

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

1. บทนำ

ความสำคัญและที่มาของปัญหาการวิจัย

ไซเพอร์เมทรินเป็นสารป้องกันกำจัดศัตรูพืช (pesticide) ในกลุ่มสารไพรีทรอยด์สังเคราะห์ ใช้เป็นสารกำจัดแมลง (insecticide) มีโครงสร้างเลียนแบบโมเลกุลจากสารไพรีทริน (pyrethrins) ที่สกัดได้จากพืชไพรีธรัม (pyrethrum) หรือดอกเบญจมาศ (*Chrysanthemum flower*) ใช้ได้ผลในช่วงกว้างกับแมลงหลายชนิด (Leahey, 1985) ปัจจุบันมีการใช้สารไพรีทรอยด์สังเคราะห์กันมากขึ้นหลายเท่าตัว เนื่องจากเป็นพิษน้อยต่อสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม และระยะเวลาการตกค้างในดินสั้นกว่าสารกำจัดแมลงกลุ่มออร์กาโนคลอรีน อย่างไรก็ตามสารประกอบเหล่านี้มีรายงานว่า เป็นพิษต่อปลา และสัตว์น้ำหลายชนิด (McLeese et al., 1980; Dalta and Kaviraj, 2003) รวมทั้งหากมีการใช้อย่างแพร่หลายมากขึ้น จะทำให้เกิดผลเสียต่อพืชและสัตว์

จากการสำรวจการปนเปื้อนของสารป้องกันกำจัดศัตรูพืชในผักที่ขายในกรุงเทพมหานครและจังหวัดใกล้เคียง รวมทั้งหมด 957 ตัวอย่าง โดยแบ่งเป็นผักติดป้ายปลอดสารพิษ 230 ตัวอย่าง และผักธรรมดา 727 ตัวอย่าง พบว่าปริมาณสารป้องกันกำจัดศัตรูพืชตกค้างในผักติดป้ายปลอดสารพิษและผักธรรมดาไม่มีความแตกต่างกัน (ร้อยละ 48 และร้อยละ 43 สำหรับผักธรรมดาและผักติดป้ายปลอดสารพิษ ตามลำดับ) รายชื่อสารป้องกันกำจัดศัตรูพืชที่พบในผักธรรมดา (พบมากกว่าร้อยละ 1) เรียงตามลำดับจากมากไปหาน้อย ได้แก่ cypermethrin, endosulfan, methamidophos, profenophos, carbofuran, methomyl, monocrotophos, carbaryl, chlorpyrifos, parathion-methyl, prothiophos, dimethoate, cyhalothrin, fenvalerate, ethion, omethoate และ cyfluthrin ส่วนสารป้องกันกำจัดศัตรูพืชที่พบในผักติดป้ายปลอดสารพิษ (พบมากกว่าร้อยละ 1) เรียงตามลำดับจากมากไปหาน้อย ได้แก่ cypermethrin, endosulfan, dicrotophos, methomyl, methamidophos, profenophos, carbofuran, EPN, chlorpyrifos, dicofol และ fenvalerate (Atisook et al. 2003) เหตุที่สารกำจัดศัตรูพืชไซเพอร์เมทรินตกค้างในผักมากที่สุด อาจเป็นเพราะไซเพอร์เมทรินมีระยะเวลาการตกค้างนานกว่าสารกำจัดศัตรูพืชชนิดอื่น ดังนั้นหากเกษตรกรใช้สารกำจัดศัตรูพืชนี้ในปริมาณมาก และใช้อย่างไม่ระมัดระวังอาจส่งผลกระทบต่อเกษตรกร ผู้บริโภค สิ่งแวดล้อม และสิ่งมีชีวิตที่ไม่ใช่เป้าหมาย ดังนั้นผู้วิจัยจึงเลือกไซเพอร์เมทรินมาทดสอบความเป็นพิษ เพื่อหาระดับความปลอดภัยในการใช้

ไซเพอร์เมทริน [alpha-cyano-3 phenoxybenzyl ester of 2,2-dimethyl-3-(2,2-dichlorovinyl) cyclopropane carboxylic acid] เป็นไพรีทรอยด์สังเคราะห์ชนิดหนึ่ง ที่นิยมใช้กันอย่างแพร่หลาย ระดับความเป็นพิษของไพรีทรอยด์สังเคราะห์แต่ละชนิดขึ้นอยู่กับความแตกต่างของโครงสร้างทางสเตอริโอเคมี (Hassal, 1982) จากการสืบค้นข้อมูลที่ผ่านมา พบว่า ไซเพอร์เมทรินมีฤทธิ์ข้างเคียงต่อสารพันธุกรรมของสิ่งมีชีวิตที่ไม่ใช่สิ่งมีชีวิตเป้าหมาย ซึ่งเป็นสิ่งที่อันตรายอย่างยิ่ง เพราะจะมีผลกระทบต่อห่วงโซ่

อาหารในระบบนิเวศ จากการศึกษาบางชี้ว่า ไพรีทรอยด์ทำให้เกิดความผิดปกติของโครโมโซม (chromosomal aberration) เช่น การฟอร์ม micronucleus การเกิด Sister chromatid exchange ในเซลล์ไขกระดูกของหนู mouse และหนู rat (Pati and Bhuniya, 1989; Bhuniya and Pati, 1990; Agarwal et al., 1994; Surrales et al., 1995; Chauhan et al., 1997; Celik et al., 2005) และทำให้เกิด chromosomal breaks และ Mitotic aberrations ใน Root meristem cells ของ *Allium cepa* (Chauhan et al., 1986) และของ *Allium sativum* (Saxena and Gupta, 2005) Villarini et al. (1998) รายงานว่า Deltamethrin เป็นไพรีทรอยด์สังเคราะห์ชนิดหนึ่งซึ่งชักนำให้เกิดการทำลายสารพันธุกรรม ในเซลล์ leucocytes ของคนเมื่อตรวจด้วย Comet assay แต่อย่างไรก็ตาม ในการตรวจสอบไพรีทรอยด์ด้วย mutagenicity assay ใน *Salmonella typhimurium* และ V79 Chinese hamsters (Pluijmen et al., 1984) ไม่พบว่าเป็นพิษต่อสารพันธุกรรม ดังนั้นความเป็นพิษต่อสารพันธุกรรมขึ้นอยู่กับโมเดลที่ใช้ทดลองและวิธีที่ใช้ทดสอบ

ยังมีรายงานผลของไซเพอร์เมธรินต่อการลดความเหลว (fluidity) ของ erythrocyte membrane ของหนู โดยไซเพอร์เมธรินไปเกาะที่ hydrophobic core ของเมมเบรน ทำให้เพิ่มการอัดแน่นของลิพิด ทำให้ความเหลวของเมมเบรนลดลง (Gabbianelli et al., 2002) นอกจากนี้ยังชักนำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงของ synaptosomal membrane potential ในสมองหนู (Eells et al., 1992) เพิ่ม ROS/free radicals-mediated lipid peroxidation และเพิ่มความเข้มข้นของ Ca^{++} ใน cytosol ชักนำให้เกิดพิษต่อเซลล์และสารพันธุกรรมในสัตว์มีกระดูกสันหลัง (Kadous et al., 1994; Gassner et al., 1997; Kale et al., 1999)

แม้ไส้เดือนดินไม่ใช่สิ่งมีชีวิตเป้าหมายของสารกำจัดศัตรูพืช แต่ไส้เดือนดินเป็นสิ่งมีชีวิตที่พบแพร่หลายในดินแทบทุกสภาพ มีชีวิตที่ยืนยาว พอที่จะทนต่อสารพิษจนเกิดการสะสม และส่งผลกระทบต่อสรีระของไส้เดือนดิน หากไซเพอร์เมธรินมีผลต่อสารพันธุกรรม หรือเมมเบรนของไส้เดือนดิน จะมีผลกระทบต่อประชากรไส้เดือนดิน และสิ่งมีชีวิตที่สูงขึ้นในลำดับชั้นอาหาร ส่งผลกระทบต่อความอุดมสมบูรณ์ของทรัพยากรดิน ทำหน้าที่ส่งผลกระทบต่อผลผลิตทางการเกษตรและการส่งออกของประเทศ

มีรายงานความเป็นพิษแบบเฉียบพลันและเรื้อรังของไซเพอร์เมธรินต่อไส้เดือนดินหลายชนิด พบว่ามีค่าแตกต่างกันมากขึ้นอยู่กับชนิดหรือสายพันธุ์ของไส้เดือนดินที่ทดสอบ ระยะเวลาการทดสอบ และประเภทของดิน เช่น ทดสอบสายพันธุ์ *Aporrectodea caliginosa* ในดินสังเคราะห์มีค่า 28 day-LC₅₀ เป็น 139.90 mg.Kg⁻¹ ดิน (Mosleh et al., 2003) ทดสอบ *Eisenia fetida andrei* ในดินมาตรฐานสังเคราะห์ของ OECD มีค่า 14 day-LC₅₀ เป็น 84.14 mg.Kg⁻¹ ดิน (Zhou et al., 2008) ทดสอบ *Perionyx excavatus* ในดินจากเขตเกษตรกรรม มีค่า 96 h-LC₅₀ เป็น 0.008 mg.Kg⁻¹ ดิน (Gupta et al., 2010) ทดสอบ *Eisenia fetida* ในดินจากเขตเกษตรกรรมที่ไม่เคยได้รับสารกำจัดแมลงมาก่อน มีค่า 96 h-LC₅₀ เป็น 0.054 mg.Kg⁻¹ ดิน (Gupta et al., 2011) นอกจากนี้อายุของไส้เดือนดินยังมีผลต่อการตอบสนองต่อไซเพอร์เมธริน Zhou et al. (2008) พบว่าไส้เดือนดินระยะ juvenile ตอบสนองต่อไซเพอร์เมธรินได้ดีกว่าระยะตัวเต็มวัย จะเห็นได้ว่าการทดสอบส่วนใหญ่ทำกับสายพันธุ์ที่มีในต่างประเทศ แต่ยังไม่มีการทดสอบไซเพอร์เมธรินกับ *Pheretima peguana* ซึ่งเป็นไส้เดือนดินที่แพร่กระจายแทบทุกพื้นที่ในประเทศไทย หากได้ข้อมูลของ

ไส้เดือนดินชนิดนี้น่าจะเป็นข้อมูลที่ดีต่อการประเมินคุณภาพสิ่งแวดล้อมของประเทศ และเป็นข้อมูลพื้นฐานของการกำหนดมาตรฐานความเป็นพิษของไซเพอร์เมธรินของไทย

การตรวจสอบปริมาณไซเพอร์เมธรินในสภาพแวดล้อมเป็นเรื่องยากและเสียค่าใช้จ่ายสูง จึงมีการใช้ biomarkers แทนการประเมินปริมาณที่แท้จริงในสภาพแวดล้อม biomarkers สามารถเชื่อมโยงความสัมพันธ์ระหว่างสารเคมีและผลของความเป็นพิษ และมีความไวมากกว่าวิธีพื้นฐาน เช่น การตาย การเจริญเติบโต และการสืบพันธุ์ (Booth et al., 2000) ปัจจุบันข้อมูลการประเมินความเสี่ยงและการประเมินผลกระทบทางนิเวศพิษวิทยาของสารกำจัดศัตรูพืชของประเทศไทยด้วย biomarkers ยังมีจำกัด โดยเฉพาะข้อมูลต่อสิ่งมีชีวิตในประเทศไทย ทำให้ข้อมูลส่วนใหญ่ที่ใช้อย่างอิงและนำมาพัฒนาข้อมูลมาตรฐานคุณภาพดิน รวมถึงใช้ในการกำหนดค่าความปลอดภัยของสารกำจัดศัตรูพืช เป็นข้อมูลจากต่างประเทศแถบยุโรปหรืออเมริกา ข้อมูลที่นำมาใช้อาจไม่เหมาะสม เนื่องจากชนิดของสิ่งมีชีวิตและสภาพแวดล้อมที่แตกต่างกันของแต่ละพื้นที่ ดังนั้นการศึกษาข้อมูลผลกระทบของสารกำจัดศัตรูพืชในประเทศไทยจึงเป็นเรื่องที่สำคัญต่อการเฝ้าระวังปัญหามลพิษ

ปัญหามลพิษในดินซึ่งเกิดจากการใช้สารกำจัดศัตรูพืชในการเกษตรเป็นจำนวนมาก และต่อเนื่องเป็นเวลานาน ส่งผลเสียในวงกว้าง ทั้งด้านคุณภาพของผลผลิต และการปนเปื้อนของสารพิษในผลผลิตจากการเกษตร ก่อให้เกิดปัญหาด้านการส่งออกและขีดความสามารถในการแข่งขันของประเทศ ตลอดจนสุขภาพอนามัยและคุณภาพชีวิตของประชาชนทั้งที่เป็นเกษตรกรและผู้บริโภค

ประเทศไทยได้ชื่อว่าเป็นประเทศที่ใช้สารกำจัดศัตรูพืชมากที่สุดประเทศหนึ่งในภูมิภาคเอเชีย และมักเผชิญปัญหาด้านการถูกกีดกันทางการค้าภายใต้ข้อตกลงการค้าเสรี โดยเฉพาะด้านมาตรฐานความปลอดภัย สาเหตุหนึ่งคือ ประเทศไทยไม่มีคู่มือมาตรฐานในการใช้สิ่งมีชีวิตทดสอบความเป็นพิษในสิ่งแวดล้อม ซึ่งประเทศที่พัฒนาแล้วและเป็นคู่ค้าที่สำคัญของไทยต่างก็มีคู่มือและพัฒนาคู่มือการทดสอบร่วมกัน เช่น ข้อตกลงการค้าเสรีของอเมริกาเหนือทำให้เกิดการจัดทำคู่มือ “Proposal to update non-target plant toxicity testing under NAFTA” ระหว่างสหรัฐอเมริกาและแคนาดา ซึ่งออสเตรเลียและนิวซีแลนด์ก็ดำเนินการในหลักการที่สอดคล้องกัน ดังนั้นโครงการวิจัยนี้มีความมุ่งมั่นจะทำการวิจัยให้ได้ข้อมูลที่สามารถใช้เป็นมาตรฐานในการทดสอบสารพิษและเผยแพร่สู่เกษตรกรและผู้เกี่ยวข้อง

วัตถุประสงค์การวิจัย

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

ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

1. ได้โมเดลของไส้เดือนดินที่สามารถนำไปใช้เป็น biomarkers วัดความเป็นพิษ และประเมินความปลอดภัยของไซเปอร์เมธริน ซึ่งหน่วยงานภาครัฐและเอกชนสามารถนำไปใช้ประโยชน์
2. ได้ค่าระดับความปลอดภัยและค่าระดับที่ก่อให้เกิดความเป็นพิษด้าน genotoxicity และ cytotoxicity ของสารไซเปอร์เมธริน ซึ่งหน่วยงานภาครัฐและเอกชนสามารถนำไปใช้ประโยชน์ในการออกมาตรฐานการใช้ไซเปอร์เมธริน
3. ได้ค่าความถี่ของ micronucleus (MN), binucleate, Tail DNA%, Tail length และ Olive tail moment ที่ตรวจพบใน coelomocytes ของไส้เดือนดินหลังจากได้รับไซเปอร์เมธรินที่ระดับความเข้มข้นต่าง ๆ ซึ่งหน่วยงานภาครัฐและเอกชนสามารถนำไปใช้ประโยชน์
4. เผยแพร่ข้อมูลและวิธีประเมินความปลอดภัยของไซเปอร์เมธรินที่ใช้ในการเกษตรให้กับเยาวชนและประชาชน

ขอบเขตการวิจัย

งานวิจัยนี้ใช้ไส้เดือนดิน *Pheretima peguana* เป็นตัวแทนของไส้เดือนผิวดินในการทดสอบความเป็นพิษของไซเปอร์เมธรินต่อเซลล์ coelomocytes ของไส้เดือนดินเมื่อได้รับสารละลายไซเปอร์เมธรินที่ความเข้มข้นระดับต่ำกว่าค่า LC_{50} ไม่น้อยกว่า 5 ระดับความเข้มข้น ในเวลา 48 ชั่วโมง บนกระดาดรอง

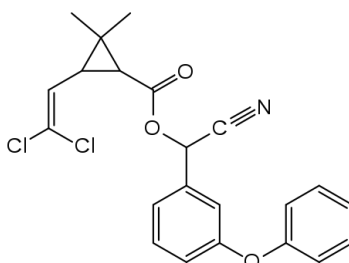
การทบทวนเอกสารงานวิจัยต่าง ๆ ที่เกี่ยวข้อง

ไซเปอร์เมธรินเป็นสารกำจัดแมลงประเภทไพรีทรอยด์ มีความเป็นพิษต่อแมลงสูงมาก ใช้กำจัดแมลงศัตรูข้าว เช่น หนอนกินใบ เพลี้ยจักจั่นสีเขียว และเพลี้ยกระโดดสีน้ำตาล กลไกการออกฤทธิ์เป็นแบบถูกตัวตาย และกินตาย ไม่มีฤทธิ์ในแง่ดูดซึม มีพิษตกค้างบนพืช ผลข้างเคียงนอกกลุ่มเป้าหมายพบว่ามีพิษต่อปลาและผึ้ง แต่ไม่มีพิษกับนก นอกจากนี้ยังใช้กำจัดหนอนเจาะเมล็ดทุเรียน โดยใช้ร่วมกับสารกำจัดศัตรูพืชอื่น เช่น ไซไซเปอร์เมธริน 6.25 % อีซี + โซโลน 22.5 % อีซี อัตรา 40 มิลลิลิตรต่อน้ำ 20 ลิตร (สมชาย กมลพันธ์, 2547)

ไซเปอร์เมธรินเป็นพิษกับกระเพาะอาหารและระบบประสาทของสัตว์มีกระดูกสันหลังและไม่มีกระดูกสันหลัง โดยมีผลต่อ sodium channels และยับยั้งเอนไซม์ ATPase (Hildebrand et al., 2004) มีการศึกษาความเป็นพิษของไซเปอร์เมธรินในห้องปฏิบัติการพบว่า มีผลกับปลาและอาร์โทพอดในน้ำ (Bradbury and Coats, 1989) มีผลต่อหัวใจจนทำให้หัวใจบวมผิดปกติ (Coskun et al., 2004) มีผลทำให้จำนวนประชากรแพลงก์ตอนทะเลมีจำนวนลดลง (Medina et al., 2004) มีผลต่อเซลล์สมองเมื่อทดสอบกับหนู mouse โดยวิธี Comet assay (Patel et al., 2006) ชักนำให้เกิดการทำลายสารพันธุกรรม และชักนำ oxidative stress ในเซลล์ประสาท มีผลต่อระดับของ neurotransmitters เช่น gamma-aminobutyric acid และ dopamine (Singh et al., 2012) จะเห็นได้ว่าไซเปอร์เมธรินมีผลต่อจำนวนประชากร สรีระ เซลล์ และโครโมโซมของสิ่งมีชีวิตหลายชนิด

สารสังเคราะห์ไพรีทรอยด์ (Pyrethrum and Pyrethroids)

ไพรีทรอยด์สังเคราะห์ เป็นสารเลียนแบบโครงสร้างโมเลกุลจากสารไพรีทริน (Pyrethrins) ที่สกัดได้จากดอกเบญจมาศ ซึ่งมีองค์ประกอบของสารเคมี 6 ชนิดด้วยกันคือ Cinerin I, Cinerin II, Pyrethrin I, Pyrethrin II, Jasmolin I, และ Jasmolin II สารไพรีทริน ($C_{22}H_{19}O_3NC_{12}$) อยู่ในรูปของสารประกอบราซีมิก ประกอบด้วย 8 stereo-isomers (ภาพที่ 1) ออกฤทธิ์แบบสัมผัส ทำให้แมลงสลบและตายอย่างรวดเร็ว หรือมีการออกฤทธิ์แบบ “knock-down action” อย่างไรก็ตามหากความเข้มข้นของสารไม่เพียงพอในระดับที่จะฆ่าแมลงได้ แมลงจะฟื้นอย่างรวดเร็ว คุณสมบัติเด่นของสารไพรีทรินคือ ออกฤทธิ์ได้ดีขึ้นอีกเมื่อผสมกับสารเพิ่มฤทธิ์ (synergist) เช่น สาร piperonyl butoxide (PBO) สารไพรีทรินสลายตัวโดยปฏิกิริยาออกซิเดชัน (oxidation) เมื่อโดนแสงแดด และหากอยู่ในสภาพต่างจะสลายตัวรวดเร็วโดยผ่านปฏิกิริยาการแยกสลายของน้ำ (hydrolysis) การเติมสารเพิ่มฤทธิ์จะช่วยยับยั้งการสลายดังกล่าวได้



ภาพที่ 1 โครงสร้างของไซเพอร์เมทริน

ที่มา: <http://commons.wikimedia.org/wiki/File:Cypermethrin.svg>

กลไกการออกฤทธิ์ของสารกลุ่มไพรีทรอยด์

สารกลุ่มไพรีทรอยด์เข้าสู่ร่างกายได้โดยการสูดดม (inhalation) และการกิน (ingestion) ในอัตราที่จำกัด ส่วนการดูดซึมทางผิวหนังมีน้อยมาก สารไพรีทรอยด์มีฤทธิ์ขัดขวาง sodium channel ของเซลล์ประสาทในสมอง ทำให้การเปิดของ channel นี้นานขึ้น (Tatebayashi and Narahashi, 1994) มีผลให้เซลล์ประสาทอยู่ในภาวะที่ถูกกระตุ้นมาก (hyperexcitability) และยังออกฤทธิ์โดยตรงต่อเซลล์ประสาทที่ gaba-chloride channel ยับยั้งการส่งผ่านสัญญาณเข้าออก เนื่องจากสารไพรีทรอยด์ มีความจำเพาะต่อเซลล์ประสาทของแมลง แต่เซลล์ประสาทในสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนมจะไม่ไวต่อสารกลุ่มนี้ กล่าวคือ ขนาดความเป็นพิษของสารกลุ่มนี้ประมาณ 1 กรัม/กิโลกรัม ทำให้สารกลุ่มไพรีทรอยด์จัดเป็นสารที่มีความเป็นพิษต่ำต่อคนและสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนมเมื่อเทียบกับสารกลุ่มออร์กาโนฟอสเฟตและคาร์บาเมต นอกจากอาการพิษโดยตรงแล้วสารกลุ่มไพรีทรอยด์ยังทำให้เกิดภาวะแพ้ (hypersensitivity) ได้เช่นเดียวกัน

ไล่เหือดดิน

เนื่องจากไล่เหือดดินไล่เหือดดินเป็นสิ่งมีชีวิตที่อยู่ในดิน มีความสำคัญต่อการย่อยสลายสารอินทรีย์ในดิน มีความไวต่อสารพิษ และเป็นสิ่งมีชีวิตที่ดีที่สุดในการประเมินความเป็นพิษของสารเคมีในดิน

(Bouche, 1992) การทดสอบสารพิษในดินด้วยไส้เดือนดินกระทำกันเป็นเวลานานแล้ว เพราะไส้เดือนดินมีผิวหนัง ได้รับสารพิษจากการสัมผัส พิษซึมผ่านอีพิเดอร์มิส กล้ามเนื้อวง กล้ามเนื้อตามยาว เข้าสู่ช่องลำตัว ซึ่งภายในมีเซลล์ Coelomic leukocytes (coelomocytes) ที่ทำหน้าที่เป็นเซลล์ภูมิคุ้มกัน ทำจัดสิ่งแปลกปลอม เช่น แบคทีเรีย รา และโพรโทซัว coelomocytes เป็นเซลล์ที่ไวต่อสารพิษ และสามารถกระตุ้นให้ปล่อยออกจาก dorsal pore ของไส้เดือนดินโดยไม่เป็นอันตรายต่อไส้เดือนดิน นอกจากนี้ไส้เดือนดินยังกินสารอินทรีย์เป็นอาหาร สารพิษที่ปนเปื้อนในอาหารจึงผ่านเข้าไปในร่างกายผ่านทางระบบทางเดินอาหารได้อีกทางหนึ่ง *Pheretima peguana* เป็นไส้เดือนผิวดิน (epigeic) จึงได้รับผลกระทบจากการใช้ไซเพอร์เมธรินมากกว่าไส้เดือนในระดับลึก การใช้การเปลี่ยนแปลงของสารพันธุกรรมหรือเมมเบรนเป็น biomarkers ประเมินการปนเปื้อนของสารพิษในสิ่งแวดล้อมในระดับที่ไม่ทำให้ไส้เดือนดินตาย (Sublethal effect) จึงเป็นการเตือนล่วงหน้าวิธีหนึ่งก่อนที่สารพิษจะส่งผลกระทบต่อระบบนิเวศ ในการทดลองนี้เลือกใช้ endpoint 2 ชนิดคือ การทำลายสารพันธุกรรม (ใช้ Comet assay และ Micronucleus test) และความผิดปกติของเมมเบรน (ใช้ Lysosomal membrane stability assay และ Pinocytic adherence ability assay)

เทคนิคที่ใช้ทดสอบ

วิธีการตรวจสอบการทำลายสารพันธุกรรมในไส้เดือนดิน มีการพัฒนาอย่างต่อเนื่อง หนึ่งในวิธีการนั้นคือ Comet assay เป็น Micro-electrophoretic technique ที่ทำให้เห็นการทำลายสารพันธุกรรมสายเดี่ยว (DNA single-strand breaks; SSBs) ในจีโนมของสิ่งมีชีวิตแต่ละตัว (Martin et al., 2005) ข้อดีของ Comet assay คือ ใช้เซลล์จำนวนน้อยในการตรวจสอบ (~100 เซลล์) แต่เซลล์ที่ใช้ทดสอบต้องเป็นเซลล์ที่ไวต่อ genotoxins ในช่วงกว้าง coelomocytes ที่แยกได้จากไส้เดือนดินได้รับการยอมรับว่ามีความสัมพันธ์อย่างมีนัยสำคัญกับ DNA SSBs เมื่อตรวจด้วย Comet assay (Verschaeve and Gilles, 1995; Salagovic et al., 1996; Reinecke and Reinecke, 2004)

Micronucleus test เป็นวิธีการตรวจสอบความเป็นพิษของสารประกอบที่มีผลต่อสารพันธุกรรมอีกวิธีหนึ่ง ประเมินจากความเสียหายที่เกิดจากความผิดปกติในการเคลื่อนที่ของโครโมโซม (Lagging chromosome) หรือชิ้นส่วนของโครโมโซมเกิดการแตกหักในระหว่างการแบ่งเซลล์แบบไมโทซิสในระยะเมทาเฟสถึงระยะแอนาเฟส (Ballantyne, 1988; Udriou, 2006) Micronucleus assay ได้รับการยอมรับว่าให้ผลดีในการประเมินสารประกอบที่ทำลายสารพันธุกรรม

มีรายงานว่าไซเพอร์เมธรินออกฤทธิ์ยับยั้ง Chloride channel จึงอาจมีผลต่อความเสถียรของเมมเบรน (membrane stability) ดังนั้นการทดสอบด้วย Lysosomal membrane stability assay และ Pinocytic adherence ability assay จึงน่าจะเป็น biomarkers ที่เหมาะต่อการตรวจสอบพิษของไซเพอร์เมธริน

ความเสถียรของเยื่อหุ้ม lysosome เป็น biomarkers ที่ตอบสนองต่อความเป็นพิษที่ไม่มีความจำเพาะเจาะจงต่อประเภทของความเครียด (stressors) และใช้วัดการปนเปื้อนของสารเคมีแทบทุกชนิด (Huggett et al., 1992) หนึ่งในวิธีที่ตรวจสอบความเสถียรของเยื่อหุ้ม lysosome คือ Neutral red retention assay ซึ่งเป็น assay ที่พิสูจน์แล้วว่าน่าเชื่อถือ สัมพันธ์กับปริมาณพิษที่ได้รับ และใช้ง่าย ใช้ได้

ดีกับสิ่งมีชีวิตในทะเล (Lowe et al., 1992) และบนบก (Svendsen et al., 2004) Neutral red retention assay เป็น assay ที่ไวต่อโลหะหนักแทบทุกชนิด สารกำจัดศัตรูพืชและสัตว์หลายชนิด (Lowe et al., 1992; Eason and O' Halloran, 2002) Weeks and Svendsen (1996) พบความสัมพันธ์ระหว่างการปนเปื้อนทองแดงในดินกับคุณสมบัติความเสถียรของเยื่อหุ้ม lysosome ของไส้เดือนดิน

Pinocytic adherence ability เป็น biomarkers ที่ใช้ตรวจสอบการย่นของเมมเบรน (membrane ruffling) ส่งผลต่อการยึดเกาะกับวัตถุ และอัตราการกินแบบ pinocytosis ซึ่งจะมีผลต่อกิจกรรมของเซลล์ coelomocytes ในการกำจัดสิ่งแปลกปลอม ดังนั้นสามารถนำมาใช้ตรวจสอบการปนเปื้อนสารพิษในสภาพแวดล้อม Weeks et al. (1987) พบความสัมพันธ์ระหว่างการปนเปื้อนสารเคมีในน้ำกับคุณสมบัติ pinocytosis ของเซลล์ macrophages ของปลา

การศึกษาครั้งนี้จะเป็นประโยชน์ต่อการตรวจสอบความเป็นพิษของสารกำจัดศัตรูพืชไซเปอร์เมทรินทางการค้า ที่มีการใช้อย่างแพร่หลายในปัจจุบันว่าจะมีผลต่อไส้เดือนดินและสิ่งแวดล้อมอย่างไร ใช้ไส้เดือนดิน *Pheretima peguana* เป็นโมเดลทดสอบความเป็นพิษระดับที่ไม่ทำให้ตาย และความไวของ biomarkers ที่ใช้ตรวจสอบความเป็นพิษของไซเปอร์เมทริน

2. คำสำคัญ (Keyword)

Cypermethrin, Comet assay, Micronucleus, Lysosomal membrane stability

3. คำอธิบายสัญลักษณ์และคำย่อ ที่ใช้ในการวิจัย (list of symbols and abbreviations)

T DNA% เป็นคำย่อของ Tail DNA%

TL เป็นคำย่อของ Tail length

OTM เป็นคำย่อของ Olive tail moment

NRRT เป็นคำย่อของ Neutral red retention time

4. เนื้อเรื่อง (Main Body)

4.1 สมมติฐานของการทดลอง

1. ถ้าไซเปอร์เมทรินมีผลต่อสารพันธุกรรมจะวัดผลได้จากการเกิด

1. DNA single-strand breaks ของเซลล์ coelomocytes เมื่อตรวจสอบด้วย Comet assay จะเกิดภาพ DNA คล้ายดาวหางบน agarose gel เมื่อ run electrophoresis ยิ่ง DNA ถูกทำลายมากหางของดาวหาง (Tail length) ยิ่งยาว หรือ Tail DNA% มากขึ้น

2. chromosomal aberration เมื่อตรวจสอบด้วย Micronucleus test จะได้จำนวนเซลล์ coelomocytes ที่มี micronucleus, binucleate และ trinucleate มากขึ้น

2. ถ้าไซเปอร์เมทรินมีผลต่อเยื่อหุ้ม lysosome จะวัดผลได้จากการเกิด

1. ความเสถียรของเยื่อหุ้ม lysosome ถูกทำลาย เมื่อตรวจสอบด้วย Neutral red retention assay จะพบว่าระยะเวลาการติดสี Neutral red ใน cytosol (Neutral red retention time; NRRT) เร็วขึ้น แสดงว่าความเสถียรของเยื่อหุ้ม lysosome ถูกทำลาย ไม่สามารถเก็บสี Neutral red ไว้ใน lysosome ได้
2. คุณสมบัติการยึดเกาะและกินแบบ pinocytosis ถูกทำลาย เมื่อตรวจด้วย Pinocytic adherence ability assay จะพบว่าการยึดเกาะร่วมกับการเกิด pinocytosis ลดลง เนื่องจากการยุบของ plasma membrane ลดลงและความเสถียรของเยื่อหุ้ม lysosome ลดลง

4.2 วิธีการดำเนินการวิจัย และสถานที่ทำการทดลอง/เก็บข้อมูล

4.2.1 การเพาะเลี้ยงไส้เดือนดิน

นำพ่อแม่พันธุ์ไส้เดือนดิน *P. peguana* ที่เลี้ยงในดินที่ไม่มีการปนเปื้อนสารกำจัดศัตรูพืช ที่ได้จากบริษัท John and Son กรุงเทพมหานคร มาเลี้ยงในบ่อในห้องปฏิบัติการเป็นเวลาอย่างน้อย 2 สัปดาห์ เพื่อให้คุ้นเคย ดินที่ใช้เลี้ยงเตรียมจากดินใบมะขามที่ใช้ปลูกต้นไม้ผสมกับขี้วัวในสัดส่วนน้ำหนัก 5:2 (ดิน:ขี้วัว) ให้ดินมีความชื้น 60% เลี้ยงในที่มืด อุณหภูมิ 25 ± 2 °C ให้แสงโมเป็นอาหารเสริมสัปดาห์ละครั้ง ถ้าพบไส้เดือนตายให้นำออกจากบ่อ

4.2.2 สารเคมีที่ใช้ทดสอบ

ไซเพอร์เมธรินทางการค้า (สตาร์น็อกซ์ 350) จากห้างหุ้นส่วนจำกัดสตาร์โกรการเกษตร โดยเตรียมสารละลายใหม่ทุกครั้งเพื่อป้องกันสารละลายเปลี่ยนรูป

4.2.3 การทดลอง

4.2.3.1 การหาค่า LC_{50} ของไซเพอร์เมธริน ต่อไส้เดือนดิน

- 1) คัดขนาดไส้เดือนดินที่มี clitellum สมบูรณ์ ไส้เดือนดินที่มี clitellum แสดงว่ามีวัยอยู่ในช่วงเจริญพันธุ์ ชั่งน้ำหนักไส้เดือนดิน และจดบันทึก
- 2) วางกระดาษกรอง Whatmann เบอร์ 1 บนจานเพาะเชื้อขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 9 ซม.
- 3) เตรียมสารละลายไซเพอร์เมธรินอย่างละ 5 ความเข้มข้น (0 , 23.5×10^{-4} , 23.5×10^{-3} , 23.5×10^{-2} , 23.5×10^{-1} $\mu\text{g} \cdot \text{cm}^{-2}$ กระดาษกรอง) เป็นความเข้มข้นในช่วงกว้าง
- 4) ตูดยาสารละลายไซเพอร์เมธรินความเข้มข้นละ 3 มล. ใส่ลงในจานเพาะเชื้อ
- 5) ใส่ไส้เดือนดินที่เตรียมไว้ลงในจานเพาะเชื้อจานละ 1 ตัว ใช้ไส้เดือนดิน 20 ตัว/1 ความเข้มข้น
- 6) วางจานเพาะเชื้อในที่มืด อุณหภูมิห้อง นับจำนวนไส้เดือนดินที่ตายทุกวันเป็นเวลา 2 วัน
- 7) เมื่อได้ช่วงความเข้มข้นกว้าง ๆ ที่ทำให้ไส้เดือนดินรอดตายและตายทั้งหมดแล้ว นำมาซอยย่อยเป็นช่วงแคบ 5 ความเข้มข้น ทำการทดลองตามข้อ 1-6 อีกครั้ง
- 8) นำค่าที่ได้มาคำนวณหา LC_{50} โดยโปรแกรมสำเร็จรูป SPSS 10.5 ด้วย Probit analysis

4.2.3.2 การศึกษาความเป็นพิษของสารละลายไซเพอร์เมธรินต่อสารพันธุกรรมของไส้เดือนดิน

4.2.3.2.1 การชักนำให้ปล่อย coelomocytes

- 1) Spray สารละลายไซเฟอร์เมธรินอย่างละ 5 ความเข้มข้น (ทุกความเข้มข้นน้อยกว่าค่า LC_{50}) คือ 3.5×10^{-5} , 3.5×10^{-4} , 3.5×10^{-3} , 3.5×10^{-2} และ $3.5 \times 10^{-1} \mu\text{g.cm}^{-2}$ และใช้น้ำกลั่นเป็นกลุ่มควบคุมลบ (negative control) ความเข้มข้นละ 3 มล. ลงบนกระดาษกรอง
- 2) นำไส้เดือนดินที่ทราบน้ำหนักวางลงบนกระดาษกรอง Whatmann เบอร์ 1 ที่รองด้วยจานเพาะเชื้อขนาด 9 ซม. ใส่ไส้เดือนดินที่เตรียมไว้ลงในจานเพาะเชื้อจานละ 1 ตัว ใช้ไส้เดือนดิน 20 ตัว/1 ความเข้มข้น วางจานเพาะเชื้อในที่มืด
- 3) เมื่อครบกำหนด 2 วัน นำไส้เดือนดินออกจากจานเพาะเชื้อ นำแต่ละตัวไปกระตุ้นให้ปล่อย coelomocytes ออกจากช่องลำตัวด้วยวิธี non-invasive extrusion method (Eyambe et al., 1991) นำ coelomocytes จากแต่ละตัวใส่ในหลอดทดลอง
- 4) เติม LBSS (Lumbricus balanced salt solution) ที่เย็น 1 มล. (NaCl 71.5 mM, KCl 4.8 mM, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 1.1 mM, KH_2PO_4 0.4 mM, NaH_2PO_4 0.3 mM, NaHCO_3 4.2 mM, pH 7.3) ปั่นให้เซลล์ตกตะกอน ความเร็วรอบ 2500 รอบ/นาที เป็นเวลา 10 นาที เพื่อให้เซลล์ตกตะกอน
- 5) 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 $10^5 \text{ cell ml}^{-1}$

4.2.3.2.2 การทดสอบด้วย Micronucleus test

- 1) นำเซลล์จากไส้เดือนดินแต่ละความเข้มข้นมา smear บนกระจกสไลด์ 2 จุด ใช้ไส้เดือนดิน 3 ตัว/ความเข้มข้น
- 2) ย้อมสี coelomocytes ด้วย Wright rapid stain ทำการตรวจนับเซลล์ปกติ เซลล์ที่มีนิวเคลียสผิดปกติ (เช่น micronucleus, binucleated, trinucleate, multinucleate และ Nuclear abnormal แบบอื่นๆ) และเซลล์ตายแบบ apoptosis และ necrosis นับรวมกันทั้งหมด 1000 เซลล์โดยไม่ซ้ำกัน ภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบเลนส์ประกอบกำลังขยาย 1000x

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

- 1) การเตรียมสไลด์

1.1 เตรียมกระจกสไลด์ให้สะอาดด้วย 70% alcohol หยด 100 μl 0.5% Normal melting agarose (NMA) เพื่อให้ NMA ฉาบบนผิวกระจกสไลด์ ปิดทับด้วยกระจกปิดสไลด์ทันที นำไปทำให้ agarose แข็งโดยแช่ตู้เย็นเป็นเวลา 5-10 นาที แล้วเอากะกักปิดสไลด์ออก โดยไม่ทำให้ NMA หลุดออกจากกระจกสไลด์

1.2 บีเปิดเซลล์ coelomocytes 5 μ l จากข้อ 3.2.1 ลงใน microcentrifuge tube ที่มี PBS (pH 7.3) ปริมาตร 15 μ l จากนั้นเติม Low melting agarose (LMA) ปริมาตร 20 μ l ลงใน microcentrifuge tube ผสมให้เข้ากัน และอุ่นที่อุณหภูมิ 37-40°C ใน heat block

1.3 นำ microcentrifuge tube ออกจาก heat block ผสมให้เซลล์ coelomocytes แขนงลอยในสารละลาย LMA อีกครั้งด้วยเครื่อง mixer บีเปิดปริมาตร 40 μ l ลงบนกระจกสไลด์ข้อ 1.1

1.4 หยด 40 μ l 0.5% LMA (เตรียมใน 40 mM Tris-Cl) ซ้อนทับบริเวณที่หยดเซลล์ ผสมลงไป 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 $\pm$ 1 ชั่วโมง เพื่อทำลายเยื่อหุ้มเซลล์ ทุกขั้นตอนทำในที่มืด อุณหภูมิ 4°C

1.5 นำกระจกสไลด์วางใน Electrophoresis chamber ที่มี Electrophoresis buffer (300 mM NaOH, 1 mM EDTA, pH>13) ให้ท่วมสไลด์ นาน 20 นาที เพื่อให้เกิด unwinding DNA

1.6 หลังจาก unwinding จึงเปิดเครื่อง electrophoresis ใช้กระแสไฟฟ้า 300 mA, 12 V เพื่อให้ DNA วิ่งไปบน agarose gel เป็นเวลา 30 นาที

1.7 นำตัวอย่าง DNA บนกระจกสไลด์ไปล้างด้วย Neutralization buffer (0.4 M Tris, pH 7.5) 3 ครั้ง ครั้งละ 5 นาที เพื่อปรับ pH ของตัวอย่างให้เป็นกลาง

1.8 นำตัวอย่าง DNA ไป fix ด้วย Absolute methanol นาน 5 นาที เพื่อช่วยละลายไขมันส่วนเกินออก และย้อมติดสีขึ้น

2) การย้อมสีสไลด์

2.1 นำกระจกสไลด์ที่มีตัวอย่าง DNA ใน agarose มาย้อมด้วย 100 μ l Ethidium bromide (EtBr) ที่มีความเข้มข้น 20 μ g ml⁻¹ เป็นเวลา 5 นาที ล้างสีส่วนเกินด้วยน้ำกลั่น เช็ดกระจกสไลด์ให้แห้ง

2.2 นำกระจกสไลด์ไปตรวจผลการทำลายสารพันธุกรรมด้วยกล้องจุลทรรศน์ fluorescence ที่มี filter block UV-2A ที่กำลังขยาย 400 เท่า บันทึกผลการทดลองและถ่ายรูป DNA ของ coelomocytes ที่เคลื่อนที่ไปตามกระแสไฟฟ้าจากขั้วลบไปยังขั้วบวก โดยนิวเคลียสที่มีปริมาณ DNA ถูกทำลายมาก และมี สารพันธุกรรม หักเป็นท่อน ๆ หลายขนาด จะเคลื่อนที่ไปในระยะทางที่ไกล จึงมองเป็นเป็นส่วนหางของ comet ส่วน สารพันธุกรรม ที่ไม่ถูกทำลาย มีขนาดใหญ่ จะไม่เคลื่อนที่ไปไกลในภาวะที่ทำ electrophoresis จึงมองเห็นเป็นส่วนหัวของ comet

3) การวิเคราะห์ผล

3.1 ถ่ายรูป DNA ที่ถูกทำลายของแต่ละเซลล์ที่ไม่ซ้อนทับกันรวม 100 เซลล์ โดยวัดไปตามความยาวของแนวลวด ไม่วัด DNA ที่ถูกทำลายที่เกิดจาก apoptosis ซึ่งสังเกตได้จากหัวและหางของ comet ยาวมาก

3.2 วัด DNA ที่ถูกทำลายด้วยโปรแกรม LUCIA Comet assay ซึ่งวิเคราะห์ DNA ที่ถูกทำลายจาก parameter 3 ชนิด คือ Tail DNA (TD) % (ค่าของเปอร์เซ็นต์ความเข้มแสงที่หาง ยิ่งเรืองแสงมากแสดงว่า DNA ถูกทำลายมาก), Tail length (TL) (ระยะทางระหว่างจุดศูนย์กลางของหัวและปลายหาง) และ Olive tail moment (OTM)
$$= (\text{Tail.mean} - \text{Head.mean}) \times \text{Tail\%DNA}/100$$

4.2.3.3 การศึกษาความเป็นพิษของสารละลายไซเพอร์เมธรินต่อความเสถียรของเยื่อหุ้ม lysosome ด้วย Neutral red retention assay

Neutral red retention assay เป็นการทดสอบคุณสมบัติความเสถียรของเยื่อหุ้ม lysosome ของ coelomocytes

- 1) เตรียม coelomocytes suspension ในสารละลาย LBSS (Lumbricus balance salt solution) นับจำนวนเซลล์ด้วย haemocytometer ควรมีเซลล์ $10^5 \text{ cell ml}^{-1}$ ใช้ 3 ตัว/ความเข้มข้น และตรวจสอบการมีชีวิตของ coelomocytes ให้มีชีวิตมากกว่า 95% โดยตรวจดูการติดสี trypan blue (Trypan blue exclusion method)
- 2) ดูด 40 μl สารละลายของ coelomocytes และ LBSS ปล่อยลงบนกระจกสไลด์ ที่ treat ด้วย poly-L-lysine (20 μl ใน 100 μl น้ำกลั่น) วางกระจกสไลด์บน rack ที่แขวนเหนือน้ำเย็น อุณหภูมิใน rack 10°C นาน 15 นาทีเพื่อให้ coelomocytes ยึดเกาะกับกระจกสไลด์ เท coelomocytes ที่มากเกินไปออกจากกระจกสไลด์ เติม 20 μl Neutral red working solution บนชั้น coelomocytes ปิด cover slip นำไปส่องดูใต้กล้อง กำลังขยาย 400X
- 3) วัดความเสถียรของเมมเบรนของ lysosome โดยดูจากจำนวนเซลล์ที่ติดสีแดงใน cytosol ซึ่งแสดงว่ามีสีรั่วออกจาก lysosome เข้าสู่ cytosol เทียบกับจำนวนเซลล์ที่ไม่มีสีแดงใน cytosol (no leak) ในเวลา 2 นาที เว้น 2 นาที นับใหม่อีกครั้งนาน 2 นาที เว้น 2 นาที ทำเช่นนี้ไปจนกระทั่ง >50% ของจำนวนเซลล์มี cytosol ติดสี หรือจนครบ 60 นาที เวลาที่เซลล์ติดสีและไม่ติดสี ~ 50% คือ Neutral red retention time (NRRT) ให้หยุดการทดลอง

หมายเหตุ เตรียมสี Neutral red stock solution จากการละลาย 2.28 mg Neutral red ใน 1 ml DMSO (Dimethyl sulphoxide) เตรียม Working solution จากการละลาย 17 μl ของ Stock solution กับ 1 ml LBSS

4.2.3.4 การศึกษาความเป็นพิษของสารละลายไซเพอร์เมธรินต่อการยึดเกาะและการกินแบบ pinocytosis ด้วย Pinocytic adherence ability assay

- 1) นำเซลล์ coelomocytes ที่ได้รับไซเพอร์เมธรินความเข้มข้นต่าง ๆ 5 ความเข้มข้น และกลุ่มควบคุม จำนวน 2×10^5 cell ml^{-1} ปริมาตร 150 μl มาบ่มในถาด 96 หลุม นาน 1 ชม. เพื่อให้เซลล์เกาะกันหลุม
- 2) ใส่ Hank's Balanced Salt Solution (HBSS) ที่มี Neutral red 500 $\mu\text{g/ml}$ ปริมาตร 150 μl วางทิ้งไว้ 1 ชม. เพื่อให้เซลล์กินสี
- 3) ล้างเซลล์ที่ไม่ติดกันหลุมและ Neutral red อีกระด้วย HBSS
- 4) นำ Neutral red ออกจากเซลล์ที่เกาะกันหลุมด้วย Acid alcohol (3% HCl ใน alcohol)
- 5) อ่านค่าการดูดกลืนแสงที่ 540 nm ด้วย Microplate reader

การวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ

ทุกการทดลองตรวจสอบข้อมูลดิบในเชิง homogeneity และ normality ถ้าการทดสอบข้อมูลดิบเป็น Normal distribution ให้เปรียบเทียบข้อมูลกลุ่มทดสอบเทียบกับกลุ่มควบคุมด้วย One-way ANOVA ที่ระดับนัยสำคัญ $p < 0.05$ หากไม่เป็น Normal distribution ให้วิเคราะห์ข้อมูลแบบ Non-parametric ด้วยวิธีทดสอบแบบ Mann Whitney U test ด้วยโปรแกรม SPSS version 11.1 และหาค่าสหสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นไซเพอร์เมธรินและ biomarkers ด้วย SPSS version 11.1

สถานที่ทำการวิจัย

ห้องปฏิบัติการภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยศิลปากร วิทยาเขตพระราชวังสนามจันทร์ นครปฐม

5. ผลการทดลอง

5.1 ค่า LC_{50} ของไซเพอร์เมธรินต่อไส้เดือนดิน

ผู้วิจัยได้ทดสอบความเป็นพิษแบบเฉียบพลันของไซเพอร์เมธรินต่อไส้เดือนดินในเวลา 48 ชั่วโมงบนกระดาดกรอง พบว่าไส้เดือนดินตายอย่างต่อเนื่องเมื่อความเข้มข้นของไซเพอร์เมธรินเพิ่มขึ้น คำนวณค่า 48h- LC_{50} จากโปรแกรม Probit analysis ได้ค่า 48h- LC_{50} เท่ากับ $3.5 \times 10^{-1} \mu\text{g.cm}^{-2}$ (ตารางที่ 1)

ตารางที่ 1 การตายสะสมของไส้เดือนดินที่ได้รับสารไซเพอร์เมธรินเป็นเวลา 48 ชั่วโมง

ความเข้มข้นของ ไซเพอร์เมธริน ($\mu\text{g.cm}^{-2}$)	การตายสะสม			
	24 ชม.		48 ชม.	
	ตัว	%	ตัว	%
0.47×10^{-1}	0	0	1	3.33
1.41×10^{-1}	1	3.33	5	16.67
2.82×10^{-1}	6	20.00	11	36.67
4.23×10^{-1}	13	43.33	19	63.33
5.64×10^{-1}	24	80.00	27	90.00
ค่า LC_{50} ที่ 48 ชม.	$3.5 \times 10^{-1} \mu\text{g.cm}^{-2}$			

5.2 การศึกษาความเป็นพิษของไซเพอร์เมธรินต่อสารพันธุกรรมของไส้เดือนดิน

การทดสอบความเป็นพิษของไซเพอร์เมธรินต่อโครโมโซม และ DNA ของเซลล์ coelomocytes ด้วย Micronucleus test และ Comet assay ที่ระดับความเข้มข้นต่ำกว่า LC_{50} ใช้ความเข้มข้น 5 ระดับ (3.5×10^{-5} , 3.5×10^{-4} , 3.5×10^{-3} , 3.5×10^{-2} และ $3.5 \times 10^{-1} \mu\text{g.cm}^{-2}$) โดยมีน้ำกลั่นเป็นกลุ่มควบคุม เป็นเวลา 2 วัน บนกระดาดกรอง ทำซ้ำความเข้มข้นละ 3 ซ้ำ

5.2.1 การทดสอบด้วย Micronucleus test

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

ไซเพอร์เมธรินความเข้มข้น $3.5 \times 10^{-1} \mu\text{g.cm}^{-2}$ (LC_{50}) ทำให้มี micronucleus เกิดขึ้น 58.67 ± 9.06 cell/1000 cell มี trinuclei เกิดขึ้น 44.00 ± 2.89 cell/1000 cell และมี multinuclei เกิดขึ้น 51.33 ± 17.15 cell/1000 cell มีเซลล์ตายแบบ necrosis เกิดขึ้น 226.00 ± 18.58 cell/1000 cell และแบบ apoptosis เกิดขึ้น 63.33 ± 10.17 cell/1000 cell (ตารางที่ 2) ซึ่งทุกค่ามากกว่ากลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$)

ตารางที่ 2 ผลของไซเพอร์เมธรินต่อความผิดปกติของนิวเคลียสของเซลล์ coelomocytes ของไส้เดือนดินที่ได้รับสารเป็นเวลา 48 ชั่วโมง

ความ เข้มข้น ($\mu\text{g.cm}^{-2}$)	จำนวนเซลล์/1000 เซลล์								เปอร์เซ็นต์
	เซลล์ที่นิวเคลียส ปกติ	binucleate	trinucleate	multinucleate	micronucleus	necrosis	apoptosis	Nuclear abnormal	เซลล์ ผิดปกติ
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
3.5x10 ⁻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
3.5x10 ⁻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
3.5x10 ⁻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
3.5x10 ⁻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
3.5x10 ⁻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)

5.2.2 การทดสอบด้วย Comet assay

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

ตารางที่ 3 ผลของไซเพอร์เมธรินต่อความผิดปกติของสารพันธุกรรมของเซลล์ coelomocytes ของไส้เดือนดินที่ได้รับสารเป็นเวลา 48 ชั่วโมง

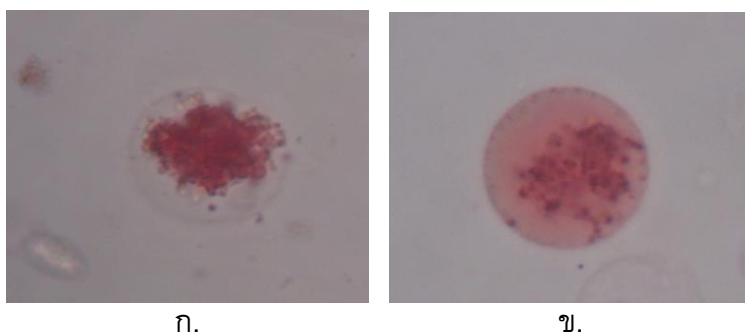
ความเข้มข้น ($\mu\text{g.cm}^{-2}$)	Tail DNA % (%)	Tail length (micron)	Olive tail moment
กลุ่มควบคุม	3.38 ± 0.66^{ab}	7.59 ± 2.05^b	0.74 ± 0.37^b
3.5×10^{-5}	4.20 ± 0.59^{ab}	11.66 ± 2.55^b	0.79 ± 0.24^b
3.5×10^{-4}	5.43 ± 1.06^{ab}	9.66 ± 1.61^b	1.43 ± 0.34^b
3.5×10^{-3}	4.06 ± 0.59^{ab}	3.17 ± 0.40^b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

หมายเหตุ ตัวอักษรภาษาอังกฤษที่เป็นตัวกในคอลัมน์เดียวกันแตกต่างกันแสดงว่ามีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$)

5.3. การศึกษาความเป็นพิษของสารละลายไซเพอร์เมธรินต่อความเสถียรของเยื่อหุ้ม lysosome ด้วย Neutral red retention assay

เซลล์ coelomocytes ที่ย้อมสี Neutral red และจับเวลาการติดสีใน cytosol ของเซลล์ 25 เซลล์ จากเซลล์ที่นับทั้งหมด 50 เซลล์ (กึ่งหนึ่งของเซลล์ที่นับ) (Neutral red retention time) พบว่าเมื่อความเข้มข้นของไซเพอร์เมธรินเพิ่มขึ้น ระยะเวลาในการติดสี Neutral red ใน cytosol ของเซลล์ coelomocytes เร็วขึ้นกว่ากลุ่มควบคุม (น้ำกลั่น) ระยะเวลาในการติดสี Neutral red สัมพันธ์กับปริมาณของไซเพอร์เมธริน ความเข้มข้นไซเพอร์เมธรินตั้งแต่ 3.5×10^{-3} $\mu\text{g.cm}^{-2}$ มีค่า Neutral red retention time น้อยกว่ากลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) (ตารางที่ 4) Neutral red retention time เป็น biomarkers ที่มีความไวมาก วัดได้แม้ความเข้มข้นต่ำ (3.5×10^{-3} $\mu\text{g.cm}^{-2}$ หรือ น้อยกว่า LC_{50} 100 เท่า) และใช้เวลาเพียง 48 ชั่วโมง

ไซเพอร์เมธรินมีผลต่อเยื่อหุ้ม lysosome ที่ทำหน้าที่กักเก็บสี Neutral red ทำให้ membrane รั่ว ไม่สามารถเก็บสีไว้ภายในได้ จึงปล่อยสีออกสู่ cytosol ทำให้ cytosol ติดสีชมพูของ Neutral red (รูปที่ 1 ข.) ถ้าเยื่อหุ้ม lysosome ทำงานได้ดีจะเก็บสีไว้ภายใน lysosome (รูปที่ 1 ก.)



รูปที่ 1 เซลล์ coelomocytes ก. cytosol ของเซลล์ coelomocytes ไม่ติดสี Neutral red ข. cytosol ของเซลล์ coelomocytes ติดสี Neutral red

ตารางที่ 4 ผลของไซเพอร์เมธรินต่อ Neutral red retention time ของเซลล์ coelomocytes ของไส้เดือนดินที่ได้รับสารเป็นเวลา 48 ชั่วโมง

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

หมายเหตุ ตัวอักษรภาษาอังกฤษที่เป็นตัวกในคอลัมน์เดียวกันแตกต่างกันแสดงว่ามีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$)

5.4 การศึกษาความเป็นพิษของสารละลายไซเพอร์เมธรินต่อการยึดเกาะและการกินแบบ pinocytosis ของเซลล์ coelomocytes (Pinocytic adherence ability)

เซลล์ coelomocytes ที่ยึดเกาะในถาดหลุมและมีการกินสี Neutral red แบบ pinocytosis และวัดค่าการดูดกลืนแสงด้วย Microplate reader อ่านค่าการดูดกลืนแสงที่ 540 nm พบว่ากลุ่มควบคุมมีค่าการดูดกลืนแสงสูงสุดและลดลงอย่างต่อเนื่องตามความเข้มข้นของไซเพอร์เมธรินที่เพิ่มขึ้น และลดลงสูงสุดที่ความเข้มข้นของไซเพอร์เมธริน $3.5 \times 10^{-1} \mu\text{g}.\text{cm}^{-2}$ (ตารางที่ 5) ไซเพอร์เมธรินความเข้มข้นตั้งแต่ $3.5 \times 10^{-2} \mu\text{g}.\text{cm}^{-2}$ ทำให้ค่าการดูดแสงลดลงแตกต่างจากกลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$)

ตารางที่ 5 ผลของไซเพอร์เมธรินต่อการยืดเกาะและการกินแบบ pinocytosis ของเซลล์ coelomocytes ของไส้เดือนดินที่ได้รับสารเป็นเวลา 48 ชั่วโมง

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

หมายเหตุ ตัวอักษรภาษาอังกฤษที่เป็นตัวกในคอลัมน์เดียวกันแตกต่างกันแสดงว่ามีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$)

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 มีความสัมพันธ์กับปริมาณไซเพอร์เมธรินแบบพหุนาม (polynomial) และจากการเปรียบเทียบความไวของ biomarkers ในการตอบสนองต่อปริมาณไซเพอร์เมธรินโดยวิเคราะห์จากความสัมพันธ์เชิงเส้นด้วยโปรแกรม SPSS version 11.5 (ตารางที่ 6) 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)

ตารางที่ 6 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

6. วิจารณ์ผลการทดลอง

ผลการศึกษาในครั้งนี้แสดงให้เห็นว่า biomarkers ที่ใช้ทดสอบทุก biomarkers มีการเปลี่ยนแปลงเมื่อไส้เดือนดินได้รับไซเพอร์เมธรินในระดับ sublethal

ค่า LC_{50} ของไซเพอร์เมธรินต่อไส้เดือนดิน *P. peguana* ในเวลา 48 ชั่วโมงเท่ากับ $3.5 \times 10^{-1} \mu\text{g.cm}^{-2}$ มีค่าใกล้เคียงกับงานวิจัยของ Wang et al. (2012) ที่ทำการทดสอบไซเพอร์เมธรินกับไส้เดือนดิน *Eisenia foetida* บนกระดาดชกรอง พบว่ามีค่า 96-h LC_{50} เท่ากับ $10.63 \mu\text{g.cm}^{-2}$ และ Gupta et al. (2010) รายงานว่า 96-h LC_{50} ของไซเพอร์เมธรินต่อไส้เดือนดิน *Perionyx excavates* มีค่าเท่ากับ 0.008 mg.Kg^{-1} และไซเพอร์เมธรินมีพิษต่อ *P. excavates* มากกว่าเอนโดซัลแฟน ($LC_{50} 0.03 \text{ mg.Kg}^{-1}$), คาร์บาริล ($LC_{50} 6.07 \text{ mg.Kg}^{-1}$), คลอร์ไพริฟอส ($LC_{50} 7.3 \text{ mg.Kg}^{-1}$), อัลดีคาร์บ ($LC_{50} 10.63 \text{ mg.Kg}^{-1}$), และโมโนโครโทฟอส ($LC_{50} 13.04 \text{ mg.Kg}^{-1}$) ซึ่ง *E. foetida* เป็นไส้เดือนดินที่ OECD (1984) ใช้เป็นไส้เดือนดินมาตรฐานในการทดสอบสารพิษ ดังนั้นผู้วิจัยจึงขอเสนอแนะว่าประเทศไทยสามารถใช้ *P. peguana* ในการทดสอบสารกลุ่มไพรีทรอยด์ และเป็นตัวแทนสัตว์ไม่มีกระดูกสันหลังในดินที่ใช้เป็น biomarkers ได้ดี เพราะมีความไวในการตอบสนองต่อไซเพอร์เมธรินใกล้เคียงกับ *E. foetida* อีกทั้งเป็นไส้เดือนดินที่พบกระจายทั่วไปในประเทศไทย และสามารถดูแลในห้องปฏิบัติการได้ง่าย

เมื่อเปรียบเทียบค่า 48-h LC_{50} ของไซเพอร์เมธริน ($LC_{50} 3.5 \times 10^{-1} \mu\text{g.cm}^{-2}$) กับ 48-h LC_{50} ของมาลาไรออน ($LC_{50} 141 \mu\text{g.cm}^{-2}$) ซึ่งเป็นสารกำจัดศัตรูพืชกลุ่มออร์แกโนฟอสเฟสต่อไส้เดือนดินสายพันธุ์เดียวกัน (*P. peguana*) พบว่า LC_{50} ของไซเพอร์เมธรินน้อยกว่า LC_{50} ของมาลาไรออนถึง 40 เท่า (พรพรรณ, 2552) แสดงว่าไซเพอร์เมธรินมีความเป็นพิษมากกว่ามาลาไรออน สอดคล้องกับข้อมูลจากกรมควบคุมมลพิษ (2556) ที่รายงานว้ไซเพอร์เมธรินมีพิษมากกว่ามาลาไรออน โดยค่า LC_{50} ของไซเพอร์เมธริน น้อยกว่า LC_{50} ของมาลาไรออนในหนู mice (LC_{50} ของไซเพอร์เมธรินในหนู mice มีค่า 251 มิลลิกรัมต่อน้ำหนักหนู 1 กิโลกรัม LC_{50} ของมาลาไรออนในหนู mice มีค่า $>2,000$ มิลลิกรัมต่อน้ำหนักหนู 1 กิโลกรัม) และ United States Environmental Protection Agency (1997) ได้จัดไซเพอร์เมธรินมีความรุนแรงระดับอันตรายปานกลาง (ประเภท II) และมาลาไรออนมีความรุนแรงระดับอันตรายน้อย (ประเภท III)

Micronucleus test เป็น biomarkers ที่เป็นที่ยอมรับในการตรวจสอบความผิดปกติของสารพันธุกรรมของเซลล์สัตว์หลายชนิด มีรายงานการใช้ micronucleus เป็น biomarkers ในการตรวจสอบสารกำจัดศัตรูพืช (Schmid, 1976) Jessen and Ramel (1980) รายงานว่า Micronucleus test สามารถใช้เป็น screen test ตรวจสอบความผิดปกติของสารพันธุกรรมที่เกิดจากสารกำจัดศัตรูพืชด้วยการนับความถี่ของการเกิด micronucleus ในเซลล์ไขกระดูกหนู mouse และ Zang et al. (2000) ใช้ micronucleus เป็น biomarkers ตรวจสอบความเป็นพิษของสารกำจัดศัตรูพืช Imidacloprid และ RH-5849 ต่อไส้เดือนดิน *Eisenia foetida*

ในการศึกษาครั้งนี้ micronucleus สามารถใช้เป็น biomarkers ตรวจสอบพิษของไซเพอร์เมธรินต่อ *P. peguana* ได้ที่ระดับความเข้มข้น LC_{50} เพราะพบว่าเซลล์ coelomocytes มีจำนวนนิวเคลียสผิดปกติคือ มี micronucleus, trinucleate และ multinucleate เพิ่มขึ้นที่ความเข้มข้น $3.5 \times 10^{-1} \mu\text{g.cm}^{-2}$ แตกต่างจากกลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยของ Scarpato et

al. (1996) และ Dougherty et al. (1993) ที่รายงานว่าเซลล์มีนิวเคลียสผิดปกติ เพิ่มขึ้นเมื่อได้รับสารกำจัดแมลงกลุ่มออร์แกโนฟอสเฟส และไพรีทรอยด์มากขึ้น ส่วนจำนวนเซลล์ที่มี binucleate มีจำนวนเพิ่มขึ้นแต่ไม่แตกต่างจากกลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ แสดงว่าไซเพอร์เมธรินไม่มีผลต่อโครงสร้างและการทำงานของ microfilament ในระหว่าง cytokinesis แต่อาจมีผลต่อโครงสร้างและการทำงานของ microtubule ทำให้ micronucleus ในบางโครโมโซมเคลื่อนที่ช้า (lagging chromosome) ไม่สามารถไปรวมกับโครโมโซมหลักได้ ซึ่งเป็นผลของไซเพอร์เมธรินต่อโครงสร้างและการทำงานของ microtubule ทำให้การทำงานของ spindle fiber ไม่สมบูรณ์ หรือไซเพอร์เมธรินทำลายสารพันธุกรรม ทำให้มีการแตกหักของโครโมโซม จนเกิดเป็นชิ้นส่วนของโครโมโซมขนาดเล็กที่ไม่มี centromere (acentric fragment) ซึ่งเป็นที่ยึดเกาะของ spindle fiber ทำให้ไม่สามารถเคลื่อนที่เข้าไปรวมกับโครโมโซมหลักได้ในระยะแอนาเฟส ซึ่งถ้าความผิดปกติเกิดจากการทำลายสารพันธุกรรมจะสามารถยืนยันได้ถูกต้องด้วยการทดสอบด้วยวิธี Comet assay

Singh et al. (1988) เป็นคนแรกที่ได้แนะนำ Comet assay และได้รับการยอมรับกันว่าให้ผลรวดเร็ว และไวต่อการตรวจการทำลายสารพันธุกรรม การตรวจการซ่อมแซมสารพันธุกรรม การตรวจสอบสภาพสิ่งแวดล้อมทางชีวะ (biomonitoring) และการตรวจสอบความเป็นพิษต่อสารพันธุกรรม (genotoxicity) หากพบว่าการทำลาย single-strand DNA จะเป็นการยืนยันว่าสารนั้นมีพิษต่อสารพันธุกรรม ในการทดลองครั้งนี้ไซเพอร์เมธรินความเข้มข้น $3.5 \times 10^{-1} \mu\text{g} \cdot \text{cm}^{-2}$ ซึ่งเป็นความเข้มข้นสูงสุด (LC_{50}) มีผลต่อสารพันธุกรรม โดยพบว่ามีค่า Tail length, Olive tail moment และ Tail DNA% เพิ่มขึ้นจากกลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) แต่ Tail DNA% ลดลงแตกต่างจากกลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญ ($p < 0.05$) ตั้งแต่ความเข้มข้น $3.5 \times 10^{-2} \mu\text{g} \cdot \text{cm}^{-2}$ เป็นไปได้ว่าที่ความเข้มข้นนี้ DNA อาจมีการถูกทำลาย แต่เซลล์ได้เพิ่มระบบการซ่อมแซม DNA จนทำให้ค่าการถูกทำลาย DNA ต่ำกว่ากลุ่มควบคุม

Patel et al. (2006) ศึกษาผลของไซเพอร์เมธรินต่ออวัยวะของหนู mouse โดยการฉีดสารเข้าใต้ช่องท้อง (intraperitoneally) $12.5\text{-}200 \text{ mg} \cdot \text{Kg}^{-1}$ น้ำหนักตัว เป็นเวลา 5 วันต่อเนื่อง แล้วตรวจสอบด้วย Comet assay พบว่าไซเพอร์เมธรินเป็นพิษต่อสารพันธุกรรม ก่อให้เกิดการทำลายสารพันธุกรรมในเซลล์สมองของหนู mouse มากกว่าในอวัยวะอื่น (ม้าม ไต ไชกระดุก และเม็ดเลือดขาว) สอดคล้องกับการทดลองในครั้งนี้ที่ไซเพอร์เมธรินมีผลต่อสารพันธุกรรมของไส้เดือนดิน แต่จากรายงานของ WHO (1989) รายงานว่าหนู mouse ที่กินไซเพอร์เมธรินมากกว่า $1600 \text{ mg} \cdot \text{Kg}^{-1}$ ตลอดชีวิต ไม่มีเนื้อร้าย (malignant tumors) แต่หนูตัวเมียบางตัวมีเนื้องอกไม่ร้ายแรงในปอด (benign lung tumor) ดังนั้น USEPA จึงจัดให้ไซเพอร์เมธรินเป็นสารก่อมะเร็งกลุ่ม C เพราะมีหลักฐานว่าทำให้เกิดมะเร็งในสัตว์เฉพาะในบางรายงาน (USEPA, 1989; 1997)

ความเข้มข้น LC_{50} ทำให้ micronucleus, trinucleate, multinucleate, necrosis, apoptosis, Tail length และ Olive tail moment เพิ่มขึ้นแตกต่างจากกลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) แต่ที่ความเข้มข้นระดับต่ำกว่า LC_{50} พบว่าทุก biomarkers มีค่าผันผวน การผันผวนอาจเกิดจากการซ่อมแซมในระดับสารพันธุกรรมหรือระดับเซลล์ ยกเว้น micronucleus ที่มีค่าเพิ่มขึ้นอย่างต่อเนื่องตามความเข้มข้นที่เพิ่มขึ้น

จากการตรวจสอบด้วยวิธี Micronucleus test และ Comet assay พบว่าไซเพอร์เมธรินความเข้มข้นสูงสุด (LC_{50}) ทำให้ Tail length, Olive tail moment และ micronucleus 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

การตรวจสอบความเสถียรของเยื่อหุ้ม lysosome เป็นที่ยอมรับว่าสามารถตรวจสอบความเป็นพิษของสารเคมีในน้ำได้ (Zhao et al., 2011) lysosome เป็นออร์แกเนลล์ที่ทำหน้าที่ลดความเป็นพิษของสิ่งแปลกปลอมที่เข้ามาในเซลล์ ซึ่งเป็นกระบวนการป้องกันตัวในสัตว์ (Moore, 1980; Lowe et al., 1992, 1995a, b)หน้าที่เหล่านี้เป็นกระบวนการที่ต้องอาศัยความเสถียรของเยื่อหุ้ม ดังนั้นความเสถียรของเยื่อหุ้ม lysosome จึงสามารถใช้ประเมินประสิทธิภาพในการทำหน้าที่ของ lysosome ได้ Neutral red retention assay จึงพัฒนามาจากหลักการนี้

Neutral red เป็นสารเคมีที่มีคุณสมบัติเป็น lipophilic สามารถผ่านเข้าเมมเบรนได้อย่างสะดวกโดยไม่ต้องใช้พลังงาน (Lowe et al., 1992) ประสิทธิภาพในการกักเก็บ neutral red ขึ้นอยู่กับ pH ของ lysosome และประสิทธิภาพของ proton pump บนเมมเบรน ที่คอยรักษาสภาวะเป็นกรดของ 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 ($3.5 \times 10^{-3} \mu g \cdot cm^{-2}$, ตารางที่ 4) Eason et al. (1999) รายงานว่า Neutral red retention time มีค่าลดลงอย่างมีนัยสำคัญเมื่อไส้เดือนดิน *Eisenia andrei* ได้รับสารกำจัดศัตรูพืชในห้องทดลอง และเช่นเดียวกับที่ Booth and O'Halloran (2001) ได้รายงานไว้กับไส้เดือนดิน *Eisenia fetida* ในการศึกษาให้ไส้เดือนดินสัมผัสกับไซเพอร์เมธริน $3.5 \times 10^{-3} \mu g \cdot cm^{-2}$ เพียง 48 ชั่วโมงก็สามารถเห็นผลของไซเพอร์เมธรินต่อความเสถียรของเยื่อหุ้ม lysosome แสดงว่า neutral red retention time เป็น biomarkers ที่มีประสิทธิภาพในการตอบสนอง และแม้เวลาสั้นๆ ก็สามารถแสดงผลของไซเพอร์เมธรินต่อ coelomocytes ของไส้เดือนดิน

โดยทั่วไปมีรายงานว่าไซเพอร์เมธรินมีผลต่อระบบประสาทส่วนกลาง และชักนำให้เกิดพิษในระบบประสาท (Soderlund et al., 2002) เข้าไปรบกวน metabolic และกลไกการส่งผ่านของเยื่อหุ้มเซลล์ (Lionetto et al., 1998) เช่น ขัดขวาง Sodium channel ของเซลล์ประสาทในสมอง ทำให้การเปิดของ channel นี้นานขึ้น มีผลให้เซลล์ประสาทอยู่ในภาวะ hyperexcitability (Singh et al., 2012) และยับยั้งการส่งผ่านสัญญาณเข้าออกที่ gaba-chloride channel จากการศึกษาครั้งนี้ยังพบว่าไซเพอร์เมธรินมีผลต่อความเสถียรของเยื่อหุ้ม lysosome 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 ซึ่งน่าจะเกิดจากความผิดปกติในการปิดเปิดของ channel ที่เยื่อหุ้ม lysosome และการยึดเกาะลดลงอาจเนื่องจากความเข้มข้นของไซเพอร์เมธรินเพิ่มขึ้นมีผลต่อ raft-like plasma membrane domains ของ coelomocytes 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 Shakoori et al. (1988) รายงานว่า male albino rats ที่ให้กินอาหารผสมไซเพอร์เมธรินนาน 6 เดือน พบว่าในกระแสเลือดปริมาณ cholesterol ลดลง 49% ขณะที่ blood serum protein เพิ่มขึ้น 12% และ free amino acid เพิ่มขึ้น 31% Anwar (2004) รายงานว่าไซเพอร์เมธรินทำให้ปริมาณ cholesterol และไขมันในเนื้อเยื่อกล้ามเนื้อใกล้เคียงลดลง 58% ที่ความเข้มข้น 50 ppm ลดลง 51% ที่ 100 ppm ลดลง 54% ที่ 200 ppm และลดลง 50% ที่ 400 ppm Dahamma et al. (2009) รายงานว่ากระต่ายที่ได้รับไซเพอร์เมธริน $\frac{1}{2} \text{LD}_{50}$ นาน 3 สัปดาห์ (1 ครั้งต่อสัปดาห์) จะกินอาหารน้อยลง น้ำหนักลดลง ตับมีการเปลี่ยนแปลงไขมัน serum ALT และ cratinine เพิ่มขึ้นขณะที่โปรตีน albumin, serum cholesterol และ triglycerides ลดลง และHussein et al. (2013) รายงานว่าไซเพอร์เมธรินทำให้ cholesterol ลดลง แต่ถ้าให้น้ำมันงาร่วมด้วยจะช่วยลดพิษของไซเพอร์เมธรินได้ โดยสรุปไซเพอร์เมธรินมีผลต่อ plasma membrane ทำให้การยึดเกาะของ coelomocytes ลดลง

จำนวน Micronucleus, Nuclear abnormal, ค่า Neutral red retention time และค่า Pinocytic adherence ability มีความสัมพันธ์กับความเข้มข้นของไซเพอร์เมธรินแบบเส้นตรง ขณะที่ Tail DNA%, Tail length และ Olive tail moment มีความสัมพันธ์แบบโพลิโนเมียล แสดงว่าสารพันธุกรรมเมื่อได้รับพิษจะมีกระบวนการซ่อมแซมเกิดขึ้นภายในเซลล์ ทำให้ไม่มีความสัมพันธ์กับไซเพอร์เมธรินแบบเส้นตรง จนเมื่อเซลล์ไม่สามารถซ่อมแซมได้จึงจะเกิดผลลัพท์

ส่วนการหาค่าสหสัมพันธ์ของ biomarkers กับปริมาณไซเพอร์เมธรินพบว่า Neutral red retention time และ Pinocytic adherence ability มีค่า Pearson correlation (r) = 0.990 เป็นค่าที่สูงที่สุด รองลงไปคือค่า Nuclear abnormal, micronucleus, Tail length, Olive tail moment และ Tail DNA% เป็น 0.989, 0.976, 0.561, 0.552, 0.357 ตามลำดับ (ตารางที่ 6) แต่ Neutral red retention time และ Pinocytic adherence ability มีค่า r เป็นลบแสดงว่าเมื่อความเข้มข้นของไซเพอร์เมธรินเพิ่มขึ้นเวลาในการเก็บกักสีใน lysosome ลดลง และการยึดเกาะของเซลล์ลดลงแตกต่างกับกลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$) โดยมีความสัมพันธ์กับไซเพอร์เมธรินแบบผกผันในระดับสูงมาก (เนื่องจากมีค่า r เกิน 0.75) ส่วน Nuclear abnormal, micronucleus, Tail length, Olive tail moment และ Tail DNA% มีค่า r เป็นบวก แสดงว่าเมื่อความเข้มข้นของไซเพอร์เมธรินเพิ่มขึ้นจำนวน Nuclear abnormal, micronucleus, Tail length, Olive tail moment และ Tail DNA% เพิ่มขึ้น แต่อย่างไรก็ตาม ความสัมพันธ์แบบเส้นตรงระหว่าง biomarkers ที่เกิดจาก comet assay กับความเข้มข้นของไซเพอร์

เมธรินมีน้อยจนถึงปานกลาง สอดคล้องกับ biomarkers ของ Comet assay ที่ fit พอดีกับสมการแบบ โพลีโนเมียลมากกว่าสมการเส้นตรง

จากการเปรียบเทียบประสิทธิภาพของ biomarkers ในการตอบสนองต่อไซเพอร์เมธรินในครั้งนี้ พบว่า 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 เท่า ความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นไซเพอร์เมธรินกับ Neutral red retention time และ Pinocytic adherence ability เป็นความสัมพันธ์แบบ dose dependent เพราะแสดงความสัมพันธ์เชิงเส้นสูงมาก ผู้วิจัยจึงขอเสนอว่าวิธี Neutral red retention assay เป็นวิธีการตรวจสอบความเป็นพิษของไซเพอร์เมธรินต่อไส้เดือนดินที่ดีที่สุด

สำหรับเวลาที่ใช้ทดสอบไซเพอร์เมธรินบนกระดาดกรอง 48 ชั่วโมง พบว่าทุกการทดสอบสามารถวัดได้ แต่ความแม่นยำและความประสิทธิภาพของความไวจะแตกต่างกัน

การศึกษาครั้งนี้แสดงว่าการประเมินความเป็นพิษของสารเคมีด้วยการตรวจ biomarkers เป็นชุดทั้งด้านสรีระวิทยาและพันธุศาสตร์ร่วมกันจะทำให้ได้ข้อมูลความเป็นพิษของสารเคมีในระดับลึก เพื่อให้การประเมินผลกระทบของสารเคมีเป็นไปอย่างแม่นยำ การเลือก biomarkers ที่เหมาะสมเป็นเรื่องสำคัญเป็นอย่างยิ่ง biomarkers ที่ดีควรตอบสนองได้เมื่อมีการเปลี่ยนแปลงสารเคมีในระบบนิเวศ และตอบสนองได้รวดเร็ว การประเมินความเป็นพิษของไซเพอร์เมธรินด้วย biomarkers ทางสรีระด้วย neutral red retention time พบว่ามีความไวมากกว่าเครื่องมือวัดทางพันธุกรรมหลายเท่า และวัดได้ที่มีความเข้มข้นไซเพอร์เมธรินต่ำ แสดงว่า biomarker นี้สามารถใช้ประเมินความเป็นพิษในระบบนิเวศบกได้ สามารถใช้ตรวจสอบคุณภาพของดินด้วยไส้เดือนดิน ซึ่งจะนำมาสู่การพัฒนาคุณภาพของดินให้ดียิ่งขึ้น biomarkers แต่ละตัวให้ผลลัพธ์เป็นรูปแบบการตอบสนองที่ต่างกัน ดังนั้นผู้วิจัยเสนอว่าในการประเมินความเสี่ยงของสารพิษในสภาพแวดล้อมในระยะแรกควรใช้ biomarkers หลายตัวร่วมกันในการประเมินในห้องทดลอง ก่อนการนำไปสู่การทดลองในภาคสนามต่อไป

7. สรุปผลการทดลอง

ไซเพอร์เมธรินเป็นสารกำจัดศัตรูพืชที่เป็นอันตรายต่อไส้เดือนดิน *Pheretima peguana* ระดับความเข้มข้นของไซเพอร์เมธรินที่ทำให้ไส้เดือนดิน *Pheretima peguana* ตาย 50% (LC_{50}) ในเวลา 48 ชั่วโมง คือ $3.5 \times 10^{-1} \mu\text{g} \cdot \text{cm}^{-2}$ สามารถทำให้เกิด DNA single strand breaks และ micronucleus biomarkers ที่ไวต่อไซเพอร์เมธรินคือ Neutral red retention time สามารถใช้ตรวจวัดความผิดปกติของไส้เดือนดินตั้งแต่ความเข้มข้นต่ำกว่า LC_{50} 100 เท่า ($3.5 \times 10^{-3} \mu\text{g} \cdot \text{cm}^{-2}$) และมีเป็นความสัมพันธ์แบบเชิงลบ

8. บรรณานุกรม

- กรมควบคุมมลพิษ. 2556. เอกสารข้อมูลความปลอดภัยของสารเคมีภัณฑ์ (ออนไลน์) แหล่งที่มา: <http://msds.pcd.go.th/name.asp>. 5 เมษายน 2556.
- พรพรรณ คล้ายโพธิ์ทอง. 2552. ผลของมาลาไรเอนตอไลต์เดือนดิน รายงานโครงงานวิจัย 2 ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยศิลปากร 56 หน้า
- สมชาย กมลพันธ์. 2556. เดือนการระบาดของศัตรูพืชประจำสัปดาห์ ปีที่ 2 ฉบับที่ 8 ประจำวันที่ 23 - 29 กุมภาพันธ์ 2547 (ออนไลน์) แหล่งที่มา: <http://plantpro.doae.go.th/forecast/week/23-290247/fruit%20borer.html>. 10 เมษายน 2556.
- Agarwal D.K., Chauhan L.K.S., Gupta S.K., Sundararaman V. (1994) Cytogenetic effects of deltamethrin on rat bone marrow cells. *Mutat. Res.* 311: 133-138.
- Anwar K. (2004) Toxic effects of cypermethrin on the development of muscle in chick embryo of *Gallus domesticus*. *Int. J. Agric. Biol.* 6(2): 400-406.
- Atisook K., Sungwaranon B., Lertreungdej Y., Jongmeevasana P., Payanant T., Chaipolngam R. (2003) Pesticides residue in foods monitored in Thailand, 1999-2003. Paper in International Symposium on Uses and Effects of Pesticides in Southeast Asia. Queen Sirikit Botanic Garden, Chiang Mai, Thailand. (11-13 Dec. 2003)
- Ballantyne B. (1988). *Perspective in basic and applied Toxicology*. Wright, USA.
- Bhuniya S.P., Pati P.C. (1990) Effect of deltamethrin, a synthetic pyrethroid, on the induction of chromosomal aberration, micronuclei and sperm abnormalities in mice. *Mutagenesis* 5: 229-232.
- Booth L., O'Halloran K. (2001) A comparison of biomarker responses in the earthworm *Aporrectodea caliginosa* to the organophosphorous insecticides diazinon and chlorpyrifos. *Environ. Toxicol. Chem.* 20: 2494-2502.
- Bouche M.B. (1992) Earthworm species and ecotoxicological studies. In: Greig-Smith, P.W., Becker, H., Edwards, P.J., Heimbach (Eds.), *Ecotoxicology of Earthworms*. Intercept, Andover. UK. pp.2-6.
- Bradbury S.P., Coats J.R. (1989) Comparative toxicology of the pyrethroid insecticides. *Rev. Environ. Contam. Toxicol.* 108: 134-177.
- Çavaş T. 2008. In vivo genotoxicity of mercury chloride and lead acetate: micronucleus test on acridine orange stained fish cells. *Food Chem Toxicol.* 46:352-358.
- 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.

- Clark J.R., Goodman L.R., Bortwick P.W., Celik A., Mazmanci B., Camlica Y., Askin A., Comelekoglu U. (2003) Cytogenetic effects of lambda-cyhalothrin on Wistar rat bone marrow. *Mutat. Res.* 539: 91-97.
- Chakra R.N, Venkateswara rao, J., (2008) Biological response of earthworm, *Eisenia foetida* (Savigny) to an organophosphorous pesticide, profenofos. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 71: 574-582.
- 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.
- Chauhan L.K.S., Dikshith T.S.S., Sundararaman V. (1986) Effect of deltamethrin on plant cells. I. Cytological effects of deltamethrin on the root meristem cells of *Allium cepa*. *Mutat. Res.* 171: 25-30.
- Coskun B., Comelekoglu U., Polat A., Kaymaz F.F. (2004) Evaluation of the toxic effects of cypermethrin inhalation on the frog heart. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 57: 220-225.
- 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.
- Eason C.T., Svendsen C., O'Halloran K., Weeks J.M. (1999) An assessment of the lysosomal neutral red retention test and immune function assay in earthworms (*Eisenia andrei*) following exposure to chlorpyrifos, benzo-a-pyrene (BaP), and contaminated soil. *Pedobiologia* 43: 641-645.
- Eason C., O' Halloran K. (2002) Biomarkers in toxicology versus ecological risk assessment. *Toxicology.* 181: 517-521.
- Eells J.T., Bandettini P.A., Holman P.A., Propp J.M. (1992) Pyrethroid insecticide-induced alterations in mammalian synaptic membrane potential. *Pharmacol. Exp. Ther.* 262: 1173-1181.

- 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(1): 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(1-3): 91-101.
- Gassner B., Wuthrich A., Scholtysik G., Solioz M. (1997) The pyrethroids permethrin and cyhalothrin are potent inhibitors of the mitochondrial complex I. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 281: 855-860.
- Gupta R.D., Chakravorty P.P., Kaviraj A. (2010) Studies on relative toxicities of six insecticides on epigeic earthworm, *Perionyx excavatus*. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 85: 83-86.
- Gupta R.D., Chakravorty P.P., Kaviraj A. (2011) Susceptibility of epigeic earthworm *Eisenia fetida* to agricultural application of six insecticides. *Chemosphere* 84: 724-726.
- Hassal K.A. (1982) *The Chemistry of Pesticides, Their Metabolism, Mode of Action and Uses in Crop Protection*. The Macmillan Press Ltd., London/Bansignstoke, pp. 67-96.
- 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.
- Hildebrand M.E., McRory J.E., Snutch T.P., Stea A. (2004) Mammalian voltage-gated calcium channels are potently blocked by the pyrethroid insecticide allethrin. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 308(3): 805-813.
- Huggett R.F., Kimerle R.A., Mehrle P.M., Bergman H.L. (1992) Biomarkers. Biochemical, physiological, and histological markers of anthropogenic stress. Lewis Publishers, Boca Raton, pp. 1-347.
- 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.
- Jessen D., Ramel C. (1980) The micronucleus test as apart of a short-term mutagenicity test program for the prediction for carcinogenicity evaluated by 143 agents tested. *Mutat. Res.* 75: 191-202.

- Kadous A., Matsumura F., Enan E. (1994) High affinity binding of 3-verapamil to rat brain synaptic membrane is antagonized by pyrethroid insecticides. *J. Environ. Sci. Health.* 29: 855-871.
- Kale M., Rathore N., John S., Bhatnagar D. (1999) Lipid peroxidative damage on pyrethroid exposure and alterations in antioxidant status in rat erythrocytes: a possible involvement of reactive oxygen species. *Toxicol. Lett.* 105: 197-205.
- 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(9): 5349-5357.
- Leahey J.P. 1985. Metabolism and environmental degradation, in *The Pyrethroid Insecticides*. Leahey, J.P. (Ed.) Taylor and Francis, London. 263-342.
- Lionetto M.G., Vilella S., Trischitta F., Cappello M.S., Schettino T. (1998) Effects of CdCl₂ on electrophysiological parameters in the intestine of teleost fish *Anguilla anguilla*. *Aquatic Toxicology.* 4(3): 251–264
- Lowe D.M., Fossato V.U., Depledge M.H. (1995a) Contaminant induced lysosomal membrane damage in blood cells of mussels *Mytilus galloprovincialis* from Venice Lagoon: an in vitro study. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 129: 189-196.
- 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.
- Lowe D.M., Soverchia C., Moore M.N. (1995b) Lysosomal membrane responses in the blood and digestive cells of mussels experimentally exposed to fluoranthene. *Aquat. Toxicol.* 33: 105-112.
- Martin F.L., Pearce T.G., Hewer A., Phillips D.H., Semple K.T. (2005) A biomarker model of sublethal genotoxicity (DNA single-strand breaks and adducts) using the sentinel organism *Aporrectodea longa* in spiked soil. *Environ. Pollut.* 138(2): 307-15.
- 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.
- Medina M., Barata C., Telfer T., Baird D.J. (2004) Effects of cypermethrin on marine plankton communities: a simulated field using mesocosms. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 58(2): 236-245.

- 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.
- Mosleh Y.Y., Ismail S.M.M., Ahmed M.T., Ahmed Y.M. (2003) Comparative toxicity and biochemical responses of certain pesticides to the mature earthworm *Aporrectodea caliginosa* under laboratory conditions. Online in Wiley InterScience (www.interscience.wiley.com). 9 pages DOI: 10.1002/tox.10134.
- OECD (1984) Earthworm, acute toxicity tests. In: Organization for Economic Cooperation and Development (Ed.) OECD Guidelines for testing of Chemical Paris.
- 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.
- Patel S., Pandey A.K., Bajpayee, M., Parmar, D., Dhawan, A. (2006) Cypermethrin-induced DNA damage in organs and tissues of the mouse: Evidence from the comet assay. Mutat. Res. 607: 176-183.
- Pati P.C., Bhuniya S.P. (1989) Cytogenetic effects of fenvalerate in mammals in vivo test system. Mutat. Res. 222: 149-154.
- Pluijmen M., Devron C., Montesano R., Malaveille C., Hautefeuille A., Bartsch H. (1984) Lack of mutagenicity of synthetic pyrethroids in *Salmonella typhimurium* strains and V79 Chinese hamster cells. Mutat Res. 137: 7-15.
- Reinecke S.A., Reinecke A.J. (2004) The comet assay as biomarker of heavy metal genotoxicity in earthworms. Arch. Environ. Contam. Toxicol. 46(2): 208-215.
- Salagovic J., Gilles J., Verschaeve L., Kalina I. (1996) The comet assay for the detection of genotoxic damage in the earthworms: a promising tool for assessing the biological hazards of polluted sites. Folia. Biol.(Praha). 42: 17-21.
- Saxena P.N., Gupta V.D. (2005) Role of molecular geometry, valence charge distribution and vibrational modes in the bioactivity of cyclodiene insecticides. J. Appl. Toxicol. 25: 39-46.
- 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.
- Schmid W. (1976) The micronucleus test for cytogenetic analysis. Chem. Mut. 4: 31-35.
- Shakoori A.R., Ali S.S., Saleem M.A. (1988) Effects of sixmonth's feeding of cypermethrin on the blood and liver of albino rats. J. Biochem. Toxicol. 3: 59-71.

- Singh A.K., Tiwari M.N., Prakash O., Singh M.P. (2012) A current review of cypermethrin-induced neurotoxicity and nigrostriatal dopaminergic neurodegeneration. *Curr. Neuropharmacol.* 10(1): 64–71.
- 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.
- Soderlund D.M., Clark J.M., Sheets L.P., Mullin L.S., Piccirillo V.J., Sargent D. (2002) Mechanisms of pyrethroid neurotoxicity: Implications for cumulative risk assessment. *Toxicology.* 171: 53-59.
- Surrallés J., Xamena N., Creus A., Catalán J., Norppa H., Marcos R. (1995) Induction of micronucleus by five pyrethroids insecticides in whole blood and isolated human lymphocytes cultures. *Mutat. Res.* 341(3): 169-184.
- Svendsen C., Spurgeon D.J., Hankard P.K., Weeks J.M. (2004) A review of lysosomal membrane stability measured by neutral red retention - is it a workable earthworm biomarker? *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 57(1): 20-29.
- Tatebayashi H., Narahashi T. (1994) Differential mechanism of action of the pyrethroid tetramethrin on tetrodotoxin-sensitive and tetrodotoxin-resistant sodium channels. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 270(2): 595-603.
- Udroiu I. 2006. The micronucleus test in piscine erythrocytes. *Aquat. Toxicol.* 79: 201-204.
- United States Environmental Protection Agency. (1989) Cypermethrin Pesticide Fact Sheet Washington, D.C.
- United States Environmental Protection Agency. (1997) Office of Pesticide Programs list of chemicals evaluated for carcinogenic potential. Memo from W.L. Burnman, HED, to HED branch chiefs. Washington, DC. February 19.
- Velisek J., Wlasow T., Gomulka P., Svobodova Z., Dobsikova R., Novotny L., Dudzik M. (2006) Effects of cypermethrin on rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Vet. Med.* 51(10): 469-476.
- Verschaeve L., Gilles J. (1995) Single cell gel electrophoresis assay in the earthworm for the detection of genotoxic compounds in soils. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 54: 112–119.
- Villarini M., Moretti M., Pasquini R., Scassellati-Sforzolini G., Fatigoni C., Marcarelli M., Monarca S. (1998) In vitro genotoxic effects of the insecticide deltamethrin in human peripheral blood leukocytes: DNA damage ('comet' assay) in relation to the induction of sister-chromatid exchanges and micronuclei. *Toxicology* 130(2-3): 129-139.

- 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*. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 79:122-128.
- Weeks B.A., Keisler A.S., Warinner J.E., Mathews E.S. (1987) Preliminary evaluation of macrophage pinocytosis as a technique to monitor fish health. *Marine Environ. Res.* 22(3): 205-213.
- Weeks J.M., Svendsen C. (1996) Neutral red retention by lysosomes from earthworm (*Lumbricus rubellus*) coelomocytes: a simple biomarker of exposure to soil copper. *Environ. Toxicol. Chem.* 15: 1801–1805.
- WHO (1989) Cypermethrin. Environmental Health Criteria 82, WHO, Geneva
- Zang Y., Zhong Y., Luo Y., Kong Z.M. (2000) Genotoxicity of two novel pesticides for the earthworm *Eisenia fetida*. *Environ. Pollut.* 108 : 271-278.
- Zhao C., Li X., Luo S., Chang Y. (2011) Assessments of lysosomal membrane responses to stresses with neutral red retention assay and its potential application in the improvement of bivalve aquaculture. *Afr. J. Biotechnol.* 10(64): 13968-13973.
- Zhou S., Duan C., Wang X., Wong H.G., Yu Z., Fu H. (2008) Assessing cypermethrin-contaminated soil with three different earthworm test methods. *J. Environ. Sci. (China)*. 20(11): 1381-1385.

ประวัติคณะผู้วิจัย

ตอนที่ 1 ประวัติทั่วไป

1. ชื่อ - สกุล นาง ปทุมพร เมืองพระ

Mrs. Ptumporn Muangphra

2. วัน เดือน ปีเกิด 23 มิถุนายน พ.ศ. 2498
3. หมายเลขประจำตัวประชาชน 3 1009 01629 04 2
4. ตำแหน่งทางวิชาการปัจจุบัน รองศาสตราจารย์
5. สถานที่ทำงาน

ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์

034 245 327 โทรสาร 034 245 325

e-mail address : ptumporn@su.ac.th

ที่อยู่ปัจจุบัน

บ้านเลขที่ 19/139 ซอย วิภาวดี 60 ถนนวิภาวดี ตำบลตลาดบางเขน

อำเภอหลักสี่ จังหวัด กรุงเทพมหานคร

โทรศัพท์ 02 9408262

6. ประวัติการศึกษา

- ปริญญาตรีสาขา วทบ.(ชีววิทยา) สถาบัน มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ปีที่จบ 2519

- ปริญญาโทสาขา MA (Biology) สถาบัน University of Kansas

ปีที่จบ 2524

ตอนที่ 2 ผลงานวิจัยที่ตีพิมพ์

Muangphra M., Sengsai S., Gooneratne R. 2013. Earthworm biomarker responses on exposure to commercial cypermethrin. *Environ Toxicol.* doi: 10.1002/tox.21937. [Epub ahead of print]

Muangphra M., Kwankua W., Gooneratne R. 2012. Genotoxic effects of glyphosate or paraquat on earthworm coelomocytes. *Environ Toxicol.* doi:10.1002/tox.21787.

Muangphra M., Gooneratne R. 2011. Toxicity of commercial neem extract to earthworms (*Pheretima peguana*). *Appl Environ Soil Sci.* Article ID 925950. doi:10.1155/2011/925950.

Muangphra M., Gooneratne R. 2011. Comparative genotoxicity of cadmium and lead in earthworm coelomocytes. *Appl Environ Soil Sci.* Article ID 218929. doi:10.1155/2011/218929.

Mayama S, Katoh K, Omori H, Seino S, Osaki H, Julius M, Lee JH, Cheong C, Lobo A. E, Witkowski A, Srivibool R, **Muangphra P**, Jahn R, Kulikovskiy M, Hamilton PB, Gao, Ya-Hui, Ector L. 2011. Progress toward the construction of an international web-based

- educational system featuring improved “SimRiver” for understanding of river environments. Asian journal of biology education.
- Muangphra, P.** 2010. In vivo genotoxicity assessment of glyphosate using micronucleus test and comet assay in earthworm coelomocytes. The 6th international conference on biological sciences, 10-11 November, 2010. Tanta, Egypt.
- Muangphra P.,** Pongsawat W., Sribuddhachart K. 2008. Factors affecting cadmium adsorption of *Kirchneriella lunaris*. The 22nd Biennial Conference of the Asian Association for Biology Education, 21-24 November 2008. Osaka, Japan.
- Muangphra P.** 2008. Genotoxicity of cadmium to coelomocytes of earthworms, *Pheretima peguana* and *Pheretima posthuma*. The 22nd Biennial Conference of the Asian Association for Biology Education, 21-24 November 2008. Osaka, Japan.
- Muangphra, P.** 2008. The genotoxicity of coelomocytes of *Pheretima peguana* dermally exposed to neem extracts. The 5th SETAC World Congress. 3-7 August 2008. Sydney, Australia.
- Muangphra P.,** Sribuddhachart K., Noophan P. 2004. A comparison of specific growth rates and orthophosphate removal efficiencies of *Chlorella vulgaris*, *Scenedesmus acuminatus*, and *Scenedesmus armatus* to be modified in the stabilization pond. In the International Symposium on Lowland Technology. 1-3 September 2004. Bangkok, Thailand.
- Muangphra P.** 2010. Toxicity of cadmium and lead on coelomocytes of earthworm *Pheretima peguana*. Proceedings of the 3rd Silpakorn Research, Nakorn Pathom, 28-29 January 2010. P16-P19.
- Pongsawat W., **Muangphra P.** 2010. Adsorption capacity of cadmium by *Kirchneriella lunaris* Proceedings of the 3rd Silpakorn Research, Nakorn Pathom, 28-29 January 2010. P.20-P.23.
- Taraphan S., **Muangphra P.** 2008. Effect of cadmium on the survival of *Kirchneriella lunaris*. Proceeding of the 3rd Science and Technology for the youth, Bangkok, 21-23 March 2008.
- วงแห ยุติธรรม, ปทุมพร เมืองพระ, วันวิวาร์ วิชิตวรคุณ. 2550.. องค์ประกอบของสัตว์ทะเลหน้าดินขนาดใหญ่บริเวณหาดเลน ตำบลบางขุนไทร จังหวัดเพชรบุรี. วารสารมหาวิทยาลัยศิลปากร, 27(1): 20-41.
- อนุสรฯ ทองเอี่ยม, อมรรัตน์ กลัดกลีบ, ชีวิน โขจรนาคกุล, ปทุมพร เมืองพระ. 2550. ผลของสารสกัดสะเดาต่อการเจริญเติบโตของ *Chlorella* sp. การประชุมวิชาการสำหรับเยาวชนและเพลงก่ตองแห่งชาติ ครั้งที่ 3, กรุงเทพฯ, 21-23 มีนาคม 2550.

- ปทุมพร เมืองพระ**, วราภรณ์ พงษ์สวัสดิ์. 2550. ความสามารถในการลดปริมาณแคดเมียมของ *Kirchneriella* sp. การประชุมวิชาการสำหรับและแพลงก์ตอนแห่งชาติ ครั้งที่ 3, กรุงเทพฯ, 21-23 มีนาคม 2550.
- ตรีรัตน์ สายวรรณ, สุนิษา อาจอ่อนศรี, อำไพพรรณ ยินดี, **ปทุมพร เมืองพระ**. 2550. ผลของสาร azadirachtin ต่อความ
- ผิดปกติดังระดับพันธุกรรมของ coelomocyte ของไส้เดือนดิน. การประชุมวิชาการวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีเพื่อเยาวชน ครั้งที่ 2, กรุงเทพฯ, 21-22 มีนาคม 2550.
- อรุณี สมมณี, สาโรจน์ เกรียงศักดิ์ชัย, **ปทุมพร เมืองพระ**, สุริยัน รัชกิจจานุกิจ. 2548. ปริมาณและความหลากหลายของแพลงก์ตอนพืชกลุ่มไดโนแฟลเจลเลต บริเวณอำเภอสรรพยา จังหวัดชัยภูมิวารสารการประมง 58(2): 151-158.
- ปทุมพร เมืองพระ**, กัลยา ศรีพุทธชาติ. 2548. ความหลากหลายของของแพลงก์ตอนพืชบนหาดเลน ต.บางขุนไทร อ.บ้านแหลม จ. เพชรบุรี. การประชุมวิชาการสำหรับและแพลงก์ตอนแห่งชาติ ครั้งที่ 2, เชียงใหม่, 23-25 มีนาคม 2548.
- ชาญวิทย์ โฆษิตานนท์, **ปทุมพร เมืองพระ**, กัลยา ศรีพุทธชาติ, กัณห์กริช ศรีพงษ์พันธุ์. 2538. การสำรวจความเปลี่ยนแปลงบางประการของแหล่งน้ำในมหาวิทยาลัยศิลปากร วิทยาเขตสนามจันทร์. จุลสารมหาวิทยาลัยศิลปากร, 5: 4-6.
- อรุณี สมมณี, **ปทุมพร เมืองพระ**. 2533. การใช้รำละเอียด กากถั่วเหลืองและปลาป่นเป็นอาหารสมทบในการเลี้ยงปลาตะเพียนขาวและปลานิล. วิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี, 5(3): 79-88.
- ปทุมพร เมืองพระ**, อรุณี สมมณี. 2532. โพรโทซัวและแบคทีเรียในดินบริเวณรากพุทธรักษา แสมและสน. วิทยาสารเกษตรศาสตร์สาขาวิทยาศาสตร์, 23(4): 364-372.
- ปทุมพร ศุภกิจวิเลขการ**, อรุณี สมมณี. 2530. โปรโตซัวที่พบตามเหืองกุ่ม. รายงานการประชุมในกสัมมนาเรื่องสัตว์ป่าเมืองไทย มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ครั้งที่ 8. กรุงเทพฯ, 22:1-15.

ประวัติผู้ร่วมวิจัย

ตอนที่ 1 ประวัติทั่วไป

- ชื่อ - สกุล นาง นงนุช เอื้อวงศ์
- วัน เดือน ปีเกิด 13 สิงหาคม พ.ศ. 2516
- หมายเลขประจำตัวประชาชน 3 7206 00079 11 1
- ตำแหน่งทางวิชาการปัจจุบัน ตำแหน่งนักวิทยาศาสตร์ ระดับ 6
- สถานที่ทำงาน

ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์

โทรศัพท์ 034 245 327 โทรสาร 034 245 325

e-mail address : nuch_nongnuch@hotmail.com

ที่อยู่ปัจจุบัน

บ้านเลขที่ 63/32 หมู่ 6 ต. ลำพระยา
อำเภอ เมือง จังหวัด นครปฐม
โทรศัพท์ 086 173 1771

6. ประวัติการศึกษา

- ปริญญาตรีสาขา วทบ. (พืชศาสตร์) สถาบันเทคโนโลยีการเกษตรแม่โจ้
ปีที่จบ 2538
- ปริญญาโทสาขา วทม. (วิทยาศาสตร์สิ่งแวดล้อม) มหาวิทยาลัยศิลปากร
ปีที่จบ 2550

ตอนที่ 2 ผลงานวิจัยที่ตีพิมพ์

- Kwankua W., Sengsai S., Kuleung C., **Euawong N.** 2010. Sunlight decreased genotoxicity of azadirachtin on roottipcells of *Allium cepa* and *Eucrosia bicolor*. *Ecotoxicology and Environmental Safety*. 73: 949–954.
- Boonyakitjinda V., Sengsai S., **Gumlangpat N.** 2008. Phytotoxicity assessment of neem extracts by seed germination testing. The Environmental Toxicology and Chemistry congress 3-7 Aust 2008. Sydney, Australia.
- Boonyakitjinda V., Sengsai S., **Gumlangpat N.** 2008. Screening plant species for assessing Cd and neem extract contamination. Proceeding of the 22nd Biennial Conference of the AABE November 21-24, Osaka, Japan.
- Kwankua W., Sengsai S., **Gumlangpat N.** 2008. Evaluation of Genotoxic Effects of Residue Aza Containing Neem Extract on Root tip Cells of *Allium cepa*, *Zephyranthes rosea*, and *Euchrosia bicolor*. Proceeding of the 22nd Biennial Conference of the AABE November 21-24, Osaka, Japan.
- Kwankua W., Sensai S., **Gumlangpat N.** 2008. The screening of Plant species for cyto-genotoxic sensitivity indicators. The Environmental Toxicology and Chemistry congress 3-7 Aust 2008. Sydney, Australia.
- Sengsai S., **Gumlangpat N.**, Kwankua W. 2008. Assessing genotoxic effects of cadmium using *Allium cepa*, *Zephyranthes rosea* and *Eucrosia bicolor* *Narasuan Science Journal*. 5(1): 21-30 (In Thai)
- Gumlungpat N.**, Sanmanee N. 2006. Genotoxicity testing of Cd on the *Ipomoea aquatica* Forsk. Abstracts of the 11th Biological Science graduate Congress (Biological Science Ph.D. programe eds.) 15th-17th December, 2006, Chulalongkorn University, Bangkok. Thailand
- Areekijserree M., Vejaratpimol R., **Gumlungpat N.** 2004. Microstructure investigations of porcine ampulary oviductal epithelial cells by scanning electron microscope. Abstract of

30th Congress on Science and Technology of Thailand. October 19-21, Impact Exhibition and Convention Center, Muang Thong Thani, Bangkok, Thailand, p. 43

หงหนู กาลังแพทย์, นัทธีรา สรรณ. 2551. การตรวจสอบความเป็นพิษของแคดเมียมโดยใช้ไลโนกินด็อก *Sesbania javinga* Mig. วารสารความปลอดภัยและสุขภาพ ปีที่ 1 ฉบับที่ 3 (กุมภาพันธ์-เมษายน 2551) หน้า 49-54.

หงหนู กาลังแพทย์, วิไลภรณ์ บุญญกิจจินดา, สุพรรณฎิกา เสี่ยงสาย, วิมล ขวัญเกื้อ. 2550. การคัดเลือกพืชเพื่อเป็นดัชนีทางชีวภาพ โดยวิธีการตรวจสอบความเป็นพิษต่อสารพันธุกรรม I. การประชุมวิชาการพันธุศาสตร์แห่งชาติครั้งที่ 15 วันที่ 23-25 พฤษภาคม 2550. โรงแรม บีพี สมิทลาบีช สงขลา.

คณิสต์ เสี่ยมสุนทร, หงหนู กาลังแพทย์, เรณู เวชรัตน์พิมล. 2548. ความเป็นพิษของสารสะเดาสกัดที่มีผลต่อสารพันธุกรรมในเซลล์เพาะเลี้ยงของหนู (L929) การประชุมวิชาการวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทย ครั้งที่ 31 (วทท.11) วันที่ 18-20 ตุลาคม 2548 ณ เทคโนโลยีมหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี จ.นครราชสีมา

ชินรัตน์ แจ้งแสงฟ้า, หงหนู กาลังแพทย์, เรณู เวชรัตน์พิมล. 2548. การเปรียบเทียบวิธีประเมินความเป็นพิษของทองแดงต่อเซลล์เพาะเลี้ยงของหนูเมาส์. การประชุมวิชาการวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทย ครั้งที่ 31 (วทท.11) วันที่ 18-20 ตุลาคม 2548 ณ เทคโนโลยีมหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี จ.นครราชสีมา