



พิษเฉียบพลันและกึ่งเฉียบพลันของสารกำจัดแมลงคลอโรไพริฟอสต่อแมงมุมสุนัขป่า

Wadicosa fidelis (Araneae : Lycosidae)



โดย

นายภาณุพงษ์ ทองเปรม

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต

สาขาวิชาชีววิทยา

ภาควิชาชีววิทยา

บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยศิลปากร

ปีการศึกษา 2558

ลิขสิทธิ์ของบัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยศิลปากร

พิษเหียบพลันและกึ่งเหียบพลันของสารกำจัดแมลงคลอโรไพริฟอสต่อแมงมุมสุนัขป่า

Wadicosa fidelis (Araneae : Lycosidae)



วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต

สาขาวิชาชีววิทยา

ภาควิชาชีววิทยา

บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยศิลปากร

ปีการศึกษา 2558

ลิขสิทธิ์ของบัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยศิลปากร

ACUTE AND SUBACUTE EFFECTS OF CHLORPYRIFOS INSECTICIDE ON WOLF SPIDER

Wadicosa fidelis (ARANEAE : LYCOSIDAE)



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

Master of Science Program in Biology

Department of Biology

Graduate School, Silpakorn University

Academic Year 2015

Copyright of Graduate School, Silpakorn University

บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยศิลปากร อนุมัติให้วิทยานิพนธ์เรื่อง “พิษเฉียบพลันและกึ่งเฉียบพลันของสารกำจัดแมลงคลอโรไพริฟอส ต่อแมงมุมสุนัขป่า *Wadicosa fidelis* (Araneae : Lycosidae)” เสนอโดย นายภาณุพงษ์ ทองเปรม เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาชีววิทยา

.....
(รองศาสตราจารย์ ดร.ปานใจ ธารทัศน์วงศ์)

คณบดีบัณฑิตวิทยาลัย

วันที่.....เดือน..... พ.ศ.....

อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์

อาจารย์ ดร.กัมปนาท ธาราภูมิ

คณะกรรมการตรวจสอบวิทยานิพนธ์

ประธานกรรมการ

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. กุลนาถ ออบสุวรรณ)

...../...../.....

กรรมการ

(อาจารย์ ดร. พัทธนี วิชิตพันธ์)

...../...../.....

กรรมการ

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. สุพรรณฎิภา เสี่ยงสาย)

...../...../.....

กรรมการ

(อาจารย์ ดร. กัมปนาท ธาราภูมิ)

...../...../.....



55303205 : สาขาวิชาชีววิทยา

คำสำคัญ : แมงมุมสุนัขป่า / คลอร์ไพริฟอส / พิษเฉียบพลัน / พิษกึ่งเฉียบพลัน

ภาพพจน์ ท่องเปรม : พิษเฉียบพลันและกึ่งเฉียบพลันของสารกำจัดแมลงคลอร์ไพริฟอส ต่อแมงมุมสุนัขป่า *Wadicosa fidelis* (Araneae : Lycosidae). อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์: อ.ดร. กัมปนาท ธาราภูมิ. 88 หน้า.

แมงมุม *Wadicosa fidelis* เป็นแมงมุมสุนัขป่าในวงศ์ Lycosidae เป็นชนิดเด่นที่พบในนาข้าวแบบอินทรีย์ อำเภอดอนตูม จังหวัดนครปฐม ในปัจจุบันสารคลอร์ไพริฟอสเป็นสารกำจัดแมลงที่ถูกนำเข้าจากต่างประเทศมาใช้มากที่สุดในประเทศไทย สามารถออกฤทธิ์ต่อระบบประสาทของสัตว์นอกกลุ่มเป้าหมาย รวมถึงแมงมุมสุนัขป่า ทำให้ไม่สามารถดำรงชีวิตตามปกติ หรืออาจทำให้ตายได้ ในงานวิจัยนี้จึงศึกษาผลกระทบแบบเฉียบพลันและกึ่งเฉียบพลันของสารกำจัดแมลงคลอร์ไพริฟอส (ยี่ห้อเซนิไฟเลท 40) ต่อแมงมุม *W. fidelis* ภายใต้สภาวะห้องปฏิบัติการ ผลการศึกษาผลกระทบแบบเฉียบพลันโดยให้แมงมุม *W. fidelis* สัมผัสกับสารเซนิไฟเลท 40 ระดับความเข้มข้นที่ระบุบนฉลาก พบว่าแมงมุมตาย 100% ภายในเวลา 1 ชั่วโมง เมื่อวิเคราะห์หาค่าความรุนแรงของสารที่ LC_{50} , LC_{30} และ LC_{10} พบว่า ในเพศเมียมีค่าเท่ากับ 1.9, 4.0 และ 5.5 ppm ซึ่งมากกว่าในเพศผู้ที่มีค่าเท่ากับ 0.2, 1.1 และ 2.8 ppm ตามลำดับ ผลจากพิษกึ่งเฉียบพลันโดยนำแมงมุมที่รอดชีวิตจากการสัมผัสสารเซนิไฟเลท 40 ที่ระดับ LC_{50} , LC_{30} และ LC_{10} เป็นเวลา 48 ชั่วโมง มาศึกษาประสิทธิภาพในการกินเหยื่อของแมงมุม และกิจกรรมของเอนไซม์ acetylcholinesterase (AChE) และ เอนไซม์ catalase (CAT) ที่สกัดจากแมงมุมแต่ละกลุ่ม พบว่าแมงมุมในกลุ่มทดสอบ LC_{50} ใช้เวลาก่อนตอบสนองต่อเหยื่อครั้งแรกนานกว่า 1 นาที กินเหยื่อได้จำนวนเฉลี่ยน้อยกว่ากลุ่มควบคุม ซึ่งสอดคล้องกับการที่แมงมุมตอบสนองทางประสาทช้าลงเนื่องจากกิจกรรมเอนไซม์ AChE ในแมงมุมที่ได้รับสารระดับความเข้มข้น LC_{50} ถูกยับยั้งมากขึ้นถึง 68.69% ในเพศผู้ และ 77.54% ในเพศเมีย และยังส่งผลให้แมงมุมมีความเครียดจึงมีกิจกรรมเอนไซม์ CAT เพิ่มขึ้นถึง 12.02 และ 12.21 $\mu\text{moles} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mgprotein}^{-1}$ ในแมงมุมเพศผู้และเพศเมียตามลำดับ เกษตรกรจึงควรตระหนักถึงผลของสารเคมีกลุ่มคลอร์ไพริฟอสต่อสัตว์นอกกลุ่มเป้าหมายก่อนเลือกนำมาใช้ควบคุมศัตรูพืช

ภาควิชาชีววิทยา

บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยศิลปากร

ลายมือชื่อนักศึกษา.....

ปีการศึกษา 2558

ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์

55303205: MAJOR: BIOLOGY

KEY WORD: LYCOSIDAE / CHLORPYRIFOS / ACUTE EFFECT / SUBACUTE EFFECT

PANUPONG THONGPREM: ACUTE AND SUBACUTE EFFECTS OF CHLORPYRIFOS INSECTICIDE ON WOLF SPIDER *Wadicosa fidelis* (ARANEAE : LYCOSIDAE). THESIS ADVISOR: KAMPANAT THARAPOOM, Ph.D. 88 PP.

Wadicosa fidelis is a wolf spider in family Lycosidae. It is a dominant species of lycosid spiders which can be found in an organic paddy field at Don Tum, Nakhon Pathom. Recently, a chlorpyrifos has been the most imported insecticide into Thailand. It directly affects to a nervous system of non-target animals including wolf spiders. These animals would be disabled or executed by this insecticide. In this study, we investigate the acute and subacute effects of the chlorpyrifos insecticide (Zenipilat 40) in *W. fidelis* under laboratory conditions. The acute effect by exposing spiders to Zenipilat 40 at the recommended dose performed a hundred percent dead within an hour. The values of lethal concentrations at LC₅₀, LC₃₀ and LC₁₀ for female spiders were 1.9, 4.0 and 5.5 ppm, while those values for male spiders were 0.2, 1.1 and 2.8 ppm, respectively. After exposed to Zenipilat 40 at LC₅₀, LC₃₀ and LC₁₀ for 48 hours, the subacute effects were evaluated on survived spiders by their consumption efficiencies and activities of enzyme acetylcholinesterase (AChE) and catalase (CAT) extraction. The exposed spiders at LC₅₀ level spent more than 1 minute before approaching to a prey and less prey consumption than those spiders in the control group which were correspond to a slower response of nervous system due to % inhibition of AChE activity increased up to 68.69% in male and 77.54% in female. This condition had also driven a stress in spiders by considering from the escalation of CAT activity at 12.012 and 12.21 $\mu\text{moles} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mgprotein}^{-1}$ in male and female spiders, respectively. In conclusion, farmers should concern the consequence of effects on non-target animals before applying a chlorpyrifos to the field.

Department of Biology

Graduate School, Silpakorn University

Student's signature

Academic Year 2015

Thesis Advisor's signature

กิตติกรรมประกาศ

การจัดทำวิทยานิพนธ์ในครั้งนี้สามารถสำเร็จได้ จากความอนุเคราะห์ของบุคคลหลายท่านที่มีส่วนร่วมในงานวิจัยของข้าพเจ้ามาโดยตลอด

ขอขอบพระคุณอาจารย์ ดร.กัมปนาท ธาราภูมิ ผู้เป็นอาจารย์ที่ปรึกษา คอยดูแลให้คำแนะนำ และให้การช่วยเหลือในทุกๆ เรื่อง ขอขอบคุณผู้ช่วยศาสตราจารย์ ปทุมพร เมืองพระ ผู้เป็นกรรมการในการสอบอนุมัติหัวข้องานวิจัย อีกทั้งคอยให้ความช่วยเหลือ คำปรึกษาและวิธีการแก้ปัญหาต่างๆ ในการทำวิทยานิพนธ์ครั้งนี้จนประสบความสำเร็จ ขอขอบคุณ Prof. Dr. Torbjörn Kronested ที่ให้คำแนะนำและช่วยยืนยันการจดจำแนกชนิดแมงมุมที่พบในการศึกษา ขอขอบคุณผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.สุพรรณฎิภา เสงี่ยม ผู้เป็นกรรมการในการสอบอนุมัติหัวข้อและการสอบวิทยานิพนธ์ อีกทั้งให้คำปรึกษาและแนวคิดอันมีประโยชน์ต่อวิทยานิพนธ์ ขอขอบคุณอาจารย์ ดร. พชณี วิชิตพันธ์ ที่ให้ความกรุณาเป็นผู้ทรงคุณวุฒิในการสอบวิทยานิพนธ์ และยังคงคอยดูแลให้คำแนะนำต่างๆ เป็นอย่างดีต่อการจัดทำวิทยานิพนธ์จนเสร็จสมบูรณ์ ขอขอบคุณผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. กุลนาถ ออบสุวรรณ ที่เอื้อเฟื้อห้องปฏิบัติการ และเป็นกรรมการในการสอบวิทยานิพนธ์ ขอขอบคุณอาจารย์ ดร. อติศรี เจริญพาณิชย์ ที่ช่วยดำเนินการซื้ออุปกรณ์และสารเคมี ขอขอบคุณผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. ประหยัด แสงงาม ที่ให้คำแนะนำในการวิเคราะห์ผลทางสถิติ ขอขอบคุณคุณณรงค์ สามงามนิม ที่ช่วยอำนวยความสะดวกเรื่องการเบิกจ่ายอุปกรณ์ต่างๆ เป็นอย่างดี ขอขอบคุณพี่นงนุช กำลังแพทย์ สำหรับการเพาะเลี้ยงแมลงหวี่ที่ใช้ในห้องปฏิบัติการ ขอขอบคุณพี่ภรพรณ ศเวตสุวรรณกุล ที่เอื้อเฟื้ออุปกรณ์และสารเคมีในช่วงที่ขาดแคลน ขอขอบคุณเพื่อนๆ ได้แก่ จิราพร ปานมณี วิกานดา พรหมมณี และรวีวรรณ บุญสมบอง ที่คอยให้ความช่วยเหลือในเรื่องต่างๆ ที่ติดขัดระหว่างการทำวิทยานิพนธ์ โดยเฉพาะอุปกรณ์ต่างๆ ที่ใช้ในห้องปฏิบัติการ ขอขอบคุณพี่ประภัสรา สงค์ประชา และน้องณัฐกฤษ ทองน้อย ที่คอยช่วยเหลือและเป็นกำลังใจ ขอขอบคุณพี่อธิปไตย อุทัยปะกิจ พี่พรหมสุรีย์ภัสสร ศุกระศร ชลิตา วรครุฑตานนท์ น้องกมลศรี มาชื่น พงศ์ศิริ ตาลทอง ธาวัน เข้มกัลดคงพัฒน์ พันธาทิก นนทชัย เทียงสันเทียะ และเอกชัย สินธุนาวา ที่คอยช่วยเหลือและเป็นเพื่อนกันในระหว่างเก็บข้อมูลภาคสนาม ขอขอบคุณคุณพ่อสมศักดิ์ คุณแม่สมบัติ มาชื่น ที่เอื้อเฟื้อและอำนวยความสะดวกที่พัก ตลอดจนการเก็บข้อมูลภาคสนามขอขอบคุณคุณพี่กุลนที ศุภรัตน์ชาติพันธ์ จาก Greenliving Camp ที่อนุญาตให้เข้าถึงพื้นที่ศึกษา

ขอขอบคุณทุนพัฒนาและส่งเสริมผู้มีความสามารถพิเศษทางวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี (พสวท.) ที่ให้โอกาสพร้อมทั้งเงินทุนสำหรับการศึกษาและเงินอุดหนุนการวิจัย

สุดท้ายนี้ขอขอบพระคุณบิดา มารดา และพี่สาวที่คอยให้ความรัก กำลังใจการสนับสนุน ข้าพเจ้าเสมอมา

สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อภาษาไทย	ง
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ	จ
กิตติกรรมประกาศ	ฉ
สารบัญ	ช
สารบัญตาราง	ฌ
สารบัญรูป	ญ
บทที่	
1 บทนำ	1
ที่มาและความสำคัญ	1
วัตถุประสงค์ของการศึกษา	2
ประโยชน์ที่ได้รับ	3
ขอบเขตการศึกษา	3
การใช้อักษรย่อ	3
2 บทตรวจเอกสาร	4
แมงมุม	5
แมงมุมสุนัขป่า	8
แมงมุมสุนัขป่าในสกุล <i>Wadicosa</i>	9
บทบาทของแมงมุมสุนัขป่าในนาข้าว	12
สารกำจัดศัตรูพืช	13
สารกำจัดแมลง	14
สารกำจัดแมลงคลอร์ไพริฟอส	19
สารคลอร์ไพริฟอสที่ใช้ในงานวิจัยนี้	19
ความเป็นพิษเฉียบพลันของสารคลอร์ไพริฟอส	21
กลไกการออกฤทธิ์	22
การตรวจวัดปฏิกิริยาเอนไซม์ AChE	28
การเกิดความเครียดของเซลล์	29
เอนไซม์ CAT และการตรวจวัดกิจกรรมเอนไซม์	30

3	วิธีการศึกษา	32
	วัสดุอุปกรณ์และสารเคมี	32
	พื้นที่เก็บแมงมุม	34
	วิธีการเก็บและเลี้ยงแมงมุม	38
	การศึกษาข้อมูลทางสัณฐานวิทยาและชีววิทยาของแมงมุม <i>W. fidelis</i>	38
	การทดลองในห้องปฏิบัติการ	40
4	ผลการศึกษา	50
	ชีววิทยาของแมงมุมสุนัขป่า	50
	ความเป็นพิษเฉียบพลันของสารคลอโรไพริฟอส	60
	ความเป็นพิษกึ่งเฉียบพลันของสารคลอโรไพริฟอส	62
5	สรุปและอภิปรายผล	69
	ชีววิทยาของแมงมุมสุนัขป่า	69
	ความเป็นพิษเฉียบพลันของสารคลอโรไพริฟอส	70
	ความเป็นพิษกึ่งเฉียบพลันของสารคลอโรไพริฟอส	71
	สรุปผลการศึกษา	76
	ข้อเสนอแนะเพิ่มเติม	76
	รายการอ้างอิง	77
	ภาคผนวก	84
	ประวัติผู้วิจัย	88

สารบัญตาราง

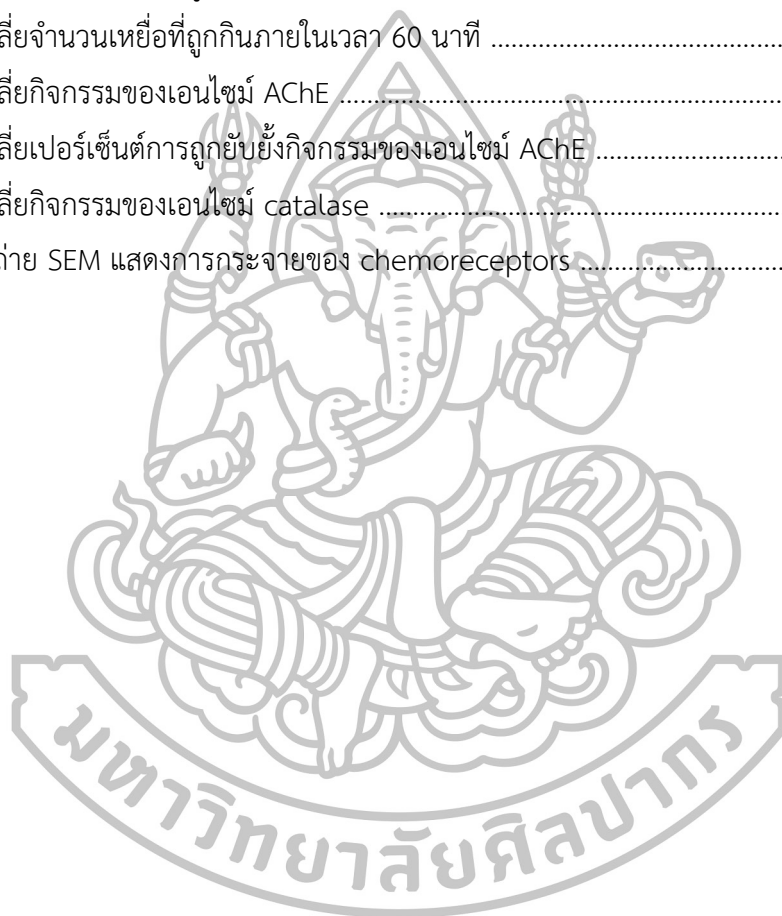
ตารางที่		หน้า
2-1	ปริมาณการนำเข้าวัตถุอันตรายทางการเกษตรประเภทสารเคมี ปี 2556-2557	17
2-2	รายชื่อวัตถุอันตรายที่มีการนำเข้าสูงสุด 10 อันดับแรก ปี 2557	18
2-3	ค่า LD ₅₀ ของสารคลอร์ไพริฟอสในสัตว์แต่ละชนิด	21
2-3	ค่า LD ₅₀ ของสารคลอร์ไพริฟอสในสัตว์แต่ละชนิด (ต่อ)	22
2-3	ค่า LD ₅₀ ของสารคลอร์ไพริฟอสในสัตว์แต่ละชนิด (ต่อ)	23
4-1	ขนาดเฉลี่ยในแต่ละส่วนของร่างกายของแมงมุม <i>W. fidelis</i> เพศผู้และเพศเมีย	52
4-2	ความยาวเฉลี่ยขาในแต่ละส่วนของแมงมุม <i>W. fidelis</i> เพศผู้	52
4-3	ความยาวเฉลี่ยขาในแต่ละส่วนของแมงมุม <i>W. fidelis</i> เพศเมีย	52
4-4	ค่า LC ₁₀ , LC ₃₀ และค่า LC ₅₀ ของสารคลอร์ไพริฟอส	61
4-5	เปอร์เซ็นต์ของจำนวนแมงมุมที่มีการตอบสนองต่อเหยื่อในช่วงเวลาต่างๆ	62



สารบัญรูป

รูปที่		หน้า
2-1	ตัวอย่างแมงมุมในวงศ์ต่างๆ	5
2-2	ลักษณะแมงมุมใน Suborder Mesothelae	6
2-3	ลักษณะการวางตัวของเขี้ยวแมงมุม	7
2-4	ตัวอย่างชนิดแมงมุมในกลุ่ม Megalomorphae และ Araneomorphae	7
2-5	การจัดเรียงตัวของตาแมงมุมสุนัขป่าในวงศ์ Lycosidae	8
2-6	ใยของแมงมุมสุนัขป่าในสกุล <i>Hippasa</i>	9
2-7	ตัวอย่างแมงมุมในสกุล <i>Wadicosa</i>	11
2-8	สูตรโครงสร้างโมเลกุลของสารคลอโรไพริฟอส	19
2-9	สารกำจัดแมลงคลอโรไพริฟอสยี่ห้อ เซนิไฟเลท 40	21
2-10	การเกิดปฏิกิริยาระหว่างสารสื่อประสาท acetylcholine กับเอนไซม์ AChE	25
2-11	กลไกการส่งกระแสประสาทโดยใช้เอนไซม์ acetylcholinesterase	26
2-12	การเกิดปฏิกิริยาระหว่างสารเคมีในกลุ่ม OPs กับเอนไซม์ AChE	27
2-13	เอนไซม์ที่เกี่ยวข้องในกระบวนการ antioxidant process	30
3-1	แผนที่แสดงพื้นที่นาข้าวแบบอินทรีย์และพื้นที่โดยรอบที่ใช้ในการเก็บตัวอย่าง	35
3-2	ลักษณะพื้นที่บริเวณที่เก็บตัวอย่างตามหมายเลขในรูปที่ 3-1	36
3-3	ลักษณะของ microhabitat ที่พบแมงมุม <i>W. fidelis</i>	37
3-4	ขวดเลี้ยงแมงมุมในห้องปฏิบัติการ	38
3-5	ภาพถ่าย SEM แสดง pedipalp ของแมงมุม <i>W. fidelis</i> เพศผู้	39
3-6	ภาพถ่าย SEM แสดง epigyne ของแมงมุม <i>W. fidelis</i> เพศเมีย	40
3-7	สารละลายคลอโรไพริฟอสที่เตรียมในระดับความเข้มข้นต่างๆ	42
3-8	การเตรียมกระดาษกรองเพื่อทดสอบสารคลอโรไพริฟอสกับแมงมุม	45
3-9	การบดแมงมุมด้วยเครื่อง homogenizer	45
4-1	ลักษณะของแมงมุม <i>W. fidelis</i> ตัวเต็มวัยเพศผู้	53
4-2	ลักษณะของแมงมุม <i>W. fidelis</i> ตัวเต็มวัยเพศเมีย	54
4-3	ภาพถ่าย SEM ระบบสืบพันธุ์ ของแมงมุม <i>W. fidelis</i>	55
4-4	แมงมุม <i>W. fidelis</i> เพศเมีย ที่มีสีและขนาดต่างกัน	53

รูปที่	หน้า
4-5 แมงมุม <i>W. fidelis</i> ใน microhabitat แบบต่างๆ	58
4-6 ลักษณะของถุงไข่แมงมุม <i>W. fidelis</i>	59
4-7 ค่าเฉลี่ยเปอร์เซ็นต์การตายสะสมของแมงมุม	61
4-8 ค่าเฉลี่ยจำนวนเหยื่อที่ถูกกินสะสมในระยะเวลาต่างๆ	64
4-9 ค่าเฉลี่ยจำนวนเหยื่อที่ถูกกินภายในเวลา 60 นาที	65
4-10 ค่าเฉลี่ยกิจกรรมของเอนไซม์ AChE	66
4-11 ค่าเฉลี่ยเปอร์เซ็นต์การถูกยับยั้งกิจกรรมของเอนไซม์ AChE	67
4-12 ค่าเฉลี่ยกิจกรรมของเอนไซม์ catalase	68
5-1 ภาพถ่าย SEM แสดงการกระจายของ chemoreceptors	72



บทที่ 1

บทนำ

ที่มาและความสำคัญ

การใช้สารเคมีสังเคราะห์เพื่อกำจัดศัตรูพืชในนาข้าว ยังคงเป็นปัญหาสำคัญที่ส่งผลกระทบต่อตัวเกษตรกรและสิ่งแวดล้อม ไม่เพียงแต่สิ่งมีชีวิตศัตรูพืชในกลุ่มเป้าหมายเท่านั้นที่ได้รับผลกระทบโดยตรง แต่สิ่งมีชีวิตนอกกลุ่มเป้าหมายทั้งพืชและสัตว์ ยังคงได้รับผลกระทบ อันเป็นเหตุให้ความหลากหลายทางชีวภาพลดน้อยลงไป (McLaughlin and Mineau, 1995)

โดยธรรมชาติในระบบนิเวศเกษตรกรรม สิ่งมีชีวิตจะมีความสัมพันธ์กันในแง่ของห่วงโซ่อาหาร โดยแมลงศัตรูพืชจะมีสัตว์ที่เป็นศัตรูธรรมชาติของแมลงเหล่านั้น คอยควบคุมจำนวนประชากรอยู่ในระดับที่ไม่ก่อให้เกิดการระบาดได้ (Hawkins et al., 1999) แต่เกษตรกรส่วนใหญ่เลือกใช้สารเคมีสังเคราะห์กำจัดแมลง เช่น สารพาราไธออน (parathion) มาลาไธออน (malathion) ไดอะซีนอน (diazinon) ไดคลอวอส (dichlorvos) และ คลอร์ไพริฟอส (chlorpyrifos) เป็นต้น ซึ่งเป็นสารเคมีในกลุ่มออร์กาโนฟอสเฟต (organophosphate) ออกฤทธิ์โดยตรงกับระบบประสาท (Agency for Toxic Substances and Disease Registry, 1997) สารคลอร์ไพริฟอสเป็นสารที่มีปริมาณการนำเข้ามากที่สุดในประเทศไทยปี พ.ศ. 2550 2551 2553 และ 2555 (สำนักงานเศรษฐกิจการเกษตร, 2555) และเป็นสารกำจัดแมลงกลุ่มหนึ่งที่เกษตรกรไทยนำมาใช้กำจัดแมลงศัตรูพืชในนาข้าว (Chaiwong et al., 2013) ซึ่งพบว่ามีสารตกค้างอยู่ในดินและน้ำที่ใช้ในนาข้าว (Zhang et al., 2012) เมื่อมีการใช้สารเคมีกลุ่มนี้อย่างแพร่หลาย จึงอาจจะส่งผลกระทบต่อสัตว์ที่เป็นศัตรูธรรมชาติซึ่งมีประโยชน์ต่อระบบนิเวศนาข้าวทำให้มีจำนวนน้อยลงไปด้วย

แมงมุมเป็นสัตว์ขาข้อกลุ่มหนึ่งที่อาศัยในระบบนิเวศนาข้าว มีบทบาทเป็นตัวห้ำที่สำคัญสามารถควบคุมจำนวนประชากรของแมลงศัตรูข้าวได้หลายชนิด (Barrion and Litsinger, 1995; Riechert and Lockley, 1984) แมงมุมที่พบได้มากที่สุด 3 กลุ่มแรกในระบบนิเวศนาข้าว คือ แมงมุมเขี้ยวยาว (family Tetragnathidae) แมงมุมใยกลม (family Araneidae) และแมงมุมสุนัขป่า (family Lycosidae) (ชุตินา สันธนาพิพัฒน์, 2555; ญัฐกฤษ ทองน้อย, 2556; ภาณุพงษ์ ทองเปรม, 2554; วิภาดา วังศิลาบัตร, 2531; วิภาดา วังศิลาบัตร, 2539) หากเกษตรกรมีการฉีดพ่นสารกำจัดแมลง จึงอาจส่งผลกระทบต่อแมงมุมที่มีประโยชน์เหล่านี้ได้ เมื่อพิจารณาจากพฤติกรรมการหาอาหารของแมงมุมเขี้ยวยาวและแมงมุมใยกลม พบว่าแมงมุมทั้ง 2 กลุ่ม ต้องชกใยในการดักจับเหยื่อ ฟันที่อาศัยจึงต้องมีความเหมาะสมต่อการชกใย ดังนั้นแมงมุมทั้ง 2 กลุ่ม จึงไม่เหมาะที่จะนำมาใช้เป็นตัวแทนศึกษาผลกระทบของสารกำจัดแมลง ในแง่การศึกษาทางพิษวิทยาในห้องปฏิบัติการ เนื่องจากต้องใช้พื้นที่มากและจัดการได้ยาก แต่แมงมุมสุนัขป่าที่อาศัยในระบบนิเวศนาข้าว มีพฤติกรรมในการ

ออกสู่อากาศที่อาศัยอยู่ตามพื้นดิน (Foelix, 2011) และตามโคนต้นข้าว ซึ่งเป็นที่อยู่อาศัยของแมลงศัตรูข้าวที่สำคัญหลายชนิด เช่น เพลี้ยกระโดดสีน้ำตาล (Chaiyawat and Chan-uthai, 2001; Heong, Bleih, and Rubia, 1991) และเพลี้ยจักจั่นสีเขียว พฤติกรรมดังกล่าวจึงมีโอกาสนำให้แมงมุมสุนัขป่าได้รับและสัมผัสกับสารเคมีสังเคราะห์กำจัดแมลงที่เกษตรกรฉีดพ่น จนเกิดการตกค้างอยู่ตามต้นข้าวและพื้นดินได้ (Babczynska, Wilczek, and Migula, 2006; Hodge and Vink, 2000; Hof, Heimann, and Römbke, 1995) มากกว่าแมงมุมเขียวยาว และแมงมุมใยกลมที่อาศัยอยู่บริเวณยอดข้าว (วิภาดา วังศิลาบัตร, 2539) แต่การศึกษาผลกระทบของสารกำจัดแมลงคลอร์ไพริฟอส ต่อกลุ่มแมงมุมสุนัขป่ายังมีไม่มากนัก โดยเฉพาะอย่างยิ่งในประเทศไทย ยังไม่มีการศึกษาผลจากการได้รับสารคลอร์ไพริฟอสในแมงมุม จากการที่ผู้วิจัยเคยสำรวจแมงมุมด้วยวิธีการเดินหาแบบเห็นตัว ในพื้นที่นาข้าวของเกษตรกรที่อำเภอดอนตูม จังหวัดนครปฐม ซึ่งมีทั้งนาข้าวที่มีการฉีดพ่นสารกำจัดแมลงคลอร์ไพริฟอส และนาข้าวแบบอินทรีย์ที่ไม่มีการใช้สารเคมีสังเคราะห์กำจัดศัตรูพืช พบแมงมุมสุนัขป่า *Wadicosa fidelis* เป็นชนิดที่สามารถพบเห็นได้ง่าย และจำแนกความแตกต่างจากแมงมุมสุนัขป่าชนิดอื่นในพื้นที่ได้ค่อนข้างชัดเจน อีกทั้งยังสามารถพบแมงมุม *W. fidelis* ตัวเต็มวัยทั้งเพศผู้และเพศเมียได้ตลอดทุกฤดูกาล

ดังนั้นในงานวิจัยนี้จึงทำการศึกษาความเป็นพิษเฉียบพลัน (acute) และพิษกึ่งเฉียบพลัน (subacute effects) ของสารคลอร์ไพริฟอสต่อแมงมุมสุนัขป่า *W. fidelis*

วัตถุประสงค์ของการศึกษา

1. ศึกษาความเป็นพิษเฉียบพลัน (lethal effects) ของสารคลอร์ไพริฟอสต่อแมงมุม *W. fidelis*
 - 1.1 เพื่อทราบความรุนแรงของสารคลอร์ไพริฟอสในระดับความเข้มข้นที่ระบุบนฉลากต่อการตายของแมงมุม *W. fidelis*
 - 1.2 เพื่อทราบระดับความเข้มข้นของสารคลอร์ไพริฟอสที่ทำให้แมงมุมตาย 50 เปอร์เซ็นต์ (median lethal concentration, LC₅₀)
2. ศึกษาความเป็นพิษกึ่งเฉียบพลัน (subacute effects) ของสารคลอร์ไพริฟอสต่อแมงมุม *W. fidelis*
 - 2.1 เพื่อทราบประสิทธิภาพในการกินเหยื่อของแมงมุมที่ได้รับสารคลอร์ไพริฟอสระดับความเข้มข้นที่ LC₅₀, LC₃₀ และ LC₁₀
 - 2.2 เพื่อทราบผลกระทบที่เกิดต่อกิจกรรมของเอนไซม์ Acetylcholinesterase ในแมงมุมที่ได้รับสารคลอร์ไพริฟอสระดับความเข้มข้นที่ LC₅₀, LC₃₀ และ LC₁₀ ในระยะเวลา 48 ชั่วโมง
 - 2.3 เพื่อทราบผลกระทบที่เกิดต่อกิจกรรมของเอนไซม์ Catalase ในแมงมุมที่ได้รับสารคลอร์ไพริฟอส ระดับความเข้มข้นที่ LC₅₀, LC₃₀ และ LC₁₀ ในระยะเวลา 48 ชั่วโมง

ประโยชน์ที่ได้รับ

1. ได้ทราบความเป็นพิษของสารคลอโรไพริฟอส ในระดับความเข้มข้นที่ระบุบนฉลาก ต่อการตายของแมงมุม *W. fidelis*
2. ได้ทราบค่า LC_{50} ของสารคลอโรไพริฟอสต่อแมงมุม *W. fidelis*
3. เมื่อทราบความเป็นพิษของสารคลอโรไพริฟอสที่เกิดต่อแมงมุม *W. fidelis* แล้ว อาจเป็นข้อมูลพื้นฐานเพื่อใช้ในการพิสูจน์ว่า ความหลากหลายและจำนวนประชากรของแมงมุมที่ลดลง หรือเปลี่ยนแปลงไป อาจเป็นเพราะได้รับผลกระทบจากการใช้สารเคมีกำจัดแมลง
4. เมื่อทราบความเป็นพิษของสารคลอโรไพริฟอสจากการศึกษานี้ น่าจะช่วยเป็นข้อมูลพื้นฐานให้ผู้ใช้อำนาจกำจัดแมลงเช่นไฟเลข 40 มีความตระหนักถึงผลกระทบที่จะเกิดต่อตนเอง และสิ่งมีชีวิตอื่นได้มากขึ้น

ขอบเขตการศึกษา

ศึกษาผลกระทบของสารคลอโรไพริฟอสทั้งในแง่ความเป็นพิษเฉียบพลัน (acute effect) และกึ่งเฉียบพลัน (subacute effects) ต่อแมงมุม *W. fidelis* ตัวเต็มวัย ที่เก็บจากนาข้าวแบบอินทรีย์พื้นที่ 13 ไร่ โดยไม่มีการใช้สารเคมีสังเคราะห์กำจัดศัตรูพืช ตำบลทุ่งพิชัย อำเภอดอนตูม จังหวัดนครปฐม โดยนำมาศึกษาภายใต้สภาวะห้องปฏิบัติการ ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยศิลปากรพระราชวังสนามจันทร์

การใช้อักษรย่อ

คำศัพท์	อักษรย่อ
anterior retrolateral tegular process	a.r.l.p
acetylcholinesterase	AChE
anterior eyes row	AE row
catalase	CAT
cholinesterase	ChE
centimeter	cm
conductor	cond
embolus	emb
foveolar	f

คำศัพท์	อักษรย่อ
gram	g
glutathione peroxidase	GPx
liter	l
lethal concentration	LC
minute	min
milliliter	ml
millimeter	mm
nanometer	nm
organophosphate	OP
posterior retrolateral tegular process	p.rl.p
potassium phosphate buffer	PBS
posterior eyes row	PE row
posterior lateral eyes	PLE
posterior median eyes	PME
part per million	ppm
reactive oxygen species	ROS
spermathecae	s
scanning electron microscope	SEM
superoxide dismutase	SOD
tegulum apophysis	teg.ap
microgram	μg

บทที่ 2 บทตรวจเอกสาร

แมงมุม (Spiders)

แมงมุมเป็นสัตว์ไม่มีกระดูกสันหลังในกลุ่มสัตว์ขาข้อ (arthropod) ซึ่งมีความหลากหลายทางชีวภาพสูง มีการแพร่กระจายทั่วไป อาศัยอยู่ได้เกือบทุกระบบนิเวศ ยกเว้นในระบบนิเวศที่เป็นมหาสมุทรเปิด ในปัจจุบันมีแมงมุมที่ถูกค้นพบและจัดจำแนกแล้ว 114 วงศ์ 3,974 สกุล และมีจำนวนชนิดมากถึง 45,776 ชนิด (World spider catalog, 2015)

แมงมุมส่วนใหญ่มีขนาดตัวค่อนข้างเล็ก (ความยาวลำตัวประมาณ 2-10 mm) ที่พบเห็นได้ทั่วไปเช่นแมงมุมกระโดดในวงศ์ Salticidae (รูปที่ 2-1 ก.) แต่ก็ยังมีแมงมุมขนาดใหญ่ที่ขนาดลำตัวยาวกว่า 10 cm เช่น แมงมุมใยทอง (*Nephila* sp.) เพศเมีย เป็นแมงมุมที่มีขนาดใหญ่ในวงศ์ Nephilidae (รูปที่ 2-1 ข. และรูปที่ 2-4 ข.) ตัวบึ้ง หรือ ทารันทูล่า (tarantula) ซึ่งเป็นแมงมุมโบราณในวงศ์ Theraphosidae (รูปที่ 2-1 ค. และรูปที่ 2-4 ก.) โดยส่วนใหญ่แมงมุมเพศผู้มักจะมีขนาดเล็กกว่าแมงมุมเพศเมีย และมีอายุขัยที่สั้นกว่า



ก.



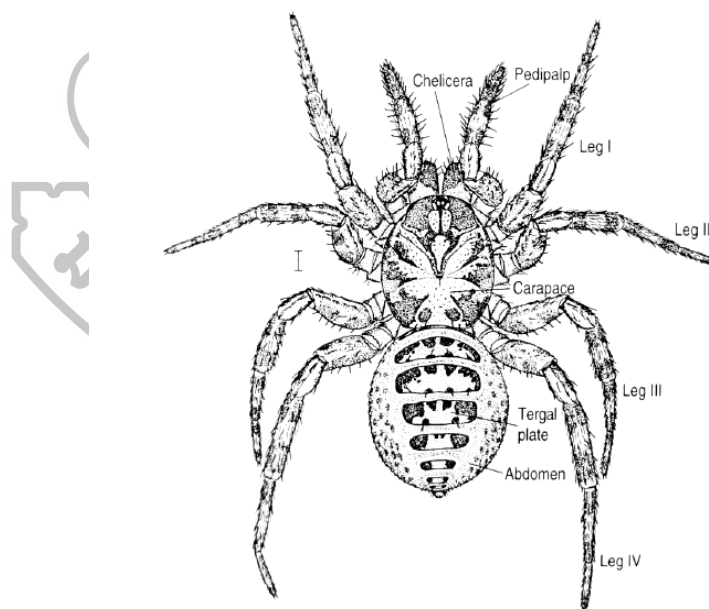
ข.



ค.

รูปที่ 2-1 ตัวอย่างแมงมุมในวงศ์ต่างๆ; ก.) แมงมุมกระโดดในวงศ์ Salticidae ขนาดความยาวลำตัวน้อยกว่า 10 mm, ข.) แมงมุมใยทองเพศเมียเป็นแมงมุมใยกลมในวงศ์ Nephilidae ขนาดความยาวลำตัวมากกว่า 10 mm, ค.) บึ้งสีน้ำเงิน เป็นแมงมุมโบราณขนาดใหญ่ในวงศ์ Theraphosidae

แมงมุมถูกจัดจำแนกอยู่ใน Phylum Arthropoda; Class Arachnida; Order Araneae โดยแบ่งออกเป็น 3 Suborder คือ 1.) Suborder Mesothelae เป็นแมงมุมโบราณที่สุด โดยร่างกายยังคงถูกแบ่งเป็นปล้องๆ ในส่วนท้อง (abdomen) มีแผ่นแข็งปกคลุมด้านบนส่วนท้องในแต่ละปล้องเรียกว่า tergal plate (รูปที่ 2-2) หายใจโดยใช้ book lung สมาชิกใน Suborder นี้พบเพียงหนึ่งวงศ์เท่านั้นคือ Family Liphistiidae 2.) Suborder Mygalomorphae ยังเป็นกลุ่มแมงมุมโบราณ โดยส่วนมากมีขนาดใหญ่ตัวเต็มวัยบางชนิดมีขนาดลำตัวยาวกว่า 10 cm มีการหายใจโดยใช้ book lung ลักษณะเขี้ยวเป็นแบบขนาน (parallel) มีอวัยวะชักใยคู่หลัง (posterior spinnerets) ยาว (รูปที่ 2-3) เช่นพวกบึ้งหรือทาร์ันทูล่า 3.) Suborder Araneomorphae เป็นแมงมุมที่มีวิวัฒนาการสูงขึ้นมากกว่า 2 กลุ่มแรก โดยมีลักษณะของเขี้ยวเป็นแบบไขว้กัน (paraxial) จำนวนของ book lung ลดลง และใช้ระบบท่อลม (tracheal spiracle) ช่วยในการหายใจ (รูปที่ 2-4) มีหลายชนิดอาศัยอยู่บนใบ และใช้ใยในการดักจับเหยื่อ เช่น แมงมุมเขี้ยวยาวในวงศ์ Tetragnathidae แมงมุมใยกลมในวงศ์ Araneidae บางชนิดเป็นผู้ล่าจับตะครุบเหยื่อโดยไม่ต้องใช้ใย เช่น แมงมุมกระโดดในวงศ์ Salticidae และแมงมุมสุนัขป่าในวงศ์ Lycosidae เป็นต้น (Murphy, F. and Murphy, 2000)



รูปที่ 2-2 ลักษณะของแมงมุมใน Suborder Mesothelae (*Liphistius murphyorum* เพศเมีย) ส่วนท้องจะแบ่งออกเป็นปล้องที่ชัดเจน มีแผ่น tergal plate อยู่ด้านบนของแต่ละปล้อง
ที่มา: Murphy F. and Murphy J., **An introduction to the spiders of Southeast Asia** (Kuala Lumpur: United Selangor Press, 2000), 15

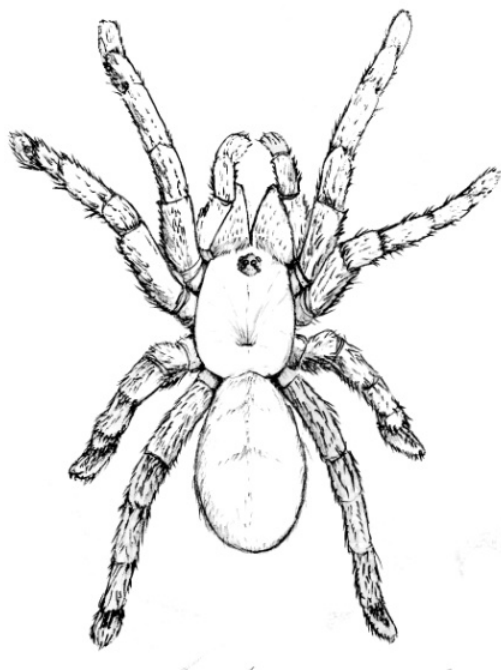


ก.

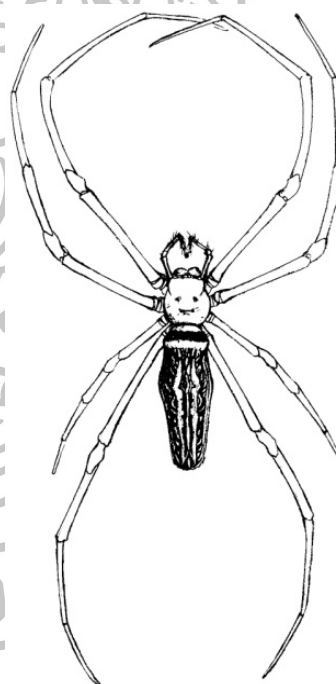


ข.

รูปที่ 2-3 ลักษณะการวางตัวของเขี้ยวแมงมุม ก.) Suborder Mygalomorphae ลักษณะเขี้ยวเป็นแบบ parallel ข.) Suborder Araneomorphae ลักษณะเขี้ยวเป็นแบบ paraxial



ก.

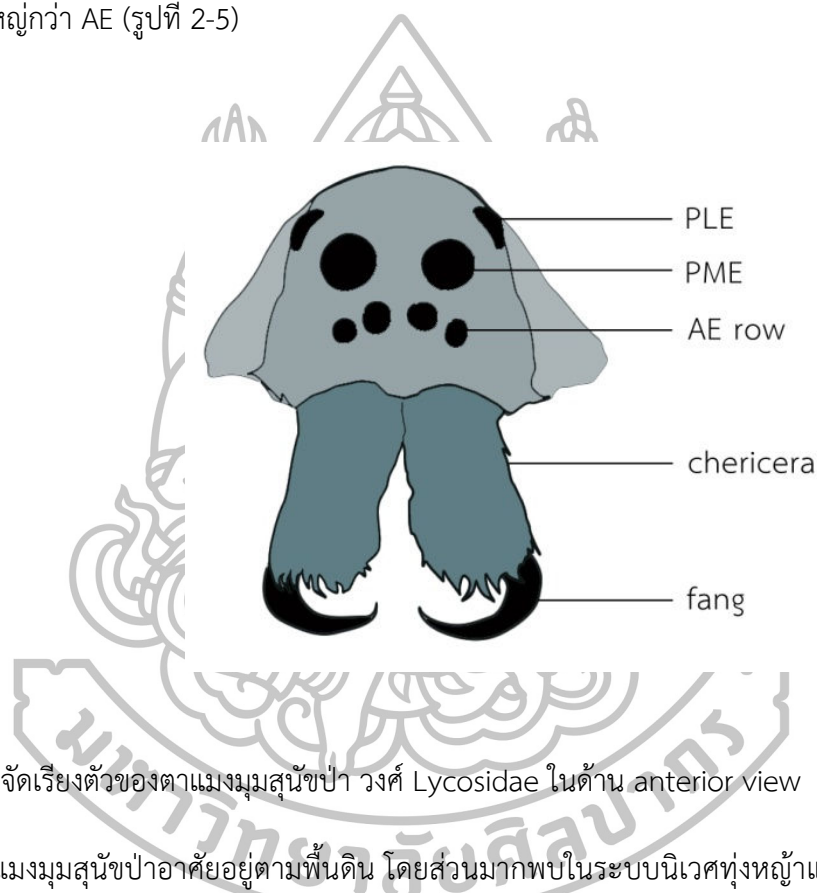


ข.

รูปที่ 2-4 ตัวอย่างชนิดของแมงมุมกลุ่ม megalomorph และ araneomorph; ก.) Suborder Mygalomorphae บั้งสีน้ำเงิน *Haplopelma lividum*, ข.) Suborder Araneomorphae แมงมุมใยทองเทศเมีย *Nephila* sp.

แมงมุมสุนัขป่า (Wolf spider)

แมงมุมสุนัขป่าเป็นแมงมุมในวงศ์ Lycosidae มาจากภาษากรีกคำว่า Lycos แปลว่าหมาป่า มีจำนวนสมาชิก 123 สกุล ทั่วโลกค้นพบแล้ว 2,403 ชนิด (World Spider Catalog, 2015) มีตา 8 ตา แบ่งเป็น 3 แถว 4 :2 :2 คือตาแถวหน้าสุด (anterior eyes row; AE) มี 4 ตา ขนาดเล็กที่สุด เรียงชิดติดกัน แถวที่ 2 มี 2 ตา เป็นตาคู่กลางแถวหลัง (posterior median eyes; PME) มีขนาดใหญ่สุด แถวที่ 3 มี 2 ตา เป็นตาคู่ริมแถวหลัง (posterior lateral eyes; PLE) มีขนาดเล็กกว่า PME แต่มักใหญ่กว่า AE (รูปที่ 2-5)



รูปที่ 2-5 การจัดเรียงตัวของตาแมงมุมสุนัขป่า วงศ์ Lycosidae ในด้าน anterior view

แมงมุมสุนัขป่าอาศัยอยู่ตามพื้นดิน โดยส่วนมากพบในระบบนิเวศทุ่งหญ้าและพื้นที่เปิดโล่ง หรือบริเวณใกล้แหล่งน้ำ บางชนิดมีการสร้างใยปกคลุมยอดหญ้าและอาศัยอยู่บนใยซึ่งทำเป็นรู (funnel) เข้าไป เช่น แมงมุมสุนัขป่าในสกุล *Hippasa* (รูปที่ 2-6) อาหารโดยทั่วไปของแมงมุมสุนัขป่าคือแมลงและสัตว์ไม่มีกระดูกสันหลังขนาดเล็กที่อาศัยตามหน้าดิน แมงมุมสุนัขป่าบางชนิดมีขนาดใหญ่ ขนาดลำตัวยาวกว่า 2 cm เช่น แมงมุมสุนัขป่าทารันตุล่า *Lycosa tarantula* และแมงมุมสุนัขป่าในสกุล *Hogna* เป็นต้น แต่โดยทั่วไปแมงมุมสุนัขป่าจะมีขนาดลำตัวยาวประมาณ 10-20 mm เช่น แมงมุมสุนัขป่าในสกุล *Pardosa*, *Hippasa*, *Throchosa* และ *Wadicosa* เป็นต้น



รูปที่ 2-6 โยของแมงมุมสุนัขป่าในสกุล *Hippasa* ซักโยปกคลุมพื้นหญ้า ตรงกลางโยเป็นรู (funnel) เข้าไปเพื่อใช้หลบศัตรู

แมงมุมสุนัขป่าในสกุล *Wadicosa*

แมงมุมในสกุล *Wadicosa* ถูกค้นพบครั้งแรกโดย Zyuzin ในปี 1985 โดยมีชนิดที่ถูกใช้ในการเขียนคำอธิบายลักษณะในการจัดจำแนกอยู่ 2 ชนิด คือ *W. commoventa* และ *W. fidelis* มีลักษณะภายนอกทั่วไปคล้ายกับแมงมุมบางชนิดในสกุล *Pardosa* บางครั้งอาจจำเป็นต้องใช้ระบบสืบพันธุ์ช่วยในการจัดจำแนก โดยลักษณะสำคัญของแมงมุมในสกุล *Wadicosa* มีดังนี้

ลำตัว : เป็นแมงมุมขนาดกลาง ขนาดความยาวของส่วน carapace ประมาณ 4-6 mm โดยทั่วไปร่างกายมีสีเข้ม บริเวณกลาง carapace มีลักษณะคล้ายรูปดาวสีอ่อนกว่าบริเวณริมขอบของ carapace ด้านหลังของส่วนท้องบริเวณเยื้องมาด้านหน้ามีลายสีเข้มลักษณะคล้ายรูปหอกแทงย้อนลงไปด้ายท้าย สลับกับจุดสีอ่อนวางตัวเป็นคู่ในแนวขวาง โดยกลางจุดสีอ่อนที่อยู่ตรงบริเวณด้านท้ายของส่วนท้องจะมีขนสีเข้มตั้งตรงแทงยื่นออกมา (Kronstedt and Zyuzin, 2009)

ตา : เมื่อมองจากด้านหน้า ตาแถวหน้าสุด (AE) มีลักษณะค่อนข้างโค้งงอ (procurved) เล็กน้อย และมีความยาวแกวสั้นกว่าแกวของตาคู่กลางแถวหลัง (PME) ส่วนความยาวแกวของตาคู่กลางแถวหลังสั้นกว่าแกวของตาคู่ริมแถวหลังเล็กน้อย (PLE) เมื่อพิจารณาระหว่างตาในแถวหน้าสุด (AE) จะเห็นว่า ตาคู่กลางแถวหน้า (AME) ค่อนข้างใหญ่กว่าตาคู่ริมแถวหน้า (ALE) มีอัตราส่วนเส้นผ่านศูนย์กลางของ AME/ALE ประมาณ 1.3-1.4 (Kronstedt and Zyuzin, 2009)

ฟัน : ซี่ฟันบน chelicerae มีเฉพาะซี่ฟันแถวหลัง (retromarginal teeth) จำนวน 3 ซี่ (Kronstedt and Zyuzin, 2009)

ขา : เรียงตามลำดับความยาวเป็น $4 > 1 > 2 > 3$ (Kronestedt and Zyuzin, 2009)

Male palp : บริเวณ tegulum มี retrolateral process ยื่นลงไปทางด้าน ventral ส่วนของ subtegulum ค่อนข้างใหญ่ และแทรกตัวอยู่ด้านในของ bulbus และถูกปกคลุมด้วย cuticle ที่มีลักษณะเป็นคลื่น ส่วนปลายของ bulbus ติดกับ conductor ของ embolus (Kronestedt and Zyuzin, 2009)

Epigyne : มีช่อง foveola แบ่งบริเวณด้านหน้า (anterior part) ออกเป็นส่วนๆ อาจจะมากกว่า 2 หรือน้อยกว่า (Kronestedt and Zyuzin, 2009)

ปัจจุบันแมงมุมในสกุล *Wadicosa* มีจำนวนสมาชิก 11 ชนิด (World spider catalog, 2015) คือ *W. benadiria* (Caporiacco, 1940) (รูปที่ 2-7 ก.-ค.), *W. cognata* Kronestedt, 2015 (รูปที่ 2-7 จ.-ฉ.), *W. commoventia* Zyuzin, 1985, *W. daliensis* Yin, Peng & Zhang, 1997, *W. russellsmithi* Kronestedt, 2015 (รูปที่ 2-7 ง.), *W. jocquei* Kronestedt, 2015 (รูปที่ 2-7 ช.-ญ.), *W. okinawensis* (Tanaka, 1985), *W. oncka* (Lawrence, 1927), *W. prasante* Ahmed *et al.*, 2014, *W. quadrifera* (Gravely, 1924) และ *W. fidelis* (O. Pickard-Cambridge, 1872)

อนุกรมวิธาน

Kingdom : Animalia

Phylum : Arthropoda

Class : Arachnida

Order : Araneae

Family : Lycosidae Sundevall, 1833

Genus : *Wadicosa* Zyuzin, 1985

Species : *Wadicosa fidelis* (O.P.-Cambridge, 1872)



รูปที่ 2-7 ตัวอย่างแมงมุมในสกุล *Wadicosa*, ก.) *W. benadira* เพศผู้จาก Kenya, ข.) *W. benadira* เพศผู้จาก Marsabit, ค.) *W. benadira* เพศเมียจาก Kenya, ง.) *W. russellsmithi* เพศเมีย, จ.- ฉ.) *W. cognata* เพศผู้และเพศเมียจาก Kenya, Lake Magadi, ช.) *W. jocquei* เพศผู้จาก Comoros, Pomon, ฉ.) *W. jocquei* เพศเมียจาก Mayotte

ที่มา: Kronstedt T., "Species of *Wadicosa* (Araneae, Lycosidae): transfer of two species from *Pardosa* and description of three new species from Africa." **European Journal of Taxonomy** 132 (2015), 7

บทบาทของแมงมุมสุนัขป่าในนาข้าว

แมงมุมจัดเป็นสัตว์ผู้ล่าในห่วงโซ่อาหาร สามารถกินเหยื่อได้หลากหลาย เมื่อพิจารณาในเชิง top-down effects แมงมุมมีส่วนช่วยเร่งการหมุนเวียนสารอาหารและพลังงานในระบบนิเวศได้ เนื่องจากเหยื่อของแมงมุมส่วนใหญ่เป็นแมลง โดยเฉพาะแมงมุมที่หากินตามพื้นดิน เช่น แมงมุมสุนัขป่า มีเหยื่ออาหารบางส่วนเป็นกลุ่มแมลงที่กินซากพืชซากสัตว์ (detritivore) หรือเห็ดรา (fungivore) เช่น แมลงหางคืด (springtails) ในอันดับ Collembola (Nyffeler, Sterling, and Dean, 1994) เป็นต้น จึงมีโอกาที่การหมุนเวียนพลังงานและธาตุอาหาร เช่น ไนโตรเจน เกิดได้เร็วขึ้น กล่าวคือแมลงในกลุ่มดังกล่าวจะกินซากพืชซากสัตว์และเห็ดราเป็นอาหาร ดังนั้นธาตุไนโตรเจนจึงถูกส่งผ่านเข้ามาสู่แมลงได้โดยตรง โดยไม่ต้องผ่านผู้ผลิต (producer) ในห่วงโซ่อาหาร ดังนั้นธาตุไนโตรเจนจึงถูกส่งผ่านไปยังผู้บริโภคลำดับต่อไปในห่วงโซ่อาหารได้เร็วขึ้น (Wise et al., 1999)

ในแง่ของระบบนิเวศเกษตรกรรม แมงมุมมีบทบาทสำคัญในการควบคุมจำนวนประชากรของแมลงศัตรูพืช (Pearce and Zalucki, 2006; Schmidt, Thies, and Tschamtké, 2009; Symondson, Sunderland, and Greenstone, 2002) ในบริเวณที่มีแมงมุมอาศัยอยู่จะช่วยให้พืชมีอัตราการถูกทำลายโดยแมลงศัตรูพืชน้อยกว่าในบริเวณที่ไม่มีแมงมุมอาศัยอยู่ (Maloney, Drummond, and Alford, 2003) จะเห็นว่าถ้าเกษตรกรมีการจัดการพื้นที่การเกษตรให้เอื้อต่อการอาศัยของแมงมุมผู้ล่าชนิดต่างๆ เช่น การทำพื้นที่ให้มีที่หลบภัย และให้ความชื้นที่เหมาะสม จะช่วยลดอัตราการถูกทำลายของพืชผักได้มากขึ้น (Riechert and Bishop, 1990)

แมงมุมโดยทั่วไปกินเหยื่อแบบไม่จำเพาะเจาะจงกับชนิดเหยื่อ (polyphagous) ทำให้แมงมุมสามารถควบคุมจำนวนประชากรของแมลงที่เป็นเหยื่อได้หลายชนิด ในบางครั้งการฆ่าเหยื่อให้ตายอาจไม่ได้เป็นไปเพื่อตอบสนองต่อความต้องการอาหารของแมงมุม เนื่องจากมีแมงมุมหลายชนิดที่ทำให้เหยื่อตายโดยไม่ได้อินเป็นอาหาร เช่น ในกลุ่มแมงมุมใยกลม (orb-web spider) สกุล *Argiope*, *Gastracantha*, *Salassinia*, *Micrathena*, และ *Uloborus* จะมีการสร้างใยที่มีการตกแต่งด้วยเส้นใยชนิดพิเศษซึ่งเรียกว่า “stabilimentum” มีความสามารถในการสะท้อนแสง UV และดึงดูดแมลงให้มาติดบนใยได้จำนวนมาก แต่แมงมุมไม่ได้กินแมลงทั้งหมดที่มาติดบนใย แมลงบางส่วนต้องตายไปโดยไม่ได้ถูกบริโภค เรียกเหตุการณ์เช่นนี้ว่า “wasteful killing”

นอกจากแมงมุมในกลุ่ม orb-web ที่ทำให้แมลงจำนวนมากตายอยู่บนใยโดยบังเอิญแล้วยังมีแมงมุมอีกกลุ่มหนึ่งซึ่งออกล่าเหยื่อโดยเข้าจับเหยื่อโดยตรงเรียกแมงมุมกลุ่มนี้ว่า แมงมุนักล่า เช่น แมงมุมสุนัขป่าซึ่งเป็นนักล่าบนพื้นดิน (ground hunter) Richert and Rockley (1984) รายงานว่าแมงมุมสุนัขป่าบางชนิดสามารถฆ่าเหยื่อให้ตายมากกว่าที่ต้องการกินเป็นอาหารถึง 50 เท่า จากการศึกษาของ Persons (1999) พบว่าแมงมุมสุนัขป่า *Schizocosa ocreata* ฆ่าจิ้งหรีดตายเป็นจำนวนมากแม้ว่าไม่มีความต้องการกินอาหารแล้วก็ตาม ทำให้เห็นว่าแมงมุมสุนัขป่าสามารถช่วย

ควบคุมจำนวนประชากรของแมลงหลายชนิดได้ โดยเฉพาะกลุ่มแมลงกินพืช (phytophagous) ที่มีอัตราการเจริญของประชากรสูงๆ เมื่อมีแมงมุมอาศัยอยู่ในบริเวณที่มีแมลงดังกล่าวจะช่วยลดอัตราการเจริญของประชากรแมลงเหล่านั้นได้

แมงมุมสุนัขป่ากินแมลงและสัตว์ไม่มีกระดูกสันหลังขนาดเล็กที่อาศัยอยู่ตามพื้นดินเป็นอาหาร เช่น จิ้งหรีด ตัวบางชนิด หรือแม้แต่แมลงที่อาศัยอยู่ตามโคนของต้นข้าว เช่น เพลี้ยกระโดดสีน้ำตาล และเพลี้ยจักจั่นสีเขียว เป็นต้น แต่ในบางครั้งยังพบว่าแมงมุมสุนัขป่ายังสามารถล่าเหยื่อที่อาศัยอยู่ระดับเรือนยอดของต้นข้าวได้ Takada et al., (2013) รายงานว่า มวน mirrid bug (*Stenotus rubrovittatus*) ซึ่งเป็นแมลงศัตรูข้าวที่สำคัญในประเทศญี่ปุ่น จะบินขึ้นมาชนกับใยของแมงมุมเขียวยาว (*Tetragnatha* sp.) ที่ซึ่งอยู่ในแนวขนานกับพื้นนา แล้วร่วงลงสู่พื้นดินด้านล่างซึ่งเป็น hunting zone ของแมงมุมสุนัขป่า ทำให้ mirrid bug กลายเป็นเหยื่อของแมงมุมสุนัขป่าได้ การที่แมงมุมสุนัขป่ากินแมลงได้หลากหลาย (Malony, Drummond, and Alford, 2003) และเป็นแมงมุมกลุ่มเด่นที่มีจำนวนมากในนาข้าว (ชุตินา สันธนาพิพัฒน์, 2555; ญัฐกฤษ ทองน้อย, 2556; ภาณุพงษ์ ทองเปรม, 2554; วิภาดา วังศิลาบัตร, 2531; วิภาดา วังศิลาบัตร, 2539) ดังนั้นแมงมุมสุนัขป่าจึงเป็นตัวห้ำหรือผู้ล่า (predator) ที่มีความสำคัญต่อเกษตรกรรมในแง่ของการควบคุมแมลงศัตรูพืชโดยชีววิธี แต่จากการที่เกษตรกรเลือกใช้การฉีดพ่นสารฆ่าแมลงสังเคราะห์เพื่อกำจัดแมลงศัตรูพืช เช่น สารเคมีในกลุ่มพาราไธออน ไคคลอวอส และคลอร์ไพริฟอส แทนการปล่อยให้แมงมุมซึ่งเป็นตัวห้ำควบคุมประชากรของแมลงศัตรูพืชตามธรรมชาติ ก็เป็นอีกปัจจัยหนึ่งซึ่งส่งผลกระทบต่อสมดุลประชากรระหว่างตัวห้ำกับแมลงศัตรูพืช ทำให้เกิดการระบาดของแมลงศัตรูพืชได้

สารกำจัดศัตรูพืช (Pesticides)

สารกำจัดศัตรูพืช เป็นสารในกลุ่มวัตถุอันตรายที่ใช้ในการควบคุมศัตรูพืชและสิ่งมีชีวิตต่างๆ ที่ไม่พึงประสงค์ (pests) สามารถแบ่งตามคุณสมบัติทางเคมีออกได้เป็น 3 กลุ่ม (กลุ่มควบคุมวัตถุอันตราย และคณะ, 2556) คือ

1. สารประกอบอินทรีย์ : เป็นสารที่มีองค์ประกอบหลักเป็นแร่ธาตุซึ่งมีอยู่แล้วในธรรมชาติ แต่ไม่มีธาตุคาร์บอน เป็นองค์ประกอบ มักมีความเสถียรสูง ส่วนใหญ่มีพิษสะสมในร่างกายของสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนมเนื่องจากมีองค์ประกอบของธาตุที่เป็นโลหะหนัก เช่น สารหนู พรอท เป็นต้น แต่ในปัจจุบันสารในกลุ่มนี้ไม่ค่อยถูกนำมาใช้แล้ว

2. สารสกัดจากธรรมชาติ : เป็นสารที่ผ่านกระบวนการสกัดจากวัตถุดิบในธรรมชาติ มีความเป็นอันตรายต่อผู้ใช้และสิ่งมีชีวิตนอกกลุ่มเป้าหมายน้อย เช่น ตะไคร้หอม *Cymbopogon nardus* (Linn.) (Phasomkusolsil and Soonwera, 2011) และสารสกัดสะเดา *Azadirachta indica* A.Juss. var. *siamensis* Valetton (อภิชาติ ลาวัณย์ประเสริฐ และ บรรยง นิชรรัตน์, 2546)

เป็นต้น ในปัจจุบันสารในกลุ่มนี้ถูกส่งเสริมให้ใช้เป็นสารกำจัดและขับไล่แมลง ในกลุ่มเกษตรกรที่ทำการเกษตรแบบอินทรีย์

3. สารประกอบอินทรีย์ : เป็นสารที่ถูกสังเคราะห์ขึ้นและใช้กันอย่างแพร่หลายที่สุด มีส่วนประกอบของ คาร์บอน ไฮโดรเจน และธาตุอื่นๆ เช่น ออกซิเจน กำมะถัน ไนโตรเจน คลอรีน และ ฟอสฟอรัส เป็นต้น ความรุนแรงและอันตรายขึ้นอยู่กับชนิดของสารเคมีและปริมาณที่ใช้

โดยหน่วยงานพิทักษ์สิ่งแวดล้อม The Environmental Protection Agency (EPA) ซึ่งเป็นหน่วยควบคุมการใช้วัตถุอันตรายทางการเกษตรแห่งแรกในสหรัฐอเมริกา ได้ให้คำจำกัดความของคำว่า pesticides ว่า “สารกำจัดแมลงและศัตรูพืช อาจเป็นสารหรือส่วนผสมของสารใดๆ ที่ช่วยป้องกัน (preventing) ทำลาย (destroying) ขับไล่ (repelling) หรือทำให้ศัตรูพืชและสิ่งมีชีวิตต่างๆ ที่ไม่พึงประสงค์ ลดจำนวนลง (mitigating)” ตัวอย่างของสารกำจัดแมลงและศัตรูพืชเช่น สารกำจัดวัชพืช (herbicides) สารกำจัดเห็ดรา (fungicides) สารกำจัดหนอนตัวกลม (nematicides) สารกำจัดหนู (rodenticides) สารกำจัดเห็บไร (acaricides) และสารกำจัดแมลง (insecticides) เป็นต้น (Yu, 2015)

สารกำจัดแมลง (Insecticides)

สารกำจัดแมลงสามารถแบ่งออกเป็นประเภทต่างๆ ได้ตามรูปแบบโครงสร้างทางเคมี โดยสารแต่ละชนิดจะประกอบไปด้วยชื่อ 3 ชื่อ คือ ชื่อสามัญ (common name) ชื่อทางการค้า (trade name) และชื่อทางเคมี (chemical name) ชื่อสามัญส่วนใหญ่มักจะมาจากชื่อของสารที่มีหน้าที่ออกฤทธิ์และเป็นส่วนประกอบหลักสารกำจัดแมลงนั้นๆ ซึ่งมีการตั้งชื่อโดยนักวิทยาศาสตร์หรือผู้เชี่ยวชาญจากองค์กรต่างๆ เช่น สมาคมกีฏวิทยาสหรัฐอเมริกา (Entomological Society of America) เป็นต้น และเป็นที่ยอมรับร่วมกันในวงกว้าง ชื่อทางการค้ามาจากบริษัท หรือผู้ประกอบการที่มีส่วนรับผิดชอบในการผลิตสารกำจัดแมลงยี่ห้อนั้นๆ ในปัจจุบันพบว่าสารหลายชนิดมีชื่อการค้าต่างกัน แต่ถูกจัดเป็นสารกำจัดแมลงในกลุ่มเดียวกัน เพราะมีสารเคมีกลุ่มหลักและมีกลไกในการออกฤทธิ์แบบเดียวกัน ส่วนชื่อทางเคมีเป็นชื่ออ้างอิงการเรียกชื่อของสารเคมีในระบบ International Union of Pure and Applied Chemistry (IUPAC) (Yu, 2015)

สารกำจัดแมลงส่วนใหญ่เป็นสารเคมีสังเคราะห์ซึ่งเป็นสารประกอบอินทรีย์ สามารถแบ่งออกได้เป็นหลายกลุ่ม เช่น

1. สารประกอบออร์กาโนคลอรีน (organochlorine compounds) เป็นสารอินทรีย์ที่มีธาตุ คลอรีน เป็นองค์ประกอบ สารในกลุ่มนี้มีฤทธิ์ตกค้างนาน ความคงตัวสูง ละลายได้ดีในตัวทำละลายที่ไม่มีขั้ว เป็นสารกลุ่มแรกที่ทำมาใช้ในการควบคุมแมลงภายในอาคารและบ้านเรือน ปัจจุบันสารกลุ่มนี้หลายชนิดถูกจัดเป็นวัตถุอันตรายชนิดที่ 4 ตามพระราชบัญญัติวัตถุอันตราย พ.ศ. 2535

คือ ห้ามมิให้ ผลิต นำเข้า ส่งออก หรือมีไว้ในครอบครอง เนื่องจากมีความเป็นพิษต่อสัตว์เลี้ยงลูกด้วยน้ำนม เป็นสาเหตุที่ทำให้เกิดโรคมะเร็ง เพราะมีพิษสะสมในอวัยวะต่างๆ ตกค้างในสิ่งแวดล้อมนาน และมีการสะสมความเป็นพิษขึ้นในสัตว์ต่างๆ ตามลำดับห่วงโซ่อาหาร ตัวอย่างสารในกลุ่มนี้ เช่น ดีดีที (DDT) คลอเดน (chlordane) และ เฮปทาคลอร์ (heptachlor) เป็นต้น (กลุ่มควบคุมวัตถุอันตราย และคณะ, 2556)

2. สารประกอบออร์กาโนฟอสเฟต (organophosphate compounds) เป็นสารอินทรีย์ที่มีธาตุฟอสฟอรัสเป็นองค์ประกอบ ละลายได้ในน้ำและตัวทำละลายประเภทอินทรีย์ สามารถถูกดูดซึมเข้าสู่ตัวแมลงได้โดยการสัมผัส ออกฤทธิ์โดยเข้ายับยั้งการทำงานของเอนไซม์ในกลุ่ม cholinesterase (ChE) ซึ่งพบในระบบประสาทของคนและสัตว์ ตัวอย่างสารในกลุ่มนี้ เช่น ไดคลอร์วอส (dichlorvos) ไดอะซีนอน (diazinon) พาราไรออน (parathion) และ คลอร์ไพริฟอส (chlorpyrifos) เป็นต้น (กลุ่มควบคุมวัตถุอันตราย และคณะ, 2556)

3. สารประกอบคาร์บาเมต (carbamate compounds) เป็นสารอินทรีย์ที่มีธาตุไนโตรเจนเป็นองค์ประกอบ ลักษณะการออกฤทธิ์คล้ายสารในกลุ่มออร์กาโนฟอสเฟต คือ ยับยั้งเอนไซม์ ChE ตัวอย่างสารในกลุ่มนี้ เช่น โพรพอกเซอร์ (propoxur) คาร์บาริล (carbaryl) เบนไดโอคาร์บ (bendiocarb) เป็นต้น (กลุ่มควบคุมวัตถุอันตราย และคณะ, 2556)

4. สารกลุ่มไพรีทรอยด์สังเคราะห์ (synthetic pyrethroids) เป็นสารเคมีสังเคราะห์ซึ่งมีสูตรโครงสร้างโมเลกุลคล้ายกับสารไพรีทรินส์ (pyrethrins) เป็นสารเคมีในธรรมชาติพบในดอกเบญจมาศ (*Chrysanthemum*) มีประสิทธิภาพในการกำจัดแมลงสูง ปลอดภัยในการใช้ แต่ไม่ทนต่อแสง จึงมีการผลิตสารไพรีทรอยด์สังเคราะห์ขึ้นมาแทน สามารถทนต่อแสงได้นานกว่า สารกลุ่มนี้ออกฤทธิ์โดยตรงกับระบบประสาทของแมลง แต่ไม่มีฤทธิ์ตกค้างในร่างกายสัตว์เลี้ยงลูกด้วยน้ำนม สลายตัวเร็วในสิ่งแวดล้อม ตัวอย่างสารในกลุ่มนี้ เช่น อัลเลทริน (allethrin) ไบโອอัลเลทริน (bioallethrin) และ ไซเพอร์เมทริน (cypermethrin) เป็นต้น (กลุ่มควบคุมวัตถุอันตราย และคณะ, 2556)

5. สารกลุ่มคลอโรนิโคตินิล (chloronicotinyls) หรือเรียกว่า นิโอนิโคตินอยด์ (neonicotinoids) เป็นสารที่ออกฤทธิ์คล้ายกับนิโคตินแต่มีพิษต่อสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนมน้อยกว่า ออกฤทธิ์ต่อระบบประสาทของแมลงได้อย่างมีประสิทธิภาพ จัดเป็นสารชนิดดูดซึม ปัจจุบันถูกนำมาใช้เป็นสารกำจัดแมลงในบ้านเรือน เช่น ปลวก มด และ แมลงสาบ ตัวอย่างสารในกลุ่มนี้ เช่น อิมิดาโคลพริด (imidacloprid) เป็นต้น (กลุ่มควบคุมวัตถุอันตราย และคณะ, 2556)

6. สารกลุ่มเฟนิลไพราโซล (phenylpyrazoles) เป็นสารที่ใช้สำหรับกำจัดแมลงที่มีความต้านทานต่อสารกลุ่มออร์กาโนฟอสเฟต คาร์บาเมต และไพรีทรอยด์สังเคราะห์ เป็นสารชนิดดูด

ซีม ออกฤทธิ์โดยการสัมผัส และการกิน เช่น ฟิโพรนิล (fipronil) เป็นต้น (กลุ่มควบคุมวัตถุอันตราย และคณะ, 2556)

7. สารควบคุมการเจริญเติบโตของแมลง (insect growth regulators; IGR) สารในกลุ่มนี้มีฤทธิ์คล้ายฮอร์โมนของแมลง (hormone mimics) เช่น เฮกซาฟลูมูรอน (hexaflumuron) มีฤทธิ์ยับยั้งการสร้างผนังลำตัวแมลง (chitin synthesis inhibitors) ปัจจุบันมีการนำสารกำจัดแมลงในชนิดนี้มาทำเป็นผลิตภัณฑ์ในรูปแบบเหยื่อกำจัดปลวก ที่สามารถติดตั้งภายในตัวอาคารและฝังดินรอบตัวอาคาร นอกจากนี้สารในกลุ่มนี้ยังนำมาทำเป็นผลิตภัณฑ์สำหรับควบคุมลูกน้ำยุง และแมลงวัน เช่น สารไพริพ็อกซิเฟน (pyriproxifen) เป็นต้น (กลุ่มควบคุมวัตถุอันตราย และคณะ, 2556)

สารกำจัดแมลงยังถือเป็นกลุ่มวัตถุอันตรายอีกกลุ่มหนึ่ง ที่มีการนำเข้าในประเทศไทยสูงเป็นอันดับ 2 ในปี พ.ศ. 2556 และ 2557 โดยมีรายงานปริมาณสารเคมีกำจัดแมลงที่นำเข้า สูงถึง 13,910,544.21 กก. คิดเป็นมูลค่า 4,013,851,563.11 บาท เพิ่มสูงขึ้นจากปี 2556 ซึ่งมีปริมาณนำเข้า 12,660,992.44 กก. คิดเป็นมูลค่า 2,246,367,346.20 บาท (ตารางที่ 2-1) เมื่อพิจารณาจากรายชื่อวัตถุอันตรายที่มีการนำเข้ามากที่สุด 10 อันดับแรก ในปี พ.ศ. 2557 ดังตารางที่ 2-2 จะเห็นว่า สารคลอร์ไพริฟอสเป็นสารกำจัดแมลงเพียงชนิดเดียว ที่มีการนำเข้ามากที่สุดในปี 2557 และยังคงจัดให้เป็นวัตถุอันตรายชนิดที่ 3 ตามพระราชบัญญัติวัตถุอันตราย พ.ศ. 2535

กล่าวโดยสรุปเกี่ยวกับวัตถุอันตรายชนิดที่ 3 คือ เป็นวัตถุอันตรายที่มีความเป็นอันตรายหรือความเสี่ยงค่อนข้างสูง กฎหมายจึง กำหนดให้ผู้ผลิตหรือผู้นำเข้าต้องขอขึ้นทะเบียนวัตถุอันตรายและผู้ผลิต ผู้นำเข้า ผู้ส่งออก หรือผู้มีไว้ในครอบครอง ต้องได้รับอนุญาตให้ดำเนินการจากพนักงานเจ้าหน้าที่ก่อนจึงจะประกอบกิจการได้ โดยสถานที่ผลิตและสถานที่เก็บรักษาวัตถุอันตรายจะต้องเป็นไปตามข้อกำหนดในกฎกระทรวงของปี พ.ศ. 2537 ซึ่งออกตามความในพระราชบัญญัติวัตถุอันตราย พ.ศ. 2535 (กลุ่มควบคุมวัตถุอันตราย และคณะ, 2556)

ตารางที่ 2-1 ปริมาณการนำเข้าวัตถุอันตรายทางการเกษตร ประเภทสารเคมี ปี 2556-2557

ลำดับที่	ประเภทของวัตถุอันตราย	ปริมาณ (กก.)		มูลค่า (บาท)	
		ปี 2556	ปี 2557	ปี 2556	ปี 2557
1	สารกำจัดวัชพืช (Herbicide)	77,122,826.97	117,645,359.22	8,188,099,080.61	13,435,770,253.87
2	สารกำจัดแมลง (Insecticide)	12,660,992.44	13,910,544.21	2,246,367,346.20	4,013,851,563.11
3	สารป้องกันและกำจัดโรคพืช (Fungicide)	4,763,646.36	10,988,224.79	2,526,719,202.06	4,708,029,322.53
4	สารควบคุมการเจริญเติบโตของพืช (PGR)	1,054,931.00	1,600,430.00	94,063,772.00	163,539,061.22
5	สารรมควัน (Fumigants)	745,204.00	1,480,959.00	107,949,575.73	259,258,009.82
6	สารกำจัดไร (Acaricide)	418,716.50	1,296,700.41	59,126,122.67	167,205,892.58
7	สารกำจัดหอยและทาก (Mollussicide)	27,064.00	212,046.00	6,632,685.91	11,491,092.00
8	สารกำจัดหนู (Rodenticide)	ไม่มีข้อมูล	135,600.00	ไม่มีข้อมูล	30,034,156.55
9	สารกำจัดไส้เดือนฝอย (Nematocide)	6	65	18,884.34	45,912.36
	รวม	96,793,387.27	147,269,928.63	13,228,976,669.52	22,789,225,264.04

ที่มา: สำนักควบคุมพืชและวัสดุการเกษตร, รายงานสรุปการนำเข้าวัตถุอันตราย, เข้าถึงเมื่อ 20 ธันวาคม 2558, เข้าถึงได้จาก http://www.doa.go.th/ard/index.php?option=com_content&view=article&id=22:stat2535&catid=29:stat&Itemid=104

ตารางที่ 2-2 รายชื่อของวัตถุอันตรายที่มีการนำเข้าสูงสุด 10 อันดับแรก ปี 2557 จัดเรียงตามปริมาณสารสำคัญ

ลำดับที่	ชื่อสามัญ	ประเภท	ปริมาณ (กก.)	มูลค่า (บาท)	สารสำคัญ (กก.)
1	glyphosate-isopropylammonium	Herbicide	63,166,211.70	4,531,253,488.19	31,358,626.84
2	paraquat dichloride	Herbicide	21,325,348.00	2,712,452,173.61	9,085,575.74
3	2,4-D dimethyl ammonium	Herbicide	6,790,052.00	465,874,140.54	5,703,643.68
4	atrazine	Herbicide	4,104,988.00	576,112,768.68	3,488,526.30
5	ametryn	Herbicide	3,597,009.00	583,112,295.02	2,750,047.32
6	2,4-D sodium salt	Herbicide	2,605,159.00	290,828,564.40	2,474,901.05
7	butachlor	Herbicide	2,681,280.00	387,796,348.14	2,145,124.05
8	chlorpyrifos	Insecticide	2,380,553.00	375,599,554.36	1,686,672.15
9	acetochlor	Herbicide	2,520,111.00	205,002,518.00	1,448,773.50
10	mancozeb	Herbicide	1,794,707.00	179,044,886.42	1,435,763.60
	รวม		110,965,418.70	10,307,076,737.36	61,577,654.23

ที่มา: สำนักควบคุมพืชและวัสดุการเกษตร, รายงานสรุปการนำเข้าวัตถุอันตราย, เข้าถึงเมื่อ 20 ธันวาคม 2558, เข้าถึงได้จาก http://www.doa.go.th/ard/index.php?option=com_content&view=article&id=22:stat2535&catid=29:stat&Itemid=104

สารกำจัดแมลงคลอริไพริฟอส (Chlorpyrifos insecticide)

ข้อมูลทั่วไป (Agency for Toxic Substances and Disease Registry (ATSDR), 1997)

ชื่อสามัญภาษาไทย : คลอริไพริฟอส

ชื่อสามัญภาษาอังกฤษ : chlorpyrifos

ประเภทสารเคมี : Organophosphorus

ชื่อทางเคมี : 0, 0-diethyl 0-3, 5, 6-trichloro-2-pyridyl

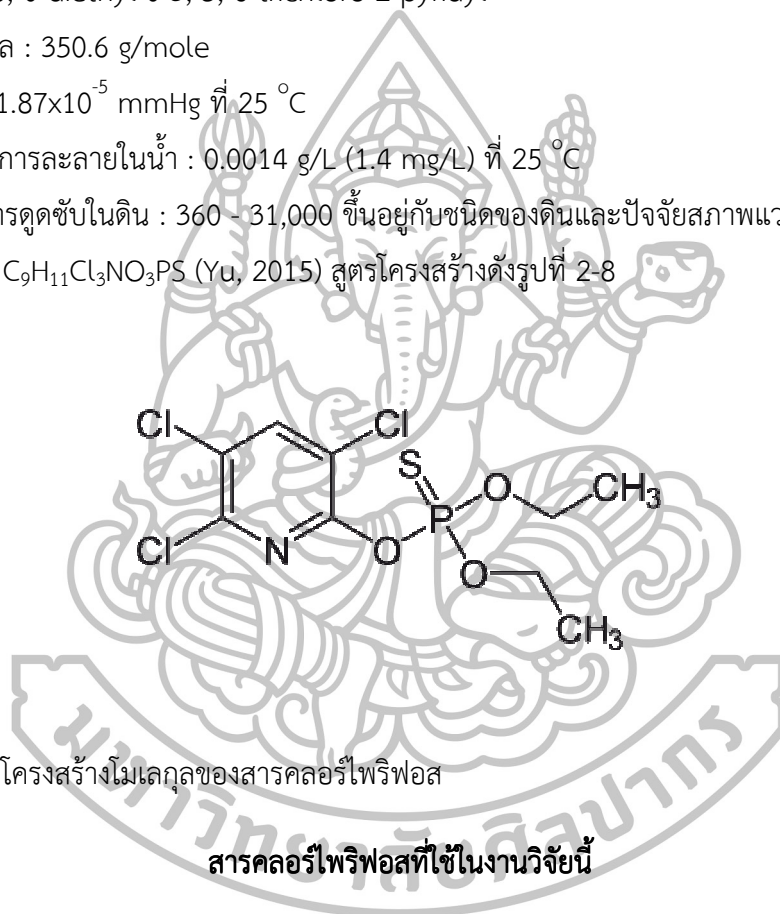
น้ำหนักโมเลกุล : 350.6 g/mole

ความดันไอ : 1.87×10^{-5} mmHg ที่ 25°C

ความสามารถการละลายในน้ำ : 0.0014 g/L (1.4 mg/L) ที่ 25°C

สัมประสิทธิ์การดูดซับในดิน : 360 - 31,000 ขึ้นอยู่กับชนิดของดินและปัจจัยสภาพแวดล้อม

สูตรโมเลกุล : $\text{C}_9\text{H}_{11}\text{Cl}_3\text{NO}_3\text{PS}$ (Yu, 2015) สูตรโครงสร้างดังรูปที่ 2-8



ชื่อทางการค้า : เซนีไฟเลท 40 (รูปที่ 2-9)

ทะเบียนวัตถุอันตรายเลขที่ : 924/2548

กลุ่มสาร : organophosphate

สารสำคัญ : 0, 0-diethyl 0-3, 5, 6-trichloro-2-pyridyl-phosphorothioate 40% W/V EC

ปริมาตร : 1,000 ml

ประโยชน์และวิธีใช้ : ใช้กำจัดแมลงศัตรูพืชชนิดต่างๆ เช่น เพลี้ยอ่อน เพลี้ยจักจั่น

ความเข้มข้นที่ระบุบนฉลาก : ผสมเซนีไฟเลท 40 ปริมาตร 50 ml กับน้ำ 20 l พ่นเมื่อพบการระบาดของแมลงศัตรูพืช ฉีดพ่นห่างกันทุกๆ 10 วัน

คำเตือน : เซนีไฟเลข 40 เป็นวัตถุอันตรายที่มีพิษมาก ต้องใช้ด้วยความระมัดระวัง เพื่อป้องกันมิให้เป็นอันตรายต่อผู้ใช้และสิ่งมีชีวิตอื่น ผู้ใช้ต้องปฏิบัติตามนี้

1. การผสมเซนีไฟเลข 40 ต้องสวมถุงมือและหน้ากากเพื่อป้องกันมิให้สารเข้มข้นถูกผิวหนังและกระเด็นเข้าตา ขณะผสมให้ใช้ไม้กวน ห้ามผสมกับสารที่มีฤทธิ์เป็นด่าง
2. การฉีดพ่น เซนีไฟเลข 40 ต้องอยู่เหนือลมเสมอ ควรสวมถุงมือและหน้ากากขณะพ่น ระวังอย่าให้ละอองเซนีไฟเลข 40 เข้าปาก ตา จมูก หรือสัมผัสกับผิวหนังและเสื้อผ้า
3. ห้ามดื่มน้ำ รับประทานอาหาร หรือสูบบุหรี่ในขณะที่ปฏิบัติงาน ล้างหน้าและมือให้สะอาดด้วยน้ำและสบู่ก่อนรับประทานอาหาร หรือสูบบุหรี่
4. หลังจากทำงานเสร็จแล้วต้องอาบน้ำสระผมเปลี่ยนเสื้อผ้า และซักชุดที่สวมทำงานให้สะอาด
5. ป้องกันเด็กหรือผู้ที่ไม่เกี่ยวข้องออกจากบริเวณที่ฉีดพ่นเซนีไฟเลข 40 ห้ามคนและสัตว์เข้าไปในบริเวณที่ฉีดพ่นเซนีไฟเลข 40 อย่างน้อย 24 ชั่วโมง
6. ภาชนะบรรจุเซนีไฟเลข 40 เมื่อใช้หมดแล้วให้ล้างด้วยน้ำ 3 ครั้ง และรวมเอาน้ำล้างไปใช้ผสมฉีดพ่น
7. ห้ามเทสารที่เหลือหรือล้างภาชนะบรรจุ อุปกรณ์ เครื่องพ่นสาร ลงในแม่น้ำลำคลอง และบริเวณใกล้เคียง กำจัดภาชนะที่ล้างแล้วโดยทำลายแล้วฝังดิน หรือรวมทั้งให้ปลอดภัย ห้ามใช้ไฟเผาหรือนำกลับไปใช้อีก
8. เซนีไฟเลข 40 เป็นพิษกับตัวห้ำตัวเบียน และผึ้ง ไม่ควรใช้ในเวลาที่พืชกำลังมีดอกบาน
9. เซนีไฟเลข 40 เป็นพิษต่อปลาต้องระวังการชะล้างลงสู่แหล่งน้ำ
10. ต้องเว้นระยะเวลาก่อนการเก็บผลผลิตอย่างน้อย 7-14 วัน หลังจากฉีดพ่นเซนีไฟเลข 40 ครั้งสุดท้ายแล้ว

อาการเกิดพิษ : ผู้ที่ได้รับพิษจากเซนีไฟเลข 40 ทางปาก ผิวหนังและสูดดมจะมีอาการมีนงง ปวดศีรษะ อ่อนเพลีย ภาวกรวย อาการคันที่ปลายลิ้นและเปลือกตา คลื่นไส้ อาเจียน น้ำลายและเหงื่อออกมาก น้ำตาไหล ปวดท้อง ท้องเสีย กล้ามเนื้อเกร็ง



รูปที่ 2-9 สารกำจัดแมลงคลอโรไฟลอสยี่ห้อ เซนิเพลท 40 ปริมาตร 1,000 ml

ความเป็นพิษแบบเฉียบพลันของสารคลอโรไฟลอส

ระดับความเป็นพิษของสารคลอโรไฟลอส แตกต่างกันขึ้นอยู่กับชนิดของสิ่งมีชีวิต โดยส่วนมากสารคลอโรไฟลอสจะก่อความเป็นพิษในระดับรุนแรงมากกับปลาและสัตว์น้ำ แต่ก่อความเป็นพิษในสัตว์เลี้ยงลูกด้วยน้ำนมระดับเล็กน้อยถึงปานกลาง (ตารางที่ 2-4)

ตารางที่ 2-3 ค่า LD₅₀ ของสารคลอโรไฟลอสในสัตว์แต่ละชนิด

กลุ่มสัตว์	ชนิด	ค่าความเป็นพิษ	ระดับความรุนแรง
สัตว์เลี้ยงลูกด้วยน้ำนม (Mammals)	หนู mice (<i>Mus</i> sp.) เพศผู้/เพศเมีย	LD ₅₀ = 380/415 (mg/kg bw)	พิษปานกลาง
	หนู rat (<i>Rattus</i> sp.) เพศผู้/ เพศเมีย	LD ₅₀ = 794/870 (mg/kg bw)	พิษเล็กน้อย
	กระต่าย	LD ₅₀ = 1,000 – 2,000 (mg/kg bw)	พิษเล็กน้อย
	หนูตะเภา	LD ₅₀ = 500-504 (mg/kg bw)	พิษปานกลาง

ตารางที่ 2-3 ค่า LD₅₀ ของสารคลอรีไพริฟอสในสัตว์แต่ละชนิด (ต่อ)

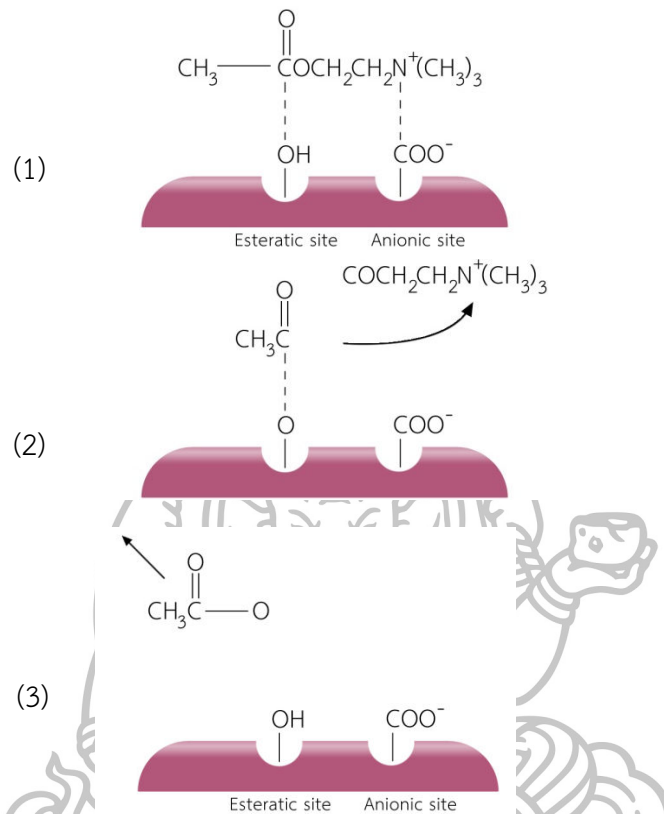
กลุ่มสัตว์	ชนิด	ค่าความเป็นพิษ	ระดับความรุนแรง
สัตว์ปีก (Avians)	ลูกไก่	LD ₅₀ = 32-102 (mg/kg diet)	พิษรุนแรง
	northern bobwhite (<i>Colinus virginianus</i>) เทศผู้/เทศเมีย	LD ₅₀ = 545 (mg/kg diet)	พิษปานกลาง
	common grackle (<i>Quiscalus quiscula</i>)	LD ₅₀ = 5.62 (mg/kg bw)	พิษรุนแรงมาก
	house sparrow (<i>Passer domesticus</i>) เทศผู้	LD ₅₀ = 21 (mg/kg bw)	พิษรุนแรง
ปลาและ สัตว์ไม่มีกระดูกสันหลัง ในน้ำ (Fishes and aquatic invertebrates)	rainbow trout (<i>Oncorhynchus mykiss</i>)	LC ₅₀ = 0.007-0.051 (mg/l ที่ 96 ชั่วโมง)	พิษรุนแรงมาก
	bluegill sunfish (<i>Lepomis macrochirus</i>)	LC ₅₀ = 0.002-0.010 (mg/l ที่ 96 ชั่วโมง)	พิษรุนแรงมาก
	fathead minnows (<i>Pimephales promelas</i>)	LC ₅₀ = 0.12-0.54 (mg/l ที่ 96 ชั่วโมง)	พิษรุนแรงมาก
	<i>Daphnia</i>	LC ₅₀ = 1.7 (µg/l ที่ 48 ชั่วโมง)	พิษรุนแรง
	Korean shrimp (<i>Palaemon macrodactylus</i>)	LC ₅₀ = 0.05 (µg/l ที่ 48 ชั่วโมง)	พิษรุนแรงมาก
	Amphipod (<i>Gammarus</i>)	LC ₅₀ = 1.47 (nM ที่ 96 ชั่วโมง) (Xuereb et al., 2009)	-

ปฏิกิริยาการสลาย acetylcholine โดยเอนไซม์ AChE สามารถแบ่งออกเป็น 3 ขั้นตอนย่อย ดังรูปที่ 2-10 จากนั้น choline ที่ได้จากการสลายของ acetylcholine จะถูกลำเลียงกลับไปยัง post-synaptic cell เพื่อใช้ในวัฏจักรการสังเคราะห์ acetylcholine ต่อไป (รูปที่ 2-11)

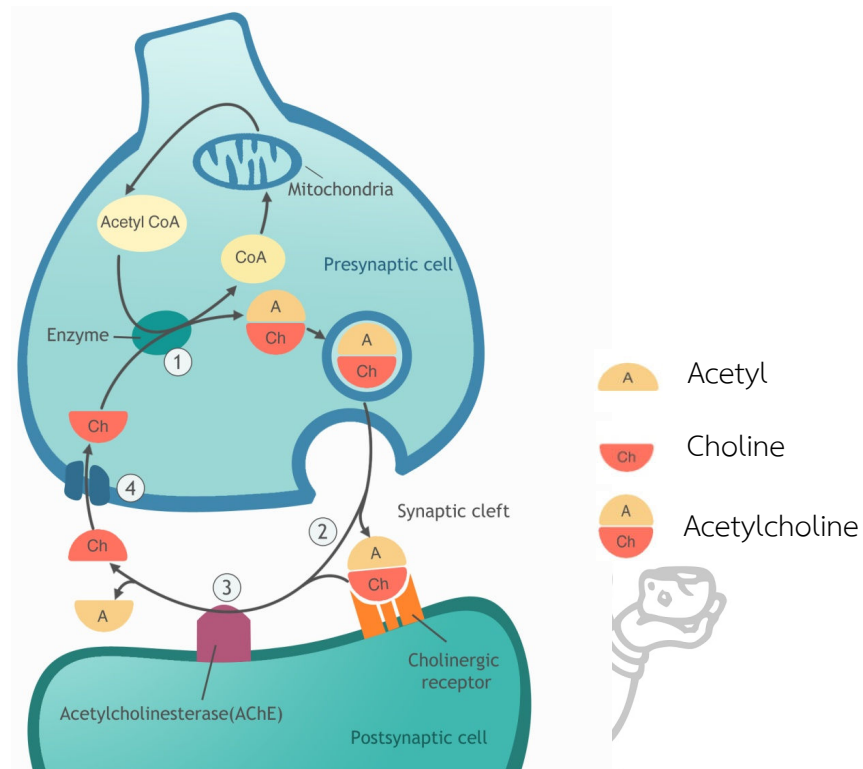
ในกรณีที่แมลงได้รับสารคลอโรไพริฟอสเข้าสู่ร่างกาย โมเลกุลของสารคลอโรไพริฟอสจะเข้าสู่ระบบประสาทและเข้าทำปฏิกิริยากับเอนไซม์ AChE เช่นเดียวกับกับ สารเคมีในกลุ่ม OP ชนิดอื่นๆ โดยเกิดปฏิกิริยาย่อย 3 ขั้นตอน ดังรูปที่ 2-12 กล่าวโดยสรุปคือ โมเลกุลของ OP จะเข้าจับกับเอนไซม์ AChE บริเวณ active site (steratic site) ทำให้เอนไซม์ไม่สามารถจับกับโมเลกุลของ acetylcholine ได้ตามปกติ โดยอัตราการเกิด dephosphorylation (ขั้นตอนที่ 3 รูปที่ 2-12) ของสารในกลุ่ม OP ที่จับกับเอนไซม์ AChE จะใช้เวลานาน บางครั้งอาจยาวนานถึงหลายสัปดาห์ ดังนั้นจึงถือว่า การเข้าจับกันระหว่างโมเลกุลของสารในกลุ่ม OP กับเอนไซม์ AChE เป็นแบบไม่สามารถย้อนกลับได้ (irreversible)

เมื่อเอนไซม์ AChE ถูกยับยั้งแล้ว acetylcholine ที่ค้างอยู่ในช่องว่างระหว่างเซลล์ (synaptic cleft) จำนวนมาก จะทำการกระตุ้น post-synaptic cell อยู่ตลอดเวลา ทำให้เกิดผลเสียต่อตัวแมลง ซึ่งสามารถสังเกตได้จากลักษณะอาการที่ผิดปกติ เช่น เกิดอาการกระสับกระส่าย (restlessness) ตัวสั่น (tremors) หดเกร็ง (convulsions) และเป็นอัมพาต (paralysis) เป็นต้น (Yu, 2015) การตรวจความผิดปกติของกิจกรรมเอนไซม์ AChE สามารถนำมาใช้เป็น biomarker เพื่อตรวจสอบภาวะความเสี่ยงของการปนเปื้อนสารกลุ่ม OP ในสัตว์ได้ (Yu, 2015)

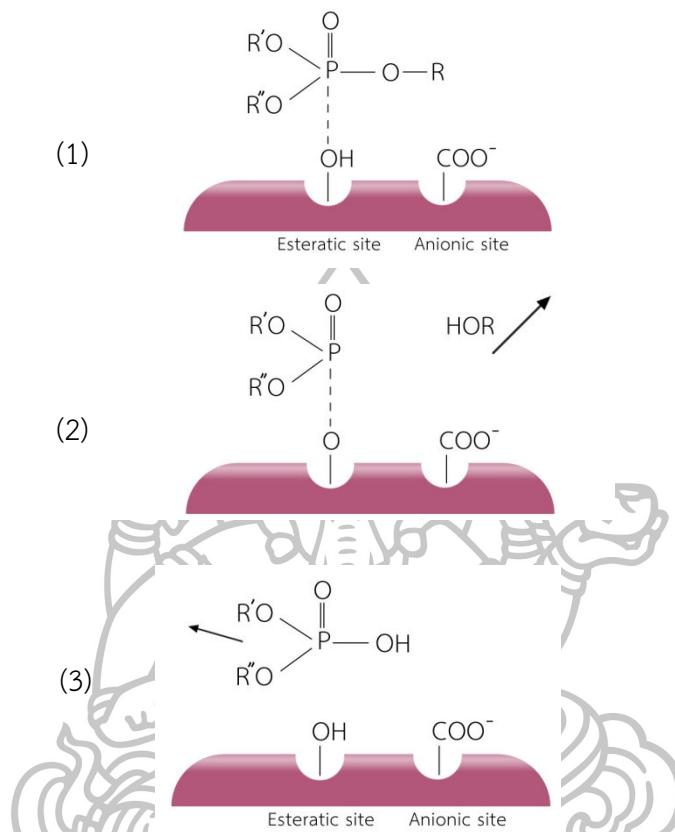




รูปที่ 2-10 การเกิดปฏิกิริยาระหว่างสารสื่อประสาท acetylcholine กับเอนไซม์ AChE ; (1) เกิดการจับกันระหว่าง acetylcholine และ AChE, (2) ปฏิกิริยา acetylation มีการสลายพันธะระหว่าง choline กับ acetyl และ choline หลุดออกไป, (3) ปฏิกิริยา deacetylation หรือ hydrolysis ทำให้ acetyl หลุดออกจาก AChE และ AChE อยู่ในรูปที่ active อีกครั้ง (ดัดแปลงจาก Yu, 2015)



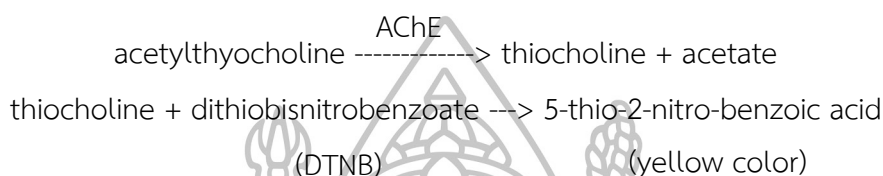
รูปที่ 2-11 กลไกการส่งกระแสประสาทโดยใช้เอนไซม์ acetylcholinesterase : 1.) การสังเคราะห์ acetylcholine ใน presynaptic cell, 2.) acetylcholine ถูกลำเลียงออกจาก presynaptic cell และเข้าจับกับ receptor ที่ผิวของ postsynaptic cell เกิดการส่งกระแสประสาทที่ขั้นตอนนี้, 3.) acetylcholine ที่อยู่ภายใน synaptic cleft เข้าจับกับ AChE เกิดการสลายตัวได้ acetic acid กับ choline, 4.) choline ถูกลำเลียงกลับไปยัง presynaptic cell โดยใช้ carrier protein ซึ่ง choline ที่ถูกลำเลียงกลับไปจะถูกนำไปใช้เป็นส่วนตั้งต้นในการผลิต acetylcholine อีกครั้ง



รูปที่ 2-12 การเกิดปฏิกิริยาระหว่างสารเคมีในกลุ่ม OP กับเอนไซม์ AChE; (1) การเข้าจับกันของสารเคมีในกลุ่ม OP กับเอนไซม์ AChE, (2) ปฏิกิริยา phosphorylation กำจัดหมู่ R ออกจากโมเลกุลของ OP, (3) ปฏิกิริยา dephosphorylation หรือ hydrolysis เกิดการสลายพันธะ phosphate ระหว่าง OP กับ AChE แต่ใช้เวลาในการเกิดปฏิกิริยานี้ยาวนาน อาจยาวนานเป็นวันหรือสัปดาห์ ดังนั้นจึงถือว่าการจับกันของ OP กับ AChE เป็นแบบ irreversible (ดัดแปลงจาก Yu, 2015)

การตรวจวัดปฏิกิริยาเอนไซม์ AChE

Elman et al. (1961) ได้ออกแบบการทดลอง photometric technique เพื่อติดตามการทำงานของเอนไซม์ AChE ในเนื้อเยื่อต่างๆ โดยอาศัยหลักการคือ เมื่อเอนไซม์ AChE สลายสาร acetylthiocholine จะได้สารผลิตภัณฑ์เป็น thiocholine เมื่อนำไปทำปฏิกิริยาต่อกับ dithiobisnitrobenzoate (DTNB) จะได้ 5-thio-2-nitro-benzoic acid ซึ่งสารผลิตภัณฑ์ที่มีสีเหลืองดังปฏิกิริยา



การวัดปริมาณของสารผลิตภัณฑ์สีเหลืองที่เกิดขึ้น ด้วยเครื่อง spectrophotometer สามารถทำให้ทราบปริมาณของเอนไซม์ AChE ที่ยังทำงานได้เป็นปกติจากเนื้อเยื่อของสิ่งมีชีวิตที่นำมาใช้ศึกษาได้ ประโยชน์จากการวิเคราะห์ความผิดปกติของกิจกรรมเอนไซม์ ถูกนำไปใช้เพื่อเฝ้าระวังความผิดปกติที่เกิดขึ้นในคนหรือเกษตรกรผู้ที่มีการสัมผัสกับโลหะหนัก และสารวัตถุอันตรายต่างๆ โดยเฉพาะสารกำจัดแมลงในกลุ่ม OP และ carbamate อย่างต่อเนื่อง จึงต้องต้องมีการตรวจเช็คกิจกรรมเอนไซม์ AChE ในน้ำเลือด อย่างน้อยปีละ 1 ครั้ง (กลุ่มควบคุมวัตถุอันตราย และ คณะ, 2556) การตรวจความผิดปกติจากกิจกรรมเอนไซม์ AChE มักถูกนำมาใช้เป็น biomarker ทางด้านพิษวิทยา เพื่อตรวจสอบผลกระทบต่อสัตว์หลายชนิด ที่ได้รับการปนเปื้อนโลหะหนัก และสารวัตถุอันตรายชนิดอื่น เช่น สารกำจัดวัชพืชบางกลุ่ม และสารกำจัดแมลงในกลุ่ม OP และ carbamate เป็นต้น

กรณีศึกษาผลของโลหะหนักต่อกิจกรรมเอนไซม์ AChE ในสิ่งมีชีวิต Bainy et al. (2006) ได้แสดงให้เห็นว่าโลหะหนักบางชนิดสามารถกระตุ้นให้เกิดการยับยั้งกิจกรรมเอนไซม์ AChE ได้ โดยศึกษาใน digestive gland ของหอยแมลงภู *Perna perna* ที่ได้รับ โลหะแคดเมียม (Cd) และ ตะกั่ว (Pb) เป็นเวลา 72 และ 12 ชั่วโมงตามลำดับ พบว่ากิจกรรมเอนไซม์ AChE ลดต่ำกว่ากลุ่มควบคุม คาดว่าโลหะหนักชนิดดังกล่าวน่าจะมีผลต่อ acetylcholine receptor และอาจส่งผลต่อการสังเคราะห์เอนไซม์ AChE ซึ่งเป็นการส่งผลกระทบต่อกิจกรรมของ AChE ในทางตรงกันข้าม สารกำจัดแมลงสามารถส่งผลกระทบได้โดยตรงกับกิจกรรมของเอนไซม์ AChE

Brethead, Toutant, and Saglio (2000) ตรวจพบความผิดปกติของกิจกรรมเอนไซม์ AChE ในปลาทอง *Carassius auratus* ที่ได้รับสาร carbofuran, diuron และ nicosulfuron ที่ระดับความเข้มข้นต่างๆ โดยสารทั้ง 3 ชนิด มีผลยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ AChE ที่สมองและ

กระดุกสันหลัง ของปลาอย่างมีนัยสำคัญ แต่การทำงานของเอนไซม์ AChE ที่ถูกยับยั้งยังบริเวณกล้ามเนื้อด้านหลังของปลายังไม่เห็นผลอย่างชัดเจน อาจเป็นเพราะปริมาณของสารสื่อประสาทที่แทรกตัวอยู่ตามกล้ามเนื้อยังมีปริมาณไม่เพียงพอต่อการศึกษาในครั้งนี้ ในทำนองเดียวกันการศึกษาปลากลุ่มอื่นๆ เช่น กลุ่มปลาคาร์ป (Cyprinidae) กลุ่มปลาเพิร์ช (Percidae) และกลุ่มปลาไพค์ (Esocidae) ยังคงให้ผลสอดคล้องว่ากิจกรรมเอนไซม์ AChE ถูกยับยั้งโดยมีสาเหตุมาจากสารกำจัดแมลงในกลุ่ม OP เป็นต้น (Chuiiko, 2000)

ในกลุ่มสัตว์ขาข้อ (arthropod) Xuereb et al. (2009) ศึกษาผลกระทบจากสารคลอโรไพริฟอสต่อกิจกรรมเอนไซม์ AChE ของ amphipod (*Gammarus fossarum*) พบว่า กิจกรรมเอนไซม์ AChE ถูกยับยั้งมากขึ้นเมื่อ *G. fossarum* ได้รับสารคลอโรไพริฟอสความเข้มข้นสูงขึ้น โดยมีเปอร์เซ็นต์การยับยั้งสูงสุด $72.5 \pm 5.2\%$ ในกลุ่มที่ถูกทดสอบด้วยสารคลอโรไพริฟอสความเข้มข้น 2.86 nM เป็นเวลา 96 ชั่วโมง เช่นเดียวกับกับการศึกษาของ Van Erp et al. (2002) ในแมงมุมสุนัขป่า *Lycosa hiliaris* พบว่า กิจกรรมเอนไซม์ AChE จะถูกยับยั้งมากขึ้นถ้าได้สัมผัสกับสารคลอโรไพริฟอสความเข้มข้นสูงขึ้น

แม้ว่าสารคลอโรไพริฟอสในระดับความเข้มข้นต่ำๆ เมื่อเข้าสู่ร่างกายของสัตว์แล้วจะทำให้เกิดความผิดปกติ ในระดับชีวโมเลกุล เช่น กิจกรรมเอนไซม์ AChE ที่เปลี่ยนแปลงไป แต่ความผิดปกติดังกล่าว หรือการได้รับสารพิษเป็นเวลาต่อเนื่อง ก็อาจส่งผลให้กิจกรรมภายในเซลล์ของสัตว์เกิดความเครียด และการทำงานของเซลล์เกิดความผิดปกติได้

การเกิดความเครียดของเซลล์

สารอนุมูลอิสระ (free radical) และอนุพันธ์ที่เกี่ยวข้อง โดยส่วนใหญ่เกิดจากผลผลิตของปฏิกิริยาภายในเซลล์ที่มีการใช้ O_2 เข้ามาเกี่ยวข้อง ผลผลิตที่เกิดจากการเปลี่ยนรูปของ O_2 เรียกว่า Reactive Oxygen species (ROS) ได้แก่ hydroxide radical (OH^\cdot), superoxide (O_2^\cdot) และ hydrogen peroxide (H_2O_2) เป็นต้น ซึ่ง ROS ชนิดต่างๆ มีความไวต่อการเกิดปฏิกิริยาสามารถเหนี่ยวนำ ไอออน (ion) ต่างๆ ที่อยู่บนเยื่อหุ้มเซลล์หรือ organelle ที่ผิวของโปรตีน และ DNA ที่อยู่ภายในเซลล์ ให้เกิดความเสียหายได้ แหล่งกำเนิดของ ROS สามารถแบ่งออกเป็น 2 ประเภทหลักๆ คือ

1. แหล่งกำเนิดภายนอก (exogenous ROS): เป็น ROS ที่ได้รับจากสิ่งแวดล้อมภายนอกในร่างกาย หรือเซลล์ของสิ่งมีชีวิต เช่น รังสี มลพิษ หมอกควัน ยาเสพติด สารพิษชนิด สารกำจัดวัชพืชและ สารกำจัดแมลง เป็นต้น
2. แหล่งกำเนิดภายใน (endogenous ROS): เป็น ROS ที่เกิดจากปฏิกิริยาทางชีวเคมีภายในเซลล์ของสิ่งมีชีวิต ปริมาณของ ROS ที่เกิดขึ้นอยู่กับกลไก ชนิดของเซลล์และเนื้อเยื่อต่างๆ

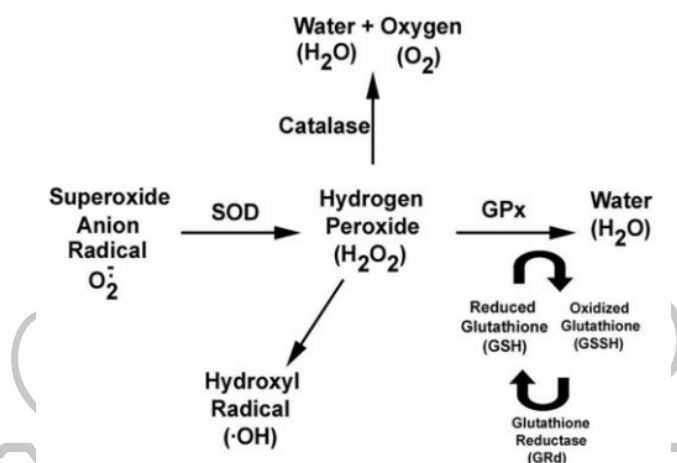
เช่น กลไกการขนส่งอิเล็กตรอนที่เกิดขึ้นบนเยื่อหุ้มชั้นในของไมโทคอนเดรีย มีการใช้ O_2 เป็นตัวรับอิเล็กตรอนตัวสุดท้าย

การที่มีอนุมูลอิสระเกิดขึ้นจะทำให้เซลล์เกิดภาวะความเครียด ดังนั้นเซลล์จะต้องมีกลไกการกำจัดอนุมูลอิสระที่เกิดขึ้น (antioxidant process) โดยอาศัยเอนไซม์ ดังนี้ (ศศิธร คาศสนิท และคณะ, 2554; Hofseth, 2004) (รูปที่ 2-13)

2.1 superoxide dismutase (SOD) ทำหน้าที่เปลี่ยน superoxide anion radical (O_2^-) ให้กลายเป็น hydrogenperoxide (H_2O_2)

2.2 glutathione peroxidase (GPx) ทำหน้าที่เปลี่ยน H_2O_2 ให้กลายเป็นน้ำ (H_2O)

2.3 catalase (CAT) ทำหน้าที่เปลี่ยน H_2O_2 ให้กลายเป็นน้ำและออกซิเจน (O_2)

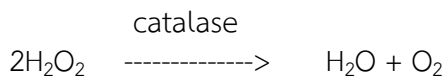


รูปที่ 2-13 เอนไซม์ที่เกี่ยวข้องในกระบวนการ antioxidant process โดยมีเอนไซม์ที่เกี่ยวข้อง คือ SOD, GPx และ CAT

ที่มา: Hofseth J. L., "The adaptive imbalance to genotoxic stress: genome guardians rear their ugly heads," *Carcinogenesis* 25 (2004)

เอนไซม์ Catalase (CAT) และการตรวจวัดกิจกรรมเอนไซม์

เอนไซม์ CAT ส่วนใหญ่ถูกบรรจุอยู่ใน peroxisomes ในเซลล์ของ eukaryotes การที่พบ CAT ใน peroxisomes มาก น่าจะมีสาเหตุมาจาก การที่เซลล์สิ่งมีชีวิตส่วนใหญ่ ไม่สามารถทนต่อสภาวะการมี H_2O_2 ที่มากเกินไปได้ ดังนั้นเซลล์จึงทำการกำจัด H_2O_2 โดยการจำกัดพื้นที่ไม่ให้ไปเกิดปฏิกิริยากับ organelles ต่างๆ ภายในเซลล์ให้เร็วที่สุด การจำกัดพื้นที่ดังกล่าวคือการใช้ peroxisomes และใช้เอนไซม์ CAT ช่วยเร่งปฏิกิริยา เพื่อสลาย H_2O_2 ให้กลายเป็นสารที่ไม่เป็นอันตรายต่อเซลล์คือ น้ำ และ oxygen (Robinson and Eskin, 1991) ดังปฏิกิริยา



การทำงานของเอนไซม์ CAT เกี่ยวข้องกับการมี ROS ภายในเซลล์ ถ้าเซลล์มี ROS มากเกินไปจะทำให้เซลล์เกิดภาวะ oxidative stress ทำให้เซลล์เกิดความเครียด เมื่อเซลล์มีความจำเป็นที่จะต้องกำจัด ROS ที่เกิดขึ้น ดังนั้นเซลล์จะมีการผลิตเอนไซม์เพื่อใช้กำจัด ROS เพิ่มมากขึ้นด้วย โดยเอนไซม์ CAT เป็นเอนไซม์อีกชนิดหนึ่งที่มีผู้นิยมใช้ศึกษาระดับ oxidative stress ของเซลล์ในสิ่งมีชีวิต (Nikolić et al., 2015)

Aebi (1947) ได้เสนอวิธีการสำหรับวิเคราะห์กิจกรรมเอนไซม์ CAT อย่างง่าย อาศัยหลักการทาง photometric technique เพื่อวัดการดูดกลืนแสงของ H_2O_2 ที่ช่วงความยาวคลื่น 240 nm โดยให้เอนไซม์ CAT ทำปฏิกิริยากับ H_2O_2 แล้วติดตามปริมาณ H_2O_2 ที่ถูกใช้ไป ต่อหน่วยเวลา ถ้าปริมาณเอนไซม์ CAT มาก ก็จะไปสลาย H_2O_2 ให้กลายเป็น H_2O และแก๊ส O_2 เร็ว ดังนั้นการลดลงของ H_2O_2 ก็จะเกิดขึ้นเร็ว แต่ถ้าปริมาณเอนไซม์ CAT น้อย อัตราการลดลงของ H_2O_2 ก็จะเกิดขึ้นช้า ซึ่งสามารถสังเกตได้จากการค่าที่ลดลงของการดูดกลืนแสงที่ 240 nm และเพื่อเป็นการหลีกเลี่ยงไม่ให้ ปริมาณ O_2 ที่เกิดขึ้น ไปรบกวนการดูดกลืนแสงของ H_2O_2 จึงมีการปรับใช้ H_2O_2 ให้มีความเข้มข้นต่ำๆ (10mM) เพื่อลดปริมาณ O_2 ที่เกิดจากอัตราของปฏิกิริยาที่เร็วเกินไป

สัตว์ที่อาศัยอยู่ในสิ่งแวดล้อมที่แตกต่างกันสามารถตรวจวัดปริมาณเอนไซม์ CAT ได้แตกต่างกัน ขึ้นอยู่กับสิ่งแวดล้อมที่ส่งผลต่อความเครียดหรือการกำเนิด ROS ต่อเซลล์ได้แตกต่างกันหรือไม่ Nikolić et al. (2015) แสดงให้เห็นว่าผึ้ง *Apis mellifera* ที่อาศัยในพื้นที่เขตโรงงานเขตชุมชนเมือง มีกิจกรรมเอนไซม์ CAT สูงกว่าในเขตชนบทโดยน่าจะมีส่วนมาจากการได้รับมลภาวะทางคมนาคมและการใช้สารเคมีในปริมาณมาก ในขณะที่กิจกรรมเอนไซม์ CAT จากผึ้งที่อาศัยในเขตโรงงานอุตสาหกรรม มีกิจกรรมเอนไซม์ CAT ต่ำกว่าผึ้งในเขตชุมชน ซึ่งน่าจะได้รับผลกระทบจากปริมาณตะกั่ว (Pb) ที่พบในเขตโรงงานอุตสาหกรรม โดยตะกั่วมีผลในการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ CAT แต่ถึงอย่างไรก็ตาม ผึ้งที่อาศัยในเขตชุมชนเมืองและอุตสาหกรรม มีการแสดงออกของ *Cat* gene (ยีนที่ควบคุมการสร้างเอนไซม์ CAT) ในปริมาณมาก การที่สัตว์อาศัยในสิ่งแวดล้อมที่มีมลภาวะมากจนมีผลกระทบต่อการเปลี่ยนแปลงกระบวนการของสารชีวโมเลกุลในร่างกาย เช่น การเพิ่มการผลิตเอนไซม์ CAT หรือแม้แต่การลดกิจกรรมเอนไซม์ AChE เป็นต้น เมื่อกลไกเหล่านี้ถูกรบกวนจนเสียสมดุล จึงส่งผลต่อการแสดงออกทางพฤติกรรมของสัตว์ เช่น การตอบสนองของเหยื่อเพื่อหนีจากสัตว์ผู้ล่า หรือการล่าเหยื่อของสัตว์ผู้ล่า เมื่อเกิดความผิดปกติจะทำให้สัตว์ไม่สามารถดำรงชีวิตในธรรมชาติตามปกติได้

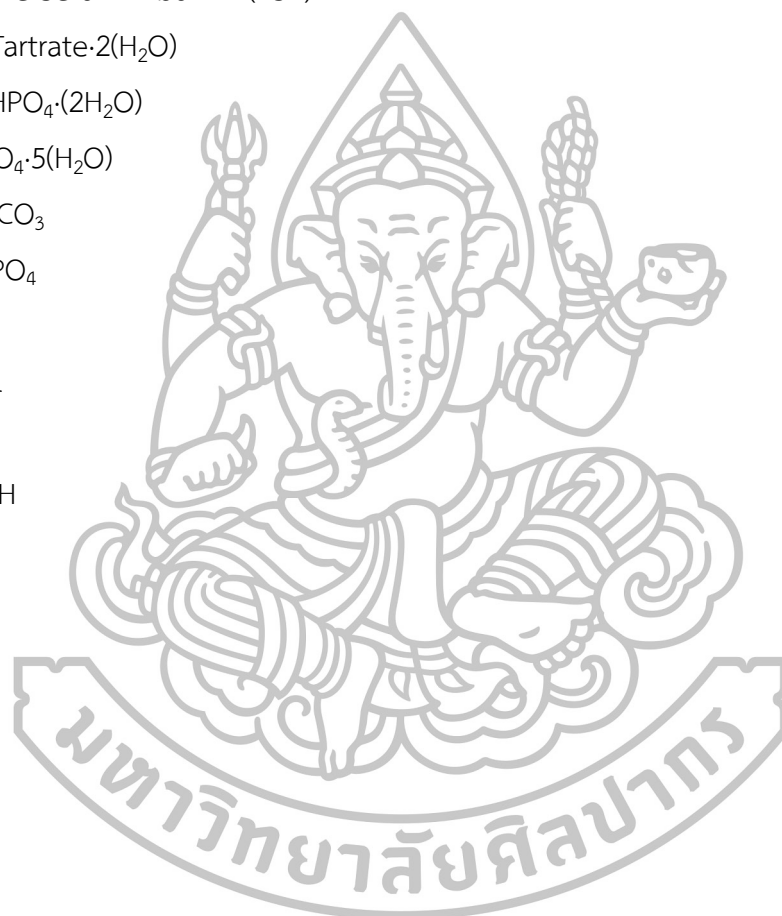
บทที่ 3 วิธีการศึกษา

วัสดุอุปกรณ์และสารเคมี

1. อุปกรณ์ที่ใช้เก็บแมงมุมภาคสนาม
 1. ขวดพลาสติก ขนาดกลาง (ผ่านศูนย์กลาง 3.00 cm สูง 5.00 cm)
 2. ขวดแก้วขนาดเล็ก (ผ่านศูนย์กลาง 2.00 cm สูง 6.00 cm)
 3. ไฟฉายคาดศีรษะ (Fenix HL30)
 4. สำลี
2. อุปกรณ์ที่ใช้ในห้องปฏิบัติการ
 1. ถ้วยพลาสติกใส (ขนาด เส้นผ่านศูนย์กลาง 6.50 cm สูง 4.50 cm)
 2. จานแก้วเพาะเชื้อ (ขนาด เส้นผ่านศูนย์กลาง 110 mm สูง 20 mm)
 3. ปิเปต (ขนาด 1.00, 5.00, 10.00 ml)
 4. ปีกเกอร์ (ขนาด 25.0, 50.0, 100.0 ml)
 5. กระบอกตวง (10.00, 25.00 ml)
 6. ขวดปรับปริมาตรขนาด 100 ml
 7. ฟู่กัน (เบอร์ 6)
 8. หลอดทดลองแก้วขนาด 5 ml
 9. หลอดปั่นเหวี่ยงแบบพลาสติก (centrifuge tube) ขนาด 1.5 ml ยี่ห้อ Eppendorf
 10. หลอดปั่นเหวี่ยงแบบพลาสติก ขนาด 5 ml ยี่ห้อ Corning
 11. เครื่องปั่นเนื้อเยื่อ (homogenizer) รุ่น Ultra Turrax
 12. เครื่องปั่นเหวี่ยง (centrifuge) ยี่ห้อ Sanyo รุ่น Harrier 18/80
 13. เครื่องชั่งสารรุ่น PB 303-S
 14. เครื่อง pH meter รุ่น 713 pH Meter
 15. เครื่องทำความร้อนแบบมีแม่เหล็กหมุนได้ (Hot plate and Stirrer)
 16. เครื่อง Spectrophotometer รุ่น 6405 UV/Vis
 17. ตู้ดูดควัน

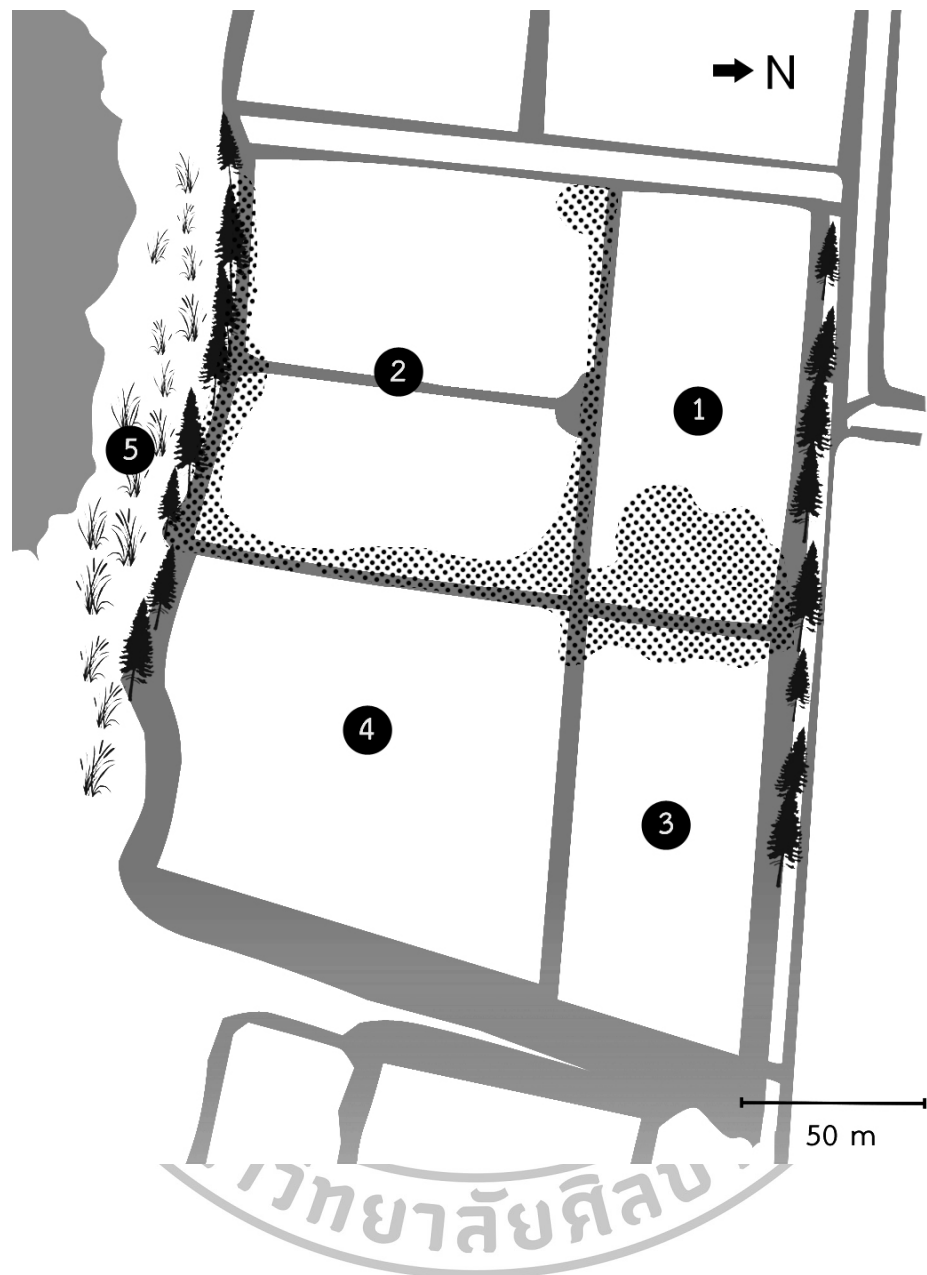
3. สารเคมีที่ใช้ในห้องปฏิบัติการ

1. Chlorpyrifos ยี่ห้อ เซนิไฟเลท 40
2. 35% v/v H_2O_2 (conc. H_2O_2)
3. 2 N Folin & Ciocalteu's Phenol Reagent (Analytical)
4. 15 mM Acetylthiocholine Iodide (ACT iodide) (Analytical $\geq 99\%$)
5. DTNB [5,5'- Dithiobis (2-nitrobenzoic acid)] (Analytical $\geq 99\%$)
6. Bovine Serum Albumin (BSA)
7. $Na_2Tartrate \cdot 2(H_2O)$
8. $Na_2HPO_4 \cdot (2H_2O)$
9. $CuSO_4 \cdot 5(H_2O)$
10. $NaHCO_3$
11. KH_2PO_4
12. KCl
13. NaCl
14. HCl
15. NaOH



พื้นที่เก็บแมงมุม

นาข้าวแบบอินทรีย์ภายในพื้นที่ฟาร์มขนาด 280 ไร่ ได้รับใบรับรองมาตรฐานเกษตรอินทรีย์จาก IFoam (International Federation of Organic Agriculture Movements) และกรมการข้าว (Organic Thailand) โดยใช้ชื่อฟาร์มว่า “Green living camp” ตำบลทุ่งพิชัย อำเภอดอนตูม จังหวัดนครปฐม (13° 55' 43.40" N. |100° 3' 23.15"E) ปลูกข้าวพันธุ์พื้นเมือง เช่น นครชัยศรี ปิ่นเพชร และข้าวมะลิแดง เป็นต้น พื้นที่ส่วนใหญ่เป็นระบบนิเวศนาข้าว มีพื้นที่แปลงนาสำหรับปลูกข้าวอยู่ติดกันหลายแปลง (รูปที่ 3-1) พืชกลุ่มเด่นในพื้นที่เป็นข้าวและหญ้า (รูปที่ 3-2 ก.-ค.) มีขอบคันนาสูง ประมาณ 80-90 cm คันนากว้างประมาณ 2-4 m (รูปที่ 3-3 จ.) บริเวณรอบนาข้าว (รูปที่ 3-1 หมายเลข 1-3) บนคันนาบริเวณที่เก็บแมงมุมมีแนวต้นสนขึ้นเป็นแถวยาว ภายในบริเวณฟาร์มมีบ่อเลี้ยงปลาขนาดใหญ่ (รูปที่ 3-1 หมายเลข 4, รูปที่ 3-2 ง.) และพื้นที่ชุ่มน้ำ (รูปที่ 3-1 หมายเลข 5) มีธูปฤๅษีเป็นพืชกลุ่มเด่น (รูปที่ 3-2 จ.) จากรูปที่ 3-1 บริเวณที่เก็บแมงมุมคือ บริเวณพื้นที่ลาดจุด ซึ่งเป็นพื้นที่ที่สามารถเข้าถึงและพบเจอแมงมุมได้ง่าย โดยพื้นที่ดังกล่าวครอบคลุมบริเวณคันนา และภายในแปลงนาที่อยู่ใกล้ขอบคันนา หมายเลข 1, 2 และ 3 ลักษณะของ microhabitat ที่พบแมงมุม *W. fidelis* บ่อย คือบริเวณพื้นดินที่มีรอยแยก (รูปที่ 3-3 ก.) บริเวณที่มีเศษซากใบไม้และใบสนทับถมกัน (รูปที่ 3-3 ข.) บริเวณที่ขึ้น (รูปที่ 3-3 ค.) บริเวณที่มีน้ำท่วมขัง (รูปที่ 3-3 ง.) บริเวณขอบด้านข้างและบนพื้นของคันนา (รูปที่ 3-3 จ.) การเก็บแมงมุมทำใน 2 ช่วงเวลาคือ ช่วงเวลาเย็นประมาณ 17.00 – 19.00 น. และช่วงเช้า 07.00 –09.00 น. เนื่องจากช่วงเช้าและเย็นเป็นช่วงเวลาแมงมุมออกหาอาหาร (Foelix, 2011) และสามารถมองเห็นได้ง่าย หากเก็บแมงมุมในช่วงกลางวันหลังจาก 18.00 น. จะใช้ไฟฉายคาดศีรษะช่วยเพราะสะดวกในการใช้มือจับแมงมุม และไฟฉายยังสามารถสะท้อนตาของแมงมุมสุนัขป่าทำให้สามารถมองเห็นได้ง่าย เก็บตัวอย่างทุกๆ 2 สัปดาห์ ตั้งแต่เดือนมกราคม 2558 – เดือนพฤษภาคม 2558



รูปที่ 3-1 แผนที่แสดงพื้นที่นาข้าวแบบอินทรีย์และพื้นที่โดยรอบที่ใช้ในการเก็บตัวอย่าง: หมายเลข 1, 2 และ 3 เป็น นาข้าวที่ใช้ในการเก็บตัวอย่างแมงมุม, หมายเลข 4 เป็นบ่อเลี้ยงปลา, หมายเลข 5 เป็นพื้นที่ชุ่มน้ำมีรูปฤาษีเป็นพืชกลุ่มเด่น, พื้นที่ลายจุดเป็นพื้นที่ที่สามารถเข้าถึงและจับแมงมุมได้ง่าย



ก.



ข.



ค.



ง.



จ.

รูปที่ 3-2 ลักษณะพื้นที่บริเวณที่เก็บตัวอย่างตามหมายเลขในรูปที่ 3-1: ก.) จุดที่ 1, ข.) จุดที่ 2, ค.) จุดที่ 3, ง.) จุดที่ 4, จ.) จุดที่ 5



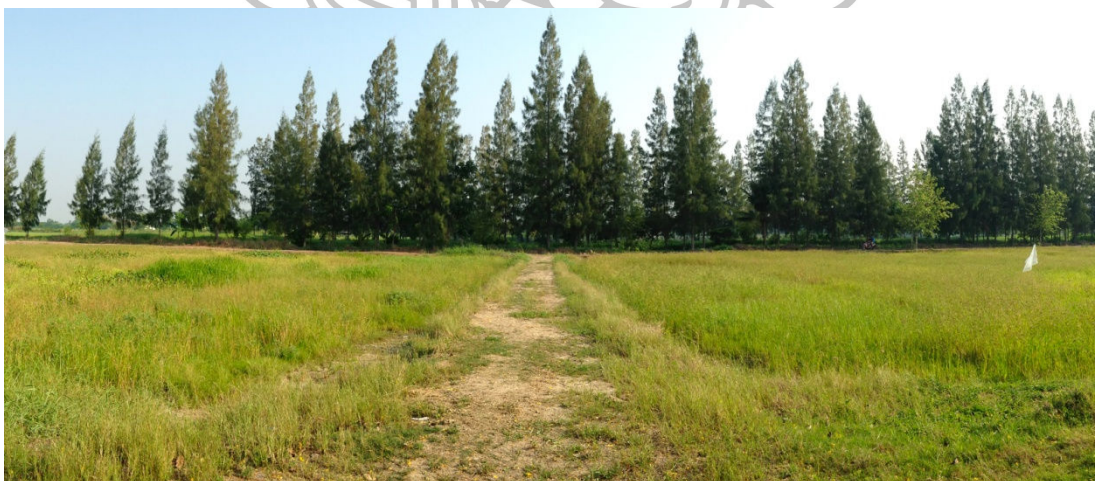
ก.

ข.



ค.

ง.

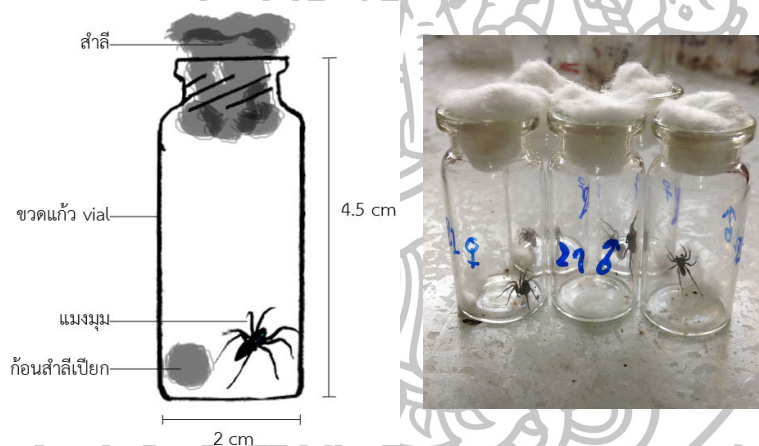


จ.

รูปที่ 3-3 ลักษณะของ microhabitat ที่พบแมงมุม *W. fidelis*: ก.) บริเวณดินที่มีรอยแยก, ข.) บริเวณที่มีเศษซากใบไม้และใบสนทับถมกัน, ค.) บริเวณที่ชื้น, ง.) บริเวณที่มีน้ำท่วมขัง, จ.) บริเวณคันทามิพีซชื้นไม่หนาแน่น

วิธีการเก็บและเลี้ยงแมงมุม

เก็บแมงมุมโดยใช้วิธีการเดินหาแบบเห็นตัว (visual encounter survey) บันทึกถิ่นอาศัยที่พบและชนิดอาหารที่แมงมุมกินหรือกำลังล่าเหยื่อในพื้นที่ เก็บแมงมุมที่พบด้วยขวดพลาสติกขนาดกลาง แล้วถ่ายแมงมุมลงในขวดแก้วขนาดเล็ก ปิดด้วยก้อนสำลี เพื่อให้อากาศสามารถถ่ายเทได้ นำกลับมาที่บ้านพัก ใส่ก้อนสำลีชุบน้ำหมาดๆ เพื่อเพิ่มความชื้นให้กับแมงมุม จากนั้นนำแมงมุมมาเลี้ยงในห้องปฏิบัติการ แยกเลี้ยงเดี่ยวในขวดแก้วขนาดเล็ก (เส้นผ่านศูนย์กลาง 2.0 cm สูง 4.5 cm) ภายในใส่ก้อนสำลีขนาดเล็กชุบน้ำเปียกหมาด ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางประมาณ 2 cm เพื่อเพิ่มความชื้นให้กับแมงมุม (รูปที่ 3-4) ให้แมลงหวี่ (*Drosophila melanogaster*) ชนิด wild type เป็นอาหารวันละ 2 ตัว แต่เนื่องจากแมงมุมกินเหยื่อที่มีชีวิต และเพื่อสะดวกในการจัดการ จึงนำแมลงหวี่ใส่ขวดแก้ว ไปสลับด้วยความเย็นที่อุณหภูมิ $-4 - 0^{\circ}\text{C}$ เป็นเวลา 8 นาที ก่อนนำไปเป็นอาหารให้แมงมุม



รูปที่ 3-4 ขวดเลี้ยงแมงมุมในห้องปฏิบัติการ ขวดแก้วภายในใส่ก้อนสำลีเปียกเพื่อเพิ่มความชื้น ปิดฝาด้านบนด้วยก้อนสำลีเพื่อช่วยในการถ่ายเทอากาศ

การศึกษาข้อมูลทางสัณฐานวิทยาและชีววิทยาของแมงมุม *W. fidelis*

สุ่มเลือกแมงมุมเพศผู้และเพศเมียตัวเต็มวัย มาศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบสเตอริโอและกล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสง ถ่ายภาพและบันทึกขนาดของส่วนประกอบต่างๆ ของแมงมุม เพื่อใช้ประกอบในการจำแนกชนิด โดยอ้างอิงลักษณะต่างๆ ของแมงมุมจาก Kronstedt and Zyuzin (2009) มีส่วนประกอบหลักที่ต้องพิจารณาคือ

1. ลักษณะการจัดเรียงตัวของตา
2. จำนวนซี่ฟันบน chelicera
3. ลักษณะของระบบสืบพันธุ์ของแมงมุมเพศผู้ (รูปที่ 3-5) และเพศเมีย (รูปที่ 3-6)

วัดขนาดส่วนประกอบต่างๆ ของแมงมุมเพศละ 10 ตัว ในหน่วย mm ได้แก่ ความยาวและความกว้างของส่วน หัว-อก และส่วนท้อง ความยาวของขาในแต่ละส่วน คือ coxa, patella, femur, trochanter, tibia, meta tarsus และ tarsus

นำแมงมุมตัวเต็มวัยทั้งเพศผู้ และเพศเมียอย่างน้อยเพศละ 30 ตัว ไปชั่งน้ำหนักด้วยเครื่องชั่งแบบละเอียดในหน่วย g

หากพบแมงมุมเพศเมียที่มีไข่ สังเกตพฤติกรรมกรรมการดูแลบุตรมาวัดขนาดถุงไข่ และนับจำนวนลูกที่ฟักเป็นตัว



ก.

ข.

รูปที่ 3-5 ภาพถ่าย SEM แสดงลักษณะทางสัณฐานของ pedipalp แมงมุม *W. fidelis* เพศผู้; ก.) ด้าน retrolateral view แสดงส่วน embolus (emb) และ conductor (cond), ข.) ด้าน anterior view แสดงส่วน tegulum apophysis (teg.ap), การโค้งงอของ anterior retrolateral tegular process (a.r.l.p) และ posterior lateral tegular process (p.r.l.p) ลงมาทางด้าน ventral
ที่มา: Kronstedt T. and Zyuzin A., “Fixation of *Lycosa fidelis* O. Pickard-Cambridge, 1872 as the type species for the genus *Wadicosa* Zyuzin, 1985 (Araneae: Lycosidae), with a redescription of the species,” *Contributions to Natural History* 12 (2009): 821



ก.

ข.

รูปที่ 3-6 ภาพถ่าย SEM แสดงลักษณะทางสัณฐานของ epigyne แมงมุม *W. fidelis* เพศเมีย; ก.) ด้าน ventral view แสดงช่องเปิดเข้าสู่ foveolae ที่แบ่งออกเป็น 2 ช่องชัดเจน, ข.) ด้าน dorsal view แสดงลักษณะการวางตัวของ spermathecae (s) และ foveolae (f)
ที่มา: Kronstedt T. and Zyuzin A., “Fixation of *Lycosa fidelis* O. Pickard-Cambridge, 1872 as the type species for the genus *Wadicosia* Zyuzin, 1985 (Araneae: Lycosidae), with a redescription of the species,” **Contributions to Natural History** 12 (2009): 823

การทดลองในห้องปฏิบัติการ

1. การทดลองเพื่อทดสอบความเป็นพิษของสารคลอรีไพริฟอสความเข้มข้นที่ระบุบนฉลาก

สมมติฐาน: เนื่องจากการเตรียมสารตามความเข้มข้นที่ระบุบนฉลากของ เซนิไฟเลท 40 สามารถใช้กำจัดแมลงศัตรูพืชตามคำแนะนำได้ ดังนั้นสารเซนิไฟเลท 40 ที่ระดับความเข้มข้นดังกล่าว จึงน่าจะผลส่งกระทบต่อแมงมุม *W. fidelis* โดยทำให้แมงมุมตายแบบเฉียบพลันได้

อ้างอิงวิธีการจาก Karen and Brown (1996) และ Muangphra, Sengsai, and Gooneratne (2013)

1.1 เตรียมสารคลอรีไพริฟอส [ชื่อการค้า: เซนิไฟเลท 40, 40% emulsifiable concentration (EC); 40 mg ของสารคลอรีไพริฟอส ในตัวทำละลายปริมาตร 100 ml, Zenithai Intertrade CO.,LTD] ความเข้มข้นที่ระบุบนฉลาก (สารคลอรีไพริฟอส 50 ml ผสมน้ำ 20 l) ได้ความเข้มข้นเทียบเท่า 1,000 ppm โดยปิเปตสารคลอรีไพริฟอส 250 μ l ปรับปริมาตรในขวดปรับ

ปริมาตรด้วยน้ำกลั่น 100 ml ได้สารละลายเข้มข้น 1,000 ppm ($\mu\text{g/ml}$) ปริมาตร 100 ml (รูปที่ 3-7) ส่วนกลุ่มควบคุมใช้น้ำกลั่นโดยไม่ผสมสารคลอรีไพริฟอส

1.2 ใช้จานแก้วเพาะเชื้อขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 90 mm ขอบสูง 10 mm รองด้วยกระดาษกรอง Whatman No.1 เส้นผ่านศูนย์กลาง 110 mm โดยพับขอบกระดาษกรองให้ขึ้นมาเสมอกับขอบของจานแก้ว เพื่อให้มั่นใจว่าแมงมุมจะได้สัมผัสกับสารเคมีทุกๆ พื้นที่ในจานแก้ว (รูปที่ 3-8 ก.)

1.3 เตรียมจานแก้วกลุ่มทดสอบ (ระดับความเข้มข้นสารที่ระบุบนฉลาก) ปิเปตสารละลายคลอรีไพริฟอส 1,000 ppm ที่เตรียมไว้ปริมาตร 1.0 ml ลงบนกระดาษกรองให้ทั่ว (ได้ปริมาณสารบนกระดาษกรองเท่ากับ $10.518 \mu\text{g/cm}^2$) ส่วนกลุ่มควบคุมใช้น้ำกลั่นปริมาตร 1.0 ml จากนั้นตั้งจานแก้วที่ใส่สารหรือน้ำกลั่นแล้วทิ้งไว้ในตู้ดูดควัน เพื่อเป็นการกำจัดกลิ่นของคลอรีไพริฟอส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง แล้วนำออกมาปิเปตน้ำกลั่นปริมาตร 800 μl ลงบนกระดาษกรองเพื่อเพิ่มความชื้นระหว่างการทดลองให้เหมาะสมกับแมงมุม

1.4 สุ่มนำแมงมุม *W. fidelis* ตัวเต็มวัยเพศผู้ 10 ตัว เพศเมีย 10 ตัว ต่อกลุ่มทดลอง แยกใส่ลงในจานแก้วละ 1 ตัว ปิดด้วยพลาสติกใสสำหรับห่ออาหาร เจาะรูด้วยเข็มปักแมลงเบอร์ 0 จำนวน 20 รู (รูปที่ 3-8 ข.)

1.5 สังเกตพฤติกรรมของแมงมุมอย่างต่อเนื่องตั้งแต่เริ่มใส่แมงมุมลงไปจนครบ 1 ชั่วโมง จากนั้นนำจานแก้วตั้งทิ้งไว้ในที่มืด และอากาศถ่ายเทได้ดี งดอาหารเป็นเวลา 48 ชั่วโมง บันทึกจำนวนการตายสะสมของแมงมุมที่เวลา 24 และ 48 ชั่วโมง

1.6 ทำการทดลองซ้ำ 3 ครั้ง

2. การทดลองหาค่าความเข้มข้นถึงตาย (Lethal Concentration; LC)

เพื่อหาค่าความเป็นพิษของสารคลอรีไพริฟอส อ้างอิงวิธีการจาก Karen and Brown (1996) และดัดแปลงวิธีการจาก Muangphra, Sengsai, and Gooneratne (2013)

2.1 เตรียมสารละลายคลอรีไพริฟอสให้ได้ความเข้มข้น 1.0, 3.0, 6.0 และ 9.0 ppm โดยการทำให้ dilution จากสารความเข้มข้นที่ 1,000 ppm (รูปที่ 3-7)

2.2 เตรียมจานแก้วเพาะเชื้อและทำตามขั้นตอนเช่นเดียวกันกับข้อ 1.2

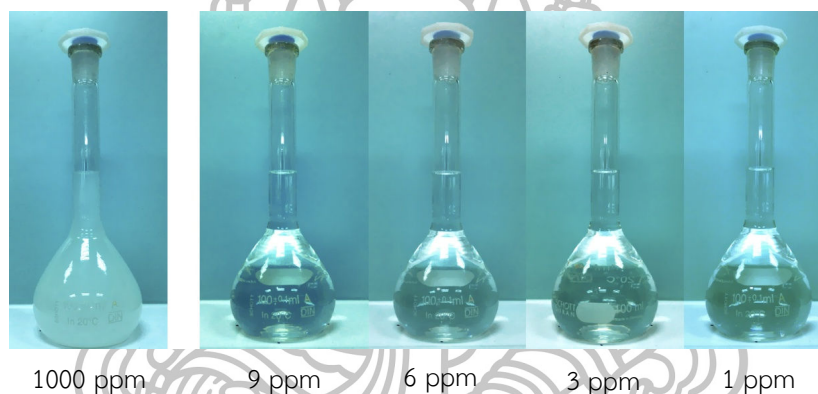
2.3 ปิเปตสารละลายคลอรีไพริฟอส แต่ละความเข้มข้น ปริมาตร 5 ml ให้ทั่วบนกระดาษกรอง (ได้ปริมาณสารเท่ากับ 0.053, 0.158, 0.316 และ 0.473 $\mu\text{g/cm}^2$ ตามลำดับ) ส่วนกลุ่มควบคุม (0.000 $\mu\text{g/cm}^2$) ใช้น้ำกลั่นปริมาตร 5 ml แทนสารละลายคลอรีไพริฟอส

2.4 ตั้งจานแก้วทิ้งไว้ในตู้ดูดควัน เป็นเวลา 24 ชั่วโมง เพื่อเป็นการกำจัดกลิ่นของคลอรีนไฟรีฟอสที่มากเกินไป จากนั้นเปิดน้ำกลั่นปริมาตร 800 μ l ลงบนกระดาษกรองของทุกกลุ่มความเข้มข้น เพื่อเพิ่มความชื้นระหว่างการทดลองให้เหมาะสมกับแมงมุม

2.5 สุ่มนำแมงมุม *W. fidelis* ตัวเต็มวัยเพศผู้ 10 ตัว เพศเมีย 10 ตัว ต่อความเข้มข้น แยกใส่ลงในจานแก้วละ 1 ตัว ปิดด้วยพลาสติกใสสำหรับห่ออาหาร เจาะรูด้วยเข็มปักแมลงเบอร์ 0 จำนวน 20 รู ตั้งจานแก้วทิ้งไว้ในที่มืด และอากาศถ่ายเทได้ดี งดการให้อาหาร

2.6 สํารวจและบันทึกจำนวนการตายของแมงมุมในแต่ละความเข้มข้นที่เวลา 24 และ 48 ชั่วโมง

2.7 ทำการทดลองซ้ำรวม 5 ครั้งหาค่า LC_{50} , LC_{30} และ LC_{10} ด้วยโปรแกรม Probit analysis จาก SPSS version 11.5



รูปที่ 3-7 สารละลายคลอรีนไฟรีฟอสที่เตรียมในระดับความเข้มข้นต่างๆ ในขวดปรับปริมาตรขนาด 100 ml

3. ประสิทธิภาพในการกินเหยื่อหลังจากการได้รับสารเคมีที่ LC_{10} , LC_{30} และ LC_{50}

สมมติฐาน: ถ้าสารคลอรีนไฟรีฟอสส่งผลให้ประสิทธิภาพในการกินเหยื่อของแมงมุม *W. fidelis* ลดลง ดังนั้นแมงมุมที่สัมผัสกับสารคลอรีนไฟรีฟอสที่ความเข้มข้นสูง ก็น่าจะมีประสิทธิภาพในการกินเหยื่อ น้อยกว่าแมงมุมในกลุ่มที่สัมผัสกับสารคลอรีนไฟรีฟอสความเข้มข้นต่ำ และไม่ได้สัมผัสกับสารคลอรีนไฟรีฟอสเลย (ประสิทธิภาพในการกินเหยื่อของแมงมุม *W. fidelis* ในกลุ่ม $LC_{50} < LC_{30} < LC_{10} <$ กลุ่มควบคุม)

เนื่องจากประสิทธิภาพในการกินเหยื่อของแมงมุมที่สนใจในการศึกษารั้งนี้จะพิจารณาทั้งในแง่ของระยะเวลาที่ใช้ก่อนการตอบสนองต่อเหยื่อและจำนวนเหยื่อที่ถูกกิน ดังนั้นจึงแบ่งสมมติฐานหลักออกเป็นสมมติฐานย่อย 2 สมมติฐาน คือ

1. สมมติฐานย่อยในแง่ของระยะเวลาที่ใช้ก่อนการตอบสนองต่อเหยื่อตัวแรก

สมมติฐาน : สารคลอรีไฟรฟอสน่าจะส่งผลให้แมงมุม *W. fidelis* มีการตอบสนองต่อเหยื่อช้าลง ดังนั้นตัวแปรเรื่องความเข้มข้นของสารคลอรีไฟรฟอสในแต่ละกลุ่มทดสอบ น่าจะมีความสัมพันธ์เชิงบวกกับตัวแปรเรื่องเวลาที่แมงมุมใช้ก่อนตอบสนองต่อเหยื่อตัวแรก กล่าวคือกลุ่มแมงมุมที่ได้สัมผัสกับสารคลอรีไฟรฟอสที่มีความเข้มข้นสูงขึ้น น่าจะใช้เวลาก่อนตอบสนองต่อเหยื่อตัวแรกนานขึ้นด้วย

2. สมมติฐานย่อยในแง่ของจำนวนเหยื่อที่ถูกกิน

สมมติฐาน : สารคลอรีไฟรฟอสน่าจะส่งผลให้แมงมุมมีความสามารถในการกินเหยื่อลดลง ดังนั้นแมงมุมที่ได้สัมผัสกับสารคลอรีไฟรฟอสจะกินเหยื่อได้น้อยกว่าแมงมุมที่ไม่ได้สัมผัสกับสารคลอรีไฟรฟอส (จำนวนเหยื่อที่ถูกกินโดยแมงมุม *W. fidelis* ในกลุ่ม $LC_{50} < LC_{30} < LC_{10} <$ กลุ่มควบคุม)

วิธีการทดลองดัดแปลงจาก Hof, Heimann, and Römcke (1995) และ Hanna, C., and Hanna (2012)

3.1 เตรียมสารละลายคลอรีไฟรฟอสให้ได้ความเข้มข้นเทียบเท่ากับ LC_{10} , LC_{30} และ LC_{50} (จากผลการทดลอง ตารางที่ 4-4 ได้ความเข้มข้นของสารที่ LC_{10} , LC_{30} และ LC_{50} ของเพศผู้เท่ากับ 0.2, 1.1 และ 2.8 ppm ของเพศเมียเท่ากับ 1.9, 4.0 และ 5.5 ppm ตามลำดับ)

3.2 เตรียมจานแก้วเพาะเชื้อและทำตามขั้นตอนเช่นเดียวกันกับข้อ 1.2

3.3 ปิเปตสารละลายคลอรีไฟรฟอสความแต่ละเข้มข้นที่เตรียมไว้ปริมาตร 5 ml ลงบนกระดาษกรองให้ทั่ว ส่วนกลุ่มควบคุมใช้น้ำกลั่นปริมาตร 5 ml แทนสารละลายคลอรีไฟรฟอส (รวมเป็น 4 กลุ่มทดสอบ คือ กลุ่มควบคุม, LC_{50} , LC_{30} และ LC_{10})

3.4 ตั้งจานแก้วทิ้งไว้ในตู้ดูดควัน เป็นเวลา 24 ชั่วโมง เพื่อเป็นการกำจัดกลิ่นของคลอรีไฟรฟอสที่มากเกินไป

3.5 หลังจากครบ 24 ชั่วโมง ปิเปตน้ำกลั่นปริมาตร 800 μ l ลงบนกระดาษกรองในทุกกลุ่มการทดลองเพื่อเพิ่มความชื้นระหว่างการทดสอบให้เหมาะสมกับแมงมุม

3.6 สุ่มนำแมงมุม *W. fidelis* ตัวเต็มวัยเพศผู้และเพศเมีย อย่างน้อยเพศละ 10 ตัว แยกใส่ลงจานแก้วละ 1 ตัว ปิดด้วยพลาสติกใสสำหรับห่ออาหาร เจาะรูด้วยเข็มปักแมลงเบอร์ 0 จำนวน 20 รู

3.7 นำจานแก้วตั้งทิ้งไว้ในที่มืด และอากาศถ่ายเทได้ดี อดอาหารแมงมุมเป็นเวลา 48 ชั่วโมง

3.8 เตรียมจานแก้วใหม่ทำเช่นเดียวกับข้อ 1.2 แล้วเติมน้ำกลั่นที่สะอาด ปริมาตร 800 μ l ลงบนกระดาษกรองในทุกกลุ่มการทดลองเพื่อเพิ่มความชื้นระหว่างการทดสอบให้เหมาะสมกับแมงมุม

3.9 ย้ายแมงมุมที่ยังมีชีวิตออกจากจานแก้วเดิมของแต่ละกลุ่มทดสอบ ไปใส่ในจานแก้วใหม่ให้อาหารแมงมุม ด้วยแมลงหวี่สายพันธุ์ปกติจำนวน 5 ตัว (เนื่องจากแมงมุมกินเหยื่อที่มีชีวิตและเพื่อ

สะดวกในการจัดการ จึงนำแมลงหวี่ไปสลบที่ความเย็น $-4 - 0^{\circ}\text{C}$ เป็นเวลา 8 นาที ก่อนนำไปให้แมงมุม) โดยวางแมลงหวี่บริเวณด้านหน้าของแมงมุม แล้วปิดฝาจานแก้วให้สนิท

3.10 สังเกตพฤติกรรมหลังจากที่เริ่มใส่แมลงหวี่ลงไป และทำการบันทึกข้อมูล ดังนี้

3.10.1 บันทึกจำนวนแมงมุมในแต่ละกลุ่มทดสอบ ที่เริ่มตอบสนองต่อเหยื่อครั้งแรกโดยดูจากการแสดงพฤติกรรมในการจู่โจมแมลงหวี่ เช่น การเคลื่อนตัวเข้าไปตะครุบแมลงหวี่ หรือการวิ่งไล่จับแมลงหวี่ โดยไม่สนใจว่าแมงมุมจะจับแมลงหวี่ได้สำเร็จหรือไม่ แล้วทำการบันทึกจำนวนตัวแมงมุมที่มีการแสดงพฤติกรรมดังกล่าว ให้อยู่ในช่วงเวลาดังนี้ 0 - 1 นาที / หลังจาก 1 นาที - 5 นาที / หลังจาก 5 นาที - 30 นาที / หลังจาก 30 นาที - 60 นาที แมงมุมตัวใดที่แสดงพฤติกรรมดังกล่าว และถูกบันทึกลงในแต่ละช่วงเวลาเรียบร้อยแล้วให้นำแมงมุมตัวนั้นออกจากการทดลองและจะไม่ทำการบันทึกซ้ำอีก หากมีแมงมุมตัวใดไม่มีการแสดงพฤติกรรมในการจู่โจมแมลงหวี่ภายในเวลา 60 นาที ให้กลับมาบันทึกว่ามีเหยื่อที่ถูกกินหรือไม่ที่เวลา 24 ชั่วโมง

3.10.2 บันทึกจำนวนเหยื่อที่ถูกกินสะสมในระยะเวลา 1, 5, 30, 60 นาที และ 24 ชั่วโมง

3.11 วิเคราะห์หาความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของสารคลอโรไพริฟอสกับเวลาที่ใช้ก่อนตอบสนองต่อเหยื่อด้วย Spearman's rho และวิเคราะห์หาความแตกต่างของจำนวนเหยื่อที่ถูกกินสะสมในแต่ละกลุ่มทดสอบที่เวลา 60 นาที ด้วย ANOVA โปรแกรม SPSS เวอร์ชัน 11.5 เพื่อทดสอบสมมติฐานย่อยที่ 1 และ 2 ตามลำดับ

4. การติดตามผลของกิจกรรมเอนไซม์

4.1 การเตรียมแมงมุมเพื่อใช้ในการสกัดเอนไซม์

ดัดแปลงจาก Van Erp et al. (2002)

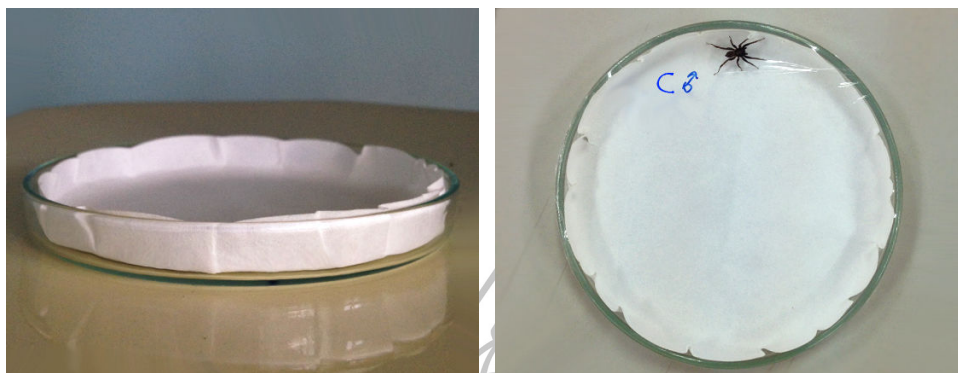
4.1.1 การให้สารคลอโรไพริฟอส กับแมงมุม ทำเช่นเดียวกันกับข้อ 3.1-3.7

4.1.2 หลังจากครบ 48 ชั่วโมง นำแมงมุมที่รอดชีวิตไปแช่เย็น ที่อุณหภูมิ -4°C เพื่อให้แมงมุมตายอย่างสงบและไม่ทำให้เอนไซม์เสียสภาพ

4.1.3 นำแมงมุมที่แช่เย็นแล้วออกมาล้างที่ละตัวให้สะอาด โดยนำแมงมุมแต่ละตัวใส่ลงในหลอดทดลองขนาด 5 ml ใส่ 0.2 M PBS แช่เย็น ปริมาตร 3 ml นำไปเขย่าโดยใช้เครื่อง vortex ทำการล้างอย่างน้อย 3 ครั้ง (การวิเคราะห์กิจกรรมของเอนไซม์ AChE จะใช้ 0.2 M PBS pH 7.5 ทุกขั้นตอนตลอดการทดลอง ส่วนการวิเคราะห์กิจกรรมของเอนไซม์ CAT ใช้ 0.2 M PBS pH 7.0 ทุกขั้นตอนตลอดการทดลอง)

4.1.4 นำแมงมุมที่ล้างสะอาดจำนวน 3 ตัว ของแต่ละกลุ่มทดสอบ ใส่ลงในหลอดปั่นเหวี่ยงแบบพลาสติก (centrifuge tube) ขนาด 5 ml ใส่ 0.2 M PBS ให้พอท่วมตัวแมงมุมแต่ไม่ให้

เกิน 2 ml นำไปปั่นละเอียด (homogenized) ด้วยเครื่องปั่นละเอียด (homogenizer) (รูปที่ 3-9 ก.) ความถี่ 16,000 รอบ/นาที เป็นเวลา 3 นาที โดยแช่อยู่ในบีกเกอร์ที่มีน้ำแข็งตลอดเวลา



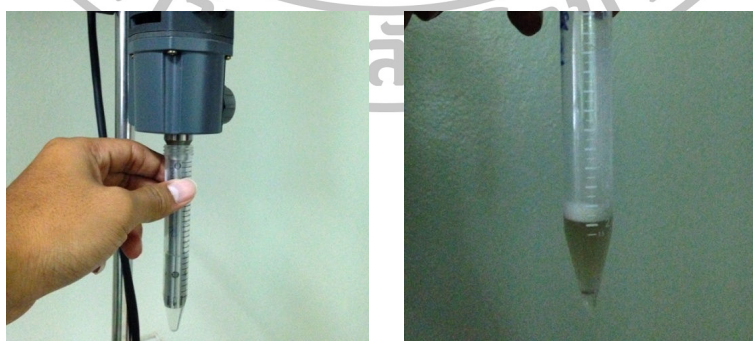
ก.

ข.

รูปที่ 3-8 การเตรียมกระดาษกรองเพื่อทดสอบสารคลอโรไพริฟอสกับแมงมุม: ก.) พับขอบกระดาษกรองให้เสมอกับขอบจานแก้ว, ข.) ปิดฝาด้วยพลาสติกใส เจาะรูด้วยเข็มปักแมลงเบอร์ 0 จำนวน 20 รู เพื่อให้อากาศถ่ายเท

4.1.5 นำ tissue lysates (รูปที่ 3-9 ข.) ที่ได้จากการปั่นละเอียด ปรับปริมาตรด้วย 0.2 M PBS 2.0 ml แล้วไปปั่นเหวี่ยงที่ 5,000 g ด้วยเครื่องปั่นเหวี่ยง (centrifuge) เป็นเวลา 30 นาที ที่ อุณหภูมิ 2 °C และนำเฉพาะสารละลายส่วนใส (supernatant) มาปั่นเหวี่ยงอีกครั้ง ที่ 5,000 g เป็น เวลา 10 นาที อุณหภูมิ 2 °C

4.1.6 นำ supernatant ซึ่งเป็นส่วนที่มีเอนไซม์ของแมงมุม ใส่ใน centrifuge tube ขนาด 2.0 ml ท่อด้วยกระดาษฟอยล์เก็บแยกและติดป้ายบอกชื่อแต่ละกลุ่มให้ชัดเจน เก็บไว้ที่ อุณหภูมิ ไม่เกิน 4 °C เพื่อใช้ในการวิเคราะห์กิจกรรมเอนไซม์ต่อไป



ก.

ข.

รูปที่ 3-9 การบดแมงมุมด้วยเครื่อง homogenizer: ก.) การบดแมงมุมในหลอด centrifuge ด้วย เครื่อง homogenizer, ข.) tissue lysates ที่ได้จากการบดแมงมุมจนละเอียด

4.2 การวัดปริมาณโปรตีนเพื่อใช้เทียบสัดส่วนปริมาณเอนไซม์ทั้งหมด

วัดปริมาณโปรตีนตามวิธีของ Lowry et al. (1951)

4.2.1 นำ supernatant ที่เก็บไว้ มาผสมให้เข้ากันด้วยเครื่อง vortex แบ่งสารละลายมา 0.5 ml ใส่ในหลอดทดลองขนาด 10 ml

4.2.2 เติม Lowry solution 0.7 ml ลงในหลอดทดลอง และนำไปผสมให้เข้ากัน (ด้วยเครื่อง vortex) เพื่อให้โปรตีนทำปฏิกิริยากับไอออนของทองแดง

4.2.3 เก็บไว้ในที่มืดที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 20 นาที แล้วนำตัวอย่างออกมาเติม 0.1 ml Folin Reagent นำไปผสมให้เข้ากัน (ด้วยเครื่อง vortex) เก็บไว้ในที่มืดเป็นเวลา 30 นาที เพื่อให้กรดอะมิโนที่เป็นสารพวกอะโรมาติกในตัวอย่างรีดิวซ์ phosphomolybdate phosphotungstic acid ซึ่งอยู่ใน Folin's reagent ซึ่งจะได้ผลิตภัณฑ์สุดท้ายเป็นสีน้ำเงิน

4.2.4 นำออกมาผสมให้เข้ากัน (ด้วยเครื่อง vortex) และนำตัวอย่างซึ่งมีสารสีน้ำเงินไปใส่ใน cuvette และนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงด้วยเครื่อง spectrophometer ที่ 750 nm

4.2.5 นำค่าที่อ่านได้มาเทียบกับกราฟโปรตีนมาตรฐาน บันทึกเป็นปริมาณโปรตีนที่พบใน supernatant ของแต่ละกลุ่มทดสอบ

4.2.6 ทำการวัดปริมาณโปรตีนทุกครั้งที่มีการสกัดเอนไซม์ใหม่

4.3 การวิเคราะห์กิจกรรมเอนไซม์ Acetyl cholinesterase (AChE)

สมมติฐาน: ถ้าสารคลอรีไพริฟอสมีผลในการยับยั้งกิจกรรมเอนไซม์ AChE ของแมงมุม *W. fidelis* ได้ ดังนั้นแมงมุมที่สัมผัสกับสารคลอรีไพริฟอสที่ความเข้มข้นสูง ก็น่าจะมีเปอร์เซ็นต์การยับยั้งเอนไซม์ AChE มากกว่าในกลุ่มที่สัมผัสกับสารคลอรีไพริฟอสความเข้มข้นต่ำ หรือไม่ได้สัมผัสกับสารคลอรีไพริฟอสเลย (เปอร์เซ็นต์การยับยั้งเอนไซม์ AChE ในกลุ่ม $LC_{50} > LC_{30} > LC_{10} >$ กลุ่มควบคุม)

ปรับปรุงวิธีการทดลอง โดยอ้างอิงจาก Ellman et al. (1961) และ Van Erp et al. (2002)

4.3.1 วิเคราะห์การทำงานของเอนไซม์ AChE โดยผสม 0.2 M PBS pH 7.5 ปริมาตร 1700 μ l, 0.5 mM DTNB ปริมาตร 50 μ l, supernatant ที่เตรียมไว้ 150 μ l ผสมให้เข้ากันด้วย micropipette ใน cuvette แก้ว ขนาด 3.0 ml ได้สารละลายรวม ปริมาตร 1,900 μ l ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 5 นาที นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 412 nm ปรับค่า blank

4.3.2 เติม 15 mM acetylthiocholine iodide (ACT iodide) ปริมาตร 100 μ l ผสมให้เข้ากันด้วย micropipette โดย ACT iodide จะทำปฏิกิริยากับเอนไซม์ AChE ได้สารผลิตภัณฑ์สุดท้ายเป็นสารที่มีสีเหลือง

4.3.3 นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงทันทีที่ 412 nm ด้วยเครื่อง spectrophotometer ในโหมด timing scan บันทึกค่าการดูดกลืนแสงทุกๆ 15 วินาที เป็นเวลา 5 นาที ทำการบันทึกผล

4.3.4 ทดสอบต่อกับ supernatant ของกลุ่มทดสอบที่ความเข้มข้นอื่นๆ ทำเช่นเดียวกับข้อ 4.3.1 – 4.3.3 ตามลำดับ โดยจะดูการเกิดผลิตภัณฑ์สีเหลืองที่เป็นผลสืบเนื่องจากการทำปฏิกิริยาของเอนไซม์ตัวอย่างกับ ACT iodide

4.3.5 นำค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 412 nm คำนวณความเข้มข้นของ AChE ที่ถูกใช้ไปในการทำปฏิกิริยา (c) หน่วยเป็น mol/L โดยแทนค่าในสมการดังนี้

$$c = \frac{\Delta A_{412nm}}{\epsilon b}$$

ΔA_{412nm} คือ ผลต่างของค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 412 nm ที่เวลา

$T_2 - T_1$

ϵ คือ ค่าการดูดกลืนแสงต่อโมลของสาร (extinction coefficient) มี

ค่า $1.36 \times 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$

b คือ ความยาวของแสงที่ผ่านสารละลาย (path length) หน่วยเป็น cm

c คือ ความเข้มข้นของสารละลาย ในที่นี้คือจำนวนโมลของ AChE ที่ถูกใช้ไปหน่วยเป็น mol/L

โดย T_2 และ T_1 เลือกจากช่วงเวลาที่ค่าการดูดกลืนแสงเพิ่มขึ้นคงที่ หน่วยเป็น min

4.3.6 คำนวณ activity ของเอนไซม์เป็นหน่วย $\mu\text{moles} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg protein}^{-1}$ ตามสมการด้านล่าง (โดยวิธีการวัดปริมาตรโปรตีนตามหัวข้อ 4.2)

$$AChE \text{ activity} = \frac{c}{\text{เวลา } (T_2 - T_1) \times \text{mg protein}}$$

4.3.7 นำค่า AChE activity ที่ได้ของกลุ่มทดสอบ LC_{50} , LC_{30} และ LC_{10} ไปคำนวณค่าเปอร์เซ็นต์การถูกยับยั้งของเอนไซม์ (%Inhibition) โดยนำไปหาผลต่างกับค่า AChE activity ของกลุ่มควบคุม (control) ตามสมการด้านล่าง

$$\% \text{ Inhibition} = \frac{AChE \text{ activity } | \text{control} - LCx |}{AChE \text{ activity } (\text{control})} \times 100$$

4.4 การวิเคราะห์กิจกรรมเอนไซม์ Catalase (CAT)

สมมติฐาน: ถ้าสารคลอโรไพริฟอสมีผลในการกระตุ้นกิจกรรมเอนไซม์ CAT ของแมงมุม *W. fidelis* ได้ ดังนั้นแมงมุมที่สัมผัสกับสารคลอโรไพริฟอสที่ความเข้มข้นสูง ก็น่าจะมีกิจกรรมเอนไซม์ CAT มากกว่าในกลุ่มที่สัมผัสกับสารคลอโรไพริฟอสความเข้มข้นต่ำ และไม่ได้สัมผัสกับสารคลอโรไพริฟอสเลย (กิจกรรมเอนไซม์ CAT ในกลุ่ม $LC_{50} > LC_{30} > LC_{10} > control$)

ปรับปรุงวิธีการทดลอง CAT activity ดัดแปลงจาก Aebi (1984) และ Jemec (2007)

4.4.1 เตรียม cuvette ขนาด 3 ml micropipette สำหรับเครื่อง spectrophometer และทำการตั้งค่าเครื่องที่ค่าความยาวคลื่นที่ 240 nm

4.4.2 ตูด supernatant ที่เตรียมไว้ปริมาตร 0.15 ml เจือจางลงด้วย 50 mM PBS pH 7.0 ปริมาตร 1.85 ml

4.4.3 ทำการผสมให้เข้ากันอย่างดีด้วย micropipette นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 240 nm ปรับค่าแสดงให้เป็นศูนย์เป็นการ blank

4.4.4 นำออกมาเติมสารละลาย H_2O_2 1 ml ผสมให้เข้ากันทันที นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงของ H_2O_2 ที่ความยาวคลื่น 240 nm ในโหมด timing scan วัดทุกๆ 15 วินาที เป็นเวลา 4 นาที ทำการบันทึกผล

4.4.5 ทดสอบต่อกับ supernatant ของกลุ่มทดสอบที่ความเข้มข้นอื่นๆ ทำเช่นเดียวกับข้อ 4.4.2 – 4.4.4 ตามลำดับ โดยจะดูการลดลงของ H_2O_2 ที่ทำปฏิกิริยากับเอนไซม์ตัวอย่าง

4.4.6 นำค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 240 nm คำนวณความเข้มข้นของ H_2O_2 ที่ถูกใช้ไปในการทำปฏิกิริยา (c) หน่วยเป็น mol/l โดยแทนค่าในสมการดังนี้

$$c = \frac{\Delta A_{240nm}}{\epsilon b}$$

ΔA_{240nm} คือ ผลต่างของค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 240 nm ที่เวลา $T_2 - T_1$

ϵ คือ ค่าการดูดกลืนแสงต่อโมลของสาร (extinction coefficient) มีค่า $43.6 M^{-1} cm^{-1}$

b คือ ความยาวของแสงที่ผ่านสารละลาย (path length) หน่วยเป็น cm

c คือ ความเข้มข้นของสารละลาย ในที่นี้คือจำนวนโมลของ H_2O_2 ที่ถูกใช้ไปหน่วยเป็น mol/l

โดย T_2 และ T_1 เลือจากช่วงเวลาที่ค่าการดูดกลืนแสงเพิ่มขึ้นคงที่ หน่วยเป็น min

4.4.7 คำนวณ activity ของเอนไซม์เป็นหน่วย $\mu\text{moles} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mgprotein}^{-1}$ ตามสมการด้านล่าง (โดยวิธีการวัดปริมาณโปรตีนตามหัวข้อ 4.2)

$$\text{CAT activity} = \frac{c}{\text{เวลา (T2 - T1)} \times \text{mg protein}}$$

นำค่าการดูดกลืนแสงของกิจกรรมเอนไซม์ทั้ง 2 ชนิด (AChE และ CAT) เทียบกับปริมาณโปรตีนที่วัดได้ มาคำนวณหากิจกรรมเอนไซม์ซึ่งมีหน่วยเป็น $\mu\text{moles} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mgprotein}^{-1}$ (ตามสมการในข้อ 4.3.6 และ 4.4.7) สำหรับการวัดกิจกรรมเอนไซม์ AChE นำมาคำนวณค่าเป็นเปอร์เซ็นต์การถูกยับยั้งโดยเทียบจากกลุ่มควบคุม (ตามสมการที่ 4.3.7) สำหรับทุกกลุ่มทดสอบทำการทดลองซ้ำ 3 ครั้ง นำค่ากิจกรรมเอนไซม์ทั้ง 2 ชนิด และ เปอร์เซ็นต์การยับยั้ง AChE ที่ได้มาเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยกันทางสถิติในแต่ละกลุ่มทดสอบโดยเปรียบเทียบแบบมูมภายในเพศเดียวกันด้วย ANOVA โปรแกรม SPSS เวอร์ชัน 11.5



บทที่ 4 ผลการศึกษา

ชีววิทยาของแมงมุมสุนัขป่า *Wadicosa fidelis*

1. ลักษณะทางสัณฐานวิทยา

แมงมุมเพศผู้

carapace : ความยาวเฉลี่ย 2.59 ± 0.06 mm (ตารางที่ 4-1) มีสีดำเข้มบริเวณขอบตั้งแต่ด้านหน้าเริ่มจากบริเวณ MLE ทั้งสองด้าน จนถึงบริเวณ pedicel กลาง carapace ด้าน dorsal เป็นสีเทาปนน้ำตาลเหลือง fovea ยาวประมาณ $1/3$ ขนานกับความยาวของ carapace ด้าน ventral มีสีเทาอ่อนกว่าด้านข้างลำตัว sternum คล้ายรูปหัวใจมีสีเทาดำบางครั้งมีสีน้ำตาลเหลือง แต่เข้มกว่า carapace ด้าน dorsal ปลาย sternum ด้าน posterior มีลักษณะแหลม (รูปที่ 4-1)

abdomen : ความยาวเฉลี่ย 2.19 ± 0.04 mm (ตารางที่ 4-1) โดยส่วนมากมีขนาดเล็กกว่า carapace เล็กน้อย pedicel ชอนตัวอยู่ด้านล่างของ cephalothorax บริเวณ dorsal ด้าน anterior มีสีดำเข้มคล้ายสีดำของขอบ carapace มีขนสีขาวขึ้นถัดจากบริเวณที่เป็นสีดำ สีโดยส่วนใหญ่ของด้าน dorsal เป็นสีเทาจนถึงน้ำตาลเหลือง มีลายสีเทาดำคล้ายรูปลูกศรจางๆ แขนงย่อยลงมาทางด้าน posterior มีจุดสีขาว 2 แถว แถวละ 3-4 จุดเรียงตัวตามแนวยาวด้าน dorsal (รูปที่ 4-1) ด้าน ventral มีสีอ่อนกว่าไม่มีลายเหมือนด้าน dorsal บริเวณ epigastric furrow มีสีเข้ม ด้านข้างมี book lung สีอ่อน เห็นตำแหน่งเปิดของ book lung 1 คู่ ชัดเจน

chelicera : ขอบที่ติดกับ clypeus มีสีเทา clypeus มีสีเข้ม มีขนแทงยื่นออกมาทางด้านหน้าอย่างชัดเจน chelicera มีสีน้ำตาลส้ม มีเส้นสีดำพาดยาว มี retromarginal teeth 3 อัน fang มีสีน้ำตาลเข้ม (รูปที่ 4-1 ง.)

ตา: เมื่อมองจากด้านหน้า ตาแถวหน้าสุด (AE) มีลักษณะค่อนข้างโค้งลง (procurved) เล็กน้อย และมีความยาวแถวสั้นกว่าแถวของตาคู่กลางแถวหลัง (PME) ส่วนความยาวแถวของตาคู่กลางแถวหลังสั้นกว่าแถวของตาคู่ริมแถวหลังเล็กน้อย (PLE) เมื่อพิจารณาระหว่างตาในแถวหน้าสุด (AE) จะเห็นว่า ตาคู่กลางแถวหน้า (AME) ค่อนข้างใหญ่กว่าตาคู่ริมแถวหน้า (ALE) ตาเป็นสีดำเข้ม โดยเฉพาะตาคู่ริมแถวหลัง (PLE) จะมีสีกลมกลืนกับสีดำของขอบ carapace (รูปที่ 4-1 ก.)

ขา : เรียงตามลำดับความยาวเป็น $4 > 1 > 2 > 3$ (ตารางที่ 4-2) โดยขาข้อที่ 1 ส่วนของ femur มักจะมีสีดำเข้มมากกว่าขาข้ออื่นๆ สีพื้นของขาเป็นสีเทา มีลายสีเทาเข้ม จุดน้ำตาลเหลืองและขนสีขาวเป็นแถบแทรกตามแนวขวาง ทำให้เห็นขามีลักษณะเป็นลายปล้องๆ (รูปที่ 4-1)

pedipalp : บริเวณ tegulum มี retrolateral process ยื่นลงไปทางด้าน ventral มี subtegulum ค่อนข้างใหญ่ และแทรกตัวอยู่ด้านในของ bulbus มี cuticle ลักษณะเป็นคลื่นปกคลุมอยู่ด้านบน ส่วนปลายของ bulbus ติดกับ conductor ของ embolus (รูปที่ 4-3 ก.)

แมงมุมเพศเมีย

carapace : ความยาวเฉลี่ย 6.16 ± 0.18 mm (ตารางที่ 4-1) มีสีเทาเข้มทั่วทั้ง carapace ไม่มีขอบสีดำเหมือนเพศผู้ มีลายสีขาวและเทาอ่อนจนถึงน้ำตาลเหลืองแทรกตัวกระจายทั้ง carapace มี fovea วางตัวขนานกับความยาวของลำตัว บริเวณรอบ fovea มีเส้นสีเข้มกระจายตัวใกล้กับขอบของ carapace โดยวางตัวในแนวรัศมีของ fovea

abdomen : ความยาวเฉลี่ย 3.18 ± 0.17 mm (ตารางที่ 4-1) โดยส่วนมากมีขนาดใหญ่กว่า carapace มีสีเทาและลายคล้ายกับส่วน carapace ส่วนของ pedicel ซ่อนตัวอยู่ด้านล่างของ cephalothorax บริเวณ dorsal ด้าน anterior มีสีดำเข้มกว่าบริเวณอื่น ด้าน dorsal มีลายสีดำจางคล้ายลูกศร แทรกย่นลงไปด้าน posterior มีจุดสีขาว 2 แถว แถวละ 3-4 จุดเรียงตัวตามแนวยาว ด้าน dorsal (รูปที่ 4-2) ด้าน ventral มีสีอ่อนกว่าไม่มีลายเหมือนด้าน dorsal บริเวณ epigastric furrow มีสีเข้ม สามารถมองเห็นตำแหน่งของ epigyne ซึ่งมีสีน้ำตาลอ่อน ด้านข้างมี book lung สีอ่อน เห็นตำแหน่งเปิดของ book lung 1 คู่ ชัดเจน

chelicera : ขอบที่ติดกับ clypeus มีสีเทา clypeus มีสีเข้มแต่สีอ่อนกว่า clypeus ของเพศผู้ มีขนที่ยื่นออกมาทางด้านหน้าอย่างชัดเจน บน chelicera มีเส้นสีดำพาดยาว มี retromarginal teeth 3 อัน fang มีสีน้ำตาลเข้ม (รูปที่ 4-1 ง.)

ตา: เมื่อมองจากด้านหน้า ตาแถวหน้าสุด (AE) มีลักษณะค่อนข้างโค้งงอ (procurved) เล็กน้อย และมีความยาวแฉกสั้นกว่าแฉกของตาคู่กลางแฉกหลัง (PME) ส่วนความยาวแฉกของตาคู่กลางแฉกหลังสั้นกว่าแฉกของตาคู่ริมแฉกหลังเล็กน้อย (PLE) เมื่อพิจารณาระหว่างตาในแถวหน้าสุด (AE) จะเห็นว่า ตาคู่กลางแฉกหน้า (AME) ค่อนข้างใหญ่กว่าตาคู่ริมแฉกหน้า (ALE) ตามีสีดำเข้มเห็นตำแหน่งได้ชัดเจนกว่าตาของแมงมุมเพศผู้ (รูปที่ 4-2 ก.)

ขา : เรียงตามลำดับความยาวเป็น $4 > 1 > 2 > 3$ (ตารางที่ 4-2) ขาทุกคู่มีสีเทา มีลายสีเทาเข้ม จุดน้ำตาลเหลืองและขนสีขาวเป็นแถบแทรกตามแนวขวาง ทำให้เห็นขามีลักษณะเป็นลายปล้องๆ (รูปที่ 4-2)

epigyne : มีช่อง foveolae ด้าน ventral 2 ช่อง มีถุง spermathecae ด้าน dorsal 2 ถุงขนาดใหญ่หันปลายถุงเข้าหากัน แบ่งเป็น 2 ฝั่งชัดเจน (รูปที่ 4-3 ข.)

ตารางที่ 4-1 ขนาดเฉลี่ย (mean±SE) ในแต่ละส่วนของร่างกายแมงมุม *W. fidelis* เพศผู้ (n = 10) และเพศเมีย (n = 10)

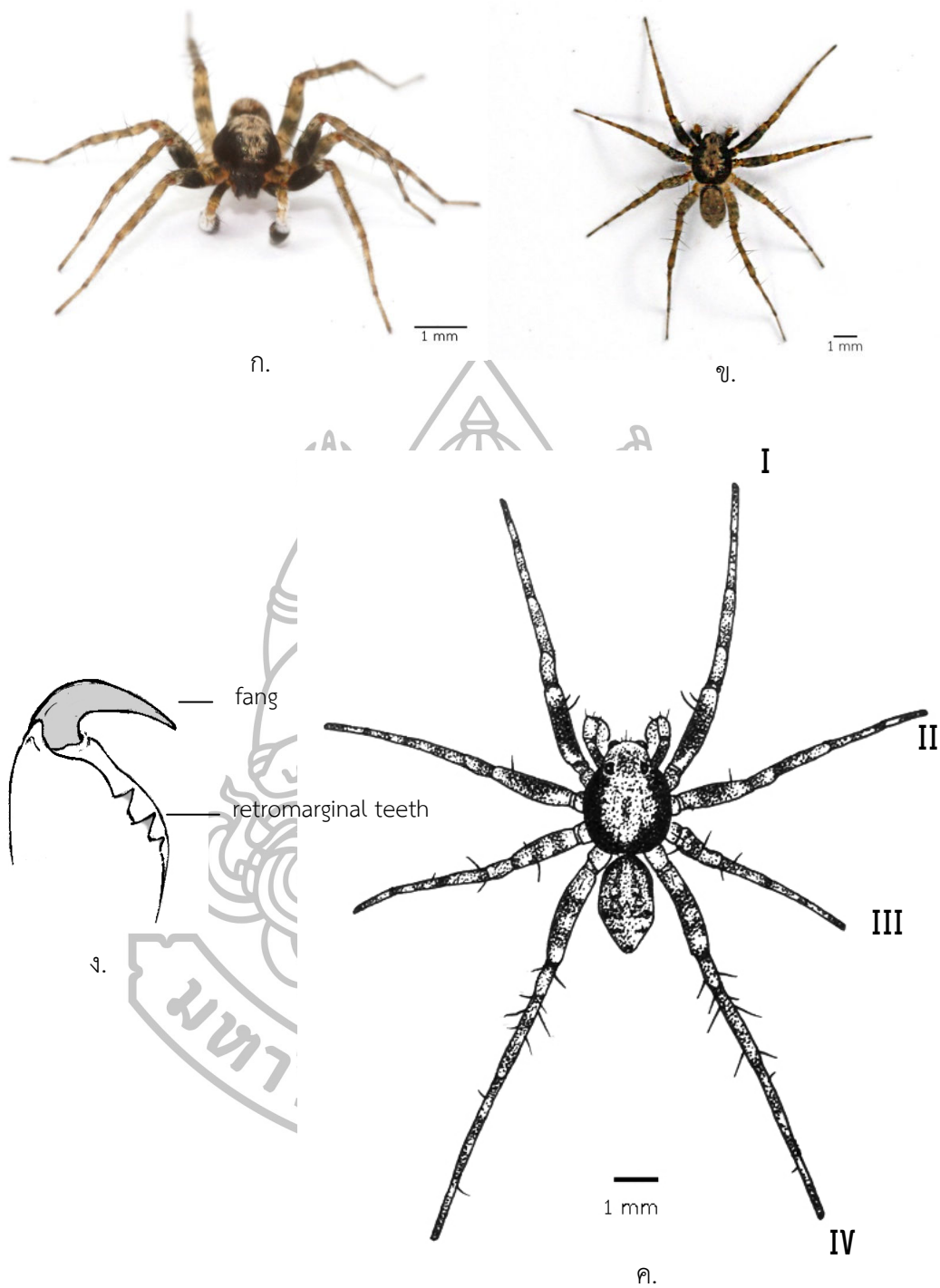
Body parts	Male	Female
Total length (TL)	4.78±0.09 mm	6.16±0.33 mm
Carapace length (CL)	2.59±0.06 mm	2.98±0.18 mm
Carapace width (CW)	1.78±0.02 mm	2.53±0.14 mm
Abdomen length (AL)	2.19±0.04 mm	3.18±0.17 mm
Abdomen width (AW)	1.27±0.01 mm	2.33±0.14 mm

ตารางที่ 4-2 ความยาวเฉลี่ย (mean±SE) ขาในแต่ละส่วนของแมงมุม *W. fidelis* เพศผู้ ในหน่วย mm (n = 10)

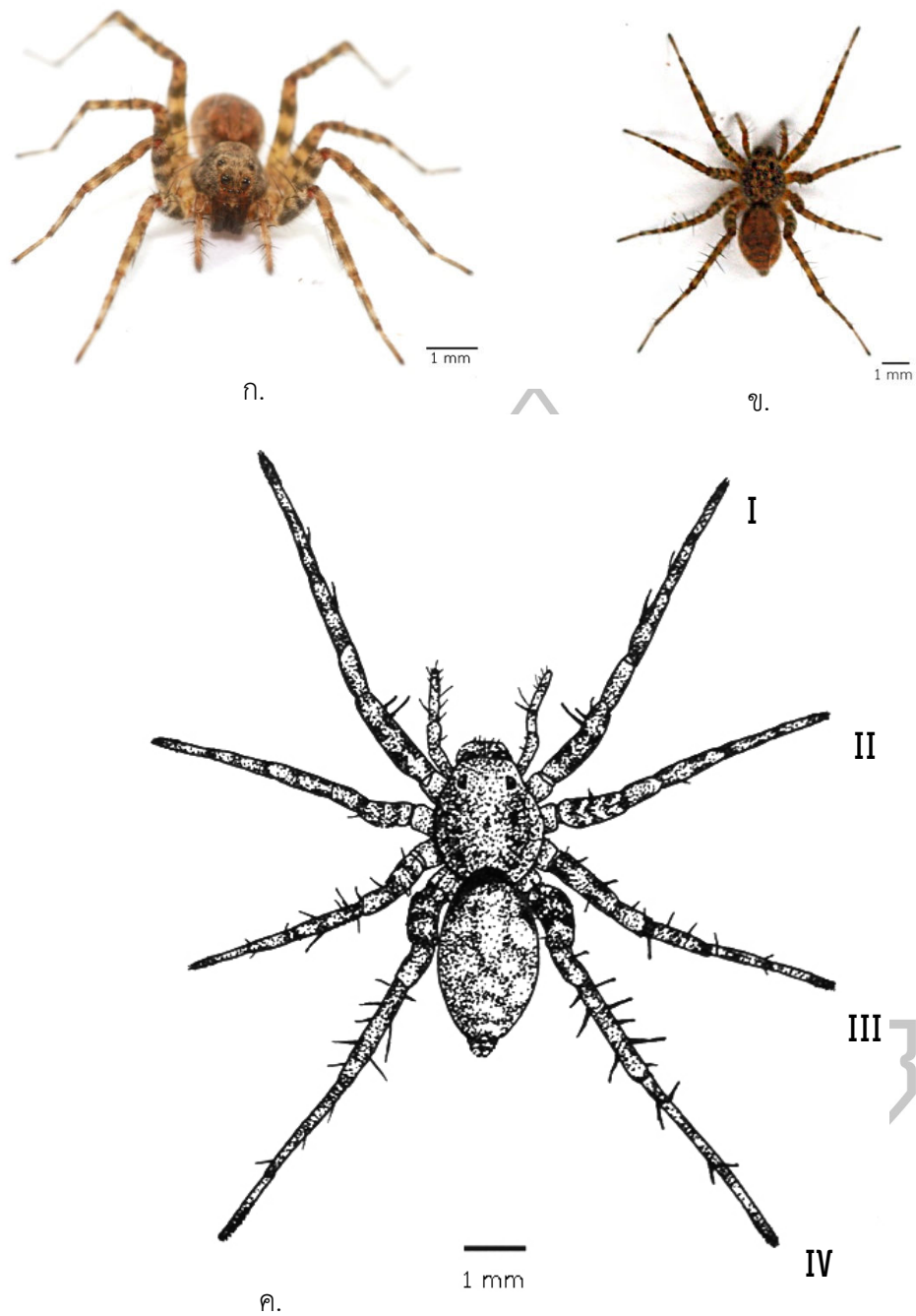
ขาคู่ที่	Femur	Patella	Tibia	Metatarsus	Tarsus	Total
IV	2.26±0.12	0.87±0.02	2.08±0.03	3.17±0.04	1.41±0.02	9.80±0.16
III	1.65±0.02	0.68±0.08	1.16±0.06	1.55±0.02	1.00±0.00	6.04±0.14
II	1.73±0.10	0.69±0.08	1.24±0.11	1.54±0.10	1.15±0.07	6.34±0.46
I	1.70±0.08	0.69±0.09	1.47±0.07	1.48±0.05	1.10±0.03	6.44±0.28

ตารางที่ 4-3 ความยาวเฉลี่ย (mean±SE) ขาในแต่ละส่วนของแมงมุม *W. fidelis* เพศเมีย ในหน่วย mm (n = 10)

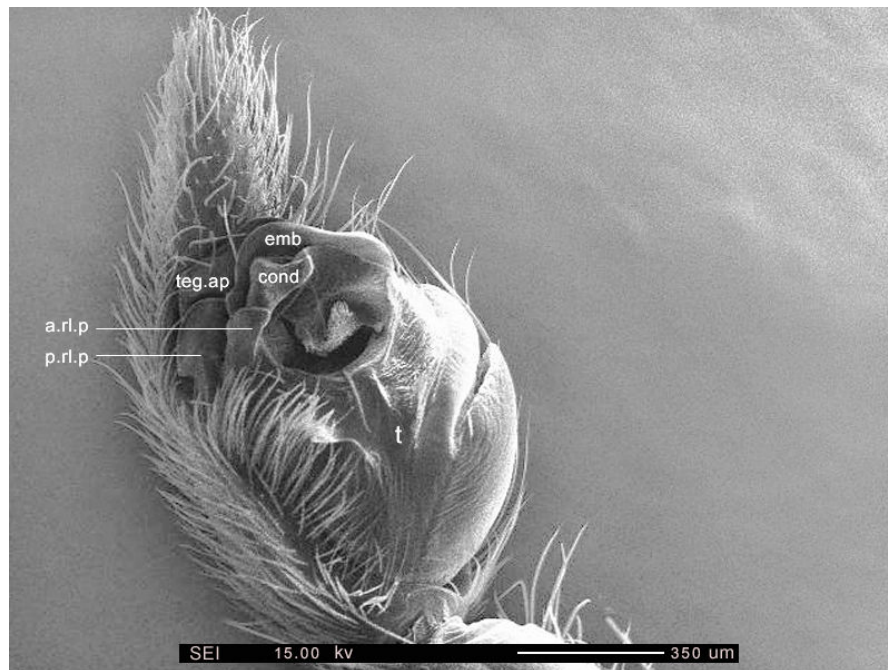
ขาคู่ที่	Femur	Patella	Tibia	Metatarsus	Tarsus	Total
IV	2.36±0.09	0.93±0.04	2.04±0.11	2.56±0.15	1.47±0.05	9.53±0.14
III	1.80±0.10	0.68±0.05	1.45±0.09	1.71±0.11	1.11±0.01	7.28±0.02
II	1.92±0.05	0.85±0.01	1.49±0.07	1.58±0.04	1.13±0.01	6.97±0.04
I	2.06±0.12	0.85±0.01	1.69±0.14	1.66±0.09	1.23±0.01	7.91±0.06



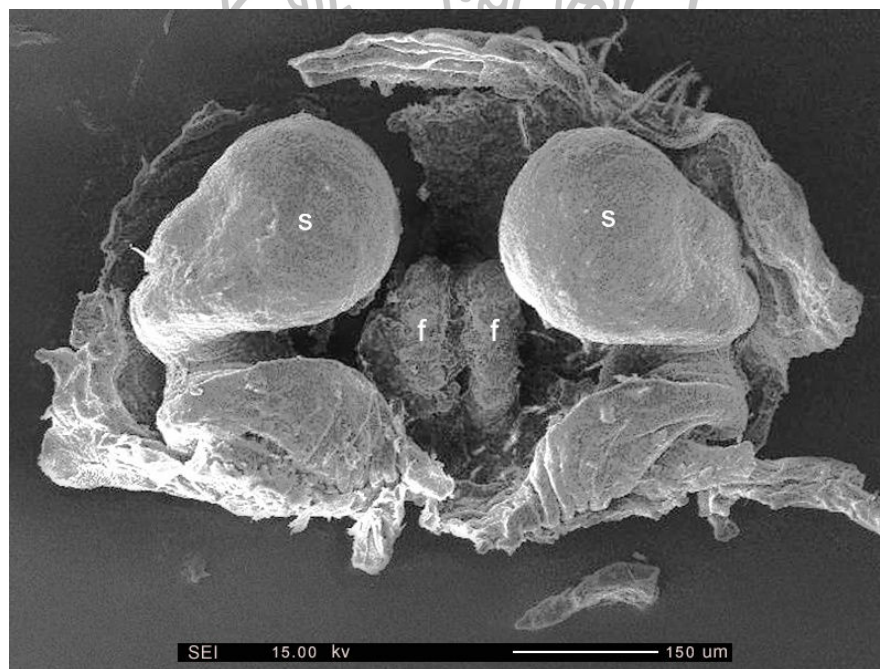
รูปที่ 4-1 ลักษณะของแมงมุม *W. fidelis* ตัวเต็มวัยเพศผู้ (scale bar = 1 mm): ก.) ด้าน anterior view, ข.) ด้าน dorsal view, ค.) ภาพวาดแมงมุม *W. fidelis* เพศผู้ ด้าน dorsal view ตัวเลขโรมัน = ลำดับขาของแมงมุมคู่ที่ 1 - 4 และ ง.) จำนวน retromarginal teeth บน chelicera ของแมงมุมเพศผู้ซึ่งมีลักษณะเดียวกับแมงมุมเพศเมีย



รูปที่ 4-2 ลักษณะของแมงมุม *W. fidelis* ตัวเต็มวัยเพศเมีย (scale bar = 1 mm): ก.) ด้าน anterior view, ข.) ด้าน dorsal view, ค.) ภาพวาดแมงมุม *W. fidelis* เพศเมีย ด้าน dorsal view
ตัวเลขโรมัน = ลำดับขาของแมงมุมคู่ที่ 1 - 4



ก.



รูปที่ 4-3 ภาพถ่าย SEM ระบบสืบพันธุ์ของแมงมุม *W. fidelis*; ก.) pedipalp ของแมงมุมเพศผู้ ตำแหน่งของ embolus (emb), conductor (cond), tegulum (t), tegulum apophysis (teg.ap) การโค้งงอของ anterior retrolateral apophysis (a.rl.p) และ posterior retrolateral apophysis (p.rl.p) ลงมาทางด้าน ventral, ข.) epigyne ของแมงมุมเพศเมีย ด้าน dorsal view แสดงตำแหน่งของ spermathecae (s) ที่หันเข้าหากัน และ foveolae

ข้อสังเกตอื่นๆ : แมงมุม *W. fidelis* ในวัยอ่อนมีลักษณะไม่แตกต่างกันทั้งเพศผู้และเพศเมีย โดยเพศผู้วัยอ่อนจะมีลักษณะคล้ายแมงมุมเพศเมีย มีปลาย pedipalp โป่งพองออกแต่ยังไม่เกิดการ sclerotized ของโปรตีนในบริเวณดังกล่าว จนกว่าจะถึงการลอกคราบครั้งสุดท้ายเป็นตัวเต็มวัย จึงจะเกิดสีดาบนขอบของ carapace และ pedipalp มีการเจริญอย่างสมบูรณ์ บางครั้งแมงมุม *W. fidelis* ตัวเต็มวัยมีสีแตกต่างกัน ทั้งในเพศผู้ด้วยกันเองพบว่า สีดาที่ปรากฏบริเวณขอบของ carapace มีสีดาจนปกคลุมส่วนของ cephalothorax เกือบทั้งหมด รวมถึง femur ของขาคู่ที่ 2 และ 3 ก็มีสีเข้ม แต่แมงมุมเพศผู้บางตัวกลับมีสีอ่อนกว่า แถบสีดายาวปรากฏเฉพาะบน femur ของขาคู่ที่ 1 เท่านั้น ส่วนเพศเมียที่พบบางตัวมีสีเทาเข้มทั่วทั้งตัว แต่บางตัวมีสีเทาอ่อน (รูปที่ 4-5) แต่เมื่อพิจารณาอวัยวะสืบพันธุ์ของทั้งเพศผู้เพศเมียที่แตกต่างกัน (ภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบสเตอริโอ) พบว่า อวัยวะสืบพันธุ์มีลักษณะที่เหมือนกัน

2. น้ำหนักตัว

แมงมุมเพศผู้ตัวเต็มวัยมีน้ำหนักโดยเฉลี่ย (mean±SE) เท่ากับ 0.0198 ± 0.0012 g (n=35) ซึ่งมีน้ำหนักน้อยกว่าแมงมุมเพศเมียตัวเต็มวัย ที่มีน้ำหนักเฉลี่ย (mean±SE) เท่ากับ 0.0260 ± 0.0004 g (n=35)

3. ถิ่นที่อยู่

โดยส่วนใหญ่พบแมงมุม *W. fidelis* อาศัยอยู่ในพื้นที่ชุ่มน้ำ หรือเปิดโล่งที่มีความชุ่มชื้น หรืออยู่ใกล้แหล่งน้ำ โดยส่วนมากในพื้นที่ศึกษาจะพบแมงมุม *W. fidelis* บนพื้นบริเวณริมขอบของคันนาที่มีรอยแยกของดิน (รูปที่ 4-5 ก.) มักจะพบแมงมุมซ่อนตัวอยู่ตามรอยแยก สีของแมงมุมมักจะกลมกลืนกับสีของพื้นดินที่อาศัย (รูปที่ 4-5 ข.) ด้วยความสามารถในการวิ่งบนผิวน้ำได้ของแมงมุมสุนัขป่า จึงทำให้พบแมงมุม *W. fidelis* เกาะพึดตามโคนต้นข้าว ต้นหญ้า หรือเศษกิ่งไม้ที่ทับถมกันในแหล่งน้ำท่วมขังได้ (รูปที่ 4-5 ค.) นอกจากบริเวณพื้นที่ศึกษาแล้วในช่วงที่ทำการสำรวจเบื้องต้นยังพบแมงมุม *W. fidelis* อาศัยอยู่ในพื้นที่ชุ่มชื้นใกล้กับบ้านเรือน บนพื้นดินทรายซึ่งเป็นพื้นที่เปิดโล่งใกล้แหล่งน้ำ (รูปที่ 4-5 ง.)

4. อาหาร

อาหารของแมงมุม *W. fidelis* จากการสำรวจพบ แมงมุม *W. fidelis* มีเหยื่ออาหารเป็นแมลงในอันดับ Orthoptera เช่น จิ้งหรีด ตั๊กแตนหนวดยาว และตั๊กแตนหนวดยาวขนาดเล็ก แมลงในอันดับ Homoptera เช่น เพลี้ยจักจั่นสีเขียว เพลี้ยกระโดดสีน้ำตาล แมลงในอันดับ Hemiptera เช่น มวนเขียว แมลงในอันดับ Diptera เช่น ยุง และ แมลงวัน ที่ลงเกาะตามพื้นดิน และแมลงในอันดับ Lepidoptera เช่น ผีเสื้อหนอนข้าวสาร และผีเสื้อกลางคืนขนาดเล็ก ในบางครั้งพบเหยื่ออาหารเป็นแมงมุมสุนัขป่าที่มีขนาดตัวเล็กกว่า เช่น แมงมุมสุนัขป่าในสกุล *Pardosa* นอกจากนี้ยัง

พบพฤติกรรมการกินแมงมุม *W. fidelis* ชนิดเดียวกันเอง (cannibalism) โดยส่วนมากจะพบในแมงมุมเพศเมียซึ่งมีขนาดตัวที่ใหญ่กว่า กินแมงมุมเพศผู้และแมงมุมเพศเมียที่มีขนาดเล็กกว่าเป็นอาหาร

5. พฤติกรรมการดูแลลูก

เมื่อแมงมุม *W. fidelis* เพศเมียวางไข่จะชักใยเป็นแผ่น (sheet web) เพื่อรองรับไข่ที่แมงมุมวางลงไป แล้วชักใยห่อเป็นถุงไข่ โดยถุงไข่ของแมงมุม *W. fidelis* มีขนาดประมาณ 3 mm ขนาดของถุงไข่จะแตกต่างกันออกไปขึ้นอยู่กับปริมาณของไข่ที่บรรจุและช่วงเวลาที่แมงมุมวางไข่ จากการสำรวจพบว่าแมงมุม *W. fidelis* เพศเมียที่ได้รับการผสมแล้ว สามารถวางไข่ได้ 4 - 5 ครั้งหรือมากกว่า แต่ถุงไข่จะมีขนาดเล็กลง ลักษณะของถุงไข่ค่อนข้างเป็นทรงกลม มีสีเทาอ่อนจนถึงน้ำตาลอ่อน มีแถบสีขาวพาดบริเวณแนวตะเข็บของถุงไข่ (รูปที่ 4-6 ก.) โดยแมงมุมเพศเมียที่วางไข่จะนำถุงไข่ติดไว้ที่ spinnerets ปลายสุดของส่วนท้อง และพกถุงไข่ติดตัวไปตลอดจนกว่าไข่จะฟัก (รูปที่ 4-6 ข.) ซึ่งใช้เวลาประมาณ 20 วัน นับตั้งแต่เริ่มวางไข่ เมื่อใกล้เวลาฟักแมงมุมที่เป็นแม่จะทำการตรวจเช็คโดยการใช้ขาคู่ที่ 3 หนีบถุงไข่มาไว้ทางด้านท้อง ใช้ chelicerae และ pedipalp ช่วยในการแกะบริเวณตะเข็บของถุงไข่เพื่อแยกใยที่สานอยู่ออกจากกัน (รูปที่ 4-6 ค.-จ.) เมื่อลูกแมงมุมฟักแล้วแม่แมงมุมจะฉีกถุงไข่ออกบริเวณแนวตะเข็บ ลูกแมงมุมจะออกมาจากถุงไข่แล้วไต่ขึ้นบนหลังใน ส่วน abdomen ของแม่แมงมุม (รูปที่ 4-6 ฉ.) จำนวนลูกแมงมุมโดยเฉลี่ย (mean±SE) ต่อถุงไข่มีจำนวน 44±4.74 ตัว โดยพบมากที่สุด 75 ตัว น้อยสุด 17 ตัว ซึ่งแตกต่างกันไปตามขนาดของถุงไข่ ส่วนใหญ่เมื่อลูกแมงมุมตัวสุดท้ายไต่ขึ้นหลังของแม่แมงมุมแล้ว ไข่ที่ติดอยู่บริเวณ spinnerets จะหลุดออก อาจใช้เวลาประมาณ 1-2 วันหลังจากที่ลูกแมงมุมฟักออกมาหมดแล้ว แต่ในบางครั้งก็พบว่าไข่เริ่มหลุดออกจาก spinnerets โดยทันทีที่ลูกแมงมุมฟักออกมาจนหมด ลูกแมงมุมจะอาศัยอยู่บน abdomen ของแม่ประมาณ 3-4 วัน หลังจากนั้นจะเริ่มไต่ออกจากตัวแม่เพื่อไปหาแหล่งอาศัยอื่น



รูปที่ 4-4 แมงมุม *W. fidelis* เพศเมีย มีความเข้มของสีและขนาดของ cephalothorax แตกต่างกัน แมงมุมตัวเต็มวัยเพศเมียด้านซ้ายมีสีเข้มกว่าและขนาดของ cephalothorax ใหญ่กว่าแมงมุมเพศเมียตัวเต็มวัยด้านขวา



ก.

ข.



ค.

ง.

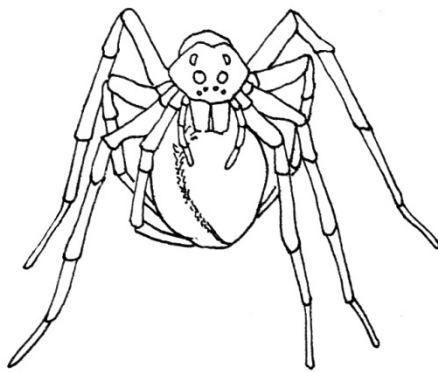
รูปที่ 4-5 แมงมุม *W. fidelis* ที่ปรากฏในถิ่นที่อยู่ย่อยแบบต่างๆ; ก.) บริเวณซอกดินที่แตกตามขอบของคันทนา, ข.) แมงมุมเพศผู้มีลักษณะกลมกลืนกับพื้นดิน, ค.) แมงมุมเพศเมียที่คลานอยู่บนผิวน้ำ, ง.) ถิ่นที่อยู่ที่พบแมงมุมบริเวณบ้านเรือนในชุมชน



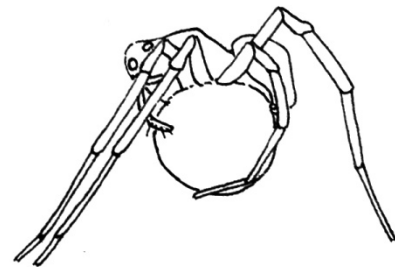
ก.



ข.



ค.



ง.



จ.



ฉ.

รูปที่ 4-6 ลักษณะของถุงไข่แมงมุม *W. fidelis* : ก.) ลักษณะถุงไข่ของแมงมุม, ข.) แม่แมงมุมจะนำถุงไข่ติดไว้ที่ spinnerets ตลอดเวลา, ค.) และ ง.) ภาพวาดแสดงการกักถุงไข่ของแม่แมงมุม ด้าน anterior view และ lateral view ตามลำดับ, จ.) แมงมุมที่กำลังตรวจเช็คถุงไข่, ฉ.) แมงมุมและลูกแมงมุมที่เกาะอยู่บนหลังส่วน abdomen

ความเป็นพิษเฉียบพลันของสารคลอรีไพริฟอส

1. ความเป็นพิษของสารคลอรีไพริฟอสความเข้มข้นที่ระบุบนฉลาก

การทดสอบแมงมุม *W. fidelis* ด้วยสารคลอรีไพริฟอสความเข้มข้นที่ระบุบนฉลาก พบว่าเป็นไปตามสมมติฐาน กล่าวคือที่สารคลอรีไพริฟอสที่ระดับความเข้มข้นดังกล่าว มีผลทำให้แมงมุมตายเฉียบพลัน โดยแมงมุมจำนวน 60 ตัว ($n=60$) ทั้งเพศผู้ (30 ตัว) และเพศเมีย (30 ตัว) หลังจากได้สัมผัสกับสารเคมีภายในระยะเวลา 1 ชั่วโมง เกิดการตายคิดเป็นเปอร์เซ็นต์ได้ 100% (รูปที่ 4-7) หลังจาก 15 นาที ที่มีการสัมผัสกับสารคลอรีไพริฟอส แมงมุมเริ่มมีการขยับ pedipalp มากขึ้น ใช้ pedipalp ปิดปากคู้หน้าบ่อยขึ้น หลังจาก 15 นาทีผ่านไป แมงมุมบางตัวลดการเคลื่อนไหวลง บางตัวมีการเคลื่อนที่เร็วกว่าปกติ ภายในระยะเวลา 30 นาที แมงมุมมีการหดเกร็งของขาอย่างรุนแรง แมงมุมบางตัวจะเคลื่อนที่ไปเรื่อยๆ พร้อมกับการกระตุกของขา เมื่อหยุดเคลื่อนที่จะหดเกร็งขาเข้ามา การทรงตัวไม่เป็นปกติ มีการเหยียด pedipalp ออกไปด้านหน้า ส่วนของ sternum สัมผัสกับพื้นของกระดาษกรอง ภายในระยะเวลา 30 นาที ถึง 1 ชั่วโมงแมงมุมเริ่มตายโดยการหงายท้องและหงอขาทุกคู่เข้าหาลำตัวทางด้าน ventral

ในขณะที่แมงมุมเพศผู้ในกลุ่มควบคุมมีความตื่นตัวโดยมีการเคลื่อนที่มากกว่าแมงมุมเพศเมีย แต่แมงมุมทั้งสองเพศไม่ได้แสดงพฤติกรรมเช่นเดียวกับที่พบในกลุ่มทดสอบ และ

2. ความเข้มข้นถึงตาย (Lethal Concentration; LC)

2.1 เปอร์เซนต์การตายสะสม

จากการทดสอบแมงมุมด้วยสารคลอรีไพริฟอสที่ความเข้มข้นต่างๆ เป็นระยะเวลา 48 ชั่วโมง พบว่าแมงมุมที่สัมผัสกับสารคลอรีไพริฟอสความเข้มข้นสูงจะมีเปอร์เซนต์การตายสะสมสูงกว่ากลุ่มที่สัมผัสกับสารคลอรีไพริฟอสความเข้มข้นต่ำ โดยแมงมุมเพศผู้ มีเปอร์เซนต์การตายสะสมสูงสุด 100% ที่ความเข้มข้น $0.437 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ ในขณะที่เพศเมียมีเปอร์เซนต์การตายสะสมสูงสุด $91.90 \pm 7.33\%$ ที่ความเข้มข้นเดียวกัน (รูปที่ 4-7)

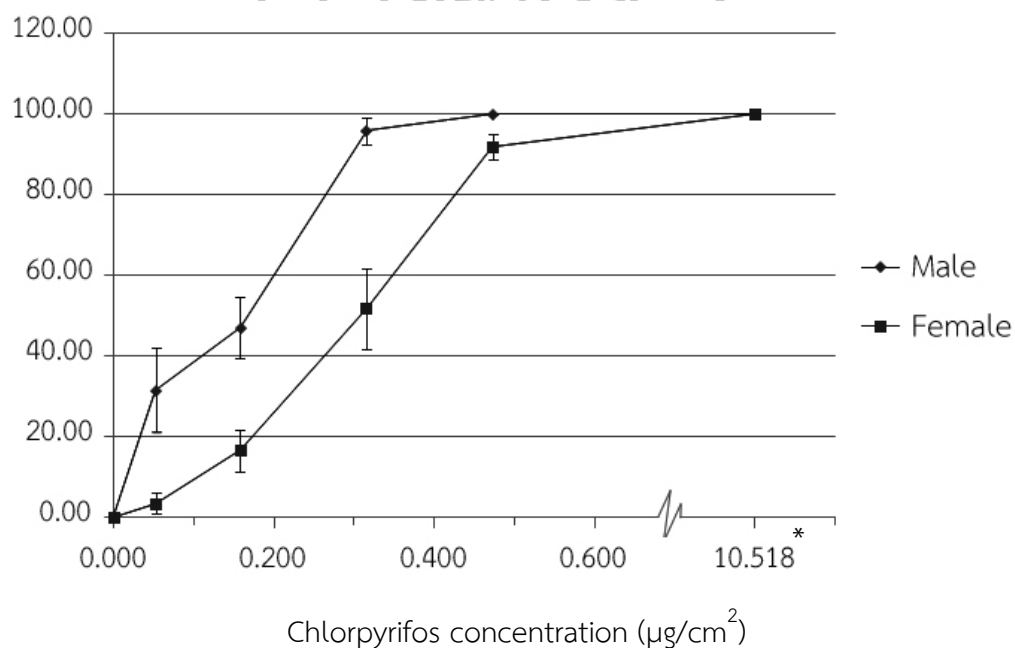
2.2 ค่าความเข้มข้นถึงตาย

จากการทดสอบแมงมุม *W. fidelis* ด้วยสารคลอรีไพริฟอสที่ความเข้มข้นต่างๆ ได้ค่า LC_{10} , LC_{30} และ LC_{50} ของเพศเมียเท่ากับ 1.9, 4.0 และ 5.5 ppm ตามลำดับ ในขณะที่เพศผู้มีค่า LC_{10} , LC_{30} และ LC_{50} เท่ากับ 0.2, 1.1 และ 2.8 ppm (ตารางที่ 4-4) โดยจะเห็นว่า แมงมุมเพศเมียมีค่า lethal concentration ในทุกๆ ค่าสูงกว่าแมงมุมเพศผู้

ตารางที่ 4-4 ค่า LC₁₀, LC₃₀ และค่า LC₅₀ ของสารคลอร์ไพริฟอสที่ได้จากการทดลองและวิเคราะห์ผลจาก Probit analysis

กลุ่มทดสอบ	เพศผู้		เพศเมีย		ปริมาณสารต่อพื้นที่กระดาดากรอง ($\mu\text{g}/\text{cm}^2$)	
	Dose (ppm)	95%CI	Dose (ppm)	95%CI	เพศผู้	เพศเมีย
Control	0.0	-	0.0	-	0.000	0.000
LC ₁₀	0.2	-1.228-0.944	1.9	0.225-2.938	0.011	0.100
LC ₃₀	1.1	0.987-2.381	4.0	3.038-4.837	0.058	0.210
LC ₅₀	2.8	2.219-3.679	5.5	4.670-6.468	0.147	0.289

Cumulative Death at 24 hr (%)



รูปที่ 4-7 ค่าเฉลี่ย (mean \pm SE) เปอร์เซ็นต์การตายสะสมของแมงมุมเพศผู้และเพศเมีย ที่ถูกทดสอบด้วยสารกำจัดแมลงคลอร์ไพริฟอสที่ความเข้มข้นต่างๆ ในหน่วย μg ของสาร ต่อพื้นที่กระดาดากรอง (cm^2) ที่เวลา 48 ชั่วโมง (* คือ ระดับความเข้มข้นของสารที่ระบุบนฉลาก)

ความเป็นพิษกึ่งเฉียบพลันของสารคลอร์ไพริฟอส

1. ประสิทธิภาพในการกินเหยื่อ

1.1 ระยะเวลาที่ใช้ก่อนตอบสนองต่อเหยื่อครั้งแรก

จากสมมติฐาน: สารคลอร์ไพริฟอสน่าจะส่งผลให้แมงมุม *W. fidelis* มีการตอบสนองต่อเหยื่อช้าลง ดังนั้นความเข้มข้นของสารคลอร์ไพริฟอสในแต่ละกลุ่มทดสอบ น่าจะมีความสัมพันธ์เชิงบวก กับระยะเวลาที่แมงมุมใช้ก่อนตอบสนองต่อเหยื่อครั้งแรก กล่าวคือกลุ่มแมงมุมที่ได้สัมผัสกับสารคลอร์ไพริฟอสที่ความเข้มข้นสูงๆ จะใช้เวลาก่อนตอบสนองต่อเหยื่อครั้งแรกนานขึ้นด้วย

จากผลการวิเคราะห์ความสัมพันธ์ Spearman's rho ระหว่างความเข้มข้นของสารคลอร์ไพริฟอส กับระยะเวลาที่ใช้ก่อนตอบสนองต่อเหยื่อครั้งแรกของแมงมุม *W. fidelis* เพศเมีย พบว่าเป็นไปตามสมมติฐาน โดยปัจจัยทั้ง 2 มีความสัมพันธ์เชิงบวกกันในทางสถิติ (Spearman's rho = 0.322, $p = 0.026$, $N = 48$) กล่าวคือ เมื่อแมงมุมได้สัมผัสกับสารคลอร์ไพริฟอสที่ความเข้มข้นสูงขึ้นจะใช้เวลาก่อนตอบสนองต่อเหยื่อครั้งแรกนานขึ้น ในขณะที่กลุ่มควบคุมส่วนใหญ่ใช้เวลาก่อนตอบสนองต่อเหยื่อครั้งแรกภายในช่วงเวลา 0 - 1 นาที (ตารางที่ 4-5)

ในขณะที่ความสัมพันธ์ระหว่างระยะเวลาที่ใช้ก่อนตอบสนองต่อเหยื่อครั้งแรกของแมงมุม *W. fidelis* เพศผู้ กับความเข้มข้นของสารคลอร์ไพริฟอสในแต่ละกลุ่มทดสอบ พบว่าไม่มีความสัมพันธ์กันในทางสถิติที่ระดับนัยสำคัญ 0.05 (Spearman's rho = 0.277, $p = 0.062$, $N=46$) แต่เมื่อพิจารณาจาก ตารางที่ 4-5 พบว่าแมงมุม *W. fidelis* เพศผู้ที่สัมผัสกับสารคลอร์ไพริฟอสที่ความเข้มข้นสูงขึ้นมีแนวโน้มที่จะใช้เวลาก่อนตอบสนองต่อเหยื่อครั้งแรกนานขึ้น

ตารางที่ 4-5 เปอร์เซ็นต์ของจำนวนแมงมุมที่มีการตอบสนองต่อเหยื่อครั้งแรกในช่วงเวลาต่างๆ ของแต่ละกลุ่มทดสอบ

ช่วงเวลาที่ใช้ ในก่อนตอบสนองต่อเหยื่อ	Control		LC10		LC30		LC50	
	เพศเมีย (n=14)	เพศผู้ (n=14)	เพศเมีย (n=14)	เพศผู้ (n=13)	เพศเมีย (n=6)	เพศผู้ (n=11)	เพศเมีย (n=10)	เพศผู้ (n=8)
0 - 1 นาที	50.0	57.1	28.6	38.5	33.3	9.1	10.0	25.0
>1 - 5 นาที	21.4	-	42.9	7.7	33.3	36.4	40.0	25.0
>5 - 30 นาที	14.3	21.4	7.1	30.8	33.3	27.3	20.0	-
>30 นาที - 1 ชั่วโมง	7.1	14.3	7.1	7.7	-	-	-	-
>1 - 24 ชั่วโมง	7.1	7.1	14.3	15.4	-	27.3	30.0	50.0

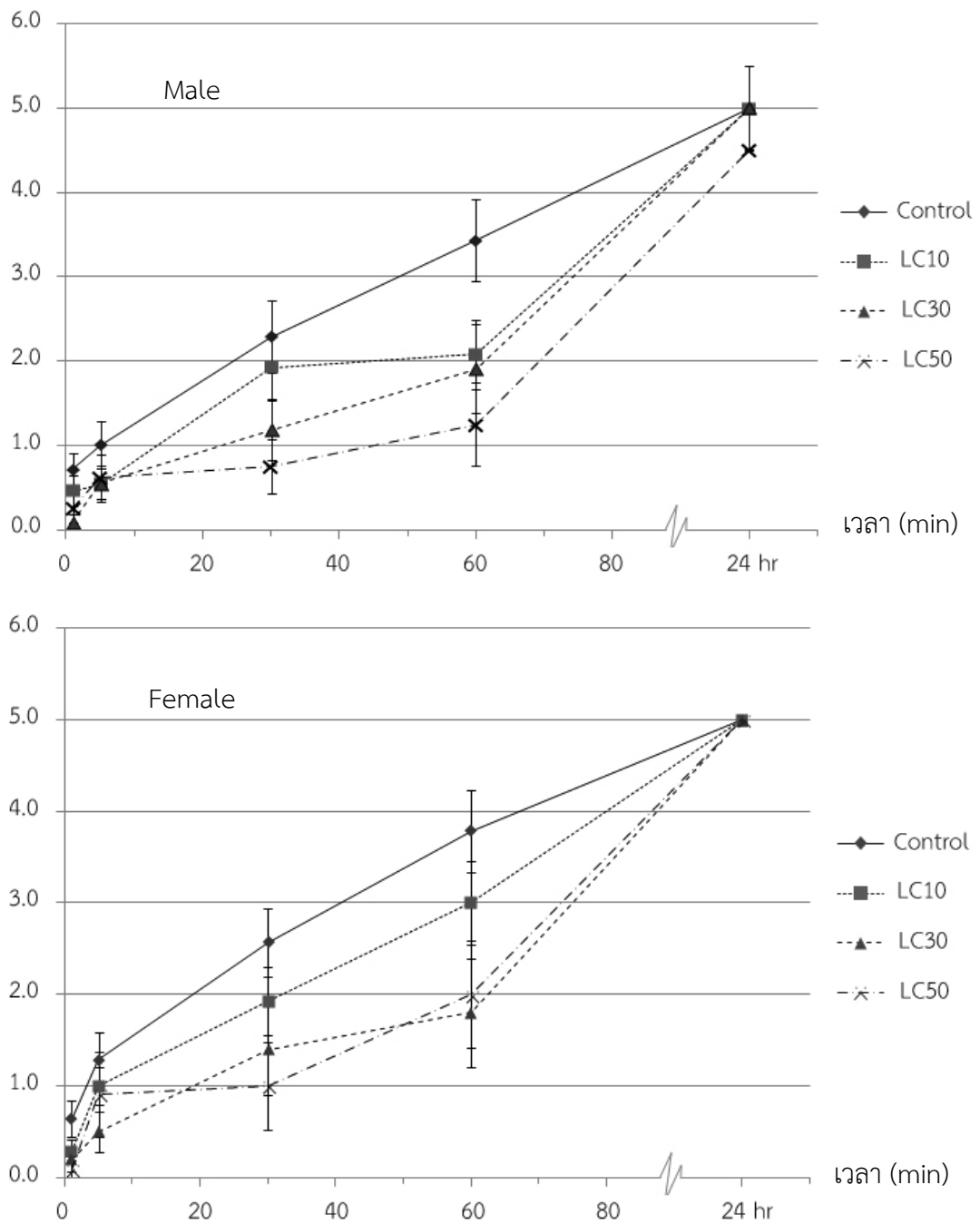
1.2 จำนวนของเหยื่อที่ถูกกิน

จากสมมติฐาน : สารคลอรีไพริฟอสน่าจะทำให้แมงมุมมีความสามารถกินเหยื่อลดลง ดังนั้นแมงมุมที่ได้สัมผัสกับสารคลอรีไพริฟอสจะกินเหยื่อได้จำนวนสะสมน้อยกว่าแมงมุมที่ไม่ได้สัมผัสกับสารคลอรีไพริฟอส

จากผลการศึกษาพบว่า ที่ระยะเวลา 60 นาที แมงมุมมีการกินเหยื่อได้จำนวนสะสมมากที่สุด โดยยังสามารถเห็นความแตกต่างระหว่างกลุ่มทดสอบได้ชัดเจน (รูปที่ 4-8) จึงนำช่วงเวลาดังกล่าวมาใช้เปรียบเทียบเพื่อหาจำนวนเหยื่อเฉลี่ยที่ถูกกินสะสมในแต่ละกลุ่มทดสอบ จากการวิเคราะห์ผลพบว่าเป็นไปตามสมมติฐานทั้งในกลุ่มทดสอบแมงมุมเพศผู้และเพศเมีย คือจำนวนเหยื่อเฉลี่ยที่ถูกกินสะสมโดยแมงมุมเพศผู้ เมื่อเปรียบเทียบระหว่างกลุ่มทดสอบมีความแตกต่างกันในทางสถิติ ($F = 3.535$, $df = 3, 42$, $p = 0.023$) โดยแมงมุมเพศผู้ที่ถูกทดสอบด้วยสารคลอรีไพริฟอสที่ระดับความเข้มข้น LC_{50} มีความสามารถในการกินเหยื่อได้จำนวนสะสมเฉลี่ย (1.25 ± 0.50 ตัว) น้อยกว่ากลุ่มควบคุม (3.43 ± 0.50 ตัว) อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (Dunnett's test $p = 0.014$) ในขณะที่กลุ่มทดสอบที่ระดับความเข้มข้น LC_{30} และ LC_{10} มีความสามารถในการกินเหยื่อได้จำนวนเฉลี่ย (1.91 ± 0.50 และ 2.08 ± 0.40 ตัว ตามลำดับ) ไม่แตกต่างจากกลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (Dunnett's test $p = 0.073$ และ 0.103 ตามลำดับ) แต่มีแนวโน้มว่าจำนวนเหยื่อเฉลี่ยที่ถูกกินสะสมของกลุ่มทดสอบทั้ง 2 น้อยกว่ากลุ่มควบคุม (รูปที่ 4-9)

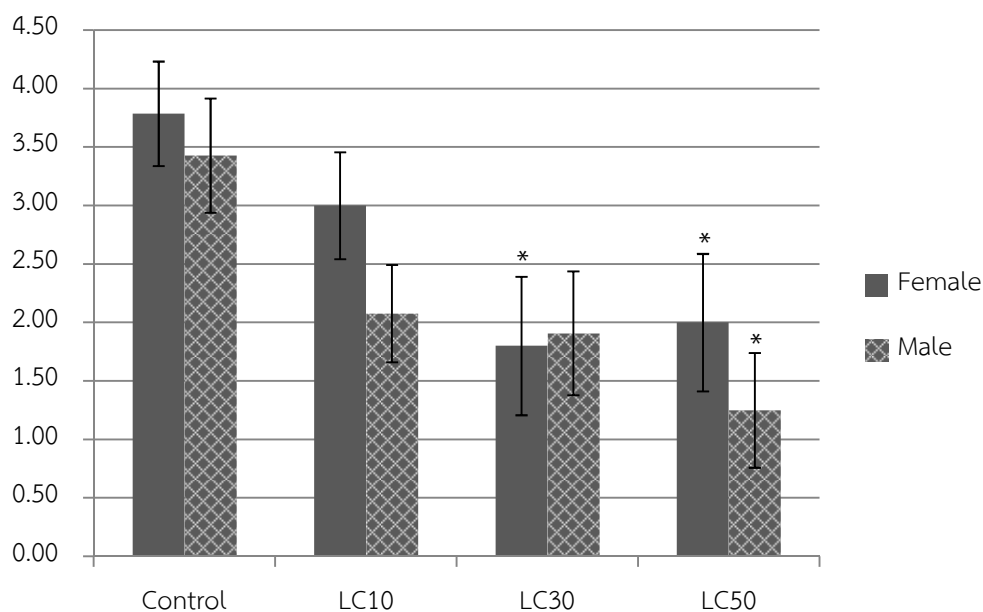
แมงมุมเพศเมีย ที่ระยะเวลา 60 นาที (รูปที่ 4-9) พบว่า จำนวนเหยื่อเฉลี่ยที่ถูกกินสะสมเมื่อเปรียบเทียบระหว่างกลุ่มทดสอบมีความแตกต่างกันในทางสถิติ ($F = 3.241$, $df = 3, 45$, $p = 0.031$) โดยแมงมุมเพศเมียที่ถูกทดสอบด้วยสารคลอรีไพริฟอสที่ระดับความเข้มข้น LC_{50} และ LC_{30} มีความสามารถในการกินเหยื่อได้จำนวนสะสมเฉลี่ย (2.00 ± 0.60 ตัว และ 1.80 ± 10.60 ตัว ตามลำดับ) น้อยกว่ากลุ่มควบคุม (3.79 ± 0.40 ตัว) อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (Dunnett's test $p = 0.046$ และ 0.028 ตามลำดับ) ในขณะที่กลุ่มทดสอบที่ระดับความเข้มข้น LC_{10} มีความสามารถในการกินเหยื่อได้จำนวนเฉลี่ย (3.00 ± 0.50 ตัว) ไม่แตกต่างจากกลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (Dunnett's test $p = 0.528$) แต่มีแนวโน้มว่าจำนวนเหยื่อที่ถูกกินเฉลี่ยของกลุ่มทดสอบดังกล่าวน้อยกว่ากลุ่มควบคุม

ค่าเฉลี่ยจำนวนเหยื่อที่ถูกกินสะสม (ตัว)



รูปที่ 4-8 ค่าเฉลี่ย (mean±SE) จำนวนเหยื่อที่ถูกกินสะสมที่ระยะเวลาต่างๆ ของแมงมุมเพศผู้และเพศเมียในแต่ละกลุ่มทดสอบคือ กลุ่มควบคุม (control), LC₁₀, LC₃₀ และ LC₅₀

ค่าเฉลี่ยจำนวนเหยื่อที่ถูกกินสะสม (ตัว)



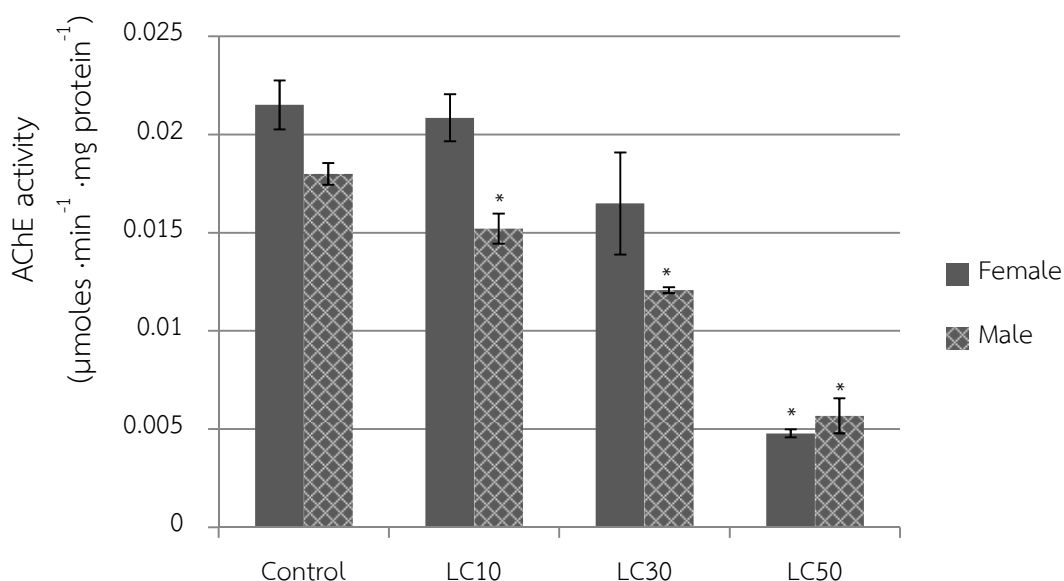
รูปที่ 4-9 ค่าเฉลี่ย (mean±SE) จำนวนเหยื่อที่ถูกกินสะสมภายในเวลา 60 นาที ในแต่ละกลุ่มทดสอบ คือ กลุ่มควบคุม (control), LC₁₀, LC₃₀ และ LC₅₀ (* คือ จำนวนเหยื่อที่ถูกกินโดยเฉลี่ยที่มีความแตกต่างจากกลุ่มควบคุมโดยใช้ Dunnett's test ที่ $p < 0.05$)

2. กิจกรรมเอนไซม์ AChE

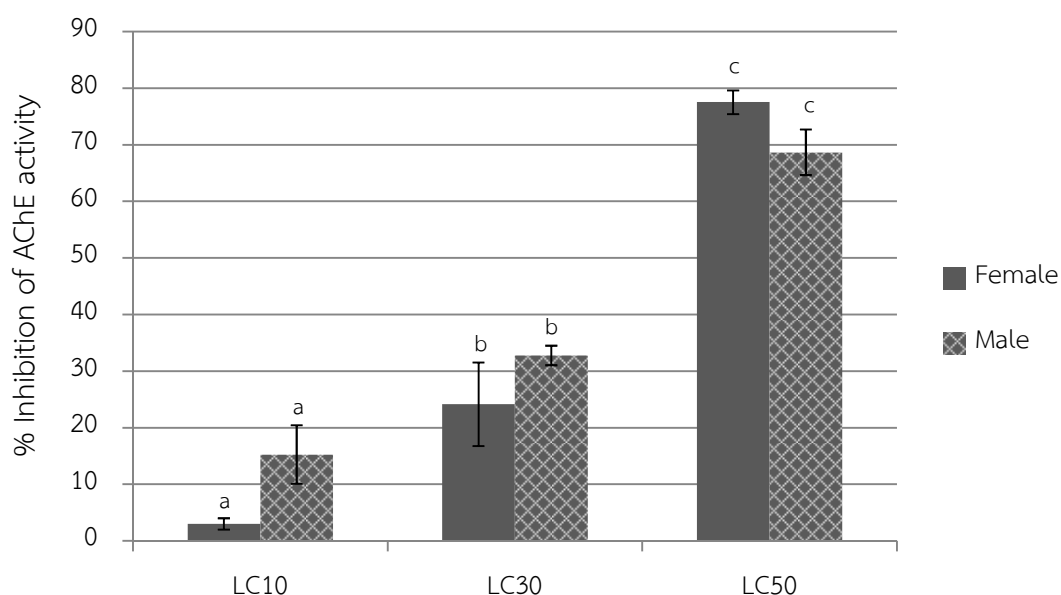
เมื่อวิเคราะห์จากกิจกรรมของเอนไซม์ AChE ในแมงมุมที่ได้สัมผัสกับสารคลอร์ไพริฟอส ที่ระดับความเข้มข้นแตกต่างกัน เป็นเวลา 48 ชั่วโมง พบว่ากิจกรรมของเอนไซม์ AChE มีความแตกต่างกันในทางสถิติ (แมงมุมเพศเมีย $F = 24.486$, $df = 3, 8$, $p < 0.001$, เพศผู้ $F = 65.387$, $df = 3, 8$, $p < 0.001$) ในแมงมุมเพศเมีย กลุ่มที่ถูกทดสอบด้วยสารคลอร์ไพริฟอสที่ระดับความเข้มข้น LC₅₀ มีกิจกรรมเอนไซม์ลดลงต่ำสุด ($0.0048 \pm 0.0002 \mu\text{moles} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mgprotein}^{-1}$) แตกต่างจากกลุ่มควบคุม ($0.0215 \pm 0.0012 \mu\text{moles} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mgprotein}^{-1}$) อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (Dunnett's test $p < 0.001$) แต่กิจกรรมเอนไซม์ AChE จากกลุ่มทดสอบที่ระดับความเข้มข้น LC₃₀ ($0.0165 \pm 0.0026 \mu\text{moles} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mgprotein}^{-1}$) และ LC₁₀ ($0.0209 \pm 0.0012 \mu\text{moles} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mgprotein}^{-1}$) ไม่แตกต่างจากกลุ่มควบคุมในทางสถิติ (Dunnett's test $p = 0.124$ และ 0.981 ตามลำดับ) เช่นเดียวกันกับแมงมุมเพศผู้ กิจกรรมเอนไซม์ AChE ในกลุ่มทดสอบที่ระดับ LC₅₀ ลดต่ำลงต่ำสุด ($0.0057 \pm 0.0009 \mu\text{moles} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mgprotein}^{-1}$) ตามด้วยกลุ่มทดสอบที่ระดับ LC₃₀ ($0.0121 \pm 0.0002 \mu\text{moles} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mgprotein}^{-1}$) และ LC₁₀ ($0.0152 \pm 0.0008 \mu\text{moles} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mgprotein}^{-1}$) โดยทั้ง 3 กลุ่มทดสอบมีระดับกิจกรรมเอนไซม์ AChE แตกต่างจากกลุ่มควบคุม

($0.0180 \pm 0.0005 \mu\text{moles} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg protein}^{-1}$) อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (Dunnett's test $p < 0.001$, $p = 0.001$ และ 0.041 ตามลำดับ) (รูปที่ 4-10)

เมื่อพิจารณาจาก เปอร์เซ็นต์การยับยั้งปฏิกิริยาเอนไซม์ (รูปที่ 4-11) พบว่าเป็นไปตามสมมติฐาน กล่าวคือเปอร์เซ็นต์การยับยั้งปฏิกิริยาเอนไซม์ในแต่ละกลุ่มทดสอบ มีความแตกต่างกันในทางสถิติ ทั้งแมงมุมเพศเมีย ($F = 73.995$, $df = 2, 6$, $p < 0.001$) และแมงมุมเพศผู้ ($F = 48.413$, $df = 2, 6$, $p < 0.001$) แมงมุมในกลุ่มที่สัมผัสกับสารคลอรีไพริฟอส ความเข้มข้นที่ LC_{50} ในเพศเมีย มีเปอร์เซ็นต์การยับยั้งปฏิกิริยาเอนไซม์สูงที่สุด ($77.54 \pm 2.08\%$) แตกต่างจากกลุ่ม LC_{30} (เปอร์เซ็นต์การยับยั้ง = $24.18 \pm 7.38\%$, $p < 0.001$) และ LC_{10} (เปอร์เซ็นต์การยับยั้ง = $3.04 \pm 0.99\%$, $p < 0.001$) อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ เช่นเดียวกับแมงมุมเพศผู้ กลุ่มที่สัมผัสกับสารคลอรีไพริฟอสความเข้มข้นที่ LC_{50} มีเปอร์เซ็นต์การยับยั้งปฏิกิริยาเอนไซม์สูงที่สุด ($68.69 \pm 4.02\%$) แตกต่างจากกลุ่ม LC_{30} (เปอร์เซ็นต์การยับยั้ง = $32.79 \pm 1.72\%$, $p = 0.001$) และ LC_{10} (เปอร์เซ็นต์การยับยั้ง = $15.31 \pm 5.17\%$, $p < 0.001$) อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ



รูปที่ 4-10 ค่าเฉลี่ย (mean±SE) กิจกรรมของเอนไซม์ AChE ในแต่ละกลุ่มทดสอบคือ กลุ่มควบคุม (control), LC_{10} , LC_{30} และ LC_{50} (* คือ กิจกรรมของเอนไซม์ AChE ที่มีความแตกต่างจากกลุ่มควบคุมโดยใช้ Dunnett's test ที่ $p < 0.05$)



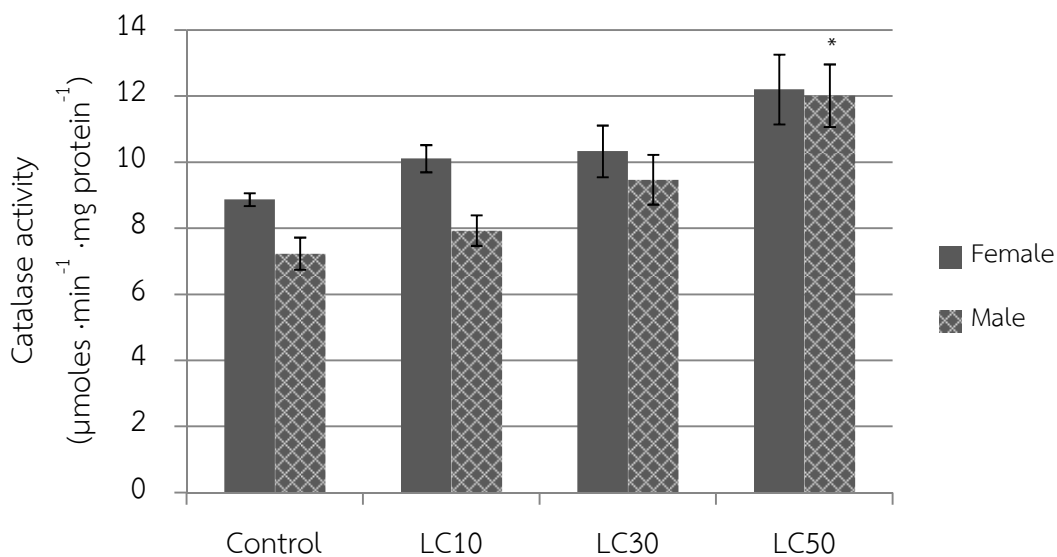
รูปที่ 4-11 ค่าเฉลี่ย (mean±SE) เปอร์เซ็นต์การถูกยับยั้งกิจกรรมของเอนไซม์ AChE ในแต่ละกลุ่มทดสอบคือ LC₁₀, LC₃₀ และ LC₅₀ (ตัวอักษรภาษาอังกฤษ: a, b และ c คือ การจัดกลุ่มความแตกต่างของค่าเฉลี่ยในแต่ละกลุ่มทดสอบ เปรียบเทียบภายในเพศเดียวกันโดยใช้ Duncan's test ที่ $p < 0.05$)

3. กิจกรรมเอนไซม์ CAT

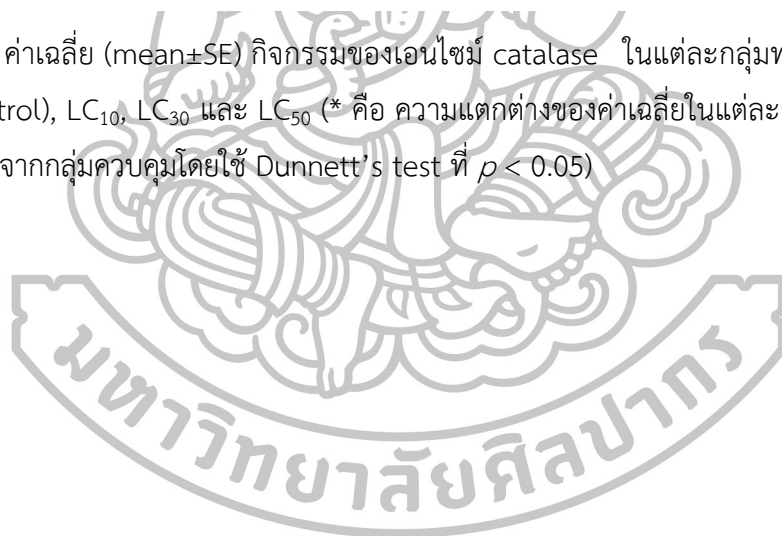
ผลการทดสอบกิจกรรมเอนไซม์ CAT ของแมงมุมเพศผู้ เป็นไปตามสมมติฐาน กล่าวคือ เมื่อเปรียบเทียบกันระหว่างกลุ่มทดสอบมีความแตกต่างกันในทางสถิติ ($F = 9.365$, $df = 3, 8$, $p = 0.005$) โดยกิจกรรมเอนไซม์ CAT ในกลุ่มทดสอบ LC₅₀ เพิ่มสูงถึง $12.0194 \pm 0.9487 \mu\text{moles} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mgprotein}^{-1}$ แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ เมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม ($7.2388 \pm 0.4876 \mu\text{moles} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mgprotein}^{-1}$, Dunnett's test $p = 0.003$) แต่กิจกรรมเอนไซม์ CAT ในกลุ่มทดสอบที่ระดับความเข้มข้น LC₃₀ ($9.4755 \pm 0.7515 \mu\text{moles} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mgprotein}^{-1}$) และ LC₁₀ ($7.9363 \pm 0.4631 \mu\text{moles} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mgprotein}^{-1}$) ไม่แตกต่างจากกลุ่มควบคุมในทางสถิติ (Dunnett's test $p = 0.121$ และ 0.819 ตามลำดับ) แต่มีแนวโน้มที่กิจกรรมเอนไซม์ CAT ของกลุ่มทดสอบทั้ง 2 เพิ่มสูงขึ้นมากกว่ากลุ่มควบคุม (รูปที่ 4-12)

ในขณะที่กิจกรรมเอนไซม์ CAT ของแมงมุมเพศเมีย เมื่อเปรียบเทียบกันระหว่างกลุ่มทดสอบกลับไม่มีความแตกต่างกันในทางสถิติที่ระดับนัยสำคัญ 0.05 ($F = 3.927$, $df = 3, 8$, $p = 0.054$) แต่มีแนวโน้มที่ค่อนข้างชัดเจนว่า กิจกรรมเอนไซม์ CAT เพิ่มขึ้นเรื่อยๆ เมื่อแมงมุมเพศเมียถูกทดสอบด้วยสารคลอรีไพริฟอสที่ความเข้มข้นสูงขึ้น โดยมีระดับกิจกรรมเอนไซม์ CAT สูงสุดในกลุ่มทดสอบที่ระดับความเข้มข้น LC₅₀ ($12.2059 \pm 1.054 \mu\text{moles} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mgprotein}^{-1}$) ตามด้วยกลุ่ม

ทดสอบที่ระดับความเข้มข้น LC_{30} , LC_{10} และกลุ่มควบคุมตามลำดับ (10.3366 ± 0.7813 , 10.1139 ± 0.4119 และ $8.8718 \pm 0.1944 \mu\text{moles} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg protein}^{-1}$) (รูปที่ 4-12)



รูปที่ 4-12 ค่าเฉลี่ย (mean±SE) กิจกรรมของเอนไซม์ catalase ในแต่ละกลุ่มทดสอบคือ กลุ่มควบคุม (control), LC_{10} , LC_{30} และ LC_{50} (* คือ ความแตกต่างของค่าเฉลี่ยในแต่ละกลุ่มทดสอบที่มีความแตกต่างจากกลุ่มควบคุมโดยใช้ Dunnett's test ที่ $p < 0.05$)



บทที่ 5 สรุปและอภิปรายผล

ชีววิทยาของแมงมุม *W. fidelis*

แมงมุม *W. fidelis* ที่พบในพื้นที่ศึกษา เพศเมียมีขนาดตัวใหญ่กว่าเพศผู้ (ความยาว carapace ในเพศเมีย = 2.98 ± 0.57 mm ในเพศผู้ = 2.59 ± 0.18 mm) แต่ค่าเฉลี่ยของขนาดแมงมุมทั้งสองเพศยังมีขนาดเล็กกว่าเมื่อเทียบกับแมงมุม *W. fidelis* ที่รายงานใน Kronstedt and Zyuzin (2009) เพศเมียความยาว carapace 3.6 mm (lectotype จาก Spain) เพศผู้มี carapace ยาว 3.5 mm (lectotype จาก Spain ส่วน lectotype จาก Palestine มี carapace ยาว 3.20 mm) ความแตกต่างของขนาดตัวของแมงมุมอาจเกิดจากปัจจัยทางสิ่งแวดล้อมที่แมงมุมอาศัย เช่น ชนิดของอาหาร และปัจจัยทางกายภาพอื่นๆ อันมีผลมาจากสภาพทางภูมิศาสตร์ที่แตกต่างกัน (Foelix, 2011) Baba and Miyashita (2008) พบว่าแมงมุม *Argyrodes kumadai* เป็นแมงมุมในวงศ์ Theridiidae ตัวเต็มวัยมีขนาด carapace แตกต่างกันใน 3 พื้นที่ศึกษาที่ประเทศญี่ปุ่น ซึ่งความหลากหลาย (variation) ดังกล่าวอาจมีผลสืบเนื่องมาจากความผันแปรทางพันธุกรรมของแมงมุมได้ เนื่องจากอาศัยอยู่ในเขตภูมิศาสตร์ที่แตกต่างกันมาเป็นเวลานาน (Gurdebeke, Maelfait, and Backeljau, 2003)

การเกิดพฤติกรรมการกินกันเอง (cannibalism) ของแมงมุมสามารถพบได้เป็นปกติในแมงมุมชนิดอื่นๆ โดยเฉพาะพฤติกรรมการกินกันเองระหว่างเพศ (sexual cannibalism) กรณีศึกษาของ Elgar and Nash (1988) ในแมงมุม *Araneus diadematus* พบว่าแมงมุมเพศผู้จะถูกกินหลังจากที่ได้ผสมพันธุ์กับเพศเมียตัวนั้นแล้ว โดยแมงมุมเพศผู้ที่มีขนาดตัวเล็กมีโอกาสในการถูกกินมากกว่าเพศผู้ที่มีขนาดตัวใหญ่ การที่ *A. diadematus* กินแมงมุมเพศผู้เป็นอาหารหลังจากรับการผสมพันธุ์แล้ว ส่งผลให้เพศเมียมีมวลร่างกาย (body mass) เพิ่มขึ้น ซึ่งเป็นโอกาสที่ช่วยให้การตั้งท้องของเพศเมียประสบความสำเร็จมากขึ้น เช่นเดียวกับกับแมงมุมจับปลา *Dolomedes triton* ในวงศ์ Pisauridae โดย Johnson and Sih (2005) พบว่าแมงมุมเพศเมียจะกินแมงมุมเพศผู้ที่พยายามเข้ามาผสมพันธุ์ด้วยคิดเป็น 46% จากการทดสอบคู่ผสมพันธุ์ทั้งหมด หรือแม้แต่ในสภาวะขาดแคลนอาหารลูกแมงมุมอาจกินกันเอง (Whitcomb and Eason, 1965) ในระหว่างที่อาศัยอยู่ร่วมกัน หลังจากฟักออกมาจากถุงไข่ แต่การที่แมงมุมเป็นผู้ล่าที่ไม่จำเพาะต่อชนิดเหยื่อ อาจเป็นอีกสาเหตุหนึ่งที่ทำให้แมงมุมไม่สนใจชนิดเหยื่อที่จะถูกล่าเป็นอาหาร จึงอาจมีการตอบสนองต่อเหยื่อที่มีขนาดเท่ากันหรือเล็กกว่าตัวของแมงมุมที่เป็นผู้ล่าเอง

แมงมุมสุนัขป่าเป็นแมงมุมอีกกลุ่มหนึ่งที่เพศเมียมีพฤติกรรมการเลี้ยงดูลูก (maternal care) โดยแมงมุมเพศเมียจะพกกุ้งไข่ติดไว้ที่ spinnerets ตลอดเวลา จำนวนไข่ในถุงไข่แตกต่างกันออกไปขึ้นอยู่กับชนิดของแมงมุม ในแมงมุม *Pardosa sp.* อาจพบไข่เพียง 8 ฟอง/ถุงไข่ ในขณะที่แมงมุม *Lycosa rabida* พบมากถึง 1035 ฟอง (Eason, 1964) สีของถุงไข่แตกต่างกันไปตามชนิดของแมงมุมสุนัขป่า ในแมงมุม *W. fidelis* มีสีเทาจนถึงน้ำตาลอ่อน เมื่ออยู่ในธรรมชาติจะมองเห็นเป็นสีขาว ในแมงมุม *L. rabida* จะหลังของเหลวสีน้ำตาลออกมาจากช่องเปิด genitalia ลงบนถุงไข่สีขาว ทำให้เกิดสีน้ำตาลบนผิวของถุงไข่ (Eason, 1964) ระยะเวลาที่ใช้ในการฟักมีความแตกต่างกันไปตามชนิดของแมงมุมสุนัขป่าและช่วงเวลาในการวางไข่ในแต่ละปี แมงมุม *W. fidelis* ใช้เวลาประมาณ 20 วัน แต่แมงมุมสุนัขป่าชนิดอื่นอาจใช้เวลาประมาณ 12 - 35 วัน (Eason, 1964) เมื่อลูกแมงมุมฟักออกมาจะไต่ขึ้นไปอาศัยอยู่บนหลังในส่วน abdomen ของแมงมุมที่เป็นแม่ Eason (1964) พบว่าลูกแมงมุมที่อาศัยอยู่บนหลังของแม่จะมีอัตราการรอดสูงกว่าลูกแมงมุมที่ถูกจับแยกออกมา แม่แมงมุม *L. rabida* จะช่วยให้ลูกแมงมุมที่อาศัยอยู่บนหลังกินน้ำได้สะดวกขึ้น ในขณะที่แม่แมงมุม *L. rabida* กินน้ำจะเหยียดขาคู่หน้า (คู่ที่ 1 และ 2) ลงไปในแหล่งน้ำ โน้มตัวในส่วนหน้าลงต่ำ ให้ลูกแมงมุมไต่ลงไปตามขาเพื่อไปกินน้ำและไต่กลับขึ้นมาบนหลัง ระยะเวลาที่ลูกแมงมุมอาศัยอยู่บนหลังของแม่แมงมุมในแมงมุม *W. fidelis* ใช้เวลาประมาณ 3 - 4 วัน ในขณะที่ *Pardosa milvina* ใช้เวลา 4 - 6 วัน แต่แมงมุมสุนัขป่าที่ขนาดค่อนข้างใหญ่อย่าง *L. rabida* อาจใช้เวลาถึง 50 วัน (Eason, 1964)

ความเป็นพิษเฉียบพลันของสารคลอรีไพริฟอส

ผลการทดสอบความเป็นพิษของสารคลอรีไพริฟอส (เซนิไฟเลท 40) ด้วยระดับความเข้มข้นที่ระบุบนฉลาก ต่อแมงมุมสุนัขป่า *W. fidelis* นั้นเป็นไปตามสมมติฐาน กล่าวคือ ที่ระดับความเข้มข้นดังกล่าวมีผลทำให้แมงมุมตายอย่างเฉียบพลัน ภายในระยะเวลา 1 ชั่วโมง โดยจำนวนการตายคิดเป็นเปอร์เซ็นต์ได้เท่ากับ 100 เปอร์เซ็นต์ ในการศึกษาครั้งนี้ ได้ค่า LC_{50} ของสารคลอรีไพริฟอส ในแมงมุม *W. fidelis* เพศเมียเท่ากับ 5.5 ppm และแมงมุมเพศผู้ 2.8 ppm จะเห็นว่าแมงมุมเพศผู้มีความไวต่อพิษของสารคลอรีไพริฟอสมากกว่าเพศเมีย กล่าวคือหากมีสารคลอรีไพริฟอสเพียง 2.8 ppm จะมีโอกาสทำให้แมงมุม *W. fidelis* เพศผู้ตายได้ถึง 50% จากจำนวนประชากรทั้งหมด ในขณะที่การใช้สารคลอรีไพริฟอสต้องเพิ่มปริมาณถึง 5.5 ppm จึงจะทำให้แมงมุม *W. fidelis* เพศเมียตาย 50% ซึ่งความสามารถในการทนต่อสารพิษของแมงมุมเพศเมียที่มากกว่าแมงมุมเพศผู้สามารถพบได้ในแมงมุมสุนัขป่า *Lycosa hilaris* (Van Erp et al., 2002) และ *L. terrestris* เช่นเดียวกัน โดย Mustafa et al. (2011) ได้ทดสอบระดับความเป็นพิษของสารคลอรีไพริฟอส (Lorsban) ในแมงมุมสุนัขป่า *L. terrestris* พบค่า LC_{50} ที่ 8 ชั่วโมง ในเพศผู้และเพศเมียเท่ากับ 80.42 และ 180.93 ng a.i./individual ตามลำดับ ทั้งนี้อาจเป็นเพราะโดยส่วนใหญ่แมงมุมเพศเมีย

มักจะมีขนาดตัวใหญ่กว่าแมงมุมเพศผู้ และมีอายุไขที่ยาวนานกว่า (Foelix, 2011) จากผลการศึกษาในตารางที่ 4-1 จะเห็นว่าแมงมุมเพศเมียมีขนาดตัวใหญ่กว่าแมงมุมเพศผู้ และจากการเก็บข้อมูลน้ำหนักของแมงมุม *W. fidelis* เพิ่มเติม พบว่าเพศเมียตัวเต็มวัยมีน้ำหนักเฉลี่ยอยู่ที่ 0.0260 g ค่อนข้างหนักกว่าเพศผู้ซึ่งมีน้ำหนักโดยเฉลี่ย 0.0198 g อีกทั้งจากการสังเกตเบื้องต้นยังพบว่าแมงมุม *W. fidelis* เพศผู้ที่นำมาใช้ในการทดสอบมีความตื่นตัวมากกว่าแมงมุมเพศเมีย กล่าวคือแมงมุมเพศผู้มักมีการเคลื่อนที่และขยับตัวบ่อยกว่าแมงมุมเพศเมีย จึงอาจเป็นอีกสาเหตุหนึ่งที่ทำให้แมงมุมเพศผู้มีโอกาสสัมผัสกับสารคลอโรไพริฟอสที่อยู่บนกระดาดชกรอง ได้มากกว่าแมงมุมเพศเมีย ค่า LC_{50} ของแมงมุมเพศผู้จึงอยู่ในระดับที่รุนแรงกว่า ดังนั้นหากมีการศึกษาปัจจัยต่างๆ ที่มีผลกระทบต่อแมงมุมควรพิจารณาถึงเพศของแมงมุมในแต่ละชนิดด้วย

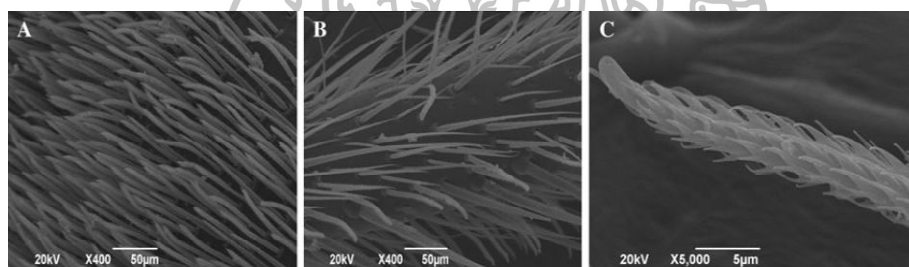
ในระยะเริ่มต้นหลังจากที่แมงมุมมีการสัมผัสกับสารคลอโรไพริฟอสโดยตรง แมงมุมบางตัวมีการเคลื่อนที่เร็วขึ้น ขยับ pedipalp และใช้ pedipalp ปิดปากคู้หน้าบ่อยขึ้น คาดว่าน่าจะเกิดจากความระคายเคืองจากการได้สัมผัสกับสารคลอโรไพริฟอส พฤติกรรมเช่นนี้สามารถพบได้ทั่วไปในแมลงที่เกิดความระคายเคืองต่อสารเคมี หรือสารกำจัดแมลง โดยเรียกพฤติกรรมเช่นนี้ว่า grooming behavior ในแมลงตัวงเต่าทอง *Coccinella septempunctata* มีการแสดงพฤติกรรม grooming ด้วยความถี่สูงขึ้นเมื่อถูกปล่อยลงไปใน plot ทดลอง ที่ฉีดพ่นสาร deltamethrin (Wiles and Jepson, 1994) การแสดงพฤติกรรม grooming หมายถึงการที่แมลงมีการเพิ่มอัตราการเคลื่อนที่อย่างรวดเร็ว ซึ่งอาจจะเป็น reflex จากการที่สารเคมีไปมีผลกระตุ้น chemoreceptors ที่อยู่บนผิวหนังของแมลง (Reingold and Camhi, 1978) เช่นเดียวกับกับแมงมุมสุนัขป่า chemoreceptors สามารถพบได้มากตามขาคู้หน้าและ pedipalp โดยเฉพาะในส่วน tibia, metatarsus และ tarsus (Foelix, 2011) การเกิด reflex นี้ จึงอาจเป็นการเพิ่มอัตราการเคลื่อนที่ทำให้แมลงลดการสัมผัสกับสารเคมีที่ก่อความระคายเคืองได้มากขึ้น (Desneux, Decourtye, and Delpuech, 2007) แต่การที่อัตราการเคลื่อนที่ที่เร็วขึ้นไม่ได้ส่งผลต่อประสิทธิภาพในการเป็นผู้ล่าหรือศัตรูธรรมชาติได้

ความเป็นพิษกึ่งเฉียบพลันของสารคลอโรไพริฟอส

1. การตอบสนองต่อเหยื่อ

จากผลการศึกษาพบว่าเป็นไปตามสมมติฐาน กล่าวคือแมงมุมที่ถูกทดสอบด้วยสารคลอโรไพริฟอส ที่ระดับความเข้มข้นสูงขึ้น จะมีประสิทธิภาพในการกินเหยื่อลดลง ทั้งในแง่ของระยะเวลาที่ใช้ในการตอบสนองต่อเหยื่อ และจำนวนเหยื่อที่ถูกกิน การสังเกตระหว่างการทดสอบ แมงมุม *W. fidelis* ที่ถูกปล่อยลงในจานแก้วเพาะเชื้อที่มีสารคลอโรไพริฟอสระดับความเข้มข้นเทียบเท่ากับ LC_{10} , LC_{30} และ LC_{50} จะพบว่าแมงมุมสุนัขป่าบางตัวมีการเคลื่อนที่เร็วขึ้น เมื่อได้สัมผัสกับสารคลอโรไพริ

ฟอสภายในระยะเวลา 15-30 นาที เป็นไปได้ว่า chemoreceptors ของแมงมุมสุนัขป่าเมื่อถูกกระตุ้นจะส่งสัญญาณให้เกิดการตอบสนองเพื่อหลบหลีกการสัมผัสพื้นที่ในบริเวณที่มีการปนเปื้อนสารคลอโรไพริฟอส แต่สิ่งที่กระตุ้น chemoreceptors อาจเป็นได้ทั้งสารคลอโรไพริฟอสและสารจับใบ (surfactant) ที่ผสมอยู่ในสารกำจัดแมลง เช่นไพลาท 40 หาก chemoreceptors มีผลต่อการล่าเหยื่อของแมงมุม ดังนั้นการตอบสนองต่อเหยื่อก็คงจะช้าลงด้วย แต่ Jiao et al. (2011) ได้ทำการทดลองเพื่อตรวจวัดผลกระทบจากการสูญเสียคุณสมบัติของ chemoreceptors ที่บริเวณ tarsi ของขาคู่หน้าและ pedipalps (รูปที่ 5-1) ของแมงมุมสุนัขป่า *Pardosa astrigera* เพศผู้ โดยใช้ zinc sulfate พบว่าการสูญเสียคุณสมบัติของ chemoreceptors ในบริเวณดังกล่าวมีผลต่อพฤติกรรมการเกี่ยวพาราสีของแมงมุม *P. astrigera* เพศผู้ ซึ่งคาดว่าน่าจะใช้สำหรับตอบสนองต่อ pheromone จากแมงมุมเพศเมียเท่านั้น แต่กลับไม่มีผลต่อการกินเหยื่อและกิจกรรมต่างๆ ของแมงมุม



รูปที่ 5-1 ภาพถ่าย SEM แสดงการกระจายของ chemoreceptors บริเวณ pedipalps (A) tarsi ของขาคู่หน้า (B) และภาพถ่ายกำลังขยายสูงในส่วน chemoreceptor ของแมงมุม *P. astrigera* เพศผู้

ที่มา: Jiao X. et al., "Chemoreceptors distribution and relative importance of male forelegs and palps in intersexual chemical communication of the wolf spider *Pardosa astrigera*," *Chemoecology* 21 (2011), 47

ในแง่ระยะเวลาที่ใช้ในการตอบสนองต่อเหยื่อของแมงมุม *W. fidelis* เพศเมีย พบว่าเป็นไปตามสมมติฐาน โดยระยะเวลาที่ใช้ในการตอบสนองต่อเหยื่อมีความสัมพันธ์เชิงบวกกับระดับความเข้มข้นของสารคลอโรไพริฟอสที่ใช้ทดสอบกับแมงมุมเพศเมียในแต่ละกลุ่ม กล่าวคือแมงมุมเพศเมียในกลุ่มที่สัมผัสกับสารคลอโรไพริฟอสที่ระดับความเข้มข้นสูงขึ้นไปจะใช้เวลาในการตอบสนองต่อเหยื่อนานขึ้น คาดว่าสารคลอโรไพริฟอสน่าจะส่งผลกระทบต่อการทำงานของประสาทของแมงมุม ซึ่งไม่น่าจะมีผลต่อการถูกกระตุ้นของ chemoreceptors ดังที่ได้กล่าวมาแล้ว การที่สารคลอโรไพริฟอสความเข้มข้นเทียบเท่า LC_{10} , LC_{30} และ LC_{50} (ตารางที่ 4-4) ซึ่งถือว่าเป็นความเข้มข้นในปริมาณน้อย อาจเข้าไปก่อความผิดปกติต่อระบบประสาทของแมงมุม เนื่องจากสารคลอโรไพริฟอสสามารถเข้าจับ

กับเอนไซม์ AChE ในระบบประสาท ทำให้อัตราการสลายสารสื่อประสาท acetylcholine ลดลง มีผลต่อการกระตุ้นสัญญาณประสาทที่ผิดปกติไป (Eaton et al., 2008; Yu, 2015) ดังนั้นแมงมุมที่ได้รับสารคลอรีไพริฟอสจึงอาจสูญเสียสมดุลการส่งกระแสประสาททำให้การตอบสนองต่อสิ่งเร้า (เช่นเหยื่อ) ต้องใช้เวลานาน มากกว่าแมงมุมปกติที่ไม่ได้สัมผัสกับสารคลอรีไพริฟอส แต่ถึงอย่างไรก็ตามความสัมพันธ์ระหว่างระยะเวลาที่ใช้ในการตอบสนองต่อเหยื่อ กับระดับความเข้มข้นของสารคลอรีไพริฟอสในแต่ละกลุ่มทดสอบ ยังคงมีค่าน้อยโดยสังเกตจากค่า Spearman's Rho หรือค่า r (ในเพศเมีย $r = 0.322$, เพศผู้ $r = 0.277$) อีกทั้งความสัมพันธ์ของตัวแปรทั้งสองที่เกิดในกลุ่มทดสอบแมงมุมเพศผู้ยังคงไม่มีผลที่ชัดเจนทางสถิติ อาจมีสาเหตุมาจากงานวิจัยในครั้งนี้ได้กำหนดการวัดระดับตัวแปรระยะเวลาที่แมงมุม *W. fidelis* ใช้ในการตอบสนองต่อเหยื่อ เป็นตัวแปรแบบอันดับ (ordinal scale) จึงไม่สามารถนำค่าระยะเวลาที่แมงมุมแต่ละตัวใช้ในการตอบสนองต่อเหยื่อเป็นระยะเวลาจริงได้ อีกทั้งจำนวนแมงมุมที่นำมาทดสอบในแต่ละกลุ่มยังมีจำนวนไม่มาก ดังนั้นค่าความสัมพันธ์ของตัวแปรทั้งสองจึงมีค่าน้อย แต่ก็ยังสามารถแสดงให้เห็นแนวโน้มของความสัมพันธ์ระหว่างตัวแปรทั้งสอง ว่ามีความสอดคล้องไปตามสมมติฐานที่ตั้งไว้ได้

เนื่องจากแมงมุม *W. fidelis* ที่สัมผัสกับสารคลอรีไพริฟอส มีผลทำให้การตอบสนองต่อเหยื่อช้าลง ดังนั้นความสามารถในการกินเหยื่อจึงอาจเป็นผลกระทบที่สืบเนื่องกันมา โดยจะเห็นว่าเมื่อเวลาผ่านไปถึง 60 นาทีหลังจากที่แมงมุมได้รับการให้อาหาร จำนวนเหยื่อที่แมงมุมในกลุ่มที่ได้รับสารคลอรีไพริฟอสความเข้มข้นสูงขึ้น เช่น กลุ่ม LC₅₀ มีจำนวนเหยื่อที่ถูกกินน้อยแตกต่างจากกลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ซึ่งสอดคล้องกับสมมติฐานในแง่ของจำนวนเหยื่อที่ถูกกิน เช่นเดียวกับในกรณีศึกษาของ Hanna, C., and Hanna (2012) พบว่าสาร Orthro ซึ่งเป็นสารกำจัดแมลงในกลุ่ม pyrethroid มีผลทำให้แมงมุมตาหกเหลี่ยม (*Oxyopes salticus*) สูญเสียประสิทธิภาพในการจับเหยื่อ สามารถจับเหยื่อได้น้อยลงคิดเป็น 52.5% ในขณะที่กลุ่มควบคุม แมงมุม *O. salticus* จับเหยื่อได้ 68.3% ถึงอย่างไรก็ตามหากมีการศึกษาในสิ่งแวดล้อมธรรมชาติอาจมีปัจจัยอื่นที่ทำให้แมงมุมจับเหยื่อได้แตกต่างกัน เช่น การมีผู้ล่าของแมงมุม หรือการมีที่หลบซ่อนของเหยื่อ (Persons et al., 2001) อาจทำให้จำนวนเหยื่อที่จะถูกกินมีความแตกต่างกันในช่วงเวลาเท่ากันก็เป็นได้

2. กิจกรรมเอนไซม์ AChE

จะเห็นว่าแมงมุม *W. fidelis* แม้ได้รับสารคลอรีไพริฟอสในปริมาณน้อย ก็ทำให้เกิดความผิดปกติในระดับชีวโมเลกุลได้ จากผลการทดลองเป็นไปตามสมมติฐาน โดยแมงมุมเพศผู้ที่สัมผัสกับสารคลอรีไพริฟอสเพียง 0.2 ppm อย่างต่อเนื่อง 48 ชั่วโมง มีผลทำให้การทำงานของเอนไซม์ AChE ถูกยับยั้ง 8.96 % ความเข้มข้นของสารคลอรีไพริฟอสที่แมงมุมได้รับมีแนวโน้มแปรผันตรงกับเปอร์เซ็นต์การถูกยับยั้งของเอนไซม์ AChE ซึ่งให้ผลสอดคล้องกับการศึกษาของ Van Erp et al.

Whitcomb and Eason, 1965) ดังนั้นการเลือกจับแมลงมดตัวเต็มวัยจากพื้นที่ธรรมชาติจึงอาจเป็นอีกทางเลือกหนึ่งที่นิยมใช้ในการศึกษาในทางพิษวิทยา (Babczynska, Wilczek, and Migula, 2006; Hanna, C., and Hanna, 2012; Mustafa et al., 2011; Van Erp et al., 2002) แต่ทั้งนี้ก็ยังขึ้นกับปัจจัยทางธรรมชาติต่างๆ เช่น ฤดูกาล และปัจจัยทางกายภาพในแต่ละพื้นที่ซึ่งยังคงมีความผันแปรมาก

แมลงมดที่อาศัยในพื้นที่เกษตรกรรม เช่น นาข้าว มีบทบาทสำคัญในการช่วยควบคุมแมลงศัตรูพืชที่ทำลายผลผลิตทางการเกษตร ทำให้ประชากรของแมลงศัตรูพืชไม่อยู่ในระดับที่ก่อให้เกิดการระบาดของได้ (Hawkins et al., 1999) แต่เมื่อเกษตรกรมีการฉีดพ่นสารกำจัดแมลงสังเคราะห์เพื่อวัตถุประสงค์ในการกำจัดศัตรูกลุ่มเป้าหมายคือ แมลงศัตรูพืช สารดังกล่าว เช่น สารกำจัดแมลงคลอร์ไพริฟอส เป็นสารในกลุ่มออร์กาโนฟอสเฟตที่ออกฤทธิ์ในวงกว้าง สามารถออกฤทธิ์ได้โดยตรงกับศัตรูทุกชนิดที่มีระบบประสาท (Yu, 2015) ดังนั้นสัตว์นอกกลุ่มเป้าหมายชนิดอื่นๆ ที่อาศัยในระบบนิเวศนาข้าว จึงมีโอกาสได้รับผลกระทบโดยตรงจากการใช้สารกำจัดแมลงนั้น อันเป็นสาเหตุให้ความหลากหลายทางชีวภาพลดน้อยลงไป (McLaughlin and Mineau, 1995) เมื่อพิจารณาในแง่โอกาสของสัตว์ที่จะได้สัมผัสกับสารกำจัดแมลงตกค้าง ที่เกษตรกรได้ฉีดพ่นลงไปบนนาข้าว ระหว่างแมลงศัตรูพืช เช่น เพลี้ยกระโดดสีน้ำตาล ซึ่งเป็นศัตรูกลุ่มเป้าหมาย และตัวห้ำ เช่น แมงมุมสุนัขป่า ซึ่งเป็นสัตว์นอกกลุ่มเป้าหมาย จะเห็นว่าโดยพฤติกรรมของแมลงศัตรูพืชมักจะเกาะอยู่นิ่งๆ บนต้นข้าวบริเวณโคนต้น (Chaiyawat and Chan-uthai, 2001) แต่แมงมุมสุนัขป่าเป็นผู้ล่าที่ค่อนข้างมีความตื่นตัว จะออกล่าเหยื่อทั้งที่อาศัยอยู่ตามพื้นดินและที่อาศัยอยู่บนต้นข้าว ดังนั้นด้วยลักษณะของพฤติกรรมดังกล่าวจึงทำให้แมงมุมสุนัขป่ามีโอกาสในการได้สัมผัสกับสารกำจัดแมลงที่ตกค้างอยู่บนพื้นดินและตามต้นข้าว ซึ่งมีความเป็นไปได้มากกว่าที่แมลงศัตรูพืช จะได้สัมผัสกับสารกำจัดแมลงที่ตกค้างอยู่บนต้นข้าวเท่านั้น

เมื่อแมงมุมสุนัขป่ามีโอกาสในการได้สัมผัสกับสารกำจัดแมลงมากกว่า จึงมีโอกาสที่จำนวนประชากรของตัวห้ำที่มีประโยชน์เหล่านี้จะลดน้อยลงไป และแมลงศัตรูพืชเมื่อไม่มีตัวห้ำคอยควบคุมจำนวนประชากร ก็สามารถเพิ่มจำนวนประชากรได้อย่างอิสระมากขึ้น จนก่อให้เกิดการระบาดและส่งผลกระทบต่อผลผลิตของเกษตรกรได้ ดังนั้นเมื่อเกิดเหตุการณ์เช่นนี้เกษตรกรก็มีแนวโน้มที่จะกลับมาฉีดพ่นสารกำจัดแมลงอีกต่อไปเรื่อยๆ จึงทำให้เห็นผลเสียของการใช้สารกำจัดแมลงอยู่ 2 ประการหลักๆ คือ

1. ผลเสียต่อตัวเกษตรกร คือ ทำให้ต้องเพิ่มเงินทุนสำหรับการจัดซื้อสารกำจัดแมลงบ่อยครั้งขึ้น และทำให้มีโอกาสในการได้รับอันตรายจากสารกำจัดแมลงที่เข้าสู่ร่างกายมากขึ้น
2. ผลเสียต่อระบบนิเวศ คือ ทำให้สูญเสียสมดุลของห่วงโซ่อาหารในระบบนิเวศ และอาจเป็นสาเหตุที่ทำให้ความหลากหลายทางชีวภาพลดน้อยลงไป

สรุปผลการศึกษา

จากผลการศึกษา แมงมุมสุนัขป่า *W. fidelis* ที่พบเป็นกลุ่มเด่นของแมงมุมผู้ล่าบนพื้นดินในระบบนิเวศนาข้าวแบบอินทรีย์จากพื้นที่ศึกษา เมื่อนำมาทดสอบกับสารกำจัดแมลงคลอร์ไพริฟอส (ยี่ห้อเซนิไฟเลท 40) ในห้องปฏิบัติการ ในแง่ความเป็นพิษแบบเฉียบพลันพบว่า ที่ระดับความเข้มข้นของสารเซนิไฟเลท 40 ที่ระบุบนฉลาก มีผลทำให้แมงมุม *W. fidelis* ทั้งเพศผู้และเพศเมียตาย 100 เปอร์เซ็นต์ ภายในเวลา 1 ชั่วโมง ในขณะที่ผลการศึกษาความเป็นพิษแบบกึ่งเฉียบพลันพบว่า แมงมุมที่ถูกทดสอบด้วยสารคลอร์ไพริฟอสในความเข้มข้นต่ำ หรือเทียบเท่าค่า LC₁₀, LC₃₀ และ LC₅₀ มีผลทำให้แมงมุมใช้เวลาก่อนตอบสนองต่อเหยื่อตัวแรกนานขึ้น จำนวนเหยื่อสะสมที่ถูกกินโดยเฉลี่ยลดลง ซึ่งสอดคล้องกับการที่แมงมุมมีการตอบสนองทางประสาทช้าลง เนื่องจากสารเซนิไฟเลท 40 มีผลไปยับยั้งกิจกรรมเอนไซม์ AChE และยังส่งผลให้แมงมุมมีความเครียดมากขึ้น ซึ่งเห็นได้จากกิจกรรมเอนไซม์ CAT ที่เพิ่มสูงขึ้น ในแมงมุมที่ถูกทดสอบกับสารเซนิไฟเลท 40 ที่ระดับความเข้มข้นสูงขึ้นไป

ข้อเสนอแนะเพิ่มเติม

1. ในการศึกษาครั้งนี้เป็นการศึกษาผลกระทบของสารกำจัดแมลงคลอร์ไพริฟอสต่อแมงมุมสุนัขป่าภายใต้สภาวะห้องปฏิบัติการ ดังนั้นผลกระทบที่เกิดขึ้นอาจจะไม่เหมือนกับผลกระทบที่เกิดขึ้นจริงในสภาพธรรมชาติ จึงควรมีการศึกษาเพิ่มเติมในพื้นที่เกษตรกรรมที่มีการใช้สารกำจัดแมลงดังกล่าวถึงผลกระทบที่เกิดต่อสัตว์ผู้ล่ากลุ่มนี้
2. การจับแมงมุมตัวเต็มวัยมาศึกษาในห้องปฏิบัติการ อาจทำให้เกิดความคลาดเคลื่อนจากปัจจัยเรื่องอายุของแมงมุมที่ไม่เท่ากัน ดังนั้นถ้าเป็นไปได้ที่จะศึกษาผลกระทบทางพิษวิทยาภายใต้สภาวะห้องปฏิบัติการควรเตรียมวิธีการสำหรับเพาะเลี้ยงแมงมุมให้ครบวงจรชีวิตภายในห้องปฏิบัติการได้ เพื่อกำจัดอิทธิพลจากปัจจัยอื่นๆ เช่น ปัจจัยอายุ ที่ไม่เท่ากันได้

รายการอ้างอิง

ภาษาไทย

- กลุ่มควบคุมวัตถุอันตราย, สำนักควบคุมเครื่องสำอางและวัตถุอันตราย, สำนักงานคณะกรรมการอาหารและยา, และ กระทรวงสาธารณสุข. (2556). **คู่มือ ผู้ควบคุมการใช้วัตถุอันตรายเพื่อใช้รับจ้าง**. กรุงเทพฯ: โรงพิมพ์ชุมนุมสหกรณ์การเกษตรแห่งประเทศไทย จำกัด
- ชุติมา สันธนาพิพัฒน์. (2555). "ความหลากหลายของแมงมุมในนาข้าว จังหวัดเพชรบุรี." **โครงการวิจัย 2 หลักสูตรวิทยาศาสตร์บัณฑิต ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยศิลปากร**.
- ณัฐกฤษ ทองน้อย. (2556). "ความหลากหลายของแมงมุมในนาข้าว จังหวัดเพชรบุรี." **โครงการวิจัย 2 หลักสูตรวิทยาศาสตร์บัณฑิต ภาควิชาชีววิทยา มหาวิทยาลัยศิลปากร**.
- ณัฐยา วรวานิชกุล. (2555). "การประเมินความเป็นพิษของสารกำจัดวัชพืช Roundup ต่อไรแดง *Moina macrocopa* ด้วยวิธี comet และผลกระทบต่อกิจกรรมของเอนไซม์ catalase." **โครงการวิจัย 2 หลักสูตรวิทยาศาสตร์บัณฑิต ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยศิลปากร**.
- ภาณุพงษ์ ทองเปรม. (2554). "ความหลากหลายของแมงมุมในนาข้าว จังหวัดเพชรบุรี." **โครงการวิจัย 1 หลักสูตรวิทยาศาสตร์บัณฑิต ภาควิชาชีววิทยา. นครปฐม: มหาวิทยาลัยศิลปากร วิทยาเขตพระราชวังสนามจันทร์**.
- วิภาดา วังศิลาบัตร. (2531). "ชนิดและปริมาณแมงมุมในนาข้าว." **กีฏวิทยาและสัตววิทยา 10: 15-21**
- วิภาดา วังศิลาบัตร. (2539). **แมงมุมในนาข้าวของประเทศไทย**. กรุงเทพฯ: กองกีฏวิทยา กรมวิชาการเกษตร
- ศศิธร คาคสนิท, ชฎามาศ พิณจสนุทร, วัชรินทร์ ลอยลม, และ พวงรัตน์ ยงวณิชย์. (2554). "ผลเสียต่อเซลล์เมื่อมีการปรับตัวที่ไม่สมดุลต่อภาวะเครียดที่เกิดกับยีน ภายหลังจากติดเชื้อและการอักเสบ." **ศรีนครินทร์เวชสาร 26: 127-135**
- สำนักงานเศรษฐกิจการเกษตร. (2555). "ปริมาณการนำเข้าสารศัตรูพืช." **กระทรวงเกษตรและสหกรณ์**
- อภิชาติ ลาวินัยประเสริฐ และ บรรยง นิษฐ์รัตน์. (2546). "ผลของสารสกัดจากสะเดาต่อการทำลายของแมลงสิงและผีเสื้อข้าวเปลือกที่ระยะเวลาก่อนเก็บเกี่ยวต่างๆ กัน." **การประชุมวิชาการข้าวและธัญพืชเมืองหนาว**. ชลบุรี: กรมวิชาการเกษตร สถาบันวิจัยข้าว ศูนย์วิจัยข้าวปทุมธานี.

ภาษาต่างประเทศ

- Aebi, H. (1984). "[13] Catalase in vitro." **Methods in Enzymology** 105: 121–126
- Agency for Toxic Substances and Disease Registry (ATSDR). (1997). "Toxicological Profile for Chlorpyrifos." U.S. Department of Health and Human Services. Atlanta: Public Health Service.
- Baba, Y. G., and T. Miyashita. (2008). "Geographic variation in adult body size and voltinism in the kleptoparasitic spider, *Argyrodes kumadai* (Araneae: Theridiidae)." **Acta Arachnologica** 57: 51-54
- Babczynska, A., G. Wilczek, and P. Migula. (2006). "Effects of dimethoate on spiders from metal pollution gradient." **Science of the Total Environment** 370, 352-359:
- Bainy, A. C. D., M. H. G. Medeiros, P. D. Mascio, and E. A. Almeida. (2006). "In vivo effects of metals on the acetylcholinesterase activity of the *Perna perna* mussel's digestive gland." **Biotemas** 19, 1: 35-39
- Barrion, A. T., and J. A. Litsinger. (1995). **Riceland Spiders of South and Southeast Asia**. UK: CAB International
- Brethead, S., J. P. Toutant, and P. Saglio. (2000). "Effects of Carbofuran, Diuron, and Nicosulfuron on Acetylcholinesterase Activity in Goldfish (*Carassius auratus*)." **Ecotoxicology and Environmental Safety** 47: 117-124
- Chaiwong, J., W. Sriratanasak, S. Arunmit, and U. Boonpramook. (2013). **Insecticide application of farmers' behavior in the BPH outbreak areas of central rice growing region**. Bangkok: Department of Agriculture, Rice Research Institute.
- Chaiyawat, P., and P. Chan-uthai. (2001). **Roles of *Tetragnatha* and *Lycosa* spider in population regulation of brown plant hopper in deepwater rice ecosystem**. Bangkok: Department of Agriculture, Rice Research Institute.
- Chuiko, G M. (2000). "Comparative study of acetylcholinesterase and butyrylcholinesterase in brain and serum of several freshwater fish: specific activities and in vitro inhibition by DDVP, an organophosphorus pesticide." **Comparative Biochemistry and Physiology. C, Toxicology & Pharmacology** 127: 233-242

- Corbin, M., R. Daiss, and D. R. Judkins. (2009). "Risks of Chlorpyrifos Use to Federally Threatened & Endangered California red-legged frog (*Rana aurora draytonii*), California tiger salamander (*Ambystoma californiense*), San Francisco garter snake (*Thamnophis sirtalis tetrataenia*), California clapper rail, (*Rallus longirostris obsoletus*), Salt marsh harvest mouse (*Reithrodontomys raviventris*), Bay checkerspot butterfly (*Euphydryas editha bayensis*), Valley elderberry longhorn beetle (*Desmocerus californicus dimorphus*), San Joaquin kit fox (*Vulpes macrotis mutica*), California freshwater shrimp (*Syncaresis pacifica*), and Delta smelt (*Hypomesus transpacificus*)." USEPA Office of Pesticide Program.
- Desneux, N., A. Decourtye, and J. Delpuech. (2007). "The Sublethal Effects of Pesticides on Beneficial Arthropods." **Annual Review of Entomology** 52: 81-106
- Eaton, D. L., R. B. Daroff, H. Autrup, J. Bridges, P. Buffler, L. G. Costa, J. Coyle, G. McKhann, W. C. Mobley, L. Nadel, D. Neubert, R. Schulte-Hermann, and P. S. Spencer. (2008). "Review of the toxicology of chlorpyrifos with an emphasis on human exposure and neurodevelopment." **Critical Reviews in Toxicology** 38: 1-125
- Elgar, M. A., and D. R. Nash. (1988). "Sexual cannibalism in the garden spider *Araneus diadematus*." **Animal Behaviour** 36: 1511-1517
- Ellman, G. L., K. D. Courtney, V. Andres, and R. M. Featherstone. (1961). "A new and rapid colorimetric determination of acetylcholine- esterase activity." **Biochemical Pharmacology** 7, 2: 88-90
- Foelix, R. (2011). **Biology of Spiders**. 3 rd ed. New York: Oxford University Press
- Gurdebeke, S., J. Maelfait, and T. Backeljau. (2003). "Contrasting allozyme and RAPD variation in spider populations from patchy forest habitats." **Genetica** 119: 27-34
- Hanna, C., and C. Hanna. (2013). "The lethal and sublethal effects of three pesticides on the striped lynx spider (*Oxyopes salticus* Hentz)." **Journal of Applied Entomology** 137: 68-76

- Hawkins, B. A., N. J. Mills, M. A. Jervis, and P. W. Price. (1999). "Is the Biological Control of Insects a Natural Phenomenon?" **OIKOS** 86: 493-450
- Heong, K. L., Saad Bleih, and E. G. Rubia. (1991). "Prey preference of the wolf spider, *Pardosa pseudoannulata* (Boesenberg et Strand)." **Researches on Population Ecology** 33, 2: 179-186
- Hodge, S., and C. J. Vink. (2000). "An evaluation of *Lycosa hilaris* as a bioindicator of organophosphate insecticide contamination." In **Proceedings of the New Zealand Plant Protection Conference**. Rotorua. 226-229
- Hof, A., D. Heimann, and J. Römbke. (1995). "Further development for testing the effects of pesticides on wolf spiders." **Ecotoxicology and Environmental Safety** 31, 3: 264-270
- Hofseth, L. J. (2004). "The adaptive imbalance to genotoxic stress: genome guardians rear their ugly heads." **Carcinogenesis** 25: 1787-1793
- Jemec, A., T. Tišler, D. Drobne, K. Sepčič, D. Fournier, and P. Trebše. (2007). "Comparative toxicity of imidacloprid, of its commercial liquid formulation and of diazinon to a non-target arthropod, the microcrustacean *Daphnia magna*." **Chemosphere** 68: 1408-1418
- Jiao, X., Z. Chen, H. Du, J. Chen, and F. Liu. (2011). "Chemoreceptors distribution and relative importance of male forelegs and palps in intersexual chemical communication of the wolf spider *Pardosa astrigera*." **Chemoecology** 21: 45-49
- Johnson, J. C., and A. Sih. (2005). "Precopulatory sexual cannibalism in fishing spiders (*Dolomedes triton*): a role for behavioral syndromes." **Behavioral Ecology and Sociobiology** 58: 390-396
- Karen, E. S., and T. M. Brown. (1996). **Principles of Toxicology**. 1st ed. New York: Lewis Publishers.
- Kronstedt, T. (2015). "Species of *Wadicosa* (Araneae, Lycosidae): transfer of two species from *Pardosa* and description of three new species from Africa." **European Journal of Taxonomy** 132: 1-19
- Kronstedt, T., and A. A. Zyuzin. (2009). "Fixation of *Lycosa fidelis* O. Pickard-Cambridge, 1872 as the type species for the genus *Wadicosa* Zyuzin, 1985

- (Araneae: Lycosidae), with a redescription of the species." **Contributions to Natural History** 12: 813–828
- Lowry, O. H., N. J. Rosebrough, A. L. Farr, and R. J. Randall. (1951). "Protein measurement with the Folin phenol reagent." **The Journal of Biological Chemistry** 193, 1: 265-275
- Maloney, D., F. A. Drummond, and R. Alford. (2003). "Spider predation in agroecosystems: Can spiders effectively control pest populations?" Maine Agricultural and Forest Experiment Station Technical Bulletin 190.
- McLaughlin, A., and P. Mineau. (1995). "The impact of agricultural practices on biodiversity." **Agriculture, Ecosystems and Environment** 55: 201-212
- Muangphra, P., S. Sengsai, and R. Gooneratne. (2013). "Earthworm Biomarker Responses on Exposure to Commercial Cypermethrin." **Environmental Toxicology** 30: 597-606
- Murphy, F., and J. Murphy. (2000). **An introduction to the spiders of Southeast Asia**. Kuala Lumpur: United Selangor Press
- Mustafa, A., A. Butt, H. M. Tahir, and M. Bilal. (2011). "Susceptibility of wolf spider, *Lycosa terrestris* (Araneae: Lycosidae) to chlorpyrifos." **Pakistan Journal of Zoology** 43: 403-405
- Nikolić, T. V., J. Purać, S. Orčić, D. Kojić, D. Vujanović, Z. Stanimirović, I. Gržetić, K. Ilijević, B. Šikoparija, and D. P. Blagojević. (2015). "Environmental effects on superoxide dismutase and catalase activity and expression in honey bee." **Archives of Insect Biochemistry and Physiology** 0: 1–14
- Nyffeler, M., W. L. Sterling, and D. A. Dean. (1994). "How spiders make a living." **Environmental Entomology** 23: 1357-1367
- Pearce, S., and M. P. Zalucki. (2006). "Do predators aggregate in response to pest density in agroecosystems? Assessing within-field spatial patterns." **Journal of Applied Ecology** 43: 128-140
- Persons, M. H., S. E. Walker, A. L. Rypstra, and S. D. Marshall. (2001). "Wolf spider predator avoidance tactics and survival in the presence of diet-associated predator cues (Araneae: Lycosidae)." **Animal Behaviour** 61: 43-51

- Persons, M. H. (1999). "Hunger effects on foraging responses to perceptual cues in immature and adult wolf spiders (Lycosidae)." **Animal Behaviour** 57: 81-88
- Phasomkusolsil, S., and M. Soonwera. (2011). "Comparative mosquito repellency of essential oils against *Aedes aegypti* (Linn.), *Anopheles dirus* (Peyton and Harrison) and *Culex quinquefasciatus* (Say)." **Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine**: S113-S118
- Reingold, S. C., and J. M. Camhi. (1978). "Abdominal grooming in the cockroach: Development of an adult behavior." **Journal of Insect Physiology** 24: 101-110
- Riechert, S. E., and T. Lockley. (1984). "Spiders as biological control agents." **Annual Review of Entomology** 29: 299-320
- Riechert, S. E., and L. Bishop. (1990). "Prey control by an assemblage of generalist predators: spiders in garden test systems." **Ecology** 71: 1441-1450
- Robinson, D. S., and N. A. M. Eskin. (1991). **Oxidative enzymes in foods**. ed. New York: Elsevier applied science
- Schmidt, M. H., C. Thies, and T. Tschardt. (2009). **Landscape context of arthropod biological control**. In: **Ecological engineering for pest management: advances in habitat manipulation for arthropods**. Collingwood: CSIRO Press
- Symondson, W. O. C., K. D. Sunderland, and H. M. Greenstone. (2002). "Can generalist predators be effective biocontrol agents?" **Annual Review of Entomology** 47: 561-594
- Takada, M. B., T. Kobayashi, A. Yoshioka, S. Takagi, and I. Washitani. (2013). "Facilitation of ground-dwelling wolf spider predation on mirid bugs by horizontal webs built by *Tetragnatha* spiders in organic paddy fields." **The Journal of Arachnology** 41: 31-35
- Van Erp, S., L. Booth, R. Gooneratne, and K. O'Halloran. (2002). "Sublethal responses of wolf spiders (Lycosidae) to organophosphorous insecticides." **Environmental Toxicology** 17, 5: 449-456

- Whitcomb, W. H., and R. Eason. (1965). "The rearing of wolf and lynx spiders in the laboratory (families Lycosidae and Oxyopidae : Araneida)." **Arkansas Academy of Science Proceeding** 19: 19-27
- Wiles, J. A., and P. C. Jepson. (1994). "Sub-lethal effects of deltamethrin residues on the within-crop behaviour and distribution of *Coccinella septempunctata*." **Entomologia Experimentalis et Applicata** 72: 33-45
- Wise, D. H., W. E. Snyder, P. Tuntibunpakul, and J. Halaj . (1999). "Spiders in decomposition food webs of agroecosystems: theory and evidence." **The Journal of Arachnology** 27: 363-370
- World spider catalog. (2015). "World spider catalog". Natural History Museum Bern. Accessed December 26. Available from <http://wsc.nmbe.ch>, version 16.5.
- Xuereb, B., E. Lefèvre, J. Garric, and O. Geffard. (2009). "Acetylcholinesterase activity in *Gammarus fossarum* (Crustacea Amphipoda): Linking AChE inhibition and behavioural alteration." **Aquatic Toxicology** 94: 114-122
- Yu, S. J. (2015). **The toxicology and biochemistry of insecticides**. 2nd ed. New York: CRC Press
- Zhang, X., Y. Shen, X. Yu, and X. Liu. (2012). "Dissipation of chlorpyrifos and residue analysis in rice, soil and water under paddy field conditions." **Ecotoxicology and Environmental Safety** 78: 276-280





ภาคผนวก

การเตรียมสารเคมี

1. การเตรียมสารละลายสำหรับการวิเคราะห์กิจกรรมเอนไซม์ AChE

Potassium phosphate buffer pH 7.5 (PBS pH 7.5)

สารเคมี

NaCl	6.9 g
KCl	0.2 g
Na ₂ HPO ₄ ·(2H ₂ O)	11.5 g
KH ₂ PO ₄	2.0 g

วิธีการเตรียม

ชั่งสารตามส่วนประกอบ ละลายด้วยน้ำกลั่น ปรับปริมาตรให้เท่ากับ 1,000 ml นำไปปรับ pH ด้วยเครื่อง pH meter โดยใช้สาร 0.1 M HCl และ 0.1 M NaOH ปรับให้มี pH เท่ากับ 7.5 นำไปฆ่าเชื้อด้วยการ autoclave เก็บไว้เป็น stock ที่อุณหภูมิต่ำกว่า 4°C เวลานำมาใช้ให้แบ่งออกมาใช้ปริมาณครั้งละน้อยๆ ตามความเหมาะสม ควรควบคุมอุณหภูมิให้มีความเย็นตลอดเวลา เพื่อรักษาสภาพของเอนไซม์

10 mM DTNB (stock)

สารเคมี

15 mM DTNB	0.4 g
NaHCO ₃	0.3 g
PBS pH 7.5	100 ml

วิธีการเตรียม

หลีกเลี่ยงการเตรียมในที่มืด โดยชั่ง 15 mM DTNB ปริมาณ 0.4 g ด้วยเครื่องชั่งแบบละเอียด ละลายและปรับปริมาตรด้วย PBS pH 7.5 ให้เท่ากับ 100 ml เติมน้ำ NaHCO₃ 0.3 g ลงไป เก็บเป็น stock ในขวดสีชาที่อุณหภูมิต่ำกว่า 4°C เมื่อนำมาใช้แบ่ง DTNB จาก stock ออกมาเจือจางด้วย PBS pH 7.5 ในอัตราส่วน DTNB : PBS = 0.5 ml : 9.5 ml จะได้ 0.5 mM DTNB ปริมาตร 10.0 ml

15 mM ACT Iodide

สารเคมี

ACT Iodide	0.2 g
PBS pH 7.5	100 ml

วิธีการเตรียม

หลีกเลี่ยงการเตรียมในที่มืด โดยชั่ง ACT Iodide ปริมาณ 0.2 g ละลายและปรับปริมาตรด้วย PBS pH 7.5 ให้เท่ากับ 50 ml เก็บเป็น stock ในขวดสีชาที่อุณหภูมิต่ำกว่า 4°C เมื่อนำมาใช้ แบ่งจาก stock ออกมาใช้ครั้งละน้อยๆ ขึ้นอยู่กับปริมาณจำนวนชุดของปฏิกิริยาที่จะใช้ทดสอบ เนื่องจากสารมีการเสื่อมสภาพได้ง่ายจึงควรเก็บในหลอดที่บดแสงและไว้ในที่เย็นทุกครั้งระหว่างนำสารออกมาใช้งาน

2. การเตรียมสารละลายสำหรับการวิเคราะห์กิจกรรมเอนไซม์ CAT

Potassium phosphate buffer pH 7.0 (PBS pH 7.0)

สารเคมี

NaCl	6.9 g
KCl	0.2 g
Na ₂ HPO ₄ ·2(H ₂ O)	11.5 g
KH ₂ PO ₄	2.0 g

วิธีการเตรียม

ชั่งสารตามส่วนประกอบ ละลายด้วยน้ำกลั่น ปรับปริมาตรให้เท่ากับ 1,000 ml นำไปปรับ pH ด้วยเครื่อง pH meter โดยใช้สาร 0.1 M HCl และ 0.1 M NaOH ปรับให้มี pH เท่ากับ 7.0 นำไปฆ่าเชื้อด้วยการ autoclave เก็บไว้เป็น stock ที่อุณหภูมิต่ำกว่า 4°C เวลานำมาใช้ให้แบ่งออกมาใช้ปริมาณครั้งละน้อยๆ ตามความเหมาะสม และควรควบคุมอุณหภูมิให้มีความเย็นตลอดเวลาเพื่อรักษาสภาพของเอนไซม์

สารละลาย hydrogen peroxide (0.35% v/v H₂O₂)

สารเคมี

35% v/v H₂O₂ (conc. H₂O₂)

PBS pH 7.0

วิธีการเตรียม

ปิเปตสาร 35% v/v H₂O₂ ปริมาตร 0.1 ml ปรับปริมาตรด้วย PBS pH 7.0 ให้เท่ากับ 10 ml จะได้ 0.35% v/v H₂O₂ ก่อนการทดลองเก็บสารไว้ที่อุณหภูมิต่ำกว่า 4°C และควรเตรียมสารใหม่ทุกครั้งที่ทำกรทดลอง

3. การเตรียมสารละลายสำหรับการวิเคราะห์ปริมาณโปรตีนตามวิธี Lowry et al. (1951)

Lowry's solution

สารเคมี

Solution A (500 ml)

NaOH 2 g

Na₂CO₃ 14 g

Solution B (100 ml)

CuSO₄·5(H₂O) 1.4 g

Solution C (100 ml)

Na₂Tartrate·2(H₂O) 2.8 g

วิธีการเตรียม

ชั่งสารตามส่วนประกอบในแต่ละ solution ทั้ง 3 ชนิด ใช้ น้ำกลั่น เป็นตัวทำละลาย โดยเก็บแยก solution ทั้ง 3 เป็น stock A, B และ C ไว้ที่อุณหภูมิต่ำกว่า 4 °C เมื่อนำมาใช้งาน ผสม solution ทั้ง 3 ชนิดในอัตราส่วน A : B : C = 100 : 1 : 1 ml และต้องเตรียมใหม่ทุกครั้ง

Standard protein

สารเคมี

Bovine Serum Albumin (BSA) 0.1 g

วิธีการเตรียม

ชั่ง BSA 0.1 g ด้วยเครื่องชั่งแบบละเอียด ละลายด้วยน้ำกลั่น ปรับปริมาตรเป็น 100 ml จะได้ BSA ความเข้มข้น 1,000 mg/l เก็บเป็น stock แล้วแบ่งไปทำ serial dilutions ให้ได้ความเข้มข้นเท่ากับ 100, 80, 60, 40, 20, 0 mg/l ปริมาตรในแต่ละความเข้มข้น 5 ml เพื่อนำไปใช้หา standard curve

ประวัติผู้วิจัย

ชื่อ-สกุล	นายภาณุพงษ์ ทองเปรม
ที่อยู่	165/12 ต.ตลาด อ.เมือง จ.จันทบุรี 22000
สถานศึกษา	มหาวิทยาลัยศิลปากร วิทยาเขตพระราชวังสนามจันทร์ จ. นครปฐม
ประวัติการศึกษา	
พ.ศ. 2551-2554	วิทยาศาสตรบัณฑิต จากสาขาวิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์มหาวิทยาลัยศิลปากร วิทยาเขตพระราชวังสนามจันทร์ จ. นครปฐม
พ.ศ. 2555-2558	วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์มหาวิทยาลัยศิลปากร วิทยาเขตพระราชวังสนามจันทร์ จ. นครปฐม
โทรศัพท์	086-3505627
E-mail	thongprem_p@silpakorn.edu

