

ผลของอาหารเสริมผสมโพรไบโอติกส์ต่อน้ำหนักตัวและอายุของผึ้งพันธุ์ (*Apis mellifera*)

Effect of Dietary Supplement Mixed with Probiotics on Body Weight and Age of Honeybee (*Apis mellifera*)

สมศักดิ์ อยู่บุรีรัมย์¹ วนิดา ชื่นชื่น^{1*} และ ธนพงศ์ สำเภาลอย²

Somsak Yooboriboon¹ Wanida Chuenchan¹ and Thanaphong Sumpaoloi²

¹สาขาวิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยราชภัฏบ้านสมเด็จเจ้าพระยา

²ศูนย์ส่งเสริมเทคโนโลยีการเกษตรด้านแมลงเศรษฐกิจ จังหวัดเชียงใหม่

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

²Agricultural Technology Promotion Center (Economic insects), Chiangmai Province

วันที่ส่งบทความ : 19 ตุลาคม 2565 วันที่แก้ไขบทความ : 13 มกราคม 2566 วันที่ตอบรับบทความ : 1 มิถุนายน 2566

Received: 19 October 2022, Revised: 13 January 2022, Accepted: 1 June 2023

บทคัดย่อ

งานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาผลของอาหารเสริมผสมโพรไบโอติกส์ต่อน้ำหนักตัวและอายุของผึ้งพันธุ์ (*Apis mellifera*) โดยใช้เชื้อแบคทีเรียโพรไบโอติกส์จำนวน 4 ชนิด ได้แก่ *Lactobacillus casei* TISTR 390, *L. plantarum* TISTR 541, *L. curvatus* TISTR 938 และ *L. acidophilus* TISTR 2365 หาน้ำหนักตัวของผึ้งด้วยวิธีการสุ่มชั่งน้ำหนักผึ้งงานจำนวน 100 ตัวต่อรัง โดยทำการทดลองละ 5 รัง และนำมาหาค่าเฉลี่ยของน้ำหนักผึ้งต่อ 1 ตัว โดยสุ่มตั้งแต่ผึ้งเริ่มออกจากหลอดรวงที่สร้างทุกสัปดาห์ เป็นเวลา 8 สัปดาห์ หาอายุของผึ้งด้วยวิธีการแต้มสี acrylic ที่บริเวณส่วนอกของผึ้งงานที่เกิดใหม่จำนวน 300 ตัวต่อรัง โดยทำการทดลองละ 5 รัง และนับจำนวนผึ้งงานที่ทำเครื่องหมายไว้ทุกวันเป็นเวลา 80 วัน เพื่อหาค่าเฉลี่ยอายุผึ้งงาน จากการทดลองพบว่า ในสัปดาห์สุดท้ายของการวิจัย ผึ้งงานที่เลี้ยงด้วยอาหารตามธรรมชาติมีน้ำหนักเฉลี่ยมากที่สุด (113.76 ± 24.88 มิลลิกรัม) แตกต่างกับชุดการทดลองอื่นอย่างมีนัยสำคัญ รองลงมาคือผึ้งงานที่เลี้ยงด้วยอาหารเสริมผสม *L. casei* (101.36 ± 15.23 มิลลิกรัม) *L. curvatus* (96.78 ± 12.69 มิลลิกรัม) *L. plantarum* (95.66 ± 15.29 มิลลิกรัม) *L. acidophilus* (93.52 ± 14.61 มิลลิกรัม) และผึ้งงานที่เลี้ยงด้วยอาหารเสริมที่ไม่ได้ผสมโพรไบโอติกส์ (92.62 ± 12.84 มิลลิกรัม) ตามลำดับ [F (5, 144) = 5.729, $p \leq 0.05$] และจากการหาค่าเฉลี่ยอายุของผึ้งงานพบว่า อายุของผึ้งงานที่ได้รับโพรไบโอติกส์มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญกับอายุของผึ้งงานที่ไม่ได้รับโพรไบโอติกส์ โดยผึ้งงานที่ได้รับ *L. plantarum* มีอายุเฉลี่ยสูงสุดเท่ากับ 68.60 ± 0.707 วัน รองลงมาคือผึ้งงานที่ได้รับ *L. acidophilus* (67.60 ± 0.548 วัน) *L. casei* (67.40 ± 0.548 วัน) *L. curvatus* (66.80 ± 0.447 วัน) ผึ้งงานที่เลี้ยงด้วยอาหารเสริมที่ไม่ได้ผสมโพรไบโอติกส์ (51.80 ± 0.447 วัน) และผึ้งงานที่เลี้ยงด้วย

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

อาหารตามธรรมชาติ (42.60 ± 0.548 วัน) ตามลำดับ [F (5, 24) = 2245.80, $p \leq 0.05$] งานวิจัยนี้บ่งชี้ว่า โพรไบโอติกส์ทั้ง 4 ชนิด สามารถนำไปพัฒนาเป็นส่วนผสมในผลิตภัณฑ์อาหารเสริมสำหรับส่งเสริมอายุของ ผึ้งพันธุ์ได้

คำสำคัญ : อาหารเสริม โพรไบโอติกส์ น้ำหนักผึ้งงาน อายุผึ้งงาน ผึ้งพันธุ์

Abstract

The objective of this research was to study the effect of dietary supplement mixed with probiotics on body weight and age of honeybee (*Apis mellifera*) workers. Four species of probiotics, *Lactobacillus casei* TISTR 390, *L. plantarum* TISTR 541, *L. curvatus* TISTR 938 and *L. acidophilus* TISTR 2365 were used in this study. A random sampling of marked workers beginning from coming out of the comb was performed. Honeybee samples of 100 workers per hive were weighed every week for 8 weeks. Five hives were investigated for each experiment. The average body weight per worker was calculated. To find the average age of workers, acrylic color was painted on thorax of newly born workers with 300 workers per hive. The number of worker bees that were marked daily for 80 days, was counted in 5 hives per experiment. The results showed that in the last week of this research, the worker bees fed by natural foods had the highest average body weight with 113.76 ± 24.88 mg which showed significant differences with other experimental results, followed by the honeybee group with dietary supplement mixed with *L. casei* (101.36 ± 15.23 mg), *L. curvatus* (96.78 ± 12.69 mg), *L. plantarum* (95.66 ± 15.29 mg), *L. acidophilus* (93.52 ± 14.61 mg), and the group fed without probiotics (92.62 ± 12.84 mg), respectively [F (5, 144) = 5.729, $p \leq 0.05$]. In addition, the age of worker bees fed with dietary supplement mixed with all probiotics showed significant difference from those without probiotics. The highest age of workers was found in the honeybee workers fed with dietary supplement mixed with *L. plantarum* (67.40 ± 0.548 days), followed by those with *L. curvatus* (66.80 ± 0.447 days), without probiotics (51.80 ± 0.447 days) and with natural foods (42.60 ± 0.548 days), respectively [F (5, 24) = 2245.80, $p \leq 0.05$]. The research indicated that all four species of probiotics can be progressively developed to be a mixture in supplementary diet to enhance honeybee age.

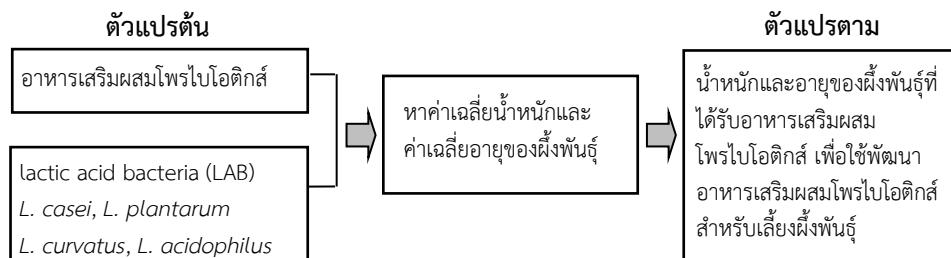
Keywords: Dietary supplement, Probiotics, Body weight of worker bee, Age of worker bee, *Apis mellifera*

1. บทนำ

การเลี้ยงผึ้งนอกจากจะประสบปัญหาหลักในเรื่องโรคและศัตรูผึ้งแล้ว อีกหนึ่งในปัญหาสำคัญของการเลี้ยงผึ้งคือความหนาแน่นของพืชอาหารที่มีอยู่อย่างจำกัด จากสภาพดินฟ้าอากาศที่เปลี่ยนแปลงไป รวมถึงปัญหาความแห้งแล้งซึ่งล้วนแล้วแต่ส่งผลกระทบต่อ การออกดอกของพืช ทำให้เกิดปัญหากับพืชอาหารผึ้งทั้งด้านปริมาณและคุณภาพ [1] ในช่วงฤดูที่พืชอาหารอุดมสมบูรณ์ ผึ้งจะมีน้ำหนักเพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญแต่จะมีอายุขัยที่สั้นลง [2] ขณะที่เมื่อเข้าสู่ฤดูขาดแคลนพืชอาหาร ผึ้งจะอ่อนแอ ไม่ออกหาอาหาร วางไข่ลดลง ภูมิคุ้มกันต้านต่อโรคและศัตรูผึ้งต่ำ จนทำให้จำนวนประชากรของผึ้งลดลงและอาจเกิดการทิ้งรังในที่สุด [3] เกษตรกรหลายรายแก้ปัญหาด้วยวิธีการเลี้ยงผึ้งแบบเคลื่อนย้ายไปตามสถานที่ต่าง ๆ เพื่อหาแหล่งพืชอาหารทำให้ต้นทุนการเลี้ยงผึ้งสูงขึ้น ประกอบกับในช่วงหลายทศวรรษที่ผ่านมา มีการใช้สารกำจัดศัตรูพืชเพิ่มขึ้นเพื่อปกป้องพืชจากศัตรูพืชโรคต่าง ๆ ทำให้ส่งผลเชิงลบต่อแมลงผสมเกสรโดยเฉพาะผึ้ง สารเหล่านี้จะส่งผลกระทบต่อจุลินทรีย์ในลำไส้ ทำให้ภูมิคุ้มกันลดลง และอายุขัยสั้นลง ซึ่งถือเป็นปัญหาระดับโลก [4] ประเทศไทยเป็นประเทศเกษตรกรรมที่มีแนวโน้มพึ่งพาสารเคมีกำจัดศัตรูพืชมากขึ้นอย่างต่อเนื่องจากการเกษตรเชิงเดี่ยว ส่งผลให้แหล่งอาหารที่เหลื่อมล้นผึ้งเสาะหาเพื่อผลิตน้ำหวานจากเกสรดอกไม้ลดน้อยลง ถือเป็นภัยคุกคามที่ทำให้เกิดผลกระทบต่อเกษตรกรผู้เลี้ยงผึ้งเป็นอย่างมาก [5] ฤดูที่พืชออกดอกเป็นช่วงที่ผึ้งได้รับสารพิษมากที่สุด เนื่องจากเป็นช่วงที่เกษตรกรมีการใช้สารฆ่าแมลงโดยตรงกับช่อดอกที่ผลิอกใหม่ ทำให้ผึ้งได้รับสารเหล่านั้นโดยตรงตามไปด้วย นอกจากผึ้งงานที่ทำหน้าที่ออกไปหาอาหารจะได้รับสารพิษแล้ว ในสังคมผึ้งอาจได้รับสารพิษด้วย เนื่องจากผึ้งงานอาจจะได้รับสารเคมีจากเกสรหรือน้ำหวานดอกไม้ที่มีการปนเปื้อนสารเคมีมาเลี้ยงประชากรในรัง ทั้งนางพญา ผึ้งตัวผู้ และตัวอ่อน โดยสัญญาณที่บ่งชี้ว่าผึ้งได้รับสารพิษ คือ เกิดการสูญหายของรังผึ้งเป็นจำนวนมากกว่า มีผึ้งในช่วงอายุเดียวกันตายหนักรังผึ้งจำนวนมาก [6] เกษตรกรจึงเลี้ยงไม่ได้ก็ต้องให้อาหารเสริมแก่ผึ้ง ซึ่งเป็นผลิตภัณฑ์ที่มนุษย์ผลิตขึ้นมาสำหรับเลี้ยงผึ้ง มีคุณค่าอาหารใกล้เคียงกับแหล่งอาหารธรรมชาติ ประกอบด้วยแป้งข้าวเหลืองและเกสรที่เป็นแหล่งโปรตีน วิตามิน และแร่ธาตุต่าง ๆ แต่คุณภาพยังไม่ดีเท่าที่ควรเนื่องจากขาดจุลินทรีย์ตามธรรมชาติ จึงอาจส่งผลให้สภาพรังอ่อนแอ ไม่ต้านทานโรคและศัตรูผึ้ง ซึ่งแตกต่างจากน้ำหวานและเกสรที่ได้จากพืชอาหารตามธรรมชาติที่มีคุณภาพดีเพราะประกอบด้วยสารอาหารและจุลินทรีย์กลุ่มที่มีคุณสมบัติเป็นโพรไบโอติกส์ (Probiotics) ช่วยปรับสมดุลของจุลินทรีย์ในระบบทางเดินอาหาร ผลิตสารต่อต้านหรือกำจัดจุลินทรีย์ชนิดอื่น ก่อให้เกิดประโยชน์ต่อสุขภาพ และสามารถแข่งขันกับจุลินทรีย์ก่อโรครวมทั้งสามารถกระตุ้นให้เกิดระบบภูมิคุ้มกันในสัตว์ ทำให้สุขภาพผึ้งแข็งแรง [7],[8] จากความสำคัญของปัญหาดังกล่าว ผู้วิจัยจึงมีแนวคิดในการศึกษาผลของอาหารเสริมผสมโพรไบโอติกส์ต่อน้ำหนักและอายุของผึ้งพันธุ์ ผลการวิจัยในครั้งนี้จึงเป็นข้อมูลพื้นฐานสำคัญเพื่อพัฒนาผลิตภัณฑ์อาหารเสริมสำหรับเลี้ยงผึ้งพันธุ์ ซึ่งจะช่วยแก้ปัญหาการขาดแคลนพืชอาหาร อีกทั้งส่งผลเชิงบวกต่ออายุของผึ้งพันธุ์ เสริมสร้างสุขภาพผึ้ง และส่งผลดีต่อสภาพรังโดยรวม ซึ่งจะเป็นนวัตกรรมที่สามารถส่งให้กับเกษตรกรผู้เลี้ยงผึ้งได้ใช้ประโยชน์ต่อไป

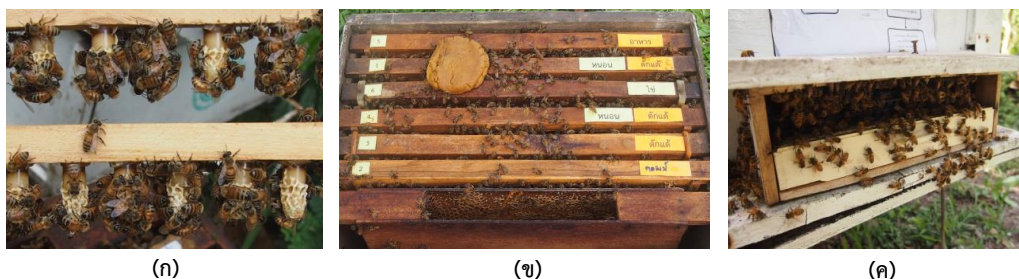
2. วิธีดำเนินการวิจัย

2.1 กรอบแนวคิดของการวิจัย



2.2 การเตรียมผึ้งที่ใช้ดำเนินการวิจัย

เตรียมผึ้งพันธุ์ (*Apis mellifera*) จำนวน 30 รัง โดยผึ้งทุกรังมีสุขภาพดีและไม่พบโรคหรือไรศัตรูผึ้งผลิตมาจากนางพญาารุ่นเดียวกัน (อายุ 8 สัปดาห์) ได้รับความอนุเคราะห์จากศูนย์ส่งเสริมเทคโนโลยีการเกษตรด้านแมลงเศรษฐกิจ จังหวัดเชียงใหม่ กระทรวงเกษตรและสหกรณ์ เป็นรังแบบขั้นบันได แต่ละรังประกอบด้วย 6 คอน ทำเครื่องหมายระบุหมายเลขคอนตั้งแต่ลำดับที่ 1 - 6 และติดฉลากเพื่อบ่งบอกชนิดของคอนในรังที่ทำการทดลอง ได้แก่ คอนเกสร คอนน้ำหวาน คอนไข คอนหนอน คอนตัวอ่อน และคอนดักแด่ วางกับดักเกสรที่ปากทางเข้ารังเพื่อป้องกันอาหารจากภายนอกเข้ามาในรังผึ้งพันธุ์ที่ทำการทดลองแสดงดังรูปที่ 1



รูปที่ 1. การเตรียมผึ้งที่ใช้ในการดำเนินการวิจัย

(ก) การสร้างนางพญา (ข) การติดฉลากรังผึ้งพันธุ์ที่ใช้ในการทดลอง (ค) การวางกับดักเกสรที่ปากทางเข้ารัง

2.3 การเตรียมจุลินทรีย์ที่ใช้ดำเนินการวิจัย

1) โพรไบโอติกส์ที่ใช้ในการทดลองประกอบด้วยแบคทีเรียกรดแลคติกจำนวน 4 ชนิด ได้แก่ *Lactobacillus casei* TISTR 390, *L. plantarum* TISTR 541, *L. curvatus* TISTR 938 และ *L. acidophilus* TISTR 2365 เตรียมโดยเพาะแบคทีเรียจากหลอดเชื้อแบบผง (Lyophilized form) แต่ละสายพันธุ์ในอาหารเหลว De Man, Rogosa and Sharpe (MRS) บ่มที่อุณหภูมิ 35-37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง ในสภาวะไร้อากาศ ทำการถ่ายเชื้ออย่างน้อย 3 ครั้ง เพื่อกระตุ้นการเจริญเติบโต จากนั้น

เลี้ยงเชื้อแต่ละสายพันธุ์ในอาหารแข็ง MRS บ่มที่อุณหภูมิ 35-37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง เก็บรักษาเชื้อเพื่อใช้เป็นเชื้อใช้งาน [9]

2) นำเชื้อบริสุทธิ์จากอาหารแข็ง MRS เลี้ยงในอาหารเหลว MRS ปริมาตร 200 มิลลิลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 35-37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง ในสภาวะไร้อากาศ จากนั้นนำมาหมวนเหวี่ยงด้วยความเร็ว 6,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที ล้างเซลล์ด้วยสารละลายโซเดียมคลอไรด์ 0.85 เปอร์เซ็นต์ (น้ำหนักต่อปริมาตร) 3 ครั้ง นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร ปรับความขุ่นของเชื้อให้เท่ากับ 0.1 ซึ่งจะทำให้มีปริมาณเชื้อประมาณ 1.0×10^8 ซีเอฟยูต่อมิลลิลิตร [10]

2.4 การเตรียมอาหารเสริมผสมโพรไบโอติกส์สำหรับใช้เลี้ยงผึ้งพันธุ์

นำอาหารเสริมยี่ห้อ Bee power (ผลิตภัณฑ์เสริมอาหารสำหรับผึ้ง ประกอบด้วยโปรตีน วิตามิน และแร่ธาตุ ที่ใกล้เคียงอาหารตามธรรมชาติในปริมาณและอัตราส่วนที่เหมาะสมกับการเจริญเติบโตของผึ้ง) 500 กรัม ผสมกับแป้งถั่วเหลือง 1,250 กรัม คลุกเคล้าให้เข้ากัน ค่อย ๆ เติมน้ำผึ้งหัวคอน (ความเข้มข้นเท่ากับ 80 บริกซ์) 2,000 กรัม นวดให้เข้ากันจนเป็นก้อนไม่ติดมือ แบ่งออกเป็น 5 ส่วน ส่วนละ 750 กรัม จากนั้นเติมเชื้อโพรไบโอติกส์ที่เตรียมไว้จากข้อ 2.3 ลงในอาหารแต่ละส่วนที่แยกไว้ โดยให้มีปริมาณแบคทีเรียเริ่มต้นเท่ากันคือ 10^8 ซีเอฟยูต่อกรัม แบ่งเป็นก้อนกลมแบนขนาด 150 กรัม จำนวน 5 ก้อน [11]

2.5 การให้อาหารเสริมผสมโพรไบโอติกส์แก่ผึ้งพันธุ์

ดำเนินการทดลอง โดยวางแผนการทดลองแบบสุ่มสมบูรณ์ (Completely Randomized Design: CRD) แบ่งเป็น 6 ชุดการทดลอง ชุดละ 5 รัง ดังนี้

ชุดการทดลองที่ 1 อาหารเสริมผสม *L. casei* TISTR 390

ชุดการทดลองที่ 2 อาหารเสริมผสม *L. plantarum* TISTR 541

ชุดการทดลองที่ 3 อาหารเสริมผสม *L. curvatus* TISTR 938

ชุดการทดลองที่ 4 อาหารเสริมผสม *L. acidophilus* TISTR 2365

ชุดการทดลองที่ 5 อาหารเสริมที่ไม่ผสมเชื้อโพรไบโอติกส์ (No probiotic)

ชุดการทดลองที่ 6 อาหารธรรมชาติ (Control)

ทำการเลี้ยงผึ้งพันธุ์ด้วยอาหารตามี่วางแผนการทดลอง โดยให้อาหารแต่ละรัง รังละ 150 กรัม และเปลี่ยนอาหารใหม่ทุกสัปดาห์ตลอดการทดลอง

2.6 การสร้างคอนผึ้งงาน ตามวิธีของ Human และคณะ [12]

เลี้ยงผึ้งพันธุ์ทั้ง 30 รัง (6 ชุดการทดลอง) ตามที่วางแผนการทดลองเป็นระยะเวลา 2 สัปดาห์ เพื่อปรับระบบทางเดินอาหารของผึ้งทั้งหมดภายในรังให้ได้รับอาหารตามแผนการทดลองอย่างสม่ำเสมอ จากนั้นทำการสร้างคอนผึ้งงานโดยใส่แผ่นรังเทียมเพื่อให้นางพญาวางไข่ จะได้ตัวอ่อนผึ้งงานที่เกิดจากนางพญาที่เลี้ยงด้วยอาหารตามแผนการทดลอง เลือกแผ่นคอนที่มีการวางไข่เต็มทั่วทั้งแผ่นคอน เมื่อหนอนในคอนเข้าระยะดักแด้และปิดฝาให้เลือกคอนที่เห็นการปิดฝาสมาเสมอเต็มคอนเป็นวงกว้าง รอจนผึ้งเริ่ม

ออกจากหลอดตรงจึงทำการทดลองศึกษาผลของอาหารเสริมผสมโปรไบโอติกส์ต่อน้ำหนักผึ้งงานและอายุผึ้งงานของประชากรผึ้งพันธุ์

2.7 การหาค่าเฉลี่ยน้ำหนักของผึ้งงาน ตามวิธีของ Giovanetti และ Lasso [13]

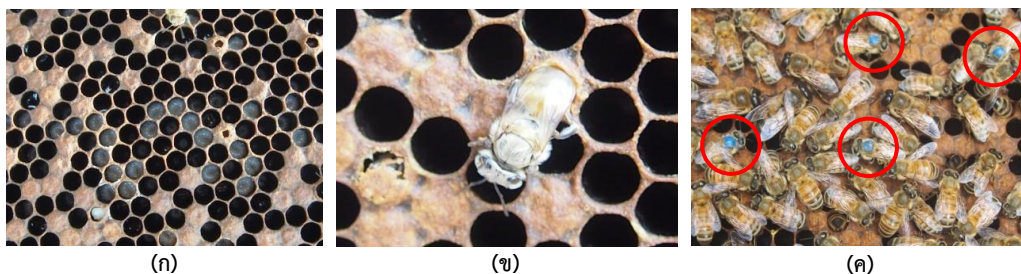
1) รวบรวมจำนวนผึ้งงานจากคอนที่มีจำนวนผึ้งงานเกาะหนาแน่น สกัดตัวผึ้งงานออกจากคอนดังกล่าวให้ตกลงในโหลแก้ว จากนั้นตรึงผึ้งงานโดยนำโหลแก้วไปแช่เย็นด้วยน้ำแข็ง ประมาณ 5 นาที หลังจากผึ้งงานถูกตรึงสงบไม่เคลื่อนไหวให้นำผึ้งงานที่ถูกตรึงมาชั่งน้ำหนักที่เครื่องชั่งไฟฟ้าทศนิยม 4 ตำแหน่ง จำนวน 100 ตัวต่อรัง และนำมาหาค่าเฉลี่ยของน้ำหนักผึ้งต่อ 1 ตัว

2) หาค่าเฉลี่ยน้ำหนักของผึ้งงาน โดยเริ่มทำการสุ่มชั่งน้ำหนักผึ้งงานตั้งแต่ผึ้งเริ่มออกจากหลอดตรงที่สร้างทุกสัปดาห์ เป็นเวลา 8 สัปดาห์

2.8 การหาค่าเฉลี่ยอายุของผึ้งงาน ตามวิธีของ Behrends และ Scheiner [14]

1) สร้างหรือคัดเลือกคอนที่มีระยะดักแด่ที่ใกล้เป็นผึ้งงานตัวเต็มวัย (Seal brood comb) ซึ่งใช้ระยะเวลา 21 วัน เมื่อผึ้งงานจะออกจากหลอดตรงรัง ให้ทำเครื่องหมายโดยการแต้มสี acrylic ที่บริเวณส่วนอก (Thorax) ของผึ้งงานที่เกิดใหม่ ชุดการทดลองละ 1,500 ตัว (300 ตัวต่อรัง) กำหนดให้สีแตกต่างกันในแต่ละชุดการทดลอง แสดงดังรูปที่ 2

2) หาค่าเฉลี่ยอายุของผึ้งงาน โดยเริ่มตั้งแต่ผึ้งออกจากหลอดตรง ในแต่ละวันให้นับจำนวนผึ้งงานที่ได้ทำเครื่องหมายไว้ ทั้งภายในรังผึ้งพันธุ์และทำการปิดหน้ารังผึ้งพันธุ์ทางเข้าไว้ เพื่อนับจำนวนผึ้งงานที่ได้ทำเครื่องหมายไว้มารออยู่บริเวณหน้ารังทางเข้า บันทึกการนับจำนวนผึ้งงานที่ได้ทำเครื่องหมายไว้ทุกวันเป็นเวลา 80 วัน เมื่อสิ้นสุดการทดลองแล้วให้นำข้อมูลมาวิเคราะห์หาค่าเฉลี่ยอายุของผึ้งงาน



รูปที่ 2. การเตรียมคอนผึ้งงานสำหรับหาค่าเฉลี่ยอายุของผึ้งงาน

(ก) คอนที่มีระยะดักแด่ใกล้เป็นผึ้งงานตัวเต็มวัย (ข) ผึ้งงานเกิดใหม่ที่เริ่มออกจากหลอดตรงรัง

(ค) การแต้มสี acrylic ที่บริเวณส่วนอกของผึ้งงานที่เกิดใหม่

2.9 การวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ

ข้อมูลแสดงเป็นค่าเฉลี่ย $\pm$ ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน จากการทดลองจำนวน 5 ซ้ำ ทำการวิเคราะห์หาค่าความแปรปรวนของค่าเฉลี่ยด้วยวิธีการวิเคราะห์ความแปรปรวนที่มีตัวแปรอิสระเพียงตัวเดียว (One-Way Analysis of Variance) ด้วยโปรแกรม SPSS version 21.0 และเปรียบเทียบความแตกต่างค่าเฉลี่ย

ระหว่างชุดการทดลองด้วยวิธีของ Duncan (Duncan's New Multiple Range Test) ที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95

3. ผลการทดลองและวิจารณ์

3.1 การหาค่าเฉลี่ยน้ำหนักของฝัองงาน

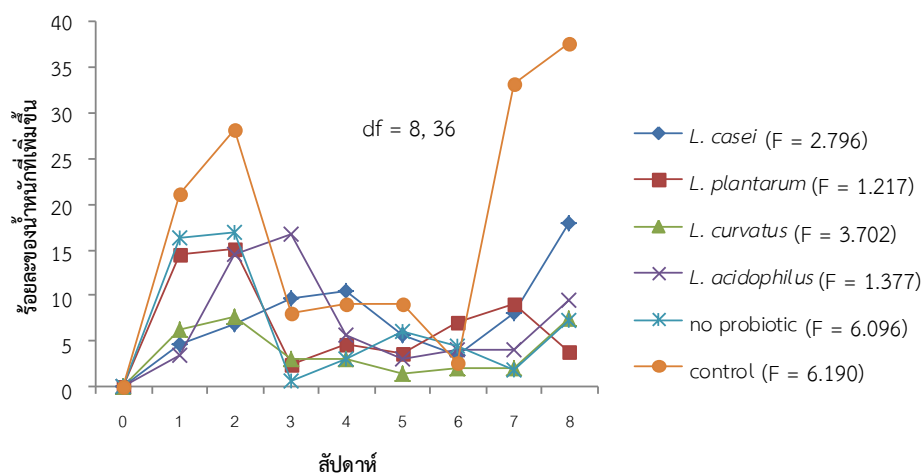
จากการหาค่าเฉลี่ยน้ำหนักของฝัองงาน จำนวน 100 ตัวต่อรัง โดยการตรึงฝัองงานและนำมาชั่งน้ำหนักด้วยเครื่องชั่งไฟฟ้าทศนิยม 4 ตำแหน่ง ตามวิธีของ Giovanetti และ Lasso [13] โดยเริ่มทำการสุ่มชั่งน้ำหนักฝัองงานตั้งแต่ฝัองเริ่มออกจากหลอดรวงที่สร้างทุกสัปดาห์ เป็นเวลา 8 สัปดาห์ พบว่าน้ำหนักเฉลี่ยของฝัองงานในทุกชุดการทดสอบเพิ่มขึ้นตามลำดับในแต่ละสัปดาห์ ซึ่งในสัปดาห์สุดท้ายของการวิจัย ฝัองงานที่เลี้ยงด้วยอาหารตามธรรมชาติมีน้ำหนักเฉลี่ยมากที่สุด (113.76 ± 24.88 มิลลิกรัม) รองลงมาคือฝัองงานที่เลี้ยงด้วยอาหารเสริมผสม *L. casei* (101.36 ± 15.23 มิลลิกรัม) ฝัองงานที่เลี้ยงด้วยอาหารเสริมผสม *L. curvatus* (96.78 ± 12.69 มิลลิกรัม) ฝัองงานที่เลี้ยงด้วยอาหารเสริมผสม *L. plantarum* (95.66 ± 15.29 มิลลิกรัม) ฝัองงานที่เลี้ยงด้วยอาหารเสริมผสม *L. acidophilus* (93.52 ± 14.61 มิลลิกรัม) และฝัองงานที่เลี้ยงด้วยอาหารเสริมที่ไม่ได้ผสมโพรไบโอติกส์ (92.62 ± 12.84 มิลลิกรัม) ตามลำดับ ดังแสดงในตารางที่ 1

ตารางที่ 1. ค่าเฉลี่ยน้ำหนักของฝัองงานที่เลี้ยงด้วยอาหารเสริมผสมโพรไบโอติกส์เป็นระยะเวลา 8 สัปดาห์

เวลา (สัปดาห์)	น้ำหนักเฉลี่ยของฝัองพันธุ์ (มิลลิกรัม)					
	<i>L. casei</i>	<i>L. plantarum</i>	<i>L. curvatus</i>	<i>L. acidophilus</i>	No probiotic	Control
0	70.38 ± 14.68^f	71.27 ± 12.21^e	79.60 ± 15.59^c	67.79 ± 10.49^d	68.50 ± 8.58^c	57.56 ± 3.28^e
1	73.66 ± 19.75^{ef}	81.61 ± 17.85^d	84.67 ± 18.05^{bc}	70.20 ± 12.32^d	79.69 ± 10.60^b	69.74 ± 1.61^d
2	75.18 ± 14.07^{def}	82.09 ± 16.49^d	85.76 ± 13.15^{bc}	77.65 ± 15.80^c	80.10 ± 14.45^b	73.74 ± 13.69^{cd}
3	80.82 ± 11.74^{cde}	83.58 ± 10.17^{cd}	87.30 ± 11.06^{bc}	81.90 ± 12.50^{bc}	80.16 ± 19.85^b	75.34 ± 14.84^{bcd}
4	83.10 ± 5.59^{cd}	85.98 ± 7.28^{bcd}	88.34 ± 7.16^{ab}	82.01 ± 10.91^{bc}	82.57 ± 4.99^b	80.48 ± 9.19^{bc}
5	85.38 ± 10.92^{bc}	86.70 ± 11.42^{bcd}	88.51 ± 11.60^{ab}	84.42 ± 10.20^{bc}	85.11 ± 9.24^{ab}	82.12 ± 9.29^b
6	85.99 ± 18.35^{bc}	92.09 ± 16.32^{abc}	90.09 ± 16.18^{ab}	85.40 ± 9.85^{bc}	86.31 ± 14.83^{ab}	82.64 ± 11.94^b
7	92.36 ± 15.46^b	94.52 ± 17.83^{ab}	90.33 ± 16.79^{ab}	87.80 ± 16.18^{ab}	86.64 ± 10.40^{ab}	109.30 ± 17.30^a
8	101.36 ± 15.23^a	95.66 ± 15.29^a	96.78 ± 12.69^a	93.52 ± 14.61^a	92.62 ± 12.84^a	113.76 ± 24.88^a

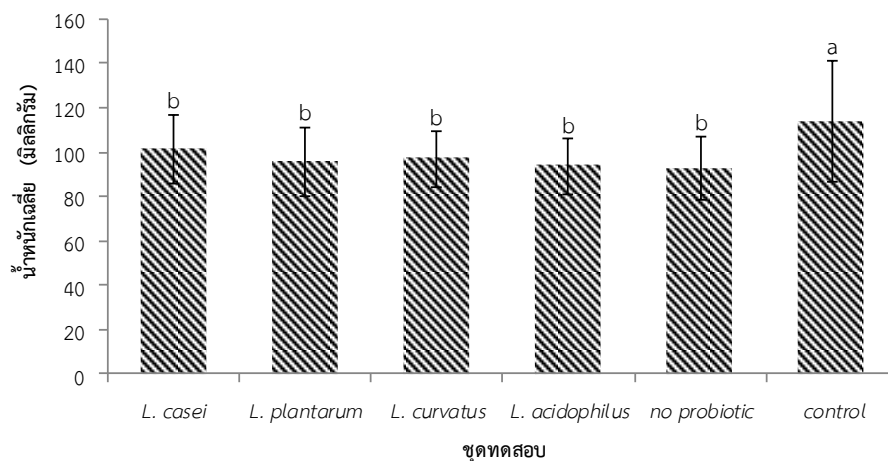
หมายเหตุ : ตัวอักษรเหมือนกันในคอลัมน์เดียวกันไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95

ร้อยละของอัตราการเพิ่มขึ้นของน้ำหนักฝัองงาน หลังจากทดลอง 8 สัปดาห์ พบว่าฝัองงานมีอัตราการเพิ่มขึ้นของน้ำหนักจากสัปดาห์แรก (สัปดาห์ที่ 0) จนถึงสัปดาห์ที่ 8 เท่ากับ 0, 11.10, 14.89, 6.75, 6.02, 4.84, 3.99, 9.69 และ 13.94 ตามลำดับ แสดงดังรูปที่ 3



รูปที่ 3. อัตราการเพิ่มขึ้นของน้ำหนักร่างกายที่เลี้ยงด้วยอาหารเสริมผสมโพรไบโอติกส์ เป็นระยะเวลา 8 สัปดาห์

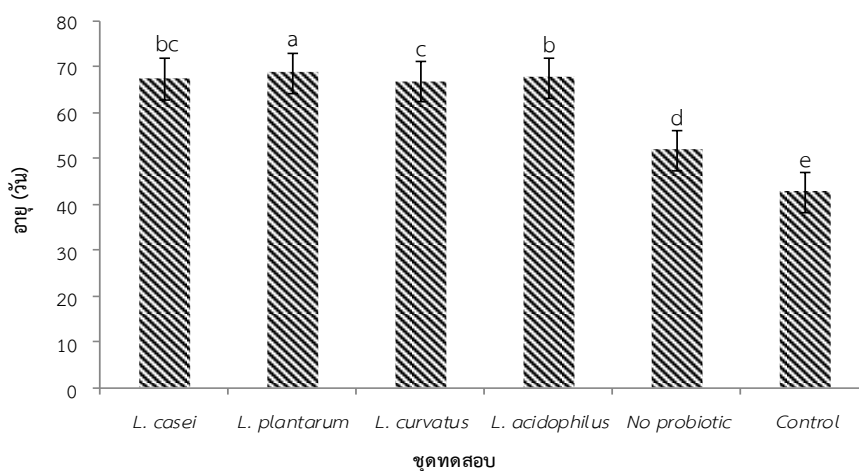
เมื่อนำข้อมูลในสัปดาห์ที่ 8 ซึ่งเป็นสัปดาห์ที่น้ำหนักเฉลี่ยสูงที่สุดมาวิเคราะห์ทางสถิติพบว่า ฝักร่างกายที่เลี้ยงด้วยอาหารตามธรรมชาติมีค่าเฉลี่ยน้ำหนักที่เพิ่มขึ้นสูงสุด และมีค่าเฉลี่ยน้ำหนักแตกต่างจากชุดการทดลองอื่นอย่างมีนัยสำคัญ [$F(5, 144) = 5.729, p < 0.05$] แสดงดังรูปที่ 4



รูปที่ 4. เปรียบเทียบน้ำหนักเฉลี่ยของฝักร่างกายที่เลี้ยงด้วยอาหารเสริมผสมโพรไบโอติกส์ ในสัปดาห์ที่ 8 (อายุฝัก 60 วัน) (ตัวอักษรเหมือนกันไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ความเชื่อมั่นร้อยละ 95)

3.2 การหาค่าเฉลี่ยอายุของฝั่งงาน

จากการหาค่าเฉลี่ยอายุของฝั่งงาน ตามวิธีของ Behrends และ Scheiner [14] ตั้งแต่ฝั่งออกจากหลอดรวง ซึ่งใช้ระยะเวลา 21 วัน นับจำนวนฝั่งงานที่ได้ทำเครื่องหมายด้วยวิธีการแต้มสี acrylic ที่บริเวณส่วนนอกของฝั่งงานที่เกิดใหม่ ชุดการทดลองละ 1,500 ตัว (300 ตัว/รัง) โดยทำการตรวจนับทุกวัน เป็นระยะเวลา 80 วัน พบว่า ฝั่งงานที่เลี้ยงด้วยอาหารเสริมผสม *L. plantarum* มีอายุเฉลี่ยสูงสุด (68.60 ± 0.707 วัน) รองลงมาคือ ฝั่งงานที่เลี้ยงด้วยอาหารเสริมผสม *L. acidophilus* (67.60 ± 0.548 วัน) ฝั่งงานที่เลี้ยงด้วยอาหารเสริมผสม *L. casei* (67.40 ± 0.548 วัน) ฝั่งงานที่เลี้ยงด้วยอาหารเสริมผสม *L. curvatus* (66.80 ± 0.447 วัน) ฝั่งงานที่เลี้ยงด้วยอาหารเสริมที่ไม่ผสมโพรไบโอติกส์ (51.80 ± 0.447 วัน) และฝั่งงานที่เลี้ยงด้วยอาหารตามธรรมชาติ (42.60 ± 0.548 วัน) ตามลำดับ เมื่อวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติพบว่าทุกชุดทดสอบมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ [F (5, 24) = 2245.80, $p \leq 0.05$] แสดงดังรูปที่ 5



รูปที่ 5. อายุเฉลี่ยของฝั่งงานหลังเลี้ยงด้วยอาหารเสริมผสมโพรไบโอติกส์
(ตัวอักษรเหมือนกันไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ความเชื่อมั่นร้อยละ 95)

3.3 อภิปรายผล

จากการศึกษาผลของอาหารเสริมผสมโพรไบโอติกส์ต่อน้ำหนักตัวของฝั่งงาน พบว่าฝั่งงานในทุกชุดทดสอบมีน้ำหนักเพิ่มขึ้นตามลำดับในแต่ละสัปดาห์ และมีน้ำหนักเฉลี่ยเพิ่มขึ้นสูงสุดในสัปดาห์สุดท้ายของการทดลอง (สัปดาห์ที่ 8) โดยฝั่งงานที่เลี้ยงด้วยอาหารตามธรรมชาติมีค่าเฉลี่ยน้ำหนักเพิ่มขึ้นสูงสุดแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ ($p \leq 0.05$) กับฝั่งงานที่เลี้ยงด้วยอาหารเสริมผสมโพรไบโอติกส์ทั้ง 4 ชนิดและฝั่งงานที่เลี้ยงด้วยอาหารเสริมที่ไม่ได้ผสมโพรไบโอติกส์ จึงอธิบายผลการทดลองครั้งนี้ได้ว่าสาเหตุสำคัญที่ทำให้ฝั่งงานที่เลี้ยงด้วยอาหารตามธรรมชาติมีน้ำหนักเฉลี่ยสูงกว่ากลุ่มทดสอบอื่น ๆ ที่ได้รับอาหารเสริมอาจเนื่องจากฝั่งงานต้องออกมาแหล่งพือาหารเองตามธรรมชาติประกอบกับระยะเวลาที่ทำการทดลองเป็นรอยต่อระหว่างฤดูร้อนและฤดูฝน ซึ่งมีพือาหารค่อนข้างมากโดยเฉพาะดอกดาวกระจายได้หวั่นและพืซ้อนในตระกุก

ดาวกระจาย แต่เป็นพืชอาหารที่มีคุณภาพค่อนข้างต่ำ ทำให้ผึ้งต้องทำงานหนักจึงต้องเพิ่มขนาดและน้ำหนักตัวเพื่อให้สามารถแบกน้ำหนักอาหารสำหรับสะสมให้ได้มากเพียงพอต่อความต้องการของสมาชิกภายในรัง [15]-[17] ดังนั้นน้ำหนักตัวของผึ้งงานกลุ่มที่ได้รับอาหารตามธรรมชาติจึงมากกว่าผึ้งงานกลุ่มที่ได้รับอาหารเสริมสอดคล้องกับงานวิจัยของ Sauthier และคณะ [2] ที่ศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างขนาดของผึ้งงานกับฤดูกาลและระยะทางในการหาอาหาร พบว่าขนาดเฉลี่ยของผึ้งงานจะเพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญในช่วงฤดูหาอาหาร และจากการศึกษาข้อมูลเบื้องต้นพบว่าขนาดและน้ำหนักตัวของผึ้งพันธุ์ขึ้นอยู่กับปัจจัยต่าง ๆ ได้แก่ พันธุกรรม ขนาดหลอดรวง (แผ่นรังเทียม) คุณภาพของพืชอาหาร และระยะทางในการหาพืชอาหาร [2], [18],[19] การทดลองในครั้งนี้จึงได้ควบคุมพันธุกรรมโดยสร้างคอนผึ้งงานที่มาจากนางพญาชุดเดียวกัน และควบคุมแผ่นรังเทียมให้มีขนาดเท่ากัน และเมื่อพิจารณาน้ำหนักเฉลี่ยของผึ้งงานที่เลี้ยงด้วยอาหารเสริมผสมโปรไบโอติกส์ และที่เลี้ยงด้วยอาหารเสริมที่ไม่ได้ผสมโปรไบโอติกส์ พบว่าไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ซึ่งอาจสรุปได้ว่าตัวแปรสำคัญของน้ำหนักตัวของผึ้งงานคืออาหารเสริม โดยโปรไบโอติกส์ไม่ส่งผลต่อน้ำหนักตัวของผึ้งงาน

ผึ้งพันธุ์ที่เลี้ยงด้วยอาหารเสริมผสมโปรไบโอติกส์ทั้ง 4 สายพันธุ์ มีอายุของผึ้งงานเฉลี่ยยาวนานกว่าผึ้งที่เลี้ยงด้วยอาหารเสริมที่ไม่ได้ผสมโปรไบโอติกส์และผึ้งที่เลี้ยงด้วยอาหารตามธรรมชาติ แสดงให้เห็นว่าโปรไบโอติกส์ส่งผลโดยตรงต่ออายุของผึ้งงาน สอดคล้องกับงานวิจัยของ Eyer และคณะ [20] ที่พบว่าอายุขัยของผึ้ง *A. mellifera* ขึ้นอยู่กับปัจจัยทางพันธุกรรมและสิ่งแวดล้อม โดยผึ้งงานทั่วไปจะมีอายุประมาณ 5-6 สัปดาห์ในช่วงฤดูร้อน และสามารถอยู่ได้ยาวนานถึง 10 เท่า ในช่วงฤดูหนาวเนื่องจากการทำงานหนักเพื่อหาอาหารจะทำให้ผึ้งอายุสั้นลง [21] ซึ่งผลการทดลองในครั้งนี้ พบว่าผึ้งงานที่เลี้ยงด้วยอาหารเสริมผสมโปรไบโอติกส์มีอายุเฉลี่ยยาวนานถึง 68 วัน (ประมาณ 10 สัปดาห์) ขณะที่ผึ้งที่เลี้ยงด้วยอาหารเสริมที่ไม่ผสมโปรไบโอติกส์และผึ้งที่เลี้ยงด้วยอาหารตามธรรมชาติมีอายุเฉลี่ยเพียง 6-7 สัปดาห์ นอกจากนี้ Behrends และ Scheiner [14] ยังพบว่าผึ้งที่มีอายุมากจะมีการปรับสภาพการได้รับกลิ่นหรือการรับสัมผัสต่อสิ่งแวดล้อม และเมื่อทดสอบประสิทธิภาพการหาอาหารยังพบว่าถึงแม้ผึ้งที่อายุมากจะมีความบกพร่องในการดมกลิ่นเพียงเล็กน้อยแต่ความสามารถในการหาอาหารกลับไม่ได้ลดลงซึ่งแตกต่างจากสัตว์อื่น ๆ ที่ประสิทธิภาพจะลดลงเมื่ออายุมากขึ้น

เมื่อนำข้อมูลดังกล่าวมาเปรียบเทียบกับผลการทดลองในครั้งนี้แสดงให้เห็นว่าโปรไบโอติกส์ส่งผลดีต่อสภาพโดยรวมของรังเนื่องจากอายุของผึ้งงานจะมีความสัมพันธ์โดยตรงกับสุขภาพผึ้ง สอดคล้องกับงานวิจัยของ Chen และคณะ [22] ที่พบว่าอายุของผึ้งเกี่ยวข้องกับปัจจัยทางกายภาพและทางสรีระ ขณะที่ผึ้งอายุน้อยผนังที่ทางเดินอาหารส่วนกลางยังมีความหนาน้อยหรือยังสร้างไม่สมบูรณ์ จึงมักเกิดโรคที่ปนเปื้อนมากับอาหารได้ง่ายกว่าผึ้งที่มีอายุมาก ซึ่งตรงกับผลการทดลองในครั้งนี้ที่พบว่าผึ้งที่ได้รับอาหารเสริมผสมโปรไบโอติกส์มีอายุเฉลี่ยของผึ้งงานยาวนานกว่าชุดทดสอบอื่น สอดคล้องกับงานวิจัยของ Corby-Harris และคณะ [23] ที่ได้ศึกษาความเกี่ยวข้องของกลุ่มแบคทีเรียกับผึ้งงานสายพันธุ์ *A. mellifera* โดยการผสมแบคทีเรียที่สามารถผลิตกรดแลคติก (Lactic Acid Bacteria: LAB) ลงในหลอดรวงรังที่เก็บสะสมเกสร พบว่าแบคทีเรียมีบทบาทในการป้องกันการติดเชื้อโรคของผึ้ง สามารถทำให้ค่าเฉลี่ยของอายุผึ้งงานเพิ่มขึ้น และสอดคล้องกับงานวิจัยของ Corby-Harris และคณะ [24] ศึกษา *Parasaccharibacter apium* ซึ่งเป็นแบคทีเรียชนิดใหม่ในการปรับปรุงความต้านทานเชื้อ *Nosema* ในผึ้งพันธุ์ *A. mellifera*

พบว่าช่วยเพิ่มอัตราการรอดชีวิตของตัวอ่อนได้ ข้อมูลดังกล่าวสนับสนุนงานวิจัยในครั้งนี้อย่างเห็นได้ชัดว่า โปรไบโอติกส์ช่วยให้ผึ้งพันธุ์มีอายุเฉลี่ยยาวนานขึ้น ทั้งนี้เพราะโปรไบโอติกส์ช่วยส่งเสริมและกระตุ้นลำไส้ของผึ้งงานในผึ้งพันธุ์ (*A. mellifera*) ให้มีพัฒนาการในการดูดซึมอาหารและมีความสัมพันธ์กับพัฒนาการที่ดีของรังผึ้ง [25] และเมื่อพิจารณาผลของโปรไบโอติกส์ทั้ง 4 สายพันธุ์ต่ออายุของผึ้งงาน พบว่าไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ($p < 0.05$) ดังนั้นในการวิจัยขั้นต่อไปจึงควรมีการตรวจวัดการสะสมของสาร lipofuscin ซึ่งเป็นสาระสำคัญที่ทำให้เซลล์เกิดการเสื่อมสภาพ [26] เพื่อเปรียบเทียบความแตกต่างระหว่างผลของโปรไบโอติกส์แต่ละสายพันธุ์

ผลการทดลองครั้งนี้บ่งชี้ว่าโปรไบโอติกส์ทั้ง 4 ชนิด ช่วยส่งเสริมอายุผึ้งงานให้ยืนยาวกว่ากลุ่มควบคุม สามารถนำไปพัฒนาเป็นส่วนผสมในผลิตภัณฑ์อาหารเสริมสำหรับเลี้ยงผึ้งพันธุ์ต่อไป ทั้งนี้ควรพิจารณาผลด้านอื่น ๆ ร่วมด้วย โดยเลือกใช้ชนิดของเชื้อที่เหมาะสมที่สุดตามวัตถุประสงค์ของเกษตรกรหรืออาจพัฒนาในรูปแบบของหัวเชื้อผสมเพื่อให้ได้ประสิทธิภาพสูงสุด

4. สรุปผลการวิจัย

ผึ้งพันธุ์ (*A. mellifera*) ทุกชุดทดสอบมีน้ำหนักเฉลี่ยสูงสุดในสัปดาห์ที่ 8 โดยผึ้งงานที่เลี้ยงด้วยอาหารตามธรรมชาติมีค่าเฉลี่ยน้ำหนักที่เพิ่มขึ้นสูงสุด (113.76 ± 24.88 มิลลิกรัม) รองลงมาคือผึ้งงานที่เลี้ยงด้วยอาหารเสริมผสม *L. casei* (101.36 ± 15.23 มิลลิกรัม) ผึ้งงานที่เลี้ยงด้วยอาหารเสริมผสม *L. curvatus* (96.78 ± 12.69 มิลลิกรัม) ผึ้งงานที่เลี้ยงด้วยอาหารเสริมผสม *L. plantarum* (95.66 ± 15.29 มิลลิกรัม) ผึ้งงานที่เลี้ยงด้วยอาหารเสริมผสม *L. acidophilus* (93.52 ± 14.61 มิลลิกรัม) และผึ้งงานที่เลี้ยงด้วยอาหารเสริมที่ไม่ได้ผสมโปรไบโอติกส์ (92.62 ± 12.84 มิลลิกรัม) และเมื่อวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ พบว่าผึ้งงานในกลุ่มที่เลี้ยงด้วยอาหารตามธรรมชาติมีค่าเฉลี่ยน้ำหนักแตกต่างจากผึ้งงานกลุ่มที่เลี้ยงด้วยอาหารเสริมผสมโปรไบโอติกส์จากแบคทีเรียกรดแลคติกทั้ง 4 ชนิดและอาหารเสริมที่ไม่ได้ผสมโปรไบโอติกส์อย่างมีนัยสำคัญ ($p < 0.05$) และผลจากการศึกษาอายุของผึ้งพบว่าผึ้งงานที่เลี้ยงด้วยอาหารเสริมผสม *L. plantarum* มีอายุเฉลี่ยสูงสุด (68.60 ± 0.707 วัน) รองลงมาคือผึ้งงานที่เลี้ยงด้วยอาหารเสริมผสม *L. acidophilus* (67.60 ± 0.548 วัน) ผึ้งงานที่เลี้ยงด้วยอาหารเสริมผสม *L. casei* (67.40 ± 0.548 วัน) และผึ้งงานที่เลี้ยงด้วยอาหารเสริมผสม *L. curvatus* (66.80 ± 0.447 วัน) ตามลำดับ และเมื่อวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติพบว่าค่าเฉลี่ยอายุของผึ้งงานที่เลี้ยงด้วยอาหารเสริมผสมโปรไบโอติกส์ทั้ง 4 สายพันธุ์มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ($p < 0.05$) กับผึ้งงานที่เลี้ยงด้วยอาหารเสริมที่ไม่ผสมโปรไบโอติกส์ (51.80 ± 0.447 วัน) และผึ้งงานที่เลี้ยงด้วยอาหารตามธรรมชาติ (42.60 ± 0.548 วัน) ผลการทดลองดังกล่าวบ่งชี้ได้ว่าอาหารเสริมผสมโปรไบโอติกส์ทั้ง 4 ชนิด มีผลต่ออายุของผึ้งงานในผึ้งพันธุ์ โดยผึ้งงานที่ได้รับอาหารเสริมผสมเชื้อ *L. plantarum* มีอายุเฉลี่ยสูงสุด เหมาะที่จะนำไปพัฒนาเป็นอาหารเสริมผสมโปรไบโอติกส์เพื่อทดแทนอาหารธรรมชาติในฤดูขาดแคลนอาหารและส่งเสริมอายุของผึ้งพันธุ์ให้ยืนยาว

กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบคุณศูนย์ส่งเสริมเทคโนโลยีการเกษตรด้านแมลงเศรษฐกิจ จังหวัดเชียงใหม่ ที่ให้ความอนุเคราะห์วัสดุอุปกรณ์ และสถานที่ทำวิจัย

เอกสารอ้างอิง (References)

- [1] Kjohl, M., Nielsen, A., and Stenseth, N.C. 2011. Potential effects of climate change on crop pollination. Food and Agriculture Organization of the United Nations, Rome, 38p.
- [2] Sauthier, R., Price, R.I.A. and Gruter, C. 2017. Worker size in honeybees and its relationship with season and foraging distance. *Apidologie*, 48, 234–246. doi: 10.1007/s13592-016-0468-0.
- [3] Anderson, K.E., Sheehan, T.H., Eckholm, B.J., Mott, B.M. and De Grandi-Hoffman G. 2011. An emerging paradigm of colony health: microbial balance of the honey bee and hive (*Apis mellifera*). *Insectes Sociaux*, 58, 431. doi:10.1007/s00040-011-0194-6.
- [4] Syromyatnikov, M.Y., Isuwa, M.M., Savinkova, O.V., Derevshchikova, M.I. and Popov, V.N. 2020. The effect of pesticides on the microbiome of animals. *Agriculture*, 10(3), 79-92. doi:10.3390/agriculture10030079.
- [5] สิริวัฒน์ วงษ์ศิริ และนิคม โคตรสุวรรณ. 2562. บทความพิเศษชุด : ความหวานและอำนาจ-หอบรวงผึ้งหาแหล่งความหวาน (2), แหล่งข้อมูล <https://theisaanrecord.co/2019/09/20/sweetness-and-power-part-12-th/>. ค้นเมื่อวันที่ 10 กรกฎาคม 2565. [Sirieat Wongsiri, and Nikhom Khotsuwan. 2019. Special articles: Sweetness and power-gather up the hive for sweet source (2), from <https://theisaanrecord.co/2019/09/20/sweetness-and-power-part-12-th/>. Retrieved 10 July 2022. (in Thai)]
- [6] ภาณุวรรณ จันทวรรณกุล, วรรณจันทร์ แสงหิรัญ ลี, ปิยรัตน์ นิมมานพิภักดิ์ และศศิประภา ครองแดง. 2561. ผึ้ง สารฆ่าแมลง ผลกระทบต่อระบบนิเวศ และสุขภาพของมนุษย์. แม็กซ์ปริ้นติ้ง, เชียงใหม่. [Panuwan Chantawannakul, Vannajan Sanghiran Lee, Piyaat Nimmanpipug, and Sasiprapa Krongdang. 2018. Bee, pesticide, the impact on ecosystem and human health. MaxxPRINTING™, Chiangmai. (in Thai)]
- [7] Mountzouris, K., Tsitsrikos, 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. doi:103382/ps.2009-00308.
- [8] ชัยวัฒน์ ไชยสุต. 2554. โพรไบโอติก : จุลินทรีย์เพื่อชีวิต. อินฟินิตี้ คัลเลอร์ พรินติ้ง, กรุงเทพฯ. [Chaiwat Chaiyasut. 2011. Probiotics: microorganisms for life. Infinity color Printing, Bangkok. (in Thai)]
- [9] De Man, J.C., Rogosa, M. and Sharpe, M.E. 1960. A medium for the cultivation of lactobacilli. *Journal of Applied Bacteriology*, 23, 130-135.

- [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 & Shellfish Immunology*, 73, 1-10.
- [11] Coeuret, V., Gueguen M. and Vernoux J.P. 2004. Numbers and strains of lactobacilli in some probiotic products. *International Journal of Food Microbiology*, 97, 147-56.
- [12] Human, H., Brodschneider, R., Dietemann, V., Dively, G., Ellis, J.D., Forsgren, E., Fries, I., Hatjina, F., Hu, F.L., Jaffe, R., Jensen, A.B., Köhler, A., Magyar, J.P., Ozkırým, A., Pirk, C.W.W., Rose, R., Strauss, U., Tanner, G., Tarpy, D.R., van der Steen, J.J.M., Vaudo, A., Vejsnæs, F., Wilde, J., Williams, G.R. and Zheng, H.Q. 2013. Miscellaneous standard methods for *Apis mellifera* research. *Journal of Apicultural Research*, 5(4), 1-53. doi: 10.3896/IBRA.1.52.4.10.
- [13] Giovanetti, M. and Lasso, E. 2005. Body size, loading capacity and rate of reproduction in the communal bee *Andrena agilissima* (Hymenoptera; Andrenidae). *Apidologie*, 36(3), 439-447.
- [14] Behrends, A. and Scheiner, R. 2010. Learning at old age: a study on winter bees. *Frontiers in Behavioral Neuroscience*. 4(15), 1-11. doi:10.3389/fnbeh.2010.00015.
- [15] Greenleaf, S.S., Williams, N.M., Winfree, R. and Kremen, C. 2007. Bee foraging ranges and their relationship to body size. *Oecologia*, 153(3), 589-596. doi: 10.1007/s00442-007-0752-9.
- [16] Di Pasquale, G., Salignon, M., Conte, Y.L., Belzunces, L.P., Decourtye, A., Kretzschmar, A., Suchail, S., Brunet, J.L. and Alaux, C. 2013. Influence of pollen nutrition on honey bee health: Do pollen quality and diversity matter? *PLoS ONE*, 8(8), e72016. doi: 10.1371/journal.pone.0072016.
- [17] Frias, B.E.D., Barbosa, C. and Lourenco, A.P. 2016. Pollen nutrition in honey bees (*Apis mellifera*): impact on adult health. *Apidologie*, 47, 15–25. doi: 10.1007/s13592-015-0373-y.
- [18] Mc Mullan, J.B. and Brown, M.J.F. 2006. The influence of small-cell brood combs on the morphometry of honeybees (*Apis mellifera*). *Apidologie*, 37(6), 665-672. doi: 10.1051/apido:2006041.
- [19] Slater, G. 2017. Comb management part 2: Comb size., Available at: <https://beeinfo.rned.org/2017/11/03/comb-management-part2-comb-size/> Retrieved July 10, 2022.
- [20] Eyer, M., Dainat, B., Neumann, P. and Dietemann, V. 2017. Social regulation of ageing by young workers in the honey bee, *Apis mellifera*. *Experimental Gerontology*, 87(Pt A), 84–91. doi:10.1016/j.exger.2016.11.006.

- [21] Gillespie, C. 2018. What is the life Span of a honey bee? Available at: <https://sciencing.com/life-span-honey-bee-6573678.html>. Retrieved April 13, 2021.
- [22] Chen, Y.W., Hwang, G.Y. and Ho, K.K. 2000. Susceptibility of the asian honey bee *Apis cerana* to american foulbrood *Paenibacillus larvae*. *Journal of Apicultural Research*, 39(1), 169-175.
- [23] Corby-Harris, V., Maes, P. and Anderson, K.E. 2014. The bacterial communities associated with honey bee (*Apis mellifera*) foragers. *PLoS ONE*, 9(4), e95056. doi:10.1371/journal.pone.0095056.
- [24] Corby-Harris, V., Snyder, L., Meador, C.A.D., Naldo, R., Mott, B. and Anderson, K.E. 2016. *Parasaccharibacter apium*, gen. nov., sp. nov., improves honey bee (Hymenoptera: Apidae) resistance to *Nosema*. *Journal of Economic Entomology*, 109(2), tow012. doi:10.1093/jee/tow012: 1-7.
- [25] Patruica, S. and 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(3), 259-263. doi:10.3906/vet-1110-20.
- [26] Münch, D., Kreibich, C.D. and Amdam, G.V. 2013. Aging and its modulation in a long-lived worker caste of the honey bee. *Journal of Experimental Biology*, 216(Pt9), 1638-1649. doi:10.1242/jeb.078915.