



ความเป็นพิษร่วมของ imidacloprid และแคดเมียมต่อการเปลี่ยนแปลงพยาธิสภาพเนื้อเยื่อและ  
กิจกรรมของเอนไซม์อะซิทิลโคลีนเอสเตอเรสในไส้เดือนน้ำ (*Tubifex tubifex* Müller, 1774)  
COMBINED TOXICITY OF IMIDACLOPRID AND CADMIUM ON HISTOPATHOLOGY  
AND ACETYLCHOLINESTERASE ACTIVITY IN AQUATIC OLIGOCHAETES (*Tubifex*  
*tubifex* Müller, 1774)

ปกรณ์ เล็กวงศ์ไพบุลย์

ความเป็นพิษร่วมของ imidacloprid และแคดเมียมต่อการเปลี่ยนแปลงพยาธิสภาพ  
เนื้อเยื่อและกิจกรรมของเอนไซม์อะซิติลโคลีนเอสเทอเรสในไส้เดือนน้ำ (*Tubifex*  
*tubifex* Müller, 1774)



ปริญญานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตร  
การศึกษามหาบัณฑิต สาขาวิชาชีววิทยา  
คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ  
ปีการศึกษา 2561  
ลิขสิทธิ์ของมหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ

COMBINED TOXICITY OF IMIDACLOPRID AND CADMIUM ON  
HISTOPATHOLOGY AND ACETYLCHOLINESTERASE ACTIVITY IN AQUATIC  
OLIGOCHAETES (*Tubifex tubifex* Müller, 1774)



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

2018

Copyright of Srinakharinwirot University

ปริญญาานิพนธ์

เรื่อง

ความเป็นพิษร่วมของ imidacloprid และแคดเมียมต่อการเปลี่ยนแปลงพยาธิสภาพเนื้อเยื่อและ  
กิจกรรมของเอนไซม์อะซิติลโคลีนเอสเทอเรสในไส้เดือนน้ำ (*Tubifex tubifex* Müller, 1774)

ของ

ปกรณณ์ เล็กวงศ์ไพบูลย์

ได้รับอนุมัติจากบัณฑิตวิทยาลัยให้นับเป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตร

ปริญญาการศึกษามหาบัณฑิต สาขาวิชาชีววิทยา

ของมหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ

คณบดีบัณฑิตวิทยาลัย

(รองศาสตราจารย์ นายแพทย์ฉัตรชัย เอกปัญญาสกุล)

คณะกรรมการสอบปากเปล่าปริญญาานิพนธ์

ที่ปรึกษาหลัก

ประธาน

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.นลินา ประไพรัชสิทธิ์)

(รองศาสตราจารย์ ดร.เฟื่องฟ้า อุ่นอบ)

กรรมการ

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.อนิษฐาน ศรีนวล)

ชื่อเรื่อง	ความเป็นพิษร่วมของ imidacloprid และแคดเมียมต่อการเปลี่ยนแปลงพยาธิสภาพเนื้อเยื่อและกิจกรรมของเอนไซม์อะซีทิลโคลีนเอสเตอเรสในไส้เดือนน้ำ ( <i>Tubifex tubifex</i> Müller, 1774)
ผู้วิจัย	ปกรณ เด็กลงศ์ไพบูลย์
ปริญญา	การศึกษามหาบัณฑิต
ปีการศึกษา	2561
อาจารย์ที่ปรึกษา	ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. นลินา ประไพรัชสิทธิ์

Imidacloprid เป็นหนึ่งในยาฆ่าแมลงในกลุ่มนีโอนิโคตินอยด์ที่มีการใช้งานอย่างแพร่หลายในการทำเกษตรกรรมและพบการปนเปื้อนในแหล่งน้ำ อย่างไรก็ตามไม่เพียงยาฆ่าแมลงเท่านั้นที่พบในแหล่งน้ำบริเวณพื้นที่เกษตรกรรมและโรงงานอุตสาหกรรม แต่ยังมีรายงานการปนเปื้อนของโลหะหนักแคดเมียมอีกด้วย งานวิจัยนี้จึงมีจุดมุ่งหมายเพื่อประเมินความเป็นพิษเฉียบพลันร่วมของ imidacloprid และแคดเมียมต่อการเปลี่ยนแปลงทางชีวเคมี พยาธิสภาพเนื้อเยื่อ และการสะสมของโลหะหนักในไส้เดือนน้ำ (*Tubifex tubifex*) โดยผลการทดสอบความเป็นพิษพบว่าค่า  $LC_{50}$  ของ imidacloprid ที่ 24 และ 48 ชั่วโมงมีค่าเท่ากับ 1.429 และ 1.663 มิลลิกรัมต่อลิตร ค่า  $LC_{50}$  ของแคดเมียมที่ 24 และ 48 ชั่วโมงมีค่าเท่ากับ 0.34 และ 0.018 มิลลิกรัมต่อลิตร นอกจากนี้จากการวิเคราะห์ค่ากิจกรรมทางชีววิทยา พบว่าสารผสมของ imidacloprid และแคดเมียมทำให้เกิดผลความเป็นพิษแบบเสริมฤทธิ์กัน โดยมีค่าดัชนีส่งเสริมการทำงานเท่ากับ 0.467 และ 0.041 ที่เวลา 24 และ 48 ชั่วโมงตามลำดับ ทั้งนี้ผลการทดสอบความเป็นพิษเฉียบพลันสอดคล้องกับการเปลี่ยนแปลงกิจกรรมเอนไซม์อะซีทิลโคลีนเอสเตอเรสและการสะสมของแคดเมียมในไส้เดือนน้ำที่มีแนวโน้มเพิ่มมากขึ้น เมื่อได้รับสารเคมีทั้งสองชนิดนี้พร้อมกัน ด้านพยาธิสภาพเนื้อเยื่อในไส้เดือนน้ำที่ได้รับสารเคมีปรากฏให้เห็นความเสียหายของเซลล์เยื่อชั้นผิว เซลล์ทางเดินอาหาร เซลล์กล้ามเนื้อ และเซลล์ประสาท การเพิ่มจำนวนที่ผิดปกติของเซลล์เยื่อชั้นผิวและเซลล์ทางเดินอาหาร การเพิ่มขึ้นของ chloragosome และการแยกชั้นของส่วนห่อหุ้มภายนอกและชั้นกล้ามเนื้อ

คำสำคัญ : ความเข้มข้นถึงขนาดมัตฐาน, ยาฆ่าแมลง, โลหะหนัก, ดัชนีทางชีวภาพ

Title	COMBINED TOXICITY OF IMIDACLOPRID AND CADMIUM ON HISTOPATHOLOGY AND ACETYLCHOLINESTERASE ACTIVITY IN AQUATIC OLIGOCHAETES ( <i>Tubifex tubifex</i> Müller, 1774)
Author	PAKORN LEKVONGPHIBOON
Degree	MASTER OF EDUCATION
Academic Year	2018
Thesis Advisor	Assistant Professor Nalena Praphairaksit , Ph.D.

Imidacloprid is one of the neonicotinoid insecticides that has been applied in many farms and can be detected in many natural resources, such as water. However, not only is this insecticide a heavy metal, cadmium was also found in the agricultural land in close proximity to industrial areas. This research aimed to investigate the combined acute toxic effects of imidacloprid and cadmium in term of biochemical changes, pathological changes, and the accumulation of cadmium in *Tubifex tubifex*, the aquatic oligochaete worm. The results showed that the  $LC_{50}$  of imidacloprid at twenty-four and forty-eight hours were 1.429 and 1.663 mg L<sup>-1</sup>,  $LC_{50}$  of cadmium at twenty-four and forty-eight hours were 0.34 and 0.018 mg L<sup>-1</sup>. In addition, the biological activity analysis indicated that the combined toxicity of two chemicals was a synergistic action and an additive index of 0.467 and 0.041 in twenty-four and forty-eight hours' test. The toxicity test results were in-line with the cadmium accumulation and the changes of AChE activity in worm tissue that increased significantly in the binary test. The results of the histopathology in the treated worms was observed and identified epidermal cell degeneration, gut cell degeneration, hyperplasia of epidermal cells, hyperplasia of gut cells, mussel degeneration, nerve degeneration, overexpression of chloragosome, and separation between integument and muscle layer.

Keyword : median-lethal concentration, insecticide, heavy metal, biological indicator

## กิตติกรรมประกาศ

ปริญญาานิพนธ์ฉบับนี้สำเร็จลงได้เป็นอย่างดี เนื่องจากความกรุณาและการให้คำปรึกษาจากอาจารย์ที่ปรึกษาปริญญาานิพนธ์ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. นลินา ประไพรัชสิทธิ์ ผู้ซึ่งให้คำปรึกษา ความรู้ คำแนะนำ และให้การสนับสนุนในด้านการทำงานวิจัย รวมทั้งปลูกฝังลักษณะของนักวิจัยที่ดี และเป็นแบบอย่างที่ดีในการทำงาน ผู้วิจัยต้องขอกราบขอบพระคุณเป็นอย่างสูงด้วยความนับถือ

ขอขอบพระคุณ รองศาสตราจารย์ ดร.เฟื่องฟ้า อุ่นอบ ที่ให้ความกรุณาในการเป็นประธานกรรมการในการสอบปากเปล่าปริญญาานิพนธ์

ขอขอบพระคุณ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.อนิษฐาน ศรีนวล ที่ให้ความกรุณาในการเป็นกรรมการในการสอบปากเปล่าปริญญาานิพนธ์

ขอขอบพระคุณ รองศาสตราจารย์ ดร.สมใจ เพ็งปรีชา ที่ให้ความกรุณาในการเป็นกรรมการผู้ทรงคุณวุฒิในการสอบเค้าโครงปริญญาานิพนธ์

ขอขอบพระคุณ รองศาสตราจารย์ ดร.ณรงค์ ประไพรัชสิทธิ์ ที่ให้ความกรุณาให้ความรู้ คำแนะนำ และเอื้อเฟื้อเครื่องมือในการวิจัย

ขอขอบพระคุณ คณาจารย์ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒที่ให้ความรู้ คำแนะนำ และเอื้อเฟื้อสถานที่และเครื่องมือในการวิจัย

ขอขอบคุณ สถาบันส่งเสริมการสอนวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีที่มอบทุนการศึกษาและทุนวิจัยให้ผู้วิจัยภายใต้โครงการส่งเสริมการผลิตครูที่มีความสามารถพิเศษทางวิทยาศาสตร์และคณิตศาสตร์ (สควค.)

สุดท้ายนี้ ขอกราบขอบพระคุณบิดา มารดา พี่ น้อง และเพื่อน ๆ ทุกคน ที่ได้ช่วยเหลือทั้งในด้านกำลังใจและกำลังใจ ทำให้ผู้วิจัยสามารถทำปริญญาานิพนธ์ฉบับนี้สำเร็จลงได้

ปกรณ์ เล็กวงศ์ไพบูลย์

## สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อภาษาไทย.....	ง
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ.....	จ
กิตติกรรมประกาศ.....	ฉ
สารบัญ.....	ช
สารบัญตาราง.....	ฎ
สารบัญภาพประกอบ.....	ฐ
บทที่ 1 บทนำ.....	1
ภูมิหลัง.....	1
ความมุ่งหมายของการวิจัย.....	3
ความสำคัญของการวิจัย.....	3
ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ.....	3
ขอบเขตการวิจัย.....	4
สมมติฐานการวิจัย.....	4
ระยะเวลาในการดำเนินงานวิจัย.....	5
สถานที่ทำการวิจัย.....	5
บทที่ 2 เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง.....	6
หลักการทดสอบความเป็นพิษ.....	6
สารพิษ.....	6
ความเป็นพิษต่อสิ่งมีชีวิต.....	7
ร้อยละการตายของสัตว์ทดลอง.....	8
การทดสอบความเป็นพิษของสารพิษต่อสัตว์ทดลอง.....	8



การประเมินความเป็นพิษร่วม .....	11
ดัชนีชี้วัดทางชีวภาพ .....	14
การเตรียมสารละลายมาตรฐานเพื่อทดสอบความเป็นพิษ .....	15
การเลือกใช้สัตว์ทดลอง .....	16
หลักการในการเตรียมเนื้อเยื่อเพื่อศึกษาด้วยกล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสง .....	17
หลักการตรวจวัดกิจกรรมของเอนไซม์อะซีทิลโคลีนเอสเตอเรส .....	18
Imidacloprid .....	19
คุณสมบัติทางเคมีของ imidacloprid .....	19
การใช้งาน imidacloprid .....	21
การปนเปื้อนและความเป็นพิษของ imidacloprid ในสิ่งแวดล้อม .....	21
แคดเมียม .....	25
คุณสมบัติทางกายภาพและทางเคมี .....	25
การใช้งานแคดเมียม .....	25
การปนเปื้อนของแคดเมียมในสิ่งแวดล้อม .....	26
ความเป็นพิษของแคดเมียม .....	29
การวิเคราะห์ปริมาณโลหะหนัก .....	32
ไส้เดือนน้ำ .....	35
ลักษณะทั่วไปของไส้เดือนน้ำ .....	35
การจัดอนุกรมวิธานของไส้เดือนน้ำ .....	36
วงชีวิตและการสืบพันธุ์ของไส้เดือนน้ำ .....	37
สรีรวิทยาของไส้เดือนน้ำ .....	37
หน้าที่เชิงระบบนิเวศของไส้เดือนน้ำ .....	38
บทที่ 3 วิธีดำเนินการวิจัย .....	39

วัสดุ อุปกรณ์ สารเคมี และเครื่องมือ .....	39
วัสดุ อุปกรณ์ .....	39
เครื่องมือ .....	39
สารเคมี .....	40
วิธีการทดลอง .....	40
การเตรียมสัตว์ทดลอง .....	40
การศึกษาความเป็นพิษ .....	41
การวิเคราะห์ความเป็นพิษร่วมของ imidacloprid และแคดเมียม .....	41
การศึกษาระดับการสะสมของแคดเมียม .....	42
การศึกษาการเปลี่ยนแปลงพยาธิสภาพเนื้อเยื่อ .....	43
การศึกษาการเปลี่ยนแปลงกิจกรรมของเอนไซม์อะซีทิลโคลีนเอสเทอเรส .....	44
การวิเคราะห์ข้อมูล .....	46
บทที่ 4 ผลการดำเนินงานวิจัย .....	47
การประเมินระดับความเป็นพิษเฉียบพลันเชิงเดี่ยวและความเป็นพิษร่วม .....	47
ผลการวิเคราะห์คุณภาพน้ำ .....	47
ผลการศึกษาความเป็นพิษเฉียบพลันเชิงเดี่ยว .....	48
ผลการศึกษาความเป็นพิษเฉียบพลันร่วม .....	51
การเปลี่ยนแปลงพยาธิสภาพเนื้อเยื่อในไส้เดือนน้ำ .....	53
การเปลี่ยนแปลงกิจกรรมของเอนไซม์อะซีทิลโคลีนเอสเทอเรสในไส้เดือนน้ำ .....	56
การประเมินระดับการสะสมแคดเมียมในไส้เดือนน้ำ .....	58
บทที่ 5 สรุปผลการวิจัย อภิปรายผล และข้อเสนอแนะ .....	60
สรุปผลการวิจัย .....	60
อภิปรายผลการวิจัย .....	61

ข้อเสนอแนะ .....	66
บรรณานุกรม.....	68
ประวัติผู้เขียน.....	78



## สารบัญตาราง

	หน้า
ตาราง 1 นิยามการทดสอบความเป็นพิษแบบเฉียบพลันและเรื้อรัง.....	8
ตาราง 2 คุณสมบัติทางเคมีของ imidacloprid .....	20
ตาราง 3 การนำเข้า imidacloprid ของประเทศไทย .....	21
ตาราง 4 รายงานการนำเข้าและจำนวนแหล่งน้ำที่มีการตกค้างของ imidacloprid ในรัฐแคลิฟอร์เนีย .....	23
ตาราง 5 รายงานการศึกษาความเป็นพิษของ imidacloprid ต่อสิ่งมีชีวิตในกลุ่ม Oligochaetes	24
ตาราง 6 คุณสมบัติทางเคมีของแคดเมียม .....	25
ตาราง 7 เกณฑ์มาตรฐานปริมาณของแคดเมียมในน้ำของประเทศไทย.....	27
ตาราง 8 รายงานการปนเปื้อนของแคดเมียมในประเทศไทย.....	28
ตาราง 9 รายงานการปนเปื้อนของแคดเมียมในสัตว์น้ำจืดของประเทศไทย .....	28
ตาราง 10 เอนไซม์ต่าง ๆ ที่มีสังกะสีเป็นองค์ประกอบ.....	29
ตาราง 11 รายงานการศึกษาความเป็นพิษของแคดเมียมต่อสิ่งมีชีวิตในกลุ่ม Oligochaetes.....	31
ตาราง 12 สภาวะเหมาะสมสำหรับการตรวจวัดปริมาณแคดเมียมด้วยเครื่อง inductively coupled plasma spectroscopy .....	35
ตาราง 13 ผลการวิเคราะห์ค่าเฉลี่ยคุณภาพน้ำเมื่อเริ่มต้นและสิ้นสุดการทดลอง .....	48
ตาราง 14 ร้อยละการตายของสัตว์ทดลองที่ได้รับ imidacloprid เป็นเวลา 24 และ 48 ชั่วโมง....	48
ตาราง 15 ผลการวิเคราะห์โพธิทจากการตายของสัตว์ทดลองที่ได้รับ imidacloprid เป็นเวลา 24 และ 48 ชั่วโมง .....	49
ตาราง 16 ร้อยละการตายของสัตว์ทดลองที่ได้รับแคดเมียมเป็นเวลา 24 และ 48 ชั่วโมง.....	50
ตาราง 17 ผลการวิเคราะห์โพธิทจากการตายของสัตว์ทดลองที่ได้รับแคดเมียมเป็นเวลา 24 และ 48 ชั่วโมง.....	51

ตาราง 18 ร้อยละการตายของสัตว์ทดลองที่ได้รับ imidacloprid และแคดเมียมเป็นเวลา 24 และ 48 ชั่วโมง.....52

ตาราง 19 ผลการวิเคราะห์โพธิ์บทและการวิเคราะห์กิจกรรมทางชีววิทยาจากการตายของ สัตว์ทดลองที่ได้รับ imidacloprid และแคดเมียมเป็นเวลา 24 และ 48 ชั่วโมง..... 52

ตาราง 20 การเปลี่ยนแปลงทางพยาธิสภาพของเนื้อเยื่อไตเดือนน้ำที่ได้รับ imidacloprid แคดเมียม และสารผสม imidacloprid กับแคดเมียมเป็นเวลา 24 และ 48 ชั่วโมง ..... 53

ตาราง 21 กิจกรรมของเอนไซม์อะซีทิลโคลีนเอสเทอเรสในไตเดือนน้ำที่ได้รับ imidacloprid แคดเมียม และ สารผสม imidacloprid กับแคดเมียมเป็นเวลา 24 และ 48 ชั่วโมง ..... 57

ตาราง 24 ร้อยละการตกค้างของแคดเมียมในเนื้อเยื่อไตเดือนน้ำที่ได้รับแคดเมียมและสารผสม imidacloprid กับแคดเมียมที่ความเข้มข้นและเวลาแตกต่างกัน..... 58



## สารบัญภาพประกอบ

### หน้า

ภาพประกอบ 1 ความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณสารเคมีและการตอบสนอง.....	7
ภาพประกอบ 2 การเทียบค่าร้อยละการตายของสัตว์ทดลองและค่าช่วงห่างของ .....	10
ภาพประกอบ 3 ลักษณะการแสดงความเป็นพิษร่วมของสาร 2 ชนิด .....	11
ภาพประกอบ 4 ผลรวมของความเป็นพิษของสารเคมีจากค่ากิจกรรมทางชีววิทยา.....	13
ภาพประกอบ 5 ผลรวมของความเป็นพิษของสารเคมีจากค่าดัชนีการส่งเสริมการทำงาน.....	13
ภาพประกอบ 6 แผนภูมิพิษวิทยา .....	15
ภาพประกอบ 7 ปฏิบัติการทดสอบกิจกรรมของเอนไซม์อะซีทิลโคลีนเอสเทอเรส .....	18
ภาพประกอบ 8 โครงสร้างทางเคมีของ imidacloprid.....	20
ภาพประกอบ 9 หลักการทำงานของเครื่อง inductively coupled plasma spectroscopy.....	34
ภาพประกอบ 10 ไข่เดือนน้ำ ( <i>T. tubifex</i> ) .....	36
ภาพประกอบ 11 ลักษณะพยาธิสภาพเนื้อเยื่อไข่เดือนน้ำที่ได้รับสารพิษ.....	56
ภาพประกอบ 12 กิจกรรมของเอนไซม์อะซีทิลโคลีนเอสเทอเรสในไข่เดือนน้ำที่ได้รับ imidacloprid แคดเมียม และ สารผสม imidacloprid กับแคดเมียมเป็นเวลา 24 และ 48 ชั่วโมง	57
ภาพประกอบ 15 ร้อยละการตกค้างของแคดเมียมในเนื้อเยื่อไข่เดือนน้ำที่ได้รับแคดเมียมและ ....	59

## บทที่ 1

### บทนำ

#### ภูมิหลัง

Imidacloprid เป็นสารออกฤทธิ์สำคัญในยาฆ่าแมลงที่ใช้กันอย่างแพร่หลายในกลุ่มยาฆ่าแมลง neonicotinoid (Cang et al., 2017; Tomizawa & Casida, 2005) ซึ่งพัฒนาและออกแบบมาให้ออกฤทธิ์ต่อระบบประสาทของแมลงศัตรูพืช แต่ในปัจจุบันมีการรายงานผลกระทบของสารชนิดนี้ต่อสิ่งมีชีวิตนอกกลุ่มเป้าหมายอีกด้วย (Cang et al., 2017) จากการศึกษาของ Miranda, Raetano, Silva, Daam, and Cerejeira (2011) ได้รายงานไว้ว่า imidacloprid ที่ใช้ฉีดพ่นหรือเคลือบเมล็ดพืชมีความสามารถในการละลายน้ำที่สูงจึงถูกชะล้างลงสู่ระบบนิเวศได้ง่าย ส่งผลให้อัตราส่วนของการปนเปื้อนของ imidacloprid ในดินต่อน้ำสูงถึง 1 ต่อ 3 นอกจากนี้ผลการศึกษาของ Gorman, Liu, Denholm, Brügggen, and Nauen (2008) ยังพบว่าเกษตรกร มีแนวโน้มที่จะเพิ่มปริมาณ ความถี่และความเข้มข้นในการใช้ imidacloprid เนื่องจากการดื้อยาของแมลงที่เพิ่มมากขึ้น ส่งผลให้แนวโน้มการปนเปื้อนของ imidacloprid ในแหล่งน้ำเพิ่มสูงขึ้นตามไปด้วย ทั้งนี้ imidacloprid เป็นพิษต่อระบบประสาทโดยมีฤทธิ์รบกวนการทำงานของเอนไซม์อะซิติลโคลีนเอสเตอเรสซึ่งเป็นเอนไซม์สำคัญในการส่งสัญญาณกระแสประสาท ทำให้เกิดการกระตุ้นเซลล์ประสาทหลังไซแนปส์ (postsynaptic neuron) ต่อเนื่องอย่างผิดปกติโดยเฉพาะอย่างยิ่งบริเวณส่วนเชื่อมของระบบประสาทและกล้ามเนื้อ นำไปสู่การเป็นอัมพาตและก่อให้เกิดความเสียหายของกล้ามเนื้อในสิ่งมีชีวิต (Beauvais, Atchison, Stenback, & Crumpton, 1999; Kallander, Fisher, & Lydy, 1997; Rakotondravelo, Anderson, Charlton, & Zhu, 2006)

ปัจจุบัน imidacloprid ได้รับความสนใจในการศึกษาเป็นวงกว้างแต่การศึกษาความเป็นพิษของสารพิษที่ปนเปื้อนในระบบนิเวศ ยังคงมุ่งเน้นไปที่การรายงานผลความเป็นพิษของสารเพียงชนิดเดียวต่อสิ่งมีชีวิต (Daam, Pereira, Silva, Caetano, & Cerejeira, 2013) ทั้งที่ในสภาพแวดล้อมจริงการปนเปื้อนของสารพิษในระบบนิเวศไม่ได้เกิดจากสารพิษเพียงชนิดใดชนิดหนึ่งเท่านั้น โดยเฉพาะในบริเวณพื้นที่การเกษตรที่มีโรงงานอุตสาหกรรมอยู่ใกล้เคียง ดังนั้นการประเมินความเป็นพิษต่อระบบนิเวศจึงจำเป็นที่จะต้องปรับเปลี่ยนจากการพิจารณาความเป็นพิษของสารเพียงชนิดเดียวสู่การพิจารณาความเป็นพิษของสารที่สามารถพบได้ในระบบนิเวศพร้อมกันเพื่อสร้างมาตรฐานในการควบคุมการปนเปื้อนของสารพิษที่ใกล้เคียงกับสภาพความเป็นจริงในธรรมชาติมากที่สุด ทั้งนี้จากการศึกษาของ Cang et al. (2017) พบว่า

นอกจากยาฆ่าแมลงแล้วในพื้นที่เกษตรกรรมยังพบการปนเปื้อนของโลหะหนัก เช่น แคดเมียม (Cadmium, Cd) ได้อีกด้วย ซึ่งแคดเมียมสามารถรั่วไหลจากการปล่อยน้ำทิ้งของโรงงานอุตสาหกรรมหรือการใช้ปุ๋ยฟอสเฟต โดยประเทศไทยมีการรายงานการปนเปื้อนของแคดเมียมในแหล่งน้ำที่ระดับสูงกว่าค่ามาตรฐานของสหประชาชาติกำหนดไว้ถึง 72 เท่า (Satarug, Vesey, & Gobe, 2017; Wisa, 2010) เนื่องจากคุณสมบัติของแคดเมียมที่ละลายตัวช้า สามารถสะสมในน้ำได้ จึงมีโอกาสสูงที่แคดเมียมจะก่อให้เกิดความเป็นพิษต่อสิ่งมีชีวิตที่อาศัยในแหล่งน้ำ (Hall, Scott, & Killen, 1998) มีรายงานวิจัยเกี่ยวกับความเป็นพิษของแคดเมียมไว้ว่า แคดเมียมสามารถรบกวนการทำงานของเอนไซม์ และกระตุ้นการเปลี่ยนแปลงทางพยาธิสภาพในสิ่งมีชีวิตที่อาศัยในระบบนิเวศแหล่งน้ำในระดับความเข้มข้นที่ต่ำ จากการที่แคดเมียมเข้าจับกับหมู่ฟังก์ชันของกรดอะมิโนซีสเทอีนและเมไทโอนีนของโปรตีนตัวรับต่าง ๆ ที่เยื่อหุ้มเซลล์และเยื่อหุ้มออร์แกเนลล์ ทำให้เกิดการรบกวนการส่งสัญญาณทั้งภายในเซลล์และการส่งสัญญาณระหว่างเซลล์ นอกจากนี้แคดเมียมยังสามารถสะสมอยู่ในสิ่งมีชีวิตทำให้เกิดความเป็นพิษจากการสะสมสารพิษในห่วงโซ่อาหารที่สูงขึ้นอีกด้วย (Bouché, Habets, Biagianti-Risbourg, & Vernet, 2000; Uwizeyimana, Wang, Chen, & Khan, 2017)

ดังนั้นการศึกษาความเป็นพิษร่วมในระบบนิเวศจึงเป็นประเด็นสำคัญ ไม่เพียงเพื่อประเมินความเป็นพิษที่เกิดขึ้นจริงในธรรมชาติ แต่สารผสมของ imidacloprid และแคดเมียมอาจทำงานร่วมกันและส่งผลให้เกิดการออกฤทธิ์แบบเสริมฤทธิ์ (synergistic effect) จนนำไปสู่ความเสียหายของระบบนิเวศแหล่งน้ำได้ (Cang et al., 2017) ในงานวิจัยนี้ผู้วิจัยเลือกใช้ไส้เดือนน้ำ (*Tubifex tubifex* Müller, 1774) ซึ่งเป็นสิ่งมีชีวิตที่สามารถพบได้ทั่วไปในระบบนิเวศแหล่งน้ำจืดหรือบ่อบำบัดน้ำเสียที่มีตะกอนใต้พื้นน้ำ (Milbrink, 1980; Sakset, Gallardo, & Ikejima, 2012) โดยไส้เดือนน้ำ ทำหน้าที่เป็นผู้ย่อยสลายสารอินทรีย์และยังเป็นแหล่งอาหารสำคัญของสิ่งมีชีวิตที่อยู่ในระบบนิเวศแหล่งน้ำจืด จากการศึกษาของ Bouché et al. (2000) พบว่า ไส้เดือนน้ำเป็นสิ่งมีชีวิตสุดท้ายที่สามารถอยู่รอดในระบบนิเวศแหล่งน้ำที่ปนเปื้อนสารพิษ ดังนั้นหากไส้เดือนน้ำซึ่งเป็นสิ่งมีชีวิตที่มีความทนทานต่อการปนเปื้อนสารพิษได้รับผลกระทบ จึงอาจเป็นไปได้ว่าสิ่งมีชีวิตชนิดอื่นในระบบนิเวศย่อมได้รับผลกระทบไปด้วย จากเหตุผลที่กล่าวข้างต้นจึงทำให้ไส้เดือนน้ำเป็นตัวแทนที่เหมาะสมในการประเมินความเป็นพิษร่วมของ imidacloprid และแคดเมียมในระบบนิเวศน้ำจืด และจากกลไกการออกฤทธิ์ของ imidacloprid และแคดเมียม ที่ส่งผลต่อการทำงานของเอนไซม์และกระตุ้นให้เกิดการเปลี่ยนแปลงพยาธิสภาพ ผู้วิจัยจึงเลือกที่จะประเมินความเป็นพิษเฉียบพลันเชิงเดี่ยวและความเป็นพิษร่วมของ



imidacloprid และแคดเมียมต่อการเปลี่ยนแปลงทางพยาธิสภาพของเนื้อเยื่อและกิจกรรมของ เอนไซม์อะซีทิลโคลีนเอสเทอเรสในไส้เดือนน้ำ ซึ่งผลที่ได้จากการวิจัยครั้งนี้ สามารถใช้เป็น แนวทางประกอบการประเมินความเสี่ยงของ imidacloprid และแคดเมียมที่ปนเปื้อนในระบบ นิเวศแหล่งน้ำจืดต่อไป

### ความมุ่งหมายของการวิจัย

1. เพื่อประเมินระดับความเป็นพิษเฉียบพลันเชิงเดี่ยวและความเป็นพิษร่วมของ imidacloprid และแคดเมียมต่อไส้เดือนน้ำ
2. เพื่อเปรียบเทียบผลของความเป็นพิษเฉียบพลันของ imidacloprid และแคดเมียมต่อ การเปลี่ยนแปลงทางพยาธิสภาพเนื้อเยื่อไส้เดือนน้ำ
3. เพื่อเปรียบเทียบผลของความเป็นพิษเฉียบพลันของ imidacloprid และแคดเมียมต่อ การเปลี่ยนแปลงกิจกรรมของเอนไซม์อะซีทิลโคลีนเอสเทอเรสในไส้เดือนน้ำ
4. เพื่อวัดระดับการสะสมแคดเมียมในไส้เดือนน้ำหลังได้รับแคดเมียมเป็นเวลา 24 และ 48 ชั่วโมง

### ความสำคัญของการวิจัย

งานวิจัยมีเป้าหมายเพื่อประเมินผลกระทบจากความเป็นพิษเฉียบพลันเชิงเดี่ยวและ ความเป็นพิษร่วมของ imidacloprid และแคดเมียมเนื่องจากงานวิจัยที่เกี่ยวกับพิษวิทยา ในปัจจุบันยังคงเน้นไปที่การประเมินความเป็นพิษเชิงเดี่ยวเท่านั้น ดังนั้นผู้วิจัยจึงได้ทำการทดลอง ในห้องปฏิบัติการและรวบรวมงานวิจัยที่เกี่ยวข้องอื่น ๆ เพื่อประเมินระดับความเป็นพิษที่ทำให้ สัตว์ทดลองตาย (lethal concentration) และความเป็นพิษที่ไม่ทำให้สัตว์ทดลองตาย (sub-lethal concentration) อันเกิดจาก imidacloprid และแคดเมียมที่สะสมในน้ำ เพื่อให้ประกอบการวาง แนวทางในการป้องกันผลกระทบจากการปนเปื้อนของ imidacloprid และแคดเมียมในระบบนิเวศ แหล่งน้ำจืดในประเทศไทย

### ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

1. ทราบระดับความเป็นพิษเฉียบพลันเชิงเดี่ยวและความเป็นพิษร่วมของ imidacloprid และแคดเมียมต่อไส้เดือนน้ำ
2. ทราบรูปแบบการเกิดอันตรกิริยาจากความเป็นพิษร่วมของ imidacloprid และ แคดเมียมต่อไส้เดือนน้ำ

3. ทราบระดับความเข้มข้นของ imidacloprid และแคดเมียมที่ทำให้ไส้เดือนน้ำแสดงความเป็นพิษทางพยาธิสภาพเนื้อเยื่อและกิจกรรมของเอนไซม์อะซิติลโคลีนเอสเทอเรส
4. ทราบระดับการสะสมของแคดเมียมในไส้เดือนน้ำ
5. กำหนดแนวทางเพื่อเป็นเกณฑ์การควบคุมการปนเปื้อนของ imidacloprid และแคดเมียมในแหล่งน้ำ

### ขอบเขตการวิจัย

การทดสอบความเป็นพิษเฉียบพลันเชิงเดี่ยวและความเป็นพิษร่วมของ imidacloprid (analytic standard, Sigma-aldrich) และแคดเมียม (98%  $\text{Cd}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ , Sigma-aldrich) ที่มีต่อไส้เดือนน้ำ (*T. tubifex*) ด้วยวิธีชีววิเคราะห์ (biological assay) ในห้องปฏิบัติการเพื่อให้ทราบถึงระดับความเข้มข้นของ imidacloprid และแคดเมียมที่สัตว์ทดลองแต่ละตัวได้รับและมีผลทำให้สัตว์ทดลองตายลงร้อยละ 50 จากจำนวนสัตว์ทดลองทั้งหมด ที่ระยะเวลา 24 และ 48 ชั่วโมง (24, 48 hours  $\text{LC}_{50}$ ) โดยตรวจสอบคุณภาพน้ำเมื่อเริ่มต้นและเมื่อสิ้นสุดการทดลอง และเปรียบเทียบผลจากความเป็นพิษเฉียบพลันเชิงเดี่ยวและความเป็นพิษร่วมของ imidacloprid และแคดเมียมต่อการเปลี่ยนแปลงทางพยาธิสภาพ กิจกรรมของเอนไซม์อะซิติลโคลีนเอสเทอเรสและระดับการสะสมแคดเมียมในไส้เดือนน้ำโดยใช้ระดับความเข้มข้นของ imidacloprid และแคดเมียมในระดับต่ำกว่าค่า  $\text{LC}_{50}$  ที่ระยะเวลา 24 และ 48 ชั่วโมง

### สมมติฐานการวิจัย

1. การปนเปื้อนของ imidacloprid และแคดเมียมพร้อมกันก่อให้เกิดความเป็นพิษต่อไส้เดือนน้ำมากกว่าการปนเปื้อนของสารพิษชนิดใดชนิดหนึ่งเพียงอย่างเดียว
2. ระดับความเข้มข้นของแคดเมียมที่มากขึ้นทำให้เกิดการสะสมแคดเมียมในไส้เดือนน้ำที่มากขึ้น
3. ระดับความเข้มข้นของ imidacloprid และแคดเมียมที่มากขึ้นก่อให้เกิดการเปลี่ยนแปลงทางพยาธิสภาพในเนื้อเยื่อของไส้เดือนน้ำมากขึ้น
4. ระดับความเข้มข้นของ imidacloprid และแคดเมียมที่แตกต่างกันก่อให้เกิดการเปลี่ยนแปลงกิจกรรมของเอนไซม์อะซิติลโคลีนเอสเทอเรสในไส้เดือนน้ำแตกต่างกันที่ระดับนัยสำคัญ 0.05

**ระยะเวลาในการดำเนินงานวิจัย**

ระยะเวลาที่ใช้ในการทำวิจัยเริ่มตั้งแต่เดือนมกราคม 2561 – เมษายน 2562

**สถานที่ทำการวิจัย**

ห้องปฏิบัติการ 1118 ชั้น 11 อาคารศูนย์เครื่องมือวิทยาศาสตร์ (อาคาร 19)

คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ



## บทที่ 2

### เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

ในงานวิจัยนี้ทำการศึกษาเอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้องดังนี้

1. หลักการทดสอบความเป็นพิษ
2. imidacloprid
3. แคดเมียม
4. ไข่เดือนน้ำ

#### หลักการทดสอบความเป็นพิษ

##### สารพิษ

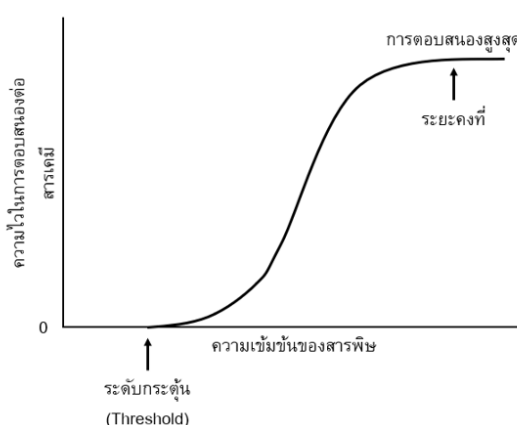
สารพิษ หมายถึง สารที่เมื่อเข้าสู่ร่างกายแล้วสามารถทำให้เกิดอันตรายต่อสิ่งมีชีวิต เนื่องจากมีการทำอันตรกิริยาทางชีวเคมี (physio-chemical interaction) กับส่วนประกอบหรือระบบต่าง ๆ ของร่างกายของสิ่งมีชีวิตนั้น โดยการตอบสนองของร่างกายสิ่งมีชีวิตต่อสารพิษสามารถเกิดขึ้นได้ในหลายลักษณะ สามารถจำแนกได้ดังนี้ (Maturot & Juthamas, 2009)

1. จำแนกตามระยะเวลาที่แสดงความเป็นพิษ เช่น ชนิดเฉียบพลันหรือชนิดแสดงอาการช้า
2. จำแนกตามความรุนแรง เช่น ชนิดไม่รุนแรงหรือชนิดรุนแรง
3. จำแนกตามลักษณะความคงทนของผล เช่น ไม่เสถียรหรือไม่ถาวรและผลแบบถาวร
4. จำแนกตามตำแหน่งที่เกิดผลความเป็นพิษในร่างกาย เช่น เฉพาะที่และเกิดทั่วร่างกายผ่านกระแสเลือด
5. จำแนกตามกระบวนการที่นำไปสู่การเกิดผลที่เป้าหมาย เช่น ฤทธิ์โดยตรงและฤทธิ์ทางอ้อม
6. จำแนกตามลักษณะผลการตอบสนอง เช่น เป็นประโยชน์และไม่พึงประสงค์

### ความเป็นพิษต่อสิ่งมีชีวิต

เนื่องจากการตอบสนองต่อสารพิษขึ้นอยู่กับจำนวนตัวรับที่มีสารเคมีเข้าไปทำอันตรกริยาโดยสร้างพันธะระหว่างสารเคมีกับโปรตีนตัวรับ (receptor) ดังนั้นการตอบสนองจึงเป็นสัดส่วนของปริมาณ หรือความเข้มข้นของสารเคมีที่มีตำแหน่งตัวรับนั้น ๆ หากได้รับสารเคมีในปริมาณมากย่อมทำให้เกิดการแสดงความความเป็นพิษมากตามไปด้วย ทั้งนี้ปริมาณสารพิษต่ำสุดที่ทำให้เกิดการแสดงความความเป็นพิษเรียกว่า threshold dose ในกรณีที่สิ่งมีชีวิตได้รับสารเคมีที่ต่ำกว่าระดับ threshold dose จะไม่มีการแสดงความความเป็นพิษจนสามารถวัดหรือสังเกตได้

อย่างไรก็ตามปัจจัยที่มีผลต่อระดับ threshold นั้นมีหลายประการ เช่น ปริมาณของสารเคมี กระบวนการที่ร่างกายจัดการต่อสารเคมี ความไวของสารเคมีและโปรตีนตัวรับ รวมทั้งสภาพร่างกายของสิ่งมีชีวิต ในทางชีววิทยาการแสดงผลออกเมื่อสัตว์ได้รับสารพิษจะมีระดับ threshold dose ที่แตกต่างกันตามประเภทของสารเคมีที่ได้รับและชนิดของสิ่งมีชีวิตโดยการตอบสนองจะมีลำดับการแสดงความความเป็นพิษในแต่ละลำดับแตกต่างกันไปซึ่งความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณของสารเคมีและการตอบสนองจะแสดงให้เห็นได้ในลักษณะความสัมพันธ์เชิงเส้นของปริมาณและการตอบสนองดังภาพประกอบ 1



ภาพประกอบ 1 ความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณสารเคมีและการตอบสนอง

ที่มา: Maturot, R., & Juthamas, S. (2009). *Ecotoxicology* (2 ed.). Bangkok: Faculty of medicine Mahidol University.

### ร้อยละการตายของสัตว์ทดลอง

ในการพิจารณาความเป็นพิษต่อสัตว์ทดลองในระดับที่ทำให้สัตว์ทดลองตาย (lethal dose) โดยทั่วไปมักจะทำการทดลองโดยมีเวลาเป็นตัวกำหนดและมีชุดควบคุมเป็นชุดเปรียบเทียบ ดังนั้นเพื่อเปรียบเทียบร้อยละการตายให้ถูกต้อง หากมีการตายเกิดขึ้นในชุดควบคุมจะต้องคำนวณร้อยละการตายที่ถูกต้องของชุดทดลองทั้งหมดตามสมการที่ 1

$$\text{ร้อยละการตายที่ถูกต้อง} = \frac{(A-C)}{100-C} \times 100 \text{ --- (1)}$$

เมื่อ A แทน ร้อยละการตายของสัตว์ทดลองในชุดทดลองของแต่ละความเข้มข้น  
C แทน ร้อยละการตายของสัตว์ทดลองในชุดควบคุม

### การทดสอบความเป็นพิษของสารพิษต่อสัตว์ทดลอง

การทดสอบความเป็นพิษในสิ่งมีชีวิตสามารถจำแนกได้ 2 ประเภทตามระยะเวลาที่ได้รับสารซึ่งผลกระทบต่อสิ่งมีชีวิตคือ พิษเฉียบพลันและพิษเรื้อรัง (ตาราง 1)

1. ความเป็นพิษเฉียบพลัน (acute toxicity) เป็นการศึกษาผลกระทบอันไม่พึงประสงค์ที่เกิดขึ้นภายในระยะเวลาสั้น 1 – 7 วันหลังจากที่สิ่งมีชีวิตได้รับสารหนึ่งครั้ง หรือมากกว่า ซึ่งโดยทั่วไปแล้วการทดสอบความเป็นพิษเฉียบพลันมักใช้ในการหาค่า median lethal concentration

2. ความเป็นพิษเรื้อรัง (chronic toxicity) เป็นการศึกษาความเป็นพิษโดยสังเกตสัตว์ทดลองเป็นช่วงเวลานานตลอดช่วงอายุขัยหรือเกินกว่าครึ่งหนึ่งของอายุขัยของสิ่งมีชีวิตนั้น โดยการให้สารทดสอบตลอดช่วงระยะเวลาของการสังเกตหรือเฉพาะช่วงเวลาสำคัญมักใช้ในการหา effect concentration

ตาราง 1 นิยามการทดสอบความเป็นพิษแบบเฉียบพลันและเรื้อรัง

ประเภทการทดสอบ	ระยะเวลา
เฉียบพลัน	ระยะเวลาสั้นอยู่ในช่วง 2 – 3 วัน จนถึงประมาณ 2 สัปดาห์ โดยทั่วไปมักไม่มีการให้อาหารและให้สารพิษเพียงครั้งเดียว

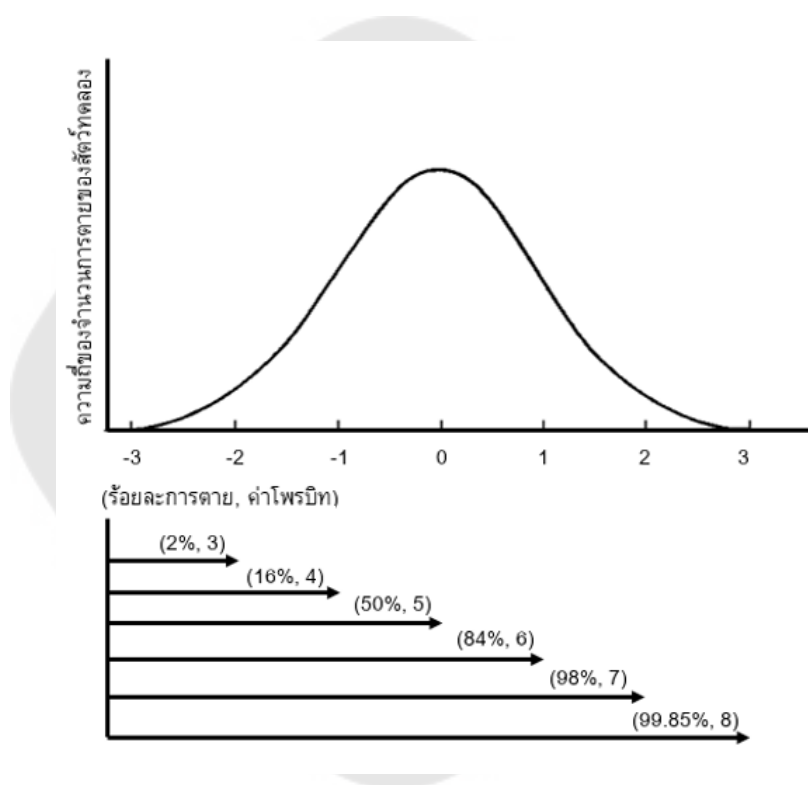
ตาราง 1 (ต่อ)

ประเภทการทดสอบ	ระยะเวลา
เรื้อรัง	ระยะเวลาในการทดลองนาน ในสิ่งมีชีวิตขนาดเล็กมักศึกษาทั้งวงชีวิต ในสิ่งมีชีวิตขนาดใหญ่มักศึกษา 1 ใน 3 ของวงชีวิต ส่วนในสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนมมักศึกษาเป็นเวลา 1 – 2 ปี

ที่มา: Rand, G. M. (1995). *Fundamentals of aquatic toxicology: effects, environmental fate and risk assessment*: CRC press.

ในการเปรียบเทียบระดับของสารพิษที่ก่อให้เกิดผลความเป็นพิษต่อสัตว์ทดลองแบบเฉียบพลันมักใช้การตายเป็นเกณฑ์ โดยทำการทดสอบสัตว์ทดลองกับสารพิษที่มีความเข้มข้น 3 – 5 ระดับ และวัดอัตราการตายของสัตว์ทดลองที่อยู่ในช่วงร้อยละ 10 – 90 แล้วนำค่าที่ได้มาสร้างกราฟโดยให้แกน x เป็นความเข้มข้นของสารละลายที่อยู่ในรูปค่า log ความเข้มข้น และแกน y เป็นเป็นร้อยละการตาย จากนั้นทำการคำนวณร้อยละการตายที่ 50 และแปลงค่า antilog เพื่อคำนวณความเข้มข้นที่ทำให้สัตว์ทดลองตายลงร้อยละ 50 ทั้งนี้เนื่องจากผลที่ได้จากการประเมินความเป็นพิษต่อสัตว์ทดลองจะต้องมีการนำเสนอในรูปแบบที่เข้าใจได้ง่ายละสะดวกต่อการนำไปใช้ และสามารถเปรียบเทียบข้อมูลจากการศึกษาอื่นในลักษณะเชิงปริมาณ (quantitative indices) โดยทำการเปรียบเทียบระดับความเป็นพิษของสารพิษต่อสัตว์ทดลองที่อาศัยในน้ำนิยมใช้ค่า Median lethal concentration ( $LC_{50}$ ) ซึ่งหมายถึง ปริมาณของสารพิษที่ละลายในน้ำ และทำให้สัตว์ทดลองตายเป็นจำนวนครึ่งหนึ่งจากสัตว์ทดลองทั้งหมด หากค่า  $LC_{50}$  มีค่าตัวเลขที่สูงแสดงว่าสารเคมีมีอันตรายน้อย เนื่องจากจะต้องได้รับในปริมาณมากจึงจะทำให้สัตว์ทดลองตายไปครึ่งหนึ่ง ในทางกลับกันหากค่าตัวเลขต่ำจะแสดงความเป็นพิษที่รุนแรง เพราะการได้รับสารเพียงเล็กน้อยก็ทำให้สัตว์ทดลองตายไปครึ่งหนึ่ง อย่างไรก็ตามการหาค่า  $LC_{50}$  จากการเขียนกราฟแบบปกติอาจทำให้เกิดความคลาดเคลื่อนเนื่องจากอัตราการตายไม่อยู่บนเส้นตรงที่ลากต่อกันเลยทีเดียว ทำให้เกิดความแปรปรวนจากการลากเส้นของผู้ทดลองแต่ละคน ทำให้มีการพัฒนาหลักการคำนวณสมการถดถอยอย่างง่าย (simple linear regression) ร่วมกับการวิเคราะห์โพรบิท (probit analysis) เพื่อใช้ในการหาค่า  $LC_{50}$  ให้ถูกต้องมากยิ่งขึ้น

ในการวิเคราะห์โพรบิทข้อมูลที่จะนำมาใช้ในการวิเคราะห์จะต้องมีลักษณะตามข้อตกลงเบื้องต้นนั่นคือ มีการกระจายของข้อมูลเป็นปกติ (normal probability curve) และค่าตัวแปรตอบสนอง (response variable) จะเป็นแบบไบนารี (binary) คือมีค่าเป็น 1 หรือ 0 ซึ่ง Bliss (1934) ได้ทำการเทียบค่าร้อยละการตายของสัตว์ทดลองและค่าช่วงห่างของส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานในกราฟการกระจายแบบปกติและเรียกค่านี้ว่าค่าโพรบิท (ภาพประกอบ 2) จากนั้น Finney and Tattersfield (1952) ได้สร้างตารางเปรียบเทียบค่าร้อยละการตายเป็นเลขโพรบิทเพื่อให้ง่ายต่อการคำนวณมากยิ่งขึ้น



ภาพประกอบ 2 การเทียบค่าร้อยละการตายของสัตว์ทดลองและค่าช่วงห่างของส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานในกราฟการกระจายแบบปกติ

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

เมื่อทำการเทียบข้อมูลร้อยละการตายของสัตว์ทดลองกับค่าโพรบิทแล้วจะพบว่าร้อยละการตายที่ 50 จะมีค่าตรงกับค่าโพรบิทเท่ากับ 5 และหากเขียนกราฟค่าโพรบิทกับความเข้มข้น

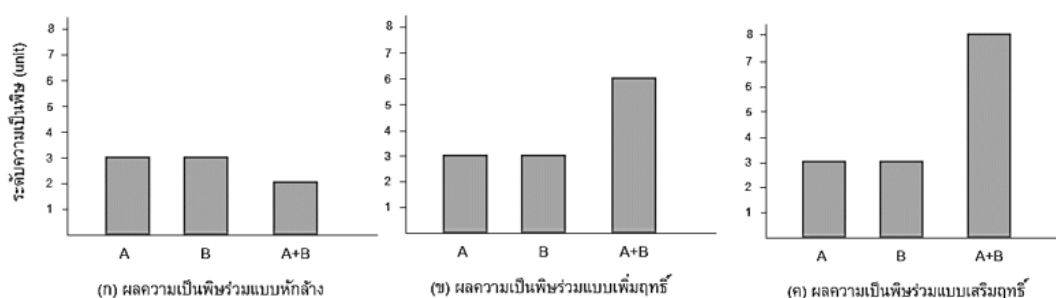


ในรูปของค่า log และทำการสร้างสมการถดถอยเพื่อหาค่าโพธิทที่ 5 จะสามารถคำนวณค่าความเข้มข้นเพื่อหาค่า Median lethal concentration ( $LC_{50}$ ) ได้

### การประเมินความเป็นพิษร่วม

ในธรรมชาติสารพิษมีการออกฤทธิ์ให้เกิดความเป็นพิษที่แตกต่างกัน (ภาพประกอบ 3) ทั้งนี้ขึ้นอยู่กับสิ่งมีชีวิต ลักษณะทางกายภาพและกลไกการออกฤทธิ์ของสาร โดยสารผสมเหล่านั้นอาจเกิดอันตรกิริยาระหว่างกันหรือไม่เกิดอันตรกิริยาระหว่างกันก็ได้ ทั้งนี้การแสดงผลอันตรกิริยาสามารถแบ่งได้ 3 รูปแบบดังนี้

1. ความเป็นพิษแบบหักล้าง (antagonistic effect) หมายถึง ฤทธิ์ของสารผสมตั้งแต่ 2 ชนิดแสดงความเป็นพิษน้อยกว่าผลรวมความเป็นพิษของสารแต่ละชนิดเมื่อให้เป็นสารเดี่ยว
2. ความเป็นพิษแบบเพิ่มฤทธิ์ (additive effect) หมายถึง ฤทธิ์ของสารผสมตั้งแต่ 2 ชนิดแสดงความเป็นพิษเท่ากับผลรวมความเป็นพิษของสารแต่ละชนิดเมื่อให้เป็นสารเดี่ยว
3. ความเป็นพิษแบบเสริมฤทธิ์ (synergistic effect) หมายถึง ฤทธิ์ของสารผสมตั้งแต่ 2 ชนิดแสดงความเป็นพิษมากกว่าผลรวมความเป็นพิษของสารแต่ละชนิดเมื่อให้เป็นสารเดี่ยว



ภาพประกอบ 3 ลักษณะการแสดงความเป็นพิษร่วมของสาร 2 ชนิด

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.

การประเมินความเป็นพิษร่วมของยาฆ่าแมลงและโลหะหนักสามารถทำได้โดยใช้วิธีวิเคราะห์ความเป็นพิษร่วมของสารเคมี Marking's additive index method ของ Marking (1977) โดยทำการวิเคราะห์กิจกรรมทางชีววิทยา (biological activity) ตามสมการที่ 2

$$S = \frac{A_m}{A_i} + \frac{B_m}{B_i} \dots (2)$$

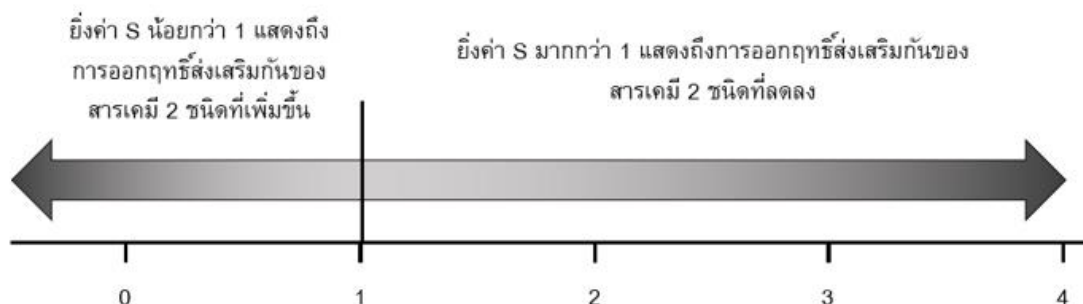
เมื่อ	S	แทน กิจกรรมทางชีววิทยา (biological activity) ของสารเคมี A และ B
	$A_m$	แทน ค่า $LC_{50}$ ของสาร A เมื่อมีสาร B ผสม
	$A_i$	แทน ค่า $LC_{50}$ ของสารเคมี A
	$B_m$	แทน ค่า $LC_{50}$ ของสาร B เมื่อมีสาร A ผสม
	$B_i$	แทน ค่า $LC_{50}$ ของสารเคมี B

ทั้งนี้เพื่อให้การแปลค่าการประเมินความเป็นพิษร่วมของสารเคมี 2 ชนิดสอดคล้องกับเส้นจำนวนและง่ายต่อการแปลผล Marking (1977) จึงได้ทำการสร้างสมการเพื่อปรับแก้ค่ากิจกรรมทางชีววิทยาด้วยดัชนีการส่งเสริมการทำงาน (additive index, AI) ตามสมการที่ 3.1 หรือสมการที่ 3.2

$$AI = \left(\frac{1}{S}\right) - 1; S < 1 \dots (3.1) \text{ หรือ}$$

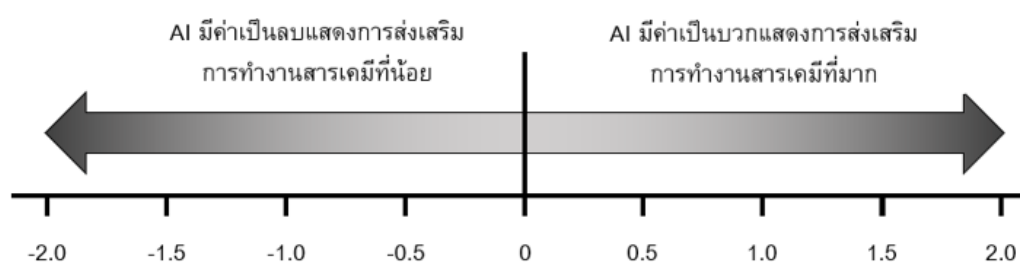
$$AI = 1 - S; S > 1 \dots (3.2)$$

จากสมการที่ 2, 3.1 และ 3.2 จะสามารถเขียนเส้นจำนวนแสดงความสัมพันธ์จากค่ากิจกรรมทางชีววิทยาและดัชนีการส่งเสริมการทำงานได้ดังภาพประกอบ 4 และ 5 ตามลำดับ



ภาพประกอบ 4 ผลรวมของความเป็นพิษของสารเคมีจากค่ากิจกรรมทางชีววิทยา

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



ภาพประกอบ 5 ผลรวมของความเป็นพิษของสารเคมีจากค่าดัชนีการส่งเสริมการทำงาน

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

อย่างไรก็ตามเมื่อเกิดความเป็นพิษแบบเสริมฤทธิ์หรือเพิ่มฤทธิ์จะส่งผลให้สิ่งมีชีวิตที่ได้รับสารผสมนั้นแสดงความเป็นพิษได้หลายรูปแบบ เช่น การตาย การเปลี่ยนแปลงกิจกรรมของเอนไซม์ หรือพยาธิสภาพ ซึ่งลักษณะที่แสดงถึงความเป็นพิษเหล่านี้สามารถนำมาใช้เป็นดัชนีชี้วัดความเป็นพิษของสารเคมีได้ ในปัจจุบันมีการศึกษาความเป็นพิษร่วมของยาฆ่าแมลงและโลหะหนักเป็นวงกว้าง และพบว่าความเป็นพิษร่วมของสารสองชนิดนี้ มีแนวโน้มเป็นการออกฤทธิ์

แบบเสริมฤทธิ์ และส่งผลให้เกิดความเป็นพิษมากกว่าการได้รับโลหะหนักหรือยาฆ่าแมลงอย่างเดี่ยว โดย Uwizeyimana et al. (2017) ได้ทำการรวบรวมงานวิจัยที่ศึกษาเกี่ยวกับความเป็นพิษของยาฆ่าแมลง ยาปราบศัตรูพืช และโลหะหนัก พบว่าสารพิษทั้ง 3 ประเภทที่กล่าวข้างต้นสามารถก่อให้เกิดความเป็นพิษร่วม และแสดงความเป็นพิษแบบส่งเสริมกัน ในสิ่งมีชีวิตที่อาศัยในระบบนิเวศที่มีการปนเปื้อนได้ แม้ว่าในปัจจุบันจะมีรายงานความเป็นพิษร่วมของสารพิษทั้งสามประเภทมากขึ้นแต่ยังคงต้องการข้อมูลจากงานวิจัยอื่น ๆ เพิ่มเติม ทั้งในแง่ของความหลากหลายของสารพิษที่ใช้ทดสอบ และความหลากหลายของสิ่งมีชีวิตที่ใช้ทดสอบ จากการรวบรวมงานวิจัยพบว่าความเป็นพิษร่วมที่อาจแสดงออกในสิ่งมีชีวิตนั้นสามารถเกิดได้หลายประการ เช่น การทำลาย DNA การรบกวนการทำงานของเอนไซม์ การลดความสามารถในการรอดชีวิตและเจริญเติบโต รวมไปถึงพฤติกรรมต่าง ๆ เช่น การหาอาหารและการรวมกลุ่ม ดังนั้นจะเห็นว่าความเป็นพิษร่วมแบบส่งเสริมกันของสารพิษต่างประเภทกันควรได้รับการศึกษาให้มากขึ้นเพื่อสร้างมาตรการในการควบคุมและตรวจสอบการใช้งานสารเคมีในการทำเกษตรกรรมให้เหมาะสม

### ดัชนีชี้วัดทางชีวภาพ

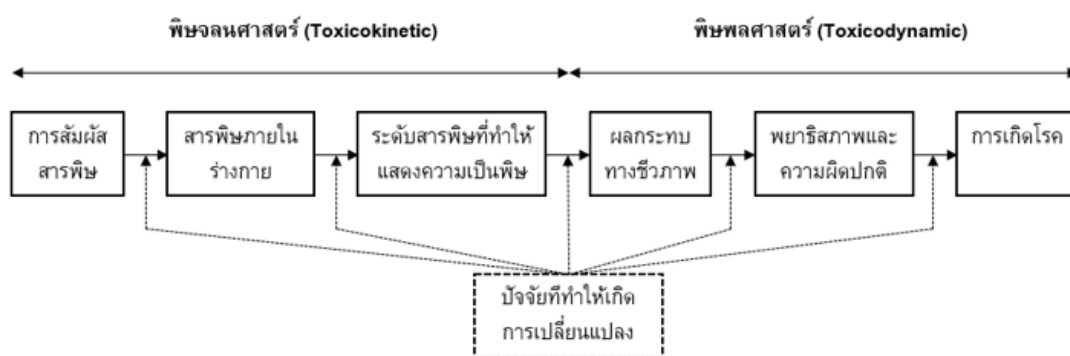
ดัชนีชี้วัดทางชีวภาพ (biomarkers) หมายถึงตัววัดที่สามารถบอกได้ถึงอันตรกริยาที่เกิดขึ้นระหว่างสิ่งมีชีวิตกับสารในสิ่งแวดล้อม โดยดัชนีนี้จะเกี่ยวข้องกับการสัมผัสสารและการแสดงผลความเป็นพิษสามารถแบ่งออกเป็น 3 ลักษณะ Maturot and Juthamas (2009) คือ

1. ดัชนีชีวภาพสัมผัส หมายถึง การวัดการเปลี่ยนแปลงที่เกิดจากสารพิษหรือสารที่เกิดขึ้นจากกระบวนการทางชีวภาพที่เป็นผลมาจากการได้รับสารพิษในร่างกายของสิ่งมีชีวิต โดยจะต้องสามารถวัดจากส่วนต่าง ๆ ภายในสิ่งมีชีวิต ดัชนีนี้จะใช้อธิบายความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณสารพิษภายนอกกับปริมาณสารพิษที่สามารถเข้าสู่ร่างกายสิ่งมีชีวิตได้

2. ดัชนีชีวภาพการเกิดผล หมายถึง การวัดการเปลี่ยนแปลงทางชีวเคมี สรีรวิทยา หรือพฤติกรรมของสิ่งมีชีวิตที่สามารถตรวจวัดได้ และสามารถแสดงความเชื่อมโยงถึงความเป็นพิษของสารพิษกับการชักนำให้เกิดโรคหรือความผิดปกติ โดยดัชนีนี้จะแสดงให้เห็นถึงความสัมพันธ์ของการได้รับสารพิษต่อการเกิดความผิดปกติ

3. ดัชนีชีวภาพความไวต่อการตอบสนอง หมายถึง การประเมินความไวต่อการตอบสนองของสิ่งมีชีวิต โดยดัชนีนี้มักถูกใช้ในแปลผลและสรุปผลได้จากการศึกษาการแสดงออกถึงความเป็นพิษที่มีการตอบสนองแตกต่างกันในสิ่งมีชีวิต อันเป็นผลมาจากปัจจัยบางประการที่ทำให้เกิดความรุนแรงแตกต่างกัน

ทั้งนี้ดัชนีทั้ง 3 ลักษณะนี้มีส่วนเกี่ยวข้องกับกระบวนการทางชีวภาพที่เกิดขึ้นในสิ่งมีชีวิตตั้งแต่การรับสารพิษเข้าสู่ร่างกายไปจนถึงการแสดงออกของความผิดปกติที่แสดงตามภาพประกอบ 6 ซึ่งสามารถแบ่งออกเป็น 2 ช่วงคือ พิษจลนศาสตร์ หมายถึงกระบวนการที่สารพิษที่เข้าสู่ร่างกายซึ่งจะต้องผ่านขั้นตอนต่าง ๆ ได้แก่ การดูดซึมสารพิษ การกระจายสารพิษและการกำจัดสารพิษ และพิษพลศาสตร์ หมายถึงกระบวนการที่ก่อให้เกิดการเปลี่ยนแปลงทางด้านชีวเคมี และสรีรวิทยาของสิ่งมีชีวิตซึ่งก่อให้เกิดการแสดงความเป็นพิษหรือพยาธิสภาพ



ภาพประกอบ 6 แผนภูมิพิษวิทยา

ที่มา : Maturot, R., & Juthamas, S. (2009). *Ecotoxicology* (2 ed.). Bangkok: Faculty of medicine Mahidol University.

### การเตรียมสารละลายมาตรฐานเพื่อทดสอบความเป็นพิษ

สารเคมีที่เป็นสารพิษมักเป็นสารที่ผลิตขึ้นด้วยกรรมวิธีทางเคมี ดังนั้นในการทดลองเกี่ยวกับสารเคมีเหล่านี้จำเป็นต้องศึกษาคุณสมบัติของสารให้ดี เพื่อที่จะเตรียมอุปกรณ์และศึกษาวิธีการใช้สารให้ถูกต้อง ในการทดสอบความเป็นพิษต่อสัตว์ทดลองนั้นสามารถทำได้ 3 รูปแบบคือ การฉีดเข้าสัตว์ทดลอง การผสมในอาหาร และการทำเป็นสารละลายเพื่อให้สัตว์ได้

สัมผัสจากภายนอกซึ่งวิธีการทำเป็นสารละลายเป็นวิธีที่ได้รับความนิยมในการทดสอบความเป็นพิษต่อสัตว์น้ำมากที่สุด ดังนั้นก่อนการทดลองจึงจำเป็นต้องเตรียมสารละลายมาตรฐานเพื่อผสมลงในน้ำเลี้ยงสัตว์ทดลองในระดับความเข้มข้นต่าง ๆ โดยการเตรียมสารละลายมาตรฐานนิยมใช้น้ำกลั่นเป็นตัวทำละลาย แต่ถ้าสารนั้นไม่ละลายในน้ำจะต้องใช้ตัวทำละลายชนิดอื่น ทั้งนี้ต้องคำนึงถึงความเป็นพิษของตัวทำละลายเหล่านั้นด้วย โดยจะต้องพิจารณาเลือกตัวทำละลายที่มีความเป็นพิษต่ำและทำการทดลองโดยมีการจัดชุดควบคุมทั้งกลุ่มควบคุมแบบลบ (negative control) และกลุ่มควบคุมแบบบวก (positive control) เพื่อเปรียบเทียบความเป็นพิษของตัวทำละลาย

### การเลือกใช้สัตว์ทดลอง

สัตว์ทดลองที่เลือกใช้หากไม่ใช้สัตว์ทดลองที่เลี้ยงในห้องปฏิบัติการมาก่อน หลังจากการคัดเลือกหรือขนย้าย ควรพักสัตว์ทดลองก่อนเริ่มทำการทดลองอย่างน้อย 1 สัปดาห์เพื่อให้สัตว์ทดลองปรับตัวเข้าสู่สภาพแวดล้อม และลดความเครียดที่อาจจะเกิดขึ้นระหว่างการขนย้าย ทั้งนี้ในการทดลองทุกครั้งจะต้องจัดชุดควบคุม (control group) เพื่อใช้ในการเปรียบเทียบผลของความเป็นพิษจากสารเคมีที่ใช้ทดสอบ โดยจะต้องจัดสภาพแวดล้อมให้เหมือนกับชุดทดลอง นอกจากนี้จะต้องตรวจสอบคุณภาพน้ำเมื่อเริ่มต้นและสิ้นสุดการทดลองทุกครั้ง เนื่องจากสารบางชนิดเมื่อละลายน้ำอาจจับตัวกันเป็นสารแขวนลอยที่อยู่ในน้ำซึ่งจะทำให้การประเมินความเป็นพิษที่เกิดขึ้นไม่ถูกต้อง อย่างไรก็ตามการใช้สัตว์ทดลองยังจำเป็นต้องคำนึงถึงจรรยาบรรณการใช้สัตว์ทดลอง (Retnam et al., 2016) ซึ่งมีข้อกำหนดดังนี้

1. ผู้ใช้สัตว์ต้องตระหนักถึงคุณค่าของชีวิตสัตว์ ต้องใช้สัตว์เฉพาะกรณีที่ได้พิจารณาอย่างถี่ถ้วนแล้วว่าเป็นประโยชน์และจำเป็นสูงสุดต่อการพัฒนาคุณภาพชีวิตของมนุษย์และสัตว์ และความก้าวหน้าทางวิชาการ
2. ผู้ใช้สัตว์ต้องตระหนักถึงความเมตตาของผลงานโดยใช้สัตว์จำนวนน้อยที่สุด ทั้งนี้ผู้ใช้สัตว์จะต้องคำนึงถึงคุณสมบัติทางพันธุกรรมของสัตว์ที่จะนำมาใช้ ให้สอดคล้องกับวัตถุประสงค์และเป้าหมายของการใช้สัตว์ เพื่อให้ได้รับผลงานที่ถูกต้องแม่นยำมากที่สุด

3. การใช้สัต์ว์ป่าต้องไม่ขัดต่อกฎหมายและนโยบายการอนุรักษ์สัต์ว์ป่า การนำสัต์ว์ป่ามาใช้ ควรกระทำเฉพาะกรณีที่มีความจำเป็นต่อการศึกษาวิจัย โดยไม่สามารถใช้สัต์ว์ประเภทอื่นทดแทนได้

4. ผู้ใช้สัต์ว์ต้องตระหนักว่าสัต์ว์เป็นสิ่งมีชีวิตเช่นเดียวกับมนุษย์โดยต้องตระหนักว่าสัต์ว์มีความรู้สึกเจ็บปวดและมีความรู้สึกตอบสนองต่อสภาพแวดล้อม ต้องปฏิบัติต่อสัต์ว์ด้วยความระมัดระวังทุกขั้นตอน นับตั้งแต่การขนส่ง การใช้วัสดุอุปกรณ์ในการเลี้ยง การจัดการสภาพแวดล้อมของสถานที่เลี้ยง เทคนิคในการเลี้ยง

5. ผู้ใช้สัต์ว์ต้องบันทึกข้อมูลไว้เป็นหลักฐานอย่างครบถ้วน ต้องปฏิบัติต่อสัต์ว์ตรงตามวิธีการที่เสนอไว้ในโครงการ และต้องบันทึกไว้เป็นหลักฐานอย่างละเอียด

### หลักการในการเตรียมเนื้อเยื่อเพื่อศึกษาด้วยกล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสง

ขั้นตอนในการเตรียมเนื้อเยื่อสัต์ว์เพื่อศึกษาได้กล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสงสามารถทำได้ดังนี้

1. การรักษาสภาพ (fixation) เป็นขั้นตอนการตัดชิ้นเนื้อเยื่อของตัวอย่างสัต์ว์ทดลองให้มีขนาดเล็ก และแช่ในสารละลายรักษาสภาพเพื่อคงสภาพเนื้อเยื่อไม่ให้เกิดการเน่าเปื่อย

2. การดึงน้ำออก (dehydration) เป็นขั้นตอนในการลดความเข้มข้นของน้ำภายในเซลล์โดยการไล่ระดับความเข้มข้นของเอทิลแอลกอฮอล์ให้สูงขึ้น

3. การทำให้ใส (clearing) เป็นขั้นตอนในการแทนที่เอทิลแอลกอฮอล์ด้วยสารละลายอินทรีย์ เช่น ไชลีน ซึ่งนอกจากจะทำให้เนื้อเยื่อใสขึ้นแล้ว ไชลีนยังเป็นตัวทำละลายสารที่จะนำชิ้นเนื้อเยื่อไปฝังอีกด้วย

4. การฝังตัวอย่าง (embedding) เป็นขั้นตอนการฝังชิ้นตัวอย่างลงในไขหรือสารที่สามารถแข็งตัวได้ เช่น พาราฟิน

5. การตัดตัวอย่าง (sectioning) เป็นการตัดแท่งตัวอย่างที่ฝังลงในไขเรียบร้อยแล้ว โดยการตัดชิ้นตัวอย่างของเนื้อเยื่อสัต์ว์นิยมตัดให้มีความหนาอยู่ในช่วง 8 - 10 ไมโครเมตร ทั้งนี้ขึ้นอยู่กับชนิดเนื้อเยื่อและอวัยวะที่ศึกษา

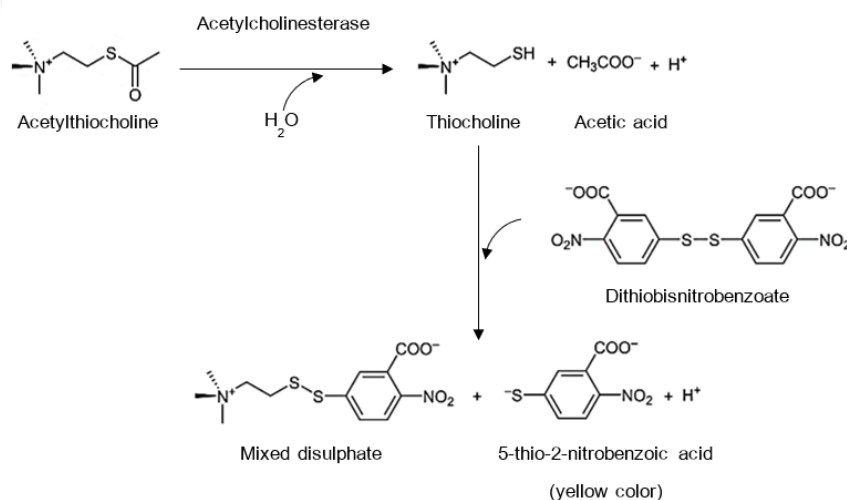
6. การย้อม (staining) เป็นขั้นตอนในการย้อมสีเนื้อเยื่อเพื่อให้เกิดความแตกต่างของโครงสร้างให้ชัดเจนยิ่งขึ้น โดยทั่วไปแล้วสีย้อมเนื้อเยื่อเป็นสีที่มีองค์ประกอบเป็นเบส (basic dye)



เช่น สีฮีมาทอกไซลีน (hematoxylin) และสีที่มีองค์ประกอบเป็นกรด (acid dye) เช่น สีอีโอซิน (eosin) ดังนั้นโครงสร้างแต่ละส่วนของเซลล์จะติดสีที่แตกต่างกัน เช่น นิวเคลียสย้อมติดสีที่มีองค์ประกอบเป็นเบส เรียกโครงสร้างเนื้อเยื่อเหล่านี้ว่า basophilic structure ส่วนโครงสร้างของเซลล์ที่มีอนุภาคเป็นเบสอยู่ในส่วนประกอบ เช่น โปรตีนและไซโตพลาสซึมจะย้อมติดสีที่มีองค์ประกอบเป็นกรดและเรียกโครงสร้างเหล่านี้ว่า acidophilic structure

### หลักการตรวจวัดกิจกรรมของเอนไซม์อะซิติลโคลีนเอสเทอเรส

การตรวจวัดกิจกรรมของเอนไซม์อะซิติลโคลีนเอสเทอเรสใช้วิธีการของ Ellman, Courtney, Andres Jr, and Featherstone (1961) ซึ่งได้ออกแบบการทดลอง photometric technique เพื่อติดตามการทำงานของเอนไซม์อะซิติลโคลีนเอสเทอเรสในเนื้อเยื่อต่าง ๆ โดยอาศัยหลักการ คือ เมื่อเอนไซม์อะซิติลโคลีนเอสเทอเรสย่อยสาร acetylthiocholine จะได้สารผลิตภัณฑ์เป็น thiocholine เมื่อนำไปทำปฏิกิริยากับสารให้สี dithiobisnitrobenzoate (DTNB) จะได้ 5-thio-2-nitrobenzoic acid ซึ่งเป็นผลิตภัณฑ์ที่มีสีเหลือง ดังภาพประกอบ 7



ภาพประกอบ 7 ปฏิกิริยาการทดสอบกิจกรรมของเอนไซม์อะซิติลโคลีนเอสเทอเรส

ที่มา: Pohanka, M. (2015). Biosensors containing acetylcholinesterase and butyrylcholinesterase as recognition tools for detection of various compounds. *Chemical Papers*, 69(1), 4-16.

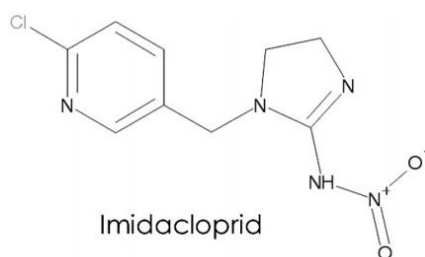


การวัดปริมาณของสารผลิตภัณฑ์สีเหลืองที่เกิดขึ้นสามารถทำได้โดยใช้เครื่อง spectrophotometer กำหนดความยาวคลื่นที่ 412 นาโนเมตร จากนั้นนำมาคำนวณกิจกรรมของเอนไซม์อะซิทิลโคลีนเอสเทอเรสได้ ประโยชน์ของการวิเคราะห์กิจกรรมของเอนไซม์อะซิทิลโคลีนเอสเทอเรสได้ถูกนำมาใช้เฝ้าระวังและตรวจสอบความผิดปกติของประชาชนหรือเกษตรกรที่สัมผัสกับโลหะหนัก เนื่องจากมีรายงานการศึกษาของ Bairy, de Medeiros, Di Mascio, and de Almeida (2006) พบว่าโลหะหนักบางชนิด เช่น แคดเมียมและตะกั่ว สามารถทำให้เกิดการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์อะซิทิลโคลีนเอสเทอเรสในหอยแมลงภู่โดยคาดว่า โลหะหนักเหล่านี้จะมีผลต่อโปรตีนตัวรับอะซิทิลโคลีน (acetylcholine receptor) และอาจจะส่งผลต่อการสังเคราะห์เอนไซม์อะซิทิลโคลีนเอสเทอเรสซึ่งเป็นผลกระทบทางอ้อมต่อกิจกรรมของเอนไซม์ชนิดนี้ นอกจากนี้ (Beauvais et al., 1999; Kallander et al., 1997; Rakotondravelo et al., 2006) ได้รายงานว่า การตรวจสอบกิจกรรมของเอนไซม์ acetylcholinesterase (AChE) เป็นหนึ่งในดัชนีชี้วัดทางชีวภาพที่สามารถใช้การทดสอบความเป็นพิษของ imidacloprid ต่อสิ่งมีชีวิตได้โดยกล่าวว่า AChE เป็นเอนไซม์สำคัญที่ทำให้ระบบประสาททำงานได้อย่างเป็นปกติ และทำหน้าที่ในการทำลาย acetylcholine (ACh) ซึ่งเป็นสารสื่อประสาทที่กระตุ้นการส่งกระแสประสาทที่ post-synaptic neuron ดังนั้นหากปราศจาก AChE จะส่งผลให้ ACh ที่มีปริมาณมากไปกระตุ้น post-synaptic neuron อย่างต่อเนื่อง และส่งผลต่อดำเนินการร่างทำให้ไม่สามารถควบคุมการเคลื่อนไหวได้ ในกรณีที่สิ่งมีชีวิตที่ได้รับ imidacloprid เข้าสู่ร่างกายเมื่อ imidacloprid เข้าจับกับโปรตีนตัวรับอะซิทิลโคลีนจึงทำให้ ACh คงค้างอยู่ในร่องประสาทส่งผลให้กิจกรรมของเอนไซม์ acetylcholinesterase สูงขึ้น ดังนั้นการตรวจวัดกิจกรรมของเอนไซม์นี้จึงเชื่อมโยงกับผลความเป็นพิษของ imidacloprid ต่อระบบประสาทของสิ่งมีชีวิตได้

## Imidacloprid

### คุณสมบัติทางเคมีของ imidacloprid

Imidacloprid เป็นสารออกฤทธิ์สำคัญในยาฆ่าแมลงในกลุ่ม neonicotinoid และใช้งานอย่างแพร่หลายมากที่สุดในกลุ่มยาฆ่าแมลงชนิดเดียวกัน เพื่อควบคุมแมลงศัตรูพืชในพื้นที่เกษตรกรรม (Cang et al., 2017; Matsumura et al., 2008; Tomizawa & Casida, 2005) ถึงแม้ว่ายาฆ่าแมลงกลุ่มนี้ออกแบบมาให้ออกฤทธิ์ต่อแมลงศัตรูพืชโดยตรง แต่ยังคงมีรายงานผลกระทบของยาฆ่าแมลงกลุ่มนี้ต่อสิ่งมีชีวิตนอกกลุ่มเป้าหมายอีกด้วย (Cang et al., 2017)



ภาพประกอบ 8 โครงสร้างทางเคมีของ imidacloprid

ที่มา: Anderson, J., Dubetz, C., & Palace, V. (2015). Neonicotinoids in the Canadian aquatic environment: a literature review on current use products with a focus on fate, exposure, and biological effects. *Science of the Total Environment*, 505, 409-422.

ตาราง 2 คุณสมบัติทางเคมีของ imidacloprid

คุณสมบัติทางเคมี	
ชื่อ IUPAC	N-{1-[(6-Chloro-3-pyridyl) methyl]-4,5-dihydroimidazol-2-yl} nitramide
ลักษณะของผลึก	ผลึกไม่มีสี
กลิ่น	มีกลิ่นเล็กน้อย
สูตรเคมี	$C_9H_{10}ClN_5O_2$
น้ำหนักโมเลกุล	$255.7 \text{ g mol}^{-1}$
ความสามารถในการละลายน้ำ	$514 \text{ mg L}^{-1}$ ที่ $20^\circ\text{C}$ pH 7
ค่าสัมประสิทธิ์การกระจายตัว ( $\log K_{ow}$ )	0.57 ที่ $21^\circ\text{C}$
ค่าสัมประสิทธิ์การดูดซับในดิน ( $K_{oc}$ )	262
ค่าครึ่งชีวิตในน้ำไม่มีแสง	มากกว่า 30 วัน ที่ $25^\circ\text{C}$ pH 7
ค่าครึ่งชีวิตในน้ำมีแสง	น้อยกว่า 2 ชั่วโมง ที่ $24^\circ\text{C}$ pH 7
ค่าครึ่งชีวิตในดิน	ประมาณ 38 วัน

ที่มา: Tomlin, C. D. (2009). *The pesticide manual: A world compendium*.

*The pesticide manual: A World compendium.* (Ed. 15).

### การใช้งาน imidacloprid

ทั้งนี้ในประเทศไทยและกลุ่มประเทศในเอเชียมีรายงานการดื้อยาของแมลงศัตรูพืชต่อ imidacloprid (Matsumura et al., 2008) ซึ่งส่งผลให้เกษตรกรโดยเฉพาะชาวนาจำเป็นต้องเพิ่มปริมาณและความถี่ในการใช้ imidacloprid เพื่อกำจัดแมลงศัตรูพืช และอาจส่งผลให้พบตกค้างของ imidacloprid ในระบบนิเวศมากยิ่งขึ้นอีกด้วย (Gorman et al., 2008)

ตาราง 3 การนำเข้า imidacloprid ของประเทศไทย

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

ที่มา: Department of Agricultural Regulatory Office. (2010). *The report of hazardous substances import.* Retrieved from [http://www.doa.go.th/ard/index.php?option=com\\_content&view=article&id=22:stat2535&catid=29:stat&Itemid=104](http://www.doa.go.th/ard/index.php?option=com_content&view=article&id=22:stat2535&catid=29:stat&Itemid=104)

### การปนเปื้อนและความเป็นพิษของ imidacloprid ในสิ่งแวดล้อม

Imidacloprid ออกแบบมาให้ออกฤทธิ์ผ่านการสัมผัสหรือการกินของแมลง โดยพบว่า พืชสามารถดูดซึมและเก็บสะสม imidacloprid ไว้จากการฉีดพ่นหรือการเคลือบเมล็ดก่อนการเพาะปลูก ดังนั้นจึงมีความเป็นไปได้สูงที่ imidacloprid จะสะสมและถ่ายทอดไปยังห่วงโซ่อาหารที่สูงขึ้น ทั้งนี้ความเป็นพิษของ imidacloprid เกิดขึ้นในรูปแบบของ transmission toxicity โดยก่อให้เกิดความเป็นพิษต่อการส่งสัญญาณประสาท จากการที่ imidacloprid เข้าจับกับโปรตีนตัวรับนิโคตินิกอะซีทิลโคลีน (nicotinic acetylcholine receptor) ของเซลล์ในระบบประสาท

ส่วนกลางเมื่อ imidacloprid จับกับ nicotinic acetylcholine receptor จะส่งผลให้ระบบประสาทถูกกระตุ้นอย่างต่อเนื่อง เนื่องจากการเข้าจับเกิดขึ้นอย่างถาวร (irreversible binding) และไม่มีเอนไซม์ในระบบประสาทสามารถทำลาย imidacloprid ได้ เป็นผลให้แมลงแสดงอาการชักเกร็งในช่วงแรกจากนั้นจะเข้าสู่ภาวะเป็นอัมพาตและตาย นอกจากนี้ยังมีรายงานของ Nicodemo et al. (2014) ที่ได้รายงานไว้ว่า imidacloprid มีความเป็นพิษต่อระบบประสาทโดยลดความสามารถในการสังเคราะห์ ATP จากไมโทคอนเดรียของเซลล์ประสาท ดังนั้นเซลล์ประสาทจึงไม่สามารถสร้างสารสื่อประสาทมาตอบสนองการกระตุ้นที่ต่อเนื่อง และส่งผลให้แมลงแสดงอาการเป็นพิษดังที่กล่าวมาข้างต้น

จากการศึกษาวิจัยเกี่ยวกับ imidacloprid สารกำจัดแมลงชนิดนี้มักถูกฉีดพ่นหรือเคลือบเมล็ดพืชที่ปลูกบนพื้นดิน แต่ความสามารถในการละลายน้ำที่สูง ทำให้ imidacloprid ถูกชะล้างลงสู่ระบบนิเวศน้ำจืดได้ง่าย รวมทั้งการปล่อยน้ำทิ้งหลังจากการทำเกษตรกรรมทำให้อัตราส่วนของการปนเปื้อนในธรรมชาติของ imidacloprid ในดินต่อน้ำอาจสูงถึง 1 ต่อ 3 ได้ (Miranda et al., 2011) และมีรายงานว่า ความเข้มข้นของการปนเปื้อน imidacloprid ในพื้นที่เกษตรกรรมของสหรัฐอเมริกาคงที่ตลอด 1 ปี แม้จะหยุดการใช้งาน imidacloprid แล้วก็ตาม (Watts, 2012) เนื่องจาก imidacloprid สามารถละลายน้ำได้ดีจึงมีโอกาที่สารเคมีชนิดนี้จะไหลลงสู่ระบบนิเวศแหล่งน้ำใกล้พื้นที่เกษตรกรรมจึงทำให้มีการศึกษาเกี่ยวกับความสามารถในการสะสมของ imidacloprid ในตะกอนใต้พื้นน้ำพบว่าค่าครึ่งชีวิตของ imidacloprid ในดินอยู่ที่ 30 – 162 วัน และในน้ำเหนือตะกอนดินทรายอยู่ที่ 4.7 วัน Croucher, Jewess, and Roberts (2007) ได้ทำการศึกษาเกี่ยวกับการปนเปื้อนของ imidacloprid ในแหล่งน้ำธรรมชาติพบว่า imidacloprid ที่พบในน้ำเป็นสารพิษที่ย่อยสลายทางชีวภาพได้ยาก และมักจะตกค้างอยู่ในระบบนิเวศแหล่งน้ำ

อย่างไรก็ตามในประเทศไทยยังไม่มีรายงานหรือการศึกษาค้นคว้าของ imidacloprid ในแหล่งน้ำ แต่ทั้งนี้เมื่อศึกษาข้อมูลการใช้งาน imidacloprid ของรัฐแคลิฟอร์เนีย ประเทศสหรัฐอเมริกาที่มีการใช้งานและปริมาณนำเข้าใกล้เคียงกับประเทศไทย ดังที่แสดงในตาราง 4 พบว่าในรัฐแคลิฟอร์เนียพบการปนเปื้อนของ imidacloprid ในแหล่งน้ำ และการปนเปื้อนเหล่านั้นเพิ่มมากขึ้น เมื่อมีการนำเข้า imidacloprid ที่มากขึ้น และยังพบว่าจำนวน

แหล่งน้ำที่มีการปนเปื้อน imidacloprid ที่สูงกว่ามาตรฐานของสำนักงานปกป้องสิ่งแวดล้อมสหรัฐอเมริกา กำหนดไว้ก็เพิ่มมากขึ้นตามไปด้วย

ตาราง 4 รายงานการนำเข้าและจำนวนแหล่งน้ำที่มีการตกค้างของ imidacloprid ในรัฐแคลิฟอร์เนีย

ปี	ปริมาณนำเข้า (kg)	จำนวนแหล่งที่พบการ ตกค้าง	จำนวนแหล่งที่มีการปนเปื้อน สูงกว่าค่ามาตรฐาน
2008-2010	570,316.10	20 จาก 22 (90.9%)	1
2011	681,508.47	9 จาก 41 (22.5%)	1
2013	238,416.19	57 จาก 95 (59.3%)	10
2014	232,361.31	132 จาก 164 (80.5%)	16
2015	358,847.81	92 จาก 112 (82.1%)	17
2016	1,686,298.84	68 จาก 88 (77.3%)	24

ที่มา: Department of pesticide regulation, C. (2018). *Study Reports*. Retrieved from <http://www.cdpr.ca.gov/docs/emon/pubs/ehapreps.htm?filter=surfwater>

ทั้งนี้จากการรวบรวมงานวิจัยพบว่า imidacloprid ในธรรมชาติจะเกิดปฏิกิริยาไฮโดรไลซิสและสลายตัวอย่างรวดเร็วเมื่อสัมผัสกับแสง ซึ่ง Anderson, Dubetz, and Palace (2015) ศึกษาการออกฤทธิ์ของ imidacloprid ในระบบนิเวศแหล่งน้ำจืดของประเทศแคนาดาพบว่าในแหล่งน้ำจืดของแคนาดามีการปนเปื้อน imidacloprid อยู่ประมาณ 0.23 มิลลิกรัมต่อน้ำหนึ่งลิตร ซึ่งมากพอที่จะก่อให้เกิดความเป็นพิษต่อแมลงน้ำและลูกปลาขนาดเล็ก

ทั้งนี้เมื่อ imidacloprid เกิดการแตกตัวสารเมแทบอลิต์ที่เกิดขึ้นบางชนิดยังมีฤทธิ์ต่อระบบประสาทของผึ้งอีกด้วย (Desneux, Decourtye, & Delpuech, 2007) ทำให้ปัจจุบันความเป็นพิษของ imidacloprid ต่อสิ่งมีชีวิตในแหล่งน้ำได้รับความสนใจและมีการศึกษาเป็นวงกว้าง โดย Y. Wang et al. (2012) ได้ทำการศึกษาผลกระทบของยาฆ่าแมลงในกลุ่ม neonicotinoid 5 ชนิดต่อไส้เดือนดิน (*Eisenia fetida*) ซึ่งพบว่ายาฆ่าแมลง imidacloprid, acetamiprid, nitenpyram, clothianidin และ thiacloprid มีค่า LC<sub>50</sub> เท่ากับ 3.05, 2.69, 4.34, 0.93 และ 2.68

mg kg<sup>-1</sup> ตามลำดับ เมื่อตรวจนับความดกของไข่ (fecundity) และการทำงานของเอนไซม์ cellulase พบว่ามีค่าลดลงอย่างมีนัยสำคัญ อีกทั้งเมื่อตรวจสอบพยาธิสภาพเนื้อเยื่อพบพยาธิสภาพที่เนื้อเยื่อชั้นผิวหนัง (epidermis) และเนื้อเยื่อของลำไส้ส่วนกลาง (midgut) ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยของ Desneux et al. (2007) ที่ได้ทำการศึกษากลไกการออกฤทธิ์ของ imidacloprid ต่อ *Lumbriculus variegatus* ที่เป็นสิ่งมีชีวิตในกลุ่ม Oligochaete พบว่าผลของการปนเปื้อนของ imidacloprid ทำให้ *L. variegatus* มีการบริโภคอาหารและการขับถ่ายน้อยลงอันเกิดมาจากการทำงานที่ผิดปกติของสรีรวิทยาของสิ่งมีชีวิต ทั้งนี้ยังพบว่า imidacloprid สามารถส่งผลกระทบต่อระบบประสาท การพัฒนาของตัวอ่อน การลอกคราบ ภูมิคุ้มกัน การเคลื่อนไหว และพฤติกรรมอื่นที่จำเป็นต่อการดำรงชีวิตของ *L. variegatus* อีกด้วย สำหรับงานวิจัยเกี่ยวกับความเป็นพิษของ imidacloprid ต่อไส้เดือนน้ำมีเพียงผลการศึกษาของ Gerhardt (2009) ที่ได้รายงานค่า LC<sub>50</sub> ที่ 24 ชั่วโมงไว้ที่ 0.3 มิลลิกรัมต่อลิตรโดยรายงานค่า EC<sub>50</sub> ของไส้เดือนน้ำเมื่อใช้พฤติกรรมเคลื่อนที่ เป็นเกณฑ์พบว่ามีค่าอยู่ที่ 0.09 มิลลิกรัมต่อลิตร นอกจากนี้ผู้วิจัยยังได้ตั้งข้อสังเกตว่าระดับของความเป็นพิษจะขึ้นอยู่กับความเข้มข้นและระยะเวลาที่ได้รับสารพิษ โดยไส้เดือนน้ำจะแสดงออกถึงความผิดปกติของพฤติกรรมเคลื่อนที่ แม้จะได้รับสารพิษในปริมาณน้อย และจะแสดงพฤติกรรมตอบสนองต่อสารพิษไวกว่าการตาย

ตาราง 5 รายงานการศึกษาค่าความเป็นพิษของ imidacloprid ต่อสิ่งมีชีวิตในกลุ่ม Oligochaetes

สิ่งมีชีวิต	การประเมินความเป็นพิษ (LC <sub>50</sub> )	ผู้วิจัย
<i>Tubifex tubifex</i>	0.3 mg L <sup>-1</sup> ที่ 24 ชั่วโมง	Gerhardt (2009)
<i>Eisenia fetida</i>	3.15 mg L <sup>-1</sup> ที่ 7 วัน	Y. Wang et al. (2012)
<i>Lumbricus terrestris</i>	10.7 mg L <sup>-1</sup> ที่ 14 วัน	Capowiez et al. (2010)
<i>Aporrectodea nocturna</i>	3.74 mg L <sup>-1</sup> ที่ 14 วัน	
<i>Dendrobaena octaedra</i>	5.7 mg L <sup>-1</sup> ที่ 35 วัน	Kreutzweiser et al. (2008)



## แคดเมียม

### คุณสมบัติทางกายภาพและทางเคมี

แคดเมียมเป็นโลหะที่มีคุณสมบัติเบา อ่อน ดัดงอได้ง่าย เป็นธาตุที่ไม่ละลายน้ำ แต่ละลายได้ในกรด เช่น กรดไนตริกหรือกรดไฮโดรคลอริก ด้วยเหตุนี้ทำให้แคดเมียมก่อให้เกิดอันตรายต่อมนุษย์ผ่านการรับประทานได้สูง ทั้งนี้สารประกอบของแคดเมียมมีหลายชนิด เช่น แคดเมียมซัลเฟต ( $\text{CdSO}_4$ ), แคดเมียมคลอไรด์ ( $\text{CdCl}_2$ ) และแคดเมียมไนเตรต ( $\text{Cd}(\text{NO}_3)_2$ ) ซึ่งสารประกอบเหล่านี้สามารถละลายในน้ำได้ดี

ตาราง 6 คุณสมบัติทางเคมีของแคดเมียม

คุณสมบัติทางเคมี	
ชื่อ	แคดเมียม
สัญลักษณ์	Cd
เลขอะตอม	48
หมู่, คาบ, บล็อก	12, 5, d
อนุกรมเคมี	โลหะทรานซิชัน
การจัดเรียงอิเล็กตรอน	$[\text{Kr}] 4d^{10} 5s^2$
อิเล็กตรอนต่อระดับพลังงาน	2, 8, 18, 18, 2
ลักษณะกายภาพ	โลหะสีเงิน
มวลอะตอม	$112.411 \text{ u} \pm 0.008 \text{ u}$
สถานะที่อุณหภูมิและความดันมาตรฐาน	ของแข็ง

ที่มา: National Center for Biotechnology Information. (2018). *PubChem Compound Database*. CID=23973. Retrieved from <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/23973>

### การใช้งานแคดเมียม

แคดเมียมเป็นโลหะที่ใช้ผสมกับโลหะอื่น เพื่อความเหนียวและความทนทานต่อการสึกกร่อน โดยอาจใช้ผสมกับทองแดงเพื่อผลิตเส้นลวดโทรศัพท์ ใช้ในการชุบโลหะโดยมักใช้

แคดเมียมซุบของแดง หรืออะลูมิเนียมเพื่อผลิตอุปกรณ์ไฟฟ้า สารประกอบของแคดเมียมยังเป็นสารให้สีในอุตสาหกรรมต่าง ๆ เช่น อีนาเมล เซรามิก ยาง เส้นใย หรือหมึกพิมพ์ นอกจากนี้แคดเมียมยังใช้ในการผลิตและอุตสาหกรรมอื่น ๆ อีกเช่น การผลิตแบตเตอรี่ การผลิตสารกำจัดเชื้อรา การผลิตหลอดไฟฟลูออเรสเซนต์ หรือใช้ในอุตสาหกรรมภาพถ่าย

### การปนเปื้อนของแคดเมียมในสิ่งแวดล้อม

แคดเมียมเป็นโลหะหนักที่สามารถพบได้ทั้งในน้ำ ดิน และอากาศโดยการสะสมของแคดเมียมที่ก่อให้เกิดอันตรายต่อสิ่งมีชีวิตมากที่สุดคือ การสะสมของแคดเมียมในน้ำ เนื่องจากความสามารถในการละลายน้ำที่สูงของสารประกอบแคดเมียม ทำให้เกิดผลกระทบต่อสิ่งมีชีวิตที่อาศัยอยู่ในแหล่งน้ำ ยิ่งไปกว่านั้นการที่แหล่งน้ำมีการปนเปื้อนแคดเมียมทำให้มีโอกาสสูงที่สิ่งมีชีวิตเหล่านั้นจะสะสมแคดเมียม และถ่ายทอดไปยังห่วงโซ่อาหารที่สูงขึ้น ซึ่งไม่เพียงแต่ในสัตว์เท่านั้น การสะสมแคดเมียมยังสามารถพบได้ในพืชอีกด้วย โดยปริมาณการสะสมของแคดเมียมในต้นพืชจะขึ้นอยู่กับค่าความเป็นกรดต่างของดิน ยิ่งมีความเป็นกรดมากขึ้นพืชจะดูดซึมและสะสมแคดเมียมมากยิ่งขึ้น ทั้งนี้การปนเปื้อนของแคดเมียมออกสู่สิ่งแวดล้อมสามารถเกิดได้จากหลายทางดังนี้

1. อุตสาหกรรมตะกั่วและสังกะสี ได้แก่ การทำเหมือง การหลอมและถลุงซึ่งอุตสาหกรรมเหล่านี้จะปล่อยไอฝุ่น น้ำเสีย และกากตะกอนที่มีแคดเมียมออกมา
2. โรงงานอุตสาหกรรมแคดเมียม ซึ่งของเสียจากโรงงานประเภทนี้จะมีแคดเมียมประมาณ 100 – 500 ppm และมีโลหะหนักอื่น ๆ รวมทั้งไซยาไนด์ผสมออกมาด้วย
3. การเผาของเสีย เมื่อเผาวัตถุที่มีแคดเมียมเป็นสารประกอบอยู่ จะทำให้เกิดควัน (fume) ที่มีแคดเมียมผสมอยู่ เช่น แคดเมียมออกไซด์ (CdO)
4. ปุ๋ยฟอสเฟต โดยในปุ๋ยฟอสเฟตจะมีแคดเมียมผสมอยู่ เนื่องจากหินฟอสเฟตที่เป็นวัตถุดิบในการผลิตปุ๋ยชนิดนี้มีแคดเมียมผสมอยู่ประมาณ 2 – 170 ppm มีรายงานการศึกษาของ Roberts (2014) พบว่าการใช้ปุ๋ยฟอสเฟตสามารถเพิ่มการสะสมของแคดเมียมในดินได้ เนื่องจากแคดเมียมฟอสเฟตจะละลายน้ำได้น้อยทำให้ส่วนที่ไม่ละลายน้ำถูกสะสมไว้ในดิน ทั้งนี้หากมีการใช้ปุ๋ยแอมโมเนียร่วมด้วยจะส่งผลให้แคดเมียมละลายน้ำได้มากขึ้น เนื่องจากแคดเมียมจะรวมตัวกับแอมโมเนียเป็นไอออนที่ละลายน้ำได้คือ  $[Cd(NH_3)_2]^{+2}$  และ  $[Cd(NH_3)_4]^{+2}$



นอกจากนี้การที่แคดเมียมเป็นโลหะหนักที่มีความเป็นพิษสูงในแหล่งน้ำ กรมควบคุมมลพิษ กระทรวงทรัพยากรและสิ่งแวดล้อม จึงได้มีการประกาศกำหนดค่ามาตรฐานของแคดเมียมในแหล่งน้ำไว้ดังนี้

ตาราง 7 เกณฑ์มาตรฐานปริมาณของแคดเมียมในน้ำของประเทศไทย

มาตรฐาน	ชนิดของมาตรฐาน	ปริมาณของแคดเมียม
มาตรฐานคุณภาพน้ำทิ้ง	น้ำทิ้งจากโรงงานอุตสาหกรรมและ นิคมอุตสาหกรรม	0.03 mg L <sup>-1</sup>
	น้ำทิ้งลงบ่อน้ำบาดาล	0.1 mg L <sup>-1</sup>
	น้ำระบายลงทางน้ำชลประทาน	0.03 mg L <sup>-1</sup>
มาตรฐานคุณภาพน้ำผิวดิน	แหล่งน้ำที่ได้รับน้ำทิ้งจากกิจกรรมบาง ประเภท และสามารถใช้เป็นประโยชน์	0.005 <sup>a</sup> mg L <sup>-1</sup> 0.05 <sup>b</sup> mg L <sup>-1</sup>
มาตรฐานคุณภาพน้ำใต้ดิน		ไม่เกิน 0.003 mg L <sup>-1</sup>

<sup>a</sup> ในกรณีที่น้ำที่มีความกระด้างในรูป CaCO<sub>3</sub> ไม่เกินกว่า 100 มิลลิกรัมต่อลิตร

<sup>b</sup> ในกรณีที่น้ำที่มีความกระด้างในรูป CaCO<sub>3</sub> เกินกว่า 100 มิลลิกรัมต่อลิตร

ที่มา : Maturot, R., & Juthamas, S. (2009). Ecotoxicology (2 ed.). Bangkok: Faculty of medicine Mahidol University.

จากการรวบรวมงานวิจัย และรายงานการปนเปื้อนของแคดเมียมในแหล่งน้ำของประเทศไทยพบว่าปริมาณแคดเมียมปนเปื้อนสูงกว่าเกณฑ์มาตรฐานที่กรมควบคุมมลพิษ กระทรวงทรัพยากรและสิ่งแวดล้อมกำหนดไว้ในทุกพื้นที่สำรวจ (ตาราง 8) ไม่เพียงแต่พบการปนเปื้อนในน้ำเท่านั้น แต่การปนเปื้อนแคดเมียมยังพบในสัตว์น้ำจืดประเทศไทยอีกด้วย (ตาราง 9)

ตาราง 8 รายงานการปนเปื้อนของแคดเมียมในประเทศไทย

ชนิดตัวอย่าง	ปริมาณแคดเมียม	พื้นที่เก็บตัวอย่าง	ผู้วิจัย
ดินตะกอนท้องน้ำ	9.750±9.090 mg kg <sup>-1</sup>	ลำธารใกล้เหมืองแร่ อำเภอแม่ตาว จังหวัดตาก	Pimchada, Ampol, and TaengOn (2013)
น้ำ	0.057±0.047 mg kg <sup>-1</sup> (ฤดูน้ำแล้ง)	แม่น้ำท่าจีน	Jintanan, Wit, Kasem, and Naruechid (2013)
	0.182±0.123 mg kg <sup>-1</sup> (ฤดูน้ำหลาก)		
	0.0034 µg L <sup>-1</sup>	น้ำบาดาล จังหวัดนครราชสีมา	Juthathip (2557)
	0.270±0.046 µg L <sup>-1</sup> (ฤดูแล้ง)	บริเวณนาข้าว จังหวัดสุพรรณบุรี	Yuttachai, Bundit, and Supapich (2546)
	1.021±0.213 mg L <sup>-1</sup> (ฤดูแล้ง)	ปากแม่น้ำท่าตะเภา จังหวัดชุมพร	Thita (2014)
0.665±0.229 mg L <sup>-1</sup> (ฤดูฝน)			

ตาราง 9 รายงานการปนเปื้อนของแคดเมียมในสัตว์น้ำจืดของประเทศไทย

สิ่งมีชีวิต	ปริมาณแคดเมียม	พื้นที่เก็บ ตัวอย่าง	ผู้วิจัย
<i>Chitala</i> sp.	0.040±0.029 mg kg <sup>-1</sup>	เขื่อนลำปาว	Kochaphan and
<i>Phalacronotus</i> sp.	0.045±0.029 mg kg <sup>-1</sup>	จังหวัดกาฬสินธุ์	Sirinan (2013)
<i>Oxyeleotris marmorata</i>	0.023±0.005 mg kg <sup>-1</sup>		

ตาราง 9 (ต่อ)

สิ่งมีชีวิต	ปริมาณแคดเมียม	พื้นที่เก็บตัวอย่าง	ผู้วิจัย
<i>Trichogaster pectoralis</i>	0.059 <sup>a</sup> mg kg <sup>-1</sup>	จังหวัดสกลนคร	Naiyana, Somsak, Sugunya, and Sukrichaya (2013)
<i>Macrobrachium rosenbergii</i>	0.145±0.167 mg kg <sup>-1</sup>	เขื่อนลำปาว จังหวัดกาฬสินธุ์	Kochaphan and Sirinan (2013)

<sup>a</sup>ปริมาณแคดเมียมตกค้างสูงกว่าค่าที่กระทรวงสาธารณสุขกำหนดไว้ (Ministry of Public Health, 1986)

#### ความเป็นพิษของแคดเมียม

แคดเมียมเป็นสารที่ก่อให้เกิดความเป็นพิษต่อเซลล์โดยสามารถยับยั้งกระบวนการต่าง ๆ ภายในเซลล์ได้ โดยกลไกการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์จากแคดเมียมนั้น เกิดจากการที่แคดเมียมเข้าจับกับหมู่ sulfhydryl (-SH) ในเอนไซม์และโปรตีนได้ดี รวมทั้งการที่แคดเมียมสามารถเข้าทำปฏิกิริยากับโปรตีนซึ่งเป็นองค์ประกอบของ metalloenzyme และเอนไซม์ที่มีสังกะสีเป็น prosthetic group โดยแคดเมียมจะเข้าไปแทนที่สังกะสี (Zn<sup>2+</sup>) และมีประสิทธิภาพในการเข้าจับกับลิแกนด์ของสารอินทรีย์ในสิ่งมีชีวิตได้ดีกว่า (Viarengo & Nott, 1993) เมื่อแคดเมียมเข้าจับกับหมู่ sulfhydryl แล้วจะทำให้โปรตีนหรือเอนไซม์ชนิดนั้น ๆ เสียสภาพและไม่สามารถทำงานได้เป็นสาเหตุของความเป็นพิษที่แสดงออกมาในรูปแบบต่าง ๆ ทั้งพยาธิสภาพและการเปลี่ยนแปลงกิจกรรมของเอนไซม์ต่าง ๆ

ตาราง 10 เอนไซม์ต่าง ๆ ที่มีสังกะสีเป็นองค์ประกอบ

เอนไซม์หรือโปรตีน	ปฏิกิริยาหรือหน้าที่
Carbonic anhydrase	ช่วยรักษาสมดุลความเป็นกรดต่างจากการสะสมของแก๊สคาร์บอนไดออกไซด์ในเลือดและเนื้อเยื่อต่าง ๆ ( $\text{CO}_2 + \text{OH}^- \rightarrow \text{HCO}_3^-$ )
Superoxide dismutase	เร่งปฏิกิริยาที่ทำลายอนุมูลซูเปอร์ออกไซด์ ( $\text{O}_2^-$ ) เพื่อป้องกันไม่ให้เซลล์เกิดออกซิเดชัน ( $2\text{O}_2^- + 2\text{H}^+ \rightarrow \text{H}_2\text{O}_2 + \text{O}_2$ )
Aldolase	เร่งปฏิกิริยาเปลี่ยน fructose 1,6 bisphosphate เป็น glyceraldehyde-3-phosphate และ dihydroxyacetone phosphate ในกระบวนการ glycolysis
DNA polymerase	เร่งปฏิกิริยาการต่อสาย DNA ในกระบวนการ DNA replication
RNA polymerase	เร่งปฏิกิริยาการต่อสาย RNA ในกระบวนการ transcription
Transcarboxylase	เร่งปฏิกิริยาย้ายหมู่คาร์บอกซิล
Carboxypeptidase A	เร่งปฏิกิริยาการสลายพันธะเพปไทด์จากด้านปลายสุดที่มีหมู่คาร์บอกซิล (C-terminal) ของกรดอะมิโน
Pyruvate carboxylase	เร่งปฏิกิริยาดึงเอาหมู่คาร์บอกซิลออกจากกรดคีโทให้เป็นแอลดีไฮด์และแก๊สคาร์บอนไดออกไซด์
Alcohol dehydrogenase	เร่งปฏิกิริยาการย้ายไฮโดรเจนอะตอมไปยังตัวรับ เช่น $\text{NAD}^+$ หรือ NADP
Estrogen receptor	โปรตีนตัวรับฮอร์โมนเอสโตรเจน

ที่มา: Kendrick, M. J. (1992). *Metals in biological systems*: Ellis horwood Ltd.

แคดเมียมเป็นโลหะที่ไม่จำเป็น (non-essential metal) ในสัตว์โดยมีการศึกษาพบว่า แคดเมียมเป็นสารก่อมะเร็ง และก่อให้เกิดการเจริญที่ผิดปกติของเอ็มบริโอ ความเป็นพิษของแคดเมียมนั้นมีผลต่อสรีรวิทยาของสิ่งมีชีวิตทั้งในระยะสั้นและระยะยาว ในระยะยาวแคดเมียมก่อให้เกิดความผิดปกติในการเจริญเติบโต การสืบพันธุ์ ภูมิคุ้มกัน ฮอร์โมนและพฤติกรรมของสิ่งมีชีวิตในน้ำ (Shuhaimi-Othman, Nadzifah, Umirah, & Ahmad, 2012)

นอกจากนี้ความผิดปกติของสิ่งมีชีวิตในน้ำยังสามารถตรวจสอบได้จากการเปลี่ยนแปลงพยาธิสภาพต่าง ๆ เช่น เหงือก ตับ และไตของปลา รวมทั้งเหงือกของสัตว์ไม่มีกระดูกสันหลังในน้ำอีกด้วย สำหรับความเป็นพิษของแคดเมียมต่อการส่งสัญญาณประสาทคาดว่าเกิดขึ้นจากการที่แคดเมียมเข้าจับกับโปรตีนตัวรับอะซิติลโคลีน ทำให้โปรตีนตัวรับไม่สามารถรับสัญญาณจากสารสื่อประสาทอะซิติลโคลีนได้ โดยตำแหน่งที่คาดว่าแคดเมียมจะเข้าจับกับโปรตีนตัวรับอะซิติลโคลีนได้คือตำแหน่งของ Cys-loop ที่บริเวณ extracellular domain

ตาราง 11 รายงานการศึกษาความเป็นพิษของแคดเมียมต่อสิ่งมีชีวิตในกลุ่ม Oligochaetes

สิ่งมีชีวิต	การประเมินความเป็นพิษ LC <sub>50</sub> (95% CI)	ผู้วิจัย
<i>T. tubifex</i>	4.9 mg L <sup>-1</sup> ที่เวลา 24 ชั่วโมง	Gerhardt (2009)
<i>T. tubifex</i>	0.03 mg L <sup>-1</sup> ที่เวลา 96 ชั่วโมง	Bouché et al. (2000)
<i>Branchiura sowerbyi</i>	15.89 mg L <sup>-1</sup> (10.78–20.82) ที่เวลา 96 ชั่วโมง	Dhara, Mukherjee, and Saha (2015)
<i>Nais elinguis</i>	158 µg L <sup>-1</sup> (97-278) ที่ 24 ชั่วโมง 94 µg L <sup>-1</sup> (56-153) ที่ 48 ชั่วโมง	Shuhaimi-Othman et al. (2012)

จากการศึกษาวิจัยที่เกี่ยวข้องกับความเป็นพิษของแคดเมียม Bouché et al. (2000) ได้รายงานค่า LC<sub>50</sub> ของแคดเมียมต่อไส้เดือนน้ำที่ 96 ชั่วโมงไว้ที่ 0.03 มิลลิกรัมต่อลิตร ส่วน Gerhardt (2009) ได้รายงานค่า LC<sub>50</sub> ของแคดเมียมต่อไส้เดือนน้ำที่ 24 ชั่วโมงไว้ที่ 4.9 มิลลิกรัมต่อลิตร นอกจากนี้ผู้วิจัยยังได้ทำการศึกษาการเปลี่ยนแปลงพฤติกรรมของไส้เดือนน้ำจากความเป็นพิษของแคดเมียมและพบว่าค่า EC<sub>50</sub> ของไส้เดือนน้ำเมื่อใช้พฤติกรรมด้านการเคลื่อนที่เป็นเกณฑ์มีค่าอยู่ที่ 1.1 มิลลิกรัมต่อลิตร นอกจากนี้แคดเมียมยังมีความเป็นพิษต่อไส้เดือนน้ำโดยกระตุ้นให้เกิดการสลัดส่วนท้ายลำตัว (autotomy) ยับยั้งการสร้างกล้ามเนื้อ (muscle regeneration) และพบการสะสมแคดเมียมในร่างกายของไส้เดือนน้ำ (Bouché et al., 2000) ซึ่งสนับสนุนผลการวิจัยของ Back (1990) ที่ได้รายงานไว้ว่าแคดเมียมเป็นโลหะหนักที่มีความสามารถในการแทรกซึมเข้าสู่เนื้อเยื่อชั้นผิวหนังของไส้เดือนน้ำได้มากที่สุด ทั้งนี้ผู้วิจัยยัง

คาดการณ์ว่าการสะสมของแคดเมียมในไส้เดือนน้ำอาจส่งผลกระทบต่อให้เกิดการสะสมสารพิษในสิ่งมีชีวิตที่อยู่ในห่วงโซ่อาหารที่สูงขึ้นด้วย (Bouché et al., 2000) จากรายงานการศึกษาของ Liang et al. (2011) พบว่าความเป็นพิษของโลหะหนักมีส่งผลกระทบต่อความสามารถในการเจริญเติบโตและการสืบพันธุ์ของไส้เดือนดิน ทำให้ DNA เสียหาย เกิดพยาธิสภาพเนื้อเยื่อ และก่อให้เกิดความผิดปกติของการแบ่งเซลล์การทำงานของเอนไซม์ และพบว่าแคดเมียมเป็นโลหะหนักที่ก่อความเป็นพิษรุนแรงต่อไส้เดือนดินมากที่สุดทำให้เกิดการลดจำนวนของประชากรไส้เดือนดินในแหล่งที่มีการปนเปื้อนอย่างรวดเร็ว

### การวิเคราะห์ปริมาณโลหะหนัก

เทคนิคในการวิเคราะห์ปริมาณธาตุต่าง ๆ โดยใช้เครื่อง Inductively Coupled Plasma Atomic Emission Spectroscopy (ICP-AES) เป็นเครื่องมือที่สามารถวิเคราะห์ปริมาณธาตุโลหะได้พร้อมกันหลายชนิดในครั้งเดียวกัน ซึ่งเนื่องจากเทคนิคนี้สามารถนำไปใช้วิเคราะห์ธาตุต่าง ๆ ได้ทั้งโลหะและอโลหะอย่างรวดเร็ว สามารถวิเคราะห์ตัวอย่างที่มีปริมาณธาตุความเข้มข้นสูงไปจนถึงระดับความเข้มข้นต่ำ (trace elements) ได้อย่างดีและแทบทุกชนิดของตัวอย่าง ทำให้เทคนิคนี้ได้รับความนิยมในการวิเคราะห์ตัวอย่างจากสิ่งมีชีวิตทั้งส่วนที่เป็นตัวอย่างเนื้อเยื่อและตัวอย่างของเหลวจากร่างกาย

#### 1. ลักษณะเฉพาะของเครื่อง ICP

1.1 ให้อุณหภูมิสูงถึงประมาณ 10,000 เคลวิน

1.2 สารตัวอย่างที่จะนำมาวิเคราะห์สามารถอยู่ในพลาสมาได้นานพอ โดยทั่วไปจะอยู่ได้นานถึง 2 – 3 มิลลิวินาทีทำให้สารตัวอย่างสามารถแตกตัวเป็นอะตอมได้อย่างมีประสิทธิภาพ

1.3 Matrix และ interelement effects มีน้อยโดยเฉพาะเมื่ออยู่ในบรรยากาศของแก๊สเฉื่อยทำให้อะตอมอิสระที่เกิดขึ้นในพลาสมามี life time ที่ยาวขึ้น

1.4 ในกรณีที่ใช้แก๊สอาร์กอนพบว่าให้ความหนาแน่นของอิเล็กตรอนสูง และใส่สารที่ไอออนไนส์ได้ง่ายก็จะมีผลต่อจำนวนอิเล็กตรอนที่เกิดขึ้น ดังนั้นการแทรกสอดที่เกิดจากการไอออนไนเซชันจะมีผลกระทบน้อย

1.5 Molecular species มีโอกาสเกิดน้อยหรือไม่เกิดเลยเพราะอุณหภูมิที่สูง ทำให้ลดการเกิดฟลูออเรสเซนซ์และ self-absorption

1.6 แก๊สที่ใช้เป็นแก๊สเฉื่อยจึงไม่มีการระเบิดเกิดขึ้น

1.7 ไม่ต้องใช้ขั้วไฟฟ้า

## 2. หลักการทำงานของเครื่อง ICP

การทำงานของเครื่อง ICP เริ่มต้นจากการปล่อยแก๊สอาร์กอนเข้าไปในคอบ (torch) ซึ่งประกอบด้วยหลอดที่ทำด้วยควอตซ์ ที่ปลายคอบจะเป็นท่อกลวงที่มีทองแดงพันรอบอยู่เรียกว่า load coil โดย coil นี้จะต่อเข้ากับเครื่องส่งความถี่วิทยุ (radio frequency generator, RF generator) เมื่อส่งความถี่วิทยุเข้าสู่ load coil จะทำให้เกิดการสั่นสะเทือนโดยส่วนมากจะใช้ความถี่ที่ 27 หรือ 40 เมกะเฮิร์ตซ์ เมื่อมีการสั่นสะเทือนจะทำให้เกิดสนามแม่เหล็กขึ้นรอบปลายคอบซึ่งทำให้เกิดกระแสเอ็ดดี้ไหลผ่านตัวนำและทำให้ตัวนำเกิดความร้อนขึ้น จากนั้นเมื่อปล่อยแก๊สอาร์กอนเข้าไปในหลอดควอตซ์แล้วจะใช้แท่งเทสลาในการทำให้เกิดการปล่อยประจุไฟฟ้าเพื่อทำให้แก๊สอาร์กอนเกิดไอออนไนส์ได้อิเล็กตรอนขึ้น สนามแม่เหล็กจะช่วยเร่งให้อิเล็กตรอนที่แตกตัวจากอาร์กอนให้เคลื่อนที่เร็วขึ้น อิเล็กตรอนมีพลังงานเพิ่มมากขึ้น เรียกกระบวนการนี้ว่าเกิด inductive coupling อิเล็กตรอนที่มีพลังงานสูง จะเกิดการชนกับอะตอมของแก๊สอาร์กอนอะตอมอื่นต่อ ๆ ไปและเกิดเป็นปฏิกิริยาถูกใช้จนกลายเป็นพลาสมา จึงเรียกว่า inductive coupled plasma หรือ ICP ทั้งนี้การปล่อยประจุจากพลาสมาจะให้ความร้อนที่อุณหภูมิประมาณ 1,000 – 10,000 เคลวิน และมีความเสถียรดีเมื่อใช้กำลังไฟฟ้า 1 – 2 กิโลวัตต์ โดยองค์ประกอบสำคัญของเครื่อง ICP-AES ประกอบด้วย

2.1 Plasma generation systems ประกอบด้วยส่วนย่อย คือ ส่วนที่เป็น power supplies, Radio frequency generator

2.2 Gas control systems เป็นส่วนที่จะ supply gases ให้กับ ICP torch, nebulizer, optic pulse และ  $O_2$  gas ในกรณีใช้สารอินทรีย์เป็นตัวทำละลาย

2.3 Sample introduction system เป็นส่วนที่จะนำสารละลายตัวอย่างที่เป็นเนื้อเดียวกันส่งเข้าไปในพลาสมาซึ่งประกอบด้วย peristaltic pump, spray chamber หรือ nebulizer

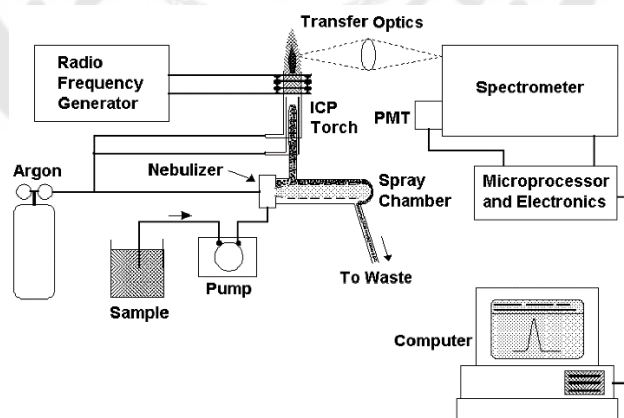
2.4 Optical system ประกอบด้วย monochromator หรือ polychromator ซึ่งเป็น grating หรือ echelle grating window slits, mirrors และ detector



2.5 Data acquisition and communications เป็นส่วนของ electronics ที่ใช้เปลี่ยนค่าของกระแสที่ได้จาก detector และส่งข้อมูลที่รวบรวมเข้า data processing ของเครื่องคอมพิวเตอร์และหน่วยนี้ยังเป็นส่วนที่ใช้ควบคุมการทำงานของเครื่องด้วย

### 3. หลักการของเทคนิค Atomic emission spectroscopy (AES)

เทคนิค AES อาศัยหลักการ คือ อะตอมของธาตุแต่ละธาตุประกอบด้วยนิวเคลียสเป็นศูนย์กลางโดยมีอิเล็กตรอนอยู่โดยรอบ หากมีการให้พลังงานถ่ายเทเข้าสู่อะตอมจำนวนมาก เช่น การให้พลังงานความร้อน หรือคลื่นแม่เหล็กไฟฟ้าพลังงานสูง พลังงานเหล่านี้จะกระตุ้นให้อิเล็กตรอนในอะตอมเปลี่ยนสภาพจากที่เคยอยู่ในสภาวะพื้น (ground state) เข้าสู่ช่วงระดับพลังงานสูง (excited state) กระบวนการนี้เรียกว่า atomic absorption อย่างไรก็ตามอิเล็กตรอนไม่สามารถอยู่ในระดับสภาวะพลังงานสูงได้นาน ดังนั้นอิเล็กตรอนจะคายพลังงานออกมาเพื่อกลับเข้าสู่สภาวะพื้นหรือกลับเข้าสู่สภาวะพลังงานกระตุ้นระดับต่ำกว่า พลังงานที่คายออกมาจะเป็นรังสีคลื่นแม่เหล็กไฟฟ้าในช่วงสเปกตรัมต่าง ๆ โดยธาตุที่ถูกกระตุ้นแต่ละชนิดจะปล่อยสเปกตรัมที่มีความยาวคลื่นเฉพาะของแต่ละธาตุออกมา รังสีคลื่นแม่เหล็กไฟฟ้าในช่วงสเปกตรัมต่าง ๆ จะถูกสะท้อนด้วยกระจกและปริซึมเพื่อแยกความยาวคลื่นที่แตกต่างกัน ก่อนไปกระทบยัง detector และประมวลผลความเข้มของรังสีคลื่นแม่เหล็กไฟฟ้าเป็นปริมาณของธาตุที่ต้องการ



ภาพประกอบ 9 หลักการทำงานของเครื่อง inductively coupled plasma spectroscopy

ที่มา: Charles, B., & Fredeen, K. J. (1997). *Concepts, instrumentation and techniques in inductively coupled plasma optical emission spectrometry*. Perkin Elmer Corporation.



ตาราง 12 สภาวะเหมาะสมสำหรับการตรวจวัดปริมาณแคดเมียมด้วยเครื่อง inductively coupled plasma spectroscopy

Conditions	
Torch view	Axial
RF Power	1200 Watt
Plasma gas flow rate	18 L min <sup>-1</sup>
Auxiliary gas flow rate	0 L min <sup>-1</sup>
Nebulizer gas pressure <sup>a</sup>	30 psi
Peristaltic pump flow rate	1.5 mL min <sup>-1</sup>
Detector integration time	10 seconds
Number of integrations per solution	3
Wavelengths	228.802 nm

<sup>a</sup> Concentric glass 2 mL min<sup>-1</sup> nebulizer connected to cyclonic double pass spray chamber

ที่มา: John, C. (2010). *Inductively coupled plasmaatomic Emission spectrometric Determination of cadmium and Lead extracted from ceramic Foodware*. Retrieved from [https://www.fda.gov/downloads/Food/FoodScienceResearch/Laboratory Methods/UCM479979.pdf](https://www.fda.gov/downloads/Food/FoodScienceResearch/LaboratoryMethods/UCM479979.pdf)

## ไส้เดือนน้ำ

### ลักษณะทั่วไปของไส้เดือนน้ำ

ไส้เดือนน้ำ (*T. tubifex*) เป็นสิ่งมีชีวิตไม่มีกระดูกสันหลังในกลุ่มหนอนปล้องชนิดหนึ่งอยู่ในวงศ์ Naididae สกุล *Tubifex* สามารถพบได้ทั่วไปตามระบบนิเวศแหล่งน้ำจืด ทั้งบริเวณตะกอนใต้พื้นน้ำและเกาะอยู่ตามพืชน้ำ (Crottini, Marotta, Barbuto, Casiraghi, & Ferraguti, 2008; Milbrink, 1980) ในประเทศไทยมีรายงานการพบไส้เดือนน้ำกระจายอยู่ทั่วทุกภูมิภาคของประเทศ (Sakset et al., 2012) ไส้เดือนน้ำมีลักษณะพื้นฐานวิทยาศาสตร์ที่สำคัญคือ ตัวเต็มวัยมีขนาดประมาณ 1 นิ้ว เส้นผ่านศูนย์กลางลำตัวประมาณ 1 มิลลิเมตร (Dixon, 1915; Timm, 1996) มีสีส้มถึงแดงอ่อนจากสีของ erythrocrucorin ซึ่งเป็นรงควัตถุที่ช่วยในการลำเลียงออกซิเจนในระบบ

หมูนเวียนเลือด นอกจากนี้ไส้เดือนน้ำมีชั้นผิวหนัง (epidermis) ที่ใสสามารถมองเห็นอวัยวะภายใน ทางเดินอาหารและหลอดเลือดได้ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ ลำตัวของไส้เดือนน้ำไม่มีพาราโพเดียม (parapodium) แต่มีซีตี่ (setae) โดยที่ซีตี่มีลักษณะยาวออกมาจากลำตัวและที่ปลายแยกออกเป็นเป็นสองแฉก ที่โคนซีตี่มีถุงซีตี่ (setae sac) ที่สร้างซีตี่ออกมาเป็นกลุ่ม 4 กลุ่ม อยู่ที่ด้านข้างของท้อง 2 – 4 กลุ่ม อาจมีที่ด้านข้างของหลังอีก 2 กลุ่ม ไส้เดือนน้ำไม่มีส่วนของเหงือกที่ชัดเจนดังนั้นจึงอาศัยการแพร่ของแก๊สและสารเคมีผ่านทางผิวหนัง โดยบริเวณที่มีการแลกเปลี่ยนแก๊สและสารเคมีมากที่สุดคือบริเวณของส่วนหางที่มีชั้นเนื้อเยื่อบางกว่าส่วนหัว ทั้งนี้ไส้เดือนน้ำมักจะสลับส่วนหางอยู่ตลอดเวลาเพื่อช่วยในการแลกเปลี่ยนแก๊สและสารเคมีอื่นให้มีประสิทธิภาพมากขึ้น



ภาพประกอบ 10 ไส้เดือนน้ำ (*T. tubifex*)

### การจัดอนุกรมวิธานของไส้เดือนน้ำ

ชื่อไทย ไส้เดือนน้ำ

ชื่อสามัญ Tubifex worms, sludge worm, sewage worm

อนุกรมวิธาน

Phylum Annelida

Class Clitellata

Order Oligochaeta

Family Tubificidae

Genus *Tubifex*

Species *Tubifex tubifex* (Müller, 1774)

### วงชีวิตและการสืบพันธุ์ของไส้เดือนน้ำ

วงชีวิตของไส้เดือนน้ำสามารถแบ่งได้เป็น 4 ระยะคือ ระยะโคคอน (cocoon) ระยะตัวอ่อน ระยะวัยเจริญพันธุ์และระยะหลังวัยเจริญพันธุ์ (Bonomi & Di Cola, 1980) โดยไข่ที่ได้รับการปฏิสนธิจะเจริญในโคคอนที่ปล่อยออกมาจากไคลเทลลัม (clitellum) ในหนึ่งโคคอน อาจจะมีไข่ตั้งแต่ 3 – 5 ฟอง ตัวอ่อนที่ออกจากไข่จะพัฒนาเป็นวัยเจริญพันธุ์ที่มีการพัฒนาของไคลเทลลัมและอวัยวะสืบพันธุ์ที่สมบูรณ์ และจะสืบพันธุ์แบบอาศัยเพียงหนึ่งครั้งต่อปี ทั้งนี้จำนวนครั้งและความถี่ในการวางไข่อาจจะแตกต่างกันไปในแต่ละสภาพแวดล้อม (Adreani & Bonomi, 1978) โดยพบว่าในระยะสุดท้ายของวงชีวิตเมื่อไส้เดือนน้ำไม่มีการสืบพันธุ์แบบอาศัยเพศ การเพิ่มจำนวนของไส้เดือนน้ำจะเกิดจากการขาดออกเป็นท่อน (fragmentation) ซึ่งแต่ละท่อนสามารถเกิดการงอกใหม่ (regeneration) ได้ จากความสามารถนี้เป็นสาเหตุสำคัญที่ทำให้ไส้เดือนน้ำมีความทนทานสูง เนื่องจากเมื่อไส้เดือนน้ำได้รับสารพิษหรือเกิดการระคายเคือง ไส้เดือนน้ำจะสลัดส่วนหาง ซึ่งเป็นบริเวณที่มีโอกาสได้รับสารพิษมากที่สุดทิ้งออกไป

### สรีรวิทยาของไส้เดือนน้ำ

ไส้เดือนน้ำเป็นสิ่งมีชีวิตในกลุ่มหนอนปล้องมีระบบทางเดินอาหารสมบูรณ์โดยด้านหน้ามีช่องปากที่อยู่ในส่วนหน้าสุดของลำตัวเรียกว่า prostomium และมีรูทวารอยู่ที่ปล้องทางด้านปลายสุดของลำตัว (pygidium) โดยทางเดินอาหารสามารถแบ่งได้ออกเป็นส่วนๆ คือส่วนของปากที่เชื่อมต่อกับส่วนของคอหอยในปล้องที่ 2 – 3 ซึ่งส่วนของคอหอยมีลักษณะเป็นชั้นกล้ามเนื้อหนาเปิดออกสู่หลอดอาหารในปล้องที่ 4 - 5 บริเวณหลอดอาหารจะมีต่อม pharyngeal glands ที่ทำหน้าที่หลั่งน้ำย่อย ระบบหมุนเวียนเลือดของไส้เดือนน้ำเป็นระบบปิด ประกอบด้วยหลอดเลือดสำคัญ 2 หลอดเลือดขนานไปกับลำตัวของไส้เดือนน้ำและแตกแขนงออกเป็นหลอดเลือดฝอยในแต่ละปล้อง การบีบตัวของหลอดเลือดจะเกิดจากการการเคลื่อนไหวของไส้เดือนน้ำ และแรงที่เกิดจากการบีบตัวของหัวใจเทียมที่บริเวณส่วนหัว (Dixon, 1915) ระบบประสาทของไส้เดือนน้ำมีส่วนของปมประสาทที่มีลักษณะคล้ายสมองอยู่ใกล้กับบริเวณของ prostomium สามารถแบ่งออกได้หลายพู่ แต่ละพู่ประกอบด้วยเซลล์ประสาทและเส้นใยประสาทจำนวนมาก โดยปมประสาทแรกของไส้เดือนน้ำตั้งอยู่ใต้ส่วนของคอหอย (sub-pharyngeal ganglion) และมีแขนงทอดยาวไปตลอดลำตัวตั้งแต่ปล้องที่สองจนถึงปล้องสุดท้ายของลำตัว (Dixon, 1915)

## หน้าที่เชิงระบบนิเวศของไส้เดือนน้ำ

ไส้เดือนน้ำจัดเป็นสัตว์พื้นท้องน้ำ (benthic fauna) เนื่องจากอาศัยและสืบคลานหาอาหารตามผิวหน้าดินในแหล่งน้ำจืด มีหน้าที่เป็นผู้ย่อยสลายในระบบนิเวศโดยย่อยสลายเศษอินทรีย์และจุลินทรีย์เป็นอาหาร มีความสำคัญในการเกิดการหมุนเวียนของกระแสน้ำ พร้อมกับเพิ่มการไหลเวียนของออกซิเจนในพื้นที่น้ำจืดและยังเป็นแหล่งอาหารที่สำคัญของสิ่งมีชีวิตที่อยู่ในระบบนิเวศน้ำจืดโดยเฉพาะปลา (Welsch, 1952) ไส้เดือนน้ำเป็นสิ่งมีชีวิตที่มีความทนทานที่สูง สามารถอาศัยในน้ำจืดได้ทุกสภาพทั้งบริเวณน้ำตื้นและทะเลสาบลึก ไส้เดือนน้ำที่พบในแหล่งน้ำจืดมักมีขนาดเล็ก บางชนิดฝังตัวอยู่ในโคลนตม บางชนิดอาศัยเกาะอยู่ตามลำต้นหรือรากพืชที่แช่อยู่ในน้ำ นอกจากนี้ไส้เดือนน้ำยังเป็นสิ่งมีชีวิตที่เป็นตัวแทนที่ดีในการประเมินความเป็นพิษของแหล่งน้ำเนื่องจากความสามารถในการทนทานความเป็นพิษที่สูง พบได้ทั่วไปในแหล่งน้ำจืด และสามารถเพาะเลี้ยงได้ง่ายในห้องปฏิบัติการ (Bettinetti, Giarei, & Provini, 2003; Chapman, 2001; Fargašová, 1997; Özdemir, Şen, & Duran, 2006; Pasteris, Vecchi, Reynoldson, & Bonomi, 2003; Reynoldson, 1994)

จากการรวบรวมและศึกษาเอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้องทั้งหมดทำให้สามารถกำหนดแนวทางการทดสอบความเป็นพิษเฉียบพลันเชิงเดี่ยวและความเป็นพิษร่วมของ imidacloprid และแคดเมียมที่มีต่อไส้เดือนน้ำด้วยวิธีชีววิเคราะห์ในห้องปฏิบัติการเพื่อให้ทราบถึงค่า  $LC_{50}$  ที่ระยะเวลา 24 และ 48 ชั่วโมง และทำการเปรียบเทียบ และบรรยายผลจากความ เป็นพิษเฉียบพลันเชิงเดี่ยวและความเป็นพิษร่วมของ imidacloprid และแคดเมียมต่อการเปลี่ยนแปลงทางพยาธิสภาพเปรียบเทียบ การเปลี่ยนแปลงกิจกรรมของเอนไซม์อะซิติลโคลีนเอสเทอเรส และระดับการสะสมแคดเมียมในไส้เดือนน้ำโดยใช้ระดับความเข้มข้นของ imidacloprid และแคดเมียมในระดับต่ำกว่า ค่า  $LC_{50}$  ที่ระยะเวลา 24 และ 48 ชั่วโมงเพื่อใช้เป็นแนวทางการประเมินความเสี่ยงของ imidacloprid และแคดเมียมที่ปนเปื้อนในระบบนิเวศแหล่งน้ำจืดต่อไป

### บทที่ 3 วิธีดำเนินการวิจัย

#### วัสดุ อุปกรณ์ สารเคมี และเครื่องมือ

##### วัสดุ อุปกรณ์

วัสดุ อุปกรณ์	ยี่ห้อ
ขวดแก้ว 3 มิลลิลิตร	ตั้งชุมชนฮวด
บีกเกอร์ (beaker) 20 – 500 มิลลิลิตร	Pyrex
จานเพาะเชื้อ (Petri dish) 25 x 25 เซนติเมตร	Pyrex
หลอดทดลอง 12 x 75 เซนติเมตร	Pyrex
ฟุ้งกัน เบอร์ 6	Masterart
กระจกสไลด์ 26 x 76 มิลลิเมตร	Citolus
แผ่นปิดสไลด์ 22 x 22 มิลลิเมตร	Menzel-glaser
คิวเวต (cuvette)	VWR
ไมโครปิเปต (micropipette) 10 – 1,000 มิลลิลิตร	Gilson

##### เครื่องมือ

เครื่องมือ	ยี่ห้อ	รุ่น
กล้องจุลทรรศน์ใช้แสงแบบธรรมดา	Leica	DM750
กล้องจุลทรรศน์ใช้แสงแบบสเตอริโอ	Leica	MZ6
เครื่องชั่งดิจิทัล (analytical balances)	Satorius	ED224S
เครื่องปั่นเหวี่ยง (centrifuge)	Benchmark	LC-8
เครื่องวัดการดูดกลืนแสงยูวี (UV-spectrophotometer)	Shimadzu	UV-1800
เครื่องวัดความเป็นกรดต่าง (pH meter)	Extech instrument	PH100
เครื่องวัดออกซิเจนที่ละลายน้ำ (oxygen meter)	AMTAST	AMT08
เครื่อง ICP-AES	Thermo Fisher scientific	iCAP6500
ตู้อบลมร้อน (hot oven)	Memmert	VO200
เครื่องให้ความร้อน (hot plate)	Nuova	SP18420
เครื่องสอโมจีไนเซอร์ (homogenizer)	Mastech	MA-30DL
เครื่องตัดชิ้นเนื้อ (microtome)	Leica	RM2135

### สารเคมี

สารเคมี	ยี่ห้อ
Imidacloprid (analytical standard)	Sigma-aldrich
Bouin's fixative	Bio-optica
Xylene	RCI labscan
Paraplast	Surgipath
Hematoxylin	Sigma-aldrich
Eosin	Sigma-aldrich
Ethyl alcohol	Merck
Nitric acid	Merck
HCl	Merck
Permout	Sigma-aldrich
5, 5' dithiobis-2-nitrobenzoic acid (DTNB)	Sigma-aldrich
Acetylthiocholine iodide	Sigma-aldrich
$\text{Cd}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ (98%)	Sigma-aldrich
NaOH	Sigma-aldrich
NaCl	Sigma-aldrich
KCl	Sigma-aldrich
$\text{KH}_2\text{PO}_4$	Univar
$\text{Na}_2\text{HPO}_4$	Univar

### วิธีการทดลอง

#### การเตรียมสัตว์ทดลอง

ไส้เดือนน้ำ (*Tubifex tubifex* Müller, 1774) ที่ได้จากฟาร์มเอกชนแห่งหนึ่งในกรุงเทพฯ ทำการระบุยีนชนิดโดยยึดตามคู่มือการระบุชนิดหนอนปล้องในน้ำของ Brinkhurst (1971) เพาะเลี้ยงในน้ำประปาปราศจากคลอรีนโดยเปลี่ยนน้ำทุก 24 ชั่วโมง และให้อาหารปลาบดละเอียดละลายน้ำสัปดาห์ละ 1 ครั้ง นับจำนวนไส้เดือนน้ำเตรียมใส่ภาชนะทดลองอย่างเบามือ

### การศึกษาความเป็นพิษ

ทดสอบเพื่อหาช่วงความเข้มข้นสูงสุดที่ไม่ทำให้สัตว์ทดลองตายและความเข้มข้นต่ำที่สุดที่ทำให้สัตว์ทดลองตายทั้งหมดเพื่อใช้กำหนดช่วงความเข้มข้น จากนั้นทดสอบความเป็นพิษเชิงเดี่ยวของ imidacloprid และแคดเมียมต่อไส้เดือนน้ำโดยเตรียมสารละลายให้มีความเข้มข้น 5 ระดับจากสารละลายเข้มข้น 1000 มิลลิกรัมต่อลิตร แต่ละความเข้มข้นใช้ไส้เดือนน้ำ 30 ตัว ในน้ำ 20 มิลลิลิตร ทำการทดลอง 3 ซ้ำและตรวจสอบคุณภาพน้ำโดยวัดอุณหภูมิ ความเป็นกรดต่าง และปริมาณออกซิเจนที่ละลายน้ำเมื่อเริ่มต้นและสิ้นสุดการทดลอง บันทึกการตายของไส้เดือนน้ำที่ 24 และ 48 ชั่วโมง ใช้เกณฑ์พิจารณาการตายของไส้เดือนน้ำโดยใช้การแตะที่ส่วนหัวของไส้เดือนน้ำ หากไม่มีการตอบสนองภายใน 10 วินาทีถือว่าสัตว์ทดลองไม่มีชีวิตแล้ว (American Public Health Association, American Water Works Association, Water Pollution Control Federation, & Water Environment Federation, 1915) ในการทดสอบความเป็นพิษร่วมของ imidacloprid และแคดเมียมต่อไส้เดือนน้ำ ทำการผสม imidacloprid และแคดเมียมในอัตราส่วน 1 ต่อ 1 โดยเลือกใช้สารที่มีความเป็นพิษสูงสุดเป็นสารกำหนดความเข้มข้นและทำการทดลองเหมือนกับการทดสอบความเป็นพิษเชิงเดี่ยว

### การวิเคราะห์ความเป็นพิษร่วมของ imidacloprid และแคดเมียม

วิเคราะห์ความเป็นพิษร่วมของสารพิษโดยใช้วิธี Marking's additive index method (Marking, 1977) โดยทำการวิเคราะห์กิจกรรมทางชีววิทยา (biological activity) ตามสมการที่ 2 และดัชนีการส่งเสริมการทำงาน (additive index, AI) โดยพิจารณาจากค่ากิจกรรมทางชีววิทยา หากค่ากิจกรรมทางชีววิทยามีค่าน้อยกว่า 1 คำนวณตามสมการที่ 3.1 และหากค่ากิจกรรมทางชีววิทยามีค่ามากกว่าหรือเท่ากับ 1 คำนวณตามสมการที่ 3.2

$$S = \frac{A_m}{A_i} + \frac{B_m}{B_i} \dots (2)$$

$$AI = \left(\frac{1}{S}\right) - 1; S < 1 \dots (3.1) \text{ หรือ}$$

$$AI = 1 - S; S < 1 \dots (3.2)$$



เมื่อ S แทน กิจกรรมทางชีววิทยา (biological activity) ของสารเคมี A และ B  
 $A_m$  แทน ค่า  $LC_{50}$  ของสาร A เมื่อมีสาร B ผสม  
 $A_i$  แทน ค่า  $LC_{50}$  ของสารเคมี A  
 $B_m$  แทน ค่า  $LC_{50}$  ของสาร B เมื่อมีสาร A ผสม  
 $B_i$  แทน ค่า  $LC_{50}$  ของสารเคมี B  
 AI แทน ค่าดัชนีการส่งเสริมการทำงาน ซึ่งแปลผลค่าดัชนีการส่งเสริมการทำงานตามเกณฑ์ของ Wang et al. (2018) ดังนี้

ค่า $AI \leq -0.2$	หมายถึง ผลการออกฤทธิ์แบบยับยั้ง (antagonistic effect)
ค่า $-0.2 < AI < 0.25$	หมายถึง ผลการออกฤทธิ์แบบเพิ่มฤทธิ์ (additive effect)
ค่า $AI \geq 0.25$	หมายถึง ผลการออกฤทธิ์แบบเสริมฤทธิ์ (synergistic effect)

### การศึกษาระดับการสะสมของแคดเมียม

#### 1. การเตรียมตัวอย่าง

เตรียมหลอดพลาสติกโพลีโพรพิลีนที่ผ่านการฆ่ากรดไนตริกความเข้มข้น 10 เปอร์เซ็นต์ อย่างน้อย 24 ชั่วโมง ล้างด้วยน้ำกลั่นและน้ำปราศจากไอออนในการเก็บตัวอย่างน้ำที่ใช้ในการทดลองเมื่อเริ่มต้นและสิ้นสุดการทดลอง 100 มิลลิลิตร โดยทำการเก็บรักษาตัวอย่างด้วยการเติมกรดไนตริกเข้มข้นจนมีค่าความเป็นกรดต่างเท่ากับ 2 และเก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส จากนั้นเก็บตัวอย่างใส่เดือนน้ำที่ต้องการวิเคราะห์ปริมาณโลหะหนัก นำไปอบที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียสจนแห้ง ชั่งน้ำหนักให้ได้ 1 กรัม นำตัวอย่างใส่ขวดรูปชมพู่เติมกรดไนตริกเข้มข้น 20 มิลลิลิตร ร เก็บตัวอย่างใส่หลอดพลาสติกโพลีโพรพิลีนที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

#### 2. การตรวจสอบโลหะหนัก

ทำการวิเคราะห์หาปริมาณแคดเมียมในน้ำและใส่เดือนน้ำด้วยเครื่อง Inductively coupled plasma atomic emission spectroscopy, ICP-AES (Thermo Fisher scientific, iCAP6500)



## การศึกษาการเปลี่ยนแปลงพยาธิสภาพเนื้อเยื่อ

แช่ไส้เดือนน้ำในระดับความเข้มข้นของ imidacloprid แคดเมียม และสารผสม imidacloprid และแคดเมียมที่ระดับความเข้มข้น 0.2 และ 0.8 เท่าของค่า  $LC_{50}$  เป็นเวลา 24 และ 48 ชั่วโมงเพื่อศึกษาการเปลี่ยนแปลงพยาธิสภาพเนื้อเยื่อของไส้เดือนน้ำ (Humason, 1962) ในระดับที่ต่ำกว่าค่า  $LC_{50}$

### 1. ขั้นตอนการเตรียมเนื้อเยื่อ

ทำการเก็บรักษาเนื้อเยื่อไส้เดือนน้ำโดยแช่ในสารละลายคงสภาพเนื้อเยื่อ (Bouin's fixative) เป็นเวลา 24 ชั่วโมง เมื่อครบเวลาดังกล่าวประปาหลาย ๆ ครั้ง ทำการตัดแบ่งส่วนของไส้เดือนน้ำออกเป็น 3 ส่วนได้แก่ ส่วนหัวตั้งแต่ปลายด้านหน้า (anterior) จนถึงบริเวณท้ายสุดของโคลเทลลัม ส่วนลำตัวตั้งแต่ส่วนท้ายของโคลเทลลัมลงไปประมาณ 12 ปล้อง และส่วนหาง จากนั้นแช่ในแอลกอฮอล์ที่มีความเข้มข้น 50 เปอร์เซ็นต์ 30 นาที เปลี่ยนมาแช่ในแอลกอฮอล์ที่มีความเข้มข้น 70 เปอร์เซ็นต์ 1 ชั่วโมงหลาย ๆ ครั้งจนกระทั่งไม่มีสีเหลืองของ Bouin's fixative จากนั้นนำมาผ่านกระบวนการดองน้ำออกในแอลกอฮอล์ที่มีความเข้มข้นต่ำไปหาความเข้มข้นสูงโดยแช่ในแอลกอฮอล์ที่มีความเข้มข้น 95 เปอร์เซ็นต์และ 100 เปอร์เซ็นต์ 2 ครั้ง ครั้งละ 30 นาที เตรียมเนื้อเยื่อเพื่อเข้าสู่กระบวนการแทรกพาราพลาสติกโดยแช่เนื้อเยื่อในสารละลาย 1:1 ไซลีนผสมแอลกอฮอล์สัมบูรณ์ 15 นาที จากนั้นแช่ในไซลีน 2 ครั้ง ครั้งละ 30 นาที แช่ชิ้นเนื้อในสารละลาย 1:1 พาราพลาสติกผสมไซลีน 30 นาที ย้ายชิ้นเนื้อลงแช่ในพาราพลาสติก 2 ครั้ง จากนั้นทำการฝังเนื้อเยื่อในพาราพลาสติกและตัดเนื้อเยื่อด้วยเครื่องตัดเนื้อเยื่อให้มีความหนาประมาณ 10 ไมโครเมตร นำเนื้อเยื่อติดลงบนสไลด์ที่เคลือบด้วยเจลาตินที่ทิ้งไว้จนแห้ง แล้วนำไปวางบนแผ่นความร้อน 24 ชั่วโมง แล้วจึงนำสไลด์ไปย้อมสีด้วยสีฮีมาทอกซิดีนและสีอีโอซิน (Hematoxylin & Eosin)

### 2. ขั้นตอนการย้อมสีฮีมาทอกซิดีน-อีโอซิน

นำสไลด์ที่ติดแผ่นเนื้อเยื่อแล้ว แช่ในไซลีน 3 ครั้ง ครั้งละ 10 นาที จากนั้นเปลี่ยนมาแช่ 1:1 ไซลีนผสมแอลกอฮอล์สัมบูรณ์ 5 นาที แช่แอลกอฮอล์ที่มีความเข้มข้น 95, 90, 70 เปอร์เซ็นต์ ชั้นละ 5 นาที เปลี่ยนมาแช่ในน้ำประปา 3 นาที น้ำกลั่น 5 นาที ย้อมสีด้วยสีฮีมาทอกซิดีน 5 นาที ล้างด้วยน้ำประปาที่ไหลผ่านตลอดเวลา 3 นาที จุ่มลงในสารละลาย 0.05 เปอร์เซ็นต์ HCl 1 ครั้ง ล้างด้วยน้ำประปาที่ไหลผ่านตลอดเวลา 3 นาที จากนั้นจุ่มลงในสารละลาย 1

เปอร์เซ็นต์ NaOH และน้ำกลั่นอย่างละ 1 ครั้ง แช่แอลกอฮอล์ที่มีความเข้มข้น 70, 80, 90, 95 เปอร์เซ็นต์ชั้นละ 10 นาที ย้อมสีด้วยสีไอโอดีน 2 นาที จุ่มลงในแอลกอฮอล์ที่มีความเข้มข้น 95 เปอร์เซ็นต์ 2 นาที แล้วเปลี่ยนมาแช่ในแอลกอฮอล์สัมบูรณ์ 10 นาที แช่ในสารละลาย 1:1 ไชลีน ผสมแอลกอฮอล์สัมบูรณ์ 10 นาที แช่ในไชลีนอีก 3 ครั้ง ครั้งละ 10 นาที ปิดสไลด์ด้วยกระจกปิด สไลด์โดยใช้เปอร์เมทแล้วนำไปศึกษาภายใต้กล้องจุลทรรศน์ต่อไป

### การศึกษาการเปลี่ยนแปลงกิจกรรมของเอนไซม์อะซีทิลโคลีนเอสเทอเรส

เลี้ยงได้เดือนน้ำในระดับความเข้มข้นของ imidacloprid แคดเมียม และสารผสม imidacloprid และแคดเมียมที่ระดับความเข้มข้น 0.2 และ 0.8 เท่าของค่า  $LC_{50}$  เป็นเวลา 24 และ 48 ชั่วโมง เพื่อวิเคราะห์กิจกรรมของเอนไซม์อะซีทิลโคลีนเอสเทอเรสในเนื้อเยื่อสิ่งมีชีวิตโดย ดัดแปลงจากวิธีของ Ellman et al. (1961) และ Van Erp, Booth, Gooneratne, and O'Halloran (2002)

#### 1. ขั้นตอนการเตรียมเนื้อเยื่อ

เตรียมเนื้อเยื่อ 30 มิลลิกรัมเติมลงในหลอดทดลองที่มีโพแทสเซียมฟอสเฟต บัฟเฟอร์ (pH 7.5) 1.5 มิลลิลิตร บั่นให้ละเอียดโดยใช้โฮโมจีไนส์เซอร์เป็นเวลา 2 นาที แล้วจึงปั่น เหยียงสารละลายให้ตกตะกอนที่ 5000g ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 10 นาที จากนั้น เก็บสารละลายส่วนใส (supernatant) ไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียสตลอดเวลาก่อนการใช้งาน

#### 2. การวิเคราะห์ปริมาณโปรตีน

วิเคราะห์ปริมาณโปรตีนในเนื้อเยื่อของได้เดือนน้ำอ้างอิงตามวิธีของ Bradford (1976) โดยเตรียมสารละลายมาตรฐานโดยเจือจาง Bovine serum albumin 5 ความเข้มข้น ปริมาตร 0.1 มิลลิลิตรเติมลงในหลอดทดลองที่มีรีเอเจนต์เบรดฟอร์ด 5 มิลลิลิตร จากนั้นเตรียม รีเอเจนต์แบลงค์โดยใช้น้ำกลั่นแทนสารละลายมาตรฐาน ผสมให้เข้ากันทิ้งไว้ให้เกิดปฏิกิริยา สมบูรณ์เป็นเวลา 5 นาที จากนั้นเติมสารละลายมาตรฐานลงในคิวเวตและนำไปวัดค่าการดูดกลืน แสงที่ความยาวคลื่น 595 นาโนเมตร เขียนกราฟมาตรฐานระหว่างค่าการดูดกลืนแสงกับความ เข้มข้นของสารละลายมาตรฐาน จากนั้นวัดปริมาณโปรตีนจากตัวอย่างเนื้อเยื่อโดยเตรียม สารละลายตัวอย่างจากขั้นตอนการเตรียมเนื้อเยื่อปริมาตร 0.1 มิลลิลิตร เตรียมรีเอเจนต์แบลงค์ โดยใช้น้ำกลั่นแทนสารละลายตัวอย่าง ผสมให้เข้ากันโดยเครื่องผสมสารละลาย ตั้งทิ้งไว้ให้

เกิดปฏิกิริยาสมบูรณ์ 5 นาที เติมสารละลายตัวอย่างลงในคิวเวตและนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 595 นาโนเมตร หาความเข้มข้นของโปรตีนในสารละลายตัวอย่างเทียบจากกราฟมาตรฐาน

### 3. การวัดกิจกรรมของเอนไซม์อะซีทิลโคลีนเอสเทอเรส

เติมสารละลายโพแทสเซียมฟอสเฟตบัฟเฟอร์ (pH 7.5) ปริมาตร 1700 ไมโครลิตร สารละลายที่ได้จากขั้นตอนการเตรียมเนื้อเยื่อ 150 ไมโครลิตรและ DTNB 50 ไมโครลิตรลงในคิวเวต นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 412 นาโนเมตรและตั้งค่าให้เป็นศูนย์ จากนั้นนำคิวเวตออกจากเครื่องสเปกโตรโฟโตมิเตอร์ เติม acetylthiocholine iodine ความเข้มข้น 15 มิลลิโมลาร์ ปริมาตร 100 ไมโครลิตรลงในคิวเวต แล้วนำไปวัดค่าดูดกลืนแสงโดยวัดซ้ำทุก ๆ 15 วินาทีเป็นเวลา 5 นาที แล้วจึงนำค่าการดูดกลืนแสงที่ได้มาคำนวณความเข้มข้นของเอนไซม์อะซีทิลโคลีนเอสเทอเรสที่ถูกใช้ไปในปฏิกิริยา (C) และกิจกรรมของเอนไซม์อะซีทิลโคลีนเอสเทอเรสจากสมการที่ 4 และ 5 ตามลำดับ

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

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

- เมื่อ C หมายถึง ความเข้มข้นของเอนไซม์อะซีทิลโคลีนเอสเทอเรสที่ถูกใช้ไปในปฏิกิริยามีหน่วยเป็นโมลต่อลิตร
- $\Delta A_{412}$  หมายถึง ผลต่างของค่าการดูดกลืนแสงที่ 412 นาโนเมตรที่เวลา  $T_2 - T_1$  เมื่อ  $T_2$  และ  $T_1$  เลือกจากช่วงเวลาที่ค่าดูดกลืนแสงเพิ่มขึ้นคงที่มีหน่วยเป็นนาที
- $\epsilon$  หมายถึง ค่าการดูดกลืนแสงต่อโมลของสาร (extinction coefficient) มีค่า  $1.36 \times 10^4$  ต่อโมล.เซนติเมตร
- b หมายถึง ความยาวของแสงที่ผ่านสารละลาย (path length) มีหน่วยเป็นเซนติเมตร

$AChE_{activity}$	หมายถึง กิจกรรมของเอนไซม์อะซิติลโคลีนเอสเทอเรสที่มีหน่วยเป็นไมโครโมลต่อนาที.มิลลิกรัมโปรตีน
$T_2-T_1$	หมายถึง ผลต่างของเวลาเมื่อ $T_2$ และ $T_1$ เลื่อนจากช่วงเวลา ค่าดูดกลืนแสงเพิ่มขึ้นคงที่มีหน่วยเป็นนาที
$P$	หมายถึง ปริมาณโปรตีนจากตัวอย่างเนื้อเยื่อในหน่วยมิลลิกรัม

### การวิเคราะห์ข้อมูล

1. วิเคราะห์ความเข้มข้นของ imidacloprid และแคดเมียมที่ทำให้สัตว์ทดลองตาย 50 เปอร์เซ็นต์เมื่อเวลาผ่านไป 24 และ 48 ชั่วโมง (24, 48 hours- $LC_{50}$ ) และช่วงความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์โดยใช้การวิเคราะห์โพรบิท (Probit analysis)
2. ทดสอบความแตกต่างระหว่างค่าเฉลี่ยโดยการวิเคราะห์ความแปรปรวน (one-way ANOVA) ของกิจกรรมของเอนไซม์อะซิติลโคลีนเอสเทอเรสและเปรียบเทียบความแตกต่างระหว่างค่าเฉลี่ยรายคู่โดยใช้วิธี Bonferroni  $t$

## บทที่ 4

### ผลการดำเนินงานวิจัย

งานวิจัยนี้มีจุดประสงค์เพื่อประเมินความเป็นพิษเฉียบพลันเชิงเดี่ยวและความเป็นพิษร่วมของ imidacloprid และแคดเมียมต่อการเปลี่ยนแปลงทางพยาธิสภาพเนื้อเยื่อและกิจกรรมของเอนไซม์อะซิติลโคลีนเอสเทอเรสในไส้เดือนน้ำ (*Tubifex tubifex* Müller, 1774) โดยผู้วิจัยได้วางแผนการทดลองและวิเคราะห์ผลการทดลองดังต่อไปนี้

1. การประเมินระดับความเป็นพิษเฉียบพลันเชิงเดี่ยวและความเป็นพิษร่วมของ imidacloprid และแคดเมียมต่อไส้เดือนน้ำ
2. การประเมินความเป็นพิษเฉียบพลันของ imidacloprid และแคดเมียมต่อการเปลี่ยนแปลงทางพยาธิสภาพของไส้เดือนน้ำ
3. การประเมินความเป็นพิษเฉียบพลันของ imidacloprid และแคดเมียมต่อการเปลี่ยนแปลงกิจกรรมของเอนไซม์อะซิติลโคลีนเอสเทอเรสในไส้เดือนน้ำ
4. การประเมินระดับการสะสมแคดเมียมในไส้เดือนน้ำหลังได้รับแคดเมียมเป็นเวลา 24 และ 48 ชั่วโมง

#### การประเมินระดับความเป็นพิษเฉียบพลันเชิงเดี่ยวและความเป็นพิษร่วม

##### ผลการวิเคราะห์คุณภาพน้ำ

การตรวจวัดคุณภาพน้ำในการทดลองที่เวลา 24 ชั่วโมงพบว่า เมื่อเริ่มต้นการทดลอง อุณหภูมิของน้ำมีค่าเท่ากับ  $23.2 \pm 1.2$  องศาเซลเซียส เมื่อสิ้นสุดการทดลองมีค่าเท่ากับ  $23.5 \pm 0.3$  องศาเซลเซียส ค่าความเป็นกรดต่างเมื่อเริ่มต้นการทดลองเท่ากับ  $8.3 \pm 0.1$  เมื่อสิ้นสุดการทดลองเท่ากับ  $8.1 \pm 0.2$  ปริมาณออกซิเจนที่ละลายน้ำเมื่อเริ่มต้นการทดลองเท่ากับ  $5.5 \pm 0.4$  มิลลิกรัมต่อลิตร เมื่อสิ้นสุดการทดลองเท่ากับ  $5.2 \pm 0.9$  มิลลิกรัมต่อลิตร

การตรวจวัดคุณภาพน้ำในการทดลองที่เวลา 48 ชั่วโมงพบว่า เมื่อเริ่มต้นการทดลอง อุณหภูมิของน้ำมีค่าเท่ากับ  $23.6 \pm 1.5$  องศาเซลเซียส เมื่อสิ้นสุดการทดลองมีค่าเท่ากับ  $23.7 \pm 1.2$  องศาเซลเซียส ค่าความเป็นกรดต่างเมื่อเริ่มต้นการทดลองเท่ากับ  $8.3 \pm 0.1$  เมื่อสิ้นสุดการทดลองเท่ากับ  $8.3 \pm 0.2$  ปริมาณออกซิเจนที่ละลายน้ำเมื่อเริ่มต้นการทดลองเท่ากับ  $5.5 \pm 0.4$  มิลลิกรัมต่อลิตร เมื่อสิ้นสุดการทดลองเท่ากับ  $4.3 \pm 0.6$  มิลลิกรัมต่อลิตร

ตาราง 13 ผลการวิเคราะห์ค่าเฉลี่ยคุณภาพน้ำเมื่อเริ่มต้นและสิ้นสุดการทดลอง

พารามิเตอร์ในการตรวจวัดคุณภาพน้ำ	24 ชั่วโมง		48 ชั่วโมง	
	เริ่มต้น	สิ้นสุด	เริ่มต้น	สิ้นสุด
อุณหภูมิน้ำ (°C)	23.2±1.2	23.5±0.3	23.6±1.5	23.7±1.2
ความเป็นกรดต่าง	8.3±0.1	8.1±0.2	8.3±0.1	8.3±0.2
ปริมาณออกซิเจนที่ละลายน้ำ (mg L <sup>-1</sup> )	5.5±0.4	5.2±0.9	5.5±0.4	4.3±0.6

### ผลการศึกษาความเป็นพิษเฉียบพลันเชิงเดี่ยว

ความเป็นพิษเฉียบพลันเชิงเดี่ยวของ imidacloprid

ผลการศึกษาความเป็นพิษเฉียบพลันเชิงเดี่ยวของ imidacloprid ที่เวลา 24 ชั่วโมงพบว่าค่า LC<sub>50</sub> มีค่าอยู่ที่ 1.429 มิลลิกรัมต่อลิตร ช่วงความเชื่อมั่นร้อยละ 95 เท่ากับ 0.606 – 3.049 มิลลิกรัมต่อลิตร ความเป็นพิษเฉียบพลันเชิงเดี่ยวของ imidacloprid ที่เวลา 48 ชั่วโมง ค่า LC<sub>50</sub> มีค่าอยู่ที่ 1.663 มิลลิกรัมต่อลิตร ช่วงความเชื่อมั่นร้อยละ 95 เท่ากับ 0.946 – 2.965 มิลลิกรัมต่อลิตร โดยมีร้อยละการตายของสัตว์ทดลองแสดงดังตารางที่ 14 และผลการวิเคราะห์ไพรบิทแสดงดังตารางที่ 15

ตาราง 14 ร้อยละการตายของสัตว์ทดลองที่ได้รับ imidacloprid เป็นเวลา 24 และ 48 ชั่วโมง

เวลา	ความเข้มข้น (mg L <sup>-1</sup> )	จำนวนการตาย (n=30)			ร้อยละการตายของ สัตว์ทดลอง
		การทดลอง 1	การทดลอง 2	การทดลอง 3	
24	ชุดควบคุม	0	0	0	0
	0.05	8	14	10	35.56±10.18
	0.25	14	10	10	37.78±7.70
	1.25	16	18	10	48.89±13.88
	6.25	15	13	19	52.22±10.18
	31.25	20	17	18	61.11±5.09
	156.25	26	24	27	85.56±5.09

ตาราง 14 (ต่อ)

เวลา	ความเข้มข้น (mg L <sup>-1</sup> )	จำนวนการตาย (n=30)			ร้อยละการตายของ สัตว์ทดลอง
		การทดลอง 1	การทดลอง 2	การทดลอง 3	
48	ชุดควบคุม	0	0	0	0
	0.05	10	13	8	34.44±8.39
	0.25	10	11	15	40.00±8.82
	1.25	17	13	10	44.44±11.71
	6.25	19	11	22	57.78±18.95
	31.25	21	22	21	71.11±1.92
	156.25	21	24	27	80.00±10.00

ตาราง 15 ผลการวิเคราะห์โพรบิทจากการตายของสัตว์ทดลองที่ได้รับ imidacloprid เป็นเวลา 24 และ 48 ชั่วโมง

การวิเคราะห์โพรบิท (Probit analysis)		
เวลา	24 ชั่วโมง	48 ชั่วโมง
ค่า LC <sub>50</sub>	1.429 mg L <sup>-1</sup>	1.663 mg L <sup>-1</sup>
ช่วงความเชื่อมั่นที่ร้อยละ 95	0.606 – 3.049 mg L <sup>-1</sup>	0.946 – 2.965 mg L <sup>-1</sup>
สมการถดถอย (regression equation)	Y = -0.05+0.33X	Y = -0.11+0.45X
ค่าสัมประสิทธิ์แสดงการตัดสินใจ (r <sup>2</sup> )	0.949	0.936

#### ความเป็นพิษเฉียบพลันเชิงเดี่ยวของแคดเมียม

ผลการศึกษาความเป็นพิษเฉียบพลันเชิงเดี่ยวของแคดเมียมที่เวลา 24 ชั่วโมง พบว่าค่า LC<sub>50</sub> มีค่าอยู่ที่ 1.484 มิลลิกรัมต่อลิตร ช่วงความเชื่อมั่นร้อยละ 95 เท่ากับ 1.346 – 1.615 มิลลิกรัมต่อลิตร ความเป็นพิษเฉียบพลันเชิงเดี่ยวของแคดเมียมที่เวลา 48 ชั่วโมงค่า LC<sub>50</sub> มีค่าอยู่ที่ 0.593 มิลลิกรัมต่อลิตร ช่วงความเชื่อมั่นร้อยละ 95 เท่ากับ 0.334 – 0.689 มิลลิกรัมต่อ



ลิตร โดยมีร้อยละการตายของสัตว์ทดลองแสดงดังตารางที่ 16 และผลการวิเคราะห์โพธิ์ทแสดงดังตารางที่ 17

ตาราง 16 ร้อยละการตายของสัตว์ทดลองที่ได้รับแคดเมียมเป็นเวลา 24 และ 48 ชั่วโมง

เวลา	ความเข้มข้น (mg L <sup>-1</sup> )	จำนวนการตาย (n=30)			ร้อยละการตายของ สัตว์ทดลอง
		การทดลอง 1	การทดลอง 2	การทดลอง 3	
24	ชุดควบคุม	0	0	0	0
	0.5	0	0	1	1.11±0.17
	1	5	2	7	15.56±0.75
	1.5	10	12	6	31.11±0.92
	2	15	14	21	55.56±1.14
	2.5	30	30	22	91.11±1.39
	3	30	28	29	96.67±0.30
	48	ชุดควบคุม	0	0	0
0.10		0	2	2	4.44±0.35
0.25		2	4	2	8.89±0.35
0.50		20	20	24	71.11±0.69
0.75		23	26	21	77.78±0.75
1.00		29	27	30	95.56±0.46
1.25		30	30	30	100.00

ตาราง 17 ผลการวิเคราะห์โพรบิทจากการตายของสัตว์ทดลองที่ได้รับแคดเมียมเป็นเวลา 24 และ 48 ชั่วโมง

การวิเคราะห์โพรบิท		
เวลา	24 ชั่วโมง	48 ชั่วโมง
ค่า LC <sub>50</sub>	1.484 mg L <sup>-1</sup>	0.593 mg L <sup>-1</sup>
ช่วงความเชื่อมั่นที่ร้อยละ 95	1.346 – 1.615 mg L <sup>-1</sup>	0.334 – 0.689 mg L <sup>-1</sup>
สมการถดถอย (regression equation)	Y = -0.8+5.37X	Y = 1.35+3.39X
ค่าสัมประสิทธิ์แสดงการตัดสินใจ (r <sup>2</sup> )	0.994	0.930

#### ผลการศึกษาความเป็นพิษเฉียบพลันร่วม

ผลการศึกษาความเป็นพิษเฉียบพลันร่วมของ imidacloprid และแคดเมียมที่เวลา 24 ชั่วโมงพบว่าค่า LC<sub>50</sub> มีค่าอยู่ที่ 0.34 มิลลิกรัมต่อลิตร ช่วงความเชื่อมั่นร้อยละ 95 เท่ากับ 0.244 – 0.440 มิลลิกรัมต่อลิตร เมื่อทำการวิเคราะห์หกิจกรรมทางชีววิทยาพบว่า มีค่าอยู่ที่ 0.467 และดัชนีส่งเสริมการทำงานมีค่าเท่ากับ 1.141 ซึ่งแสดงถึงความสัมพันธ์ของสารเคมีสองชนิดเป็นผลการออกฤทธิ์แบบเสริมฤทธิ์

ความเป็นพิษเฉียบพลันร่วมของ imidacloprid และแคดเมียมที่เวลา 48 ชั่วโมง ค่า LC<sub>50</sub> เท่ากับ 0.018 มิลลิกรัมต่อลิตร ช่วงความเชื่อมั่นร้อยละ 95 เท่ากับ 0.012 – 0.023 มิลลิกรัมต่อลิตร เมื่อทำการวิเคราะห์หกิจกรรมทางชีววิทยาพบว่า มีค่าอยู่ที่ 0.041 และดัชนีส่งเสริมการทำงานมีค่าเท่ากับ 23.285 ซึ่งแสดงถึงความสัมพันธ์ของสารเคมีสองชนิดเป็นผลการออกฤทธิ์แบบเสริมฤทธิ์ โดยมีร้อยละการตายของสัตว์ทดลองแสดงดังตารางที่ 18 และผลการวิเคราะห์โพรบิทและการวิเคราะห์หกิจกรรมทางชีววิทยาแสดงดังตารางที่ 19

ตาราง 18 ร้อยละการตายของสัตว์ทดลองที่ได้รับ imidacloprid และแคดเมียมเป็นเวลา 24 และ 48 ชั่วโมง

เวลา	ความเข้มข้น (mg L <sup>-1</sup> )	จำนวนการตาย (n=30)			ร้อยละการตายของ สัตว์ทดลอง
		การทดลอง 1	การทดลอง 2	การทดลอง 3	
24	ชุดควบคุม	0	0	0	0
	0.1	6	10	10	28.89±0.69
	0.5	15	17	19	56.67±0.60
	1	22	18	18	64.44±0.69
	1.5	25	22	20	74.44±0.75
	2	29	24	28	90.00±0.79
	48	ชุดควบคุม	0	0	0
0.01		16	7	12	38.89±1.35
0.03		18	17	19	60.00±0.30
0.05		21	20	18	65.56±0.46
0.7		27	25	20	80.00±1.08
0.09		27	24	24	83.33±0.52

ตาราง 19 ผลการวิเคราะห์โพธิพิทและการวิเคราะห์หกิจกรรมทางชีววิทยาจากการตายของ สัตว์ทดลองที่ได้รับ imidacloprid และแคดเมียมเป็นเวลา 24 และ 48 ชั่วโมง

การวิเคราะห์โพธิพิท		
เวลา	24 ชั่วโมง	48 ชั่วโมง
ค่า LC <sub>50</sub>	0.34 mg L <sup>-1</sup>	0.018 mg L <sup>-1</sup>
ช่วงความเชื่อมั่นที่ร้อยละ 95	0.244 – 0.440 mg L <sup>-1</sup>	0.012 – 0.023 mg L <sup>-1</sup>
สมการถดถอย (regression equation)	Y = 0.59+1.23X	Y = 2.25+1.29X
ค่าสัมประสิทธิ์แสดงการตัดสินใจ (r <sup>2</sup> )	0.899	0.956

## ตาราง 19 (ต่อ)

การวิเคราะห์กิจกรรมทางชีววิทยา		
กิจกรรมทางชีววิทยา	0.467	0.041
ดัชนีส่งเสริมการทำงาน	1.141 (0.053 - 3.329)	23.285 (11.106 - 45.728)
ความสัมพันธ์ของสารเคมี	การออกฤทธิ์แบบเสริมฤทธิ์	การออกฤทธิ์แบบเสริมฤทธิ์

## การเปลี่ยนแปลงพยาธิสภาพเนื้อเยื่อในไส้เดือนน้ำ

ผลการศึกษาการเปลี่ยนแปลงทางพยาธิสภาพของเนื้อเยื่อไส้เดือนน้ำที่ได้รับ imidacloprid แคดเมียม และสารผสม imidacloprid กับแคดเมียมโดยการย้อมสีฮีมาทอกซิดิน และอีโอซินภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสงที่กำลังขยาย 400 เท่าพบการเปลี่ยนแปลงทางพยาธิสภาพเนื้อเยื่อแสดงดังตาราง 21

ตาราง 20 การเปลี่ยนแปลงทางพยาธิสภาพของเนื้อเยื่อไส้เดือนน้ำที่ได้รับ imidacloprid แคดเมียม และสารผสม imidacloprid กับแคดเมียมเป็นเวลา 24 และ 48 ชั่วโมง

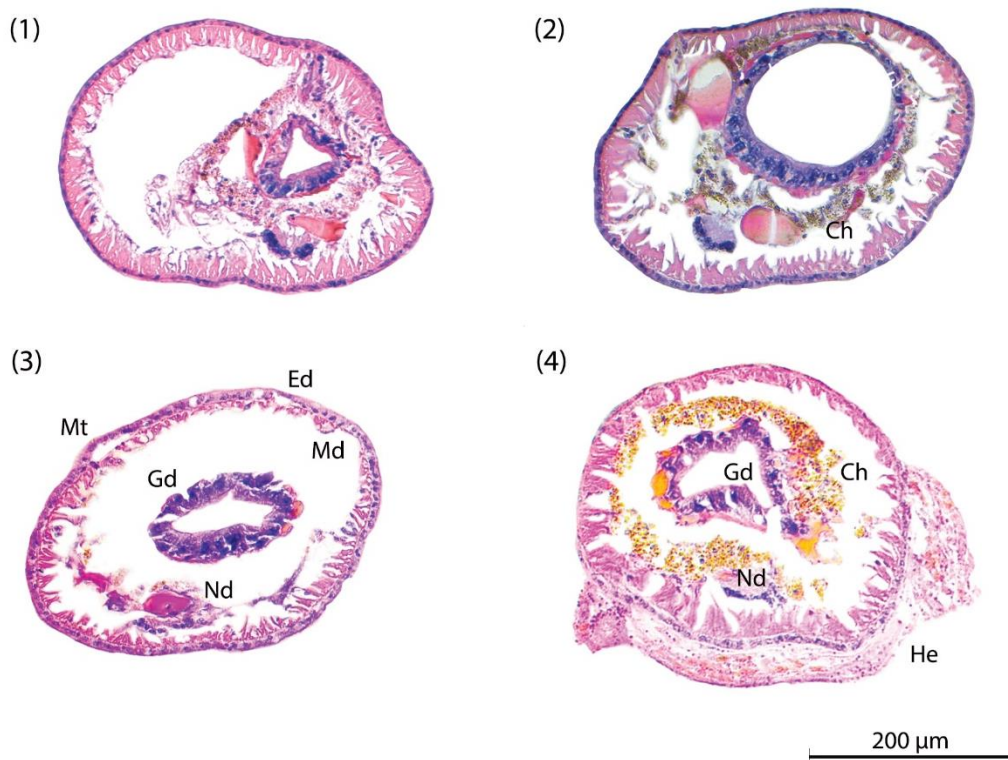
เวลา	สารเคมี	ความเข้มข้น	พยาธิสภาพ
24	imidacloprid	0.2LC <sub>50</sub>	gut cell degeneration nerve degeneration
		0.8 LC <sub>50</sub>	gut cell degeneration hyperplasia of epidermal cells hyperplasia of gut cells irregular surface of epidermis nerve degeneration overexpression of chloragosome
48		0.2LC <sub>50</sub>	epidermal cell degeneration gut cell degeneration hyperplasia of gut cells irregular surface of epidermis

ตาราง 20 (ต่อ)

เวลา	สารเคมี	ความเข้มข้น	พยาธิสภาพ
48	imidacloprid	0.2LC <sub>50</sub>	nerve degeneration overexpression of chloragosome
		0.8 LC <sub>50</sub>	epidermal cell degeneration gut cell degeneration irregular surface of epidermis overexpression of chloragosome
24	แคดเมียม	0.2LC <sub>50</sub>	hyperplasia of gut cells nerve degeneration overexpression of chloragosome
		0.8LC <sub>50</sub>	hyperplasia of gut cells nerve degeneration
48		0.2LC <sub>50</sub>	gut cell degeneration hyperplasia of epidermal cells hyperplasia of gut cells nerve degeneration separation between integument and muscle layer
		0.8LC <sub>50</sub>	gut cell degeneration nerve degeneration overexpression of chloragosome separation between integument and muscle layer
24	สารผสม imidacloprid กับแคดเมียม	0.2LC <sub>50</sub>	epidermal cell degeneration gut cell degeneration irregular surface of epidermis nerve degeneration overexpression of chloragosome

ตาราง 20 (ต่อ)

เวลา	สารเคมี	ความเข้มข้น	พยาธิสภาพ
24	สารผสม imidacloprid กับแคดเมียม	0.2LC <sub>50</sub> 0.8LC <sub>50</sub>	separation between integument and muscle layer epidermal cell degeneration gut cell degeneration muscle degeneration overexpression of chloragosome
48		0.2LC <sub>50</sub> 0.8LC <sub>50</sub>	epidermal cell degeneration gut cell degeneration nerve degeneration overexpression of chloragosome gut cell degeneration overexpression of chloragosome



ภาพประกอบ 11 ลักษณะพยาธิสภาพเนื้อเยื่อไส้เดือนน้ำที่ได้รับสารพิษ  
imidacloprid และแคดเมียม

(1) เนื้อเยื่อไส้เดือนน้ำชุดควบคุม (2 - 4) เนื้อเยื่อไส้เดือนน้ำชุดทดลอง พยาธิสภาพที่ปรากฏได้แก่ epidermal cell degeneration (Ed), gut cell degeneration (Gd), hyperplasia of epidermal cell (He), mussel degeneration (Md), nerve degeneration (Nd), overexpression of chloragosome (Ch) และ separation between integument and muscle layer (Mt)

### การเปลี่ยนแปลงกิจกรรมของเอนไซม์อะซิติลโคลีนเอสเทอเรสในไส้เดือนน้ำ

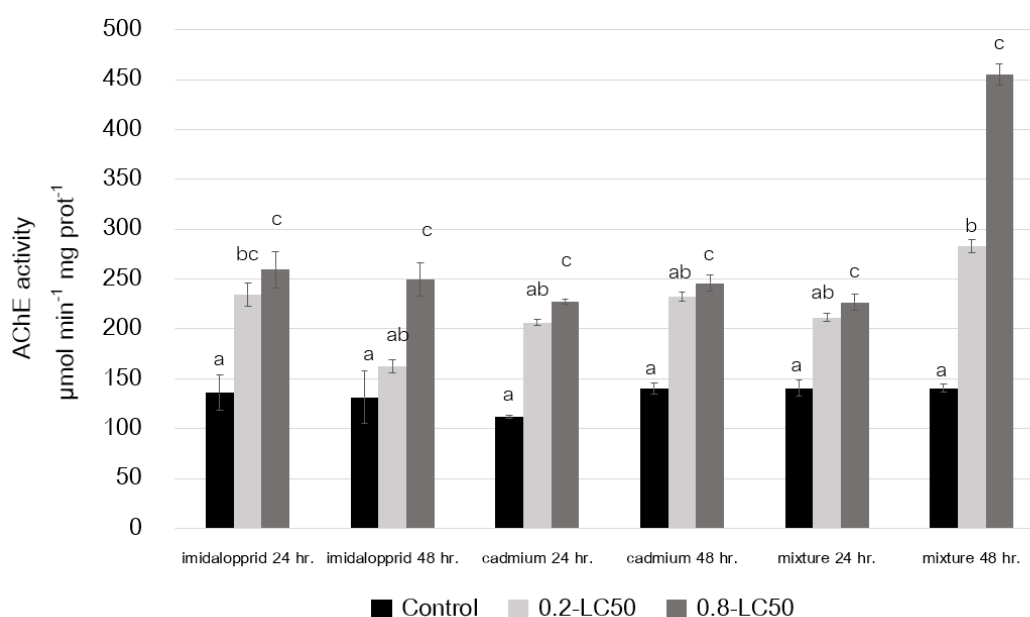
ผลการวัดกิจกรรมของเอนไซม์อะซิติลโคลีนเอสเทอเรสในไส้เดือนน้ำที่ได้รับ imidacloprid แคดเมียม และสารผสมระหว่าง imidacloprid กับแคดเมียมเป็นเวลา 24 และ 48 ชั่วโมงในระดับความเข้มข้นที่ 0.2 และ 0.8 เท่าของค่า  $LC_{50}$  พบว่า เมื่อเพิ่มความเข้มข้นของ imidacloprid และแคดเมียมมากขึ้น กิจกรรมของเอนไซม์อะซิติลโคลีนเอสเทอเรสมากขึ้นตามไปด้วย นอกจากนี้ยังพบว่าที่ระดับความเข้มข้นของสารเคมีเท่ากับ 0.8 เท่าของค่า  $LC_{50}$  กิจกรรมของเอนไซม์อะซิติลโคลีนเอสเทอเรสในไส้เดือนน้ำเพิ่มมากขึ้นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ 0.05 ( $p < 0.05$ ) ในทุกชุดการทดลอง



ตาราง 21 กิจกรรมของเอนไซม์อะซิติลโคลีนเอสเทอเรสในไส้เดือนน้ำที่ได้รับ imidacloprid แคดเมียม และ สารผสม imidacloprid กับแคดเมียมเป็นเวลา 24 และ 48 ชั่วโมง

สารเคมี	เวลา	ชุดควบคุม	0.2 LC <sub>50</sub>	0.8 LC <sub>50</sub>
imidacloprid	24 hr.	135.94 <sup>a</sup> ±17.61	234.67 <sup>bc</sup> ±11.77	259.51 <sup>c</sup> ±18.36
	48 hr.	131.30 <sup>a</sup> ±26.45	162.80 <sup>ab</sup> ±6.38	249.87 <sup>b</sup> ±16.83
แคดเมียม	24 hr.	111.79 <sup>a</sup> ±1.52	206.54 <sup>ab</sup> ±2.81	227.41 <sup>b</sup> ±2.27
	48 hr.	140.69 <sup>a</sup> ±5.55	232.60 <sup>ab</sup> ±4.78	245.97 <sup>b</sup> ±8.11
สารผสม imidacloprid กับแคดเมียม	24 hr.	206.31 <sup>a</sup> ±7.83	211.22 <sup>ab</sup> ±4.00	226.40 <sup>b</sup> ±8.11
	48 hr.	200.31 <sup>a</sup> ±4.03	282.74 <sup>b</sup> ±6.52	454.65 <sup>c</sup> ±10.69

<sup>a,b,c</sup> ค่าเฉลี่ยในคอลัมน์เดียวกันที่อักษรเหมือนกัน ไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ 0.05



<sup>a,b,c</sup> ค่าเฉลี่ยในกราฟแท่งชุดเดียวกันที่อักษรเหมือนกัน ไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ 0.05

ภาพประกอบ 12 กิจกรรมของเอนไซม์อะซิติลโคลีนเอสเทอเรสในไส้เดือนน้ำที่ได้รับ imidacloprid แคดเมียม และ สารผสม imidacloprid กับแคดเมียมเป็นเวลา 24 และ 48 ชั่วโมง

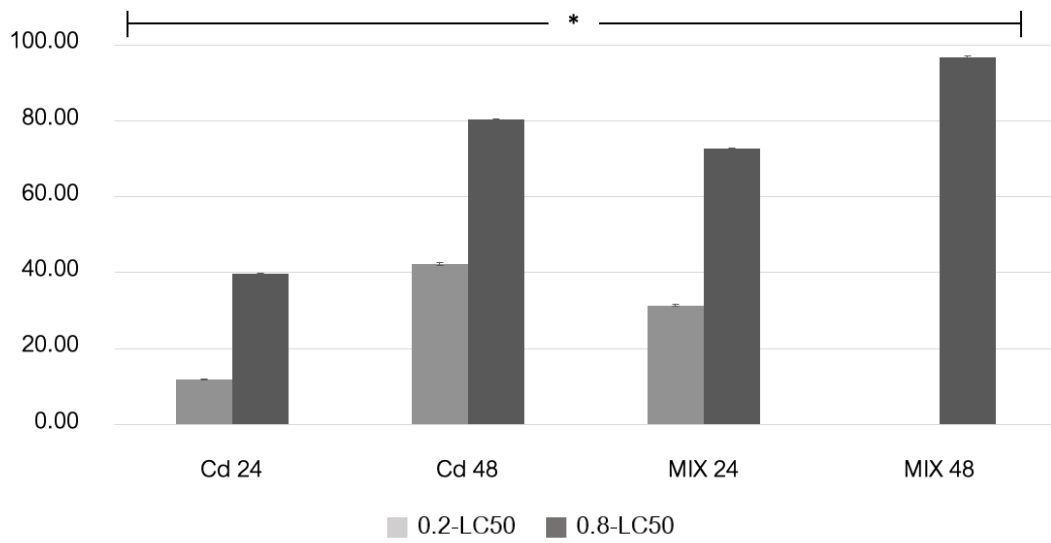
### การประเมินระดับการสะสมแคดเมียมในไส้เดือนน้ำ

ผลการตรวจวัดปริมาณโลหะหนักแคดเมียมที่ตกค้างในเนื้อเยื่อของไส้เดือนน้ำที่ได้รับ imidacloprid แคดเมียม และสารผสมระหว่าง imidacloprid กับแคดเมียมเป็นเวลา 24 และ 48 ชั่วโมงในระดับความเข้มข้นที่ 0.2 และ 0.8 เท่าของค่า  $LC_{50}$  โดยใช้เครื่อง Inductively coupled plasma atomic emission spectroscopy, ICP-AES (Thermo Fisher scientific, iCAP6500) พบว่า ไส้เดือนน้ำที่ได้รับสารผสมมีอัตราการสะสมแคดเมียมในเนื้อเยื่อมากกว่าไส้เดือนน้ำที่ได้รับแคดเมียมเพียงอย่างเดียวอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ 0.05 ( $p < 0.05$ ) และเมื่อระยะเวลาที่ได้รับสารเคมีเพิ่มมากขึ้น อัตราการสะสมแคดเมียมในไส้เดือนน้ำก็มากขึ้นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ 0.05 ( $p < 0.05$ ) ทั้งนี้ค่าความเที่ยง (%RSD,  $n=3$ ) ในทุกความเข้มข้นและช่วงเวลาที่ทดสอบมีค่าน้อยกว่า 5 กราฟมาตรฐานมีช่วงที่เป็นเส้นตรงอยู่ระหว่าง  $0.05 - 5 \mu\text{g L}^{-1}$  และค่าสัมประสิทธิ์แสดงการตัดสินใจ ( $r^2$ ) ของกราฟมาตรฐานมีค่าเท่ากับ 0.9996

ตาราง 22 ร้อยละการตกค้างของแคดเมียมในเนื้อเยื่อไส้เดือนน้ำที่ได้รับแคดเมียมและสารผสม imidacloprid กับแคดเมียมที่ความเข้มข้นและเวลาแตกต่างกัน

สารเคมี	ความเข้มข้นที่ทดสอบ ( $\mu\text{g L}^{-1}$ )		ปริมาณการตกค้าง ( $\mu\text{g L}^{-1}$ )		ร้อยละการตกค้างเทียบกับ ความเข้มข้นที่ทดสอบ	
	24 ชั่วโมง	48 ชั่วโมง	24 ชั่วโมง	48 ชั่วโมง	24 ชั่วโมง	48 ชั่วโมง
ชุดควบคุม	-	-	0	0	0	0
แคดเมียม	296.5	118.6	$35 \pm 0.28$	$50 \pm 0.55$	$11.88 \pm 0.09$	$42.25 \pm 0.47$
	1187.2	474.4	$472 \pm 1.54$	$381 \pm 0.67$	$39.72 \pm 0.13$	$80.27 \pm 0.15$
สารผสม	68.0	3.6	$21 \pm 0.16$	*	$31.38 \pm 0.24$	*
imidacloprid กับแคดเมียม	272.0	14.4	$198 \pm 0.49$	$14 \pm 0.07$	$72.67 \pm 0.18$	$96.64 \pm 0.48$

\* ปริมาณแคดเมียมที่สะสมในเนื้อเยื่อของไส้เดือนน้ำมีค่าน้อยกว่าขีดต่ำสุดที่สามารถตรวจวัดได้



\* ค่าเฉลี่ยแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ 0.05

ภาพประกอบ 13 ร้อยละการตกค้างของแคดเมียมในเนื้อเยื่อไข่เดือนน้ำที่ได้รับแคดเมียมและสารผสม imidacloprid กับแคดเมียมที่ความเข้มข้นและเวลาแตกต่างกัน

## บทที่ 5

### สรุปผลการวิจัย อภิปรายผล และข้อเสนอแนะ

ในการวิจัยเรื่องความเป็นพิษร่วมของ imidacloprid และแคดเมียมต่อการเปลี่ยนแปลงพยาธิสภาพเนื้อเยื่อและกิจกรรมของเอนไซม์อะซิติลโคลีนเอสเทอเรสในไส้เดือนน้ำ (*Tubifex tubifex* Müller, 1774) ผู้วิจัยได้ทำการประเมินความเป็นพิษเฉียบพลันเชิงเดี่ยวและความเป็นพิษร่วมของ imidacloprid และแคดเมียมต่อการเปลี่ยนแปลงทางพยาธิสภาพของเนื้อเยื่อและกิจกรรมของเอนไซม์อะซิติลโคลีนเอสเทอเรสในไส้เดือนน้ำในระดับห้องปฏิบัติการหลังจากได้ผลการวิจัยสามารถสรุปผลการดำเนินงานวิจัยโดยแบ่งหัวข้อได้ดังนี้

1. สรุปผลการวิจัย
2. อภิปรายผลการวิจัย
3. ข้อเสนอแนะ

#### สรุปผลการวิจัย

1. ความเป็นพิษเฉียบพลันเชิงเดี่ยวและความเป็นพิษร่วมของ imidacloprid และแคดเมียมต่อไส้เดือนน้ำ

ผลการทดสอบความเป็นพิษเฉียบพลันเชิงเดี่ยวของ imidacloprid พบว่าที่ 24 ชั่วโมง imidacloprid มีค่า  $LC_{50}$  อยู่ที่ 1.429 (0.606 – 3.049) มิลลิกรัมต่อลิตร ที่ 48 ชั่วโมงมีค่า  $LC_{50}$  อยู่ที่ 1.663 (0.946 – 2.965) มิลลิกรัมต่อลิตร ความเป็นพิษเฉียบพลันเชิงเดี่ยวของแคดเมียมที่ 24 ชั่วโมงมีค่า  $LC_{50}$  อยู่ที่ 1.484 (1.346 – 1.615) มิลลิกรัมต่อลิตร ที่ 48 ชั่วโมงมีค่า  $LC_{50}$  อยู่ที่ 0.593 (0.334-0.689) มิลลิกรัมต่อลิตร

ผลการทดสอบความเป็นพิษเฉียบพลันร่วมของ imidacloprid และแคดเมียมพบว่าที่ 24 ชั่วโมง สารผสม imidacloprid กับแคดเมียมมีค่า  $LC_{50}$  อยู่ที่ 0.34 (0.244 – 0.440) มิลลิกรัมต่อลิตร ที่เวลา 48 ชั่วโมงมีค่า  $LC_{50}$  อยู่ที่ 0.018 (0.012 – 0.023) มิลลิกรัมต่อลิตร ค่ากิจกรรมทางชีววิทยาเท่ากับ 0.041 ดัชนีส่งเสริมการทำงานมีค่าเท่ากับ 23.285 ซึ่งแปลผลได้ว่า ความสัมพันธ์ของสารเคมีสองชนิดเป็นผลการออกฤทธิ์แบบเสริมฤทธิ์กัน

2. ความเป็นพิษเฉียบพลันของ imidacloprid และแคดเมียมต่อการเปลี่ยนแปลงทางพยาธิสภาพของไส้เดือนน้ำ

ผลการตรวจสอบพยาธิสภาพเนื้อเยื่อของไส้เดือนน้ำที่ได้รับ imidacloprid และแคดเมียมพบการเปลี่ยนแปลงทางพยาธิสภาพเนื้อเยื่อชั้นผิว ได้แก่ epidermal cell degeneration, hyperplasia of epidermal cells, irregular surface of epidermis และ separation between integument and muscle layer พยาธิสภาพเนื้อเยื่อทางเดินอาหาร ได้แก่ gut cell degeneration, hyperplasia of gut cells และ overexpression of chloragosome และพยาธิสภาพเนื้อเยื่อประสาท ได้แก่ nerve degeneration

3. ความเป็นพิษเฉียบพลันของ imidacloprid และแคดเมียมต่อการเปลี่ยนแปลงกิจกรรมของเอนไซม์อะซิติลโคลีนเอสเทอเรสในไส้เดือนน้ำ

ผลการทดสอบความเป็นพิษเฉียบพลันเชิงเดี่ยวและความเป็นพิษร่วมของ imidacloprid และแคดเมียมต่อการเปลี่ยนแปลงกิจกรรมเอนไซม์อะซิติลโคลีนเอสเทอเรสที่ระดับต่ำกว่าค่า  $LC_{50}$  พบว่า เมื่อเพิ่มความเข้มข้นของ imidacloprid และแคดเมียมมากขึ้น กิจกรรมของเอนไซม์อะซิติลโคลีนเอสเทอเรสมากขึ้นตามไปด้วย โดยที่ระดับความเข้มข้นเท่ากับ 0.8 เท่าของค่า  $LC_{50}$  กิจกรรมของเอนไซม์อะซิติลโคลีนเอสเทอเรสมีค่ามากกว่าชุดควบคุมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ 0.05 ในทุกชุดการทดลอง

4. การประเมินระดับการสะสมแคดเมียมในไส้เดือนน้ำหลังได้รับแคดเมียมเป็นเวลา 24 และ 48 ชั่วโมง

ผลการทดสอบระดับการสะสมแคดเมียมในไส้เดือนน้ำที่ได้รับแคดเมียม และสารผสมระหว่างแคดเมียมกับ imidacloprid พบว่า เมื่อเพิ่มความเข้มข้นและระยะเวลาที่ได้รับแคดเมียมมากขึ้นพบการตกค้างของแคดเมียมมากขึ้นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ 0.05 และไส้เดือนน้ำที่ได้รับสารผสมระหว่างแคดเมียมกับ imidacloprid มีปริมาณแคดเมียมตกค้างในเนื้อเยื่อมากกว่าไส้เดือนน้ำในชุดควบคุมและไส้เดือนน้ำที่ได้รับแคดเมียมเพียงอย่างเดียวอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ 0.05

### อภิปรายผลการวิจัย

งานวิจัยนี้เป็นการประเมินความเป็นพิษเฉียบพลันเชิงเดี่ยวและความเป็นพิษร่วมของ imidacloprid และแคดเมียมต่อการเปลี่ยนแปลงทางสรีรวิทยาและชีวเคมีของไส้เดือนน้ำ (*T. tubifex*) โดยผลการทดสอบความเป็นพิษเฉียบพลันเชิงเดี่ยวของ imidacloprid พบว่ามีค่า

median lethal concentration (LC<sub>50</sub>) อยู่ที่ 1.429 (0.606 – 3.049) มิลลิกรัมต่อลิตรที่เวลา 24 ชั่วโมงและ 1.663 (0.946 – 2.965) มิลลิกรัมต่อลิตรที่เวลา 48 ชั่วโมง ผลการทดสอบความเป็นพิษเฉียบพลันเชิงเดี่ยวของแคดเมียมพบว่า มีค่า LC<sub>50</sub> อยู่ที่ 10.34 (0.244 – 0.440) มิลลิกรัมต่อลิตรที่เวลา 24 ชั่วโมงและ 0.018 (0.012 – 0.023) มิลลิกรัมต่อลิตรที่เวลา 48 ชั่วโมง ทั้งนี้ในการศึกษางานวิจัยที่เกี่ยวข้องกับความเป็นพิษเชิงเดี่ยวของ imidacloprid และแคดเมียมต่อไส้เดือนน้ำจากงานวิจัยต่าง ๆ พบว่า Gerhardt (2009) รายงานค่า LC<sub>50</sub> ที่ 24 ชั่วโมงของ imidacloprid ต่อไส้เดือนน้ำไว้ที่ 0.3 มิลลิกรัมต่อลิตร และรายงานค่า LC<sub>50</sub> ที่ 24 ชั่วโมงของแคดเมียมต่อไส้เดือนน้ำไว้ที่ 4.9 มิลลิกรัมต่อลิตร งานวิจัยของ Bouché et al. (2000) รายงานค่า LC<sub>50</sub> ที่ 96 ชั่วโมงของแคดเมียมต่อไส้เดือนน้ำไว้ที่ 0.03 มิลลิกรัมต่อลิตร ทั้งนี้จากการเปรียบเทียบข้อมูลที่มีการรายงานเกี่ยวกับการทดสอบความเป็นพิษในสิ่งมีชีวิตจะพบความแตกต่างของผลการทดลองในแต่ละงานวิจัย อันเกิดจากปัจจัยจากสัตว์ทดลอง เช่น แหล่งที่มา และความแข็งแรงของสัตว์ที่ใช้ทดลอง (Maestre, Martinez-Madrid, & Rodriguez, 2009) ซึ่งปัจจัยเหล่านี้ขึ้นอยู่กับสภาพแวดล้อมที่สิ่งมีชีวิตอาศัยอยู่ซึ่งแตกต่างกันในแต่ละภูมิภาค ทั้งนี้สิ่งมีชีวิตทุกชนิดมีความสามารถในการปรับตัวให้เหมาะสมต่อสภาพแวดล้อมที่อาศัยโดยการเปลี่ยนแปลงพฤติกรรมหรือสรีระวิทยาบางประการเพื่อให้สามารถดำรงชีวิตอยู่ในสิ่งแวดล้อมนั้นได้เป็นปกติ (Gerhardt, 2009) ดังนั้นจึงเป็นไปได้ที่การทดสอบความเป็นพิษของสารชนิดเดียวกันอาจจะให้ผลการทดลองที่ต่างกันไปจากปัจจัยที่กล่าวไปข้างต้น และการทดสอบความเป็นพิษของสารพิษแต่ละชนิดควรทำการทดลองในสภาพแวดล้อมที่ใกล้เคียงกับสภาพแวดล้อมที่เกิดการปนเปื้อนจริงในแต่ละพื้นที่ เพื่อให้ได้ผลการทดลองที่ถูกต้องมากที่สุด (Lobo, Méndez-Fernández, Martínez-Madrid, Daam, & Espíndola, 2016) ในการทดสอบความเป็นพิษร่วมของ imidacloprid กับแคดเมียมต่อไส้เดือนน้ำพบว่าที่เวลา 24 ชั่วโมงมีค่า LC<sub>50</sub> อยู่ที่ 0.34 (0.244 – 0.440) มิลลิกรัมต่อลิตร ที่เวลา 48 ชั่วโมงมีค่า LC<sub>50</sub> อยู่ที่ 0.018 (0.012 – 0.023) มิลลิกรัมต่อลิตร จากนั้นทำการประเมินค่ากิจกรรมทางชีววิทยาโดยวิธีการของ Marking (1977) พบว่ามีค่าเท่ากับ 0.041 คำนวณดัชนีส่งเสริมการทำงานมีค่าเท่ากับ 23.285 ซึ่งแปลผลตามเกณฑ์ของ Y. Wang et al. (2018) ได้ว่าความสัมพันธ์ของสารเคมีสองชนิดเป็นผลการออกฤทธิ์แบบเสริมฤทธิ์กัน จากการศึกษากลไกการออกฤทธิ์ของ imidacloprid ทำให้ทราบว่า imidacloprid สามารถในการจับกับ nicotinic acetylcholine receptor (nAChRs) ในระบบประสาทของสิ่งมีชีวิต อันทำให้เกิดความเป็นพิษต่อ

สิ่งมีชีวิตที่ได้รับสารชนิดนี้เข้าไป (Beauvais et al., 1999; Kallander et al., 1997; Rakotondravelo et al., 2006) ซึ่งกลไกนี้มีความคล้ายคลึงกับความสามารถของแคดเมียมในการจับกับเอนไซม์หรือโปรตีนตัวรับในร่างกายของสิ่งมีชีวิตได้โดย Bouché et al. (2000) และ Uwizeyimana et al. (2017) คาดว่าแคดเมียมสามารถเข้าจับกับ nAChRs ได้ในตำแหน่งของ Cys-loop ที่บริเวณ extracellular domain ดังนั้นจึงเห็นได้ว่า สารเคมีทั้งสองชนิดนี้มีเป้าหมายในการทำให้เกิดความเป็นพิษที่ตำแหน่งเดียวกันของสิ่งมีชีวิต อันเป็นสาเหตุที่ทำให้ผลการประเมินความเป็นพิษร่วมของ imidacloprid กับแคดเมียมแสดงความสัมพันธ์ของสารเคมีสองชนิดเป็นผลการออกฤทธิ์แบบเสริมฤทธิ์กัน แม้ว่าจะงานวิจัยครั้งนี้จะเป็นงานวิจัยแรกที่ทำการศึกษาความเป็นพิษร่วมของ imidacloprid และแคดเมียมต่อไส้เดือนน้ำแต่จากการศึกษาความเป็นพิษร่วมของ imidacloprid กับสารกำจัดแมลงชนิดอื่น ๆ พบว่า imidacloprid มีแนวโน้มที่จะส่งเสริมให้เกิดความเป็นพิษร่วมในลักษณะของความเป็นพิษแบบเสริมฤทธิ์ซึ่ง Cang et al. (2017) ได้ทำการศึกษาความเป็นพิษร่วมของ imidacloprid และสารกำจัดแมลงอีก 3 ชนิดในไส้เดือนดิน (*Eisenia fetida*) พบว่าสารผสมระหว่าง imidacloprid-phoxim-lambda-cyhalothrin และ imidacloprid-phoxim-chlorpyrifos-lambda-cyhalothrin แสดงความสัมพันธ์แบบเสริมฤทธิ์ด้านการตรวจสอบพยาธิสภาพที่เกิดขึ้นในไส้เดือนน้ำที่ได้รับ imidacloprid และแคดเมียมแสดงให้เห็นถึงการเปลี่ยนแปลงทางพยาธิสภาพเนื้อเยื่อในบริเวณทางเดินอาหารและบริเวณเนื้อเยื่อชั้นผิวหนังอย่างชัดเจน โดยบริเวณเนื้อเยื่อชั้นผิวหนังปรากฏลักษณะของ epidermal cell degeneration, hyperplasia of epidermal cells และ irregular surface of epidermis ส่วนพยาธิสภาพที่ปรากฏในบริเวณทางเดินอาหารได้แก่ gut cell degeneration, hyperplasia of gut cells และ overexpression of chloragosome ซึ่งพยาธิสภาพเหล่านี้ปรากฏชัดเจนแม้ในความเข้มข้นที่ต่ำที่สุดของการทดลอง ทั้งนี้จากการศึกษาของ K. Wang et al. (2015) ได้รายงานว่ไส้เดือนดิน (*Eisenia fetida*) ที่ได้รับ imidacloprid ความเข้มข้น 0.2 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัมเป็นเวลา 14 วัน ปรากฏลักษณะของพยาธิสภาพเนื้อเยื่อชั้นผิวหนังได้แก่ irregular surface of epidermis และ epidermal cell degeneration พยาธิสภาพส่วนทางเดินอาหารได้แก่ gut cell degeneration และจากการศึกษาวิจัยที่เกี่ยวข้องกับความเป็นพิษของโลหะหนักต่อไส้เดือนน้ำจากรายงานของ Thompson, Brown, Chapman, and Brinkhurst (1982) และ Chapman and Brinkhurst (1984) ที่ทำการศึกษาความเป็นพิษของแคดเมียมต่อ *T. tubifex* พบว่าความเข้มข้นของแคดเมียม



ในระดับที่ไม่ทำให้ถึงตายมีผลทำให้เกิดพยาธิสภาพในบริเวณผนังลำตัวและทางเดินอาหารของไส้เดือนน้ำ ได้แก่ การฉีกออกของผนังลำตัว (rupturing of the body wall) และการสลายของเยื่อบุทางเดินอาหาร (degeneration of the digestive epithelium) นอกจากนี้ยังมีรายงานความเป็นพิษของโลหะหนักต่อสิ่งมีชีวิตในกลุ่มไส้เดือน (annelid) ที่อาศัยในบริเวณที่มีการปนเปื้อนของโลหะหนักจากโรงงานอุตสาหกรรม (Morgan & Morgan, 1990) พบว่า แคดเมียม ทองแดง สังกะสี ตะกั่ว และแคลเซียม มีความเป็นพิษต่อเนื้อเยื่อของไส้เดือนดิน (*Lumbricus rubellus*) โดยเฉพาะเนื้อเยื่อส่วนของทางเดินอาหารซึ่งปรากฏลักษณะของ gut cell degeneration และ hyperplasia of gut cells เช่นเดียวกับการทดลองในครั้งนี้ ดังนั้นจะเห็นได้ว่าการปนเปื้อนของ imidacloprid และแคดเมียมมีความเป็นพิษในระดับเซลล์ต่อสิ่งมีชีวิต โดยจากการรายงานของ (Martinez et al., 2019) ที่ได้ศึกษาความเป็นพิษระดับเซลล์ของ imidacloprid ต่อแมลงปีกแข็ง (*Podisus nigrispinus*) พบว่า imidacloprid เป็นสารเคมีที่ส่งผลให้เกิดการเพิ่มขึ้นของโปรตีน caspase-3 ซึ่งเป็นโปรตีนที่ทำให้เกิดการตายแบบ apoptosis ของเซลล์ในทางเดินอาหารของแมลงชนิดนี้หลังจากได้รับ imidacloprid ที่ความเข้มข้น 6.27 มิลลิกรัมต่อลิตรเป็นเวลา 24 ชั่วโมง ด้านความเป็นพิษของแคดเมียมต่อเซลล์พบว่า แคดเมียมเป็นโลหะหนักที่ทำให้เกิดการเพิ่มขึ้นของสารอนุมูลอิสระภายในเซลล์ โดยยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ในระบบกำจัดสารอนุมูลอิสระ เช่น superoxide dismutase, catalase และ glutathione รวมทั้งยับยั้งการทำงานของโปรตีน metallothionin ที่ทำหน้าที่สำคัญในการกำจัดโลหะหนักภายในเซลล์ ซึ่งกระบวนการเหล่านี้ทำให้เกิดความเครียดจากสารอนุมูลอิสระที่เพิ่มมากขึ้นและกระตุ้นให้เกิดการตายของเซลล์แบบ apoptosis เช่นเดียวกับ imidacloprid (Henkler, Brinkmann, & Luch, 2010) นอกจากการสลายของเนื้อเยื่อชั้นผิวและเนื้อเยื่อทางเดินอาหารแล้ว ลักษณะทางพยาธิสภาพอีกประการที่ปรากฏให้อย่างชัดเจนในไส้เดือนน้ำที่ได้รับสารพิษคือ การเพิ่มขึ้นของ chloragocyte ซึ่งเป็นเซลล์ที่ทำหน้าที่ในกระบวนการกำจัดสารพิษโดยเฉพาะอย่างยิ่งสารพิษจากโลหะหนัก (Klerks & Bartholomew, 1991) ซึ่งจากการรายงานของ Cancio, Ap Gwynn, Ireland, and Cajaraville (1995) ได้อธิบายถึงความสำคัญของ chloragocyte ไว้ว่า เซลล์ชนิดนี้จะทำหน้าที่เก็บสะสมและควบคุมโลหะหนักให้อยู่ในรูปของแกรนูลก่อนที่จะขับออกจากร่างกายของสิ่งมีชีวิต ดังนั้นการเพิ่มขึ้นของ chloragocyte จึงเป็นดัชนีชี้ให้เห็นว่าไส้เดือนน้ำได้รับสารพิษเข้าสู่ร่างกายมากขึ้น นอกจากนี้เมื่อทำการทดสอบความเป็นพิษเฉียบพลันเชิงเดี่ยวและความเป็นพิษร่วมของ imidacloprid และ

แคดเมียมต่อการเปลี่ยนแปลงกิจกรรมของเอนไซม์อะซิติลโคลีนเอสเทอเรสที่ระดับ 0.2 และ 0.8 เท่าของค่า  $LC_{50}$  พบว่า เมื่อเพิ่มความเข้มข้นของ imidacloprid และแคดเมียมมากขึ้น กิจกรรมของเอนไซม์อะซิติลโคลีนเอสเทอเรสมากขึ้นโดยที่ระดับความเข้มข้นเท่ากับ 0.8 เท่าของค่า  $LC_{50}$  กิจกรรมของเอนไซม์อะซิติลโคลีนเอสเทอเรสมีค่ามากกว่าชุดควบคุมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ 0.05 ในทุกชุดการทดลอง ดังนั้นการเพิ่มขึ้นของกิจกรรมของเอนไซม์นั้นมีความสอดคล้องกับกลไกการออกฤทธิ์ของ imidacloprid และแคดเมียมที่ส่งผลต่อโปรตีนตัวรับ nAChRs โดย imidacloprid จะเข้าจับกับ nAChRs บริเวณจำเพาะของสารสื่อประสาทอะซิติลโคลีน (Beauvais et al., 1999; Kallander et al., 1997; Rakotondravelo et al., 2006) ส่วน แคดเมียม จะเข้าจับกับ extracellular domain ของ nAChRs (Uwizeyimana et al., 2017) ทำให้โปรตีนตัวรับเกิดการเปลี่ยนแปลงรูปร่างไปซึ่งทั้งสองกลไกนี้จะส่งผลให้สารสื่อประสาทอะซิติลโคลีนไม่สามารถจับกับ nAChRs ได้ ส่งผลให้เกิดการคงค้างของสารสื่อประสาทอะซิติลโคลีนในร่องประสานประสาทและมีผลต่อการเพิ่มขึ้นของกิจกรรมของเอนไซม์อะซิติลโคลีนเอสเทอเรสเนื่องจากเอนไซม์ชนิดนี้ทำหน้าที่ในการกำจัดสารสื่อประสาทอะซิติลโคลีนที่คงค้างในร่องประสานประสาท ทั้งนี้ความเป็นพิษของ imidacloprid และแคดเมียมต่อกิจกรรมของเอนไซม์อะซิติลโคลีนเอสเทอเรสจากการวิจัยนี้ยังสอดคล้องกับงานวิจัยของ Bairy et al. (2006) ที่ทำการศึกษาความเป็นพิษของแคดเมียมต่อหอยแมลงภู่ (*Perna perna*) พบว่าที่หอยแมลงภู่ที่ได้รับแคดเมียมเป็นเวลา 72 ชั่วโมงมีค่ากิจกรรมของเอนไซม์อะซิติลโคลีนเอสเทอเรสมากกว่าชุดควบคุมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ 0.05 นอกจากนี้ Boily, Sarrasin, DeBlois, Aras, and Chagnon (2013) ได้รายงานผลการทดสอบผลของ imidacloprid ต่อกิจกรรมของเอนไซม์อะซิติลโคลีนเอสเทอเรสทั้งรูปแบบการทดลองในห้องปฏิบัติการและการทดสอบในพื้นที่จริงพบว่า imidacloprid มีผลทำให้กิจกรรมของเอนไซม์อะซิติลโคลีนเอสเทอเรสในผึ้ง (*Apis mellifera*) เพิ่มขึ้น แต่อย่างไรก็ตามผลของ imidacloprid ต่อกิจกรรมของเอนไซม์อะซิติลโคลีนเอสเทอเรสในสิ่งมีชีวิตแต่ละชนิดนั้นมีความแตกต่างกันโดย Malev, Klobučar, Fabbretti, and Trebše (2012) ทำการศึกษาในแมลงน้ำ (*Gammarus fossarum*) และ Capowiez, Rault, Mazzia, and Belzunces (2003) ทำการศึกษาในไส้เดือนดิน (*Aporrectodea nocturna*) พบว่า imidacloprid ไม่มีผลต่อกิจกรรมของเอนไซม์อะซิติลโคลีนเอสเทอเรสในสิ่งมีชีวิตทั้งสองชนิดนี้ แต่การศึกษาในตัวอ่อนของจิ้งน้ำจืด (*Chironomus riparius*) พบว่าเมื่อเพิ่มความเข้มข้นของ imidacloprid มากขึ้นกิจกรรมของเอนไซม์ชนิดนี้จะลดลง

ดังนั้นผู้วิจัยหลานท่านจึงตั้งข้อสังเกตว่าผลของ imidacloprid ต่อสิ่งมีชีวิตแต่ละชนิดนั้นเป็นลักษณะที่จำเพาะของสิ่งมีชีวิต (species-specific feature) (Azevedo-Pereira, Lemos, & Soares, 2011; Boily et al., 2013; Capowiez et al., 2003; Malev et al., 2012; Radwan & Mohamed, 2013) ด้านการทดสอบระดับการสะสมแคดเมียมในไส้เดือนน้ำที่ได้รับแคดเมียม และสารผสมระหว่างแคดเมียมกับ imidacloprid ผลการทดลองแสดงให้เห็นว่าการเพิ่มขึ้นของความเข้มข้นและระยะเวลาที่ได้รับแคดเมียม ทำให้เกิดการตกค้างของแคดเมียมในเนื้อเยื่อไส้เดือนน้ำมากขึ้นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ 0.05 นอกจากนี้การปนเปื้อนของ imidacloprid ร่วมกับแคดเมียมยังส่งผลให้เกิดการสะสมแคดเมียมมากขึ้นอีกด้วย ซึ่งผลการทดลองครั้งนี้สอดคล้องกับงานวิจัยของ Back (1990) ที่ได้ศึกษาการตกค้างของโลหะหนักในไส้เดือนน้ำและรายงานผลไว้ว่าเมื่อเพิ่มความเข้มข้นและระยะเวลาที่ได้รับแคดเมียมมากขึ้นจะทำให้เกิดการตกค้างของแคดเมียมมากขึ้น และแคดเมียมยังเป็นโลหะหนักที่สามารถแทรกซึมผ่านเนื้อเยื่อชั้นผิวหนังของไส้เดือนน้ำ (*T. tubifex*) ได้ดีที่สุดเมื่อเทียบกับตะกั่วและสังกะสี นอกจากนี้งานวิจัยของ Yanhua Wang, Chen Chen, Yongzhong Qian, Xueping Zhao, and Qiang Wang (2015) ได้รายงานผลความสัมพันธ์ของสารผสมแบบเพิ่มฤทธิ์และเสริมฤทธิ์ระหว่าง imidacloprid แคดเมียม และ Atrazine ต่อไส้เดือนดิน (*E. fetida*) อีกด้วย

การศึกษาผลกระทบของ imidacloprid และแคดเมียมในไส้เดือนน้ำในงานวิจัยนี้แสดงให้เห็นถึงความเป็พิษที่มากขึ้นต่อสิ่งมีชีวิตเมื่อได้รับสารผสมทั้งสองชนิดนี้ พร้อมกัน ทั้งในระดับความเป็นพิษที่ทำให้สัตว์ทดลองตาย (lethal effect) และความเป็นพิษที่ไม่ทำให้สัตว์ทดลองตาย (sub-lethal effect) อันได้แก่ ผลต่อพยาธิสภาพเนื้อเยื่อ ผลต่อการทำงานของเอนไซม์ และผลต่อการสะสมโลหะหนัก ดังนั้นผลที่ได้จากการทดลองนี้จึงสามารถยืนยันถึงความสำคัญของการประเมินความเป็นพิษร่วมของสารเคมีที่สามารถพบได้ในแหล่งน้ำธรรมชาติ และเป็นแนวทางในการวิจัยความเป็นพิษร่วมของสารเคมีชนิดอื่น ๆ ต่อสิ่งมีชีวิตในระบบนิเวศต่อไป

### ข้อเสนอแนะ

1. ในการศึกษาครั้งนี้ผู้วิจัยทำการทดลองในระดับห้องปฏิบัติการเท่านั้น ควรนำผลการทดลองครั้งนี้ไปทำการทดลองในระดับพื้นที่การเกษตรจำลองต่อไป

2. ควรทำการศึกษาความเป็นพิษร่วมของสารเคมีชนิดต่าง ๆ ที่พบการปนเปื้อนในระบบนิเวศจริงเพื่อประเมินความสัมพันธ์ระหว่างสารเคมีแต่ละชนิดที่อาจก่อให้เกิดความเป็นพิษร่วมแบบเสริมฤทธิ์หรือเพิ่มฤทธิ์

3. ควรทำการศึกษาความเป็นพิษต่อสิ่งมีชีวิตชนิดอื่น ๆ เพื่อศึกษาผลกระทบที่อาจจะเกิดขึ้นจากระดับการกินอาหารที่แตกต่างกันของสิ่งมีชีวิตแต่ละชนิด



## บรรณานุกรม

- Adreani, L., & Bonomi, G. (1978). *Elementi per una dinamica di popolazione dei tubificidi (Annelida, Oligochaeta)*. Paper presented at the Proceedings of the 3rd Congress of the Italian Association for Oceanology and Limnology. Sorrento, Italy.
- American Public Health Association, American Water Works Association, Water Pollution Control Federation, & Water Environment Federation. (1915). *Standard methods for the examination of water and wastewater* (Vol. 2): American Public Health Association.
- Anderson, J., Dubetz, C., & Palace, V. (2015). Neonicotinoids in the Canadian aquatic environment: a literature review on current use products with a focus on fate, exposure, and biological effects. *Science of the Total Environment*, 505, 409-422.
- Azevedo-Pereira, H., Lemos, M., & Soares, A. M. (2011). Effects of imidacloprid exposure on *Chironomus riparius* Meigen larvae: linking acetylcholinesterase activity to behaviour. *Ecotoxicology and environmental safety*, 74(5), 1210-1215.
- Back, H. (1990). Epidermal uptake of Pb, Cd, and Zn in tubificid worms. *Oecologia*, 85(2), 226-232.
- Bainy, A. C. D., de Medeiros, M. H. G., Di Mascio, P., & de Almeida, E. A. (2006). In vivo effects of metals on the acetylcholinesterase activity of the *Perna perna* mussel's digestive gland. *Biotemas*, 19(1), 35-39.
- Beauvais, S. L., Atchison, G. J., Stenback, J. Z., & Crumpton, W. G. (1999). Use of cholinesterase activity to monitor exposure of *Chironomus riparius* (Diptera: Chironomidae) to a pesticide mixture in hypoxic wetland mesocosms. *Hydrobiologia*, 416, 163-170.
- 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), 72-78.
- Bliss, C. I. (1934). The method of probits. *Science*, 79(2053), 409-410.
- Boily, M., Sarrasin, B., DeBlois, C., Aras, P., & Chagnon, M. (2013). Acetylcholinesterase in

- honey bees (*Apis mellifera*) exposed to neonicotinoids, atrazine and glyphosate: laboratory and field experiments. *Environmental Science and Pollution Research*, 20(8), 5603-5614.
- Bonomi, G., & Di Cola, G. (1980). Population dynamics of *Tubifex tubifex*, studied by means of a new model *Aquatic oligochaete biology* (pp. 185-203): Springer.
- Bouché, M.-L., Habets, F., Biagiante-Risbourg, S., & Vernet, G. (2000). Toxic effects and bioaccumulation of cadmium in the aquatic oligochaete *Tubifex tubifex*. *Ecotoxicology and environmental safety*, 46(3), 246-251.
- Brinkhurst, R. O. (1971). *A guide for the identification of British aquatic Oligochaeta*. Ambleside, England: Freshwater Biological Association.
- Cancio, I., Ap Gwynn, I., Ireland, M., & Cajaraville, M. (1995). The effect of sublethal lead exposure on the ultrastructure and on the distribution of acid phosphatase activity in chloragocytes of earthworms (Annelida, Oligochaeta). *The Histochemical Journal*, 27(12), 965-973.
- 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., Triebkorn, 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., Mazzia, C., & Belzunces, L. (2003). Earthworm behaviour as a biomarker—a case study using imidacloprid: The 7th international symposium on earthworm ecology· Cardiff· Wales· 2002. *Pedobiologia*, 47(5-6), 542-547.
- Chapman, P. M. (2001). Utility and relevance of aquatic oligochaetes in ecological risk assessment *Aquatic Oligochaete Biology VIII* (pp. 149-169): Springer.
- Chapman, P. M., & Brinkhurst, R. O. (1984). Lethal and sublethal tolerances of aquatic oligochaetes with reference to their use as a biotic index of pollution *Aquatic Oligochaeta* (pp. 139-144): Springer.
- Crottini, A., Marotta, R., Barbuto, M., Casiraghi, M., & Ferraguti, M. (2008). The world in a



- river? A preliminary analysis of the 16S rDNA variability of Tubifex species (Clitellata: Tubificidae) from the Lambro River. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 48(3), 1189-1203.
- Croucher, L., Jewess, P., & Roberts, M. C. (2007). *Metabolic Pathways of Agrochemicals: Part 2: Insecticides and Fungicides*: Royal Society of Chemistry.
- Daam, M. A., Pereira, A. C. S., Silva, E., Caetano, L., & Cerejeira, M. J. (2013). Preliminary aquatic risk assessment of imidacloprid after application in an experimental rice plot. *Ecotoxicology and environmental safety*, 97, 78-85.
- Desneux, N., Decourtye, A., & Delpuech, J.-M. (2007). The sublethal effects of pesticides on beneficial arthropods. *Annual Review of Entomology*, 52, 81-106.
- Dhara, K., Mukherjee, D., & Saha, N. C. (2015). *Acute Toxicity of Cadmium to Benthic Oligochaete Worm, Branchiura sowerbyi Beddard, 1982 and Juvenile Catfish, Clarias batrachus Linnaeus, 1758*. Paper presented at the Proceedings of the Zoological Society.
- Dixon, G. C. (1915). *Tubifex* (Vol. 23): Williams & Norgate.
- 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.
- Fargašová, A. (1997). Comparative study of ecotoxicological effect of triorganotin compounds on various biological subjects. *Ecotoxicology and environmental safety*, 36(1), 38-42.
- Finney, D. J., & Tattersfield, F. (1952). *Probit analysis*: Cambridge University Press; Cambridge.
- 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.
- Gorman, K., Liu, Z., Denholm, I., Brügggen, K. U., & Nauen, R. (2008). Neonicotinoid resistance in rice brown planthopper, Nilaparvata lugens. *Pest management science*, 64(11), 1122-1125.



- Hall, L. W., Scott, M. C., & Killen, W. D. (1998). Ecological risk assessment of copper and cadmium in surface waters of Chesapeake Bay watershed. *Environmental toxicology and chemistry*, 17(6), 1172-1189.
- Henkler, F., Brinkmann, J., & Luch, A. (2010). The role of oxidative stress in carcinogenesis induced by metals and xenobiotics. *Cancers*, 2(2), 376-396.
- Humason, G. L. (1962). Animal tissue techniques. *Animal tissue techniques*.
- Jintanan, W., Wit, T., Kasem, J., & Naruechid, d. (2013). The Quantity of Heavy metals in the Tha-chin River and its Inflow canals from Nakhon Chai Si to Estuary. *Naresuan University Journal: Science And Technology*, 21(2), 1-13.
- Juthathip, O. (2557). *Pollutant contamination in groundwater near industrial zone and landfill site in muang district Nakhonratchasima*. (Master of Engineering ), Suranaree University, Nakhonrajchasima.
- Kallander, D., Fisher, S., & Lydy, M. (1997). Recovery following pulsed exposure to organophosphorus and carbamate insecticides in the midge, *Chironomus riparius*. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, 33(1), 29-33.
- Klerks, P., & Bartholomew, P. (1991). Cadmium accumulation and detoxification in a Cd-resistant population of the oligochaete *Limnodrilus hoffmeisteri*. *Aquatic toxicology*, 19(2), 97-112.
- Kochaphan, V., & Sirinan, Y. (2013). The Study of Lead and Cadmium content in *Hemibagrus wyckioides*, *Notopterus notopterus*, *Kryptopterus bleekeri*, *Oxyeleotris marmoratus*, *Puntioplites Proctozysron* and *Macrobrachium rosenbergii* Around Lam Pao Dam, Kalasin Province. *Academic Journal of Kalasin Rajabhat University*, 2(1), 42 - 46.
- 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.
- Liang, S.-H., Chen, S.-C., Chen, C.-Y., Kao, C.-M., Yang, J.-I., Shieh, B.-S., . . . Chen, C.-C. (2011). Cadmium-induced earthworm metallothionein-2 is associated with metal

- accumulation and counteracts oxidative stress. *Pedobiologia*, 54(5), 333-340.
- Lobo, H., Méndez-Fernández, L., Martínez-Madrid, M., Daam, M. A., & Espindola, 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.
- Maestre, Z., Martínez-Madrid, M., & Rodríguez, P. (2009). Monitoring the sensitivity of the oligochaete *Tubifex tubifex* in laboratory cultures using three toxicants. *Ecotoxicology and environmental safety*, 72(8), 2083-2089.
- Malev, O., Klobučar, R. S., Fabbretti, E., & Trebše, P. (2012). Comparative toxicity of imidacloprid and its transformation product 6-chloronicotinic acid to non-target aquatic organisms: Microalgae *Desmodesmus subspicatus* and amphipod *Gammarus fossarum*. *Pesticide biochemistry and physiology*, 104(3), 178-186.
- Marking, L. (1977). Method for assessing additive toxicity of chemical mixtures *Aquatic toxicology and hazard evaluation*: ASTM International.
- Martínez, L. C., Plata-Rueda, A., Gonçalves, W. G., Freire, A. F. P. A., Zanuncio, J. C., Bozdoğlan, H., & Serrão, J. E. (2019). Toxicity and cytotoxicity of the insecticide imidacloprid in the midgut of the predatory bug, *Podisus nigrispinus*. *Ecotoxicology and environmental safety*, 167, 69-75.
- 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.
- Maturet, R., & Juthamas, S. (2009). *Ecotoxicology* (2 ed.). Bangkok: Faculty of medicine Mahidol University.
- Milbrink, G. (1980). Oligochaete communities in pollution biology: the European: situation with special reference to lakes in Scandinavia *Aquatic oligochaete biology* (pp. 433-455): Springer.
- Ministry of Public Health. (1986). *Notification of the Ministry of Public Health (No. 135) B.E.*

2529 (1986). Bangkok: Soonphisan.

- Miranda, G. R., Raetano, C. G., Silva, E., Daam, M. A., & Cerejeira, M. J. (2011). Environmental fate of neonicotinoids and classification of their potential risks to hypogean, epygean, and surface water ecosystems in Brazil. *Human and Ecological Risk Assessment: An International Journal*, 17(4), 981-995.
- Morgan, J. E., & Morgan, A. (1990). The distribution of cadmium, copper, lead, zinc and calcium in the tissues of the earthworm *Lumbricus rubellus* sampled from one uncontaminated and four polluted soils. *Oecologia*, 84(4), 559-566.
- Naiyana, S., Somsak, R., Sugunya, K., & Sukrichaya, H. (2013). The accumulation of some Heavy metals Freshwater fish in Nongharn Sakonnakhon campus. *Khon Kaen agriculture journal*, 44(1), 670-674.
- Nicodemo, D., Maioli, M. A., Medeiros, H. C., Guelfi, M., Balieira, K. V., De Jong, D., & Mingatto, F. E. (2014). Fipronil and imidacloprid reduce honeybee mitochondrial activity. *Environmental toxicology and chemistry*, 33(9), 2070-2075.
- Özdemir, A., Şen, A., & Duran, M. (2006). *Cholinesterases as Potential Biomarkers in Tubifex sp.* Paper presented at the FEBS JOURNAL.
- 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.
- Pimchada, D., Ampol, P., & TaengOn, P. (2013). An Assessment of Cadmium and Zinc in Stream Contaminated by Mining Activities using Aquatic Insects. *SDU Research Journal Sciences and Technology*, 9(2), 159-167.
- 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.
- Rakotondravelo, M. L., Anderson, T. D., Charlton, R. E., & Zhu, K. Y. (2006). Sublethal effects of three pesticides on activities of selected target and detoxification enzymes in the aquatic midge, *Chironomus tentans* (Diptera: Chironomidae).

- Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, 51(3), 360.
- Retnam, L., Chatikavanij, P., Kunjara, P., Paramastri, Y. A., Goh, Y. M., Hussein, F. N., . . . Poosala, S. (2016). Laws, Regulations, Guidelines and Standards for Animal Care and Use for Scientific Purposes in the Countries of Singapore, Thailand, Indonesia, Malaysia, and India. *ILAR journal*, 57(3), 312-323.
- Reynoldson, T. B. (1994). A field test of a sediment bioassay with the oligochaete worm *Tubifex tubifex* (Müller, 1774) *Aquatic Oligochaete Biology V* (pp. 223-230): Springer.
- 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.
- Satarug, S., Vesey, D. A., & Gobe, G. C. (2017). Current health risk assessment practice for dietary cadmium: Data from different countries. *Food and Chemical Toxicology*, 106, 430-445.
- Shuhaimi-Othman, M., Nadzifah, Y., Umirah, N., & Ahmad, A. (2012). Toxicity of metals to an aquatic worm, *Nais elinguis* (Oligochaeta, Naididae). *Research Journal of Environmental Toxicology*, 6(4), 122-132.
- Thita, D. (2014). *The cotamination of heavy metal in water and sediment around Thatapow estuary, Chumphon province*. (Master of Education), Thaksin University, Phattalung.
- Thompson, K., Brown, D., Chapman, P., & Brinkhurst, R. (1982). Histopathological effects and cadmium-binding protein synthesis in the marine oligochaete *Monopylephorus cuticulatus* following cadmium exposure. *Transactions of the American Microscopical Society*, 10-26.
- Timm, T. (1996). *Tubifex tubifex* (Müller, 1774)(Oligochaeta, Tubificidae) in the profundal of Estonian lakes. *Internationale Revue der gesamten Hydrobiologie und Hydrographie*, 81(4), 589-596.
- Tomizawa, M., & Casida, J. E. (2005). Neonicotinoid insecticide toxicology: mechanisms of

- selective action. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.*, 45, 247-268.
- 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 Erp, S., Booth, L., Gooneratne, R., & O'Halloran, K. (2002). Sublethal responses of wolf spiders (Lycosidae) to organophosphorous insecticides. *Environmental Toxicology: An International Journal*, 17(5), 449-456.
- Viarengo, A., & Nott, J. (1993). Mechanisms of heavy metal cation homeostasis in marine invertebrates. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Comparative Pharmacology*, 104(3), 355-372.
- 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, Y., Cang, T., Zhao, X., Yu, R., Chen, L., Wu, C., & Wang, Q. (2012). Comparative acute toxicity of twenty-four insecticides to earthworm, *Eisenia fetida*. *Ecotoxicology and environmental safety*, 79, 122-128.
- 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.
- Watts, M. (2012). Human Health Impacts of Exposure to Pesticides. *WWF Australia*. Contract ref, 11005.
- Welsch, P. S. (1952). *Limnology*: McGraw-Hill Book Company, Inc.; New York.
- Wisa, S. (2010). *Factors Affecting Iron Deficiency and High Iron Consumption on Cadmium Dioxide Intake of People Living in Cadmium Contaminated Areas In Mae Taow, Mae Ku and Phra That Pha Pha Da, Mae Sot District, Tak Province*. Retrieved from <http://dric.nrct.go.th/Search/SearchDetail/231599>
- Yanhua Wang, Chen Chen, Yongzhong Qian, Xueping Zhao, & Qiang Wang. (2015). Ternary toxicological interactions of insecticides, herbicides, and a heavy metal on the earthworm *Eisenia fetida*. *Journal of Hazardous Materials*, 284, 233-240.

Yuttachai, A., Bundit, A.-r., & Supapich, T. (2546, 3-7 ก.พ. 2546). *Contamination of lead and cadmium in soil, water and plants from the sanitary landfill of Muang district Suphanburi province by means of GIS*. Paper presented at the Proceedings of 41<sup>th</sup> Kasetsart University Annual Conference: Science, Natural Resources and Environmental Economics, Bangkok.







## ประวัติผู้เขียน

ชื่อ-สกุล	นายปรกรณ์ เล็กวงศ์ไพบูลย์
วัน เดือน ปี เกิด	2 ธันวาคม 2536
สถานที่เกิด	จังหวัดสิงห์บุรี
วุฒิการศึกษา	การศึกษาระดับบัณฑิต สาขาวิชาวิทยาศาสตร์-ชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ
ที่อยู่ปัจจุบัน	141/92 ถนนมาลัยแมน ตำบลรั้วใหญ่ อำเภอเมือง จังหวัดสุพรรณบุรี

