



## รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

โครงการ ความหลากหลายของพืชและสารเคมีตกค้างใน  
พื้นที่เกษตรกรรมและพื้นที่ป่าบริเวณภาคเหนือของ  
ประเทศไทยโดยการวิเคราะห์เกสรที่เก็บโดยผึ้ง

โดย วีรพันธ์ ไชยมณี

มิถุนายน 2560

สัญญาเลขที่ TRG5880180

รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

โครงการ ความหลากหลายของพืชและสารเคมีตกค้างใน  
พื้นที่เกษตรกรรมและพื้นที่ป่าบริเวณภาคเหนือของ  
ประเทศไทยโดยการวิเคราะห์เกสรที่เก็บโดยผึ้ง

วีรพันธ์ ไชยมณี  
มหาวิทยาลัยแม่โจ้

สนับสนุนโดยสำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัยและ  
มหาวิทยาลัยแม่โจ้

(ความเห็นในรายงานนี้เป็นของผู้วิจัย  
สกว.และมหาวิทยาลัยแม่โจ้ไม่จำเป็นต้องเห็นด้วยเสมอไป)

## กิตติกรรมประกาศ

โครงการวิจัยเรื่อง ความหลากหลายของพืชและสารเคมีตกค้างในพื้นที่เกษตรกรรมและพื้นที่ป่าบริเวณภาคเหนือของประเทศไทยโดยการวิเคราะห์เกสรที่เก็บโดยผึ้งนี้ได้รับทุนสนับสนุนการวิจัยจากสำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย มหาวิทยาลัยแม่โจ้-แพร์ เฉลิมพระเกียรติ และมหาวิทยาลัยแม่โจ้ และงานวิจัยนี้สำเร็จลุล่วงได้ด้วยดีด้วยการสนับสนุนและความช่วยเหลือจากบุคคลหลายฝ่าย ซึ่งทางผู้จัดทำโครงการวิจัยต้องขอกราบขอบพระคุณมา ณ โอกาสนี้ด้วย

ขอขอบพระคุณ Dr. Jeffery S. Pettis จากสถาบันผึ้ง มหาวิทยาลัยเบิร์น ประเทศสวิตเซอร์แลนด์ (Institute of Bee Health, University of Bern, Switzerland) และ รองศาสตราจารย์ ดร. ภาณุวรรณ จันทวรรณกุล ที่คอยให้คำแนะนำ คำปรึกษา ตลอดจนความช่วยเหลือในด้านต่าง ๆ เกี่ยวกับการทำวิจัยในครั้งนี้ให้สำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยดี

ขอขอบคุณสาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ และห้องปฏิบัติการทางวิทยาศาสตร์มหาวิทยาลัยแม่โจ้-แพร์ เฉลิมพระเกียรติ ตลอดจนเจ้าหน้าที่ผู้เกี่ยวข้องที่อำนวยความสะดวกในการใช้สถานที่สำหรับการศึกษาวิจัยในครั้งนี้

ขอขอบคุณลูกศิษย์ที่นารักทุกคนที่ช่วยกันทำงานวิจัยนี้อย่างแข็งขัน จนทำให้งานวิจัยนี้สำเร็จไปได้

สุดท้ายขอกราบขอบพระคุณคุณพ่อและคุณแม่ สำหรับขวัญและกำลังใจ และการสนับสนุนในทุกด้าน เพื่อให้มีพลังในการทำงานจนสามารถทำงานวิจัยลุล่วงไปได้ด้วยดี

วีรพันธ์ ไชยมณี

มิถุนายน 2560

## บทคัดย่อ

รหัสโครงการ : TRG5880180

ชื่อโครงการ : ความหลากหลายของพืชและสารเคมีตกค้างในพื้นที่เกษตรกรรมและพื้นที่ป่า  
บริเวณภาคเหนือของประเทศไทยโดยการวิเคราะห์เกสรที่เก็บโดยผึ้ง

ชื่อนักวิจัย : ดร. วีรพันธ์ ไชยมณี มหาวิทยาลัยแม่โจ้-แพร่ เฉลิมพระเกียรติ

E-mail Address : chveeranana@gmail.com

ระยะเวลาโครงการ : 1 กรกฎาคม 2558 ถึง 30 มิถุนายน 2560

ความหลากหลายและคุณภาพของเกสรพืชถือได้ว่าเป็นความจำเป็นต่อการพัฒนาและอายุของผึ้ง โดยการขาดแคลนสารอาหารนั้นถูกพิจารณาให้เป็นอีกหนึ่งปัจจัยที่ส่งผลให้ประชากรของผึ้งลดลง ซึ่งในงานวิจัยนี้ได้ทำการศึกษาเกี่ยวกับความอุดมสมบูรณ์ของแหล่งอาหารโปรตีน โดยดูจากความหลากหลายของเกสรพืช รวมถึงชนิดและปริมาณสารเคมีที่ตกค้างในเกสรพืช ที่ผึ้งเก็บเข้ามาในรัง ทำการศึกษาทั้งหมด 4 จังหวัดภาคเหนือของประเทศไทย คือ เชียงใหม่ ลำปาง พะเยา และแพร่ โดยนำรังผึ้งไปตั้งอยู่ในบริเวณพื้นที่เกษตรกรรมและในบริเวณที่อยู่ห่างไกลพื้นที่เกษตรกรรม ทำการเก็บเกสรในทุก ๆ เดือน เป็นระยะเวลา 1 ปี จากนั้นนำตัวอย่างเกสรที่ได้มาทำการแยกออกตามสีของเกสรเพื่อดูความหลากหลายของเกสรที่ผึ้งเก็บเข้ามา จากผลการศึกษา พบว่า ในพื้นที่จังหวัดเชียงใหม่มีความหลากหลายของพืชเกสรค่อนข้างดี ซึ่งพบอย่างน้อย 4 ชนิดเกสรในแต่ละช่วงเวลาที่ทำการศึกษา ส่วนในจังหวัดแพร่นั้นพบว่าตัวอย่างเกสรที่เก็บในเดือนกุมภาพันธ์ 2559 จัดได้ว่าเกสรแต่ละชนิดนั้นจัดอยู่ในสัดส่วนที่เหมาะสม แต่อย่างไรก็ตามตัวอย่างเกสรพืชในจังหวัดลำปางที่เก็บในเดือนพฤศจิกายนนั้นมีพืชเพียงชนิดเดียวที่มีสัดส่วนมากที่สุดถึง 80 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งอาจจะจัดได้ว่ามีความหลากหลายของพืชค่อนข้างน้อยต่อการเลี้ยงผึ้ง เช่นเดียวกันกับจังหวัดพะเยาพบว่ามีพืชเกสรเพียง 2-3 ชนิดเท่านั้นที่ผึ้งเก็บเข้ามาในรัง นอกจากนี้งานวิจัยนี้ยังได้ทำการวิเคราะห์หาชนิดและปริมาณของสารเคมีที่ตกค้างอยู่ในเกสรอีกด้วย โดยพบสารเคมีจำนวน 8 กลุ่มในตัวอย่างที่ทำการศึกษา คือ ยาฆ่าวัชพืช ยาฆ่าเชื้อรา ฟอรัมามิติน ออกาโนฟอสเฟส ไพรีทรอยด์ และนีโอนิโคตินอยด์ ในปริมาณที่แตกต่างกันในเกสรที่เก็บมาจากพื้นที่เกษตรกรรมและในบริเวณที่อยู่ห่างไกลพื้นที่เกษตรกรรม ซึ่งสารเคมีทั้งหมดที่ตรวจพบนี้ค่อนข้างที่จะมีปริมาณต่ำ ดังนั้นพื้นที่ทางภาคเหนือของประเทศไทยน่าจะจัดเป็นพื้นที่ที่เหมาะสมสำหรับการเลี้ยงขยายรังผึ้งและผลิตน้ำผึ้ง

คำสำคัญ: ผึ้ง, *Apis mellifera*, ความหลากหลายของพืช, สารเคมีตกค้าง, เกสร, ภาคเหนือของประเทศไทย

## Abstract

Project Code: TRG5880180

Project Title : Plant diversity and pesticide residues in agricultural and wild areas of Northern Thailand as measured in honeybee collected pollen

Investigator : Dr. Veeranan Chaimanee, Maejo University Phrae Campus

E-mail Address : chveeranan@gmail.com

Project Period : July 1<sup>st</sup> 2015 - June 30<sup>th</sup> 2017

Pollen diversity and quality are necessary for optimal honeybee development and longevity. Nutritional deficiency is considered as a factor in honeybee population decline. Here, the nutritional richness of protein for bees based on pollen/plant diversity and the pesticide residues in pollen were studied. Honeybee colonies (*Apis mellifera*) were used to collect pollen at monthly intervals in four provinces of Northern Thailand. At each location an agricultural and non-agricultural areas were selected for pollen collection which resulted in 8 distinct sites. Bee-collected pollen was sorted by color to determine plant diversity at each location. The two sites at Chiang Mai consistently showed good plant diversity as four or more pollen types were recorded at each date of collection. An individual collection that exhibits ideal diversity is February 2016 in Phrae where four distinct pollens were approximately 25% of the sample. In contrast, Lampang in November had over 80% of the total pollen represented by a single plant; an example of inadequate nutritional diversity for bees. Also in Phayao only 2-3 pollen types were dominant at both sites which may indicate less than optimal areas to maintain bee colonies. Additionally, pollen was analyzed for 170 common pesticides to determine the level of pesticide exposure at each location. We found 8 different pesticides such as herbicides, fungicides, formamidines, organophosphates, pyrethroids and neonicotinoids at different levels between agricultural and non-agricultural locations. However, overall the detection of agricultural chemicals was low. Therefore, many areas of Northern Thailand do offer a relatively clean environment in which to keep honeybees and produce honey.

**Keywords:** honeybees/*Apis mellifera*/plant diversity/pesticide residues /pollen/  
northern Thailand

## สารบัญ

	หน้า
กิตติกรรมประกาศ.....	i
บทคัดย่อ.....	ii
Abstract.....	iii
สารบัญ.....	iv
สารบัญตาราง.....	vi
สารบัญภาพ.....	vii
บทที่ 1 บทนำ.....	1
ที่มาและความสำคัญ.....	1
วัตถุประสงค์.....	2
บทที่ 2 เอกสาร และงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง.....	3
ผึ้ง (Honey bee).....	3
สปีชีส์ของผึ้ง (Honeybee species).....	5
วงจรชีวิต และระยะการเจริญเติบโตของผึ้ง.....	7
ปัญหาของการเลี้ยงผึ้ง.....	8
เกสรพืช (Pollen).....	9
บทที่ 3 วิธีการดำเนินการวิจัย.....	12
การเก็บตัวอย่างเกสร.....	12
การวิเคราะห์ความหลากหลายของเกสร .....	12
การวิเคราะห์หาสารเคมีตกค้างในเกสร.....	12
บทที่ 4 ผลการวิจัย.....	14
ความหลากหลายของเกสรพืชในบริเวณพื้นที่เกษตรกรรมและบริเวณที่ไม่ใช่ พื้นที่เกษตรกรรม.....	14

สารบัญ (ต่อ)	หน้า
ชนิดและปริมาณของสารเคมีตกค้างในเกษตรพืชที่ฝังเก็บเข้ามาในรั้งบริเวณ พื้นที่เกษตรกรรม และพื้นที่ที่ห่างจากการทำเกษตรกรรม.....	21
บทที่ 5 อภิปรายและสรุปผลการวิจัย .....	25
ข้อเสนอแนะ.....	27
บรรณานุกรม.....	28
บทความงานวิจัยรอการตีพิมพ์.....	31

## สารบัญญัตินำ

ตารางที่		หน้า
4.1	จำนวนชนิดของเกสรพืชที่แยกตามสีของเกสรที่เก็บมาจากบริเวณพื้นที่เกษตรกรรม และพื้นที่ที่ห่างจากการทำเกษตรกรรมในจังหวัดเชียงใหม่ ลำปาง พะเยา และแพร่ ในช่วงเดือนตุลาคม 2558 ถึงเดือนกันยายน 2559.....	16
4.2	เปอร์เซ็นต์การตรวจพบสารเคมีตกค้างในตัวอย่างเกสรพืชที่เก็บมาจากพื้นที่เกษตรกรรม และจากบริเวณที่ห่างจากพื้นที่เกษตรกรรม.....	21
4.3	ชนิดและปริมาณสารเคมีที่ตกค้างในเกสรพืชที่เก็บจากบริเวณพื้นที่เกษตรกรรมในจังหวัดเชียงใหม่ ลำปาง พะเยา และแพร่.....	22
4.4	ชนิดและปริมาณสารเคมีที่ตกค้างในเกสรพืชที่เก็บจากบริเวณที่ห่างจากพื้นที่เกษตรกรรมในจังหวัดเชียงใหม่ ลำปาง พะเยา และแพร่.....	24

## สารบัญภาพ

ภาพที่		หน้า
2.1	อนุกรมวิธานของผึ้ง.....	3
2.2	ลักษณะของผึ้งงาน (Worker) ผึ้งนางพญา (Queen) และผึ้งตัวผู้ (Drone).....	4
2.3	ลักษณะลำตัวของผึ้งพันธุ์ ( <i>A. mellifera</i> ) และลักษณะผึ้งภายในรังผึ้งพันธุ์.....	5
2.4	ลักษณะลำตัวของผึ้งโพรง ( <i>A. cerana</i> ) และรวงรังของผึ้งโพรง.....	6
2.5	ลักษณะลำตัวของผึ้งหลวง ( <i>A. dorsata</i> ) และรวงรังของผึ้งหลวง.....	6
2.6	ลักษณะลำตัวของผึ้งมีม ( <i>A. florea</i> ) และรวงรังของผึ้งมีม.....	7
2.7	ลักษณะลำตัวของผึ้งม้าน ( <i>A. andreniformis</i> ) และรวงรังของผึ้งม้าน.....	7
2.8	วงจรชีวิตของผึ้ง.....	8
2.9	การเก็บรวบรวมเรณูของผึ้ง.....	10
3.1	การคัดแยกสีเกสรพืชด้วยตาเปล่า.....	13
4.1	สัดส่วนของเกสรพืชแต่ละชนิดที่แยกตามสีของเกสรในบริเวณพื้นที่เกษตรกรรม และพื้นที่ที่ห่างจากการทำเกษตรกรรมในจังหวัดเชียงใหม่ ในช่วง เดือนตุลาคม 2558 ถึงเดือนกันยายน 2559.....	17
4.2	สัดส่วนของเกสรพืชแต่ละชนิดที่แยกตามสีของเกสรในบริเวณพื้นที่เกษตรกรรม และพื้นที่ที่ห่างจากการทำเกษตรกรรมในจังหวัดลำปาง ในช่วง เดือนตุลาคม 2558 ถึงเดือนกันยายน 2559.....	18
4.3	สัดส่วนของเกสรพืชแต่ละชนิดที่แยกตามสีของเกสรในบริเวณพื้นที่เกษตรกรรม และพื้นที่ที่ห่างจากการทำเกษตรกรรมในจังหวัดพะเยา ในช่วงเดือนตุลาคม 2558 ถึงเดือนกันยายน 2559.....	19
4.4	สัดส่วนของเกสรพืชแต่ละชนิดที่แยกตามสีของเกสรในบริเวณพื้นที่เกษตรกรรม และพื้นที่ที่ห่างจากการทำเกษตรกรรมในจังหวัดแพร่ ในช่วงเดือนตุลาคม 2558 ถึงเดือนกันยายน 2559.....	20

## บทที่ 1

### บทนำ (Introduction)

#### ที่มาและความสำคัญ

ผึ้งเป็นแมลงที่มีความสัมพันธ์เกี่ยวข้องกับมนุษย์ และการเกษตรมาเป็นเวลายาวนาน ซึ่งผึ้งเป็นแมลงที่ช่วยเพิ่มผลผลิตของพืชผลทางการเกษตร โดยผึ้งจะมีบทบาทในการผสมเกสรจากการถ่ายละอองเกสรจากดอกหนึ่งไปสู่อีกดอกหนึ่งเพื่อเป็นการขยายพันธุ์ของพืช และให้พืชมีความหลากหลายมากยิ่งขึ้น ซึ่งการผสมเกสรของพืชผลทางการเกษตรนั้น พบว่ามีการอาศัยแมลงเป็นตัวช่วยในการผสมเกสรเป็นจำนวนถึง 35 เปอร์เซ็นต์ และในจำนวนแมลงทั้งหมดนี้ ถือได้ว่าการผสมเกสรเกิดขึ้นโดยอาศัยผึ้งถึง 90 เปอร์เซ็นต์ (Klein et al., 2007) ในประเทศสหรัฐอเมริกาได้รายงานว่ามีผึ้งสามารถช่วยเพิ่มผลผลิตได้ประมาณ 15 ล้านดอลลาร์ต่อปี (Morse and Calderone, 2000) ซึ่งนอกจากน้ำผึ้ง (honey) และการช่วยผสมเกสรผึ้งแล้วนั้น ยังมีผลิตภัณฑ์อีกหลายชนิดที่ได้จากผึ้ง ได้แก่ นมผึ้งหรือรอยัลเจลลี่ (royal jelly) ไขผึ้ง (bee wax) พรอพอลิส (propolis) เกสรผึ้ง (bee pollen) และพิษผึ้ง (bee venom) อีกด้วย ในประเทศไทย มีผึ้งอยู่อย่างน้อย 5 ชนิด ได้แก่ ผึ้งพันธุ์ (*Apis mellifera*) ผึ้งโพรง (*Apis cerana*) ผึ้งมิม (*Apis florea*) ผึ้งหลวง (*Apis dorsata*) และผึ้งมิมเล็ก (*Apis andreniformis*) ในประเทศไทยนั้นมีการเลี้ยงผึ้งจำนวนมาก โดยเฉพาะทางภาคเหนือ เช่น เชียงใหม่ ลำพูน ลำปาง น่าน พะเยา และแพร่ แต่ในปัจจุบันพบว่าประชากรของผึ้งมีจำนวนลดลงอย่างมากในหลายประเทศในทวีปยุโรป อเมริกา รวมถึงทวีปเอเชียด้วย ซึ่งประเทศไทยเองก็ได้มีการรายงานว่าการสูญเสี้ยงผึ้งไปจำนวนมาก โดยอาจจะมีหลายปัจจัยที่ส่งผลต่อการลดจำนวนของผึ้ง เช่น เชื้อแบคทีเรีย (Bacteria) เช่น *Paenibacillus larvae* และ *Melissococcus pluton* ที่ก่อให้เกิดโรคตัวอ่อนเน่าอเมริกัน (American Foulbrood Disease, AFB) และโรคตัวอ่อนเน่ายุโรป (European Foulbrood Disease, EFB) ตามลำดับ เชื้อไวรัส (Virus) เช่น Black queen cell virus และ Deformed wing virus เป็นต้น ฟังไจ (Fungi) เช่น โรคชอล์คบรูด (Chalk brood disease) ซึ่งมีสาเหตุมาจากเชื้อ *Ascosphaera apis* และไมโครสปอริเดีย (Microsporidia) เช่น *Nosema apis* และ *Nosema ceranae* นอกจากนั้นสภาวะการขาดอาหารของผึ้ง และการได้รับสารเคมีของผึ้ง ก็ส่งผลให้จำนวนประชากรของผึ้งลดลงด้วยเช่นเดียวกัน อีกทั้งเมื่อมีปัจจัยต่าง ๆ เหล่านี้รวมกัน ก็ยิ่งส่งผลให้ผึ้งมีความอ่อนแอมากยิ่งขึ้นด้วย (Alaux et al., 2010; Pettis et al., 2012, 2013)

ปัจจุบันมีการรายงานถึงสภาวะการขาดแคลนอาหาร และการอดอาหารของผึ้งนั้นส่งผลต่อการสูญเสี้ยงผึ้งไปจำนวนมาก (vanEngelsdorp et al., 2008) โดยพืชถือเป็นสิ่งสำคัญต่อผึ้งมากที่สุดที่สามารถผลิตน้ำหวานและเกสร ซึ่งน้ำหวานและเกสรเป็นแหล่งพลังงาน และแหล่ง

โปรตีนที่สำคัญเพื่อการเจริญเติบโตของผึ้ง และตัวอ่อนภายในรัง ผึ้งจะขาดน้ำหวานและเกสรของพืชไม่ได้ เกสรพืชถือได้ว่าเป็นแหล่งโปรตีนที่สำคัญของผึ้ง รวมถึงเป็นแหล่งของกรดอะมิโน ไชมัน วิตามิน และแร่ธาตุต่าง ๆ ด้วย (Roulston and Cane, 2000) ดังนั้นคุณภาพและความหลากหลายของเกสรพืชจึงเป็นสิ่งสำคัญสำหรับการพัฒนาของตัวอ่อนผึ้ง รวมถึงช่วยให้มีระบบภูมิคุ้มกันที่ดีด้วย (Alaux et al., 2010; Di Pasquale et al., 2013) อย่างไรก็ตามในเกสรพืชที่ผึ้งเก็บมานั้นก็อาจจะมีการปนเปื้อนของสารเคมีที่ใช้ในด้านการเกษตรอยู่ด้วย โดยกลุ่มสารเคมีที่มีการตรวจพบในเกสรพืช ไชผึ้ง และแผ่นรวงผึ้ง ประกอบด้วย ยาฆ่าเชื้อรา (fungicide) ยาฆ่าแมลง (insecticide) ยาฆ่าวัชพืช (herbicide) และยาฆ่าไร (miticide) (Johnson et al., 2010; Mullin et al., 2010; Wu et al., 2011, Pettis et al., 2013) โดยสารเคมีเหล่านี้มีผลกระทบต่อการพัฒนาของตัวอ่อน อายุของผึ้ง พฤติกรรมผึ้ง การเรียนรู้และการรับรู้ของผึ้ง นอกจากนี้ยังส่งผลต่อสเปิร์มของผึ้งตัวผู้ จำนวนสเปิร์มและน้ำหนักตัวของผึ้งราชินีอีกด้วย

ในประเทศไทยพบว่ามีการใช้สารเคมีในพื้นที่เกษตรกรรมกันอย่างกว้างขวาง และยังมี การใช้ยาฆ่าไรในรังผึ้งอีกด้วย อย่างไรก็ตามยังไม่มียงานวิจัยที่รายงานเกี่ยวกับความหลากหลายของเกสรพืช และชนิดและปริมาณของสารเคมีที่ตกค้างอยู่ในเกสรพืช ดังนั้นงานวิจัยนี้จึงได้ทำการศึกษาเปรียบเทียบความหลากหลายของพรรณพืชโดยวิธีการเก็บเกสรของพืชจากตัวผึ้ง และชนิดและปริมาณของสารเคมีที่ตกค้างในเกสรจากพื้นที่เกษตรกรรมและพื้นที่ป่าทางภาคเหนือของประเทศไทย ซึ่งในการศึกษาครั้งนี้จะทำให้ทราบถึงความหลากหลายของชนิดพรรณพืชที่ผึ้งใช้เป็นแหล่งอาหารและสารเคมีที่ตกค้างที่จะนำไปสู่ความเข้าใจเกี่ยวกับปัจจัยที่มีผลต่อการลดลงของประชากรผึ้งในภาคเหนือได้ดียิ่งขึ้น นอกจากนี้ข้อมูลนี้ยังจะช่วยให้เกษตรกรผู้เลี้ยงผึ้งสามารถจัดการเลี้ยงผึ้งได้ดียิ่งขึ้นด้วย

### วัตถุประสงค์ (Objectives)

1. เพื่อเปรียบเทียบความหลากหลายของเกสรพืชที่เก็บโดยผึ้งจากพื้นที่เกษตรกรรม และพื้นที่ป่าทางภาคเหนือของประเทศไทย
2. เพื่อวิเคราะห์หาชนิดและปริมาณของสารเคมีที่ตกค้างในเกสรพืชที่เก็บจากพื้นที่เกษตรกรรมและพื้นที่ป่าทางภาคเหนือของประเทศไทย
3. นำข้อมูลที่ได้มาวิเคราะห์ร่วมกับปัจจัยอื่น ๆ ที่มีผลต่อการลดลงของประชากร ผึ้งในประเทศไทย และเพื่อเป็นแนวทางให้เกษตรกรผู้เลี้ยงผึ้งจัดการเลี้ยงผึ้งได้อย่างมีประสิทธิภาพมากยิ่งขึ้น

## บทที่ 2

### เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง (Literature review)

#### 2.1 ผึ้ง (Honeybee)

ผึ้งเป็นแมลงที่นักกีฏวิทยาได้อธิบายและจัดไว้ในอันดับ (Order) ไฮมีนอพเทรา (Hymenoptera) วงศ์ (Family) Apidae และอยู่ในจีนัส (Genus) *Apis* แสดงดังภาพที่ 2.1 โดยมีการดำรงชีวิตแบบสังคมสมบูรณ์ มีการแบ่งหน้าที่การทำงานอย่างชัดเจน จำแนกออกเป็น 3 วรณะ คือ ผึ้งนางพญา (Queen) ผึ้งตัวผู้ (Drone) และผึ้งงาน (Worker) โดยผึ้งแต่ละวรรณะ มีลักษณะสำคัญ ดังนี้

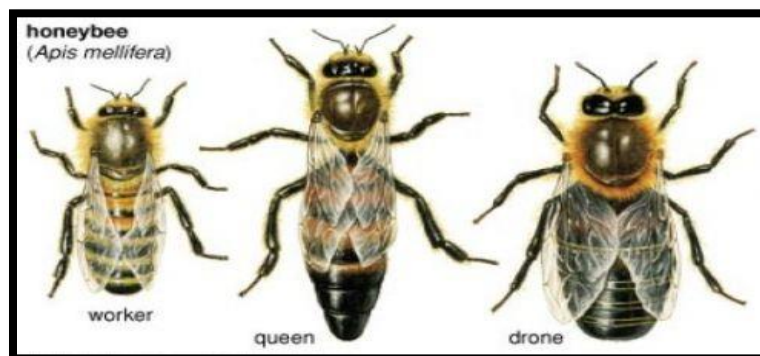
Kingdom	Animalia
Phylum	Arthropoda
Class	Insecta
Order	Hymenoptera
Family	Apidae
Genus	<i>Apis</i>

#### ภาพที่ 2.1 ออนุกรมวิธานของผึ้ง

ที่มา: สิริวัฒน์ (2532)

##### (1) ผึ้งนางพญา (Queen)

ผึ้งนางพญาเป็นผึ้งที่มีขนาดใหญ่ มีลำตัวยาวกว่าผึ้งตัวผู้และผึ้งงาน ปีกของผึ้งนางพญาจะมีขนาดสั้นเมื่อเทียบกับความยาวของลำตัว เนื่องจากส่วนท้องของนางพญาจะค่อนข้างเรียวยาว ลักษณะคล้ายตัวต่อ (ภาพที่ 2.2) ผึ้งนางพญามีหน้าที่ในการวางไข่ภายในรัง ซึ่งสามารถวางไข่ได้ถึงวันละ 2,000 ฟอง โดยทั่วไปนางพญาจะมีอายุประมาณ 2-3 ปี มีเหล็กไนสำหรับต่อสู้กับนางพญาตัวอื่น การเคลื่อนไหวค่อนข้างเชื่องช้า มีความสุขุมและรอบคอบ ผึ้งนางพญาที่ผสมพันธุ์แล้วมักจะพบอยู่บริเวณรวงผึ้งที่มีตัวอ่อนผึ้งภายในรังผึ้ง นางพญาจะถูกห้อมล้อมด้วยตัวผึ้งงาน โดยผึ้งงานจะใช้หนวดแตะหรือใช้ลิ้นเลียตามตัวผึ้งนางพญา ผึ้งงานจะคอยให้อาหาร ทำความสะอาดและนำของเสียที่ผึ้งนางพญาขับถ่ายทิ้ง นอกจากนี้ผึ้งงานยังรับสารฟีโรโมน (Queen pheromone) ที่ผึ้งนางพญาผลิตออกมา แล้วส่งต่อให้กับผึ้งงานตัวอื่น โดยใช้ปีกกระพือให้กลิ่นของสารแพร่กระจายไปทั่วรังผึ้ง เพื่อรักษาสมดุลของสังคมไว้ (สิริวัฒน์ และเพ็ญศรี, 2529)



ภาพที่ 2.2 ลักษณะของผึ้งงาน (Worker) ผึ้งนางพญา (Queen) และผึ้งตัวผู้ (Drone)

ที่มา: <http://www.britannica.com/topic/queen-insect-caste/images-videos/honeybees-queen-worker-drone/141787>

### (2) ผึ้งตัวผู้ (Drone)

ผึ้งตัวผู้เป็นผึ้งที่มีขนาดใหญ่ และตัวอ่อนกว่าผึ้งนางพญาและผึ้งงาน ลำตัวมีความยาวน้อยกว่าผึ้งนางพญา (ภาพที่ 2.2) โดยผึ้งตัวผู้เจริญมาจากไข่ที่ไม่ได้รับการผสม ผึ้งในวรรณะนี้ไม่มีเหล็กใน ลิ้นของผึ้งตัวผู้มีขนาดสั้นมาก มีไว้สำหรับคอยรับอาหารจากผึ้งงานหรือดูดกินน้ำหวานจากที่เก็บไว้ในรวงรังเท่านั้น จะไม่มีการออกไปหาอาหารกินเองภายนอกรัง และไม่มีที่เก็บ ละอองเกสร มีหน้าที่ผสมพันธุ์กับผึ้งนางพญา และจะตายไปภายหลังการผสมพันธุ์ ปริมาณของ ผึ้งตัวผู้ภายในรังนั้นไม่มีความแน่นอนขึ้นอยู่กับฤดูกาล (สิริวัฒน์ และเพ็ญศรี, 2529)

### (3) ผึ้งงาน (Worker)

ผึ้งงานเป็นผึ้งที่มีขนาดเล็กที่สุดภายในรัง (ภาพที่ 2.2) แต่มีปริมาณมากที่สุด สามารถดำรงชีวิตได้ประมาณ 30-45 วัน โดยผึ้งงานเกิดจากไข่ที่ได้รับการผสมกับเชื้อตัวผู้ (Fertilized egg) ผึ้งงานเป็นเพศเมียเช่นเดียวกับนางพญา แต่เป็นเพศที่ไม่สมบูรณ์ คือ ส่วนของรังไข่จะมีขนาดเล็กไม่สามารถสร้างไข่ได้ แต่ในกรณีที่รังผึ้งไม่มีนางพญาอาจมีผึ้งงานบางตัวที่สามารถวางไข่ได้ (Laying worker) แต่ไข่ที่วางจะเป็นไข่ที่เป็นผึ้งตัวผู้ ผึ้งงานจะมีอวัยวะพิเศษหลายอย่างเพื่อที่จะปฏิบัติงานสำคัญ ๆ ภายในรังไข่ เช่น มีต่อมไขผึ้งเพื่อสร้างและซ่อมแซมรวงรัง ต่อมผลิตสารฟีโรโมน และต่อมผลิตสารเตือนภัย นอกจากนี้ยังมีอวัยวะที่ขาหลังดัดแปลงใหญ่ขึ้นที่เรียกว่าตะกร้าเก็บเกสร มีอวัยวะทางเดินอาหารส่วนหน้าขยายเป็นถุงเพื่อเก็บน้ำหวานที่ดูด

จากดอกไม้ เรียกว่ากระเพาะเก็บน้ำผึ้ง อวัยวะเหล่านี้มีความสำคัญต่อหน้าที่การทำงานของ ผึ้งงาน เช่น การสร้าง และซ่อมแซมรัง การทำความสะอาดรัง การหาอาหาร และน้ำ ตลอดจน การป้องกันรัง เป็นต้น (สิริวัฒน์ และเพ็ญศรี, 2529)

## 2.2 สปีชีส์ของผึ้ง (Honeybee species)

ผึ้งมีอยู่อย่างน้อย 5 ชนิด ทางภาคเหนือของประเทศไทย คือ ผึ้งพันธุ์ (*Apis mellifera*) ผึ้งโพรง (*Apis cerana*) ผึ้งหลวง (*Apis dorsata*) ผึ้งม้าน (*Apis andreniformis*) และผึ้งมี้ม (*Apis florea*)

2.2.1 ผึ้งพันธุ์ (*A. mellifera*) เป็นผึ้งที่มีขนาดใหญ่กว่าผึ้งโพรงแต่เล็กกว่าผึ้งหลวง มีลักษณะการดำรงชีวิตเหมือนผึ้งโพรง คือ มักจะทำรังในที่มืด จำนวนประชากรภายในรังมีมากถึง 20,000–60,000 ตัวต่อรัง (ภาพที่ 2.3) อุณหภูมิไม่ดูร้ายไม่ทิ้งรัง ขนาดลำตัวของผึ้งพันธุ์ยาวประมาณ 16 มิลลิเมตร ส่วนอกกว้างประมาณ 4 มิลลิเมตร และมีความยาวของลิ้นประมาณ 5.7 – 6.8 มิลลิเมตร โดยผึ้งชนิดนี้เป็นผึ้งที่นำเข้ามาเลี้ยงจากต่างประเทศ และปัจจุบันถูกนำไปเลี้ยงเป็นอุตสาหกรรมทั่วทั้งโลก



(ก)



(ข)

ภาพที่ 2.3 ลักษณะลำตัวของผึ้งพันธุ์ (*A. mellifera*) (ก) และลักษณะผึ้งภายในรังผึ้งพันธุ์ (ข)

ที่มา: [https://en.wikipedia.org/wiki/Western\\_honey\\_bee](https://en.wikipedia.org/wiki/Western_honey_bee); [http://news.thairatchee.com/2015/09/blog-post\\_731.html](http://news.thairatchee.com/2015/09/blog-post_731.html)

2.2.2 ผึ้งโพรง (*A. cerana*) มีขนาดลำตัวใหญ่กว่าผึ้งมี้ม แต่เล็กกว่าผึ้งหลวง (ภาพที่ 2.4) โดยผึ้งโพรงมักจะสร้างรังในโพรงไม้ ในอาคารบ้านเรือนที่มืดซิดและมีด รวงของผึ้งโพรงมีลักษณะเป็นหลาย ๆ ชั้น เรียงขนานกัน ผึ้งโพรงเป็นผึ้งที่ไม่หนีรังง่าย ปัจจุบันสามารถแบ่งผึ้งโพรงออก เป็น 3 พันธุ์ (Ruttner, 1985) ที่สำคัญคือ

2.2.2.1 ผึ้งโพรงจีน (*A. cerana cerana*) มีเขตการแพร่กระจายในประเทศจีน ขึ้นไป

ถึงตอนเหนือของทวีปเอเชีย เป็นผึ้งโพรงที่มีขนาดใหญ่ที่สุด สีไม่เข้มเหมือนผึ้งโพรงไทย

2.2.2.2 ผึ้งโพรงญี่ปุ่น (*A. cerana japonica*) มีเขตการแพร่กระจายอยู่ตาม เกาะญี่ปุ่น และทะเลจีนเหนือ ผึ้งโพรงญี่ปุ่นมีขนาดกลาง เล็กกว่าผึ้งจีนเล็กน้อย สีเข้มกว่าผึ้งจีน

2.2.2.3 ผึ้งโพรงไทยหรือผึ้งโพรงอินเดีย (*A. cerana indica*) มีเขตการแพร่กระจายทั่วไปในอินเดีย ศรีลังกา ไทย อินโดจีน มาเลเซีย และอินโดนีเซีย มีขนาดเล็กที่สุด และมีสีเข้ม



(ก)



(ข)

ภาพที่ 2.4 ลักษณะลำตัวของผึ้งโพรง (*A. cerana*) (ก) และรวงรังของผึ้งโพรง (ข)

ที่มา: <https://sites.google.com/site/karleiynghungphorngthiy/>; <http://www.kasetporpeang.com/forums/index.php?topic=5745.2816>

2.2.3 ผึ้งหลวง (*A. dorsata*) มีขนาดของผึ้งและรังใหญ่ที่สุด มักจะสร้างรังบนต้นไม้สูง ลักษณะรวงรังมีชั้นเดียวเป็นรูปครึ่งวงกลมไม่มีที่ปกปิด (ภาพที่ 2.5) มีพฤติกรรมดุกว่าผึ้งทุกชนิด ปัจจุบันผึ้งหลวงมีจำนวนลดลงกว่าผึ้งมี้ม เนื่องจากคนไทยนิยมนำผึ้งจากผึ้งหลวงมากกว่าน้ำผึ้งชนิดอื่น



(ก)



(ข)

ภาพที่ 2.5 ลักษณะลำตัวของผึ้งหลวง (*A. dorsata*) (ก) และรวงรังของผึ้งหลวง (ข)

ที่มา: <http://www.manager.co.th/Science/ViewNews.aspx?NewsID=9560000089375>

2.2.4 ผึ้งมี้ม (*A. florea*) มีขนาดตัวผึ้งและรังเล็กที่สุด ลักษณะรังเป็นรวงรังชั้นเดียว มักจะมีที่ปกปิดด้วยซุ้มใบไม้ และกิ่งไม้เพื่อป้องกันศัตรูพบเห็น (ภาพที่ 2.6) แต่ผึ้งมี้มจะไม่อยู่นาน จะหนีไปเมื่อเกิดภาวะขาดแคลนอาหาร



(ก)



(ข)

ภาพที่ 2.6 ลักษณะ ลำตัวของผึ้งมี้ม (*A. florea*) (ก) และรวงรังของผึ้งมี้ม (ข)

ที่มา: [http://uae.hymis.net/species/&tree\\_h=9.38673](http://uae.hymis.net/species/&tree_h=9.38673); [http://www.123rf.com/photo\\_23075246\\_apis-florea-or-dwarf-honeybees-hive-on-tree.html](http://www.123rf.com/photo_23075246_apis-florea-or-dwarf-honeybees-hive-on-tree.html)

2.2.5 ผึ้งม้วนหรือผึ้งมี้มเล็ก (*A. andreniformis*) จัดว่าเป็นผึ้งที่มีขนาดตัว และรังเล็กที่สุดในโลก ที่ต้องเป็นปล้องสีด้าสลับขาว รังขนาดเล็กใกล้เคียงกับผึ้งมี้ม มักพบทำรังบนกิ่งไม้หรือกิ่งไผ่เล็ก ๆ ในแหล่งที่ใกล้แหล่งน้ำที่มีความชื้นสูง (ภาพที่ 2.7)



(ก)



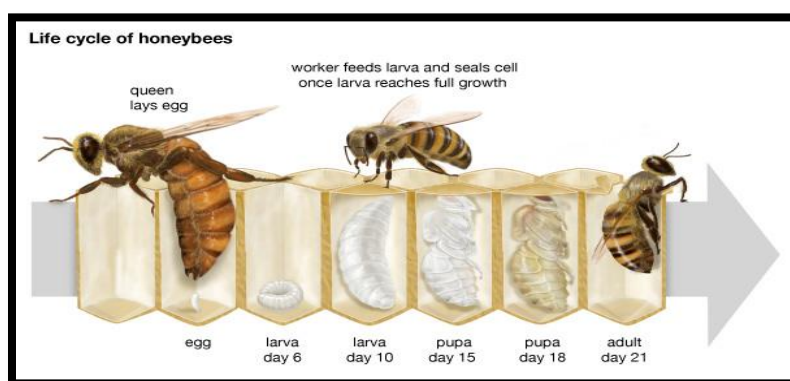
(ข)

ภาพที่ 2.7 ลักษณะลำตัวของผึ้งม้วน (*A. andreniformis*) (ก) และรวงรังของผึ้งม้วน (ข)

ที่มา: <http://xn--22cjab6hpbd1es9a9c2i5ch.blogspot.com/>

### 2.3 วงจรชีวิต และระยะการเจริญเติบโตของผึ้ง

ผึ้งมีระยะการเจริญเติบโตแต่ละขั้นตอนแตกต่างกัน และใช้เวลาที่แตกต่างกันด้วยขึ้นอยู่กับวิธีการดำรงชีวิต และอาหารที่ตัวอ่อนได้รับ โดยตัวอ่อนของผึ้งงานมีขั้นตอนการเจริญเติบโตต่างกับตัวอ่อนของผึ้งนางพญาและผึ้งตัวผู้ ซึ่งระยะการเจริญเติบโตของผึ้งงานจากไข่เป็นตัวเต็มวัย แสดงดังภาพที่ 2.8 หลังจากที่ผึ้งราชินีทำการวางไข่แล้ว วันแรกไข่จะติดแน่นกับฐานของ เซลล์ และตั้งตรงอยู่ที่กลางเซลล์ขนานกับผนังเซลล์ จากนั้นไข่จะเจริญขึ้นและเอียงประมาณ 45 องศา ในวันที่ 2 และ 3 ไข่จะนอนราบกับฐานเซลล์ก่อน แล้วฟักออกมาเป็นตัวหนอนสีขาว ในวันที่แรกผึ้งงานที่เลี้ยงจะผลิตรอยัลเยลลี่ออกมาให้เป็นอาหารเต็มที่เป็นเวลา 3 วันติดต่อกัน ตัว หนอนก็จะว่ายอยู่ในรอยัลเยลลี่ และใช้กินเป็นอาหาร และจะมีการงอตัวทางด้านใดด้านหนึ่ง อาจทางด้านซ้ายหรือขวา หลังจาก 3 วันไปแล้ว ผึ้งงานจะหยุดให้รอยัลเยลลี่ แต่จะให้เกสร และน้ำผึ้งแก่ตัวหนอน จนตัวหนอนอายุได้ 8 วันจะหยุดกินอาหาร โดยในระหว่างนี้ตัวหนอนจะลอกคราบเป็นจำนวน 4 ครั้งจนถึงวันที่ 9 (นับจากวันวางไข่) ตัวหนอนจะปั้นเปลือกหุ้มอยู่ภายใน และลอกคราบครั้งสุดท้ายกลายเป็นดักแด้ วันที่ 10 ตัวจะเหยียดยาว ส่วนหัวขึ้นไปทางปากเซลล์ และเมื่อเจริญเต็มที่ผึ้งงานประจำรังจะปิดเซลล์ด้วยฝาซึ่งทำจากไขผึ้ง วันที่ 13 เริ่มเกิดรังควัตถุ ที่ตาของดักแด้ก่อน โดยตอนแรกเป็นสีชมพู ต่อมาจะเป็นสีแดงม่วง และเป็นสีน้ำตาลในที่สุด เมื่อเจริญสมบูรณ์เต็มที่แล้วเปลือกดักแด้จะแยก และตัวเต็มวัยจะออกมาโดยส่วนหัวออกมาก่อน อาศัยกรามกัดฝาปิดเซลล์ออกมารวมระยะเวลาทั้งหมด 21 วันนับจากวางไข่ สำหรับผึ้งโพรง พบว่า ในการเจริญเติบโตของผึ้งงานจากไข่ถึงตัวเต็มวัยมีอายุเพียง 20 วัน (สิริวัฒน์, 2532)



ภาพที่ 2.8 วงจรชีวิตของผึ้ง

ที่มา: <http://global.britannica.com/animal/honeybee>

## 2.4 ปัญหาของการเลี้ยงผึ้ง

โรคและไรศัตรูผึ้งเป็นปัญหาที่สำคัญในอุตสาหกรรมการเลี้ยงผึ้ง ซึ่งจะส่งผลกระทบต่อเกษตรกรที่เลี้ยงผึ้ง ทำให้ประชากรของผึ้งในรังลดลง และส่งผลให้ผลผลิตที่ได้จากผึ้งลดลง โดยเชื้อจุลินทรีย์ที่เป็นสาเหตุทำให้เกิดโรคนผึ้ง เช่น แบคทีเรีย (Bacteria) เชื้อรา (Fungi) ไวรัส (Virus) และไมโครสปอริเดียม (Microsporidia) เป็นต้น ส่วนไรศัตรูผึ้งที่ก่อให้เกิดปัญหาหนักที่สุดคือ ไร *Tropilaelaps* และ *Varroa*

นอกจากเชื้อจุลินทรีย์และไรศัตรูผึ้งแล้ว ปัจจุบันพบว่าสารเคมีที่ตกค้างในเกสรผึ้งและรังผึ้ง รวมถึงสภาวะการขาดแคลนอาหารของผึ้งก็ส่งผลกระทบต่อจำนวนประชากรของผึ้งด้วยเช่นเดียวกัน โดยอาหารที่จำเป็นต่อผึ้งคือ น้ำหวาน และเกสรพืช

## 2.5 เกสรพืช (Pollen)

### 2.5.1 ความสำคัญเกสรพืช (bee pollen)

เกสรพืชเป็นสิ่งจำเป็นสำหรับสิ่งมีชีวิตบางชนิด เช่น นก และแมลงหลายชนิด มนุษย์เองนิยมบริโภคเกสร และผลิตภัณฑ์อาหารที่มีเกสรเป็นส่วนประกอบสำหรับบริโภคมานานแล้ว โดยจะใช้มาเป็นอาหารเสริมสำหรับบำรุงสุขภาพให้แข็งแรง ซึ่งในปี 1960 มีงานวิจัยที่แสดงให้เห็นว่าการใช้เกสรผสมลงไปในการอาหารสัตว์จะสามารถเร่งการเจริญเติบโตของสัตว์ได้ เกสรมีความจำเป็นต่อการเจริญเติบโตของแมลงบางชนิด นอกจากนี้การปรับตัวและวิวัฒนาการระหว่างแมลงและดอกไม้จะเป็นกุญแจสำคัญของกระบวนการถ่ายเกสร ซึ่งจะควบคุมภาวะการรอดชีวิตตลอดจนการแพร่และขยายพันธุ์ของพืชออกไป

### 2.5.2 คุณค่าทางอาหารของเกสรสำหรับผึ้ง

เกสรมีความสำคัญมากต่อการเจริญเติบโตของประชากรผึ้ง การเติบโตในระยะแรก ๆ ของผึ้งจำเป็นต้องมีอาหารประเภทโปรตีนเป็นองค์ประกอบหลัก ในสภาวะที่มีการขาดแคลนเกสรพบว่า การให้อาหารเสริมที่มีโปรตีนจะสามารถทำให้ประชากรผึ้งเติบโตต่อไปได้ ถ้าผึ้งขาดเกสรจะส่งผลให้การเจริญพัฒนาของรังไข่ ตลอดจนประสิทธิภาพการวางไข่ของผึ้งนางพญาลดลง นอกจากนี้ยังพบว่า การขาดแคลนเกสรพืชจะทำให้การสังเคราะห์สารจำพวกไขมันในฤดูหนาวลดลงด้วย ตลอดจนการสร้างนมผึ้งก็จะเกิดขึ้นไม่ได้ถ้าขาดเกิดภาวะการขาดแคลนเกสร เพราะนมผึ้งเกิดจากกระบวนการทางชีวเคมีจากเกสรที่ผึ้งเก็บมานั่นเอง

### 2.5.3 กระบวนการเก็บรวบรวมเกสร

ผึ้งจะมีขนเล็กปกคลุมอยู่ตามตัว เมื่อผึ้งไปตอมดอกไม้ก็จะทำให้เกสรติดมาด้วย ผึ้งจะปัดเกสรเหล่านั้นด้วยขาหน้า แล้วส่งต่อไปเก็บรวบรวมในส่วนตะกร้าที่ขาหลัง เรียกว่า ตะกร้าเรณู (pollen basket) ซึ่งกลไกการเก็บแบ่งได้ 2 ขั้นตอน ขั้นแรกเกิดในขณะที่ผึ้งเกาะอยู่บน

ดอกไม้ เริ่มต้นโดยผึ้งจะไขขุ่นเล็ก ๆ (stiff hair) ซึ่งอยู่ที่ขาหน้า ลักษณะคล้ายแปรงรวบรวมเกสรซึ่งติดอยู่ตามตัวผึ้งโดยเฉพาะในส่วนอก ขนเหล่านี้จะมีลักษณะเป็ยกและขึ้นด้วยจากละอองน้ำดอกไม้ ทำให้ผึ้งสามารถเก็บได้ง่ายขึ้น เกสรที่ติดอยู่บริเวณหัว และส่วนอกด้านหลังจะ ถูกเก็บโดยขากลางของผึ้ง ส่วนขนของขาหลังจะเก็บไว้บริเวณท้องของผึ้ง ขั้นตอนที่สองเกิดขึ้นขณะที่ผึ้งกำลังบิน โดยเรณูเก็บได้ที่ขาหน้า และขากลางจะถูกส่งไปอัดเพื่อรวมเป็นก้อนในตะกร้าเรณู จากนั้นก็เริ่มกระบวนเก็บใหม่ต่อไป ปริมาณเรณูที่ติดตามขนที่ตัวผึ้งนั้นจะมากกว่าในแมลงชนิดอื่น ๆ ผึ้งสามารถเก็บรวบรวมเกสรในแต่ละครั้งได้ถึง 100-200 มิลลิกรัม ซึ่งคิดเป็นน้ำหนักถึงครึ่งหนึ่งของน้ำหนักตัวผึ้งเอง ผึ้งงาน 1 ตัว จะรวบรวมเกสรได้ 4 ล้านอณูใน 1 ชั่วโมง



## ภาพที่ 2.9 การเก็บรวบรวมเรณูของผึ้ง

ที่มา : อรุณโรจน์ (2559), ออนไลน์

### 2.5.4 ประโยชน์ของเกสรผึ้ง

เกสรพืชจัดเป็นแหล่งอาหารหลักประเภทโปรตีน กรดอะมิโน ไขมัน วิตามิน และแร่ธาตุ (Roulston and Cane, 2000) ซึ่งคุณภาพและความหลากหลายของเกสรพืชมีความสำคัญ ต่อการพัฒนาของตัวอ่อน และมีผลต่อระบบภูมิคุ้มกันของผึ้งด้วย (Alaux et al., 2010; Di Pasquale et al., 2013) นอกจากนี้ยังมีงานวิจัยรายงานว่าคุณภาพของเกสรพืชมีผลต่ออายุของผึ้ง (Schmidt et al., 1987; Wang et al., 2014) มีผลต่อสรีรวิทยาของผึ้ง (Di Pasquale et al., 2013) และมีผลต่อการพัฒนาของรังไข่รวมถึงต่อม hypopharyngeal gland ด้วย (Pernal and Currie, 2000; Human et al., 2007) อีกทั้งเกสรพืชยังส่งผลกระทบต่อระดับความไวของผึ้งต่อการติดเชื้อแบคทีเรีย (Rinderer et al., 1974) ไวรัส (DeGrandi et al., 2010) และเชื้อไมโครสปอริเดียม (Rinderer and Elliott, 1977) และยังมีผลให้ผึ้งมีความไวต่อสารเคมีมากขึ้นด้วย

(Schmehl et al., 2014)

#### 2.5.5 สารเคมีตกค้างในเกสรพืชและผลกระทบที่มีต่อผึ้ง

เกสรพืชถือเป็นแหล่งสะสมสารเคมีต่าง ๆ ที่มีการใช้ในพื้นที่เกษตรกรรมที่ผึ้งนำเข้ามาภายในรังด้วย โดยสารเคมีที่ตกค้างในเกสรพืช ประกอบด้วย ยาฆ่าเชื้อรา (fungicide) ยาฆ่าแมลง (insecticide) ยาฆ่าวัชพืช (herbicide) และยาฆ่าไร (miticide) (Johnson et al., 2010; Mullin et al., 2010; Wu et al., 2011, Pettis et al. 2013)

สารเคมีที่ตกค้างในรังผึ้งนั้นมีผลต่อการพัฒนา พฤติกรรม การรับรู้ การมีชีวิตรอดของสเปิร์มในผึ้งตัวผู้ จำนวนสเปิร์มและน้ำหนักตัวของผึ้งราชินี ยกตัวอย่างเช่น สารเคมี imidacloprid มีผลต่อพฤติกรรมและสรีรวิทยาของผึ้งงาน รวมถึงมีผลต่อหน่วยการจำและการเรียนรู้ของผึ้งงานอีกด้วย (Decourtye et al., 2003; 2004; Yang et al., 2012) รวมถึงทำให้ผึ้งมีพฤติกรรมการบินที่ผิดปกติไป (Colin et al., 2004; Yang et al., 2008) มีผลกระทบต่อการพัฒนาของต่อม hypopharyngeal gland และระบบการหายใจของผึ้ง (Hatjina et al., 2013) นอกจากนี้ ผึ้งที่ได้รับสารเคมีชนิดนี้ยังมีโอกาสติดเชื้อ *Nosema* ได้สูงขึ้นด้วย (Pettis et al., 2013)

ในประเทศไทยนั้นมีการใช้สารเคมีในการทำเกษตรกรรมเป็นจำนวนมาก รวมถึงในอุตสาหกรรมการเลี้ยงผึ้งเองก็มีการใช้สารเคมีในการควบคุมและรักษาโรคต่าง ๆ ที่เกิดขึ้นกับผึ้ง แต่อย่างไรก็ตามยังไม่ได้มีการวิจัยที่รายงานเกี่ยวกับความหลากหลายของเกสรพืชและสารเคมีที่ตกค้างในเกสรที่อาจจะส่งผลกระทบต่อจำนวนประชากรในผึ้งได้ ดังนั้นในงานวิจัยนี้จึงได้ทำการศึกษาในหัวข้อดังกล่าว

### บทที่ 3

#### วิธีการดำเนินวิจัย (Materials and Methods)

##### 3.1 การเก็บตัวอย่างเกสร

เก็บตัวอย่างเกสรที่ผึ้งเก็บเข้ามาในรังที่ตั้งอยู่ในพื้นที่ 2 บริเวณ คือ บริเวณพื้นที่เกษตรกรรมและบริเวณพื้นที่ที่ห่างจากการทำการเกษตรกรรม โดยทำการเก็บตัวอย่างเกสรพืชจาก 4 จังหวัดในพื้นที่ภาคเหนือ คือ จังหวัดเชียงใหม่ ลำปาง พะเยา และแพร่ เก็บตัวอย่างในทุก ๆ เดือน ตั้งแต่เดือนตุลาคม 2558 ถึงเดือน กันยายน 2559 เป็นระยะเวลา 1 ปี โดยรังผึ้งที่ตั้งอยู่ห่างจากพื้นที่เกษตรกรรม 500 เมตร จะจัดว่าเป็นบริเวณพื้นที่เกษตรกรรม ส่วนรังผึ้งที่จัดว่าไม่อยู่ในบริเวณพื้นที่เกษตรกรรมจะถูกวางห่างจากพื้นที่เกษตรกรรมประมาณ 7-10 กิโลเมตร ซึ่งพืชผลหลักทางการเกษตรของประเทศไทยนั้น คือ ข้าว ข้าวโพด มันสำปะหลัง อ้อย ถั่ว แต่มันสำปะหลังและอ้อยนั้นไม่ได้เป็นพืชผลหลักที่ได้ในภาคเหนือของประเทศไทย ในการวิจัย ครั้งนี้เกสรพืชจะถูกเก็บจากผึ้งที่บินออกหาอาหารแล้วกลับเข้ามาในรัง โดยจะวางกล่องดักเกสร ไว้ตรงบริเวณหน้ารังเป็นระยะเวลา 1 วัน เพื่อเก็บตัวอย่างเกสรให้ได้ในปริมาณ 5 กรัมในแต่ละ ครั้ง ในกรณีที่ได้เกสรในปริมาณที่น้อยกว่า 5 กรัม นั้นจะวางกล่องดักเกสรเป็นระยะเวลา นาน กว่า 1 วัน จนกว่าจะได้ปริมาณเกสรครบตามที่ต้องการ (Pettis et al., 2013) จากนั้น นำ ตัวอย่างเกสรที่เก็บได้ใส่ในหลอดปั่นเหวี่ยงขนาด 50 มิลลิลิตร เก็บที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส เพื่อนำไปวิเคราะห์ความหลากหลายของเกสรและสารเคมีตกค้างต่อไป

##### 3.2 การวิเคราะห์ความหลากหลายของเกสร

ซึ่งตัวอย่างเกสรปริมาณ 3 กรัม จากนั้นทำการวิเคราะห์ความหลากหลายของเกสรพืช โดยทำการแยกจากสีที่มีความแตกต่างกันด้วยตาเปล่า แล้วนำเกสรแต่ละสีที่แยกได้ไปซึ่งนำหนักคำนวณหาเปอร์เซ็นต์ของเกสรแต่ละชนิดที่แยกได้ ดังภาพที่ 3.1 (Pettis et al., 2013)

##### 3.3 การวิเคราะห์หาสารเคมีตกค้างในเกสร

นำตัวอย่างเกสรที่เก็บได้ในแต่ละช่วงเวลาอย่างน้อยตัวอย่างละ 3 กรัม ส่งไปวิเคราะห์หาชนิดและปริมาณสารเคมีที่ตกค้างในเกสรที่ USDA-AMS-NSL, Gastonia ประเทศสหรัฐอเมริกา โดยการวิเคราะห์หาชนิดและปริมาณของสารเคมีที่ตกค้างจะใช้วิธี LC/MS-MS และ GC/MS ซึ่งวิธีการวิเคราะห์นั้นได้อธิบายโดย Mullin et al. (2010)



ภาพที่ 3.1 การตัดแยกสีเกสรพืชด้วยตาเปล่า

## บทที่ 4 ผลการวิจัย (Results)

### 4.1 ความหลากหลายของเกสรพืชในบริเวณพื้นที่เกษตรกรรมและบริเวณที่ไม่ใช่พื้นที่เกษตรกรรม

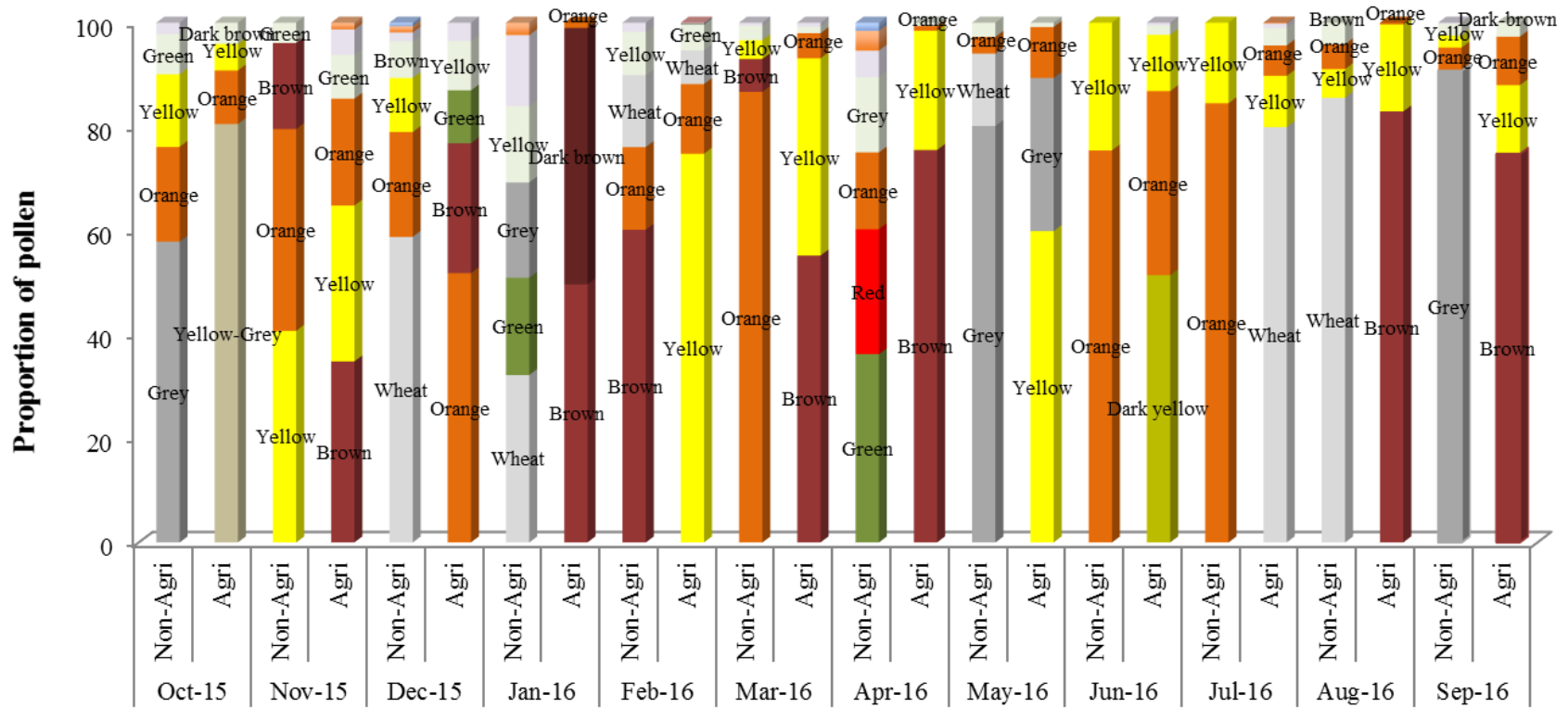
จากผลการศึกษาความหลากหลายของเกสรพืชที่เก็บโดยผึ้งจากบริเวณพื้นที่เกษตรกรรม และพื้นที่ที่ห่างจากการทำเกษตรกรรมในพื้นที่ 4 จังหวัดภาคเหนือตอนบน พบว่า ในตัวอย่างที่เก็บมานั้นมีจำนวนชนิดเกสรพืชตั้งแต่ 1-8 ชนิด ตลอดระยะเวลา 1 ปีที่ทำการศึกษา โดยความหลากหลายของเกสรพืชมีความแตกต่างกันเล็กน้อยระหว่างบริเวณพื้นที่เกษตรกรรม และพื้นที่ที่ห่างจากการทำเกษตรกรรม (ตารางที่ 4.1) จากผลการศึกษาพบว่าพื้นที่จังหวัดเชียงใหม่ มีความหลากหลายของพืชเกสรค่อนข้างดีจากทั้งบริเวณพื้นที่เกษตรกรรม และพื้นที่ที่ห่างจากการทำเกษตรกรรม โดยมีเกสรพืชอย่างน้อย 4 ชนิดในช่วงเวลาที่ทำการศึกษา แต่อย่างไรก็ตามพบว่าในพื้นที่ที่ห่างจากการทำเกษตรกรรม พบว่ามีเกสรพืชจำนวน 2 ชนิดเท่านั้นในช่วงเดือนมิถุนายนถึงกรกฎาคม 2559 ส่วนตัวอย่างที่เก็บมาจากจังหวัดลำปางและแพร่ พบว่า มีความหลากหลายของเกสรพืชในแต่ละช่วงเวลา และยังพบว่ายังมีบางช่วงเวลาที่ไม่สามารถเก็บตัวอย่างเกสรได้ คือ ช่วงเดือนมีนาคมถึงสิงหาคม 2559 ในพื้นที่บริเวณเกษตรกรรมของจังหวัดลำปาง และเดือนธันวาคม 2558 และช่วงเดือนมีนาคมถึงพฤษภาคม 2559 ในจังหวัดแพร่ ทำให้ การเปรียบเทียบความหลากหลายของพืชเกสรค่อนข้างยากในทั้งสองจังหวัด ตัวอย่างเกสรที่เก็บมาจากจังหวัดพะเยาพบว่ามีความหลากหลายของพืชเกสรค่อนข้างน้อย โดยจะพบประมาณ 2-3 ชนิดเท่านั้น ยกเว้นช่วงเดือนพฤศจิกายน 2558 ถึงเดือนกุมภาพันธ์ 2559 จะพบชนิดเกสรพืชมากกว่า 3 ชนิด ในทั้งบริเวณพื้นที่เกษตรกรรม และพื้นที่ที่ห่างจากการทำเกษตรกรรม (ตารางที่ 4.1)

ตลอดระยะเวลา 1 ปีที่ทำการศึกษาคความหลากหลายของเกสรพืช พบว่า สัดส่วนของเกสรพืชแต่ละชนิดค่อนข้างที่จะมีความแตกต่างกันในแต่ละเดือน และพบว่ามีความหลากหลายของเกสรมากที่สุดในพื้นที่จังหวัดเชียงใหม่ (ภาพที่ 4.1) แต่จากผลการศึกษาพบว่าในแต่ละช่วงเดือนจะมีเกสรพืชเพียง 1-2 ชนิดเท่านั้นที่เป็นเกสรพืชหลัก เช่นในเดือนกรกฎาคมถึงเดือนกันยายน 2559 พบว่ามีพืชเพียง 1 ชนิดที่มีปริมาณมากที่สุดถึง 80-90 เปอร์เซ็นต์ ในทั้งสองบริเวณพื้นที่เกษตรกรรม และพื้นที่ที่ห่างจากการทำเกษตรกรรม เช่นเดียวกันกับจังหวัดลำปาง และจังหวัดพะเยาที่พบว่ามีพืชเพียง 1-2 ชนิดเท่านั้นที่เป็นแหล่งเกสรของผึ้ง (ภาพที่ 4.2 และ 4.3) ซึ่งจังหวัดลำปางพบว่ามีพืชเพียง 1 ชนิดที่เป็นแหล่งเกสรให้ผึ้งโดยมีสัดส่วนมากกว่า 80 เปอร์เซ็นต์ในเดือนพฤศจิกายน 2558 โดยจะเห็นว่าความหลากหลายของเกสรค่อนข้างที่จะ

น้อยมาก ส่วนในจังหวัดแพร่ พบว่าความหลากหลายของพืชเกษตรค่อนข้างที่จะมีมากในช่วงเดือนตุลาคม 2558 ถึงเดือนเมษายน 2559 แต่จะมีน้อยลงในช่วงฤดูฝน (เดือนพฤษภาคมถึงเดือนกันยายน 2559) (ภาพที่ 4.4)

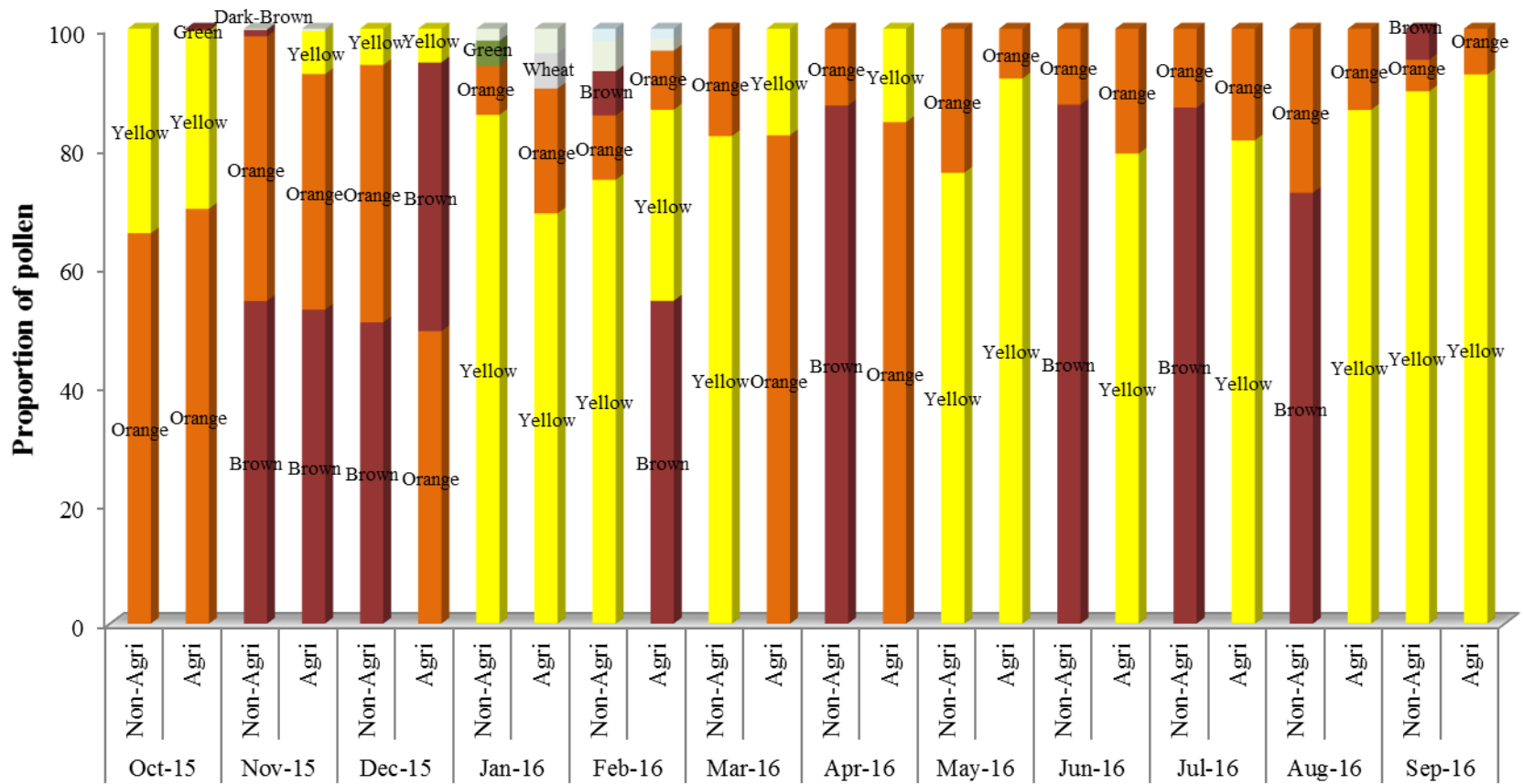
ตารางที่ 4.1 จำนวนชนิดของเกสรพืชที่แยกตามสีของเกสรที่เก็บมาจากบริเวณพื้นที่เกษตรกรรม และพื้นที่ที่ห่างจากการทำเกษตรกรรมใน  
จังหวัดเชียงใหม่ ลำปาง พะเยา และแพร่ ในช่วงเดือนตุลาคม 2558 ถึงเดือนกันยายน 2559

Month	Number of different colours							
	Chiang Mai		Lampang		Phayao		Phare	
	Agricultural area	Non- agricultural area	Agricultural area	Non- agricultural area	Agricultural area	Non- agricultural area	Agricultural area	Non- agricultural area
October 2015	4	5	3	4	3	2	4	5
November 2015	6	4	5	4	4	4	6	8
December 2015	5	7	5	6	3	3	Missing data	6
January 2016	3	6	5	5	4	4	4	6
February 2016	8	5	5	6	5	5	7	4
March 2016	5	5	Missing data		2	2	Missing data	4
April 2016	4	7	Missing data		2	2	Missing data	6
May 2016	4	4	Missing data		2	2	Missing data	5
June 2016	5	2	Missing data		2	2	5	3
July 2016	6	2	Missing data		2	2	4	5
August 2016	3	4	Missing data		2	2	1	3
September 2016	4	5	4	4	2	3	4	2

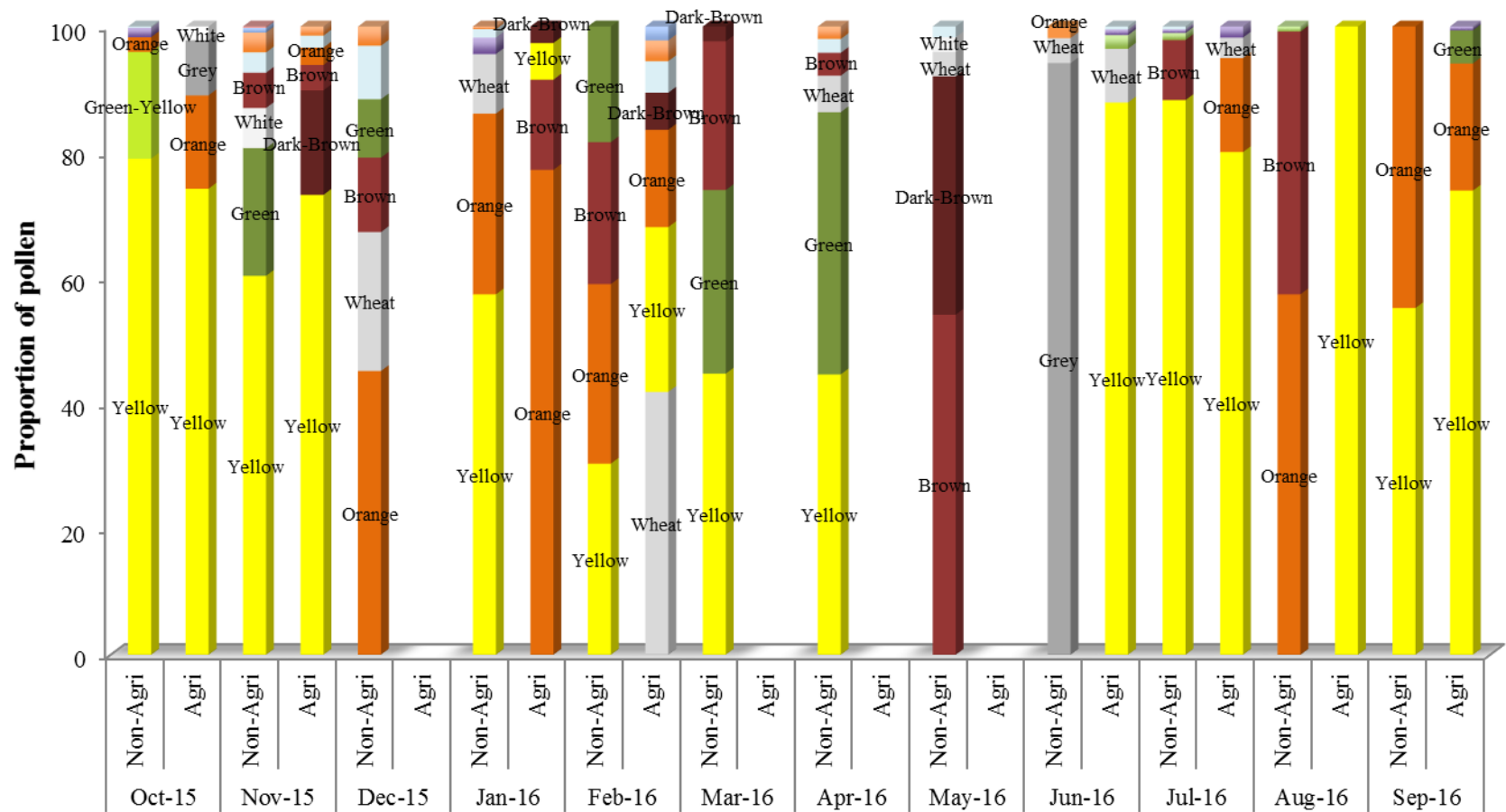


ภาพที่ 4.1 สัดส่วนของเกสรพืชแต่ละชนิดที่แยกตามสีของเกสรในบริเวณพื้นที่เกษตรกรรม และพื้นที่ที่ห่างจากการทำเกษตรกรรมในจังหวัด เชียงใหม่ ในช่วงเดือนตุลาคม 2558 ถึงเดือนกันยายน 2559





ภาพที่ 4.3 สัดส่วนของเกสรพืชแต่ละชนิดที่แยกตามสีของเกสรในบริเวณพื้นที่เกษตรกรรม และพื้นที่ที่ห่างจากการทำเกษตรกรรมในจังหวัดพะเยา ในช่วงเดือนตุลาคม 2558 ถึงเดือนกันยายน 2559



ภาพที่ 4.4 สัดส่วนของเกสรพืชแต่ละชนิดที่แยกตามสีของเกสรในบริเวณพื้นที่เกษตรกรรม และพื้นที่ที่ห่างจากการทำเกษตรกรรมในจังหวัดแพร่ ในช่วงเดือนตุลาคม 2558 ถึงเดือนกันยายน 2559

#### 4.2 ชนิดและปริมาณของสารเคมีตกค้างในเกสรพืชที่ผึ้งเก็บเข้ามาในรังบริเวณพื้นที่เกษตรกรรม และพื้นที่ที่ห่างจากการทำเกษตรกรรม

จากการวิเคราะห์สารเคมีตกค้างในตัวอย่างเกสรพืชจำนวน 36 ตัวอย่าง โดยเป็นตัวอย่างเกสรพืชที่เก็บมาจากพื้นที่เกษตรกรรมจำนวน 16 ตัวอย่าง และจากบริเวณที่ห่างจากพื้นที่เกษตรกรรมจำนวน 20 ตัวอย่าง พบว่า มีตัวอย่างที่มีสารเคมีตกค้างอยู่เป็นจำนวน 62.5 และ 55 เปอร์เซ็นต์ ของตัวอย่างที่เก็บมาจากพื้นที่เกษตรกรรม และบริเวณที่ห่างจากพื้นที่เกษตรกรรม ตามลำดับ (ตารางที่ 4.2) และจากการวิเคราะห์ พบสารเคมีจำนวน 8 ชนิดที่ตกค้าง ในเกสรพืชที่เก็บมาจากพื้นที่เกษตรกรรม โดยในจังหวัดเชียงใหม่พบว่ามีปริมาณสารเคมีตกค้างมากที่สุดเมื่อเปรียบเทียบกับจังหวัดอื่น โดยเมื่อแยกตามชนิดของสารเคมี พบว่า มีสารกลุ่ม ออกาโนฟอสเฟส (organophosphate) ชนิด คลอร์ไพริฟอส (chlorpyrifos) ในตัวอย่างเกสรพืช ที่เก็บมาจากจังหวัดเชียงใหม่ ลำปาง และพะเยา เท่ากับ 42.9, 66.7 และ 33.3 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ ในปริมาณตั้งแต่ 3.1 ถึง 244 ppb (ตารางที่ 4.3)

#### ตารางที่ 4.2 เปอร์เซ็นต์การตรวจพบสารเคมีตกค้างในตัวอย่างเกสรพืชที่เก็บมาจากพื้นที่เกษตรกรรม และจากบริเวณที่ห่างจากพื้นที่เกษตรกรรม

% with detections	
Agricultural area (n = 16)	Non-agricultural area (n = 20)
62.5	55

ในจังหวัดเชียงใหม่พบสารกลุ่มยาฆ่าเชื้อรา (fungicide) ชนิด คาร์เบนดาซิม (carbendazim) ในตัวอย่างเกสรพืชที่มากที่สุด (57.1 เปอร์เซ็นต์) ในระดับปริมาณน้อยจนถึง 1,160 ppb นอกจากนี้ยังพบสารเคมีกลุ่มยาฆ่าแมลงไพรีทรอยด์ (pyrethroid insecticide) เช่น ไซเพอร์เมทริน (cypermethrin) และฟลูวาไลเนต (fluvalinate) เท่ากับ 42.9 และ 28.6 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ รวมถึงพบเมทาแล็กซิล (metalaxyl) และ อิมิดาโคลพริด (imidacloprid) จำนวน 14.3 เปอร์เซ็นต์ในจำนวนตัวอย่างทั้งหมด

ในการศึกษาครั้งนี้พบว่ามีสารเคมีที่ใช้ในภาคเกษตรกรรมตกค้างอยู่ในเกสรพืชที่เก็บมาจากจังหวัดลำปาง พะเยา และแพร่ จำนวน 3 ชนิด ในจังหวัดแพร่พบว่าการปนเปื้อนของยาฆ่าวัชพืช (herbicide) ชนิดอะทราซีน (atrazine) ในตัวอย่างเกสร เท่ากับ 25 เปอร์เซ็นต์ และพบอิมิดาโคลพริด เท่ากับ 25 เปอร์เซ็นต์ ส่วนในจังหวัดพะเยาพบยาฆ่าไร (miticide) ชนิด formamidine 2,4 dimethylphenyl formamide (DMPF) ในตัวอย่างเท่ากับ 66.7 เปอร์เซ็นต์

ตารางที่ 4.3 ชนิดและปริมาณสารเคมีที่ตกค้างในเกษตรพืชที่เก็บจากบริเวณพื้นที่เกษตรกรรมในจังหวัดเชียงใหม่ ลำปาง พะเยา และแพร่

Pesticide	Class	Chiang Mai				Lampang				Phayao				Phrae				LOD (ppb)
		% detections	with detections	min	max	% detections	with detections	min	max	% detections	with detections	min	max	% detections	with detections	min	max	
2,4 Dimethylphenyl formamide (DMPF)	Formamidine	ND				ND				66.7	44.1	80.1	ND					10.0
Carbendazim (MBC)	Fungicide	57.1	Trace	1,160	ND					ND			ND					5.0
Metalaxyl		14.3	Trace		ND					ND			ND					2.0
Atrazine	Herbicide	ND			ND					ND			25.0		50.8			6.0
Imidacloprid	Neonicotinoid	14.3	22		ND					ND			25.0		3.9			1.0
Chlorpyrifos	Organophosphate	42.9	38.1	244	66.7	3.1	3.9			33.3	5.0		ND					1.0
Cypermethrin	Pyrethroid	42.9	39.7	49.8	ND					ND			ND					4.0
Fluvalinate		28.6	20.7	27.7	33.3	14				ND			ND					1.0

จากการวิเคราะห์หาชนิดและปริมาณสารเคมีที่ตกค้างในตัวอย่างเกสรพืชที่เก็บมาจาก พื้นที่ที่อยู่ห่างจากพื้นที่เกษตรกรรม พบว่ามีสารเคมีตกค้างอยู่จำนวน 5 ชนิด (ตารางที่ 4.4) โดยตัวอย่างเกสรพืชที่เก็บมาจากจังหวัดเชียงใหม่ พบสารเคมีที่ตกค้างดังนี้ คาร์เบนดาซิม (น้อย) คลอร์ไพริฟอส (4.4-6.7 ppb) และฟลูวาลินेत (14.6-46.5 ppb) ในตัวอย่างเกสรพืชที่เก็บมาจากจังหวัดลำปาง พบสารเคมีเพียงชนิดเดียว คือ ฟลูวาลินेत ในปริมาณเท่ากับ 9.7-11.3 ppb ในจังหวัดพะเยาพบสารเคมี 2 ชนิดในตัวอย่างเกสรพืช คือ DMPF และ คลอร์ไพริฟอส เท่ากับ 33.3 และ 66.7 เปอร์เซ็นต์ของตัวอย่างทั้งหมดที่ส่งวิเคราะห์ ส่วนในจังหวัดแพร่ นั้นพบว่า มีสารเคมีที่ตกค้างอยู่ในเกสรพืช ดังนี้ คาร์เบนดาซิม (106 ppb) อาทราซีน (น้อย) และคลอร์ไพ-ริฟอส (4 ppb)

**ตารางที่ 4.4** ชนิดและปริมาณสารเคมีที่ตกค้างในเกษตรพืชที่เก็บจากบริเวณที่ห่างจากพื้นที่เกษตรกรรมในจังหวัดเชียงใหม่ ลำปาง พะเยา และแพร่

Pesticide	Class	Chiang Mai				Lampang				Phayao				Phrae				LOD (ppb)
		% detections	with	min	max	% detections	with	min	max	% detections	with	min	max	% detections	with	min	min	
2,4 Dimethylphenyl formamide (DMPF)	Formamidine	ND				ND				33.3		58.6		ND				10.0
Carbendazim (MBC)	Fungicide	28.6		Trace		ND				ND				14.3		106.0		5.0
Metalaxyl		ND				ND				ND				ND				2.0
Atrazine	Herbicide	ND				ND				ND				14.3		Trace		6.0
Imidacloprid	Neonicotinoid	ND				ND				ND				ND				1.0
Chlorpyrifos	Organophosphate	28.6		4.4	6.7	ND				66.7		4.9	5.0	14.3		4.0		1.0
Cypermethrin	Pyrethroid	ND				ND				ND				ND				4.0
Fluvalinate		28.6		14.6	46.5	66.7		9.7	11.3	ND				ND				1.0

## บทที่ 5

### อภิปรายและสรุปผลการวิจัย (Discussion and conclusion)

เกสรพืชจัดว่าเป็นแหล่งโปรตีนที่สำคัญสำหรับผึ้ง โดยความหลากหลายและคุณภาพของเกสรส่งผลกระทบต่อการพัฒนาอายุ และความต้านทานของผึ้งต่อไวรัสและเชื้อก่อโรคชนิดต่าง ๆ รวมถึงส่งผลกระทบต่อความแข็งแรงของรังผึ้งด้วย ซึ่งผลที่ได้จากการทดลองนี้แสดงให้เห็นถึงความหลากหลายของชนิดของเกสรพืช รวมถึงชนิดและปริมาณของสารเคมีที่ตกค้างอยู่ในเกสรพืชที่เก็บมาจากพื้นที่เกษตรกรรมและจากบริเวณที่ห่างจากพื้นที่เกษตรกรรมใน 4 จังหวัดทางภาคเหนือตอนบนของประเทศไทยซึ่งถือว่าเป็นภูมิภาคที่มีการเลี้ยงผึ้งเป็นจำนวนมาก โดยจากลักษณะทางภูมิประเทศทางภาคเหนือ นั้น พบว่ามีพืชหลากหลายชนิดที่สามารถเป็นแหล่งอาหารของผึ้งได้ตลอดทั้งปี โดยจากผลการศึกษา พบว่า ชนิดของเกสรพืชที่ผึ้งเก็บมาก่อนข้างจะมีความแตกต่างกันในช่วงปีที่ทำการศึกษา แต่ผึ้งมีแนวโน้มที่จะเก็บเกสรพืชมาอย่างน้อย 1-2 ชนิดหลักในทุกพื้นที่ที่ทำการศึกษา นอกจากนี้ยังพบว่าความหลากหลายของเกสรพืชที่ผึ้งเก็บในบริเวณพื้นที่เกษตรกรรม และบริเวณที่ห่างจากพื้นที่เกษตรกรรมนั้นไม่มีความแตกต่างกันมากนักในทั้ง 4 จังหวัดที่ทำการศึกษา อย่างไรก็ตามในการศึกษารังนี้ไม่ได้ทำการเปรียบเทียบปริมาณและคุณภาพของเกสรที่ผึ้งเก็บมาระหว่างพื้นที่เกษตรกรรมและในพื้นที่ที่ห่างจากการทำเกษตรกรรม ซึ่งข้อมูลนี้อาจจะช่วยให้มองเห็นสภาวะการณของแหล่งอาหารของผึ้งในแต่ละจังหวัดได้ชัดเจนมากยิ่งขึ้น โดยในงานวิจัยบางเรื่องได้ให้ข้อเสนอแนะว่าไม่เพียงแต่ความหลากหลายของเกสรพืชเท่านั้นที่มีผลต่อการเลี้ยงผึ้ง แต่คุณภาพของเกสรพืชก็ส่งผลกระทบต่อความแข็งแรงของผึ้งด้วยเช่นเดียวกัน (Di Pasquale et al., 2013) จากการศึกษาครั้งนี้ พบว่า จังหวัดเชียงใหม่และแพร่มีความหลากหลายของเกสรพืชมากที่สุดในช่วงเวลาที่ทำการศึกษา โดยเฉพาะในช่วงเดือนตุลาคม 2558 และเดือนเมษายน 2559 ส่วนจังหวัดลำปางและพะเยานั้นมีความหลากหลายของเกสรพืชค่อนข้างน้อย โดยในบางช่วงของการศึกษาในจังหวัดพะเยา เช่น เดือนมีนาคม 2559 และ เดือนกันยายน 2559 พบเกสรพืชเพียง 2 ชนิดที่ผึ้งเก็บเข้ามาในรัง ซึ่งได้มีการรายงานว่าความหลากหลายของชนิดเกสรพืชนั้นมีผลต่อระบบภูมิคุ้มกันของผึ้ง (Alaux et al., 2010) และมีผลต่อความแข็งแรงของผึ้งด้วย (Di Pasquale et al., 2013; 2016) เนื่องจากเกสรที่ได้จากพืชต่างชนิดกันจะให้สารอาหารที่แตกต่างกัน ดังนั้นความเข้าใจเกี่ยวกับความหลากหลายของเกสรพืชในพื้นที่ของการเลี้ยงผึ้งจะช่วยให้เกษตรกรผู้เลี้ยงผึ้งจัดการ และเลือกหาพื้นที่ที่เหมาะสมต่อการเลี้ยงผึ้งต่อไปได้ โดยเกษตรกรควรหาแหล่งที่มีเกสรอุดมสมบูรณ์ต่อผึ้ง หรือในบางช่วงเวลาที่เกสรพืชค่อนข้างน้อยควรที่จะมีการเสริมอาหารให้แก่ผึ้งเพิ่มเติมด้วย

การศึกษาในครั้งนี้แสดงให้เห็นว่าผึ้งอาจได้รับสารเคมีที่ตกค้างในทั้งบริเวณพื้นที่เกษตรกรรมและในบริเวณที่ห่างจากพื้นที่เกษตรกรรม โดยข้อมูลที่ได้สามารถที่จะทำให้เข้าใจมากขึ้นเกี่ยวกับ

กับความเสี่ยงที่จะเกิดขึ้นในการเลี้ยงผึ้ง รวมไปถึงช่วยในการอธิบายเกี่ยวกับโคลีนีสลอสลายในประเทศไทยร่วมกับปัจจัยอื่น ๆ เช่น เชื้อจุลินทรีย์ก่อโรคและไรศัตรูผึ้งได้

ตัวอย่างเกสรพืชที่เก็บมาวิเคราะห์ในครั้งนี้ พบว่า มีการปนเปื้อนของสารเคมีหลายกลุ่ม เช่น ยาฆ่าวัชพืช ยาฆ่าเชื้อรา formamidine, organophosphate, pyrethroid และ neonicotinoid ในปริมาณที่แตกต่างกันออกไป โดยในจังหวัดเชียงใหม่ พบว่าเกสรที่เก็บมาจากทั้งสองบริเวณ มีการปนเปื้อนของสารเคมี โดยสารเคมีในกลุ่มไพรีทรอยด์ ชนิดฟลูวาไลเนต พบว่าตกค้างอยู่ในเกสรพืชที่เก็บมาจากจังหวัดเชียงใหม่และลำปาง ซึ่งฟลูวาไลเนต และฟลูเมทริน เป็นยาฆ่าไรที่ใช้กันทั่วไปในการควบคุมการระบาดของไรในรังผึ้ง อย่างไรก็ตามปริมาณของฟลูวาไลเนตที่พบในตัวอย่างเกสรที่นำมาศึกษาค่อนข้างต่ำกว่าปริมาณ LD<sub>50</sub> (median lethal dose) ในผึ้ง (Mullin et al., 2010)

สารเคมีในกลุ่มไพรีทรอยด์ ชนิดไซเพอร์เมทริน และกลุ่มออกาโนฟอสเฟต ชนิดคลอร์ไพริฟอส เป็นยาฆ่าแมลงทั่วไปที่ใช้ในการทำเกษตรกรรมในประเทศไทย (Tawatsin et al., 2015) โดยไซเพอร์เมทรินนั้นพบตกค้างอยู่ในเกสรที่เก็บมาจากพื้นที่เกษตรกรรมเท่านั้น ส่วนคลอร์ไพริฟอส พบในเกสรที่เก็บมาจากทั้งสองบริเวณ ซึ่งในปี 2013 นั้นประเทศไทยถือได้ว่าการนำเข้าของคลอร์ไพริฟอสปริมาณมากกว่าหนึ่งล้านกิโลกรัมต่อปี (Tawatsin et al., 2015)

การปนเปื้อนของสารเคมีกลุ่ม neonicotinoid ชนิดอิมิดาโคลพริด พบได้ในตัวอย่างเกสรที่เก็บมาจากพื้นที่เกษตรกรรม โดยปริมาณที่ตรวจพบอยู่ในช่วง 3.9-22 ppb ซึ่งมากกว่า ที่มีการตรวจพบจากงานวิจัยอื่น ๆ ที่พบปริมาณของอิมิดาโคลพริดประมาณ 0.94-2.9 ppb (Mullin et al., 2010; Pettis et al., 2013; Long and Krupke, 2016) ในการศึกษาครั้งนี้ตรวจพบยาฆ่าเชื้อราจำนวน 2 ชนิด คือ คาเบนดาซิม และเมทาแล็กซิล ซึ่งยาฆ่าเชื้อราทั้งสองชนิดนี้มีการนำเข้ามาใช้ในประเทศไทยจำนวนมากติดอยู่ใน 10 อันดับแรกของสารเคมีที่การนำเข้ามากที่สุด ส่วนสารในกลุ่มยาฆ่าวัชพืชพบว่ามีเพียงอะทราซีนที่มีการตรวจพบในตัวอย่างเกสรพืชที่เก็บมาจากจังหวัดแพร่ แต่พบอยู่ในปริมาณที่น้อยมากเมื่อเปรียบเทียบกับค่า LD<sub>50</sub> (980000 ppb) (Mullin et al., 2010) ซึ่งในปี 2013 ประเทศไทยมีการนำเข้าสารเคมีชนิดนี้ประมาณ 4.28 ล้านกิโลกรัมต่อปี (Tawatsin et al., 2015) จากการวิเคราะห์พบสารกลุ่ม DMPF ในตัวอย่าง ที่เก็บมาจากจังหวัดพะเยาทั้งสองบริเวณ แสดงให้เห็นว่ายังมีการใช้สารเคมีชนิดอะมิแทเรซเพื่อควบคุมการระบาดของไรกันอยู่

จากผลของงานวิจัยนี้แสดงให้เห็นว่ามีการตกค้างของสารเคมีหลายชนิดในเกษตรพืชที่ผึ้งเก็บเข้ามาในรัง โดยผลกระทบของสารเคมีต่อผึ้งนั้นยากที่จะอธิบายว่ามาจากสารเคมีเพียงชนิดเดียว หรือมาจากสารเคมีหลาย ๆ ชนิดรวมกัน แต่อย่างไรก็ตามก็เชื่อได้ว่าการพบสารเคมีตกค้างอยู่ในเกษตรพืชที่จัดว่าเป็นแหล่งอาหารของผึ้งนั้นไม่ส่งผลต่อผึ้งอย่างแน่นอน และจากการเปรียบเทียบชนิดของสารเคมีระหว่างพื้นที่เกษตรกรรมและพื้นที่ที่ตั้งอยู่ห่างจากพื้นที่เกษตร

กรรม นั้นพบว่าพื้นที่เกษตรกรรมพบสารเคมีที่ตกค้างอยู่มากกว่าถึง 2 เท่า ซึ่งถ้าเป็นไปได้เกษตรกรควรที่จะหลีกเลี่ยงการวางรังผึ้งในบริเวณที่ใกล้เคียงกับพื้นที่เกษตรกรรม และการใช้ยาฆ่าไรในรังผึ้งนั้นทำให้มีการตกค้างของสารอยู่ด้วย แต่ถือว่าพบในปริมาณที่น้อยมากเมื่อเปรียบเทียบกับงานวิจัยอื่น ๆ ดังนั้นจากงานวิจัยนี้จะเห็นได้ว่าในพื้นที่ทางภาคเหนือของประเทศไทยนั้นค่อนข้างมีความเหมาะสมที่จะทำการเลี้ยงผึ้งและผลิตน้ำผึ้งได้ถึงแม้ว่าจะตรวจพบสารเคมีบางชนิดก็ตาม แต่ถือว่าพบในปริมาณค่อนข้างน้อย

#### ข้อเสนอแนะ

1. ควรที่จะทำการจัดจำแนกชนิดของพืชเกษตรหลักที่ผึ้งนำเข้ามาในรังผึ้งด้วย เพื่อให้ทราบว่าในแต่ละช่วงเวลามีพืชเกษตรใดเป็นแหล่งอาหารสำหรับผึ้งได้ดีในแต่ละจังหวัด
2. ควรที่จะทำการศึกษาองค์ประกอบและปริมาณสารอาหารของเกษตรพืชแต่ละชนิดในแต่ละช่วงเวลา

## บทที่ 6

### เอกสารอ้างอิง (References)

- สิริวัฒน์ วงษ์ศิริ. 2532. ชีววิทยาของผึ้ง. พิมพ์ครั้งที่ 2. กรุงเทพมหานคร : บริษัทต้นอ้อ จำกัด. กรุงเทพฯ. 184 หน้า.
- สิริวัฒน์ วงษ์ศิริ และเพ็ญศรี ตังคะระสิงห์. 2529. ชีววิทยาของผึ้ง: ผึ้งพันธุ์ ผึ้งมิม ผึ้งหลวง ผึ้งโพรง. กรุงเทพมหานคร. ฝ่ายวิจัยจุพาลงกรณ์มหาวิทยาลัย. กรุงเทพฯ.
- Alaux, C., Brunet, J.L., Dussaubat, C., Mondet, F., Tchamichan, S., et al. 2010. Interactions between *Nosema* microspores and a neonicotinoid weaken honeybees (*Apis mellifera*). Environ Microbiol 12, 774-782.
- Alaux, C., Ducloz, F., Crauser, D., Le Conte, Y. 2010. Diet effects on honeybee immunocompetence. Biol Lett 6, 562-565.
- Collins, A.M., Pettis, J.S. 2012. Correlation of queen size and spermathecal contents and effects of miticide exposure during development. Apidologie 44, 351-356.
- Decourtye, A., Devillers, J., Cluzeau, S., Charreton, M., Pham-Delegue, M.H. 2004. Effects of imidacloprid and deltamethrin on associative learning in honeybees under semi-field and laboratory conditions. Ecotoxicol Environ Saf 57, 410-419.
- Decourtye, A., Lacassie, E., Pham-Delegue, M.H. 2003. Learning performances of honeybees (*Apis mellifera* L) are differentially affected by imidacloprid according to the season. Pest Manag Sci 59, 269-278.
- Degrandi-Hoffman, G., Chen, Y., Huang, E., Huang, M.H. 2010. The effect of diet on protein concentration, hypopharyngeal gland development and virus load in worker honey bees (*Apis mellifera* L.). J Insect Physiol 56: 1184-1191.
- Di Pasquale, G., Alaux, C., Le Conte, Y., Odoux, J-F., Pioz, M., Vaissière, B.E., et al. 2016. Variations in the Availability of Pollen Resources Affect Honey Bee Health. PLoS One 11(9), e0162818.
- Di Pasquale, G., Salignon, M., Le Conte, Y., Belzunces, L.P., Decourtye, A., et al. 2013. Influence of Pollen Nutrition on Honey Bee Health: Do Pollen Quality and Diversity Matter? PLoS ONE 8(8), e72016.

- Hatjina, F., Papaefthimiou, C., Charistos, L., Dogaroglu, T., Bouga, M., et al. 2013. Sublethal doses of imidacloprid decreased size of hypopharyngeal glands and respiratory rhythm of honeybees in vivo. *Apidologie* 44, 467-480.
- Human, H., Nicolson, S.W., Strauss, K., Pirk, C.W.W., Dietemann, V. 2007. Influence of pollen quality on ovarian development in honeybees *Apis mellifera scutellata*. *J Insect Physiol.* 53, 649–655.
- Johnson, R.M., Ellis, M.D., Mullin, C.A., Frazier, M. 2010. Pesticides and honey bee toxicity-USA. *Apidologie* 41(3), 312–331.
- Klein, A.M., Vaissière, B.E., Cane, J.H., Steffan-Dewenter, I., Cunningham, S.A., Kremen, C., Tscharntke, T. 2007. Importance of pollinators in changing landscapes for world crops. *Proceedings of The Royal Society B.* 274, 303–313.
- Long, E.Y., Krupke, C.H. 2016. Non-cultivated plants present a season-long route of pesticide exposure for honey bees. *Nature Communications* 7, 11629.
- Morse, R.A., Calderone, N.W. 2000. The value of honey bee pollination in the United States. *Bee Culture* 128, 1-15.
- Mullin, C.A., Frazier, M., Frazier, J.L., Ashcraft, S., Simonds, R., et al. 2010. High levels of miticides and agrochemicals in North American apiaries: implications for honey bee health. *PLoS One* 5, e9754.
- Pernal, S.F., Currie, R.W. 2000. Pollen quality of fresh and 1-year-old single pollen diets for worker honey bees (*Apis mellifera* L.). *Apidologie* 31, 387-409.
- Pettis, J.S., Lichtenberg, E.M., Andree, M., Stitzinger, J., Rose, .R, et al. 2013. Crop pollination exposes honey bees to pesticides which alters their susceptibility to the gut pathogen *N. ceranae*. *PLoS One* 8, e70182.
- Pettis, J.S., vanEngelsdorp, D., Johnson, J., Dively, G. 2012. Pesticide exposure in honey bees results in increased levels of the gut pathogen *Nosema*. *Naturwissenschaften* 99, 153-158.
- Rinderer, T.E., Elliott, K.D. 1977. Worker honey bee response to infection with *Nosema apis*. *J Econ Entomol* 70, 431-433.

- Rinderer, T.E., Rothenbuhler, W.C., Gochnauer, T.A. 1974. The influence of pollen on the susceptibility of honey-bee larvae to *Bacillus* larvae. *J Invertebr Pathol* 23, 347-350.
- Roulston, T.H., Cane, J.H. 2000. Pollen nutritional content and digestibility for animals. *Plant Syst Evol* 222, 187-209.
- Ruttner, F.F. 1985. Characteristics and geographic variability of *Apis cerana* Fabr. theInternational Apicultural Congress. Nagoya. Japan. (Abstract), 49-50.
- Schmehl, D.R., Teal, P.E.A., Frazier, J.L., Grozinger, C.M., 2014. Genomic analysis of the interaction between pesticide exposure and nutrition in honey bees (*Apis mellifera*). *J Insect Physiol.* 71, 177-190.
- Schmidt, J.O., Thoenes, S.C., Levin, M.D. 1987. Survival of honey bees, *Apis mellifera* (Hymenoptera: Apidae), fed various pollen sources. *J Econ Entomol* 80, 176-183.
- Tawatsin, A., Thavara, U., Siriyasatien, P. 2015. Pesticides used in Thailand and toxic effects to human health. *Medical Research Archives* 3, 1-10.
- van Engelsdorp, D., Hayes, J. Jr., Underwood, R.M., Pettis, J. 2008. A survey of honey bee colony losses in the U.S., fall 2007 to spring 2008. *PLoS One* 3, e4071.
- Wang, H., Zhang, S-W., Zeng, Z-Z., Yan, W-Y. 2014. Nutrition affects longevity and gene expression in honey bee (*Apis mellifera*) workers. *Apidologie* 45, 618-625.
- Wu, J.Y., Anelli, C.M., Sheppard, W.S. 2011. Sub-lethal effects of pesticide residues in brood comb on worker honey bee (*Apis mellifera*) development and longevity. *PLoS One* 6, e14720.
- Yang, E.C., Chuang, Y.C., Chen, Y.L., Chang, L.H. 2008. Abnormal foraging behavior induced by sublethal dosage of imidacloprid in honey bee (Hymenoptera:Apidae). *J Econ Entomol* 101, 1743-1748.
- Yang, E.C., Chang, H.C., Wu, W.Y., Chen, Y.W. 2012. Impaired olfactory associative behavior of honeybee workers due to contamination of imidacloprid in the larval stage. *PLoS One* 7, e49472.

1

2 Journal: Apidologie

3

4 **Plant diversity and pesticide residues in agricultural and non-agricultural areas**  
5 **of northern Thailand as measured in honeybee-collected pollen**

6

7 Veeranan Chaimanee<sup>1\*</sup>, Panuwan Chantawannakul<sup>2</sup>, Kitiphong Khongphinitbunjong<sup>3</sup>  
8 and Jeffery S. Pettis<sup>4</sup>

9

10

11 1 Department of Biotechnology, Maejo University Phrae Campus, Rong Kwang,  
12 Phrae, Thailand

13 2 Bee Protection Laboratory, Department of Biology, Faculty of Science, Chiang Mai  
14 University, Chiang Mai, Thailand

15 3 School of Science, Mae Fah Luang University, Chiang Rai, Thailand

16 2 Institute of Bee Health, University of Bern, Bern, Switzerland

17

18 \* Corresponding author

19 Veeranan Chaimanee

20 Department of Biotechnology,

21 Maejo University Phrae Campus,

22 Rong Kwang, Phrae 54140 Thailand

23 Phone: 66871744049

24 E-mail: chveeranan@gmail.com

25 **Short title:** Plant diversity and pesticide residues in pollen

26

27 **Abstract**

28           Pollen diversity and quality are necessary for optimal honeybee development  
29 and longevity. Nutritional deficiency is considered as a factor in honeybee population  
30 decline. Here, the nutritional richness of protein for bees based on pollen/plant  
31 diversity and the pesticide residues in pollen were studied. Honeybee colonies (*Apis*  
32 *mellifera*) were used to collect pollen at monthly intervals in four provinces of  
33 Northern Thailand. At each location an agricultural and non-agricultural areas were  
34 selected for pollen collection which resulted in 8 distinct sites. Bee-collected pollen  
35 was sorted by color to determine plant diversity at each location. The two sites at  
36 Chiang Mai consistently showed good plant diversity as four or more pollen types  
37 were recorded at each date of collection. An individual collection that exhibits ideal  
38 diversity is February 2016 in Phrae where four distinct pollens were approximately  
39 25% of the sample. In contrast, Lampang in November had over 80% of the total  
40 pollen represented by a single plant; an example of inadequate nutritional diversity for  
41 bees. Also in Phayao only 2-3 pollen types were dominant at both sites which may  
42 indicate less than optimal areas to maintain bee colonies. Additionally, pollen was  
43 analyzed for 170 common pesticides to determine the level of pesticide exposure at  
44 each location. We found 8 different pesticides such as herbicides, fungicides,  
45 formamidines, organophosphates, pyrethroids and neonicotinoids at different levels  
46 between agricultural and non-agricultural locations. However, overall the detection of  
47 agricultural chemicals was low. Therefore, many areas of Northern Thailand do offer  
48 a relatively clean environment in which to keep honeybees and produce honey.

49 **Keywords: honeybees/*Apis mellifera*/plant diversity/pesticide**  
50 **residues/pollen/northern Thailand**

51

52 **Introduction**

53           The Western honeybee, *Apis mellifera* is the single most important managed  
54 pollinator of agricultural crops worldwide (Potts et al. 2010). Currently, populations  
55 of honeybees have declined in many regions of Europe, North America  
56 (vanEngelsdorp and Meixner 2010) and also Thailand. In Thailand, there are  
57 approximately 300,000 managed colonies of *A. mellifera*, more than half of which are  
58 located in the Northern provinces (Wongsiri et al. 2000). Colony loss for managed  
59 honeybee colonies in Thailand have been reported by beekeepers. Several factors are  
60 considered as contributing causes including; parasitic mites, pathogens, poor nutrition  
61 and exposure to pesticides. Also, combinations of these factors are reported to weaken  
62 honeybees (Alaux et al. 2010; Pettis et al. 2012). Of the many factors investigated,  
63 nutritional deficiency and starvation have been implicated in colony losses  
64 (vanEngelsdorp et al. 2008). Pollen is the main dietary source of proteins, amino  
65 acids, lipids, vitamins and minerals (Roulston and Cane 2000) and its quality and  
66 diversity are essential to bee development and immune system functionality (Alaux et  
67 al. 2010; Di Pasquale et al. 2013). Several studies have shown that pollen quality can  
68 influence honeybee longevity (Schmidt et al. 1987; Wang et al. 2014), physiology (Di  
69 Pasquale et al. 2013), and ovary and hypopharyngeal gland development (Pernal and  
70 Currie 2000; Human et al. 2007). Furthermore, pollen affects the susceptibility of  
71 honeybees to pathogen such as bacteria (Rinderer et al. 1974), virus (DeGrandi et al.  
72 2010) and microsporidia (Rinderer and Elliott 1977) and also reduces the bees'  
73 pesticide sensitivity (Schmehl et al. 2014).

74 Pollen is a chemically complex matrix, which can carry into the hive a variety of  
75 pesticide residues, often directly from treated crops. Pesticide residues including

76

77 fungicides, insecticides, herbicides and miticides have been detected in pollen, wax  
78 and honey bee combs in other areas of the world (Johnson et al. 2010; Mullin et al.  
79 2010; Wu et al. 2011, Pettis et al. 2013, Traynor et al. 2016). Pesticides can have  
80 negative impacts on development, longevity (Wu et al. 2011), behavior (Yang et al.  
81 2008, 2012), learning performance (Decourtye et al. 2003), sperm viability in drones  
82 (Burley et al. 2008) and number of sperm and body weight in queens (Collin and  
83 Pettis 2013). Moreover, pesticide-exposed honeybees are more susceptible to  
84 pathogens such as *Nosema ceranae* (Pettis et al. 2012, 2013; Wu et al. 2012). In  
85 Thailand, many classes of pesticides are widely used in agriculture. Also, miticides  
86 are used to control parasitic mites in honeybee colonies. However, virtually nothing is  
87 known about pollen diversity nor pesticide residues in honeybee-collected pollen in  
88 Thailand. Given the importance of apiculture in the Thai economy it is important to  
89 better understand the availability of pollen and the level of pesticide exposure in  
90 dominant Northern Provinces where bees are kept.

91 To explore this topic, honeybee-collected pollen was sorted by color and  
92 analyzed for pesticide residues over a one year period and comparisons made between  
93 agricultural and non-agricultural areas in Northern Thailand. The results from this  
94 research should provide information on nutritional diversity and pesticide exposure  
95 leading to a better understanding of factors influencing *A. mellifera* colony health.  
96 Lastly, results on nutrition and pesticide exposure should help beekeepers better  
97 manage their colonies.

## 98 **Materials and methods**

### 99 **Pollen collection**

100 Samples of honeybee-collected pollen were collected from two apiaries

101

102 (agricultural and non-agricultural areas) in each of four provinces (Chiang Mai,  
103 Lampang, Phayao and Phrae) in Northern Thailand, every month over a one-year  
104 period (October 2015-September 2016). Honeybee hives were placed 500 meters  
105 from crops at the agricultural sites and about 7-10 kilometres away from crops for  
106 non-agricultural sites. The major crops in Thailand are rice, corn, cassava, sugar cane,  
107 soybeans and mung bean but cassava and sugar cane are not grown widely in  
108 Northern provinces (Chainuvati and Athipanan 2001). Pollen was collected from  
109 foraging honeybees returning to hives using pollen traps (wooden traps, Flora Bee,  
110 Chiang Mai Healthy Products). Pollen traps were placed on the front of each hive for  
111 one day to allow collection of at least 5g of pollen. Traps with less than 5g remained  
112 on hives until 5 g of pollen had been collected (Pettis et al. 2013). Due to differences  
113 in locations and logistics it was not possible to measure quantity of pollen collected.  
114 Pollen was transferred into 50 ml centrifuge tubes, put on ice for transport and then  
115 stored at -20 °C for pollen diversity and pesticides analysis.

#### 116 **Pollen diversity**

117 Pollen diversity was measured by taking a random three gram sample, sorting  
118 by color and re-weighing each group after color separation (Pettis et al. 2013) to yield  
119 the proportion of each pollen color in the sample.

#### 120 **Pesticide analysis**

121 A three gram pollen sample from each location and time interval was sent for  
122 pesticide analysis at the USDA-AMS-NSL, Gastonia, USA. The number of pesticides  
123 detected and the total load of each pesticide was determined by LC/MS-MS and  
124 GC/MS methods. The protocols are described by Mullin et al. (2010).

125

126

## 127 **Results**

### 128 **Pollen diversity in agricultural and non-agricultural areas**

129 Honeybee-collected pollen was sorted by color to determine pollen diversity at  
130 each site. The results showed 1-8 pollen types throughout a one-year period and there  
131 was very little difference between agricultural and non-agricultural sites in each  
132 province (Table I). The two sites at Chiang Mai consistently showed good plant  
133 diversity as four or more pollen types were recorded at each date of collection.  
134 However, only two pollen types were detected in June and July 2016 in the non-  
135 agricultural site. Lampang and Phrae also showed pollen variation at each date of  
136 collection but missing dates of collection occurred in both provinces making year-  
137 long comparisons difficult in these two provinces. Only 2-3 pollen types were  
138 recorded for most of the Phayao collections, except in November 2015-February  
139 2016, when more than 3 pollen types were collected (Table I).

140 Over the year-long sampling period, the proportion of the pollen types was  
141 dramatically differed every month in Chiang Mai and had the most diversity of colors  
142 (Fig. 1). However, every month 1-2 pollen types were predominant. An extreme  
143 example was that only one pollen type was dominate in July-September 2016  
144 representing 80-90% of the total pollen in both agricultural and non-agricultural areas.  
145 Similarly, honeybees had a tendency to collect only 1-2 pollen types in Lampang and  
146 Phayao (Fig. 2 and 3). Lampang in November had over 80% of the total pollen  
147 represented by a single plant, an example of inadequate nutritional diversity for bees.  
148 In Phrae, the diversity of pollen varied most during October 2015-April 2016 and  
149 showed less diversity with only 1-2 pollen types in the fall (May-September 2016)  
150 (Fig. 4).

151

152 **Pesticide Residues in honeybee-collected pollen in agricultural and non-**  
153 **agricultural areas**

154 Thirty-six samples of pollen collected by honeybees (16 samples of  
155 agricultural sites and 20 samples of non-agricultural sites) were analyzed for pesticide  
156 residues. We detected pesticide contamination in 62.5% and 55% of samples from  
157 agricultural and non-agricultural sites, respectively (Table II). In agricultural sites,  
158 eight different pesticides were detected. Chiang Mai had more pesticide residues in  
159 pollen when compared to other sites. We found the organophosphate chlorpyrifos in  
160 pollen samples from Chiang Mai, Lampang and Phayao, with 42.9, 66.7 and 33.3% of  
161 detection, respectively, with levels ranging from 3.1 to 244 ppb (Table III). In Chiang  
162 Mai, the fungicide carbendazim was the most frequent detection in 57.1% (trace-  
163 1,160 ppb). Additionally, the pyrethroid insecticides cypermethrin and fluvalinate  
164 were detected in 42.9 and 28.6% of samples as well as metalaxyl and imidacloprid  
165 (14.3% of detection). We found only 3 agriculturally related pesticide residues in  
166 pollen samples collected from Lampang, Phayao and Phrae. We detected herbicide  
167 atrazine in 25% and imidacloprid in 25% of pollen samples in Phrae. The miticide  
168 formamidine 2,4-dimethylphenyl formamide (DMPF) was present only in bee-  
169 collected pollen in Phayao (66.7%).

170 In non-agricultural sites, five pesticides were found in pollen samples (Table  
171 IV). Carbendazim (Trace), chlorpyrifos (4.4-6.7 ppb) and fluvalinate (14.6-46.5 ppb)  
172 were found in pollen samples collected from Chiang Mai. Fluvalinate was the only  
173 pesticide found in pollen samples from Lampang with 66.7% of samples positive.  
174 DMPF and chlorpyrifos were detected in pollen from Phayao. In Phrae, carbendazim  
175 (106 ppb), atrazine (trace) and chlorpyrifos (4 ppb) were detected (14.3% of

176

177 detection).

178 **Discussion**

179         Pollen is the only protein source for honeybees. Pollen diversity and quality  
180 can affect honeybee development, longevity, the resistance to honeybee viruses and  
181 parasites and colony health. The results of this study document the diversity of pollen  
182 and pesticide residues in agricultural and non-agricultural areas from four different  
183 provinces in Northern Thailand where most of Thai honeybee colonies are located. In  
184 Northern Thailand, many plant species are present and could provided nutritional  
185 resources for honeybees throughout the year. However, even though pollen types  
186 varied over the study period, honeybees trended to forage on 1-2 predominant plant  
187 species in all areas. The results showed the diversity of pollen collected by bees did  
188 not differ between agricultural and non-agricultural areas in each province. The  
189 amount and quality of pollen were not compared between the two sites in this study  
190 and this could have provided more insight into the overall nutritional conditions in  
191 each Province. Some studies suggested that not only variation of pollen can impact  
192 honeybee health but also the pollen quality (Di Pasquale et al. 2013). Among the four  
193 provinces, Chiang Mai and Phrae showed the most plant diversity at each date of  
194 collection, especially between October 2015 and April 2016. Lampang and Phayao  
195 had less pollen diversity during this time period. We found only two types of pollen  
196 between March 2016 and September 2016 in both sites of Phayao. Pollen diversity  
197 (polyfloral pollen) has been shown to have an affect on immunity of honeybees  
198 (Alaux et al. 2010) and honeybee health (Di Pasquale et al. 2013, 2016). The pollen  
199 from different plants generally provides different nutrients for bees. Understanding  
200 pollen diversity in an area could help the beekeepers to determine the suitability of

201

202 each site for honeybee cultivation. If sites have poor pollen diversity the beekeepers  
203 may be advised to move their colonies to better locations and/or feed supplemental  
204 protein to help honeybee colonies overcome nutritional shortfalls resulting from  
205 limited pollen sources.

206 Our study also demonstrates that honeybees are exposed to pesticides in both  
207 of agricultural and non-agricultural locations. The results should lead to understand  
208 the potential risks for bee health and explain for colony collapse in Thailand with  
209 others factors such as pathogen and parasitic mites. Pollen collected in this study  
210 contained some pesticides such as herbicides, fungicides, formamidines,  
211 organophosphates, pyrethroids and neonicotinoids at different levels between  
212 agricultural and non-agricultural locations. Chiang Mai had more pesticide  
213 contamination at both locations. The pyrethroid fluvalinate was found in pollen  
214 samples collected at agricultural and non-agricultural areas in Chiang Mai and  
215 Lampang. Fluvalinate and flumethrin are mainly used as miticide to control mites in  
216 apiaries in Northern Thailand. Fortunately, the levels of fluvalinate in pollen samples  
217 that we found are much lower than the median lethal dose (LD<sub>50</sub>) to honeybee (Mullin  
218 et al. 2010). The pyrethroid cypermethrin and the organophosphate chlorpyrifos are  
219 common insecticides used to kill insects in crops and others agricultural products  
220 (Tawatsin et al. 2015). Cypermethrin was only detected in honeybee-collected pollens  
221 in agricultural area but chlorpyrifos was found in pollen collected from both  
222 agricultural and non-agricultural areas. The results demonstrate that chlorpyrifos is  
223 widely used in Thailand. Not surprisingly, chlorpyrifos has been reported as the  
224 predominant imported insecticide into Thailand in 2013 with over a million kilogram  
225 per year (Tawatsin et al. 2015). The contamination of the neonicotinoid imidacloprid

226

227 was found in pollen collected in agricultural areas. The levels of imidacloprid in the  
228 pollen samples that we detected (3.9-22 ppb) are higher than that reported in others  
229 studies (0.94-2.9 ppb) (Mullin et al. 2010; Pettis et al. 2013; Long and Krupke 2016).  
230 Two fungicides carbendazim and metalaxyl were detected in pollen around an  
231 agricultural location but only carbendazim was detected in pollen collected from non-  
232 agricultural areas. These fungicides were in the top ten pesticides imported into  
233 Thailand, for use in the control of fungal diseases (Tawatsin et al. 2015). Atrazine  
234 was the only herbicide detected in this study at both sites in Phrae with very low  
235 concentrations when compared to the LD<sub>50</sub> for honeybees (980000 ppb) (Mullin et al.  
236 2010). In Thailand, atrazine was imported at about 4.28 million kilograms per year in  
237 2003 (Tawatsin et al. 2015). The finding of DMPF in both sites in Phayao but not in  
238 others three locations indicates continued usage of amitraz by beekeepers in one  
239 province. Amitraz usage for mite control in Thailand does not appear to be wide  
240 spread.

241 The current research builds on previous studies that demonstrated multiple  
242 chemical exposures in pollen (Mullin et al. 2010; Pettis et al. 2013). Multiple  
243 exposures are hard to quantify and/or assess as to the impact of individual compounds  
244 or combinations on bee health (Traynor et al. 2016). However, there is agreement that  
245 these chemical cocktails can not be positive for bee health (Mullin et al. 2010;  
246 Traynor et al. 2016). The results of the current testing indicated that twice as many  
247 agricultural chemicals (6vs.3) were detected in the agricultural areas and thus  
248 beekeepers can indeed find some refuge from chemical exposure in Northern  
249 Thailand by placing bees in non-agricultural areas. Overall the detection of  
250 agricultural chemicals was low but chlorpyrifos and imidacloprid levels are of

251

252 concern at multiple locations. Beekeeper use on miticides was documented but levels  
253 were lower than those reported in previous studies (Mullin et al. 2010). Many areas of  
254 Northern Thailand, while not chemical free, do offer a relatively clean environment in  
255 which to keep honeybees and produce honey.

## 256 **Acknowledgments**

257 This research was supported by the Thailand Research Fund (TRG5880180).

## 258 **Authors Contribution**

259 VC and JSP conceived this research and designed experiments; VC and JSP  
260 performed experiments and analysis; KK participated in the performance of  
261 experiments; VC, PC, KK and JSP wrote the paper and participated in the revisions of  
262 it. All authors read and approved the final manuscript.

## 263 **Conflict of interest**

264 The authors declare that they have no potential conflict of interest in relation  
265 to the study in this paper.

## 266 **References**

- 267 Alaux, C., Brunet, J.L., Dussaubat, C., Mondet, F., Tchamitchan, S., Cousin, M.,  
268 Brillard, J., Baldy, A., Belzunces, L.P., Le Conte, Y. (2010) Interactions  
269 between *Nosema* microspores and a neonicotinoid weaken honeybees (*Apis*  
270 *mellifera*). *Environ. Microbiol.* 12, 774–782
- 271 Burley, L., Fell, R.D., Saacke, R.G. (2008) Survival of honey bee (Hymenoptera:  
272 Apidae) spermatozoa incubated at room temperature from drones exposed to  
273 miticides. *J. Econ. Entomol.* 101, 1081–1087
- 274 Chainuvati, C., Athipanan, W. (2001) Crop diversification in Thailand. In: *Crop*  
275 *diversification in the Asia-Pacific region: Food and Agriculture Organization*

276

- 277 of the United Nations Regional Office for Asia and the Pacific, Bangkok,  
278 Thailand, pp. 130–146
- 279 Wongsiri, S., Chanchao, C., Lekprayoon, C., Wattanasermkit, K., Deowanish, S.,  
280 Leepitakrat, S. (2000) Honey bee diversity and management in the new  
281 millennium in Thailand. In: Proc. VIIth Int. Conf. on Tropical Bees:  
282 Management and Diversity and Vth Asian Apicultural Association Conf.,  
283 Chiang Mai, Thailand, IBRA, pp. 9–14
- 284 Collins, A.M., Pettis, J.S. (2013) Correlation of queen size and spermathecal contents  
285 and effects of miticide exposure during development. *Apidologie* 44, 351–356
- 286 Decourtye, A., Lacassie, E., Pham-Delegue, M.H. (2003) Learning performances of  
287 honeybees (*Apis mellifera* L) are differentially affected by imidacloprid  
288 according to the season. *Pest Manag. Sci.* 59, 269–278
- 289 Degrandi-Hoffman, G., Chen, Y., Huang, E., Huang, M.H. (2010) The effect of diet  
290 on protein concentration, hypopharyngeal gland development and virus load in  
291 worker honey bees (*Apis mellifera* L.). *J. Insect Physiol.* 56, 1184–1191
- 292 Di Pasquale, G., Alaux, C., Le Conte, Y., Odoux, J-F., Pioz, M., Vaissière, B.E.,  
293 Belzunces, L.P., Decourtye, A. (2016) Variations in the availability of pollen  
294 resources affect honey bee health. *PLoS ONE* 11(9), e0162818
- 295 Di Pasquale, G., Salignon, M., Le Conte, Y., Belzunces, L.P., Decourtye, A.,  
296 Kretzschmar, A., Suchail, S., Brunet, J-L., Alaux, C. (2013) Influence of  
297 pollen nutrition on honey bee health: Do pollen quality and diversity matter?  
298 *PLoS ONE* 8(8), e72016
- 299
- 300

301

- 302 Human, H., Nicolson, S.W., Strauss, K., Pirk, C.W.W., Diemann, V. (2007)  
303 Influence of pollen quality on ovarian development in honeybees *Apis*  
304 *mellifera scutellata*. J. Insect Physiol. 53, 649–655
- 305 Johnson, R.M., Ellis, M.D., Mullin, C.A., Frazier, M. (2010) Pesticides and honey bee  
306 toxicity-USA. Apidologie 41(3), 312–331
- 307 Long, E.Y., Krupke, C.H. (2016) Non-cultivated plants present a season-long route of  
308 pesticide exposure for honey bees. Nat. Commun. 7, 11629
- 309 Mullin, C.A, Frazier, M., Frazier, J.L., Ashcraft, S., Simonds, R., vanEngelsdorp, D.,  
310 Pettis, J.S. (2010) High levels of miticides and agrochemicals in North  
311 American apiaries: implications for honey bee health. PLoS ONE 5, e9754
- 312 Pernal, S.F., Currie, R.W. (2000) Pollen quality of fresh and 1-year-old single pollen  
313 diets for worker honey bees (*Apis mellifera* L.). Apidologie 31, 387–409
- 314 Pettis, J.S., Lichtenberg, E.M., Andree, M., Stitzinger, J., Rose, .R, vanEngelsdorp, D.  
315 (2013) Crop pollination exposes honey bees to pesticides which alters their  
316 susceptibility to the gut pathogen *N. ceranae*. PLoS ONE 8, e70182
- 317 Pettis, J.S., vanEngelsdorp, D., Johnson, J., Dively, G. (2012) Pesticide exposure in  
318 honey bees results in increased levels of the gut pathogen *Nosema*.  
319 Naturwissenschaften 99, 153–158
- 320 Potts, S.G., Biesmeijer, J.C., Kremen, C., Neumann, P., Schweiger, O., Kunin, W.E.  
321 (2010) Global pollinator declines: trends, impacts and drivers. Trends Ecol.  
322 Evol. 25(6), 345–353
- 323 Rinderer, T.E., Elliott, K.D. (1977) Worker honey bee response to infection with  
324 *Nosema apis*. J. Econ. Entomol. 70, 431–433
- 325

326

- 327 Rinderer, T.E., Rothenbuhler, W.C., Gochnauer, T.A. (1974) The influence of pollen  
328 on the susceptibility of honey-bee larvae to *Bacillus* larvae. *J. Invertebr.*  
329 *Pathol.* 23, 347–350
- 330 Roulston, T.H., Cane, J.H. (2000) Pollen nutritional content and digestibility for  
331 animals. *Plant Syst. Evol.* 222, 187–209
- 332 Schmehl, D.R., Teal, P.E.A., Frazier, J.L., Grozinger, C.M. (2014) Genomic analysis  
333 of the interaction between pesticide exposure and nutrition in honey bees  
334 (*Apis mellifera*). *J. Insect Physiol.* 71, 177–190
- 335 Schmidt, J.O., Thoenes, S.C., Levin, M.D. (1987) Survival of honey bees, *Apis*  
336 *mellifera* (Hymenoptera: Apidae), fed various pollen sources. *J. Econ.*  
337 *Entomol.* 80, 176–183
- 338 Tawatsin, A., Thavara, U., Siriyasatien, P. (2015) Pesticides used in Thailand and  
339 toxic effects to human health. *Med. Res. Arch.* 3, 1–10
- 340 Traynor, K.S., Pettis, J.S., Tarpy, D.R., Mullin, C.A., Frazier, J.L., Frazier, M.,  
341 vanEngelsdorp, D. (2016) In-hive pesticide exposome: assessing risks to  
342 migratory honey bees from in-hive pesticide contamination in the Eastern  
343 United States. *Sci. Rep.* 6, 33207
- 344 vanEngelsdorp, D., Hayes, J.Jr., Underwood, R.M., Pettis, J. (2008) A survey of  
345 honey bee colony losses in the U.S., fall 2007 to spring 2008. *PLoS ONE* 3,  
346 e4071
- 347 vanEngelsdorp, D., Meixner, M.D. (2010) A historical review of managed honey bee  
348 populations in Europe and the United States and the factors that may affect  
349 them. *J. Invertebr. Pathol.* 103, S80–S95
- 350

351

- 352 Wang, H., Zhang, S-W., Zeng, Z-Z., Yan, W-Y. (2014) Nutrition affects longevity  
353 and gene expression in honey bee (*Apis mellifera*) workers. *Apidologie* 45,  
354 618–625
- 355 Wongsiri, S., Chanchao, C., Lekprayoon, C., Wattanasermkit, K., Deowanish, S.,  
356 Leepitakrat, S. (2000) Honey bee diversity and management in the new  
357 millennium in Thailand. In: Proc. VIIth Int. Conf. on Tropical Bees:  
358 Management and Diversity and Vth Asian Apicultural Association Conf.,  
359 Chiang Mai, Thailand, IBRA, pp. 9–14
- 360 Wu, J.Y., Anelli, C.M., Sheppard, W.S. (2011) Sub-lethal effects of pesticide residues  
361 in brood comb on worker honey bee (*Apis mellifera*) development and  
362 longevity. *PLoS ONE* 6, e14720
- 363 Wu, J.Y., Smart, M.D., Anelli, C.M., Sheppard, W.S. (2012) Honey bees (*Apis*  
364 *mellifera*) reared in brood combs containing high levels of pesticide residues  
365 exhibit increased susceptibility to *Nosema* (Microsporidia) infection. *J.*  
366 *Invertebr. Pathol.* 109, 326–329
- 367 Yang, E.C., Chuang, Y.C., Chen, Y.L., Chang, L.H. (2008) Abnormal foraging  
368 behavior induced by sublethal dosage of imidacloprid in honey bee  
369 (Hymenoptera:Apidae). *J. Econ. Entomol.* 101, 1743–1748
- 370 Yang, E.C., Chang, H.C., Wu, W.Y., Chen, Y.W. (2012) Impaired olfactory  
371 associative behavior of honeybee workers due to contamination of  
372 imidacloprid in the larval stage. *PLoS ONE* 7, e49472
- 373
- 374

376 **Table I** Number of different colours of honeybee collected-pollen in agricultural and non-agricultural areas in four Northern provinces of  
 377 Thailand.

Month	Number of different colours							
	Chiang Mai		Lampang		Phayao		Phare	
	Agricultural area	Non-agricultural area	Agricultural area	Non-agricultural area	Agricultural area	Non-agricultural area	Agricultural area	Non-agricultural area
October 2015	4	5	3	4	3	2	4	5
November 2015	6	4	5	4	4	4	6	8
December 2015	5	7	5	6	3	3	Missing data	6
January 2016	3	6	5	5	4	4	4	6
February 2016	8	5	5	6	5	5	7	4
March 2016	5	5	Missing data		2	2	Missing data	4
April 2016	4	7	Missing data		2	2	Missing data	6
May 2016	4	4	Missing data		2	2	Missing data	5
June 2016	5	2	Missing data		2	2	5	3
July 2016	6	2	Missing data		2	2	4	5
August 2016	3	4	Missing data		2	2	1	3
September 2016	4	5	4	4	2	3	4	2

378

379

380

381

382

384

385 **Table II** Detection of pesticide residues in pollen samples collected from agricultural and non-agricultural areas.

386

387

388

389

% with detections	
Agricultural area (n = 16)	Non-agricultural area (n = 20)
62.5	55

390 **Table III** Pesticide residues in honeybee collected pollens from agricultural area in Northern Thailand.

Pesticide	Class	Chiang Mai			Lampang			Phayao			Phrae			LOD (ppb)
		% with detections	min	max	% with detections	min	max	% with detections	min	max	% with detections	min	max	
2,4-Dimethylphenyl formamide (DMPF)	Formamidine	ND			ND			66.7	44.1	80.1	ND			10.0
Carbendazim (MBC)	Fungicide	57.1	Trace	1,160	ND			ND			ND			5.0
Metalaxyl		14.3	Trace		ND			ND			ND			2.0
Atrazine	Herbicide	ND			ND			ND			25.0	50.8		6.0
Imidacloprid	Neonicotinoid	14.3	22		ND			ND			25.0	3.9		1.0
Chlorpyrifos	Organophosphate	42.9	38.1	244	66.7	3.1	3.9	33.3	5.0		ND			1.0
Cypermethrin	Pyrethroid	42.9	39.7	49.8	ND			ND			ND			4.0
Fluvalinate		28.6	20.7	27.7	33.3	14		ND			ND			1.0

391

392

394

395 **Table IV** Pesticide residues in honeybee collected pollens from non-agricultural area in Northern Thailand.

Pesticide	Class	Chiang Mai			Lampang			Phayao			Phrae			LOD (ppb)
		% with detections	min	max	% with detections	min	max	% with detections	min	max	% with detections	min	min	
2,4 Dimethylphenyl formamide (DMPF)	Formamidine	ND			ND			33.3	58.6		ND			10.0
Carbendazim (MBC)	Fungicide	28.6	Trace		ND			ND			14.3	106.0		5.0
Metalaxyl		ND			ND			ND			ND			2.0
Atrazine	Herbicide	ND			ND			ND			14.3	Trace		6.0
Imidacloprid	Neonicotinoid	ND			ND			ND			ND			1.0
Chlorpyrifos	Organophosphate	28.6	4.4	6.7	ND			66.7	4.9	5.0	14.3	4.0		1.0
Cypermethrin	Pyrethroid	ND			ND			ND			ND			4.0
Fluvalinate		28.6	14.6	46.5	66.7	9.7	11.3	ND			ND			1.0

396

397

398

399

400

401

402

403

404

405 **Figure Captions**

406 **Fig. 1** Proportion of the pollen types collected by honeybees in agricultural and non-  
407 agricultural areas in Chiang Mai province throughout a one-year period.

408 **Fig. 2** Proportion of the pollen types collected by honeybees in agricultural and non-  
409 agricultural areas in Lampang province throughout a one-year period.

410 **Fig. 3** Proportion of the pollen types collected by honeybees in agricultural and non-  
411 agricultural areas in Phayao province throughout a one-year period.

412 **Fig. 4** Proportion of the pollen types collected by honeybees in agricultural and non-  
413 agricultural areas in Phrae province throughout a one-year period.

414

415

416

417

418

419

420

421

422

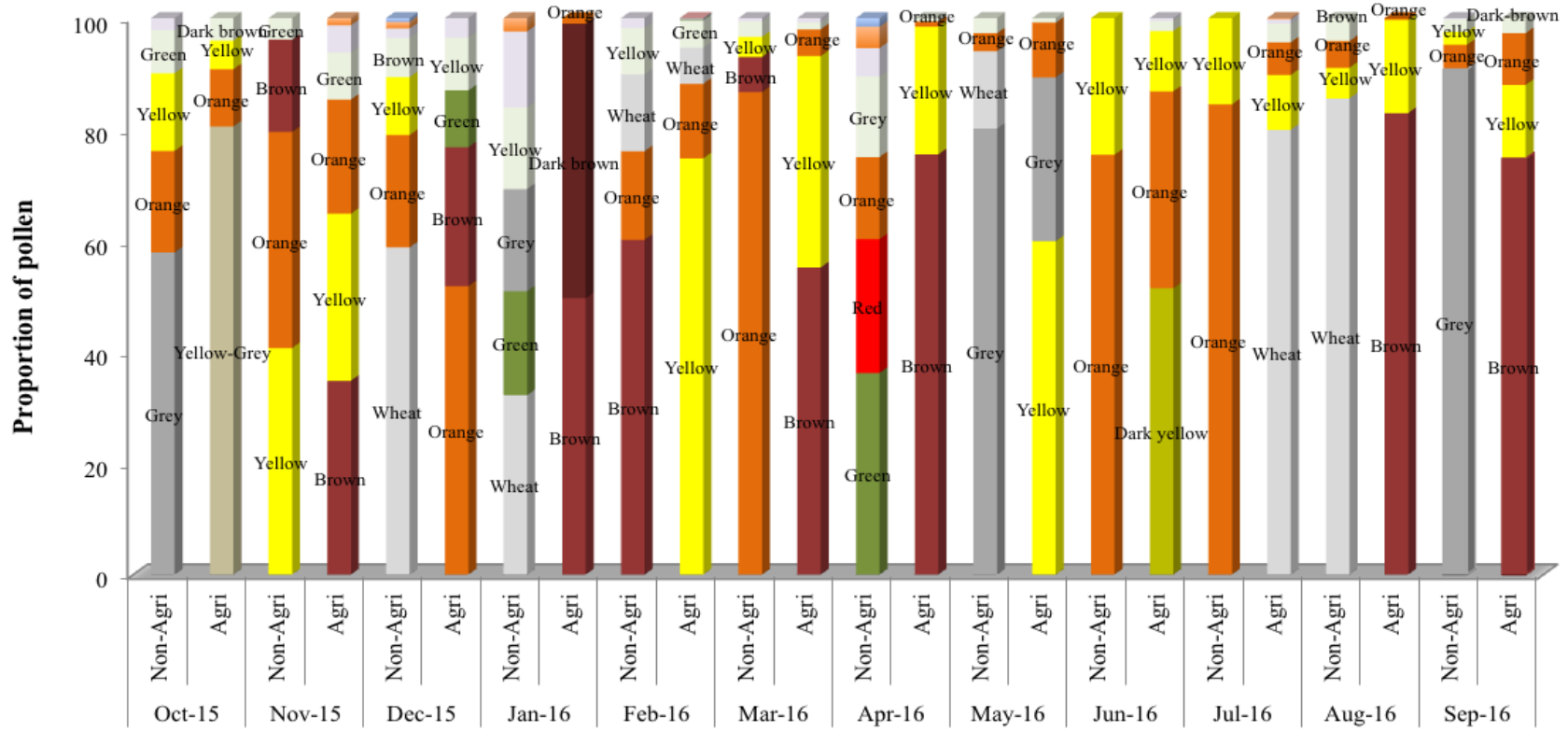
423

424

425

426

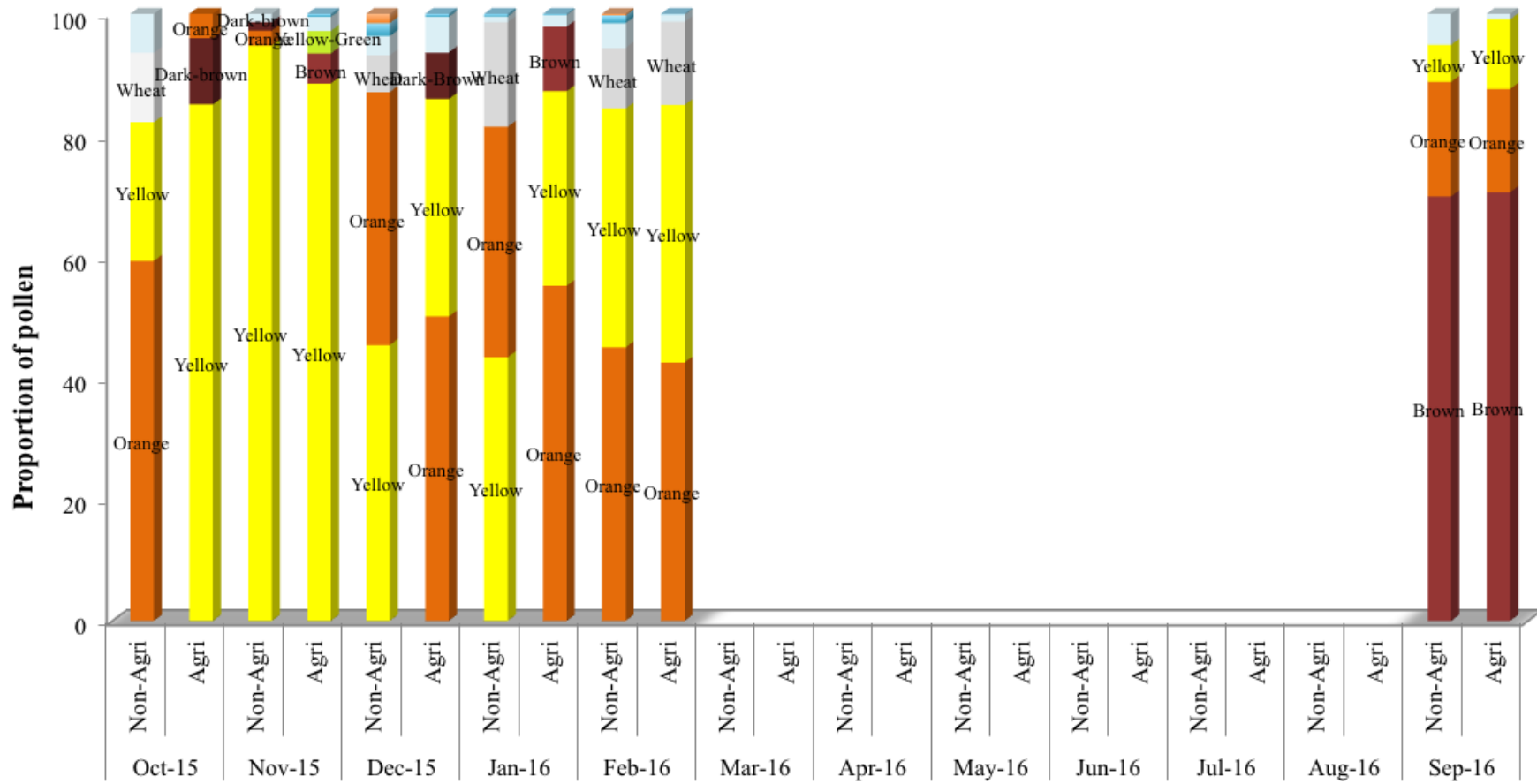
428 Fig. 1



429

431 Fig. 2

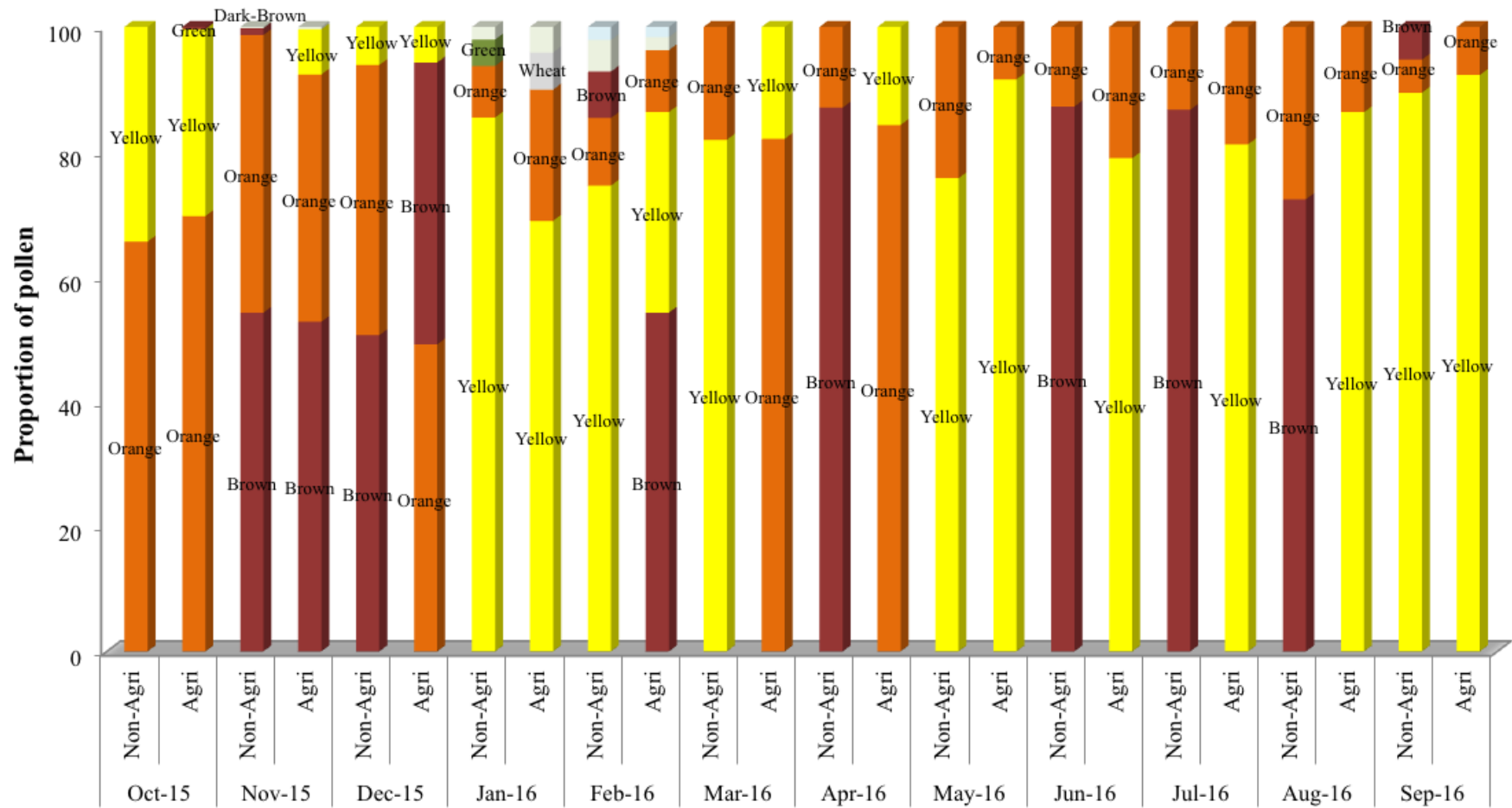
432



433

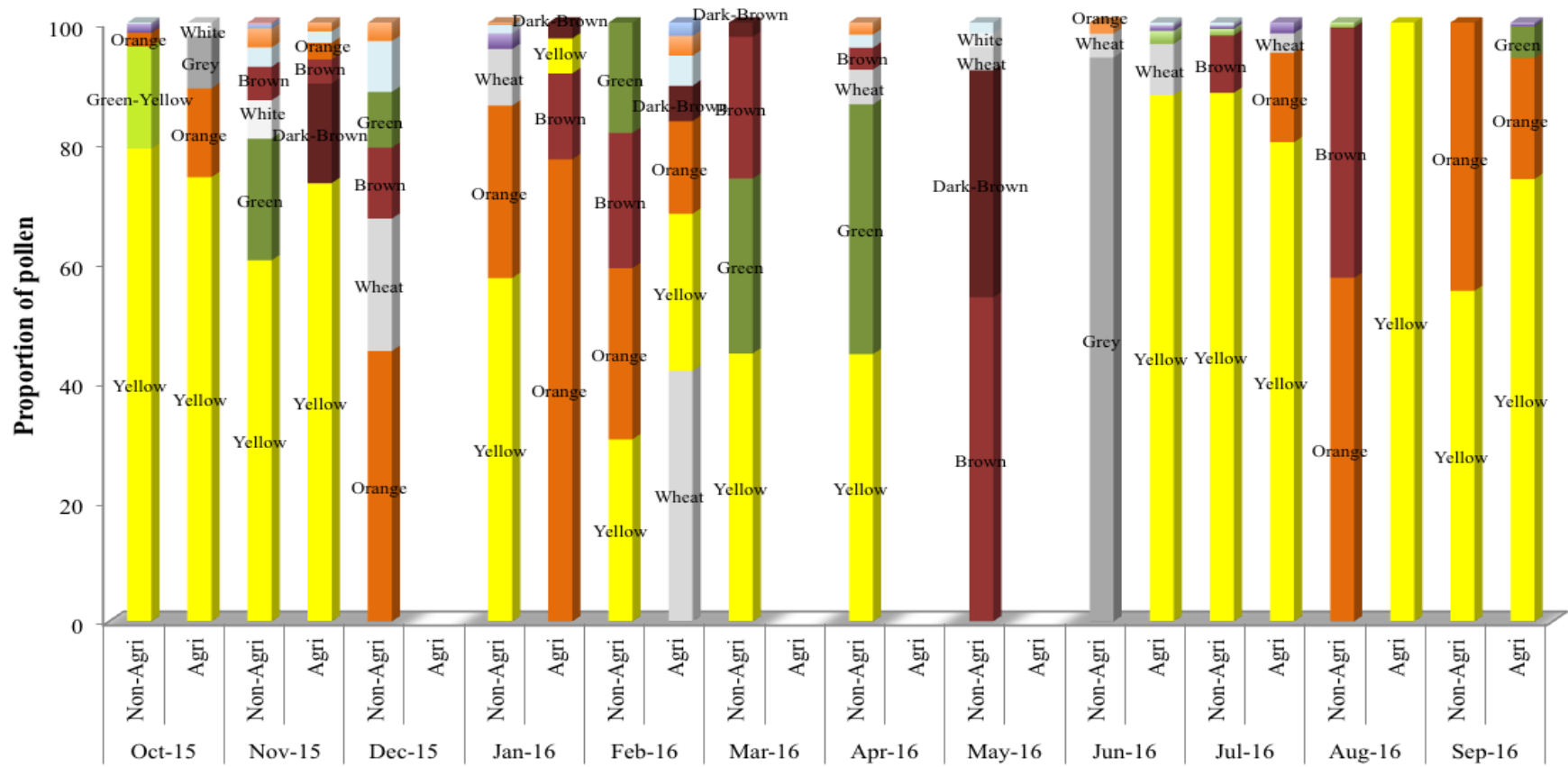
435 Fig. 3

436



437

439 Fig. 4



440