

## บทที่ 4

### อภิปรายและสรุปผลการทดลอง

#### 4.1 ประเมินวิธีการที่ใช้วัดการทำงานของเอนไซม์โพลีไฮดรอกซีอะลคานอยด์

จากการศึกษาพบว่าค่า % recovery ของเอนไซม์โพลีไฮดรอกซีอะลคานอยด์ในชีวมวลสาหร่ายที่ผสม ซึ่งประยุกต์ใช้วิธีการวัดของ Ellman et al. (1961) มีค่า % recovery อยู่ในเกณฑ์ที่ยอมรับได้โดยมีค่าไม่ต่ำกว่า 96 % ซึ่งสอดคล้องกับการศึกษาของภทรา หาญจรียากุล (2536) ที่พบว่า % recovery ในสมองและกล้ามเนื้อปลากะพงขาวอยู่ในช่วง 93.75-106.12 และ 95.48-105.65 ตามลำดับ จึงสามารถนำวิธีการวัดนี้มาใช้ในการหาค่าการทำงานของเอนไซม์โพลีไฮดรอกซีอะลคานอยด์ในการศึกษาครั้งนี้ได้

#### 4.2 ประเมินค่าความคงตัวของเอนไซม์โพลีไฮดรอกซีอะลคานอยด์

การวัดค่าความคงตัวของเอนไซม์โพลีไฮดรอกซีอะลคานอยด์พบว่า สามารถเก็บตัวอย่างไว้ที่อุณหภูมิ  $-10^{\circ}\text{C}$  ได้นาน 6 สัปดาห์ โดยไม่มีผลทำให้การทำงานของเอนไซม์แตกต่างจากค่าปกติ ใกล้เคียงกับการศึกษาของภทรา หาญจรียากุล (2536) ที่รายงานว่าสามารถเก็บตัวอย่างสมองและกล้ามเนื้อของปลากะพงขาวที่อุณหภูมิ  $0^{\circ}\text{C}$  ได้นาน 30 วัน โดยไม่ทำให้การทำงานของเอนไซม์เปลี่ยนแปลงไปจากวันเริ่มทดลอง นอกจากนี้ยังมีรายงานถึงค่าความคงตัวของเอนไซม์ในตัวอย่างอื่นๆอีก เช่น ในเลือดพบว่าจะคงตัวได้นานหลายสัปดาห์ถ้าเก็บที่อุณหภูมิ  $0-5^{\circ}\text{C}$  และในพลาสมาพบว่าคงตัวได้นานหลายเดือนถ้าเก็บในช่องแช่แข็ง (Osweller et al., 1985)

### 4.3 ความเป็นพิษและค่า median lethal concentration (LC<sub>50</sub>, 96 hr.) ของ DDVP ในปลาอุกพันธุ์ผสม

จากการสังเกตพฤติกรรมของปลาอุกภายหลังได้รับ DDVP ซึ่งเป็นสารปราบศัตรูพืชในกลุ่มออร์กาโนฟอสเฟต พบว่าอาการที่เกิดขึ้นได้แก่อาการกระวนกระวาย การเคลื่อนไหวที่ไม่มีทิศทางแน่นอน อาการที่เกิดขึ้นเหล่านี้แสดงให้เห็นว่า DDVP มีผลต่อระบบประสาทที่ควบคุมพฤติกรรม และการทรงตัวของปลา ความรุนแรงของอาการที่แสดง รวมทั้งการฟื้นตัวของปลาขึ้นอยู่กับขนาดความเข้มข้นของ DDVP ที่ปลาได้รับ โดยปลาอุกที่ได้รับ DDVP ขนาดต่างๆ อาการเป็นพิษจะเกิดขึ้นช้ากว่าปลาอุกที่ได้รับ DDVP ในขนาดความเข้มข้นสูง ส่วนการฟื้นตัวพบว่าปลาอุกที่ได้รับ DDVP ขนาดความเข้มข้นต่ำอาการเป็นพิษจะหายไปเร็วกว่าปลาที่ได้รับในขนาดความเข้มข้นสูง ผลการทดลองที่ได้นี้สอดคล้องกับการศึกษาของภัทรา หาญจริยากุล (2536) ที่ทำการศึกษาในปลากระพงขาวเมื่อได้รับเมทิลพาราไรออนในขนาดต่างๆ และการศึกษาของวรา พานิชเกรียงไกร และคนอื่นๆ (2536) ที่ทำการศึกษาในปลาอุกเมื่อได้รับเมทิลพาราไรออนในขนาดต่างๆ จากการศึกษานี้ของ Cusack and Johnson (1990) พบว่า DDVP มีผลต่อกล้ามเนื้อ และเพลงตอนในน้ำ โดยอาการพิษและอัตราการตายขึ้นอยู่กับขนาดความเข้มข้นของ DDVP ที่สัตว์ได้รับเช่นเดียวกัน แสดงว่าระดับความเป็นพิษของ DDVP ขึ้นอยู่กับปริมาณที่สัตว์ได้รับ (dose-dependent)

นอกจากอาการเป็นพิษที่เกิดขึ้นดังกล่าวแล้ว ยังพบว่าเมื่อปลาได้รับ DDVP จะมีผลทำให้ปลากินอาหารได้น้อยลง ซึ่งการกินอาหารได้น้อยลงนี้แปรผันตามขนาดความเข้มข้นที่เพิ่มขึ้นของ DDVP จากการศึกษาของ Pavlov et al. (1992) โดยให้ปลา bream ได้รับ DDVP แล้วศึกษาถึงพฤติกรรมการกินพร้อมกับศึกษาการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์โมลิโนเทอเรส พบว่าพฤติกรรมการกินและการทำงานของเอนไซม์ที่ถูกยับยั้งมีความสัมพันธ์กัน โดยเมื่อเอนไซม์ถูกยับยั้งมากขึ้นการกินอาหารของปลาจะลดลง ทั้งนี้อาจเกิดขึ้นจากสารสื่อประสาทได้แก่ serotonin, norepinephrine และ dopamine ซึ่งถูกทำให้ลดลงได้โดยสารปราบศัตรูพืชในกลุ่มออร์กาโนฟอสเฟต เมื่อสารสื่อประสาทเหล่านี้ลดลง จะมีผลทำให้พฤติกรรมการกินลดลงไปด้วย (McDonald, 1979)

จากการศึกษาครั้งนี้พบว่าค่า median lethal concentration ของ DDVP ที่ 96 ชั่วโมง (LC<sub>50</sub>, 96 hr.) ในปลาอุกพันธุ์ผสมเท่ากับ 6.9 ppm ซึ่งแตกต่างจากผลการศึกษาของ McHenry, Seward and Seaton (1991) ที่พบว่าค่า LC<sub>50</sub>, 96 hr. ของ DDVP ในปลาแฮร์ริง (herring, *Clupea harengus* L.) มีค่าเท่ากับ 122 ppb และในกุ้งมังกร (lobster, *Homarus gammarus* L.) มีค่าเท่ากับ 5.7 ppb การศึกษาของ Hossain, Ghatak and Komar (1987) พบว่าค่า LC<sub>50</sub>, 96 hr. ของ DDVP ในปลา *Tilapia mossambica* มีค่า 7.3 ppm ในสัตว์ทะเลเล็ก ๆ พวก copepod มีค่า 0.074 ppm และในปลิง (*Branchiura sowerbyi*) มีค่า 0.071 ppm ส่วนในการศึกษาของ Pavlov et al. (1992) พบว่าค่า LC<sub>50</sub>, 48 hr. ของ DDVP ในปลาบรีม (bream, *Abramis brama* L.) มีค่าเท่ากับ 28.05 ppm ค่าที่แตกต่างกันเหล่านี้ อาจเกิดจากความแตกต่างของชนิด ขนาด และอายุของปลาที่ใช้ ตลอดจนผลิตภัณฑ์ทางการค้า ของสารเคมีที่นำมาใช้ (Zbider and Flurycoversi, 1981) สำหรับค่า sublethal concentration ของ DDVP ที่ได้จากการศึกษาครั้งนี้มีค่าต่ำกว่า 0.925 ppm และขนาดที่เลือกใช้ในการศึกษาต่อคือ 0.8 ppm ซึ่งมีค่าใกล้เคียงกับขนาดที่ใช้จริงในการรักษาปรสิตภายนอกของปลาน้ำจืดคือ 1 ppm (Brown, 1993) และใกล้เคียงกับการศึกษาของ Hoy et al, 1991 ที่ใช้กับปลาเรนโบว์เทราท์ (rainbow trout) คือขนาด 1.136 ppm

#### 4.4 ผลของ DDVP ในขนาดที่ไม่ทำให้ปลาตายต่อการทำงานของเอนไซม์โกลีทีนเอสเทอเรส ค่าทางโลหิตวิทยา และการทำงานของตับ

##### 4.4.1 ผลของ DDVP ต่อการทำงานของเอนไซม์โกลีทีนเอสเทอเรส

พบว่า DDVP ทำให้การทำงานของเอนไซม์โกลีทีนเอสเทอเรสลดลงทั้งในสมองและซีรัม โดยเริ่มตั้งแต่หลังจากปลาได้รับ DDVP โดยการแช่ นาน 1 ชั่วโมง ซึ่งนับเป็นวันที่ 0 ของการศึกษา และมีการลดลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเทียบกับปลากลุ่มที่ไม่ได้รับ DDVP จนถึงวันที่ 7 ของการศึกษา ส่วนในวันที่ 14 และ 21 ของการศึกษากการทำงานของเอนไซม์ในปลากลุ่มที่ได้รับ DDVP แม้จะมีค่าลดลงแต่แตกต่างจากกลุ่มที่ไม่ได้รับ DDVP อย่างไม่มีนัยสำคัญ

ทางสถิติ นอกจากนี้ยังพบว่าเมื่อเวลาผ่านไปนานขึ้นการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์จะลดลง และการทำงานของเอนไซม์ที่วัดได้จะเพิ่มสูงขึ้นตามลำดับ แต่ไม่เท่ากับกลุ่มที่ไม่ได้รับ DDVP ผลการศึกษาที่ได้นี้สอดคล้องกับการศึกษาของ Hoy et al, 1991 ที่ทำการศึกษาในปลาเรนโบว์เทราท์เมื่อได้รับ DDVP เป็นเวลานาน 21 วัน พบว่าการทำงานของเอนไซม์ในปลากลุ่มที่ได้รับ DDVP จะลดลงในช่วงวันที่ 0-14 ของการศึกษา และเริ่มมีค่าใกล้เคียงกับปลากลุ่มที่ไม่ได้รับ DDVP ในวันที่ 21 และจากการศึกษาของ Weiss (1961) พบว่าการทำงานของเอนไซม์โกลีเอสเทอเรสในปลากลุ่มที่ได้รับสารปราบศัตรูพืชกลุ่มออร์กาโนฟอสเฟต จะกลับสู่ระดับปกติต้องใช้เวลานาน 1 เดือน เนื่องจากการจับเกาะระหว่างออร์กาโนฟอสเฟตและเอนไซม์เป็นแบบผันกลับได้ ยากจึงต้องอาศัยขบวนการสังเคราะห์เอนไซม์ขึ้นมาใหม่ (Eto, 1974)

มีรายงานถึงระดับวิกฤติของเอนไซม์โกลีเอสเทอเรสแตกต่างกันออกไป จากการศึกษาของ Salte et al. (1987) พบว่าการยับยั้งเอนไซม์โกลีเอสเทอเรสในสมองปลาเทราท์ถึง 96 % จะมีผลทำให้ปลาตาย ในขณะที่ปลาที่รอดชีวิตเอนไซม์ถูกยับยั้ง 70 % จากการศึกษาของ Horsberg, Hoy and Nafstad (1989) พบว่าการยับยั้งเอนไซม์โกลีเอสเทอเรสในสมองปลา salmon ที่มากกว่า 80 % ขึ้นไปมีผลทำให้ปลาตาย ส่วนในปลาที่มีชีวิตอยู่จะที่ค่าการทำงานของเอนไซม์ในสมองอยู่ในช่วง 22-61 % นอกจากนี้ยังได้วัดระดับ DDVP ในเนื้อและตับด้วย พบว่าการทำงานของเอนไซม์ในสมองจะสัมพันธ์กับอาการและเชื่อถือได้มากกว่าการดูระดับของ DDVP ในเนื้อเยื่ออื่น และจากการศึกษาของ Weiss (1959) พบว่าการยับยั้งเอนไซม์โกลีเอสเทอเรสในสมองของปลา 40-70 % เป็นสาเหตุให้ปลาตาย จากการศึกษาครั้งนี้พบว่าในวันที่ 0 ของการทดลองมีการยับยั้งเอนไซม์ในสมองปลาถึง 81.51 % แต่ปลาไม่ตายเพียงแต่มีอาการแสดงอาการผิดปกติเกี่ยวกับการเคลื่อนไหว และการกินอาหาร ซึ่งอาจเกิดจากการที่ปลาแต่ละตัวต่างมีความแตกต่างเฉพาะตัว และใช้ปลาถึง 10 กลุ่มแล้วจึงนำมาหาค่าเฉลี่ยของการยับยั้งเอนไซม์ นอกจากนี้อาจเกิดจากความสามารถของปลาแต่ละตัว ในการปรับตัวต่อภาวะการทำงานของเอนไซม์โกลีเอสเทอเรสที่ลดลงและอะเซทิลโคลีนเพิ่มสูงขึ้น โดยทำให้ตัวรับโคลิเนอร์จิคลดความไวลง (Taylor, 1991) จากการศึกษาพบว่าปลาเริ่มมีอาการดีขึ้นในวันที่ 1 ของการศึกษา ซึ่งสอดคล้องกับการทำงานของเอนไซม์ที่เริ่มเพิ่มขึ้นทั้งในสมองและซีรัม

การวัดค่าการทำงานของเอนไซม์โกลบินเอสเทอเรส สามารถใช้เป็นตัวบ่งชี้ทางชีววิทยา (biological indicator) ที่บ่งชี้ถึงความเป็นพิษของสารกลุ่มออร์กาโนฟอสเฟต โดยตรวจได้จากเนื้อเยื่อเช่น สมอ พลาสมา ซีรัม ตับ หรือแม้แต่เรตินา (Harlin, Hamdy and Beasley, 1989) พบว่าการทำงานของเอนไซม์ในสมอเป็นตัวบ่งชี้ที่ค่อนข้างแน่นอนกว่าเนื้อเยื่ออื่น ข้อเสียของการนำสมอมาใช้ตรวจหาการทำงานของเอนไซม์คือจำเป็นต้องทำให้สัตว์ตายก่อน แต่สัตว์ที่ได้รับสารกลุ่มออร์กาโนฟอสเฟตอาจไม่ตายทุกตัวขึ้นอยู่กับปริมาณและชนิดของสารนั้น ดังนั้นในทางปฏิบัติจึงไม่สามารถนำเอาสมอมาตรวจได้เสมอไป จากการศึกษาครั้งนี้พบว่าการยับยั้งเอนไซม์โกลบินเอสเทอเรสในสมอและซีรัมของปลาที่ได้รับ DDVP มีค่าไปในทิศทางเดียวกัน โดยมีค่าสัมประสิทธิ์ความสัมพันธ์เท่ากับ 0.9918 และมีเปอร์เซ็นต์การยับยั้งใกล้เคียงกัน สอดคล้องกับการศึกษาของ Harlin and Dellinger (1993) ที่พบว่าการตรวจวัดค่าการทำงานของเอนไซม์โกลบินเอสเทอเรสในพลาสมาและสมอของแมวมีค่าใกล้เคียงและมีทิศทางไปทางเดียวกัน จึงเสนอแนะว่าสามารถนำเอาพลาสมาเป็นตัวบ่งชี้ทางชีววิทยาแทนสมอได้

#### 4.4.2 ผลของ DDVP ต่อค่าทางโลหิตวิทยา

จากการศึกษาพบว่าค่าทางโลหิตวิทยาได้แก่ จำนวนเม็ดเลือดขาว จำนวนเม็ดเลือดแดง ฮีมาโตคริต และฮีโมโกลบิน ในปลาตุ๊กที่ได้รับ DDVP เปรียบเทียบกับปลาตุ๊กที่ไม่ได้รับ DDVP มีความแตกต่างกันอย่างไม่มีนัยสำคัญทางสถิติ แต่ในกลุ่มที่ได้รับ DDVP มีแนวโน้มที่จะลดลง นอกจากนี้ยังพบว่าในวันที่ 21 ซึ่งเป็นวันสุดท้ายของการศึกษา จำนวนเม็ดเลือดขาวและเม็ดเลือดแดงในกลุ่มที่ได้รับ DDVP มีแนวโน้มที่จะเพิ่มขึ้น ซึ่งอาจเกิดขึ้นเนื่องจากมี regeneration of hemopoietic tissue ทำให้สร้างเม็ดเลือดขึ้นมาใหม่ (Chinabut et al, 1990) จากการศึกษาของอัจฉริยา ไสละสุต และคนอื่นๆ (2536) พบว่าค่าทางโลหิตวิทยาในปลาตุ๊กกลุ่มที่ได้รับเมทิลพาราไรออนขนาดที่ไม่ทำให้ตายเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุมแตกต่างกันอย่างไม่มีนัยสำคัญทางสถิติ แต่จากการศึกษาของ Rajeswari et al. (1989) พบว่าปลาตุ๊กที่ได้รับ DDVP ขนาด 2 ppm ซึ่งเป็น sublethal dose นาน 30 วันจะมีผลทำให้ค่าฮีมาโตคริต ฮีโมโกลบิน และจำนวนเม็ดเลือดแดงลดลงในวันที่ 7, 15 และ 30 ส่วน Areechon and Plumb (1990) รายงานว่ามาลาไรออนในขนาดที่ไม่ทำให้ปลาตาย มีผลต่อการเปลี่ยนแปลงค่าทาง

โลหิตวิทยาในปลาตุ๊กโดยทำให้จำนวนเม็ดเลือดแดง ค่าฮีมาโตคริต และค่าฮีโมโกลบินเพิ่มขึ้น แต่จำนวนเม็ดเลือดขาวลดลงในเวลา 72 และ 96 ชั่วโมง สำหรับการนับแยกชนิดเม็ดเลือดขาวได้แก่ neutrophils, lymphocytes และ monocytes จากการศึกษาครั้งนี้พบว่าแตกต่างกันอย่างไม่มีนัยสำคัญทางสถิติ เมื่อเปรียบเทียบปลากลุ่มที่ได้รับ DDVP กับกลุ่มที่ไม่ได้รับ DDVP ซึ่งการศึกษานี้สอดคล้องกับการศึกษาของ Areechon and Plumb (1990) ที่พบว่า การนับแยกชนิดเม็ดเลือดขาวของปลาตุ๊กกลุ่มที่ได้รับมาลาโรดอน แตกต่างกันอย่างไม่มีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม

#### 4.4.3 ผลของ DDVP ต่อการทำงานของตับ

จากการศึกษาค่าทางเคมีคลินิกในซีรัมของปลาตุ๊ก ได้แก่ SGOT และ SGPT พบว่าค่า SGOT ในปลากลุ่มที่ได้รับ DDVP แตกต่างอย่างไม่มีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มที่ไม่ได้รับ DDVP ส่วนค่า SGPT ในวันที่ 1 ของการศึกษา พบว่ากลุ่มที่ได้รับ DDVP มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มที่ไม่ได้รับ DDVP โดยค่าที่แตกต่างนั้นมีค่า SGPT ในกลุ่มควบคุมสูงกว่ากลุ่มควบคุมในวันอื่นๆด้วย ทั้งนี้อาจเนื่องมาจากมีความผิดปกติของตับในปลากลุ่มนั้น (Cole, 1980) จากการศึกษาของอัจฉริยา ไศละสุต และคนอื่นๆ (2536) พบว่าค่า SGPT ในปลากลุ่มที่ได้รับเมทิลพาราโรดอนแตกต่างอย่างไม่มีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม ส่วนค่า SGOT ที่เวลาเริ่มต้นมีค่าสูงเมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม เนื่องจากในกลุ่มที่ได้รับเมทิลพาราโรดอน มีค่า SGOT ในกลุ่มสูงอยู่แล้ว และจากรายงานของ Shobha-Rani, Venkateshwarlu and Janaiah (1989) ทำการศึกษาในปลาตุ๊กที่ได้รับไตรคลอโรฟอนซึ่งเป็นสารที่สามารถเปลี่ยนเป็น DDVP ได้ พบว่าเมื่อให้ไตรคลอโรฟอนขนาด sublethal dose คือ 2 ppm ในช่วงเวลา 48 และ 96 ชั่วโมง ทำให้ค่า SGOT และ SGPT สูงขึ้นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม

### สรุปผลและข้อเสนอแนะ

ผลการศึกษาค้นพบว่า DDVP ในขนาดที่ไม่ทำให้ปลาตายมีผลยับยั้งการทำงานของ เอนไซม์โมลินเอสเทอเรส และก่อให้เกิดอาการของความเป็นพิษแบบเฉียบพลันจากฤทธิ์ของ DDVP ชั่วขณะ แต่ไม่มีผลต่อค่าทางโลหิตวิทยาและการทำงานของตับ จึงไม่ก่อให้เกิดอาการพิษแบบเรื้อรังของ DDVP ผลที่ได้จากการศึกษานี้อาจนำไปใช้เป็นแนวทางในการประยุกต์ใช้ DDVP ในขนาดที่ไม่ทำให้ปลาตายเพื่อขจัดปรสิตภายนอกตัวปลาได้ โดยปลาอาจแสดงอาการผิดปกติบ้างในช่วงแรกที่ได้รับ DDVP และมีการทำงานของเอนไซม์โมลินเอสเทอเรสลดลงแต่ไม่ทำให้เกิดอันตรายต่อตับและระบบเม็ดเลือดของปลาในระยะ 21 วันที่ทำการศึกษา สิ่งที่ยังเป็นคำถาม และควรศึกษาต่อคือหากใช้ DDVP ในขนาด 0.8 ppm โดยการแช่ปลานาน 1 ชั่วโมงจะสามารถกำจัดปรสิตภายนอกตัวปลาได้หมดหรือไม่ และควรศึกษาเพิ่มเติมถึงการให้ DDVP ชั่วในการกำจัด โดยต้องพิจารณาถึงวงจรชีวิตของปรสิตชนิดที่เกิดขึ้นกับปลานั้นๆ ประกอบรวมทั้งอัตราการสลายตัวของ DDVP ในน้ำ เพื่อศึกษาถึงผลกระทบของ DDVP ต่อสิ่งแวดล้อม