

ความเป็นพิษและพิษตกค้างของสารสกัดจากสะเดาไทย Azadirachta indica
var. siamensis และสารไซธาโลทริน ที่มีต่อผึ้งมด Apis florea
และผึ้งโพรง Apis cerana



นางสาว ชลิตมาศ บุญไทย

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาค้นคว้าหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต

สาขาวิชาวิทยาศาสตร์สภาวะแวดล้อม

บัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

พ.ศ. 2537

ISBN 974-583-676-1

ลิขสิทธิ์ของบัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

I17286220

TOXICITY AND RESIDUAL EFFECTS OF Azadirachta indica var. siamensis
EXTRACT AND CYHALOTHRIN ON Apis florea AND Apis cerana



Miss Chuleemas Boonthai

A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements
for the Degree of Master of Science

Interdepartment of Environmental Science
Graduate School

Chulalongkorn University

1994

ISBN 974-583-676-1

Thesis Title TOXICITY AND RESIDUAL EFFECTS OF Azadirachta indica var. siamensis EXTRACT AND CYHALOTHRIN ON Apis florea AND Apis cerana

By Miss Chuleemas Boonthai

Interdepartment Environmental Science

Thesis Advisor Prof. Siriwat Wongsiri, Ph.D.



Accepted by the Graduate School, Chulalongkorn University in
Partial Fulfillment of the Requirements for the Master's Degree/
Thavorn Vajrabhaya
..... Dean of Graduate School
(Prof. Thavorn Vajrabhaya, Ph.D.)

Thesis Committee

Pairath Saichuae
.....Chairman
(Assoc. Prof. Pairath Saichuae)

Siriwat Wongsiri
.....Thesis Advisor
(Prof. Siriwat Wongsiri, Ph.D.)

Premchit Tansathit
.....Member
(Assoc. Prof. Premchit Tansathit)

Kumthorn Thirakhupt
.....Member
(Asst. Prof. Kumthorn Thirakhupt, Ph.D.)



ชูลีมาศ บุญไทย: ความเป็นพิษและพิษตกค้างของสารสกัดจากสะเดาไทย *Azadirachta indica* var. *siamensis* และสารไซยาโลทรินที่มีต่อผึ้งมัม *Apis florea* และผึ้งโพรง *Apis cerana* (TOXICITY AND RESIDUAL EFFECTS OF *Azadirachta indica* var. *siamensis* EXTRACT AND CYHALOTHRIN ON *Apis florea* AND *Apis cerana*) อาจารย์ที่ปรึกษา: ศาสตราจารย์ ดร. สิริวิวัฒน์ วงษ์ศิริ. 173 หน้า. ISBN 974-583-676-1.

ศึกษาความเป็นพิษของสารสกัดจากสะเดาไทยและสารไซยาโลทรินต่อผึ้งมัมและผึ้งโพรง โดยวิธีทดสอบสารลงบนตัวผึ้งและวิธีผสมสารกับน้ำเชื่อมให้ผึ้งกิน และประเมินความเป็นพิษในรูปของค่า LD_{50} ในระยะเวลา 24 ชั่วโมงที่ช่วงความเชื่อมั่น $p=0.05$ ด้วยโปรแกรมโทปทิก พบว่า โดยวิธีทดสอบสารลงตัวผึ้งมัม ค่าเฉลี่ย 24 h LD_{50} ของสารสกัดจากเมล็ดสะเดาไทยเท่ากับ 129.5 ไมโครกรัมต่อผึ้ง 1 ตัว, สารสกัดจากใบสะเดาเท่ากับ 2021.4 ไมโครกรัมต่อผึ้ง 1 ตัว, น้ำมันสะเดาเท่ากับ 325.7 ไมโครกรัมต่อผึ้ง 1 ตัว, สารสกัดจากสะเดาในรูปการค้า Margosan-0 เท่ากับ 4539.9 ไมโครกรัมต่อผึ้ง 1 ตัว, Neemix เท่ากับ 2099.0 ไมโครกรัมต่อผึ้ง 1 ตัว, Advantage เท่ากับ 12899.0 ไมโครกรัมต่อผึ้ง 1 ตัว และสำหรับผึ้งโพรงมีค่าเท่ากับ 67.4, 3779.6, 380.3, 1788.4, 789.0 และ 1621.0 ไมโครกรัมต่อผึ้ง 1 ตัว ตามลำดับ ค่าเฉลี่ย 24 h LD_{50} ของสารไซยาโลทริน ต่อผึ้งมัมและผึ้งโพรงเท่ากับ 0.0003 และ 0.0039 ไมโครกรัมต่อผึ้ง 1 ตัว โดยวิธีทดสอบสารลงบนตัวผึ้งและ 0.0005 และ 0.018 ไมโครกรัมต่อผึ้ง 1 ตัว โดยวิธีผสมสารกับน้ำเชื่อมให้ผึ้งกิน

ศึกษาความเป็นพิษตกค้างของสารสกัดจากสะเดาไทยและสารไซยาโลทรินต่อผึ้งมัมและผึ้งโพรงโดยฉีดพ่นสารสกัดจากเมล็ดสะเดา 1% และสารไซยาโลทริน 0.002% บนดอกพวงชมพูและเก็บดอกมาสกัดที่ระยะเวลาต่างๆ เพื่อทดสอบความเป็นพิษพบว่าพิษตกค้างของสารสกัดจากเมล็ดสะเดาต่อผึ้งมัมและผึ้งโพรงมีค่าน้อยกว่า 3 และ 6 ชั่วโมง โดยวิธีทดสอบสารลงตัวและ น้อยกว่า 1 ชั่วโมง โดยวิธีผสมสารกับน้ำเชื่อมให้ผึ้งกิน ตามลำดับและพิษตกค้างของสารไซยาโลทรินต่อผึ้งมัมและผึ้งโพรงมีค่าน้อยกว่า 48 และ 6 ชั่วโมงโดยวิธีทดสอบสารลงตัวและน้อยกว่า 12 และ 1 ชั่วโมง โดยวิธีผสมสารกับน้ำเชื่อมให้ผึ้งกิน ตามลำดับและพบว่าสารไซยาโลทรินมีผลในการไล่ผึ้งสูง แตกต่างจากกลุ่มควบคุมและสารสกัดจากสะเดาอย่างมีนัยสำคัญ ($p < 0.05$)

ศึกษาผลของสารสกัดจากเมล็ดสะเดาต่อสภาพภายในรังผึ้งโพรงในภาคสนามโดยการฉีดพ่นสารสกัดจากเมล็ดสะเดา 1% ทุกๆ 3 วันในตาข่ายขนาด 3m x 3m x 2m ที่มีดอกไม้และรังผึ้งโพรงตั้งอยู่ พบว่าการเปลี่ยนแปลงของสภาพภายในรังผึ้งได้แก่ จำนวนของไข่, ตัวอ่อน, ตัวเต็มวัย, น้ำหนักของรัง, การเก็บน้ำหวานและเกสร และความผิดปกติของตัวอ่อน ไม่มีความแตกต่างกับกลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญ ($p < 0.05$) แต่พบว่ามีผลกระทบต่อกำหนดของตัวหนอนในสัปดาห์ที่ 9 และการหนีรังของผึ้งอย่างมีนัยสำคัญ ($p < 0.05$)

ศึกษาผลของสารสกัดจากเมล็ดสะเดา 0.1% ต่อตัวหนอนของผึ้งโพรงอายุ 1, 2, 3 วัน พบว่ามีผลกระทบต่อการเปอร์เซ็นต์ความผิดปกติของตัวหนอนและการคาบตัวหนอนทั้งอย่างมีนัยสำคัญ ($p < 0.05$)

ภาควิชา สหสาขา
สาขาวิชา วิทยาศาสตร์สภาวะแวดล้อม
ปีการศึกษา 2536

ลายมือชื่อนิติกร อลิษา บุญไทย
ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา
ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษาร่วม



C426171 : MAJOR INTER-DEPARTMENT OF ENVIRONMENTAL SCIENCE

KEY WORD: TOXICITY/NEEM EXTRACT/CYHALOTHRIN/Apis florea/Apis cerana

CHULEEMAS BOONTHAI : TOXICITY AND RESIDUAL EFFECTS OF Azadirachta

indica var. siamensis EXTRACT AND CYHALOTHRIN ON Apis florea AND

Apis cerana THESIS ADVISOR : PROF. SIRIWAT WONGSIRI, Ph.D. 173 pp.

ISBN 974-583-676-1.

Toxicity of Thai neem extract and cyhalothrin on Apis florea and Apis cerana were investigated by using topical application and feeding methods. The 24 h LD50 values with $p=0.05$ were evaluated and analysed by probit analysis program. The results showed that when using topical application, in A. florea the mean 24 h LD50 values for Thai neem-seed extract was 129.5 $\mu\text{g}/\text{bee}$, for neem-leaf extract was 2021.4 $\mu\text{g}/\text{bee}$, for neem oil was 325.7 $\mu\text{g}/\text{bee}$, for commercial neem extracts such as Margosan-O was 4539.9 $\mu\text{g}/\text{bee}$, for Neemix was 2099.0 $\mu\text{g}/\text{bee}$, and for Advantage was 12899.0 $\mu\text{g}/\text{bee}$. The respective values for A. cerana were 67.4, 3779.6, 380.3, 1788.4, 789.0, and 1621.0 $\mu\text{g}/\text{bee}$. The mean 24 h LD50 values of cyhalothrin on A. florea and A. cerana were 0.0003 and 0.0039 $\mu\text{g}/\text{bee}$ by using topical application and 0.0005 and 0.018 $\mu\text{g}/\text{bee}$ by using feeding methods.

Residual effects of neem-seed extract and cyhalothrin on A. florea and A. cerana were studied by spraying 1% neem-seed extract and 0.002% cyhalothrin on Antigonon leptopus plots. The residue after different times was tested on A. florea and A. cerana. The residual toxicity of neem-seed extract on A. florea and A. cerana was less than 3 and 6 hours by using topical application and less than 1 hour by using feeding methods. Residual toxicity of cyhalothrin on A. florea and A. cerana was less than 48 and 6 hours by using topical application and less than 12 and 1 hour by using feeding methods. The repellent effect of cyhalothrin was significantly higher than that of the control group and of the neem extract ($p<0.05$).

The effect of neem-seed extract on conditions within the beehive was studied by spraying 1% neem-seed extract every 3 days on flowers in 3m x 3m x 2m test cages each containing one A. cerana hive. The conditions within the beehives, such as the number of eggs, brood, adults, the amount of nectar and pollen collected, beehive weight, and the number of abnormal larvae/brood, were not significantly different from the control group ($p<0.05$). However, there was a significant effect on the number of larvae at the ninth week and an absconding ($p<0.05$).

The effect of 0.1% neem-seed extract on 1 day-, 2 day-, and 3 day-old larvae of A. cerana was investigated. There was a significant effect on the percentage of abnormal larvae and larvae expelled from the hive ($p<0.05$).

ภาควิชา สหสาขา

สาขาวิชา วิทยาศาสตร์สภาวะแวดล้อม

ปีการศึกษา 2536

ลายมือชื่อนิสิต ชลวัฒ บุญไทย

ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา

ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษาร่วม

ACKNOWLEDGEMENT



I would like to express my sincere thanks and grateful appreciation to my thesis advisor, Prof. Dr. Siriwat Wongsiri, for his encouragement, valuable guidance, suggestions and kindness throughout the course of this study. Special thanks to Dr. Thomas Wolf of University of Cambridge, UK and Dr. Kassim Haji Daud of University of Brunei Darussalam, Brunei for pre-corrections to the manuscript. Special thanks are due to my thesis committee, Assoc. Prof. Pairath Saichuae, Assoc. Prof. Premchit Tansathit and Asst. Prof. Dr. Kumthorn Thirakhupt for their suggestions, criticism and corrections to the manuscript.

I wish to express my deepest gratitude to Khun Kaewkwan Vajarodaya, Lord Chamberlain of the Gland Palace, Thailand and director of the Royal Chitralada Project and the Chitralada School for kindly allowing me to use the location for this experiment. A grant from the Graduate School, Chulalongkorn University supported this work. I also thanks Mr. Chaiyapat Chirathamjaree of the Agricultural Toxic Division for suggestions and kindness, Mrs. Virachit Lionjumroon and Mr. Robert O. Larson who supplied me with some of neem product.

Special thanks to Mr. Surachai Leepitakrat, Mr. Prapoht Juprachakorn, Mr. Chokchai Yachusri and all of the other that are not named here for their help and friendship in periods of this study. Finally, I would like to express my appreciation and gratitude to my family for their love and care and their support and understanding throughout my study.

Chuleemas Boonthai



CONTENTS

	Page
ABSTRACT IN THAI.....	IV
ABSTRACT IN ENGLISH.....	V
ACKNOWLEDGEMENTS.....	VI
LIST OF TABLES.....	VIII
LIST OF FIGURES.....	XIII
CHAPTER	
1. INTRODUCTION.....	1
2. LITERATURE REVIEW.....	7
3. MATERIALS AND METHODS.....	43
4. RESULTS.....	58
5. DISCUSSION.....	123
6. CONCLUSION AND RECOMMENDATIONS.....	136
REFERENCES.....	142
APPENDIX A.....	152
APPENDIX B.....	157
APPENDIX C.....	169
APPENDIX D.....	171
BIOGRAPHY	173

LIST OF TABLES

TABLES	PAGE
2.1 : Extent of bee poisoning by pesticides.....	22
2.2 : Example of anticipated honey bee mortality.....	30
2.3 : Toxicity of cyhalothrin on honey bee.....	41
4.1 : Contact toxicity of cyhalothrin on <i>A. florea</i>	61
4.2 : Contact toxicity of cyhalothrin on <i>A. cerana</i>	61
4.3 : Oral toxicity of cyhalothrin on <i>A. florea</i>	62
4.4 : Oral toxicity of cyhalothrin on <i>A. cerana</i>	62
4.5 : Azadirachtin determined by HPLC.....	63
4.6 : Contact toxicity of neem-seed crude extract on <i>A. florea</i>	64
4.7 : Contact toxicity of neem-seed crude extract on <i>A. cerana</i>	64
4.8 : Oral toxicity of neem-seed crude extract on <i>A. florea</i>	65
4.9 : Oral toxicity of neem-seed crude extract on <i>A. cerana</i>	65
4.10: Contact toxicity of neem-seed extract on <i>A. florea</i>	75
4.11: Contact toxicity of neem-seed extract on <i>A. cerana</i>	75
4.12: Oral toxicity of neem-seed extract on <i>A. florea</i>	76
4.13: Oral toxicity of neem-seed extract on <i>A. cerana</i>	76
4.14: Contact toxicity of neem-leaf extract on <i>A. florea</i>	77
4.15: Contact toxicity of neem-leaf extract on <i>A. cerana</i>	77
4.16: Oral toxicity of neem-leaf extract on <i>A. florea</i>	78
4.17: Oral toxicity of neem-leaf extract on <i>A. cerana</i>	78

LIST OF TABLES (CONT.)

TABLES	PAGE
4.18: Contact toxicity of neem oil on <i>A. florea</i>	79
4.19: Contact toxicity of neem oil on <i>A. cerana</i>	79
4.20: Oral toxicity of neem oil on <i>A. florea</i>	80
4.21: Oral toxicity of neem oil on <i>A. cerana</i>	80
4.22: Contact toxicity of Margosan-0 [®] on <i>A. florea</i>	81
4.23: Contact toxicity of Margosan-0 [®] on <i>A. cerana</i>	81
4.24: Oral toxicity of Margosan-0 [®] on <i>A. florea</i>	82
4.25: Oral toxicity of Margosan-0 [®] on <i>A. cerana</i>	82
4.26: Contact toxicity of Neemix [®] on <i>A. florea</i>	83
4.27: Contact toxicity of Neemix [®] on <i>A. cerana</i>	83
4.28: Oral toxicity of Neemix [®] on <i>A. florea</i>	84
4.29: Oral toxicity of Neemix [®] on <i>A. cerana</i>	84
4.30: Contact toxicity of Advantage [®] on <i>A. florea</i>	85
4.31: Contact toxicity of Advantage [®] on <i>A. cerana</i>	85
4.32: Oral toxicity of Advantage [®] on <i>A. florea</i>	86
4.33: Oral toxicity of Advantage [®] on <i>A. cerana</i>	86
4.34: Comparative toxicity of cyhalothrin and various neem extracts on <i>A. florea</i> by topical application and feeding methods (LC ₅₀ at 24 hours).....	88

LIST OF TABLES (CONT.)

TABLES	PAGE
4.35: Comparative toxicity of cyhalothrin and various neem extracts on <i>A. cerana</i> by topical application and feeding methods (LC ₅₀ at 24 hours).....	90
4.36: Comparative toxicity of cyhalothrin and various neem extracts on <i>A. florea</i> by topical application and feeding methods (LD ₅₀ at 24 hours).....	92
4.37: Comparative toxicity of cyhalothrin and various neem extracts on <i>A. cerana</i> by topical application and feeding methods (LD ₅₀ at 24 hours).....	94
4.38: Comparative toxicity of cyhalothrin and various neem extracts on <i>A. florea</i> by topical application and feeding methods (LD ₅₀ azadirachtin at 24 hours).....	96
4.39: Comparative toxicity of cyhalothrin and various neem extracts on <i>A. cerana</i> by topical application and feeding methods (LC ₅₀ azadirachtin at 24 hours).....	98
4.40: Residual effect of neem extract on <i>Antigonon leptopus</i> to <i>A. florea</i>	101
4.41: Residual effect of neem extract on <i>Antigonon leptopus</i> to <i>A. cerana</i>	102

LIST OF TABLES (CONT.)

TABLES	PAGE
4.42: Residual effect of cyhalothrin on <i>Antigonon leptopus</i> to <i>A. florea</i>	103
4.43: Residual effect of cyhalothrin on <i>Antigonon leptopus</i> to <i>A. cerana</i>	104
4.44: Repellant effects of cyhalothrin and neem extract on <i>Antigonon leptopus</i> to honey bees.....	107
4.45: Climatic condition during the study.....	110
4.46: Effects of neem extract on variation of egg within beehive..	111
4.47: Effects of neem extract on variation of larvae within beehive.....	112
4.48: Effects of neem extract on variation of brood within beehive.....	113
4.49: Effects of neem extract on variation of adult within beehive.....	114
4.50: Effects of neem extract on variation of nectar collection within beehive.....	115
4.51: Effects of neem extract on variation of pollen collection within beehive.....	116

LIST OF TABLES (CONT.)

TABLES	PAGE
4.52: Effects of neem extract on variation of weight within beehive.....	118
4.53: Effects of neem extract on variation of abnormal larvae and brood within beehive.....	119
4.54: Effects of neem extract on larvae of <i>A. cerana</i>	121



ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

LIST OF FIGURES

FIGURES	PAGE
2.1 : <i>Apis florea</i>	9
2.2 : <i>Apis cerana</i>	9
2.3 : The mechanism by which a honey bee pollinates a flower.....	12
2.4 : <i>Azadirachta indica</i> A. Juss tree.....	33
2.5 : <i>Azadirachta indica</i> var. <i>siamensis</i> tree.....	33
2.6 : Chemical structure of azadirachtin.....	34
2.7 : Pyrethrum flower.....	38
2.8 : Chemical structure of cyhalothrin.....	40
3.1 : Neem extract.....	49
3.2 : Commercial neem extract.....	49
3.3 : Cyhalothrin.....	50
3.4 : Electric microapplicator.....	50
3.5 : Test cages in incubator.....	50
3.6 : A fence of <i>Antigonon leptopus</i> at Chitralada Royal Palace.....	53
3.7 : <i>A. florea</i> on <i>Antigonon leptopus</i> flower.....	53
3.8 : <i>A. cerana</i> on <i>Antigonon leptopus</i> flower.....	53
3.9 : Small movable frame hives of <i>A. cerana</i> in experimental cages.....	55
3.10: Meteorological station at Chitralada Royal Palace.....	56
4.1 : Oral toxicity of neem-seed crude extract on <i>A. florea</i> and <i>A. cerana</i>	66

LIST OF FIGURES (CONT.)

FIGURES	PAGE
4.2 : Oral toxicity of neem-seed extract on <i>A. florea</i> and <i>A. cerana</i>	66
4.3 : Oral toxicity of Neemix [®] on <i>A. florea</i> and <i>A. cerana</i>	87
4.4 : Oral toxicity of Advantage [®] on <i>A. florea</i> and <i>A. cerana</i>	87
4.5 : Residual effect of neem extract on <i>Antogonon leptopus</i> to <i>A. florea</i> and <i>A. cerana</i>	105
4.6 : Residual effect of cyhalothrin on <i>Antogonon leptopus</i> to <i>A. florea</i> and <i>A. cerana</i>	105
4.7 : Repellant effects of neem extract and cyhalothrin to honey bee.....	106
4.8 : Effects of neem extract on variation of egg within beehive.....	111
4.9 : Effects of neem extract on variation of larvae within beehive.....	112
4.10: Effects of neem extract on variation of brood within beehive.....	113
4.11: Effects of neem extract on variation of adult within beehive.....	114
4.12: Effects of neem extract on variation of nectar collection within beehive.....	115

LIST OF FIGURES (CONT.)

FIGURES	PAGE
4.13: Effects of neem extract on variation of pollen collection within beehive.....	116
4.14: Effects of neem extract on variation of weight within beehive.....	118
4.15: Effects of neem extract on variation of abnormal larvae and brood within beehive.....	119
4.16: Effects of neem extract on normal cell of 1 day-, 2 day- and 3 day-old larvae.....	120
4.17: Effects of neem extract on abnormal cell of 1 day-, 2 day- and 3 day-old larvae.....	122
4.18: Effects of neem extract to disappear cell of 1 day-, 2 day- and 3 day-old larvae.....	122
5.1 : Comparative toxicity of cyhalotrin on <i>A. florea</i> at 3 h and 24 h.....	127
5.2 : Comparative toxicity of cyhalothrin on <i>A. florea</i> and <i>A. cerana</i>	127
5.3 : Comparative toxicity of various neem extracts on <i>A. florea</i> and <i>A. cerana</i> (LD ₅₀ µg/bee).....	129
5.4 : Quantity of azadirachtin in various neem extract.....	129

LIST OF FIGURES (CONT.)

FIGURES	PAGE
5.5 : Comparative toxicity of various neem extracts on <i>A. florea</i> (LD ₅₀ µg azadirachtin value).....	130
5.6 : Comparative toxicity of various neem extracts on and <i>A. cerana</i> (LD ₅₀ µg azadirachtin value).....	130
5.7 : <i>A. florea</i> nest on the Thai neem tree at Changwat Samut- Songkhram.....	132



 ศูนย์วิทยทรัพยากร
 จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย