

แบบเสนอรายงานวิจัย/สร้างสรรค์ฉบับย่อ

ส่วนที่ 1 รายละเอียดเกี่ยวกับโครงการวิจัย/สร้างสรรค์

ชื่อโครงการ (ภาษาไทย) การตอบสนองของตัวบ่งชี้ทางชีวภาพของไส้เดือนดิน *Pheretima peguana* ต่อไซเปอร์เมทริน(ภาษาอังกฤษ) Biomarkers responses of the earthworm *Pheretima peguana* to cypermethrin

ชื่อผู้วิจัย/สร้างสรรค์ (นาย,นาง,นางสาว) (ภาษาไทย) ปทุมพร เมืองพระ, นงนุช เอื้อวงศ์

(ภาษาอังกฤษ) Ptumporn Muangphra, Nongnuch Euawong

คณะวิชา วิทยาศาสตร์ ภาควิชา ชีววิทยา มหาวิทยาลัยศิลปากร

สาขาวิชา สาขาเกษตรศาสตร์และชีววิทยา กลุ่มวิชาทรัพยากรดิน

แหล่งทุนอุดหนุนการวิจัย/สร้างสรรค์.....สถาบันวิจัยและพัฒนา มหาวิทยาลัยศิลปากร

.....งบประมาณแผ่นดิน ปี 2555.....

ปีที่เสร็จ 2556

ส่วนที่ 2 รายละเอียดรายงานวิจัย/สร้างสรรค์ฉบับย่อ

1. บทคัดย่อภาษาไทยและภาษาอังกฤษ

บทคัดย่อ

ไซเปอร์เมทรินเป็นสารกำจัดศัตรูพืชที่ใช้กันอย่างแพร่หลาย มีระยะเวลาการตกค้างนานกว่าสารกำจัดศัตรูพืชชนิดอื่น ดังนั้นหากเกษตรกรใช้สารกำจัดศัตรูพืชอย่างไม่ระมัดระวังอาจส่งผลกระทบต่อเกษตรกร ผู้บริโภค สิ่งแวดล้อม และสิ่งมีชีวิตที่ไม่ใช่เป้าหมาย การศึกษาการตอบสนองของตัวบ่งชี้ทางชีวภาพของไส้เดือนดินต่อไซเปอร์เมทรินจึงเป็นเรื่องสำคัญต่อการเฝ้าระวังปัญหามลพิษ การศึกษาครั้งนี้ทำในห้องปฏิบัติการบนกระดาดกรอง ใช้ไส้เดือนดิน *Pheretima peguana* ศึกษาความเป็นพิษแบบเฉียบพลัน และการตอบสนองของตัวบ่งชี้ทางชีวภาพ (micronucleus, Tail length, Olive tail moment, Neutral red retention time, Pinocytic adherence ability) ของไส้เดือนดินต่อไซเปอร์เมทรินที่ความเข้มข้นระดับ sublethal 5 ความเข้มข้น (3.5×10^{-5} , 3.5×10^{-4} , 3.5×10^{-3} , 3.5×10^{-2} และ $3.5 \times 10^{-1} \mu\text{g.cm}^{-2}$) ทำการศึกษาบนกระดาดกรอง เป็นเวลา 48 ชั่วโมง ผลการศึกษาพบว่า ไซเปอร์เมทรินเป็นพิษต่อไส้เดือนดิน ความเป็นพิษแบบเฉียบพลันต่อไส้เดือนดินในเวลา 48 ชั่วโมง (48h-LC_{50}) เป็น $3.5 \times 10^{-1} \mu\text{g.cm}^{-2}$ และเป็นความเข้มข้น LC_{50} ที่ทำให้เซลล์ coleomocytes เกิด DNA single-strand breaks และ micronucleus เพิ่มขึ้นแตกต่างจากกลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) ความเข้มข้นต่ำกว่า LC_{50} 10 เท่า ($3.5 \times 10^{-2} \mu\text{g.cm}^{-2}$) พบว่าทำให้คุณสมบัติการยึดเกาะและกินแบบ pinocytosis มีค่าลดลงแตกต่างจากกลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) และที่ความเข้มข้นต่ำกว่า LC_{50} 100 เท่า ($3.5 \times 10^{-3} \mu\text{g.cm}^{-2}$) พบว่าทำให้ค่า neutral red retention time มีค่าลดลงแตกต่างจากกลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) การศึกษาความสัมพันธ์ระหว่าง biomarkers กับความเข้มข้นของไซเปอร์เมทรินพบที่มีความสัมพันธ์แบบผกผันในระดับสูงมาก ระหว่างความเข้มข้นไซเปอร์เมทรินกับ neutral red retention time และ pinocytic adherence ability ($R^2 = 0.98$; $r = -0.990$ $p\text{-value} = 0.000$)

คำสำคัญ : Cypermethrin, Comet assay, Micronucleus, Lysosomal membrane stability

Abstract

Cypermethrin is a current pesticide with long lasting or residual properties more than many other pesticides. Therefore, if cultivators are less awareness on the use of this pesticide it may be harmful to themselves, consumer, environment and non target animal. The study of biomarkers responses of the earthworm *Pheretima peguana* to cypermethrin is essential for the monitoring of environmental pollution.

We studied the acute toxicity of cypermethrin to earthworm, *Pheretima peguana*. The biomarker responses (micronucleus, Tail length, Olive tail moment, Neutral red retention time, Pinocytic adherence ability) to cypermethrin were conducted at 5 sublethal concentrations (3.5×10^{-5} , 3.5×10^{-4} , 3.5×10^{-3} , 3.5×10^{-2} and $3.5 \times 10^{-1} \mu\text{g.cm}^{-2}$) on filter papers for 48 h. The results showed that cypermethrin was toxic to earthworms. The acute toxicity of cypermethrin to earthworm in 48 h (48h-LC₅₀) was $3.5 \times 10^{-1} \mu\text{g.cm}^{-2}$. The LC₅₀ concentration increased significantly DNA single-strand breaks and micronucleus of coelomocytes ($p < 0.05$). At concentration less than $10 \times \text{LC}_{50}$ ($3.5 \times 10^{-2} \mu\text{g.cm}^{-2}$) decreased significantly the pinocytic adherence ability of coelomocytes ($p < 0.05$) and less than $100 \times \text{LC}_{50}$ ($3.5 \times 10^{-3} \mu\text{g.cm}^{-2}$) decreased significantly neutral red retention time ($p < 0.05$). The correlation coefficient of biomarkers and cypermethrin concentration was highly negative between cypermethrin concentration, and neutral red retention time and pinocytotic adherence ability ($R^2 = 0.98$; $r = -0.990$ $p\text{-value} = 0.000$).

Key words : Cypermethrin, Comet assay, Micronucleus, Lysosomal membrane stability

2. บทนำ

ไซเพอร์เมธริน [alpha-cyano-3 phenoxybenzyl ester of 2,2-dimethyl-3-(2,2-dichlorovinyl) cyclopropane carboxylic acid] เป็นสารป้องกันกำจัดศัตรูพืช (pesticide) ในกลุ่มสารไพรีทรอยด์สังเคราะห์ ใช้เป็นสารกำจัดแมลง (insecticide) มีโครงสร้างเลียนแบบโมเลกุลจากสารไพรีทริน (pyrethrins) ที่สกัดได้จากพืชไพรีธรัม (pyrethrum) ใช้ได้ผลในช่วงกว้างกับแมลงหลายชนิด (Leahey, 1985) ปัจจุบันมีการใช้สารไพรีทรอยด์สังเคราะห์กันมากขึ้นหลายเท่าตัว เนื่องจากเป็นพิษน้อยต่อสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม และระยะเวลาการตกค้างในดินสั้นกว่าสารกำจัดแมลงกลุ่มออร์กาโนคลอรีน อย่างไรก็ตามสารประกอบเหล่านี้มีรายงานว่าเป็นพิษต่อปลา และสัตว์น้ำหลายชนิด (McLeese et al., 1980; Dalta and Kaviraj, 2003) รวมทั้งหากมีการใช้อย่างแพร่หลายมากขึ้น จะทำให้เกิดผลเสียต่อพืชและสัตว์

จากการสืบค้นข้อมูลที่ผ่านมา พบว่า ไซเพอร์เมธรินทำให้เกิดความผิดปกติของโครโมโซม (chromosomal aberration) เช่น การฟอร์ม micronucleus การเกิด Sister chromatid exchange ในเซลล์ไขกระดูกของหนู mouse และหนู rat (Chauhan et al., 1997; Celik et al., 2005) ยังมีรายงานผลของไซเพอร์เมธรินต่อการลดความเหลว (fluidity) ของ erythrocyte membrane ของหนู โดยไซเพอร์เมธรินไปเกาะที่ hydrophobic core ของเมมเบรน ทำให้เพิ่มการอัดแน่นของลิปิด ทำให้ความเหลวของเมมเบรนลดลง (Gabbianelli et al., 2002)

แม้ไส้เดือนดินไม่ใช่สิ่งมีชีวิตเป้าหมายของสารกำจัดศัตรูพืช แต่หากไซเพอร์เมธรินมีผลต่อสารพันธุกรรม หรือเมมเบรนของไส้เดือนดิน จะมีผลกระทบต่อประชากรไส้เดือนดิน และสิ่งมีชีวิตที่สูงขึ้นในลำดับชั้นอาหาร ส่งผลต่อความอุดมสมบูรณ์ของทรัพยากรดิน ท้ายที่สุดส่งผลต่อผลผลิตทางการเกษตรและการส่งออกของประเทศ *Pheretima peguana* ซึ่งเป็นไส้เดือนดินที่แพร่กระจายพบทุกพื้นที่ในประเทศไทย หากได้ข้อมูลของไส้เดือนดินชนิดนี้น่าจะเป็นข้อมูลที่ต่อการประเมินคุณภาพสิ่งแวดล้อมของประเทศ และเป็นข้อมูลพื้นฐานของการกำหนดมาตรฐานความเป็นพิษของไซเพอร์เมธรินของไทย

การตรวจสอบปริมาณไซเพอร์เมธรินในสภาพแวดล้อมเป็นเรื่องยากและเสียค่าใช้จ่ายสูง จึงมีการใช้ biomarkers แทนการประเมินปริมาณที่แท้จริงในสภาพแวดล้อม biomarkers สามารถเชื่อมโยงความสัมพันธ์ระหว่างสารเคมีและผลของความเป็นพิษ และมีความไวมากกว่าวิธีพื้นฐาน เช่น การตาย การเจริญเติบโต และการสืบพันธุ์ ปัจจุบันข้อมูลการประเมินความเสี่ยงและการประเมินผลกระทบทางนิเวศพิษวิทยาของสารกำจัดศัตรูพืชของประเทศไทยด้วย biomarkers ยังมีจำกัด โดยเฉพาะข้อมูลต่อสิ่งมีชีวิตในประเทศไทย ทำให้ข้อมูลส่วนใหญ่ที่ใช้อย่างอิงและนำมาพัฒนาข้อมูลมาตรฐานคุณภาพดิน รวมถึงใช้ในการกำหนดค่าความปลอดภัยของสารกำจัดศัตรูพืช เป็นข้อมูลจากต่างประเทศแถบยุโรปหรืออเมริกา ข้อมูลที่นำมาใช้อาจไม่เหมาะสม เนื่องจากชนิดของสิ่งมีชีวิตและสภาพแวดล้อมที่แตกต่างกันของแต่ละพื้นที่ ดังนั้นการศึกษาข้อมูลผลกระทบของสารกำจัดศัตรูพืชในประเทศไทยจึงเป็นเรื่องที่สำคัญต่อการเฝ้าระวังปัญหามลพิษ

3. วัตถุประสงค์การวิจัย

1. ศึกษาระดับความเข้มข้นของไซเพอร์เมธรินที่ทำให้ไส้เดือนดิน *Pheretima peguana* ตาย 50% (LC₅₀) ในเวลา 48 ชั่วโมง เพื่อใช้เป็นข้อมูลพื้นฐานในการศึกษาความเป็นพิษแบบเฉียบพลัน
2. ศึกษาระดับความเข้มข้นของไซเพอร์เมธรินที่ไม่ทำให้ไส้เดือนดินตาย แต่มีผลต่อสารพันธุกรรม (เกิด DNA single-strand breaks หรือเกิด Chromosome aberration) ความเสถียรของเมมเบรนของ lysosome และความสามารถในการยึดเกาะและกินแบบ pinocytosis (Pinocytic adherence ability) ของเซลล์ coelomocytes
3. ทราบดัชนีชีวภาพ (biomarkers) ที่ตอบสนองไวต่อไซเพอร์เมธริน

4. วิธีการดำเนินการวิจัย

4.1 การหาค่า LC₅₀ ของไซเพอร์เมธรินต่อไส้เดือนดิน

ใช้ไส้เดือนดินที่มี clitellum สมบูรณ์ ชั่งน้ำหนักไส้เดือนดินและจดบันทึก เตรียมสารละลายไซเพอร์เมธรินทางการค้า (สตาร์น็อกซ์ 350) 5 ความเข้มข้น เป็นความเข้มข้นในช่วงกว้าง ดูดสารละลายไซเพอร์เมธรินความเข้มข้นละ 3 มล. ใส่ลงในจานเพาะเชื้อขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 9 ซม. ที่บุด้วยกระดาษกรอง Whatmann เบอร์ 1 ให้มีความเข้มข้น 23.5×10^{-4} , 23.5×10^{-3} , 23.5×10^{-2} , 23.5×10^{-1} $\mu\text{g} \cdot \text{cm}^{-2}$ กระดาษกรอง ใส่ไส้เดือนดินที่เตรียมไว้ลงในจานเพาะเชื้อจานละ 1 ตัว ใช้ไส้เดือนดิน 20 ตัว/1 ความเข้มข้น วางจานเพาะเชื้อในที่มืด อุณหภูมิห้อง นับจำนวนไส้เดือนดินที่ตายทุกวันเป็นเวลา 2 วัน เมื่อได้ช่วงความเข้มข้นกว้าง ๆ ที่ทำให้ไส้เดือนดินรอดตายและตายทั้งหมดแล้ว นำมาซอยย่อยเป็นช่วงแคบ 5 ความเข้มข้น ทำการทดลองแบบเดิมอีกครั้ง นำค่าที่ได้มาคำนวณหา LC₅₀ โดยโปรแกรมสำเร็จรูป SPSS 10.5 ด้วย Probit analysis

4.2 การศึกษาความเป็นพิษของสารละลายไซเพอร์เมธรินต่อสารพันธุกรรมของไส้เดือนดิน

4.2.1 การชักนำให้ปล่อย coelomocytes

Spray สารละลายไซเพอร์เมธรินอย่างละ 5 ความเข้มข้น (ทุกความเข้มข้นน้อยกว่าค่า LC₅₀) คือ 3.5×10^{-5} , 3.5×10^{-4} , 3.5×10^{-3} , 3.5×10^{-2} และ 3.5×10^{-1} $\mu\text{g} \cdot \text{cm}^{-2}$ และใช้น้ำกลั่นเป็นกลุ่มควบคุมลบ (negative control) ความเข้มข้นละ 3 มล. ลงบนกระดาษกรอง Whatmann เบอร์ 1 ที่รองด้วยจานเพาะเชื้อขนาด 9 ซม. ใส่ไส้เดือนดินที่เตรียมไว้ในจานเพาะเชื้อจานละ 1 ตัว ใช้ไส้เดือนดิน 20 ตัว/1 ความเข้มข้น วางจานเพาะเชื้อในที่มืด เมื่อครบกำหนด 2 วัน นำไส้เดือนดินออกจากจานเพาะเชื้อ นำแต่ละตัวไปกระตุ้นให้ปล่อย coelomocytes ออกจากช่องลำตัวด้วยวิธี non-invasive extrusion method (Eyambe et al., 1991) นำ coelomocytes จากแต่ละตัวใส่ในหลอดทดลอง เติมน้ำ LBSS (Lumbricus balanced salt solution) ที่เย็น 1 มล. ปั่นให้เซลล์แตกกะดอน ความเร็วรอบ 2500 รอบ/นาที เป็นเวลา 10 นาที นำ coelomocytes ของไส้เดือนดิน 3 ตัว/ความเข้มข้น ไปทดสอบ Micronucleus test, Comet assay, Neutral red retention time assay และ Pinocytic adherence ability assay นับจำนวนเซลล์ coelomocytes ด้วย haemocytometer ควรมีจำนวนเซลล์มากกว่า 10^5 cell ml⁻¹

4.2.2 การทดสอบด้วย Micronucleus test

นำเซลล์จากไส้เดือนดินแต่ละความเข้มข้นมา smear บนกระจกสไลด์ ใช้ไส้เดือนดิน 3 ตัว/ความเข้มข้น ย้อมสี coelomocytes ด้วย Wright rapid stain ทำการตรวจนับเซลล์ปกติ เซลล์ที่มีนิวเคลียสผิดปกติ (เช่น micronucleus, binucleated, trinucleate, multinucleate และ Nuclear abnormal แบบอื่นๆ) และเซลล์ตายแบบ apoptosis และ necrosis นับรวมกันทั้งหมด 1000 เซลล์โดยไม่ซ้ำกัน ภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบเลนส์ประกอบ กำลังขยาย 1000x

4.2.3 การทดสอบด้วย Comet assay (Reinecke and Reinecke, 2004 ดัดแปลงจาก Singh et al., 1988)

เตรียมกระจกสไลด์ให้สะอาดด้วย 70% alcohol หยด 100 μl 0.5% Normal melting agarose (NMA) เพื่อให้ NMA ผนบบนผิวกระจกสไลด์ ทำให้ agarose แข็งโดยแช่ตู้เย็นเป็นเวลา 5-10 นาที ปิเปิดเซลล์ coelomocytes 5 μl ลงใน microcentrifuge tube ที่มี PBS (pH 7.3) ปริมาตร 15 μl จากนั้นเติมน้ำ Low melting agarose (LMA) ปริมาตร 20 μl ลงใน microcentrifuge tube ผสมให้เข้ากัน และอุ่นที่อุณหภูมิ 37-40°C ใน heat block ปิเปิดปริมาตร 40 μl ลงบนกระจกสไลด์ที่เคลือบ ด้วย NMA หยด 40 μl 0.5% LMA ซ้อนทับบริเวณที่หยดเซลล์ผสมลงไป ปิดด้วยกระจกปิดสไลด์ นำกระจกสไลด์ไปวางบน ice pack นาน 1 นาที เมื่อแข็งแล้วให้นำกระจกปิดสไลด์ออก นำกระจกสไลด์ไปแช่ใน lysis solution (2.5 M NaCl, 100 mM EDTA, 10 mM Tris base, 1% Triton-X, pH 10.0) ที่ 4°C เป็นเวลา 15±1 ชั่วโมง ทุกขั้นตอนทำในที่มืด อุณหภูมิ 4°C นำกระจกสไลด์วางใน Electrophoresis chamber ที่มี Electrophoresis buffer (300 mM NaOH, 1 mM EDTA, pH>13) นาน 20 นาที เปิดเครื่อง electrophoresis ใช้กระแสไฟฟ้า 300 mA, 12 V เป็นเวลา 30 นาที นำตัวอย่าง DNA บนกระจกสไลด์

ไปล้างด้วย Neutralization buffer 3 ครั้ง ครั้งละ 5 นาที เพื่อปรับ pH ของตัวอย่างให้เป็นกลาง นำตัวอย่าง DNA ไป fix ด้วย Absolute methanol นาน 5 นาที เพื่อช่วยละลายไขมันส่วนเกินออก และย้อมติดสีดีขึ้น

ทำการย้อมสีด้วย 100 μ l Ethidium bromide (EtBr) ที่มีความเข้มข้น 20 μ g.ml⁻¹ เป็นเวลา 5 นาที ล้างสีส่วนเกินด้วย น้ำกลั่น นำกระจกสไลด์ไปตรวจผลการทำลายสารพันธุกรรมด้วยกล้องจุลทรรศน์ fluorescence ที่มี filter block UV-2A ที่ กำลังขยาย 400 เท่า บันทึกผลการทดลองและถ่ายรูป DNA ของ coelomocytes วิเคราะห์ผลโดยการถ่ายรูป DNA ที่ถูกทำลายของแต่ละเซลล์ที่ไม่ซ้อนทับกันรวม 100 เซลล์ วัด DNA ที่ถูกทำลายด้วยโปรแกรม LUCIA Comet assay ซึ่งวิเคราะห์ DNA ที่ถูกทำลายจาก parameter 3 ชนิด คือ Tail DNA (TD) %, Tail length (TL) และ Olive tail moment

4.3 การศึกษาความเป็นพิษของสารละลายไซเพอร์เมธรินต่อความเสถียรของเยื่อหุ้ม lysosome ด้วย Neutral red retention assay

ตรวจสอบการมีชีวิตของ coelomocytes suspension ในสารละลาย LBSS (Lumbricus balance salt solution) ให้มีชีวิตมากกว่า 95% โดยตรวจดูการติดสี trypan blue (Trypan blue exclusion method) ดูด 40 μ l สารละลายของ coelomocytes และ LBSS ปั่นลงบนกระจกสไลด์ ที่ treat ด้วย poly-L-lysine (20 μ l ใน 100 μ l น้ำกลั่น) วางกระจกสไลด์ บน rack ที่แขวนเหนืออ่างน้ำเย็น อุณหภูมิใน rack 10°C นาน 15 นาทีเพื่อให้ coelomocytes ยึดเกาะกับกระจกสไลด์ เท coelomocytes ที่มากเกินพอออกจากกระจกสไลด์ เติม 20 μ l Neutral red working solution บนชั้น coelomocytes ปิด cover slip นำไปส่องดูใต้กล้อง กำลังขยาย 400X วัดความเสถียรของเมมเบรนของ lysosome โดยดูจากจำนวนเซลล์ที่ติดสีแดงใน cytosol (leak) เทียบกับจำนวนเซลล์ที่ไม่มีสีแดงใน cytosol (no leak) ทุก 2 นาที เว้น 2 นาที ทำเช่นนี้ไปจนกระทั่ง >50% ของจำนวนเซลล์มี cytosol ติดสี หรือจนครบ 60 นาที เวลาที่เซลล์ติดสีและไม่ติดสี ~ 50% คือ Neutral red retention time (NRRT) ให้หยุดการทดลอง

4.4 การศึกษาความเป็นพิษของสารละลายไซเพอร์เมธรินต่อการยึดเกาะและการกินแบบ pinocytosis ด้วย Pinocytic adherence ability assay

นำเซลล์ coelomocytes ที่ได้รับไซเพอร์เมธรินความเข้มข้นต่าง ๆ 5 ความเข้มข้น และกลุ่มควบคุม จำนวน 2×10^5 cell.ml⁻¹ ปริมาตร 150 μ l มาบ่มในถาด 96 หลุม นาน 1 ชม. เพื่อให้เซลล์เกาะกันหลุม ใส่ Hank's Balanced Salt Solution (HBSS) ที่มี Neutral red 500 μ g.ml⁻¹ ปริมาตร 150 μ l วางทิ้งไว้ 1 ชม. เพื่อให้เซลล์กินสี ล้างเซลล์ที่ไม่ติดกันหลุมและ Neutral red อีกระด้วย HBSS นำ Neutral red ออกจากเซลล์ที่กินหลุมด้วย Acid alcohol (3% HCl ใน alcohol) อ่านค่าการดูดกลืนแสงที่ 540 nm ด้วย Microplate reader

5. ผลการทดลอง

5.1 ค่า LC₅₀ ของไซเพอร์เมธรินต่อไส้เดือนดิน

ผลการทดสอบความเป็นพิษแบบเฉียบพลันของไซเพอร์เมธรินต่อไส้เดือนดินในเวลา 48 ชั่วโมง บนกระดาดกรอง พบว่าไส้เดือนดินตายอย่างต่อเนื่องเมื่อความเข้มข้นของไซเพอร์เมธรินเพิ่มขึ้น คำนวณค่า 48h-LC₅₀ จากโปรแกรม Probit analysis ได้ค่า 48h-LC₅₀ เท่ากับ 3.5×10^{-1} μ g.cm⁻²

5.2 การศึกษาความเป็นพิษของไซเพอร์เมธรินต่อสารพันธุกรรมของไส้เดือนดิน

การทดสอบความเป็นพิษของไซเพอร์เมธรินต่อโครโมโซม และ DNA ของเซลล์ coelomocytes ด้วย Micronucleus test และ Comet assay ที่ระดับความเข้มข้นต่ำกว่า LC₅₀ ใช้ความเข้มข้น 5 ระดับ (3.5×10^{-5} , 3.5×10^{-4} , 3.5×10^{-3} , 3.5×10^{-2} และ 3.5×10^{-1} μ g.cm⁻²) โดยมีน้ำกลั่นเป็นกลุ่มควบคุม เป็นเวลา 2 วัน บนกระดาดกรอง ทำซ้ำความเข้มข้นละ 3 ซ้ำ

ผลการศึกษา Micronucleus test พบว่าไส้เดือนดินที่ได้รับไซเพอร์เมธริน มีจำนวน micronucleus, binucleate, trinucleate, multinucleate, มีเซลล์ตายแบบ necrosis และ apoptosis, และมี Nuclear abnormal อื่น ๆ เพิ่มขึ้นตามความเข้มข้นที่เพิ่มขึ้น ทุกความเข้มข้นเปอร์เซ็นต์ของเซลล์ผิดปกติมีน้อยกว่า 50 เปอร์เซ็นต์ของเซลล์ปกติ (ตารางที่ 1) ยกเว้นที่ความเข้มข้น 3.5×10^{-1} μ g.cm⁻² (LC₅₀) มีเปอร์เซ็นต์เซลล์ผิดปกติ 52.23 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งมากกว่าเซลล์ปกติ

ไซเพอร์เมธรินความเข้มข้น 3.5×10^{-1} μ g.cm⁻² (LC₅₀) ทำให้มี micronucleus, trinuclei, multinuclei, necrosis และ apoptosis มากกว่ากลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (p<0.05) (ตารางที่ 1)

การทดสอบความเป็นพิษของไซเพอร์เมธรินต่อการทำลายสารพันธุกรรมด้วย Comet assay พบว่าเมื่อความเข้มข้นเพิ่มขึ้นจะทำลายสารพันธุกรรมของเซลล์ coelomocytes ที่ความเข้มข้นต่ำ (3.5×10^{-5} , 3.5×10^{-4} $\mu\text{g} \cdot \text{cm}^{-2}$) ทำให้เกิด Tail length และ Olive tail moment เพิ่มขึ้น และเมื่อความเข้มข้นสูงขึ้น (3.5×10^{-3} , 3.5×10^{-2} $\mu\text{g} \cdot \text{cm}^{-2}$) ค่า Tail length และ Olive tail moment กลับลดลง และที่ความเข้มข้น 3.5×10^{-1} $\mu\text{g} \cdot \text{cm}^{-2}$ กลับเพิ่มขึ้นอีกครั้ง (ตารางที่ 2) ไซเพอร์เมธรินความเข้มข้น LC_{50} (3.5×10^{-1} $\mu\text{g} \cdot \text{cm}^{-2}$) ทำให้ Tail length และ Olive tail moment เพิ่มขึ้นมากกว่ากลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$)

5.3. การศึกษาความเป็นพิษของสารละลายไซเพอร์เมธรินต่อความเสถียรของเยื่อหุ้ม lysosome ด้วย Neutral red retention assay

พบว่าเมื่อความเข้มข้นของไซเพอร์เมธรินเพิ่มขึ้น ระยะเวลาในการติดสี Neutral red ใน cytosol ของเซลล์ coelomocytes เร็วขึ้นกว่ากลุ่มควบคุม (น้ำกลั่น) ระยะเวลาในการติดสี Neutral red สัมพันธ์กับปริมาณของไซเพอร์เมธริน ความเข้มข้นไซเพอร์เมธรินตั้งแต่ 3.5×10^{-3} $\mu\text{g} \cdot \text{cm}^{-2}$ มีค่า Neutral red retention time น้อยกว่ากลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) (ตารางที่ 3) Neutral red retention time เป็น biomarkers ที่มีความไวมาก วัดได้แม้ความเข้มข้นต่ำ (3.5×10^{-3} $\mu\text{g} \cdot \text{cm}^{-2}$ หรือ น้อยกว่า LC_{50} 100 เท่า) และใช้เวลาเพียง 48 ชั่วโมง

5.4. การศึกษาความเป็นพิษของสารละลายไซเพอร์เมธรินต่อการยึดเกาะและการกินแบบ pinocytosis ของเซลล์ coelomocytes (Pinocytic adherence ability)

พบว่ากลุ่มควบคุมมีค่าการดูดกลืนแสงสูงสุดและลดลงอย่างต่อเนื่องตามความเข้มข้นของไซเพอร์เมธรินที่เพิ่มขึ้น และลดลงสูงสุดที่ความเข้มข้นของไซเพอร์เมธริน 3.5×10^{-1} $\mu\text{g} \cdot \text{cm}^{-2}$ (ตารางที่ 4) ไซเพอร์เมธรินความเข้มข้นตั้งแต่ 3.5×10^{-2} $\mu\text{g} \cdot \text{cm}^{-2}$ ทำให้ค่าการดูดแสงลดลงแตกต่างจากกลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$)

การศึกษาค่าสหสัมพันธ์ (correlation coefficient) ระหว่าง biomarkers กับปริมาณของไซเพอร์เมธรินพบว่า Micronucleus, Nuclear abnormal, Neutral red retention time และ Pinocytic adherence ability มีความสัมพันธ์แบบเส้นตรงกับปริมาณไซเพอร์เมธริน ส่วน Tail DNA%, Tail length และ Olive tail moment มีความสัมพันธ์กับปริมาณไซเพอร์เมธรินแบบโพลีโนเมียล (polynomial) และจากการเปรียบเทียบความไวของ biomarkers ในการตอบสนองต่อปริมาณไซเพอร์เมธรินโดยวิเคราะห์จากความสัมพันธ์เชิงเส้นด้วยโปรแกรม SPSS version 11.5 (ตารางที่ 5) พบว่าค่า r ของ Neutral red retention assay และ Pinocytic adherence ability มีค่าเป็นลบ (-0.090) ขณะที่ Nuclear abnormal, Micronucleus, Tail length, Olive tail moment และ Tail DNA% มีค่าเป็นบวก (0.989, 0.976, 0.561, 0.552 และ 0.352 ตามลำดับ)

6. วิจารณ์ผลการทดลอง

การศึกษานี้ micronucleus สามารถใช้เป็น biomarkers ตรวจสอบพิษของไซเพอร์เมธรินต่อ *P. peguana* ได้ที่ระดับความเข้มข้น LC_{50} เพราะพบว่าเซลล์ coelomocytes มีจำนวนนิวเคลียสผิดปกติคือ มี micronucleus, trinucleate และ multinucleate เพิ่มขึ้นที่ความเข้มข้น 3.5×10^{-1} $\mu\text{g} \cdot \text{cm}^{-2}$ แตกต่างจากกลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยของ Scarpato et al. (1996) และ Dougherty et al. (1993) ที่รายงานว่าเซลล์มีนิวเคลียสผิดปกติเพิ่มมากขึ้นเมื่อได้รับสารกำจัดแมลงกลุ่มออร์แกโนฟอสเฟส และไพรีทรอยด์มากขึ้น ไซเพอร์เมธรินอาจมีผลต่อโครงสร้างและการทำงานของ microtubule ทำให้การทำงานของ spindle fiber ไม่สมบูรณ์ หรือไซเพอร์เมธรินทำลายสารพันธุกรรม ทำให้มีการแตกหักของโครโมโซม จนเกิดเป็นชิ้นส่วนของโครโมโซมขนาดเล็กที่ไม่มี centromere (acentric fragment) ซึ่งเป็นที่ยึดเกาะของ spindle fiber ทำให้ไม่สามารถเคลื่อนที่เข้าไปรวมกับโครโมโซมหลักได้ในระยะแอนาเฟส เกิดเป็น micronucleus ซึ่งถ้าความผิดปกติเกิดจากการทำลายสารพันธุกรรมจะสามารถยืนยันได้ถูกต้องด้วยการทดสอบด้วยวิธี Comet assay

จากการตรวจสอบด้วยวิธี Comet assay พบว่าไซเพอร์เมธรินความเข้มข้นสูงสุด (LC_{50}) ทำให้ Tail length และ Olive tail moment เพิ่มขึ้นแตกต่างจากกลุ่มควบคุม แสดงว่าความเข้มข้นสูงจะทำลาย DNA single strand ทำให้โครโมโซมขาดเป็นท่อนสั้นที่ไม่มี centromere ทำให้มีความผิดปกติของการเคลื่อนที่ของโครโมโซม จนเกิดเป็น micronucleus หลังจากมีการแบ่งเซลล์ ไซเพอร์เมธรินไม่น่าจะมีผลต่อ microtubule เพราะถ้ามีผลต่อ microtubule ด้วย น่าจะส่งผลให้ micronucleus แตกต่างจากกลุ่มควบคุมที่ความเข้มข้นต่ำกว่า LC_{50} ซึ่งเป็นความเข้มข้นที่ทำให้เกิด Tail length และ Olive tail moment อยู่แล้ว

ตารางที่ 1 ผลของไซเพอร์เมธรินต่อความผิดปกติของนิวเคลียสของเซลล์ coelomocytes ของไส้เดือนดินที่ได้รับสารเป็นเวลา 48 ชั่วโมง

ความเข้มข้น ($\mu\text{g.cm}^{-2}$)	จำนวนเซลล์/1000 เซลล์								เปอร์เซ็นต์ เซลล์ ผิดปกติ
	เซลล์ที่นิวเคลียส ปกติ	binucleate	trinucleate	multinucleate	micronucleus	necrosis	apoptosis	Nuclear abnormal	
0	926.67 $\pm$ 15.71 ^c	7.67 $\pm$ 1.67 ^a	4.33 $\pm$ 3.71 ^a	4.67 $\pm$ 1.86 ^a	1.67 $\pm$ 0.33 ^a	48.67 $\pm$ 11.57 ^a	2.33 $\pm$ 1.33 ^a	1.67 $\pm$ 0.67 ^a	7.12
3.5 $\times 10^{-5}$	890.00 $\pm$ 21.60 ^{cb}	7.33 $\pm$ 2.60 ^a	11.00 $\pm$ 2.65 ^a	3.67 $\pm$ 1.20 ^a	3.67 $\pm$ 1.45 ^a	77.00 $\pm$ 17.52 ^a	4.00 $\pm$ 1.16 ^a	3.33 $\pm$ 0.67 ^a	11.00
3.5 $\times 10^{-4}$	787.00 $\pm$ 41.62 ^{cb}	17.67 $\pm$ 6.64 ^a	8.33 $\pm$ 1.33 ^a	12.67 $\pm$ 4.06 ^{ab}	27.00 $\pm$ 7.56 ^{ab}	132.33 $\pm$ 39.89 ^{ab}	4.00 $\pm$ 1.73 ^a	11.00 $\pm$ 4.36 ^a	21.30
3.5 $\times 10^{-3}$	709.67 $\pm$ 48.91 ^b	13.33 $\pm$ 2.96 ^a	22.00 $\pm$ 7.02 ^{ab}	18.00 $\pm$ 9.07 ^{ab}	41.33 $\pm$ 13.13 ^{ab}	159.67 $\pm$ 34.84 ^{ab}	18.33 $\pm$ 8.15 ^a	19.00 $\pm$ 14.53 ^a	29.13
3.5 $\times 10^{-2}$	703.67 $\pm$ 62.38 ^b	38.00 $\pm$ 7.13 ^a	21.00 $\pm$ 8.54 ^{ab}	16.67 $\pm$ 5.21 ^{ab}	44.00 $\pm$ 22.72 ^{ab}	138.00 $\pm$ 20.60 ^{ab}	14.00 $\pm$ 7.51 ^a	24.67 $\pm$ 8.17 ^a	29.63
3.5 $\times 10^{-1}$	477.67 $\pm$ 36.09 ^a	45.00 $\pm$ 16.09 ^a	44.00 $\pm$ 2.89 ^b	51.33 $\pm$ 17.15 ^b	58.67 $\pm$ 9.06 ^b	226.00 $\pm$ 18.58 ^b	63.33 $\pm$ 10.17 ^b	34.00 $\pm$ 6.03 ^a	52.23

หมายเหตุ ตัวอักษรภาษาอังกฤษที่เป็นตัวยกในคอลัมน์เดียวกันแตกต่างกันแสดงว่ามีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$)

ตารางที่ 2 ผลของไซเพอร์เมธรินต่อความผิดปกติของสารพันธุกรรมของเซลล์ coelomocytes ของไส้เดือนดินที่ได้รับสารเป็นเวลา 48 ชั่วโมง

ความเข้มข้น ($\mu\text{g.cm}^{-2}$)	Tail DNA % (%)	Tail length (micron)	Olive tail moment
กลุ่มควบคุม	3.38 $\pm$ 0.66 ^{ab}	7.59 $\pm$ 2.05 ^b	0.74 $\pm$ 0.37 ^b
3.5 $\times 10^{-5}$	4.20 $\pm$ 0.59 ^{ab}	11.66 $\pm$ 2.55 ^b	0.79 $\pm$ 0.24 ^b
3.5 $\times 10^{-4}$	5.43 $\pm$ 1.06 ^{ab}	9.66 $\pm$ 1.61 ^b	1.43 $\pm$ 0.34 ^b
3.5 $\times 10^{-3}$	4.06 $\pm$ 0.59 ^{ab}	3.17 $\pm$ 0.40 ^b	0.27 $\pm$ 0.22 ^b
3.5 $\times 10^{-2}$	2.77 $\pm$ 0.53 ^a	4.78 $\pm$ 1.79 ^b	0.34 $\pm$ 0.23 ^b
3.5 $\times 10^{-1}$	6.24 $\pm$ 0.81 ^b	50.98 $\pm$ 5.94 ^a	3.87 $\pm$ 0.64 ^a

หมายเหตุ ตัวอักษรภาษาอังกฤษที่เป็นตัวยกในคอลัมน์เดียวกันแตกต่างกันแสดงว่ามีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$)

ตารางที่ 3 ผลของไซเพอร์เมธรินต่อ Neutral red retention time ของเซลล์ coelomocytes ของไส้เดือนดินที่ได้รับสารเป็นเวลา 48 ชั่วโมง

ความเข้มข้น ($\mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-2}$)	Neutral red retention time (min)
กลุ่มควบคุม	31.25 $\pm$ 0.10 ^a
3.5 $\times 10^{-5}$	28.14 $\pm$ 0.23 ^{ab}
3.5 $\times 10^{-4}$	24.25 $\pm$ 1.96 ^{ab}
3.5 $\times 10^{-3}$	18.26 $\pm$ 2.66 ^{bc}
3.5 $\times 10^{-2}$	12.05 $\pm$ 2.14 ^c
3.5 $\times 10^{-1}$	5.01 $\pm$ 0.87 ^c

หมายเหตุ ตัวอักษรภาษาอังกฤษที่เป็นตัวยกในคอลัมน์เดียวกันแตกต่างกันแสดงว่ามีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$)

ตารางที่ 4 ผลของไซเพอร์เมธรินต่อการยึดเกาะและการกินแบบ pinocytosis ของเซลล์ coelomocytes ของไส้เดือนดินที่ได้รับสารเป็นเวลา 48 ชั่วโมง

ความเข้มข้น ($\mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-2}$)	การดูดกลืนแสง
กลุ่มควบคุม	1.97 $\pm$ 0.37 ^a
3.5 $\times 10^{-5}$	1.75 $\pm$ 0.22 ^{ab}
3.5 $\times 10^{-4}$	1.17 $\pm$ 0.22 ^{abc}
3.5 $\times 10^{-3}$	0.84 $\pm$ 0.27 ^{abc}
3.5 $\times 10^{-2}$	0.64 $\pm$ 0.20 ^{bc}
3.5 $\times 10^{-1}$	0.30 $\pm$ 0.09 ^c

หมายเหตุ ตัวอักษรภาษาอังกฤษที่เป็นตัวยกในคอลัมน์เดียวกันแตกต่างกันแสดงว่ามีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$)

ตารางที่ 5 เปรียบเทียบความไวของคุณลักษณะของ biomarkers สำหรับตรวจสอบไซเพอร์เมธริน

Biomarker	สมการความสัมพันธ์แบบเส้นตรง	Pearson Correlation, r	P -value	F	Correlation Level
Micronucleus	$y = 12.009x - 12.642$ ($R^2 = 0.95$)	$r = 0.976$	0.001	80.684	Very high
Nuclear abnormal	$y = 6.676x - 7.755$ ($R^2 = 0.977$)	$r = 0.989$	0.000	172.209	Very high
TD%	$y = 2.46x + 3.487$ ($R^2 = 0.128$)	$r = 0.357$	0.487	0.589	Low
TL	$y = 5.423x - 4.342$ ($R^2 = 0.315$)	$r = 0.561$	0.246	1.842	moderate
OTM	$y = 0.238x + 0.293$ ($R^2 = 0.305$)	$r = 0.552$	0.256	1.754	moderate
NRRT	$y = -5.299x + 38.373$ ($R^2 = 0.98$)	$r = -0.990$	0.000	191.350	Very high
Pinocytic adherence ability	$y = -0.343x + 2.313$ ($R^2 = 0.98$)	$r = -0.990$	0.000	195.730	Very high

Neutral red เป็นสารเคมีที่มีคุณสมบัติเป็น lipophilic สามารถผ่านเข้าเมมเบรนได้อย่างสะดวกโดยไม่ต้องใช้พลังงาน (Lowe et al., 1992) ประสิทธิภาพในการกักเก็บ neutral red ขึ้นอยู่กับ pH ของ lysosome และประสิทธิภาพของ proton pump บนเมมเบรนที่คอยรักษาสภาวะเป็นกรดของ lysosome (Ohkuma et al., 1982) ในสภาวะไม่ถูกกดดัน (stress) lysosome จะกักเก็บ Neutral red หลังจากการ uptake ได้ดีกว่าเมื่อมีสภาวะกดดัน เมื่อเยื่อหุ้ม lysosome หรือ H^+ ion pump ทำงานผิดปกติไป Neutral red จะรั่วเข้าสู่ cytosol ของเซลล์ได้เร็วขึ้น (Moore, 1980; Lowe et al., 1992) Neutral red retention assay มักใช้เป็น biomarkers เพื่อประเมินคุณภาพน้ำ และประเมินผลของ stressors ต่างๆ ต่อหอยทะเล (Da Ros et al., 2002; Martinez-Gomez et al., 2008; Franzellitti et al., 2010)

ในการศึกษานี้ Neutral red retention time เป็น biomarkers ที่มีประสิทธิภาพมากที่สุดในการตอบสนองต่อไซเพอร์เมธริน เพราะตอบสนองที่ระดับความเข้มข้นต่ำ ($3.5 \times 10^{-3} \mu\text{g} \cdot \text{cm}^{-2}$, ตารางที่ 3) เพียง 48 ชั่วโมงก็สามารถเห็นผลของไซเพอร์เมธรินต่อความเสถียรของเยื่อหุ้ม lysosome แสดงว่า neutral red retention time เป็น biomarkers ที่มีประสิทธิภาพในการตอบสนอง

จากการตรวจสอบด้วย Neutral red retention assay และการยึดเกาะด้วย Pinocytic adherence ability assay พบว่าไซเพอร์เมธรินความเข้มข้นที่ $3.5 \times 10^{-3} \mu\text{g} \cdot \text{cm}^{-2}$ ทำให้ค่า Neutral red retention time ลดลงแตกต่างจากกลุ่มควบคุม และที่ความเข้มข้นเพิ่มสูงขึ้น ($3.5 \times 10^{-2} \mu\text{g} \cdot \text{cm}^{-2}$) ยังทำให้ค่าการยึดเกาะลดลงด้วย แสดงว่ามีความผิดปกติของการกักเก็บสีใน lysosome ซึ่งน่าจะเกิดจากความผิดปกติในการเปิดปิดของ channel ที่เยื่อหุ้ม lysosome และการยึดเกาะลดลงอาจเนื่องจากความเข้มข้นของไซเพอร์เมธรินเพิ่มขึ้นมีผลต่อ raft-like plasma membrane domains ของ coelomocytes ซึ่ง Laughlin et al. (2004) รายงานว่า Lipid rafts ใน plasma membrane ของ eukaryotic cells มีบทบาทสำคัญในการยึดเกาะและ pinocytosis Heiniget et al. (1976, 1979) รายงานว่า Lipid raft เป็น microdomains มีองค์ประกอบเป็น cholesterol และถ้ามีการยับยั้งการสร้าง cholesterol จะทำให้ pinocytosis ลดลง Shakoory et al. (1988), Dahamma et al. (2009) และ Hussein et al. (2013) รายงานว่าไซเพอร์เมธรินมีผลทำให้ปริมาณ cholesterol ในกระแสเลือดลดลง ดังนั้นจึงส่งผลต่อ Lipid rafts ใน plasma membrane ทำให้การยึดเกาะของ coelomocytes ลดลง

Neutral red retention time เป็น biomarkers ที่มีประสิทธิภาพไวกว่า biomarkers อื่น ๆ เพราะสามารถตรวจสอบพิษของไซเพอร์เมธรินต่อ *P. peguana* ตั้งแต่ความเข้มข้น $3.5 \times 10^{-3} \mu\text{g} \cdot \text{cm}^{-2}$ ซึ่งเป็นความเข้มข้นต่ำกว่า Pinocytic adherence ability ถึง 10 เท่า และต่ำกว่าการตรวจสอบด้วย Comet assay (Tail length, Olive tail moment) และ Micronucleus ถึง 100 เท่าความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นไซเพอร์เมธรินกับ Neutral red retention time และ Pinocytic adherence ability เป็นความสัมพันธ์แบบ dose dependent เพราะแสดงความสัมพันธ์เชิงเส้นสูงมาก ผู้วิจัยจึงขอเสนอว่าวิธี Neutral red retention assay เป็นวิธีการตรวจสอบความเป็นพิษของไซเพอร์เมธรินต่อไส้เดือนดินที่ดีที่สุด

การศึกษานี้แสดงให้เห็นว่าการประเมินความเป็นพิษของสารเคมีด้วยการตรวจ biomarkers เป็นชุดทั้งด้านสรีรวิทยาและพันธุศาสตร์ร่วมกันจะทำให้ได้ข้อมูลความเป็นพิษของสารเคมีในระดับลึก เพื่อให้การประเมินผลกระทบของสารเคมีเป็นไปอย่างแม่นยำ การเลือก biomarkers ที่เหมาะสมเป็นเรื่องสำคัญเป็นอย่างยิ่ง biomarkers ที่ดีควรตอบสนองได้เมื่อมีการเปลี่ยนแปลงสารเคมีในระบบนิเวศและตอบสนองได้รวดเร็ว การประเมินความเป็นพิษของไซเพอร์เมธรินด้วย biomarkers ทางสรีรวิทยด้วย neutral red retention time พบว่ามีความไวมากกว่าเครื่องมือวัดทางพันธุกรรมหลายเท่า และวัดได้ความเข้มข้นไซเพอร์เมธรินต่ำ แสดงว่า biomarker นี้สามารถใช้ประเมินความเป็นพิษในระบบนิเวศบ่งได้ สามารถใช้ตรวจสอบคุณภาพของดินด้วยไส้เดือนดิน ซึ่งจะนำมาสู่การพัฒนาคุณภาพของดินให้ดียิ่งขึ้น biomarkers แต่ละตัวให้ผลลัพธ์เป็นรูปแบบการตอบสนองที่ต่างกัน ดังนั้นผู้วิจัยเสนอว่าในการประเมินความเสี่ยงของสารพิษในสภาพแวดล้อมในระยะแรกควรใช้ biomarkers หลายตัวร่วมกันในการประเมินในห้องทดลอง ก่อนการนำไปสู่การทดลองในภาคสนามต่อไป

7. บรรณานุกรม

- Celik A., Mazmanci B., Camlica Y., Askin A., Comelekoglu U. (2005) Evaluation of cytogenetic effects of lambda-cyhalothrin on Wistar rat bone marrow by gavage administration. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 61: 128-133.
- Chauhan L.K.S., Agarwal D.K., Sundararaman V. (1997) In vivo induction of sister chromatid exchanges in mouse bone marrow following oral exposure to commercial formulations of alpha-cyanopyrethroids. *Toxicol. Let.* 93: 153-157.
- Dahamma S., Harzallah D., Guemache A., Sekfali N. (2009) Biochemical investigation of cypermethrin toxicity in rabbits. *Commun. Agric. Appl. Biol. Sci.* 74(1): 149-153.
- Dalta M., Kaviraj A. (2003) Acute toxicity of the synthetic pyrethroids deltamethrin to freshwater catfish *Clarias gariepinus*. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 70: 296-299.
- Da Ros L., Meneghetti F., Nasci C. (2002) Field application of lysosomal destabilisation indices in the mussel *Mytilus galloprovincialis*: biomonitoring and transplantation in the Lagoon of Venice (north-east Italy). *Mar. Environ. Res.* 54: 817-822.
- Dougherty E.J., McPeters A.L., Overcash M.R., Carbonell R.G. (1993) Theoretical analysis of a method for in situ decontamination of soil containing 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin. *Environ. Sci. Technol.* 27: 505-515.
- Eyambe G.S., Goven A.J., Fitzpatrick L.C., Venables B.J., Cooper E.L. (1991) A non-invasive technique for

- sequential collection of earthworm (*Lumbricus terrestris*) leukocytes during subchronic immunotoxicity studies. Laboratory Animal. 25: 61-67.
- Franzellitti S., Buratti S., Donnini F., Fabbri E. (2010) Exposure of mussels to a polluted environment: Insights into the stress syndrome development. Comp. Biochem. Phys. C. 152: 24-33.
- Gabbianelli R., Falcioni G., Nasuti C., Cantalamessa F. (2002) Cypermethrin-induced plasma membrane perturbation on erythrocytes from rats: reduction of fluidity in the hydrophobic core and in glutathione peroxidase activity. Toxicology 175: 91-101.
- Heiniger H.J., Kandutsch, A.A., Chen, H.W. (1976) Depletion of L-cell sterol depresses endocytosis. Nature 263: 515-517.
- Heiniger, H.J., Marshall J.D. (1979) Pinocytosis in L cells: its dependence on membrane sterol and the cytoskeleton. Cell Biol. Int. Rep. 3: 409-420.
- Hussein H.M., Abdou H.M., Yousef M.I. (2013) Cypermethrin induced damage in genomic DNA and histopathological changes in brain and haematotoxicity in rats: The protective effect of sesame oil. Brain Res. Bull. 92: 76-83.
- Laughlin R.C., McGugan G.C., Powell R.R., Welter B.H., Temesvari L.A. (2004) Involvement of raft-like plasma membrane domains of *Entamoeba histolytica* in pinocytosis and adhesion. Infect. Immun. 72: 5349-5357.
- Leahey J.P. 1985. Metabolism and environmental degradation, in *The Pyrethroid Insecticides*. Leahey, J.P. (Ed.) Taylor and Francis, London. 263-342.
- Lowe D.M., Moore M.N., Evans B.M. (1992) Contamination impact on interactions of molecular probes with lysosomes in living hepatocytes from dab *Limanda limanda*. Mar. Ecol. Prog. Ser. 91: 135-140.
- Martinez-Gomez C., Benedicto J., Campillo J.A., Moore M. (2008) Application and evaluation of the neutral red retention (NRR) assay for lysosomal stability in mussel populations along the Iberian Mediterranean coast. J. Environ. Monitor. 10(4): 490-499.
- McLeese D.W., Metcalf C.D., Zitiko V. (1980) Lethality of permethrin, cypermethrin and fenvalerate to salmon, lobster and shrimp. Bull. Environ. Contam. Toxicol. 25: 950-955.
- Moore M.N. (1980) Cytochemical determination of cellular responses to environmental stressors in marine organisms. Rapp. P.-V. Réun. Cons. Int. Explor. Mer. 170: 7-15.
- Ohkuma S., Moriyama Y., Takano T. (1982) Identification and characterization of a proton pump on lysosomes by fluorescein isothiocyanate-dextran fluorescence. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 79: 2758-2762.
- Reinecke S.A., Reinecke A.J. (2004) The comet assay as biomarker of heavy metal genotoxicity in earthworms. Arch. Environ. Contam. Toxicol. 46: 208-215.
- Scarpato R., Migliore L., Angotzi G., Fedi A., Migli L., Loprieno N. (1996) Cytogenetic monitoring of a group of Italian floriculturists: no evidence of DNA damage related to pesticide exposure. Mutat. Res. 367: 73-82.
- Shakoori A.R., Ali S.S., Saleem M.A. (1988) Effects of six month's feeding of cypermethrin on the blood and liver of albino rats. J. Biochem. Toxicol. 3: 59-71.
- Singh N.P., McCoy M.T., Tice R.R., Schneider E.L. (1988) A simple technique for quantitation of low levels of DNA damage in individual cells. Exp. Cell Res. 175: 123-130.

8. คำขอบคุณ (Acknowledgement)

ขอขอบพระคุณสถาบันวิจัยและพัฒนา มหาวิทยาลัยศิลปากร ที่ได้ให้การสนับสนุนการวิจัย