รายงานผลการวิจัย
ทุนวิจัยงบประมาณแผ่นดิน ปี พ.ศ. 2536

เรื่อง

การศึกษาผลของสารเคมีกำจัดแมลงกลุ่มออกาโนฟอสเฟต ต่อการเปลี่ยนแปลงทางโลหิตวิทยา พยาธิวิทยา และระดับเอนไซม์โคลีนเอสเตอเรสในปลาดุก

(Effects of organophosphate insecticide on hematological, pathological changes and cholinesterase activity of the catfish)

668.651
7296ก
จ.1

โดย

วรา พานิชเกรียงไกร
อัจฉริยา ไศละสูต

คณะสัตวแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

รายงานผลการวิจัย

ทุนวิจัยงบประมาณแผ่นดิน ปี พ.ศ. 2536

เรื่อง

การศึกษาผลของสารเคมีกำจัดแมลงกลุ่มออกาโนฟอสเฟตต่อการเปลี่ยนแปลงทางโลหิตวิทยา พยาธิวิทยา และระดับเอนไซม์โมลีนเอสเตอเรสในปลาดุก

Effects of organophosphate insecticide on hematological, pathological changes and cholinesterase activity of the catfish

วรา พานิชเกรียงไกร
อัจฉริยา ไศละสูต

คณะสัตวแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

I18540429

กองส่งเสริมและประสานงานวิจัย จุฬาฯ
มอบให้ สาง ศถ วิ...
จุฬ ...ณ์มหาวิทยาลัย
16 / พ.ศ. / 37

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

668.651
ก 296ก
ค.1

สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อ	i
Summary	ii
บทนำ	1
อุปกรณ์และวิธีการ	2
ผลการทดลอง	4
วิจารณ์	31
กิตติกรรมประกาศ	36
เอกสารอ้างอิง	37

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

การศึกษาผลของสารเคมีกำจัดแมลงกลุ่มออกาโนฟอสเฟตต่อการเปลี่ยนแปลงทางโลหิตวิทยา พยาธิวิทยาและระดับเอนไซม์โพลีนเอสเตอเรสในปลาดุก

วรา พานิชเกรียงไกร
อัจฉริยา ไสละสูต

บทคัดย่อ

ศึกษาค่า median lethal concentration ของเมทิลพาราไธออนต่อปลาดุกที่เวลา 96 ชั่วโมง (LC_{50}, 96 hrs.) พบมีค่า 38 ppm. และ sublethal concentration มีค่า 10 ppm

นำค่า sublethal concentration ไปศึกษาผลต่อค่าทางโลหิตวิทยา เคมีคลินิค และ พยาธิวิทยา ไม่พบมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญเมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม ส่วนการศึกษาทางจุลพยาธิวิทยาของอวัยวะภายในกลุ่มปลาทดลอง พบมีการเสื่อมสภาพของเซลล์ตับอย่างมีนัยสำคัญ รวมทั้งมีการสะสมของรงควัตถุของเม็ดเลือดแดงในไตและม้าม นอกจากนี้ ระดับเอนไซม์โพลีนเอสเตอเรสในซีรั่มของปลากลุ่มที่ได้รับยาจะมีระดับต่ำกว่ากลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญตั้งแต่สัมผัสยาได้ 12 ชั่วโมง และลดลงตามลำดับจนถึง 96 ชั่วโมง เปอร์เซนต์ของเอนไซม์โพลีนเอสเตอเรสลดลงเหลือ 8.06% ที่ 96 ชั่วโมง คิดเป็นเปอร์เซนต์การยับยั้งเอนไซม์ 91.94%

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

Effects of organophosphate insecticide on hematological, pathological changes and cholinesterase activity of the catfish

Wara Panichkriangkrai
Achariya Sailasuta

Summary

Median lethal concentration of methyl parathion at 96 hrs. (LC_{50}, 96 hrs.) in the catfish was found to be 38 ppm and sublethal concentration was 10 ppm.

Effects of sublethal concentration of methyl parathion on hematology, blood chemistry and pathology was not significantly different from those of the control group. Histopathology findings of the visceral organs revealed the evidence of significant liver cell degeneration and hemosiderosis of kidney and spleen. Serum level of cholinesterase has been found to be significantly lower than that of the control since 12 hr.-exposure. The decrease was gradual until the level of 8.06% was detected at the end of the experiment (96 hrs). In other word, the enzyme inhibition was 91.94% at 96 hr.-exposure.

บทนำ

ประเทศไทยเป็นประเทศเกษตรกรรมซึ่งอยู่ในเขตร้อน มีสภาพภูมิอากาศที่เอื้ออำนวยต่อการแพร่ระบาดของศัตรูพืช พบว่าสิ่งสำคัญที่ทำให้การผลิตอาหารในทวีปเอเชียลดลงกว่าเป้าที่กำหนดไว้ถึง 30% ก็คือศัตรูพืชที่คอยทำลายพืชผลและผลิตภัณฑ์ทางการเกษตร ในการเพิ่มผลทางการเกษตร นอกจากจะต้องใช้พืชพันธุ์ดี การบำรุงรักษาดีแล้วยังต้องมีการป้องกันกำจัดศัตรูพืชที่ได้ผลอีกด้วย เกษตรกรชาวไทยนิยมใช้สารเคมีในการป้องกันและปราบปรามศัตรูพืช จากสถิติการนำสารเคมีดังกล่าวเข้ามาใช้ภายในประเทศ พบว่ามีการใช้สารเคมีปราบศัตรูพืชเพิ่มขึ้นทุกปี ในจำนวนนี้เมทิลพาราไธออนซึ่งเป็นสารกำจัดศัตรูพืชกลุ่มออกาโนฟอสเฟตเป็นตัวที่มีสถิติการนำเข้าและการใช้สูงที่สุด (ปรีชาและคณะ, 1988) การใช้สารเคมีกำจัดศัตรูพืชอย่างไม่ระมัดระวังอาจก่อให้เกิดมลพิษกับสิ่งแวดล้อม มีการปนเปื้อนของสารเหล่านี้ในดิน น้ำ ตะกอนดิน ผลิตผลทางการเกษตร ตลอดจนสิ่งมีชีวิตที่อาศัยอยู่ในแหล่งน้ำนั้น ๆ (สุรภี, 1989) ระดับความรุนแรงจะขึ้นกับปัจจัยต่าง ๆ เช่น ชนิดและระดับความเข้มข้นของสารกำจัดศัตรูพืช ความต้านทานของสิ่งมีชีวิต ผลกระทบของสารกำจัดศัตรูพืชตั้งแต่ 2 ชนิดขึ้นไป ซึ่งอาจต้านหรือเสริมฤทธิ์กัน ผลกระทบต่อสัตว์น้ำในขนาดรุนแรง อาจทำให้สัตว์น้ำตายอย่างรวดเร็วหรือหากเป็นความเข้มข้นในระดับที่ไม่ทำให้ถึงตายก็จะเป็นอันตรายต่ออวัยวะและระบบต่าง ๆ ของร่างกายตลอดจนพฤติกรรม ขบวนการทางสรีรวิทยา และพันธุกรรม เป็นต้น ซึ่งจะมีลักษณะค่อยเป็นค่อยไป ความเข้มข้นประเภทหลังนี้จะต่ำกว่าความเข้มข้นที่ทำให้สัตว์ตาย เรียกว่า sublethal concentration

เมทิลพาราไธออน เป็นสารเคมีในกลุ่มออกาโนฟอสเฟต มีชื่อเคมีว่า O-O-dimethyl-O-(p-nitrophenyl) phosphorothioate มีกลไกในการออกฤทธิ์โดยยับยั้งการทำงานของเอนไซม์โฆลีนเอสเตอเรส (cholinesterase enzyme, ChE) ก่อให้เกิด phosphorylated enzyme และมีการสะสมของอะซิทิลโฆลีน (acetylcholine, ACh) ทำให้มีผลต่อระบบต่าง ๆ ของร่างกายที่ถูกควบคุมโดย parasympathetic division ของระบบประสาทอัตโนมัติ ขณะเดียวกันระดับของเอนไซม์โฆลีนเอสเตอเรสจะลดต่ำลงเนื่องจากการจับเกาะของสารเคมีและเอนไซม์เป็นไปอย่างถาวร (Taylor, 1991) มีรายงานการใช้สารเคมีกลุ่มออกาโนฟอสเฟตคือ trichlorfon ขนาด 300 มก./ลิตร เพื่อรักษาปรสิตภายนอกของปลา พบว่าปลาเทราต์ (rainbow trout, Salmo gairdneri) ตาย 30-90% หลังการรักษา โดยมีระดับเอนไซม์โฆลีนเอสเตอเรสลดลงถึง 96% ส่วนปลาที่รอดชีวิตจะมีระดับเอนไซม์เหลือเพียง 30% เทียบกับปลาปกติ (Salte, et al., 1987) เป็นที่ยอมรับว่าการวัดระดับเอนไซม์โฆลีนเอสเตอเรสในเลือด สมองและกล้ามเนื้อจะเป็นสิ่งที่บ่งชี้ได้ถึงการเกิดพิษจากสารกำจัดศัตรูพืชกลุ่มออกาโนฟอสเฟต (Murphy et al., 1968; Darlington et al., 1971)

มีรายงานถึงผลกระทบของสารเคมีกำจัดศัตรูพืชกลุ่มออกาโนฟอสเฟตต่อค่าทางโลหิตวิทยาของปลาดุก โดย Mukhopadyhay และ Dehadrai (1980) ว่า มาลาไธออนมีผลทำให้จำนวนเม็ดเลือดแดงลดลง (erythropenia) ส่วน Areechon และ Plumb (1990) รายงานว่ามาลาไธออนทำให้เม็ดเลือดแดงในปลา channel catfish เพิ่มสูงขึ้น จำนวนเม็ดเลือดขาวลดลง ปลามีการเคลื่อนไหวผิดปกติ เสียการทรงตัว และมีกระดูกสันหลังผิดปกติ

จากรายงานดังกล่าวแสดงให้เห็นว่าสารเคมีกลุ่มออกาโนฟอสเฟตมีความเป็นพิษต่อสัตว์น้ำ เช่น ปลาหลาย ๆ ชนิด จึงเป็นที่น่าสนใจที่จะศึกษาถึงผลของสารกลุ่มนี้ในขนาดไม่ทำให้ปลาตาย (sublethal concentration) ที่อาจมีต่อปลาดุกในแง่ของโลหิตวิทยา พยาธิวิทยา และการเปลี่ยนแปลงของระดับเอนไซม์โฆลีนเอสเตอเรส เพื่ออาจนำเอาผลเหล่านี้มาเป็นสิ่งชี้บอก (indicator) ในการวินิจฉัยเมื่อเกิดการระบาดของโรคปลาที่อาจมีสาเหตุมาจากการปนเปื้อนของสารกำจัดศัตรูพืชนี้ในแหล่งน้ำ

อุปกรณ์และวิธีการ

แบ่งการทดลองเป็น 2 ขั้นตอน คือ

1. การศึกษาหาค่า median lethal concentration ในเวลา 96 ชั่วโมง (LC_{50}, 96 hrs.) และค่า sublethal concentration ในเวลา 96 ชั่วโมง ของเมทธิลพาราไธออนต่อปลาดุก

2. นำค่า sublethal concentration มาใช้ศึกษาผลต่อปลาดุกในแง่ของโลหิตวิทยา ค่าเคมีคลินิค การเปลี่ยนแปลงทางพยาธิวิทยาและจุลพยาธิวิทยาตลอดจนผลต่อระดับเอนไซม์โฆลีนเอสเตอเรส

การหาค่า LC_{50}, 96 hrs.

ปลาดุกที่ใช้ศึกษาเป็นปลาดุกพันธุ์ผสมระหว่างปลาดุกอุยและปลาดุกรัสเซียจากบ่อเพาะเลี้ยง ขนาดความยาวเฉลี่ย 20 เซนติเมตร น้ำหนักประมาณ 250 กรัม แบ่งปลาเป็น 6 กลุ่ม ๆ ละ 5 ตัว เลี้ยงแยกแต่ละกลุ่มในถังไฟเบอร์กลาสสี่เหลี่ยม จุน้ำ 50 ลิตร อุณหภูมิ 26-27° ซ. pH 6-7 โดยมีกลุ่มควบคุม 1 กลุ่ม และกลุ่มทดลองที่ได้รับเมทธิลพาราไธออน (Folidol, 50% เมทธิลพาราไธออน) ในระดับต่าง ๆ 5 กลุ่มที่ความเข้มข้น 20, 25, 30, 40 และ 50 ppm. ตามลำดับ สังเกตอาการและบันทึกจำนวนปลาที่ตายจนครบ 96 ชั่วโมง นำค่าที่ได้มาหาค่า LC_{50} ตามวิธีของ Litchfield and Wilcoxon (1949)

อ่านค่า sublethal concentration ของเมททิลพาราไธออนจากกราฟที่ได้และนำค่านั้นมาศึกษาถึงผลต่อค่าโลหิตวิทยา ค่าเคมีคลินิค การเปลี่ยนแปลงทางพยาธิวิทยา จุลพยาธิวิทยา และผลต่อระดับเอนไซม์โฆลีนเอสเตอเรส

<u>การศึกษาผลต่อค่าทางโลหิตวิทยา เคมีคลินิค พยาธิวิทยา จุลพยาธิวิทยา และระดับเอนไซม์โฆลีนเอสเตอเรสโดยใช้ sublethal concentration ของเมททิลพาราไธออน (10 ppm)</u>

แบ่งปลาทดลองเป็น 2 กลุ่ม ๆ ละ 25 ตัว เลี้ยงในถังไฟเบอร์กลาสสี่เหลี่ยมจุน้ำ 200 ลิตร อุณหภูมิ 26-27° ซ. pH 6-7 ปลากลุ่มที่ 1 เป็นกลุ่มควบคุม กลุ่มที่ 2 เป็นกลุ่มทดลองที่ได้รับเมททิลพาราไธออนในขนาด sublethal concentration (จากการทดลองในช่วงแรกพบว่ามีค่า 10 ppm) ทำการเจาะเลือดปลาทั้ง 2 กลุ่มที่เวลา 0, 12, 24, 48, 72 และ 96 ชั่วโมง โดยเจาะที่ด้าน ventral ของตัวปลา สูงขึ้นมาจากโคนหาง 1-1 1/2 นิ้ว แบ่งเลือดที่เจาะได้ออกเป็น 2 ส่วน

ส่วนที่หนึ่ง เลือดปริมาณ 1 มล. ในขวดที่มี EDTA (ethylene diamine tetraacetic acid) เป็นสารกันเลือดแข็งตัว นำเลือดมาหาค่าฮีมาโตคริต, ฮีโมโกลบิน ทำ complete blood count (CBC) ตรวจนับเม็ดเลือดแยกชนิด (differential cell count) โดยใช้วิธี Benjamin (1961)

ส่วนที่สอง เลือดปริมาณ 5 มล. ตั้งทิ้งไว้ให้แข็งตัว ปั่นแยกเอาซีรั่ม นำ 0.5 มล. ตรวจหาค่า SGOTSGPT และ BUN โดยวิธีของ Benjamin (1961)

นำซีรั่มอีก 0.5 มล. ไปตรวจหาระดับเอนไซม์โฆลีนเอสเตอเรสโดยประยุกต์จากวิธีของ Ellman <u>et al.</u> (1961)

นำตัวอย่างปลามาศึกษาการเปลี่ยนแปลงทางพยาธิวิทยา และนำตัวอย่างอวัยวะ ได้แก่ ตับ ไต ม้าม และเหงือก เก็บในน้ำยาฟอร์มาลีน 10 % มาศึกษาการเปลี่ยนแปลงทางจุลพยาธิวิทยา

ทำการทดลองเลี้ยงปลาซ้ำ 10 ครั้ง หาค่าเฉลี่ยของเม็ดเลือดทั้ง complete blood count และแยกชนิด รวมทั้งค่า SGOT, SGPT, BUN และระดับเอนไซม์โฆลีนเอสเตอเรส ทดสอบความแตกต่างระหว่างกลุ่มควบคุมและกลุ่มทดลองโดยใช้ unpaired Student's t test

ผลการทดลอง

ค่า LC_{50} ที่เวลา 96 ชั่วโมง

พบว่าปลากลุ่มที่ได้รับเมททิลพาราไธออนจะแสดงอาการตื่นเต้น กระวนกระวาย เคลื่อนไหวผิดปกติ และว่ายน้ำขึ้นมาหายใจที่ขอบอ่าง อัตราการตายของปลาจะเพิ่มขึ้นตามขนาดของเมททิลพาราไธออนที่เพิ่ม ดังตารางที่ 1

ตารางที่ 1 ผลของเมททิลพาราไธออนในขนาดต่าง ๆ ต่ออัตราการตายของปลาในช่วงเวลาสัมผัสยา 96 ชั่วโมง

กลุ่ม	เมททิลพาราไธออน (ppm)	อัตราการตาย	% การตาย
1	0	0/5	0
2	20	0/5	0
3	25	1/5	20
4	30	3/5	60
5	40	3/5	60
6	50	5/5	100

นำค่าที่ได้ไปหาค่า median lethal concentration ที่ 96 ชั่วโมง (LC_{50}, 96 hrs.) ตามวิธีของ Litchfield and Wilcoxon (1961) ได้ค่า LC_{50}, 96 hrs. เป็น 38 ppm และ sublethal concentration มีค่า 10 ppm ซึ่งเป็นค่าที่นำไปทดลองศึกษาผลต่อระดับเอนไซม์โพลีนเอสเตอเรสในขั้นต่อไป

หอสมุดกลาง สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ผลของ sublethal concentration ของเมทธิลพาราไธออน (10 ppm) ต่อค่าทางโลหิตวิทยา เคมีคลินิค พยาธิวิทยา จุลพยาธิวิทยา และระดับเอนไซม์โพลีนเอสเตอเรส

ผลต่อค่าทางโลหิตวิทยา พบว่าจำนวนเม็ดเลือดแดง ฮีมาโตคริต ฮีโมโกลบิน และจำนวนเม็ดเลือดขาวของปลาในกลุ่มทดลอง ไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p>0.05$) เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม ตารางที่ 2 เป็นการสรุปค่าจากกลุ่มควบคุม ตารางที่ 3 สรุปค่าจากกลุ่มทดลองส่วนตารางที่ 4, 5, 6, 7, 8, 9 และ 10 เป็นการแสดงรายละเอียดของจำนวนเม็ดเลือดแดง ค่าฮีมาโตคริต ค่าฮีโมโกลบิน จำนวนเม็ดเลือดขาวโดยรวม เม็ดเลือดขาวชนิดนิวโตรฟิล เม็ดเลือดขาวชนิดลิมโฟไซต์ เม็ดเลือดขาวชนิดโมโนไซต์ เปรียบเทียบระหว่างกลุ่มควบคุมและกลุ่มทดลองตามเวลาที่ผ่านไปตามลำดับ

เป็นที่น่าสังเกตจากตารางที่ 8 พบว่าค่านิวโตรฟิลของกลุ่มทดลองที่เวลา 24 ชั่วโมง มีค่าต่ำกว่ากลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญ ($p < 0.05$)

ผลต่อค่าเคมีคลินิค พบว่าค่า SGOT ของกลุ่มควบคุมแตกต่างจากกลุ่มทดลองที่เวลาเริ่มต้นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.01$, ตารางที่ 11) แต่หลังจากนั้นค่าจะใกล้เคียงกัน สำหรับค่า SGPT และ BUN ไม่พบว่ามีความแตกต่างระหว่างกลุ่มทดลองและกลุ่มควบคุม ตั้งแต่ต้นจนสิ้นสุดการทดลอง (ตารางที่ 12, 13)

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 2 แสดงค่าทางโลหิตวิทยา (ค่าเฉลี่ย ± S.D.) ของปลาดุกกลุ่มควบคุม (n = 10) ในเวลาต่างกัน

ค่า	เวลา (ชั่วโมง)					
	0	12	24	48	72	96
WBC (cells/mm^3)	284800.00± 16000.00	277066.67± 99179.00	265750.00± 71654.36	315200.00± 15030.52	385650.00± 127052.99	278100.00± 113216.03
RBCx10^6 (cells/mm^3)	6.10±1.58	4.33±1.10	5.80±1.62	4.93±0.41	5.38±0.90	4.98±0.71
Hct. (%)	36.67±9.53	26.00±6.53	34.75±9.68	29.75 2.49	30.75 3.96	30.00 4.18
Hb. (gram %)	12.23±3.19	8.67±2.16	4.58±3.22	9.95±0.83	10.25±1.32	9.90±1.33
Neutrophil (%)	2.5 ±0.71	4.00±1.41	4.5±0.7	1.5±0.7	4.0±4.2	2.5±.71
Lymphocyte (%)	12.5±6.36	8.12±2.83	16.0±0.5	13±1.41	11±8.48	19±0.73
Monocyte (%)	86±8.49	88±8.48	79.5±0.71	85.5±2.12	85±4.24	83.5±0.71

ตารางที่ 3 แสดงค่าทางโลหิตวิทยา (ค่าเฉลี่ย ± S.D.) ของ ปลาดุกกลุ่มทดลองที่ได้รับเมทิลพาราไธออนในขนาด sublethal concentration (10 ppm) ในเวลาต่างกัน (n = 10)

ค่า	เวลา (ชั่วโมง)					
	0	12	24	48	72	96
WBC (cells/mm^3)	239733.33± 54295.99	227680.00± 75281.47	237560.00± 72581.71	224900.00± 88287.37	270688.89± 100155.83	231620.00± 119954.45
RBCx10^6 (cells/mm^3)	6.30±2.45	5.61±1.63	6.66±1.61	5.21±0.99	5.44±1.36	5.83±1.29
Hct. (%)	37.78±12.9	33.67±6.95	40.00±9.55	31.30±5.96	32.60±8.60	34.90±7.68
Hb. (gram %)	12.59±4.29	11.22±2.31	13.34±3.17	10.44±1.98	10.86±2.74	11.62±2.55
Neutrophil (%)	6.8±7.6	2.4±1.14	2.2±1.09	3.2±1.3	3.4±2.07	4.6±1.8
Lymphocyte (%)	10.8±10.55	4.8±2.77	18.2±9.5	13.2±8.13	11.6±7.46	10.4±2.70
Monocyte (%)	82.6±8.93	93±3.94	79.41± 10.53	83.6±7.86	83.6±9.74	85±4.12

ตารางที่ 4 เปรียบเทียบจำนวนเม็ดเลือดแดง (ค่าเฉลี่ย ± S.D.) ระหว่างปลาดุกกลุ่มควบคุมและกลุ่มทดลองที่ได้รับเมททิลพาราไธออนขนาด sublethal concentration (10 ppm) ในเวลาต่างกัน

เวลาที่ผ่านไป (ชม.)	เม็ดเลือดแดง (x 10^6 cells/mm^3)	
	กลุ่มควบคุม (n = 10)	กลุ่มทดลอง (n = 10)
0	6.10±0.91	6.30±0.72
12	4.33±0.64	5.61±0.39
24	5.80±0.81	6.66±0.51
48	4.93±0.21	5.21±0.32
72	5.38±0.45	5.44±0.43
96	4.98±0.35	5.83±0.41

ตารางที่ 5 เปรียบเทียบค่าฮีมาโตคริต (ค่าเฉลี่ย ± S.D.) ระหว่างปลาดุกกลุ่มควบคุมและกลุ่มทดลองที่ได้รับเมททิลพาราไธออนขนาด sublethal concentration (10 ppm) ในเวลาต่างกัน

เวลาที่ผ่านไป (ชม.)	ฮีมาโตคริต (%)	
	กลุ่มควบคุม (n = 10)	กลุ่มทดลอง (n = 10)
0	36.67±5.50	37.78±4.29
12	26.00±3.77	33.67±2.32
24	34.75±4.84	40.00±3.02
48	29.75±1.24	31.30±1.89
72	30.75±1.98	32.60±2.59
96	30.00±2.06	34.90±2.43

ตารางที่ 6 เปรียบเทียบจำนวนฮีโมโกลบิน (ค่าเฉลี่ย ± S.D.) ระหว่างปลาดุกกลุ่มควบคุมและกลุ่มทดลองที่ได้รับเมททิลพาราไธออนขนาด sublethal concentration (10 ppm) ในเวลาต่างกัน

เวลาที่ผ่านไป (ชม.)	ฮีโมโกลบิน (g%)	
	กลุ่มควบคุม (n = 10)	กลุ่มทดลอง (n = 10)
0	12.23±1.84	12.59±1.43
12	8.67±1.29	11.22±0.77
24	11.56±1.25	13.34±1.00
48	9.95±0.41	10.44±0.63
72	10.25±0.66	10.86±0.87
96	9.90±0.67	11.62±0.81

ตารางที่ 7 เปรียบเทียบจำนวนเม็ดเลือดขาว (ค่าเฉลี่ย ± S.D.) ระหว่างปลาดุกกลุ่มควบคุมและกลุ่มทดลองที่ได้รับเมททิลพาราไธออนขนาด sublethal concentration (10 ppm) ในเวลาต่างกัน

เวลาที่ผ่านไป (ชม.)	จำนวนเม็ดเลือดขาว (cells/mm^3)	
	กลุ่มควบคุม (n = 10)	กลุ่มทดลอง (n = 10)
0	284200.00±11313.71	239733.33±18098.50
12	277066.67±57261.14	227680.00±23806.09
24	265750.00±35827.18	237560.00±22952.35
48	315200.00±86777.77	224900.00±27918.92
72	385650.00±63525.99	270688.89±31672.06
96	278100.00±56608.02	231620.00±37932.93

ตารางที่ 8 เปรียบเทียบจำนวนเม็ดเลือดขาว ชนิด neutrophil (ค่าเฉลี่ย ± S.D.) ระหว่างปลาดุกกลุ่มควบคุมและกลุ่มทดลองที่ได้รับเมทิลพาราไธออนขนาด sublethal concentration (10 ppm) ในเวลาต่างกัน

เวลาที่ผ่านไป (ชม.)	เม็ดเลือดขาวชนิด neutrophil (%)	
	กลุ่มควบคุม (n = 10)	กลุ่มทดลอง (n = 10)
0	2.5±0.71	6.8±7.6
12	4.0±1.41	2.4±1.14
24	4.5±0.7	2.2±1.09*
48	1.5±0.7	3.2±1.3
72	4.0±4.2	3.4±2.07
96	2.5±0.71	4.6±1.8

* แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$) เมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุมในเวลาเดียวกัน

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 9 เปรียบเทียบจำนวนเม็ดเลือดขาวชนิด lymphocyte (ค่าเฉลี่ย ± S.D.) ระหว่างปลาดุกกลุ่มควบคุมและกลุ่มทดลองที่ได้รับเมทิลพาราไธออนขนาด sublethal concentration (10 ppm) ในเวลาต่างกัน

เวลาที่ผ่านไป (ชม.)	เม็ดเลือดขาวชนิด lymphocyte (%)	
	กลุ่มควบคุม (n=10)	กลุ่มทดลอง (n=10)
0	12.5±6.36	10.8±10.55
12	8.12±2.83	4.8±2.77
24	16.0±0.5	18.2±9.5
48	13.0±1.41	13.2±8.13
72	11.0±8.48	11.6±7.46
96	19.0±0.73	10.4±2.70

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 10 เปรียบเทียบจำนวนเม็ดเลือดขาวชนิด monocyte (ค่าเฉลี่ย ± S.D.) ระหว่างปลาดุกกลุ่มควบคุมและกลุ่มทดลองที่ได้รับเมททิลพาราไธออนขนาด sublethal concentration (10 ppm) ในเวลาต่างกัน

เวลาที่ผ่านไป (ชม.)	เม็ดเลือดขาวชนิด monocyte (%)	
	กลุ่มควบคุม (n = 10)	กลุ่มทดลอง (n = 10)
0	86.0±8.49	82.6±8.93
12	88.0±8.48	93.0±3.94
24	79.5±0.71	79.4±10.53
48	85.5±2.12	83.6±7.86
72	85.0±4.24	83.6±9.74
96	78.5±0.71	85.0±4.12

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 11 เปรียบเทียบค่าการทำงานของตับ (SGOT) (ค่าเฉลี่ย ± S.D.) ระหว่างปลาดุกกลุ่มควบคุมและกลุ่มทดลองที่ได้รับเมทิลพาราไธออนขนาด sublethal concentration (10 ppm) ในเวลาต่างกัน

เวลาที่ผ่านไป (ชม.)	SGOT (units)	
	กลุ่มควบคุม (n = 10)*	กลุ่มทดลอง (n = 10)
0	80.50± 6.50**	137.00±16.40
12	152.75±22.98	137.20± 9.26
24	152.50±26.92	150.90±15.87
48	151.00±29.83	146.32±20.16
72	125.00±30.75	96.90±11.26
96	102.75±13.19	100.90±16.69

* ยกเว้นที่เวลาศูนย์ (0) ซึ่งค่า n = 2

** มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.01$) เมื่อเทียบกับปลากลุ่มทดลองในเวลาเดียวกัน

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 12 เปรียบเทียบค่าการทำงานของตับ (SGPT) ระหว่างปลากลุ่มควบคุมและกลุ่มทดลองที่ได้รับเมททิลพาราไธออนขนาด sublethal concentration (10 ppm) ในเวลาต่างกัน

เวลาที่ผ่านไป (ชม.)	SGPT (units)	
	กลุ่มควบคุม(n = 10)	กลุ่มทดลอง(n = 10)
0	6.67±3.31	11.00±2.04
12	10.75±3.19	6.40±0.95
24	5.75±1.02	10.00±1.79
48	17.50±8.43	11.65±4.24
72	9.00±3.02	5.50±1.12
96	12.00±5.61	11.00±4.15

ตารางที่ 13 เปรียบเทียบค่าการทำงานของไต (BUN) ระหว่างปลากลุ่มควบคุมและกลุ่มทดลองที่ได้รับเมททิลพาราไธออนขนาด sublethal concentration (10 ppm) ในเวลาต่างกัน

เวลาที่ผ่านไป (ชม.)	BUN (mg. %N_2)	
	กลุ่มควบคุม(n = 10)	กลุ่มทดลอง(n = 10)
0	3.03±0.45	2.76±0.18
12	2.32±0.28	2.72±0.23
24	2.50±0.39	2.60±0.40
48	2.35±0.18	1.87±0.24
72	2.18±0.30	2.00±0.12
96	1.85±0.16	1.78±0.08

ผลทางพยาธิวิทยา จากการตรวจทางพยาธิวิทยาด้วยตาเปล่า (gross pathology) ไม่พบรอยโรคที่มีนัยสำคัญทั้งในกลุ่มควบคุมและกลุ่มทดลอง

ผลการศึกษาทางจุลพยาธิวิทยา (histopathology) ดังแสดงในตารางต่อไปนี้

ตารางที่ 14 แสดงการเปลี่ยนแปลงทางจุลพยาธิวิทยาของปลากลุ่มควบคุมที่ไม่ได้รับยา

อวัยวะที่ตรวจ / ชม.		การเปลี่ยนแปลงทางจุลพยาธิวิทยาเมื่อเวลาผ่านไป [จำนวนเปลี่ยนแปลง / จำนวนตัวอย่าง x100 = %]					
		0	12	24	48	72	96
ตับ		NR (100%)	FC(+1) (50%)	FC (+1) (70%)	FC (+1) (20%)	FC (+1) (50%)	FC (+1) (40%))
ไต		NR (100%)	NR (100%)	NR (100%)	NR (100%)	NR (100%)	NR (100%)
ม้าม		NR (100%)	NR (100%)	Con (20%)	NR (100%)	NR (100%)	NR (100%)
เหงือก	dendrite	NR (100%)	NR (100%)	MC (20%)	MC (30%)	NR (100%)	NR (100%)
	gill	NR (100%)	AG (10%)	NR (100%)	NR (100%)	NR (100%)	NR (100%)

NR (normal) = ปกติ

FC (fatty change) = การเสื่อมของเซลล์ตับแบบมีไขมันแทรก น้อย +1, ปานกลาง +2, มาก +3

Con (congestion) = สภาพคั่งเลือด

MC (mycotic infection on mucosal layer) = การติดเชื้อราบนเยื่อบุผิว

AG (activated globlet cells) = ต่อมเมือกทำงานมากกว่าปกติ

จากตารางที่ 14 พบว่าการเปลี่ยนแปลงทางจุลพยาธิวิทยาของอวัยวะต่าง ๆ ของปลาดุกในกลุ่มควบคุมในช่วงระยะเวลาต่าง ๆ โดยทั่วไปไม่พบรอยโรคที่สำคัญทางพยาธิวิทยาอย่างมีนัยสำคัญ รอยโรคที่พบ ได้แก่ การเสื่อมสภาพของเซลล์ตับแบบมีไขมันแทรก (fatty change) ระดับน้อย (+1) ในชั่วโมงที่ 12, 24, 48, 72, 96 ประมาณ 50% ของตัวอย่างที่ตรวจ การคั่งเลือดในม้ามในชั่วโมงที่ 24 การติดเชื้อราซึ่งอาจปนเปื้อนในน้ำบนเยื่อบุเหงือกในชั่วโมงที่ 24, 48 และการสร้างเมือกมากกว่าปกติของเหงือกในชั่วโมงที่ 12 เป็นต้น

ตารางที่ 15 แสดงการเปลี่ยนแปลงทางจุลพยาธิวิทยาของกลุ่มปลาทดลองที่ได้รับเมทิลพาราไธออนขนาด sublethal concentration (10 ppm) ในเวลาต่างกัน

อวัยวะที่ตรวจ / ชม.		การเปลี่ยนแปลงทางจุลพยาธิวิทยาเมื่อเวลาผ่านไป $\left[\frac{\text{จำนวนเปลี่ยนแปลง}}{\text{จำนวนตัวอย่าง}} \times 100\ \%\right]$					
		0	12	24	48	72	96
ตับ		NR (100%)	FC(+1) (20%)	FC (+1) (30%)	FC (+2) (70%)	FC (+2) (50%)	FC (+3) (90%))
ไต		NR (100%)	NR (100%)	HS (40%)	HS (50%)	HS (20%)	HS (40%) HS/HM(10%)
ม้าม		NR (100%)	NR (100%)	HS (50%)	HS (40%)	HS (50%)	HS (30%)
เหงือก	dendrite	NR (100%)	NR (100%)	NR (100%)	NR (100%)	NR (100%)	NR (100%)
	gill	NR (100%)	NR (100%)	NR (100%)	NR (100%)	NR (100%)	NR (100%)

NR (normal) = ปกติ

FC (fatty change) = การเสื่อมของเซลล์ตับแบบมีไขมันแทรก
น้อย +1, ปานกลาง +2, มาก +3

HS (hemosiderosis) = การสะสมของรงควัตถุจากเม็ดเลือดแดง

HM (hemorrhage) = จุดเลือดออก

จากตารางที่ 15 พบว่ามีการเปลี่ยนแปลงทางจุลพยาธิวิทยาของอวัยวะต่าง ๆ ของปลาดุก ในแต่ละช่วงเวลาที่ได้รับสารเคมีเมททิลพาราไธออน รอยโรคที่พบเด่นชัดคือ การเสื่อมสภาพของเซลล์ตับแบบมีไขมันแทรก เป็นลำดับในปลาดุกที่ได้รับสารเคมีในช่วงเวลาที่ผ่านไปได้แก่ (+1) ในชั่วโมงที่ 12-24,(+2) ในช่วงเวลา 48,72,และ (+3) ในช่วงเวลา 96 ชั่วโมง รอยโรคของการสะสมรงควัตถุจากเม็ดเลือดแดง (hemosiderosis) พบในไต และม้าม ในชั่วโมงที่ 24 จนถึง 96 ปริมาณการพบไม่คงที่และไม่เปลี่ยนแปลงตามระยะเวลาผ่านไปในการได้รับสารเคมี พบรอยโรคดังกล่าวร่วมกับจุดเลือดออกในไต (10%) ในชั่วโมงที่ 96 ส่วนเหงือกไม่พบความปกติในทุกตัวอย่างที่ศึกษา

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 16 การเปรียบเทียบการเปลี่ยนแปลงทางจุลพยาธิวิทยา (histopathology findings) ระหว่างปลากลุ่มควบคุมและกลุ่มทดลองที่ได้รับเมทธิลพาราไธออน ขนาด sublethal concentration (10 ppm) ในเวลาต่างกัน

การเปลี่ยนแปลงทางจุลพยาธิวิทยาของอวัยวะต่าง ๆ [จำนวนเปลี่ยนแปลง / จำนวนตัวอย่าง × 100 = %]										
	กลุ่มควบคุม (n = 10)					กลุ่มทดลอง (n = 10)				
ชม.	ตับ	ไต	ม้าม	เหงือก		ตับ	ไต	ม้าม	เหงือก	
				dendrite	gill				dendrite	gill
0	NR (100%)	NR (100%)	NR (100%)	NR (100%)	NR (100%)	NR (100%)	NR (100%)	NR (100%)	NR (100%)	NR (100%)
12	FC(+1) (50%)	NR (100%)	NR (100%)	NR (100%)	AG (10%)	FC(+1) (20%)	NR (100%)	NR (100%)	NR (100%)	NR (100%)
24	FC(+1) (70%)	NR (100%)	Con (20%)	MC (20%)	NR (100%)	FC(+1) (30%)	HS (40%)	HS (50%)	NR (100%)	NR (100%)
48	FC(+1) (20%)	NR (100%)	NR (100%)	MC (30%)	NR (100%)	FC(+2) (70%)	HS (50%)	HS (40%)	NR (100%)	NR (100%)
72	FC(+1) (50%)	NR (100%)	NR (100%)	NR (100%)	NR (100%)	FC(+2) (50%)	HS (20%)	HS (50%)	NR (100%)	NR (100%)
96	FC(+1) (40%)	NR (100%)	NR (100%)	NR (100%)	NR (100%)	FC(+3) (90%)	HS(40%) HS/HM (10%)	HS (30%)	NR (100%)	NR (100%)

NR (normal) = ปกติ

FC (fatty change) = การเสื่อมของเซลล์ตับแบบมีไขมันแทรก
น้อย +1, ปานกลาง +2, มาก +3

HS (hemosiderosis) = การสะสมของรงควัตถุจากเม็ดเลือดแดง

HM (hemorrhage) = จุดเลือดออก

Con (congestion) = การคั่งเลือด

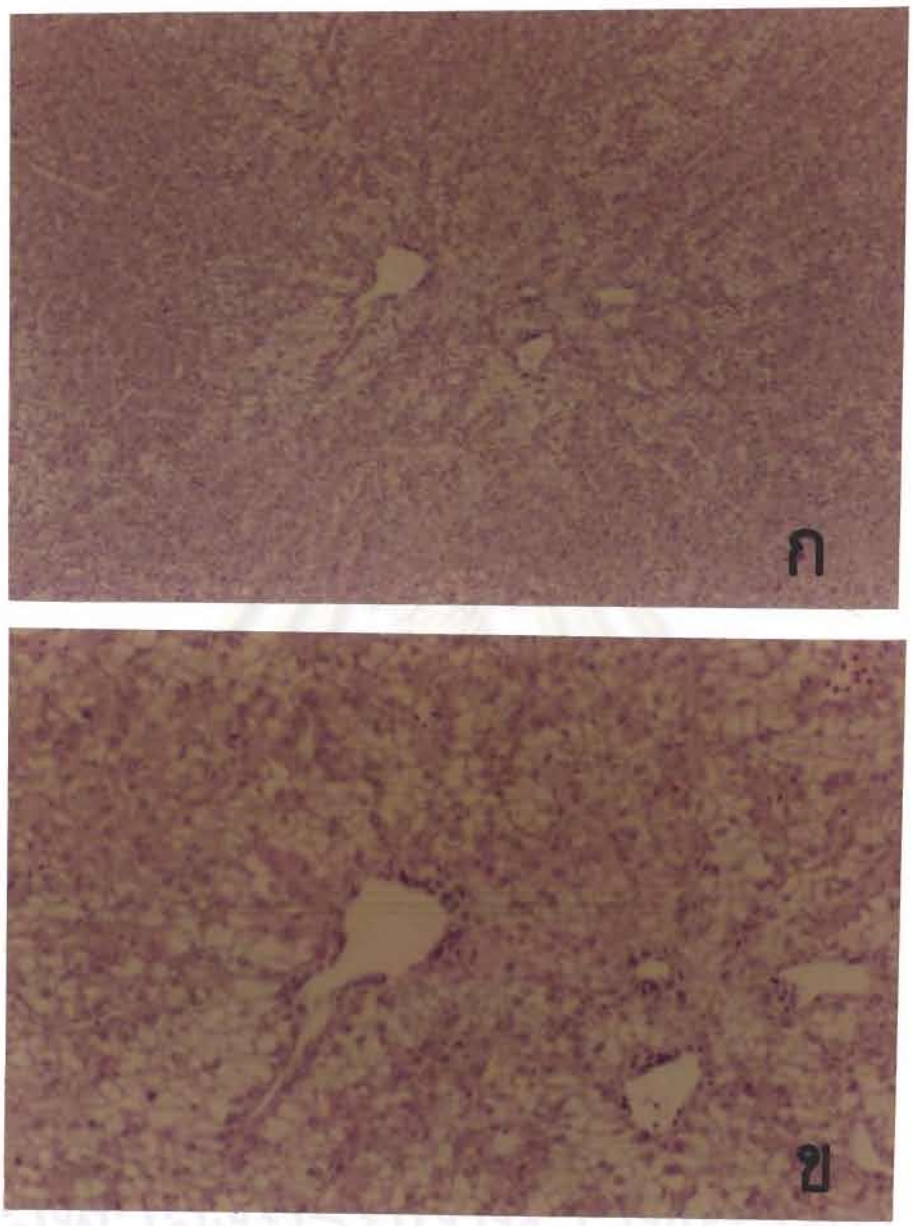
MC (mycotic infection on mucosal layer) = การติดเชื้อราบนเยื่อบุผิว

AG (activated globlet cells) = ต่อมเมือกทำงานมากกว่าปกติ

จากตารางที่ 16 เปรียบเทียบการเปลี่ยนแปลงทางจุลพยาธิวิทยาของกลุ่มควบคุมและกลุ่มทดลองจะเห็นได้ว่า การเสื่อมสภาพของเซลล์ตับมีการเปลี่ยนแปลงทางพยาธิวิทยาอย่างมีนัยสำคัญในกลุ่มทดลอง เมื่อเวลาผ่านไปความรุนแรงของรอยโรคจะมากขึ้นตามลำดับ นอกจากนี้รอยโรคของการสะสมรงควัตถุจากเม็ดเลือดแดงใน ไต, ม้าม พบในเฉพาะกลุ่มทดลองแต่ความรุนแรงของรอยโรคไม่เป็นสัดส่วนโดยตรงกับเวลาที่ผ่านไป ส่วนในเหงือกนั้นทั้งในกลุ่มควบคุมและกลุ่มทดลองไม่พบการเปลี่ยนแปลงอย่างมีนัยสำคัญ

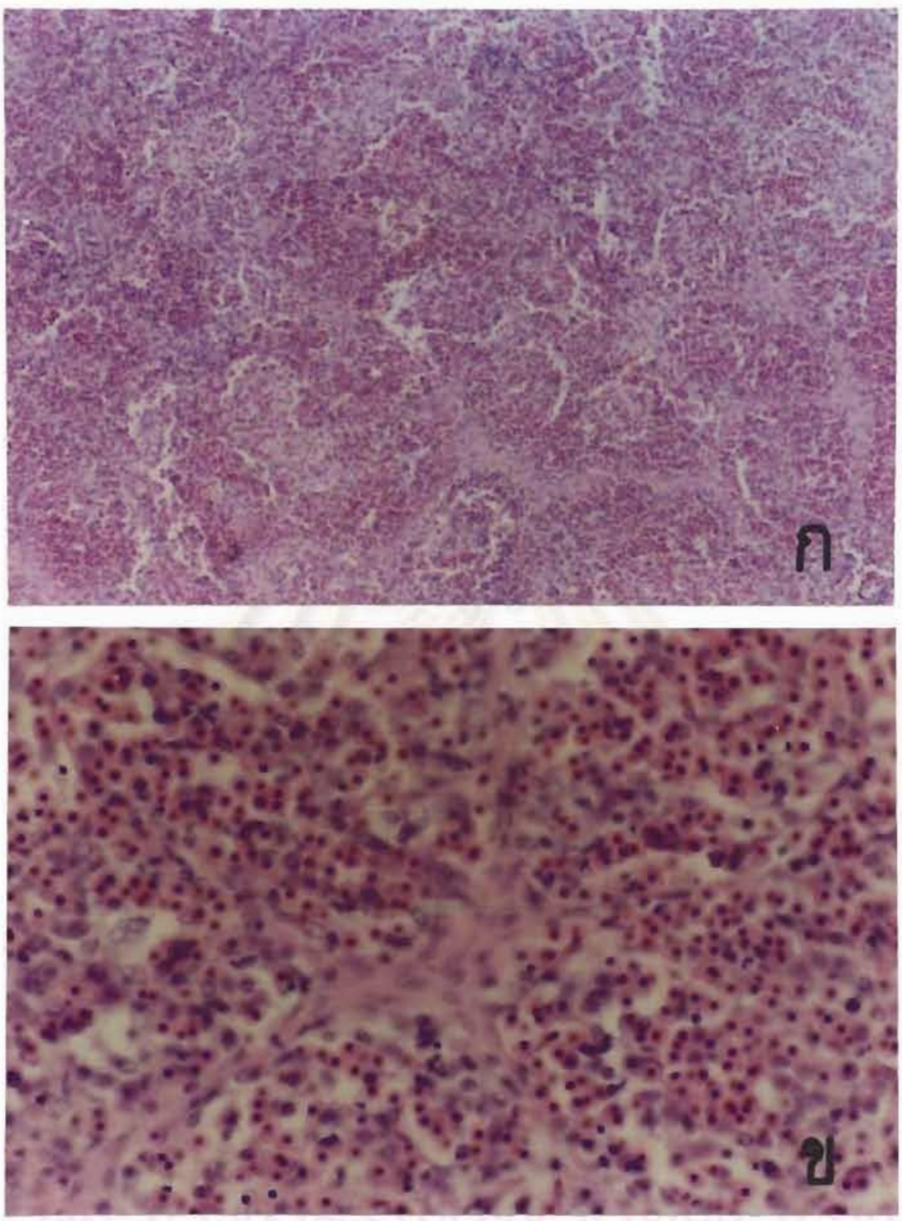
<u>รูปที่ 1-10</u> แสดงลักษณะทางจุลพยาธิวิทยาที่เปลี่ยนแปลงใน ตับ, ไต, ม้าม และเหงือกของปลาดุกในกลุ่มควบคุมและกลุ่มทดลอง ในช่วงระยะเวลาต่าง ๆ

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

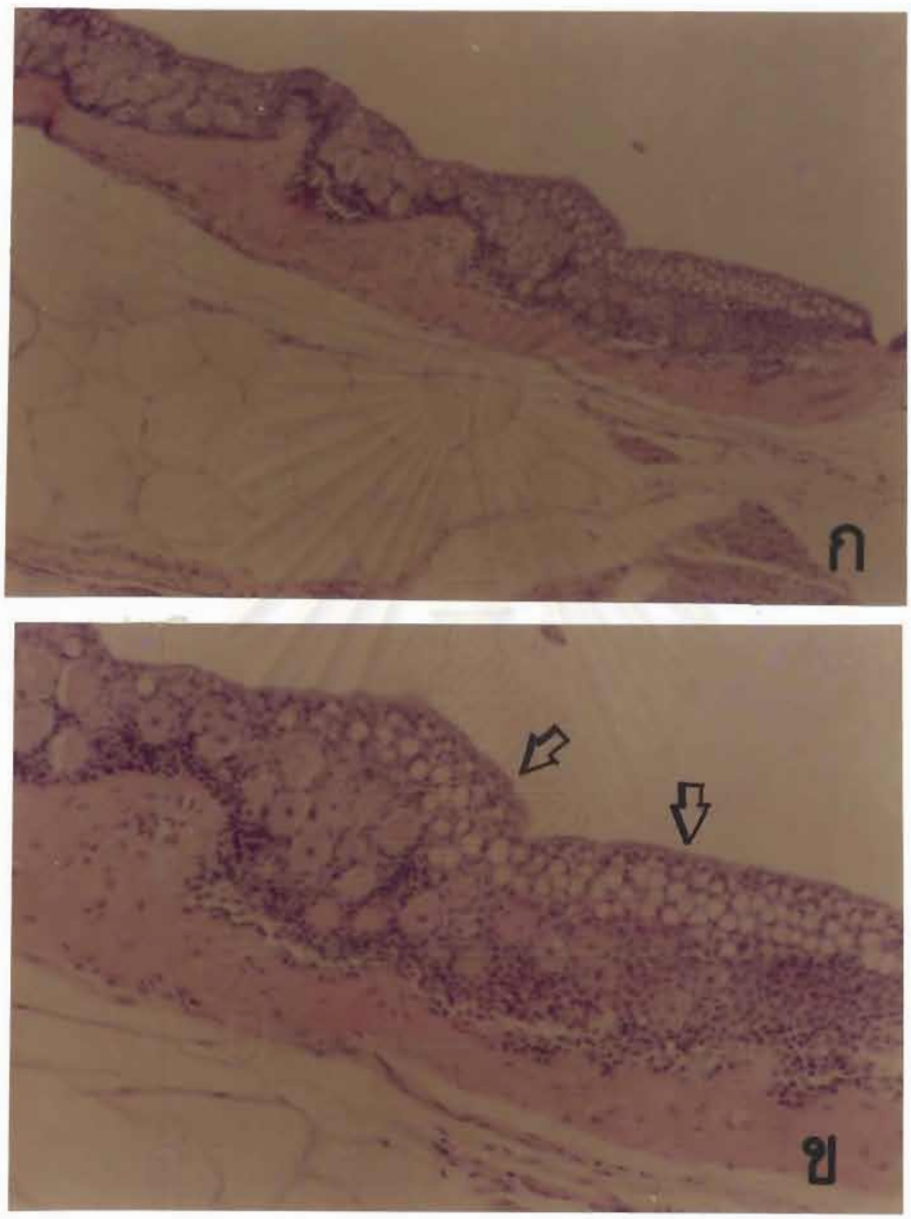


<u>รูปที่ 1</u> ตับของปลากลุ่มควบคุม เมื่อเวลา 72 ชั่วโมง พบการเสื่อมสภาพแบบมีเซลล์ไขมันแทรก (fatty degeneration) ระดับอ่อน (+1) Formalin's Fixative; H & E; (ก) x 100, (ข) x 200

หอสมุดกลาง สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

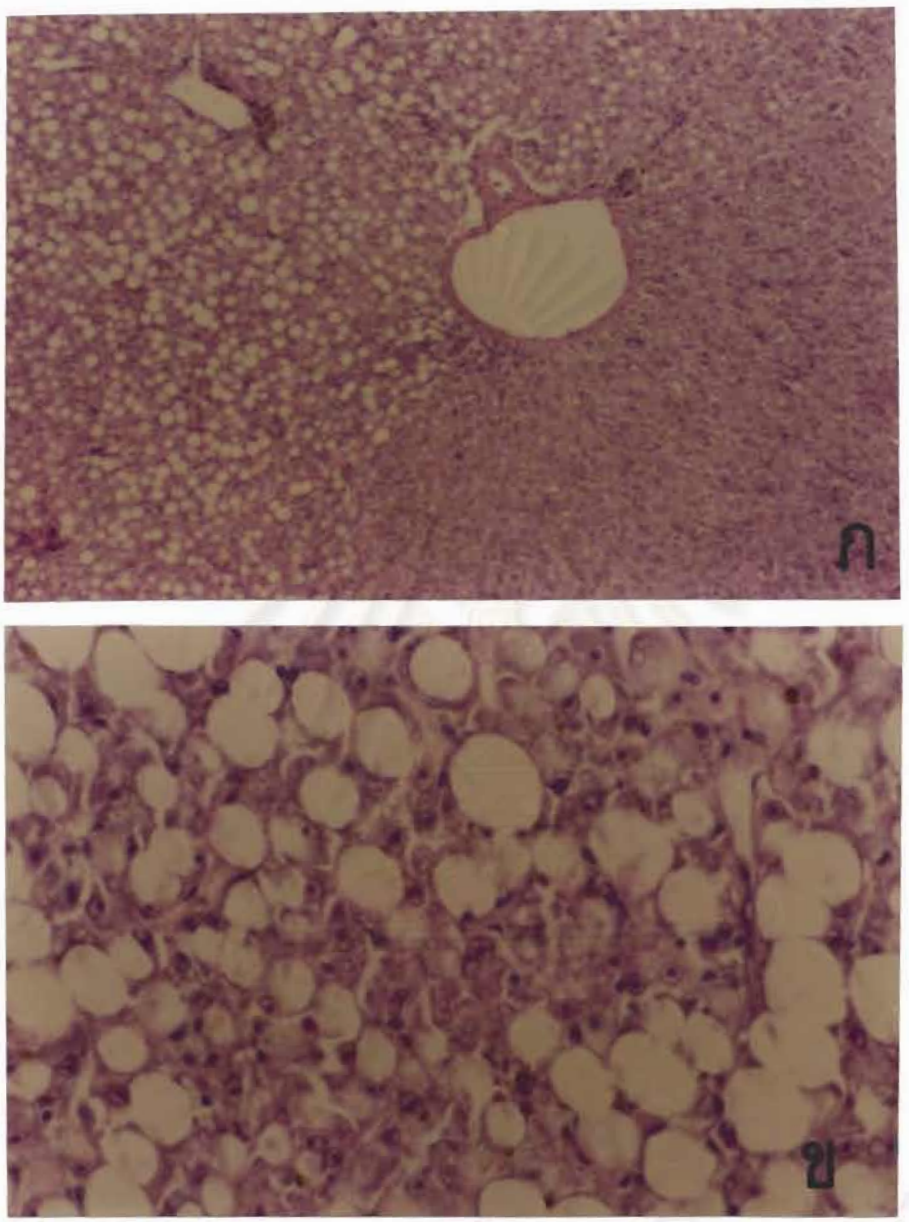


รูปที่ 2 ม้ามของปลากลุ่มควบคุม ที่เวลา 24 ชั่วโมง มีลักษณะเลือดคั่ง (congestion) Formalin's Fixative; H & E; (ก) x 100, (ข) x 400



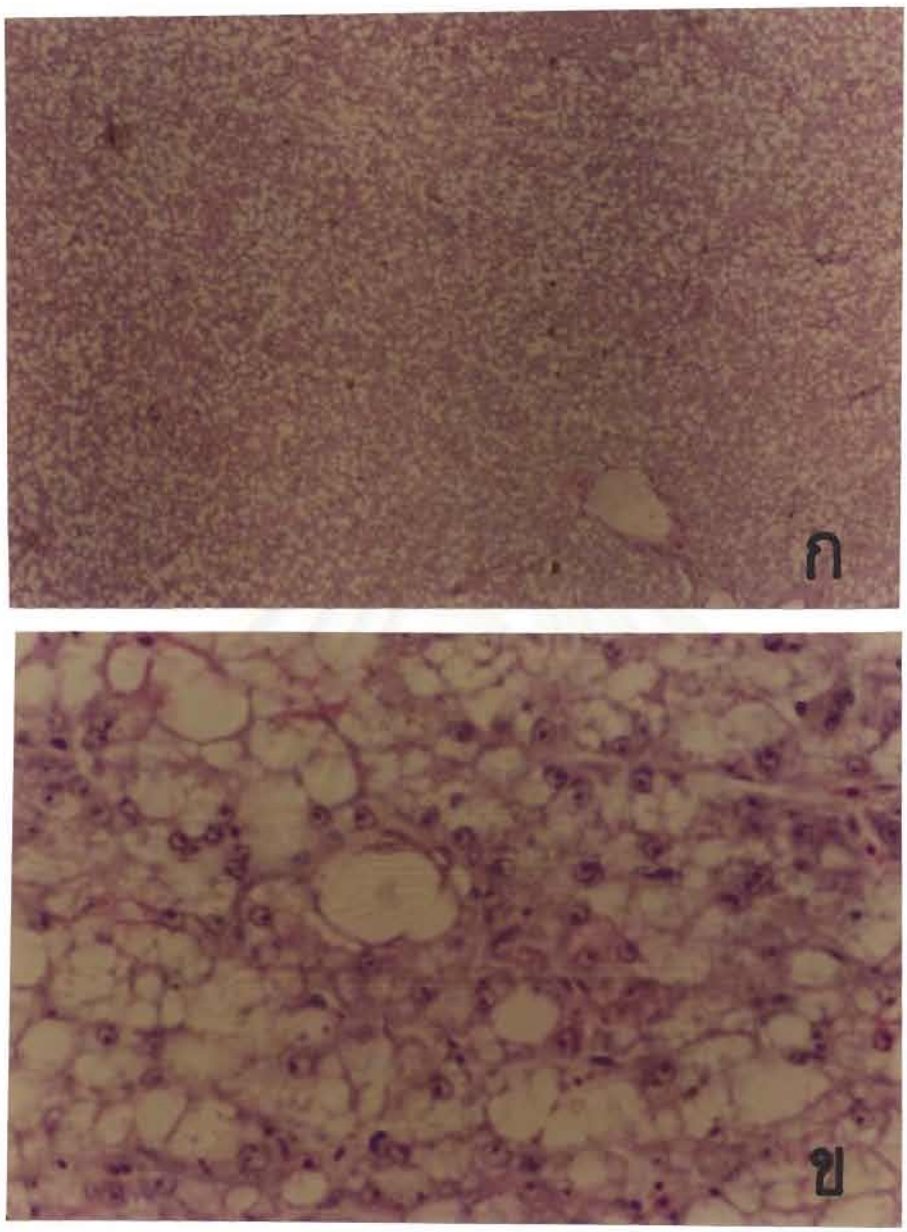
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

รูปที่ 4 เหงือกของปลากลุ่มควบคุม เมื่อเวลา 12 ชั่วโมง gill lamella พบรอยโรค การทำงานมากกว่าปกติของต่อมเมือก (activated goblet cells) บนเยื่อบุผิว (ลูกศรชี้) Formalin's Fixative; H & E; (ก) x 100 (ข) x 200



จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

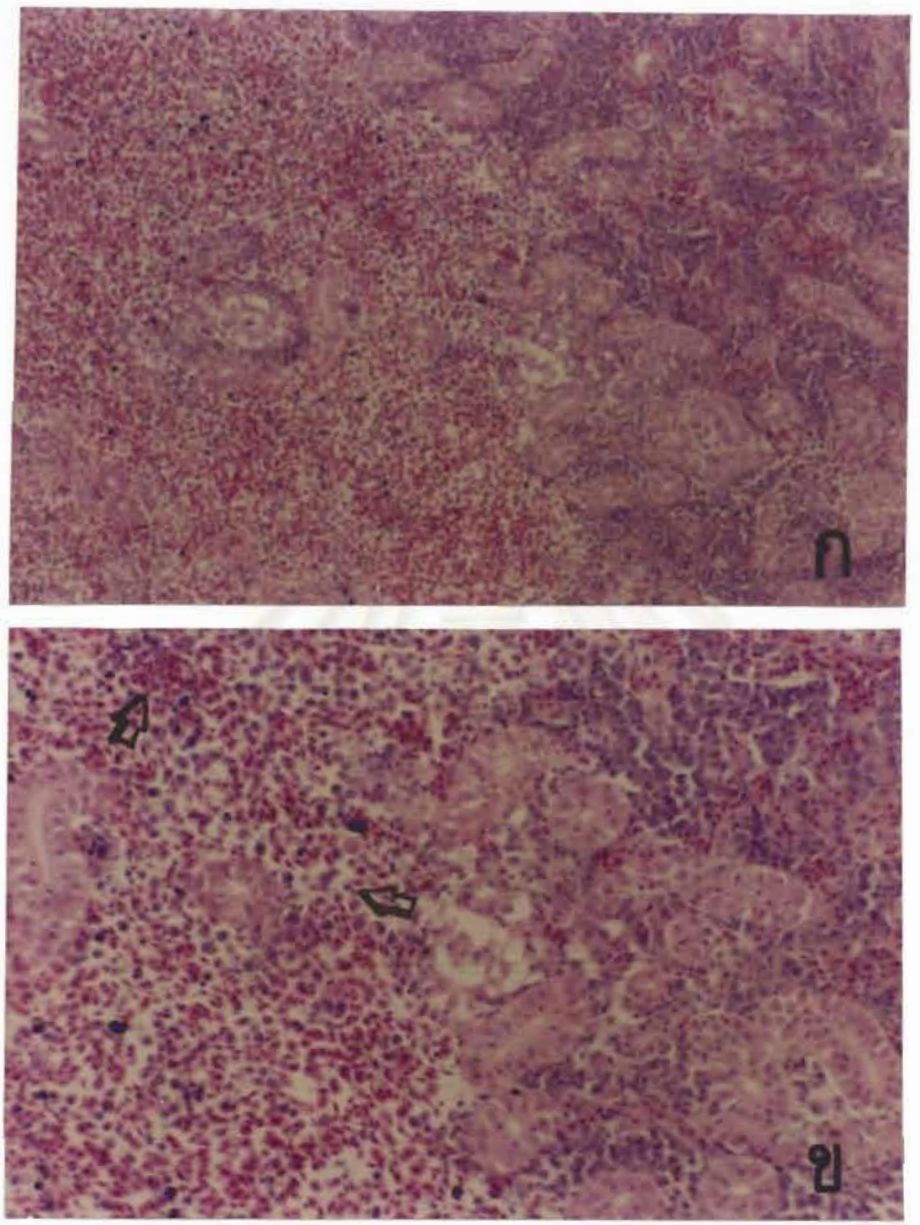
<u>รูปที่ 5</u> ตับของปลากลุ่มทดลอง ที่ได้รับเมทธิลพาราไธออน 10 ppm นาน 72 ชั่วโมง พบการเสื่อมสภาพแบบมีเซลล์ไขมันแทรก ในระดับปานกลาง (+2) Formalin's Fixative; H & E; (ก) x 100 (ข) x 400



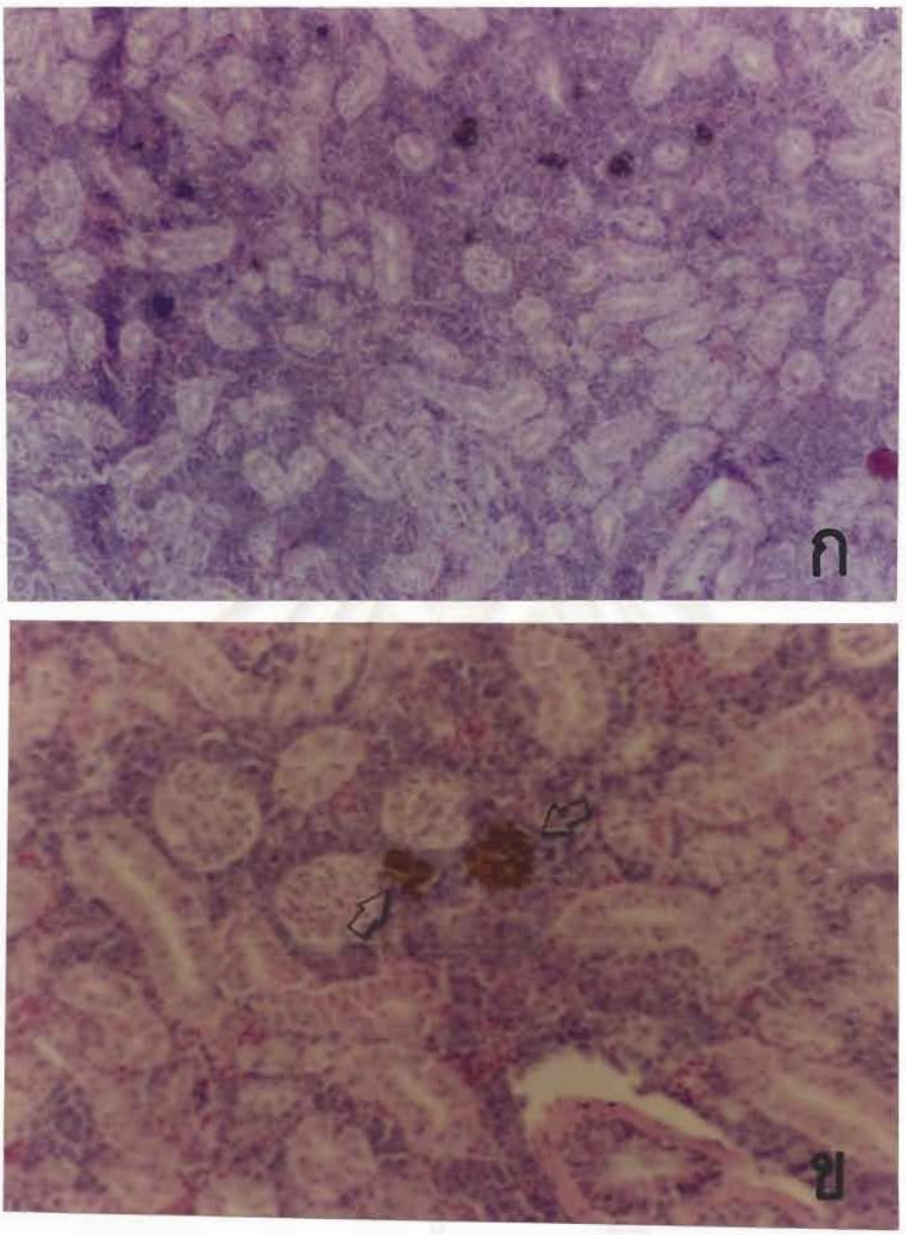
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

รูปที่ 6 ตับของปลากลุ่มทดลอง ที่ได้รับเมททิลพาราไธออน 10 ppm นาน 96 ชั่วโมง พบมีการเสื่อมสภาพแบบมีเซลล์ไขมันแทรก แบบกระจายทั่วไป (diffuse) อยู่ในระดับมาก (+3) Formalin's Fixative; H & E; (ก) x 100 (ข) x 400

I18540429

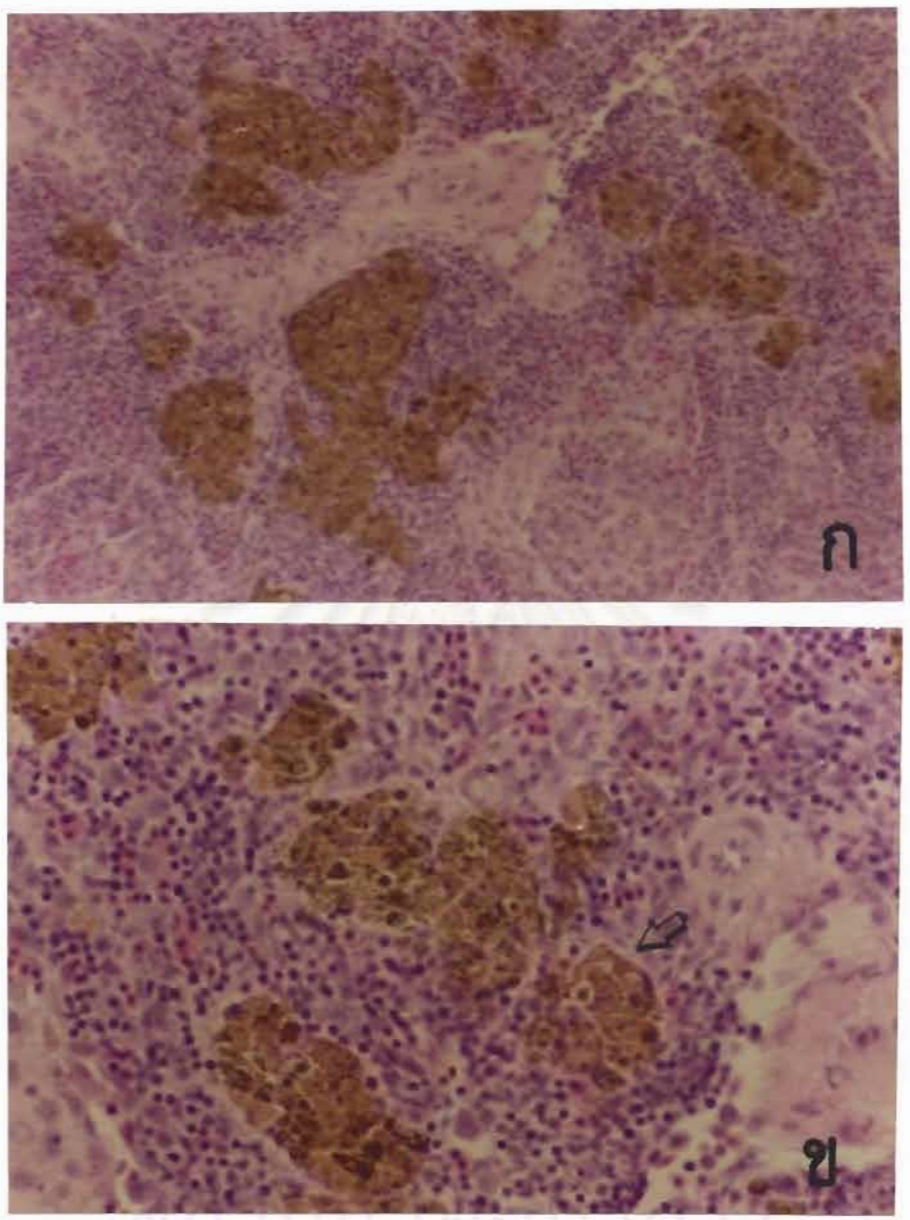


รูปที่ 7 ไตของปลากลุ่มทดลอง ที่ได้รับเมททิลพาราไธออน 10 ppm นาน 96 ชั่วโมง พบหย่อมเลือดออกในเนื้อเยื่อระหว่างท่อไต (ลูกศรชี้) Formalin's Fixative; H & E; (ก) x 100 (ข) x 200



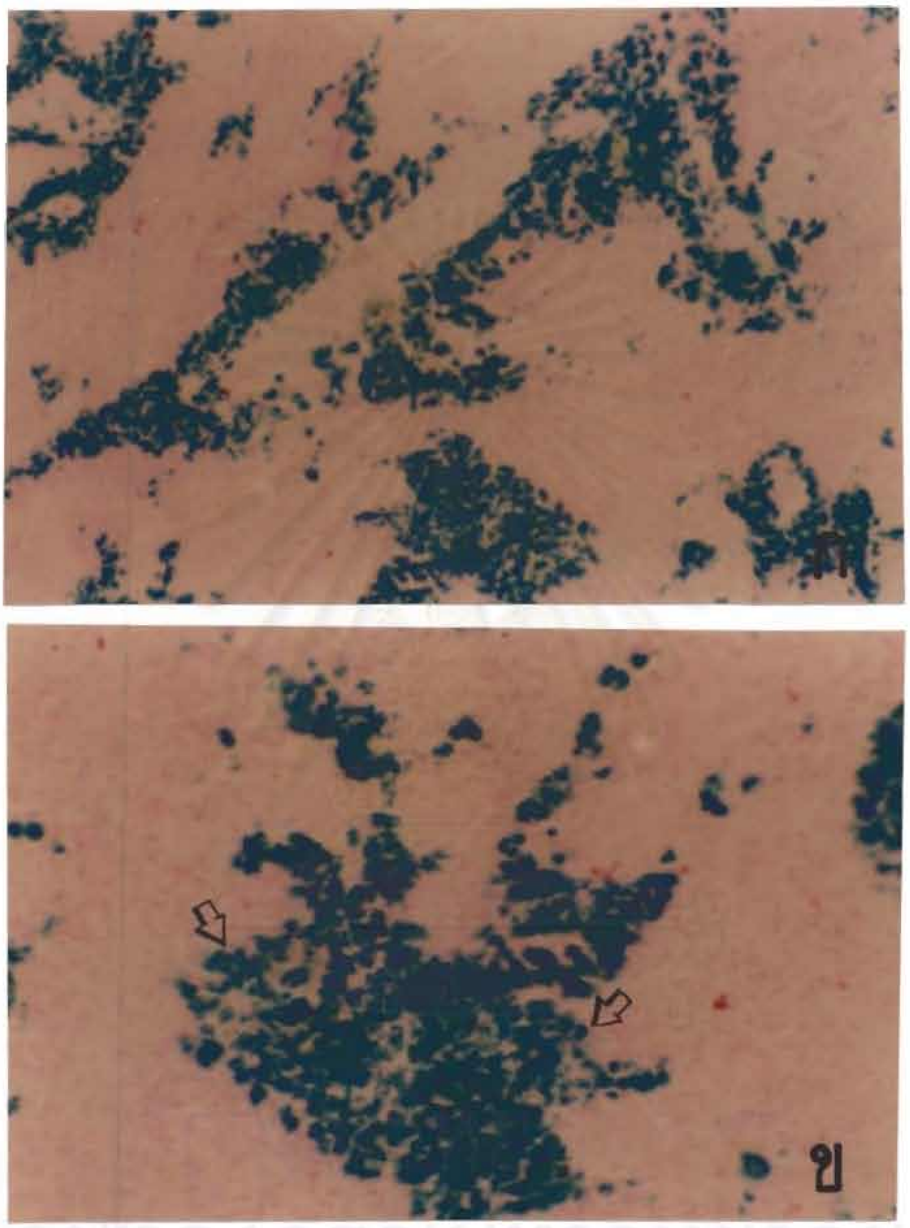
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

รูปที่ 8 ไตของปลากลุ่มทดลอง ที่ได้รับเมทธิลพาราไธออน 10 ppm นาน 48 ชั่วโมง พบการสะสมของรงควัตถุของเม็ดเลือดแดง สะสมอยู่ในเซลล์เก็บกิน (ลูกศรชี้) Formalin's Fixative; H & E; (ก) x 100 (ข) x 200



ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

รูปที่ 9 ม้ามของปลากลุ่มทดลอง ที่ได้รับเมททิลพาราไธออน 10 ppm นาน 72 ชั่วโมง พบการสะสมของรงควัตถุของเม็ดเลือดแดงในเซลล์เก็บกิน ในเนื้อเยื่อระหว่าง red pulp และ white pulp (ลูกศรชี้) Formalin's Fixative; H & E; (ก) x 200 (ข) x 400



รูปที่ 10 ม้ามของปลากลุ่มทดลอง ที่ได้รับเมทธิลพาราไธออน 10 ppm นาน 96 ชั่วโมง เกิดสภาพ hemosiderosis (มีการสะสมของรงควัตถุ hemosiderin) ในเซลล์เก็บกิน ระหว่าง red pulp และ white pulp, Formalin's Fixative; Turnbull Blue Method for Hemosiderin (Hemosiderin pigment สีน้ำเงินเข้ม ลูกศรชี้); (ก) x 100 (ข) x 400

ผลของ sublethal concentration ของเมททิลพาราไธออน (10 ppm) ต่อระดับเอนไซม์โพลีนเอสเตอเรส เมททิลพาราไธออนในขนาด 10 ppm มีผลทำให้ระดับเอนไซม์โพลีนเอสเตอเรสในซีรั่มของปลาลดลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม (ตารางที่ 17) ตั้งแต่เวลาหลังสัมผัสเมททิลพาราไธออนที่ 12 ชั่วโมงจนถึง 96 ชั่วโมง ระดับของเอนไซม์โพลีนเอสเตอเรส ลดลงตามเวลาที่สัมผัส โดยเหลือเพียง 8.06% ที่เวลา 96 ชั่วโมงเมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม หรือคิดเป็นเปอร์เซนต์การยับยั้ง 91.94%

ตารางที่ 17 การลดลงของระดับเอนไซม์โพลีนเอสเตอเรสในซีรั่มปลาดุกที่สัมผัสสารกำจัดแมลงเมททิลพาราไธออนในระยะเวลาต่าง ๆ

กลุ่มที่	เวลาสัมผัส (ชั่วโมง)	enzyme activity (uM-SH/3min/ml-serum		% ของเอนไซม์ที่เหลือ	%การยับยั้ง
		กลุ่มควบคุม (n = 10)	กลุ่มทดลอง (n = 5)		
1	0	1.15±0.02	0.93±0.26	80.87	19.13
2	12	1.11±0.12	0.46±0.24*	41.44	58.56
3	24	1.25±0.05	0.33±0.16*	26.40	73.60
4	48	1.21±0.01	0.21±0.08*	17.36	82.64
5	72	1.32±0.12	0.16±0.06*	12.12	87.88
6	96	1.24±0.01	0.10±0.04*	8.06	91.94

* แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญที่ $p < 0.001$ เมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม

วิจารณ์

เมื่อปลาดุกได้รับสารเคมีกำจัดศัตรูพืช ปลาจะแสดงอาการดิ้นเต้นกระวนกระวาย มีการเคลื่อนไหวผิดปกติ และว่ายน้ำขึ้นมาหายใจบริเวณผิวน้ำ แสดงว่า สารเคมีนี้มีผลต่อระบบประสาทที่ควบคุมพฤติกรรมและการเคลื่อนไหวของปลา ซึ่งจากการศึกษาของ Areechon และ Plumb (1990) พบว่า ปลาจะมีการเคลื่อนไหวผิดปกติ เสียการทรงตัวและมีการผิดปกติของกระดูกสันหลังเมื่อได้รับสารเคมีกำจัดศัตรูพืชมาลาไธออน ซึ่งเป็นสารเคมีในกลุ่มออกาโนฟอสเฟตชนิดหนึ่ง นอกจากนี้ Agarwal และ Nair (1989) ก็พบว่า ปลาจะแสดงอาการชัก การหายใจอ่อนลง พฤติกรรมเปลี่ยนไปและไวต่อการกระตุ้นจากภายนอก เมื่อได้รับสารเคมีกำจัดศัตรูพืชมาลาไธออนเช่นกัน

จากการทดลองขั้นตอนที่ 1 การศึกษาหาค่า median lethal concentration ในเวลา 96 ชั่วโมง (LC_{50}, 96 hrs.) พบว่าค่า LC_{50}, 96 hrs. ของเมทิลพาราไธออนต่อปลาดุกพันธุ์ผสมเท่ากับ 38 ppm จากการศึกษาของ Eisler (1969) พบว่า LC_{50}, 96 hrs. ของเมทิลพาราไธออนต่อ sand shrimp, grass shrimp และ hermit crab เท่ากับ 2, 3 และ 5 ppb ตามลำดับ และค่า LC_{50}, 96 hrs. ของมาลาไธออนต่อ sand shrimp, grass shrimp และ hermit crab เท่ากับ 33, 82 และ 50 ppb ตามลำดับ แต่ค่า LC_{50}, 96 hrs. ของมาลาไธออนต่อปลาดุก (Ictalurus puntatus) เท่ากับ 9.65 ppm (Areechon and Plumb, 1990) ส่วน Singh และ Singh (1987) พบว่า LC_{50}, 96 hrs. ของ มาลาไธออนต่อปลาดุก (Clarias batrachus) เท่ากับ 12 ppm ฉะนั้น จะเห็นได้ว่า ค่า LC_{50}, 96 hrs. มีค่าแตกต่างกัน ขึ้นอยู่กับชนิด ขนาดและอายุของปลาที่ใช้ตลอดจนผลิตภัณฑ์ทางการค้าของสารเคมี (Zbinder and Flurycoversi, 1981)

จากการศึกษาค่าทางโลหิตวิทยาและค่าเคมีคลินิคของซีรั่มปลาดุกที่ได้รับสารกำจัดศัตรูพืชเมทธิลพาราไธออนในขนาด sublethal concentration เปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม พบว่า ค่าทางโลหิตวิทยา ได้แก่ จำนวนเม็ดเลือดขาว, จำนวนเม็ดเลือดแดง, ฮีมาโตคริต และ ฮีโมโกลบิน ไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ แต่จากการศึกษาของ Areechon และ Plumb (1990) พบว่าจำนวนเม็ดเลือดแดงเพิ่มสูงขึ้น และจำนวนเม็ดเลือดขาวจะลดลง เมื่อได้รับสารเคมีกำจัดศัตรูพืชมาลาไธออน ส่วน Mukhopadyhay และ Dehadrai (1980) รายงานว่าพาราไธออนทำให้จำนวนเม็ดเลือดแดงลดลง (erythropenia) ส่วนการนับแยกชนิดเม็ดเลือดขาว ได้แก่ neutrophil, lymphocyte และ monocyte นั้น พบว่าในแต่ละช่วงเวลามีค่าแปรปรวนบ้างอาจเนื่องจากเป็นความเฉพาะของปลาแต่ละตัว หรืออาจมีการ

ติดเชื้อเฉพาะกลุ่มดังเช่นในชั่วโมงที่ 24 ค่าความแตกต่างของเม็ดเลือดขาวชนิด neutrophil ในกลุ่มควบคุมและกลุ่มทดลองมีค่าแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ อาจเนื่องจากการติดเชื้อมาก่อนของปลา แต่เมื่อเปรียบเทียบระหว่างกลุ่มทดลองและกลุ่มควบคุมในช่วงเวลาต่าง ๆ ไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ

ผลการศึกษาทางเคมีคลินิคของซีรั่มปลาดุก ได้แก่ SGPT และ BUN พบว่าไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ เมื่อเปรียบเทียบระหว่างกลุ่มควบคุมและกลุ่มทดลอง ส่วน SGOT ที่เวลาเริ่มต้นมีค่าสูงขึ้นเมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม เพราะค่าเฉลี่ย SGOT ที่เวลาเริ่มต้นของกลุ่มควบคุมมีค่าต่ำ ซึ่งน่าจะเกิดจากจำนวนตัวอย่างน้อย

ผลการศึกษาทางพยาธิวิทยาของปลาในกลุ่มต่าง ๆ พบว่าการเปลี่ยนแปลงทางพยาธิวิทยาที่มองเห็นด้วยตาเปล่า (gross pathology) ไม่พบการเปลี่ยนแปลงในปลากลุ่มทดลอง ซึ่ง Kabota (1982) เคยรายงานว่า มาลาไธออน ทำให้เกิดสภาพความผิดปกติของไขสันหลัง (spinal injury) ซึ่งมีผลทำให้เกิดลักษณะคดงอของกระดูกสันหลัง โดยมองเห็นได้จากสภาพของปลาภายนอก สนับสนุนโดยการทดลองของ Areechon และ Plumb (1990) ด้วย อย่างไรก็ตามในการทดลองครั้งนี้ไม่พบความผิดปกติดังกล่าว การเปลี่ยนแปลงทางจุลพยาธิวิทยา (histopathological changes) ของอวัยวะภายใน ผลการศึกษาทางจุลพยาธิวิทยา ของเนื้อเยื่อ ตับ, ไต, ม้าม และเหงือก ในส่วนของ gill lamella และ dendrites พบว่า ตับ มีการเปลี่ยนแปลงในเซลล์ตับมีการเสื่อมแบบมีไขมันแทรก ทั้งในกลุ่มทดลองและกลุ่มควบคุม โดยในกลุ่มควบคุมเริ่มพบการเปลี่ยนแปลงในระดับอ่อน (+1) ในกลุ่มต่าง ๆ ที่ตลอดการทดลอง ค่าเฉลี่ยของจำนวนตัวอย่างที่มีการเปลี่ยนแปลงประมาณ 50% ของจำนวนปลาในการทดลองทั้งหมด ส่วนในกลุ่มทดลองนั้น การเปลี่ยนแปลงแปรตามระยะเวลาที่ได้รับสารเคมี เริ่มจากระดับอ่อน (+1) ในชั่วโมงที่ 12 จนถึงระดับมาก(+3) ในชั่วโมงที่ 96 จำนวน % ของตัวอย่างที่พบการเปลี่ยนแปลง เริ่มจาก20% ถึง 90% ตามลำดับ ซึ่งจากผลการทดลองนี้ อาจเนื่องจากสภาพของปลาที่นำมาทดลองที่สภาพการเสื่อมของตับอยู่แล้ว เช่น อ่อนแอ, ขาดอาหาร หรือภาวะความเครียดอื่น ๆ อย่างไรก็ตาม เมื่อเปรียบเทียบระดับความเสื่อมสภาพของตับระหว่างกลุ่มควบคุมและกลุ่มทดลองแล้ว กลุ่มทดลองมีระดับความรุนแรงและเด่นชัดมากกว่าในกลุ่มควบคุม ในช่วงระยะเวลาต่าง ๆ ของการทดลองซึ่งน่าจะสรุปได้ว่า มีการเปลี่ยนแปลงอย่างมีนัยสำคัญ การเปลี่ยนแปลงในเซลล์ตับนี้เคยมีรายงานเกี่ยวกับพิษของเมทธิลพาราไธออนในปลากะพงขาว (ภัทรา หาญจริยากูล 1993) และ ใน ปลาดุก (Clarias batrachus) (Mandal และ Kalshrestha, 1983)ซึ่งจากรายงานต่างกันพบมีความรุนแรงทำให้เซลล์ตับตายด้วย สำหรับการศึกษาครั้งนี้ไม่พบเซลล์ตาย อาจเนื่องจากระยะเวลาในการให้ยาอยู่ในระยะสั้น ไม่ทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงรุนแรงได้ ในไตและม้าม

ของกลุ่มทดลอง พยาธิสภาพที่พบคล้ายคลึงกันคือ สภาพการสะสมของรงควัตถุจากการสลายของเม็ดเลือดแดง (hemosiderosis) ในเซลล์เก็บกิน (macrophage) เริ่มจากชั่วโมงที่ 24 จนถึง ชั่วโมงที่ 96 โดยเฉลี่ย 30% ของจำนวนตัวอย่างที่ได้รับสารเคมี และในไตยังพบสภาพเลือดออกในเนื้อเยื่อระหว่างท่อไต โดยเฉลี่ย 10 % ในชั่วโมงที่ 96 ด้วย ซึ่งต่างจากผลการทดลองของ Areechon และ Plumb (1990) ซึ่งทำในปลาดุกเช่นกัน แต่ไม่พบรอยโรคที่สำคัญในไต ส่วนม้ามและตับไม่มีรายงานมาก่อน ตามปกติสภาพ hemosiderosis เกิดเนื่องจากมีการทำลายเม็ดเลือดแดงที่อายุมากในเซลล์ที่มีคุณสมบัติเป็นอวัยวะทำลายและสร้างเม็ดเลือด (reticulo-endothelial cells) มักพบในสัตว์อายุน้อย (Lancker, 1976) ส่วนปลานั้น ม้ามและไตมีการสร้างเม็ดเลือดแดงด้วย โดยมีเนื้อเยื่อสร้างเม็ดเลือดแดง เช่น haemoblast, macrophage ที่มีการสะสมของรงควัตถุของเม็ดเลือดแดงอยู่ (Chinabut et al., 1991) ดังนั้นการพบสภาพ hemosiderosis ในเนื้อเยื่อไตและม้ามอาจพบได้ในปลาปกติโดยเฉพาะปลาที่อายุน้อย หรืออาจสอดคล้องกับ Areechon และ Plumb (1990) ที่รายงานว่าผลของมาลาไธออนจะทำให้มีการเพิ่มส่วนประกอบของเม็ดเลือดแดงในปลาดุกโดยตรง ผลทำให้มีการสร้างเม็ดเลือดแดงขึ้นมาใหม่ทำให้เม็ดเลือดแดงที่อายุมากถูกทำลายไปเกิดมีสภาพ hemosiderosis เด่นชัดขึ้น

เหงือกทั้งในส่วนของ gill lamella และ dendrites พบการผิดปกติทางพยาธิวิทยาในกลุ่มควบคุม คือ ที่ gill lamella ในชั่วโมงที่ 12 มีการทำงานมากกว่าปกติของต่อมเมือก (activated globlet cells) บริเวณเยื่อบุ ซึ่งอาจเนื่องจากมีการระคายเคืองจากคุณภาพหรือสภาพการปนเปื้อนในน้ำ ส่วน dendrites ในชั่วโมงที่ 24 และ 48 พบว่ามีการติดเชื้อราบนเยื่อบุผิว (epithelial layer) ของ dendrites ซึ่งอาจเนื่องจากการปนเปื้อนของเชื้อราดังกล่าวในน้ำ แต่ไม่น่าจะเป็นสาเหตุของราก่อโรคแต่อย่างใด ส่วนในกลุ่มทดลองไม่พบการเปลี่ยนแปลงใด ๆ ที่มีนัยสำคัญ จุลพยาธิวิทยาที่พบอยู่ในเกณฑ์ปกติ ซึ่งต่างจากรายงานของ Shukla และคณะ (1984) ที่ทำในปลา Tilapia (Sarotherodon Mossambicus) ที่มีพยาธิสภาพในส่วน gill เช่น เกิดเนื้อตายของเซลล์เยื่อบุ สภาพบวมน้ำ เป็นต้น

จากผลการศึกษาผลกระทบของยาฆ่าแมลงเมทธิลพาราไธออน ซึ่งเป็นสารเคมีในกลุ่มออกาโนฟอสเฟตตัวหนึ่ง ในขนาดไม่ทำให้ปลาตาย ที่มีต่อสิ่งมีชีวิต และสิ่งแวดล้อม โดยพิจารณาการเปลี่ยนแปลงทางโลหิตวิทยา ค่าเคมีคลินิคของซีรั่ม เปรียบเทียบระหว่างกลุ่มได้รับสารเคมีและกลุ่มควบคุม ผลปรากฏว่าไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ แต่ถ้าระยะเวลาในการทดลองนานกว่านี้อาจจะมีผลต่อค่าทางโลหิตวิทยาและเคมีเลือดได้เช่นเดียวกัน การเปลี่ยนแปลงทางพยาธิวิทยานั้น พยาธิสภาพที่เห็นด้วยตาเปล่าอยู่ในเกณฑ์

ปกติส่วนทางจุลพยาธิวิทยาของอวัยวะภายใน จากอวัยวะที่ศึกษาคือ ตับ, ม้าม, ไต และเหงือก พบการเปลี่ยนแปลงในระดับอ่อน ๆ ไม่รุนแรงดังเช่นรายงานต่าง ๆ ที่เคยศึกษามา เช่น การเสื่อมสภาพของตับแบบมีไขมันแทรก ซึ่งแสดงให้เห็นแนวโน้มว่าหากใช้เวลานานมากขึ้นอาจมีการเปลี่ยนแปลงจนถึงขั้นเซลล์ตายได้ ส่วนในม้ามและไตนั้นการสะสมของรงควัตถุเม็ดเลือดแดง พบอย่างเด่นชัดในกลุ่มได้รับสารเคมีซึ่งอาจเนื่องจากที่มีการเพิ่มปริมาณองค์ประกอบของเม็ดเลือดแดงควบคู่กับการสร้างเม็ดเลือดแดงอ่อน ๆ มาก ซึ่งอาจเนื่องจากการกระตุ้นของสารเคมีที่ได้รับ ส่วนในเหงือก ไม่พบการเปลี่ยนแปลงแต่อย่างใด ดังนั้นอาจกล่าวได้ว่าปลาดุกที่ได้รับสารเคมีในระดับไม่ทำให้ปลาตายของเมททิลพาราไธออน จะไม่มีการเปลี่ยนแปลงของเลือดและเคมีเลือดอย่างเด่นชัดและมีนัยสำคัญทางสถิติ ส่วนการเปลี่ยนแปลงทางจุลพยาธิวิทยาพบที่ตับ ม้าม, ไต เป็นตัวบ่งชี้ถึงความเป็นพิษของเมททิลพารา-ไธออนในช่วงสั้นได้

ผลของเมททิลพาราไธออนขนาด sublethal concentration (10 ppm) แม้จะไม่ทำให้ปลาตายในช่วงที่ทำการทดลอง แต่ระดับของเอนไซม์โพลีนเอสเตอเรสในซีรั่มลดลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเทียบกับกลุ่มควบคุม เริ่มตั้งแต่เวลา 12 ชั่วโมงหลังสัมผัสเมททิลพาราไธออนจนถึง 96 ชั่วโมง ซึ่งเป็นระยะเวลาสิ้นสุดการทดลอง ระดับของเอนไซม์ลดลงตามระยะเวลาที่เพิ่มขึ้นจนเหลือเพียง 8% ที่ 96 ชั่วโมงเทียบกับกลุ่มควบคุม Salte et al. (1987) ได้รายงานการเกิดพิษของสารกลุ่มออกาโนฟอสเฟตในปลาเทราต์ พบว่าปลาที่รอดชีวิตจะมีระดับเอนไซม์เหลือ 30% เทียบกับปลาปกติ และเหลือเพียง 4% ในปลาที่ตายจากพิษของสารนี้ จากการทดลองครั้งนี้พบว่าแม้ระดับเอนไซม์จะลดลงมากเหลือเพียง 8% แต่ปลาไม่ตายเพียงแสดงอาการผิดปกติเกี่ยวกับพฤติกรรม ทำให้คิดว่าอาจเป็นความสามารถของปลาในการปรับตัวต่อภาวะที่มีระดับเอนไซม์โพลีนเอสเตอเรสลดลงและอะซิทิลโพลีนเพิ่มสูงขึ้นโดยทำให้ตัวรับโพลิเนอร์จิคลดความไวลง (Taylor, 1991)

Passino (1984) กล่าวว่า การตรวจระดับของตัวบ่งชี้ทางชีววิทยา (biological indicator) เพียงตัวใดตัวหนึ่งอาจไม่เพียงพอที่จะวิเคราะห์ถึงสุขภาพของปลา นอกจากนี้การผสมผสานระหว่างการศึกษาทางห้องปฏิบัติการให้เข้ากับสภาพความเป็นจริงในภาคสนามเป็นสิ่งสำคัญที่จะทำให้สามารถแปลผลและเข้าใจถ่องแท้ถึงการตอบสนองของปลาต่อสิ่งแวดล้อมที่ปนเปื้อนตามธรรมชาติ Cappage et al. (1975) รายงานว่าการวัดระดับโพลีนเอสเตอเรสในสมองของปลาเป็นตัวบ่งชี้ที่ค่อนข้างแน่นอนที่จะบอกถึงความเป็นพิษของสารกลุ่มออกาโนฟอสเฟต อย่างไรก็ตามมีความพยายามอย่างมากในปัจจุบันเพื่อค้นหาตัวบ่งชี้อื่น ๆ ทางชีววิทยาที่จะช่วยเสริมและพัฒนาหลักการที่ทำให้ทราบโดยเร็วถึงสภาพของน้ำและสิ่งแวดล้อมที่มีต่อสัตว์น้ำก่อนที่ภาวะการณ์จะรุนแรงมากขึ้นกว่านี้ เอนไซม์ที่กำลัง

ได้รับความสนใจคือ mixed function oxidase ซึ่งเป็นกลุ่มของเอนไซม์ที่จะเปลี่ยนแปลงหรือลดพิษของสารปนเปื้อน โดยอาศัยหลักความจริงที่ว่าเมื่อสัตว์อยู่ในสิ่งแวดล้อมที่มีสารพิษ เอนไซม์ที่ทำหน้าที่ในการลดพิษจะถูกสร้างเพิ่มมากขึ้น (Melancon et al.1981; Addison, 1984) หนึ่งในจำนวนนี้คือ cytochromes P-450 ซึ่งทำหน้าที่เป็น rate-limiting step ใน hepatic drug oxidation พบว่า cytochromes P-450 จะเพิ่มขึ้นในตับของปลาหลายชนิดที่อยู่ในสิ่งแวดล้อมที่เป็นพิษ (Parke, 1981; Rattner, et al., 1989) เป็นที่น่าสนใจที่จะทำการศึกษาถึงตัวบ่งชี้เหล่านี้เพื่อยืนยันถึงความเป็นพิษจากสิ่งแวดล้อมต่อสัตว์น้ำทั้งตามธรรมชาติและในห้องปฏิบัติการต่อไป

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

กิตติกรรมประกาศ

งานวิจัยครั้งนี้ได้รับทุนอุดหนุนจากเงินทุนวิจัยงบประมาณแผ่นดิน ปี 2536

คณะผู้วิจัยขอขอบพระคุณผู้มีรายนามต่อไปนี้ ที่มีส่วนช่วยให้งานครั้งนี้สำเร็จลุล่วงไปด้วยดี รองศาสตราจารย์ น.สพ.ดร. จิรศักดิ์ ตั้งตรงไพโรจน์, อาจารย์ น.สพ.อนุเทพ รังสีพิพัฒน์, น.สพ. ศิริวัฒน์ ทรวดทรง, น.สพ. พลกฤษณ์ อุ้ยตา, น.สพ. อุดม จันทร์ประไพภัทร, คุณศักดา อัศสานิก, คุณอมรรัตน์ ทัศนกิจ, คุณพรพิมล มีใย, คุณสามารถ ริ้วชูศรี, คุณภัทรา หาญจริยากูล, คุณชลอ สังฆะโต, คุณจรีนุช ผูกจิต และคุณวารุณี นุ่มจันทร์

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

เอกสารอ้างอิง

ทวีศักดิ์ บูรณวุฒิ ธรรค์ชัย จ๋วงพานิช และ ภราดร พันธุมะบำรุง 1984 (2527) การศึกษาค่าทางโลหิตวิทยา และ เคมีของเลือดในปลาดุกไทย ภายวิชาสรีรวิทยา กองการศึกษา วิทยาลัยแพทยศาสตร์มงกุฎ 82 หน้า

ปรีชา พุทธิปรีชาพงศ์ พัฒนันท์ สังขะตะวรรธน์ จิตรพันธุ์ พวงมะลิต บุญส่ง หุตังคบดี 1988 (2531) สถิติสารกำจัดศัตรูพืชปี 2531 (การนำเข้า การผลิต การจัดจำหน่าย และการใช้) ฝ่ายวัตถุมีพิษ กองควบคุมพืชและวัสดุการเกษตร กรมวิชาการเกษตร กระทรวงเกษตรและสหกรณ์

ภัทรา หาญจริยากูล 1993 (2536) การศึกษาพิษเฉียบพลันในขนาดที่ไม่ทำให้ปลาตายของเมทิลพาราไธออนต่อปลากะพงขาว (Lates calcarifer) วิทยานิพนธ์หลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตร์มหาบัณฑิต สหสาขาวิชาเภสัชวิทยา บัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

สุรภี โรจน์อารยานนท์ 1989 (2532) สภาวะแวดล้อมของเรา ตอน มลพิษสภาวะแวดล้อม พิมพ์ครั้งที่ 3 สถาบันวิจัยสภาวะแวดล้อม จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

Addison, R.F. 1984. Hepatic mixed function oxidase (induction in fish as a possible biological monitoring system. In: Contaminant effects on fisheries. V.C. Cairns, P.V. Hodson, I.O. Nriagu eds. John Wiley and Sons. p. 51.

Agarwal, S. and Nair, N.B. 1989. Physiological effect to malathion on the brain of Sarotherodon mossambicus Current Science 58 (18) : 1046-1047.

Areechon, N. and Plumb, J.A. 1990. Sublethal effect of malathion on Channel catfish, Ictalurus punctatus. Bull. Environ. Contam. Toxicol. 44 : 435-442.

Benjamin, M.M. 1961. Outline of Veterinary Clinical Pathology. 3rd ed. The Iowa State University press Ames, Iowa U.S.A. 351 p.

Cambell, T. 1992. Hematology of birds, reptiles, and fish. Topics in Veterinary Medicine. p. 4-8.

Chinabut, S., Limsuwan, C., and Ritsawat, P. 1990. Histology of the Walking Catfish (Clarias batrachus). National Inland Fisheries Institute. 1st ed. p. 26, 28, 30, 36-40, 45-48, 83-87.

Cappage, D.L., Matthews, E., Cook, G.H., and Knight, J. 1975. Brain acetylcholinesterase inhibition in fish as a diagnosis of environmental poisoning by malathion, O, O,-dimethyl S-(1,2-dicarbethoxyethyl) phosphorodithioate. Pestic. Biochem. Physiol. 5 : 536-542.

Darlington, W.A., Partos, R.D., and Ratts, K.W. 1971. Correlation of cholinesterase inhibition and toxicity in insects and mammals. I. Ethylphosphonates. Toxicol. Appl. Pharmacol. 18 : 542-547.

Eisler, R. 1969. Acute toxicities of insecticides to marine decapod crustaceans. Crustaceana. 16:302-310.

Ellman, G.L., Courtney, K.D., Andres, V., and Featherstone, R.M. 1961. A new rapid colorimetric determination of actylcholinesterase activity. Biochem. Pharmacol. p. 7, 88-95

Kabota, S.S., Miyazaki, T., and Egusa, S. 1982. Cotor Atlas of Fish Histopathology, Vol. 1 Shin-Suisan Shinbun-Sha, Tokyo, Japan

Lancker, J.L.V. 1976. In Molecular and Cellular Mechanisms in Disease. Vol. 1. Springer Verlag Berlin Heidelberg Germany p. 379-381.

Litchfield, J.T. and Wilcoxon, F. 1949. A simplified method of evaluating dose-effect experiments I. Pharmacol. Exp. Ther. 96 : 99-113.

Mandal P.K. and Kulshrestha A.K. 1983. Chronic effects of malathion on erythropoiesis in catfish Clarias batrachus (Linn) Nat. Acad. Sci. Letters 6 : 311-313.

Melancon, M.J., Elcombe, C.R. Vodichick, M.J., and Lech, J.J. 1981. Induction of cytochromes P-450 and mixed function oxidase activity by polychlorinated biphenyls and B-naphthoflavone in carp (Cyprinus carpio). Comp. Biochem. Physiol. 69 C : 219-226.

Mukhopadyhay, P.K. and Dehadria, P.V. 1980. Biochemical changes in the air-breath in catfish Clarias bratrachus (Linn.) exposed to malathion. Environ. Pollut. Serv. 22 : 149-158.

Murphey, S.D., Lauwerys, R.R., and Cheever, K. 1968. Comparative anticholinesterase action of organophosphorus insecticides in vertebrates. Toxicol. Appl. Pharmacol. 12 : 22-35.

Palawski, D., Buckler, D.R. and Mayer, E.L. 1983. Survival and condition of rainbow trout (Salmo gairdneri) after acute exposure to methyl paration, triphenyl phosphate, and DEF. Bull. Environ. Contam. Toxicol. 30 : 614-620.

Parke, D.V. 1981. Cytochrome P-450 and the detoxication of environmental chemicals. Aquat. Tox. 1 : 367-376.

Passino, D.R.M. 1984. Biochemical indicators of stress in fishes : an overview. In : Contaminant effects on fisheries. V.C. Cairns, P.V. Hodson, J.O. Nriagru. eds. John Wiley and Sons, p. 37-49.

Pigmental, D. 1971. Ecological effects of pesticides on non-target species. Washington, D.C. : U.S. Department Printing Office.

Rattner, B.A., Hoffman, D.I., and Marn, C.M. 1989. Use of mixed-function oxygenases to monitor contaminant exposure in wildlife. Environ Toxicol. Chem. 8 : 1093-1102.

Salte, R., Syvertsen, C., Kjonnoy, M., and Fonnum, F. 1987. Fatal acetylcholinesterase inhibition in salmonids subjected to a routine organophosphate treatment. Aquaculture 61:173-179.

Shukla L., Shrivastava, A., Merwani, D., and Dandly, A.K. 1984. Effect of sublethal malathion on ovarian histophysiology in Sarotherodon mossambicus Comp. Physiol. Ecol. 9 : 13-17.

Singh, S and Singh, T.P. 1987. Evaluation of toxicity limit and sex hormone production in response to Cythion and BHC in the vitellogenic catfish, Clarias batrachus. Environ. Res. 42 (2) : 482-488.

Taylor, P. 1991. Anticholinesterase agents. In : Goodman and Gilman's the Pharmacological Basis of Therapeutics. 11th ed. A.G. Gilman, T.W. Rall, A. Nies and P. Taylor, eds. Pergamon Press Republic of singapore. p. 131-165.

Zbinder, G. and Flurycoversi, M. 1981. Significance of the LD_{50} test for the toxicological evaluation of chemical substances. Arch. Toxicol. 47 : 77-99.

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย