



การเปลี่ยนแปลงกิจกรรมของเอนไซม์และพยาธิสภาพเนื้อเยื่อของไส้เดือนน้ำ (*Tubifex tubifex* Müller, 1774) หลังจากได้รับสารผสม imidacloprid และ glyphosate

ALTERATION IN ENZYME ACTIVITY AND HISTOPATHOLOGY OF AQUATIC OLIGOCHAETE (*Tubifex tubifex* Müller, 1774) AFTER EXPOSURE TO MIXTURE OF IMIDACLOPRID AND GLYPHOSATE

ปัญญาวุฒิ รัตนารมย์

บัณฑิตวิทยาลัยมหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ

การเปลี่ยนแปลงกิจกรรมของเอนไซม์และพยาธิสภาพเนื้อเยื่อของไส้เดือนน้ำ (*Tubifex tubifex* Müller, 1774) หลังจากได้รับสารผสม imidacloprid และ glyphosate



ปัญญานุฒิ รัตนารมย์

ปริญญานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตร

การศึกษามหาบัณฑิต สาขาวิชาชีววิทยา

คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ

ปีการศึกษา 2561

ลิขสิทธิ์ของมหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ

ALTERATION IN ENZYME ACTIVITY AND HISTOPATHOLOGY OF AQUATIC
OLIGOCHAETE (*Tubifex tubifex* Müller, 1774) AFTER EXPOSURE TO MIXTURE
OF IMIDACLOPRID AND GLYPHOSATE



A Thesis Submitted in partial Fulfillment of Requirements
for MASTER OF EDUCATION (Biology)
Faculty of Science Srinakharinwirot University
2018
Copyright of Srinakharinwirot University

ปริญญานิพนธ์

เรื่อง

การเปลี่ยนแปลงกิจกรรมของเอนไซม์และพยาธิสภาพเนื้อเยื่อของไส้เดือนน้ำ (*Tubifex tubifex* Müller, 1774) หลังจากได้รับสารผสม imidacloprid และ glyphosate

ของ

ปัญญาวุฒิ รัตนารมย์

ได้รับอนุมัติจากบัณฑิตวิทยาลัยให้นับเป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตร

ปริญญาการศึกษามหาบัณฑิต สาขาวิชาชีววิทยา

ของมหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ

คณบดีบัณฑิตวิทยาลัย

(รองศาสตราจารย์ นายแพทย์ฉัตรชัย เอกปัญญาสกุล)

คณะกรรมการสอบปากเปล่าปริญญานิพนธ์

ที่ปรึกษาหลัก

ประธาน

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.นลินา ประไพรัชสิทธิ์)

(รองศาสตราจารย์ ดร.เฟื่องฟ้า อุ่นอบ)

กรรมการ

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.อนิษฐาน ศรีนวล)

ชื่อเรื่อง	การเปลี่ยนแปลงกิจกรรมของเอนไซม์และพยาธิสภาพเนื้อเยื่อของไส้เดือนน้ำ (<i>Tubifex tubifex</i> Müller, 1774) หลังจากได้รับสารผสม imidacloprid และ glyphosate
ผู้วิจัย	ปัญญาวุฒิ รัตนารมย์
ปริญญา	การศึกษามหาบัณฑิต
ปีการศึกษา	2561
อาจารย์ที่ปรึกษา	ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. นลินา ประไพรัชสิทธิ์

Imidacloprid และ glyphosate เป็นยาปราบศัตรูพืชที่มักตรวจพบว่าการปนเปื้อนในระบบนิเวศแหล่งน้ำพร้อมกัน ดังนั้น งานวิจัยนี้จึงมีจุดประสงค์เพื่อศึกษาความเป็นพิษเฉียบพลันร่วมของ imidacloprid และ glyphosate ต่อไส้เดือนน้ำ (*Tubifex tubifex*) ผลการศึกษาพบว่า ที่เวลา 24 และ 48 ชั่วโมง ของการได้รับสาร imidacloprid มีความเป็นพิษเฉียบพลันต่อไส้เดือนน้ำมากกว่า glyphosate โดยอันตรกิริยาของสารผสมระหว่าง imidacloprid กับ glyphosate ที่เวลา 24 และ 48 ชั่วโมง คือ การยับยั้งฤทธิ์และการเพิ่มฤทธิ์ตามลำดับ นอกจากนี้ยังพบว่า imidacloprid glyphosate และสารผสมระหว่าง imidacloprid กับ glyphosate ที่ระดับความเข้มข้นต่ำกว่าค่า LC_{50} มีผลต่อการเปลี่ยนแปลงกิจกรรมของเอนไซม์ catalase กิจกรรมของเอนไซม์ acetylcholinesterase และพยาธิสภาพเนื้อเยื่อของไส้เดือนน้ำ โดยมีผลทำให้กิจกรรมของเอนไซม์ catalase เพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) ที่เวลา 24 และ 48 ชั่วโมง และยังพบว่ากิจกรรมของเอนไซม์ acetylcholinesterase เพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) เมื่อไส้เดือนน้ำได้รับ imidacloprid เป็นเวลา 24 และ 48 ชั่วโมง อย่างไรก็ตาม เมื่อไส้เดือนน้ำได้รับ glyphosate และสารผสมระหว่าง imidacloprid กับ glyphosate เป็นเวลา 24 และ 48 ชั่วโมง กิจกรรมของเอนไซม์ acetylcholinesterase กลับลดลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) ทั้งนี้ยังพบการสลายของเนื้อเยื่อไส้เดือนน้ำและการแสดงออกของ chloragosomes ในปริมาณมาก ดังนั้น การใช้งาน imidacloprid และ glyphosate ทั้งในด้านปริมาณและความถี่ควรคำนึงถึงผลกระทบที่จะเกิดขึ้นกับสิ่งมีชีวิตในระบบนิเวศแหล่งน้ำ

คำสำคัญ : ความเป็นพิษเฉียบพลัน, imidacloprid, glyphosate, ไส้เดือนน้ำ

Title	ALTERATION IN ENZYME ACTIVITY AND HISTOPATHOLOGY OF AQUATIC OLIGOCHAETE (<i>Tubifex tubifex</i> Müller,1774) AFTER EXPOSURE TO MIXTURE OF IMIDACLOPRID AND GLYPHOSATE
Author	PANYAWUT RATTANAROM
Degree	MASTER OF EDUCATION
Academic Year	2018
Thesis Advisor	Assistant Professor Nalena Praphairaksit , Ph.D.

Imidacloprid and glyphosate have been detected frequently in the same aquatic environments due to the simultaneous use of both of these pesticides. Therefore, this study intended to investigate the toxic concentrations of imidacloprid, glyphosate and their mixture on *Tubifex tubifex*. The results showed that after twenty-four and forty-eight hours of pesticide exposure, imidacloprid alone caused toxic effects on *T. tubifex* more than glyphosate. The interaction of these two pesticides at twenty-four and forty-eight hours were antagonistic and additive effects, respectively. The sublethal effects were further examined by investigating the alteration in enzyme activity and histopathology. The study found significant increases ($p<0.05$) in the catalase activity at twenty-four and forty-eight hours. The significant increases ($p<0.05$) in acetylcholinesterase activity were also observed after the worms exposed to imidacloprid alone at twenty-four and forty-eight hours. However, being exposed to glyphosate and their mixture with imidacloprid at 24 and 48 hours, *T. tubifex* showed a significant decrease ($p<0.05$) in acetylcholinesterase activity while H&E staining revealed the degeneration of tissues and the overexpression of chloragosomes in treated worms. In order to avoid the ecological impact, the application of imidacloprid and glyphosate, especially their mixture, must be restricted in both quality and frequency of use.

Keyword : acute toxicity, imidacloprid, glyphosate, tubifex worm

กิตติกรรมประกาศ

ปริญญานิพนธ์ฉบับนี้สำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยดีเนื่องจาก ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.นลินา ประไพรัชสิทธิ์ ซึ่งเป็นอาจารย์ที่ปรึกษาปริญญานิพนธ์ ได้ให้คำปรึกษา ความรู้ และให้การสนับสนุนในด้านการทำวิจัย รวมทั้งปลูกฝังลักษณะของนักวิจัยที่ดี ด้วยความเอาใจใส่เป็นอย่างดี ผู้วิจัยจึงต้องขอกราบขอบพระคุณเป็นอย่างสูงด้วยความนับถือ

ขอขอบพระคุณรองศาสตราจารย์ ดร.เฟื่องฟ้า อุ่นอบ ที่ให้ความกรุณาในการเป็นประธานกรรมการการสอบปากเปล่าปริญญานิพนธ์ และให้คำแนะนำในการทำปริญญานิพนธ์ฉบับนี้

ขอขอบพระคุณรองศาสตราจารย์ ดร.สมใจ เพ็งปรีชา ที่ให้ความกรุณาในการเป็นผู้ทรงคุณวุฒิในการสอบเค้าโครงปริญญานิพนธ์ และให้คำแนะนำในการทำปริญญานิพนธ์ฉบับนี้

ขอขอบพระคุณผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. อนิษฐาณ ศรีนวล ที่ให้ความกรุณาในการเป็นกรรมการการสอบปากเปล่าปริญญานิพนธ์ และให้คำแนะนำในการทำปริญญานิพนธ์ฉบับนี้

ขอขอบพระคุณคณาจารย์และเจ้าหน้าที่ ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ ที่ให้ความรู้และคำแนะนำในการทำปริญญานิพนธ์ฉบับนี้

ขอขอบคุณสถาบันส่งเสริมการสอนวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี (สสวท.) ที่มอบทุนการศึกษาและทุนสนับสนุนการทำปริญญานิพนธ์ ภายใต้โครงการส่งเสริมการผลิตครูที่มีความสามารถพิเศษทางวิทยาศาสตร์และคณิตศาสตร์ (สควค.)

สุดท้ายนี้ขอกราบขอบพระคุณบิดา มารดา พี่ น้อง และเพื่อน ๆ ทุกคน ที่ได้ช่วยเหลือทั้งในด้านกำลังใจและกำลังใจ จนทำให้ปริญญานิพนธ์ฉบับนี้สำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยดี

ปัญญาวุฒิ รัตนารมย์

สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อภาษาไทย	ง
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ	จ
กิตติกรรมประกาศ.....	ฉ
สารบัญ	ช
สารบัญตาราง.....	ญ
สารบัญภาพประกอบ	ฐ
บทที่ 1 บทนำ.....	1
ภูมิหลัง	1
ความมุ่งหมายของการวิจัย	3
ความสำคัญของการวิจัย	3
ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ.....	4
ขอบเขตการวิจัย	4
สมมติฐานการวิจัย.....	4
ระยะเวลาในการดำเนินงานวิจัย	5
สถานที่ทำการวิจัย	5
บทที่ 2 เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง.....	6
หลักการพิษวิทยา	6
การเกิดพิษในร่างกายของสิ่งมีชีวิต	7
ปัจจัยที่มีผลต่อการเกิดพิษ.....	7
อันตรายของสารพิษ	9
การประเมินความเป็นพิษ	12

สารกำจัดศัตรูพืช	23
การแบ่งกลุ่มสารกำจัดศัตรูพืช.....	24
สารเคมีกำจัดแมลง	25
สารเคมีกำจัดวัชพืช	28
Imidacloprid	31
ข้อมูลทั่วไป	31
คุณสมบัติทางกายภาพและทางเคมี	31
การใช้งาน imidacloprid	33
กลไกการออกฤทธิ์ของ imidacloprid ในสิ่งมีชีวิต	34
ความเป็นพิษของ imidacloprid	34
การปนเปื้อนของ imidacloprid ในระบบนิเวศ.....	39
Glyphosate	40
ข้อมูลทั่วไป	40
คุณสมบัติทางกายภาพและทางเคมี	41
การใช้งาน glyphosate.....	41
กลไกการออกฤทธิ์ของ glyphosate ต่อสิ่งมีชีวิตในกลุ่มเป้าหมาย	42
กลไกการออกฤทธิ์ของ glyphosate ต่อสิ่งมีชีวิตนอกกลุ่มเป้าหมาย	43
ความเป็นพิษของ glyphosate	44
การปนเปื้อนของ glyphosate ในระบบนิเวศ.....	49
ไส้เดือนน้ำ.....	50
การจัดจำแนกชั้นทางอนุกรมวิธาน	50
ลักษณะทั่วไปของไส้เดือนน้ำ	50
สรีรวิทยาบางประการของไส้เดือนน้ำ.....	52

การกระจายตัวและความสำคัญของไล้เดื่อนน้ำในระบบนิเวศ.....	53
การใช้ไล้เดื่อนน้ำในการทดสอบความเป็นพิษ	53
เทคนิคการเตรียมสไลด์ถาวรเนื้อเยื่อสัตว์เพื่อศึกษาภายใต้กล้องจุลทรรศน์ใช้แสง.....	54
การดองตัวอย่าง (specimen fixation).....	54
การดึงน้ำออกจากเนื้อเยื่อ (tissue dehydration)	55
การฝังเนื้อเยื่อในพาราฟฟิน (tissue embedding).....	56
การตัดเนื้อเยื่อ (tissue sectioning).....	56
การย้อมสี (staining).....	56
การตรวจวัดกิจกรรมของเอนไซม์ acetylcholinesterase (AChE activity)	57
การตรวจวัดกิจกรรมของเอนไซม์ catalase (CAT activity).....	59
บทที่ 3 วิธีดำเนินการวิจัย.....	61
วัสดุ อุปกรณ์ สารเคมี และเครื่องมือ.....	61
วัสดุ อุปกรณ์.....	61
เครื่องมือ	61
สารเคมี	62
วิธีการทดลอง	63
การเตรียมสัตว์ทดลอง	63
การวิเคราะห์ความเป็นพิษเชิงเดี่ยวของ imidacloprid และ glyphosate	63
การวิเคราะห์ความเป็นพิษร่วมของ imidacloprid กับ glyphosate	64
การศึกษาการเปลี่ยนแปลงพยาธิสภาพเนื้อเยื่อ	65
การศึกษาการเปลี่ยนแปลงกิจกรรมของเอนไซม์ acetylcholinesterase	66
การศึกษาการเปลี่ยนแปลงกิจกรรมของเอนไซม์ catalase	68
การวิเคราะห์ข้อมูล.....	70

บทที่ 4 ผลการดำเนินงานวิจัย	71
ผลความเป็นพิษเฉียบพลันเชิงเดี่ยวและความเป็นพิษเฉียบพลันร่วมของ imidacloprid และ glyphosate ต่อไส้เดือนน้ำ.....	71
ผลความเป็นพิษเฉียบพลันเชิงเดี่ยวของ imidacloprid	71
ผลความเป็นพิษเฉียบพลันเชิงเดี่ยวของ glyphosate	73
ผลความเป็นพิษเฉียบพลันร่วมของ imidacloprid และ glyphosate	74
ผลการวิเคราะห์คุณภาพน้ำ	76
ผลของความเป็นพิษเฉียบพลันเชิงเดี่ยวและความเป็นพิษเฉียบพลันร่วมของ imidacloprid และ glyphosate ต่อพยาธิสภาพเนื้อเยื่อของไส้เดือนน้ำ	77
ผลของความเป็นพิษเฉียบพลันเชิงเดี่ยวและความเป็นพิษเฉียบพลันร่วมของ imidacloprid และ glyphosate ต่อกิจกรรมของเอนไซม์ acetylcholinesterase ในไส้เดือนน้ำ	81
ผลของความเป็นพิษเฉียบพลันเชิงเดี่ยวและความเป็นพิษเฉียบพลันร่วมของ imidacloprid และ glyphosate ต่อกิจกรรมของเอนไซม์ catalase ในไส้เดือนน้ำ	83
บทที่ 5 สรุปผลการวิจัย อภิปรายผล และข้อเสนอแนะ	85
สรุปผลการวิจัย.....	85
อภิปรายผลการวิจัย	86
ข้อเสนอแนะ	92
บรรณานุกรม	93
ประวัติผู้เขียน.....	109

สารบัญตาราง

	หน้า
ตาราง 1 งานวิจัยที่เกี่ยวข้องกับการศึกษาการเกิดอันตรายของสารผสม.....	11
ตาราง 2 ตัวอย่างตัวบ่งชี้ทางชีวภาพที่นิยมใช้ในการประเมินค่า EC ₅₀ ในสัตว์ทดลอง.....	14
ตาราง 3 ความเข้มข้นสารพิษและร้อยละการตอบสนองของสัตว์ทดลอง	15
ตาราง 4 การแบ่งสารกำจัดศัตรูพืชตามความเป็นพิษ	24
ตาราง 5 ตัวอย่างยาฆ่าแมลงที่มีความเป็นพิษแตกต่างกัน	25
ตาราง 6 ตัวอย่างยาฆ่าแมลงที่มีกลไกการออกฤทธิ์แตกต่างกัน.....	27
ตาราง 7 ตัวอย่างยากำจัดวัชพืชที่มีความเป็นพิษแตกต่างกัน.....	28
ตาราง 8 ตัวอย่างยากำจัดวัชพืชที่มีกลไกการออกฤทธิ์แตกต่างกัน	29
ตาราง 9 คุณสมบัติทางกายภาพและทางเคมีของ imidacloprid	31
ตาราง 10 การนำเข้า imidacloprid ในประเทศไทย.....	33
ตาราง 11 รายงานการศึกษาความเป็นพิษของ imidacloprid ต่อสิ่งมีชีวิต	34
ตาราง 12 คุณสมบัติทางกายภาพและทางเคมีของ glyphosate.....	41
ตาราง 13 การนำเข้า glyphosate และยาปราบวัชพืชที่มีส่วนผสม glyphosate ในประเทศไทย	42
ตาราง 14 รายงานการศึกษาความเป็นพิษของ glyphosate และยาปราบวัชพืชที่มีส่วนผสมของ glyphosate ต่อสิ่งมีชีวิต.....	44
ตาราง 15 ร้อยละการตายของไส้เดือนน้ำที่ได้รับ imidacloprid เป็นเวลา 24 และ 48 ชั่วโมง	72
ตาราง 16 ผลการวิเคราะห์โพธิทเมื่อไส้เดือนน้ำได้รับ imidacloprid เป็นเวลา 24 และ 48 ชั่วโมง	72
ตาราง 17 ร้อยละการตายของไส้เดือนน้ำที่ได้รับ glyphosate เป็นเวลา 24 และ 48 ชั่วโมง	73
ตาราง 18 ผลการวิเคราะห์โพธิทเมื่อไส้เดือนน้ำได้รับ glyphosate เป็นเวลา 24 และ 48 ชั่วโมง	74
ตาราง 19 ร้อยละการตายของไส้เดือนน้ำที่ได้รับ imidacloprid และ glyphosate เป็นเวลา 24 และ 48 ชั่วโมง	75
ตาราง 20 ผลการวิเคราะห์โพธิทและการวิเคราะห์กิจกรรมทางชีววิทยาจากการตายของไส้เดือนน้ำที่ได้รับ imidacloprid และ glyphosate เป็นเวลา 24 และ 48 ชั่วโมง.....	75
ตาราง 21 ผลการตรวจวัดคุณภาพน้ำในการทดลองความเป็นพิษเฉียบพลันเชิงเดี่ยว.....	76

ตาราง 22 ผลการตรวจวัดคุณภาพน้ำในการทดลองความเป็นพิษเฉียบพลันร่วม	77
ตาราง 23 พยาธิสภาพของเนื้อเยื่อไส้เดือนน้ำที่ได้รับ imidacloprid glyphosate และสารผสม ระหว่าง imidacloprid กับ glyphosate เป็นระยะเวลา 24 และ 48 ชั่วโมง	77
ตาราง 24 กิจกรรมของเอนไซม์ acetylcholinesterase ในไส้เดือนน้ำที่ได้รับ imidacloprid glyphosate และสารผสมระหว่าง imidacloprid กับ glyphosate เป็นเวลา 24 และ 48 ชั่วโมง .	81
ตาราง 25 กิจกรรมของเอนไซม์ catalase ในไส้เดือนน้ำที่ได้รับ imidacloprid glyphosate และ สารผสมระหว่าง imidacloprid กับ glyphosate เป็นเวลา 24 และ 48 ชั่วโมง	83



สารบัญภาพประกอบ

	หน้า
ภาพประกอบ 1 การเกิดพิษแบบเพิ่มฤทธิ์ของสารผสม.....	9
ภาพประกอบ 2 การเกิดพิษแบบเสริมฤทธิ์ของสารผสม	10
ภาพประกอบ 3 การเกิดพิษแบบยับยั้งของสารผสม.....	11
ภาพประกอบ 4 ความสัมพันธ์ของความเข้มข้นสารพิษกับร้อยละการตอบสนองของสัตว์ทดลอง	16
ภาพประกอบ 5 ความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของสารพิษที่สัตว์ทดลองได้รับกับร้อยละการตอบสนองของสัตว์ทดลองที่เพิ่มขึ้นในแต่ละความเข้มข้น.....	17
ภาพประกอบ 6 การเปลี่ยนร้อยละการตอบสนองของสัตว์ทดลองเป็นค่า probit.....	18
ภาพประกอบ 7 การเปลี่ยนแปลงร้อยละการตอบสนองเป็นค่า probit.....	19
ภาพประกอบ 8 ความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของสารพิษที่ถูกแปลงเป็นลอการิทึมกับค่า probit ซึ่งแปลงมาจากร้อยละการตอบสนองของสัตว์ทดลองที่ได้รับสารชนิดที่ 1 และสารชนิดที่ 2	20
ภาพประกอบ 9 การแปลความค่ากิจกรรมทางชีววิทยา (biological activity, S) ที่คำนวณได้จาก Marking's additive index method	22
ภาพประกอบ 10 การแปลความค่าดัชนีการส่งเสริมการทำงาน (additive index, AI) ที่คำนวณได้จาก Marking's additive index method.....	23
ภาพประกอบ 11 สูตรโครงสร้างของ imidacloprid.....	31
ภาพประกอบ 12 ผลของ imidacloprid ที่ทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงในสิ่งมีชีวิต	37
ภาพประกอบ 13 สูตรโครงสร้างของ glyphosate	40
ภาพประกอบ 14 กลไกการออกฤทธิ์ของ glyphosate.....	43
ภาพประกอบ 15 การสร้างพันธะระหว่างสารออกฤทธิ์ในกลุ่ม organophosphorus (OP) กับบริเวณ esteric site (ser-OH) ของเอนไซม์ AChE.....	48
ภาพประกอบ 16 ไส้เดือนน้ำ (<i>T. tubifex</i>)	51
ภาพประกอบ 17 ลักษณะภายนอกบางประการของ <i>T. tubifex</i>	51
ภาพประกอบ 18 ระบบหมุนเวียนเลือดแบบปิดของ <i>T. tubifex</i>	52
ภาพประกอบ 19 การสลายพันธะเอสเทอร์ของ acetylcholine โดยเอนไซม์ acetylcholinesterase ได้สารผลิตภัณฑ์เป็น acetic acid และ choline	58

ภาพประกอบ 20 ปฏิกริยาการตรวจวัดกิจกรรมของเอนไซม์ acetylcholinesterase	59
ภาพประกอบ 21 ปฏิกริยาการตรวจวัดกิจกรรมของเอนไซม์ catalase	60
ภาพประกอบ 22 ความเป็นพิษเฉียบพลันเชิงเดี่ยวและความเป็นพิษเฉียบพลันร่วมของ imidacloprid และ glyphosate ต่อพยาธิสภาพเนื้อเยื่อของไส้เดือนน้ำที่เวลา 24 และ 48 ชั่วโมง	80
ภาพประกอบ 23 กิจกรรมของเอนไซม์ acetylcholinesterase ในไส้เดือนน้ำที่ได้รับ imidacloprid glyphosate และสารผสมระหว่าง imidacloprid กับ glyphosate เป็นเวลา 24 และ 48 ชั่วโมง .	82
ภาพประกอบ 24 กิจกรรมของเอนไซม์ catalase ในไส้เดือนน้ำที่ได้รับ imidacloprid glyphosate และสารผสมระหว่าง imidacloprid กับ glyphosate เป็นเวลา 24 และ 48 ชั่วโมง	84



บทที่ 1

บทนำ

ภูมิหลัง

การขยายตัวที่เพิ่มขึ้นของภาคเกษตรอุตสาหกรรมทั่วโลกเพื่อตอบสนองความต้องการของผู้บริโภคในปัจจุบันเป็นผลให้เกษตรกรเลือกใช้สารเคมีกำจัดศัตรูพืชที่หลากหลายขึ้น (Cooper & Dobson, 2007; Hvezdová et al., 2018; Uwizeyimana, Wang, Chen, & Khan, 2017) ซึ่งการใช้สารเคมีกำจัดศัตรูพืชในปริมาณมากอาจนำไปสู่เกิดการปนเปื้อนในระบบนิเวศแหล่งน้ำได้ (Brown & Van Beinum, 2009; Elbert, Haas, Springer, Thielert, & Nauen, 2008; Verro, Finizio, Otto, & Vighi, 2008) จากการตรวจวัดการตกค้างของสารเคมีกำจัดศัตรูพืชในบางพื้นที่ของประเทศสหรัฐอเมริกาและในประเทศไทยพบว่า ในระบบนิเวศแหล่งน้ำโดยเฉพาะอย่างยิ่งบริเวณที่มีการทำเกษตรกรรมมีการปนเปื้อนจากทั้งยากำจัดวัชพืช (herbicide) และยาฆ่าแมลง (insecticide) (Department of Agriculture, 2015; Nowell et al., 2018) อย่างไรก็ตาม การวิจัยผลกระทบของสารเคมีกำจัดศัตรูพืชต่อสิ่งมีชีวิตในปัจจุบันยังคงมุ่งเน้นรายงานผลความเป็นพิษของสารกำจัดศัตรูพืชเพียงชนิดใดชนิดหนึ่งต่อสิ่งมีชีวิตในระบบนิเวศจึงทำให้ผลการประเมินความเป็นพิษไม่สามารถสะท้อนผลกระทบที่เกิดขึ้นจริงต่อสิ่งมีชีวิตในระบบนิเวศแหล่งน้ำได้ (Schnug, Leinaas, & Jensen, 2014; Uwizeyimana et al., 2017) การศึกษาความเป็นพิษร่วมของยากำจัดวัชพืชและยาฆ่าแมลงจึงมีความสำคัญเพื่อทำความเข้าใจรูปแบบความเป็นพิษที่เกิดขึ้นจริงในระบบนิเวศแหล่งน้ำ ไม่ว่าจะเป็นการเสริมฤทธิ์ (synergism) หรือการเพิ่มฤทธิ์ (additives) ซึ่งล้วนมีผลกระทบต่อสิ่งมีชีวิตในระบบนิเวศแหล่งน้ำมากกว่าการได้รับสารเพียงชนิดเดียวและอาจนำไปสู่การลดจำนวนอย่างรวดเร็วของสิ่งมีชีวิตในระบบนิเวศแหล่งน้ำได้ (Cang et al., 2017) ด้วยเหตุนี้คณะกรรมการการยุโรปจึงประกาศนโยบายให้มีการศึกษาความเป็นพิษร่วมที่เกิดจากสารเคมีกำจัดศัตรูพืชเพื่อเป็นข้อมูลในการควบคุมปริมาณการใช้สารเคมี (COM, 2012)

Imidacloprid คือ สารออกฤทธิ์ในยาฆ่าแมลงกลุ่ม neonicotinoids ที่นิยมใช้อย่างแพร่หลายเพื่อควบคุมแมลงศัตรูพืช (Cang et al., 2017; Van Dijk, Van Staalduinen, & Van der Sluijs, 2013) ยาฆ่าแมลงชนิดนี้สามารถสร้างพันธะกับ nicotinic acetylcholine receptors และไม่สามารถถูกทำลายด้วยเอนไซม์ acetylcholinesterase (AChE) ส่งผลให้การทำงานของระบบประสาทล้มเหลวจนนำไปสู่การเป็นอัมพาตและการตายในที่สุด (Morrissey et al., 2015; Topal et al., 2017) โดยงานวิจัยของ Moncaleano-Niño, Luna-Acosta, Gómez-Cubillos, Villamil, and

Ahrens (2018) และ Qi et al. (2018) ได้รายงานไว้ว่า imidacloprid มีผลต่อกิจกรรมของเอนไซม์ AChE ในหอย (*Saccostrea* sp.) และไร่น้ำ (*Daphnia magna*) รวมถึงส่งผลต่อการเปลี่ยนแปลงพยาธิสภาพเนื้อเยื่อในปลาคาร์ป (*Cyprinus carpio*) และไส้เดือนดิน (*Eisenia fetida*) (Özdemir, Altun, & Arslan, 2018; Y. Wang et al., 2018) ทั้งนี้ยังมีรายงานการดื้อต่อ imidacloprid ของแมลงในประเทศไทยและกลุ่มประเทศเอเชียจึงเป็นผลให้เกษตรกรเพิ่มปริมาณและความถี่ในการใช้ imidacloprid จนส่งผลให้มีการตกค้างในระบบนิเวศแหล่งน้ำมากยิ่งขึ้น (Matsumura et al., 2008; Tang, Qiu, Cuthbertson, & Ren, 2015) นอกจากนี้ยังมีรายงานการตรวจพบการปนเปื้อนของยากำจัดวัชพืชในระบบนิเวศแหล่งน้ำโดยเฉพาะอย่างยิ่ง glyphosate (Environmental Research and Training Center, 2017; Nowell et al., 2018) ซึ่งเป็นยากำจัดวัชพืชที่นิยมใช้เพื่อควบคุมวัชพืชในระบบนิเวศแหล่งน้ำ (Bridi, Altenhofen, Gonzalez, Reolon, & Bonan, 2017; Hattaya, Nuttaya, & Ptumporn, 2015; Matozzo et al., 2018) โดย glyphosate มีผลยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ 5-enolpyruvylshikimate-3-phosphate synthase ซึ่งเป็นเอนไซม์สำคัญในกระบวนการสังเคราะห์กรดอะมิโนของพืช (Gomes et al., 2017; Matozzo et al., 2018) อย่างไรก็ตาม งานวิจัยก่อนหน้านี้ได้ระบุว่า glyphosate มีผลต่อกิจกรรมของเอนไซม์ catalase (CAT) ในไร่น้ำ (*D. magna*) และในหอยทากน้ำจืด (*Pomacea canaliculata*) (Hansen & Roslev, 2016; Xu, Li, Li, Qin, & Li, 2017) นอกจากนี้ยังพบว่า glyphosate ยังมีผลต่อการทำงานของเอนไซม์ AChE จนส่งผลให้เกิดความผิดปกติในการส่งสัญญาณประสาทได้ (Matozzo et al., 2018; Sobjak et al., 2017) จากข้อมูลข้างต้นแสดงให้เห็นว่า imidacloprid และ glyphosate เป็นสารกำจัดศัตรูพืชที่มีการปนเปื้อนและมีผลกระทบต่อการดำรงชีวิตของสิ่งมีชีวิตในระบบนิเวศแหล่งน้ำ

สิ่งมีชีวิตไม่มีกระดูกสันหลังที่มีการแพร่กระจายอยู่ทั่วไปในระบบนิเวศแหล่งน้ำและนิยมใช้ในการทดสอบความเป็นพิษ คือ ไส้เดือนน้ำ (*Tubifex tubifex*, Müller, 1774) (Bettinetti, Giarei, & Provini, 2003; Lagauzère, Terrail, & Bonzom, 2009; Paris-Palacios et al., 2010; Pasteris, Vecchi, Reynoldson, & Bonomi, 2003) ในประเทศไทยมีรายงานการพบไส้เดือนน้ำกระจายอยู่ทั่วไปในระบบนิเวศแหล่งน้ำจืดและนาข้าว (Naritsara, Sitthi, & Jirawet, 2013; Sakset, Gallardo, & Ikejima, 2012) โดยไส้เดือนน้ำมีหน้าที่เชิงระบบนิเวศที่สำคัญ คือ เป็นผู้ย่อยสลายอินทรีย์สารหมุนเวียนตะกอนดิน และเป็นแหล่งอาหารสำคัญของสิ่งมีชีวิตอื่นในระบบนิเวศแหล่งน้ำจืด (Paris-Palacios et al., 2010) งานวิจัยก่อนหน้านี้ได้ระบุว่า เมื่อไส้เดือนน้ำได้รับสารพิษจะส่งผลให้เกิดการเปลี่ยนแปลงกิจกรรมของเอนไซม์ AChE และ CAT (Di, Liu, Cheng, et al., 2017) นอกจากนี้ยังพบว่า ไส้เดือนน้ำสามารถปรับตัวเพื่ออยู่รอดจากการปนเปื้อนของสารพิษในระบบ

นิเวศแหล่งน้ำ และหากได้เดือนน้ำซึ่งทนทานต่อสารพิษได้รับผลกระทบหรือลดจำนวนลง จึงอาจเป็นไปได้ว่าสิ่งมีชีวิตชนิดอื่นที่อ่อนแอกว่าหรือบริโภคได้เดือนน้ำเป็นอาหารอาจได้รับผลกระทบจากการปนเปื้อนของสารพิษไปด้วย (Lucan-Bouché, Biagianti-Risbourg, Arsac, & Vernet, 1999) ดังนั้น งานวิจัยนี้จึงมุ่งเน้นไปยังการประเมินความเป็นพิษเฉียบพลันเชิงเดี่ยวและความเป็นพิษร่วมของ imidacloprid และ glyphosate ต่อการเปลี่ยนแปลงทางพยาธิสภาพเนื้อเยื่อ การเปลี่ยนแปลงกิจกรรมของเอนไซม์ AChE และกิจกรรมของเอนไซม์ CAT เพื่อนำผลที่ได้ไปใช้วางแผนทางในการป้องกันผลกระทบของ imidacloprid และ glyphosate ต่อระบบนิเวศแหล่งน้ำ

ความมุ่งหมายของการวิจัย

1. เพื่อเปรียบเทียบผลความเป็นพิษเฉียบพลันเชิงเดี่ยวและความเป็นพิษเฉียบพลันร่วมของ imidacloprid และ glyphosate ต่อไส้เดือนน้ำ
2. เพื่อประเมินผลความเป็นพิษเฉียบพลันเชิงเดี่ยวและความเป็นพิษเฉียบพลันร่วมของ imidacloprid และ glyphosate ต่อการเปลี่ยนแปลงพยาธิสภาพเนื้อเยื่อของไส้เดือนน้ำ
3. เพื่อประเมินผลความเป็นพิษเฉียบพลันเชิงเดี่ยวและความเป็นพิษเฉียบพลันร่วมของ imidacloprid และ glyphosate ต่อการเปลี่ยนแปลงกิจกรรมของเอนไซม์ acetylcholinesterase ในไส้เดือนน้ำ
4. เพื่อประเมินผลความเป็นพิษเฉียบพลันเชิงเดี่ยวและความเป็นพิษเฉียบพลันร่วมของ imidacloprid และ glyphosate ต่อการเปลี่ยนแปลงกิจกรรมของเอนไซม์ catalase ในไส้เดือนน้ำ

ความสำคัญของการวิจัย

แผนยุทธศาสตร์การจัดการสารเคมีแห่งชาติระบุว่า ปัญหาการใช้สารเคมีกำจัดศัตรูพืชเป็นปัญหาหลักที่ส่งผลกระทบต่อสุขภาพของเกษตรกรและสิ่งแวดล้อมในประเทศไทย (National Committee on Strategy Development for Chemical Management, 2011) ดังนั้น ผลการวิจัยนี้จึงสามารถนำไปใช้เป็นข้อมูลประกอบการวางแผนทางในการใช้สารเคมีและป้องกันผลกระทบจากการปนเปื้อนของ imidacloprid และ glyphosate ในระบบนิเวศแหล่งน้ำ จนนำไปสู่การสร้างมาตรฐานในการควบคุมการใช้สารเคมีให้สอดคล้องกับแผนยุทธศาสตร์การจัดการสารเคมีแห่งชาติและแผนการจัดการสิ่งแวดล้อมของประเทศไทย

ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

1. ทราบระดับความเข้มข้นของ imidacloprid และ glyphosate ที่ก่อให้เกิดความเป็นพิษเฉียบพลันเชิงเดี่ยวและพิษเฉียบพลันร่วมในไส้เดือนน้ำ
2. ทราบอันตรกิริยาของ imidacloprid และ glyphosate ที่ก่อให้เกิดพิษเฉียบพลันร่วมในไส้เดือนน้ำ เพื่อเชื่อมโยงเข้ากับสภาพการปนเปื้อนจริงในระบบนิเวศแหล่งน้ำ
3. ทราบลักษณะการเปลี่ยนแปลงทางพยาธิสภาพเนื้อเยื่อ กิจกรรมของเอนไซม์ acetylcholinesterase และกิจกรรมของเอนไซม์ catalase ในไส้เดือนน้ำ เพื่อใช้เป็นตัวบ่งชี้ทางชีวภาพเมื่อไส้เดือนน้ำได้รับความเป็นพิษจาก imidacloprid และ glyphosate

ขอบเขตการวิจัย

ศึกษาความเป็นพิษเฉียบพลันเชิงเดี่ยวและความเป็นพิษเฉียบพลันร่วมของ imidacloprid (analytical standard, Sigma-Aldrich) และ glyphosate (analytical standard, Sigma-Aldrich) ต่อไส้เดือนน้ำ (*T. tubifex*) ด้วยวิธีชีววิเคราะห์ (biological assay) ในระดับห้องปฏิบัติการ เพื่อประเมินระดับความเข้มข้นของ imidacloprid และ glyphosate ที่มีผลทำให้ไส้เดือนน้ำตายลงร้อยละ 50 ของจำนวนไส้เดือนน้ำทั้งหมดในชุดการทดลองนั้น ๆ ที่เวลา 24 ชั่วโมง (24 hr-LC₅₀) และ 48 ชั่วโมง (48 hr-LC₅₀) โดยมีการตรวจสอบคุณภาพน้ำเมื่อเริ่มต้นและหลังการทดลอง และประเมินผลจากความเป็นพิษเฉียบพลันเชิงเดี่ยวและความเป็นพิษร่วมของ imidacloprid และ glyphosate ในระดับต่ำกว่าค่า LC₅₀ ที่เวลา 24 และ 48 ชั่วโมง ต่อการเปลี่ยนแปลงทางพยาธิสภาพเนื้อเยื่อ กิจกรรมของเอนไซม์ acetylcholinesterase และกิจกรรมของเอนไซม์ catalase ในไส้เดือนน้ำ

สมมติฐานการวิจัย

1. ความเป็นพิษเฉียบพลันร่วมของ imidacloprid กับ glyphosate ก่อให้เกิดความเป็นพิษต่อไส้เดือนน้ำมากกว่าความเป็นพิษเฉียบพลันเชิงเดี่ยวของ imidacloprid และ glyphosate
2. ระดับความเข้มข้นของ imidacloprid glyphosate และสารผสม imidacloprid กับ glyphosate ที่มากขึ้น ก่อให้เกิดการเปลี่ยนแปลงทางพยาธิสภาพเนื้อเยื่อของไส้เดือนน้ำมากขึ้น
3. ระดับความเข้มข้นของ imidacloprid glyphosate และสารผสม imidacloprid กับ glyphosate ที่แตกต่างกัน ก่อให้เกิดการเปลี่ยนแปลงกิจกรรมของเอนไซม์ acetylcholinesterase ในไส้เดือนน้ำแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับ $p < 0.05$

4. ระดับความเข้มข้นของ imidacloprid glyphosate และสารผสม imidacloprid กับ glyphosate ที่แตกต่างกัน ก่อให้เกิดการเปลี่ยนแปลงกิจกรรมของเอนไซม์ catalase ในไส้เดือนน้ำแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับ $p < 0.05$

ระยะเวลาในการดำเนินงานวิจัย

ระยะเวลาที่ใช้ในการทำวิจัยเริ่มตั้งแต่เดือนมกราคม 2561 - เมษายน 2562

สถานที่ทำการวิจัย

ห้อง 1118 ชั้น 11 อาคารศูนย์เครื่องมือวิทยาศาสตร์ (อาคาร 19) คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ



บทที่ 2

เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

ในการวิจัยครั้งนี้ผู้วิจัยได้ศึกษาเอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง และได้นำเสนอตามหัวข้อต่อไปนี้

1. หลักการพิษวิทยา
2. สารกำจัดศัตรูพืช
3. Imidacloprid
4. Glyphosate
5. ไล่เดื่อนน้ำ
6. เทคนิคการเตรียมสไลด์ถาวรเนื้อเยื่อสัตว์
7. การตรวจวัดกิจกรรมของเอนไซม์ acetylcholinesterase
8. การตรวจวัดกิจกรรมของเอนไซม์ catalase

หลักการพิษวิทยา

การพัฒนาของภาคการเกษตรอุตสาหกรรมอย่างรวดเร็วในปัจจุบันนำไปสู่การศึกษาทางด้านพิษวิทยาที่เพิ่มมากขึ้น เนื่องจากการนำเอาสารเคมีเข้ามาใช้ในกิจกรรมต่าง ๆ ไม่ว่าจะเป็นการใช้ยาฆ่าแมลงเพื่อควบคุมแมลงศัตรูพืช การใช้ยาปราบวัชพืชเพื่อควบคุมวัชพืช และการใช้ปุ๋ยเคมีเพื่อเพิ่มปริมาณผลผลิต เป็นต้น ซึ่งการเกิดพิษจากสารเคมีและการตอบสนองของร่างกายของสิ่งมีชีวิตเมื่อได้รับสารเคมีมีหลายรูปแบบ อาจจะไปมีผลต่ออวัยวะใดอวัยวะหนึ่งหรือระบบใดระบบหนึ่ง ยิ่งไปกว่านั้นอาจทำให้เกิดผลข้างเคียงกับอวัยวะอื่นหรือระบบอื่นได้เช่นกัน ดังนั้นสารเคมีที่ทำให้เกิดพิษเหล่านี้จะต้องมีการใช้อย่างระมัดระวังเพื่อให้เกิดอันตรายน้อยที่สุด อย่างไรก็ตาม ปัญหาทางด้านพิษวิทยาไม่ได้เกิดขึ้นเฉพาะในคนเท่านั้น แต่ยังทำให้เกิดผลกระทบต่อสัตว์ที่อาศัยอยู่ในระบบนิเวศอีกด้วย สภาวะดังกล่าวจะทำให้เกิดการขาดสมดุลในสิ่งแวดล้อม จนนำไปสู่การสูญเสียความหลากหลายทางชีวภาพได้

การเกิดพิษในร่างกายของสิ่งมีชีวิต

1. การเกิดพิษเฉียบพลัน (acute toxicity) หมายถึง การได้รับสารพิษเข้าสู่ร่างกายในปริมาณมากเพียงครั้งเดียวเป็นเวลานาน ๆ ในช่วงชีวิตของสิ่งมีชีวิต เช่น การเกิดพิษเฉียบพลันของ imidacloprid, guadipyr และ cycloxyaprid ที่ชักนำให้เกิดภาวะ oxidative stress ใน *Daphnia magna* เป็นระยะเวลา 48 ชั่วโมง (Qi et al., 2018)

2. การเกิดพิษกึ่งเฉียบพลัน (subacute toxicity) หมายถึง การได้รับสารพิษเข้าสู่ร่างกายติดต่อกันเป็นระยะเวลาน้อยกว่า 1 เดือน เช่น การเกิดพิษกึ่งเฉียบพลันของ radioactive tracer ¹²³I-CMICE-013 ใน Sprague Dawley และ Gottingen minipigs เป็นระยะเวลา 14 วัน (Duan et al., 2016)

3. การเกิดพิษกึ่งเรื้อรัง (subchronic toxicity) หมายถึง การได้รับสารพิษเข้าสู่ร่างกายติดต่อกันเป็นระยะเวลานานประมาณ 1 ถึง 3 เดือน หรือได้รับสารพิษเข้าไปน้อยกว่าร้อยละ 10 ของช่วงชีวิต (life span) เช่น การเกิดพิษต่อระบบภูมิคุ้มกันของหนูขาว (albino mice) เมื่อได้รับ acetamiprid เป็นระยะเวลา 61 วัน (Marzouki et al., 2017)

4. การเกิดพิษเรื้อรัง (chronic toxicity) หมายถึง การได้รับสารพิษในปริมาณน้อยติดต่อกันเป็นระยะเวลายาวนานกว่า 3 เดือน หรือได้รับสารพิษเข้าไปนานมากกว่าร้อยละ 10 ของช่วงชีวิต เช่น การเกิดพิษเรื้อรังจากการได้รับ thiamethoxam ของ *Chironomus riparius* เป็นระยะเวลา 28 วัน ซึ่งมากกว่าร้อยละ 10 ของช่วงชีวิตสัตว์ทดลอง (Saraiva et al., 2017)

ดังนั้น การเกิดพิษในสิ่งมีชีวิตขึ้นอยู่กับปัจจัยสำคัญ 2 ประการคือ ปริมาณของสารพิษที่สิ่งมีชีวิตได้รับและระยะเวลาที่สิ่งมีชีวิตได้รับสารพิษ

ปัจจัยที่มีผลต่อการเกิดพิษ

1. ปัจจัยจากคุณสมบัติของสารเคมี เช่น ขนาดอนุภาค สถานะสาร ความเป็นกรดด่าง ความสามารถในการละลายในน้ำ และความสามารถในการละลายในไขมัน เป็นต้น คุณสมบัติเหล่านี้มีผลต่อการเกิดพิษ ถ้าสารใดมีความสามารถในการละลายในไขมันสูง ทำให้สารนั้นสามารถเคลื่อนที่ผ่านเยื่อหุ้มเซลล์ได้อย่างรวดเร็ว หรือถ้าสารใดสามารถละลายน้ำได้ดี สารชนิดนั้นอาจมีโอกาสนปนเปื้อนในแหล่งน้ำได้ง่าย ก่อให้เกิดผลกระทบต่อสิ่งมีชีวิตที่อาศัยในแหล่งน้ำได้

2. ปัจจัยที่เกี่ยวข้องกับการรับสารเคมีเข้าสู่ร่างกาย ซึ่งหมายรวมถึงวิธีการได้รับสารเคมีเข้าสู่ร่างกาย ปริมาณของสารเคมีที่ได้รับ ความถี่และระยะเวลาที่ได้รับสารเคมี โดยสิ่งเหล่านี้เป็นตัวกำหนดความรุนแรงของการเกิดพิษ เช่น งานวิจัยของ Xia et al. (2016) ศึกษาความเป็นพิษของ imidacloprid ต่อ *Misgurnus anguillicaudatus* พบว่า เมื่อความเข้มข้นของ imidacloprid เพิ่มขึ้น ทำให้เกิดอัตราความผิดปกติของนิวเคลียสเซลล์เม็ดเลือดแดงเพิ่มมากขึ้น นอกจากนี้ยังพบว่า imidacloprid ชักนำให้เกิดความเป็นพิษมากขึ้น เมื่อ *M. anguillicaudatus* ได้รับสารเป็นเวลานานขึ้น

3. ปัจจัยที่เกี่ยวข้องกับผู้รับสารเคมี ได้แก่ ชนิดของสิ่งมีชีวิต (species) ซึ่งมีกระบวนการเปลี่ยนแปลงสารพิษ ขนาดตัว น้ำหนัก สันฐานวิทยา ที่แตกต่างกัน นอกจากนี้ยังต้องคำนึงถึงอายุ เพศ ภาวะทางสรีรวิทยาและพันธุกรรม เช่น งานวิจัยของ Lobo, Méndez-Fernández, Martínez-Madrid, Daam, and Espíndola (2016) ที่พบว่า ไข่เดือนน้ำชนิด *Branchiura sowerbyi* มีความทนทานต่อการปนเปื้อนสารหนูและสังกะสีต่ำกว่าไข่เดือนน้ำชนิด *Tubifex tubifex* และงานวิจัยของ Johansen and McFadden (2017) พบว่า การได้รับ methamphetamine ส่งผลให้สารเคมีในระบบประสาทเปลี่ยนแปลงแตกต่างกันในหนูเพศผู้และเพศเมีย นอกจากนี้หากสิ่งมีชีวิตได้รับสารอาหารที่ไม่เพียงพออาจส่งผลถึงกระบวนการเกิด oxidative stress มากขึ้น เนื่องจากการสร้าง antioxidant ลดลง เช่น glutathione s-transferase glutathione reductase หรือ catalase เป็นต้น

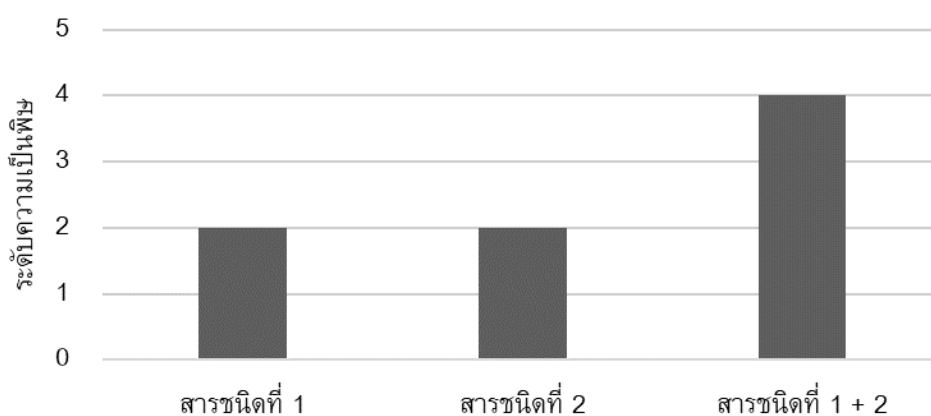
4. ปัจจัยที่เกี่ยวข้องกับสิ่งแวดล้อม เช่น อุณหภูมิ ความชื้น แสง และปริมาณแก๊สออกซิเจน เป็นต้น เช่น การศึกษาพิษของ diclofenac, ibuprofen และ carbamazepine ในกุ้งน้ำจืด (*Atyaephyra desmarestii*) ของ Nieto, Hampel, González-Ortegón, Drake, and Blasco (2016) พบว่า เมื่ออุณหภูมิเพิ่มขึ้นมีผลทำให้เกิดความเป็นพิษมากขึ้น เนื่องจากอุณหภูมิเกี่ยวข้องกับกระบวนการเมตาบอลิซึมและปริมาณของออกซิเจนที่ละลายในน้ำ ส่วนงานวิจัยของ Baxter et al. (2016) พบว่า ความเข้มแสง อุณหภูมิ และปริมาณสารอาหารที่ลดลงมีผลทำให้ความเป็นพิษของ atrazine ใน *Raphidocelis subcapitata* เพิ่มมากขึ้น

ดังนั้น การศึกษาความเป็นพิษของสารเคมีหรือการนำผลการวิจัยมาอธิบายการเกิดพิษในสิ่งมีชีวิตจะต้องคำนึงถึงปัจจัยที่มีผลต่อการเกิดพิษด้วย ไม่ว่าจะเป็นคุณสมบัติของสารเคมี การรับสารเคมีเข้าสู่ร่างกาย ผู้รับสารเคมี และสิ่งแวดล้อม

อันตรกิริยาของสารพิษ

การได้รับสารพิษพร้อมกันมากกว่าหนึ่งชนิดทำให้สิ่งมีชีวิตแสดงอาการเกิดพิษที่แตกต่างกัน สารบางชนิดเมื่อให้พร้อมกันอาจไปเพิ่มหรือลดฤทธิ์ของสารอีกชนิดหนึ่ง ซึ่งปฏิกิริยาระหว่างสารแต่ละชนิดแบ่งออกได้ดังนี้

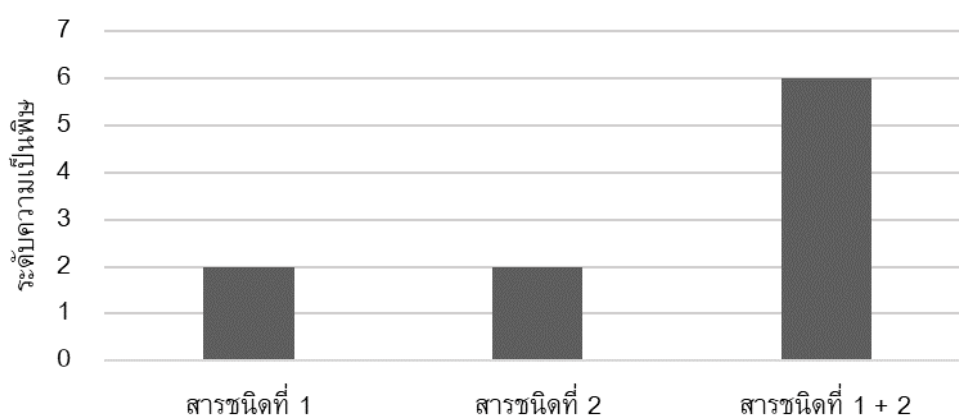
1. การเพิ่มฤทธิ์ (Additives) หมายถึง การได้รับสารพิษมากกว่าหนึ่งชนิดร่วมกันแล้วทำให้เกิดการตอบสนองต่อสารพิษในทิศทางเดียวกัน โดยผลของการเกิดพิษ คือ ผลรวมของการออกฤทธิ์ของสารพิษแต่ละชนิด กล่าวคือ ความเป็นพิษของสารผสมชนิดที่ 1 กับ 2 จะเท่ากับความเป็นพิษของสารชนิดที่ 1 รวมกับความเป็นพิษของสารชนิดที่ 2 เช่น สารในกลุ่ม organophosphate สองชนิดเมื่อรวมกันพบว่า การเกิดพิษเป็นผลรวมจากการที่สารไปยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ acetylcholinesterase



ภาพประกอบ 1 การเกิดพิษแบบเพิ่มฤทธิ์ของสารผสม

ที่มา: Uwizeyimana, H., Wang, M., Chen, W., & Khan, K. (2017). The eco-toxic effects of pesticide and heavy metal mixtures towards earthworms in soil. *Environmental toxicology and pharmacology*, 55, 20-29.

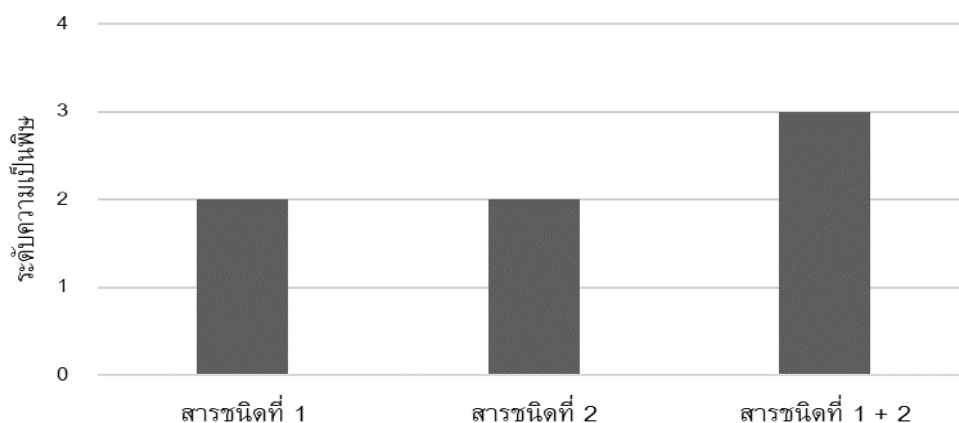
2. การเสริมฤทธิ์ (Synergism) หมายถึง การได้รับสารพิษมากกว่าหนึ่งชนิดร่วมกัน แล้วทำให้เกิดการตอบสนองต่อสารพิษในทิศทางเดียวกัน ผลของการเกิดพิษเกิดจากสารพิษตัวหนึ่งไปทำให้สารพิษอีกตัวหนึ่งมีฤทธิ์เพิ่มมากขึ้น กล่าวคือ ความเป็นพิษของสารผสมชนิดที่ 1 กับ 2 มากกว่าความเป็นพิษของสารชนิดที่ 1 รวมกับความเป็นพิษของสารชนิดที่ 2 เช่น คาร์บอนเตตระคลอไรด์และเอทานอล สารทั้งสองมีพิษต่อดับ เมื่อได้รับร่วมกันทำให้เกิดพิษต่อดับรุนแรงมากขึ้นกว่าให้สารตัวใดตัวหนึ่ง



ภาพประกอบ 2 การเกิดพิษแบบเสริมฤทธิ์ของสารผสม

ที่มา: Uwizeyimana, H., Wang, M., Chen, W., & Khan, K. (2017). The eco-toxic effects of pesticide and heavy metal mixtures towards earthworms in soil. *Environmental toxicology and pharmacology*, 55, 20-29.

3. การยับยั้งฤทธิ์ (Antagonism) หมายถึง การได้รับสารพิษหลายชนิดร่วมกันแล้วทำให้เกิด การตอบสนองต่อสารพิษในทิศทางตรงกันข้ามกันหรือยับยั้งการออกฤทธิ์ของสารอีกชนิดหนึ่ง กล่าวคือ ความเป็นพิษของสารผสมชนิดที่ 1 กับ 2 น้อยกว่าความเป็นพิษของสารชนิดที่ 1 รวมกับความเป็นพิษของสารชนิดที่ 2 เช่น การใช้ยา atropine เป็นยาต้านพิษของสารกำจัดแมลงกลุ่ม carbamate



ภาพประกอบ 3 การเกิดพิษแบบยับยั้งของสารผสม

ที่มา: Uwizeyimana, H., Wang, M., Chen, W., & Khan, K. (2017). The eco-toxic effects of pesticide and heavy metal mixtures towards earthworms in soil. *Environmental toxicology and pharmacology*, 55, 20-29.

งานวิจัยก่อนหน้านี้ที่ทำการศึกษาการเกิดอันตรกิริยาของสารพิษที่ใช้ในภาคเกษตร อุตสาหกรรมพบว่า การได้รับสารพิษ 2 ชนิดพร้อมกัน ทำให้สิ่งมีชีวิตมีการตอบสนองที่แตกต่างกัน ดังแสดงไว้ในตาราง 1

ตาราง 1 งานวิจัยที่เกี่ยวข้องกับการศึกษาการเกิดอันตรกิริยาของสารผสม

อันตรกิริยา	สิ่งมีชีวิต	ตัวบ่งชี้	สารผสม		อ้างอิง
			ชนิดที่ 1	ชนิดที่ 2	
การเพิ่มฤทธิ์	<i>Lumbricus rubellus</i>	การตาย	Niggle	Chlorpyrifos	Lister, Svendsen, Wright, Hooper, and Spurgeon (2011)
	<i>Eisenia fetida</i>		Imidacloprid	Phoxim	Cang et al. (2017)
			Imidacloprid	Chlorpyrifos	

ตาราง 1 (ต่อ)

อันตรกิริยา	สิ่งมีชีวิต	ตัวบ่งชี้	สารผสม		อ้างอิง
			ชนิดที่ 1	ชนิดที่ 2	
การเสริมฤทธิ์	<i>Eisenia fetida</i>	DNA damage	Cadmium	Atrazine	Yang et al. (2015)
		การตาย	Clothianidin	Chlorpyrifos	Yang et al. (2017)
			Clothianidin	Acetochlor	
	<i>Danio rerio</i>		Clothianidin	Fenobucarb	
			Acetamiprid	Iprodione	Y. Wang et al. (2018)
การยับยั้ง	<i>Eisenia fetida</i>	Enzyme activity	Copper	Glyphosate	Zhou et al. (2013)
		การตาย	Acetochlor	Chlorpyrifos	Yang et al. (2017)

ในธรรมชาติสิ่งมีชีวิตมักได้รับสารพิษเข้าสู่ร่างกายมากกว่าหนึ่งชนิดหรืออาจได้รับสารพิษชนิดหนึ่งเข้าไปก่อนแล้วได้รับสารพิษอีกชนิดหนึ่งตามเข้าไป ดังนั้น การศึกษาอันตรกิริยาของสารพิษจึงมีความสำคัญ เพื่อประเมินความเป็นพิษของสารที่ได้รับหลายชนิดพร้อมกัน ซึ่งอาจทำให้เกิดการตอบสนองในสิ่งมีชีวิตที่แตกต่างกันดังที่กล่าวไว้ข้างต้น

การประเมินความเป็นพิษ

การทดสอบความเป็นพิษของสารพิษที่จะนำไปใช้กับมนุษย์หรือนำไปใช้ในด้านอุตสาหกรรมต่าง ๆ จำเป็นต้องประเมินความเป็นพิษของสารชนิดนั้นก่อนเพื่อให้เกิดความปลอดภัยแก่ผู้บริโภคและสิ่งแวดล้อม องค์ความรู้ที่ได้จากการทดสอบความเป็นพิษมักได้มาจากการทดลองกับสัตว์ทดลองหลายชนิด ซึ่งมีการตอบสนองต่อพิษที่แตกต่างกัน บางชนิดมีการตอบสนองใกล้เคียงกับคน บางชนิดมีการตอบสนองที่แตกต่างจากคน การประเมินความเป็นพิษจำเป็นต้องประเมินให้ครอบคลุมกับสิ่งมีชีวิตทุกกลุ่ม เพื่อให้ได้องค์ความรู้ในการควบคุมการใช้สารพิษอย่างปลอดภัยทั้งทางด้านสิ่งแวดล้อมและสุขภาพของมนุษย์

1. การประเมินความเป็นพิษเฉียบพลัน

กำหนดหลักการประเมินโดยคณะกรรมการขององค์การด้านความร่วมมือทางเศรษฐกิจและพัฒนา (Organization for Economic Cooperation and Development, OECD) ซึ่งเป็นการประเมินความเป็นพิษของสารพิษที่เข้าสู่ร่างกายในปริมาณมากเพียงครั้งเดียว เป็นช่วงเวลาสั้น ๆ ในช่วงชีวิตของสิ่งมีชีวิต มีวัตถุประสงค์ของการประเมินเพื่อให้ทราบว่า สัตว์ทดลองชนิดใดที่ตอบสนองต่อการเกิดพิษได้อย่างรวดเร็วและมีความทนทานต่อสารพิษสูง (susceptible and resistant species) สัตว์ทดลองมีการตอบสนองทางชีวภาพต่อสารพิษอย่างไร รวมถึงสามารถนำข้อมูลไปใช้พิจารณาถึงอันตรายเมื่อสิ่งมีชีวิตได้รับสารพิษ และใช้เป็นข้อมูลพื้นฐานในการวางแผนเลือกใช้ปริมาณสารพิษต่อไป

2. ดัชนีสำหรับการประเมินความเป็นพิษเฉียบพลัน

สามารถแบ่งเป็น 2 ลักษณะ คือ การตายของสัตว์ทดลองจำนวนครึ่งหนึ่ง (median lethal concentration หรือ lethal concentration 50%, LC_{50}) และอาการพิษเฉียบพลันที่ไม่ทำให้เกิดการตายแต่ทำให้สัตว์ทดลองแสดงอาการผิดปกติจำนวนครึ่งหนึ่ง (median effective concentration หรือ effective concentration 50%, EC_{50}) ทั้งนี้หาก LC_{50} และ EC_{50} มีค่าตัวเลขสูงก็แสดงว่าสารชนิดนั้นมีอันตรายน้อย เนื่องจากต้องได้รับสารในปริมาณมากจึงทำให้สัตว์ทดลองตายลงไปครึ่งหนึ่งหรือแสดงอาการผิดปกติครึ่งหนึ่งในกลุ่มสัตว์ที่ทำการทดลอง ในขณะที่ค่าตัวเลขต่ำแสดงความเป็นพิษที่รุนแรงสูง เนื่องจากได้รับสารเพียงเล็กน้อยก็ทำให้สัตว์ทดลองตายครึ่งหนึ่งหรือแสดงอาการผิดปกติครึ่งหนึ่งในกลุ่มสัตว์ที่ทำการทดลอง

การพิจารณาค่า LC_{50} ของสารพิษแต่ละชนิดต้องคำนึงถึงปัจจัยที่นอกเหนือจากค่าตัวเลข เช่น ความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณสารพิษกับการตอบสนองในช่วงระยะเวลาของการตาย เนื่องจาก สารพิษ 2 ชนิดที่มีค่า LC_{50} เท่ากัน แต่สารชนิดหนึ่งทำให้สัตว์ทดลองตายเมื่อมีการเปลี่ยนแปลงปริมาณสารพิษเพียงเล็กน้อยเมื่อเทียบกับสารพิษอีกชนิดหนึ่ง หรือการที่สารพิษมีค่า LC_{50} เท่ากัน แต่อาจทำให้เกิดการตายในช่วงระยะเวลาที่แตกต่างกัน สารพิษที่ทำให้เกิดการตายได้ในช่วงระยะเวลาอันสั้นแสดงถึงความเป็นพิษที่รุนแรงกว่าสารพิษที่ทำให้เกิดการตายในช่วงระยะเวลายาวนาน เช่น งานวิจัยของ Xu et al. (2017) ศึกษาความเป็นพิษของ glyphosate ต่อ *Pomacea canaliculata* พบว่า ค่า LC_{50} ที่ 24 ชั่วโมง อยู่ที่ 178.2 มิลลิกรัมต่อลิตร แต่ค่า LC_{50} ที่ 96 ชั่วโมง อยู่ที่ 175.1 มิลลิกรัมต่อลิตร จากผลการวิจัยจะเห็นว่าช่วงระยะเวลาในการรับสารมีผลต่อความรุนแรงของสารพิษแตกต่างกัน ดังนั้น ค่าตัวเลข LC_{50} เพียงอย่างเดียวไม่สามารถบ่งบอกการเกิดพิษอย่างเฉียบพลันที่สมบูรณ์ได้

การพิจารณาค่า EC_{50} ของสารพิษ ซึ่งเป็นอาการพิษที่ไม่ทำให้สัตว์ทดลองตาย แต่ทำให้สัตว์ทดลองแสดงอาการผิดปกติจำนวนครั้งหนึ่ง เช่นเดียวกับการพิจารณาค่า LC_{50} ที่ต้องคำนึงถึงช่วงเวลาในการทำให้สัตว์ทดลองแสดงอาการผิดปกติด้วย เนื่องจากว่า สารพิษ 2 ชนิดที่มีค่า EC_{50} เท่ากัน แต่สารชนิดหนึ่งทำให้สัตว์ทดลองแสดงอาการผิดปกติเมื่อมีการเปลี่ยนแปลงปริมาณสารพิษเพียงเล็กน้อยเมื่อเทียบกับสารพิษอีกชนิดหนึ่ง หรือการที่สารพิษมีค่า EC_{50} เท่ากัน แต่อาจทำให้แสดงอาการผิดปกติในช่วงระยะเวลาที่แตกต่างกัน สารพิษที่ทำให้เกิดอาการผิดปกติได้ในช่วงระยะเวลาอันสั้นแสดงถึงความเป็นพิษที่รุนแรงกว่าสารพิษที่ทำให้เกิดอาการผิดปกติในช่วงระยะเวลายาวนาน เช่น งานวิจัยของ Hansen and Roslev (2016) ศึกษาความเป็นพิษของ glyphosate ต่อการเปลี่ยนแปลงพฤติกรรมและการเคลื่อนที่ของ *D. magna* พบว่า ค่า EC_{50} ที่ 24 ชั่วโมงอยู่ที่ 81.9 ไมโครกรัมต่อลิตร แต่เมื่อศึกษาค่า EC_{50} ที่ 24 ชั่วโมงอยู่ที่ 52.8 ไมโครกรัมต่อลิตร จากผลการวิจัยจะเห็นได้ว่าช่วงระยะเวลาในการรับสารมีผลต่อความรุนแรงของการเกิดพิษในสิ่งมีชีวิต โดยอาการผิดปกติที่นำมาใช้ในการประเมินมีตั้งแต่การเปลี่ยนแปลงในระดับชีวโมเลกุลจนถึงการเปลี่ยนแปลงในระดับพฤติกรรมของสิ่งมีชีวิตดังแสดงไว้ในตาราง 2

ตาราง 2 ตัวอย่างตัวบ่งชี้ทางชีวภาพที่นิยมใช้ในการประเมินค่า EC_{50} ในสัตว์ทดลอง

สารเคมี	สิ่งมีชีวิต	ตัวบ่งชี้ทางชีวภาพ	อ้างอิง
Copper + Glyphosate	<i>Eisenia fetida</i>	Enzyme activity	Zhou et al. (2013)
Cadmium + Atrazine	<i>Eisenia fetida</i>	DNA damage	Yang et al. (2015)
Cycloxadiprid	<i>Bemisia tabaci</i>	Egg hatching rate	R. Wang et al. (2016)
Glyphosate	<i>Danio rerio</i>	Immunohistochemistry	Roy, Ochs, Zambrzycka, and Anderson (2016)
Imidacloprid	<i>Rattus norvegicus</i>	Stress hormones	Khalil, Awad, Mohammed, and Nassan (2017)
Pirimicarb	<i>Boana pulchella</i>	Behavioural changes	Natale et al. (2018)

3. การคำนวณค่าความเป็นพิษของสาร

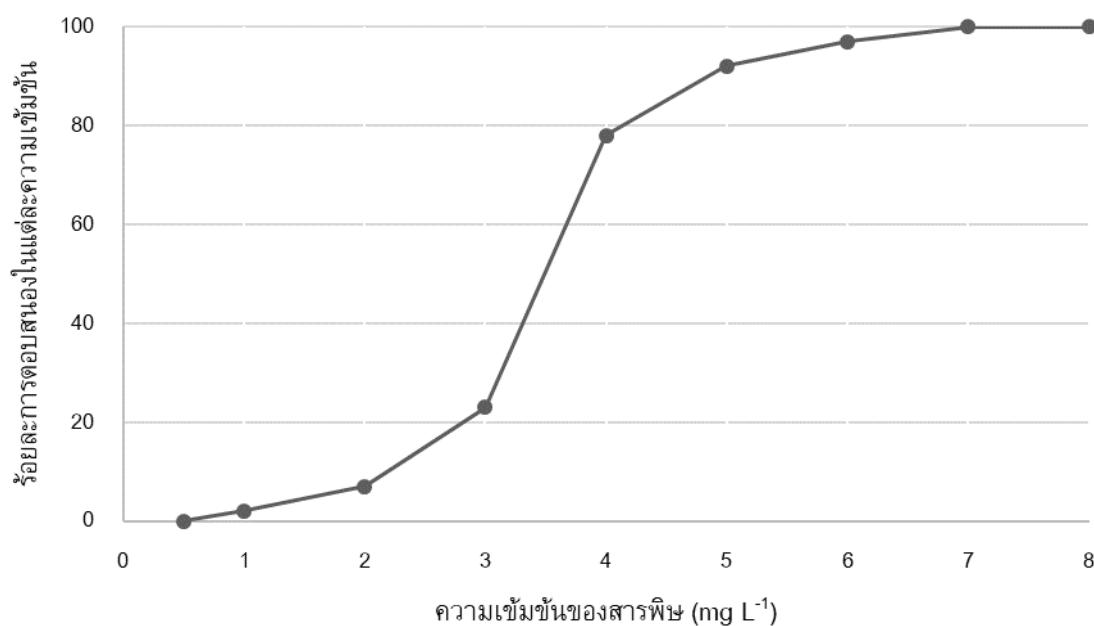
สามารถคำนวณจากความสัมพันธ์ของความเข้มข้นสารพิษหรือปริมาณสารพิษต่อการตอบสนองของสัตว์ทดลอง (dose-response relationship) โดยให้สัตว์ทดลองได้รับสารพิษ จากนั้นสังเกตการตอบสนองของสัตว์ทดลองต่อสารพิษที่ได้รับซึ่งจำนวนของสัตว์ทดลองที่แสดงอาการตอบสนองต่อสารพิษนั้นจะแตกต่างกันที่ระดับความเข้มข้นต่าง ๆ ของสารพิษ สัตว์ทดลองที่ไวต่อการตอบสนองจะแสดงอาการก่อนเมื่อได้รับสารพิษที่ระดับความเข้มข้นต่ำ และแสดงอาการตอบสนองมากขึ้นเมื่อได้รับสารพิษในระดับความเข้มข้นสูง ดังแสดงในตาราง 3

ตาราง 3 ความเข้มข้นสารพิษและร้อยละการตอบสนองของสัตว์ทดลอง

	ความเข้มข้นของสารพิษ (mg L ⁻¹)								
	0.5	1.0	2.0	3.0	4.0	5.0	6.0	7.0	8.0
ร้อยละการตอบสนอง	0.0	2.0	7.0	23.0	78.0	92.0	97.0	100.0	100.0
ร้อยละการตอบสนองที่เพิ่มขึ้นในแต่ละความเข้มข้น	0.0	2.0	5.0	15.0	55.0	15.0	5.0	3.0	0.0

ที่มา: Landis, W., Sofield, R., Yu, M.-H., & Landis, W. G. (2003). *Introduction to environmental toxicology: impacts of chemicals upon ecological systems*: Crc Press.

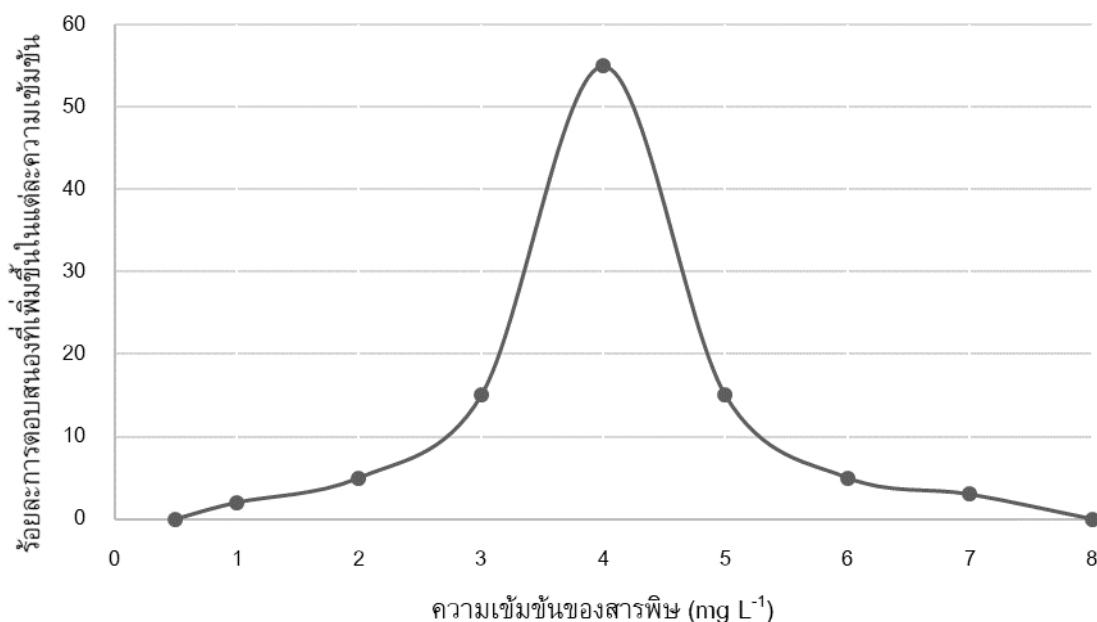
จากตาราง 3 สามารถนำมาเขียนกราฟแสดงความสัมพันธ์ของความเข้มข้นสารพิษต่อร้อยละการตอบสนองของสัตว์ทดลองได้ดังนี้



ภาพประกอบ 4 ความสัมพันธ์ของความเข้มข้นสารพิษกับร้อยละการตอบสนองของสัตว์ทดลอง

ที่มา: Landis, W., Sofield, R., Yu, M.-H., & Landis, W. G. (2003). *Introduction to environmental toxicology: impacts of chemicals upon ecological systems*: Crc Press.

นอกจากนี้ ยังสามารถนำข้อมูลในตาราง 3 มาเขียนกราฟความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของสารพิษที่สัตว์ทดลองได้รับกับร้อยละการตอบสนองของสัตว์ทดลองที่เพิ่มขึ้นในแต่ละความเข้มข้น ทำให้ได้กราฟรูประฆังคว่ำหรือกราฟการแจกแจงแบบปกติ (normal distribution graph) ดังแสดงในภาพประกอบ 5 และเมื่อพิจารณากราฟการแจกแจงแบบปกติพบว่า ครึ่งหนึ่งของสัตว์ทดลองที่อยู่ด้านซ้ายของกราฟเป็นพวกที่ไวต่อการตอบสนองต่อสารพิษ และอีกครึ่งหนึ่งของสัตว์ทดลองที่อยู่ด้านขวาของกราฟเป็นพวกที่ไวต่อการตอบสนองต่อสารพิษน้อยกว่าหรือเป็นพวกที่ทนต่อสารพิษมากกว่านั่นเอง

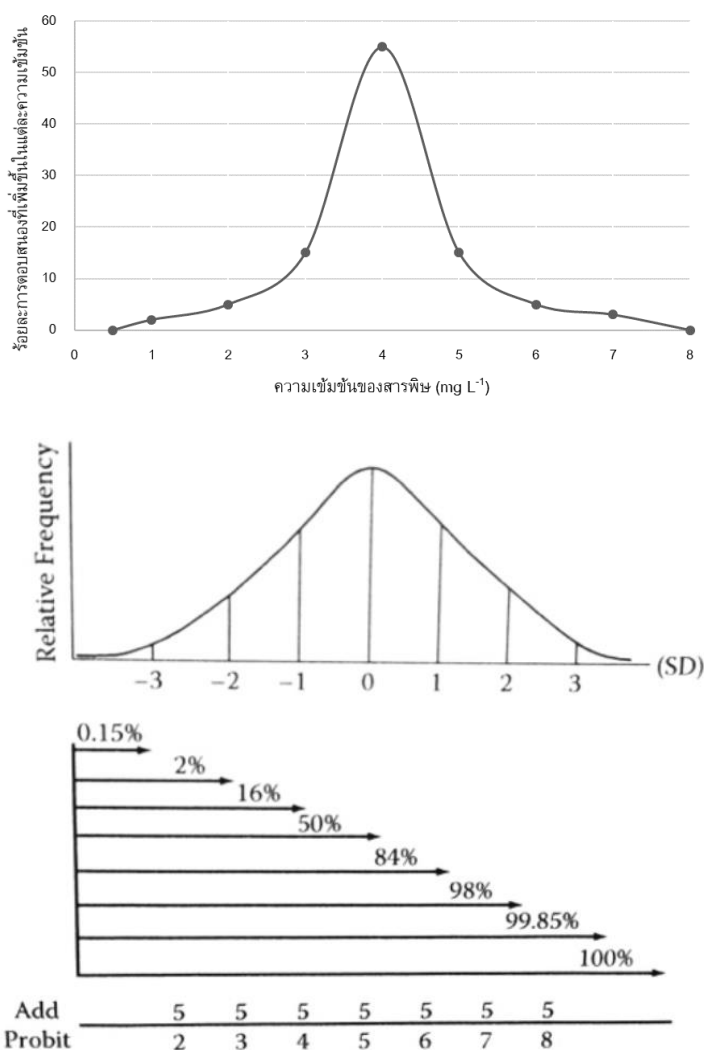


ภาพประกอบ 5 ความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของสารพิษที่สัตว์ทดลองได้รับกับร้อยละการตอบสนองของสัตว์ทดลองที่เพิ่มขึ้นในแต่ละความเข้มข้น

ที่มา: Landis, W., Sofield, R., Yu, M.-H., & Landis, W. G. (2003). *Introduction to environmental toxicology: impacts of chemicals upon ecological systems*: Crc Press.

นอกจากนี้ เมื่อนำภาพประกอบ 5 ไปเปรียบเทียบกับกราฟค่าส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน (standard deviation) ดังแสดงในภาพประกอบ 6 พบว่า ร้อยละ 50 ของสัตว์ทดลองที่ตอบสนองต่อสารพิษอยู่ตรงกับด้านซ้ายของค่าส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานที่เท่ากับ 0 ร้อยละ 16 ของสัตว์ทดลองที่ตอบสนองต่อสารพิษอยู่ตรงกับค่าส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานที่เท่ากับ -1 ร้อยละ 2 ของสัตว์ทดลองที่ตอบสนองต่อสารพิษอยู่ตรงกับค่าส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานที่เท่ากับ -2 และร้อยละ 0.15 ของสัตว์ทดลองที่ตอบสนองต่อสารพิษอยู่ตรงกับค่าส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานที่เท่ากับ -3 แต่เพื่อหลีกเลี่ยงค่าติดลบ Bliss (1934) ได้เพิ่มช่วงห่างของส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานทีละ 5 ค่า ดังนั้น ได้ว่า ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานที่เดิมเท่ากับ -3 ถูกเปลี่ยนเป็น 2 ซึ่งตรงกับร้อยละ 0.15 ของสัตว์ทดลองที่ตอบสนองต่อสารพิษ ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานที่เดิมเท่ากับ -2 ถูกเปลี่ยนเป็น 3 ซึ่งตรงกับร้อยละ 2 ของสัตว์ทดลองที่ตอบสนองต่อสารพิษ ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานที่เดิมเท่ากับ -1 ถูกเปลี่ยนเป็น 4 ซึ่งตรงกับร้อยละ 16 ของสัตว์ทดลองที่ตอบสนองต่อสารพิษ และส่วนเบี่ยงเบน

มาตรฐานที่เดิมเท่ากับ 0 ถูกเปลี่ยนเป็น 5 ซึ่งตรงกับร้อยละ 50 ของสัตว์ทดลองที่ตอบสนองต่อสารพิษ ซึ่งเรียกการเปลี่ยนแปลงส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานนี้ว่า probit หลังจากการปรับเปลี่ยนเพื่อให้ได้ข้อมูลในลักษณะ probit แล้วพบว่า ร้อยละ 50 ของสัตว์ทดลองที่ตอบสนองต่อสารพิษ ตรงกับค่า probit ที่ 5



ภาพประกอบ 6 การเปลี่ยนร้อยละการตอบสนองของสัตว์ทดลองเป็นค่า probit

ที่มา: Bliss, C. I. (1934). The method of probits-a correction. *Science*, 79(2053), 409-410.

ต่อมาในปี ค.ศ. 1971 Finney ได้พัฒนาตารางการเปลี่ยนแปลงค่าร้อยละการตอบสนองเป็นค่า probit ขึ้น ดังแสดงในภาพประกอบ 7

Percentage	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9
0	-	2.67	2.95	3.12	3.25	3.36	3.45	3.52	3.59	3.66
10	3.72	3.77	3.82	3.87	3.92	3.96	4.01	4.05	4.08	4.12
20	4.16	4.19	4.23	4.26	4.29	4.33	4.36	4.39	4.42	4.45
30	4.48	4.50	4.53	4.56	4.59	4.61	4.64	4.67	4.69	4.72
40	4.75	4.77	4.80	4.82	4.85	4.87	4.90	4.2	4.95	4.97
50	5.00	5.03	5.05	5.08	5.10	5.13	5.15	5.18	5.20	5.23
60	5.25	5.28	5.31	5.33	5.36	5.39	5.41	5.44	5.47	5.50
70	5.52	5.55	5.58	5.61	5.64	5.67	5.71	5.74	5.77	5.81
80	5.84	5.88	5.92	5.95	5.99	6.04	6.08	6.13	6.18	6.23
90	6.28	6.34	6.41	6.48	6.55	6.64	6.75	6.88	7.05	7.33
%	0.00	0.1	0.2	0.3	0.4	0.5	0.6	0.7	0.8	0.9
99	7.33	7.37	7.41	7.46	7.51	7.58	7.65	7.75	7.88	8.09

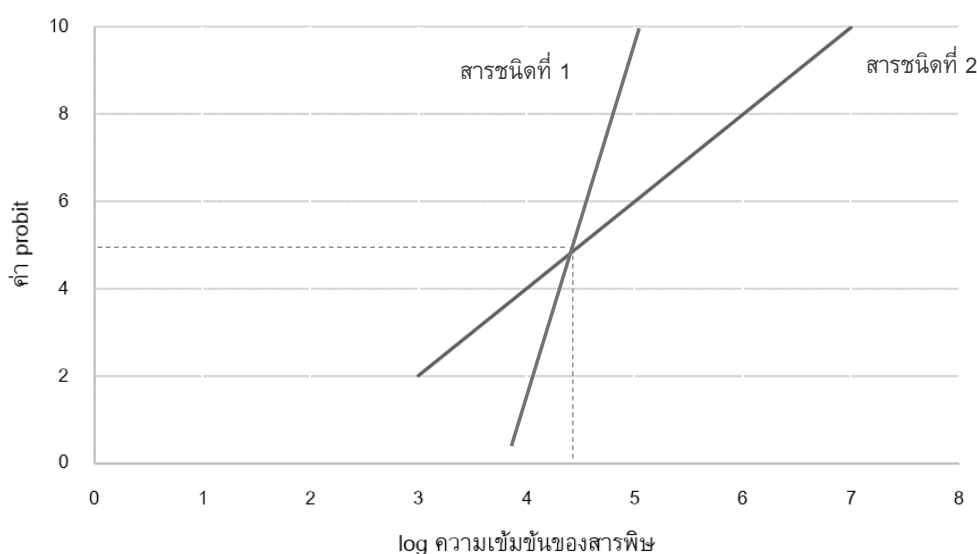
ภาพประกอบ 7 การเปลี่ยนแปลงร้อยละการตอบสนองเป็นค่า probit

ที่มา: Finney, D. (1971). Probit analysis. 1971. New York, Ny, 10022, 32.

เมื่อเขียนกราฟความสัมพันธ์ระหว่างร้อยละการตอบสนองและค่าความเข้มข้นของสารพิษลักษณะของกราฟจะอยู่ในรูปของ sigmoid curve อย่างไรก็ตาม เมื่อปรับค่าความเข้มข้นของสารพิษให้อยู่ในรูปของลอการิทึม ลักษณะของกราฟจะเปลี่ยนแปลงไป และหากเปลี่ยนร้อยละการตอบสนองให้เป็นค่า probit ส่วนค่าความเข้มข้นให้อยู่ในรูปลอการิทึมจะได้กราฟเส้นตรง ดังนั้น ปัจจุบันการประเมินความเป็นพิษจึงใช้วิธีวิเคราะห์โพรบิต (probit analysis)

การเปรียบเทียบความเป็นพิษของสารสองชนิดโดยใช้ค่า LC_{50} ซึ่งโดยปกติแล้วหากสารชนิดใดมีค่า LC_{50} ต่ำกว่ากันแสดงว่าสารชนิดนั้นมีความเป็นพิษมากกว่า แต่ถ้าเส้นกราฟที่ได้จากการศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของสารพิษที่สัตว์ทดลองได้รับกับร้อยละการตอบสนองของสัตว์ทดลองของสารสองชนิดซ้อนทับกัน ดังแสดงในภาพประกอบ 8 ซึ่งหมายความว่า ค่า LC_{50} ของสารชนิดที่ 1 และสารชนิดที่ 2 มีค่าเท่ากัน แต่อย่างไรก็ตามหากพิจารณาค่า LC_{10} หรือความเข้มข้นของสารที่ทำให้สัตว์ทดลองตายลงร้อยละ 10 ของสัตว์ทดลองทั้งหมดพบว่า สารชนิดที่ 2 มีค่า LC_{10} ต่ำกว่าค่า LC_{10} ของสารชนิดที่ 1 ดังนั้น เมื่อมีการใช้กราฟ

ความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของสารพิษที่สัตว์ทดลองได้รับกับร้อยละการตอบสนองของสัตว์ทดลองมาประเมินความเป็นพิษของสารจะต้องพิจารณาด้วยว่า สารพิษที่กำลังศึกษาอยู่นั้นในสิ่งแวดล้อมจริง ๆ จะมีความเข้มข้นของสารอยู่ในระดับใด ซึ่งโดยทั่วไปแล้วการปนเปื้อนของสารพิษในสิ่งแวดล้อมอาจพบได้ในระดับต่ำ ๆ และถ้าเป็นเช่นนั้น การประเมินความเป็นพิษจึงควรสรุปว่า สารชนิดที่ 2 มีความเป็นพิษมากกว่าสารชนิดที่ 1 นอกจากนี้การพิจารณาความเป็นพิษจากกราฟยังสามารถใช้ความชันของเส้นกราฟมาร่วมพิจารณาได้อีกด้วยกล่าวคือ จากการทดลองสารชนิดที่ 1 มีความชันของกราฟมากกว่าสารชนิดที่ 2 ซึ่งแสดงว่า แม้ว่าจะได้รับสารชนิดที่ 1 ไปเพียงปริมาณเล็กน้อย ก็สามารถทำให้สัตว์ทดลองมีการตอบสนองหรือการตายเพิ่มขึ้นอย่างมากในทางตรงกันข้ามสารชนิดที่ 2 ที่มีความชันของกราฟน้อยกว่า แสดงให้เห็นว่าปริมาณของสารพิษที่สัตว์ทดลองได้รับจะค่อย ๆ ทำให้สัตว์ทดลองตอบสนอง และต้องใช้ปริมาณของสารต่างกันมากหรือความเข้มข้นของสารที่ห่างกันมากจึงจะทำให้สัตว์ทดลองตอบสนองมากขึ้น



ภาพประกอบ 8 ความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของสารพิษที่ถูกแปลงเป็นลอการิทึมกับค่า probit ซึ่งแปลงมาจากร้อยละการตอบสนองของสัตว์ทดลองที่ได้รับสารชนิดที่ 1 และสารชนิดที่ 2

ที่มา: Maliwan, B. (2011). *Environmental toxicology*. Nakhon Pathom: Silpakorn University.

4. การคำนวณค่าความเป็นพิษของสารผสม

การปนเปื้อนในแหล่งน้ำธรรมชาติตามสภาพจริงมักเกิดจากการปนเปื้อนของสารมากกว่าหนึ่งชนิด จึงทำให้สิ่งมีชีวิตได้รับสารพิษเข้าสู่ร่างกายมากกว่าหนึ่งชนิดในเวลาเดียวกัน หรืออาจได้รับสารพิษชนิดหนึ่งเข้าไปก่อนแล้วได้รับสารพิษอีกชนิดหนึ่งตามเข้าไป ดังนั้น การทดสอบพิษของสารผสมจึงมีความสำคัญเพื่อประเมินการออกฤทธิ์ที่เกิดขึ้น ไม่ว่าจะเป็น การเสริมฤทธิ์ การเพิ่มฤทธิ์ และการยับยั้งฤทธิ์

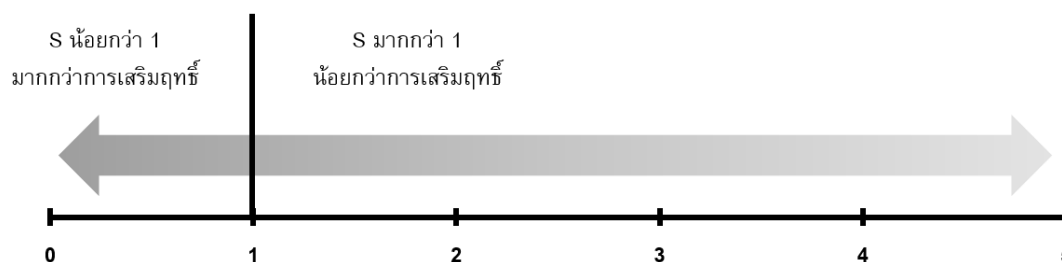
การทดสอบที่มีสารพิษมากกว่าหนึ่งชนิดโดยทั่วไปเรียกว่า การศึกษาความเป็นพิษร่วมของสารผสม ซึ่งมีวิธีการทดลองเช่นเดียวกับการศึกษาความเป็นพิษของสารเดี่ยว โดยใช้วิธีวิเคราะห์โพธิบท และการหาค่าความเป็นพิษของสารผสมยังต้องอาศัยข้อมูลจากการประเมินความเป็นพิษของสารเดี่ยวหรือค่า LC_{50} ของสารเดี่ยวร่วมคำนวณด้วย ในปัจจุบันการวิเคราะห์ความเป็นพิษของสารผสมใช้วิธี Marking's additive index method (Marking, 1984) เพื่อคำนวณหาค่ากิจกรรมทางชีววิทยา (biological activity, S) ของสารผสมซึ่งมีสมการดังนี้

$$S = \frac{A_m}{A_i} + \frac{B_m}{B_i} \dots (1)$$

เมื่อ	S	คือ กิจกรรมทางชีววิทยาของสาร A และ B
	A_m	คือ ค่า LC_{50} ของสารผสม A เมื่อมีสาร B ผสมอยู่
	A_i	คือ ค่า LC_{50} ของสารเคมี A
	B_m	คือ ค่า LC_{50} ของสารผสม B เมื่อมีสาร A ผสมอยู่
	B_i	คือ ค่า LC_{50} ของสารเคมี B

จากนั้นนำค่ากิจกรรมทางชีววิทยา (S) ที่คำนวณได้จากสมการ 1 มาวิเคราะห์อันตรกิริยาของสารผสมได้ดังนี้

เมื่อ	$S = 1$	คือ การออกฤทธิ์แบบการเสริมฤทธิ์
	$S < 1$	คือ การออกฤทธิ์แบบมากกว่าการเสริมฤทธิ์
	$S > 1$	คือ การออกฤทธิ์แบบน้อยกว่าการเสริมฤทธิ์



ภาพประกอบ 9 การแปลความค่ากิจกรรมทางชีววิทยา (biological activity, S) ที่คำนวณได้จาก Marking's additive index method

ที่มา: Landis, W., Sofield, R., Yu, M.-H., & Landis, W. G. (2003). *Introduction to environmental toxicology: impacts of chemicals upon ecological systems*: Crc Press.

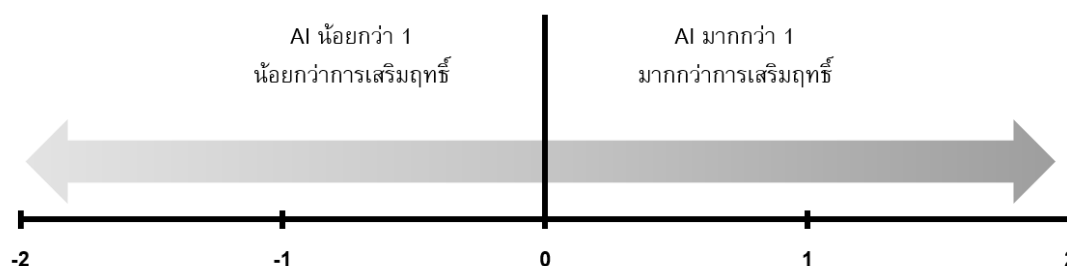
เพื่อให้่ายต่อการเข้าใจจึงมีการปรับค่ากิจกรรมทางชีววิทยาให้เป็นค่าดัชนีการส่งเสริมการทำงาน (additive index, AI) โดยใช้สมการที่ 2 เมื่อค่า S น้อยกว่า 1 และใช้สมการที่ 3 เมื่อค่า S มากกว่าหรือเท่ากับ 1

$$AI = \frac{1}{S} - 1 \quad \text{--- (2)}$$

$$AI = 1 - S \quad \text{--- (3)}$$

จากนั้นนำค่าดัชนีการส่งเสริมการทำงาน (AI) ที่คำนวณได้จากสมการ 2 หรือ 3 มาแปลความอันตรกิริยาของสารผสมได้ดังนี้

- เมื่อ
- $S = 1$ คือ การออกฤทธิ์แบบการเสริมฤทธิ์
 - $S < 1$ คือ การออกฤทธิ์แบบมากกว่าการเสริมฤทธิ์
 - $S > 1$ คือ การออกฤทธิ์แบบน้อยกว่าการเสริมฤทธิ์



ภาพประกอบ 10 การแปลความค่าดัชนีการส่งเสริมการทำงาน (additive index, AI)
ที่คำนวณได้จาก Marking's additive index method

ที่มา: Landis, W., Sofield, R., Yu, M.-H., & Landis, W. G. (2003). Introduction to environmental toxicology: impacts of chemicals upon ecological systems: Crc Press.

ซึ่งต่อมานงานวิจัยของ Y. Wang et al. (2018) ปรับเกณฑ์การประเมินค่า AI ของสารผสมจากวิธี Marking's additive index method ได้ดังนี้

ค่า $AI \leq -0.2$	คือ การออกฤทธิ์แบบยับยั้ง (antagonistic effect)
ค่า $-0.2 < AI \leq 0.25$	คือ การออกฤทธิ์แบบเพิ่มฤทธิ์ (additive effect)
ค่า $AI > 0.25$	คือ การออกฤทธิ์แบบเสริมฤทธิ์ (synergistic effect)

สารกำจัดศัตรูพืช

สารกำจัดศัตรูพืช (pesticides) เป็นกลุ่มสารเคมีที่นำมาใช้ในการเพิ่มผลผลิตทางด้านเกษตรกรรม มีจุดประสงค์เพื่อใช้ไล่หรือกำจัดสิ่งมีชีวิตที่มาทำลายพืช ในปัจจุบันมีการสังเคราะห์สารกำจัดศัตรูพืชชนิดใหม่ขึ้นมาหลายชนิด ซึ่งบางชนิดมีความเป็นพิษต่อสัตว์เลื้อยคลานด้วยนมต่ำมาก แต่อย่างไรก็ตามการใช้สารเคมีอย่างไม่ถูกต้องอาจส่งผลให้เกิดอันตรายต่อผู้ใช้ อย่างเฉียบพลันและเรื้อรังได้ นอกจากนี้สารกำจัดวัชพืชบางชนิดสามารถตกค้างในสิ่งแวดล้อมได้นาน จึงสามารถส่งผลเสียต่อสิ่งมีชีวิตในสิ่งแวดล้อมได้

การแบ่งกลุ่มสารกำจัดศัตรูพืช

สารกำจัดศัตรูพืชสามารถแบ่งได้ตามเป้าหมายที่ต้องการกำจัด เช่น สารเคมีกำจัดเชื้อราเรียกว่า fungicide สารเคมีกำจัดวัชพืชเรียกว่า herbicide สารเคมีกำจัดแมลงเรียกว่า insecticide สารเคมีกำจัดหอยเรียกว่า molluscicide และสารเคมีกำจัดหนูหรือยาเบื่อหนูเรียกว่า rodenticide นอกจากการแบ่งสารกำจัดศัตรูพืชข้างต้นแล้ว องค์การอนามัยโลก (World Health Organization, WHO) ยังจัดกลุ่มสารกำจัดศัตรูพืชตามความเป็นพิษของสาร โดยพิจารณาจากค่าความเป็นพิษของสารชนิดนั้นในหนูทดลอง ซึ่งสามารถแบ่งความเป็นพิษออกเป็น 4 กลุ่มคือ Ia, Ib, II และ III โดยกลุ่ม Ia มีความเป็นพิษสูงสุด Ib มีความเป็นพิษสูงมาก II มีความเป็นพิษปานกลาง และ III มีความเป็นพิษน้อยดังแสดงในตาราง 4

ตาราง 4 การแบ่งสารกำจัดศัตรูพืชตามความเป็นพิษ

กลุ่มสาร กำจัดศัตรูพืช	ความเป็นพิษ	ปริมาณสารที่ก่อให้เกิดพิษ (mg/kg body weight)			
		ได้รับการกิน		ได้รับทางผิวหนัง	
		ของแข็ง	สารละลาย	ของแข็ง	สารละลาย
Ia	เป็นพิษอย่างรุนแรง	≤ 5	≤ 20	≤ 10	≤ 40
Ib	เป็นพิษอย่างสูง	5 - 50	20 - 200	10 - 100	40 - 400
II	เป็นพิษระดับกลาง	50 - 500	200 - 2000	100 - 1000	400 - 4000
III	เป็นพิษน้อย	≥ 500	≥ 2000	≥ 1000	≥ 4000

ที่มา: World Health Organization, & International Programme on Chemical Safety. (2010). *The WHO recommended classification of pesticides by hazard and guidelines to classification: 2009*. Retrieved from Geneva: <http://www.who.int/iris/handle/10665/44271>

สารเคมีกำจัดแมลง

สารเคมีกำจัดแมลงหรือยาฆ่าแมลง (insecticides) คือ สารเคมีที่มีฤทธิ์เปลี่ยนแปลงสรีรวิทยาของแมลงจนส่งผลให้เกิดการเปลี่ยนแปลงพฤติกรรมหรือการตาย (Gupta, 2014; Wright & Welbourn, 2002) ยาฆ่าแมลงถูกนำมาใช้ในภาคการเกษตรเพื่อช่วยควบคุมการเข้าทำลายของแมลงศัตรูพืชและควบคุมการระบาดของแมลง บางชนิดเป็นสารอินทรีย์ซึ่งอาจได้จากการสกัดสารจากธรรมชาติ เช่น สารนิโคตินอยด์ (nicotinoids) ที่ได้จากการสกัดใบยาสูบ สารไพริทรอยด์ (pyrethroids) ที่สกัดได้จากดอกของพืชตระกูลเบญจมาศ เป็นต้น หรือได้จากการสังเคราะห์ขึ้นในห้องปฏิบัติการ เช่น สารกลุ่มออร์กาโนคลอรีน สารกลุ่มคาร์บาเมต เป็นต้น บางชนิดอาจเป็นสารอนินทรีย์ เช่น สารหนู กำมะถัน เป็นต้น อย่างไรก็ตาม ในปัจจุบันนิยมแบ่งกลุ่มของยาฆ่าแมลงตามความเป็นพิษดังแสดงในตาราง 5 และกลไกการออกฤทธิ์ของสารดังแสดงในตาราง 6

ตาราง 5 ตัวอย่างยาฆ่าแมลงที่มีความเป็นพิษแตกต่างกัน

กลุ่ม	ความเป็นพิษ	สารออกฤทธิ์	ปริมาณสารที่ก่อให้เกิดพิษในหนูทดลอง (mg/kg body weight)
กลุ่มที่ 1	เป็นพิษอย่างรุนแรง (Ia)	Aldicarb	0.93
		Chlorethoxyfos	1.8
		Parathion	13
		Parathion-methyl	14
กลุ่มที่ 2	เป็นพิษอย่างสูง (Ib)	Carbofuran	8
		Methidathion	25
		Methamidophos	30
		Omethoate	50

ตาราง 5 (ต่อ)

กลุ่ม	ความเป็นพิษ	สารออกฤทธิ์	ปริมาณสารที่ก่อให้เกิด พิษในหนูทดลอง (mg/kg body weight)
กลุ่ม 3	เป็นพิษระดับกลาง (II)	Thiodicarb	66
		Chlorpyrifos	135
		Carbosulfan	250
		Beta-cyfluthrin	450
		Imidacloprid	450
กลุ่มที่ 4	เป็นพิษน้อย (III)	Trichlorfon	560
		Dicofol	690
		Acephate	945
		Azamethiphos	1010
		Diafenthion	2068

ที่มา: World Health Organization, & International Programme on Chemical Safety. (2010). *The WHO recommended classification of pesticides by hazard and guidelines to classification: 2009*. Retrieved from Geneva: <http://www.who.int/iris/handle/10665/44271>

ตาราง 6 ตัวอย่างยาฆ่าแมลงที่มีกลไกการออกฤทธิ์แตกต่างกัน

กลไกการออกฤทธิ์	กลุ่มย่อย	สารออกฤทธิ์ในยาฆ่าแมลง
Acetylcholinesterase (AChE) inhibitors	Carbamates	Alanycarb, Aldicarb, Bendiocarb, Benfuracarb, Butocarboxim
	Organophosphates	Acephate, Azamethiphos, Azinphosmethyl, Cadusafos
GABA-gated chloride channel blockers	Cyclodiene organochlorines	Chlordane, Endosulfan
Sodium channel modulators	Phenylpyrazoles (Fiproles)	Ethiprole, Fipronil
	Pyrethroids	Acrinathrin, Allethrin
	DDT	DDT
	Methoxychlor	Methoxychlor
Nicotinic acetylcholine receptor (nAChR) competitive modulators	Neonicotinoids	Acetamiprid, Clothianidin, Dinotefuran, Imidacloprid, Nitenpyram, Thiacloprid, Thiamethoxam
	Nicotine	Nicotine
	Sulfoximines	Sulfoxaflor
Inhibitors of mitochondrial ATP synthase	Diafenthiuron	Diafenthiuron
	Organotin miticides	Azocyclotin, Cyhexatin
	Tetradifon	Tetradifon

ที่มา: World Health Organization, & International Programme on Chemical Safety. (2010). *The WHO recommended classification of pesticides by hazard and guidelines to classification: 2009*. Retrieved from Geneva: <http://www.who.int/iris/handle/10665/44271>

สารเคมีกำจัดวัชพืช

สารเคมีกำจัดวัชพืชหรือยาปราบวัชพืช (herbicides) คือ สารเคมีที่มีฤทธิ์กำจัดวัชพืช โดยการยับยั้งกระบวนการเมแทบอลิซึมที่สำคัญในวัชพืช แต่ต้องไม่เป็นอันตรายต่อพืชที่ปลูก (Harrington & Ghanizadeh, 2017) ยากำจัดวัชพืชถูกนำมาใช้ในภาคการเกษตรเพื่อช่วยควบคุมปริมาณของวัชพืชที่เข้ามารุกรานพืชที่ปลูก นอกจากนำมาใช้ด้านเกษตรกรรมแล้วยังสามารถนำมาใช้กำจัดวัชพืชที่ขึ้นตามอาคารบ้านเรือน การจัดจำแนกกลุ่มของยากำจัดวัชพืชสามารถพิจารณาได้หลายหลักเกณฑ์ด้วยกัน ไม่ว่าจะเป็นความจำเพาะเจาะจงในการกำจัดวัชพืช องค์ประกอบโครงสร้างทางเคมี ช่วงเวลาการใช้งาน หรือการเคลื่อนย้ายของสารเข้าสู่ต้นวัชพืช (Zimdahl, 2018) อย่างไรก็ตาม ในปัจจุบันนิยมแบ่งกลุ่มของยาฆ่าแมลงตามความเป็นพิษ ดังแสดงในตาราง 7 และกลไกการออกฤทธิ์ของสารดังแสดงในตาราง 8

ตาราง 7 ตัวอย่างยากำจัดวัชพืชที่มีความเป็นพิษแตกต่างกัน

กลุ่ม	ความเป็นพิษ	สารออกฤทธิ์	ปริมาณสารที่ก่อให้เกิดพิษในหนูทดลอง (mg/kg body weight)
กลุ่มที่ 1	เป็นพิษอย่างรุนแรง (Ia)	-	-
กลุ่มที่ 2	เป็นพิษอย่างสูง (Ib)	Dinoterb	25
		DNOC	25
		Acrolein	29
		Allyl alcohol	64
กลุ่มที่ 3	เป็นพิษระดับกลาง (II)	Ametryn	110
		loxynil	110
		Bromoxynil	190
		Bilanafos	268

ตาราง 7 (ต่อ)

กลุ่ม	ความเป็นพิษ	สารออกฤทธิ์	ปริมาณสารที่ก่อให้เกิดพิษในหนูทดลอง (mg/kg body weight)
กลุ่มที่ 4	เป็นพิษน้อย (III)	Terbutylazine	2160
		Alloxydim	2260
		Acetochlor	2950
		Butachlor	3300
		Glyphosate	4230

ที่มา: World Health Organization, & International Programme on Chemical Safety. (2010). *The WHO recommended classification of pesticides by hazard and guidelines to classification: 2009*. Retrieved from Geneva: <http://www.who.int/iris/handle/10665/44271>

ตาราง 8 ตัวอย่างยากำจัดวัชพืชที่มีกลไกการออกฤทธิ์แตกต่างกัน

กลไกการออกฤทธิ์	กลุ่มย่อย	สารออกฤทธิ์ในยาฆ่าแมลง
Amino acid synthesis inhibitors	Imidazolinone	Imazamox, Imazapic, Imazaquin
	Sulfonylurea	Bensulfuron, Chlorimuron
	Triazolopyrimidine	Cloransulam, Florasulam
	Organophosphorus	Glyphosate

ตาราง 8 (ต่อ)

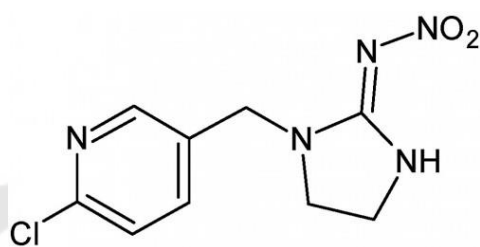
กลไกการออกฤทธิ์	กลุ่มย่อย	สารออกฤทธิ์ในยาฆ่าแมลง
Lipid synthesis inhibitors	Aryloxyphenoxypropionate	Clodinafop, Cyhalofop, Fenoxaprop
	Cyclohexanedione	Clethodim, Sethoxydim
	Phenylpyrazolin	Pinoxaden
Growth regulators	Arylpicolinate	Halauxifen
	Benzoic acid	Dicamba
	Carboxylic acid	Aminopyralid, Clopyralid, Fluroxypyr
	Phenoxy	2,4-D, MCPA
Photosynthesis inhibitors	Semicarbazone	Diflufenzopyr
	Phenylcarbamate	Desmedipham, Phenmedipham
	Triazine	Atrazine, Prometryn, Simazine
	Triazinone	Hexazinone, Metribuzin
	Uracil	Terbacil
Cell membrane disrupters	Aryl triazinone	Sulfentrazone, Carfentrazone, Fluthiacet
	Diphenylether	Acifluorfen, Fomesafen, Lactofen
	N-phenylphthalimide	Flumiclorac, Flumioxazin

ที่มา: World Health Organization, & International Programme on Chemical Safety. (2010). *The WHO recommended classification of pesticides by hazard and guidelines to classification: 2009*. Retrieved from Geneva: <http://www.who.int/iris/handle/10665/44271>

Imidacloprid

ข้อมูลทั่วไป

Imidacloprid คือ สารออกฤทธิ์ในยาฆ่าแมลงในกลุ่ม neonicotinoid มีชื่อทางเคมี คือ 1-(6-chloro-3-pyridylmethyl)-N-nitroimidazolidin-2-ylideneamine โดย WHO ได้จัดกลุ่ม imidacloprid ไว้ในกลุ่มที่ 3 ซึ่งระบุเป็นอันตรายปานกลางในสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม



ภาพประกอบ 11 สูตรโครงสร้างของ imidacloprid

ที่มา : Mohamed, F., Gawarammana, I., Robertson, T. A., Roberts, M. S., Palangasinghe, C., Zawahir, S., . . . Buckley, N. A. (2009). Acute human self-poisoning with imidacloprid compound: a neonicotinoid insecticide. *PloS one*, 4(4), e5127.

คุณสมบัติทางกายภาพและทางเคมี

ตาราง 9 คุณสมบัติทางกายภาพและทางเคมีของ imidacloprid

คุณสมบัติทางกายภาพและเคมี	imidacloprid	เอกสารอ้างอิง
ลักษณะของผลึก	ผลึกไม่มีสี	Tomlin (2009)
สูตรเคมี	$C_9H_{10}ClN_5O_2$	
น้ำหนักโมเลกุล	255.7 g mol^{-1}	
ความสามารถในการละลายน้ำ	514 mg L^{-1} ที่ 20°C pH 7	

ตาราง 9 (ต่อ)

คุณสมบัติทางกายภาพและเคมี	imidacloprid	เอกสารอ้างอิง
ความสามารถในการละลายในสารละลายอินทรีย์		Kong, Shi, Cao, and Zhou (2008)
n-hexane	น้อยกว่า 0.1 mg L^{-1}	
2-propanol	2.3 mg L^{-1}	
acetonitrile	50.0 mg L^{-1}	
acetone	50.0 mg L^{-1}	
จุดหลอมเหลว	143.8°C	Tomlin (2009)
ความดันไอ	$4 \times 10^{-10} \text{ Pa}$ ที่ 20°C	
ค่าคงที่ของ Henry (H)	$1.7 \times 10^{-10} \text{ Pa m}^3 \text{ mol}^{-1}$	
ค่าสัมประสิทธิ์การกระจายตัว ($\log K_{ow}$)	0.57 ที่ 21°C	
ค่าสัมประสิทธิ์การดูดซับในดิน (K_{oc})	262	Kegley, Hill, Orme, and Choi (2011)
ค่าครึ่งชีวิตในน้ำ		Fossen (2006)
ไม่มีแสง	มากกว่า 30 วัน ที่ 25°C pH 7	
มีแสง	น้อยกว่า 2 ชั่วโมง ที่ 24°C pH 7	
ค่าครึ่งชีวิตในดิน	ประมาณ 38 วัน	

การใช้งาน imidacloprid

ในช่วงปี พ.ศ. 2555 ถึง 2560 ประเทศไทยมีแนวโน้มการนำเข้า imidacloprid เพิ่มขึ้น ดังแสดงในตาราง 10 ยาฆ่าแมลงชนิดนี้มักใช้ในทางการเกษตรเพื่อควบคุมแมลงศัตรูพืชที่รุกรานพืชปลูก เช่น ข้าว ฝ้าย ส้มเขียวหวาน ส้มโอ มะนาว มะเขือเปราะ พริก หอมแดง หอมแบ่ง หอมหัวใหญ่ กระเทียม และถั่วเหลือง เป็นต้น โดยยาฆ่าแมลง imidacloprid สามารถกำจัดศัตรูพืชซึ่งได้แก่ เพลี้ยกระโดดสีน้ำตาล เพลี้ยกระโดดหลังขาว เพลี้ยจักจั่นสีเขียว เพลี้ยจักจั่นปีกลายหยัก เพลี้ยจักจั่นฝ้าย เพลี้ยอ่อนฝ้าย เพลี้ยไฟ เพลี้ยไก่แจ้ส้ม เพลี้ยไฟพริก แมลงหวี่ขาวยาสูบ และปลวก เป็นต้น นอกจากนี้ยังใช้สำหรับฆ่าหมัดในสัตว์เลี้ยง เช่น สุนัข และแมว เป็นต้น (Cang et al., 2017; Matsumura et al., 2008)

ตาราง 10 การนำเข้า imidacloprid ในประเทศไทย

ปี	ปริมาณนำเข้า (กิโลกรัม)	ปริมาณสารสำคัญ (กิโลกรัม)	มูลค่าการนำเข้า
2555	189,847.00	83,165.50	อันดับ 6
2556	130,359.00	68,046.59	N/A
2557	422,185.00	250,782.80	อันดับ 3
2558	377,677.00	225,765.95	อันดับ 5
2559	499,072.00	288,444.05	อันดับ 1
2560	502,787.00	305,139.80	อันดับ 5

ที่มา : Bureau of agricultural plant and material control. (2018). *The summary report on import of hazardous substances*. Retrieved from Bangkok: http://www.doa.go.th/ard/index.php?option=com_content%20&view=article&id=22:stat2535&catid=29:stat&Itemid=104

กลไกการออกฤทธิ์ของ imidacloprid ในสิ่งมีชีวิต

Imidacloprid ออกแบบมาให้ออกฤทธิ์ผ่านการสัมผัสหรือการกิน โดยพืชสามารถดูดซึม imidacloprid ผ่านทางรากแล้วสะสมไว้ในเนื้อเยื่อต่าง ๆ และถ่ายทอดสู่แมลงศัตรูพืชได้ ซึ่ง imidacloprid จะออกฤทธิ์บริเวณ synaptic cleft หรือ neuromuscular junction เมื่อสิ่งมีชีวิตได้รับ imidacloprid สารชนิดนี้จะเข้าจับกับ post-synaptic nicotinic acetylcholine receptor แบบผันกลับไม่ได้ (irreversible) และเนื่องจาก active site ของเอนไซม์ AChE ไม่จำเพาะต่อ imidacloprid จึงทำให้ AChE ไม่สามารถสลาย imidacloprid เป็นผลให้การทำงานของระบบประสาทล้มเหลว ในช่วงแรกสิ่งมีชีวิตจะแสดงพฤติกรรมชักเกร็ง แต่เมื่อเวลาผ่านไปการสังเคราะห์พลังงานในเซลล์ประสาทจะลดลงทำให้เซลล์ประสาทไม่สามารถหลั่งสารสื่อประสาทได้ จนนำไปสู่การเป็นอัมพาตและการตายในที่สุด (Morrissey et al., 2015; Topal et al., 2017)

ความเป็นพิษของ imidacloprid

WHO (2009) ระบุว่า imidacloprid มีพิษอยู่ในระดับปานกลาง โดยมีค่า LC_{50} ที่ก่อให้เกิดพิษในหนูทดลองอยู่ที่ 450 mg/kg body weight แต่อย่างไรก็ตาม งานวิจัยอื่น ๆ ได้ระบุว่า imidacloprid มีความเป็นพิษต่อสิ่งมีชีวิตแต่ละชนิดแตกต่างกัน ดังแสดงในตาราง 11

ตาราง 11 รายงานการศึกษาความเป็นพิษของ imidacloprid ต่อสิ่งมีชีวิต

สิ่งมีชีวิต	ค่าความเป็นพิษ	เวลา	เอกสารอ้างอิง
Mollusks			
<i>Helix aspersa</i>	0.109 mg body weight ⁻¹	48 ชั่วโมง	Radwan and Mohamed (2013)
<i>Lymnaea stagnalis</i>	0.069 mg L ⁻¹	48 ชั่วโมง	El-Sayed H., Mohamed S., and Youssef (2016)
<i>Theba pisana</i>	0.051 mg L ⁻¹	48 ชั่วโมง	
<i>Helicella vestalis</i>	0.037 mg L ⁻¹	48 ชั่วโมง	

ตาราง 11 (ต่อ)

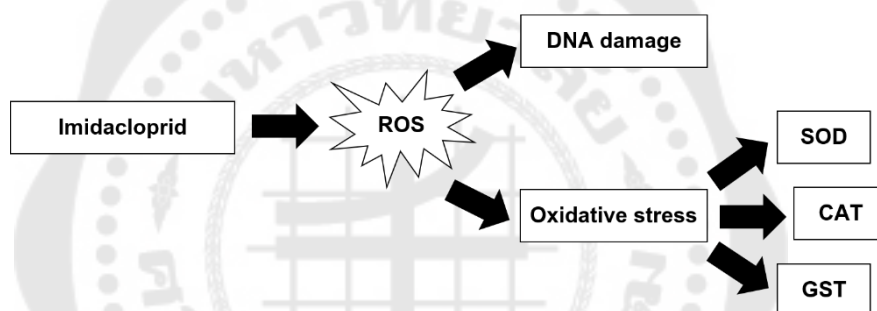
สิ่งมีชีวิต	ค่าความเป็นพิษ	เวลา	เอกสารอ้างอิง
Annelids			
<i>Aporrectodea nocturna</i>	3.74 mg L ⁻¹	14 วัน	Capowiez, Rault, Costagliola, and Mazzia (2005)
<i>Dendrobaena octaedra</i>	5.7 mg L ⁻¹	35 วัน	Kreutzweiser et al. (2008)
<i>Tubifex tubifex</i>	0.3 mg L ⁻¹	24 ชั่วโมง	Gerhardt (2009)
<i>Lumbricus terrestris</i>	10.7 mg L ⁻¹	14 วัน	Capowiez et al. (2010)
<i>Eisenia fetida</i>	3.39 mg L ⁻¹	24 ชั่วโมง	Chen, Wang, Zhao, Wang, and Qian (2014)
	3.63 mg L ⁻¹	48 ชั่วโมง	
	3.05 mg L ⁻¹	14 วัน	K. Wang, Pang, et al. (2015)
	2.61 mg kg ⁻¹	14 วัน	
Arthropods			
<i>Palaemonetes pugio</i>	0.3088 mg L ⁻¹	96 ชั่วโมง	Key, Chung, Siewicki, and Fulton (2007)
<i>Daphnia pulex</i>	1.5 mg L ⁻¹	24 ชั่วโมง	Hassoon and Salman (2016)
	1.9 mg L ⁻¹	48 ชั่วโมง	
<i>Hexagenia</i> spp.	0.9 mg L ⁻¹	96 ชั่วโมง	Bartlett et al. (2018)
<i>Cloeon</i> sp.	0.0238 mg L ⁻¹	96 ชั่วโมง	Sumon et al. (2018)
<i>Diaptomus</i> sp.	6.54 mg L ⁻¹	96 ชั่วโมง	

ตาราง 11 (ต่อ)

สิ่งมีชีวิต	ค่าความเป็นพิษ	เวลา	เอกสารอ้างอิง
Chordates			
<i>Misgurnus anguillicaudatus</i>	167.7 mg L ⁻¹	24 ชั่วโมง	Xia et al. (2016)
	158.6 mg L ⁻¹	48 ชั่วโมง	
	147.9 mg L ⁻¹	72 ชั่วโมง	
<i>Danio rerio</i>	76.08 mg L ⁻¹	96 ชั่วโมง	Wu et al. (2018)

จากตาราง 11 แสดงให้เห็นว่า ค่าความเป็นพิษของ imidacloprid ต่อสิ่งมีชีวิตแต่ละชนิดมีความแตกต่างกัน ขึ้นอยู่กับความทนทานต่อสารพิษในสิ่งมีชีวิตแต่ละชนิด รวมทั้งเวลาและรูปแบบการได้รับสารพิษด้วย นอกจากนี้ยังพบว่าสิ่งมีชีวิตแต่ละชนิดมีการตอบสนองของร่างกายต่อ imidacloprid แตกต่างกัน ตั้งแต่การเปลี่ยนแปลงระดับสารพันธุกรรมจนถึงระดับการแสดงออกของพฤติกรรม จากงานวิจัยของ J. Wang, Wang, Wang, Zhu, and Wang (2016) พบว่า เมื่อไส้เดือนดิน (*E. fetida*) ได้รับ imidacloprid เป็นเวลา 7, 14, 21 และ 28 วัน ทำให้เกิดความเสียหายของดีเอ็นเอ (DNA damage) ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยของ Vieira, Pérez, Acayaba, Raimundo, and dos Reis Martinez (2018) ที่พบว่า เมื่อปลา *Prochilodus lineatus* ได้รับ imidacloprid เป็นเวลา 120 ชั่วโมง ส่งผลให้เกิดความเสียหายของดีเอ็นเอในเม็ดเลือดแดงและเซลล์ตับ นอกจากนี้ J. Wang et al. (2016) และ Vieira et al. (2018) ยังได้ศึกษาสาเหตุที่ทำให้เกิดความเสียหายของดีเอ็นเอพบว่า imidacloprid สามารถชักนำให้เกิด Reactive Oxygen Species (ROS) ซึ่งเป็นสารอนุมูลอิสระที่มีความไวต่อการเกิดปฏิกิริยาเคมีกับสารชีวโมเลกุลในสิ่งมีชีวิต และการเกิด ROS ในปริมาณมากยังส่งผลต่อกิจกรรมของเอนไซม์ superoxide dismutase (SOD) เอนไซม์ catalase (CAT) และเอนไซม์ glutathione S-transferase (GST) ซึ่งเป็นกลุ่มเอนไซม์ที่สำคัญที่ใช้ในการกำจัดสารอนุมูลอิสระในร่างกายของสิ่งมีชีวิต อย่างไรก็ตาม เมื่อปลา *P. lineatus* ได้รับ imidacloprid การเปลี่ยนแปลงกิจกรรมของเอนไซม์ในแต่ละเนื้อเยื่อของปลาแตกต่างกัน เช่น กิจกรรมเอนไซม์ของ CAT ลดลงในเนื้อเยื่อตับ แต่เพิ่มขึ้นในเนื้อเยื่อไตและสมอง ทั้งนี้อาจเป็นเพราะปลาได้รับ imidacloprid ในแต่ละอวัยวะไม่เท่ากัน ส่วนการลดลง

ของกิจกรรมของเอนไซม์ CAT ที่ตับอาจเป็นเพราะการถูกรบกวนจาก ROS ในกระบวนการสังเคราะห์เอนไซม์ และ J. Wang et al. (2016) ยังได้สรุปไว้ว่า เอนไซม์ที่เกี่ยวข้องกับการกำจัดสารอนุมูลอิสระจะทำงานได้ดีเมื่อสิ่งมีชีวิตได้รับ imidacloprid ในความเข้มข้นต่ำ แต่มีประสิทธิภาพที่ลดลงเมื่อสิ่งมีชีวิตได้รับ imidacloprid ที่ความเข้มข้นสูง Qi et al. (2018) ยังได้ทำการศึกษาผลของ imidacloprid ต่อการเปลี่ยนแปลงกิจกรรมของเอนไซม์ SOD และ CAT ใน *D. magna* ที่เวลา 48 ชั่วโมง พบว่า กิจกรรมของเอนไซม์ CAT เพิ่มขึ้น ดังนั้นจึงสรุปได้ว่า imidacloprid สามารถชักนำให้เกิด ROS ในสิ่งมีชีวิต ซึ่งส่งผลกระทบต่อความเสียหายต่อดีเอ็นเอและทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงกิจกรรมของเอนไซม์ CAT ซึ่งเกี่ยวข้องกับการกำจัดสารอนุมูลอิสระ ดังแสดงในภาพประกอบ 12



ภาพประกอบ 12 ผลของ imidacloprid ที่ทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงในสิ่งมีชีวิต

นอกจากนี้งานวิจัยของ Radwan and Mohamed (2013) ได้ศึกษาการเปลี่ยนแปลงกิจกรรมของเอนไซม์ AChE ในเนื้อเยื่อของหอยทากบก (*H. aspersa*) เมื่อได้รับ imidacloprid เป็นเวลา 1, 3 และ 7 วัน พบว่า กิจกรรมของเอนไซม์ AChE ในเนื้อเยื่อของหอยทากบก (*H. aspersa*) ลดลงเมื่อความเข้มข้นของ imidacloprid เพิ่มขึ้น ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยของ Topal et al. (2017) ที่ได้ศึกษาการเปลี่ยนแปลงกิจกรรมของเอนไซม์ AChE ในเนื้อเยื่อสมองของปลาเทราต์สายรุ้ง (*Oncorhynchus mykiss*) เมื่อได้รับ imidacloprid เป็นระยะเวลา 21 วัน พบว่า กิจกรรมของเอนไซม์ AChE ในเนื้อเยื่อสมองของปลาเทราต์สายรุ้งลดลงเมื่อความเข้มข้นของ imidacloprid เพิ่มขึ้น ในทางกลับกันงานวิจัยของ Annabi and Dhouib (2015) ได้ศึกษา กิจกรรมของเอนไซม์ AChE ในเนื้อเยื่อสมองของหนูที่ได้รับ imidacloprid เป็นเวลา 21 วัน พบว่า มีการเพิ่มขึ้นของกิจกรรมของเอนไซม์ AChE อย่างไรก็ตาม งานวิจัย K. Wang, Qi, et al. (2015) พบว่า ช่วงเวลาที่ได้รับ imidacloprid เพิ่มขึ้น ไม่มีผลต่อการเปลี่ยนแปลงกิจกรรมของเอนไซม์

AChE ของ *E. fetida* ที่ได้รับ imidacloprid เป็นเวลา 3, 7, 14 และ 21 รวมถึงงานวิจัยของ Rios, Wilcoxon, and Zimmerman (2017) และ Vieira et al. (2018) ที่ศึกษาการเปลี่ยนแปลงกิจกรรมของเอนไซม์ AChE เมื่อได้รับ imidacloprid ใน *Rana catesbeiana* และ *P. lineatus* ตามลำดับพบว่า กิจกรรมของเอนไซม์ AChE ในสิ่งมีชีวิตที่ได้รับ imidacloprid และสิ่งมีชีวิตที่ไม่ได้รับ imidacloprid ไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ 0.05 ดังนั้นจึงสรุปได้ว่าการเปลี่ยนแปลงของกิจกรรมของเอนไซม์ AChE เมื่อได้รับ imidacloprid แตกต่างกันในแต่ละชนิดขึ้นอยู่กับช่วงเวลาที่ได้รับสาร ระยะเวลาที่รับสาร และความเข้มข้นของสารที่สิ่งมีชีวิตได้รับ

งานวิจัยของ Dittbrenner, Schmitt, Capowiez, and Triebkorn (2011) ได้ศึกษาเปรียบเทียบผลของ imidacloprid ต่อการเปลี่ยนแปลงพยาธิสภาพเนื้อเยื่อของไส้เดือนดิน 3 ชนิด คือ *E. fetida*, *A. caliginosa* และ *L. terrestris* ด้วยเทคนิค Hematoxylin - Eosin (H&E) พบว่าเกิดความเสียหายที่เซลล์เยื่อบุผิว (epidermal cells) เซลล์เยื่อบุทางเดินอาหารส่วนกลาง (midgut cells) และเซลล์คลอโรพลาสต์ (chloragocytes) ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยของ K. Wang, Pang, et al. (2015) ศึกษาผลของ imidacloprid ต่อการเปลี่ยนแปลงพยาธิสภาพเนื้อเยื่อของไส้เดือนดิน (*E. fetida*) ด้วยเทคนิค H&E ร่วมกับเทคนิค Periodic acid - Schiff - Alcianblue (PSA) พบว่า เซลล์เยื่อบุผิว (epidermal cells) และเซลล์เยื่อบุทางเดินอาหารส่วนกลาง (midgut cells) เกิดความเสียหาย นอกจากนี้ Özdemir et al. (2018) ได้ศึกษาการเปลี่ยนแปลงพยาธิสภาพเนื้อเยื่อของปลา *Cyprinus carpio* L. ด้วยเทคนิค H&E เมื่อได้รับ imidacloprid 96 ชั่วโมง พบว่า เกิดความเสียหายของเนื้อเยื่อบุผิวเหงือก (gill epithelium) การหนาตัวของเซลล์หลั่งเมือก (mucous cells) บริเวณเหงือก เกิดการตายของเซลล์แบบ necrosis ที่เซลล์ตับ และ Xia et al. (2016) ศึกษาผลของ imidacloprid ต่อการเปลี่ยนแปลงพยาธิสภาพเนื้อเยื่อในปลา *M. anguillicaudatus* ด้วยเทคนิค H&E พบว่า เมื่อความเข้มข้นของ imidacloprid มากขึ้นทำให้เกิดความเสียหายในเนื้อเยื่ออวัยวะมากขึ้น ดังนั้นจึงสรุปได้ว่า imidacloprid สามารถชักนำให้เกิดความเสียหายในเนื้อเยื่อของสิ่งมีชีวิตได้ในหลายอวัยวะ

งานวิจัยของ Sardo and Soares (2010) ยังได้ทำการศึกษาการเปลี่ยนพฤติกรรมของไส้เดือนน้ำ (*Lumbriculus variegatus*) เมื่อได้รับ imidacloprid เป็นเวลา 24 ชั่วโมง พบว่า พฤติกรรมการเคลื่อนไหว (locomotion behaviour) และพฤติกรรมการเคลื่อนที่ (peristaltic movement) ของ *L. variegatus* ลดลงเมื่อความเข้มข้น imidacloprid เพิ่มขึ้น ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยของ Dittbrenner, Triebkorn, Moser, and Capowiez (2010) ที่รายงานผลของ imidacloprid ต่อพฤติกรรมของไส้เดือนดิน 2 ชนิด คือ *L. terrestris* และ *A. caliginosa* พบว่า

imidacloprid มีผลต่อพฤติกรรมการขุดดินที่ลดลง ซึ่งอาจส่งผลต่อคุณภาพของดินในระบบนิเวศ นอกจากนี้ Crosby, Bailey, Oliveri, and Levin (2015) ยังได้ทำการศึกษาการแสดงออกของพฤติกรรมในปลาหมากลาย (*D. rerio*) ที่ได้รับ imidacloprid พบว่า พฤติกรรมการว่ายน้ำและการตอบสนองต่อสิ่งเร้าลดลง ซึ่งสอดคล้องกับกลไกการออกฤทธิ์ของ imidacloprid ที่ชักนำให้สิ่งมีชีวิตหลังสารสื่อประสาทที่ควบคุมกล้ามเนื้อลดลง ดังนั้น จึงสรุปได้ว่า imidacloprid มีผลต่อการเปลี่ยนแปลงพฤติกรรมในสิ่งมีชีวิต โดยเฉพาะอย่างยิ่งพฤติกรรมที่เกี่ยวข้องกับการเคลื่อนที่

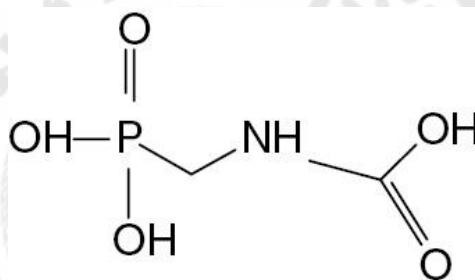
การปนเปื้อนของ imidacloprid ในระบบนิเวศ

สารเคมีกำจัดศัตรูพืชที่ถูกใช้จะมีเพียงร้อยละ 0.1 เท่านั้นที่ถึงศัตรูพืชเป้าหมาย (targeted pests) ส่วนอีกร้อยละ 99.9 มักตกค้างในสิ่งแวดล้อม (Pimentel, 1995) ยาฆ่าแมลงบางประเภทมีพิษสูงต่อสัตว์นอกกลุ่มเป้าหมาย เช่น ยาฆ่าแมลงในกลุ่ม neonicotinoids ซึ่งเป็นสาเหตุที่ทำให้เกิดปรากฏการณ์ Colony Collapse Disorder (CCD) หรือปรากฏการณ์การตายยกรังของผึ้ง ปรากฏการณ์นี้สร้างความเสียหายต่อปริมาณผลผลิตและการขยายพันธุ์พืชที่สำคัญ (Dively, Embrey, Kamel, Hawthorne, & Pettis, 2015; Meikle et al., 2016) จากการตรวจวัดการตกค้างของสารเคมีกำจัดศัตรูพืชในบางพื้นที่ของประเทศสหรัฐอเมริกาและประเทศไทยพบว่าการปนเปื้อนของยากำจัดวัชพืชและยาฆ่าแมลงในแหล่งน้ำบริเวณที่มีการทำเกษตรกรรมรวมถึงบริเวณลุ่มน้ำสำคัญ ซึ่งเป็นผลมาจากการใช้ยากำจัดวัชพืชและยาฆ่าแมลงร่วมกันในพื้นที่ทำการเกษตร (Department of Agriculture, 2015; Nowell et al., 2018) อย่างไรก็ตาม การวิจัยผลกระทบของสารเคมีกำจัดศัตรูพืชต่อสิ่งมีชีวิตในปัจจุบันยังคงมุ่งเน้นรายงานผลความเป็นพิษของสารกำจัดศัตรูพืชเพียงชนิดเดียวต่อสิ่งมีชีวิตในระบบนิเวศ (Uwizeyimana et al., 2017) จึงทำให้การประเมินความเป็นพิษไม่สามารถสะท้อนสภาพการปนเปื้อนจริงที่เกิดขึ้นในระบบนิเวศแหล่งน้ำได้ (Schnug et al., 2014) การศึกษาความเป็นพิษร่วมจึงมีความสำคัญ เพื่อทำความเข้าใจรูปแบบความเป็นพิษที่เกิดขึ้นจริงในระบบนิเวศแหล่งน้ำ ไม่ว่าจะเป็นการเสริมฤทธิ์ (synergistic effect) หรือการเพิ่มฤทธิ์ (additive effect) ซึ่งมีผลกระทบต่อสิ่งมีชีวิตในระบบนิเวศมากกว่าการได้รับสารเพียงชนิดเดียว (Cang et al., 2017) และอาจนำไปสู่การลดจำนวนของสิ่งมีชีวิตอย่างรวดเร็วในระบบนิเวศแหล่งน้ำได้

Glyphosate

ข้อมูลทั่วไป

Glyphosate (ไกลโฟเสท) คือ สารออกฤทธิ์ในยาปราบวัชพืชในกลุ่ม amino acid synthesis inhibitor มีชื่อทางเคมี คือ N-(phosphonomethyl)glycine โดย World Health Organization and International Programme on Chemical Safety (2010) ได้จัด glyphosate อยู่ในกลุ่มที่ 4 ซึ่งเป็นพิษน้อยต่อสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม ในทางเกษตรกรรม glyphosate มักนำไปใช้ร่วมกับสารลดแรงตึงผิว (surfactant) เช่น โพลีออกซีเอทิลีนเอมีน (polyoxyethylene amine) โพรพิลีนไกลคอล (propylene glycol) หรืออาจใช้ในรูปของเกลือไอโซโพรพิลเอมีน (isopropylamine salt) ผู้ผลิตอาจมีการปรับชนิด ความเข้มข้น หรือสารลดแรงตึงผิว อย่างไรก็ตาม ส่วนผสมหลักก็ยังคงเป็น glyphosate



ภาพประกอบ 13 สูตรโครงสร้างของ glyphosate

ที่มา : Mattos, R., Khan, S., Hussain, S., & de Alencar Simoni, J. (2017). Quantitation and Adsorption of Glyphosate Using Various Treated Clay. *Zeitschrift für Physikalische Chemie*, 231(11-12), 1815-1829.

คุณสมบัติทางกายภาพและทางเคมี

ตาราง 12 คุณสมบัติทางกายภาพและทางเคมีของ glyphosate

คุณสมบัติทางกายภาพและเคมี	glyphosate	เอกสารอ้างอิง
ลักษณะของผลึก	ผลึกสีขาว	Mensink and Janssen
กลิ่น	ไม่มีกลิ่น	(1994)
สูตรเคมี	$C_3H_8NO_5P$	Giesy, Dobson, and
น้ำหนักโมเลกุล	169.09 g mol ⁻¹	Solomon (2000)
ความสามารถในการละลายน้ำ	10,000 - 15,700 mg L ⁻¹ ที่ 25 °C	
จุดหลอมเหลว	200 - 230 °C	
ความดันไอ	2.59×10^{-5} Pa ที่ 25 °C	
ค่าคงที่ของ Henry (H)	น้อยกว่า 7×10^{-11}	Mensink and Janssen
ค่าสัมประสิทธิ์การกระจายตัว (log K _{ow})	-2.8	(1994)
ค่าสัมประสิทธิ์การดูดซับในดิน (K _{oc})	61 g (m ³) ⁻¹	
ค่าครึ่งชีวิตในน้ำ	มากกว่า 35 วัน	Kollman and Segawa
ค่าครึ่งชีวิตในดิน	ประมาณ 96 วัน	(1995)

การใช้งาน glyphosate

Glyphosate คือ สารออกฤทธิ์ในยาปราบวัชพืชที่มีการใช้กันอย่างแพร่หลายทั่วโลก โดยประเทศไทยมีการนำเข้า glyphosate และยาปราบวัชพืชที่มีส่วนผสมของ glyphosate ในปริมาณมากและมีมูลค่าการนำเข้าเป็นอันดับ 1 ในช่วงปี 2555 ถึง 2560 ดังแสดงในตาราง 13 โดย glyphosate นิยมใช้ควบคุมวัชพืชทุกชนิดรวมถึงวัชพืชในแหล่งน้ำ ใช้ฉีดพ่นหลังวัชพืชงอก (post-emergence) ในพื้นที่ทำการเกษตรและพื้นที่ไม่ได้ทำการเกษตร (Bridi et al., 2017; Hattaya et al., 2015; Matozzo et al., 2018)

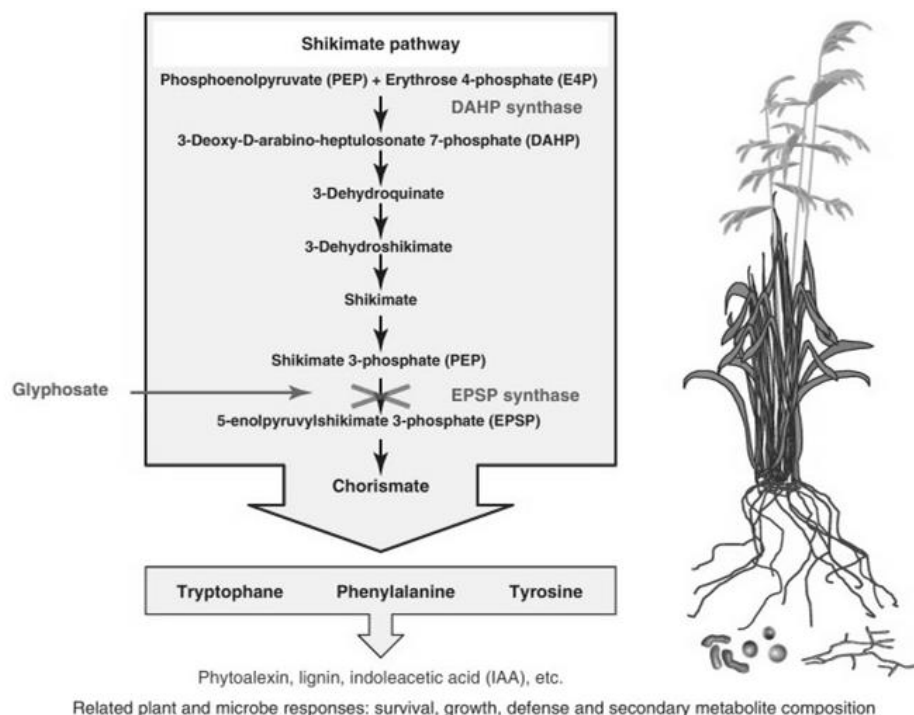
ตาราง 13 การนำเข้า glyphosate และยาปราบวัชพืชที่มีส่วนผสม glyphosate ในประเทศไทย

ปี	ปริมาณนำเข้า (กิโลกรัม)	ปริมาณสารสำคัญ (กิโลกรัม)	มูลค่าการนำเข้า
2555	40,315,427.65	19,866,793.49	อันดับ 1
2556	29,170,912.80	14,373,892.40	N/A
2557	63,296,628.00	7,217,716.59	อันดับ 1
2558	59,182,224.00	6,250,493.78	อันดับ 1
2559	764,880.00	628,803.40	อันดับ 1
2560	47,276,005.70	2,327,098,502.02	อันดับ 1

ที่มา : Bureau of agricultural plant and material control. (2018). *The summary report on import of hazardous substances*. Retrieved from Bangkok: http://www.doa.go.th/ard/index.php?option=com_content%20&view=article&id=22:stat2535&catid=29:stat&Itemid=104

กลไกการออกฤทธิ์ของ glyphosate ต่อสิ่งมีชีวิตในกลุ่มเป้าหมาย

กลไกการทำงานของ glyphosate ในการกำจัดวัชพืช (ภาพประกอบ 14) เกิดจากคุณสมบัติที่สามารถยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ 5-enolpyruvylshikimate-3-phosphate synthase (EPSPS) ในกระบวนการสังเคราะห์กรดอะมิโนที่สำคัญ 3 ชนิด คือ phenylalanine, tyrosine, และ tryptophan โดย glyphosate สามารถเข้าทำปฏิกิริยากับบริเวณ active site ของเอนไซม์ EPSPS ส่งผลให้ phosphoenolpyruvate (PEP) ซึ่งเป็นสารตั้งต้นในการสร้างกรดอะมิโนดังกล่าว ไม่สามารถเกิดปฏิกิริยากับ EPSPS ได้ ดังนั้นทำให้พืชไม่สามารถสังเคราะห์กรดอะมิโนที่มีความจำเป็นในกระบวนการดำรงชีวิตของพืชได้ (Gomes et al., 2017; Matozzo et al., 2018)



ภาพประกอบ 14 กลไกการออกฤทธิ์ของ glyphosate

ที่มา: Helander, M., Saloniemi, I., & Saikkonen, K. (2012). Glyphosate in northern ecosystems. *Trends in plant science*, 17(10), 569-574.

กลไกการออกฤทธิ์ของ glyphosate ต่อสิ่งมีชีวิตนอกกลุ่มเป้าหมาย

กลไกการออกฤทธิ์ของ glyphosate คล้ายคลึงกับยาฆ่าแมลงกลุ่มออร์แกนอโฟสเฟต และคาร์บาเมต โดยที่ในระบบประสาทของสิ่งมีชีวิต acetylcholine เป็นสารสื่อประสาทช่วยในการนำกระแสประสาทจากเซลล์ประสาทหนึ่งสู่อีกเซลล์หนึ่งโดยผ่าน synaptic cleft ในระบบประสาทส่วนกลางและระบบประสาทอัตโนมัติที่บริเวณรอยต่อระหว่างเซลล์ประสาท (nerve junction) และ ระหว่างเซลล์ในระบบกล้ามเนื้อ เมื่อ acetylcholine นำกระแสประสาทแล้ว acetylcholinesterase (AChE) ซึ่งอยู่ใน synaptic cleft จะสลาย acetylcholine เป็น choline และ acetic acid เพื่อหยุดการนำกระแสประสาท การยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ acetylcholinesterase ทำให้เกิดการสะสมของ acetylcholine ใน synaptic cleft จึงเกิดการกระตุ้นเซลล์ประสาทหรือกล้ามเนื้อนานมากขึ้น และเกิดการตายของสิ่งมีชีวิตในที่สุด

ความเป็นพิษของ glyphosate

World Health Organization and International Programme on Chemical Safety (2010) ระบุว่า glyphosate มีพิษอยู่ในระดับน้อย โดยมีค่า LC_{50} ที่ก่อให้เกิดพิษในหนูทดลองอยู่ที่ 4,230 mg/kg body weight แต่อย่างไรก็ตาม งานวิจัยอื่นๆ ได้ระบุว่า glyphosate รวมถึงยาปราบวัชพืชที่มีส่วนผสมของ glyphosate มีความเป็นพิษต่อสิ่งมีชีวิตแต่ละชนิดแตกต่างกัน ดังแสดงในตาราง 14

ตาราง 14 รายงานการศึกษาความเป็นพิษของ glyphosate และยาปราบวัชพืชที่มีส่วนผสมของ glyphosate ต่อสิ่งมีชีวิต

สิ่งมีชีวิต	ค่าความเป็นพิษ	เวลา	เอกสารอ้างอิง
Mollusks			
<i>Utterbackia imbecillis</i>	18.3 mg L ⁻¹	24 ชั่วโมง	Connors and Black (2004)
<i>Pomacea canaliculata</i> *	178.2 mg L ⁻¹	24 ชั่วโมง	Xu et al. (2017)
	176.5 mg L ⁻¹	48 ชั่วโมง	
	176.2 mg L ⁻¹	72 ชั่วโมง	
	175.1 mg L ⁻¹	96 ชั่วโมง	
Annelids			
<i>Eisenia andrei</i> *	0.66 mg cm ⁻²	72 ชั่วโมง	Piola et al. (2013)
<i>Eisenia andrei</i> *	2.939 mg cm ⁻²		
<i>Nsukkadrilus mbae</i> *	9.46 mg kg ⁻¹	72 ชั่วโมง	Stanley and Joy (2014)
<i>Lumbricus terrestris</i> *	26.804 mg L ⁻¹	21 วัน	Stellin et al. (2018)
	7.001 mg L ⁻¹	42 วัน	

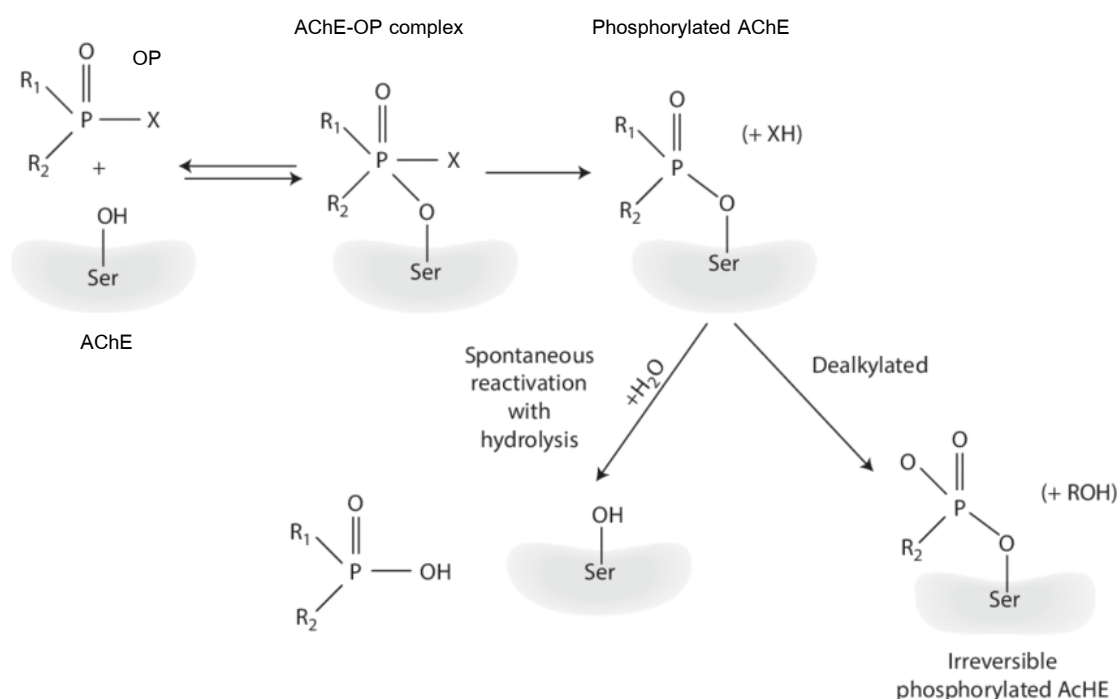
ตาราง 14 (ต่อ)

สิ่งมีชีวิต	ค่าความเป็นพิษ	เวลา	เอกสารอ้างอิง
Arthropods			
<i>Ceriodaphnia dubia</i> *	5.7 mg L ⁻¹	48 ชั่วโมง	Tsui and Chu (2004)
<i>Acanthocyclops robustus</i> *	19 mg L ⁻¹	24 ชั่วโมง	Houssou, Daguégué, and Montchowui (2017)
	23 mg L ⁻¹	48 ชั่วโมง	
<i>Eriocheir sinensis</i>	461.54	24 ชั่วโมง	Hong et al. (2017)
	97.89	48 ชั่วโมง	
Chordates			
<i>Rhinella arenarum</i>	19.4 mg L ⁻¹	96 ชั่วโมง	Brodeur, Poliserpi, and Sánchez (2014)
<i>Poecilia reticulata</i> *	12.01 mg L ⁻¹		Sadeghi and Hedayati (2014)
<i>Clarias gariepinus</i>	0.53 mg L ⁻¹		Ayanda, Oniye, Auta, and Ajibola (2015)
<i>Cyprinus carpio</i>	520.77 mg L ⁻¹		Ma and Li (2015)

* แสดงค่าความเป็นพิษที่เกิดจากยาปราบวัชพืชที่มีส่วนผสมของ glyphosate

จากตาราง 14 แสดงให้เห็นว่า ค่าความเป็นพิษของ glyphosate ต่อสิ่งมีชีวิตแต่ละชนิดมีความแตกต่างกัน ขึ้นอยู่กับความทนทานต่อสารพิษในสิ่งมีชีวิตแต่ละชนิด ช่วงเวลาที่ได้รับสาร รูปแบบการได้รับสารพิษ และส่วนผสมอื่นในยาปราบวัชพืช นอกจากนี้ยังพบว่า สิ่งมีชีวิตแต่ละชนิดมีการตอบสนองต่อ glyphosate ที่แตกต่างกัน จากงานวิจัยของ M.-H. Li et al. (2017); Xu et al. (2017) และ Sánchez et al. (2017) ที่ศึกษาพิษของยาปราบวัชพืชที่มีส่วนผสมของ glyphosate ต่อปลาทอง (*Carassius auratus*) หอยทากน้ำจืด (*P. canaliculata*) และปลา *Jenynsia multidentata* พบว่า glyphosate สามารถชักนำให้เกิด ROS ซึ่งเป็นสารอนุมูลอิสระที่มีความไวต่อการเกิดปฏิกิริยาเคมีกับสารชีวโมเลกุลในสิ่งมีชีวิต โดย ROS ในปริมาณมากสามารถสร้างความเสียหายต่อดีเอ็นเอในเซลล์เม็ดเลือดของปูน้ำจืด (*E. sinensis*) รวมถึงเซลล์เม็ดเลือดแดงและเซลล์เหงือกของปลา *Prochilodus lineatus* (Cavalcante, Martinez, & Sofia, 2008; Hong et al., 2017; Moreno, Sofia, & Martinez, 2014) นอกจากนี้ ROS ในปริมาณมากยังส่งผลต่อกิจกรรมของเอนไซม์ SOD เอนไซม์ CAT และเอนไซม์ GST เช่น งานวิจัยของ Héritier, Duval, Galinier, Meistertzheim, and Verneau (2017) ศึกษาผลของยาปราบวัชพืชที่มีส่วนผสมของ glyphosate ต่อกิจกรรมของเอนไซม์ CAT ในเต่า (*Trachemys scripta elegans*) พบว่า กิจกรรมของเอนไซม์ CAT ของเต่าที่ได้รับยาปราบวัชพืชที่มีส่วนผสมของ glyphosate เป็นเวลา 96 ชั่วโมง เพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ 0.05 ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยของ Hattaya et al. (2015) ที่ศึกษาผลของยาปราบวัชพืชที่มีส่วนผสมของ glyphosate ต่อการเปลี่ยนแปลงกิจกรรมของเอนไซม์ CAT ในไรแดง (*Moina macrocopa*) ที่เวลา 48 ชั่วโมง พบว่า กิจกรรมของเอนไซม์ CAT เพิ่มขึ้นเมื่อความเข้มข้นของยาปราบวัชพืชที่มีส่วนผสมของ glyphosate เพิ่มขึ้น อย่างไรก็ตาม งานวิจัยของ Mottier et al. (2015) ได้รายงานว่ เมื่อหอยนางรม (*Crassostrea gigas*) ได้รับ glyphosate เป็นเวลา 7, 14, 58 และ 56 วัน ส่งผลให้เกิดการเปลี่ยนแปลงของกิจกรรมของเอนไซม์ CAT ไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ 0.05 เมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยของ Dai, Hu, Tang, Li, and Li (2016) และ Sobjak et al. (2017) ที่พบว่า เมื่อหนู Sprague Dawley และปลา *Rhamdia quelen* ได้รับ glyphosate ส่งผลให้เกิดการเปลี่ยนแปลงของกิจกรรมของเอนไซม์ CAT ไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ 0.05 เมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม ดังนั้นจากงานวิจัย จึงสรุปได้ว่า glyphosate สามารถชักนำให้เกิด ROS ในสิ่งมีชีวิตซึ่งส่งผลต่อความเสียหายต่อดีเอ็นเอ แต่อย่างไรก็ตาม พบว่า glyphosate ทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงกิจกรรมของเอนไซม์ CAT ซึ่งเป็นเอนไซม์ที่เกี่ยวข้องกับการกำจัดสารอนุมูลอิสระในแต่ละสิ่งมีชีวิตแตกต่างกัน

เนื่องจาก glyphosate เป็นสารออกฤทธิ์ในกลุ่ม organophosphorus ซึ่งสามารถใช้ หมู่ฟอสเฟตในโมเลกุลทำพันธะกับบริเวณ esteric site ของเอนไซม์ AChE ส่งผลให้เกิด การเปลี่ยนแปลงกิจกรรมของเอนไซม์ AChE โดยงานวิจัยของ Matozzo et al. (2018) ได้ศึกษา การเปลี่ยนแปลงกิจกรรมของเอนไซม์ AChE ในเหงือกของหอย *Mytilus galloprovincialis* พบว่า เมื่อหอยได้รับ glyphosate เป็นเวลา 7 วัน ทำให้กิจกรรมของเอนไซม์ AChE (ภาพประกอบ 15) ลดลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ 0.05 เมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม แต่เมื่อหอยได้รับ glyphosate เป็นเวลา 14 วัน พบว่า ระดับของกิจกรรมของเอนไซม์ AChE กลับเพิ่มสูงขึ้นอย่างมีนัยสำคัญ ทางสถิติที่ 0.05 เมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม Matozzo et al. (2018) ได้ตั้งสมมติฐานว่า การเพิ่มขึ้น ของกิจกรรมของเอนไซม์ AChE อาจเกิดจากการตอบสนองต่อการลดลงของกิจกรรมของเอนไซม์ AChE ในช่วง 7 วันแรก และเมื่อหอยได้รับ glyphosate เป็นเวลา 21 วัน พบว่า ระดับของกิจกรรม ของเอนไซม์ AChE กลับลดลงอีกครั้งอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ 0.05 เมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยของ Sánchez et al. (2017) ที่ศึกษาการเปลี่ยนแปลงกิจกรรมของ เอนไซม์ AChE ในกล้ามเนื้อของปลา *J. multidentata* พบว่า เมื่อปลาได้รับยาปราบวัชพืชที่มี ส่วนผสมของ glyphosate เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ส่งผลให้กิจกรรมของเอนไซม์ AChE ลดลง อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ 0.05 เมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม แต่เมื่อปลาได้รับยาปราบวัชพืชที่มี ส่วนผสมของ glyphosate เป็นเวลา 96 ชั่วโมง ส่งผลให้กิจกรรมของเอนไซม์ AChE เพิ่มขึ้นอย่าง มีนัยสำคัญทางสถิติที่ 0.05 เมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม Sánchez et al. (2017) อธิบายไว้ว่า การเพิ่มขึ้นของกิจกรรมของเอนไซม์ AChE อาจเป็นเพราะว่า ปลาเกิดภาวะเครียดจากการได้รับ สารพิษจึงแสดงพฤติกรรมการหลีกหนีและว่ายน้ำเร็ว ทำให้ระดับกิจกรรมของเอนไซม์ AChE เพิ่มขึ้น ดังนั้นจึงสรุปได้ว่า เวลาที่สิ่งมีชีวิตได้รับ glyphosate มีผลต่อการเพิ่มหรือลดของ กิจกรรมของเอนไซม์ AChE



ภาพประกอบ 15 การสร้างพันธะระหว่างสารออกฤทธิ์ในกลุ่ม organophosphorus (OP) กับบริเวณ esteric site (ser-OH) ของเอนไซม์ AChE

ที่มา: Chandra, R., & Kumar, V. (2016). Biotransformation and Biodegradation of Organophosphates and Organohalides. *Environmental Waste Management*, 475.

งานวิจัยของ Stanley and Joy (2014) ได้ศึกษาการเปลี่ยนแปลงพยาธิสภาพของไส้เดือนดิน (*N. mbae*) พบว่า เมื่อได้รับยาปราบวัชพืชที่มีส่วนผสมของ glyphosate ความเข้มข้น 13 - 207 mg kg⁻¹ เป็นระยะเวลา 24, 48, 72 และ 96 วัน ทำให้กล้ามเนื้อตามยาว (longitudinal muscle) และกล้ามเนื้อวง (circular muscle) สลายตัว (degeneration) และแยกออกจากกัน นอกจากนี้ ยังทำให้เกิดความเสียหายบริเวณเนื้อเยื่อผิวหนัง Stanley and Joy (2014) อธิบายไว้ว่าการเปลี่ยนแปลงพยาธิสภาพที่เกิดขึ้นเป็นผลจากการสร้าง ROS ในปริมาณมาก ส่งผลให้ ROS ทำปฏิกิริยากับสารชีวโมเลกุลที่เยื่อหุ้มเซลล์และในเซลล์ นอกจากนี้ งานวิจัยของ Ma and Li (2015) ได้ศึกษาผลของยาปราบวัชพืชที่มีส่วนผสมของ glyphosate ความเข้มข้น 104.15 mg L⁻¹ ต่อเนื้อเยื่อตับ ม้าม และไตของปลา *C. carpio* ที่เวลา 168 ชั่วโมง พบว่า นิวเคลียสของเซลล์ตับ

เกิดการบวมและโครมาตินอัดแน่นเป็นแผ่นติดอยู่กับผนังของนิวเคลียส (nuclear pyknosis) ส่วนในเนื้อเยื่อไตพบลักษณะอาการบวมเฉพาะที่ของเซลล์ผิวและเซลล์ที่อยู่ใต้เซลล์ผิวเนื่องจากมีการสะสมของน้ำภายในเซลล์มาก และในเนื้อเยื่อ้ามพบการตายของเซลล์แบบ necrosis และ nuclear pyknosis อย่างไรก็ตามงานวิจัยของ M.-H. Li et al. (2017) ได้ศึกษาผลของยาปราบวัชพืชที่มีส่วนผสมของ glyphosate ต่อเนื้อเยื่อสมอง ตับ และไตของปลาทอง (*C. auratus*) พบว่ายาปราบวัชพืชที่มีส่วนผสมของ glyphosate ไม่มีผลต่อการเปลี่ยนแปลงเนื้อเยื่อสมองและตับ แต่มีผลต่อการสร้าง hyaline cast ในเนื้อเยื่อไต ดังนั้นจึงสรุปได้ว่า glyphosate สามารถชักนำให้เกิดความเสียหายในเนื้อเยื่อของสิ่งมีชีวิตได้ในหลายอวัยวะ ขึ้นอยู่กับชนิดชนิดของสิ่งมีชีวิต ระดับความเข้มข้นของสาร และเวลาที่สิ่งมีชีวิตสัมผัสกับสาร

การปนเปื้อนของ glyphosate ในระบบนิเวศ

การใช้ยาปราบวัชพืชในทางเกษตรกรรม สารเหล่านี้ส่วนใหญ่จะมีการกระจายลงสู่สิ่งแวดล้อม มีเพียงส่วนน้อยเท่านั้นที่มีผลโดยตรงกับวัชพืช (Pimentel, 1995) เนื่องจากโครงสร้างทางเคมีของ glyphosate มีขั้วที่เกิดจากหมู่ฟอสเฟตและคาร์บอกซิลจึงสามารถละลายน้ำได้ดี นอกจากนี้ glyphosate ยังสามารถจับกับไอออนของโลหะที่เป็นสารอาหารสำคัญในดินได้ดี ส่งผลให้สารอาหารในดินลดลง จากรายงานของ Berman, Marino, Quiroga, and Zagarese (2018) ที่ศึกษาการตกค้างของ glyphosate ในแหล่งน้ำของประเทศอาร์เจนตินาพบว่า glyphosate และสารเมตาบอไลต์ของ glyphosate ปนเปื้อนในบริเวณผิวน้ำสูงถึง $4.52 \mu\text{g L}^{-1}$ และ $0.07 \mu\text{g L}^{-1}$ ตามลำดับ งานวิจัยของ Silva et al. (2018) รายงานการพบ glyphosate บริเวณผิวดินใกล้แหล่งน้ำของประเทศในทวีปยุโรปสูงถึง 2 mg kg^{-1} และยังตรวจพบสารเมตาบอไลต์ของ glyphosate ถึงร้อยละ 42 ของพื้นที่ทำการศึกษา ในปีเดียวกัน Rendón-von Osten and Dzul-Caamal (2017) ยังได้ศึกษาการปนเปื้อนของ glyphosate ในแหล่งน้ำและปัสสาวะของเกษตรกรในประเทศเม็กซิโกพบว่า glyphosate ปนเปื้อนอยู่ในน้ำบาดาลถึง $1.42 \mu\text{g L}^{-1}$ และพบตกค้างในปัสสาวะของเกษตรกรสูงถึง $0.47 \mu\text{g L}^{-1}$ ส่วนงานวิจัยของ Van Stempvoort et al. (2016) พบการตกค้างของ glyphosate ในแหล่งของประเทศแคนาดาสูงถึง 663 ng L^{-1} สำหรับในประเทศไทย Jantawongsri et al. (2015) ได้ศึกษาการตกค้างของ glyphosate ในเนื้อเยื่อตับของกบนา (*Fejervarya limnocharis*) บริเวณที่มีการทำเกษตรกรรมในจังหวัดน่านพบว่า บริเวณที่มีการปนเปื้อนของ glyphosate มีความสัมพันธ์กับลักษณะพยาธิสภาพที่เกิดขึ้นในเนื้อเยื่อตับอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ 0.05

ไส้เดือนน้ำ

การจัดจำแนกชั้นทางอนุกรมวิธาน

Kingdom Animalia

Phylum Annelida

Class Clitellata

Order Oligochaeta

Family Tubificidae

Genus *Tubifex*

Species *Tubifex tubifex* (Müller, 1774)

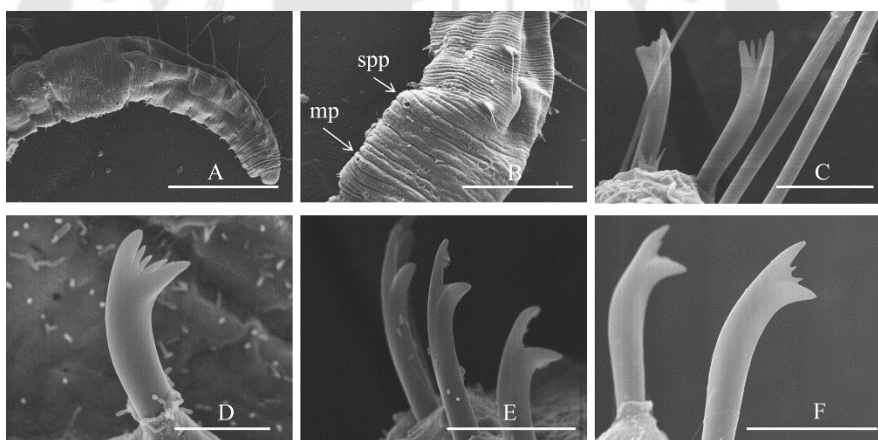
ลักษณะทั่วไปของไส้เดือนน้ำ

ไส้เดือนน้ำ (ภาพประกอบ 16) เป็นสิ่งมีชีวิตในกลุ่มหนอนปล้องที่มี chaetae โดย chaetae มักมีส่วนปลายที่แตกเป็นสองแฉก (ภาพประกอบ 17 E) หรือเป็นแบบขนนก (ภาพประกอบ 17 D) ไส้เดือนน้ำมี chaetae ที่ยาวซึ่งแตกต่างจาก chaetae ของไส้เดือนดินที่ยื่นออกจากผิวเพียงเล็กน้อย แต่ละข้างของปล้องลำตัวมี setal sac ที่สร้าง chaetae ออกมาเป็นกลุ่ม (ภาพประกอบ 17 C) รวม 4 กลุ่ม อยู่ด้านท้อง 2 กลุ่ม (ภาพประกอบ 17 E, F) และอยู่ด้านหลังอีก 2 กลุ่ม (ภาพประกอบ 17 D) บริเวณส่วนหน้าของลำตัว (anterior region) พบช่องเปิดของอวัยวะสืบพันธุ์ (ภาพประกอบ 17 B, mp = male pore & spp = Spermathecal pore) ส่วนผิวลำตัวของไส้เดือนน้ำมีลักษณะบางและใสจนสามารถมองเห็นทางเดินอาหารและหลอดเลือดได้ชัดเจน ตัวเต็มวัยมีขนาดประมาณ 1 นิ้ว เส้นผ่านศูนย์กลางลำตัวประมาณ 1 มิลลิเมตร ลำตัวมีสีแดงอ่อนเนื่องจาก erythrocrurin ซึ่งเป็นรงควัตถุในการลำเลียงออกซิเจน (Peng, Wang, & Cui, 2017)



ภาพประกอบ 16 ไข่เดือนน้ำ (*T. tubifex*)

ที่มา : taylor, K. (March 14, 2006). *T. tubifex* 's characteristics. Retrieved from https://www.naturepl.com/stock-photo/tubifex-worm-tubificidae/search/detail-0_01133190.html



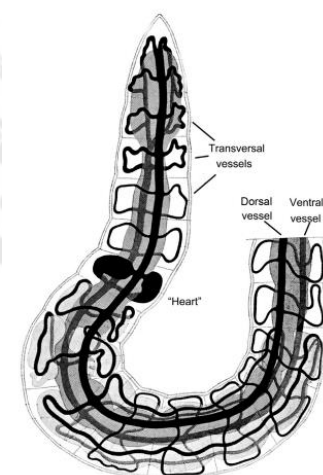
ภาพประกอบ 17 ลักษณะภายนอกบางประการของ *T. tubifex*

ภาพ A: lateral view of anterior body; ภาพ B: mp = male pore & spp = spermathecal pore; ภาพ C: pectinate chaetae; ภาพ D: dorsal pectinate chaeta; ภาพ E & F: ventral chaetae (scale bars: A = 1000 μ m; B = 500 μ m; D = 10 μ m; C, E, F. = 20 μ m)

ที่มา : Peng, Y., Wang, H., & Cui, Y. (2017). Four species of *Tubifex* Lamarck (Annelida: Oligochaeta: Naididae) from Tibet, China. *Zootaxa*, 4320(2), 366-378.

สรีรวิทยาบางประการของไส้เดือนน้ำ

ไส้เดือนน้ำมีระบบทางเดินอาหารสมบูรณ์ โดยมีช่องปากเรียกว่า prostomium อยู่ทางด้าน anterior region ของลำตัวและมีรูทวาร (anus) อยู่ทางด้าน posterior region บริเวณปล้องสุดท้ายของลำตัว (pygidium) ทางเดินอาหารแบ่งได้เป็นส่วน prostomium ซึ่งเชื่อมต่อกับคอหอย (pharynx) ประมาณปล้องที่ 2 ถึง 3 ของลำตัว คอหอยเป็นชั้นกล้ามเนื้อหนาเชื่อมต่อกับหลอดอาหารในปล้องที่ 4 ถึง 5 ของลำตัว โดยสามารถพบ pharyngeal glands บริเวณหลอดอาหารทำหน้าที่หลั่งน้ำย่อย ระบบหมุนเวียนเลือดแบบปิด ประกอบด้วยหลอดเลือดใหญ่ 2 หลอด คือ dorsal และ ventral vessel ขนานไปกับลำตัวของไส้เดือนน้ำและแตกแขนงออกเป็น transverse vessel ในแต่ละปล้อง ดังแสดงในภาพประกอบ 18 การบีบตัวของหัวใจเทียม (pseudo heart) ที่บริเวณ anterior region ของลำตัวทำให้หลอดเลือดลำเลียงเลือดไปยังส่วนต่าง ๆ ของร่างกาย โดยการแลกเปลี่ยนแก๊สเกิดขึ้นบริเวณผิวลำตัว ไส้เดือนน้ำมีปมประสาทขนาดใหญ่ทำหน้าที่คล้ายสมองอยู่บริเวณ prostomium โดยปมประสาทขนาดใหญ่ประกอบด้วยเส้นใยประสาทจำนวนมาก โดยปมประสาทมีแขนงทอดยาวไปตลอดลำตัวตั้งแต่ปล้องที่สองจนถึงปล้องสุดท้ายของลำตัว (Thorp & Rogers, 2014)



ภาพประกอบ 18 ระบบหมุนเวียนเลือดแบบปิดของ *T. tubifex*

ที่ ม า : Thorp, J. H., & Rogers, D. C. (2014). Thorp and covich's freshwater invertebrates: ecology and general biology (Vol. 1): Elsevier.

การกระจายตัวและความสำคัญของไส้เดือนน้ำในระบบนิเวศ

ไส้เดือนน้ำมีการแพร่กระจายอยู่ทั่วไปในระบบนิเวศแหล่งน้ำจืด นิยมใช้ในการทดสอบความเป็นพิษ และบ่งชี้คุณภาพน้ำ เนื่องจากมีความทนทานต่อสารพิษและเพาะเลี้ยงได้ง่ายในห้องปฏิบัติการ (Bettinetti et al., 2003; Lagauzère et al., 2009; Paris-Palacios et al., 2010; Pasteris et al., 2003) ในประเทศไทยมีรายงานการพบไส้เดือนน้ำอยู่ทั่วไปในระบบนิเวศแหล่งน้ำจืดและนาข้าว (Naritsara et al., 2013; Sakset et al., 2012)หน้าที่เชิงระบบนิเวศที่สำคัญของไส้เดือนน้ำ คือ เป็นผู้ย่อยสลายอินทรีย์สาร หมุนเวียนตะกอนดิน เพิ่มการไหลเวียนของออกซิเจนในพื้นดินได้แหล่งน้ำและเป็นแหล่งอาหารที่สำคัญของสิ่งมีชีวิตในระบบนิเวศน้ำจืด (Paris-Palacios et al., 2010)

การใช้ไส้เดือนน้ำในการทดสอบความเป็นพิษ

จากรายงานการวิจัยพบว่า ไส้เดือนน้ำมีความทนทานต่อสารพิษและเพาะเลี้ยงได้ง่ายในห้องปฏิบัติการ จึงนิยมนำมาใช้ในการทดสอบความเป็นพิษและบ่งชี้คุณภาพน้ำ (Bettinetti et al., 2003; Lagauzère et al., 2009; Paris-Palacios et al., 2010; Pasteris et al., 2003) งานวิจัยของ Yahia Y Mosleh, Paris-Palacios, Couderchet, Biagianti-Risbourg, and Vernet (2005) และ Yahia Youssef Mosleh, Mofeed, Afifi, and Almaghrabi (2014) พบว่า เมื่อ *T. tubifex* ได้รับยาฆ่าเชื้อรา fenhexamid และ pyrimethinal เป็นเวลา 2, 4 และ 7 วัน ส่งผลให้กิจกรรมของเอนไซม์ CAT เพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ 0.05 เมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม และกิจกรรมของเอนไซม์ CAT ยังเพิ่มขึ้นเมื่อ *T. tubifex* ได้รับสารนานขึ้น นอกจากนี้งานวิจัยของ Yahia Y Mosleh et al. (2007) ยังพบว่า chitosan สามารถชักนำให้กิจกรรมของเอนไซม์ CAT ใน *T. tubifex* เพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ 0.05 เมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม อย่างไรก็ตามงานวิจัยของ Di, Liu, Cheng, et al. (2017) พบว่า กิจกรรมของเอนไซม์ CAT ลดลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ 0.05 เมื่อ *T. tubifex* ได้รับยาฆ่าเชื้อรา metalaxyl และ metalaxyl-M ที่เวลา 4 และ 28 วัน Di, Liu, Cheng, et al. (2017) อธิบายไว้ว่า การลดลงของกิจกรรมเอนไซม์ CAT เป็นเพราะสิ่งมีชีวิตสามารถปรับตัวเพื่อตอบสนองต่อสภาวะเครียด ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยของ Di, Liu, Tian, et al. (2017) ที่รายงานว่า เมื่อ *T. tubifex* ได้รับ DDT เป็นเวลา 1, 5 และ 9 วัน ส่งผลให้กิจกรรมของเอนไซม์ CAT ลดลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ 0.05 เมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม แต่กิจกรรมของเอนไซม์ CAT กลับเพิ่มขึ้นเมื่อเวลาผ่านไป 14 วัน ซึ่งอาจเป็นไปได้ว่าการเปลี่ยนแปลงกิจกรรมของเอนไซม์ CAT ขึ้นอยู่กับช่วงเวลา que สิ่งมีชีวิตได้รับสารด้วย นอกจากนี้ Misra, Babu, Ray, and Hans (2002) พบว่า UV-B radiation สามารถยับยั้งกิจกรรมของเอนไซม์

AChE ใน *T. tubifex* ได้ ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยของ Kiliç and Kiliç (2011) ที่ศึกษากิจกรรมของ เอนไซม์ AChE ใน *T. tubifex* เมื่อได้รับ thallium พบว่า กิจกรรมของเอนไซม์ AChE ลดลงเมื่อ ความเข้มข้นของ thallium เพิ่มขึ้น ดังนั้นจึงสรุปได้ว่า กิจกรรมของเอนไซม์ CAT และ AChE เป็น ตัวบ่งชี้ทางชีวภาพที่เหมาะสมในการประเมินความเป็นพิษของสารเคมีต่อ *T. tubifex* อย่างไรก็ตาม ในปัจจุบันพบว่า ยังไม่มีการศึกษาการเปลี่ยนแปลงพยาธิสภาพเนื้อเยื่อของ *T. tubifex* เมื่อได้รับ สารเคมีและข้อมูลความเป็นพิษของ imidacloprid และ glyphosate ต่อ *T. tubifex* ในปัจจุบันมีอยู่ อย่างจำกัด

เทคนิคการเตรียมสไลด์ถาวรเนื้อเยื่อสัตว์เพื่อศึกษาภายใต้กล้องจุลทรรศน์ใช้แสง

หลักการพื้นฐานในการเตรียมสไลด์ถาวรเนื้อเยื่อสัตว์สามารถสรุปได้ 7 ขั้นตอน (Humason, 1962; Siwaporn & Paisarn, 2012)

การดองตัวอย่าง (specimen fixation)

เนื่องจากเมื่อสิ่งมีชีวิตตาย องค์ประกอบต่าง ๆ ภายในเซลล์จะเริ่มถูกทำลายโดย เอนไซม์ภายในเซลล์ เรียกว่า autolysis ของเหลวภายในเซลล์จะเริ่มรั่วออกจากเซลล์ เยื่อหุ้มเซลล์ เริ่มฉีกขาด เป็นผลให้แบคทีเรียหรือเชื้อราเข้าไปย่อยสลายเซลล์ได้ ดังนั้นจึงต้องใช้น้ำยาคงสภาพ (fixative) ที่สามารถรักษาสภาพของเซลล์ไว้ได้ โดยทำให้โครงสร้างของเซลล์ไม่ถูกทำลายและหยุด การทำงานของเอนไซม์ต่าง ๆ เพื่อรักษาสภาพเนื้อเยื่อให้มีโครงสร้างใกล้เคียงกับสภาพที่มีชีวิต มากที่สุด คุณสมบัติของน้ำยาคงรูปที่ดีคือ ต้องแทรกซึมเนื้อเยื่อได้รวดเร็ว ป้องกันการเกิด autopsy ทำให้ส่วนประกอบภายในเซลล์จับตัวกันเป็นก้อนแข็งไม่ละลายน้ำ ป้องกันเนื้อเยื่อไม่ให้ บิดงอ และทำให้ส่วนต่าง ๆ ภายในเซลล์สีขึ้น โดยทั่วไปแล้วจะใช้สารเคมีในกลุ่ม aldehyde ซึ่งมี คุณสมบัติในการเชื่อมต่อไปรตีนและองค์ประกอบต่าง ๆ ของเซลล์เข้าด้วยกัน นอกจากนี้ยังนิยม ใช้ alcohol และ acetic acid เป็นตัวที่ทำให้โปรตีนรวมตัวกันตกตะกอน ในทางปฏิบัติมักไม่ใช้ เพียงสารชนิดเดียว แต่จะใช้สารผสมกันเพื่อให้การตรึงเนื้อเยื่อทำได้ดีขึ้น โดย acetic acid เป็น สารที่ช่วยให้ fixative ชนิดอื่น ๆ สามารถซึมเข้าสู่เนื้อเยื่อของสิ่งมีชีวิตได้เร็วขึ้นและทำให้เนื้อเยื่อ เกิดความอ่อนนุ่ม ในขณะที่ alcohol มีส่วนช่วยตรึงให้เนื้อเยื่อแข็งและหด ดังนั้น fixative จึงมักมี ส่วนผสมของสารมากกว่าหนึ่งชนิดเพื่อช่วยรักษาสภาพของเนื้อเยื่อที่ต้องการศึกษาให้มีความ สมบูรณ์ของโครงสร้างมากที่สุด ในการย้อมเนื้อเยื่อสัตว์ที่มีลักษณะอ่อนนุ่มมักใช้ Bouin's solution หรือ Bouin's fixative ซึ่งเป็นน้ำยาคงสภาพที่ประกอบด้วยสารเคมี 3 ชนิดด้วยกัน คือ formaldehyde เป็นตัวช่วยคงสภาพไฮโดรฟลาสซึม picric acid ทำให้ไฮโดรฟลาสซึมตกตะกอน

คงสภาพโครมาติน ทำให้เนื้อเยื่อนิ่มและหดตัว และ acetic acid ที่ช่วยให้สารชนิดอื่น ๆ สามารถซึมเข้าสู่เนื้อเยื่อได้เร็วขึ้น รวมทั้งช่วยให้เนื้อเยื่อขยายขนาดให้ใกล้เคียงขนาดเดิมเนื่องจากการหดตัวเมื่อได้รับกรดฟิคริก แต่อย่างไรก็ตามการคงตัวอย่างนานเกินไปใน fixative ที่มีส่วนผสมของ formalin (40% formaldehyde) ทำให้เกิดตะกอนสีน้ำตาลในเนื้อเยื่อเรียกว่า formalin pigment ซึ่งเกิดจากการทำพันธะกันของ formalin และ hemoglobin ซึ่ง formalin pigment ที่เกิดขึ้นนั้นอาจทำให้เกิดความผิดพลาดในการแปลผลทางพยาธิสภาพของเนื้อเยื่อได้

การดึงน้ำออกจากเนื้อเยื่อ (tissue dehydration)

การดึงน้ำออกจากเนื้อเยื่อมีจุดประสงค์เพื่อให้สารเคมีอื่นเข้าไปแทนที่ของเหลวภายในเซลล์ ทำให้เนื้อเยื่อคงรูปมากขึ้นก่อนนำเนื้อเยื่อไปตัดเป็นชิ้นบาง ประกอบด้วย 4 ขั้นตอนที่สำคัญ คือ

1. การล้าง fixative (tissue washing) โดยเปิดน้ำให้ไหลผ่านตัวอย่างตลอดจนสีของ fixative ละลายออกจากชิ้นตัวอย่างจนหมด

2. การดึงน้ำออกจากเนื้อเยื่อ (tissue dehydration) เพื่อให้สารอื่นเข้าไปแทนที่น้ำในเนื้อเยื่อ ซึ่งสารชนิดนี้ไม่สามารถละลายน้ำได้จึงต้องดึงน้ำออกจากเนื้อเยื่อออกให้หมด โดยทั่วไปจะใช้แอลกอฮอล์ เนื่องจากมีคุณสมบัติในการดึงน้ำออกได้ดีและไม่ทำให้เนื้อเยื่อแข็งจนเกินไป เนื้อเยื่อจะต้องผ่านแอลกอฮอล์ระดับความเข้มข้นต่ำไปสูงตามลำดับ เพื่อป้องกันไม่ให้เนื้อเยื่อเกิดความเสียหายจากการหดตัวอย่างฉับพลัน

3. การทำเนื้อเยื่อให้ใส (tissue clearing) เป็นการใส่สารเคมีที่จะไปแทนที่แอลกอฮอล์และเป็นตัวนำในการพาสารฝังเนื้อเยื่อเข้าสู่ภายในเซลล์ โดยทั่วไปนิยมใช้ไซลีน (xylene) แต่อย่างไรก็ตามการแช่เนื้อเยื่อในไซลีนนานเกินไปจะทำให้เนื้อเยื่อหดตัวและแข็งเกินไป

4. การแทนที่ด้วยพาราฟฟิน (paraffin infiltration) เป็นขั้นตอนที่ช่วยเสริมสร้างให้เซลล์มีความแข็งแรงอย่างสม่ำเสมอเพื่อให้ง่ายต่อการตัดเนื้อเยื่อออกเป็นชิ้นบาง ๆ โดยทั่วไปนิยมใช้พาราฟฟิน (paraffin) นำไปหลอมเหลวที่อุณหภูมิต่ำกว่า 60 องศาเซลเซียส เพื่อป้องกันการเดือดของพาราฟฟินจนเกิดฟองอากาศ รวมถึงป้องกันการเสียหายของเนื้อเยื่อจากความร้อนที่สูงเกินไป และควรหลอมเหลวเป็นเวลาอย่างน้อย 24 ชั่วโมง เพื่อให้ฟองอากาศเดิมที่มีอยู่ในพาราฟฟินลอยขึ้นมาสัมผัสกับอากาศภายนอก โดยพาราฟฟินที่ผ่านการหลอมเหลวแล้วจะเรียกว่าพาราพลาสต์ (paraplast) หากนำพาราพลาสต์มาใช้เลยอาจทำให้ฟองอากาศไปขัดขวาง

การแทนที่ของพาราฟลาสต์ในเนื้อเยื่อได้ ส่งผลให้เนื้อเยื่อมีความแข็งแรงไม่สม่ำเสมอและทำให้การตัดเนื้อเยื่อเป็นชิ้นบาง ๆ นั้นไม่สำเร็จได้

การฝังเนื้อเยื่อในพาราฟฟิน (tissue embedding)

หลังจากการแทนที่ของเหลวในเซลล์ด้วยพาราฟลาสต์แล้ว เนื้อเยื่อจะถูกนำมาฝังในแม่พิมพ์ (mold) ที่มีพาราฟลาสต์อยู่ จากนั้นทำให้พาราฟลาสต์รอบเนื้อเยื่อเย็นลงจนแข็งตัวเป็นพาราฟฟินอีกครั้ง โดยสิ่งที่ต้องระวังในขั้นตอนนี้คือ การเกิดฟองอากาศรอบ ๆ ชิ้นตัวอย่าง เนื่องจากฟองอากาศจะไปมีผลทำให้เนื้อเยื่อขาดในขั้นตอนการตัดเนื้อเยื่อออกเป็นชิ้นบาง ๆ ได้

การตัดเนื้อเยื่อ (tissue sectioning)

การตัดเนื้อเยื่อออกเป็นชิ้นบาง ๆ เพื่อให้ง่ายต่อการศึกษาด้วยกล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสง โดยเริ่มต้นจากการนำชิ้นพาราฟฟินที่มีเนื้อเยื่อฝังอยู่ออกจากแม่พิมพ์ จากนั้นนำมาตัดตกแต่งให้พาราฟฟินรอบชิ้นเนื้อเยื่อมีขนาดที่เสมอกันเพื่อให้ยึดติดกับบล็อกของเครื่องตัดเนื้อเยื่อหรือไมโครโทมได้ (microtome) โดยการตัดชิ้นเนื้อเยื่อนั้นควรตัดให้มีความบางอยู่ที่ 8 - 10 ไมครอน เพื่อให้ได้ชิ้นเนื้อเยื่อที่บาง ย้อมติดสีได้ชัดเจน และง่ายต่อการศึกษารายละเอียดของเซลล์ นอกจากนี้ยังต้องคำนึงถึงความคมของใบมีดที่ใช้ตัดเนื้อเยื่อ หากใบมีดไม่มีความคมเพียงพออาจทำให้เนื้อเยื่อที่ตัดออกมานั้นหนาและเกิดรอยฉีกในเนื้อเยื่อ ทำให้ยากต่อการศึกษาและการแปลผลทางพยาธิสภาพเนื้อเยื่อ และหลังจากตัดเนื้อเยื่อได้เป็นชิ้นบาง 8-10 ไมครอนแล้ว นำแผ่นเนื้อเยื่อ (section) มาติดลงบนสไลด์ โดยระวังไม่ให้ section เกิดการพับหรือซ้อนทับกัน

การย้อมสี (staining)

การย้อมสีเป็นขั้นตอนการทำให้เนื้อเยื่อที่ต้องการศึกษาดูดสี เพื่อให้ง่ายต่อการแยกองค์ประกอบภายในเซลล์ โดยประกอบด้วยขั้นตอนดังนี้

1. การนำพาราฟฟินออกจาก section (depaffinization) เป็นการแช่สไลด์ในไซลีนเพื่อให้ไซลีนละลายพาราฟฟินออกและคงเหลือเฉพาะชิ้นเนื้อเยื่อที่ติดอยู่บนสไลด์

2. การเติมน้ำเข้าในเซลล์ (hydration) นำสไลด์ที่มีชิ้นเนื้อเยื่อติดอยู่ไปผ่านแอลกอฮอล์จากความเข้มข้น 100 เปอร์เซ็นต์ จนถึงความเข้มข้น 70 เปอร์เซ็นต์ ทั้งนี้เพราะสารละลายสีส่วนใหญ่ใช้น้ำเป็นตัวทำละลาย แต่อย่างไรก็ตามหากสารละลายสีชนิดใดที่มีแอลกอฮอล์เป็นตัวทำละลายอาจข้ามขั้นตอนนี้ไปได้

3. การย้อมสีแรก (primary staining) ส่วนใหญ่เป็นการย้อมสีที่มีประจุบวก ซึ่งจะไปติดองค์ประกอบของเซลล์ที่มีประจุลบ เช่น นิวเคลียส นิวคลีโอลัส เป็นต้น หลังจากนั้นต้องล้างสีย้อมส่วนเกินออกด้วยน้ำประปา เพราะสีย้อมชนิดนี้จะละลายได้ในน้ำ ล้างจนกว่าน้ำที่ล้างไม่มีสีย้อมละลายออกมา เช่น การย้อมด้วย hematoxylin ซึ่งเป็นสีย้อมที่มีประจุบวกอันเนื่องมาจากการมีอุมิเนียมไอออนอยู่ในโมเลกุล (hematein-Al³⁺ complex)

4. การย้อมสีที่สอง (counterstaining) ส่วนใหญ่เป็นการย้อมสีที่มีประจุลบ ซึ่งจะไปติดองค์ประกอบของเซลล์ที่มีประจุบวก เช่น โปรตีนบางชนิดในไซโตพลาสซึมของเซลล์ รวมถึงพวก acidophilic granules ต่าง ๆ หลังจากนั้นต้องล้างสีย้อมส่วนเกินออกด้วย เช่น การย้อมสี eosin ซึ่งเป็นสีย้อมที่มีประจุลบอันเนื่องมาจากการมีหมู่ฟังก์ชันคาร์บอกซิล (-COOH) ภายในโมเลกุล และจะต้องล้างสีส่วนเกินออกด้วยแอลกอฮอล์ 95 เปอร์เซ็นต์ เพราะสีย้อมชนิดนี้ใช้แอลกอฮอล์ 95 เปอร์เซ็นต์เป็นตัวทำละลาย

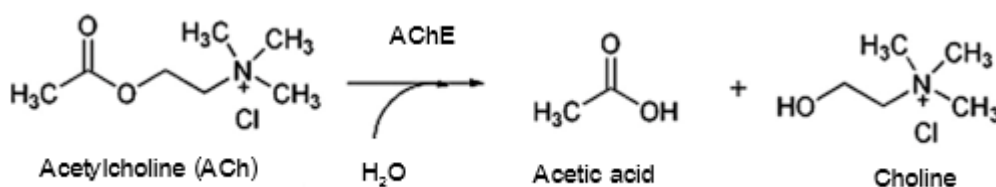
5. การดึงน้ำออก (dehydration) เป็นการขจัดน้ำออกจากเนื้อเยื่อหลังจากการย้อมสีที่สองเสร็จ เพื่อคงสภาพชิ้นตัวอย่างให้เก็บรักษาได้นานขึ้น ปราศจากการเข้าทำลายของแบคทีเรียและเชื้อรา โดยนำตัวอย่างผ่านแอลกอฮอล์ความเข้มข้นต่ำจนถึงแอลกอฮอล์สัมบูรณ์เพื่อให้แน่ใจว่าเนื้อเยื่อที่ผ่านการย้อมสีปราศจากน้ำ

6. การทำให้ใส (clearing) เป็นขั้นตอนที่ทำให้เนื้อเยื่อที่ปราศจากน้ำใสขึ้น เพื่อให้เหมาะสมต่อการศึกษากายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสง โดยจะใช้ไซลีนทำให้ชิ้นเนื้อเยื่อมีดัชนีการหักเหแสงน้อยลงและให้มีความโปร่งใสขึ้นเพื่อให้แสงผ่านชิ้นเนื้อได้ดี

7. การผนึกเนื้อเยื่อ (mounting) เป็นการให้สารที่มีดัชนีการหักเหของแสงต่ำร่วมกับการปิดกระจกปิดสไลด์ (cover slip) เพื่อเป็นการเก็บรักษาเนื้อเยื่อไว้ศึกษาได้นานยิ่งขึ้น สารตัวกลางที่นำมาใช้ผนึกเนื้อเยื่อส่วนใหญ่มาจากยางไม้ธรรมชาติหรืออาจเป็นยางไม้สังเคราะห์ โดยจะต้องมีลักษณะใสและดัชนีหักเหแสงต่ำมาก

การตรวจวัดกิจกรรมของเอนไซม์ acetylcholinesterase (AChE activity)

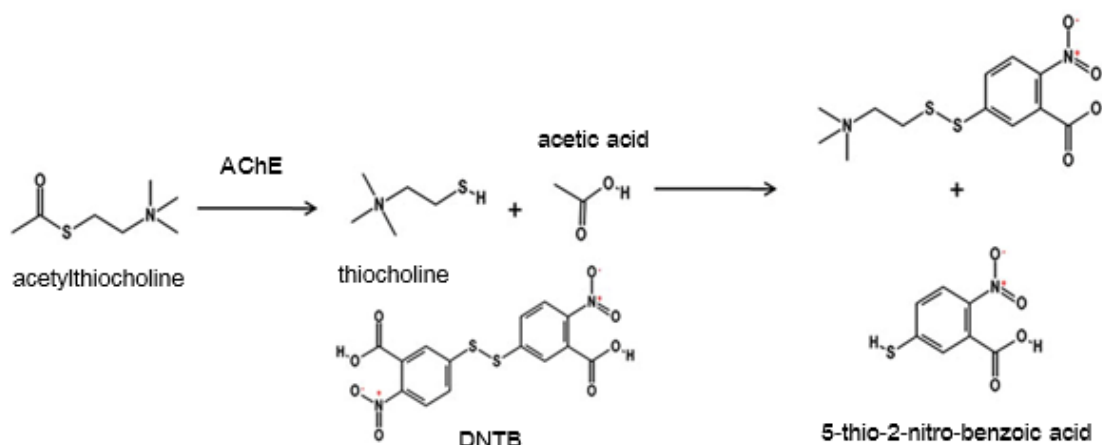
กิจกรรมของเอนไซม์ acetylcholinesterase เป็นดัชนีบ่งชี้ที่สำคัญในการประเมินความผิดปกติที่เกิดขึ้นหลังจากสิ่งมีชีวิตได้รับสารพิษไม่ว่าจะเป็นสารกำจัดวัชพืช ยาฆ่าแมลง โลหะหนัก เป็นต้น เนื่องจาก acetylcholinesterase เป็นเอนไซม์สำคัญในการควบคุมการทำงานของระบบประสาท มีหน้าที่ในการสลายพันธะเอสเทอร์ของ acetylcholine ให้ได้เป็น acetic acid และ choline ดังแสดงในภาพประกอบ 19



ภาพประกอบ 19 การสลายพันธะเอสเทอร์ของ acetylcholine โดยเอนไซม์ acetylcholinesterase ได้สารผลิตภัณฑ์เป็น acetic acid และ choline

ที่มา: Xu, Z., Yao, S., Wei, Y., Zhou, J., Zhang, L., Wang, C., & Guo, Y. (2008). Monitoring enzyme reaction and screening of inhibitors of acetylcholinesterase by quantitative matrix-assisted laser desorption/ionization fourier transform mass spectrometry. *Journal of the American Society for Mass Spectrometry*, 19(12), 1849-1855.

Ellman, Courtney, Andres Jr, and Featherstone (1961) ได้ออกแบบการทดลอง photometric technique เพื่อวิเคราะห์กิจกรรมของเอนไซม์ acetylcholinesterase ในเนื้อเยื่อสิ่งมีชีวิต โดยอาศัยหลักการ คือ เมื่อเอนไซม์ acetylcholinesterase สลายสาร acetylthiocholine ซึ่งเป็นสารตั้งต้นของปฏิกิริยาทำให้ได้สารผลิตภัณฑ์เป็น acetic acid และ thiocholine เกิดขึ้น จากนั้นนำ thiocholine ไปเป็นสารตั้งต้นในการทำปฏิกิริยาต่อกับ dithiobisnitrobenzoate (DTNB) จะได้สารผลิตภัณฑ์เป็น 5-thio-2-nitro-benzoic acid ซึ่งมีสีเหลือง การวัดปริมาณของ 5-thio-2-nitro-benzoic acid ด้วยเครื่อง spectrophotometer ที่ความยาวคลื่น 412 นาโนเมตร สามารถทำให้ทราบกิจกรรมของเอนไซม์ acetylcholinesterase ในเนื้อเยื่อของสิ่งมีชีวิต



ภาพประกอบ 20 ปฏิกิริยาการตรวจวัดกิจกรรมของเอนไซม์ acetylcholinesterase

ที่มา : Badawy, M. E., & El-Aswad, A. F. (2014). Bioactive paper sensor based on the acetylcholinesterase for the rapid detection of organophosphate and carbamate pesticides. *International Journal of Analytical Chemistry*, 2014.

การตรวจวัดกิจกรรมของเอนไซม์ catalase (CAT activity)

สารอนุมูลอิสระ (free radical) เกิดจากปฏิกิริยาภายในเซลล์ที่มีแก๊สออกซิเจน (O_2) เข้ามาเกี่ยวข้อง ผลผลิตที่ได้เกิดจากการเปลี่ยนรูปของ O_2 เรียกว่า Reactive Oxygen species (ROS) เช่น hydroxyl radical ($OH^\cdot$), superoxide ($O_2^\cdot$) และ hydrogen peroxide (H_2O_2) เป็นต้น ซึ่ง ROS มีความไวต่อการเกิดปฏิกิริยา สามารถเหนี่ยวนำสารชีวโมเลกุลภายในเซลล์ ให้เกิดความเสียหาย โดยเอนไซม์หนึ่งที่มีบทบาทสำคัญในการกำจัดสารอนุมูลอิสระ คือ catalase (CAT) ทำหน้าที่เปลี่ยน H_2O_2 ให้กลายเป็นน้ำ (H_2O) และแก๊สออกซิเจน (O_2)

Aebi (1984) ได้เสนอวิธีการวิเคราะห์กิจกรรมของเอนไซม์ CAT โดยอาศัยหลักการทาง photometric technique ให้เอนไซม์ CAT ทำปฏิกิริยากับ H_2O_2 แล้วติดตามปริมาณ H_2O_2 ที่ถูกใช้ไปต่อหน่วยเวลา ถ้าปริมาณเอนไซม์ CAT มากก็จะไปสลาย H_2O_2 ให้กลายเป็น H_2O และ O_2 เร็ว แต่ถ้าปริมาณเอนไซม์ CAT น้อยอัตราการลดลงของ H_2O_2 ก็จะเกิดขึ้นช้า ซึ่งสามารถติดตามปริมาณ H_2O_2 ได้จากค่าการดูดกลืนแสงที่ 240 นาโนเมตร และเพื่อเป็นการหลีกเลี่ยงไม่ให้ปริมาณ O_2 ที่เกิดขึ้นไปรบกวนการดูดกลืนแสงของ H_2O_2 จึงมีการปรับใช้ H_2O_2 ให้มีความเข้มข้นต่ำเพื่อลดปริมาณ O_2 ที่เกิดจากอัตราของปฏิกิริยาที่เร็วเกินไป



ภาพประกอบ 21 ปฏิกริยาการตรวจวัดกิจกรรมของเอนไซม์ catalase

ที่มา : Specialties, N. L. S. The reaction of catalase activity. Retrieved from <https://www.nwlifescience.com/nwa/product/catalase-enzyme-activity-assay>

จากการศึกษาเอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้องทำให้สามารถกำหนดแนวทางการทดสอบความเป็นพิษเฉียบพลันเชิงเดี่ยวและความเป็นพิษร่วมของ imidacloprid และ glyphosate เพื่อประเมินระดับความเข้มข้นที่มีผลทำให้ได้เดือ่น้ำตายลงร้อยละ 50 ของจำนวนได้เดือน้ำทั้งหมดในชุดการทดลองที่เวลา 24 ชั่วโมง (24 hr-LC₅₀) และ 48 ชั่วโมง (48 hr-LC₅₀) โดยมีการตรวจสอบคุณภาพน้ำเมื่อเริ่มต้นและหลังการทดลอง และเปรียบเทียบผลจากความเป็นพิษเฉียบพลันเชิงเดี่ยวและความเป็นพิษร่วมของ imidacloprid และ glyphosate ในระดับต่ำกว่าค่า LC₅₀ ที่เวลา 24 และ 48 ชั่วโมง ต่อการเปลี่ยนแปลงทางพยาธิสภาพเนื้อเยื่อ กิจกรรมของเอนไซม์ acetylcholinesterase และกิจกรรมของเอนไซม์ catalase ในได้เดือน้ำ

บทที่ 3

วิธีดำเนินการวิจัย

วัสดุ อุปกรณ์ สารเคมี และเครื่องมือ

วัสดุ อุปกรณ์

วัสดุ อุปกรณ์	ยี่ห้อ
หลอดหยดสารพลาสติก (plastic dropper) 1 มิลลิลิตร	-
ขวดแก้ว 3 มิลลิลิตร	-
กระบอกตวง (cylinder) 25 มิลลิลิตร	Witeg
ปิกเกอร์ (beaker) 20 - 500 มิลลิลิตร	Pyrex
จานเพาะเชื้อ (petri dish) 25 x 25 เซนติเมตร	Pyrex
หลอดทดลอง (test tube) 12 x 75 มิลลิลิตร	Pyrex
กระจกสไลด์ 25.4 x 76.2 มิลลิเมตร	HDA
แผ่นปิดสไลด์ 22 x 22 มิลลิเมตร	HDA
คิวเวต (cuvette)	VWR
ไมโครปิเปต (micropipette) ช่วงปิเปต 10 - 1,000 มิลลิลิตร	Gilson
ไมโครปิเปตทิป (micropipette tip)	Gilson

เครื่องมือ

เครื่องมือ	ยี่ห้อ	รุ่น
กล้องจุลทรรศน์ใช้แสงแบบธรรมดา	Leica	DM750
กล้องจุลทรรศน์ใช้แสงแบบสเตอริโอ	Leica	MZ6
เครื่องชั่ง (balance)	Satorius	ED224S
เครื่องปั่นเหวี่ยง (centrifuge)	Benchmark	LC-8
เครื่องวัดค่าดูดกลืนแสง (spectrophotometer)	Shimadzu	UV-1800
เครื่องวัดความเป็นกรดต่าง (pH meter)	Extech	PH100
เครื่องวัดออกซิเจนที่ละลายน้ำ (oxygen meter)	AMTAST	AMT08
ตู้อบลมร้อน (hot oven)	Memmert	VO200
เครื่องให้ความร้อน (hot plate)	Nuova	SP18420
เครื่องฮอโมจีไนเซอร์ (homogenizer)	Mastech	MA-30DL
เครื่องไมโครทอม (microtome)	Leica	RM2135

สารเคมี

สารเคมี	ยี่ห้อ
Imidacloprid (analytical standard)	Sigma-aldrich
Glyphosate (analytical standard)	Sigma-aldrich
Bouin's fixative	Bio-optica
Xylene	RCI labscan
Paraplast	Surgipath
Hematoxylin	Sigma-aldrich
Eosin	Sigma-aldrich
Absolute ethanol	Merck
Permout	Sigma-aldrich
Bovine serum albumin	Sigma-aldrich
Bradford reagent	Sigma-aldrich
5, 5' dithiobis-2-nitrobenzoic acid (DTNB)	Sigma-aldrich
Acetylthiocholine iodide	Sigma-aldrich
35% v/v H ₂ O ₂	Chem-supply
NaOH	Merck
NaCl	Sigma-aldrich
KCl	Sigma-aldrich
HCl	Merck
KH ₂ PO ₄	Univar
Na ₂ HPO ₄	Univar

วิธีการทดลอง

การเตรียมสัตว์ทดลอง

น้ำที่ใช้เลี้ยงสัตว์ทดลองเป็นน้ำที่ปราศจากคลอรีน ได้จากน้ำประปาภายในมหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ โดยเติมสารกำจัดคลอรีน 10 มิลลิลิตรต่อน้ำ 100 ลิตร ให้ออกซิเจนตลอดเวลา และเก็บไว้ในถังพักเป็นเวลาอย่างน้อย 1 วัน ก่อนนำมาเลี้ยงสัตว์ทดลอง

ไส้เดือนน้ำ (*Tubifex tubifex* Müller, 1774) ได้จากฟาร์มเอกชนแห่งหนึ่งในกรุงเทพมหานคร นำมาพักในกะละมังพลาสติกสำหรับเลี้ยงสัตว์น้ำเป็นระยะเวลาอย่างน้อย 2 สัปดาห์ก่อนการทดลอง ทำการเปลี่ยนน้ำปราศจากคลอรีนทุก 24 ชั่วโมง เติมออกซิเจนโดยเครื่องพ่นอากาศตลอดเวลา และให้อาหารปลาบดละเอียดสัปดาห์ละ 1 ครั้ง เมื่อมีการเคลื่อนย้ายหรือนับจำนวนไส้เดือนน้ำ ทำโดยใช้ยางวงหรือเส้นผมผูกที่ปลายหางไม้เพื่อใช้แยกไส้เดือนน้ำออกจากกันแล้วจึงใช้ปิเปตพลาสติกดูดไส้เดือนน้ำ

การวิเคราะห์ความเป็นพิษเชิงเดี่ยวของ imidacloprid และ glyphosate

1. การทดลองหาช่วงความเข้มข้นมีวัตถุประสงค์เพื่อหาช่วงความเข้มข้นที่เหมาะสมในการทดลอง โดยหาความเข้มข้นสูงสุดของ imidacloprid และ glyphosate ที่ไม่ทำให้ไส้เดือนน้ำตาย (ร้อยละการตายของไส้เดือนน้ำ = 0) และหาความเข้มข้นต่ำสุดของ imidacloprid และ glyphosate ที่ทำให้ไส้เดือนน้ำตายทั้งหมด (ร้อยละการตายของไส้เดือนน้ำ = 100) ที่เวลา 24 และ 48 ชั่วโมง นำความเข้มข้นที่ได้ไปใช้ในการกำหนดช่วงความเข้มข้น ในการทดลองขั้นละเอียด

2. การทดลองหาค่าความเป็นพิษเชิงเดี่ยวมีวัตถุประสงค์เพื่อหาค่า LC_{50} ที่เวลา 24 และ 48 ชั่วโมง ของ imidacloprid และ glyphosate โดยเตรียมสารละลายของ imidacloprid และ glyphosate จำนวน 5 ความเข้มข้น แต่ละความเข้มข้นใช้ไส้เดือนน้ำจำนวน 30 ตัว ในน้ำ 20 มิลลิลิตร ทำการทดลอง 3 ซ้ำ พร้อมทั้งตรวจคุณภาพน้ำโดยวัดอุณหภูมิ ความเป็นกรดต่าง และปริมาณออกซิเจนที่ละลายน้ำเมื่อเริ่มต้นและสิ้นสุดการทดลอง บันทึกการตายของไส้เดือนน้ำ ที่เวลา 24 และ 48 ชั่วโมง

การวิเคราะห์ความเป็นพิษร่วมของ imidacloprid กับ glyphosate

1. การทดลองหาช่วงความเข้มข้นมีวัตถุประสงค์เพื่อหาช่วงความเข้มข้นที่เหมาะสมในการทดลอง โดยหาความเข้มข้นสูงสุดของสารผสมระหว่าง imidacloprid และ glyphosate ในสัดส่วน 1 ต่อ 1 ที่ไม่ทำให้ไส้เดือนน้ำตาย (ร้อยละการตายของไส้เดือนน้ำ = 0) และหาความเข้มข้นต่ำสุดของสารผสมระหว่าง imidacloprid และ glyphosate ในสัดส่วน 1 ต่อ 1 ที่ทำให้ไส้เดือนน้ำตายทั้งหมด (ร้อยละการตายของไส้เดือนน้ำ = 100) ที่เวลา 24 และ 48 ชั่วโมง นำความเข้มข้นที่ได้ไปใช้ในการกำหนดช่วงความเข้มข้นในการทดลองขั้นละเอียด

2. การทดลองหาค่าความเป็นพิษร่วมมีวัตถุประสงค์เพื่อหาค่า LC_{50} ที่เวลา 24 และ 48 ชั่วโมง ของสารผสมระหว่าง imidacloprid และ glyphosate โดยทดสอบความเป็นพิษร่วมของ imidacloprid และ glyphosate ในสัดส่วน 1 ต่อ 1 โดยเตรียมสารละลายผสม imidacloprid และ glyphosate จำนวน 5 ความเข้มข้น แต่ละความเข้มข้นใช้ไส้เดือนน้ำจำนวน 30 ตัว ในน้ำ 20 มิลลิลิตร ทำการทดลอง 3 ซ้ำ พร้อมทั้งตรวจคุณภาพน้ำโดยวัดอุณหภูมิ ความเป็นกรดต่าง และปริมาณออกซิเจนที่ละลายน้ำเมื่อเริ่มต้นและสิ้นสุดการทดลอง บันทึกการตายของไส้เดือนน้ำ ที่เวลา 24 และ 48 ชั่วโมง

จากนั้นนำค่า LC_{50} ที่ได้มาวิเคราะห์ความเป็นพิษร่วมของสารโดยใช้วิธี Marking's additive index method (Marking, 1984) ซึ่งประกอบด้วยสมการดังนี้

สมการที่ (1) การวิเคราะห์กิจกรรมทางชีววิทยา (biological activity, S)

$$S = \frac{A_m}{A_i} + \frac{B_m}{B_i} \dots (1)$$

เมื่อ	S	คือ	กิจกรรมทางชีววิทยาของสารเคมี A และ B
	A_m	คือ	ค่า LC_{50} ของสารผสม A เมื่อมีสาร B ผสมอยู่
	A_i	คือ	ค่า LC_{50} ของสารเคมี A
	B_m	คือ	ค่า LC_{50} ของสารผสม B เมื่อมีสาร A ผสมอยู่
	B_i	คือ	ค่า LC_{50} ของสารเคมี B

นำค่า S (biological activity) ที่ได้จากสมการ (1) มาแทนค่าในสมการ (2) เมื่อค่า S น้อยกว่า 1 หรือแทนค่าในสมการ (3) เมื่อค่า S มากกว่าหรือเท่ากับ 1

$$AI = \frac{1}{S} - 1 \quad \text{--- (2)}$$

$$AI = 1 - S \quad \text{--- (3)}$$

จากงานวิจัยของ Y. Wang et al. (2018) สามารถประเมินค่า AI ของสารผสมจากวิธี Marking's additive index method ได้ดังนี้

ค่า $AI \leq -0.2$	คือ การออกฤทธิ์แบบยับยั้ง (antagonistic effect)
ค่า $-0.2 < AI \leq 0.25$	คือ การออกฤทธิ์แบบเพิ่มฤทธิ์ (additive effect)
ค่า $AI > 0.25$	คือ การออกฤทธิ์แบบเสริมฤทธิ์ (synergistic effect)

การศึกษาการเปลี่ยนแปลงพยาธิสภาพเนื้อเยื่อ

เลี้ยงไส้เดือนน้ำในระดับความเข้มข้นของ imidacloprid glyphosate และสารผสม imidacloprid กับ glyphosate ที่ระดับความเข้มข้นต่ำกว่าค่า LC_{50} เป็นเวลา 24 และ 48 ชั่วโมง เพื่อศึกษาการเปลี่ยนแปลงพยาธิสภาพเนื้อเยื่อของไส้เดือนน้ำ (Humason, 1962; Siwaporn & Paisarn, 2012)

1. ขั้นตอนการเตรียมเนื้อเยื่อ

ทำการเก็บรักษาเนื้อเยื่อไส้เดือนน้ำโดยแช่ในสารละลายคงสภาพเนื้อเยื่อ (Bouin's fixative) เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นล้างน้ำประปาจนกว่าไม่เห็นสีเหลืองของ Bouin's fixative ละลายออกมาจากน้ำประปาที่ล้าง ทำการตัดไส้เดือนน้ำที่ผ่านการคงสภาพได้กลึงจุลทรรศน์ สเตอริโอออกเป็น 3 ส่วน ได้แก่ 1. ส่วนหัวตั้งแต่ปลายด้าน anterior จนถึงบริเวณท้ายสุดของ clitellum 2. ส่วนลำตัวตั้งแต่ส่วนท้ายของ clitellum ลงไป 12 ปล้อง และ 3. ส่วนหาง จากนั้นนำไส้เดือนน้ำส่วนต่าง ๆ แช่ในแอลกอฮอล์ความเข้มข้น 50 เปอร์เซ็นต์ 15 นาที แล้วจึงเปลี่ยนมาแช่ในแอลกอฮอล์ความเข้มข้น 70 เปอร์เซ็นต์ 30 นาที จากนั้นนำมาผ่านกระบวนการดึ่งน้ำออกจากเนื้อเยื่อโดยแช่ในแอลกอฮอล์ที่มีความเข้มข้นต่ำไปหาความเข้มข้นสูง โดยแช่ในแอลกอฮอล์ที่มีความเข้มข้น 95 เปอร์เซ็นต์และแอลกอฮอล์สัมบูรณ์ 2 ครั้ง ครั้งละ 30 นาที เตรียมเนื้อเยื่อเพื่อเข้าสู่กระบวนการแทรกพาราฟลาสต์โดยแช่ชิ้นเนื้อในสารละลายไโซลีนต่อแอลกอฮอล์สัมบูรณ์

อัตราส่วน 1 ต่อ 1 เป็นเวลา 15 นาที จากนั้นแช่ในไซลีน 2 ครั้ง ครั้งละ 30 นาที แช่ชิ้นเนื้อในสารละลายพาราฟลาสต์ต่อไซลีนอัตราส่วน 1 ต่อ 1 30 นาที แช่ในพาราฟลาสต์ 2 ครั้ง ครั้งละ 3 ชั่วโมง ทำการฝังเนื้อเยื่อในพาราฟลาสต์และตัดเนื้อเยื่อด้วยเครื่องตัดเนื้อเยื่อให้มีความหนาประมาณ 10 ไมโครเมตร นำเนื้อเยื่อติดลงบนสไลด์ที่เคลือบด้วยเจลาติน วางบนแผ่นความร้อน 24 ชั่วโมง แล้วนำไปย้อมด้วยฮีมาทอกซาลีนและอีโอซิน (Hematoxylin & Eosin; H&E)

2. ขั้นตอนการย้อมสีฮีมาทอกซาลีน-อีโอซิน

นำสไลด์ที่ติดแผ่นเนื้อเยื่อแล้ว แช่ในไซลีน 3 ครั้ง ครั้งละ 10 นาที จากนั้นเปลี่ยนมาแช่ในไซลีนต่อแอลกอฮอล์สัมบูรณ์ในอัตราส่วน 1 ต่อ 1 เป็นเวลา 5 นาที แช่แอลกอฮอล์ที่มีความเข้มข้น 95, 90, 70 เปอร์เซ็นต์ ขั้นละ 5 นาที เปลี่ยนมาแช่ในน้ำประปา 3 นาที น้ำกลั่น 5 นาที ย้อมสีด้วยฮีมาทอกซาลีน 5 นาที ล้างด้วยน้ำประปาที่ไหลผ่านตลอดเวลา 3 นาที จุ่มลงในสารละลาย 0.05% HCl 1 ครั้ง ล้างด้วยน้ำประปาที่ไหลผ่านตลอดเวลา 3 นาที จากนั้นจุ่มลงในสารละลาย 1% NaOH และน้ำกลั่นอย่างละ 1 ครั้ง แช่แอลกอฮอล์ที่มีความเข้มข้น 70, 80, 90, 95 เปอร์เซ็นต์ ความเข้มข้นละ 10 นาที ย้อมสีด้วยอีโอซิน 2 นาที จากนั้นนำไปล้างสีส่วนเกินออกโดยการแช่ลงในแอลกอฮอล์ที่มีความเข้มข้น 95 เปอร์เซ็นต์ 2 นาที แล้วเปลี่ยนมาแช่ในแอลกอฮอล์สัมบูรณ์ 10 นาที แช่ในสารละลายไซลีนต่อแอลกอฮอล์สัมบูรณ์อัตราส่วน 1 ต่อ 1 เป็นเวลา 10 นาที แช่ในไซลีนอีก 3 ครั้ง ครั้งละ 10 นาที ปิดสไลด์ด้วยกระจกปิดสไลด์โดยใช้สารเปอร์มาท์แล้วนำไปศึกษาภายใต้กล้องจุลทรรศน์ใช้แสงแบบธรรมดา

การศึกษาการเปลี่ยนแปลงกิจกรรมของเอนไซม์ acetylcholinesterase

วิเคราะห์กิจกรรมของเอนไซม์ acetylcholinesterase ในเนื้อเยื่อสิ่งมีชีวิตอ้างอิงตามวิธีของ Ellman et al. (1961)

1 ขั้นตอนการเตรียมเนื้อเยื่อ

เตรียมเนื้อเยื่อได้เดือนน้ำจำนวน 30 มิลลิกรัมโดยการชั่งด้วยเครื่องชั่ง จากนั้นนำเนื้อเยื่อที่เตรียมได้เติมลงในหลอดทดลองที่มีฟอสเฟตบัฟเฟอร์ (pH 7.5) 1.5 มิลลิลิตร ใช้เครื่องโฮโมจีไนส์เซอร์ปั่นให้ละเอียดเป็นเวลา 2 นาที แล้วจึงทำให้สารละลายตกตะกอนที่ 1000 g ที่อุณหภูมิ 4 °C เป็นเวลา 10 นาที ด้วยเครื่องเครื่องปั่นเหวี่ยง จากนั้นเก็บสารละลายเหนือตะกอน (supernatant) ไว้ที่อุณหภูมิ 4 °C ตลอดเวลา ก่อนการนำไปวัดกิจกรรมของเอนไซม์

2 การวิเคราะห์ปริมาณโปรตีน (protein assay)

การวิเคราะห์ปริมาณโปรตีนในเนื้อเยื่อของสิ่งมีชีวิตอ้างอิงวิธีของ Bradford (1976) โดยมีขั้นตอนดังนี้ เตรียมสารละลายมาตรฐานโดยเจือจาง Bovine Serum Albumin (BSA) 5 ความเข้มข้นปริมาตร 0.1 มิลลิลิตรเติมลงในหลอดทดลองที่มีรีเอเจนต์แบรดฟอร์ด (Bradford reagent) 5 มิลลิลิตร เตรียมรีเอเจนต์แบลงค์ (reagent blank) โดยใช้น้ำกลั่นแทนสารละลายมาตรฐาน ผสมให้เข้ากันโดยเครื่องผสมสารละลาย ตั้งทิ้งไว้ให้เกิดปฏิกิริยาสมบูรณ์ 5 นาที เติมสารละลายมาตรฐานลงในคิวเวต และนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 595 นาโนเมตร เขียนกราฟมาตรฐาน (standard curve) ระหว่างค่าการดูดกลืนแสงกับความเข้มข้นของสารละลายมาตรฐาน จากนั้นเข้าสู่ขั้นตอนการวัดปริมาณโปรตีนโดยเตรียมสารละลายตัวอย่างจากขั้นตอนการเตรียมเนื้อเยื่อ 0.1 มิลลิลิตร เตรียมรีเอเจนต์แบลงค์โดยใช้น้ำกลั่นแทนสารละลายตัวอย่าง ผสมให้เข้ากันโดยเครื่องผสมสารละลาย ตั้งทิ้งไว้ให้เกิดปฏิกิริยาสมบูรณ์ 5 นาที เติมสารละลายตัวอย่างลงในคิวเวตและนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 595 นาโนเมตร หาความเข้มข้นของโปรตีนในสารละลายตัวอย่างจากกราฟมาตรฐาน

3. การวัดกิจกรรมของเอนไซม์ acetylcholinesterase

เติมสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ (pH 7.5, 0.2 M) ปริมาตร 1700 ไมโครลิตร สารละลายที่ได้จากขั้นตอนการเตรียมเนื้อเยื่อ 150 ไมโครลิตร และ DTNB 50 ไมโครลิตรลงในคิวเวต นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 412 นาโนเมตรและตั้งค่าให้เป็นศูนย์ จากนั้นนำคิวเวตออกจากเครื่องสเปกโตรโฟโตมิเตอร์เติม acetylthiocholine iodine ความเข้มข้น 15 มิลลิโมลาร์ปริมาตร 100 ไมโครลิตรลงในคิวเวต แล้วนำไปวัดค่าดูดกลืนแสงทันทีโดยวัดค่าการดูดกลืนแสงซ้ำทุก ๆ 15 วินาทีเป็นเวลา 5 นาที แล้วจึงนำค่าการดูดกลืนแสงที่ได้มาคำนวณความเข้มข้นของเอนไซม์ acetylcholinesterase ที่ถูกใช้ไปในปฏิกิริยา (C) โดยแทนค่าสมการ (4) ดังนี้

$$C = \frac{\Delta A(412\text{nM})}{\epsilon b} \quad \text{--- (4)}$$

เมื่อ C คือ ความเข้มข้นของเอนไซม์ acetylcholinesterase ที่
ใช้ไปในปฏิกิริยามีหน่วยเป็นโมลต่อลิตร

ΔA_{412}	คือ	ผลต่างของค่าการดูดกลืนแสงที่ 412 นาโนเมตรที่เวลา $T_2 - T_1$ เมื่อ T_2 และ T_1 เลือกจากช่วงเวลาที่ค่าดูดกลืนแสงเพิ่มขึ้นคงที่มีหน่วยเป็นนาที
ϵ	คือ	ค่าการดูดกลืนแสงต่อโมลของสาร (extinction coefficient) มีค่า 1.36×10^4 โมลลาร์ ⁻¹ ·เซนติเมตร ⁻¹
b	คือ	ความยาวของแสงที่ผ่านสารละลาย (path length) มีหน่วยเป็นเซนติเมตร

จากนั้นนำค่า C ที่คำนวณได้จากสมการ (4) มาแทนค่าในสมการ (5) ดังนี้

$$\text{AChE activity} = \frac{C}{(T_2 - T_1) \times \text{mgprotein}} \quad \text{--- (5)}$$

เมื่อ	AChE activity	คือ	กิจกรรมของเอนไซม์ acetylcholinesterase มีหน่วยเป็น $\mu\text{moles} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mgprotein}^{-1}$
	$T_1 - T_2$	คือ	ผลต่างของเวลาเมื่อ T_2 และ T_1 เลือกจากช่วงเวลาที่ค่าดูดกลืนแสงเพิ่มขึ้นคงที่มีหน่วยเป็นนาที
	mg protein	คือ	ปริมาณโปรตีนจากเนื้อเยื่อในหน่วยมิลลิกรัม

การศึกษาการเปลี่ยนแปลงกิจกรรมของเอนไซม์ catalase

1. ขั้นตอนการเตรียมเนื้อเยื่อ

เตรียมเนื้อเยื่อไส้เดือนน้ำจำนวน 30 มิลลิกรัมโดยการชั่งด้วยเครื่องชั่ง จากนั้นนำเนื้อเยื่อที่เตรียมได้เติมลงในหลอดทดลองที่มีฟอสเฟตบัฟเฟอร์ (pH 8, 0.01 M) 1.5 มิลลิลิตร ใช้เครื่องโฮโมจีไนส์เซอร์ปั่นให้ละเอียดเป็นเวลา 2 นาที แล้วจึงทำให้สารละลายตกตะกอนที่ 1000 g ที่อุณหภูมิ 4 °C เป็นเวลา 10 นาที ด้วยเครื่องเครื่องปั่นเหวี่ยง จากนั้นเก็บสารละลายเหนือตะกอน (supernatant) ไว้ที่อุณหภูมิ 4 °C ตลอดเวลาก่อนการนำไปวิเคราะห์ปริมาณโปรตีนและวัดกิจกรรมของเอนไซม์

2. การวิเคราะห์ปริมาณโปรตีน (protein assay)

การวิเคราะห์ปริมาณโปรตีนในเนื้อเยื่อของสิ่งมีชีวิตอ้างอิงวิธีของ Bradford (1976) โดยมีขั้นตอนดังนี้ เตรียมสารละลายมาตรฐานโดยเจือจาง Bovine Serum Albumin (BSA) 5 ความเข้มข้นปริมาตร 0.1 มิลลิลิตรเติมลงในหลอดทดลองที่มีรีเอเจนต์แบรดฟอร์ด (Bradford reagent) 5 มิลลิลิตร เตรียมรีเอเจนต์แบรดฟอร์ดโดยใช้น้ำกลั่นแทนสารละลายมาตรฐาน ผสมให้เข้ากันโดยเครื่องผสมสารละลาย ตั้งทิ้งไว้ให้เกิดปฏิกิริยาสมบูรณ์ 5 นาที เติมสารละลายมาตรฐานลงในคิวเวต และนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 595 นาโนเมตร เขียนกราฟมาตรฐาน (standard curve) ระหว่างค่าการดูดกลืนแสงกับความเข้มข้นของสารละลายมาตรฐาน จากนั้นเข้าสู่ขั้นตอนการวัดปริมาณโปรตีนโดยเตรียมสารละลายตัวอย่างจากขั้นตอนการเตรียมเนื้อเยื่อ 0.1 มิลลิลิตร เตรียมรีเอเจนต์แบรดฟอร์ดโดยใช้น้ำกลั่นแทนสารละลายตัวอย่าง ผสมให้เข้ากันโดยเครื่องผสมสารละลาย ตั้งทิ้งไว้ให้เกิดปฏิกิริยาสมบูรณ์ 5 นาที เติมสารละลายตัวอย่างลงในคิวเวต และนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 595 นาโนเมตร หาความเข้มข้นของโปรตีนในสารละลายตัวอย่างจากกราฟมาตรฐาน

3. การวัดกิจกรรมของเอนไซม์ catalase

วิเคราะห์กิจกรรมของเอนไซม์ catalase ในเนื้อเยื่อสิ่งมีชีวิตอ้างอิงตามวิธีของ Aebi (1984) โดยเจือจางสารละลายที่ได้จากการเตรียมเนื้อเยื่อปริมาตร 0.5 มิลลิลิตร ด้วยสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ (pH 7.0, 50 mM) ปริมาตร 1.5 มิลลิลิตรลงในคิวเวต วัดค่าการดูดกลืนแสงของสารละลายในคิวเวตที่ความยาวคลื่น 240 นาโนเมตร light path 1 เซนติเมตร และตั้งค่าให้เป็นศูนย์ จากนั้นเติมสารละลาย H_2O_2 1 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันทันที และวัดค่าการดูดกลืนแสงทุก ๆ 15 วินาที เป็นเวลา 4 นาที ทำการบันทึกผล นำค่าที่ได้มาคำนวณจำนวนโมลของ H_2O_2 ที่ใช้ไปในการทำปฏิกิริยา (c) หน่วยเป็นโมลต่อลิตร โดยแทนค่าสมการ (6) ดังนี้

$$C = \frac{\Delta A(240\text{nm})}{\epsilon b} \quad \text{--- (6)}$$

เมื่อ	C	คือ	ความเข้มข้นของ H_2O_2 ที่ใช้ไปมีหน่วยเป็นโมลต่อลิตร
	ΔA_{240}	คือ	ผลต่างของค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 240 นาโนเมตรที่เวลา $T_1 - T_2$ เมื่อ T_1 และ T_2 เลือกจากช่วงเวลาที่ค่าดูดกลืนแสงลดลงคงที่มีหน่วยเป็นนาที

- ϵ คือ ค่าการดูดกลืนแสงต่อโมลของสาร (extinction coefficient) มีค่า 43.6 โมลลาร์⁻¹·เซนติเมตร⁻¹
- b คือ ความยาวของแสงที่ผ่านสารละลาย (path length) หน่วยเป็นเซนติเมตร

โดย T_2 และ T_1 เลือกจากช่วงเวลาที่ค่าการดูดกลืนแสงลดลงคงที่มีหน่วยเป็นนาที่ จากนั้นคำนวณหากิจกรรมของเอนไซม์ catalase ($\mu\text{moles} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mgprotein}^{-1}$) โดยแทนค่าในสมการ (7) ดังนี้

$$\text{CAT activity} = \frac{C}{(T_1 - T_2) \times \text{mgprotein}} \quad \text{--- (7)}$$

- เมื่อ CAT activity คือ กิจกรรมของเอนไซม์ acetylcholinesterase มีหน่วยเป็น $\mu\text{moles} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mgprotein}^{-1}$
- $T_1 - T_2$ คือ ผลต่างของเวลาเมื่อ T_1 และ T_2 เลือกจากช่วงเวลาที่ค่าดูดกลืนแสงลดลงคงที่มีหน่วยเป็นนาที่
- mg protein คือ ปริมาณโปรตีนจากตัวอย่างเนื้อเยื่อในหน่วยมิลลิกรัม

การวิเคราะห์ข้อมูล

1. หาคความเข้มข้นของ imidacloprid และ glyphosate ที่ทำให้สัตว์ทดลองตาย 50 เปอร์เซ็นต์ เมื่อเวลาผ่านไป 24 และ 48 ชั่วโมง โดยใช้การวิเคราะห์โพรบิท (probit analysis) ที่ช่วงความเชื่อมั่นที่ 95 เปอร์เซ็นต์

2. ทดสอบความแตกต่างระหว่างค่าเฉลี่ยโดยการวิเคราะห์ความแปรปรวน (one-way ANOVA) กิจกรรมของเอนไซม์ acetylcholinesterase ที่ระดับนัยสำคัญทางสถิติ 0.05 และเปรียบเทียบความแตกต่างระหว่างค่าเฉลี่ยรายคู่โดยใช้วิธี Bonferroni t

3. ทดสอบความแตกต่างระหว่างค่าเฉลี่ยโดยการวิเคราะห์ความแปรปรวน (one-way ANOVA) กิจกรรมของเอนไซม์ catalase ที่ระดับนัยสำคัญทางสถิติ 0.05 และเปรียบเทียบความแตกต่างระหว่างค่าเฉลี่ยรายคู่โดยใช้วิธี Bonferroni t

บทที่ 4

ผลการดำเนินงานวิจัย

งานวิจัยนี้มีจุดประสงค์เพื่อประเมินความเป็นพิษเฉียบพลันเชิงเดี่ยวและความเป็นพิษร่วมของ imidacloprid และ glyphosate ต่อการเปลี่ยนแปลงทางพยาธิสภาพเนื้อเยื่อ กิจกรรมของเอนไซม์ acetylcholinesterase และ catalase ในไส้เดือนน้ำ (*Tubifex tubifex* Müller, 1774) โดยผู้วิจัยได้วางแผนการทดลองและวิเคราะห์ผลการทดลองดังต่อไปนี้

1. ผลความเป็นพิษเฉียบพลันเชิงเดี่ยวและความเป็นพิษเฉียบพลันร่วมของ imidacloprid และ glyphosate ต่อไส้เดือนน้ำ
2. ผลของความความเป็นพิษเฉียบพลันเชิงเดี่ยวและความเป็นพิษเฉียบพลันร่วมของ imidacloprid และ glyphosate ต่อพยาธิสภาพเนื้อเยื่อของไส้เดือนน้ำ
3. ผลของความความเป็นพิษเฉียบพลันเชิงเดี่ยวและความเป็นพิษเฉียบพลันร่วมของ imidacloprid และ glyphosate ต่อกิจกรรมของเอนไซม์ acetylcholinesterase ในไส้เดือนน้ำ
4. ผลของความความเป็นพิษเฉียบพลันเชิงเดี่ยวและความเป็นพิษเฉียบพลันร่วมของ imidacloprid และ glyphosate ต่อกิจกรรมของเอนไซม์ catalase ในไส้เดือนน้ำ

ผลความเป็นพิษเฉียบพลันเชิงเดี่ยวและความเป็นพิษเฉียบพลันร่วมของ imidacloprid และ glyphosate ต่อไส้เดือนน้ำ

ผลความเป็นพิษเฉียบพลันเชิงเดี่ยวของ imidacloprid

ผลการศึกษาความเป็นพิษเฉียบพลันเชิงเดี่ยวของ imidacloprid ที่เวลา 24 ชั่วโมง พบว่า LC_{50} มีค่าอยู่ที่ 1.545 มิลลิกรัมต่อลิตร ช่วงความเชื่อมั่นร้อยละ 95 เท่ากับ 0.763 – 2.722 มิลลิกรัมต่อลิตร ความเป็นพิษเฉียบพลันเชิงเดี่ยวของ imidacloprid ที่เวลา 48 ชั่วโมง พบว่า LC_{50} มีค่าอยู่ที่ 1.982 มิลลิกรัมต่อลิตร ช่วงความเชื่อมั่นร้อยละ 95 เท่ากับ 0.287 – 5.622 มิลลิกรัมต่อลิตร โดยร้อยละการตายของไส้เดือนน้ำในแต่ละความเข้มข้นแสดงดังตาราง 15 และผลการวิเคราะห์โพรบิตแสดงดังตาราง 16

ตาราง 15 ร้อยละการตายของไส้เดือนน้ำที่ได้รับ imidacloprid เป็นเวลา 24 และ 48 ชั่วโมง

เวลา	ความเข้มข้น (mg L ⁻¹)	จำนวนการตาย (n=30)			ร้อยละการตายของ สัตว์ทดลอง
		การทดลอง 1	การทดลอง 2	การทดลอง 3	
24	กลุ่มควบคุม	0	0	0	0
	0.01	1	1	1	3.33±0.00
	0.05	4	2	4	11.11±1.15
	0.25	10	9	10	32.22±0.58
	1.25	17	14	17	53.33±1.73
	6.25	17	18	20	61.11±1.53
	31.25	26	25	27	86.67±1.00
	156.25	29	28	25	91.11±2.08
48	กลุ่มควบคุม	0	0	0	0
	0.01	6	5	2	14.44±2.08
	0.05	6	8	10	26.67±2.00
	0.25	12	10	12	37.78±1.15
	1.25	14	14	15	47.78±0.58
	6.25	18	18	19	61.11±0.58
	31.25	25	24	26	83.33±1.00
	156.25	26	28	27	90.00±1.00

ตาราง 16 ผลการวิเคราะห์โพรบิตเมื่อไส้เดือนน้ำได้รับ imidacloprid เป็นเวลา 24 และ 48 ชั่วโมง

การวิเคราะห์โพรบิต (Probit analysis)		
เวลา	24 ชั่วโมง	48 ชั่วโมง
ค่า LC ₅₀	1.545 mg L ⁻¹	1.982 mg L ⁻¹
ช่วงความเชื่อมั่นที่ร้อยละ 95	0.763 – 2.722 mg L ⁻¹	0.287 – 5.622 mg L ⁻¹
สมการถดถอย (regression equation)	Y = -0.17 + 0.76X	Y = 0.02 + 0.55X
ค่าสัมประสิทธิ์แสดงการตัดสินใจ (r ²)	0.981	0.983

ผลความเป็นพิษเฉียบพลันเชิงเดี่ยวของ glyphosate

ผลการศึกษาความเป็นพิษเฉียบพลันเชิงเดี่ยวของ glyphosate ที่เวลา 24 ชั่วโมง พบว่า LC_{50} มีค่าอยู่ที่ 201.438 มิลลิกรัมต่อลิตร ช่วงความเชื่อมั่นร้อยละ 95 เท่ากับ 187.810 – 210.938 มิลลิกรัมต่อลิตร ความเป็นพิษเฉียบพลันเชิงเดี่ยวของ glyphosate ที่เวลา 48 ชั่วโมง พบว่า LC_{50} มีค่าอยู่ที่ 190.300 มิลลิกรัมต่อลิตร ช่วงความเชื่อมั่นร้อยละ 95 เท่ากับ 182.545 – 194.966 มิลลิกรัมต่อลิตร โดยร้อยละการตายของไส้เดือนน้ำในแต่ละความเข้มข้นแสดงดังตาราง 17 และผลการวิเคราะห์ โพรบิตแสดงดังตาราง 18

ตาราง 17 ร้อยละการตายของไส้เดือนน้ำที่ได้รับ glyphosate เป็นเวลา 24 และ 48 ชั่วโมง

เวลา	ความเข้มข้น (mg L ⁻¹)	จำนวนการตาย (n=30)			ร้อยละการตายของ สัตว์ทดลอง
		การทดลอง 1	การทดลอง 2	การทดลอง 3	
24	กลุ่มควบคุม	0	0	0	0
	125	3	4	5	13.33±1.00
	150	6	8	6	22.22±1.15
	175	13	13	9	38.89±2.31
	200	14	16	13	47.78±1.53
	225	24	22	23	76.67±1.00
	250	27	26	26	87.78±0.58
48	กลุ่มควบคุม	0	0	0	0
	175	5	5	6	17.78±0.58
	185	13	14	10	41.11±2.08
	195	17	25	20	68.89±4.04
	200	26	26	23	83.33±1.73
	215	30	30	28	97.78±1.15
	225	30	30	30	100.00±0.00

ตาราง 18 ผลการวิเคราะห์โพรบิทเมื่อได้เด็อนน้ำได้รับ glyphosate เป็นเวลา 24 และ 48 ชั่วโมง

การวิเคราะห์โพรบิท (Probit analysis)		
เวลา	24 ชั่วโมง	48 ชั่วโมง
ค่า LC_{50}	201.438 mg L ⁻¹	190.300 mg L ⁻¹
ช่วงความเชื่อมั่นที่ร้อยละ 95	187.810–210.938 mg L ⁻¹	182.545–194.966 mg L ⁻¹
สมการถดถอย (regression equation)	$Y = -17.1 + 7.54X$	$Y = -71.69 + 31.53X$
ค่าสัมประสิทธิ์แสดงการตัดสินใจ (r^2)	0.982	0.984

ผลความเป็นพิษเฉียบพลันร่วมของ imidacloprid และ glyphosate

ผลการศึกษาความเป็นพิษเฉียบพลันร่วมของ imidacloprid และ glyphosate ที่เวลา 24 ชั่วโมง พบว่า LC_{50} มีค่าอยู่ที่ 7.997 มิลลิกรัมต่อลิตร ช่วงความเชื่อมั่นร้อยละ 95 เท่ากับ 7.428 – 8.385 มิลลิกรัมต่อลิตร เมื่อทำการวิเคราะห์หิกรรรมทางชีววิทยาพบว่า มีค่าอยู่ที่ 5.216 และดัชนีส่งเสริมการทำงานมีค่าเท่ากับ -4.216 ซึ่งแสดงถึงอันตรกิริยาแบบยับยั้งฤทธิ์ของ imidacloprid และ glyphosate ในได้เด็อนน้ำ

ความเป็นพิษเฉียบพลันร่วมของ imidacloprid และ glyphosate ที่เวลา 48 ชั่วโมง ค่า LC_{50} เท่ากับ 1.790 มิลลิกรัมต่อลิตร ช่วงความเชื่อมั่นร้อยละ 95 เท่ากับ 1.560 – 1.973 มิลลิกรัมต่อลิตร เมื่อทำการวิเคราะห์หิกรรรมทางชีววิทยาพบว่า มีค่าอยู่ที่ 0.913 และดัชนีส่งเสริมการทำงานมีค่าเท่ากับ 0.096 ซึ่งแสดงถึงอันตรกิริยาแบบเพิ่มฤทธิ์ของ imidacloprid และ glyphosate ในได้เด็อนน้ำ โดยมีร้อยละการตายของได้เด็อนน้ำแสดงดังตาราง 19 ส่วนผลการวิเคราะห์โพรบิทและการวิเคราะห์หิกรรรมทางชีววิทยาแสดงดังตาราง 20

ตาราง 19 ร้อยละการตายของไส้เดือนน้ำที่ได้รับ imidacloprid และ glyphosate เป็นเวลา 24 และ 48 ชั่วโมง

เวลา	ความเข้มข้น (mg L ⁻¹)	จำนวนการตาย (n=30)			ร้อยละการตายของ สัตว์ทดลอง
		การทดลอง 1	การทดลอง 2	การทดลอง 3	
24	กลุ่มควบคุม	0	0	0	0
	5	5	4	6	16.67±1.00
	6	10	8	9	30.00±1.00
	7	11	12	12	38.89±0.58
	8	16	18	17	56.67±1.00
	9	23	25	24	80.00±1.00
	10	26	27	26	87.78±0.58
48	กลุ่มควบคุม	0	0	0	0
	0.5	5	5	6	20.00±1.73
	1	13	14	10	26.67±1.00
	1.5	17	25	20	48.49±1.53
	2	26	26	23	71.11±4.04
	2.5	30	30	28	77.78±2.89
	3	30	30	30	86.67±1.00

ตาราง 20 ผลการวิเคราะห์โพรบิตและการวิเคราะห์ถดถอยทางชีววิทยาจากการตายของไส้เดือนน้ำที่ได้รับ imidacloprid และ glyphosate เป็นเวลา 24 และ 48 ชั่วโมง

การวิเคราะห์โพรบิต (Probit analysis)		
เวลา	24 ชั่วโมง	48 ชั่วโมง
ค่า LC ₅₀	7.997 mg L ⁻¹	1.790 mg L ⁻¹
ช่วงความเชื่อมั่นที่ร้อยละ 95	7.428 – 8.385 mg L ⁻¹	1.560 – 1.973 mg L ⁻¹
สมการถดถอย (regression equation)	Y = -7.39+8.75X	Y = -0.29+3.31X
ค่าสัมประสิทธิ์แสดงการตัดสินใจ (r ²)	0.912	0.837

ตาราง 20 (ต่อ)

การวิเคราะห์กิจกรรมทางชีววิทยา		
กิจกรรมทางชีววิทยา (S)	0.837	0.913
ดัชนีส่งเสริมการทำงาน (AI)	-4.216 (-10.034 to -1.764)	0.096 (-5.885 to 2.503)
ความสัมพันธ์ของสารเคมี	การออกฤทธิ์แบบยับยั้งฤทธิ์	การออกฤทธิ์แบบเพิ่มฤทธิ์

ผลการวิเคราะห์คุณภาพน้ำ

การตรวจวัดคุณภาพน้ำซึ่งประกอบด้วยอุณหภูมิของน้ำ (T) ค่าความเป็นกรดต่างของน้ำ (pH) และปริมาณของออกซิเจนที่ละลายในน้ำ (DO) ในการทดลองความเป็นพิษเฉียบพลันเชิงเดี่ยวของ imidacloprid และ glyphosate เมื่อเริ่มต้นและหลังการทดลองแสดงดังตาราง 21 และการตรวจวัดคุณภาพน้ำในการทดลองความเป็นพิษเฉียบพลันร่วมของ imidacloprid และ glyphosate เมื่อเริ่มต้นและหลังการทดลองแสดงดังตาราง 22

ตาราง 21 ผลการตรวจวัดคุณภาพน้ำในการทดลองความเป็นพิษเฉียบพลันเชิงเดี่ยว

พารามิเตอร์	24 ชั่วโมง		48 ชั่วโมง	
	เริ่มต้น	สิ้นสุด	เริ่มต้น	สิ้นสุด
Imidacloprid				
T (°C)	23.23±0.38	23.75±0.25	23.33±0.33	23.94±0.10
pH	8.36±0.07	8.09±0.03	8.12±0.10	8.07±0.03
DO (mg L ⁻¹)	5.70±0.18	4.86±0.03	5.40±0.13	3.21±0.16
Glyphosate				
T (°C)	23.43±0.45	23.67±0.27	23.40±0.53	23.89±0.13
pH	5.00±0.64	5.34±0.30	5.10±0.41	8.27±0.10
DO (mg L ⁻¹)	5.62±0.27	4.50±0.25	5.22±0.11	2.77±0.23

ตาราง 22 ผลการตรวจวัดคุณภาพน้ำในการทดลองความเป็นพิษเฉียบพลันร่วม

พารามิเตอร์	24 ชั่วโมง		48 ชั่วโมง	
	เริ่มต้น	สิ้นสุด	เริ่มต้น	สิ้นสุด
T (°C)	23.91±0.03	24.01±0.11	23.61±0.31	23.40±0.03
pH	5.94±0.11	6.12±0.13	6.10±0.10	6.25±0.14
DO (mg L ⁻¹)	5.72±0.06	4.23±0.09	5.92±0.24	3.15±0.38

ผลของความเป็นพิษเฉียบพลันเชิงเดี่ยวและความเป็นพิษเฉียบพลันร่วมของ imidacloprid และ glyphosate ต่อพยาธิสภาพเนื้อเยื่อของไส้เดือนน้ำ

เมื่อไส้เดือนน้ำได้รับ imidacloprid glyphosate และสารผสมระหว่าง imidacloprid กับ glyphosate ที่ความเข้มข้น 0.2 และ 0.8 เท่าของค่า LC₅₀ เป็นระยะเวลา 24 และ 48 ชั่วโมง พบว่า เกิดการเปลี่ยนแปลงทางพยาธิสภาพเนื้อเยื่อขึ้นซึ่งแสดงดังตาราง 23

ตาราง 23 พยาธิสภาพของเนื้อเยื่อไส้เดือนน้ำที่ได้รับ imidacloprid glyphosate และสารผสมระหว่าง imidacloprid กับ glyphosate เป็นระยะเวลา 24 และ 48 ชั่วโมง

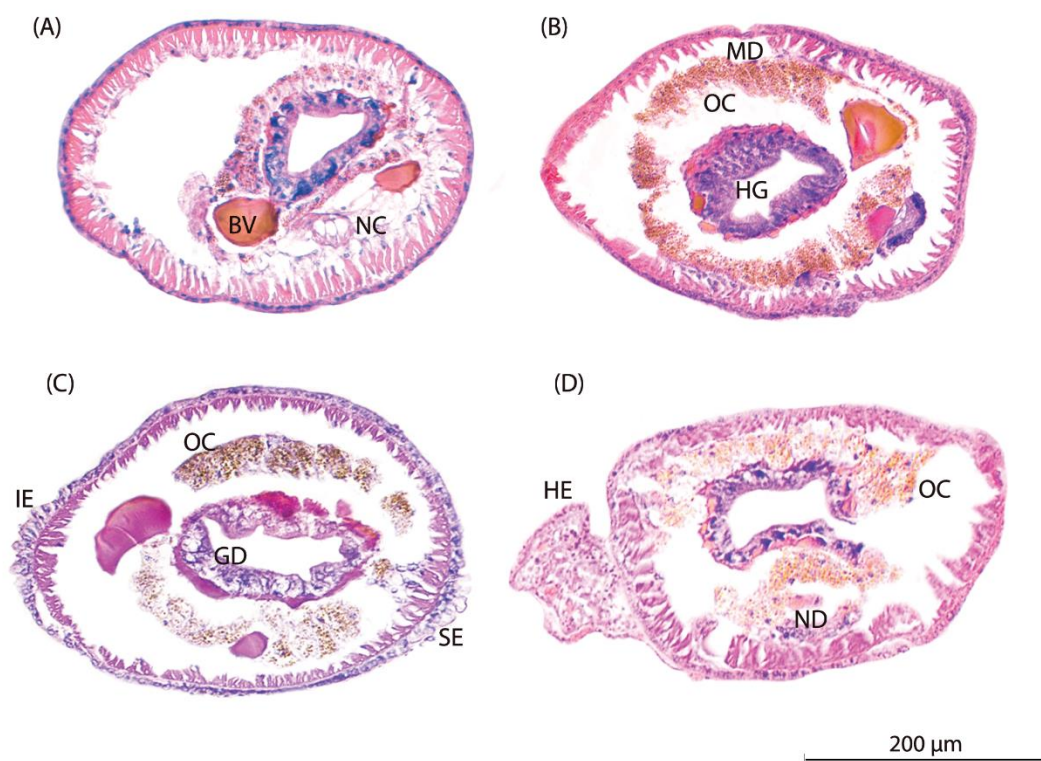
เวลา	สารเคมี	ความเข้มข้น	พยาธิสภาพเนื้อเยื่อ
24	imidacloprid	0.2LC ₅₀	gut cell degeneration
			nerve degeneration
			overexpression of chloragosomes
		0.8 LC ₅₀	gut cell degeneration
			hyperplasia of gut cells
			irregular surface of epidermis
48		0.2LC ₅₀	nerve degeneration
			overexpression of chloragosomes
			gut cell degeneration
			irregular surface of epidermis
			overexpression of chloragosomes

ตาราง 23 (ต่อ)

เวลา	สารเคมี	ความเข้มข้น	พยาธิสภาพเนื้อเยื่อ
48	imidacloprid	0.8 LC ₅₀	gut cell degeneration hyperplasia of epidermal cells muscle degeneration nerve degeneration overexpression of chloragosomes
24	glyphosate	0.2LC ₅₀	hyperplasia of gut cells irregular surface of epidermis nerve degeneration overexpression of chloragosomes
		0.8LC ₅₀	hyperplasia of gut cells muscle degeneration nerve degeneration hyperplasia of epidermal cells overexpression of chloragosomes
48		0.2LC ₅₀	gut cell degeneration hyperplasia of epidermal cells hyperplasia of gut cells nerve degeneration swelling of epidermal cells overexpression of chloragosomes
		0.8LC ₅₀	gut cell degeneration irregular surface of epidermis nerve degeneration overexpression of chloragosomes swelling of epidermal cells

ตาราง 23 (ต่อ)

เวลา	สารเคมี	ความเข้มข้น	พยาธิสภาพเนื้อเยื่อ
24	สารผสม	0.2LC ₅₀	gut cell degeneration hyperplasia of epidermal cells hyperplasia of gut cells nerve degeneration swelling of epidermal cells overexpression of chloragosomes
		0.8LC ₅₀	gut cell degeneration hyperplasia of epidermal cells muscle degeneration swelling of epidermal cells overexpression of chloragosomes
48		0.2LC ₅₀	gut cell degeneration hyperplasia of epidermal cells hyperplasia of gut cells muscle degeneration swelling of epidermal cells overexpression of chloragosomes
		0.8LC ₅₀	gut cell degeneration hyperplasia of epidermal cells hyperplasia of gut cells muscle degeneration Nerve degeneration swelling of epidermal cells overexpression of chloragosomes



ภาพประกอบ 22 ความเป็นพิษเฉียบพลันเชิงเดี่ยวและความเป็นพิษเฉียบพลันร่วมของ imidacloprid และ glyphosate ต่อพยาธิสภาพเนื้อเยื่อของไส้เดือนน้ำที่เวลา 24 และ 48 ชั่วโมง

โดย (A)	=	กลุ่มควบคุม
(B), (C) และ (D)	=	กลุ่มได้รับสาร
BV	=	blood vessel
NC	=	ventral nerve cord
MD	=	muscle degeneration
OC	=	overexpression of chloragosomes
HG	=	hyperplasia of gut cells
IE	=	irregular surface of epidermis
GD	=	gut cell degeneration
SE	=	swelling of epidermal cells
HE	=	hyperplasia of epidermal cells
ND	=	nerve degeneration

ผลของความเป็นพิษเฉียบพลันเชิงเดี่ยวและความเป็นพิษเฉียบพลันร่วมของ imidacloprid และ glyphosate ต่อกิจกรรมของเอนไซม์ acetylcholinesterase ในไส้เดือนน้ำ

ผลการศึกษากิจกรรมของเอนไซม์ acetylcholinesterase (AChE) ในไส้เดือนน้ำที่ได้รับ imidacloprid เป็นเวลา 24 และ 48 ชั่วโมง ที่ระดับความเข้มข้น 0.2 และ 0.8 เท่าของค่า LC_{50} พบว่า กิจกรรมของเอนไซม์ AChE เพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม ($p < 0.05$) นอกจากนี้ยังพบว่า ที่เวลา 24 ชั่วโมง กิจกรรมของเอนไซม์ AChE เพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ เมื่อระดับความเข้มข้นของ imidacloprid เพิ่มขึ้น ($p < 0.05$) อย่างไรก็ตาม ผลการศึกษากิจกรรมของเอนไซม์ AChE ในไส้เดือนน้ำที่ได้รับ glyphosate และสารผสมระหว่าง imidacloprid กับ glyphosate เป็นเวลา 24 และ 48 ชั่วโมง ที่ระดับความเข้มข้น 0.2 และ 0.8 เท่าของค่า LC_{50} พบว่า กิจกรรมของเอนไซม์ AChE ลดลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม ($p < 0.05$) นอกจากนี้ยังพบว่า ที่เวลา 24 ชั่วโมง กิจกรรมของเอนไซม์ AChE ลดลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ เมื่อระดับความเข้มข้นของ glyphosate และสารผสมระหว่าง imidacloprid กับ glyphosate เพิ่มขึ้น ($p < 0.05$)

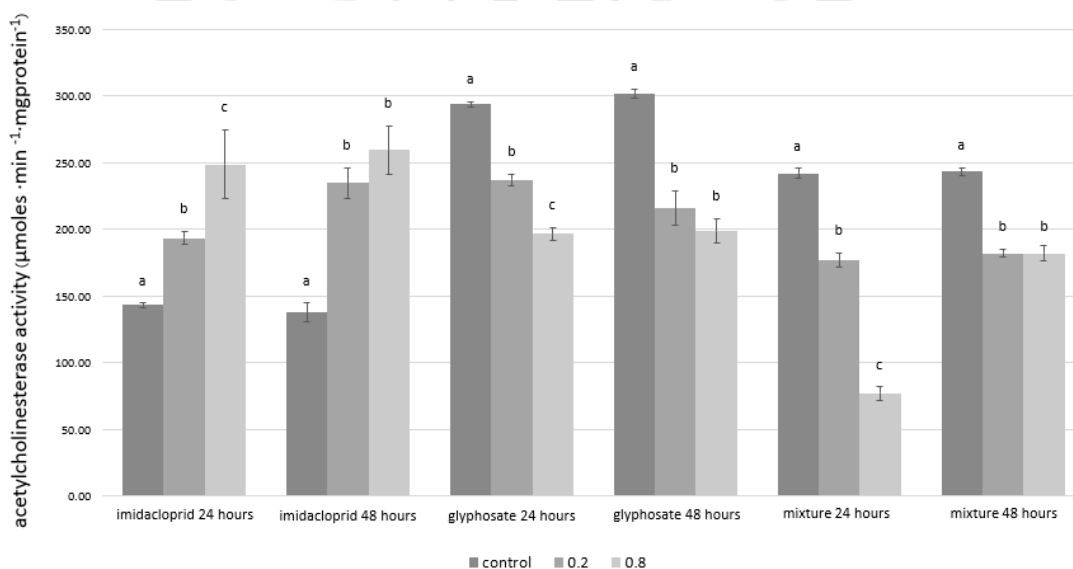
ตาราง 24 กิจกรรมของเอนไซม์ acetylcholinesterase ในไส้เดือนน้ำที่ได้รับ imidacloprid glyphosate และสารผสมระหว่าง imidacloprid กับ glyphosate เป็นเวลา 24 และ 48 ชั่วโมง

สารเคมี	ความเข้มข้น	กิจกรรมของเอนไซม์ acetylcholinesterase ($\mu\text{mol min}^{-1} \text{mg protein}^{-1}$)	
		24 ชั่วโมง	48 ชั่วโมง
imidacloprid	กลุ่มควบคุม	143.13 ^a ±2.10	137.47 ^a ±7.24
	0.2 LC_{50}	193.46 ^b ±4.59	234.67 ^b ±11.77
	0.8 LC_{50}	248.48 ^c ±25.80	259.51 ^b ±18.36
glyphosate	ชุดควบคุม	293.67 ^a ±1.66	301.76 ^a ±3.38
	0.2 LC_{50}	237.09 ^b ±4.47	215.97 ^b ±12.62
	0.8 LC_{50}	196.62 ^c ±5.05	198.50 ^b ±8.99

ตาราง 24 (ต่อ)

สารเคมี	ความเข้มข้น	กิจกรรมของเอนไซม์ acetylcholinesterase ($\mu\text{mol min}^{-1} \text{mg protein}^{-1}$)	
		24 ชั่วโมง	48 ชั่วโมง
imidacloprid	กลุ่มควบคุม	242.00 ^a ±3.71	243.15 ^a ±3.15
	0.2 LC ₅₀	176.77 ^b ±5.40	182.05 ^b ±2.62
	0.8 LC ₅₀	77.25 ^c ±5.25	181.85 ^b ±5.70

a, b, c อักษรภาษาอังกฤษตัวพิมพ์เล็กในคอลัมน์เดียวกันที่เหมือนกัน แสดงค่าเฉลี่ยกิจกรรมของเอนไซม์ AChE ไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ 0.05



a, b, c อักษรภาษาอังกฤษตัวพิมพ์เล็กในกราฟแท่งชุดเดียวกันที่เหมือนกัน แสดงค่าเฉลี่ยกิจกรรมของเอนไซม์ AChE ไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ 0.05

ภาพประกอบ 23 กิจกรรมของเอนไซม์ acetylcholinesterase ในไส้เดือนน้ำที่ได้รับ imidacloprid glyphosate และสารผสมระหว่าง imidacloprid กับ glyphosate เป็นเวลา 24 และ 48 ชั่วโมง

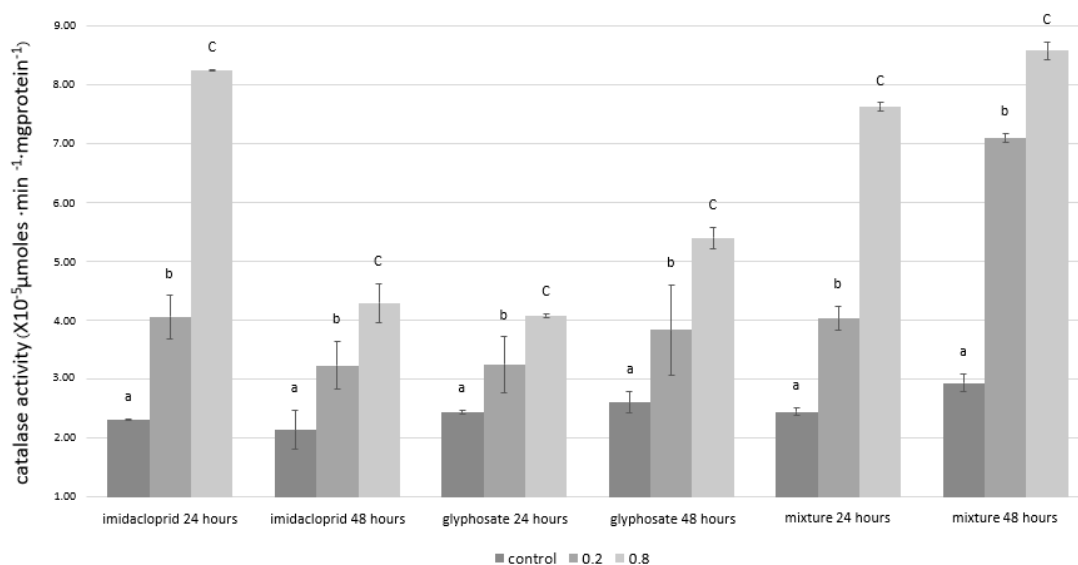
ผลของความเป็นพิษเฉียบพลันเชิงเดี่ยวและความเป็นพิษเฉียบพลันร่วมของ imidacloprid และ glyphosate ต่อกิจกรรมของเอนไซม์ catalase ในไส้เดือนน้ำ

ผลการศึกษากิจกรรมของเอนไซม์ catalase (CAT) ในไส้เดือนน้ำที่ได้รับ imidacloprid glyphosate และสารผสมระหว่าง imidacloprid กับ glyphosate เป็นเวลา 24 และ 48 ชั่วโมง ที่ระดับความเข้มข้น 0.2 และ 0.8 เท่าของค่า LC_{50} พบว่า กิจกรรมของเอนไซม์ CAT เพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม ($p < 0.05$) นอกจากนี้ยังพบว่า กิจกรรมของเอนไซม์ CAT เพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ เมื่อระดับความเข้มข้นของ imidacloprid glyphosate และสารผสมระหว่าง imidacloprid กับ glyphosate เพิ่มขึ้น ($p < 0.05$)

ตาราง 25 กิจกรรมของเอนไซม์ catalase ในไส้เดือนน้ำที่ได้รับ imidacloprid glyphosate และสารผสมระหว่าง imidacloprid กับ glyphosate เป็นเวลา 24 และ 48 ชั่วโมง

สารเคมี	ความเข้มข้น	กิจกรรมของเอนไซม์ catalase $\times 10^{-5}$ ($\mu\text{mol min}^{-1} \text{mg protein}^{-1}$)	
		24 ชั่วโมง	48 ชั่วโมง
imidacloprid	กลุ่มควบคุม	$1.31^a \pm 1.00 \times 10^{-7}$	$1.14^a \pm 3.30 \times 10^{-6}$
	0.2 LC_{50}	$3.06^b \pm 3.80 \times 10^{-6}$	$2.24^b \pm 4.10 \times 10^{-6}$
	0.8 LC_{50}	$7.25^c \pm 1.50 \times 10^{-6}$	$3.30^c \pm 5.70 \times 10^{-6}$
glyphosate	ชุดควบคุม	$1.44^a \pm 3.00 \times 10^{-7}$	$1.61^a \pm 1.80 \times 10^{-6}$
	0.2 LC_{50}	$2.26^b \pm 4.80 \times 10^{-6}$	$2.84^b \pm 7.60 \times 10^{-6}$
	0.8 LC_{50}	$3.08^c \pm 1.50 \times 10^{-5}$	$4.41^c \pm 3.00 \times 10^{-7}$
สารผสม	กลุ่มควบคุม	$1.45^a \pm 7.00 \times 10^{-7}$	$1.94^a \pm 1.50 \times 10^{-6}$
	0.2 LC_{50}	$3.03^b \pm 2.00 \times 10^{-6}$	$6.10^b \pm 7.00 \times 10^{-7}$
	0.8 LC_{50}	$6.64^c \pm 4.50 \times 10^{-6}$	$7.59^c \pm 5.30 \times 10^{-6}$

^{a, b, c} อักษรภาษาอังกฤษตัวพิมพ์เล็กในคอลัมน์เดียวกันที่เหมือนกัน แสดงค่าเฉลี่ยกิจกรรมของเอนไซม์ catalase ไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ 0.05



a, b, c อักษรภาษาอังกฤษตัวพิมพ์เล็กในกราฟแท่งชุดเดียวกันที่เหมือนกัน แสดงค่าเฉลี่ยกิจกรรมของเอนไซม์ catalase ไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ 0.05

ภาพประกอบ 24 กิจกรรมของเอนไซม์ catalase ในไส้เดือนน้ำที่ได้รับ imidacloprid glyphosate และสารผสมระหว่าง imidacloprid กับ glyphosate เป็นเวลา 24 และ 48 ชั่วโมง

บทที่ 5

สรุปผลการวิจัย อภิปรายผล และข้อเสนอแนะ

การประเมินความเป็นพิษเฉียบพลันเชิงเดี่ยวและความเป็นพิษร่วมของ imidacloprid และ glyphosate ต่อการเปลี่ยนแปลงทางพยาธิสภาพเนื้อเยื่อ กิจกรรมของเอนไซม์ acetylcholinesterase และกิจกรรมของเอนไซม์ catalase ในไส้เดือนน้ำ (*Tubifex tubifex* Müller, 1774) ในระดับห้องปฏิบัติการ สามารถสรุปผลการดำเนินงานวิจัยโดยแบ่งหัวข้อได้ดังนี้

1. สรุปผลการวิจัย
2. อภิปรายผลการวิจัย
3. ข้อเสนอแนะ

สรุปผลการวิจัย

1. ที่เวลา 24 และ 48 ชั่วโมง imidacloprid ก่อให้เกิดความเป็นพิษเฉียบพลันต่อไส้เดือนน้ำมากกว่า glyphosate และอันตรกิริยาของ imidacloprid กับ glyphosate ที่เกิดขึ้น คือ การยับยั้งฤทธิ์ (antagonism) ที่เวลา 24 ชั่วโมง และการเสริมฤทธิ์ (additives) ที่เวลา 48 ชั่วโมง

2. Imidacloprid glyphosate และสารผสมระหว่าง imidacloprid กับ glyphosate ก่อให้เกิดการเปลี่ยนแปลงพยาธิสภาพเนื้อเยื่อของไส้เดือนน้ำทั้งระบบเนื้อเยื่อชั้นผิว ระบบประสาท ระบบกล้ามเนื้อ ระบบย่อยอาหาร และระบบภูมิคุ้มกัน อย่างไรก็ตาม ระดับความเข้มข้นของ imidacloprid glyphosate และสารผสม imidacloprid กับ glyphosate ที่เพิ่มขึ้น ไม่ได้ส่งผลให้เกิดการเปลี่ยนแปลงทางพยาธิสภาพเนื้อเยื่อของไส้เดือนน้ำที่มากขึ้น

3. กิจกรรมของเอนไซม์ acetylcholinesterase (AChE) ในไส้เดือนน้ำที่ได้รับ imidacloprid เพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่เวลา 24 และ 48 ชั่วโมง เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม ($p < 0.05$) และที่เวลา 24 ชั่วโมง กิจกรรมของเอนไซม์ AChE เพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ เมื่อความเข้มข้นของ imidacloprid เพิ่มขึ้น ($p < 0.05$) อย่างไรก็ตาม กิจกรรมของเอนไซม์ AChE ในไส้เดือนน้ำที่ได้รับ glyphosate และสารผสมระหว่าง imidacloprid กับ glyphosate ลดลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่เวลา 24 และ 48 ชั่วโมง เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม ($p < 0.05$) และยังพบว่า ที่เวลา 24 ชั่วโมง กิจกรรมของเอนไซม์ AChE ลดลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ เมื่อความเข้มข้นของ glyphosate และสารผสมระหว่าง imidacloprid กับ glyphosate เพิ่มขึ้น ($p < 0.05$)

4. กิจกรรมของเอนไซม์ catalase (CAT) เพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่เวลา 24 และ 48 ชั่วโมง เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม ($p < 0.05$) นอกจากนี้ยังพบว่า กิจกรรมของเอนไซม์ CAT เพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ เมื่อระดับความเข้มข้นของ imidacloprid glyphosate และสารผสมระหว่าง imidacloprid กับ glyphosate เพิ่มขึ้น ($p < 0.05$)

อภิปรายผลการวิจัย

ผลการประเมินความเป็นพิษเฉียบพลันเชิงเดี่ยวของ imidacloprid ในไส้เดือนน้ำที่เวลา 24 ชั่วโมงพบว่า ค่า LC_{50} อยู่ที่ 1.545 มิลลิกรัมต่อลิตร และเมื่อไส้เดือนน้ำได้รับ imidacloprid เป็นระยะเวลา 48 ชั่วโมงพบว่า ค่า LC_{50} เพิ่มขึ้นเป็น 1.982 มิลลิกรัมต่อลิตร ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยของ Chen et al. (2014) ที่รายงานค่า LC_{50} ของ *Eisenia fetida* ที่ได้รับ imidacloprid เป็นระยะเวลา 24 ชั่วโมง อยู่ที่ 3.390 มิลลิกรัมต่อลิตร และเพิ่มขึ้นเป็น 3.630 มิลลิกรัมต่อลิตร เมื่อได้รับ imidacloprid เป็นระยะเวลา 48 ชั่วโมง และยังสอดคล้องกับงานวิจัยของ Hassoon and Salman (2016) ที่รายงานค่า LC_{50} ของ *Daphnia pulex* ที่ได้รับ imidacloprid เป็นระยะเวลา 24 ชั่วโมง อยู่ที่ 1.500 มิลลิกรัมต่อลิตร และเพิ่มขึ้นเป็น 1.900 มิลลิกรัมต่อลิตร เมื่อได้รับ imidacloprid เป็นระยะเวลา 48 ชั่วโมง แสดงให้เห็นว่า ระยะเวลาที่เพิ่มขึ้นส่งผลให้ความเป็นพิษของ imidacloprid ลดลง ทั้งนี้อาจเป็นเพราะว่า imidacloprid มีค่าครึ่งชีวิตในน้ำที่ต่ำจึงส่งผลให้ความเป็นพิษลดลง (Fossen, 2006) ในขณะที่ผลการประเมินความเป็นพิษเฉียบพลันเชิงเดี่ยวของ glyphosate ที่เวลา 24 ชั่วโมงพบว่า มีค่า LC_{50} อยู่ที่ 201.438 มิลลิกรัมต่อลิตร และค่า LC_{50} ที่เวลา 48 ชั่วโมงลดลงเป็น 190.300 มิลลิกรัมต่อลิตร ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยของ Hong et al. (2017) ที่รายงานค่า LC_{50} ของ *Eriochir sinensis* ที่ได้รับ glyphosate เป็นระยะเวลา 24 ชั่วโมง อยู่ที่ 461.510 มิลลิกรัมต่อลิตร และลดลงเป็น 97.890 มิลลิกรัมต่อลิตร เมื่อได้รับ glyphosate เป็นระยะเวลา 48 ชั่วโมง และยังสอดคล้องกับงานวิจัยของ Stellin et al. (2018) ที่รายงานค่า LC_{50} ของ *Lumbricus terrestris* ที่ได้รับ glyphosate เป็นระยะเวลา 21 วัน อยู่ที่ 26.804 มิลลิกรัมต่อลิตร และลดลงเป็น 7.001 มิลลิกรัมต่อลิตร เมื่อได้รับ glyphosate เป็นระยะเวลา 42 วัน แสดงให้เห็นว่า ระยะเวลาที่เพิ่มขึ้นส่งผลให้ความเป็นพิษของ imidacloprid เพิ่มขึ้น ทั้งนี้อาจเป็นไปได้ว่า glyphosate มีค่าครึ่งชีวิตในน้ำที่สูงกว่า imidacloprid จึงส่งผลให้ความเป็นพิษเพิ่มขึ้น (Kollman & Segawa, 1995) ดังนั้นจึงสรุปได้ว่า imidacloprid มีพิษต่อไส้เดือนน้ำมากกว่า glyphosate และค่า LC_{50} ขึ้นอยู่กับชนิดของสิ่งมีชีวิต รวมไปถึงระยะเวลาที่สิ่งมีชีวิตชนิดนั้นได้รับสาร

ผลการประเมินความเป็นพิษเฉียบพลันร่วมของ imidacloprid และ glyphosate ที่เวลา 24 ชั่วโมง พบว่า LC_{50} มีค่าอยู่ที่ 7.997 มิลลิกรัมต่อลิตร เมื่อทำการวิเคราะห์หกิจกรรมทางชีววิทยา พบว่า มีค่าอยู่ที่ 5.216 และดัชนีส่งเสริมการทำงานมีค่าเท่ากับ -4.216 ซึ่งแสดงถึงผลการออกฤทธิ์แบบยับยั้งฤทธิ์ของ imidacloprid และ glyphosate ในไส้เดือนน้ำ และเมื่อไส้เดือนน้ำได้รับสารผสมระหว่าง imidacloprid กับ glyphosate เป็นระยะเวลา 48 ชั่วโมง พบว่า ค่า LC_{50} ลดลงเป็น 1.790 มิลลิกรัมต่อลิตร เมื่อทำการวิเคราะห์หกิจกรรมทางชีววิทยาพบว่ามีค่าอยู่ที่ 0.913 และดัชนีส่งเสริมการทำงานมีค่าเท่ากับ 0.096 ซึ่งแสดงถึงผลการออกฤทธิ์แบบแบบเพิ่มฤทธิ์ของ imidacloprid และ glyphosate ในไส้เดือนน้ำ จากรายงานการวิจัยของ Goñalons and Farina (2018) ที่ศึกษาผลความเป็นพิษร่วมของ imidacloprid และ glyphosate ต่อผึ้ง (*Apis mellifera*) พบว่า สารผสมระหว่าง imidacloprid กับ glyphosate มีความเป็นพิษน้อยกว่าความเป็นพิษของ imidacloprid เพียงสารเดียว ซึ่งสอดคล้องกับผลการวิจัยนี้ที่พบว่า ค่า LC_{50} ที่เวลา 24 ชั่วโมงของ สารผสมระหว่าง imidacloprid กับ glyphosate อยู่ที่ 7.997 มิลลิกรัมต่อลิตร แต่ค่า LC_{50} ที่เวลา 24 ชั่วโมงของ imidacloprid อยู่ที่ 1.545 มิลลิกรัมต่อลิตร นอกจากนี้งานวิจัยของ (Zhu, Yao, Adamczyk, & Luttrell, 2017a) และ Zhu, Yao, Adamczyk, and Luttrell (2017b) รายงานว่า สารผสมระหว่าง imidacloprid และ glyphosate ไม่ได้ก่อให้เกิดอันตรายกิริยาแบบเสริมฤทธิ์หรือเพิ่มฤทธิ์ในผึ้ง (*A. mellifera*) แต่อย่างใด และงานวิจัยของ Cang et al. (2017) ได้ศึกษาความเป็นพิษร่วมของ imidacloprid กับยาปราบศัตรูพืชอื่นที่มีหมู่ฟอสเฟตเช่นเดียวกับ glyphosate พบว่า ไส้เดือนดิน (*E. fetida*) มีการตอบสนองต่อความเป็นพิษแบบยับยั้งฤทธิ์ ซึ่งสอดคล้องกับผลการวิจัยนี้ที่พบว่า สารผสมระหว่าง imidacloprid กับ glyphosate ที่เวลา 24 ชั่วโมง ก่อให้เกิดอันตรายกิริยาแบบยับยั้งฤทธิ์ในไส้เดือนน้ำ โดยอันตรายกิริยาแบบยับยั้งฤทธิ์ที่เกิดขึ้นนี้อาจเป็นเพราะปฏิกิริยาในกระบวนการเปลี่ยนแปลงสภาพของยาหรือสารเคมี (drug metabolism) ในร่างกายของสิ่งมีชีวิต ซึ่งกระบวนการเปลี่ยนแปลงสภาพของยาในสัตว์ประกอบด้วยสองระยะหลัก คือ phase I หรือ modification phase เป็นขั้นตอนที่อาศัยการทำงานของเอนไซม์ในระบบ monooxygenase โดยให้ยาผ่านปฏิกิริยา oxidation-reduction (redox) และ hydrolysis ทำให้โครงสร้างทางเคมีของยามีสภาพซับซ้อนเพิ่มมากขึ้นและมักส่งผลให้ยามีความเป็นพิษเพิ่มสูงขึ้น หลังจากนั้นยาจะถูกส่งต่อเข้าสู่ phase II หรือ conjugation phase ในระยะนี้ยาจะถูกนำไปรวมกับสารที่มีความเป็นขั้วสูงอีกครั้งเพื่อให้ยาสามารถขับออกจากร่างกายได้ง่ายขึ้นและมีมวลโมเลกุลที่มากขึ้น ทำให้เคลื่อนที่ผ่านเยื่อหุ้มเซลล์ได้ยาก จึงทำให้ความเป็นพิษของยาลดลง มีงานวิจัยรายงานว่า imidacloprid มีความสามารถในการเข้าทำปฏิกิริยากับเอนไซม์ในกระบวนการเปลี่ยนแปลงสภาพ

ของยาก่อนสารปราบศัตรูพืชที่มีหมู่ฟอสเฟตเป็นองค์ประกอบ จึงเป็นผลให้ในระยะแรกของการได้รับสารผสม โครงสร้างของ glyphosate จะยังไม่ถูกเปลี่ยนให้อยู่ในรูปของโครงสร้างที่มีความเป็นพิษ (toxic form) หรือโครงสร้างที่สามารถออกฤทธิ์ (active metabolites) ส่งผลให้เกิดพิษในช่วงนี้เกิดจากฤทธิ์ของ imidacloprid เป็นหลัก (Gaughan, Engel, & Casida, 1980; Hernández et al., 2013; Svendsen, Siang, Lister, Rice, & Spurgeon, 2010) ดังนั้น จึงกล่าวได้ว่า imidacloprid สามารถยับยั้งฤทธิ์ของ glyphosate ได้เป็นเวลา 24 ชั่วโมง อย่างไรก็ตาม หลังจากใส่ไดเอนน้ำได้รับสารผสมระหว่าง imidacloprid กับ glyphosate เป็นระยะเวลา 48 ชั่วโมง พบว่า ผลความเป็นพิษเฉียบพลันร่วมเปลี่ยนเป็นการออกฤทธิ์แบบเสริมฤทธิ์ ซึ่งเป็นไปได้ว่าในช่วงเวลานี้ glyphosate ถูกนำเข้าสู่กระบวนการเปลี่ยนแปลงสภาพของยาทำให้ glyphosate ถูกเปลี่ยนให้อยู่ในรูปของโครงสร้างที่มีความเป็นพิษ จึงส่งผลให้ฤทธิ์ของ glyphosate และ imidacloprid เกิดขึ้นพร้อมกัน ดังนั้นจึงสรุปได้ว่า กระบวนการเปลี่ยนแปลงสภาพของยามีผลต่ออันตรกิริยาของ imidacloprid กับ glyphosate ที่เกิดขึ้นในใส่ไดเอนน้ำ

ผลการศึกษาพยาธิสภาพเนื้อเยื่อของใส่ไดเอนน้ำด้วยเทคนิค Hematoxylin - Eosin (H&E) พบว่า imidacloprid glyphosate และสารผสมระหว่าง imidacloprid กับ glyphosate ที่ระดับความเข้มข้น 0.2 และ 0.8 เท่าของค่า LC_{50} ก่อให้เกิดการเปลี่ยนแปลงพยาธิสภาพเนื้อเยื่อของใส่ไดเอนน้ำ อย่างไรก็ตาม ระดับความเข้มข้นของ imidacloprid glyphosate และสารผสม imidacloprid กับ glyphosate ที่เพิ่มขึ้น ไม่ได้ส่งผลให้เกิดการเปลี่ยนแปลงทางพยาธิสภาพเนื้อเยื่อของใส่ไดเอนน้ำที่มากขึ้น ผลการวิจัยนี้สอดคล้องกับรายงานของ Dittbrenner et al. (2011) ที่ได้ศึกษาผลของ imidacloprid ต่อการเปลี่ยนแปลงพยาธิสภาพเนื้อเยื่อด้วยเทคนิค H&E ในใส่ไดเอนดิน 3 ชนิด คือ *E. fetida*, *Aporrectodea caliginosa* และ *Lumbricus terrestris* พบว่า imidacloprid สามารถชักนำให้เกิดความเสียหายที่เซลล์เยื่อบุผิว (epidermal cells) เซลล์เยื่อบุทางเดินอาหารส่วนกลาง (midgut cells) และเซลล์คลอโรพลาสต์ (chloragocytes) และงานวิจัยของ K. Wang, Pang, et al. (2015) ได้ศึกษาผลของ imidacloprid ต่อการเปลี่ยนแปลงพยาธิสภาพเนื้อเยื่อของใส่ไดเอนดิน (*E. fetida*) ด้วยเทคนิค H&E ร่วมกับเทคนิค Periodic acid - Schiff - Alcianblue (PSA) พบว่า เซลล์เยื่อบุผิวและเซลล์เยื่อบุทางเดินอาหารส่วนกลางเกิดความเสียหาย นอกจากนี้ Stanley and Joy (2014) ได้รายงานผลของ glyphosate ต่อการเปลี่ยนแปลงพยาธิสภาพของใส่ไดเอนดิน (*Nsukkadrilus mbae*) พบว่า glyphosate สามารถชักนำให้กล้ามเนื้อตามยาว (longitudinal muscle) และกล้ามเนื้อวง (circular muscle) สลายตัวและแยกออกจากกัน โดยการเปลี่ยนแปลงทางพยาธิสภาพที่เกิดขึ้นนั้นเกิดขึ้นจากการสร้างสารอนุมูลอิสระ

โดยเฉพาะอย่างยิ่ง reactive oxygen species (ROS) ในปริมาณมากจากกระบวนการเปลี่ยนแปลงสภาพของยาในระยะที่ 1 ส่งผลให้ ROS ซึ่งมีความไวในการเกิดปฏิกิริยาเข้าทำพันธะกับสารชีวโมเลกุลที่เยื่อหุ้มเซลล์และในเซลล์ ทำให้โครงสร้างของเซลล์เกิดความเสียหายจนนำไปสู่การเปลี่ยนแปลงในระดับเนื้อเยื่อในสิ่งมีชีวิต (Stanley & Joy, 2014; K. Wang, Pang, et al., 2015) นอกจากนี้งานวิจัยของ Fischer and Horváth (1976) ได้ศึกษาผลของยาฆ่าแมลง carbofuran ต่อพยาธิสภาพเนื้อเยื่อของไส้เดือนน้ำพบว่า carbofuran สามารถชักนำให้ไส้เดือนน้ำสร้าง chloragosomes ในปริมาณมาก โดยการสร้าง chloragosome ที่มากเกินไปนี้ (overexpression of chloragosomes) สามารถเป็นตัวบ่งชี้ได้ว่า ไส้เดือนน้ำตอบสนองต่อความเป็นพิษของ imidacloprid และ glyphosate เนื่องจากเซลล์คลอราโกไซต์ที่บรรจุ chloragosomes มีหน้าที่สำคัญในระบบภูมิคุ้มกันและการกำจัดสารพิษที่เข้าสู่ร่างกายของไส้เดือนน้ำซึ่งคล้ายกับหน้าที่ของตับในสิ่งมีชีวิตที่มีกระดูกสันหลัง การที่เซลล์คลอราโกไซต์สร้าง chloragosomes ที่มากขึ้นจึงบ่งชี้ได้ว่า ไส้เดือนน้ำได้รับสารพิษและเกิดกระบวนการกำจัดสารพิษออกจากร่างกาย (Kwak, Kim, & An, 2014) ดังนั้นจึงสรุปได้ว่า การเปลี่ยนแปลงพยาธิสภาพเนื้อเยื่อ โดยเฉพาะอย่างยิ่งการแสดงออกของ chloragosomes สามารถใช้เป็นตัวบ่งชี้ทางชีวภาพ (biological marker) ในการประเมินความเป็นพิษของ imidacloprid และ glyphosate ต่อไส้เดือนน้ำได้

ผลการศึกษากิจกรรมของเอนไซม์ acetylcholinesterase (AChE) ในไส้เดือนน้ำที่ได้รับ imidacloprid ที่ระดับความเข้มข้น 0.2 และ 0.8 เท่าของค่า LC_{50} พบว่า กิจกรรมของเอนไซม์ AChE เพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่เวลา 24 และ 48 ชั่วโมง เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม ($p < 0.05$) และที่เวลา 24 ชั่วโมง กิจกรรมของเอนไซม์ AChE เพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อความเข้มข้นของ imidacloprid เพิ่มขึ้น ($p < 0.05$) ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยของ W. Li et al. (2018) และ Miao, Reisig, Li, and Wu (2016) ที่ศึกษาความเป็นพิษของ imidacloprid ที่ระดับความเข้มข้นต่ำกว่าค่า LC_{50} ต่อการเปลี่ยนแปลงกิจกรรมของเอนไซม์ AChE ในแมลง *Rhopalosiphum padi* และ *Megacopta cribraria* พบว่า กิจกรรมของเอนไซม์ AChE เพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่เวลา 24 ชั่วโมง เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม ($p < 0.05$) โดยการเพิ่มขึ้นของกิจกรรมของเอนไซม์ AChE มีสาเหตุมาจากกลไกการออกฤทธิ์ (mode of action) ของ imidacloprid ที่สามารถสร้างพันธะกับ nicotinic acetylcholine receptors (nAChRs) ได้อย่างถาวรจนส่งผลให้สารสื่อประสาท acetylcholine ไม่สามารถสร้างพันธะกับ nAChRs ได้ ทำให้ปริมาณของสารสื่อประสาท acetylcholine คงเหลือสะสมอยู่ใน synaptic cleft จนส่งผลให้เอนไซม์ AChE เข้าทำปฏิกิริยาไฮโดรไลซิสกับ acetylcholine จนนำไปสู่การเพิ่มขึ้นของกิจกรรม

ของเอนไซม์ AChE (Morrissey et al., 2015) อย่างไรก็ตาม ผลการศึกษากิจกรรมของเอนไซม์ AChE ในไส้เดือนน้ำที่ได้รับ glyphosate และสารผสมระหว่าง imidacloprid กับ glyphosate กลับลดลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่เวลา 24 และ 48 ชั่วโมง เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม ($p < 0.05$) และยังพบว่า ที่เวลา 24 ชั่วโมง กิจกรรมของเอนไซม์ AChE ลดลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อความเข้มข้นของ glyphosate และสารผสมระหว่าง imidacloprid กับ glyphosate เพิ่มขึ้น ($p < 0.05$) ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยของ Matozzo et al. (2018) ที่ศึกษาความเป็นพิษของ glyphosate ต่อการเปลี่ยนแปลงกิจกรรมของเอนไซม์ AChE ในเนื้อเยื่อเหงือกของหอย *Mytilus galloprovincialis* พบว่า เมื่อหอยได้รับ glyphosate เป็นเวลา 7 วัน มีผลทำให้กิจกรรมของเอนไซม์ AChE ลดลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม ($p < 0.05$) และ Sánchez et al. (2017) ได้ศึกษาความเป็นพิษของ glyphosate ต่อการเปลี่ยนแปลงกิจกรรมของเอนไซม์ AChE ในกล้ามเนื้อปลา *Jenynsia multidentata* พบว่า เมื่อปลาได้รับ glyphosate เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ส่งผลให้กิจกรรมของเอนไซม์ AChE ลดลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม ($p < 0.05$) นอกจากนี้งานวิจัยของ Zhu et al. (2017b) รายงานว่า สารผสมระหว่าง imidacloprid กับยาปราบศัตรูพืชที่มีหมู่ฟอสเฟตเป็นองค์ประกอบมีผลทำให้กิจกรรมของเอนไซม์ AChE ลดลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม ($p < 0.05$) โดยการลดลงของกิจกรรมของเอนไซม์ AChE มีสาเหตุมาจากการเข้าทำพันธะของหมู่ฟอสเฟตในโครงสร้างของ glyphosate กับบริเวณ esteric site หรือบริเวณที่มีกรดอะมิโน serine ของเอนไซม์ AChE ส่งผลให้เอนไซม์ AChE ไม่สามารถเข้าทำปฏิกิริยาไฮโดรไลซิสกับ acetylcholine จนนำไปสู่การลดลงของกิจกรรมของเอนไซม์ AChE (Chandra & Kumar, 2016) ดังนั้นจึงสรุปได้ว่า การเปลี่ยนแปลงกิจกรรมของเอนไซม์ AChE สามารถใช้เป็นตัวบ่งชี้ทางชีวภาพ (biological marker) ในการประเมินความเป็นพิษของ imidacloprid และ glyphosate ต่อไส้เดือนน้ำได้

ผลการศึกษากิจกรรมของเอนไซม์ catalase (CAT) ในไส้เดือนน้ำที่ได้รับ imidacloprid พบว่า กิจกรรมของเอนไซม์ CAT เพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่เวลา 24 และ 48 ชั่วโมง เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม ($p < 0.05$) นอกจากนี้ยังพบว่า กิจกรรมของเอนไซม์ CAT เพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ เมื่อระดับความเข้มข้นของ imidacloprid เพิ่มขึ้น ($p < 0.05$) ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยของ Qi et al. (2018) ที่รายงานไว้ว่า imidacloprid มีผลต่อการเปลี่ยนแปลงกิจกรรมของเอนไซม์ CAT ใน *D. magna* ที่เวลา 48 ชั่วโมง โดยพบว่า กิจกรรมของเอนไซม์ CAT เพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม ($p < 0.05$) และผลการศึกษากิจกรรมของเอนไซม์ CAT ในไส้เดือนน้ำที่ได้รับ glyphosate พบว่า กิจกรรมของเอนไซม์ CAT เพิ่มขึ้น

อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่เวลา 24 และ 48 ชั่วโมง เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม ($p < 0.05$) นอกจากนี้ยังพบว่า กิจกรรมของเอนไซม์ CAT เพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ เมื่อระดับความเข้มข้นของ glyphosate เพิ่มขึ้น ($p < 0.05$) ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยของ Contardo-Jara, Klingelmann, and Wiegand (2009) รายงานว่า เมื่อได้เดือนน้ำ (*Lumbriculus variegatus*) ได้รับ glyphosate เป็นเวลา 4 วัน ส่งผลให้กิจกรรมของเอนไซม์ CAT เพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อระดับความเข้มข้นของ glyphosate เพิ่มขึ้น ($p < 0.05$) และงานวิจัยของ Hattaya et al. (2015) ที่ศึกษาผลของยาปราบวัชพืชที่มีส่วนผสมของ glyphosate ต่อการเปลี่ยนแปลงกิจกรรมของเอนไซม์ CAT ในไรแดง (*Moina macrocopa*) ที่เวลา 48 ชั่วโมง พบว่า กิจกรรมของเอนไซม์ CAT เพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อระดับความเข้มข้นของยาปราบวัชพืชที่มีส่วนผสมของ glyphosate เพิ่มขึ้น ($p < 0.05$) นอกจากนี้ผลการศึกษากิจกรรมของเอนไซม์ CAT ในได้เดือนน้ำที่ได้รับสารผสมระหว่าง imidacloprid กับ glyphosate ยังพบว่า กิจกรรมของเอนไซม์ CAT เพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่เวลา 24 และ 48 ชั่วโมง เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม ($p < 0.05$) นอกจากนี้ยังพบว่า กิจกรรมของเอนไซม์ CAT เพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ เมื่อระดับความเข้มข้นของสารผสมระหว่าง imidacloprid กับ glyphosate เพิ่มขึ้น ($p < 0.05$) ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยของ Shukla, Jhamtani, Dahiya, and Agarwal (2017) ที่ศึกษาความเป็นพิษร่วมของ imidacloprid กับยาปราบศัตรูพืชอื่นที่มีหมู่ฟอสเฟตเป็นองค์ประกอบเช่นเดียวกับ glyphosate พบว่า กิจกรรมของเอนไซม์ CAT ที่เวลา 24 ชั่วโมง ในปลาม้าลาย (*Danio rerio*) เพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อระดับความเข้มข้นของสารผสมเพิ่มขึ้น ($p < 0.05$) โดยการเพิ่มขึ้นของกิจกรรมของเอนไซม์ CAT เป็นผลมาจากกระบวนการเปลี่ยนแปลงสภาพของยาในช่วงระยะที่ 1 ที่มีการสร้างสารอนุมูลอิสระขึ้นในปริมาณมาก ซึ่งสารอนุมูลอิสระเหล่านี้จะถูกกำจัดผ่าน antioxidant system โดยการทำงานของกลุ่มของเอนไซม์ต้านอนุมูลอิสระ (antioxidant enzymes) ซึ่งหนึ่งในนั้น คือ เอนไซม์ CAT ที่พบได้มากใน peroxisomes โดยมีหน้าที่กำจัดสารอนุมูลอิสระชนิดไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ (H_2O_2) ให้เปลี่ยนเป็นโมเลกุลของน้ำและออกซิเจน การทำปฏิกิริยาของ H_2O_2 ในปริมาณมากกับเอนไซม์ catalase จึงส่งผลให้กิจกรรมของเอนไซม์ CAT เพิ่มขึ้น (M.-H. Li et al., 2017; Shukla et al., 2017; Vieira et al., 2018) ทั้งนี้ ผลการศึกษายังพบว่า กิจกรรมของเอนไซม์ CAT สอดคล้องกับอัตราการเกิดของสารผสมแบบยับยั้งฤทธิ์ที่เกิดขึ้นกล่าวคือ ที่เวลา 24 ชั่วโมง กิจกรรมของเอนไซม์ CAT ของได้เดือนน้ำที่ได้รับ imidacloprid ความเข้มข้น 0.2 เท่าของค่า LC_{50} อยู่ที่ $3.06 \times 10^{-5} \pm 3.80 \times 10^{-6} \mu\text{mol min}^{-1} \text{mg protein}^{-1}$ และกิจกรรมของเอนไซม์ CAT ของได้เดือนน้ำที่ได้รับ glyphosate ความเข้มข้น 0.2 เท่า

ของค่า LC_{50} อยู่ที่ $2.26 \times 10^{-5} \pm 4.80 \times 10^{-6} \mu\text{mol min}^{-1} \text{mg protein}^{-1}$ แต่กิจกรรมของเอนไซม์ CAT ของไส้เดือนน้ำที่ได้รับสารผสมระหว่าง imidacloprid กับ glyphosate ความเข้มข้น 0.2 เท่าของค่า LC_{50} อยู่ที่ $3.03 \times 10^{-5} \pm 2.00 \times 10^{-6} \mu\text{mol min}^{-1} \text{mg protein}^{-1}$ ซึ่งน้อยกว่าผลรวมของกิจกรรมของเอนไซม์ CAT ของไส้เดือนน้ำที่ได้รับ imidacloprid และ glyphosate เพียงสารเดียว เช่นเดียวกับกิจกรรมของเอนไซม์ CAT ของไส้เดือนน้ำที่ได้รับสารความเข้มข้น 0.8 เท่าของค่า LC_{50} ที่เวลา 24 ชั่วโมง ที่พบว่า กิจกรรมของเอนไซม์ CAT ของไส้เดือนน้ำที่ได้รับสารผสมระหว่าง imidacloprid กับ glyphosate น้อยกว่ากิจกรรมของเอนไซม์ CAT ของไส้เดือนน้ำที่ได้รับ imidacloprid และ glyphosate เพียงสารเดียว และกิจกรรมของเอนไซม์ CAT ที่เวลา 48 ชั่วโมงก็สอดคล้องกับอันตรกิริยาของของสารผสมแบบเพิ่มฤทธิ์ที่เกิดขึ้น กล่าวคือ ที่เวลา 48 ชั่วโมง กิจกรรมของเอนไซม์ CAT ของไส้เดือนน้ำที่ได้รับ imidacloprid ความเข้มข้น 0.8 เท่าของค่า LC_{50} อยู่ที่ $3.30 \times 10^{-5} \pm 5.70 \times 10^{-6} \mu\text{mol min}^{-1} \text{mg protein}^{-1}$ และกิจกรรมของเอนไซม์ CAT ของไส้เดือนน้ำที่ได้รับ glyphosate ความเข้มข้น 0.8 เท่าของค่า LC_{50} อยู่ที่ $4.41 \times 10^{-5} \pm 3.00 \times 10^{-7} \mu\text{mol min}^{-1} \text{mg protein}^{-1}$ ซึ่งเมื่อรวมกันแล้วมีค่าใกล้เคียงกับกิจกรรมของเอนไซม์ CAT ของไส้เดือนน้ำที่ได้รับสารผสมระหว่าง imidacloprid กับ glyphosate ความเข้มข้น 0.8 เท่าของค่า LC_{50} ซึ่งอยู่ที่ $7.59 \times 10^{-5} \pm 5.30 \times 10^{-6} \mu\text{mol min}^{-1} \text{mg protein}^{-1}$ ดังนั้นจึงสรุปได้ว่า การเปลี่ยนแปลงกิจกรรมของเอนไซม์ CAT สามารถใช้เป็นตัวบ่งชี้ทางชีวภาพ (biological marker) ในการประเมินความเป็นพิษของ imidacloprid และ glyphosate ต่อไส้เดือนน้ำได้

ข้อเสนอแนะ

1. งานวิจัยนี้เป็นการศึกษาในระดับห้องปฏิบัติการเท่านั้น ดังนั้น ในงานวิจัยครั้งต่อไป ควรนำผลการทดลองนี้ไปทำการทดลองต่อในระดับระบบนิเวศจำลองหรือในระบบนิเวศจริงต่อไป
2. งานวิจัยนี้เป็นการศึกษาความเป็นพิษเฉียบพลันเชิงเดี่ยวและความเป็นพิษร่วมของ imidacloprid และ glyphosate ต่อไส้เดือนน้ำที่เป็นผู้ย่อยสลายในระบบนิเวศเท่านั้น ดังนั้น ในงานวิจัยครั้งต่อไปควรทำการศึกษาความเป็นพิษของ imidacloprid และ glyphosate ต่อสิ่งมีชีวิตชนิดอื่น ๆ และศึกษาความเป็นพิษในระดับเรื้อรังต่อไป

บรรณานุกรม

- Aebi, H. (1984). Catalase in vitro *Methods in enzymology* (Vol. 105, pp. 121-126): Elsevier.
- Annabi, A., & Dhouib, I. E.-B. (2015). Mechanisms of imidacloprid-induced alteration of hypothalamic-pituitary-adrenal (HPA) axis after subchronic exposure in male rats. *Recent Advances in Biology and Medicine*.
- Ayanda, O. I., Oniye, S., Auta, J., & Ajibola, V. (2015). Acute toxicity of glyphosate and paraquat to the African catfish (*Clarias gariepinus*, Teugels 1986) using some biochemical indicators. *Tropical zoology*, 28(4), 152-162.
- Bartlett, A. J., Hedges, A. M., Intini, K. D., Brown, L. R., Maisonneuve, F. J., Robinson, S. A., . . . de Solla, S. R. (2018). Lethal and sublethal toxicity of neonicotinoid and butenolide insecticides to the mayfly, *Hexagenia* spp. *Environmental Pollution*, 238, 63-75.
- Baxter, L., Brain, R. A., Lissemore, L., Solomon, K. R., Hanson, M. L., & Prosser, R. S. (2016). Influence of light, nutrients, and temperature on the toxicity of atrazine to the algal species *Raphidocelis subcapitata*: implications for the risk assessment of herbicides. *Ecotoxicology and environmental safety*, 132, 250-259.
- Berman, M. C., Marino, D., Quiroga, M. V., & Zagarese, H. (2018). Occurrence and levels of glyphosate and AMPA in shallow lakes from the Pampean and Patagonian regions of Argentina. *Chemosphere*, 200, 513-522.
- Bettinetti, R., Giarei, C., & Provini, A. (2003). Chemical analysis and sediment toxicity bioassays to assess the contamination of the River Lambro (Northern Italy). *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, 45(1), 0072-0078.
- Bliss, C. I. (1934). The method of probits—a correction. *Science*, 79(2053), 409-410.
- Bradford, M. M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical biochemistry*, 72(1-2), 248-254.
- Bridi, D., Altenhofen, S., Gonzalez, J. B., Reolon, G. K., & Bonan, C. D. (2017). Glyphosate and Roundup® alter morphology and behavior in zebrafish. *Toxicology*, 392, 32-

39.

- Brodeur, J. C., Poliserpi, M. B., & Sánchez, M. (2014). Synergy between glyphosate-and cypermethrin-based pesticides during acute exposures in tadpoles of the common South American Toad *Rhinella arenarum*. *Chemosphere*, 112, 70-76.
- Brown, C. D., & Van Beinum, W. (2009). Pesticide transport via sub-surface drains in Europe. *Environmental Pollution*, 157(12), 3314-3324.
- Cang, T., Dai, D., Yang, G., Yu, Y., Lv, L., Cai, L., . . . Wang, Y. (2017). Combined toxicity of imidacloprid and three insecticides to the earthworm, *Eisenia fetida* (Annelida, Oligochaeta). *Environmental Science and Pollution Research*, 24(9), 8722-8730.
- Capowiez, Y., Dittbrenner, N., Rault, M., Triebskorn, R., Hedde, M., & Mazzia, C. (2010). Earthworm cast production as a new behavioural biomarker for toxicity testing. *Environmental Pollution*, 158(2), 388-393.
- Capowiez, Y., Rault, M., Costagliola, G., & Mazzia, C. (2005). Lethal and sublethal effects of imidacloprid on two earthworm species (*Aporrectodea nocturna* and *Allolobophora icterica*). *Biology and Fertility of Soils*, 41(3), 135-143.
- Cavalcante, D., Martinez, C., & Sofia, S. (2008). Genotoxic effects of Roundup® on the fish *Prochilodus lineatus*. *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, 655(1), 41-46.
- Chandra, R., & Kumar, V. (2016). Biotransformation and Biodegradation of Organophosphates and Organohalides. *Environmental Waste Management*, 475.
- Chen, C., Wang, Y., Zhao, X., Wang, Q., & Qian, Y. (2014). Comparative and combined acute toxicity of butachlor, imidacloprid and chlorpyrifos on earthworm, *Eisenia fetida*. *Chemosphere*, 100, 111-115.
- COM, E. (2012). The combination effects of chemicals—chemical mixtures. *Communication from the Commission to the Council*, 252, 252.
- Connors, D. E., & Black, M. C. (2004). Evaluation of lethality and genotoxicity in the freshwater mussel *Utterbackia imbecillis* (Bivalvia: Unionidae) exposed singly and in combination to chemicals used in lawn care. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, 46(3), 362-371.

- Contardo-Jara, V., Klingelmann, E., & Wiegand, C. (2009). Bioaccumulation of glyphosate and its formulation Roundup Ultra in *Lumbriculus variegatus* and its effects on biotransformation and antioxidant enzymes. *Environmental Pollution*, 157(1), 57-63.
- Cooper, J., & Dobson, H. (2007). The benefits of pesticides to mankind and the environment. *Crop Protection*, 26(9), 1337-1348.
- Crosby, E. B., Bailey, J. M., Oliveri, A. N., & Levin, E. D. (2015). Neurobehavioral impairments caused by developmental imidacloprid exposure in zebrafish. *Neurotoxicology and teratology*, 49, 81-90.
- Dai, P., Hu, P., Tang, J., Li, Y., & Li, C. (2016). Effect of glyphosate on reproductive organs in male rat. *Acta histochemica*, 118(5), 519-526.
- Department of Agriculture. (2015). *Determination on the Impact of Pesticide Use and Monitoring of Hazardous Pesticide or Persistent Residues in the Environment*. Retrieved from Bangkok: <http://www.doa.go.th/research/attachment.php?aid=2218>
- Di, S., Liu, R., Cheng, C., Chen, L., Zhang, W., Tian, Z., . . . Diao, J. (2017). Biomarkers in *Tubifex tubifex* for the metalaxyl and metalaxyl-M toxicity assessment in artificial sediment. *Environmental Science and Pollution Research*, 24(4), 3618-3625.
- Di, S., Liu, R., Tian, Z., Cheng, C., Chen, L., Zhang, W., . . . Diao, J. (2017). Assessment of tissue-specific accumulation, elimination and toxic effects of dichlorodiphenyltrichloroethanes (DDTs) in carp through aquatic food web. *Scientific Reports*, 7(1), 2288.
- Dittbrenner, N., Schmitt, H., Capowiez, Y., & Triebkorn, R. (2011). Sensitivity of *Eisenia fetida* in comparison to *Aporrectodea caliginosa* and *Lumbricus terrestris* after imidacloprid exposure. Body mass change and histopathology. *Journal of soils and sediments*, 11(6), 1000.
- Dittbrenner, N., Triebkorn, R., Moser, I., & Capowiez, Y. (2010). Physiological and behavioural effects of imidacloprid on two ecologically relevant earthworm species (*Lumbricus terrestris* and *Aporrectodea caliginosa*). *Ecotoxicology*, 19(8), 1567-1573.
- Dively, G. P., Embrey, M. S., Kamel, A., Hawthorne, D. J., & Pettis, J. S. (2015).

- Assessment of chronic sublethal effects of imidacloprid on honey bee colony health. *PLoS one*, 10(3), e0118748.
- Duan, Y., Yan, X., Wei, L., Bensimon, C., Fernando, P., & Ruddy, T. D. (2016). Acute and subacute toxicity studies of CMICE-013, a novel iodinated rotenone-based myocardial perfusion tracer, in Sprague Dawley rats and Gottingen minipigs. *Regulatory Toxicology and Pharmacology*, 80, 195-209.
- El-Sayed H., E., Mohamed S., E.-S., & Youssef, D. (2016). Molluscicidal Potential of Two Neonicotinoids and Fipronil Against Three Terrestrial Snail Species *International Journal of Zoological Investigations*, 2(1), 1-8.
- Elbert, A., Haas, M., Springer, B., Thielert, W., & Nauen, R. (2008). Applied aspects of neonicotinoid uses in crop protection. *Pest management science*, 64(11), 1099-1105.
- Ellman, G. L., Courtney, K. D., Andres Jr, V., & Featherstone, R. M. (1961). A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. *Biochemical pharmacology*, 7(2), 88-95.
- Environmental Research and Training Center. (2017). *A study of risk management approaches: Organophosphate pesticides in the Northern region by participatory research*. Retrieved from Bangkok: <https://www.rihes.cmu.ac.th/ERU/?p=264>
- Fischer, E., & Horváth, I. (1976). The effect of carbofuran-toxication on the chloragogen tissue of *Tubifex tubifex* Müll.(Oligochaeta). *Zeitschrift für mikroskopisch-anatomische Forschung*, 90(4), 720-736.
- Fossen, M. (2006). Environmental fate of imidacloprid. *California Department of Pesticide Regulation*, 1-16.
- Gaughan, L. C., Engel, J. L., & Casida, J. E. (1980). Pesticide interactions: effects of organophosphorus pesticides on the metabolism, toxicity, and persistence of selected pyrethroid insecticides. *Pesticide biochemistry and physiology*, 14(1), 81-85.
- Gerhardt, A. (2009). Screening the toxicity of Ni, Cd, Cu, ivermectin, and imidacloprid in a short-term automated behavioral toxicity test with *Tubifex tubifex* (Müller

- 1774)(Oligochaeta). *Human and Ecological Risk Assessment*, 15(1), 27-40.
- Giesy, J. P., Dobson, S., & Solomon, K. R. (2000). Ecotoxicological risk assessment for Roundup® herbicide *Reviews of environmental contamination and toxicology* (pp. 35-120): Springer.
- Gomes, M. P., da Silva Cruz, F. V., Bicalho, E. M., Borges, F. V., Fonseca, M. B., Juneau, P., & Garcia, Q. S. (2017). Effects of glyphosate acid and the glyphosate-commercial formulation (Roundup) on *Dimorphandra wilsonii* seed germination: interference of seed respiratory metabolism. *Environmental Pollution*, 220, 452-459.
- Goñalons, C. M., & Farina, W. M. (2018). Impaired associative learning after chronic exposure to pesticides in young adult honey bees. *Journal of Experimental Biology*, 221(7), jeb176644.
- Gupta, R. C. (2014). *Biomarkers in toxicology*: Academic Press.
- Hansen, L. R., & Roslev, P. (2016). Behavioral responses of juvenile *Daphnia magna* after exposure to glyphosate and glyphosate-copper complexes. *Aquatic Toxicology*, 179, 36-43.
- Harrington, K. C., & Ghanizadeh, H. (2017). Herbicide application using wiper applicators-A review. *Crop Protection*, 102, 56-62.
- Hassoon, H. A., & Salman, S. A. (2016). The Acute Effect of Pesticides Carbaryl and Imidacloprid on *Daphnia pulex* species. *Journal of International Environmental Application and Science*, 11(1), 18.
- Hattaya, J., Nuttaya, W., & Ptumporn, M. (2015). Toxicity of Commercial Glyphosate on Mobilization, Growth, Reproduction and Catalase Activity of Water Flea *Moina macrocopa*. *KMUTT Research and Development Journal*, 38(2), 133-143.
- Héritier, L., Duval, D., Galinier, R., Meistertzheim, A. L., & Verneau, O. (2017). Oxidative stress induced by glyphosate-based herbicide on freshwater turtles. *Environmental toxicology and chemistry*, 36(12), 3343-3350.
- Hernández, A. F., Parrón, T., Tsatsakis, A. M., Requena, M., Alarcón, R., & López-Guarnido, O. (2013). Toxic effects of pesticide mixtures at a molecular level: their

- relevance to human health. *Toxicology*, 307, 136-145.
- Hong, Y., Yang, X., Yan, G., Huang, Y., Zuo, F., Shen, Y., . . . Cheng, Y. (2017). Effects of glyphosate on immune responses and haemocyte DNA damage of Chinese mitten crab, *Eriocheir sinensis*. *Fish & shellfish immunology*, 71, 19-27.
- Houssou, A., Daguégué, E., & Montchowui, E. (2017). Lethal and sub-lethal effects of cypermethrin and glyphosate on the freshwater's copepod, *Acanthocyclops robustus*. *Invertebrate Survival Journal*, 14, 140-148.
- Humason, G. L. (1962). Animal tissue techniques. *Animal tissue techniques*.
- Hvezdová, M., Kosubová, P., Košíková, M., Scherr, K. E., Šimek, Z., Brodský, L., . . . Svobodová, M. (2018). Currently and recently used pesticides in Central European arable soils. *Science of the Total Environment*, 613, 361-370.
- Jantawongsri, K., Thammachoti, P., Kitana, J., Khonsue, W., Varanusupakul, P., & Kitana, N. (2015). Altered Immune Response of the Rice Frog *Fejervarya limnocharis* Living in Agricultural Area with Intensive Herbicide Utilization at Nan Province, Thailand. *EnvironmentAsia*, 8(1).
- Johansen, A., & McFadden, L. M. (2017). The neurochemical consequences of methamphetamine self-administration in male and female rats. *Drug and alcohol dependence*, 178, 70-74.
- Kegley, S., Hill, B., Orme, S., & Choi, A. (2011). PAN pesticide database, pesticide action network.
- Key, P., Chung, K., Siewicki, T., & Fulton, M. (2007). Toxicity of three pesticides individually and in mixture to larval grass shrimp (*Palaemonetes pugio*). *Ecotoxicology and environmental safety*, 68(2), 272-277.
- Khalil, S. R., Awad, A., Mohammed, H. H., & Nassan, M. A. (2017). Imidacloprid insecticide exposure induces stress and disrupts glucose homeostasis in male rats. *Environmental toxicology and pharmacology*, 55, 165-174.
- Kılıç, G., & Kılıç, V. (2011). Metallothionein induction, acetylcholine esterase activity and antioxidative response as biomarkers of thallium toxicity in *Tubifex tubifex* (Oligochaeta, Tubificidae). *Toxicology Letters*, 205, S65.

- Kollman, W. S., & Segawa, R. (1995). *Interim report of the pesticide chemistry database*: Environmental Hazards Assessment Program, State of California, Environmental Protection Agency, Department of Pesticide Regulation, Environmental Monitoring and Pest Management Branch.
- Kong, M.-Z., Shi, X.-H., Cao, Y.-C., & Zhou, C.-R. (2008). Solubility of imidacloprid in different solvents. *Journal of Chemical & Engineering Data*, 53(3), 615-618.
- Kreutzweiser, D. P., Good, K. P., Chartrand, D. T., Scarr, T. A., Holmes, S. B., & Thompson, D. G. (2008). Effects on litter-dwelling earthworms and microbial decomposition of soil-applied imidacloprid for control of wood-boring insects. *Pest Management Science: formerly Pesticide Science*, 64(2), 112-118.
- Kwak, J. I., Kim, S. W., & An, Y.-J. (2014). A new and sensitive method for measuring in vivo and in vitro cytotoxicity in earthworm coelomocytes by flow cytometry. *Environmental research*, 134, 118-126.
- Lagauzère, S., Terrail, R., & Bonzom, J.-M. (2009). Ecotoxicity of uranium to *Tubifex tubifex* worms (Annelida, Clitellata, Tubificidae) exposed to contaminated sediment. *Ecotoxicology and environmental safety*, 72(2), 527-537.
- Li, M.-H., Ruan, L.-Y., Zhou, J.-W., Fu, Y.-H., Jiang, L., Zhao, H., & Wang, J.-S. (2017). Metabolic profiling of goldfish (*Carassius auratus*) after long-term glyphosate-based herbicide exposure. *Aquatic Toxicology*, 188, 159-169.
- Li, W., Lu, Z., Li, L., Yu, Y., Dong, S., Men, X., & Ye, B. (2018). Sublethal effects of imidacloprid on the performance of the bird cherry-oat aphid *Rhopalosiphum padi*. *PloS one*, 13(9), e0204097.
- Lister, L., Svendsen, C., Wright, J., Hooper, H., & Spurgeon, D. (2011). Modelling the joint effects of a metal and a pesticide on reproduction and toxicokinetics in Lumbricid earthworms. *Environment international*, 37(4), 663-670.
- Lobo, H., Méndez-Fernández, L., Martínez-Madrid, M., Daam, M. A., & Espíndola, E. L. (2016). Acute toxicity of zinc and arsenic to the warmwater aquatic oligochaete *Branchiura sowerbyi* as compared to its coldwater counterpart *Tubifex tubifex* (Annelida, Clitellata). *Journal of soils and sediments*, 16(12), 2766-2774.

- Lucan-Bouché, M.-L., Biagianti-Risbourg, S., Arsac, F., & Vernet, G. (1999). An original decontamination process developed by the aquatic oligochaete *Tubifex tubifex* exposed to copper and lead. *Aquatic Toxicology*, 45(1), 9-17.
- Ma, J., & Li, X. (2015). Alteration in the cytokine levels and histopathological damage in common carp induced by glyphosate. *Chemosphere*, 128, 293-298.
- Marking, L. (1984). Toxicity of chemical mixtures.
- Marzouki, S., Dhouib, I. B., Benabdessalem, C., Rekik, R., Doghri, R., Maroueni, A., . . . Barbouche, M. R. (2017). Specific immune responses in mice following subchronic exposure to acetamiprid. *Life sciences*, 188, 10-16.
- Matozzo, V., Fabrello, J., Masiero, L., Ferraccioli, F., Finos, L., Pastore, P., . . . Bogialli, S. (2018). Ecotoxicological risk assessment for the herbicide glyphosate to non-target aquatic species: A case study with the mussel *Mytilus galloprovincialis*. *Environmental Pollution*, 233, 623-632.
- Matsumura, M., Takeuchi, H., Satoh, M., Sanada-Morimura, S., Otuka, A., Watanabe, T., & Van Thanh, D. (2008). Species-specific insecticide resistance to imidacloprid and fipronil in the rice planthoppers *Nilaparvata lugens* and *Sogatella furcifera* in East and South-east Asia. *Pest Management Science: formerly Pesticide Science*, 64(11), 1115-1121.
- Meikle, W. G., Adamczyk, J. J., Weiss, M., Gregorc, A., Johnson, D. R., Stewart, S. D., . . . Lorenz, G. M. (2016). Sublethal effects of imidacloprid on honey bee colony growth and activity at three sites in the US. *PloS one*, 11(12), e0168603.
- Mensink, H., & Janssen, P. (1994). Environmental Health Criteria 159–Glyphosate. *International Programme on Chemical Safety (www.inchem.org)*.
- Miao, J., Reisig, D. D., Li, G., & Wu, Y. (2016). Sublethal effects of insecticide exposure on *Megacopta cribraria* (Fabricius) nymphs: key biological traits and acetylcholinesterase activity. *Journal of Insect Science*, 16(1), 99.
- Misra, R., Babu, G. S., Ray, R., & Hans, R. (2002). Tubifex: a sensitive model for UV-B-induced phototoxicity. *Ecotoxicology and environmental safety*, 52(3), 288-295.
- Moncaleano-Niño, A. M., Luna-Acosta, A., Gómez-Cubillos, M. C., Villamil, L., & Ahrens, M.

- J. (2018). Cholinesterase activity in the cup oyster *Saccostrea* sp. exposed to chlorpyrifos, imidacloprid, cadmium and copper. *Ecotoxicology and environmental safety*, 151, 242-254.
- Moreno, N. C., Sofia, S. H., & Martinez, C. B. (2014). Genotoxic effects of the herbicide Roundup Transorb® and its active ingredient glyphosate on the fish *Prochilodus lineatus*. *Environmental toxicology and pharmacology*, 37(1), 448-454.
- Morrissey, C. A., Mineau, P., Devries, J. H., Sanchez-Bayo, F., Liess, M., Cavallaro, M. C., & Liber, K. (2015). Neonicotinoid contamination of global surface waters and associated risk to aquatic invertebrates: a review. *Environment international*, 74, 291-303.
- Mosleh, Y. Y., Mofeed, J., Afifi, M., & Almaghrabi, O. A. (2014). Biological effects of pyrimethinal on aquatic worms (*Tubifex tubifex*) under laboratory conditions. *Bulletin of environmental contamination and toxicology*, 92(1), 85-89.
- Mosleh, Y. Y., Paris-Palacios, S., Ahmed, M. T., Mahmoud, F., Osman, M., & Biagianti-Risbourg, S. (2007). Effects of chitosan on oxidative stress and metallothioneins in aquatic worm *Tubifex tubifex* (Oligochaeta, Tubificidae). *Chemosphere*, 67(1), 167-175.
- Mosleh, Y. Y., Paris-Palacios, S., Couderchet, M., Biagianti-Risbourg, S., & Vernet, G. (2005). Metallothionein induction, antioxidative responses, glycogen and growth changes in *Tubifex tubifex* (Oligochaete) exposed to the fungicide, fenhexamid. *Environmental Pollution*, 135(1), 73-82.
- Mottier, A., Séguin, A., Devos, A., Le Pabic, C., Voiseux, C., Lebel, J. M., . . . Costil, K. (2015). Effects of subchronic exposure to glyphosate in juvenile oysters (*Crassostrea gigas*): from molecular to individual levels. *Marine pollution bulletin*, 95(2), 665-677.
- Naritsara, P., Sitthi, K., & Jirawet, P. (2013). Change of benthic fauna composition in deepwater rice field ecosystem. *Veridian E-Journal*, 6(2), 1010-1024.
- Natale, G. S., Vera-Candioti, J., de Arcaute, C. R., Soloneski, S., Larramendy, M. L., & Ronco, A. E. (2018). Lethal and sublethal effects of the pirimicarb-based

- formulation Aficida® on *Boana pulchella* (Duméril and Bibron, 1841) tadpoles (Anura, Hylidae). *Ecotoxicology and environmental safety*, 147, 471-479.
- National Committee on Strategy Development for Chemical Management. (2011). *The Fourth National Strategic Plan on Chemical Management (2012-2021)*. Nonthaburi: Ministry of Public Health Retrieved from http://ipcs.fda.moph.go.th/csnetnew/download/detail/?g_document_id=10&document_id=64.
- Nieto, E., Hampel, M., González-Ortegón, E., Drake, P., & Blasco, J. (2016). Influence of temperature on toxicity of single pharmaceuticals and mixtures, in the crustacean *A. desmarestii*. *Journal of hazardous materials*, 313, 159-169.
- Nowell, L. H., Moran, P. W., Schmidt, T. S., Norman, J. E., Nakagaki, N., Shoda, M. E., . . . Sandstrom, M. W. (2018). Complex mixtures of dissolved pesticides show potential aquatic toxicity in a synoptic study of Midwestern US streams. *Science of the Total Environment*, 613, 1469-1488.
- Özdemir, S., Altun, S., & Arslan, H. (2018). Imidacloprid exposure cause the histopathological changes, activation of TNF- α , iNOS, 8-OHdG biomarkers, and alteration of caspase 3, iNOS, CYP1A, MT1 gene expression levels in common carp (*Cyprinus carpio* L.). *Toxicology reports*, 5, 125-133.
- Paris-Palacios, S., Mosleh, Y. Y., Almohamad, M., Delahaut, L., Conrad, A., Arnoult, F., & Biagianti-Risbourg, S. (2010). Toxic effects and bioaccumulation of the herbicide isoproturon in *Tubifex tubifex* (Oligochaete, Tubificidae): a study of significance of autotomy and its utility as a biomarker. *Aquatic Toxicology*, 98(1), 8-14.
- Pasteris, A., Vecchi, M., Reynoldson, T. B., & Bonomi, G. (2003). Toxicity of copper-spiked sediments to *Tubifex tubifex* (Oligochaeta, Tubificidae): a comparison of the 28-day reproductive bioassay with a 6-month cohort experiment. *Aquatic Toxicology*, 65(3), 253-265.
- Peng, Y., Wang, H., & Cui, Y. (2017). Four species of *Tubifex* Lamarck (Annelida: Oligochaeta: Naididae) from Tibet, China. *Zootaxa*, 4320(2), 366-378.
- Pimentel, D. (1995). Amounts of pesticides reaching target pests: environmental impacts

- and ethics. *Journal of Agricultural and environmental Ethics*, 8(1), 17-29.
- Piola, L., Fuchs, J., Oneto, M. L., Basack, S., Kesten, E., & Casabé, N. (2013). Comparative toxicity of two glyphosate-based formulations to *Eisenia andrei* under laboratory conditions. *Chemosphere*, 91(4), 545-551.
- Qi, S., Wang, D., Zhu, L., Teng, M., Wang, C., Xue, X., & Wu, L. (2018). Neonicotinoid insecticides imidacloprid, guadipyr, and cycloxaprid induce acute oxidative stress in *Daphnia magna*. *Ecotoxicology and environmental safety*, 148, 352-358.
- Radwan, M., & Mohamed, M. (2013). Imidacloprid induced alterations in enzyme activities and energy reserves of the land snail, *Helix aspersa*. *Ecotoxicology and environmental safety*, 95, 91-97.
- Rendón-von Osten, J., & Dzúl-Caamal, R. (2017). Glyphosate residues in groundwater, drinking water and urine of subsistence farmers from intensive agriculture localities: a survey in Hopelchén, Campeche, Mexico. *International journal of environmental research and public health*, 14(6), 595.
- Rios, F. M., Wilcoxon, T. E., & Zimmerman, L. M. (2017). Effects of imidacloprid on *Rana catesbeiana* immune and nervous system. *Chemosphere*, 188, 465-469.
- Roy, N. M., Ochs, J., Zambrzycka, E., & Anderson, A. (2016). Glyphosate induces cardiovascular toxicity in *Danio rerio*. *Environmental toxicology and pharmacology*, 46, 292-300.
- Sadeghi, A., & Hedayati, A. (2014). Investigation of LC₅₀, NOEC and LOEC of glyphosate, deltamethrin and pretilachlor in guppies (*Poecilia Reticulata*). *Iranian Journal of Toxicology*, 8(26), 1124-1129.
- Sakset, A., Gallardo, W. G., & Ikejima, K. (2012). Physicochemical conditions and biodiversity in the freshwater fishing area of Pak Phanang River Basin, Thailand. *International Journal of Sustainable Development & World Ecology*, 19(2), 172-188.
- Sánchez, J. A. A., Junior, A. S. V., Corcini, C. D., da Silva, J. C., Primel, E. G., Caldas, S., . . . Martins, C. D. M. G. (2017). Effects of Roundup formulations on biochemical biomarkers and male sperm quality of the livebearing *Jenynsia multidentata*.

- Chemosphere*, 177, 200-210.
- Saraiva, A. S., Sarmiento, R. A., Rodrigues, A. C., Campos, D., Fedorova, G., Žlábek, V., . . .
 . Soares, A. M. (2017). Assessment of thiamethoxam toxicity to *Chironomus riparius*. *Ecotoxicology and environmental safety*, 137, 240-246.
- Sardo, A., & Soares, A. (2010). Assessment of the effects of the pesticide imidacloprid on the behaviour of the aquatic oligochaete *Lumbriculus variegatus*. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, 58(3), 648-656.
- Schnug, L., Leinaas, H. P., & Jensen, J. (2014). Synergistic sub-lethal effects of a biocide mixture on the springtail *Folsomia fimetaria*. *Environmental Pollution*, 186, 158-164.
- Shukla, S., Jhamtani, R. C., Dahiya, M., & Agarwal, R. (2017). Oxidative injury caused by individual and combined exposure of neonicotinoid, organophosphate and herbicide in zebrafish. *Toxicology reports*, 4, 240-244.
- Silva, V., Montanarella, L., Jones, A., Fernández-Ugalde, O., Mol, H. G., Ritsema, C. J., & Geissen, V. (2018). Distribution of glyphosate and aminomethylphosphonic acid (AMPA) in agricultural topsoils of the European Union. *Science of the Total Environment*, 621, 1352-1359.
- Siwaporn, L., & Paisarn, S. (2012). *Microtechniques*. Samut Prakan: advance printing service.
- Sobjak, T. M., Romão, S., do Nascimento, C. Z., dos Santos, A. F. P., Vogel, L., & Guimarães, A. T. B. (2017). Assessment of the oxidative and neurotoxic effects of glyphosate pesticide on the larvae of *Rhamdia quelen* fish. *Chemosphere*, 182, 267-275.
- Stanley, O., & Joy, O. (2014). Histopathological effects of glyphosate and its toxicity to the earthworm (*Nsukkadrilus mbae*), *British Biotechnology Journal* 4 (2): 149–163.
- Stellin, F., Gavinelli, F., Stevanato, P., Concheri, G., Squartini, A., & Paoletti, M. G. (2018). Effects of different concentrations of glyphosate (Roundup 360®) on earthworms (*Octodrilus complanatus*, *Lumbricus terrestris* and *Aporrectodea caliginosa*) in vineyards in the North-East of Italy. *Applied Soil Ecology*, 123, 802-808.
- Sumon, K. A., Ritika, A. K., Peeters, E. T., Rashid, H., Bosma, R. H., Rahman, M. S., . . .

- Van den Brink, P. J. (2018). Effects of imidacloprid on the ecology of sub-tropical freshwater microcosms. *Environmental Pollution*, 236, 432-441.
- Svendsen, C., Siang, P., Lister, L. J., Rice, A., & Spurgeon, D. J. (2010). Similarity, independence, or interaction for binary mixture effects of nerve toxicants for the nematode *Caenorhabditis elegans*. *Environmental toxicology and chemistry*, 29(5), 1182-1191.
- Tang, L.-D., Qiu, B.-L., Cuthbertson, A. G., & Ren, S.-X. (2015). Status of insecticide resistance and selection for imidacloprid resistance in the ladybird beetle *Propylaea japonica* (Thunberg). *Pesticide biochemistry and physiology*, 123, 87-92.
- Thorp, J. H., & Rogers, D. C. (2014). *Thorp and covich's freshwater invertebrates: ecology and general biology* (Vol. 1): Elsevier.
- Tomlin, C. D. (2009). The pesticide manual: A world compendium. *The pesticide manual: A World compendium*.(Ed. 15).
- Topal, A., Alak, G., Ozkaraca, M., Yeltekin, A. C., Comaklı, S., Acil, G., . . . Atamanalp, M. (2017). Neurotoxic responses in brain tissues of rainbow trout exposed to imidacloprid pesticide: assessment of 8-hydroxy-2-deoxyguanosine activity, oxidative stress and acetylcholinesterase activity. *Chemosphere*, 175, 186-191.
- Tsui, M. T., & Chu, L. (2004). Comparative toxicity of glyphosate-based herbicides: aqueous and sediment porewater exposures. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, 46(3), 316-323.
- Uwizeyimana, H., Wang, M., Chen, W., & Khan, K. (2017). The eco-toxic effects of pesticide and heavy metal mixtures towards earthworms in soil. *Environmental toxicology and pharmacology*, 55, 20-29.
- Van Dijk, T. C., Van Staalduinen, M. A., & Van der Sluijs, J. P. (2013). Macro-invertebrate decline in surface water polluted with imidacloprid. *PloS one*, 8(5), e62374.
- Van Stempvoort, D. R., Spoelstra, J., Senger, N. D., Brown, S. J., Post, R., & Struger, J. (2016). Glyphosate residues in rural groundwater, Nottawasaga River watershed, Ontario, Canada. *Pest management science*, 72(10), 1862-1872.

- Verro, R., Finizio, A., Otto, S., & Vighi, M. (2008). Predicting pesticide environmental risk in intensive agricultural areas. II: Screening level risk assessment of complex mixtures in surface waters. *Environmental science & technology*, 43(2), 530-537.
- Vieira, C. E. D., Pérez, M. R., Acayaba, R. D. A., Raimundo, C. C. M., & dos Reis Martinez, C. B. (2018). DNA damage and oxidative stress induced by imidacloprid exposure in different tissues of the Neotropical fish *Prochilodus lineatus*. *Chemosphere*, 195, 125-134.
- Wang, J., Wang, J., Wang, G., Zhu, L., & Wang, J. (2016). DNA damage and oxidative stress induced by imidacloprid exposure in the earthworm *Eisenia fetida*. *Chemosphere*, 144, 510-517.
- Wang, K., Pang, S., Mu, X., Qi, S., Li, D., Cui, F., & Wang, C. (2015). Biological response of earthworm, *Eisenia fetida*, to five neonicotinoid insecticides. *Chemosphere*, 132, 120-126.
- Wang, K., Qi, S., Mu, X., Chai, T., Yang, Y., Wang, D., . . . Wang, C. (2015). Evaluation of the toxicity, AChE activity and DNA damage caused by imidacloprid on earthworms, *Eisenia fetida*. *Bulletin of environmental contamination and toxicology*, 95(4), 475-480.
- Wang, R., Zheng, H., Qu, C., Wang, Z., Kong, Z., & Luo, C. (2016). Lethal and sublethal effects of a novel cis-nitromethylene neonicotinoid insecticide, cycloxaprid, on *Bemisia tabaci*. *Crop Protection*, 83, 15-19.
- Wang, Y., Wu, S., Chen, J., Zhang, C., Xu, Z., Li, G., . . . Wang, Q. (2018). Single and joint toxicity assessment of four currently used pesticides to zebrafish (*Danio rerio*) using traditional and molecular endpoints. *Chemosphere*, 192, 14-23.
- World Health Organization, & International Programme on Chemical Safety. (2010). *The WHO recommended classification of pesticides by hazard and guidelines to classification : 2009*. Retrieved from Geneva:
<http://www.who.int/iris/handle/10665/44271>
- Wright, D. A., & Welbourn, P. (2002). *Environmental toxicology* (Vol. 11): Cambridge University Press.

- Wu, S., Li, X., Liu, X., Yang, G., An, X., Wang, Q., & Wang, Y. (2018). Joint toxic effects of triazophos and imidacloprid on zebrafish (*Danio rerio*). *Environmental Pollution*, 235, 470-481.
- Xia, X., Xia, X., Huo, W., Dong, H., Zhang, L., & Chang, Z. (2016). Toxic effects of imidacloprid on adult loach (*Misgurnus anguillicaudatus*). *Environmental toxicology and pharmacology*, 45, 132-139.
- Xu, Y., Li, A. J., Li, K., Qin, J., & Li, H. (2017). Effects of glyphosate-based herbicides on survival, development and growth of invasive snail (*Pomacea canaliculata*). *Aquatic Toxicology*, 193, 136-143.
- Yang, G., Chen, C., Wang, Y., Cai, L., Kong, X., Qian, Y., & Wang, Q. (2015). Joint toxicity of chlorpyrifos, atrazine, and cadmium at lethal concentrations to the earthworm *Eisenia fetida*. *Environmental Science and Pollution Research*, 22(12), 9307-9315.
- Yang, G., Chen, C., Wang, Y., Peng, Q., Zhao, H., Guo, D., . . . Qian, Y. (2017). Mixture toxicity of four commonly used pesticides at different effect levels to the epigeic earthworm, *Eisenia fetida*. *Ecotoxicology and environmental safety*, 142, 29-39.
- Zhou, C.-F., Wang, Y.-J., Li, C.-C., Sun, R.-J., Yu, Y.-C., & Zhou, D.-M. (2013). Subacute toxicity of copper and glyphosate and their interaction to earthworm (*Eisenia fetida*). *Environmental Pollution*, 180, 71-77.
- Zhu, Y. C., Yao, J., Adamczyk, J., & Luttrell, R. (2017a). Feeding toxicity and impact of imidacloprid formulation and mixtures with six representative pesticides at residue concentrations on honey bee physiology (*Apis mellifera*). *PloS one*, 12(6), e0178421.
- Zhu, Y. C., Yao, J., Adamczyk, J., & Luttrell, R. (2017b). Synergistic toxicity and physiological impact of imidacloprid alone and binary mixtures with seven representative pesticides on honey bee (*Apis mellifera*). *PloS one*, 12(5), e0176837.
- Zimdahl, R. L. (2018). Fundamentals of weed science: Academic Press.

ประวัติผู้เขียน

ชื่อ-สกุล	ปัญญาวุฒิ รัตนารมย์
วัน เดือน ปี เกิด	23 ธันวาคม 2536
สถานที่เกิด	นครศรีธรรมราช
วุฒิการศึกษา	การศึกษบัณฑิต สาขาวิชาวิทยาศาสตร์-ชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ
ที่อยู่ปัจจุบัน	224 ถ.ราชดำเนิน ต.ในเมือง อ.เมือง จ.นครศรีธรรมราช 80000

