18232

สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

ปัญหาพิเศษปริญญาตรี

เรื่อง
ระดับการทำงานของอะเซตทิลโคลินเอสเทอเรสในผึ้งพันธุ์ (*Apis mellifera*)ที่เผยกับเมทธามิโดฟอส

Acetylcholinesterase activity in Honey Bee (*Apis mellifera*), Exposed to Methamidophos

T098865

โดย

นายไมตรี ศรีโพนทอง

ปัญหาพิเศษนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต
สาขาเทคโนโลยีการจัดการศัตรูพืช
ภาควิชาเทคโนโลยีการจัดการศัตรูพืช คณะเทคโนโลยีการเกษตร
สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง
พ.ศ. 2544

ปพ.
มง655
2544

เลขหมู่.....
เลขทะเบียน.....
วัน.เดือน,ปี.....

ลิขสิทธิ์เป็นของสถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง ขอสงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า แสวงหาผลประโยชน์ หรือเพื่อการอื่นใดทั้งสิ้น ไม่อนุญาตให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ใบรับรองปัญหาพิเศษ

ภาควิชาเทคโนโลยีการจัดการศัตรูพืช

ปริญญา

วิทยาศาสตรบัณฑิต (เกษตรศาสตร์)

เรื่อง

ระดับการทำงานของอะเซลทิลโคลินเอสเทอเรสในผึ้งพันธุ์ (*Apis mellifera*)

ที่เผยกับเมทธามิโดฟอส

Acetylcholinesterase activity in Honey bee (*Apis mellifera*),

Exposed to Methamidophos

โดย

นายไมตรี ศรีโพนทอง

ได้พิจารณาเห็นชอบโดย

_____

(ผศ.ลักขณา อมรสิน)

อาจารย์ที่ปรึกษา

ภาควิชารับรองแล้ว

_____

(รศ.ดร.วรเดช จันทรสร)

หัวหน้าภาควิชาเทคโนโลยีการจัดการศัตรูพืช

วันที่....1.....เดือน.....พ.ค.....พ.ศ. 2545

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทคัดย่อ

ชื่อเรื่อง : ระดับการทำงานของอะเซตทิลโคลินเอสเทอเรสในผึ้งพันธ์ (*Apis mellifera*) ที่เผยกับเมทธามิโดฟอส

โดย : นาย ไมตรี ศรีโพนทอง

ชื่อปริญญา : วิทยาศาสตรบัณฑิต(เกษตรศาสตร์)

สาขาวิชา : เทคโนโลยีการจัดการศัตรูพืช

อาจารย์ที่ปรึกษา : ..... 1 / พ.ค. 2545

(ผศ.ลักขณา อมรสิน)

ผึ้งพันธ์ (*Apis mellifera*) ที่เผยกับเมทธามิโดฟอสที่ระดับความเข้มข้น 4, 6, 8, 10 และ 12 มก./ม^3 จะมีระดับอะเซตทิลโคลินเอสเทอเรสที่ถูกยับยั้งเท่ากับ 1,361.81, 2,482.55, 3,292.36, 3,600.41, และ 4,480.54 mU/ml.ตามลำดับ เมื่อเปรียบเทียบกับผึ้งในกลุ่มควบคุมที่เผยกับอะซีโตนซึ่งจะมีระดับอะเซตทิลโคลินเอสเทอเรสเท่ากับ 6,749.28 mU/ml.คิดเป็นเปอร์เซนต์ของอะเซตทิลโคลินเอสเทอเรสที่ถูกยับยั้งจะเท่ากับ 20.18, 36.78, 48.74, 53.35, และ 66.39% ตามลำดับ แสดงให้เห็นว่าการยับยั้งระดับอะเซตทิลโคลินเอสเทอเรสจะมีความสัมพันธ์ในทางเดียวกันกับความเข้มข้นของเมทธามิโดฟอส คือเมื่อระดับความเข้มข้นของเมทธามิโดฟอสสูงขึ้นระดับอะเซตทิลโคลินเอสเทอเรสที่ถูกยับยั้งจะสูงขึ้นด้วย ทั้งนี้ผึ้งที่เผยกับเมทธามิโดฟอสเข้มข้น 0, 4, 6, 8, 10 และ 12 มก./ม^3 จะตาย 5.83, 66.12, 80.95, 100, 100 และ 100 % ภายใน 24 ชั่วโมง ตามลำดับ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Abstract

Title : Acetylcholinesterase activity in Honey bee (*Apis mellifera*), Exposed to Methamidophos

By : Maitree Sripontong

Degree : Bachelor of science in Agriculture

Major : Plant Pest Management Technology

Advisor : Luckana Amonsin 1/5/2002

(Asst.Professor Luckana Amonsin)

The inhibition of acetylcholinesterase activity in honey bee (Apis mellifera), exposed to 4, 6, 8, 10 and 12 mg./m^3 of methamidophos were 1,361.81, 2,482.55, 3,292.36, 3600.41 and 4,480.54 mU/ml.respectively, results in percentage by comparing with honey bee in control group,exposed to acetone as 20.18, 36.78, 48.78, 53.35 and 66.39%,respectively. Acetylcholinesterase activity in honey bee of control group was 6,749.28 mU/ml. It was denoted that the relation between methamidophos concentrations and the inhibition of acetylcholinesterase was positive, that meant, the inhibition of cholinesterase activity was increased as increasing in methamidophos concentrations. Honey bee exposed to 0, 4, 6, 8, 10 and 12 mg./m^3 of methamidophos died at 5.83, 66.12, 80.95, 100, 100 and 100% in 24 hours,respectively.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

คำนิยม

การทำปัญหาพิเศษฉบับนี้ สำเร็จลงได้ด้วยดี ต้องขอขอบพระคุณผู้ช่วยศาสตราจารย์ ลักขณา อมรสิน เป็นอย่างยิ่งที่ให้ความดูแล ให้คำแนะนำ และช่วยเหลือด้วยดีมาตลอด นอกจากนี้ต้องขอขอบพระคุณ คุณจรงค์ศักดิ์ พุมนวน นักวิทยาศาสตร์ประจำภาควิชาเทคโนโลยีการจัดการศัตรูพืช ที่ให้ความช่วยเหลือ แนะนำ สั่งสอนในทุก ๆ อย่าง

ขอกราบขอบพระคุณบิดา มารดา ที่คอยให้กำลังใจ และกำลังทรัพย์ในการศึกษาเล่าเรียนตลอดมา และขอขอบคุณเพื่อน ๆ พี่ ๆ ที่คอยช่วยเหลือ เป็นกำลังใจ จนทำให้ปัญหาพิเศษฉบับนี้สำเร็จลุล่วงได้ด้วยดี

ไมตรี ศรีโพนทอง

เมษายน 2545

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญ

เรื่อง	หน้า
บทคัดย่อภาษาไทย	i
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ	ii
คำนิยม	iii
สารบัญ	iv
สารบัญตาราง	v
สารบัญภาพ	v
คำนำ	1
วัตถุประสงค์	2
ตรวจเอกสาร	3
อุปกรณ์และวิธีการ	15
ผลการทดลอง	19
วิจารณ์ผลการทดลอง	22
สรุปผลการทดลองและข้อเสนอแนะ	23
เอกสารอ้างอิง	24

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญตาราง

ตารางที่ หน้า

1. ปริมาณอะเซตทิลโคลินเอสเทอเรสที่ถูกยับยั้งและเปอร์เซ็นต์การตายของผึ้ง ในเวลา 1 ชั่วโมง.....20
2. เปอร์เซ็นต์การตายของผึ้งในเวลา 24 ชั่วโมง.....20

สารบัญภาพ

ภาพที่ หน้า

1. ความสัมพันธ์ของระดับอะเซตทิลโคลินเอสเทอเรสที่ถูกยับยั้งกับความเข้มข้นของเมทธามิโดฟอสและเปอร์เซ็นต์การตายของผึ้งในเวลา 1 ชั่วโมง.....21
2. เปอร์เซ็นต์การตายของผึ้งในเวลา 24 ชั่วโมง.....21

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

คำนำ

ผึ้งพันธุ์ (*Apis mellifera*) เป็นแมลงที่มีประโยชน์ต่อมนุษย์เป็นอย่างมาก โดยเฉพาะผู้ที่ประกอบอาชีพเป็นเกษตรกรปลูกไม้ผล โดยที่ในช่วงฤดูไม้ผลออกดอก ผึ้งจะช่วยในการผสมเกสรของไม้ผล ซึ่งจะทำให้เพิ่มผลผลิตทางการเกษตรได้ประมาณ 30% ปัจจุบันมีเกษตรกรจำนวนหลายรายที่มีสวนผลไม้ได้นำผึ้งมาเลี้ยงไว้ในสวน เพื่อให้ผึ้งช่วยผสมเกสรเพื่อเป็นการเพิ่มผลผลิต นอกจากเพิ่มผลผลิตทางการเกษตรแล้วยังมีประโยชน์อีกมากมายที่ได้จากผึ้ง เช่น น้ำผึ้ง มีประโยชน์ต่อร่างกายมนุษย์ ใช้รักษาโรคนานาชนิด อีกทั้งยังเป็นยาบำรุงได้เป็นอย่างดี

เมทธามิโดฟอส (methamidophos) เป็นสารเคมีกำจัดแมลงในกลุ่มออร์กาโนฟอสเฟตประเภทดูดซึม ออกฤทธิ์ทางสัมผัสตายและกินตาย มีสมบัติในการป้องกันกำจัดแมลงศัตรูพืชพวกหนอนผีเสื้อต่าง ๆ เพลี้ยอ่อน เพลี้ยไฟ ไรแดง แมลงหวี่ขาว ที่เข้าทำลายพืชเศรษฐกิจต่าง ๆ รวมทั้งผักและผลไม้ จากการใช้สารเมทธามิโดฟอสเพื่อกำจัดแมลงศัตรูดังกล่าว พบว่า มีผลกระทบต่อผึ้งพันธุ์ เมทธามิโดฟอสมีความเป็นพิษต่อผึ้งค่อนข้างสูงโดยที่ระดับความเป็นพิษของสารออร์กาโนฟอสเฟตสามารถประเมินความรุนแรงได้จากการตรวจวัดระดับเอนไซม์อะเซตทิลโคลินเอสเทอเรสในหัวผึ้ง จึงได้ศึกษาความสัมพันธ์ของความเข้มข้นของเมทธามิโดฟอสกับระดับอะเซตทิลโคลินเอสเทอเรสและการตายของผึ้งพันธุ์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

วัตถุประสงค์

1. ศึกษาระดับอะเซตทิลโคลินเอสเทอเรสในผึ้งที่ได้รับสารเมทธามิโดฟอส
2. ศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของเมทธามิโดฟอสกับระดับอะเซตทิลโคลินเอสเทอเรสและการตายของผึ้ง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตรวจเอกสาร

ผึ้ง (Honey bee) เป็นแมลงสังคมชนิดหนึ่ง ที่มีการดำรงชีวิตอยู่เป็นกลุ่มหรือ colony มีระบบการแบ่งวรรณะที่มีสมาชิกทำหน้าที่แตกต่างกันออกไป โดยมีผึ้งแม่รัง (Queen) ทำหน้าที่เป็นศูนย์กลางของรัง และปล่อยสารเคมีที่เรียกว่า pheromones ออกไปควบคุมกลไกของสังคมผึ้งภายในรัง

ผึ้งจัดอยู่ในวงศ์ Apidae สกุล Apis ในปัจจุบันมีด้วยกัน 4 ชนิด คือ

- ผึ้งหลวง (Giant honey bee) *Apis dorsata* และ species ใหม่ที่ใกล้เคียงกับผึ้งหลวง คือ *A. laboriosa*
- ผึ้งมิ้ม (Dwarf honey bee) *A.florea* และ species ใหม่ที่คล้ายคลึงกับผึ้งมิ้ม คือ *A. andreniformis*
- ผึ้งโพรง (Indian honey bee) *A. cerana* และ species ใหม่ใกล้เคียงกับผึ้งโพรง คือ *A. koschevnikori*
- ผึ้งพันธุ์ (European honey bee) *A. mellifera*

ผึ้งหลวง ผึ้งมิ้ม และผึ้งโพรง เป็นผึ้งพื้นเมืองในเขตเอเชีย ส่วนผึ้งพันธุ์นั้นมีถิ่นกำเนิดในทวีปยุโรปและบางส่วนของทวีปแอฟริกา(ทัศนีย์ และคณะ, 2544)

ผึ้งพันธุ์ (*Apis mellifera*) มีความสำคัญอย่างยิ่งต่อสมดุลธรรมชาติ เพราะผึ้งพันธุ์จะทำหน้าที่ในการผสมเกสร ซึ่งจำเป็นต่อการติดผลของผลไม้หลายชนิด มีประโยชน์ต่อผู้คนเป็นอย่างมาก โดยเฉพาะผู้ที่ประกอบอาชีพเกษตรกร ปลูกไม้ผล ผึ้งจะช่วยผสมเกสรให้ไม้ผลทำให้ได้ผลผลิตมากขึ้น

ปัจจุบันพบว่าสารเคมีกำจัดศัตรูพืช (Pesticides) เป็นปัญหาและอุปสรรคสำคัญที่สุดประการหนึ่งต่อการพัฒนาการเลี้ยงผึ้งทั่วโลก สารเคมีดังกล่าวถูกผลิตขึ้นมาใช้ทั้งในด้านการเกษตรและด้านสาธารณสุข สารเคมีเหล่านี้คือสารเคมีกำจัดแมลง สารเคมีกำจัดวัชพืช สารเคมีกำจัดโรคพืช สารเคมีกำจัดหนู และสารเคมีกำจัดไส้เดือนฝอย เป็นต้น (สิริวัฒน์, 2523)

สำหรับในประเทศไทยได้ทำการสำรวจปัญหาความเป็นพิษของสารเคมี กำจัดศัตรูพืชที่มีต่อการเลี้ยงผึ้งพันธุ์เป็นครั้งแรกในจังหวัดเชียงใหม่ ในปี พ.ศ. 2526 จากผู้เลี้ยงผึ้ง 20 ราย ปรากฏว่ามีผู้ที่เคยประสบปัญหาผึ้งพันธุ์ที่เลี้ยงได้รับสารพิษจากสารฆ่าแมลงตายถึง 18 ราย คิดเป็น 90 เปอร์เซ็นต์ ของผู้เลี้ยงผึ้งที่ทำการสำรวจ ส่วนใหญ่พบว่าเกิดจากการพ่นสารเคมีเพื่อกำจัดศัตรูพืชซึ่งมีผลกระทบต่อผึ้งคือ ทำให้ผึ้งตาย ยกเว้นมีเพียง 1 ราย ที่มีผึ้งที่เลี้ยงตายจากการฉีดสารเคมีกำจัดยุงของเทศบาลจังหวัดเชียงใหม่ (สิริวัฒน์, 2526)

จากการสำรวจปัญหาความเป็นพิษของสารเคมีกำจัดศัตรูพืชที่มีต่อการเลี้ยงผึ้งในประเทศไทย พบว่ากว่า 90 เปอร์เซ็นต์ ผึ้งพันธุ์จะได้รับอันตรายจากสารเคมีทางการเกษตรในขณะดอกไม้

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บาน (blooming period) โดยผึ้งพันธุ์จะบินไปสัมผัสกับสารพิษที่ตกค้างหลงเหลืออยู่บนดอกไม้ ตลอดจนบนดอกวัชพืช เช่น ดอกไมยราพ บริเวณใต้ต้นผลไม้ที่ทำการฉีดสารเคมีกำจัดศัตรูพืช ผึ้งพันธุ์อาจเก็บละอองเกสรที่มีอนุภาคสารพิษติดไปด้วยหรือดูดกลืนน้ำหรือน้ำหวานจากพืชที่มีสารพิษเจือปนอยู่ และดูดมูลหวาน (honey dew) จากเพลี้ยแป้งและเพลี้ยหอยที่ได้รับพิษจากสารเคมีประเภทดูดซึม (systemic insecticides) (สิริวัฒน์และคณะ, 2529)

สารเคมีกลุ่มออร์กาโนฟอสเฟตมีความเป็นอันตรายต่อผึ้ง เมื่อผึ้งพันธุ์ได้รับสารเคมีกลุ่มนี้เข้าไปอาจจะโดยการสัมผัส (contact) ซึ่งสารพิษจะถูกดูดซึม (absorbed) ผ่านเข้าทางผนังลำตัว ผึ้งอาจสัมผัสสารกำจัดแมลงโดยตรงขณะที่บินไปหาน้ำหวานในช่วงที่เกษตรกรกำลังพ่นสารเคมี หรือได้รับจากเกสรดอกไม้ที่ได้รับการฉีดพ่นสาร หรืออาจจะได้รับสารกำจัดแมลงโดยการกินสารพิษเข้าไป เมื่อผึ้งกินละอองเกสรหรือน้ำหวานที่มีสารพิษเจือปนอยู่ สารพิษนี้จะไปมีผลต่อระบบประสาท จะไปยับยั้งหรือลดการทำงานของเอนไซม์อะเซตทิลโคลินเอสเทอเรส ทำให้ระบบการทำงานของผึ้งผิดปกติ ซึ่งอาจจะเกิดความเหนื่อยล้าและเกิดอาการชักกระตุกอย่างรุนแรง และตายในที่สุด

การป้องกันอันตรายจากสารเคมีที่มีพิษต่อผึ้ง (สิริวัฒน์และคณะ, 2529)

1. ให้ความรู้แก่เกษตรกรและผู้เลี้ยงผึ้งให้ทราบปัญหาของความเป็นพิษของสารเคมีที่มีพิษต่อผึ้ง สาเหตุและการป้องกันอันตรายอันเกิดจากพิษของสารเคมีทางการเกษตรที่มีต่อผึ้ง ส่งเสริมให้เกิดความร่วมมือในการป้องกันอันตรายที่จะเกิดต่อผึ้งเนื่องจากการใช้สารเคมีระหว่างเกษตรกร ผู้ใช้สารเคมี และผู้เลี้ยงผึ้ง
2. ส่งเสริมให้ใช้สารที่ไม่มีพิษต่อผึ้งในขณะดอกไม้บานและงดใช้สารที่มีพิษสูงต่อผึ้ง
3. ควรทำการฉีดพ่นสารเคมีในตอนเย็นพลบต่ำหรือเช้าตรู่ ไม่ควรฉีดพ่นสารเคมีขณะที่ผึ้งออกหาอาหาร
4. ใช้สูตรที่เหมาะสมเพื่อให้มีอันตรายน้อยที่สุดต่อผึ้ง
5. เลือกสถานที่เลี้ยงผึ้งให้ห่างจากบริเวณที่มีการฉีดสารเคมี
6. ขนย้ายรังทันทีเมื่อมีการฉีดพ่นสารบริเวณใกล้เคียง ถ้าย้ายไม่ทันให้ปิดหน้ารังผึ้งและคลุมรังผึ้งด้วยผ้ากระสอบเปียกชื้นในขณะที่มีการฉีดพ่นสารเคมี 1-2 ชั่วโมง ระวังให้ผ้าเปียกชื้นตลอดเวลา
7. ทำการกำจัดวัชพืชที่กำลังออกดอกใต้ต้นไม้หรือระหว่างต้นผลไม้ก่อนฉีดสารเคมี
8. ควรมีการตรวจดูรังผึ้งสม่ำเสมอ ถ้าพบผึ้งตายน้อยกว่า 100 ตัวต่อวัน ถือว่าเป็นการตายตามปกติ ถ้าพบตายมากกว่านี้ให้รีบปฏิบัติตามข้อ 5-6 ทันที การที่ผึ้งตายด้วยสารเคมีในระดับ 200-

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

400 ตัว แสดงว่าผึ้งตายในระดับต่ำ ถ้าตายประมาณ 500-900 ตัว แสดงว่าภายในระดับปานกลาง และตายมากกว่า 1,000 ตัวขึ้นไป แสดงว่าตายในระดับสูง

วิธีการเลี้ยงผึ้ง(ทัศนีย์ และคณะ, 2544)

อุปกรณ์ที่ใช้ในการเลี้ยงผึ้ง

1. ชุดหีบเลี้ยงผึ้ง (Hive bodies)

- ตัวรังมาตรฐาน เป็นหีบรูปสี่เหลี่ยมผืนผ้า ทำด้วยไม้ สัดส่วนมาตรฐานมีขนาด 16 ¼ x 20 x 13 ½ นิ้ว ความหนาของเนื้อไม้ ¾ นิ้ว
- ฐานรัง เป็นส่วนที่รับรังผึ้งทั้งหมดมีขนาด 16 ½ x 22 นิ้ว หนา ¾ นิ้ว
- ฝาปิดรังผึ้งมีขนาด 20 ¼ x 16 ½ นิ้ว ทำจากไม้อัด ที่ฝาด้านนอกปิดทับด้วยสังกะสี เพื่อป้องกันเนื้อไม้ ไม่ให้ผุและช่วยสะท้อนรังสีความร้อนจากดวงอาทิตย์

นอกจากนี้ยังมีหีบเลี้ยงที่เรียกว่า หีบเล็ก หรือนิวคลีอาย (nuclei) บางคนเรียกว่า นุค (nuc) หรือหีบนุค บางคนเรียกว่า nucleus หรือหีบนิวเคลียส มีความยาวเท่ากับหีบมาตรฐานแต่ลดความกว้างลงมาจนใส่คอนได้ 3-5 คอน

2. คอน (Frames) ประกอบด้วยไม้ 4 ชิ้น คือ คานบน 1 ชั้น มีความยาว 19 นิ้ว เว้นปลายด้านล่าง5/8 นิ้ว ไว้พาดในตัวรัง ไม้ประกบข้าง 2 ชิ้น มีความสูง 9 1/8 นิ้ว และคานล่าง 1 ชิ้น มีความยาว 17 5/8 นิ้ว ภายในคอนขึงลวดขนาดเล็กไว้ 4 เส้น สำหรับยึดแผ่นรังเทียม

3. แผ่นรังเทียม (Foundation sheets) เป็นแผ่นขี้ผึ้งที่ขัดดอกลาย ขนาดมาตรฐานของหลอดรังผึ้ง เพื่อให้ผึ้งสร้างรวงผึ้งขึ้นในรัง

4. ขาตั้งหีบเลี้ยงผึ้ง (hive stand) ทำด้วยไม้หรือเหล็ก ต้องมีความแข็งแรงสามารถรับน้ำหนักหีบเลี้ยงผึ้งได้ สูงจากพื้นดินประมาณ 20 เซนติเมตร เพื่อป้องกันความชื้นจากดิน และทาน้ำมันเครื่องเก่ารอบขาตั้ง ป้องกันไม่ให้มดไปรบกวนผึ้งในรัง

5. เครื่องพ่นควัน (smokers) ใช้สำหรับรมควันเพื่อทำให้ผึ้งสงบไม่แตกตื่น สามารถปฏิบัติงานกับผึ้งได้โดยสะดวกและไม่เป็นอันตรายจากการถูกผึ้งต่อย ตัวกระป๋องทำจากโลหะน้ำหนักเบา รูปทรงกระบอก ฝาครอบเป็นรูปกรวยปิดเปิดได้ ที่ปลายกรวยมีรูพ่นควันออกมาได้ ตัวกระป๋องด้านล่างมีท่ออากาศติดกับหม้อลม หม้อลมประกอบด้วยไม้ 2 แผ่นบาง ๆ หม้อลมทำด้วยผ้าหนังหรือยาง เมื่อบีบหม้อลมอากาศจะพุ่งเข้าไปในกระป๋อง ทำให้เชื้อเพลิงติดเป็นควัน เชื้อเพลิงที่ใช้ส่วนมากเป็นหญ้าแห้ง

6. เหล็กงัดรัง (Hivetool) เป็นแผ่นเหล็กแบน ๆ ยาวประมาณ 6-8 นิ้ว กว้างประมาณ 1 ½ นิ้ว ทำด้วยเหล็กเหนียวอย่างดี มีความแข็งแรงเป็นพิเศษ ใช้สำหรับงัดฝารัง ขูดยางเหนียวที่ติดตาม

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ขอบรัง และคอน เหล็กงัดรังจะมีตรงกลางคอดให้เหมาะกับอุ้งมือ ปลายอีกด้านจะลดลงประมาณ ¼ นิ้ว ใช้งัดแยกคอนที่ติดกันให้หลุด ทำให้ยกคอนผึ้งตรวจได้ง่าย

7. หมวกตาข่าย (Bee Veil) ทำด้วยผ้ามุ้งหรือผ้าไนล่อน ใช้สวมกับหมวกปีกกว้าง เพื่อคลุมหน้าป้องกันผึ้งเข้าทำร้ายบริเวณหน้า

8. แปรงปัดผึ้ง มีขนแปรงยาวประมาณ 2.5 – 3 นิ้ว และอ่อนนุ่ม ใช้ปัดตัวผึ้งให้หลุดจากคอนหรือขอบตัวรัง

การให้น้ำหวานกับผึ้ง

จะให้กับผึ้งโดยวิธีการให้ในกล่องไม้ภายในรังผึ้ง โดยทำกล่องไม้อัดสี่เหลี่ยม มีบ่ายาวเท่าความยาวของคอน เวลาวางตามแนวคอนแล้วจะเป็นรูปกล่องแบน ๆ ลึกลงไปตามความลึกของรังกล่อง ๆ หนึ่งจะบรรจุน้ำหวานประมาณ 1 ลิตรครึ่ง รอยเชื่อมภายในกล่องใช้ไขผึ้งหรือพาราฟินเชื่อมกันซึม กล่องให้น้ำหวานชนิดนี้เราเรียกว่า อินเนอร์ฟีดเดอร์ (Inner feeder) การใส่น้ำหวานในกล่องชนิดนี้ควรให้ปริมาณพอดี ๆ กับปริมาณที่ผึ้งจะใช้หมดภายใน 2-3 วัน ถ้ามากกว่านั้นน้ำหวานจะบูด สำหรับน้ำหวานใช้น้ำตาลทรายผสมน้ำในอัตราส่วน 1:1 นอกจากนี้เวลาใส่น้ำหวานเข้าไปแล้ว ควรหาวัสดุที่ลอยได้ใส่ลงไปให้ผึ้งเกาะไม่เช่นนั้นผึ้งอาจจะจมน้ำหวานตายได้ วัสดุที่ใส่เข้าไปอาจเป็นใบไม้แห้ง ๆ หรือตะแกรงลวดทำเป็นรูปตัววี วางลงไปให้ผึ้งเกาะ การเปลี่ยนน้ำหวานจะเปลี่ยน 4 วันต่อครั้ง

สถานที่เลี้ยงผึ้ง

ต้องหาสถานที่ตั้งที่ปลอดภัยสำหรับผึ้ง รวมทั้งมีความร่มรื่น มีแหล่งอาหารและน้ำที่ห่างไกลจากแหล่งที่ใช้สารฆ่าแมลง หรือไม่มีการใช้สารฆ่าแมลง

การปฏิบัติกับผึ้ง

- ความถี่ในการตรวจผึ้ง ไม่ควรตรวจผึ้งบ่อยเกินไปจะเป็นการรบกวนและกระทบกระเทือนต่อความเป็นอยู่ของผึ้ง ช่วงระยะเวลาในการตรวจประมาณ 7-10 วันต่อครั้ง จะตรวจในเวลาเช้าหรือเย็น ทั้งนี้ในวันที่อากาศปลอดโปร่งผึ้งจะไม่ค่อยดุ ส่วนในวันที่มีอากาศร้อนอบอ้าวจะมีฝนผึ้งจะดุ
- วิธีการตรวจผึ้ง ป้องกันอันตรายโดยสวมหมวกตาข่าย แล้วยืนอยู่ด้านข้างของรัง จากนั้นจึงเปิดฝารังแล้วพ่นควันด้วยเครื่องพ่นควัน เมื่อผึ้งสงบ ยกคอนขึ้นมาตรวจทีละคอน ถ้าคอนใดแน่นติดกันหรือติดกับตัวรัง ต้องใช้เหล็กงัดรังช่วย คอนรวงผึ้งแต่ละคอนจะพบไข่ ตัวอ่อน ดักแด้ เกสร น้ำหวาน และนางพญา ดูว่ามีแมลงศัตรูผึ้งหรือเปล่า ถ้ามีก็ทำการป้องกันกำจัด ถ้าพบหลอดนางพญาต้องทำลาย ควรตรวจผึ้งด้วยความระมัดระวังไม่ให้ผึ้งตื่นตกใจ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

- การจัดเรียงคอน เมื่อตรวจผึ้งเสร็จต้องเอาคอนที่มีไข่ไว้ตรงกลาง แล้วขนาบด้วยคอนตัวอ่อน คอนดักแด้ คอนเกสร และคอนน้ำหวานตามลำดับ

ศัตรูผึ้งและการป้องกันกำจัด

1. ไรตัวเบียนผึ้ง

1.1 ไรวาร์รัว (Varroa jacobsoni oudermans)

1.2 ไรทรอปิเลแลปส์ (Tropilaelaps clareae Delfinado and Baker)

การป้องกันกำจัด

โดยการใช้สารเคมี มีการนำสารกำจัดไร (acaricide) มาใช้ในการป้องกันกำจัดไรศัตรูผึ้ง ข้อควรคำนึงในการเลือกใช้ชนิดของสารเคมีดังนี้

- สารชนิดนั้นต้องมีความเป็นพิษต่ำหรือไม่เป็นอันตรายต่อผึ้ง
- มีความเป็นพิษสูงในการฆ่าไร
- ไม่เป็นพิษต่อมนุษย์
- ง่ายต่อการนำมาใช้ และต้องมีการแพร่กระจายได้ภายในรังผึ้ง
- ต้องไม่เป็นพิษตกค้างในไขผึ้งและรังผึ้ง

2. แมลง (Insects)

แมลงที่เป็นศัตรูผึ้งที่สำคัญ ได้แก่

2.1 ต่อ (wasps)

ต่อในสกุล vespa จัดเป็นศัตรูที่สำคัญอีกชนิดหนึ่งสำหรับการเลี้ยงผึ้ง ที่พบมากมีอยู่ 2 ชนิด คือ ต่อหัวเสือ (*Vespa affinis*) และต่อหลุม (*V. tropica*) ตัวต่อจะโฉบจับผึ้งบริเวณหน้ารังผึ้งไปเป็นอาหารหรืออาจเข้าทำลายภายในรังผึ้งถ้าผึ้งรังนั้นอ่อนแอ

การป้องกันกำจัด

- เลือกที่ตั้งรังผึ้งบริเวณที่ไม่มีต่อชุกชุม
- ใช้สวิงจับตัวต่อที่บินมาในบริเวณที่ตั้งรังผึ้ง
- ทำลายรังต่อ บริเวณใกล้เคียงกับที่ตั้งรังผึ้ง

1.2 ผีเสื้อหนอนกินไขผึ้ง (wax moth)

ตัวหนอนของผีเสื้อชนิดนี้จะเข้าทำลายคอนผึ้งในโรงเก็บ หรือในรังผึ้งที่มีประชากรของผึ้งงานที่อ่อนแอ ผีเสื้อหนอนกินไขผึ้งที่สำคัญมีอยู่ 2 ชนิด คือ

ผีเสื้อหนอนกินไขผึ้งขนาดใหญ่ (Greater wax moth, *Galleria mellonella*)

ผีเสื้อหนอนกินไขผึ้งขนาดเล็ก (Lesser wax moth, *Achroia grisella*)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

การป้องกันกำจัด

- ในรังผึ้งที่พบการเข้าทำลายของหนอนกินไขผึ้ง ควรทำความสะอาดฐานรัง หรือเปลี่ยนรังใหม่ รวมทั้งเปลี่ยนคอนผึ้งที่หนอนเข้าทำลายด้วย

- ในรังเก็บ อาจทำการรมคอนผึ้งที่เก็บไว้ด้วยสารเคมี เช่น paradichlorobenzene methylbromide, ethylene dibromide, acetic acid และ phosphine

2.3 มด (Ants)

มดทุกชนิดเป็นศัตรูกับผึ้งทั้งนั้น แต่มดแดง *(Decophylla smaragdina)* ที่ชอบอาศัยอยู่ตามต้นมะม่วง มักทำความเสียหายให้กับผึ้งมากกว่ามดชนิดอื่น ๆ ด้วยการยกพวกเข้ารุมทำร้ายผึ้ง มดดำ (*Monomorium* spp.) มดคันไฟ มดตะนอย แม้จะไม่ทำความเสียหายให้มากนัก แต่ก็สร้างความรำคาญให้แก่ผู้เลี้ยงผึ้งมากพอสมควร เพราะมดเหล่านั้นนอกจากเข้ากัดทำลายผึ้งตัวเต็มวัยแล้วยังเข้าแย่ง และกัดกินตัวอ่อนของผึ้งด้วย

การป้องกันกำจัด

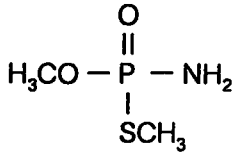
- ใช้ขาตั้งวางรังผึ้งให้สูงพื้นพื้นดินและหญ้า บริเวณขาทาด้วยน้ำมันเครื่องหรือรองขาตั้งด้วยถ้วยใส่น้ำ

- ทำความสะอาดบริเวณที่ตั้งหีบเลี้ยงผึ้ง

- ระมัดระวังไม่ให้น้ำหวานหกเรี่ยราดในขณะให้อาหารผึ้ง

เมทธามิโดฟอส (methamidophos)

เมทธามิโดฟอส เป็นสารกำจัดแมลงกลุ่มออร์กาโนฟอสเฟตประเภทดูดซึม ออกฤทธิ์ทางสัมผัสตายและกินตาย มีชื่อทางเคมีว่า O,S – dimethyl phosphoramidothioate มีสูตรโครงสร้างดังนี้



เมทธามิโดฟอสเป็นสารที่ออกฤทธิ์ยับยั้งการทำงานของเอนไซม์อะเซตทิลโคลินเอสเทอเรสมีค่า LD_{50} ทางปากต่อหนูขาว 19-21 มก./กก. ต่อกระต่ายเท่ากับ 118 มก./กก. ความดันไอ 2.3×10^{-5}

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

mbar ที่ 20 °C สมบัติทางเคมีเป็นผลึกไม่มีสี มีจุดหลอมเหลวที่อุณหภูมิ 46.1 °C เป็นสารที่ใช้กำจัดแมลงศัตรูพืชได้อย่างกว้างขวาง เช่น หนอนใยผัก หนอนคืบ หนอนเจาะสมอชนิดต่าง ๆ หนอนหลอดหอม หนอนกัดกินใบ ผล ดอก และยอด เพลี้ยอ่อน เพลี้ยไฟ ไรแดง และแมลงหวี่ขาว โดยใช้ได้กับพืชหลายชนิด คือ ฝ้าย งา ถั่วเหลือง ถั่วเขียว ยาสูบ พืชตระกูลกะหล่ำ หอม มะเขือ มะเขือเทศ เงาะ ลิ้นจี่ ส้มโอ องุ่น และไม้ผลอื่น ๆ ไม้ดอกไม้ประดับ สูตรผสมที่ใช้มี 2 ชนิด คือ 60% SC และ 60% LC วิธีใช้และอัตราการใช้ในการกำจัดแมลงโดยทั่วไป ใช้ในอัตรา 20-40 cc. ผสมกับน้ำ 20 ลิตร (ประมาณ 2-4 ช้อนแกงต่อน้ำ 1 ปีบ) พ่นให้ทั่วต้นพืชเมื่อพบแมลงระบาด ถ้าจำเป็นต้องพ่นซ้ำควรพ่นห่าง 5-7 วันต่อครั้ง ควรเก็บให้ห่างจากเด็ก อาหาร น้ำดื่ม สัตว์เลี้ยง และเปลวไฟ (มารศรี, 2535)

คำเตือน (สมาคมคนไทย-ผู้ประกอบธุรกิจสารเคมีเกษตร, 2535)

เนื่องจากเมทธามิโดฟอส เป็นวัตถุมีพิษที่มีอันตรายสูงมาก สามารถซึมผ่านผิวหนังเข้าสู่ร่างกายได้อย่างรวดเร็ว เพื่อป้องกันมิให้เป็นพิษต่อผู้ใช้และสิ่งมีชีวิตอื่น ผู้ใช้ต้องปฏิบัติดังนี้

1. ขณะพ่นต้องอยู่เหนือลมเสมอ
2. อย่าหายใจเอาละอองวัตถุมีพิษเข้าไป
3. ล้างมือและหน้าให้สะอาดด้วยน้ำและสบู่ก่อนกินอาหาร ดื่มน้ำหรือสูบบุหรี่
4. หลังจากพ่นวัตถุมีพิษเสร็จแล้วต้องอาบน้ำเปลี่ยนเสื้อผ้า และซักชุดที่สวมทำงานให้สะอาด
5. ภาชนะบรรจุเมื่อใช้แล้วต้องทำลายแล้วฝังดินเสีย ห้ามเผาไฟ
6. ห้ามล้างภาชนะบรรจุอุปกรณ์ เครื่องพ่นลงในแม่น้ำลำคลอง
7. หลังจากใช้วัตถุมีพิษครั้งสุดท้ายแล้ว 21 วัน จึงเก็บพืชมากินได้

อาการพิษ

1. การได้รับสารพิษทางปาก ทางผิวหนัง และโดยการสูดดม จะมีอาการมึนงง ปวดศีรษะอ่อนเพลีย กระวนกระวาย มีอาการสั่นที่ปลายลิ้นและเปลือกตา ม่านตาหรี่ คลื่นไส้ อาเจียน น้ำตาและน้ำลายไหล เหงื่อออกมาก ปวดท้องเกร็ง ชีพจรเต้นช้า กล้ามเนื้อเกร็ง

2. ในรายที่มีอาการรุนแรงจะท้องเสีย ตาหรี่ หายใจลำบาก ปอดบวม ขาดออกซิเจน ตัวเขียวคล้ำ (cyanosis) กล้ามเนื้อหูรูดไม่ทำงาน ชักและตายเนื่องจากหัวใจไม่ทำงาน

3. ในร่างกายที่มีพิษสะสม ระบบประสาทจะถูกทำลาย และกล้ามเนื้ออ่อนเพลีย

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

การแก้พิษเบื้องต้น

1. รีบนำผู้ป่วยออกจากบริเวณที่มีวัตถุมีพิษนั้น ให้พักผ่อนในที่ที่มีอากาศถ่ายเทได้สะดวก หากหายใจขัดให้ใช้เครื่องช่วยหายใจ

2. หากสารถูกผิวหนังให้รีบล้างออกด้วยน้ำและสบู่จำนวนมาก ๆ ถ้าเข้าตาต้องล้างน้ำจำนวนมาก ๆ หากเปื้อนเสื้อผ้าต้องรีบเปลี่ยนทันที

3. หากเข้าปากให้รีบทำให้อาเจียน โดยการใช้มือล้วงคอ หรือให้ดื่มน้ำเกลืออุ่น (เกลือ 1 ช้อนโต๊ะต่อน้ำอุ่น 1 แก้ว) หรือหากยังไม่อาเจียน ให้รับประทานยาไอปีแคค (syrup of Ipecac) 1-2ช้อนโต๊ะ และดื่มน้ำ 1 แก้ว หลังจากอาเจียนแล้วลดอาการดูดซึมของสารพิษในทางเดินอาหาร โดยให้รับประทานผงถ่าน(แอคติเวเต็ดชาร์โคล)2 ช้อนโต๊ะ ผสมน้ำ ¼ แก้ว

คำแนะนำสำหรับแพทย์

1. ให้ atropine sulphate เป็น antidose โดยให้ 2 mg และให้ซ้ำทุก 3-8 นาที จนปรากฏอาการ atropinization (หน้าแดง ปากแห้ง ม่านตาขยาย ชีพจรเต้นเร็ว) อาจให้ได้ถึง 20 mg ใน 2 ชั่วโมง ในบางรายหากหยุดให้อาจตาย เพราะอาการปอดบวมและระบบหายใจไม่ทำงาน

2. ให้ cholinesterase activator เช่น pralidoxime (protopam, pyrindine-2-aldoxime methochloride, 2-PAM) 1-2 gm. สำหรับผู้ใหญ่ (50 mg/kg) ตามปกติจะแบ่งครึ่งหนึ่งให้ single IM หรือ IV injection อีกครึ่งหนึ่งให้ IV infusion กับ glucose หรือ/และน้ำเกลือ ในรายที่รุนแรงจะให้ซ้ำใน 1-2 ชั่วโมง และถ้าจำเป็นจะให้อีกในช่วง 10-12 ชั่วโมง แต่ไม่เกิน 24 หรือ 48 ชั่วโมง การให้ pralidoxime ควรฉีดอย่างช้า ๆ ถ้าการหายใจถูกกดระหว่างหรือหลังการฉีด ควรใช้เครื่องช่วยหายใจ

3. หากมีน้ำมูกและเสมหะให้ใช้เครื่องช่วยดูดน้ำมูกและเสมหะ

4. ห้ามใช้ยาพวก morphine, theopyline, aminophylline, barbiturates, phenothiazines และ respiratory depressant อื่น ๆ ไม่ควรให้น้ำเกลือเข้าทางหลอดเลือดมากเกินไป เนื่องจากผู้ป่วยจากอาการพิษของสารออร์กาโนฟอสเฟตมี secretion มากและมีแนวโน้มที่จะเกิดอาการปอดบวมน้ำ (pulmonary edema) ได้ง่าย

ความเป็นพิษของสารกำจัดศัตรูพืชกลุ่มออร์กาโนฟอสเฟต

สารกำจัดศัตรูพืชทางการเกษตรกลุ่มที่มีความเป็นพิษเฉียบพลันมากที่สุด คือ ออร์กาโนฟอสเฟต (organophosphate) ซึ่งเป็นสารกำจัดแมลงที่ส่วนมากมีความเป็นพิษต่อสัตว์แบบเฉียบพลัน (acute toxicity) คือ ได้รับสารพิษในระยะเวลาสั้นภายใน 24 ชั่วโมงหรือน้อยกว่า 24 ชั่วโมง โดยการได้รับเพียงครั้งเดียวหรือหลายครั้งก็ได้ แล้วแสดงอาการเป็นพิษให้เห็นภายในเวลา 2-3 วันต่อมา และมีหลายรายที่แสดงอาการภายใน 2 สัปดาห์ การได้รับพิษโดยเฉียบพลันนั้นเกิดจากการดูดซึม

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารพิษเข้าสู่ร่างกายอย่างรวดเร็ว แล้วก็แสดงอาการพิษออกมาทันที แต่บางกรณีเมื่อได้รับสารพิษเฉียบพลันแล้ว อาจแสดงอาการออกมาอย่างช้า ๆ

สารกลุ่มนี้มีความเป็นพิษอย่างรุนแรง เนื่องจากมีสมบัติแสดงความเป็นพิษต่อระบบประสาท (nervous system toxicant) โดยออร์กาโนฟอสเฟต เมื่อถูกดูดซึมเข้าสู่ร่างกายแล้วจะเคลื่อนย้ายไปจับกับ acetylecholinesterase และยับยั้งการทำงานของ acetylcholinesterase ทำให้สารสื่อสัญญาณประสาท (neurotransmitter) ชนิดที่เรียกว่า acetylcholine ไม่ถูก hydrolyze และเกิดการสะสมของ acetylcholine ทำให้ระบบประสาทส่วนต่าง ๆ ในร่างกายทำงานผิดปกติ (วิภา, 2541)

โครงสร้างของเอนไซม์โคลินเอสเทอเรส

การค้นพบโครงสร้างทางเคมีของเอนไซม์นี้มีมานานหลายปี ด้วยความก้าวหน้าในการศึกษาด้านชีวโมเลกุล และชีวเคมี ทำให้ทราบว่าโดยทั่วไปเอนไซม์โคลินเอสเทอเรส แบ่งเป็น 2 ชนิดใหญ่ ๆ คือ ชนิดที่ 1 acetylcholinesterase (AChE) มีหน้าที่สำคัญในกระบวนการสื่อสัญญาณประสาทบริเวณปลายประสาทที่เรียกว่า cholinergic synapse ชนิดที่ 2 butyrylcholinesterase (BChE) ซึ่งรู้จักในชื่ออื่นอีกว่า serum cholinesterase, pseudocholinesterase หรือ nonspecific cholinesterase

ทั้งเอนไซม์ AChE และ BChE พบในสัตว์มีกระดูกสันหลังโดยเฉพาะ AChE สามารถสกัดออกมาได้จากสัตว์หลายชนิดทั้งสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม นก ปลา สัตว์เลื้อยคลาน และแมลง เอนไซม์ทั้งสองชนิดสามารถ hydrolyze สาร acetylcholine ให้แตกตัวเป็น acetic acid และ choline และถูกยับยั้งการทำงานได้โดยสารออร์กาโนฟอสเฟตและคาร์บาเมต และโดยทั่วไปคำว่า โคลินเอสเทอเรส (cholinesterase, ChE) มีความหมายรวมทั้ง AChE และ BChE

ขนาดของน้ำหนักโมเลกุล (molecular weight) ของ AChE และ BChE) อยู่ประมาณ 50,000-500,000 และพบว่ามีรูปร่างแบบที่เรียกว่า globular และ asymmetric ซึ่งประกอบด้วย polymer ของ catalytic subunit โดยทั่วไปมีขนาดตั้งแต่ 1 subunit ทำให้น้ำหนักโมเลกุลของเอนไซม์มีขนาดแตกต่างตามจำนวนของ subunit เนื่องจากบาง subunit ของเอนไซม์มีส่วนต่อกับ collagen หรือ carbohydrates หรือ glycolipids

การเรียงลำดับของหน่วย amino acid ที่เรียกว่า amino acid sequence ของเอนไซม์โคลินเอสเทอเรสได้ศึกษารู้อย่างชัดเจนในสัตว์ 3 species คือ BChE ในคน AChE ของปลา torpedo (*Torpido califomica*) AChE ของตัวอ่อนวัวถึง 85% แล้ว ในสัตว์หลายชนิดพบว่า amino acid sequence ของโคลินเอสเทอเรส มีความเหมือนกันมาก (highly conserved) โดยเฉพาะ sequence ที่อยู่รอบ ๆ serine จะเหมือนกัน (Identical) โดย serine เป็นหน่วยหนึ่งของ amino acid ที่มีหน่วย

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

อื่น ๆ รวมกันประกอบขึ้นเป็นโปรตีนของเอนไซม์และ serine เป็นตำแหน่ง active site ที่จะถูกเข้าทำลายโดยสารชนิดอื่น

เอนไซม์โคลินเอสเทอเรส พบในเนื้อเยื่อส่วนต่าง ๆ ของสัตว์ รวมทั้งพบในอวัยวะที่ทำให้เกิดไฟฟ้าของปลา เม็ดเลือดแดงของสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม เนื้อเยื่อสมองของสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนมและแมลง (วิภา, 2541)

โคลินเอสเทอเรสมีบทบาทในกระบวนการสื่อสัญญาณประสาทชนิด cholinergic transmission ณ บริเวณที่เรียกว่า synapse หรือ cholinergic juction ซึ่งเป็นบริเวณถ่ายทอดสัญญาณจากเซลล์ประสาทหนึ่งไปสู่อีกเซลล์หนึ่ง

เริ่มต้นจากสัญญาณประสาทถูกถ่ายทอดส่งมาถึงเซลล์ประสาทชนิด parasympathetic บริเวณ nerve ending ซึ่งจะมีสาร acetylcholine (ACh) ซึ่งเป็นสารเคมีที่มีหน้าที่สื่อสัญญาณประสาทสะสมอยู่ในถุง (vesicles) acetylcholine จะถูกหลั่งมาจากบริเวณ presynapse ภายในเวลา 2-3 msec สู่บริเวณ synapse ของเซลล์ประสาท สาร ACh จะเข้าไปจับกับ ACh receptor ที่อยู่ใน postsynaptic membrane ของเซลล์ประสาทตัวถัดไป จะมีผลให้ ion channel เปิด ทำให้การไหลของประจุบวกเข้าสู่เซลล์และเกิด depolarization ที่บริเวณ membrane เซลล์ประสาทตัวที่รับ ACh มาแล้วก็จะกระตุ้นให้กล้ามเนื้อบริเวณนั้นทำงาน โดยทั่วไปเอนไซม์โคลินเอสเทอเรสมีหน้าที่ควบคุมการทำงานของขบวนการสื่อสัญญาณประสาทด้วยการลดความเข้มข้นของ ACh ที่บริเวณรอยต่อของเซลล์ประสาท โดยการเร่งปฏิกิริยา hydrolysis ของ ACh เกิดเป็น Choline และ acetic acid แล้วการถ่ายทอดสัญญาณประสาทจะหยุดและการทำงานของกล้ามเนื้อบริเวณนั้นสิ้นสุดลง

เมื่อใดที่เอนไซม์โคลินเอสเทอเรสถูกเกาะโดยสารพิษออร์กาโนฟอสเฟตจะทำให้กระบวนการไฮโดรไลส์ ACh ถูกยับยั้ง ทำให้ ACh สะสมมากขึ้น ๆ มีผลทำให้มีการกระตุ้นเซลล์ประสาท หรือกล้ามเนื้อบริเวณนั้นทำงานอย่างต่อเนื่อง ทำให้เกิดความเหนื่อยล้า อาการชักต่อเนื่องอย่างรุนแรง เป็นอัมพาต และตายในที่สุด (วิภา, 2541)

กลไกการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์โคลินเอสเทอเรสโดยสารกลุ่มออร์กาโนฟอสเฟต

สารออร์กาโนฟอสเฟตถูกค้นพบครั้งแรกในประเทศเยอรมัน โดย Gerhard Schrader และผู้ร่วมงาน ระหว่างปี ค.ศ. 1930 ถึง 1940 และใช้เป็นสารกำจัดแมลง เมื่อปลายสงครามโลกครั้งที่ 2 และต่อมามีการใช้กันอย่างแพร่หลายในปัจจุบัน การยับยั้งการทำงานของเอมไซม์โคลินเอสเทอเรสโดยสารออร์กาโนฟอสเฟต มีการอธิบายถึงกลไกการยับยั้งไว้มากมาย แม้ว่าจะไม่ชัดเจน แต่มีหลักฐานที่เชื่อถือได้คือสารออร์กาโนฟอสเฟต สามารถยับยั้งการทำงานของเอนไซม์โดยทำปฏิกิริยากับ serine ที่บริเวณ catalytic center แล้วทำให้เกิดสารที่เรียกว่า phosphoserine

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ความรุนแรงของออร์กาโนฟอสเฟตที่จะยับยั้งการทำงานของเอนไซม์โคลินเอสเทอเรสขึ้นอยู่กับการเกิดปฏิกิริยา ซึ่งเรียกว่า phosphorylation และเรียกเอนไซม์ที่เปลี่ยนรูปไปแล้วนี้ว่า phosphorylated enzyme เมื่อโคลินเอสเทอเรสไม่ทำงานแล้ว สาร acetylcholine ก็จะไม่ถูก hydrolyze

สภาวะที่ไม่ทำงานของโคลินเอสเทอเรสเมื่อถูก phosphorylated ไปนั้นจะเกิดเพียงชั่วขณะเท่านั้น แล้วต่อมา phosphorylated enzyme จะถูก hydrolize ทำให้ได้โคลินเอสเทอเรสกลับคืนสู่สภาพพร้อมที่จะทำงานได้เหมือนเดิม การให้สาร pyridine-2-aldoxime methiodide (2-PAM) จะช่วยเร่งให้เอนไซม์นี้กลับคืนสู่สภาพปกติเร็วขึ้น โดยดึงเอากลุ่ม phosphate ออกไป

ในบางสถานการณ์เอนไซม์โคลินเอสเทอเรสถูกเปลี่ยนสภาพให้ทำงานไม่ได้อย่างถาวรโดยออร์กาโนฟอสเฟต ชนิดที่มีองค์ประกอบทางเคมีพวก alkyl group เปลี่ยนรูปจาก O,O-dialkylphosphoserine

สภาวะเช่นนี้เรียกว่าเกิด aging reaction คือโคลินเอสเทอเรสถูกทำให้มีสภาพ "aged" หรือการถูกยับยั้งไม่ให้ทำงานอย่างถาวร ส่วนการเกิด "non-aged" เป็นภาวะที่เอนไซม์ถูก phosphorylated ไปแล้ว สามารถกลับคืนสู่สภาพเดิมได้ตามที่ได้กล่าวข้างต้น โดยเกิดการปฏิกิริยา hydrolysis แล้วกลับคืนเอง หรือช่วยเร่งด้วย 2-PAM

ตัวอย่างของออร์กาโนฟอสเฟต ชนิดที่มี alkylgroup เป็น O,O-dimethylgroup เช่น fenitrothion, azinphos methyl และ malathion เป็นต้น และชนิดที่เป็น O,O-diethylgroup เช่น diazinon และ chlorpyrifos เป็นต้น ซึ่งสารทั้ง 2 ชนิดนี้จะได้ oxon เป็น metabolite ที่ทำปฏิกิริยากับโคลินเอสเทอเรสแล้วได้ O,O-dimethyl, O,O-diethyl, O-methyl และ O-ethyl phosphoserine moiety ในเอนไซม์ด้วย (วิภา, 2541)

การวิเคราะห์สารออร์กาโนฟอสเฟต

สารพิษกลุ่มออร์กาโนฟอสเฟต (organophosphate) เป็นสารกำจัดแมลงที่ใช้กันอย่างกว้างขวาง สารพิษกลุ่มนี้ออกฤทธิ์โดยการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ อะเซตทิลโคลินเอสเทอเรส (Acetylcholinesterase หรือ AChE) ในระบบประสาทของแมลง จึงก่อให้เกิดพิษต่อแมลง รวมทั้งสามารถก่อให้เกิดพิษต่อระบบประสาทของคนและสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนมได้ จึงเรียกสารพิษในกลุ่มนี้ว่าเป็น AChE-inhibiting insecticides หรือสารกำจัดแมลงที่มีฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์อะเซตทิลโคลินเอสเทอเรส

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

จากสมบัติในการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ AChE ดังกล่าวจึงได้มีการพัฒนาวิธีวิเคราะห์สารพิษในกลุ่มออร์กาโนฟอสเฟตโดยการใช้เอนไซม์ AChE โดยอาศัยหลักการของ Ellman's test ตามปฏิกิริยาดังนี้

ปฏิกิริยาของ Ellman (Ellman's reaction)

$$\text{Acetylthiocholine} \xrightarrow{\text{AChE}} \text{Thiocholine} + \text{Acetate}$$

$$\text{Thiocholine} + \text{DTNB} \longrightarrow \text{Yellow color (สีเหลือง)}$$

ในสภาวะที่ปราศจากสารพิษ (ออร์กาโนฟอสเฟต) เอนไซม์ AChE จะทำปฏิกิริยากับสารอะเซตทิลไธโอโคลิน (Acetylthiocholine) ซึ่งเป็นสารตั้งต้น (substrate) ของปฏิกริยาได้เป็นสารไธโอโคลิน (Thiocholine) ซึ่งจะทำปฏิกิริยาต่อกับ Ellman's reagent [5,5'-dithio-bis-(2-nitrobenzoate) หรือ DTNB] ได้สารสีเหลืองเกิดขึ้นตามปฏิกิริยาข้างบน ส่วนในสภาวะที่มีสารพิษกลุ่มออร์กาโนฟอสเฟต สารพิษดังกล่าวจะไปยับยั้งเอนไซม์ AChE ซึ่งจะทำให้การเกิดสีเหลืองลดลง ดังนั้นอัตราการเกิดปฏิกิริยาหรือการเกิดสีเหลืองจึงแปรผกผันกับปริมาณของสารพิษในตัวอย่างนั้น หมายความว่า หากตัวอย่างมีปริมาณสารพิษมาก สีของปฏิกิริยาจะเจือจางกว่าในตัวอย่างที่มีสารพิษในปริมาณที่น้อยกว่า ค่าความเข้มของสีเหลืองสามารถตรวจวัดได้จากการวัดค่าดูดกลืนแสง (absorbance) ด้วยเครื่องสเปคโตรโฟโตมิเตอร์ (spectrophotometer) ที่ความยาวคลื่น (wavelength) 412 หรือ 415 นาโนเมตร (รุ่งฤดี, 2544)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

อุปกรณ์และวิธีการ

วัสดุอุปกรณ์

1. ผึ้งพันธุ์ (*Apis mellifera*)
2. ตู้อะลูมิเนียมเลี้ยงแมลงขนาด 30 x 30 x 110 เซนติเมตร
3. น้ำหวาน (glucose 25%)
4. กล่องพลาสติกใสขนาด 18 x 25.3 x 9.3 เซนติเมตร
5. เครื่อง spectrophotometer ยี่ห้อ Genesis II
6. เซลล์แก้วบรรจุสารตัวอย่าง (cuvett)
7. เครื่องปั่นน้ำยากระแสวน (vortex)
8. เครื่องปั่นสารให้เป็นเนื้อเดียวกัน (homogenizer)
9. pH meter
10. เครื่องชั่งชนิดละเอียด (4 ตำแหน่ง)
11. เครื่อง knockdown chamber รูปทรงกระบอกขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 12 นิ้ว ความยาว 24 นิ้ว
12. เครื่องแก้ว
    - หลอดทดลอง (test tube)
    - บีกเกอร์ ขนาด 10, 50, 100, 200 ml
    - Volumetric flask ขนาด 10, 50, 100, 500, 1000 ml
13. Automatic pipette ขนาด 50, 100, 200, 1000 ml

สารเคมี

1. สาร Methamidophos ชนิด Technical grade ความเข้มข้น 71%
   - เตรียมสารละลาย methamidophos ให้ได้ความเข้มข้นที่100, 150, 200, 250 และ300 ppm จาก methamidophos Technical grade ความเข้มข้น 71% ใช้ acetone เป็นตัวทำละลาย
2. สาร 5, 5-dithiobis-2-nitrobenzoic acid (DTNB)
   - เตรียม DTNB reagent โดยละลาย 5,5-dithiobis-2-nitrdoenzoic acid 39.62 mg. ใน buffer phosphate 0.1 mol , pH 7 จำนวน 9 ml. หลังจากนั้นเติม sodium bicarbonate 15 mg. และ triton-X 100 จำนวน 1 ml.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3. สาร acetylthiocholine iodide

   - เตรียมโดย ละลาย acetylthiochloine iodide 0.2169 g. ในน้ำกลั่น 10 ml.

4. disodium hydrogen phosphate (Na_2HPO_4) และpotassium dihydrogen phosphate (KH_2PO_4)

   - เตรียม buffer phosphate 0.1 mol , pH 8 โดยละลาย Na_2HPO_4 9.465 g. ในน้ำกลั่น 1,000 ml. ละลาย KH_2PO_4 2.268 g. ในน้ำกลั่น 250 ml. หลังจากนั้นผสมสารละลาย Na_2HPO_4 และ KH_2PO_4 ในอัตรา 4:1 โดยใช้สาร Na_2HPO_4 800 ml. กับสารละลาย KH_2PO_4 200 ml. จากนั้นนำสารละลายที่ได้ไปปรับ pH ให้ได้ 8 เพื่อให้ได้ buffer phosphate 0.1 mol, pH8 โดยจะใช้สารละลาย NaOH 1 N และสารละลาย HCl 1 N เป็นตัวปรับ

   - การเตรียม buffer phosphate 0.1 mol, pH7 ทำเช่นเดียวกับการเตรียม buffer phosphate 0.1 mol, pH8 แต่ปรับ pH ให้ได้ 7

5. acetone
6. น้ำกลั่น

วิธีการ

แบ่งเป็น 3 ขั้นตอนใหญ่ๆ คือ

1. การเลี้ยงผึ้งเพื่อใช้ทดลอง
2. นำผึ้งมาเลี้ยงไว้ในห้องปฏิบัติการเพื่อให้ผึ้งคุ้นเคยกับสภาพแวดล้อม
3. การทดสอบประสิทธิภาพของ methamidophos กับผึ้ง

1. การเลี้ยงผึ้งเพื่อใช้ทดลอง

นำผึ้งเลี้ยงมาจากศูนย์อนุรักษ์และขยายพันธุ์ผึ้งเขตที่ 4 จังหวัดจันทบุรี โดยเลี้ยงไว้ในสถานที่มีความร่มรื่นมีแหล่งอาหารและน้ำที่ห่างไกลจากแหล่งที่ใช้สารฆ่าแมลง หรือไม่มีการใช้สารฆ่าแมลง รวมทั้งปลอดภัยจากแมลงศัตรูของผึ้ง

ในการปฏิบัติงานกับผึ้งจะตรวจผึ้งในเวลาเช้าหรือเย็น ช่วงห่างในการตรวจประมาณ 7-10 วันต่อครั้ง การตรวจแต่ละครั้งจะต้องสวมหมวกตาข่าย และแต่งกายมิดชิดเพื่อป้องกันผึ้งต่อย การตรวจแต่ละครั้งจะดูการเปลี่ยนแปลงของประชากรผึ้งและจัดเรียงคอนโดยเอาคอนที่มีไข่ไว้ตรงกลาง แล้วขนาบด้วยคอนตัวอ่อน คอนดักแด้ คอนเกสร และคอนน้ำหวาน ตามลำดับ การให้น้ำหวานจะ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บรรจุในถ้วยพลาสติกใส่ภายในรังผึ้ง บรรจุน้ำหวานประมาณครึ่งลิตร ใส่เศษผ้าลงไปด้วยเพื่อให้ผึ้งเกาะ การเปลี่ยนน้ำหวานจะเปลี่ยน 4 วันต่อครั้ง

2. นำผึ้งมาเลี้ยงไว้ในห้องปฏิบัติการเพื่อให้ผึ้งคุ้นเคยกับสภาพแวดล้อม

นำผึ้งจากรังเลี้ยงมาตรฐานมา 2 คอน ใส่ในหีบนุค โดยภายในหีบใส่กระป๋องพลาสติกขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 8 เซนติเมตร สูง 5 เซนติเมตรบรรจุน้ำหวาน(สารละลายกลูโคส 25%) และใส่เศษผ้าลงไปในกระป๋องเพื่อให้ผึ้งเกาะ นำหีบนุคมาใส่ไว้ในตู้อะลูมิเนียมขนาด 30 x 30 x 110 เซนติเมตร ซึ่งทั้ง 4 ด้านของตู้เป็นมุ้งลวด สามารถมองเห็นด้านในได้ชัดเจน มีช่องเปิดสำหรับจับผึ้ง เลี้ยงผึ้งไว้ 2 วัน ก่อนนำมาทำการทดลอง

3. การทดสอบประสิทธิภาพของ methamidophos กับผึ้ง

ทดสอบประสิทธิภาพของ methamidophos กับผึ้ง ในเครื่อง knockdown chamber ที่ระดับความเข้มข้น 6ระดับคือ 0,4, 6, 8, 10 และ 12 มก/ม^3 ใช้acetoneเป็นกลุ่มควบคุม ทดสอบควมเข้มข้นละ 3 ครั้ง(trials)

วิธีการทดสอบ

นำผึ้ง 65 ตัว จากตู้อะลูมิเนียมใส่ในกล่องพลาสติกขนาด 18 x 25.3 x 9.3 เซนติเมตร ให้ผึ้งอดอาหาร 30 นาที หลังจากนั้นนำผึ้งทั้ง 65 ตัว ใส่ในเครื่อง knockdown chamber แล้วฉีด methamidophos เข้าไปใน knockdown chamber ครั้งละความเข้มข้น ความเข้มข้นละ 1 ml. โดยแบ่งใส่หลอดขนาดเล็กข้างละ 0.5 ml.ภายในกำหนดเวลา 4.5 $\pm$ 0.2 วินาที แรงดันอากาศ 12.5 psi (ปอนด์ต่อตารางนิ้ว) เมื่อครบ 1 ชั่วโมง แล้วเอาผึ้งออกจาก knockdown chamber สุ่มผึ้งมาจำนวน 25 ตัวโดยพิจารณาจากผึ้งที่แสดงอาการพิษแต่ยังไม่ตาย นำไปใส่ในถุงพลาสติกในขนาด 6 x 9 นิ้ว รัดด้วยหนังยาง นำไป freeze ในตู้เย็น 5 นาที เพื่อให้ผึ้งสลบ แล้วนำผึ้งดังกล่าวไปตัดเอาหัวแล้วชั่งแบ่งทำ 5 ซ้ำ ซ้ำละ 5 หัว โดยห่อใส่กระดาษ foil จากนั้นรีบนำไป freeze ต่อในตู้เย็น รอนำไปตรวจวัดระดับเอนไซม์อะเซตทิลโคลินเอสเทอเรส ส่วนที่เหลือ 40 ตัว นำไปเลี้ยงต่อในกล่องพลาสติกขนาด 18 x 25.3 x 9.3 เซนติเมตร เพื่อสังเกตอาการภายใน 24 ชั่วโมง โดยบันทึกผลทุกชั่วโมง

การตรวจวิเคราะห์ ระดับอะเซตทิลโคลินเอสเทอเรส ในหัวผึ้งที่ได้รับการฉีดพ่นสาร methamidophos 0 , 4, 6, 8, 10 และ 12 มก/ม^3 ความเข้มข้นละ 3 ครั้ง (trials) ตรวจวิเคราะห์ระดับอะเซตทิลโคลินเอสเทอเรสความเข้มข้น ละ 5 ซ้ำ (replications) โดยใช้หัวผึ้ง ซ้ำ ละ5 หัว การทดลองจะใช้วิธีการของ Ellman et al. (1961) โดยนำหัวผึ้งซึ่งมีน้ำหนักเฉลี่ย 12.10 mg. ใส่ในสารละลายบัฟเฟอร์ในอัตราส่วนเนื้อเยื่อ 20 mg.ต่อบัฟเฟอร์ pH8 1 ml. จากนั้นปั่นด้วยเครื่องปั่นให้เป็น

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

98865

เนื้อเดียวกันประมาณ 1 นาที ที่ความเร็ว 2,200 รอบ/นาที หลังจากปั่นเสร็จดูดสารละลายเนื้อเยื่อจำนวน 0.4 ml. ใส่ในหลอดทดลองที่มีสารละลายบัฟเฟอร์ 2.6 ml. แล้วเติมสารละลาย DTNB100µl. ปั่นสารละลายให้เข้ากันด้วยเครื่องปั่นน้ำยากระแสวน 2 วินาที แล้วนำไปใส่เซลล์แก้ว(cuvett)แล้วใส่ในเครื่อง spectrophotometer(ใช้เป็น blank) จากนั้นดูดสารละลายเนื้อเยื่อ 0.4 ml. ใส่ในหลอดทดลองที่มีสารละลายบัฟเฟอร์ 2.6 ml.อีกหนึ่งหลอด แล้วเติมด้วยสารละลาย DTNB 100 µl. ปั่นด้วยเครื่องปั่นน้ำยากระแสวน 2 วินาที แล้วเติม acetylthiocholine iodide จำนวน 20 µl. แล้วปั่นให้เข้ากันด้วยเครื่องปั่นน้ำยากระแสวนใส่ในcuvett แล้วรีบนำไปวัดค่าดูดกลืนแสง (absorbance) ที่ความยาวคลื่น 412 นาโนเมตร พร้อมกับสารในหลอดแรก(blank)บันทึกค่าดูดกลืนแสงทุก 30 วินาที เป็นเวลา 3 นาที แล้วหาค่าเฉลี่ยความแตกต่างเพื่อคำนวณตามสมการของ Ellman et al. (1961) จะได้ค่าระดับการทำงานของเอนไซม์อะเซทธิลโคลินเอสเทอเรสมีหน่วยเป็น moles/min./g of tissue (mU/ml.) ทั้งนี้ตลอดเวลาของการทดลอง จะต้องแช่สาร และเนื้อเยื่อในน้ำแข็ง เพื่อป้องกันการสลายตัวของเอนไซม์ AChE

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ผลการทดลอง

จากผลการทดลองพบว่าที่ระดับความเข้มข้นของเมทธามิโดฟอส 4 ,6 , 8, 10 และ 12 มก/ม^3 อะเซตทิลโคลินเอสเทอเรสที่ถูกยับยั้งเท่ากับ 1361.81,2482.55,3292.36,3600.41และ 4480.54mU/ml คิดเป็นเปอร์เซนต์อะเซตทิลโคลินเอสเทอเรสที่ถูกยับยั้งเท่ากับ 20.18,36.78,48.78,53.35,และ66.39% ตามลำดับ โดยเปรียบเทียบกับผึ้งในกลุ่มควบคุมซึ่งได้รับเฉพาะอะซีโตนและมีระดับอะเซตทิลโคลินเอสเทอเรสเท่ากับ 6749.28 mU/ml. การตายของผึ้งหลังจากได้รับสารเมทธามิโดฟอส นาน 1 ชั่วโมง พบว่าแต่ละความเข้มข้นของเมทธามิโดฟอส คือ 0, 4, 6, 8, 10 และ 12 มก/ม^3 มีเปอร์เซ็นต์การตายของผึ้งเท่ากับ 0, 0, 0, 7.29, 41.94 และ 76.80 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ ซึ่งในภาพที่ 1 และตารางที่ 1 ได้แสดงความสัมพันธ์ของระดับอะเซตทิลโคลินเอสเทอเรสที่ถูกยับยั้งและเปอร์เซ็นต์การตายของผึ้งหลังจากได้รับสารเมทธามิโดฟอส 1 ชั่วโมง ทั้งนี้ อาการพิษที่ผึ้งแสดงคือบินวนไปมาอย่างรวดเร็ว ควบคุมตัวเองไม่ได้ โดยที่เมื่อผึ้งเดินไม่ได้จะถือว่าผึ้งตาย

การบันทึกผลภายใน 24 ชั่วโมง พบว่าที่ความเข้มข้น 0 มก/ม^3 จะเริ่มพบการตายของผึ้งในชั่วโมงที่ 4 จำนวน1.67เปอร์เซ็นต์และตั้งแต่ชั่วโมงที่ 8 อัตราการตายของผึ้งจะคงที่ ที่ 5.83 เปอร์เซ็นต์ ที่ 4 มก./ม^3 จะเริ่มพบการตายในชั่วโมงที่ 3 จำนวน 2.48 เปอร์เซนต์ในชั่วโมงที่ 10 อัตราการตายของผึ้งจะคงที่ ที่ 66.12 เปอร์เซ็นต์ ที่ 6 มก./ม^3 จะเริ่มพบการตายในชั่วโมงที่ 2 จำนวน 11.90 เปอร์เซนต์ ในชั่วโมงที่ 8 อัตราการตายของผึ้งจะคงที่ ที่ 80.95 เปอร์เซ็นต์ ที่ 8 มก./ม^3 ผึ้งจะตายตั้งแต่ชั่วโมงแรกจำนวน 7.29 เปอร์เซนต์และตาย 100 เปอร์เซ็นต์ในชั่วโมงที่ 10 ที่ 10 มก./ม^3 ผึ้งจะตาย 41.94 เปอร์เซนต์ตั้งแต่ชั่วโมงแรกและตาย 100 เปอร์เซ็นต์ในชั่วโมงที่ 5 ที่ 12 มก./ม^3 ผึ้งจะตาย 76.80 เปอร์เซนต์ตั้งแต่ชั่วโมงแรกและตาย 100 เปอร์เซ็นต์ในชั่วโมงที่ 3 ดังตารางที่ 2

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

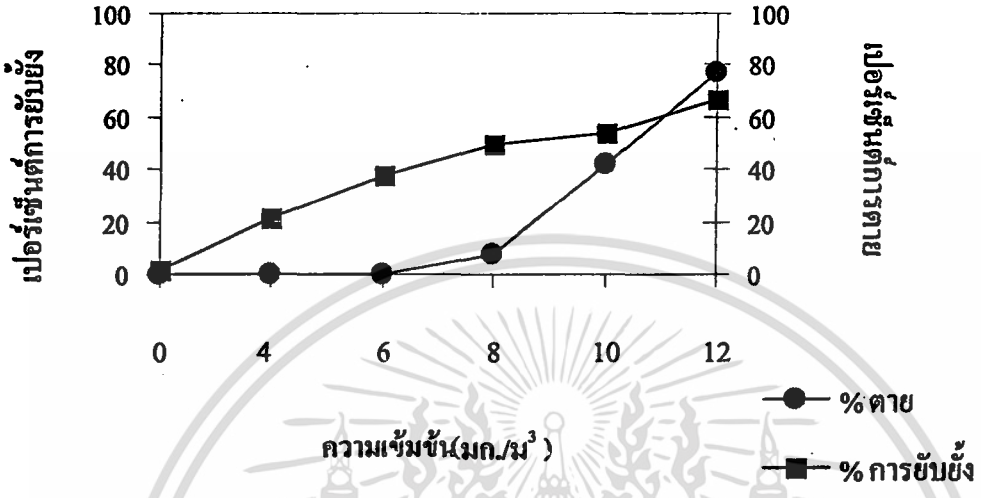
ตารางที่ 1 ปริมาณอะเซตทิลโคลินเอสเทอเรสที่ถูกยับยั้ง และเปอร์เซ็นต์การตาย ของผึ้งในเวลา 1 ชั่วโมง

ความเข้มข้น(มก./ม^3)	ระดับ AChE ที่ถูกยับยั้ง (mU/ml)	% การยับยั้ง	% การตาย
0	–	–	0
4	1361.81	20.18	0
6	2482.55	36.78	0
8	3292.36	48.78	7.29
10	3600.41	53.35	11.94
12	4480.54	66.39	76.80

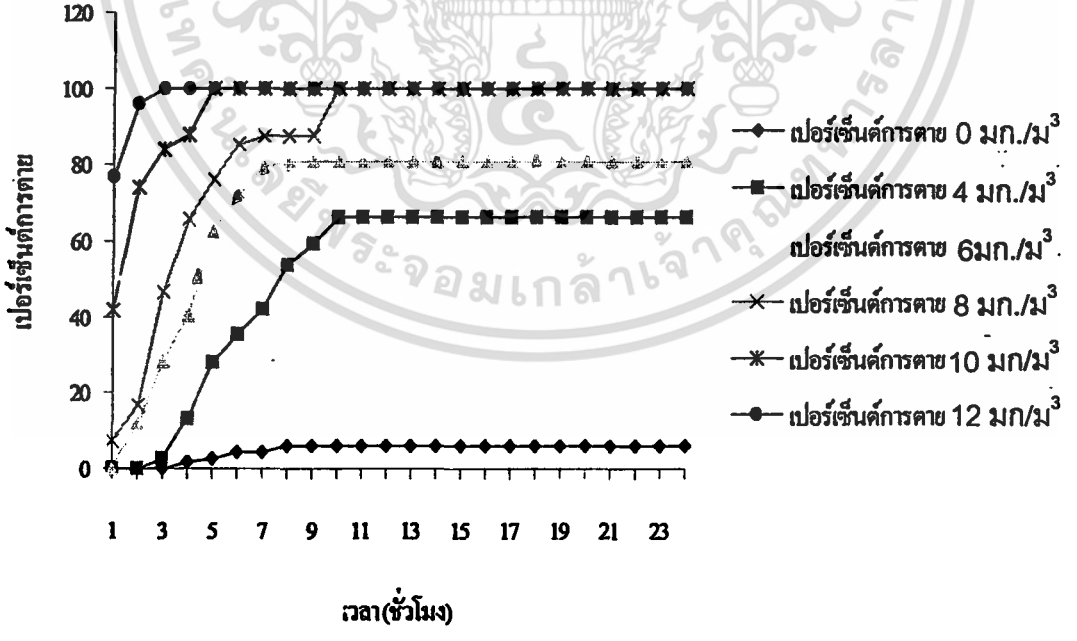
ตารางที่ 2 เปอร์เซ็นต์การตายของผึ้งในเวลา 24 ชั่วโมง

เวลา (ชั่วโมง	%การตาย (n=120)					
หลังฉีดพ่น)	0 มก./ม^3	4 มก./ม^3	6มก./ม^3	8 มก./ม^3	10 มก/ม^3	12 มก/ม^3
1	0	0	0	7.29	41.94	76.80
2	0	0	11.90	16.67	74.19	96
3	0	2.48	28.57	46.88	83.87	100
4	1.67	13.22	40.48	65.63	87.90	⋮
5	2.50	28.10	62.70	76.04	100	⋮
6	4.17	35.54	72.22	85.42	⋮	⋮
7	4.17	42.15	79.37	87.50	⋮	⋮
8	5.83	53.72	80.95	87.50	⋮	⋮
9	⋮	59.50	⋮	87.50	⋮	⋮
10	⋮	66.12	⋮	100	⋮	⋮
⋮	⋮	⋮	⋮	⋮	⋮	⋮
24	5.83	66.12	80.95	100	100	100

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



ภาพที่ 1 ความสัมพันธ์ของระดับอะเซตทิลโคลินเอสเทอเรสที่ถูกยับยั้ง กับความเข้มข้นของเมทามิโดฟอส และเปอร์เซ็นต์การตายของผึ้ง



ภาพที่ 2 เปอร์เซ็นต์การตายของผึ้งในเวลา 24 ชั่วโมง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ห้องสมุดคณะเทคโนโลยีการเกษตร

สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าฯ ฉลองกรุง

วิจารณ์ผลการทดลอง

จากผลการทดลองจะพบว่าเปอร์เซ็นต์การยับยั้งอะเซตทิลโคลินเอสเทอเรสและเปอร์เซนต์การตายของผึ้ง จะเพิ่มมากขึ้นเมื่อความเข้มข้นของเมทธามิโดฟอสมากขึ้น แสดงให้เห็นว่า การยับยั้งอะเซตทิลโคลินเอสเทอเรสจะแปรผันตรงกับความเข้มข้นของเมทธามิโดฟอส ดังนั้นเมื่อเพิ่มความเข้มข้นของเมทธามิโดฟอสมากขึ้น ระดับการทำงานของเอนไซม์อะเซตทิลโคลินเอสเทอเรสจะลดลง มีผลทำให้การตายของผึ้งเพิ่มขึ้น ซึ่งจากการทดลองให้ผึ้งเผยกับเมทธามิโดฟอสนาน 1 ชั่วโมงพบว่าเมื่อระดับอะเซตทิลโคลินเอสเทอเรสถูกยับยั้งไป 48.78 เปอร์เซนต์เริ่มมีผึ้งตาย 7.29 เปอร์เซนต์และตายถึง 76.80 เปอร์เซนต์เมื่อระดับอะเซตทิลโคลินเอสเทอเรสถูกยับยั้ง 66.39 เปอร์เซนต์ ซึ่งมีการศึกษาพบว่าในภาวะที่สารพิษกลุ่มออร์กาโนฟอสเฟตคือพาราไธออนเข้าสู่ร่างกายมนุษย์หรือสัตว์จะทำให้ระดับอะเซตทิลโคลินเอสเทอเรสลดลงต่ำกว่าปกติ ซึ่งอาการพิษจะรุนแรงเมื่อระดับอะเซตทิลโคลินเอสเทอเรส ลดลงตั้งแต่ 50 เปอร์เซ็นต์ ขึ้นไป(สกุลรัตน์,2543)

ทั้งนี้ข้อผิดพลาดที่อาจเกิดขึ้นจากการทดลองคือเอนไซม์จะสลายตัวเมื่อถูกความร้อนดังนั้นระหว่างการตรวจวิเคราะห์ทุกครั้งจะต้องทำให้สารอยู่ในสภาวะที่เย็น โดยแช่สารเคมีและเนื้อเยื่อผึ้งในน้ำแข็งตลอดเวลาที่ทำการทดลองเพื่อป้องกันการสลายตัวของเอนไซม์ ซึ่งจะทำให้ค่าที่ได้ไม่ผิดพลาด

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สรุปผลการทดลองและข้อเสนอแนะ

จากผลการทดลองจะพบว่าเมื่อเพิ่มระดับความเข้มข้นของเมทธามิโดฟอส ระดับอะเซตทิลโคลินเอสเทอเรสที่ถูกยับยั้งและการตายของผึ้งก็จะเพิ่มมากขึ้นด้วย โดยที่เมื่อความเข้มข้นของเมทธามิโดฟอสสูงถึง 10 มก./ม^3 จะทำให้เปอร์เซ็นต์การถูกยับยั้งอะเซทิลโคลินเอสเทอเรสสูงถึง 53.35 เปอร์เซ็นต์ และผึ้งตาย100เปอร์เซ็นต์ ภายในเวลา 5ชั่วโมง และที่ 12 มก./ม^3 เปอร์เซ็นต์การถูกยับยั้งของอะเซตทิลโคลินเอสเทอเรสสูงถึง 66.39 เปอร์เซ็นต์ และผึ้งตาย 100 เปอร์เซ็นต์ ภายใน 3 ชั่วโมง ทั้งนี้การใช้สารเมทธามิโดฟอสซึ่งเป็นสารกลุ่มออร์กาโนฟอสเฟตในสวนผลไม้จะทำให้มีผลกระทบต่อผึ้งโดยเฉพาะหากมีความเข้มข้นของสารสูงจะมีผลกระทบมาก ดังนั้นเกษตรกรที่เลี้ยงผึ้งในสวนผลไม้ควรระมัดระวังในการใช้สารไม่ให้เกิดอันตรายต่อผึ้งโดยไม่ฉีดพ่นสารในขณะดอกไม้บาน งดใช้สารที่มีพิษสูงต่อผึ้งและเลือกใช้สูตรที่ปลอดภัยต่อผึ้ง เช่น สูตรที่ใช้ทางดิน เป็นต้น

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เอกสารอ้างอิง

ทัศนีย์ คีรีทวีป จันทร์เพ็ญ ลิมปพยอม วนิดา จรุงจิตต์ ชุติกานต์ กิจประเสริฐ. 2544. วิทยาการเกี่ยวกับผึ้ง. *ใน* แมลง–สัตว์ ศัตรูพืช และการป้องกันกำจัด. เอกสารประกอบการบรรยายในการอบรมทางวิชาการครั้งที่ 11. กลุ่มงานผึ้งและแมลงอุตสาหกรรม กองกีฏและสัตววิทยา กรมวิชาการเกษตร กระทรวงเกษตรและสหกรณ์. กรุงเทพฯ. 43 หน้า.

ประเสริฐ พรหมรักษา. เลี้ยงผึ้งเพิ่มผลผลิตทางการเกษตร. เดลินิวส์ 21 กันยายน. หน้า 34.

มารศรี อุดมโชค. 2535. วัตถุมีพิษทางการเกษตร. ข่าวสารวัตถุมีพิษ. 19(1) : 42.

รุ่งฤดี มีสมบูรณ์. 2541. *ใน* ความรู้พื้นฐานการวิเคราะห์คุณภาพและสารพิษตกค้างของวัตถุมีพิษการเกษตร. เอกสารวิชาการประกอบคำบรรยายในการพัฒนาอบรมเจ้าหน้าที่สำนักวิจัยและพัฒนาการเกษตรเขตที่ 1-8 ครั้งที่ 1. กองวัตถุมีพิษการเกษตร กรมวิชาการกระทรวงเกษตรและสหกรณ์. กรุงเทพฯ. หน้า (12-1)-(12-8).

วิภา ตั้งนิพนธ์. 2541. ความเป็นพิษของสารกำจัดศัตรูพืชกลุ่มออร์กาโนฟอสเฟตและคาร์บาเมต. ข่าวสารวัตถุมีพิษ. 25(3)1 : 113-123.

สกุลรัตน์ อุษณาวรงค์. 2543. พิษจากสารปราบศัตรูพืช. มข.วิจัย. 2(3) : 19-21.

สมาคมคนไทยผู้ประกอบธุรกิจสารเคมีเกษตร. 2535. การขึ้นทะเบียนวัตถุมีพิษทางการเกษตรในประเทศไทย. ชาลีธุรกิจและโฆษณา. กรุงเทพฯ. 912 หน้า.

สิริวัฒน์ วงษ์ศิริ เพ็ญศรี ตังคณะสิงห์. 2529. ความเป็นพิษของสารกำจัดศัตรูพืชต่อผึ้ง. ชีววิทยาของผึ้ง. ฝ่ายวิจัยจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย. กรุงเทพฯ. 247 หน้า.

Ellman, G.L., Courtney, K.D., Andres, V., and R.M. Feastone. 1961. A new and colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. Biochem Pharmacol. 7 : 88-95.

Fukuto, T.R. 1990. Mechanism of action of organophosphorus and carbamate insecticides. Environmental Health Perspectives. 8 : 245-254.

Margaret, A., Penelope, W., and T. W. Peter. 1986. Pest Control Safe for Bees : A Manual and Directory for the Tropic and Subtropics. International Bee Research Association. London. 224 pp.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้