ผลของอาหารเสริมผึ้งผสมโพรไบโอติกส์ต่อการสร้างสเปิร์มของผึ้งพันธุ์
Effect of Supplementary Diets Mixed with Probiotics on Sperms Production of *Apis mellifera*

สมศักดิ์ อยู่บริบูรณ์[1] วนิดา ชื่นชัน[1*] ธนพงศ์ สำเภาลอย[2] และ ธราทิพย์ ปาวะระ[2]
Somsak Yooboriboon[1] Wanida Chuenchan[1] Thanaphong Sumpaoloi[2] and Tharathip Pawara[2]
[1]สาขาวิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยราชภัฏบ้านสมเด็จเจ้าพระยา
[2]ศูนย์ส่งเสริมเทคโนโลยีการเกษตรด้านแมลงเศรษฐกิจ จังหวัดเชียงใหม่
[1]Department of Biology, Faculty of Science and Technology, Bansomdejchaopraya Rajabhat University
[2]Agricultural Technology Promotion Center (Economic insects), Chiangmai Province
วันที่ส่งบทความ : 28 เมษายน 2563 วันที่แก้ไขบทความ : 2 พฤศจิกายน 2563 วันที่ตอบรับบทความ : 11กุมภาพันธ์ 2564
Received: 28 April 2020, Revised: 2 November 2020, Accepted: 11 February 2021

บทคัดย่อ

วัตถุประสงค์ของงานวิจัยนี้ เพื่อศึกษาผลของอาหารเสริมผึ้งผสมโพรไบโอติกส์ต่อการสร้างสเปิร์มของผึ้งพันธุ์ (*Apis mellifera*) โดยใช้เชื้อแบคทีเรีย 4 สายพันธุ์ ได้แก่ *Lactobacillus casei* TISTR 390, *L. plantarum* TISTR 541, *L. curvatus* TISTR 938 และ *L. acidophilus* TISTR 2365 สุ่มเก็บตัวอย่างผึ้งตัวผู้ที่ทำเครื่องหมายในวันที่ 7, 14, 21, 28 และ 35 (5 ตัว/รัง) รีดน้ำเชื้อและตรวจนับจำนวนสเปิร์มผึ้งด้วยเครื่อง haemacytometer ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ที่กำลังขยาย 400 เท่า พบว่าผึ้งตัวผู้ในทุกชุดทดสอบสามารถสร้างสเปิร์มสูงสุดในวันที่ 14 โดยผึ้งตัวผู้ที่เลี้ยงด้วยอาหารเสริมผึ้งผสม *L. plantarum* สร้างสเปิร์มได้สูงสุดเท่ากับ $2.095\pm0.147\times10^6$ เซลล์ต่อไมโครลิตร รองลงมาคือ *L. casei*, *L. curvatus* และ *L. acidophilus* สร้างสเปิร์มได้เท่ากับ $1.359\pm0.169\times10^6$, $1.300\pm0.185\times10^6$ และ $1.214\pm0.120\times10^6$ เซลล์ต่อไมโครลิตร ตามลำดับ ซึ่งผึ้งตัวผู้ที่ได้รับอาหารเสริมผึ้งผสมโพรไบโอติกส์ในทุกชุดทดสอบสามารถสร้างสเปิร์มได้มากกว่าผึ้งตัวผู้ที่เลี้ยงด้วยอาหารตามธรรมชาติ ($8.790\pm0.300\times10^5$ เซลล์ต่อไมโครลิตร) และผึ้งตัวผู้ที่เลี้ยงด้วยอาหารเสริมผึ้งที่ไม่ได้ผสมโพรไบโอติกส์ ($8.606\pm0.742\times10^5$ เซลล์ต่อไมโครลิตร) อย่างมีนัยสำคัญ ($p\leq0.05$) จากงานวิจัยนี้อธิบายได้ว่าเชื้อทั้ง 4 สายพันธุ์ สามารถส่งเสริมการสร้างสเปิร์มในผึ้งพันธุ์ สามารถนำไปพัฒนาเป็นส่วนผสมในผลิตภัณฑ์อาหารเสริมสำหรับเลี้ยงผึ้งพันธุ์

คำสำคัญ : อาหารเสริมผึ้ง โพรไบโอติกส์ สเปิร์ม ผึ้งพันธุ์

*ที่อยู่ติดต่อ E-mail address: wanida.ch@bsru.ac.th

Abstract

The research aimed to study the effect of supplementary diets mixed with probiotics on sperms production of *Apis mellifera*. Four species of the probiotics were *Lactobacillus casei* TISTR 390, *L. plantarum* TISTR 541, *L. curvatus* TISTR 938 and *L. acidophilus* TISTR 2365. Taking a random sampling of marked drones for 7, 14, 21, 28 and 35 days (5 drones/hive) and collected semen, counting the number of sperms by haemacytometer under microscope (400X). The result showed that all test could produce the highest sperms on 14 days. In accordance with the research, it's found that the number of sperms from drones fed with supplementary diet mixed with probiotics from the highest to the lowest is *L. plantarum* ($2.095\pm0.147\times 10^6$ cells/µl), *L. casei* ($1.359\pm0.169\times 10^6$ cells/µl), *L. curvatus* ($1.300\pm0.185\times 10^6$ cells/µl) and *L. acidophilus* ($1.214\pm0.120\times 10^6$ cells/µl) respectively. In which the drones treated with supplementary diet mixed with probiotic in all test could produce more sperms than the drones fed with natural food ($8.790\pm0.300\times 10^5$) and drones fed with supplementary diet that do not contain probiotics ($8.606\pm0.742\times10^5$), significantly different ($p\leq0.05$). The research indicates that all the four species of probiotics can be progressively developed to be mixture of supplementary diet for *A. mellifera*.

Keywords: Supplementary diet, Probiotics, Sperm, *Apis mellifera*

1. บทนำ

ประเทศไทยอุดมสมบูรณ์ไปด้วยพันธุ์ไม้นานาชนิดที่เหมาะสมต่อการเลี้ยงผึ้ง จึงมีการส่งเสริมให้เกษตรกรเลี้ยงเป็นอาชีพ ผึ้งที่นิยมเลี้ยงมากที่สุดคือผึ้งพันธุ์ (*Apis mellifera*) [1] โดยส่งเสริมให้มีการเลี้ยงทั้งในแหล่งที่มีพืชอาหารตามธรรมชาติ และเคลื่อนย้ายไปตามสวนผลไม้ มีเกษตรกรที่เลี้ยงผึ้งพันธุ์ไม่น้อยกว่า 1,100 ฟาร์ม ได้ผลผลิตน้ำผึ้งมากกว่า 10,000 ตัน ทำให้เกิดรายได้กับเกษตรกรทั้งที่บริโภคในประเทศและส่งออกไปต่างประเทศ มูลค่ารวมทั้งปีประมาณ 148 ล้านบาท คิดเป็นกำไรสุทธิต่อรายประมาณ 3.5 แสนบาทต่อปี [2] แต่ปัจจุบันปัญหาสำคัญที่เกษตรกรผู้เลี้ยงผึ้งทั่วโลกกำลังเผชิญ คือปัญหาฝูงผึ้งล่มสลายอันเนื่องมาจากหลายปัจจัย เช่น โรคและศัตรูผึ้ง การขาดแคลนพืชอาหาร [3] นอกจากนี้ยังพบว่า ในช่วงหลายทศวรรษที่ผ่านมามีแนวโน้มการใช้ยาฆ่าแมลงในผลผลิตทางการเกษตรเพิ่มขึ้นอย่างต่อเนื่อง จากรูปแบบการเกษตรพืชเชิงเดี่ยว ส่งผลให้แหล่งอาหารที่เหล่ามวลผึ้งเสาะหาเพื่อผลิตน้ำหวานจากเกสรดอกไม้ลดน้อยลง ถือเป็นภัยคุกคามที่ทำให้เกิดผลกระทบต่อเกษตรกรผู้เลี้ยงผึ้งเป็นอย่างมาก [4] ซึ่งฤดูพืชออกดอกเป็นช่วงที่ผึ้งได้รับสารพิษมากสุด เนื่องจากเป็นช่วงที่เกษตรกรมีการใช้สารฆ่าแมลงโดยตรงกับช่อดอกที่ผลิออกใหม่ ทำให้ผึ้งได้รับสารเหล่านั้นโดยตรงตามไปด้วย นอกจากผึ้งงานที่ทำหน้าที่ออกไปหาอาหารจะได้รับสารพิษแล้ว ผึ้งที่อยู่ในรังก็อาจได้รับสารพิษไปด้วย เนื่องจากผึ้งงานอาจจะได้รับสารเคมีจากเกสรหรือ

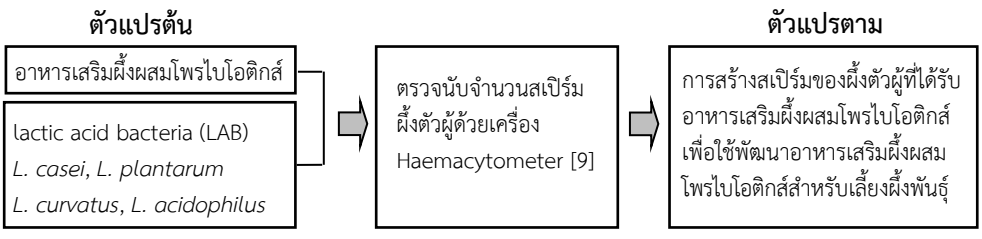
น้ำหวานดอกไม้ที่มีการปนเปื้อนสารเคมีมาเลี้ยงประชากรในรัง ทั้งนางพญา ผึ้งตัวผู้ และตัวอ่อน โดยสัญญาณที่บ่งชี้ว่าผึ้งได้รับสารพิษ คือ ความหนาแน่นของประชากรผึ้งภายในรังลดลง มีผึ้งในช่วงอายุเดียวกันตายหน้ารังผึ้งจำนวนมาก จนอาจเกิดปัญหาการหนีรัง [5]

จากการเปรียบเทียบการมีชีวิตของสเปิร์มที่เก็บจากผึ้งตัวผู้ในประเทศสหรัฐอเมริกาที่เลี้ยงด้วยขี้ผึ้งที่ปราศจากยาฆ่าแมลงและผึ้งตัวผู้ที่เลี้ยงในขี้ผึ้งที่ปนเปื้อนยาฆ่าแมลง พบว่าผึ้งที่ได้รับยาฆ่าแมลงทุกกลุ่มมีภาวะจำนวนสเปิร์มต่ำกว่าผึ้งปลอดสารพิษอย่างเด่นชัด ผลลัพธ์นี้เสริมความคิดที่ว่าการปนเปื้อนของยาฆ่าแมลงในขี้ผึ้งส่งผลเสียต่อประสิทธิภาพการสร้างเซลล์สืบพันธุ์ของผึ้งตัวผู้ และอาจส่งผลกระทบต่อสภาพรังรวมถึงสุขภาพของนางพญาและผึ้งงานในรัง [6] จากการลงพื้นที่สำรวจร่วมกับเกษตรกรและนักวิชาการเกษตรผู้เชี่ยวชาญด้านผึ้ง พบว่าผึ้งตัวผู้มีพฤติกรรมเปลี่ยนแปลงไป เคลื่อนไหวค่อนข้างช้า และเมื่อนำผึ้งตัวผู้มารีดน้ำเชื้อเพื่อนับจำนวนสเปิร์ม พบว่ามีปริมาณสเปิร์มน้อยกว่าปกติ นอกจากปัญหาเรื่องสารกำจัดศัตรูพืช อีกหนึ่งในปัญหาสำคัญของการเลี้ยงผึ้งในปัจจุบันคือความหนาแน่นของพืชอาหารที่ลดลง สภาพดินฟ้าอากาศที่เปลี่ยนแปลงอย่างรุนแรงส่งผลกระทบต่อการออกดอกของพืช สิ่งเหล่านี้ล้วนแล้วแต่ทำให้เกิดปัญหาทั้งด้านปริมาณและคุณภาพของพืชอาหาร เมื่อขาดแคลนอาหาร ผึ้งจะอ่อนแอ ไม่ออกหาอาหาร วางไข่ลดลง ภูมิต้านทานต่อโรคผึ้งและศัตรูผึ้งต่ำ ทำให้จำนวนประชากรของผึ้งลดลง และอาจเกิดการทิ้งรังในที่สุด เกษตรกรหลายรายแก้ปัญหาด้วยการเลี้ยงผึ้งแบบเคลื่อนย้ายไปตามที่ต่าง ๆ ส่งผลให้ต้นทุนที่ใช้ในการเลี้ยงผึ้งสูงขึ้น เกษตรกรส่วนใหญ่จึงแก้ปัญหาด้วยการเลี้ยงผึ้งด้วยอาหารเสริมซึ่งเป็นผลิตภัณฑ์ที่ใช้ทดแทนพืชอาหารตามธรรมชาติ แต่คุณภาพของอาหารเสริมที่ใช้อยู่ยังไม่ดีเท่าที่ควรเนื่องจากขาดจุลินทรีย์ตามธรรมชาติที่มีคุณสมบัติเป็นโพรไบโอติกส์ที่ส่งผลดีต่อสุขภาพ ช่วยปรับให้เกิดความสมดุลของเชื้อจุลินทรีย์ภายในระบบทางเดินอาหาร ทนต่อสภาพความเป็นกรดและด่าง โดยเข้าจับที่บริเวณผิวของระบบทางเดินอาหาร และผลิตสารที่มีคุณสมบัติยับยั้งการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์ชนิดอื่น ก่อให้เกิดประโยชน์ต่อสุขภาพ และสามารถแข่งขันกับจุลินทรีย์ก่อโรค รวมทั้งสามารถกระตุ้นให้เกิดระบบภูมิคุ้มกันในสัตว์ [7]-[8] จากปัญหาทั้งด้านพืชอาหาร และสภาพความอ่อนแอของผึ้ง นักวิชาการจึงมีการแก้ปัญหาด้วยการคัดเลือกผึ้งนางพญา และผึ้งตัวผู้ เพื่อนำมาใช้ในการผสมเทียม แต่หากผึ้งตัวผู้มีพฤติกรรมเชื่องช้าไม่กระปรี้กระเปร่า จำนวนสเปิร์มลดลง การผสมเทียมก็อาจไม่ประสบความสำเร็จ

จากปัญหาที่ได้กล่าวมา ผู้วิจัยจึงมีแนวคิดในการศึกษาผลของโพรไบโอติกส์ต่อการสร้างสเปิร์มของผึ้งพันธุ์ ผลการวิจัยจะเป็นข้อมูลพื้นฐานสำคัญเพื่อพัฒนาผลิตภัณฑ์อาหารเสริมสำหรับใช้เลี้ยงผึ้งพันธุ์ เพื่อแก้ปัญหาการขาดแคลนพืชอาหารอีกทั้งส่งผลเชิงบวกต่อการสร้างสเปิร์มในผึ้งพันธุ์ ซึ่งจะเป็นนวัตกรรมที่สามารถส่งให้เกษตรผู้เลี้ยงผึ้งได้ใช้ประโยชน์ในการสร้างเสริมสุขภาพของผึ้งพันธุ์ต่อไป

2. วิธีดำเนินการวิจัย

2.1 กรอบแนวคิดของการวิจัย



2.2 การเตรียมสัตว์ที่ใช้ดำเนินการวิจัย

ผึ้งพันธุ์ (*A. mellifera*) จำนวน 30 รัง เป็นรังแบบชั้นเดียว จำนวน 4 คอน ได้ความอนุเคราะห์จากศูนย์ส่งเสริมเทคโนโลยีการเกษตรด้านแมลงเศรษฐกิจ จังหวัดเชียงใหม่ กระทรวงเกษตรและสหกรณ์ เลือกบริเวณที่ตั้งรังให้ห่างจากแหล่งอาหารและวางกับดักเกสรที่ปากทางเข้ารังเพื่อป้องกันอาหารจากภายนอกเข้ามาในรังผึ้งพันธุ์ที่ทำการทดลอง

2.3 การเตรียมจุลินทรีย์ที่ใช้ดำเนินการวิจัย

1) การเตรียมแบคทีเรีย *L. 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

2) นำเชื้อบริสุทธิ์จากอาหารแข็ง MRS เลี้ยงในอาหารเหลว MRS ปริมาตร 200 มิลลิลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 35-37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง ในสภาวะไร้อากาศ จากนั้นนำมาหมุนเหวี่ยงที่ความเร็ว 6,000 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที ล้างเซลล์ด้วยสารละลายโซเดียมคลอไรด์ 0.85 เปอร์เซ็นต์ (น้ำหนักต่อปริมาตร) 3 ครั้ง แล้วนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร ปรับความขุ่นของเชื้อเปรียบเทียบกับความขุ่นมาตรฐานแมกซ์ฟาร์แลนด์ (McFarland) เบอร์ 0.5 จะได้เชื้อที่มีความขุ่นเท่ากับ 0.1 ซึ่งจะทำให้มีปริมาณเชื้อประมาณ 1.0×10^8 CFU/mL [10]

2.4 การเตรียมอาหารเสริมผึ้งผสมโพรไบโอติกส์สำหรับใช้เลี้ยงผึ้งพันธุ์

นำอาหารเสริมผึ้ง 500 กรัม และ แป้งถั่วเหลือง 1,250 กรัม ผสมให้เข้ากัน จากนั้นเติมน้ำผึ้ง (ความเข้มข้นเท่ากับ 80 บริกซ์) 2,000 กรัม จากนั้นนวดต่อให้เข้ากันจนเป็นก้อนไม่ติดมือ แบ่งออกเป็น 5 ส่วน ส่วนละ 750 กรัม ค่อย ๆ เติมโพรไบโอติกส์ที่เตรียมไว้จากข้อ 2.3 ได้แก่ *L. casei*, *L. plantarum*, *L. curvatus* และ *L. acidophilus* ลงในอาหารแต่ละส่วนที่แยกไว้ โดยให้มีปริมาณแบคทีเรียเริ่มต้นเท่ากัน 10^8 CFU/g แบ่งเป็นก้อนกลมแบนขนาด 150 กรัม

2.5 การให้อาหารเสริมผึ้งผสมโพรไบโอติกส์แก่ผึ้งพันธุ์

วางแผนการทดลองแบบสุ่มสมบูรณ์ (Completely Randomized Design : CRD) โดยแบ่งเป็น 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 ด้วยอาหารตามที่วางแผนการทดลองเป็นระยะเวลา 2 สัปดาห์ หลังจากนั้นทำการสร้างคอนผึ้งตัวผู้เพื่อศึกษาผลของอาหารเสริมผึ้งผสมโพรไบโอติกส์ต่อการสร้างสเปิร์มของผึ้งพันธุ์

2.6 การตรวจนับจำนวนสเปิร์มผึ้งตัวผู้ตามวิธีของ Rousseau, et al. [9]

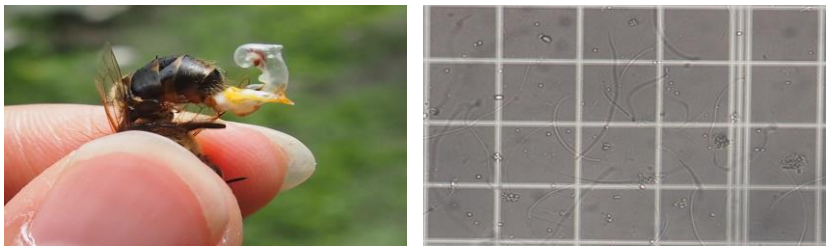
ทำการสร้างคอน หรือคัดเลือกคอนที่มีระยะดักแด้ใกล้เป็นผึ้งตัวผู้เต็มวัย (Seal brood comb) ระยะเวลา 23 วัน [11] เมื่อผึ้งออกจากหลอดรวง ทำการแต้มสี acrylic ที่บริเวณส่วนอก (Thorax) ของผึ้งตัวผู้ที่เกิดใหม่ ชุดการทดลองละ 250 ตัว (50 ตัว/รัง) กำหนดให้สีแตกต่างกันในแต่ละชุดการทดลองแสดงดังรูปที่ 1

(ก) (ข)

รูปที่ 1. ลักษณะของรังผึ้งและการทำสัญลักษณ์ผึ้งที่ใช้ในชุดทดลอง (ภาพถ่ายเมื่อ 7 เมษายน 2562)
(ก) การสร้างคอนผึ้งตัวผู้ (ข) การแต้มสี acrylic ที่บริเวณส่วนอกของผึ้งตัวผู้ที่เกิดใหม่

ทำการรีดน้ำเชื้อผึ้งตัวผู้ที่ทำเครื่องหมายในวันที่ 7, 14, 21, 28 และ 35 (5 ตัว/รัง) แสดงดังรูปที่ 2 ก และตรวจนับจำนวนสเปิร์มผึ้งตัวผู้ด้วยเครื่อง haemacytometer (depth 0.1 mm, 1/400 mm^2) โดยการนำน้ำเชื้อปริมาตร 0.2 ไมโครลิตร ผสมกับ Tris buffer ปริมาตร 1.5 มิลลิลิตร ที่ปราศจากเชื้อ (dilution factor = 7500) ตรวจนับจำนวนสเปิร์มใน 5 ช่อง บริเวณ 4 มุม และตรงกลาง (0.1 mm^3 = 0.1 ไมโครลิตร) ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ที่กำลังขยาย 400 เท่า แสดงดังรูปที่ 2 ข ทำการตรวจนับจำนวนสเปิร์ม 3 ซ้ำ โดยเปลี่ยนสไลด์ใหม่ทุกครั้ง จะได้จำนวนสเปิร์มทั้งหมด 15 ช่อง ต่อผึ้งตัวผู้ 1 ตัว นำผลที่ได้ไปคำนวณจำนวนสเปิร์มตามสูตร ดังนี้

$$\text{จำนวนสเปิร์ม} = \frac{\text{จำนวนสเปิร์มใน 15 ช่อง} \times \text{dilution factor} \times \text{ปริมาตรของน้ำเชื้อ (ไมโครลิตร)}}{1.5}$$



(ก) (ข)

รูปที่ 2. การนับจำนวนสเปิร์ม (ก) การรีดน้ำเชื้อผึ้งตัวผู้ (ข) สเปิร์มผึ้งตัวผู้ใต้กล้องจุลทรรศน์ (ภาพถ่ายเมื่อ 7 เมษายน 2562)

2.7 สังเกตการเคลื่อนที่ของสเปิร์มภายใต้กล้องจุลทรรศน์

นำน้ำเชื้อผึ้งตัวผู้ที่เจือจางแล้วจากข้อ 2.6 หยดบน heamacytometer สังเกตการเคลื่อนที่ของสเปิร์มใน 5 ช่อง บริเวณ 4 มุม และตรงกลาง ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ที่กำลังขยาย 400 เท่า ทำการทดลอง 3 ซ้ำ โดยเปลี่ยนสไลด์ใหม่ทุกครั้ง สังเกตการเคลื่อนที่ของสเปิร์มทั้งหมด 15 ช่อง และนับจำนวนช่องที่มีการเคลื่อนที่ของสเปิร์มอย่างรวดเร็ว โดยมีเกณฑ์การเคลื่อนที่ของสเปิร์ม แสดงดังตารางที่ 1

ตารางที่ 1. หลักเกณฑ์การสังเกตอัตราการเคลื่อนที่ของอสุจิ

จำนวนช่องที่มีการเคลื่อนที่ของสเปิร์มอย่างรวดเร็ว	ผลการประเมิน	การแปลผล	การเคลื่อนที่ (%)
15 ช่อง	+++++	เคลื่อนที่เร็วมาก	100
12-14 ช่อง	++++	เคลื่อนที่ค่อนข้างเร็ว	80
9-11 ช่อง	+++	เคลื่อนที่ปานกลาง	60
6-8 ช่อง	++	เคลื่อนที่ค่อนข้างช้า	40
3-5 ช่อง	+	เคลื่อนที่ช้ามาก	20
0-2 ช่อง	-	ไม่มีการเคลื่อนที่	0

2.8 การวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ

วิเคราะห์หาค่าความแปรปรวนของค่าเฉลี่ยด้วยวิธีการวิเคราะห์ความแปรปรวนที่มีตัวแปรอิสระเพียงตัวเดียว (One way analysis of variance) และเปรียบเทียบความแตกต่างค่าเฉลี่ยระหว่างชุดการทดลองด้วยวิธีของ Duncan (Duncan's new multiple range test) ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์

3. ผลการทดลองและวิจารณ์

3.1 ผลการตรวจนับจำนวนสเปิร์มผึ้งตัวผู้

จากการตรวจนับจำนวนสเปิร์มของผึ้งตัวผู้ ตามวิธีของ Rousseau et al. [9] ตั้งแต่ผึ้งตัวผู้เริ่มออกจากหลอดรวง (ระยะเวลา 23 วัน) ทำการรีดน้ำเชื้อผึ้งตัวผู้ที่ทำเครื่องหมายด้วยวิธีการแต้มสี acrylic ที่บริเวณส่วนอก (Thorax) ของผึ้งตัวผู้ที่เกิดใหม่ ในวันที่ 7, 14, 21, 28 และ 35 (5 ตัว/รัง/วัน) ตรวจนับจำนวนสเปิร์มด้วยเครื่อง haemacytometer ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ที่กำลังขยาย 400 เท่า และนำผลที่ได้

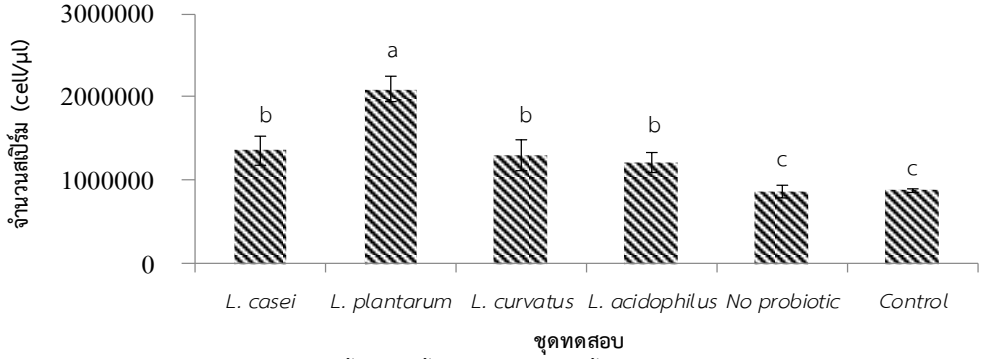
ไปคำนวณจำนวนสเปิร์ม พบว่าผึ้งตัวผู้ในทุกชุดทดสอบสามารถสร้างสเปิร์มได้สูงสุดในวันที่ 14 รองลงมาคือวันที่ 21, 28, 7 และ 35 ตามลำดับ และเมื่อเปรียบเทียบจำนวนสเปิร์มในแต่ละวันพบว่ามีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ($p \leq 0.05$) โดยวันที่ 14 ผึ้งตัวผู้ที่เลี้ยงด้วยอาหารเสริมผึ้งผสม *L. plantarum* สามารถสร้างสเปิร์มได้สูงสุดเท่ากับ $2.095\pm0.147\times10^{6}$ เซลล์ต่อไมโครลิตร รองลงมาคือผึ้งตัวผู้ที่เลี้ยงด้วยอาหารเสริมผึ้งผสม *L. casei*, *L. curvatus*, *L. acidophilus* ผึ้งตัวผู้ที่เลี้ยงด้วยอาหารตามธรรมชาติ และผึ้งตัวผู้ที่เลี้ยงด้วยอาหารเสริมผึ้งที่ไม่ได้ผสมโพรไบโอติกส์ สามารถสร้างสเปิร์มได้เท่ากับ $1.359\pm0.169\times10^{6}$, $1.300\pm0.185\times10^{6}$, $1.214\pm0.120\times10^{6}$, $8.790\pm0.300\times10^{5}$ และ $8.606\pm0.742\times10^{5}$ เซลล์ต่อไมโครลิตร ตามลำดับ แสดงดังตารางที่ 2

ตารางที่ 2. จำนวนสเปิร์มของผึ้งตัวผู้หลังเลี้ยงด้วยอาหารเสริมผึ้งผสมโพรไบโอติกส์ วันที่ 7, 14, 21, 28 และ 35 (เริ่มนับหลังออกจากหลอดรวง)

ชุดทดสอบ	จำนวนสเปิร์มของผึ้งตัวผู้หลังเลี้ยงด้วยอาหารเสริมผึ้งผสมโพรไบโอติกส์ (เซลล์ต่อไมโครลิตร)				
	วันที่ 7	วันที่ 14	วันที่ 21	วันที่ 28	วันที่ 35
L. casei	$1.037\pm0.29\times10^{5d}$	$1.359\pm0.16\times10^{6a}$	$7.446\pm1.22\times10^{5b}$	$2.696\pm0.29\times10^{5c}$	$2.233\pm0.34\times10^{4d}$
L. plantarum	$1.256\pm0.23\times10^{5d}$	$2.095\pm0.14\times10^{6a}$	$1.058\pm0.22\times10^{6b}$	$4.396\pm1.22\times10^{5c}$	$1.209\pm0.54\times10^{5d}$
L. curvatus	$8.166\pm0.99\times10^{4d}$	$1.300\pm0.18\times10^{6a}$	$7.310\pm1.62\times10^{5b}$	$3.724\pm0.57\times10^{5c}$	$3.908\pm2.21\times10^{4d}$
L. acidophilus	$6.600\pm1.60\times10^{4d}$	$1.214\pm0.12\times10^{6a}$	$7.188\pm0.63\times10^{5b}$	$3.234\pm0.48\times10^{5c}$	$6.266\pm1.63\times10^{4d}$
No probiotic	$5.666\pm1.49\times10^{4d}$	$8.606\pm0.74\times10^{5a}$	$6.112\pm0.83\times10^{5b}$	$1.532\pm0.35\times10^{5c}$	$4.350\pm2.91\times10^{4d}$
control	$8.250\pm5.30\times10^{4d}$	$8.790\pm0.30\times10^{5a}$	$7.430\pm0.42\times10^{5b}$	$1.740\pm0.18\times10^{5c}$	$4.250\pm1.06\times10^{4d}$

หมายเหตุ : ตัวอักษรเหมือนกันในคอลัมน์เดียวกันไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95%

เมื่อนำข้อมูลจำนวนสเปิร์มของผึ้งตัวผู้ในวันที่ 14 หลังจากออกจากหลอดรวง ซึ่งเป็นวันที่ผึ้งตัวผู้มีจำนวนสเปิร์มสูงสุดมาวิเคราะห์ทางสถิติ พบว่า ผึ้งตัวผู้ที่เลี้ยงด้วยอาหารเสริมผึ้งผสม *L. plantarum* จะมีจำนวนสเปิร์มสูงสุด และมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ กับผึ้งตัวผู้ที่เลี้ยงด้วยอาหารเสริมผึ้งผสมโพรไบโอติกส์สายพันธุ์อื่น ๆ ผึ้งที่เลี้ยงด้วยอาหารตามธรรมชาติ และผึ้งที่เลี้ยงด้วยอาหารเสริมผึ้งที่ไม่ได้ผสมเชื้อโพรไบโอติกส์ แสดงดังรูปที่ 3



รูปที่ 3. เปรียบเทียบจำนวนสเปิร์มของผึ้งตัวผู้ที่เลี้ยงด้วยอาหารเสริมผึ้งผสมโพรไบโอติกส์จากแบคทีเรียกรดแลคติกทั้ง 4 สายพันธุ์ ในสัปดาห์ที่ 2 (อายุผึ้ง 14 วัน) (ตัวอักษรเหมือนกันไม่แตกต่างกัน อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ, $p \leq 0.05$)

3.2 ผลการสังเกตการเคลื่อนที่ภายใต้กล้องจุลทรรศน์

จากการสังเกตการเคลื่อนที่ของสเปิร์มภายใต้กล้องจุลทรรศน์ที่กำลังขยาย 400 เท่า แสดงดังรูปที่ 4 พบว่าผึ้งตัวผู้ในทุกชุดทดสอบเคลื่อนที่เร็วที่สุดในวันที่ 14 และ 21 รองลงมาคือวันที่ 28, 35 และ 7 ตามลำดับ โดยสเปิร์มของผึ้งที่ได้รับอาหารผสมโพรไบโอติกส์ทั้ง 4 สายพันธุ์ สามารถเคลื่อนที่ได้เร็วกว่าสเปิร์มของผึ้งที่ไม่ได้รับโพรไบโอติกส์ แสดงดังตารางที่ 2

รูปที่ 4. คิวอาร์โค้ดการเคลื่อนที่ของสเปิร์มผึ้งตัวผู้ที่ได้รับอาหารเสริมผึ้งผสมโพรไบโอติกส์

ตารางที่ 2. การเคลื่อนที่ของสเปิร์มผึ้งตัวผู้หลังเลี้ยงด้วยอาหารเสริมผึ้งผสมโพรไบโอติกส์ วันที่ 7, 14, 21, 28 และ 35 (เริ่มนับหลังออกจากหลอดรวง)

ชุดทดสอบ	การเคลื่อนที่ของสเปิร์มผึ้งตัวผู้หลังเลี้ยงด้วยอาหารเสริมผึ้งผสมโพรไบโอติกส์				
	วันที่ 7	วันที่ 14	วันที่ 21	วันที่ 28	วันที่ 35
L. casei	++	+++++	+++++	++++	++
L. plantarum	++	+++++	+++++	++++	+++
L. curvatus	++	+++++	+++++	++++	++
L. acidophilus	++	+++++	+++++	++++	++
No probiotic	+	+++	+++	++	+
control	+	+++	+++	++	+

หมายเหตุ + เคลื่อนที่ช้ามาก ++ เคลื่อนที่ค่อนข้างช้า +++ เคลื่อนที่ปานกลาง
++++ เคลื่อนที่ค่อนข้างเร็ว +++++ เคลื่อนที่เร็วมาก

3.3 อภิปรายผล

จากการนับจำนวนสเปิร์มของผึ้งตัวผู้ที่ได้รับอาหารเสริมผสมโพรไบโอติกส์ พบว่าผึ้งตัวผู้ในทุกชุดทดสอบสามารถสร้างสเปิร์มได้สูงสุดในวันที่ 14 รองลงมาคือวันที่ 21, 28, 7 และ 35 ตามลำดับ แสดงให้เห็นว่าในวันที่ 7 ผึ้งตัวผู้สามารถสร้างสเปิร์มได้แต่ยังไม่มีความสมบูรณ์ทำให้มีจำนวนสเปิร์มน้อย โดยผึ้งจะมีความสมบูรณ์พร้อมในการสร้างสเปิร์มสูงสุดในวันที่ 14 และจำนวนสเปิร์มที่ผึ้งตัวผู้สร้างจะลดลงเมื่อผึ้งอายุมากขึ้น ซึ่งผลดังกล่าวสอดคล้องกับงานวิจัยของ Czekonska et al. [12] ที่ได้ทำการเปรียบเทียบปริมาณของน้ำเชื้อและการมีชีวิตของเซลล์อสุจิจากผึ้งตัวผู้ที่อายุ 15, 20, 25 และ 30 วัน โดยใช้ตัวอ่อนที่มาจากนางพญาที่แตกต่างกันและเลี้ยงในสภาพแวดล้อมที่แตกต่างกัน พบว่าปริมาณเฉลี่ยของน้ำเชื้อลดลงอย่างมีนัยสำคัญเมื่อผึ้งมีอายุมากขึ้น แต่การมีชีวิตของสเปิร์มเพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญเมื่อผึ้งอายุมากขึ้น ถึงแม้ว่าผึ้งที่อายุมากจะมีปริมาณน้ำเชื้อลดลง แต่งานวิจัยของ Rousseau et al. [9] กลับพบว่าสัดส่วน

ของผึ้งตัวผู้ที่ยังมีน้ำเชื้อในผึ้งที่อายุมากจะสูงกว่าผึ้งอายุน้อย นอกจากนี้ยังพบว่าช่วงฤดูกาลมีอิทธิพลต่อปริมาณน้ำเชื้อที่ผึ้งสร้างขึ้นด้วย โดยผึ้งจะไม่ผสมพันธุ์หากขาดแคลนอาหาร ดังนั้นหากเราสามารถกระตุ้นให้ผึ้งที่อายุมากสร้างน้ำเชื้อได้มากขึ้นก็อาจเป็นหนทางให้จำนวนผึ้งในรังไม่ลดน้อยลงในฤดูขาดแคลนพืชอาหาร เมื่อพิจารณาผลการวิจัยในครั้งนี้ พบว่าผึ้งตัวผู้ที่ได้รับอาหารเสริมผึ้งผสมโพรไบโอติกส์ทั้ง 4 สายพันธุ์ สามารถสร้างสเปิร์มได้มากกว่าผึ้งตัวผู้ที่เลี้ยงด้วยอาหารตามธรรมชาติ และผึ้งตัวผู้ที่ได้รับอาหารเสริมผึ้งที่ไม่ได้ผสมโพรไบโอติกส์ ซึ่งสามารถอธิบายได้ว่าการที่ผึ้งตัวผู้ที่ได้รับอาหารตามธรรมชาติมีจำนวนสเปิร์มน้อยกว่าผึ้งที่ได้รับอาหารผึ้งผสมโพรไบโอติกส์ อาจเป็นเพราะในช่วงเวลาที่ทำการวิจัยในครั้งนี้เป็นฤดูขาดแคลนพืชอาหาร ผึ้งที่ได้รับอาหารตามธรรมชาติไม่เพียงพอที่จะทำให้เกิดความสมบูรณ์ในการสร้างสเปิร์ม จำนวนสเปิร์มที่สร้างขึ้นจึงมีจำนวนน้อย และเมื่อเปรียบเทียบกับผึ้งที่ได้รับอาหารเสริมผึ้งผสมโพรไบโอติกส์ ซึ่งมีจำนวนสเปิร์มที่สร้างมากกว่าอย่างมีนัยสำคัญ แสดงให้เห็นว่าโพรไบโอติกส์มีผลในการส่งเสริมการสร้างสเปิร์ม นอกจากนี้ยังพบว่า ถึงแม้ว่าช่วงเวลาที่ทำวิจัยเป็นฤดูขาดแคลนพืชอาหาร ซึ่งตามธรรมชาติจะไม่ใช่ฤดูผสมพันธุ์ของผึ้ง สเปิร์มจะมีการเคลื่อนไหวแบบหมุนอย่างช้า ๆ แต่จากการวิจัยนี้พบว่าเมื่อผึ้งได้รับอาหารเสริมผึ้งผสมโพรไบโอติกส์ ทำให้สเปิร์มมีการเคลื่อนไหวแบบหมุนอย่างรวดเร็วเหมือนในฤดูผสมพันธุ์ [13] บ่งชี้ให้เห็นว่าอาหารเสริมผึ้งผสมโพรไบโอติกส์สามารถช่วยให้สเปิร์มมีคุณภาพที่ดีขึ้น โดยสังเกตได้จากการเคลื่อนที่อย่างรวดเร็ว ผลการวิจัยนี้เป็นข้อมูลที่สนับสนุนให้เห็นว่าปัจจัยทางสภาพแวดล้อมรวมถึงโภชนาการ อุณหภูมิ ฤดูกาล และอายุ มีผลต่อสุขภาพการเจริญพันธุ์ของผึ้งตัวผู้ โดยผึ้งตัวผู้นั้นไวต่อความผันผวนของสิ่งแวดล้อมและปัจจัยเหล่านี้ทำให้ผึ้งตัวผู้มีประสิทธิภาพต่ำกว่า อาจสูญเสียสุขภาพอนามัยการเจริญพันธุ์ [14] หากเกษตรกรให้อาหารเสริมผึ้งผสมโพรไบโอติกส์ในฤดูขาดแคลนอาหาร นอกจากจะช่วยลดต้นทุนการเลี้ยงผึ้งแบบเคลื่อนย้ายไปตามสถานที่ต่าง ๆ แล้ว ยังอาจช่วยแก้ปัญหาความหนาแน่นของประชากรผึ้งที่มีจำนวนลดลงจากการได้รับยาฆ่าแมลงที่เกิดจากการเปลี่ยนแปลงรูปแบบการเกษตรเป็นแบบเชิงเดี่ยว ซึ่งเป็นสาเหตุหนึ่งของความล้มเหลวในคุณภาพของเซลล์อสุจิ และการลดลงของปริมาณน้ำเชื้อและความเข้มข้นของเซลล์อสุจิ [15] แต่ทั้งนี้ควรนำข้อมูลดังกล่าวไปพิจารณาร่วมกับผลของการส่งเสริมสุขภาพในด้านอื่น ๆ ของผึ้งด้วย เช่น ความหนาแน่นของประชากรผึ้ง น้ำหนักผึ้ง และอายุผึ้ง เพราะเชื้อแต่ละสายพันธุ์อาจส่งผลต่อสุขภาพของผึ้งพันธุ์ที่แตกต่างกัน โดยเลือกใช้สายพันธุ์ของเชื้อที่เหมาะสมที่สุดตามวัตถุประสงค์ของเกษตรกร หรืออาจพัฒนาในรูปแบบของหัวเชื้อผสมเพื่อให้ได้ประสิทธิภาพสูงสุด

4. สรุปผลการวิจัย

อาหารผึ้งผสมโพรไบโอติกส์ทั้ง 4 สายพันธุ์ มีผลส่งเสริมการสร้างสเปิร์ม และการเคลื่อนที่ของสเปิร์มของผึ้งพันธุ์ โดยเชื้อ *L. plantarum* สามารถทำให้ผึ้งตัวผู้สร้างสเปิร์มได้จำนวนสูงสุด เหมาะที่จะนำไปพัฒนาเป็นอาหารเสริมผึ้งผสมโพรไบโอติกส์เพื่อสร้างเสริมปริมาณสเปิร์มของผึ้งพันธุ์

กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบคุณศูนย์ส่งเสริมเทคโนโลยีการเกษตรด้านแมลงเศรษฐกิจ จังหวัดเชียงใหม่ ที่ให้ความอนุเคราะห์วัสดุอุปกรณ์ และสถานที่ทำวิจัย

เอกสารอ้างอิง (References)

[1] บุญมี กวินเสกสรรค์. 2558. โรคและศัตรูของผึ้งและชันโรง. สำนักบริหารและพัฒนาวิชาการ (สำนักพิมพ์) มหาวิทยาลัยแม่โจ้, เชียงใหม่. [Boonmee Kavinseksan. 2015. Diseases and Pests of Honey Bees and Stingless Bees, Maejo Digatal Printing hous, MaejoPress Co.,Ltd. Maejo university, Chiangmai. (in Thai)]

[2] ทะนุพงศ์ กุสุมา ณ อยุธยา. 2562. ผึ้งได้งาน คนเลี้ยงได้เงิน. เทคโนโลยีชาวบ้าน.แหล่งข้อมูล : เว็บไซต์https://www.technologychaoban.com/bullet-news-today/article_132602. ค้นเมื่อวันที่ 3 พฤษภาคม 2563.

[3] ภาณุวรรณ จันทวรรณกูร และจักราวุธ ไม้ทิพย์. 2560. การพัฒนาเทคโนโลยีใหม่สำหรับการเลี้ยงผึ้งและผลิตภัณฑ์ผึ้ง : ผลงานวิจัยสู่การใช้ประโยชน์. *จดหมายข่าว วช*., 12(77), 5-7. [Panuwan Chantawannakul and Jakkrawut Maitip. 2017. Novel Technologies for Beekeeping and Bee Product Industries. Results into Utilization. *NRCT Newsletter*, 12(77), 5-7 (in Thai)]

[4] สิริวัฒน์ วงษ์ศิริ และนิคม โคตรสุวรรณ. 2562. บทความพิเศษชุด : ความหวานและอำนาจ-หอบรังผึ้งหาแหล่งความหวาน (2), แหล่งข้อมูล : https://isaanrecord.com/ 2019/09/20/sweetness -and-power-part-12-th/. ค้นเมื่อวันที่ 30 มีนาคม 2563.

[5] ภาณุวรรณ จันทวรรณกูร, วรรณจันทร์ แสงหิรัญ ลี, ปิยรัตน์ นิมมานพิภักดิ์ และศศิประภา ครองแดง. 2561. ผึ้ง สารฆ่าแมลง ผลกระทบต่อระบบนิเวศ และสุขภาพของมนุษย์. กลุ่มธุรกิจแม็กซ์, เชียงใหม่. [Panuwan Chantawannakul, Vannajan Sanghiran Lee, Piyarat Nimmanpipug and Sasiprapa Krongdaeng. 2018. Bee, Insect Toxins, Impact on The Ecosystem and Human Health, MaxxPRINTING$_{TM}$, Chiangmai. (in Thai)]

[6] Fisher, A., II. and Range, J. 2018. Exposure to pesticides during development negatively affects honey bee (*Apis mellifera*) drone sperm viability. *PLoS ONE*, 13(12), e0208630. https://doi.org/ 10.1371/journal.pone.0208630.

[7] ชัยวัฒน์ ไชยสุต. 2554. โพรไบโอติก: จุลินทรีย์เพื่อชีวิต. อินฟินิตี้ คัลเลอร์ พริ้นติ้ง, กรุงเทพฯ. [Chaiwat Chaiyasut. 2011. Probiotics: Microoranisms for life. 1st ed, Infinity color Print Co.,Ltd., Bangkok. (in Thai)]

[8] Mountzouris, K., Tsitrsikos, P., Palamidi, I., Arvaniti, A., Mohnl, M., Schatzmayr, G. and 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.

[9] Rousseau, A., Fournier, V. and Giovenazzo, P. 2015. *Apis mellifera* (Hymenoptera: Apidae) drone sperm quality in relation to age, genetic line, and time of breeding. *The Canadian Entomologist*, 147(6), 702-711.

[10] Meidong, R., Khotchanalekha, K., Doolgindachbaporn, S., Nagasawa, T., Nakao, M., Sakai, K. and 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.

[11] Ciereszko, A., Wilde, J., Dietrich, G.J., Siuda, M., Bak, B., Judycka, S. and Karol, H. 2017. Sperm parameters of honeybee drones exposed to imidacloprid. *Apidologie*, 48(2), 211–222.

[12] Czekonska, K., Mickiewicz, B.C. and Chorbinski, P. 2013. The influence of honey bee (*Apis mellifera*) drone age on volume of semen and viability of spermatozoa. *Journal of Apicultural Science*, 57(1), 61-66.

[13] Gontarz, A., Banaszewska, D., Gryzinska, M. and Andraszek, K. 2016. Differences in drone sperm morphometry and activity at the beginning and end of the season. *Turkish Journal of Veterinary and Animal Sci*ences, 40, 598-602.

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

[15] Ben Abderkader, F., Kairo, G., Tchamitchian, S., Bonnet, M., Cousin, M., Barbouche, N., Belzunces, L.P., and Luc Brunet, J. 2018. Effects of Clothianidin exposure on semen parameters of honey bee drones. *Journal of new sciences Agriculture & Biotechnology*, 59(1), 3791-3798.