วารสารวิทยาศาสตร์บูรพา ปีที่ 26 (ฉบับที่ 3) กันยายน – ธันวาคม พ.ศ. 2564
BURAPHA SCIENCE JOURNAL Volume 26 (No.3) September – December 2021 บทความวิจัย

ผลของอาหารเสริมผสมโพรไบโอติกส์ต่อจำนวนประชากรผึ้งพันธุ์

Effect of Supplementary Diet Mixed with Probiotics on Colony Population of *Apis mellifera* Linnaeus, 1758

สมศักดิ์ อยู่บริบูรณ์[1], วนิดา ชื่นชัน[1*] และ ธนพงศ์ สำเภาลอย [2]

Somsak Yooboriboon[1], Wanida Chuenchan[1*] and Thanaphong Sumpaoloi[2]

[1] *สาขาวิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยราชภัฏบ้านสมเด็จเจ้าพระยา*

[2] *ศูนย์ส่งเสริมเทคโนโลยีการเกษตรด้านแมลงเศรษฐกิจ*

[1] *Department of Biology, Faculty of Science and Technology, Bansomdejchaopraya Rajabhat University*

[2] *Agricultural Technology Promotion Center (Economic insects)*

Received : 4 June 2020

Revised : 3 November 2020

Accepted : 24 November 2020

บทคัดย่อ

ศึกษาผลของอาหารเสริมผสมโพรไบโอติกส์ *Lactobacillus casei* TISTR 390, *L. plantarum* TISTR 541, *L. curvatus* TISTR 938 และ *L. acidophilus* TISTR 2365 ต่อความหนาแน่นของประชากรในรังผึ้งพันธุ์ (*Apis mellifera* L.) โดยการตรวจนับไข่ ตัวอ่อน ดักแด้ และตัวเต็มวัย ทุกสัปดาห์ เป็นเวลา 12 สัปดาห์ (จำนวน 30 รัง แบ่งเป็น 6 ชุดการทดลอง ชุดละ 5 รัง) ตามวิธีมาตรฐาน (Burgett and Burikam, 1985) พบว่ากลุ่มที่ได้รับอาหารเสริมผสม *L. curvatus* มีอัตราการเพิ่มขึ้นของประชากรผึ้งงานมากที่สุดอย่างไม่มีนัยสำคัญ (96.60±45.68 %) รองลงมาเป็นกลุ่มที่ได้รับอาหารเสริมผสม *L. acidophilus* (74.37±16.38 %), *L. plantarum* (73.14±12.57 %), *L. casei* (71.54±7.30 %) กลุ่มที่ได้รับอาหารเสริมที่ไม่ผสมโพรโบโอติกส์ (69.39±11.66 %) และกลุ่มที่เลี้ยงด้วยอาหารตามธรรมชาติ (58.40±14.41 %) ตามลำดับ [$F_{(5, 24)} = 2.305$, $p = 0.076$] ผลการทดลองนี้บ่งชี้ว่าโพรไบโอติกส์ทั้ง 4 สายพันธุ์ มีผลต่อการเพิ่มจำนวนประชากรในรังผึ้งพันธุ์ สามารถนำไปพัฒนาเป็นส่วนผสมในผลิตภัณฑ์อาหารเสริมสำหรับเลี้ยงผึ้งพันธุ์ต่อไป

คำสำคัญ : อาหารเสริม ; โพรไบโอติกส์ ; จำนวนประชากร ; ผึ้งพันธุ์

Abstract

This study aimed to investigate the effect of supplementary diets mixed with four species of the probiotics, *Lactobacillus casei* TISTR 390, *L. plantarum* TISTR 541, *L. curvatus* TISTR 938 and *L. acidophilus* TISTR 2365 on colony population of the honey bee, *Apis mellifera* L. Number of eggs, larvae, pupae and adults in every week and spent the time for 12 weeks (30 colonies divided into 6 treated groups with consist of 5 colonies) by the standard method (Burgett and Burikam, 1985). The results showed that the treated groups of bees which were fed by the food mixed with *L. curvatus* (96.60±45.68 %), followed by colonies provided by food mixed with *L. acidophilus* (74.37±16.38 %), *L. plantarum* (73.14±12.57 %), *L. casei* (71.54±7.30 %), without probiotics (69.39±11.66 %) and natural foods (58.40±14.41 %) had been much involved in the increase of the rate of population insignificantly and respectively [F (5, 24) = 2.305, p = 0.076]. The research indicates that all the four species of probiotics are involved in the increase of rate of bee population in the colonies. It is considered to be progressively developed as a mixture of supplementary diet for commercial bee keeping.

Keywords : supplementary diet ; probiotics ; colony population ; *Apis mellifera*

***Corresponding author. E-mail** : wanida.ch@bsru.ac.th

บทนำ

ปัจจุบันเกษตรกรผู้เลี้ยงผึ้งทั่วโลก รวมถึงประเทศไทยกำลังประสบปัญหาฝูงผึ้งล่มสลายอันเนื่องมาจากหลายปัจจัย ประกอบกับต้นทุนที่สูงขึ้น ขาดการช่วยเหลืออย่างเป็นรูปธรรมจากภาครัฐ และราคาน้ำผึ้งในตลาดโลกปรับตัวลดลงอย่างต่อเนื่อง (Chantawannakul & Maitip, 2017) จากรายงานประชากรผึ้งลดลงอย่างรวดเร็ว เกิดปรากฏการณ์ผึ้งตายยกรังกระจายไปทั่วโลก (colony collapse disorder) ทำให้ผึ้งทั้งรังหายไปอย่างฉับพลัน เป็นผลมาจากปัจจัยหลายอย่าง เช่น การใช้สารเคมี ยาฆ่าแมลง ปุ๋ยเคมีอย่างกว้างขวางในพื้นที่การเกษตร การระบาดของโรคและศัตรูผึ้ง รวมถึงการขาดแคลนพืชอาหาร เป็นต้น (Barron, 2015; Bee health, 2019) ปัญหาสำคัญของการเลี้ยงผึ้งที่พบทั่วโลกรวมทั้งประเทศไทย ได้แก่ การลดลงของประชากรของผึ้งในรัง ในฤดูขาดแคลนพืชอาหาร ซึ่งเป็นผลมาจากสภาพดินฟ้าอากาศที่เปลี่ยนแปลงไป ทำให้จำนวนของพืชอาหารในแต่ละท้องที่ แต่ละฤดูกาลมีอย่างจำกัดทั้งชนิดและปริมาณ ส่งผลให้เกิดปัญหาทั้งด้านปริมาณและคุณภาพของพืชอาหารของผึ้ง ทำให้ผึ้งอ่อนแอ ไม่ออกหาอาหาร นางพญาวางไข่ลดลง ภูมิต้านทานต่อโรคผึ้งและศัตรูผึ้งต่ำ จนทำให้จำนวนประชากรของผึ้งลดลง และอาจเกิดการทิ้งรังในที่สุด เกษตรกรหลายรายแก้ปัญหาด้วยวิธีการเลี้ยงผึ้งแบบเคลื่อนย้ายไปตามสถานที่ต่าง ๆ ตามแหล่งของพืชอาหารทำให้ต้นทุนการเลี้ยงผึ้งสูงขึ้น อีกทั้งผึ้งยังสัมผัสกับสารเคมีทางการเกษตรโดยตรง เนื่องจากเกษตรกรมีการใช้สารฆ่าแมลงโดยตรงกับช่อดอกที่ผลิออกใหม่ โดยสัญญาณที่บ่งชี้ว่าผึ้งได้รับสารพิษ คือ เกิดการสูญหายของรังผึ้งเป็นจำนวนกว้าง มีผึ้งในช่วงอายุเดียวกันตายหน้ารังผึ้งจำนวนมาก (Chantawannakul *et al*., 2018) การให้อาหารเสริมแก่ผึ้ง เพื่อทดแทนอาหารธรรมชาติ เช่น แป้งถั่วเหลืองและเกสรผึ้ง เป็นทางทางเลือกของเกษตรกรผู้เลี้ยงผึ้งที่พบได้ทั่วโลก อย่างไรก็ตามคุณภาพของอาหารเสริมดังกล่าวยังไม่ดีเท่าที่ควรเนื่องจากขาดจุลินทรีย์ตามธรรมชาติที่มีคุณสมบัติเป็นโพรไบโอติกส์ ซึ่งเป็นจุลินทรีย์ที่ทำให้เกิดผลดีต่อสุขภาพ ช่วยปรับให้เกิดความสมดุลของเชื้อจุลินทรีย์ภายในระบบทางเดินอาหาร มีคุณสมบัติทนต่อกรดและด่าง โดยเข้าจับที่บริเวณผิวของระบบทางเดินอาหาร ผลิตสารต่อต้านหรือกำจัดเชื้อจุลินทรีย์ชนิดอื่น ก่อให้เกิดประโยชน์ต่อสุขภาพ และสามารถแข่งขันกับจุลินทรีย์ที่ก่อโรค รวมทั้งสามารถกระตุ้นให้เกิดระบบภูมิคุ้มกันในสัตว์ (Chaiyasut, 2011 ; Mountzouris *et al*., 2010) ดังนั้นการพัฒนาผลิตภัณฑ์อาหารเสริมที่อุดมไปด้วยสารอาหารและมีส่วนผสมของจุลินทรีย์ที่มีประโยชน์ทั้งทางด้านโภชนาการและสร้างภูมิต้านทานโรคให้แก่ผึ้ง จึงเป็นหนึ่งในแนวทางการแก้ปัญหาประชากรผึ้งลดลงจากสาเหตุต่าง ๆ (Anderson *et al*., 2011)

จากความสำคัญของปัญหาดังกล่าว ผู้วิจัยจึงมีแนวคิดในการศึกษาผลของโพรไบโอติกส์ต่อความหนาแน่นของประชากรผึ้งพันธุ์ (*A. mellifera* L.) ผลการวิจัยในครั้งนี้จะเป็นข้อมูลพื้นฐานสำคัญในการพัฒนาผลิตภัณฑ์อาหารเสริมผึ้งผสมโพรไบโอติกส์ เพื่อช่วยแก้ปัญหาความหนาแน่นของประชากรที่ลดลงในช่วงฤดูกาลขาดแคลนพืชอาหาร ซึ่งจะเป็นนวัตกรรมที่สามารถส่งให้เกษตรกรผู้เลี้ยงผึ้งได้ใช้ ประโยชน์ในการสร้างเสริมสุขภาพของผึ้งพันธุ์ต่อไป

วิธีดำเนินการวิจัย

1. การเตรียมผึ้งที่ใช้ดำเนินการวิจัย

ผึ้งพันธุ์ (*A. mellifera* L.) จำนวน 30 รัง จากศูนย์ส่งเสริมเทคโนโลยีการเกษตรด้านแมลงเศรษฐกิจ จังหวัดเชียงใหม่ กระทรวงเกษตรและสหกรณ์ โดยผึ้งทุกรังมีสุขภาพแข็งแรง ไม่พบโรคผึ้ง และไรศัตรูผึ้ง นางพญาผึ้งที่ใช้ในการทดลองทั้งหมดเป็นนางพญารุ่นแรกที่ผลิตในปี พ.ศ. 2562 (เริ่มวางไข่ครั้งแรกในเดือนมิถุนายน พ.ศ. 2562) รังที่ใช้เป็นรังชั้นเดียว ประกอบด้วย 4 คอน ทำเครื่องหมายระบุหมายเลขของแต่ละคอน ลำดับที่ 1 - 4 และติดฉลากคอน เพื่อบ่งบอกชนิดของคอน คือคอนเกสร คอนน้ำหวาน คอนไข่ คอนหนอน คอนตัวอ่อน และคอนดักแด้ เลือกบริเวณที่ตั้งรังให้ห่างจากแหล่งอาหาร และวางกับดักเกสรที่ปากทางเข้ารังเพื่อป้องกันอาหารจากภายนอกเข้ามาในรังผึ้งพันธุ์ที่ทำการทดลอง (ภาพที่ 1)

(ก) (ข)

ภาพที่ 1 (ก) การติดฉลากรังผึ้งพันธุ์ที่ใช้ในการทดลอง (ข) การวางกับดักเกสรที่ปากทางเข้ารัง

2. การเตรียมจุลินทรีย์ที่ใช้ดำเนินการวิจัย

2.1 การเตรียมแบคทีเรีย *Lactobacillus casei* TISTR 390, *L. plantarum* TISTR 541, *L. curvatus* TISTR 938 และ *L. acidophilus* TISTR 2365 โดยการเพาะแบคทีเรียจากหลอดเชื้อแบบผง (lyophilized form) แต่ละสายพันธุ์ในอาหารเหลว De Man, Rogosa and Sharpe (MRS) บ่มที่อุณหภูมิ 35-37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง ในสภาวะไร้อากาศ ทำการถ่ายเชื้ออย่างน้อย 3 ครั้ง เพื่อกระตุ้นการเจริญเติบโต จากนั้นเลี้ยงเชื้อแต่ละสายพันธุ์ในอาหารแข็ง MRS บ่มที่อุณหภูมิ 35-37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง เก็บรักษาเชื้อเพื่อใช้เป็นเชื้อใช้งาน (De Man, Rogosa & Sharpe ,1960)

2.2 นำเชื้อบริสุทธิ์จากอาหารแข็ง MRS เลี้ยงในอาหารเหลว MRS ปริมาตร 200 มิลลิลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 35-37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง ในสภาวะไร้อากาศ จากนั้นนำมาหมุนเหวี่ยงที่ความเร็ว 6,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที ล้างเซลล์ด้วยสารละลายโซเดียมคลอไรด์ 0.85 เปอร์เซ็นต์ (น้ำหนักต่อปริมาตร) 3 ครั้ง แล้วนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร (ED 423 S-CW) ปรับความขุ่นของเชื้อเปรียบเทียบกับความขุ่น

มาตรฐานแมกซ์ฟาร์แลนด์ (McFarland) เบอร์ 0.5 จะได้เชื้อที่มีความขุ่นเท่ากับ 0.1 ซึ่งจะทำให้มีปริมาณเชื้อประมาณ 1.0 x 10^8 CFU/mL (Meidong *et al*., 2017)

3. การเตรียมอาหารเสริมผึ้งผสมโพรไบโอติกส์สำหรับใช้เลี้ยงผึ้งพันธุ์

นำอาหารเสริมผึ้ง 500 กรัม ผสมกับแป้งถั่วเหลือง 1,250 กรัม คลุกเคล้าให้เข้ากัน เติมน้ำผึ้ง (ความเข้มข้นเท่ากับ 80 บริกซ์) 2,000 กรัม นวดให้เข้ากันจนเป็นก้อนไม่ติดมือ แบ่งออกเป็น 5 ส่วน ส่วนละ 750 กรัม ค่อย ๆ เติมแบคทีเรียกรดแลคติกที่เตรียมไว้จากข้อ 2.2 ได้แก่ *L. casei*, *L. plantarum*, *L. curvatus*, และ *L. acidophilus* ลงในอาหารแต่ละส่วนที่แยกไว้ โดยให้มีปริมาณแบคทีเรียเริ่มต้นเท่ากันคือ 10^8 CFU/g แบ่งเป็นก้อนกลมแบนขนาด 150 กรัม (Coeuret, Gueguen & Vernoux, 2004)

4. การให้อาหารเสริมผึ้งผสมโพรไบโอติกส์แก่ผึ้งพันธุ์

ดำเนินการทดลอง โดยวางแผนการทดลองแบบสุ่มสมบูรณ์ (Completely Randomized Design : CRD) แบ่งเป็น 6 ชุดการทดลอง ชุดละ 5 รัง โดยให้อาหารเสริมผึ้งผสมโพรไบโอติกส์ในแต่ละรัง เป็นน้ำหนัก 150 กรัม ประกอบด้วย

ชุดการทดลองที่ 1 อาหารเสริมผึ้งผสม *L. casei* TISTR 390
ชุดการทดลองที่ 2 อาหารเสริมผึ้งผสม *L. plantarum* TISTR 541
ชุดการทดลองที่ 3 อาหารเสริมผึ้งผสม *L. curvatus* TISTR 938
ชุดการทดลองที่ 4 อาหารเสริมผึ้งผสม *L. acidophilus* TISTR 2365
ชุดการทดลองที่ 5 อาหารเสริมผึ้งที่ไม่ผสมเชื้อโพรไบโอติกส์
ชุดการทดลองที่ 6 อาหารธรรมชาติ (ชุดควบคุม)

เลี้ยงผึ้งพันธุ์ทั้ง 30 รัง ด้วยอาหารตามที่วางแผนการทดลอง โดยให้อาหารแต่ละกลุ่ม กลุ่มละ 150 กรัม และเปลี่ยนอาหารทุกสัปดาห์ตลอดการทดลอง

5. การสร้างคอนผึ้งงาน

เลี้ยงผึ้งด้วยอาหารเสริมผสมโพรไบโอติกส์เป็นระยะเวลา 2 สัปดาห์ จากนั้นทำการสร้างคอนผึ้งงาน เพื่อศึกษาผลของอาหารเสริมผึ้งผสมโพรไบโอติกส์ต่อความหนาแน่นของจำนวนประชากรผึ้งทั้งหมดในรังผึ้งพันธุ์ (ภาพที่ 2)

(ก) (ข)

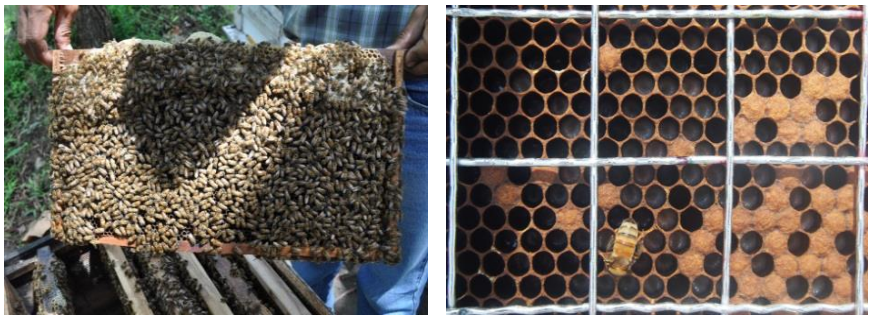
ภาพที่ 2 (ก) อาหารเสริมผสมโพรไบโอติกส์สำหรับเลี้ยงผึ้งพันธุ์ (ข) การสร้างคอนผึ้งงาน

6. การหาความหนาแน่นของจำนวนประชากรผึ้งทั้งหมดในรังผึ้งพันธุ์

6.1 นับจำนวนประชากรผึ้งงานตัวเต็มวัย ตามวิธีของ Burgett and Burikam (1985) ถ้าผึ้งงานตัวเต็มวัยเกาะเต็มพื้นที่คอนทั้ง 2 ด้าน จำนวนผึ้งงานตัวเต็มวัยประมาณ 2,430 ตัว (ภาพที่ 3 ก)

6.2 นับจำนวนไข่ ตัวอ่อน และดักแด้ผึ้งงานที่อยู่ในหลอดรวงรังที่ปิด โดยใช้ตะแกรงขนาด 23 × 43 ตารางเซนติเมตร (ขนาดช่องตะแกรง เท่ากับ 2.54 × 2.54 ตารางเซนติเมตร) ทาบบนคอนผึ้ง จากนั้นนับช่องตะแกรงที่มีไข่ ตัวอ่อน และหลอดรวงรังที่ปิดว่าได้กี่ช่องตะแกรง แล้วคูณด้วย 27 (1 ช่องตะแกรง เท่ากับ 6.45 ตารางเซนติเมตร โดยมี 27 หลอดรวงรัง) คำนวณหาจำนวนไข่ ตัวอ่อน และหลอดรวงรังที่ปิด (ภาพที่ 3 ข)

6.3 นับความหนาแน่นของจำนวนประชากรผึ้งงานทั้งหมดในรังผึ้งพันธุ์ เริ่มทำการทดลองทุกสัปดาห์ เป็นเวลา 12 สัปดาห์ โดยแต่ละชุดการทดลองทำการนับจำนวน 5 ซ้ำ



(ก) (ข)

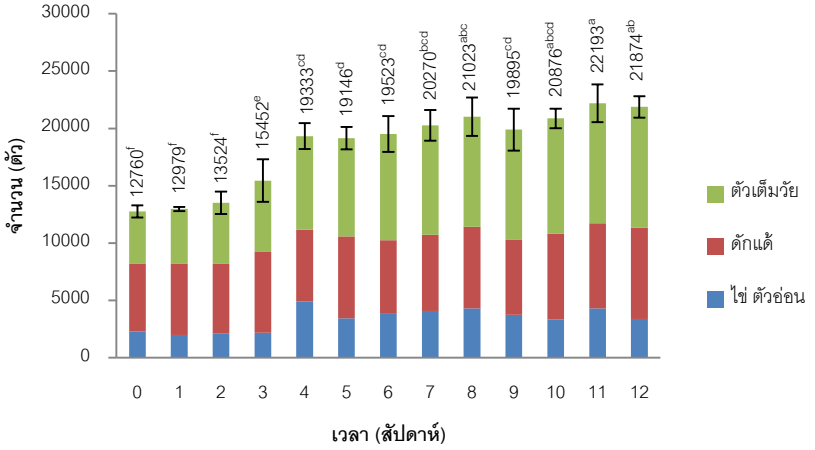
ภาพที่ 3 (ก) การหาจำนวนประชากรผึ้งงานตัวเต็มวัย (ข) การหาจำนวนไข่ ตัวอ่อน และดักแด้ผึ้งงาน

7. การวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ

ข้อมูลแสดงเป็นค่าเฉลี่ย ± ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน จากการทดลองจำนวน 5 ซ้ำ ทำการวิเคราะห์หาค่าความแปรปรวนของค่าเฉลี่ยด้วยวิธีการวิเคราะห์ความแปรปรวนที่มีตัวแปรอิสระเพียงตัวเดียว (one way analysis of variance) ด้วยโปรแกรม SPSS version 21.0 และเปรียบเทียบความแตกต่างค่าเฉลี่ยระหว่างชุดการทดลองด้วยวิธีของ Duncan (Duncan's new multiple range test) ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์

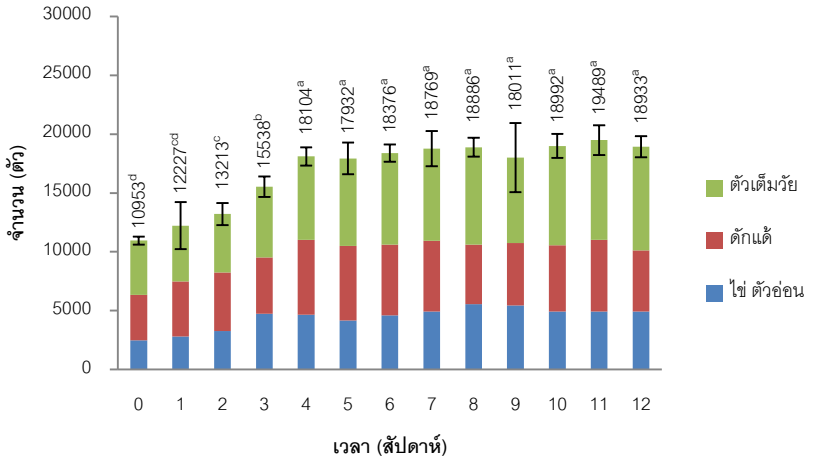
ผลการวิจัย

ค่าเฉลี่ยของจำนวนประชากรผึ้งงานทั้งหมดในรังผึ้งพันธุ์ที่เลี้ยงด้วยอาหารเสริมผึ้งผสม *L. casei* ก่อนการทดลองเป็น 12,760.40 ± 527.05 (ไข่ ตัวอ่อน 2,304.00 ± 887.96, ดักแด้ 5,888.00 ± 1,167.01 และตัวเต็มวัย 4,568.40 ± 108.67) และสิ้นสุดการทดลอง (สัปดาห์ที่ 12) เป็น 21,874.20 ± 930.17 (ไข่ ตัวอ่อน 3,392.00 ± 2,221.06, ดักแด้ 7,936.00 ± 1,714.32 และตัวเต็มวัย 10,546.20 ± 934.84) ดังแสดงในภาพที่ 4



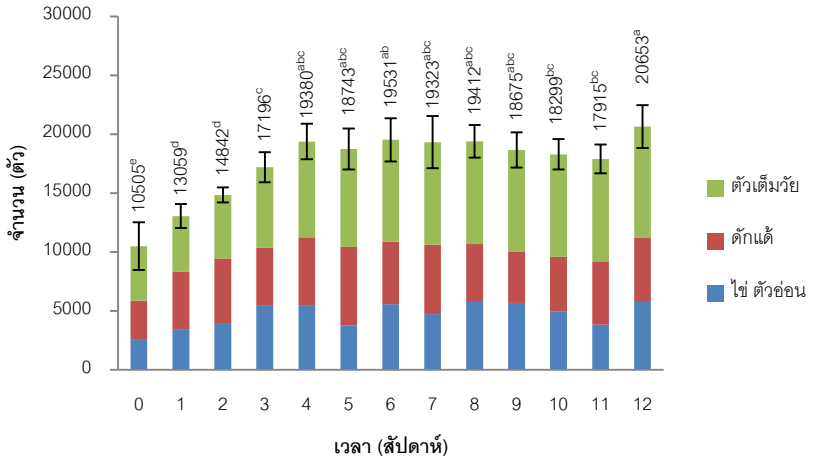
ภาพที่ 4 ค่าเฉลี่ยของจำนวนประชากรผึ้งในรังผึ้งพันธุ์ (*A. mellifera* L.) ที่เลี้ยงด้วยอาหารเสริมผสม *L. casei* เป็นเวลา 12 สัปดาห์ [ตัวอักษรที่แตกต่างกันในแต่ละสัปดาห์แสดงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ความเชื่อมั่นร้อยละ 95 (F(12,52)=35.507, p<0.05)]

ค่าเฉลี่ยของจำนวนประชากรผึ้งงานทั้งหมดในรังผึ้งพันธุ์ที่เลี้ยงด้วยอาหารเสริมผึ้งผสม *L. plantarum* ก่อนการทดลองเป็น 10,953.00 ± 350.54 (ไข่ ตัวอ่อน 2,496.00 ± 474.64, ดักแด้ 3,840.00 ± 554.26 และตัวเต็มวัย 4,617.00 ± 0.00) และสิ้นสุดการทดลอง(สัปดาห์ที่ 12) เป็น 18,932.90 ± 902.97 (ไข่ ตัวอ่อน 4,928.00 ± 921.91, ดักแด้ 5,184.00 ± 828.30 และตัวเต็มวัย 8,820.90 ± 887.03) ดังแสดงในภาพที่ 5



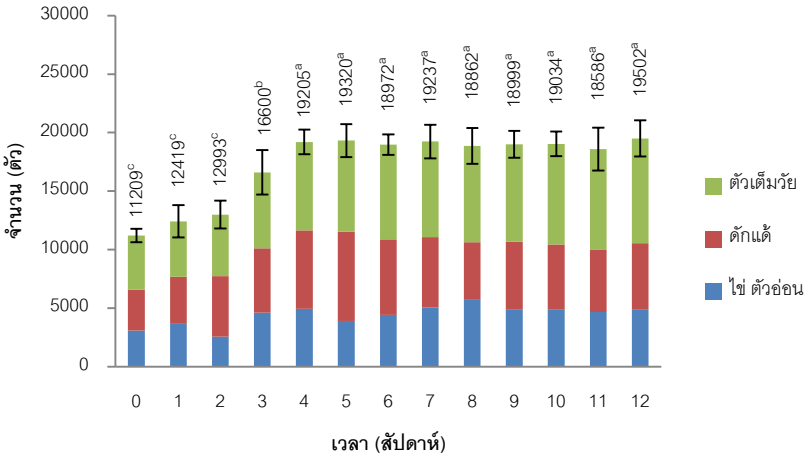
ภาพที่ 5 ค่าเฉลี่ยของจำนวนประชากรผึ้งในรังผึ้งพันธุ์ (*A. mellifera* L.) ที่เลี้ยงด้วยอาหารเสริมผสม *L. plantarum* เป็นเวลา 12 สัปดาห์ [ตัวอักษรที่แตกต่างกันในแต่ละสัปดาห์แสดงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ความเชื่อมั่นร้อยละ 95 (F(12,52)=23.222, p<0.05)]

ค่าเฉลี่ยของจำนวนประชากรผึ้งงานทั้งหมดในรังผึ้งพันธุ์ที่เลี้ยงด้วยอาหารเสริมผึ้งผสม *L. curvatus* ก่อนการทดลองเป็น 10,505.00 ± 2,031.43 (ไข่ ตัวอ่อน 2,624.00 ± 858.65, ดักแด้ 3,264.00 ± 1,541.32 และตัวเต็มวัย 4,617.00 ± 0.00) และสิ้นสุดการทดลอง(สัปดาห์ที่ 12) เป็น 20,652.70 ± 1,829.72 (ไข่ ตัวอ่อน 5,760.00 ± 1,376.37, ดักแด้ 5,440.00 ± 598.67 และตัวเต็มวัย 9,452.70 ± 639.46) ดังแสดงในภาพที่ 6



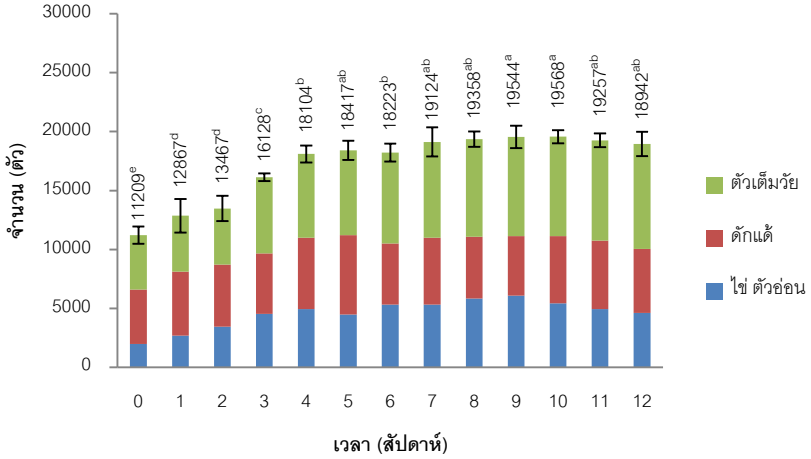
ภาพที่ 6 ค่าเฉลี่ยของจำนวนประชากรผึ้งในรังผึ้งพันธุ์ (*A. mellifera* L.) ที่เลี้ยงด้วยอาหารเสริมผสม *L. curvatus* เป็นเวลา 12 สัปดาห์ [ตัวอักษรที่แตกต่างกันในแต่ละสัปดาห์แสดงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ความเชื่อมั่นร้อยละ 95 ($F(12,52)=17.932$, $p<0.05$)]

ค่าเฉลี่ยของจำนวนประชากรผึ้งงานทั้งหมดในรังผึ้งพันธุ์ที่เลี้ยงด้วยอาหารเสริมผึ้งผสม *L. acidophilus* ก่อนการทดลองเป็น 11,209.00 ± 581.31 (ไข่ ตัวอ่อน 3,072.00 ± 1,544.64, ดักแด้ 3,520.00 ± 1,280.00 และตัวเต็มวัย 4,617.00 ± 0.00) และสิ้นสุดการทดลอง(สัปดาห์ที่ 12) เป็น 19,502.40 ± 1,548.19 (ไข่ ตัวอ่อน 4,864.00 ± 828.30, ดักแด้ 5,696.00 ± 525.81 และตัวเต็มวัย 8,942.40 ± 835.62) ดังแสดงในภาพที่ 7



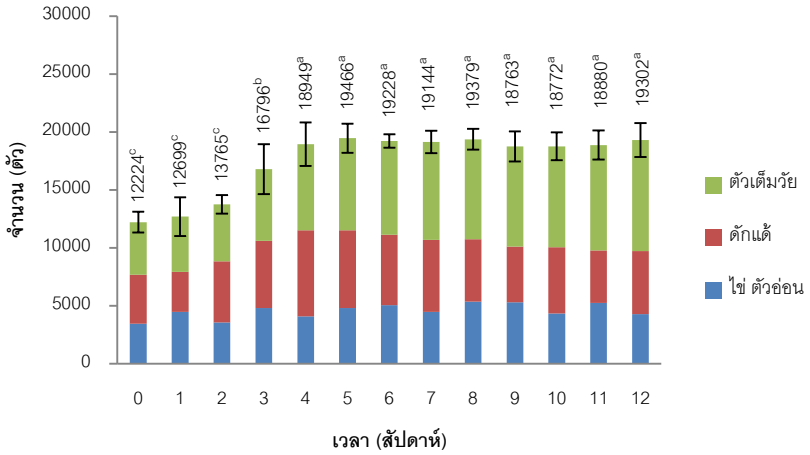
ภาพที่ 7 ค่าเฉลี่ยของจำนวนประชากรผึ้งในรังผึ้งพันธุ์ (*A. mellifera* L.) ที่เลี้ยงด้วยอาหารเสริมผสม *L. acidophilus* เป็นเวลา 12 สัปดาห์ [ตัวอักษรที่แตกต่างกันในแต่ละสัปดาห์แสดงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ความเชื่อมั่นร้อยละ 95 ($F(12,52)=24.990$, $p<0.05$)]

ค่าเฉลี่ยของจำนวนประชากรผึ้งงานทั้งหมดในรังผึ้งพันธุ์ที่เลี้ยงด้วยอาหารเสริมผึ้งที่ไม่ผสมโพรไบโอติกส์ ก่อนการทดลองเป็น 11,209.00 ± 736.70 (ไข่ ตัวอ่อน 1,984.00 ± 796.79, ดักแด้ 4,608.00 ± 429.33 และตัวเต็มวัย 4,617.00 ± 0.00) และสิ้นสุดการทดลอง (สัปดาห์ที่ 12) เป็น 18,941.80 ± 1,034.56 (ไข่ ตัวอ่อน 4,608.00 ± 1,609.57, ดักแด้ 5,440.00 ± 1,448.86 และตัวเต็มวัย 8,893.80 ± 755.84 ดังแสดงในภาพที่ 8



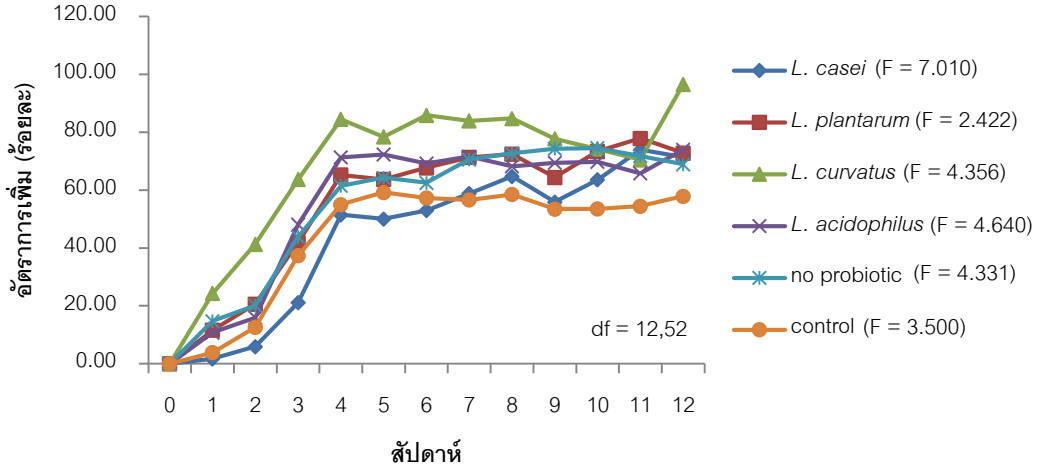
ภาพที่ 8 ค่าเฉลี่ยของจำนวนประชากรผึ้งในรังผึ้งพันธุ์ (*A. mellifera* L.) ที่เลี้ยงด้วยอาหารเสริมที่ไม่ผสมโพรไบโอติกส์ เป็นเวลา 12 สัปดาห์ [ตัวอักษรที่แตกต่างกันในแต่ละสัปดาห์แสดงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ความเชื่อมั่นร้อยละ 95 ($F(12,52)=53.098$, $p<0.05$)]

ค่าเฉลี่ยของจำนวนประชากรผึ้งงานทั้งหมดในรังผึ้งพันธุ์ที่เลี้ยงด้วยอาหารตามธรรมชาติ ก่อนการทดลองเป็น 12,224.10 ± 907.54 (ไข่ ตัวอ่อน 3,456.00 ± 1,247.59, ดักแด้ 4,224.00 ± 572.43 และตัวเต็มวัย 4,544.10 ± 66.55) และสิ้นสุดการทดลอง(สัปดาห์ที่ 12) เป็น 19,302.20 ± 1,459.91 (ไข่ ตัวอ่อน 4,288.00 ± 535.46, ดักแด้ 5,440.00 ± 505.96 และตัวเต็มวัย 9,574.20 ± 1,039.52) ดังแสดงในภาพที่ 9



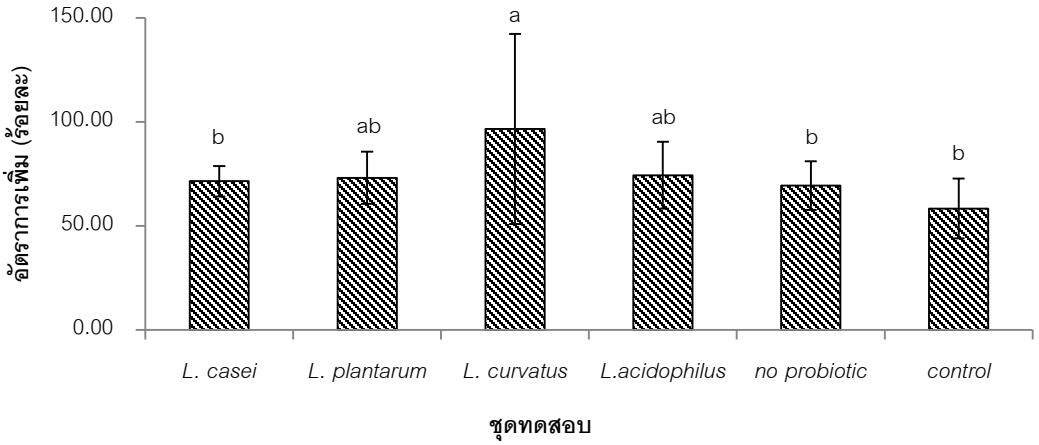
ภาพที่ 9 ค่าเฉลี่ยของจำนวนประชากรผึ้งในรังผึ้งพันธุ์ (*A. mellifera* L.) ที่เลี้ยงด้วยอาหารตามธรรมชาติ เป็นเวลา 12 สัปดาห์ [ตัวอักษรที่แตกต่างกันในแต่ละสัปดาห์แสดงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ความเชื่อมั่นร้อยละ 95 ($F(12,52)=20.944$, $p<0.05$)]

ร้อยละของอัตราการเพิ่มขึ้นของประชากร หลังจากทดลอง 12 สัปดาห์ พบว่าทุกชุดการทดลองมีจำนวนประชากรผึ้งเพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) มีจำนวนสูงสุดใน 4 สัปดาห์แรก หลังจากนั้นจำนวนค่อนข้างคงที่ โดยร้อยละของอัตราการเพิ่มขึ้นจากสัปดาห์แรก (สัปดาห์ที่ 0) จนถึงสัปดาห์ที่ 12 เท่ากับ 0, 11.18, 19.41, 42.67, 64.86, 64.68, 65.97, 68.83, 70.24, 65.91, 68.19, 69.08 และ 73.63 ตามลำดับ (ภาพที่ 10)



ภาพที่ 10 อัตราการเพิ่มของประชากรผึ้งทั้งหมดภายในรังผึ้งพันธุ์ (*A. mellifera* L.) ในแต่ละสัปดาห์ เป็นระยะเวลา 12 สัปดาห์

เมื่อวิเคราะห์อัตราการเพิ่มขึ้นของประชากรจากวันเริ่มต้น (สัปดาห์ที่ 0) จนสิ้นสุดการทดลอง (สัปดาห์ที่ 12) พบว่าผึ้งที่ได้รับอาหารเสริมผสม *L. curvatus* มีอัตราการเพิ่มขึ้นของประชากรรังได้มากกว่ากลุ่มอื่นอย่างไม่มีนัยสำคัญทางสถิติ ($F(5, 24)=2.305$, $p=0.076$) โดยมีอัตราการเพิ่มขึ้นของประชากรผึ้งทั้งหมดในรังมากที่สุดแตกต่างจากกลุ่มอื่น (96.60 ± 45.68 %) รองลงมาเป็นกลุ่มที่ได้รับอาหารเสริมผสม *L. acidophilus* (74.37 ± 16.38 %), *L. plantarum* (73.14 ± 12.57 %), *L. casei* (71.54 ± 7.30 %), กลุ่มที่ได้รับอาหารเสริมที่ไม่ผสมโพรโบโอติกส์ (69.39 ± 11.66 %) และกลุ่มที่ได้รับอาหารตามธรรมชาติ (58.40 ± 14.41 %) ตามลำดับ (ภาพที่ 11)



ภาพที่ 11 อัตราการเพิ่มของประชากรผึ้งทั้งหมดภายในรังในเมื่อสิ้นสุดการทดลอง เป็นระยะเวลา 12 สัปดาห์
[ตัวอักษรที่แตกต่างกันแสดงถึงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ความเชื่อมั่นร้อยละ 95]

วิจารณ์ผลการวิจัย

จากการศึกษาผลของอาหารเสริมผสมโพรไบโอติกส์ต่อความหนาแน่นของประชากรผึ้งพันธุ์ โดยการนับจำนวนประชากรผึ้งงานทั้งหมดภายในรัง (ตัวเต็มวัย ไข่ ตัวอ่อน และดักแด้) เป็นเวลา 12 สัปดาห์ พบว่าทุกกลุ่มทดสอบทั้งกลุ่มที่ได้รับโพรไบโอติกส์และกลุ่มที่ไม่ได้รับโพรไบโอติกส์ มีสภาพรังเป็นไปตามระยะวงจรชีวิตของผึ้ง แต่กลุ่มที่ได้รับโพรไบโอติกส์ทั้ง 4 สายพันธุ์ มีจำนวนประชากรภายในรังมากกว่ากลุ่มที่ไม่ได้รับโพรไบโอติกส์ แสดงให้เห็นว่าโพรไบโอติกส์ส่งผลโดยตรงต่อจำนวนประชากรภายในรังผึ้ง ซึ่งจำนวนของประชากรผึ้งจะมีความสัมพันธ์โดยตรงกับสุขภาพผึ้ง โพรไบโอติกส์ที่ผึ้งได้รับสามารถรอดชีวิตในระบบทางเดินอาหารของผึ้ง และผลิตไบโอฟิล์ม (biofilm) ที่มีประสิทธิภาพช่วยเพิ่มการยึดเกาะในทางเดินอาหาร (Chandran & Raghavan, 2018) ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยของ Mathialagan *et al*. (2018) ที่ทำการสำรวจแบคทีเรียกรดแลคติก (LAB) ซึ่งเป็นโพรไบโอติกส์ตามธรรมชาติที่มีความสัมพันธ์กับผึ้ง โดยแยก LAB จากกระเพาะอาหารผึ้ง อาหารผึ้ง เกสรผึ้ง และนมผึ้ง ในผึ้งสายพันธุ์ที่แตกต่างกัน พบแบคทีเรียสกุล *Lactobacillus* ประมาณ 10 เปอร์เซ็นต์ ในขณะเดียวกันแบคทีเรียเหล่านี้ก็มีศักยภาพช่วยเสริมสร้างภูมิคุ้มกันของผึ้ง ช่วยเพิ่มการย่อยสารอาหารต่าง ๆ ให้แก่ผึ้ง ส่งเสริมการได้รับสารอาหาร และยังสามารถสร้างสารปฏิชีวนะซึ่งมีประสิทธิภาพในการยับยั้งกลุ่มจุลินทรีย์ที่ก่อโรคให้แก่ผึ้งได้ (Flynn *et al*., 2002 ; Pattabhiramaiah *et al*., 2012 ; Sammataro, 2013) สอดคล้องกับงานวิจัยของ Evans and Lopez, (2004) ที่ทำการศึกษาแบคทีเรียโพรไบโอติกส์ที่กระตุ้นการตอบสนองของระบบภูมิคุ้มกันในผึ้งพันธุ์ (*Apis mellifera* L.) พบว่าตัวอ่อนผึ้งมีความสัมพันธ์กับการตอบสนองของระบบภูมิคุ้มกันอย่างมีนัยสำคัญ แสดงให้เห็นว่าแบคทีเรียที่ไม่ก่อโรคมีศักยภาพเป็นโพรไบโอติกส์ในการเสริมสร้างภูมิคุ้มกันของผึ้ง ช่วยให้ตัวอ่อนของผึ้งและผึ้งในช่วงวัยต่าง ๆ รอดชีวิตจากการโจมตีของเชื้อโรค นอกจากนี้ Szymas *et al*., (2012) ยังได้ทำการศึกษาโครงสร้างเนื้อเยื่อวิทยาทางเดินอาหารส่วนกลางของผึ้งพันธุ์ (*A. mellifera* L.) ที่ได้รับเกสรทดแทนที่เสริมด้วยโพรไบโอติกส์ พบการเปลี่ยนแปลงในเยื่อบุผิว และพบกลุ่มเซลล์ที่ทำหน้าที่คัดหลั่งสารจำนวนมากในผึ้งที่ได้รับเกสรที่เสริมด้วยโพรไบโอติกส์ การพัฒนาของเยื่อบุลำไส้ที่มีจำนวนมากขึ้นนี้ อาจช่วยให้การดูดซึมสารอาหารดีขึ้น เป็นประโยชน์ต่อสภาพของรังผึ้ง สอดคล้องกับงานวิจัยของ Patruica and Hutu, (2013) ได้ศึกษาผลของการใช้ผลิตภัณฑ์พรีไบโอติกส์และโพรไบโอติกส์ในอาหารเสริมในรังผึ้ง (*A. mellifera carpatica*) ในฤดูขาดแคลนอาหาร พบว่าการใช้ผลิตภัณฑ์อาหารเสริมพรีไบโอติกส์และโพรไบโอติกส์ ส่งเสริมการพัฒนาที่ดีของรังผึ้ง ช่วยเพิ่มจำนวนประชากรผึ้งและช่วยปรับปรุงสุขภาพผึ้ง ข้อมูลดังกล่าวสนับสนุนงานวิจัยในครั้งนี้ที่แสดงให้เห็นว่าประชากรภายในรังของผึ้งพันธุ์ที่ได้รับโพรไบโอติกส์มีจำนวนมากกว่ารังที่ไม่ได้รับโพรไบโอติกส์

ผลการวิจัยนี้แสดงให้เห็นว่าผึ้งพันธุ์ที่เลี้ยงด้วยอาหารตามธรรมชาติมีจำนวนประชากรภายในรังน้อยที่สุด อาจเนื่องจากช่วงเวลาที่ทำวิจัยเป็นฤดูขาดแคลนอาหาร ซึ่งสอดคล้องกับการศึกษาของ Davis and Ward, (2003) ที่แสดงให้เห็นว่าสารอาหารที่ผึ้งได้รับมีผลต่อภูมิต้านทานของผึ้ง พืชอาหารบางชนิดอุดมด้วยฟลาโวนอยด์ (flavonoid) สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อโรคหลายชนิด ช่วยให้ตัวอ่อนผึ้งติดโรคน้อยลง นอกจากนี้ Gojmerac, (1980) ยังพบว่าเมื่อผึ้งอยู่ในอุณหภูมิหรือความชื้นที่ไม่เหมาะสม หรือขาดสารอาหาร มักชักนำให้ผึ้งเกิดความเครียดและติดโรคได้ง่าย นอกจากปัญหาด้านพืชอาหารแล้วการเพิ่มขึ้นของสารกำจัดศัตรูพืชก็เป็นอีกหนึ่งปัญหาที่สำคัญ โดย Mikhail Y. Syromyatnikov *et al*., (2020) ได้เผยแพร่ข้อมูลที่แสดงให้เห็นว่าในช่วงทศวรรษที่ผ่านมามีการเพิ่มขึ้นของการใช้สารกำจัดศัตรูพืช ซึ่งสารเหล่านี้ส่งผลให้ลำไส้

ของผึ้งเพิ่มความไวต่อจุลินทรีย์ก่อโรค ทำให้ภูมิคุ้มกันของผึ้งลดลง นำไปสู่การลดลงของประชากรผึ้งในที่สุด ข้อมูลดังกล่าวแสดงให้เห็นถึงเหตุผลที่ทำให้ประชากรผึ้งทั่วโลก รวมถึงประเทศไทย ลดจำนวนลงอย่างเห็นได้ชัดในฤดูขาดแคลนพืชอาหาร รวมถึงโภชนาการ อุณหภูมิ ฤดูกาล ซึ่งล้วนเป็นปัจจัยที่มีผลต่อจำนวนประชากรของผึ้งงานภายในรัง เนื่องจากผึ้งเป็นแมลงที่ไวต่อความผันผวนของสิ่งแวดล้อม ปัจจัยเหล่านี้ล้วนแล้วแต่ส่งผลกระทบต่อสุขภาพของผึ้งในรัง และทำให้นางพญาและผึ้งตัวผู้สูญเสียสุขภาพอนามัยการเจริญพันธุ์ (Rangel & Fisher, 2019) นอกจากนี้ยังมีรายงานว่า สุขภาพของผึ้งนางพญามีความจำเป็นอย่างยิ่งต่อสภาพรัง โดยส่งผลต่อศักยภาพในการผสมพันธุ์ของผึ้งนางพญา การเพิ่มจำนวนของประชากรผึ้งภายในรัง ผลิตภัณฑ์ของผึ้ง และการอยู่รอดของรังผึ้ง ดังนั้นสุขภาพของผึ้งนางพญาจึงเป็นปัจจัยสำคัญที่ทำให้รังผึ้งคงอยู่หรือเกิดการล่มสลาย (Amiri *et al*., 2017) การทดลองนี้ได้ให้อาหารเสริมผสมโพรไบโอติกส์แก่ผึ้งงานจึงอาจเกี่ยวข้องกับสุขภาพของผึ้งนางพญา เนื่องจากผึ้งงานทำหน้าที่สร้างนมผึ้งเพื่อเป็นอาหารสำหรับป้อนให้แก่ตัวอ่อนและผึ้งนางพญา ซึ่งคุณภาพของนมผึ้งที่สร้างได้จะส่งผลโดยตรงต่อกระบวนการทางสรีรวิทยาของผึ้งนางพญา ทำให้ผึ้งนางพญาวางไข่ได้จำนวนมาก ดังนั้นจำนวนประชากรของผึ้งพันธุ์ในรังที่ได้รับอาหารเสริมผสมโพรไบโอติกส์จึงมากกว่ารังที่ได้รับอาหารเสริมที่ไม่ได้ผสมโพรไบโอติกส์ และอาหารตามธรรมชาติ สอดคล้องกับงานวิจัยของ Fine *et al*., (2018) ที่แสดงว่าสารอาหารในเกสรที่ผึ้งงานได้รับจะเกี่ยวข้องกับสรีรวิทยาและพฤติกรรมการวางไข่ของผึ้งนางพญา ซึ่งจะส่งผลต่อความสมบูรณ์ และความแข็งแรงของประชากรผึ้งภายในรัง ทุกวรรณะผึ้ง หากเกษตรกรให้อาหารเสริมผึ้งผสมโพรไบโอติกส์ในฤดูขาดแคลนอาหาร นอกจากจะช่วยลดต้นทุนการเลี้ยงผึ้งแบบเคลื่อนย้ายไปตามสถานที่ต่าง ๆ แล้วยังอาจช่วยแก้ปัญหาความหนาแน่นของประชากรผึ้งที่มีจำนวนลดลงได้อีกด้วย ดังนั้นข้อมูลที่ได้จากการวิจัยนี้สามารถนำไปใช้พัฒนาอาหารเสริมผึ้งซึ่งเป็นหนทางในการแก้ไขปัญหาความหนาแน่นของประชากรผึ้งได้ และมีความเป็นไปได้สูงที่จะประสบความสำเร็จเนื่องจากงานวิจัยของ Ptaszynska *et al*., (2016) ที่ศึกษาผลของโพรไบโอติกส์และพรีไบโอติกส์ต่ออัตราการรอดชีวิตของผึ้งที่ติดเชื้อ *Nosema ceranae* เพื่อพัฒนาการรักษาและป้องกันโรค Nosemosis โดยพบว่า *L. rhamnosus* ที่ใช้เป็นโพรไบโอติกส์มีอัตราการรอดชีวิตสูงในน้ำเชื่อมสำหรับใช้เลี้ยงผึ้งที่มีความเข้มข้น 56.56 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งความเข้มข้นดังกล่าวใกล้เคียงกับส่วนผสมของสูตรอาหารเสริมที่ใช้ในงานวิจัยในครั้งนี้ อีกทั้งโพรไบโอติกส์ที่ใช้ทดสอบในงานวิจัยนี้ทั้ง 4 สายพันธุ์ เป็นแบคทีเรียกรดแลคติกในสกุล *Lactobacillus*

สรุปผลการวิจัย

ผึ้งพันธุ์ (*A. mellifera* L.) ทุกชุดทดสอบมีสภาพรังเป็นไปตามระยะวงจรชีวิตของผึ้งงาน โดยกลุ่มที่ได้รับอาหารเสริมผสมโพรไบโอติกส์มีประชากรผึ้งภายในรังมากกว่ากลุ่มที่ไม่ได้รับโพรไบโอติกส์ โดยผึ้งพันธุ์ที่ได้รับ *L. curvatus* สามารถเพิ่มจำนวนคอนได้มากกว่ากลุ่มอื่น และมีอัตราการเพิ่มขึ้นของประชากรผึ้งในรังมากที่สุดแตกต่างจากกลุ่มอื่นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (96.60±45.68 %) รองลงมาเป็นกลุ่มที่ได้รับ *L. acidophilus* (74.37±16.38 %), *L. plantarum* (73.14±12.57 %), *L. casei* (71.54±7.30 %) กลุ่มที่ได้รับอาหารเสริมที่ไม่ผสมโพรโบโอติกส์ (69.39±11.66 %) และกลุ่มที่เลี้ยงด้วยอาหารตามธรรมชาติ (58.40±14.41 %) ตามลำดับ ผลการทดลองดังกล่าวบ่งชี้ได้ว่าโพรไบโอติกส์ทั้ง 4 สายพันธุ์ ช่วยส่งเสริมให้ประชากรผึ้งพันธุ์มีความหนาแน่นเพิ่มขึ้น สามารถนำไปพัฒนาเป็นส่วนผสมในอาหารสำหรับเลี้ยงผึ้งพันธุ์ได้ แต่ทั้งนี้ควรนำข้อมูลดังกล่าวไปพิจารณาร่วมกับผลต่อการส่งเสริมสุขภาพในด้านอื่น ๆ ของผึ้งด้วย เช่น น้ำหนักผึ้ง อายุผึ้ง การเสริมสร้างสเปิร์ม

ของผึ้งตัวผู้ และการเสริมสร้างภูมิคุ้มกันของผึ้ง เพราะเชื้อแต่ละสายพันธุ์อาจส่งผลต่อสุขภาพของผึ้งที่แตกต่างกัน โดยเลือกใช้สายพันธุ์ของเชื้อที่เหมาะสมที่สุดตามวัตถุประสงค์ของเกษตรกร หรืออาจพัฒนาในรูปแบบของหัวเชื้อผสมเพื่อให้ได้ประสิทธิภาพสูงสุด

กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบคุณศูนย์ส่งเสริมเทคโนโลยีการเกษตรด้านแมลงเศรษฐกิจ จังหวัดเชียงใหม่ ที่ให้ความอนุเคราะห์วัสดุอุปกรณ์และสถานที่ทำวิจัย

เอกสารอ้างอิง

Amiri, E., Strand, M.K., Rueppell, O., & Tarpy, D.R. (2017). Queen quality and the impact of honey bee diseases on queen health: Potential for interactions between two major threats to colony health. *Insects*, *8*(2), 48; doi:10.3390/insects8020048

Anderson, K.E., Sheehan, T.H., Eckholm, B.J., Mott B.M., & DeGrandi-Hoffman G. (2011). An emerging paradigm of colony health: microbial balance of the honey bee and hive (*Apis mellifera*). *Insectes Sociaux*, *58*, 431. https://doi.org/10.1007/s00040-011-0194-6

Barron, A.B. (2015). Death of the bee hive: Understanding the failure of an insect society. *Current Opinion in Insect Science*, *10*, 45-50. https://doi.org/10.1016/j.cois.2015.04.004

Bee health. (2019). *What is causing the decline of honey bee populations?*. Retrieved May 18, 2020, from https://bee-health.extension.org/what-is-causing-the-decline-of-honey-bee-populations/

Burgett, D.M., & Burikam, I. (1985). Number of adult honey bees (Hymenoptera: Apidae) occupying a comb: A standard for estimating colony populations. *Journal of Economic Entomology*, *78*, 1154-1156.

Chaiyasut, C. (2011). *Probiotics: Microorganisms for Life*. Bangkok: Infinity color Printing Co.,Ltd. (in Thai)

Chandran, H., & Raghavan K.T. (2018). Probiotic potency of *Lactobacillus plantarum* KX519413 and KX519414 isolated from honey bee gut. *FEMS Microbiology Letters*, *365*(4), 1-8.

Chantawannakul, P., & Maitip, J. (2017). Novel Technologies for beekeeping and bee product industries. research results into utilization. *NRCT Newsletter*, *12*(77), 5-7. (in Thai)

Chantawannakul, P., Sanghiran Lee, V., Nimmanpipug, P., & Krongdang, S. (2018). *Bee, Pesticide, The Impact on Ecosystem and Human Health*. Chiangmai: MaxxPRINTING™ (in Thai)

Coeuret, V., Gueguen M., & Vernoux J.P. (2004). Numbers and strains of lactobacilli in some probiotic products. *International Journal of Food Microbiology*, *97*, 147-56.

Davis, C., & Ward, W. (2003). The control of chalkbrood disease with natural products. *Journal of Apicultural Research*., *42*(3bvg), 1-23.

De Man J.C., Rogosa M., & Sharpe, M.E. (1960). A medium for the cultivation of lactobacilli. *Journal of Applied Bacteriology*, *23*, 130-135.

Evans, J., & Lopez, D.L. (2004). Bacterial probiotics induce an immune response in the honey bee (Hymenoptera: Apidae). *Journal of Economic Entomology, 97*(3), 752-756.

Fine JD, Shpigler HY, Ray AM, Beach NJ, Sankey AL, Cash-Ahmed A, Huang, ZY, Astrauskaite, L., Chao, R., Zhao, H., & Robinson, G.E. (2018). Quantifying the effects of pollen nutrition on honey bee queen egg laying with a new laboratory system. *PLoS ONE*, *13*(9): e0203444. https://doi.org/10.1371/journa.pone. 0203444

Flynn, S., van Sinderen, D., Thornton, G.M., Holo, H., Nes, I.F., & Collins, J.K. (2002). Characterization of the genetic locus responsible for the production of ABP-118, a novel bacteriocin produced by the probiotic bacterium *Lactobacillus salivarius* subsp. *salivarius* UCC118. *Microbiology*, *148*(4), 973–984.

Gojmerac, W.L. (1980). *Bee, beekeeping, honey and pollination*. Westport, Conn.: AVI Publishing.

Mathialagan, M., Johnson Thangaraj Edward, Y.S., David, P.M.M., Senthilkumar, M., Srinivasan, M.R., & Mohankumar, S. (2018). Isolation, characterization and identification of probiotic lactic acid bacteria (LAB) from honey bees. *International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences*, *7*(4), 894-906.

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

Syromyatnikov, M., Isuwa, M.M., Savinkova, O.V., Derevshchikova, M.I., & Popov, V.N. (2020). The effect of pesticides on the microbiome of animals. *Agriculture*, *10*(79), 1-14.

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

Patruica, S., & Hutu, I. (2013). Economic benefits of using prebiotic and probiotic products as supplements in stimulation feeds administered to bee colonies. *Turkish Journal of Veterinary and Animal Sciences*, *37*, 259-263.

Pattabhiramaiah, M., Reddy, M.S., & Brueckner, D. (2012). Detection of novel probiotic bacterium *Lactobacillus* spp. in the workers of Indian honeybee, *Apis cerana indica*. *International Journal of Environmental Sciences*, *2*(3), 1135-1143.

Ptaszynska, A.A., Borsuk, G., Zdybicka-Barabas, A., Cytryriska, M., & Malek, W. (2016). Are commercial probiotics and prebiotics effective in the treatment and prevention of honeybee nosemosis C. *Parasitology Research*, *115*(1), 397-406.

Rangel, J., & Fisher, A. II. (2019). Factors affecting the reproductive health of honey bee (*Apis mellifera*) drones-a review. *Apidologie*, *50*, 759–778.

Sammataro, D. (2013, August 13). *Beneficial microflora in honey bee colonies* [Video file]. Retrieved June 23, 2019, from https://www.youtube.com/watch?v=NI9Z73UAX-g

Szymas, B., Langowska, A., & Kazimierczak-Baryczko, M. (2012). Histological structure of the midgut of honey bees (*Apis mellifera* L.) fed pollen substitutes fortified with probiotics. *Journal of Apicultural Science*, *56*(1), 5-12.