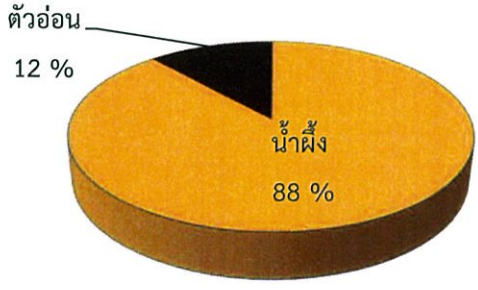
แหล่งที่มา	ตัวอย่างที่	วันที่เก็บตัวอย่าง	ที่มาของเชื้อ			
			ตัวอ่อนผึ้ง		น้ำผึ้ง	
			ยีสต์	รา	ยีสต์	รา
พัทลุง	1	7 สิงหาคม 2558	-	-	8	3
	2	20 ธันวาคม 2558	-	1	3	10
	3	8 มกราคม 2559	-	-	1	-
รวม	15 ตัวอย่าง		8	9	51	75
			17 ไอโซเลต		126 ไอโซเลต	

หมายเหตุ – คือ ไม่พบเชื้อ

จากผลการแยกเชื้อจากตัวอ่อนของผึ้งและตัวอย่างน้ำผึ้งพบว่า ปริมาณเชื้อที่แยกได้มีความหลากหลาย เนื่องจากเชื้อยีสต์และราที่สามารถเจริญได้มีความสามารถทนต่อความเข้มข้นน้ำตาลและกรด โดยส่วนใหญ่แล้วการปนเปื้อนของจุลินทรีย์ในน้ำผึ้งมีแนวโน้มมาจากละอองเกสร ระบบการย่อยของผึ้ง ดิน ฝุ่น อากาศ ดอกไม้ และจากการกระทำของมนุษย์ (Olaitan. *et al.*, 2007) ซึ่งจุลินทรีย์เหล่านี้มีการพัฒนากลไกทางด้านชีวเคมีเพื่อให้สามารถดำรงชีวิตอยู่ในสภาพแวดล้อมที่มีน้ำน้อย จากการที่ผนังเซลล์มีตัวรับสัญญาณของแรงดันออสโมติกอยู่ ทำให้สามารถรับรู้ค่าปริมาณน้ำอิสระในน้ำผึ้งและหลั่งกลีเซอรอลซึ่งเป็นตัวทำละลายเพื่อรักษาสมดุลของแรงดันภายนอกและภายในเซลล์ (Pettersson and Leong, 2011) จากตารางที่ 4.1 จะเห็นได้ว่าปริมาณเชื้อราที่แยกได้มีปริมาณมากกว่าเชื้อยีสต์ เนื่องจากในน้ำผึ้ง มีค่า a_w ต่ำ ซึ่งก็คือมีปริมาณน้ำอิสระน้อย และจากคุณสมบัติทางกายภาพของน้ำในเรื่องของการยึดเกาะกับพื้นที่ผิว และสามารถยึดเกาะกับเชื้อรากลุ่มนี้ได้ดี ทำให้เชื้ออื่น ๆ ไม่สามารถนำน้ำไปใช้กับกระบวนการเมตาบอลิซึมของเซลล์ได้ อีกเหตุผลที่สำคัญ คือ เมื่ออยู่ในสภาวะที่น้ำภายนอกมีน้อยกว่าในเซลล์ เชื้อจะมีกระบวนการเมตาบอลิซึมที่สามารถเพิ่มความเข้มข้นในเซลล์ ส่งผลให้ไม่เกิดการสูญเสียน้ำและสามารถดำเนินกิจกรรม เช่น การเจริญเติบโต หรือการสร้างสปอร์ต่อไปได้ (Burge, 2008)

สำหรับแหล่งที่มาของเชื้อ เมื่อเปรียบเทียบระหว่างตัวอ่อนของผึ้งและน้ำผึ้ง พบว่าในส่วนของจุลินทรีย์ที่พบในตัวอ่อนของผึ้งนั้น พบว่าสามารถแยกเชื้อออกมาได้น้อยกว่าจากน้ำผึ้งดังรูปที่ 4.1

เนื่องจากจุลินรีย์ที่แยกได้จากตัวอ่อนของผึ้งคิดเป็น 12% เท่านั้น ในขณะที่สามารถแยกจุลินทรีย์ได้จากน้ำผึ้งเป็นจำนวนสูงถึง 88% อาจเป็นเพราะว่าในน้ำผึ้งมีปริมาณน้ำตาล แร่ธาตุ และสารอาหารต่าง ๆ อยู่เป็นจำนวนมาก โดยในน้ำผึ้งนั้น ประกอบด้วยน้ำตาลกลูโคสและฟรุกโตส ซึ่งเป็นน้ำตาลโมเลกุลเดี่ยว สามารถนำไปใช้ได้ง่าย และยังมีน้ำตาลโมเลกุลคู่ เช่น มอลโตสและซูโครส รวมถึงแร่ธาตุต่างๆ เช่น โพแทสเซียม แคลเซียม ทองแดง เหล็ก แมงกานีสและฟอสฟอรัส นอกจากนี้ยังมีวิตามิน เช่น วิตามินบี วิตามินบีสองอีกด้วย (Olaitan. *et al.*, 2007) ช่วยให้จุลินทรีย์นำไปใช้ประโยชน์ในการดำรงชีวิตได้ ซึ่งสารเหล่านี้ล้วนจำเป็นต่อการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์ทำให้ผลการทดลองพบจุลินทรีย์จากน้ำผึ้งเป็นจำนวนมาก



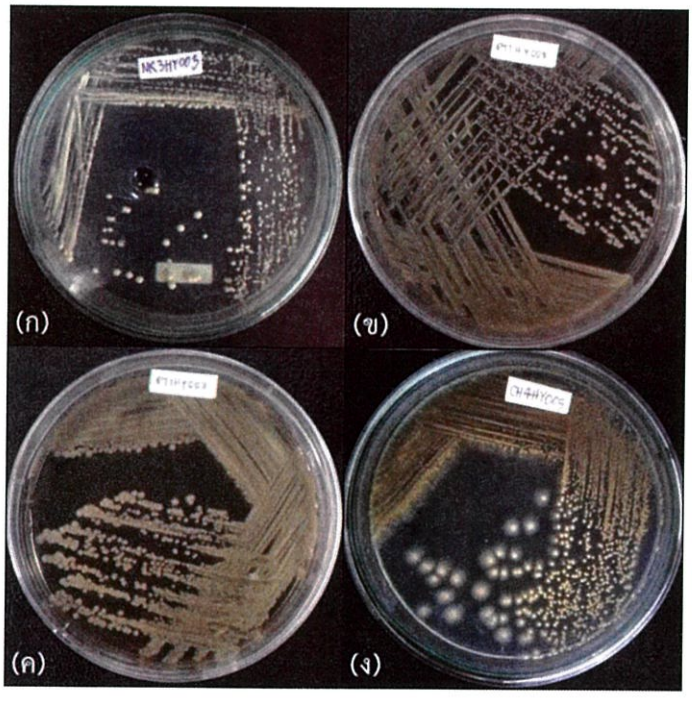
รูปที่ 4.1 ความแตกต่างของเชื้อจุลินทรีย์ที่แยกได้จากตัวอ่อนของผึ้งกับน้ำผึ้ง

อาจเป็นไปได้ว่าจุลินทรีย์ที่อาศัยอยู่ในตัวอ่อน เป็นพวก unculturable microbes คือ จุลินทรีย์ที่ไม่สามารถเพาะเลี้ยงได้ในห้องปฏิบัติการหรือต้องอาศัยเจ้าบ้าน (host) และจะเจริญได้เมื่ออาศัยอยู่ในสภาพแวดล้อมที่เป็นธรรมชาติ ซึ่งไม่ได้หมายความว่าไม่สามารถเพาะเลี้ยงได้ แต่จำเป็นต้องอาศัยข้อมูลทางด้านชีววิทยา ข้อมูลส่วนนี้จะทำให้ทราบถึงอณูชีววิทยา (Molecular biology) ซึ่งเป็นการศึกษาระดับโมเลกุล เน้นโครงสร้างของโมเลกุลต่างๆ การทำงานของยีน ปฏิสัมพันธ์ของ DNA RNA และโปรตีน รวมถึงระบบต่างๆภายในเซลล์ (Stewart, 2012)

เมื่อพิจารณาถึงอาหารเลี้ยงเชื้อที่ใช้คัดเลือกจุลินทรีย์ จากรายงานของ Kim. *et al.* (2014) กล่าวว่าจุลินทรีย์ที่ปนเปื้อนในอาหารน้ำตาลสูง เช่น แยม น้ำผึ้ง น้ำผลไม้เข้มข้น โดยส่วนใหญ่แล้วมักเป็นพวกออสโมฟิลิก คือ พวกที่สามารถเจริญได้ในที่ที่มีแรงดันออสโมติกสูง ซึ่งเมื่อพิจารณาถึงส่วนประกอบของอาหาร MY30G แล้ว พบว่ามีน้ำตาลกลูโคสสูงถึง 30% มีค่า a_w ประมาณ 0.89

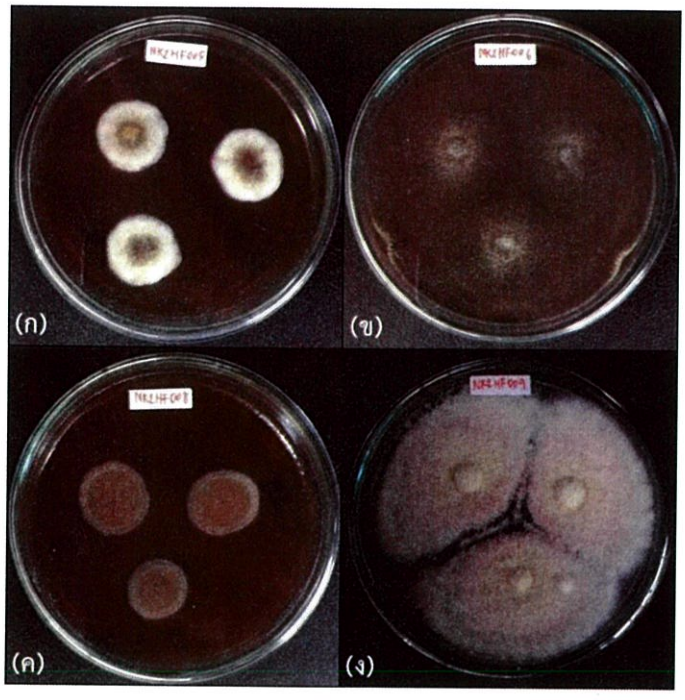
รวมถึงมีสารสกัดจากมอลต์และยีสต์ให้สารอาหารที่เป็นไนโตรเจน กรดอะมิโน วิตามินต่าง ๆ และมีความใกล้เคียงกับส่วนประกอบของน้ำผึ้ง จากรายงานของ Silva. *et al.* (2016) รายงานว่าในน้ำผึ้งมีน้ำตาลกลูโคสประมาณ 31% ทำให้อาหาร MY30G มีสารอาหารตรงต่อความต้องการของยีสต์และรา ในส่วนของอาหาร PDA เป็นอาหารที่นิยมใช้เพาะเลี้ยงเชื้อยีสต์และรา โดยมีน้ำตาลเดกซ์โตรสเป็นคาร์บอน และมีสารสกัดจากมันฝรั่งสนับสนุนการเจริญเติบโต จากรายงานของยศยาและคณะ (2016) กล่าวว่า PDA มี a_w ประมาณ 0.9 ซึ่งมีความเหมาะสมในการเพาะเลี้ยงเชื้อยีสต์และราทั่วไป ดังนั้นเชื้อที่แยกได้จากอาหาร PDA นั้น เป็นเชื้อที่สามารถพบได้ทั่วไป แตกต่างจากเชื้อที่แยกได้จากอาหาร MY30G ซึ่งเป็นเชื้อที่มีความสามารถในการทนต่อสภาพแวดล้อมไม่เหมาะสม เช่น pH ต่ำ a_w ต่ำ เพราะฉะนั้นการใช้อาหารที่มีน้ำตาลสูงจึงเหมาะต่อการแยกเชื้อจุลินทรีย์จากน้ำผึ้งมากกว่าอาหารเลี้ยงเชื้อปกติและแสดงให้เห็นว่าการควบคุมปริมาณสารอาหารและสภาวะการบ่มให้เหมาะสมมีผลต่อการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์อย่างมีนัยสำคัญ (Ikechukwu. *et al.*, 2007)

ตัวอย่างเชื้อบริสุทธิ์ที่แยกได้



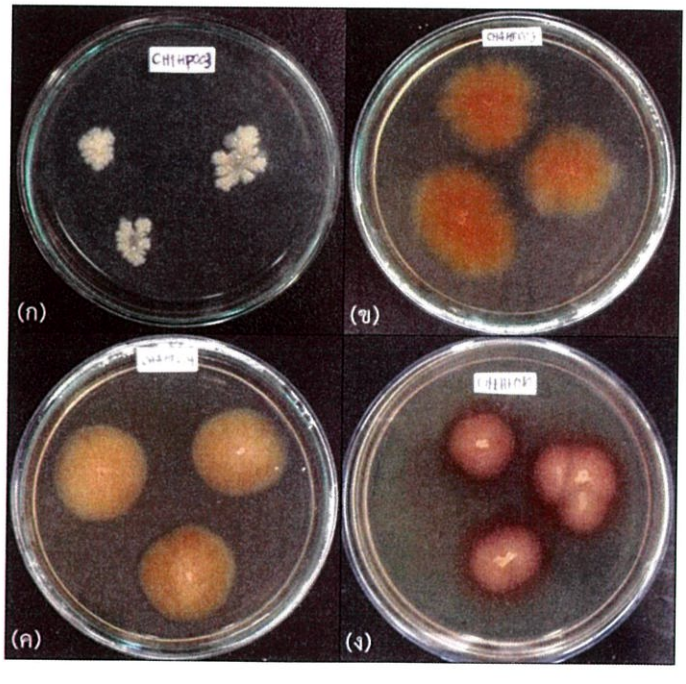
รูปที่ 4.2 ตัวอย่างเชื้อยีสต์ที่แยกได้จากแหล่งต่างๆ

โดย (ก) คือ N3HY03 (ข) คือ P1HY03 (ค) คือ P1HY08 (ง) คือ C4HY05



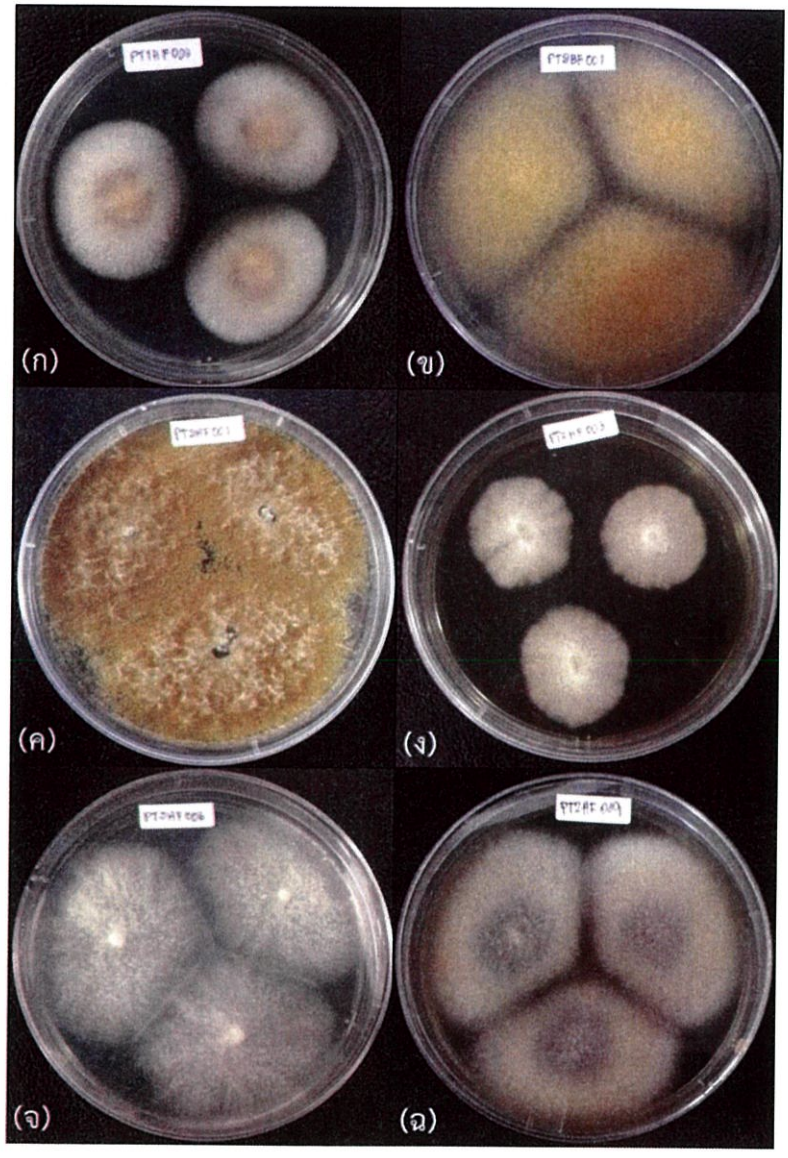
รูปที่ 4.3 ตัวอย่างเชื้อราที่แยกได้จากรังผึ้งในจังหวัดนครสวรรค์

โดย (ก) คือ N2HF05 (ข) คือ N2HF06 (ค) คือ N2HF08 (ง) คือN2HF09



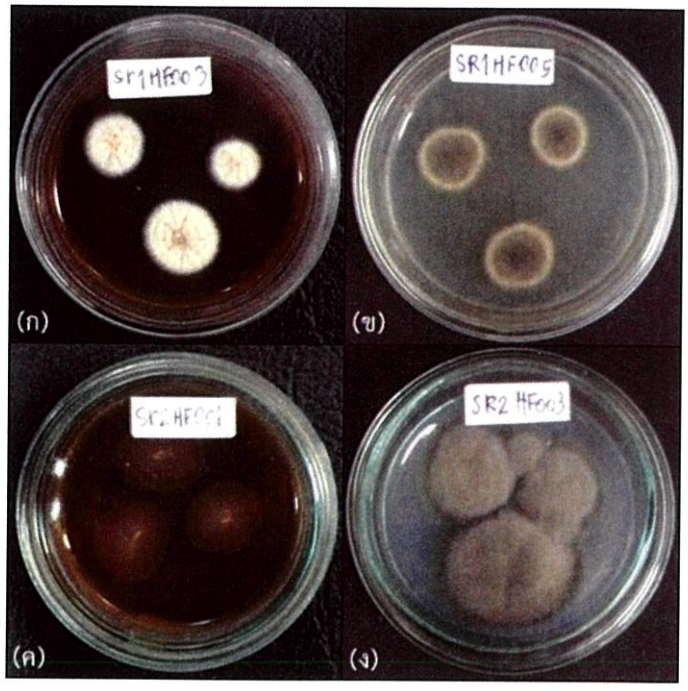
รูปที่ 4.4 ตัวอย่างเชื้อราที่แยกได้จากรังผึ้งในจังหวัดจันทบุรี

โดย (ก) คือ C1HF03 (ข) คือ C4HF03 (ค) คือ C4HF04 (ง) คือ C4HF10



รูปที่ 4.5 ตัวอย่างเชื้อราที่แยกได้จากรังผึ้งในจังหวัดพัทลุง

โดย (ก) คือ P1HF02 (ข) คือ P2BF01 (ค) คือ P2HF01 (ง) คือ P2HF03 (จ) คือ P2HF03 (ฉ) คือ P2HF09



รูปที่ 4.6 ตัวอย่างเชื้อราที่แยกได้จากรังผึ้งในจังหวัดสระบุรี

โดย (ก) คือ S1HF03 (ข) คือ S1HF05 (ค) คือ S2HF01 (ง) คือ S2HF3

4.2 ผลการทดสอบการยับยั้งแบคทีเรียก่อโรคด้วยวิธี agar well diffusion

ตัวแทนไอโซเลตเชื้อจุลินทรีย์จำนวนทั้งหมด 143 ไอโซเลต นำมาทดสอบฤทธิ์ต้านแบคทีเรียโดยวิธี agar well diffusion โดยใช้เชื้อจุลินทรีย์ทดสอบทั้งหมด 4 ชนิด คือ *S. aureus* ATCC 25923, MRSA SK1, *E. coli* ATCC 25922 และ *P. aeruginosa* ATCC 27853 โดยทำการทดลอง 2 ซ้ำ พบว่ามีเชื้อจุลินทรีย์จำนวน 4 ไอโซเลต มีฤทธิ์ทางชีวภาพในการยับยั้งการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์ชนิดอื่น ได้แก่ ไอโซเลต A B C และ D (รหัสทดสอบตามตารางภาคผนวก ข)(ตารางที่ 4.3) โดยพบว่า

ไอโซเลต A ยับยั้งการเจริญของเชื้อ MRSA SK1 วัดขนาดของเส้นผ่านศูนย์กลางได้ 26 มิลลิเมตร และ 23 มิลลิเมตร ยับยั้งการเจริญของเชื้อ *E. coli* ATCC 25922 วัดขนาดของเส้นผ่านศูนย์กลางได้ 11.50 มิลลิเมตร และ 8.50 มิลลิเมตร

ไอโซเลต B ยับยั้งการเจริญของเชื้อ *S. aureus* ATCC 25923 วัดขนาดของเส้นผ่านศูนย์กลางได้ 11.50 มิลลิเมตร และ 9 มิลลิเมตร และ MRSA SK1 วัดขนาดของเส้นผ่านศูนย์กลางได้ 15.50 มิลลิเมตร และ 16 มิลลิเมตร

ไอโซเลต C ยับยั้งการเจริญของเชื้อ MRSA SK1 วัดขนาดของเส้นผ่านศูนย์กลางได้ 12.50 มิลลิเมตร และ 11.50 มิลลิเมตร

ไอโซเลต D ยับยั้งการเจริญของเชื้อ *S. aureus* ATCC 25923 วัดขนาดของเส้นผ่านศูนย์กลางได้ 14.50 มิลลิเมตร และ 11.50 มิลลิเมตร ยับยั้งการเจริญของเชื้อ *P. aeruginosa* ATCC 27853 วัดขนาดของเส้นผ่านศูนย์กลางได้ 10.50 มิลลิเมตร

ตาราง 4.3 ผลการทดสอบฤทธิ์ต้านแบคทีเรียด้วยวิธี agar well diffusion

สารที่นำมาทดสอบ	เชื้อก่อโรค (มิลลิเมตร)			
	S. aureus ATCC 25923	MRSA SK1	*E. coli* ATCC 25922	*P. aeruginosa* ATCC 27853
A	-	24.50	10.00	-
B	10.25	15.75	-	-
C	-	12.00	-	
D	13.00	-	-	15.50
อาหาร NB	-	-	-	-
vancomycin	17.50	16.50	N/A	N/A
gentamycin	N/A	N/A	30.50	28.00

โดยทำการทดสอบสองซ้ำและรายงานผลเป็นค่าเฉลี่ย

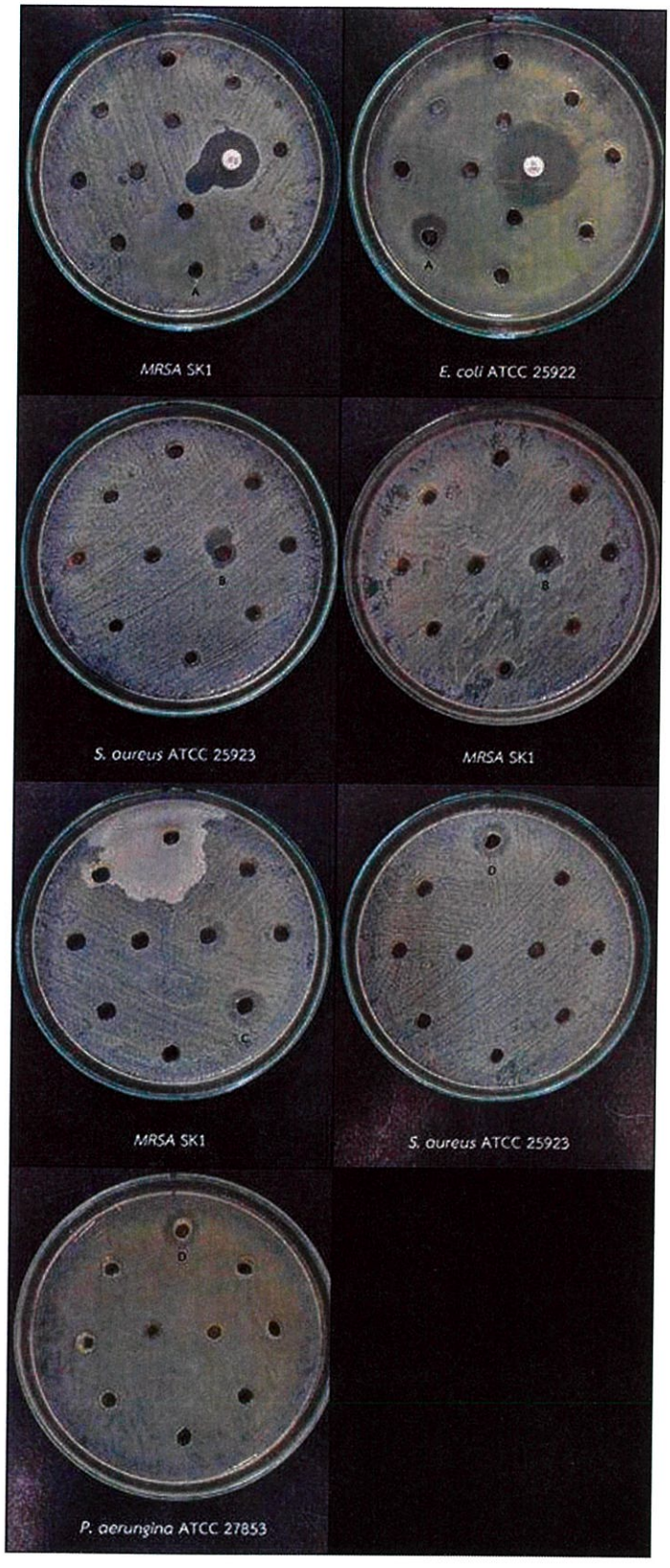
หมายเหตุ - คือ ให้ผลลบ

N/A คือ ไม่ได้ทดสอบ

เนื่องจากวิธี agar well diffusion เป็นวิธีการที่นิยมใช้กันอย่างแพร่หลายในการตรวจสอบฤทธิ์ต้านแบคทีเรีย ซึ่งเป็นการตรวจสอบเชิงคุณภาพสามารถบอกได้ว่าเชื้อมีความไวต่อการทดสอบหรือไม่ แต่ไม่สามารถทราบความเข้มข้นต่ำสุดของยาที่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อ นอกจากนี้ยังไม่เหมาะกับเชื้อที่เจริญช้าและไม่ใช้อากาศในการเจริญ (ประสาทพรและคณะ, 2551) ข้อดีคือ เป็นวิธีการที่ง่าย ต้นทุนต่ำ สามารถทดสอบกับจุลินทรีย์และสารต้านจุลินทรีย์ได้ครั้งละปริมาณมาก และในการทดสอบ สามารถใส่ปริมาณสารที่ทดสอบได้มาก เนื่องจากเรายังไม่ทราบความเข้มข้นที่แน่นอนของสารที่มีฤทธิ์ต้านแบคทีเรีย รวมถึงสามารถสรุปและแปลความหมายได้ง่าย ในทางการแพทย์นิยมใช้เป็นแนวทางในการเลือกวิธีการรักษา (Balouiri. *et al.*, 2016)

การทดสอบการออกฤทธิ์ต้านแบคทีเรีย โดยวิธี agar well diffusion จากรายงานของ Valgas. *et al.* (2007) ได้ใช้น้ำเลี้ยงเชื้อมาทำการทดสอบ เนื่องจากวิธี agar well diffusion นั้นสามารถทำให้น้ำเลี้ยงเชื้อแพร่กระจายได้ดี จากผลการทดสอบ พบว่ามีจำนวน 4 ไอโซเลต ที่มีความสามารถในการยับยั้งเชื้อก่อโรคได้ คือ A B C และD ซึ่งสอดคล้องกับรายงานของ Olaitan. *et al.* (2007) ว่าเมื่อทำการทดลองในหลอดทดลอง น้ำผึ้งมีฤทธิ์ในการต้านจุลินทรีย์ที่ก่อให้เกิดโรคแผลติดเชื้อเช่น MRSA, *S. aureus*, *P. aeruginosa* และ *E. coli*

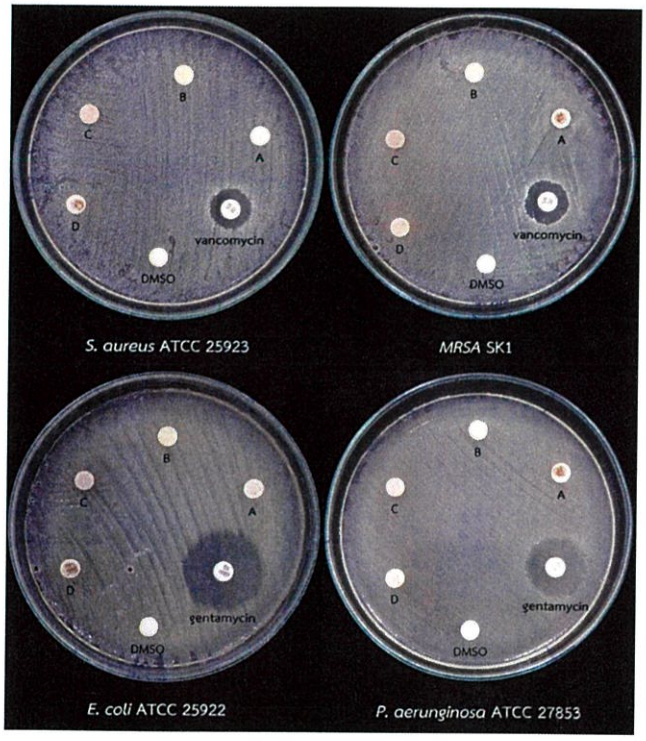
นอกจากนี้ จากกรายงานของ Mandal. *et al.* (2015) ได้ทำการศึกษาถึงคุณสมบัติในการเป็นยาและฤทธิ์ต้านแบคทีเรียของน้ำผึ้ง พบว่า น้ำผึ้งมีประสิทธิภาพในการต่อต้านเชื้อก่อโรคในมนุษย์ เช่น *E. coli*, *Enterobacter aerogenes*, *Salmonella typhimurium*, *S. aureus* และผลการศึกษาในห้องปฏิบัติการ รายงานว่า มีประสิทธิภาพในการยับยั้ง MRSA, β-haemolytic *streptococci* และ Vancomycin-Resistant *Enterococci* (VRE) โดยที่ coagulase negative *staphylococci* มีความไวใกล้เคียงกับ *S. aureus* ซึ่งมีความอ่อนแอกว่า *P. aeruginosa* และ *Enterococcus* sp. นั่นคือ เกิดบริเวณยับยั้งมากกว่า



รูปที่ 4.7 ผลการทดสอบการยับยั้งแบคทีเรียก่อโรคด้วยวิธี agar well diffusion

4.3 ผลการทดสอบฤทธิ์ต้านแบคทีเรียของสารสกัดจากรา ด้วยวิธี agar disk diffusion

จากผลการทดลองข้อ 4.2 จึงทดสอบอย่างละเอียดอีกครั้งโดยนำอาหารเลี้ยงเชื้อของไอโซเลต A B C และ D มาหาสารสกัดหยาบโดยใช้เอทิลอะซิเตตเป็นตัวสกัด และนำมาทดสอบด้วยวิธี agar disk diffusion พบว่าไม่มีความสามารถในการยับยั้งเชื้อก่อโรค ซึ่งจากผลการทดลองดังกล่าวนี้อาจเป็นไปได้ว่าตัวทำละลายที่นำมาใช้ในการสกัดสารที่มีความสามารถในการออกฤทธิ์ต้านแบคทีเรีย ซึ่งก็คือ เอทิลอะซิเตต เป็นตัวทำละลายที่ไม่เหมาะสม ทำให้ไม่สามารถทำละลายสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพออกมาได้ สารออกฤทธิ์ทางชีวภาพจึงยังคงอยู่ในชั้นของน้ำเลี้ยงเชื้อ ดังนั้น ควรเลือกใช้สารสกัดให้มีหลากชนิดมากขึ้น เพื่อที่จะแยกสารออกจากของผสมให้ได้มากที่สุด



รูปที่ 4.8 ผลการทดสอบฤทธิ์ต้านแบคทีเรียของสารสกัดจากรา ด้วยวิธี agar disk diffusion

ตาราง 4.4 ผลการทดสอบฤทธิ์ต้านแบคทีเรียของสารสกัดจากรา ด้วยวิธี agar disk diffusion

สารที่นำมาทดสอบ	เชื้อก่อโรค (มิลลิเมตร)			
	S. aureus ATCC 25923	MRSA SK1	*E. coli* ATCC 25922	*P. aeruginosa* ATCC 27853
A	-	-	-	-
B	-	-	-	-
C	-	-	-	-
D	-	-	-	-
อาหาร NB	-	-	-	-
vancomycin	15.75	14.25	N/A	N/A
gentamycin	N/A	N/A	23.25	28.00

โดยทำการทดสอบสองซ้ำและรายงานผลเป็นค่าเฉลี่ย

หมายเหตุ - คือ ให้ผลลบ

N/A คือ ไม่ได้ทำการทดสอบ

จากการทดสอบฤทธิ์ต้านแบคทีเรียของสารสกัดจากรา ด้วยวิธี agar disk diffusion โดยใช้วิธี liquid-liquid extraction และใช้เอทิลอะซิเตตเป็นตัวทำละลาย พบว่าสารสกัดที่ได้ ไม่มีฤทธิ์ในการต้านแบคทีเรีย เนื่องจากเอทิลอะซิเตต เหมาะสำหรับสารที่มีขั้วปานกลางและมีออกซิเจนเป็นองค์ประกอบ อาจเป็นไปได้ว่า สารที่มีฤทธิ์ต้านแบคทีเรีย มีคุณสมบัติแตกต่างจากเอทิลอะซิเตต ทำให้ไม่สามารถละลายมาในเอทิลอะซิเตตได้ ดังนั้น ในอนาคตอาจทำการศึกษาโดยการเปลี่ยนไปใช้ตัวทำละลายชนิดอื่น ๆ เช่น อะซีโตน เอทานอล บิวทานอล และกรดอะซิติก ซึ่งมีขั้วมากกว่าเอทิลอะซิเตต (Acton, 2013)

ความคลาดเคลื่อนของการทดสอบ อาจเกิดจากสารที่รบกวนการออกฤทธิ์หรือการดูดซึมของยาหรือส่งเสริมการเจริญของเชื้อ สิ่งเหล่านี้อาจทำให้บริเวณใสที่เกิดการยับยั้งมีขนาดเล็กลง ในทางกลับกัน ปัจจัยที่ส่งเสริมการออกฤทธิ์หรือการดูดซึมของยา รวมถึงรบกวนการเจริญของเชื้อ จะส่งผลให้บริเวณใสที่ขนาดกว้างขึ้น ปัจจัยต่าง ๆ เช่น

1. ยาปฏิชีวนะที่ใช้ทดสอบ ความเข้มข้นของยา คุณลักษณะของยา เช่น น้ำหนักโมเลกุล ความสามารถในการซึมผ่านอาหารเลี้ยงเชื้อ

2. ความหนาของ agar medium ทั่วไปแล้ว จะกำหนดประมาณ 4 มิลลิเมตร โดยการเทอาหารเลี้ยงเชื้อปริมาตร 25 และ 60 มิลลิลิตรในจานเพาะเชื้อขนาด 9 และ 15 เซนติเมตร

3. ระยะเวลาการวาง disk ควรทำหลังเชื้อก่อโรคที่เพาะไว้บนวุ้นแห้งแล้ว ประมาณ 3-5 นาที เพื่อป้องกันการละลายของยาเข้าไปในพื้นที่เปียกและไม่ควรเกิน 15 นาที

4. อุณหภูมิและเวลาการบ่มเพาะ อาจส่งผลกระทบต่อการเจริญและการซึมของยา เพราะฉะนั้น หลังการทดสอบแล้วควรเข้าตู้บ่มทันที โดยใช้อุณหภูมิ 35-37 องศาเซลเซียส ประมาณ 16-18 ชั่วโมง

นอกจากนี้ สิ่งที่อาจส่งผลกระทบต่อการแปรผลคือการวัดขนาดบริเวณใสที่เกิดขึ้น โดยทั่วไปจะทำการวัดในหน่วยมิลลิเมตร ในบางกรณี เช่น เกิดความไม่ชัดเจนของบริเวณใส กล่าวคือขอบมีเชื้อขึ้นประปราย อาจเกิดจากการออกฤทธิ์ของตัวยาเองหรือเอนไซม์จากเชื้อทำให้ตัวยาเสื่อมลง เกิดการยับยั้งไม่หมด ส่งผลให้ขอบใสไม่เรียบ (มาลิน, 2535)

4.4 การจัดจำแนกจุลินทรีย์ที่มีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ก่อโรค

จากการทดสอบความสามารถในการยับยั้งเชื้อก่อโรค พบว่า มีเชื้อ 4 ไอโซเลต ที่ทำให้เกิดบริเวณยับยั้ง และเมื่อนำมาจัดจำแนกโดยใช้ลักษณะทางสัณฐานวิทยา สามารถแบ่งออกเป็น 2 กลุ่ม

ได้แก่ กลุ่มที่ 1 คือ มีความคล้ายคลึงกับ *Aureobasidium pullulans* และกลุ่มที่ 2 คือกลุ่มที่ยังไม่สามารถจัดจำแนกได้

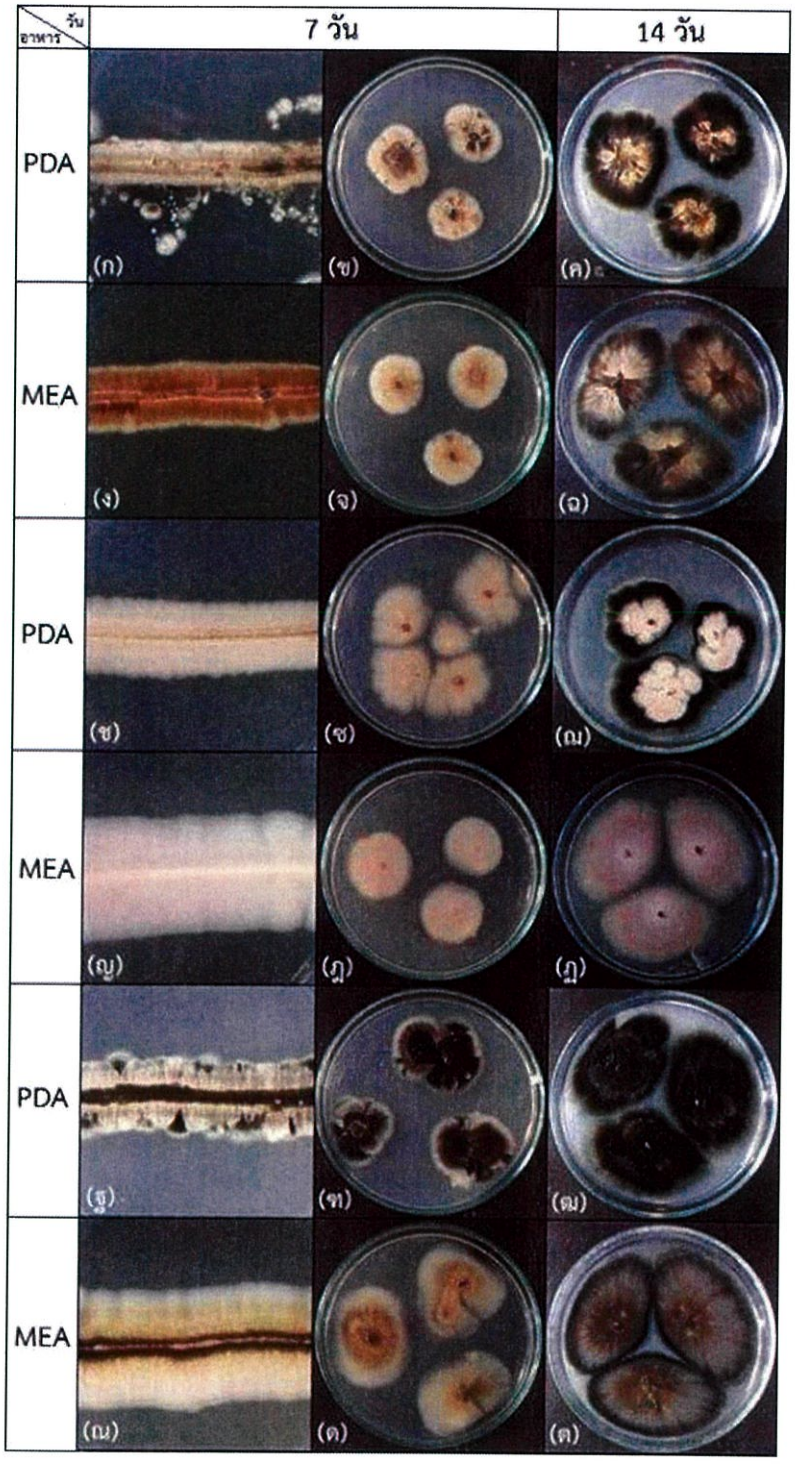
4.4.1 กลุ่มที่มีลักษณะคล้ายคลึงกับ *Aureobasidium pullulans*

ได้แก่ A C และ D (รูปที่ 4.9) โดยลักษณะสีที่บรรยายเป็นรหัสจากแผ่นเทียบสีของ The Online Auction Color Chart (OAC)

เมื่อเลี้ยงเชื้อบนอาหาร PDA และ MEA แล้วนำไปบ่มไว้ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส ในที่มืด เป็นเวลา 7 วัน พบว่า แต่ละไอโซเลตมีลักษณะที่แตกต่างกันอย่างเห็นได้ชัด โดยไอโซเลต A มีขนาดโคโลนีประมาณ 13.50 มิลลิเมตร ลักษณะโคโลนีด้านในมีสีเหลืองอ่อน (807- 809) ส่วนรอบมีสีเขียวเข้ม (815 - 816) ส่วนบนอาหาร MEA โคโลนีมีขนาดประมาณ 17.30 มิลลิเมตร ลักษณะโคโลนีด้านในมีสีไข่ไก่ (757 - 759) ล้อบรอบด้วยสีน้ำตาล (775 - 778) และเมื่อเวลาผ่านไป 14 วัน พบว่าลักษณะโคโลนีบนอาหาร PDA มีลักษณะสีชมพูอ่อน (633 - 634) แกมสีดำ (866 - 869) และโคโลนีบนอาหาร MEA มีลักษณะสีชมพูอมน้ำตาล (716 - 718) แกมสีเทา (905 - 907)

ไอโซเลต C มีขนาดโคโลนีประมาณ 22.10 มิลลิเมตร ลักษณะโคโลนีด้านในมีสีไข่ไก่ (681 - 683) แซมด้วย (749 - 751) ล้อมรอบด้วยสีไข่ไก่ (674 -676) ขอบ สีเขียวเทา (868 - 870) และเมื่อเลี้ยงบนอาหาร MEA โคโลนีมีขนาดประมาณ 28.40 มิลลิเมตร ลักษณะโคโลนีด้านในมีสีไข่อมชมพู (681 - 683) ล้อมรอบด้วยสีไข่ไก่ (674 - 676) และเมื่อเลี้ยงต่อไปเป็นเวลา 14 วัน พบว่าโคโลนีบนอาหาร PDA มีลักษณะสีน้ำตาลอ่อน (778-781) แกมสีน้ำตาลเข้ม (733-736) และโคโลนีบนอาหาร MEA มีลักษณะสีน้ำตาลอ่อน (778-781) แกมสีน้ำตาลเข้ม (734-738)

ส่วนไอโซเลต D มีขนาดโคโลนีประมาณ 22 มิลลิเมตร ลักษณะโคโลนีด้านในมีสีเทา (901 - 903) ล้อมรอบด้วยสีเขียว (866 - 869) แซมสีเหลืองอ่อน (877 - 879) และเมื่อเลี้ยงบนอาหาร MEA โคโลนีมีขนาดประมาณ 33.20 มิลลิเมตร ลักษณะโคโลนีด้านในมีสีน้ำตาล (831 - 833) ล้อมรอบด้วยสีไข่ไก่ (807 - 809) และเมื่อเลี้ยงต่อไปเป็นเวลา 14 วัน พบว่าโคโลนีบนอาหาร PDA มีสีดำ (908) แกมสีเขียวแก่ (866 - 869) และโคโลนีบนอาหาร MEA มีลักษณะสีน้ำตาลอ่อน (716 -718) แกมสีเทา (905 - 907)



รูปที่ 4.9 ลักษณะโคโลนีบนอาหารแข็ง PDA และ MEA

ลักษณะโคโลนีบนอาหาร PDA และ MEA

(ก) - (ฉ) คือ ไอโซเลต A โดยที่ (ก) (ข) และ (ง) (จ) คือการเจริญของเชื้อเมื่อเวลาผ่านไป 7 วัน บนอาหาร PDA และ MEA ตามลำดับ ส่วน (ค) และ (ฉ) คือการเจริญของเชื้อเมื่อเวลาผ่านไป 14 วัน บนอาหาร PDA และ MEA ตามลำดับ

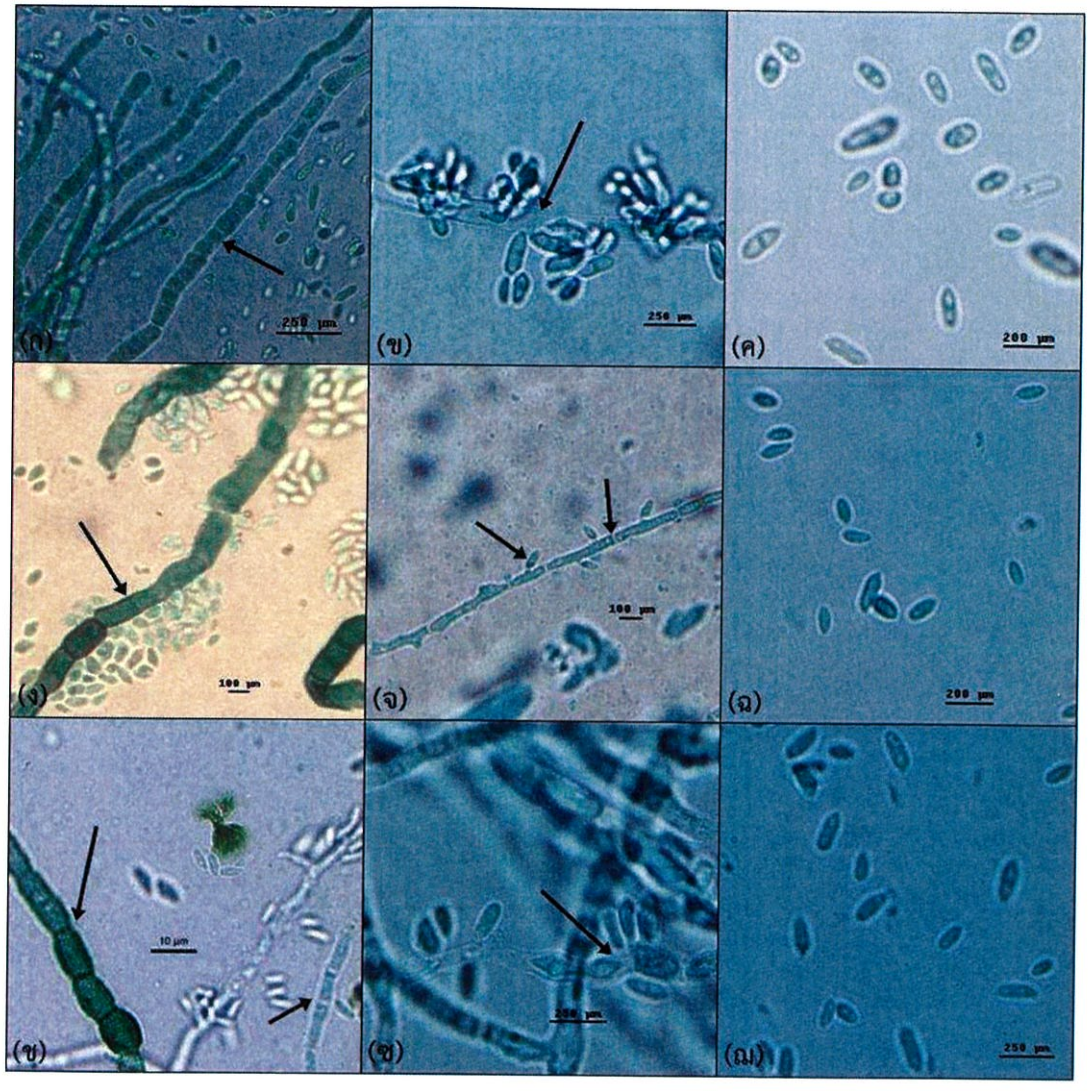
(ช) - (ฏ) คือ ไอโซเลต C โดยที่ (ช) (ซ) และ (ญ) (ฎ) คือการเจริญของเชื้อเมื่อเวลาผ่านไป 7 วัน บนอาหาร PDA และ MEA ตามลำดับ ส่วน (ฌ) และ (ฏ) คือการเจริญของเชื้อเมื่อเวลาผ่านไป 14 วัน บนอาหาร PDA และ MEA ตามลำดับ

(ฐ) - (ต) คือ ไอโซเลต D โดยที่ (ฐ) (ฑ) และ (ณ) (ด) คือการเจริญของเชื้อเมื่อเวลาผ่านไป 7 วัน บนอาหาร PDA และ MEA ตามลำดับ ส่วน (ฒ) และ (ต) คือการเจริญของเชื้อเมื่อเวลาผ่านไป 14 วัน บนอาหาร PDA และ MEA ตามลำดับ

ลักษณะการเจริญของเชื้อทั้ง 3 ไอโซเลต มีความใกล้เคียงกัน โดยเส้นใยแนบไปกับโคโลนี รูปร่างไม่แน่นอน (irregular) การยกตัวมีลักษณะรูปกลมและนูน โค้งสูงจากผิวหน้าของอาหารไม่มาก (convex) ลักษณะขอบเป็นคลื่น โค้งหรือเว้าเพียงเล็กน้อย (undulate) หรือเป็นคลื่นที่เว้าแหว่งมาก (lobate)

เมื่อทำการศึกษาภายใต้กล้องจุลทรรศน์ที่กำลังขยายต่างๆ พบว่า เชื้อทั้ง 2 ไอโซลต ได้แก่ A และ C มีความใกล้เคียงกัน โดยเส้นใยมีลักษณะเป็นเส้นยาว มีผนังกั้น สีเขียวเข้ม ผนังบางและไม่แตกแขนง แต่ส่วนของสปอร์ พบว่ามีลักษณะแตกต่างกันเล็กน้อย โดยที่ไอโซเลต A สปอร์เป็นรูปวงรีหรือรูปไข่ เกาะกลุ่มกันอยู่บริเวณรอบเส้นใย ไอโซเลต C สปอร์มีลักษณะรูปไข่หรือรูปวงรีเช่นกันแต่จะมีตำแหน่ง terminal และ subterminal

ส่วนไอโซเลต D จะมีลักษณะที่แตกต่างออกไป โดยจะมีเส้นใย 2 แบบ คือสีเขียวเข้มมีลักษณะเรียบหรือหยาบเล็กน้อย แตกกิ่งสั้น ๆ เส้นใยแตกแขนงและมีผนังกั้นเป็นปล้องชัดเจน การจัดเรียงตัวมีลักษณะของเซลล์ที่แตกต่างกัน ทั้งรูปร่างที่เป็นสี่เหลี่ยมค่อนข้างกลม และเส้นใยไม่มีสี มีผนังกั้น ส่วนของสปอร์ พบว่ามีลักษณะวงรีหรือเรียวยาว เกิดตรงตำแหน่ง subterminal



รูปที่ 4.10 ลักษณะภายใต้กล้องจุลทรรศน์

โดย (ก) (ง) และ (ช) แสดงลักษณะของ melanized hyphae ของ A C และ D ตามลำดับ (ข) (จ) และ (ซ) แสดงลักษณะผนังกั้นเส้นใยและตำแหน่งการงอกของสปอร์ ของ A C และ D ตามลำดับ ส่วน (ค) (ฉ) และ (ฌ) แสดงลักษณะสปอร์ของ A C และ D

จากการศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเชื้อที่มีความสามารถในการต้านเชื้อจุลินทรีย์ก่อโรค พบว่ามี 3 ไอโซเลต ได้แก่ A C และ D มีลักษณะคล้ายคลึงกับ *Aureobasidium pullulans* ทั้งในเรื่องของแหล่งที่มา ซึ่งสอดคล้องกับรายงานของ Lin. *et al.* (2001) ว่าสามารถพบได้ในเกสรดอกไม้ น้ำผึ้ง อาหารที่มีน้ำตาลสูง และจากรายงานของ Singh. *et al.* (2012) ยังสามารแยกเชื้อได้จากดอกไม้และใบไม้อีกด้วย เช่นเดียวกันกับรายงานของ Gostincar. *et al.* (2014) ได้กล่าวไว้ว่า *A. pullalans* สามารถมีชีวิตอยู่ได้แม้ในสภาวะที่ไม่เหมาะสม เช่น สภาวะที่มีความเค็ม มีความเป็นกรดด่างสูง อุณหภูมิต่ำ หรือแหล่งที่มีสารอาหารน้อย เนื่องจากมีความสามารถในการปรับตัวในสภาวะต่างๆได้ดี เพราะมีการปรับตัวในส่วนของชั้นไขมัน นอกจากนี้ ยังมีการป้องกันตัวเองด้วยการเปลี่ยนจากเซลล์ขนาดเล็ก ไม่มีสี เป็นเซลล์ที่มีสีเข้มและมีผนังแข็งแรง สอดคล้องกับรายงานของ

กิตติพันธุ์ (2007) ได้มีการรายงานว่ามีพบเชื้อรากลุ่ม *A. pullalans* ในน้ำทะเลและน้ำเค็มในนาเกลือ รวมถึงในถิ่นทุรกันดารสูง เช่น ทวีปแอนตาร์กติกา จึงน่าจะเป็นเชื้อในกลุ่มที่มีความทนทานต่อสภาพแวดล้อมที่ไม่เหมาะสมมากกว่าการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์อื่นๆโดยทั่วไป

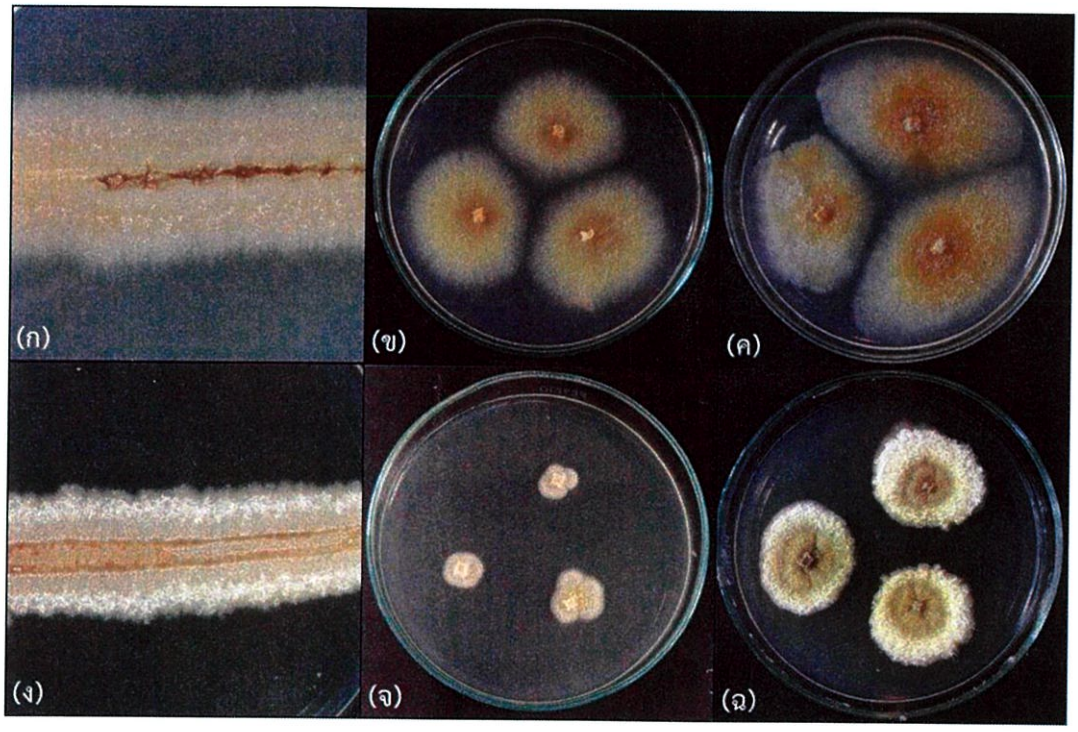
ตามรายงานของ Kazemi. *et al.* (2005) กล่าวว่า *A. pullalans* จัดอยู่ในกลุ่ม dematiaceous (Black molds) เนื่องจากมีสีดำ มีการสร้างเม็ดสีเมลานินสะสมอยู่ในผนังเซลล์ สอดคล้องกับรายงานของ Zalar. *et al.* (2014) ที่ได้กล่าวถึงลักษณะทางสัณฐานวิทยาที่โดดเด่นของ *Aureobasidium* คือการสร้างเม็ดสี ตัวอย่าง เช่น กลุ่ม *A. pullulans* var. *pullulans* และ *A. pullulans* var. *subglaciale* จัดอยู่ใน *Dematoidium nigrescens* เมื่อเวลาผ่านไป 7 วัน โคโลนีมีสีออกชมพู และจะเปลี่ยนเป็นสีเข้มขึ้นเมื่อเวลาผ่านไป 21 วัน ยกเว้นบางตัวที่มีสีเข้มเมื่อเวลาผ่านไป 7 วัน เกิดจากการสร้างเม็ดสีของเส้นใยส่วน *A. pullulans* var. *melanogenum* เมื่อเวลาผ่านไป 7 วัน จะมีการสร้างสีเขียวหรือสีดำ จากการสร้างเม็ดสีของเส้นใยหรือสปอร์ นอกจากนี้อาหารเลี้ยงเชื้อยังมีส่วนที่ทำให้เกิดความแตกต่างของลักษณะโคโลนีเช่นกัน ลักษณะเด่นของโคโลนี *A. pullalans* บนอาหารเลี้ยงเชื้อ ได้แก่ มีผิวหน้าเรียบ ขอบหยัก เป็นเมือก เนื่องจากการสร้างสปอร์ หรือ extracellular polysaccharide (EPS) ซึ่งเป็นโครงสร้างที่ช่วยในการปกป้องเซลล์มีสีดำ สีน้ำตาลมะกอก หรือในบางครั้งอาจมีสีชมพู โดยส่วนมากแล้วจะไม่มีเส้นใยอากาศ

และเมื่อพิจาณาถึงฤทธิ์ทางชีวภาพของ *A. pullulans* จากการศึกษาของ Singh. *et al.* (2012) พบว่า มีความสามารถในการยับยั้ง *E. coli* และ *P. aeruginosa* สอดคล้องกับรายงานของ Dominguez. *et al.* (2012) พบว่า *A. pullulans* มีความสามารถในการผลิตสารฟรุคโตโอลิโกแซคคาไรด์ เป็นสารประกอบโอลิโกแซคคาไรด์ชนิดหนึ่งที่ประกอบด้วยน้ำตาลฟรุกโตสเชื่อมต่อกันเป็นสายสั้น ๆ ช่วยทำให้จุลินทรีย์ชนิดดีสามารถเจริญเติบโตได้ดี ในขณะที่จุลินทรีย์ที่ก่อโรคทนต่อสภาวะเช่นนี้ไม่ได้ทำให้ลดปริมาณลงอย่างมาก สามารถควบคุมน้ำหนัก ให้พลังงานต่ำ ช่วยควบคุมระดับน้ำตาล และไขมันในเลือดได้ ดังนั้นอุตสาหกรรมอาหารจึงได้มีการนำฟรุกโตโอลิโกแซคคาไรด์ เติมลงในผลิตภัณฑ์อาหารหลาย ๆ ชนิด เนื่องจากสามารถละลายน้ำได้ดี รวมถึงทำการศึกษาของชนัญฑิตา (2557) พบว่ามีคุณสมบัติที่สำคัญหลายประการ ได้แก่เป็นสารทดแทนน้ำตาล แต่ไม่ทำให้น้ำตาลในเลือดเพิ่มขึ้น

การจัดจำแนกเชื้อราในกลุ่มที่มีลักษณะคล้ายคลึงกับ *A. pullulans* โดยอาศัยลักษณะทางสัณฐานวิทยา ทำให้ได้ข้อมูลที่ค่อนข้างแม่นยำและสามารถเชื่อถือได้ในเบื้องต้น เพื่อเป็นแนวทางในการศึกษาต่อไปในอนาคต เนื่องจาก *A. pullulans* มีลักษณะที่โดดเด่นกว่าเชื้อราสายพันธุ์อื่นๆ เช่น สามารถเจริญเติบโตได้ในสภาวะที่ไม่เหมาะสม ลักษณะโคโลนีคล้ายยีสต์ มีผิวหน้าเรียบขอบหยัก เป็นเมือก เนื่องจากการสร้างสปอร์ มีสีดำ สีน้ำตาลมะกอก หรือในบางครั้งอาจมีสีชมพู โดยส่วนมากแล้วจะไม่มีเส้นใยอากาศ รวมถึงความสามารถในการยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย และเพื่อให้ได้ข้อมูลที่มีความถูกต้องและสามารถระบุได้ถึงในระดับสปีชีส์ จะต้องใช้อาศัยการจัดจำแนกโดยเทคนิคทางชีวโมเลกุล (molecular identification)

4.4.2 กลุ่มที่ยังไม่สามารถจัดจำแนกได้

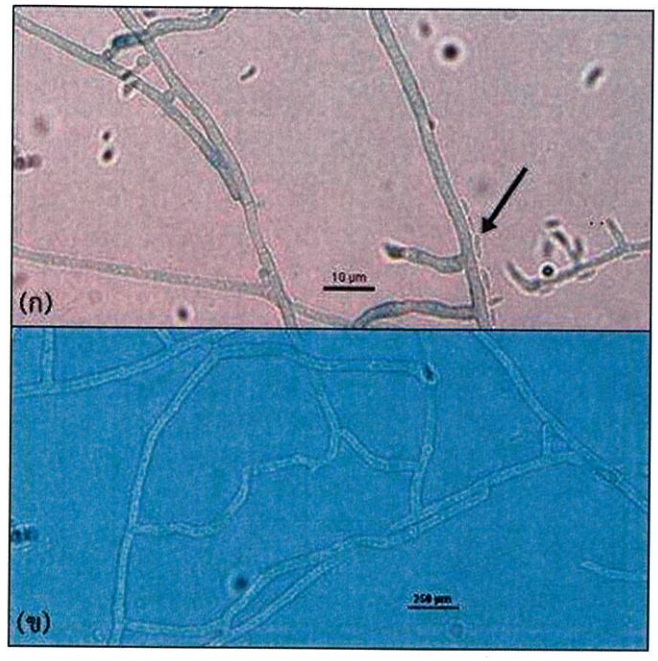
ได้แก่ ไอโซเลต B เมื่อเลี้ยงเชื้อบนอาหาร PDA และ MEA แล้วนำไปบ่มไว้ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส ในที่มืด (รูปที่ 4.11) พบว่า เมื่อเลี้ยงบนอาหาร PDA เป็นเวลา 7 วัน เชื้อมีขนาดโคโลนีประมาณ 31 มิลลิเมตร ลักษณะโคโลนีด้านในมีสีเหลืองอ่อน (898 - 900) ล้อมรอบด้วยสีแดงอิฐ และเมื่อเลี้ยงบนอาหาร MEA โคโลนีมีขนาดประมาณ 22 มิลลิเมตร ลักษณะโคโลนีด้านในมีสีน้ำตาล (707 - 709) ล้อมรอบด้วยสีเหลือง (860 - 869) และเมื่อเลี้ยงต่อไปเป็นเวลา 14 วัน พบว่าโคโลนีบนอาหาร PDA มีลักษณะสีเขียวอมเหลือง (852 - 856) แกมสีเหลืองอ่อน (898 - 900) และโคโลนีบนอาหาร MEA มีลักษณะสีเขียวอ่อน (894 - 900) แกมสีเขียวแก่ (880 - 884)



รูปที่ 4.11 ลักษณะโคโลนีบนอาหารแข็ง

ภาพของไอโซเลต B โดยที่ (ก) (ข) (ง) และ(จ) คือการเจริญของเชื้อเมื่อเวลาผ่านไป 7 วัน บนอาหาร PDA และ MEA ตามลำดับ ส่วน (ค) และ (ฉ) คือการเจริญของเชื้อเมื่อเวลาผ่านไป 14 วัน บนอาหาร PDA และ MEA ตามลำดับ

เส้นใยมีลักษณะฟูขึ้นมาเหนืออาหารเล็กน้อย (filamentous) การยกตัวมีลักษณะรูปกลมและนูน โค้งสูงจากผิวหน้าของอาหารไม่มากนัก (convex) ลักษณะขอบเป็นเส้น ๆ แบบเส้นใยของรา (filamentous)



รูปที่ 4.12 ลักษณะภายใต้กล้องจุลทรรศน์

โดย (ก) แสดงลักษณะการแตกกิ่งของเส้นใย และ (ข) แสดงลักษณะสปอร์

เมื่อทำการศึกษาภายใต้กล้องจุลทรรศน์ที่กำลังขยายต่างๆ พบว่าเส้นใยมีลักษณะมีเป็นเส้นเล็กยาว แตกแขนง ลักษณะ T shape และ Y shape เส้นใยมีผนังกั้น ส่วนของสปอร์ พบว่ามีลักษณะยาวรี มีบางส่วนเกาะอยู่รอบเส้นใยเชื้อรา

และเมื่อพิจารณาถึงฤทธิ์ต้านแบคทีเรีย พบว่าเชื้อมีความสามารถในการยับยั้งแบคทีเรีย *S. aureus* ATCC 25923 และ MRSA SK1

จากการศึกษาและจัดจำแนกโดยวิธีการทางสัณฐานวิทยา พบว่า ยังไม่สามารถทำการจัดจำแนกได้ เนื่องจากข้อมูลไม่เพียงพอ ดังนั้น เพื่อการจัดจำแนกได้ถูกต้องควรทำการศึกษาต่อโดยใช้เทคนิคทางชีวโมเลกุล ซึ่งทำได้โดยการสกัดดีเอ็นออกจากเชื้อและเพิ่มปริมาณชิ้นส่วนยีนด้วยเทคนิคปฏิกิริยาลูกโซ่โพลิเมอเรส (Polymerase Chain Reaction) จากนั้นหาลำดับเบสของยีนแล้วนำไปตรวจวิเคราะห์เปรียบเทียบกับฐานข้อมูลทางชีวภาพโดยใช้โปรแกรม BLAST โดยสามารถแยกเชื้อจุลินทรีย์ที่ยังไม่สามารถจัดจำแนกได้โดยดูจากลำดับเบสที่เหมือนที่สุด (Bednarski, 2006)

บทที่ 5

สรุปผลการวิจัยและข้อเสนอแนะ

5.1 สรุปผลการวิจัย

จากการศึกษาการคัดแยกเชื้อจุลินทรีย์และศึกษาความสามารถในการออกฤทธิ์ต้านแบคทีเรีย สามารถแยกเชื้อออกมาได้ 143 ไอโซเลต จากตัวอย่างรังผึ้ง 15 ตัวอย่าง โดยใช้อาหาร 2 ชนิด ได้แก่ PDA และ MY30G โดยแยกได้จากตัวอย่างตัวอ่อนของผึ้ง 17 ไอโซเลต แบ่งเป็นเชื้อยีสต์ 8 ไอโซเลต เชื้อรา 9 ไอโซเลต และจากตัวอย่างน้ำผึ้ง 129 ไอโซเลต แบ่งเป็นเชื้อยีสต์ 54 ไอโซเลตและเชื้อรา 75 ไอโซเลต

การทดสอบกิจกรรมการต้านเชื้อแบคทีเรียก่อโรค โดยใช้เชื้อแบคทีเรีย 4 ชนิด ได้แก่ *S. aureus* ATCC 25923, MRSA SK1, *E. coli* ATCC 25922 และ *P. aeruginosa* ATCC 27853 โดยใช้วิธี agar well diffusion พบว่ามี 4 ไอโซเลต ที่มีความสามารถในการยับยั้งแบคทีเรียก่อโรค และเมื่อทำการทดสอบแบบละเอียดด้วยวิธี agar disk diffusion สารสกัดหยาบจากเชื้อทั้ง 4 ไอโซเลต ไม่มีฤทธิ์ต้านแบคทีเรียและเมื่อทำการจัดจำแนกเชื้อโดยใช้ลักษณะทางสัณฐานวิทยา พบว่าสามารถแบ่งได้สองกลุ่ม คือ กลุ่มที่มีลักษณะคล้ายกับ *Aureobasidium pullulans* และอีกกลุ่มยังไม่สามารถจัดจำแนกได้ เนื่องจากข้อมูลไม่เพียงพอ จึงควรทำการศึกษาโดยใช้เทคนิคทางชีวโมเลกุลต่อไป

5.2 ข้อเสนอแนะ

1. ตัวอย่างน้ำผึ้งที่นำมาใช้ควรอยู่ในสภาพที่สมบูรณ์และมีการเก็บรักษาตัวอย่างที่ถูกต้อง

2. ตัวทำละลายที่นำมาใช้ควรมีมากกว่า 1 ชนิดและมีความเป็นขั้วสูงกว่าเอทิลอะซิเตต เพื่อให้ครอบคลุมต่อสารที่มีความสามารถในการออกฤทธิ์ทางชีวภาพและละลายสารออกมาได้

3. อาศัยเทคนิคทางโมเลกุลมาช่วยในการจัดจำแนกเพื่อให้ได้ข้อมูลที่ถูกต้องและมีความน่าเชื่อถือมากยิ่งขึ้น

4. นำเชื้อกลุ่มนี้ไปทดสอบฤทธิ์ต้านแบคทีเรียตัวอื่นหรือฤทธิ์ทางชีวภาพอื่นๆ เช่น เชื้อยีสต์หรือเชื้อราก่อโรคในคนหรือเชื้อก่อโรคในพืช

5. สภาวะในการเลี้ยงเชื้อรามีความหลากหลาย เช่น อาหารเลี้ยงเชื้อ อุณหภูมิ การถ่ายเทอากาศ ความเป็นกรดด่าง ความชื้น เป็นต้น เพื่อศึกษาสภาวะที่เหมาะสมที่สุดในการผลิตสารทุติยภูมิของเชื้อรา

6. ใช้วิธีการอื่นนอกจากการสกัดด้วยตัวทำละลายในการสกัดสาร เช่น การสกัดด้วยไอน้ำ ซึ่งใช้หลักการให้ไอน้ำเป็นตัวพาสารที่ต้องการออกมา

อ้างอิง

กิตติพันธุ์ เสมอพิทักษ์. 2549. **แบล็คยีสต์และกลุ่มเชื้อราใกล้เคียง : ลักษณะทั่วไปและความสำคัญทางการแพทย์**. [Online]. Availble : *http://www.smj.ejnal.com/ejournal/*showdetail/?show_detail=T&art_id=1268.

กลุ่มส่งเสริมการเลี้ยงผึ้งและแมลงเศรษฐกิจ. (2555). ผึ้งและผลิตภัณฑ์จากผึ้ง. *เกษตรก้าวหน้า*. 25(1) : 12-18.

จิระพันธ์ กรึงไกร. 2554. **เอนไซม์**. [Slide]. กรุงเทพฯ : จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.

จุรีรัตน์ ลีสมิทธิ์. 2548. **ปฏิบัติการจุลชีววิทยา**. กรุงเทพฯ : สำนักพิมพ์มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

ชนัญฑิตา ไชยโต และครรชิต จุดประสงค์. 2557. "ฟรุกโตโอลิโกแซคคาไรด์ในอาหารและผลิตภัณฑ์อาหารที่จำหน่ายในประเทศไทย." *วารสารวิจัย มข.* 19(3) : 430-440.

ธิษณา จรรยาชัยเลิศ. (2555). ผึ้งขจัดรังแค ต้านแผลในกระเพาะ. *ชีวจิต*. 15(353) : 41.

พิชญาดา เจริญจิต. (2555). น้ำผึ้ง น้ำหวานที่มากคุณค่า เพื่อสุขภาพ. *เทคโนโลยีชาวบ้าน*. 24(256) : 96-97.

ดุษณี ธนะบริพัฒน์. 2555. **จุลชีววิทยาอุตสาหกรรม.** กรุงเทพฯ : หจก. วี.เจ. พริ้นติ้ง.

นงลักษณ์ สุวรรณพินิจ และปรีชา สุวรรณพินิจ. 2550. **จุลชีววิทยาทั่วไป.** พิมพ์ครั้งที่ 2. กรุงเทพฯ : โรงพิมพ์แห่งจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.

ประภาวดี ติษยาธิคม. 2559. **โรคอาหารเป็นพิษสาเหตุจากเชื้อ *Staphylococcus aureus* .** [Online]. Available : http://webdb.dmsc.moph.go.th/ifc_nih/a_nih_1_001c.asp?info_id=210.

ประสาทพร บริสุทธิ์เพ็ชร, พิทัย กาญบุตร และสาธร พรตระกูลพิพัฒน์. 2551. **"การทดสอบฤทธิ์ต้านเชื้อของสมุนไพรในห้องปฏิบัติการ." หน้า 91-101. ใน การประชุมวิชาการสัตวแพทย์ มข. ครั้งที่ 9 "สัตวแพทย์ทางเลือกวันนี้"**. ขอนแก่น : มหาวิทยาลัยขอนแก่น.

พิมลพรรณ พิทยานุกูล. 2556. **ผิวสวยและสุขภาพแข็งแรงด้วยวิตามิ.** [Online]. Availble : http://www.pharmacy.mahidol.ac.th/th/knowledge/article/167/.

มณฑา วีระวัฒนาการ. 2556. "ปฏิกิริยาเคมีระหว่างโปรตีนและพอลีฟีนอลและผลต่อระบบชีวภาพของปฏิกิริยา." *วารสารวิทยาศาสตร์บูรพา*. 18(2556) : 210-218.

มาลิน จุลศิริ. 2532. **ยาต้านจุลชีพ : ความรู้พื้นฐานและการประยุกต์**. พิมพ์ครั้งที่ 2. กรุงเทพฯ : โรงพิมพ์สถาบันพัฒนาการสาธารณสุขอาเซียน.

ยศยา ทุวิสุทธิ์, อรรณพ ทัศนอุดม, ลัดดา วัฒนศิริธรรม, มรณี ดุ้ยเต็มวงศ์ และวราภา มหากาญจนกุล. 2559. "การต้านทานกรดเบนโซอิกและกรดซอร์บิกของ *Aspergillus flavus* ในน้ำพริกตาแดง." *KKU Science Juornal*. 44(1) : 111-123.

วีระพันธ์ ตันติพงษ์. 2527. **น้ำผึ้ง**. [Online]. Availble : https://www.doctor.or.th/article/detail/6191

วรรณพร ศรีสุคนธรัตน์. 2558. **สารต้านเชื้อจุลินทรีย์ที่ใช้ในบ้านเรือนหรือทางสาธารณสุข**. กระทรวงสาธารณสุขสมบูรณ์

ธนาศุภวัฒน์. 2539. **เทคนิคการเก็บรักษาจุลินทรีย์**. พิมพ์ครั้งที่ 1. กรุงเทพฯ : โรงพิมพ์จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.

ธีรยุทธ วิไลวัลย์ และคณะ. 2551. **การสกัดด้วยตัวทำละลาย.** [Online]. Availble : http://www.chemistry.sc.chula.ac.th/.../2302275/chapter8.pdf.

สุภาภรณ์ ปิติพร. 2555. น้ำผึ้ง เพื่อสุขภาพและความงาม. *หมอชาวบ้าน*. 30(360) : 18-22.

สุวิสา พิลาล้ำ. 2550. ความสามารถในการระงับการเจริญของ *Escherichia coli* และเอนไซม์แอลฟากลูโคไซเดสจากน้ำผึ้ง. *วารสารวิทยาศาสตร์*. 61(1) : 74-80.

เสาวนิตย์ ชอบบุญ. 2550. **การจำแนกราเส้นใยที่พบในอาหารและอากาศ**. กรุงเทพฯ : หจก.ภาพพิมพ์.

หน่วยปฏิบัติการวิจัยโรคอุบัติใหม่และอุบัติซ้ำในสัตว์. 2016. **การติดเชื้อสแตฟฟิโลคอกคัสออเรียส ที่ดื้อยาเมธิซิลิน (Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* , MRSA).** [Online]. Available : http://www.eidas.vet.chula.ac.th/th/diseases/people/bacteria/378

อรอนงค์ พริ้งศุลกะ. 2555. **จุลชีววิทยาทางการแพทย์: แบคทีเรียก่อโรค**. กรุงเทพฯ : จรัลสนิทวงศ์การพิมพ์ จำกัด.

Acton, Q.A. 2013. **Benzene Derivatives-Advances in Research and Application**. Georgia. ScholarlyEditions.

Alam, F. Islam, A. Gan, S.H. and Khalil, I. 2014. "Honey: A Potential Therapeutic Agent for Managimg Diabetic Wounds." *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*. 2014 : 1-16.

Al-Waili, N.S. and Boni, N.S. 2004. " Honey increased saliva, plasma, and urine content of total nitrite concentrations in normal individuals." *Journal of medicinal food*. 7(3) : 377-380.

Appellbaum, P.C. 2007. "Microbiology of Antibiotic Resistance in ***Staphylococcus aureus***." *Oxford Journal*. 45(3) : 165-170.

Ananias, K.R. Melo, A.A.M. and Moura,C.J. 2014. "Analysis of moisture content, acidity and contamination by yeast and molds in *Apis mellifera* honey from central Brazil." *Brazilian Journal of Microbiology*. 44(3) : 679-683.

Balouiri, M. Sadiki, M. and Ibnsouda, S.K. 2015. "Methods for ***in vitro*** evaluating antimicrobial activity." A review. *Journal of Pharmaceutical Analysis*. 6(2) : 71-79.

Bednarski, A. 2006. **Identifying Unknown Bacteria Using Biochemical and Molecular Methods**. [Online]. Availble : www.nslc.wustl.edu/elgin/genomics/bio3055/idunknbacteria06.pdf

Bogdanov, S. 1997. "Antibacterial substances in honey." *Wissenschaft and Technology*. 30(7) : 748-753.

Bogdanov, S. 2016. **Honey in Medicine**. [Online]. Availble : http://www.bee-hexagon.net/.../9HoneyMedicineReview.pdf.

Bryan, L.E. Shahrabadi, M.S. and Elzen, Van Den H.M. 1974. "Gentamycin Resistanca in *Pseudomonas aeruginosa*: R-Factor-Mediated Resistance." *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 6(2) : 191-199.

Buba, F. Gidado, A. and Shugaba, A. 2013. "Analysis of Biochemical Composition of Honey Samples from North-East Nigeria." *Biochemistry and Analytical Biochemistry*. 2(3) : 1-7.

Burge, H. 2008. **Xerophillic Fungi**. [Online]. Available : https://www.emlab.com/s/sampling/env-report-02-2006.html

Dominguez, A. Nobre, C. Rodrigues, L.R. Peres, A.M. Torres, D. Rocha, I. Lima, N. and Teixeira, J. 2012. "New improved method for fructooligosaccharides production by *Aureobasidium pullulans.*" *Carbohydrate Polymers.* 89 : 1174-1179.

Erkan, M.E. Vural, A. Guran, H.S. and Durmusoglu, H. 2015. "Microbiological investigation of honey collected from Sırnak province of Turkey." *Journal of the Hellenic Veterinary Medical Society.* 66(1) : 1-5.

Gostincar, C. Ohm, R.A. Kogej, T. Sonjak, S. Turk, M. Zajc, J. Zalar, P. Grube, M. Sun, H. Sharma, A. Chiniquy, J. Ngan, C.Y. Lipzen, A. Barry, K. Grigoriev, I.V. and Gunde-Cimerman, N. 2014. "Genome sequencing of four *Aureobasidium pullulans* varieties: biotechnological potential, stress tolerance, and description of new species." *BMC Genomics.* 15 : 549.

Gonzalez, J.B. Fernandez, F.J. and Tomasini, A. 2003. "Microbial Secondary Metabolites Production and Strain Omprovement." *Journal of Biotechnology.* 2(3) : 322-333.

Gradvol, V. Atlaban, N. Lenart, L. and Pavlovic, H. 2015. "Microbiological quality and inhibitory potential of selected Croatian apiary honeys." *Food Sci.* 7(2) : 40-46.

Kacaninova, M. Melich, M. Knazovicka, V. Hascik, P. Sudzinova, J. Pavlicova, S. and Cubon, C. 2009. "The indicator microorganisms value in relation to primary contamination of honey." *Scientific Papers Animal Science and Biotechnologies.* 42(2) : 159-166.

Kazemi, A. Robson, G.D. and Denning, D.W. 2005. " Identification, Isolation, Cloning and Sequencing Apartialannexin Gene From *Aureobasidium pullulans.*" *Medical Journal.* 19(3) : 255-265.

Kim, J. Enache, E. and Hayman, M. 2014. **Halophili and Osmophilic Microorganisms.** American Public Health Assocication. Tortorello.

Kujawska, M. Zamudio, F. and Hilgert, N.I. 2012. "Honey-Based Mixtures Used in Home Medicine by Nonindigenous Population of Misines,Argentina." *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*. 2012 : 1-15.

Kumar, K.P.S. Bnowmik, D. Biswajib, C. and Chandira, M.R. 2010. "Medicinal uses and health benefits of Honey: An Overview." *Journal of Chemical and Pharmaceutical Research*. 2(1) : 385-395.

Lin, S.J. Wen, C.Y. Liau, J.C. and Chu, W.H. 2001. "Screening and production of erythritol by newly isolated osmophilic yeast-like fungi." *Process Biochemistry* . 36(12) : 1249-1258.

Lowy, F.D. 2003. "Antimicrobial resistance: the example of *Staphylococcus aureus*." *The Journal of Clinical Investigation*. 111(9) : 1265-1273.

Ikechukwu, O. George, E. Sabinus, A.E. and Florence, O. 2007. "Role of enriched media in bacterial isolation from semen and effect of microbial infection on semen quality: A study on 100 infertile men." *Pakistan Journal of Medical Sciences*. 23(6) : 885-888.

Makhdoom, A. Khan, M.S. Lagahari, M.A. Rahopoto, M.Q. Tahir, S.M. and Siddiqui, K.A. 2009. "Management of diabetic foot by natural honey." *Journal of Ayub Medical College*. 21(1) : 103-105

Martins, H.M. Martins, M.L. and Fernando M.A. 2003. "*Bacillaceae* spores, fungi and aflatoxins determination in honey Esporos de *Bacillaceae*, fungos aflatoxinas em mel." *Revista portuguesa de ciencias veterinarias*. 98(546) : 85-88.

McLoone, P. Warnock, M. and Fyfe, L. 2016. "Honey: A realistic antimicrobial for disorders of the skin". A Review. *Immunology and infection*. 49 : 161-167.

Mohamed, H. Salma, M.A. Lenjawl, B.A. Jouda, Z. Abdi, S. Abraham, S. and Ayash, H.A. 2014. "Enhancing primary healing post ray amputation in a diabetic patient: efficacy of natural honey." *Journal of Diabetic Foot Complications*. 6(1) : 13-18.

Mohamed, H. Abu, M.S. Allenjawi, B. Barakat, N. Gouda, Z. Abdi, S. and Mohamed, A. 2012. "Natural honey as an adjunctive alternative in the management of diabetic foot ulcers." *Wound Practice and Research*. 20(4) : 212-216.

Nasser, L.A. 2004. "Isolation and characterization of fungi contaminating packged honey commonly consumed in Saudi Arabia." *The Applied Computational Electromagnetics Society*. 7(1) : 1-7.

Neverman, L. 2015. **Honey as Medicine – Prevent Infection, Kill Bacteria, Promote Healing**. [Online]. Availble : http://commonsensehome.com/honey-as-medicine/

Olaitan, P.B. Adeleke, O.E. and Ola, I.O. 2007. "Honey: a reservoir for microorganisms and an inhibitory agent for microbes." *African Health Sciences*. 7(3) : 159-165.

Pettersson, O.V. 2011. **Fungal Xerophiles (Osmophiles).** [Online]. Availble : http://www.els.net/WileyCDA/ElsArticle/refId-a0000376.html

Rizzo, N. 2015. **The Definition of Reducing Sugars.** [Online]. Availble : http://www.livestrong.com/article/386795-the-definition-of-reducing-sugars/.

Santangelo, E.C.F. 2012. **Bee Defensin-1**. [Online]. Availble : http://flipper.diff.org/app/items/info/4619.

Seraia, M.J. Toledo, V.A.A. Marchini, L.C. Alves, E.M. FaQuinello, P. and Tiago Cleyton Simoes de Oliveira Arnaut de toledo. 2010. "Microorganism in organic and non organic honey samples of africanized honeybees." *Apicultural Science*. 54(1) : 49-54.

Silva, P.M. Gauche, C. Gonzaga, L.V. Costa, A.C.O. and Fett, R. 2016. "Honey: Chemical composition, stability and authenticity." *Food Chemistry*. 196(2016) : 309-323.

Singh, R. Gaur, R. Tiwari, S. and Gaur, M.K. 2012. "Production of pullulan by a Thermotolerant *Aureobasidium pullulans* strain in non-stirred fed batch fermentation process." *Brazilian Journal of Microbiology*. 43(3). 12-31.

Stewart, E.J. 2012. "Growing Unculturable Bacteria." *Journal of Bacteriology*. 194(16) : 4151-4160.

Suarez, J.M.A. Gasparrini, M. Hernandea, T.Y.F. Mazzoni, L. and Giampieri, F. 2014. "The Composition and Biological Activity of Honey: A Focus on Manuka Honey." A review. *Foods*. 3 : 420-432.

Tadesse, D.A. Zhao, S. Tong, E. Ayers, S. Singh, A. Bartholomew, M.J. and Patrick, F. 2012. "Antimicrobial Drug Resistance in *Escherichia coli* from Humans and

Food Animals, United States, 1950–2002." *Emerging Infectious Diseases*. 18(5) .

Tayata Phongphatthanakul. 2559. **ฟลาโวนอยด์ (Flavonoid)**. [Online]. Availble : http://healthlife2you.blogspot.com/2012/10/health-life-2-you-10.html.

Valgas, C. Souza, S.M. Smania, E.F.A. and Smania, A. 2007. "Screening methods to determine anibacterail activity of natural products." *Brazilian Journal of Microbiology* . 38 : 369-380.

Mandal, M.D and Mandal, S. 2011. "Honey: its medicinal property and antibacterial activity." *Asian Pacific Jounal of Tropical Biomedicine*. 1(2) : 154-160.

Vallianou, N.G. Gounari, P. Skourtis, A. Panagos, J. and Kazazis, C. 2014. "Honey and its Anti-Inflammatory, Anti-Bacterial and Anti-Oxidant Properties." *Gen Med*. 2(2) : 1-5.

Vijaya, K.K. and Nishteswar, K. 2012. "Wound healing activity of honey: A pilot study." *Journal of Reaearch in Ayurveda*. 33(3) : 374-377.

Zalar, P. Gostincar, C. Hoog, de G.S. Ursic, V. Sudhadham, M. and Gunde-Cimerman, N. 2008. "Redefinition of *Aureobasidium pullulans* and its varieties." *Studies in Mycology*. 61 : 21-38.

ภาคผนวก

ภาคผนวก ก

อาหารเลี้ยงเชื้อ

Malt extract yeast extract 50% glucose agar (MY30G)

Malt extract	10	กรัม
Yeast extract	2.5	กรัม
Agar	10	กรัม
Glucose	300	กรัม
Water , distilled	1000	มิลลิลิตร

Potato Dextrose Agar (PDA)

Potato	200	กรัม
Dextrose	20	กรัม
Agar	15	กรัม
Water , distilled	1000	มิลลิลิตร

ปรับ pH ให้อยู่ในช่วง 5.6 ± 0.2

Potato Dextrose Broth (PDB)

Potato	200	กรัม
Dextrose	20	กรัม
Water , distilled	1000	มิลลิลิตร

ปรับ pH ให้อยู่ในช่วง 5.6 ± 0.2

Mueller-Hinton agar (MHA)

Beef Extract	2	กรัม
Acid Hydrolysate of Casein	17.5	กรัม
Starch	1.5	กรัม
Agar	17	กรัม
Water distilled	1000	มิลลิลิตร

ปรับ pH ให้อยู่ในช่วง 7.3 ± 0.1

ภาคผนวก ข

ตารางแสดงรหัสตั้งต้นและรหัสที่ใช้ในการทดสอบ

แหล่งที่มา	รหัสตั้งต้น	รหัสทดสอบ
จังหวัดนครสวรรค์	N1BF02	A
	N2HF07	B
	N5HF01	C
จังหวัดจันทบุรี	C4HF01	D

ภาคผนวก ค

คำนวณความเข้มข้นสารสกัดที่ใช้ในแผ่นทดสอบ

รหัส	น้ำหนักสารสกัด (กรัม)
A	0. 0575
B	0. 2164
C	0. 0321
D	0. 0783

ต้องการความเข้มข้นของสารสกัด 100 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร (0.1 กรัมต่อมิลลิลิตร)

คำนวณ

ชั่งสาร 0.1 กรัม DMSO 1 มิลลิลิตร

ชั่งสาร 0.015 กรัม DMSO $\frac{0.015X1}{0.1}$ = 0.15 มิลลิลิตร

เพราะฉะนั้นใช้ DMSO 0.15 มิลลิลิตร (150 ไมโครลิตร) ผสมกับสารสกัด 0.015 กรัม จะได้สารละลายที่มีความเข้มข้น 100 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร

ใส่สารละลาย 10 ไมโครลิตรต่อแผ่นทดสอบ (0.01 มิลลิลิตร)

คำนวณ

สารละลาย 1 มิลลิลิตร มีสารสกัด 100 มิลลิกรัม

สารละลาย 0.01 มิลลิลิตร มีสารสกัด $\frac{100X0.01}{1}$ = 1 มิลลิกรัม

เพราะฉะนั้น ในแผ่นทดสอบ จะมีปริมาณสารความเข้มข้นสุดท้าย 1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตรต่อแผ่นทดสอบ

ภาคผนวก ง

ลำดับ	รหัสเชื้อ	ตำแหน่ง
1.	N1HF01	A1
2.	N1HF02	A2
3.	N1HF03	A3
4.	N1HF04	A4
5.	N1HF05	A5
6.	N1HF06	A6
7.	N1HF07	A7
8.	N1HF08	A8
9.	N1HF09	A9
10.	N1BY01	A10
11.	N1BY02	B1
12.	N1BY04	B2
13.	N1BY05	B3
14.	N1BF01	B4
15.	N1BF02*	B5
16.	N1HY01	B6
17.	P1HY01	B7
18.	P1HY02	B8
19.	P1HY03	B9
20.	P1HY04	B10
21.	P1HY05	C1
22.	P1HY06	C2
23.	P1HY07	C3
24.	P1HY08	C4
25.	P1HF01	C5
26.	P1HF02	C6
27.	P1HF03	C7
28.	P2HF01	C8
29.	P2HF02	C9
30.	P2HF03	C10

ลำดับ	รหัสเชื้อ	ตำแหน่ง
31.	P2HF04	D1
32.	P2HF05	D2
33.	P2HF06	D3
34.	P2HF07	D4
35.	P2HF08	D5
36.	P2HF09	D6
37.	P2HF10	D7
38.	P2BF01	D8
39.	P2HY01	D9
40.	P2HY02	D10
41.	P2HY03	E1
42.	N2HY01	E2
43.	N2HY02	E3
44.	N2HY03	E4
45.	N2HY04	E5
46.	N2HY05	E6
47.	N2HF01	E7
48.	N2HF02	E8
49.	N2HF03	E9
50.	N2HF04	E10
51.	N2HF05	F1
52.	N2HF06	F2
53.	N2HF07*	F3
54.	N2HF08	F4
55.	N2HF09	F5
56.	N3HY01	F6
57.	N3HY02	F7
58.	N3HY03	F8
59.	C1HY01	F9
60.	C1HY02	F10

ลำดับ	รหัสเชื้อ	ตำแหน่ง
61.	C1HY03	G1
62.	C2HY01	G2
63.	C2HY02	G3
64.	C2HY03	G4
65.	C2BY01	G5
66.	C2HF01	G6
67.	C2HF02	G7
68.	C3HF01	G8
69.	C3HF02	G9
70.	C3HF03	G10
71.	C3HF04	H1
72.	C3HF05	H2
73.	C3HY01	H3
74.	C3HY02	H4
75.	C3HY03	H5
76.	C3HY04	H6
77.	C3HY05	H7
78.	S1HF01	H8
79.	S1HF02	H9
80.	S1HF03	H10
81.	S1HF04	I1
82.	S1HF05	I2
83.	S1HF06	I3
84.	S1HY01	I4
85.	S1HY02	I5
86.	S2HF01	I6
87.	S2HF02	I7
88.	S2HF03	I8
89.	S2BY01	I9
90.	S2BY02	I10
91.	S2BY03	J1

ลำดับ	รหัสเชื้อ	ตำแหน่ง
92.	S2HY01	J2
93.	S2HY02	J3
94.	S2HY03	J4
95.	P3HY01	J5
96.	C4HY01	J6
97.	C4HY02	J7
98.	C4HY03	J8
99.	C4HY04	J9
100.	C4HY05	J10
101.	C4HY06	K1
102.	C4HY07	K2
103.	C4HY08	K3
104.	C4HY09	K4
105.	C4HY10	K5
106.	C4HF01*	K6
107.	C4HF02	K7
108.	C4HF03	K8
109.	C4HF04	K9
110.	C4HF05	K10
111.	C4HF06	L1
112.	C4HF07	L2
113.	C4HF08	L3
114.	C4HF09	L4
115.	C4HF10	L5
116.	C5HY01	L6
117.	C5HY02	L7
118.	C5HY03	L8
119.	C5HY04	L9
120.	C5HY05	L10
121.	C5HF01	M1
122.	C5HF02	M2

ลำดับ	รหัสเชื้อ	ตำแหน่ง
123.	C5HF03	M3
124.	C5HF04	M4
125.	C5HF05	M5
126.	C5HF06	M6
127.	C5HF07	M7
128.	C5HF08	M8
129.	C5BF01	M9
130.	N4BF01	M10
131.	N4BF02	N1
132.	N4BF03	N2
133.	N4HY01	N3
134.	N4HF01	N4
135.	N5HY02	N5
136.	N5HF01*	N6
137.	N5HF01	N7
138.	NKHF02	N8
139.	N5HF03	N9
140.	N5HF04	N10
141.	N5HF05	O1
142.	N5HF06	O2
143.	N5BF02	O3

หมายเหตุ * คือ เชื้อที่มีความสามารถในการต้านเชื้อแบคทีเรีย