

วัสดุอุปกรณ์และวิธีดำเนินงานวิจัย

1. สารฆ่าแมลง

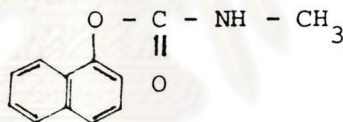
สารฆ่าแมลงทั้ง 3 ชนิดใช้ในการทดลองเป็นชนิด commercial grade ซึ่งได้รับจากบริษัทที่เป็นตัวแทนจำหน่ายในประเทศไทยมีดังนี้

1.1 Sevin® เป็นสารฆ่าแมลงกลุ่มคาร์บาเมต

ชื่อสามัญ carbaryl

ชื่อเคมี 1-naphthyl methylcarbamate

สูตรโครงสร้าง



ชนิดที่ใช้ Commercial grade 85% W. P. (wetttable powder)

การออกฤทธิ์ เป็นสารฆ่าแมลงชนิดถูกตัวตายและกินตาย

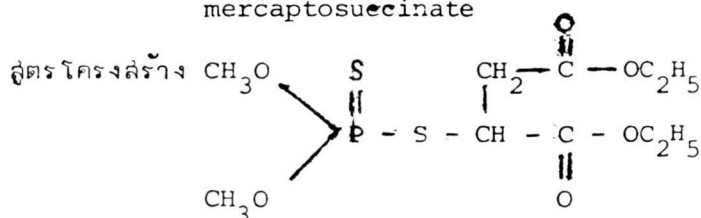
ประโยชน์ ใช้ป้องกันกำจัดแมลงศัตรูพืชต่าง ๆ ได้มากกว่า 100 ชนิด เช่น ส้ม ไม้ผล พืชอาหารสัตว์ ป่าไม้ พืชไร่ ไม้ประดับ ไม้พุ่ม และยังใช้ในการกำจัดแมลงศัตรูสัตว์เลี้ยงและสัตว์ปีกด้วย

ผู้แทนจำหน่าย บริษัท ยูเนี่ยนคาร์ไบด์ไทยแลนด์ จำกัด

1.2 Malathion® เป็นสารฆ่าแมลงกลุ่มออร์กาโนฟอสฟอรัส

ชื่อสามัญ malathion

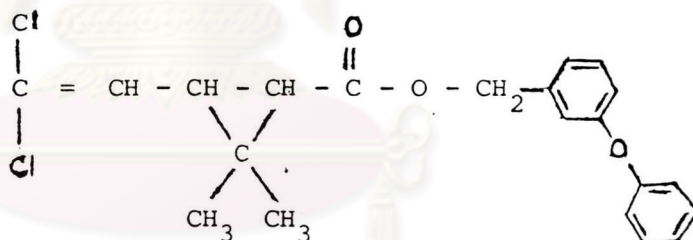
ชื่อเคมี o, o-dimethyl phosphorodithioate ester of diethyl mercaptosuccinate





ชนิดที่ใช้ Commercial grade 57% E. C.
การออกฤทธิ์ เป็นสารฆ่าแมลงและไรชนิดถูกตัวตายและกินตาย
ประโยชน์ ใช้ควบคุมและกำจัดแมลงได้หลายประเภท รวมทั้งเพลี้ยอ่อน ไร
แมงมุม เพลี้ยหอย แมลงวันบ้าน ยุง และยุงใช้กำจัดแมลง
ปากดูดและปากกัดอื่น ๆ ที่ทำลายพืช ไม้ผล ผัก ไม้ประดับ
และแมลงในโรงเก็บ เหมาะที่จะใช้ในแหล่งที่ต้องการให้ความ
ปลอดภัยแก่คนและสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม โดยเฉพาะใช้ทางสาธารณสุข
ผู้แทนจำหน่าย บริษัท เเซียโตสิ่งเสริมเกษตรกรรม จำกัด

- 1.3 Ambush® เป็นสารฆ่าแมลงกลุ่มไพโรทรอยด์
ชื่อสามัญ permethrin
ชื่อเคมี 3-phenoxybenzyl (+)-3-(2,2-dichlorovinyl)-2,
2-dimethyl cyclopropane carboxylate
สูตรโครงสร้าง



ชนิดที่ใช้ Commercial grade 10% E. C.
การออกฤทธิ์ เป็นสารฆ่าแมลงชนิดถูกตัวตายและกินตาย
ประโยชน์ ใช้กำจัดแมลงศัตรูพืช เช่น หนอนเจาะลำออเมริกัน หนอนคืบ
เพลี้ยกระโดด มวนแดง หนอนเจาะลำอสีชมพู หนอนกัดตา
ยาลูก ตั๊กแตน หนอนเจาะลำอฝ้าย แมลงหริ่งขาว เพลี้ยอ่อน
นอกจากนี้ยังใช้กำจัดแมลงศัตรูผัก ไม้ผล เช่น หอม มะเขือเทศ
ข้าวโพด องุ่น ฝรั่งเขียว ในทางสาธารณสุขยังใช้กำจัดยุง
ผู้แทนจำหน่าย บริษัท ไอซีไอเอเอเชียติก (เกษตร) จำกัด

2. สารเคมีและวัสดุ

- 2.1 อะซิโตน
- 2.2 น้ำกลั่น
- 2.3 น้ำเชื่อม 50%
- 2.4 น้ำเชื่อม 20%

3. อุปกรณ์และเครื่องมือ

- 3.1 เครื่องหยดสารละลาย (microapplicator) type L. V. 65 ของ Burkard
- 3.2 Tuberculin syringe ขนาด 1 มิลลิลิตร พร้อมเข็มฉีดเบอร์ 24
- 3.3 ตู้ควบคุมอุณหภูมิ (incubator) ของ Termaks
- 3.4 เครื่องชั่งละเอียด (analytical balance)
- 3.5 เครื่องชั่งธรรมดา ขนาด 1,000 กรัม ของคูโบต้า
- 3.6 ถังบรรจุก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ พร้อมวาล์วปรับความดัน
- 3.7 เครื่องแก้วที่จำเป็นต้องใช้ในห้องปฏิบัติการ เช่น ไซเคเกอร์ กระบอกตวง ปิเปต ลูกยางดูดสาร และขวดตวงขนาดต่าง ๆ (volumetric flask) เป็นต้น
- 3.8 กล้องพลาสติกขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 11 เซนติเมตร สูง 13 เซนติเมตร มีฝาปิดซึ่งบูไว้ด้วยตาข่ายมุ้งลวด
- 3.9 ขวดลบล้าง ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 7 เซนติเมตร สูง 18 เซนติเมตร ที่ฝาปิดเจาะรูไว้สำหรับสอดสายยางของคาร์บอนไดออกไซด์
- 3.10 ไฮโกรมิเตอร์ สำหรับวัดความชื้นสัมพัทธ์
- 3.11 เครื่องตุ้ม ตัดแปลงมาจากเครื่องตุ้มน้ำ ใยกับแบตเตอรี่ 12 โวลท์
- 3.12 กระบอกตาข่าย ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 4 เซนติเมตร สูง 12.5 เซนติเมตร ปิดด้วยโพงหนา 1 เซนติเมตรทั้งสองด้าน ที่โพงด้านบนเจาะรูไว้สำหรับเสียบหลอดแก้วบรรจุสารละลายหรือน้ำเชื่อมให้ผึ้งดูดกิน
- 3.13 ตาข่ายพลาสติก สำหรับหุ้มกระบอกตาข่ายที่ใช้ทดลองกับผึ้งโพรง
- 3.14 หลอดแก้วกันปิด ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 7 มิลลิเมตร ยาว 10 มิลลิเมตร ปลายหลอดข้างที่ปิดมีขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 2 มิลลิเมตร ใช้สำหรับใส่สารละลายให้ผึ้งดูดกิน

3.15 หลอดแก้วกันปิด ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 7 มิลลิเมตร ยาว 60 มิลลิเมตร ปลายหลอดข้างที่เปิดมีขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 3 มิลลิเมตร ใช้สำหรับใส่น้ำเชื่อม 50% ให้ผึ้งดูดกิน

3.16 ที่ใส่กระบอกตาข่าย ทำเป็นช่องกลมขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 5 เซนติเมตร มี 24 ช่อง ใช้สำหรับเคลื่อนย้ายผึ้งเข้าตู้ควบคุมอุณหภูมิ

3.17 สาลี่

3.18 ไมโครคอมพิวเตอร์ระบบซีพีเอ็ม (CP/M system) พร้อมทั้งโปรแกรมวิเคราะห์โพรบิต (Probit analysis) ของ Finney (1964)

4. สัตว์ทดลอง

4.1 ผึ้งพันธุ์ (*Apis mellifera* L.) ได้จากสถานีวิจัยผึ้งภาคสนามของหน่วยวิจัยชีววิทยาของผึ้ง ไร่พรหมพร อำเภอเขาส้ม จังหวัดตราด

4.2 ผึ้งโพรง (*Apis cerana* F.) ได้จากสถานีวิจัยผึ้งภาคสนามของหน่วยวิจัยชีววิทยาของผึ้ง ตำบลบางชันแตก จังหวัดสมุทรสงคราม

ผึ้งทั้งสองชนิดนี้ได้นำมาเลี้ยงสำหรับทดลองที่หน่วยวิจัยชีววิทยาของผึ้ง ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

5. วิธีดำเนินงานวิจัย

5.1 การศึกษาข้อมูลเบื้องต้น

ศึกษาและตรวจสอบเอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้องกับความ เป็นพิษของสารกำจัดศัตรูพืชต่อผึ้ง รวมทั้งวิธีการทดสอบความเป็นพิษของสารกำจัดศัตรูพืชต่อผึ้ง ผลของอุณหภูมิที่มีต่อความเป็นพิษของสารกำจัดศัตรูพืชที่มีต่อแมลงต่าง ๆ

5.2 ผักปฏิบัติการเลี้ยงผึ้ง

เป็นการฝึกเลี้ยงผึ้งในสภาพธรรมชาติ เพื่อให้เกิดความคุ้นเคยและสามารถแก้ปัญหาที่อาจเกิดขึ้นในระหว่างการทดลอง และเพื่อให้ผึ้งมีปริมาณพอเพียงสำหรับใช้ทดลอง

5.3 การทดลองสารฆ่าแมลง โดยวิธีหยดสารลงบนตัวผึ้ง

มีขั้นตอนและวิธีการดังนี้คือ

- เตรียมสารละลายคาร์บาริล โดยชั่ง Sevin[®] 85% W. P. มาจำนวน 0.11765 กรัม แล้วเติมอะซีโตนให้ได้สารละลายปริมาตร 10 มิลลิลิตร มีความเข้มข้นเป็น 1%
- เตรียมสารละลายมาลาโรอน โดยตุต Malathion[®] 57% E. C. มาจำนวน 0.175 มิลลิลิตร แล้วเติมอะซีโตนให้ได้สารละลายปริมาตร 10 มิลลิลิตร ซึ่งมีความเข้มข้น 1%
- เตรียมสารละลายเปอร์มีทริน โดยตุต Ambush[®] 10% E. C. มาจำนวน 1 มิลลิลิตร แล้วเติมอะซีโตนให้ได้สารละลายปริมาตร 10 มิลลิลิตร ซึ่งมีความเข้มข้น 1%
- เจือจางสารละลายที่เตรียมไว้ในตอนต้น เพื่อให้ได้ระดับความเข้มข้นต่าง ๆ ตามต้องการ โดยใช้อะซีโตนเป็นตัวทำละลาย

(รายละเอียดและวิธีการคำนวณแสดงไว้ในภาคผนวก)

5.3.1 การทดลองเบื้องต้นเพื่อหาค่าความเข้มข้นที่ทำให้ผึ้งตาย 10-90% โดยใช้เครื่องดูดผึ้งงานอายุประมาณ 2 สัปดาห์ นำมาใส่ลงในหลอดแก้วคาร์บอนไดออกไซด์ 15-20 วนาที แล้วเก็บไว้ในกล่องพลาสติกกล่องละประมาณ 70 ตัว บนฝากล่องมีลวดลวดน้ำเชื่อม 50% วางไว้เพื่อให้ผึ้งดูดกิน ขั้นตอนนี้เป็นกรเตรียมผึ้งไว้สำหรับการทดลอง ใส่ผึ้งที่เตรียมไว้แล้วแล้วถ่ายใส่กระบอกตาข่ายกระบอกละ 10 ตัว จำนวน 7 กระบอก กระบอกที่ 1 ให้เป็นชุดควบคุม กระบอกที่ 2-7 เป็นชุดทดลอง ปฏิบัติการทดลองต่อไปโดยใส่ผึ้งในแต่ละกระบอก แล้วเทลงบนกระดาษกรอง และหยดสารละลายที่ส่วนอกด้านล่าง (ventral thorax) ของผึ้งทุกตัว ๆ ละ 1 ไมโครลิตร เสร็จแล้วเทกลับคืนกระบอกเดิม สารละลายที่ใช้ได้แก่ อะซิโตน สำหรับชุดควบคุม และสารฆ่าแมลง 6 ระดับความเข้มข้น ได้แก่ 0.00001%, 0.0001%, 0.001%, 0.01%, 0.1% และ 1.0% สำหรับชุดทดลองที่ 2-7 ตามลำดับ บนฝาปิดของทุกกระบอกมีหลอดน้ำเชื่อม 50% เสียบไว้เพื่อเป็นอาหารของผึ้ง นำชุดทดลองทั้งหมดเข้าตู้ควบคุมอุณหภูมิที่อุณหภูมิ 18°C หรือ 25°C หรือ 32°C ตามที่กำหนดเป็นเวลานาน 24 ชั่วโมง แล้วนำมาตรวจลอบอัตราการตายของผึ้ง เพื่อหาช่วงความเข้มข้นที่ทำให้ผึ้งตาย 10-90% ช่วงความเข้มข้นที่ได้นี้จะนำไปกำหนดระดับความเข้มข้นเพื่อทดลองหาค่า LD_{50} ต่อไป เช่น ถ้าพบว่าช่วงความเข้มข้นที่ทำให้ผึ้งตาย 10-90% คือ 0.01-0.1% ก็สามารถจัดระดับความเข้มข้นเพื่อทดลองหาค่า LD_{50} เป็น 5 ระดับ คือ 0.01%, 0.03%, 0.05%, 0.07% และ 0.09% เป็นต้น

5.3.2 การทดลองเพื่อหาค่า LD_{50} นำผลจากการทดลองเบื้องต้นมาใช้ในการกำหนดระดับความเข้มข้นของสารฆ่าแมลงโดยลดหลั่นเป็น 5 ระดับ แล้วดำเนินการทดลองทำนองเดียวกันกับการทดลองเบื้องต้น บันทึกจำนวนผึ้งที่ตายในแต่ละความเข้มข้นเมื่อครบ 24 ชั่วโมง และคำนวณค่า LC_{50} ที่ 24 ชั่วโมง โดยใช้โปรแกรมโปรบิต (Probit analysis) ของ Finney (1964) แล้วเปลี่ยนเป็นค่า LD_{50} ต่อไป

(รายละเอียดและวิธีการคำนวณแสดงไว้ในภาคผนวก)

5.4 การทดลองสารฆ่าแมลง โดยวิธีผสมสารกับน้ำเชื่อมให้ด้งกิน

มีขั้นตอนและวิธีการดังนี้คือ

- เตรียมสารละลายคาร์บาริล โดยชั่ง Sevin[®] 85% W. P. มาจำนวน 0.11765 กรัม เติมอะซิโตนปริมาตร 1 มิลลิลิตร แล้วจึงเติมน้ำเชื่อม 20% ให้ได้สารละลาย ปริมาตร 10 มิลลิลิตร ซึ่งจะได้ความเข้มข้นรวมเป็น 1%
- เตรียมสารละลายมาลาไรออน โดยตุต Malathion[®] 57% E. C. จำนวน 0.175 มิลลิลิตร เติมอะซิโตนปริมาตร 1 มิลลิลิตร แล้วจึงเติมน้ำเชื่อม 20% ให้ได้ สารละลายปริมาตร 10 มิลลิลิตร ซึ่งจะได้ความเข้มข้นรวมเป็น 1%
- เตรียมสารละลายเปอร์มีทริน โดยตุต Ambush[®] 10% E. C. มาจำนวน 1 มิลลิลิตร เติมอะซิโตนปริมาตร 1 มิลลิลิตร แล้วจึงเติมน้ำเชื่อม 20% ให้ได้สารละลาย ปริมาตร 10 มิลลิลิตร ซึ่งจะได้ความเข้มข้นรวมเป็น 1%
- เจือจางสารละลายจากข้างต้นเพื่อให้ได้ความเข้มข้นตามต้องการ โดยใช้ อะซิโตนผสมกับน้ำเชื่อม 20% เป็นตัวเจือจาง

5.4.1 การทดลองเบื้องต้นเพื่อหาช่วงความเข้มข้นที่ทำให้ด้งตาย 10-90% โดยใช้เครื่องตุตด้งงานที่มีอายุประมาณ 2 สัปดาห์ นำมาลบลด้วยคาร์บอนไดออกไซด์เป็นเวลา 15-20 วินาที เทด้งที่ลบลแล้วลงในกล่องพลาสติก กล่องละประมาณ 70 ตัว เอาสำลีชุบน้ำเชื่อม 50% วางไว้ที่ฝากล่องทุกกล่อง เพื่อให้ด้งตุตกินเป็นเวลา 1 ชั่วโมง หลังจากนั้นจึงเอาสำลีออก ให้ด้งอดอาหารอีก 1 ชั่วโมงจึงเริ่มทดลองต่อไปดังนี้ บรรจุสารละลายสารฆ่าแมลง แต่ละความเข้มข้นตามที่กำหนดลงในหลอดแก้วเล็ก หลอดละ 0.1 มิลลิลิตร เพื่อให้ด้งกิน สำหรับชุดควบคุมนั้นใช้สารละลายอะซิโตนในน้ำเชื่อม 20% โดยไม่มีสารฆ่าแมลง นำด้งที่เตรียมไว้ในกล่องพลาสติกมาลบลอีกครั้ง แล้วใส่ในกระบอกตาข่ายกระบอกละ 10 ตัว จำนวน 7 กระบอก ปิดฝาแล้วนำหลอดแก้วบรรจุสารละลายที่เตรียมไว้เสียบที่ฝาของกระบอกตาข่ายจนครบทั้ง 7 กระบอก (โดยประมาณว่าด้งแต่ละตัวจะได้รับสารละลาย 10 ไมโครลิตร) นำกระบอกตาข่ายทั้งหมดเข้าตู้ควบคุมอุณหภูมิที่ 18°C, 25°C หรือ 32°C ตามที่กำหนด เมื่อด้งตุตกินสารละลายในหลอดแก้วจนหมด จึงให้น้ำเชื่อม 50% แก่ด้ง เมื่อครบ 24 ชั่วโมงนำด้งออกมาตรวจลบลอัตราการตาย เพื่อ

หาช่วงความเข้มข้นที่ทำให้ผึ้งตาย 10-90% แล้วกำหนดความเข้มข้น 5 ระดับ พร้อมทั้งชุดควบคุมเพื่อหาค่า LD_{50} ต่อไป

5.4.2 การทดลองเพื่อหาค่า LD_{50} นำผลจากการทดลองเบื้องต้นมาใช้ในการกำหนดระดับความเข้มข้นของสารฆ่าแมลงโดยลดหลั่นเป็น 5 ระดับ แล้วดำเนินการทดลองเช่นเดียวกับการทดลองเบื้องต้น บันทึกจำนวนผึ้งที่ตายในแต่ละความเข้มข้นเมื่อครบ 24 ชั่วโมง และคำนวณค่า LC_{50} ที่ 24 ชั่วโมง โดยใช้โปรแกรมวิเคราะห์โพรบิต (Probit analysis) ของ Finney (1964) แล้วเปลี่ยนเป็นค่า LD_{50} ต่อไป

ขอบเขตของการวิจัย

1. สัตว์ทดลองที่ใช้มี 2 ชนิด คือ ผึ้งพันธุ์ (*Apis mellifera* L.) และผึ้งโพรง (*Apis cerana* F.)
2. สารฆ่าแมลงที่ใช้ทดลองมี 3 ชนิด คือ คาร์บาริล (carbaryl) มาลาไรออน (malathion) และเพอร์มีทริน (permethrin)
3. อุณหภูมิที่ใช้ทดลองมี 3 ระดับ คือ 18°C , 25°C และ 32°C
4. แต่ละการทดลองกระทำ 3 ซ้ำ

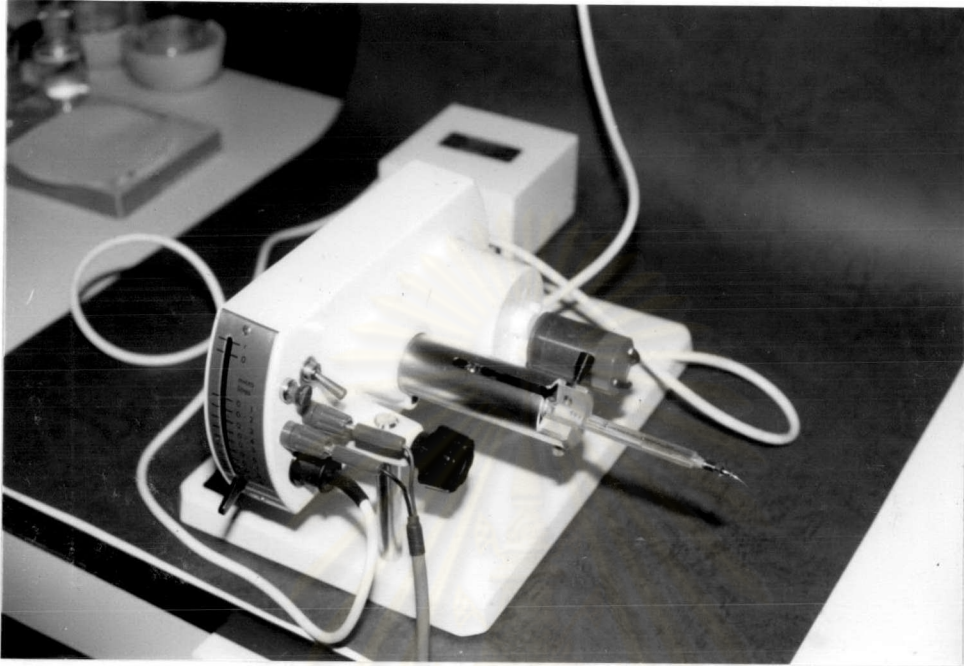
สถานที่และระยะเวลาของการทดลอง

การทดลองครั้งนี้ได้ทดลองที่ห้องปฏิบัติการพิษวิทยาของแมลง หน่วยวิจัยชีววิทยาของผึ้ง และห้องปฏิบัติการนิเวศวิทยา ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ตั้งแต่เดือนสิงหาคม 2529 ถึงเดือนพฤษภาคม 2530

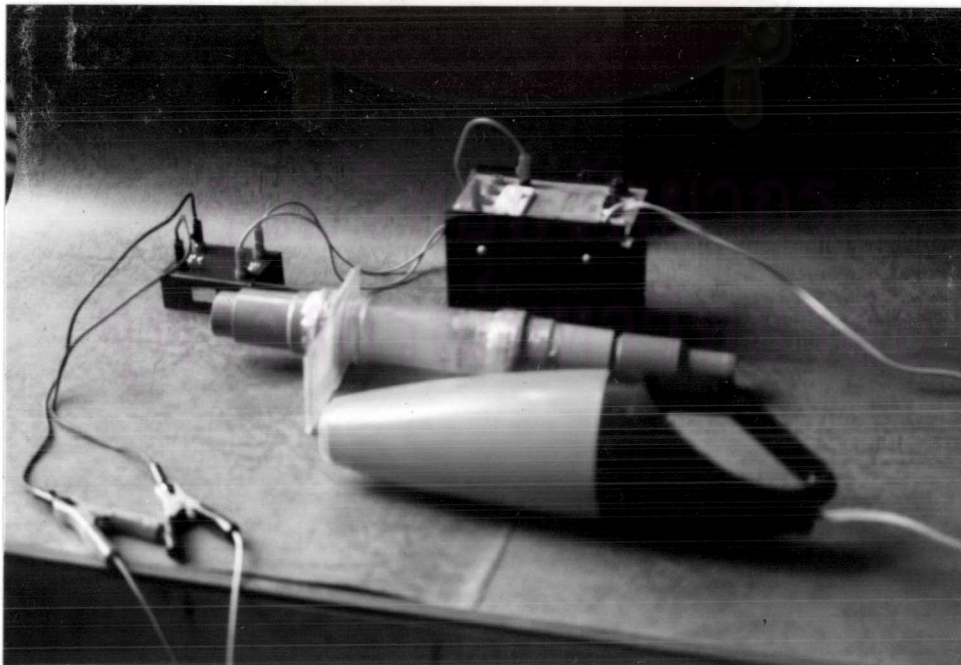


ภาพที่ 1 แสดงลักษณะของผึ้งที่ใช้ในการทดลอง คือ ผึ้งพันธุ์ (ขวามือ) และผึ้งโพรง (ซ้ายมือ)

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



ภาพที่ 2 แสดงลักษณะของเครื่องหยดสารละลาย (Microapplicator)



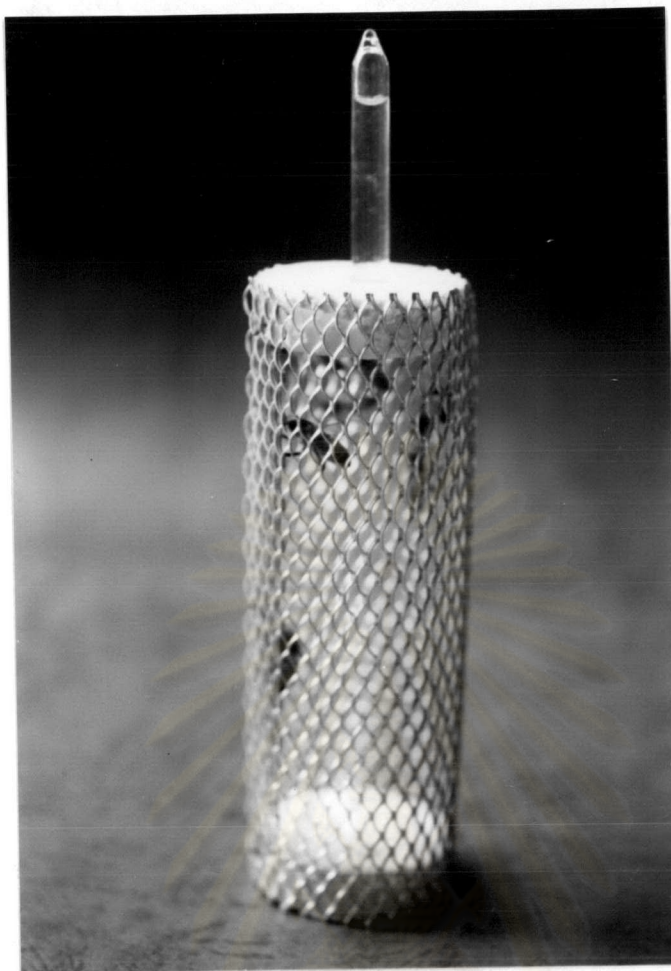
ภาพที่ 3 แสดงลักษณะของเครื่องดูดผึ้ง



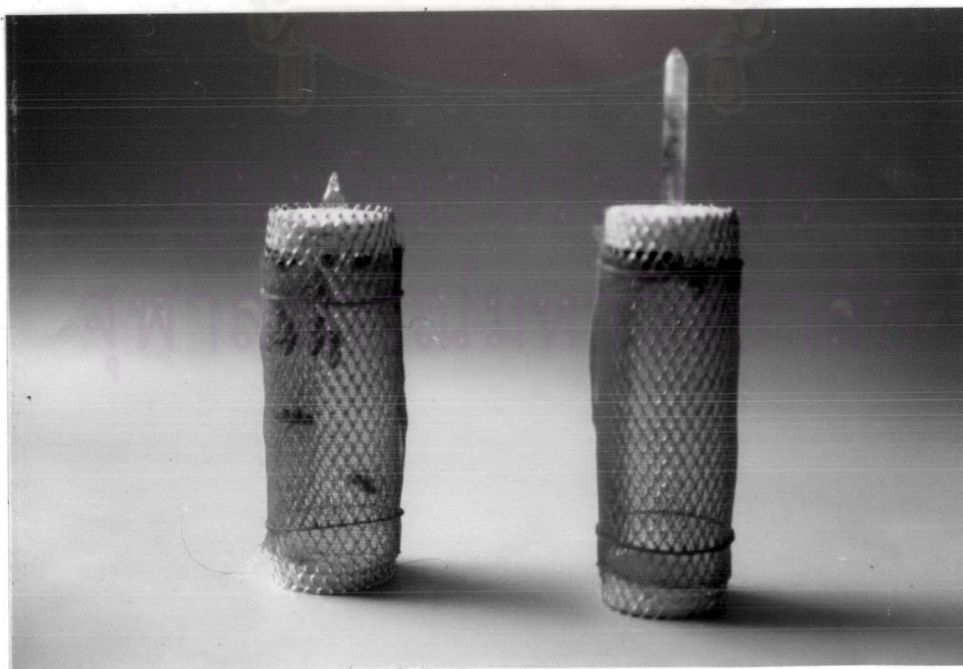
ภาพที่ 4 แสดงลักษณะของกล่องพลาสติกสำหรับฟักดั่ง ก่อนการทดลอง
ฝาด้านบนมีสาลี่ยูนน้ำ เยื่อมาให้ผึ้ง กิน เป็นอาหาร



ภาพที่ 5 แสดงลักษณะของที่ใส่กระบอกตาข่ายเพื่อนำเข้า
ตู้ควบคุมอุณหภูมิ



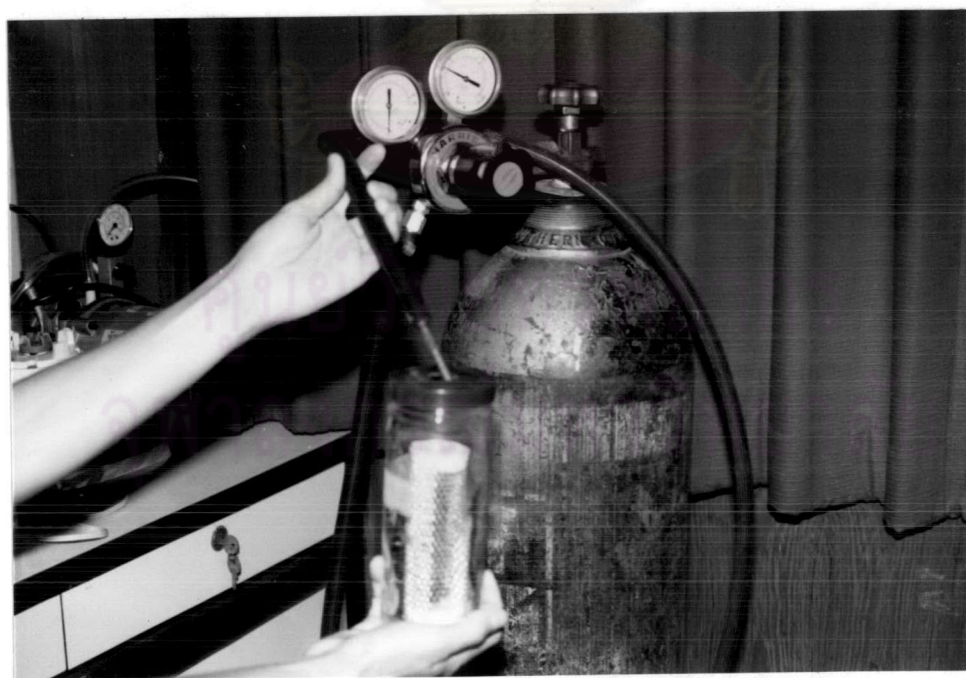
ภาพที่ 6 แสดง ลักษณะของ กระบอกตาข่ายใส่ฝักรังผึ้งและหลอดแก้วใส่น้ำาเชื่อมให้ผึ้งกินหลังจากให้ลารฆ่าแมลงแล้ว



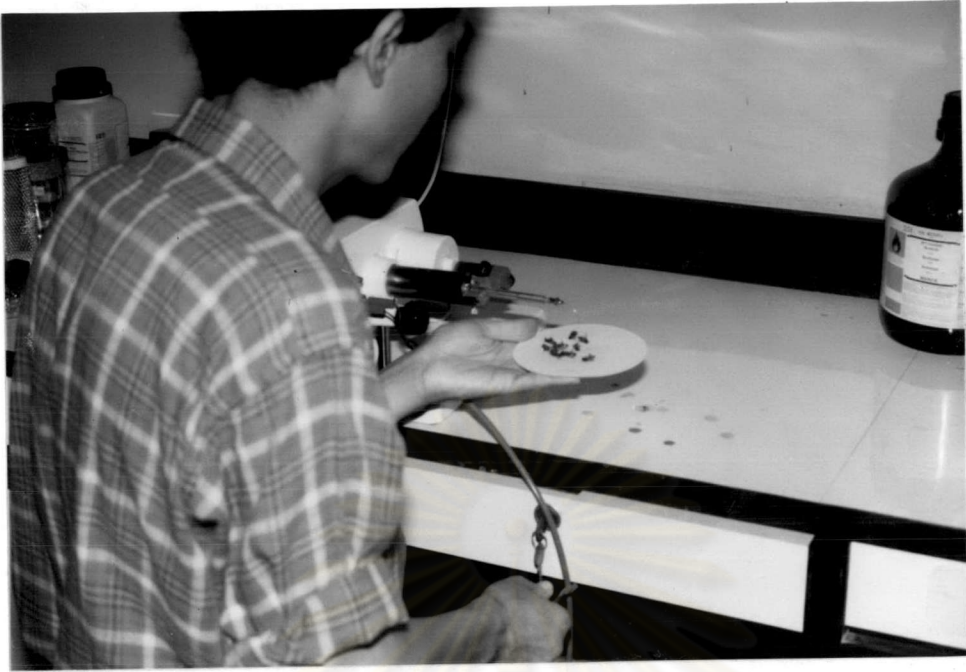
ภาพที่ 7 แสดง ลักษณะของกระบอกตาข่ายใส่ฝักรังผึ้งหมักด้วยตาข่ายพลาสติกเพื่อไม่ให้ฝักรังผึ้งหลุดออกมา และหลอดแก้วใส่น้ำาละลาย (ข้าวมีอ) และหลอดแก้วใส่น้ำาเชื่อมให้ผึ้งกิน (ยวามือ)



ภาพที่ 8 แสดงการตักสิ่งเพื่อนำไปทดลอง



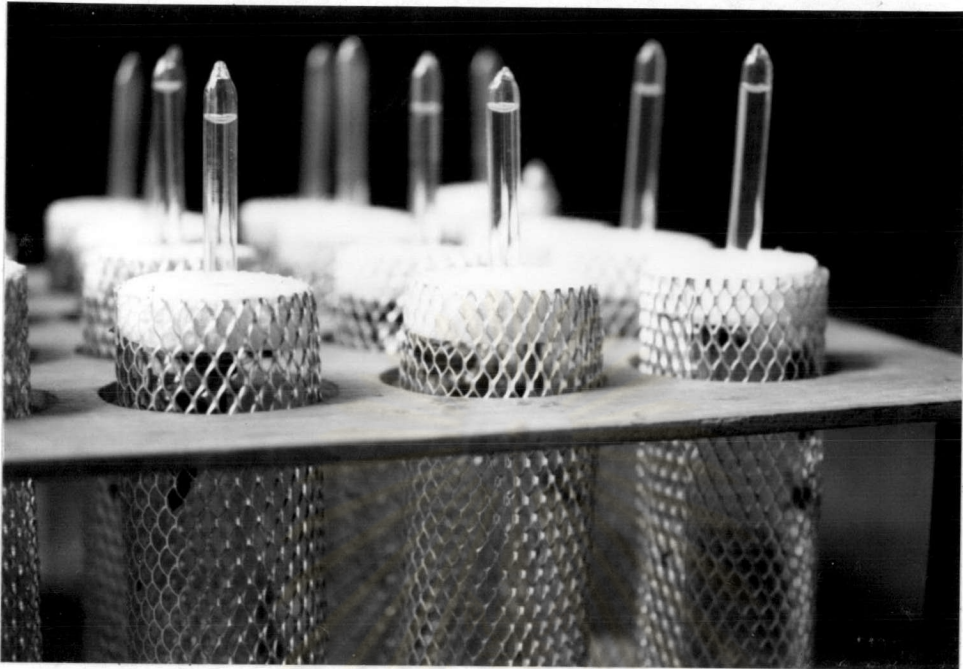
ภาพที่ 9 แสดงการสลับฝั่งระหว่างทดลองด้วยก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์



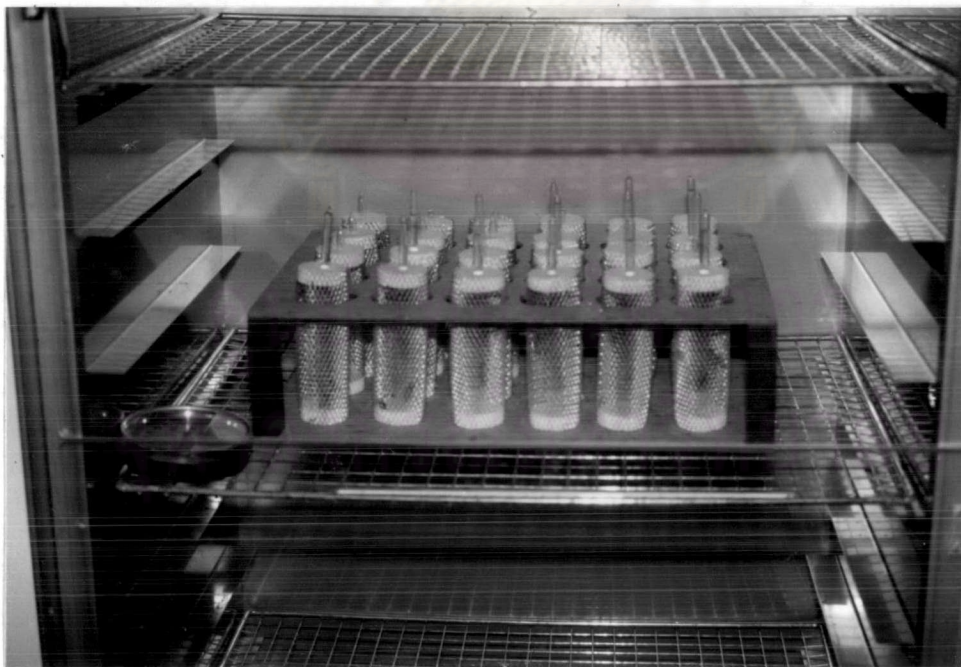
ภาพที่ 10 แสดงการทดลองโดยวิธีหยดสารลงบนตัวผึ้ง



ภาพที่ 11 แสดงการทดลองโดยวิธีผสมสารกับน้ำเชื่อมให้ผึ้งกิน



ภาพที่ 12 แสดงการให้น้ำเชื่อมแก่ผึ้งหลังการให้ลารฆ่าแมลง



ภาพที่ 13 แสดงการนำผึ้งเข้าตู้ควบคุมอุณหภูมิ