บทที่ 3

อุปกรณ์และวิธีดำเนินการทดลอง

วัสดุและอุปกรณ์

ก. สัตว์ทดลอง

ผึ้งพันธุ์(*Apis mellifera* L.) ในหีบเลี้ยงแบบ Langstroth เป็นรังชั้นเดียวจำนวน คอน 7 คอน ที่มีไรทรอปิลีแลปส์ (*Tropilaelaps clareae*) เข้าทำลายจำนวน 25 รัง

ข. อุปกรณ์ในการทดลอง

1. High Performance Liquid Chromatography (HPLC) , Shimudzu LC - 6A
2. Gas Chrommatography (GC) , Shimudzu GC - 7AG
3. กระบอกฉีด
4. เครื่องกดนับจำนวนเลข
5. กล้องถ่ายรูป
6. ตะแกรงตรวจไร
7. ตะแกรงวัดประชากรผึ้ง
8. รังสังเกต(observation hive)
9. petridish
10. กระดาษกรอง
11. ตู้ incubator

ค. สารที่ใช้ในการทดลอง

1. ไทมอล

   ชื่อทางเคมี : 5-Methyl-2-(1-methylethyl)phenol

2. เมนทอล

   ชื่อทางเคมี : (1α,2β,5α)-5-Methyl-2-(1-methylethyl)- cyclohexanol

3. น้ำมันละเดา
4. emulsifier (polyoxyethylene sorbitan monolaurate)

วิธีดำเนินการทดลอง

ก. วิธีศึกษาความเป็นพิษของไทมอล, เมนทอล และน้ำมันสะเดาต่อไร *T. clareae*

1. หาค่าLC_{50}ของไทมอล เมนทอล และน้ำมันสะเดาต่อไร *T. clareae* มีวิธีการเป็นลำดับขั้นดังต่อไปนี้

1.1 เตรียมไร *T. clareae* (เขี่ยออกจากหลอดรวงผึ้ง) และดักแด้ผึ้งโดยนำคอนผึ้งที่สลัดผึ้งตัวเต็มวัยออกแล้ว มาเจาะหลอดปิดออกแล้วใช้ปากคีบคีบดักแด้ผึ้งออกมา และใช้พู่กันเขี่ยไรออกจากหลอดรวงผึ้ง

1.2 นำไทมอลและเมนทอลปริมาณที่แตกต่างกันใส่ petridish ซึ่งมีกระดาษกรองรองอยู่ข้างใน ส่วนน้ำมันสะเดาแต่ละความเข้มข้นมาหยดลงบนกระดาษกรอง 0.5 ml แล้วปล่อยให้แห้ง

1.3 นำดักแด้ผึ้งและไร *T. clareae* ใส่ petridisc ซึ่งใส่สารตามข้อ 2 แล้ว โดยที่สารแต่ละชนิด(เมนทอล,ไทมอล และน้ำมันสะเดา)แบ่งเป็น 5กลุ่มการทดลองทำการทดลอง6 ซ้ำ

1.3.1 การทดลองของสารเมนทอล ในการทดลองแต่ละกลุ่มการทดลองมี ดังนี้ (แต่ละซ้ำใช้ไร *T. clareae* 10ตัว และดักแด้ผึ้ง 5 ตัว ทุกกลุ่มการทดลอง)

T_1 - กลุ่มควบคุม

T_2 - เมนทอล ปริมาณ 400 ไมโครกรัม (4.21 ppm)

T_3 - เมนทอล ปริมาณ 500 ไมโครกรัม (5.26 ppm)

T_4 - เมนทอล ปริมาณ 600 ไมโครกรัม (6.31 ppm)

T_5 - เมนทอล ปริมาณ 900 ไมโครกรัม (9.47 ppm)

(ppm คำนวณจากปริมาณเมนทอลต่อปริมาตรของ petridish)

1.3.2 การทดลองของสารไทมอล ในการทดลองแต่ละกลุ่มการทดลองมีดังนี้ (แต่ละซ้ำมีไร *T. clareae* 10 ตัว และดักแด้ผึ้ง 5 ตัวทุกกลุ่มการทดลอง)

T_1 - กลุ่มควบคุม

T_2 - ไทมอล ปริมาณ 50 ไมโครกรัม (0.52 ppm)

T_3 - ไทมอล ปริมาณ 100 ไมโครกรัม (1.05 ppm)

T_4 - ไทมอล ปริมาณ 200 ไมโครกรัม (2.10 ppm)

T_5 - ไทมอล ปริมาณ 300 ไมโครกรัม (3.15 ppm)

(ppm คำนวณจากปริมาณไทมอลต่อปริมาตรของ petridish)

1.3.3 การทดลองของน้ำมันสะเดา ในการทดลองแต่ละกลุ่มการทดลองมีดังนี้ (แต่ละซ้ำมีไร *T. clareae* 10 ตัว และดักแด้ผึ้ง 5 ตัว ทุกกลุ่มการทดลอง)

T_1 - กลุ่มควบคุม ใช้emulsifierและน้ำปริมาณ 0.5 มิลลิลิตร

T_2 - น้ำมันสะเดา ความเข้มข้น 20% ปริมาณ 0.5 มิลลิลิตร (1.05 ppm)

T_3 - น้ำมันสะเดาความเข้มข้น 30 % ปริมาณ 0.5 มิลลิลิตร (1.57 ppm)

T_4 - น้ำมันสะเดาความเข้มข้น 40 % ปริมาณ 0.5 มิลลิลิตร (2.10 ppm)

T_5 - น้ำมันสะเดาความเข้มข้น 50 % ปริมาณ 0.5 มิลลิลิตร (2.63 ppm)

(ppm คำนวณจากปริมาณเมนทอลต่อปริมาตรของ petridish)

1.4 ปิดpetridishด้วยกระดาษกรอง แล้วนำใส่ตู้ incubator อุณหภูมิ 35 °C

1.5 บันทึกจำนวนการตายของไร *T. clareae* เมื่อครบ 24 ชั่วโมง

1.6 นำข้อมูลมาวิเคราะห์ด้วยโปรแกรม probit analysis

ข. ศึกษาประสิทธิภาพของไทมอล, เมนทอล และน้ำมันสะเดาในการป้องกันกำจัดไร *T. clareae* และสารตกค้างในน้ำผึ้ง

1. การสำรวจประชากรผึ้งทั้งหมดในรัง มีวิธีการดังนี้

1.1 สำรวจประชากรผึ้งตัวเต็มวัย โดยการถ่ายรูปนับประชากรผึ้ง

1.2 สำรวจประชากรไข่ ตัวอ่อน และดักแด้ผึ้งที่อยู่ในหลอดปิด (sealed brood) โดยใช้ตะแกรงขนาด23 x 43 ตารางเซนติเมตร ขนาดตะแกรง2.54 x 2.54ตารางเซนติเมตร ประมาณประชากร โดยการทาบตะแกรงบนคอนผึ้ง นับช่องที่มีไข่ ตัวอ่อน และหลอดปิด (1 ช่องเท่ากับ6.45 ตารางเซนติเมตร) ได้จำนวนเท่าไรคูณด้วย 27 (6.45 ตารางเซนติเมตร มี 27 หลอดรวงผึ้ง)จะทำให้ทราบจำนวนหลอดรวงที่มีไข่ ตัวอ่อน และหลอดปิด

1.3 ทำการคำนวณประชากรผึ้งทั้งหมดใน 1 รัง นำมาเขียนกราฟใช้เปรียบเทียบประชากรทั้งหมดของผึ้ง 1 รัง ก่อนใช้สารป้องกันกำจัดไรและภายหลังการใช้สารป้องกันกำจัดไร เพื่อดูผลว่าสารที่ใช้ทดลองมีผลกระทบต่อประชากรผึ้งหรือไม่

2. การสำรวจประชากรไรศัตรูผึ้ง มีวิธีการสำรวจ 2 วิธีดังนี้

2.1 สำรวจประชากรไรศัตรูผึ้งโดยใช้ตะแกรงตรวจไรขนาด 30 x 40 ตารางเซนติเมตร ขนาดรูตะแกรงประมาณ 0.3 x 0.3 ตารางเซนติเมตร ใส่เข้าไปบนฐานรังผึ้งใน

ตอนเย็น แล้วนำมาตรวจนับปริมาณไรโดยใช้เครื่องนับจำนวนเลข วิธีนี้จะใช้สำรวจประชากรไรศัตรูผึ้งก่อนและระหว่างการใช้สารป้องกันกำจัดไร แล้วนำมาเขียนกราฟแสดงประชากรไร

2.2 สำรวจประชากรไรศัตรูผึ้งโดยการเจาะหลอดปิด 100 เซลล์ (De Jong et al.,1981) เพื่อดูเปอร์เซนต์การเข้าทำลายตัวอ่อนและดักแด้ผึ้งของไรศัตรูผึ้ง ทำการสำรวจทุก 7 วัน ก่อนและหลังการใช้สารป้องกันกำจัดไร

3. การทดลองเบื้องต้นหาความเข้มข้นของน้ำมันสะเดา ปลอดภัยต่อผึ้งซึ่งเหมาะสมในการทดลอง

เนื่องจากน้ำมันสะเดาไม่มีคำแนะนำให้ใช้กำจัดไรในรังผึ้ง จึงทดลองหาความเข้มข้นที่ไม่เป็นอันตรายต่อผึ้งเพื่อนำไปใช้ทดลองในรังต่อไป โดยนำน้ำมันสะเดาความเข้มข้นต่างๆ (40%,30%,20%,10%) ใส่กระบอกฉีด ฉีดคอนเล็กที่มีผึ้งตัวเต็มวัย 20 ตัว (มีน้ำผึ้งสะสมอยู่บนคอนด้วย) ข้างละ 1 ครั้ง (ปริมาณสารที่ฉีดครั้งละประมาณ 0.7 มิลลิลิตร รวมสารที่ฉีด 1.4 มิลลิลิตร) นำคอนใส่รังเล็กขนาด 23.5 x 28 x 18 ลูกบาศก์เซนติเมตร แล้วดูผลว่ามีผึ้งตายหรือไม่ใน 24 ชั่วโมง

4. ทดลองในรังผึ้งเพื่อศึกษาประสิทธิภาพของเมนทอล ไทมอล และน้ำมันสะเดา ในการกำจัดไร

4.1 เตรียมรังผึ้งพันธุ์ (*Apis mellifera*) ในหีบเลี้ยงแบบ Langstroth จำนวน 25 รัง ซึ่งเป็นรังชั้นเดียวที่มีไร *T. clarese* เข้าทำลาย แต่ละรังมีคอน 7 คอน ทำการสำรวจประชากรไรโดยใช้ตะแกรงตรวจไรและเจาะหลอดปิด 100 เซลล์ แล้วบันทึกผลการทดลองก่อนใช้ เมนทอล ไทมอลและน้ำมันสะเดาในรังผึ้ง

4.2 วางแผนการทดลองแบบสุ่มตลอด (completely randomized design , CRD) แบ่งผึ้ง 25 รัง โดยวิธีการจับฉลาก ออกเป็น 5 การทดลองๆละ 5 ซ้ำประกอบด้วยกลุ่มควบคุม 1 กลุ่ม และกลุ่มทดลอง 4 กลุ่ม ดังนี้

T_1 - กลุ่มควบคุม

T_2 - ใช้ emulsifier และน้ำ

T_3 - ใช้เมนทอล 50 กรัม ต่อครั้งต่อรัง

T_4 - ใช้ไทมอล 15 กรัม ต่อครั้งต่อรัง

T_5 - ใช้น้ำมันสะเดา ความเข้มข้น 20 %

4.3 การใช้สาร :

4.3.1 เมนทอล ใช้ทุกๆ 12 วัน ใช้ทั้งหมด 3 ครั้งใช้รังละ 50 กรัมต่อครั้ง โดยใส่สารใน petridisc ซึ่งปิดด้วยผ้าโปร่งที่เป็นตาข่าย เพื่อป้องกันไม่ให้ผึ้งงานนำสารไปทิ้ง แล้วจึงนำไปวางใต้คอนผึ้งบนฐานรัง

4.3.2 ไทมอล ใช้ทุกๆ 4 วัน ใช้ทั้งหมด 7 ครั้ง ใช้15 กรัมต่อรังต่อครั้ง ลักษณะการใช้เหมือนเมนทอล

4.3.3 น้ำมันสะเดาใช้ทุกๆ 4 วัน ใช้ทั้งหมด 7 ครั้ง นำสารใส่กระบอกฉีด นำไปฉีดในรังผึ้งโดยวิธียกคอนขึ้นมาฉีดทีละคอน คอนละ 4 ครั้ง (ประมาณ 2.8 มิลลิลิตร) ใช้ความเข้มข้น 20%

4.3.4 emulsifier และน้ำ มีระยะเวลาและการใช้เหมือนน้ำมันสะเดา

4.3.5 การใช้สารจะทำในตอนเย็นระหว่างเวลา 17.00 - 18.00 น.

4.4 นับจำนวนไร *T. clareae* ที่ตกลงมาบนตะแกรงตรวจไรในเช้าวันรุ่งขึ้น

4.5 เจาะหลอดปิด 100 เซลล์ ทุก 7 วัน ติดต่อกัน 4 ครั้ง เพื่อดูปริมาณการลดลงของไร ผลที่ได้จะนำไปวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ

5. วิเคราะห์สารตกค้างในน้ำผึ้ง

5.1 ใช้ syringe ดูดน้ำผึ้งจากรังที่ทดลองใส่ vial แล้วนำแช่น้ำแข็งในกล่องโฟม จากนั้นนำไปแช่ช่อง freeze (ตู้เย็น)

5.2 ไทมอล และเมนทอลที่ตกค้างในน้ำผึ้งวิเคราะห์โดยใช้เครื่อง GC , น้ำมันสะเดาที่ตกค้างในน้ำผึ้งเป็นการวิเคราะห์ Azadiracthtin ในน้ำผึ้งโดยใช้เครื่อง HPLC

การวิเคราะห์ไทมอลที่ตกค้างในน้ำผึ้งด้วยครื่อง GC

1) นำน้ำผึ้งมา centrifuge 3000 รอบ/นาที เป็นเวลา 10 นาที (เพื่อเอา impurities โดยเฉพาะ wax ออก)

2) นำน้ำผึ้ง 5 กรัมผสมกับ pH 5 acidulated water 20 มิลลิลิตร ใส่ปีกเกอร์ ทิ้งไว้ข้ามคืน

3) นำมากรองผ่าน RP C18 cartridge

4) precondition กับเมทธานอล 5 มิลลิลิตร และpH 5 acidulated water 5 มิลลิลิตร

5) ปล่อย catridge ให้แห้งเป็นเวลา 5 นาที จากนั้น eluted 3 ครั้งกับ chloroform 5 มิลลิลิตร

6) นำเข้าเครื่อง rotary evaporator เพื่อให้สารเข้มข้นขึ้น แล้ว dry ด้วยก๊าซไนโตรเจน

7) เติมคลอโรฟอร์ม 1 มิลลิลิตร แล้วจึงนำไปวิเคราะห์ด้วยเครื่อง GC

condition ที่ใช้

column : HP 5890 with MSD 5970 mass detector and 25 m and 0.2 mm id ultra 2 capillary column

carrier : helium (2 ml/min)

split : 60 ml/min (Lodesani et al. , 1992)

การวิเคราะห์เมนทอลที่ตกค้างในน้ำผึ้งด้วยเครื่อง GC

การเตรียม standard

1) standard 2,6 - dimethylphenol (2,6-DMP) solution (10 ppm) โดยการละลาย 2,6-DMP 0.002 กรัม กับ hexaneใน volummetric flask 200 มิลลิลิตร แล้ว make volume (เก็บ solution ไม่ให้โดนแสง และเตรียมใหม่ทุกๆ 2 วัน)

2) menthol standard solution (20 ppm) โดยการละลายเมนทอล 0.001 กรัม กับ standard 2,6-DMP solution ใน volumetric flask 50 มิลลิลิตร แล้ว make volume

การทำ standard curve

1) เตรียม standard ที่ 6 ความเข้มข้นคือ 0.1, 0.5, 1.0, 2.5, 5.0, 10.0 ppm

2) เติม sodium sulfate 3.5 กรัม ต่อ standard 10 มิลลิลิตร แล้วเขย่าอย่างแรง แล้วนำมา evaporat ด้วย ก๊าซไนโตรเจน จน solution เหลือ 1 มิลลิลิตร

3) ฉีดสารทุกความเข้มข้นเข้าไปในเครื่อง GC 1.0 ไมโครลิตร

4) เขียนกราฟได้ calibration curve

การเตรียมน้ำผึ้งเพื่อฉีดเข้าเครื่อง GC

1) นำน้ำผึ้ง 10 กรัม ใส่ขวดก้นกลมขนาด 500 มิลลิลิตร แล้วเติมน้ำ 100 มิลลิลิตร

2) เติม standard 2,6-DMP solution 10 มิลลิลิตร

3) ต่อขวดก้นกลมกับเครื่อง steam distilation/extraction แล้วกลั่น 20 นาที

4) เอา hexane solution ออกจากเครื่องแล้วเติม hexane 10 มิลลิลิตร ลงไปในเครื่อง

5) ส่วนของ hexane เอามารวมกันแล้วเติม sodium sulfate แล้วจึงผ่านก๊าซไนโตรเจนจนเหลือ solution 1 มิลลิลิตร

6) ฉีดเข้าเครื่อง GC

7) นำพื้นที่ peak ของ sample ไปเทียบกับ calibration curve

condition ที่ใช้

column : 30 m X 0.25 mm DB-5 capillary column หุ้มกับ 0.4 m X 0.25 mm deactivated silica capillary column

flow rate : 26.6 cm/s

detector : flame ionization detector

splitter ratio : 42 : 1

Temperature programe : 80 $^{\circ}$C(1 นาที), 50 $^{\circ}$C /min, ท้ายสุด 120 $^{\circ}$C (10 นาที)

Injector Temp. : 140 $^{\circ}$C

detector Temp. : 280 $^{\circ}$C (Li et al. , 1993)

การวิเคราะห์ Azadiracthtin ในน้ำมันสะเดาด้วยเครื่อง HPLC

conditionที่ใช้

column : RP-8 lichrospher 5 um(Merck) 125 x 4 mm

mobile phase : Acetonitrile: water , 30 : 70

flow rate : 1 ml/min

detector : UV 210 nm

attenuation : 0.02 AUFS

Elution system : Isocratic system

sample size : 10 μl

การเตรียม sample เพื่อวิเคราะห์

1) น้ำผึ้ง 1 กรัม เติม aqueous methanol 50% 10 ml และdiethyl ether 10 ml
2) เขย่าอย่างแรงใน separatory funnel แล้วปล่อยทิ้งไว้ข้ามคืน
3) ย้ายชั้น aqueous methanol ออก
4) สกัดด้วย diethyl ether และ 50% aqueous methanol 10 ml อีก 2 ครั้ง
5) รวม aqueous methanol ให้ได้ 10 ml ใน volumetric flask และกรอง sample
6) dilute sample 1:10 กับ mobile phase
7) นำ sample solution 1 ml กรองผ่าน 0.45 μm microfilter membrane
8) standard solution azadiracthtin 95% เตรียมกับ methanol ให้ได้ความเข้มข้นระหว่าง 0.01-0.18 mg/ml
9) ฉีด standard solution 10 μl และ sample 10 μl
10) นำผลไปเปรียบเทียบกับ standard และคำนวณปริมาณ azadirachtin ในsample (สุรพล วิเศษสรรค์, 2537; Boothai, 1994)

6. การศึกษาผลข้างเคียงบางประการ เนื่องจากการใช้สารป้องกันกำจัดไร

6.1 นำผึ้งจำนวน 1 คอน ใส่รังสังเกต(observation hive) ขนาด 23.5x28x18 ลูกบาศก์เซนติเมตร จำนวน 1 รัง สังเกตพฤติกรรมของผึ้งในรังสังเกต ก่อนและหลังการใช้สารป้องกันกำจัดไร

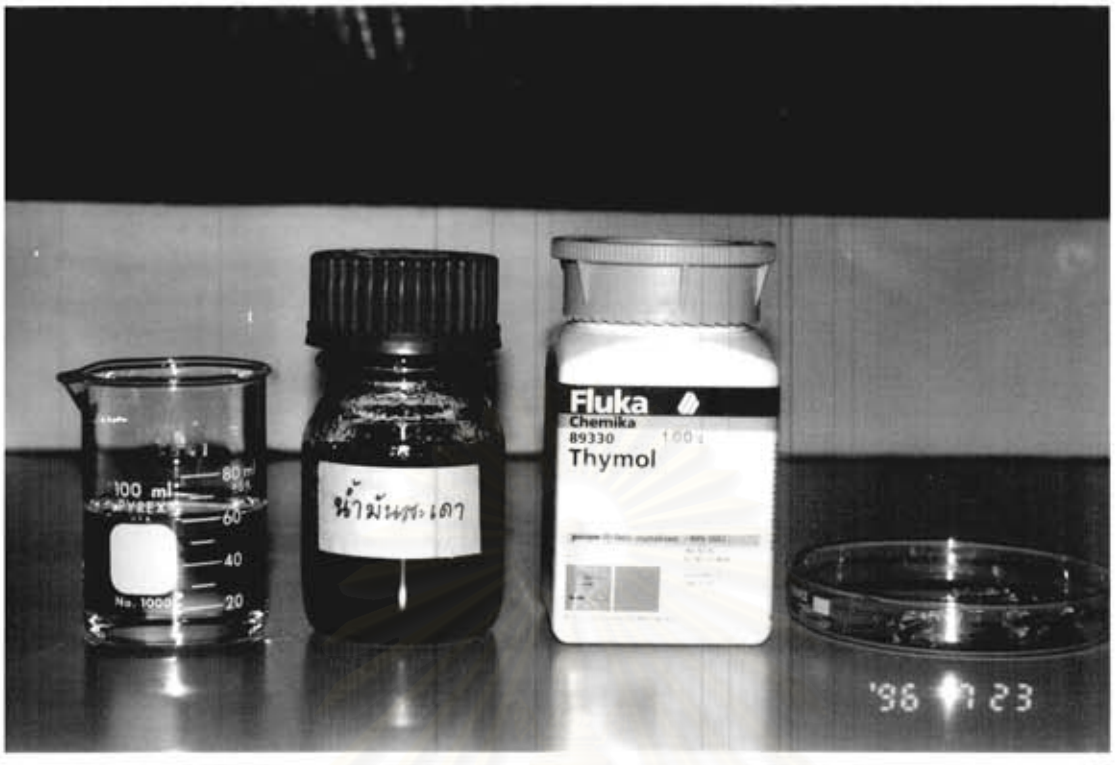
6.2 ศึกษาอัตราการวางไข่ของนางพญาผึ้ง ก่อนและหลังการใช้สารป้องกันกำจัดไร

6.3 ศึกษาพฤติกรรมของผึ้งงานหลังการใช้สารป้องกันกำจัดไร (เช่นมีพฤติกรรมก้าวร้าวขึ้นหรือไม่ , มีการทำลายนางพญาผึ้งหรือไม่)

7. การวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ

นำข้อมูลการสำรวจไร *T. clareae*โดยการเจาะหลอดปิด 100 เซลล์ไปวิเคราะห์ข้อมูลด้วยวิธี ANALYSIS OF COVARIANCE IN CRD และตรวจสอบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยด้วยวิธีการ DUNCAN'S MULTIPLE RANGE TEST

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



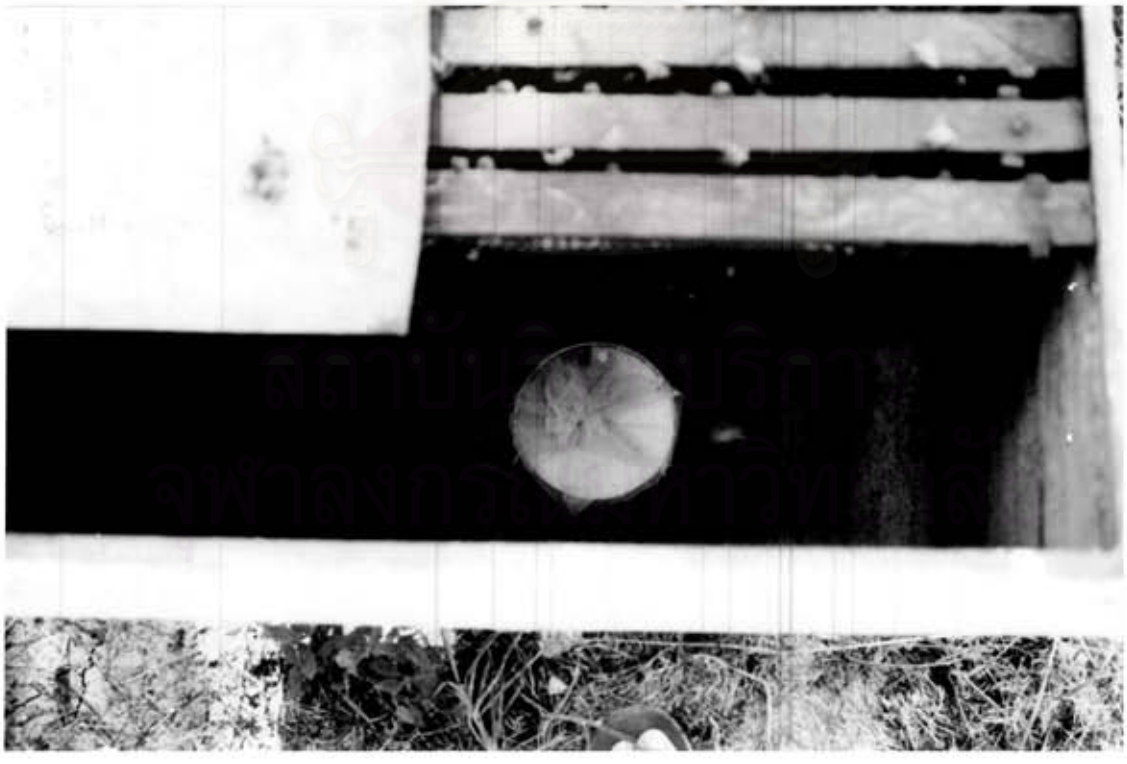
ภาพที่ 3.1 สารที่ใช้ในการทดลอง (emulsifier, น้ำมันสะเดา, ไทมอล, เมนทอล)

ภาพที่ 3.2 รังผึ้งพันธุ์ที่ใช้ทดลอง (ลูกศรชี้โดยวางใต้ต้นไม้) สถานที่ ม. นเรศวร จ.พิษณุโลก

ภาพที่ 3.3 การใช้ตะแกรงคำนวณประชากรผึ้ง

ภาพที่ 3.4 การสอดตะแกรงตรวจไรบนฐานรังผึ้ง

ภาพที่ 3.5 การใช้เมนทอลในรังผึ้ง



ภาพที่ 3.6 การใช้ไทมอลในรังผึ้ง

ภาพที่ 3.7 การฉีดน้ำมันสะเดาบนคอนฝึ้ง

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย