สหสัมพันธ์ระหว่างการปนเปื้อนสารฆ่าวัชพืชกับผลต่อตับและไตของปลากะมัง *Puntioplites proctozysron* ในแม่น้ำน่าน อำเภอเวียงสา จังหวัดน่าน

นางสาวอรสา อัชชยะพันธ์วนิช

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต
สาขาวิชาสัตววิทยา ภาควิชาชีววิทยา
คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
ปีการศึกษา 2555

ลิขสิทธิ์ของจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
บทคัดย่อและแฟ้มข้อมูลฉบับเต็มของวิทยานิพนธ์ตั้งแต่ปีการศึกษา 2554 ที่ให้บริการในคลังปัญญาจุฬาฯ (CUIR)
เป็นแฟ้มข้อมูลของนิสิตเจ้าของวิทยานิพนธ์ที่ส่งผ่านทางบัณฑิตวิทยาลัย
The abstract and full text of theses from the academic year 2011 in Chulalongkorn University Intellectual Repository (CUIR)
are the thesis authors' files submitted through the Graduate School.

CORRELATION BETWEEN HERBICIDE CONTAMINATION AND EFFECTS ON LIVER AND KIDNEY OF CYPRINID FISH *Puntioplites proctozysron* IN NAN RIVER, WIANGSA DISTRICT, NAN PROVINCE

Miss Orasa Achayapunwanich

A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements
for the Degree of Master of Science Program in Zoology
Department of Biology
Faculty of Science
Chulalongkorn University
Academic Year 2012
Copyright of Chulalongkorn University

หัวข้อวิทยานิพนธ์	สหสัมพันธ์ระหว่างการปนเปื้อนสารฆ่าวัชพืชกับผลต่อตับและไตของปลากะมัง *Puntioplites proctozysron* ในแม่น้ำน่าน อำเภอเวียงสา จังหวัดน่าน
โดย	นางสาวอรสา อัชชยะพันธ์วนิช
สาขาวิชา	สัตววิทยา
อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก	อาจารย์ ดร. จิรารัช กิตนะ
อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม	อาจารย์ ดร. นพดล กิตนะ อาจารย์ ดร. พุทธรักษา วรานุศุภากุล

คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย อนุมัติให้นับวิทยานิพนธ์ฉบับนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญามหาบัณฑิต

คณบดีคณะวิทยาศาสตร์

(ศาสตราจารย์ ดร. สุพจน์ หารหนองบัว)

คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์

....ประธานกรรมการ

(อาจารย์ ดร. ชัชวาล ใจซื่อกุล)

....อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก

(อาจารย์ ดร. จิรารัช กิตนะ)

....อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม

(อาจารย์ ดร. นพดล กิตนะ)

....อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม

(อาจารย์ ดร. พุทธรักษา วรานุศุภากุล)

....กรรมการ

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. ดวงแข สิทธิเจริญชัย)

กรรมการภายนอกมหาวิทยาลัย

(อาจารย์ ดร. ศรัณย์ เกียรติมาลีสถิตย์)

อรสา อัชชยะพันธ์วนิช : สหสัมพันธ์ระหว่างการปนเปื้อนสารฆ่าวัชพืชกับผลต่อตับและไตของปลากะมัง *Puntioplites proctozysron* ในแม่น้ำน่าน อำเภอเวียงสา จังหวัดน่าน. (CORRELATION BETWEEN HERBICIDE CONTAMINATION AND EFFECTS ON LIVER AND KIDNEY OF CYPRINID FISH *Puntioplites proctozysron* IN NAN RIVER, WIANGSA DISTRICT, NAN PROVINCE) อ.ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก : อ.ดร.จิรารัช กิตนะ, อ.ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม : อ.ดร. นพดล กิตนะ, อ.ดร. พุทธรักษา วรานุศุภากุล,146 หน้า.

การใช้สารฆ่าวัชพืชอย่างหนักในจังหวัดน่าน โดยเฉพาะอย่างยิ่ง อะทราซีน ไกลโฟเซต และพาราควอท ทำให้เกิดความกังวลเกี่ยวกับการปนเปื้อนของสารเหล่านี้ลงสู่แหล่งน้ำ จนอาจก่อให้เกิดผลกระทบต่อสิ่งมีชีวิตที่อาศัยในแหล่งน้ำ สารเหล่านี้ล้วนมีรายงานว่ามีผลเสียต่อสัตว์น้ำ งานวิจัยนี้จึงเลือกใช้ปลากะมัง *Puntioplites proctozysron* ซึ่งพบอาศัยอยู่ในแม่น้ำน่านเป็นสัตว์เฝ้าระวังเพื่อศึกษาผลกระทบของการปนเปื้อนของสารฆ่าวัชพืชเหล่านี้ต่อสัตว์ โดยเก็บตัวอย่างดินตะกอน น้ำ และปลากะมังจากแม่น้ำน่าน บริเวณใกล้พื้นที่เกษตร ในช่วงฤดูน้ำหลาก เดือนกรกฎาคมและตุลาคม พ.ศ. 2553 และในช่วงฤดูแล้ง เดือนมกราคมและเมษายน พ.ศ. 2554 และนำมาวิเคราะห์ปริมาณการปนเปื้อนของอะทราซีน ไกลโฟเซต และพาราควอท การวิเคราะห์ปริมาณการปนเปื้อนของสารฆ่าวัชพืชในดินตะกอนและน้ำ โดยใช้ HPLC และ GC-MS พบการปนเปื้อนของอะทราซีนในดินและน้ำในเดือนกรกฎาคม พ.ศ. 2553 และมกราคม พ.ศ. 2554 การวิเคราะห์ปริมาณการปนเปื้อนในเนื้อเยื่อตับและไตของปลากะมังโดยวิธี ELISA พบการตกค้างของอะทราซีน ไกลโฟเซต และพาราควอทในเนื้อเยื่อตับและไตของปลาในทุกเดือนที่ทำการศึกษา จากผลการศึกษา ค่า condition factor (CF) มีแนวโน้มที่มีค่าสูงขึ้น และลดต่ำลงเล็กน้อยในเดือนเมษายน พ.ศ. 2554 ค่า hepatosomatic index (HSI) มีค่าสูงและลดต่ำลงเล็กน้อยในเดือนมกราคม พ.ศ. 2554 และ renosomatic index (RSI) ไม่เห็นความแตกต่างที่ชัดเจนตลอดการศึกษา จากผลการศึกษาสหสัมพันธ์ด้วยสถิติ Pearson's correlation matrices ระหว่างการปนเปื้อนของสารฆ่าวัชพืชในเนื้อเยื่อตับและไตของปลากะมังกับค่า CF, HSI และ RSI พบว่าการปนเปื้อนของอะทราซีนมีสหสัมพันธ์กับค่า CF และ RSI และไกลโฟเซทมีสหสัมพันธ์กับค่า HSI ($P<0.05$) พยาธิสภาพของตับที่เด่นชัด ได้แก่ vacuolization, malano-macrophage center (MMCs), pyknosis และ necrosis พยาธิสภาพของไตที่พบเด่นชัด ได้แก่ MMCs, glomerulus swelling, glomerulus shrinkage และ renal tubular degeneration เมื่อนำข้อมูลปริมาณการปนเปื้อนของสารฆ่าวัชพืชมาวิเคราะห์สหสัมพันธ์กับความผิดปกติที่พบในเนื้อเยื่อตับและไต พบว่ามีสหสัมพันธ์กันระหว่างข้อมูลปริมาณการปนเปื้อนของสารฆ่าวัชพืชบางชนิดกับการเกิดพยาธิสภาพในตับและไตบางอาการ ได้แก่ อาการ pyknosis, karyolysis, renal tubular cell degeneration และ glomerulus shrinkage จากผลการศึกษาทั้งหมด สรุปได้ว่า มีการปนเปื้อนของสารฆ่าวัชพืชทั้งสามชนิดในปลากะมัง ซึ่งการปนเปื้อนนี้มีความเชื่อมโยงกับความผิดปกติทางร่างกายหลายประการของปลากะมัง และการใช้ค่า CF, HSI และ RSI เป็น biomarker ควรใช้ร่วมกับพยาธิสภาพภายในเนื้อเยื่อเพื่อบ่งบอกสุขภาวะของปลาที่อาศัยอยู่ในแหล่งปนเปื้อนและใช้เป็นข้อมูลในการเฝ้าระวังผลของการปนเปื้อนของสารพิษในแหล่งน้ำ

ภาควิชา ชีววิทยา	ลายมือชื่อนิสิต
สาขาวิชา สัตววิทยา	ลายมือชื่อ อ.ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก
ปีการศึกษา 2555	ลายมือชื่อ อ.ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม
	ลายมือชื่อ อ.ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม

5272621123 : MAJOR ZOOLOGY
KEYWORDS : ATRAZINE / GLYPHOSATE / PARAQUAT / SENTINEL SPECIES / HISTOPATHOLOGY

ORASA ACHAYAPUNWANICH : CORRELATION BETWEEN HERBICIDE CONTAMINATION AND EFFECTS ON LIVER AND KIDNEY OF CYPRINID FISH *Puntioplites proctozysron* IN NAN RIVER, WIANGSA DISTRICT, NAN PROVINCE. ADVISOR : JIRARACH KITANA, Ph.D., CO-ADVISOR : NOPPADON KITANA, Ph.D., PUTTARUKSA VARANUSUPAKUL, Ph.D., 146 pp.

In Nan province, the heavily use of herbicides mainly atrazine, glyphosate and paraquat, raises concerns over the potential contamination and adverse effects to aquatic environment. Since toxicity of these herbicides has been frequently reported on non-target aquatic organisms, a common cyprinid fish *Puntioplites proctozysron* inhabiting in Nan River was selected as a sentinel species to monitor the herbicide contamination and its effect on animals. In this study, sediment, water and fish samples from Nan River nearby agricultural areas were collected in rainy season (July and October 2010) and dry season (January and April 2011) and analyzed for contamination of three major herbicides. Based on HPLC and GC-MS analyses, atrazine was found in sediment (July 2010 and January 2011) and water (January 2011). All three herbicides were found in liver and kidney tissues of the fish of every month collection. The result shows that CF are significantly increased from July 2010 to January 2011. The HSI is highest in October 2010 and lowest in January 2011 with significant difference ($p<0.05$) between the last two sampling months. RSI are not significantly different between months. The result also shows that herbicide contamination in tissues are statistically correlated with CF, HSI and RSI of the fish, using Pearson's correlation matrices. The contamination of atrazine is significantly correlated with CF and RSI and the contamination of glyphosate is significantly correlated with HSI ($p<0.05$). Histopathological analysis of liver indicated major lesions, including vacuolization, malano-macrophage center (MMCs), pyknosis and necrosis. In kidney, the major lesions include MMCs, glomerulus swelling, glomerulus shrinkage and renal tubular cell degeneration. Contamination of some herbicides are significantly correlated with some histopathological changes in liver and kidney including pyknosis, karyolysis, renal tubular cell degeneration and glomerulus shrinkage. Overall results indicated that there is contamination of herbicides in the fish that associated with its morphological abnormalities. The use of CF, HSI and RSI as biomarkers should be done together with the use of histopathology, in order to evaluate the overall health of the fish living in contaminated areas and to use as information for sentinel system of aquatic contamination.

Department : Biology	Student's Signature
Field of Study : Zoology	Advisor's Signature
Academic Year : 2012	Co-advisor's Signature
	Co-advisor's Signature

กิตติกรรมประกาศ

ขอกราบขอบพระคุณ อาจารย์ ดร. จิรารัช กิตนะ อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ ที่ได้กรุณาให้คำแนะนำและข้อคิดต่าง ๆ ในการวิจัย ตลอดจนช่วยตรวจสอบและแก้ไขข้อบกพร่องวิทยานิพนธ์ฉบับนี้จนสมบูรณ์ ข้าพเจ้าขอกราบขอบพระคุณเป็นอย่างสูงไว้ ณ ที่นี้ด้วย

ขอบกราบขอบพระคุณ อาจารย์ ดร. ชัชวาล ใจซื่อกุล ประธานกรรมการสอบวิทยานิพนธ์ อาจารย์ ดร. นพดล กิตนะ และอาจารย์ ดร. พุทธรักษา วรานุศุภากุล อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม ที่ได้กรุณาให้คำแนะนำ และช่วยแก้ไขวิทยานิพนธ์ฉบับนี้ให้ถูกต้องและสมบูรณ์ยิ่งขึ้น ขอบกราบขอบพระคุณ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. ดวงแข สิทธิเจริญชัย กรรมการ และอาจารย์ ดร. ศรัณย์ เกียรติมาลีสถิตย์ กรรมการภายนอกมหาวิทยาลัย ที่เสียสละเวลามาเป็นกรรมการในวันสอบวิทยานิพนธ์

ขอกราบขอบพระคุณคุณคณาจารย์ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัยทุก ๆ ท่าน ที่ได้ถ่ายทอดวิชาความรู้ และข้อคิดต่าง ๆ ตลอดการศึกษา

ขอขอบพระคุณ นางประทุม วงษ์ศา และครอบครัว ที่ให้ความช่วยเหลือในทุกด้านขณะที่เก็บตัวอย่างที่บริเวณตำบลส้าน อำเภอเวียงสา จังหวัดน่าน คุณ ยุพิณ ไชยราชา และสำนักงานเกษตรอำเภอเวียงสา จังหวัดน่าน ที่ให้ข้อมูลและคำแนะนำเกี่ยวกับข้อมูลเบื้องต้นในพื้นที่ ผู้ใหญ่ ประนอม รวมทั้งชาวบ้านตำบลนาส้านทุกท่าน ที่ค่อยให้ความช่วยเหลือและอำนวยความสะดวกในขณะทำการวิจัย ที่บริเวณตำบลส้าน อำเภอเวียงสา จังหวัดน่าน

ขอขอบคุณสมาชิกทุกท่านในห้องปฏิบัติเนื้อเยื่อวิทยาและไมโครเทคนิค และห้องปฏิบัติการสิ่งมีชีวิตเฝ้าระวัง (Bio-sentinel laboratory) ภาควิชาชีววิทยา จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ที่ได้ให้ความช่วยเหลือในเรื่องต่าง ๆ ขอขอบคุณ นายศิลปชัย เสนารัตน์ นายธงชัย ธิติภูรี นายภานุพงศ์ ธรรมโชติ และนายรชตะ มณีอินทร์ ที่ให้ความช่วยเหลือตั้งแต่เริ่มงานวิจัยในการเก็บตัวอย่างตลอดจนให้คำปรึกษาและช่วยเหลือในทุก ๆ เรื่องในขณะทำงานวิจัย

ขอบคุณ นายวศิน สกุลคู สำหรับการตรวจสอบภาษาอังกฤษในโครงร่างบทความวิจัย ตลอดจนความช่วยเหลือทุกด้านในขณะทำงาน และขอบคุณ นายศราวุธ โกมุทธพงษ์ ที่คอยให้คำปรึกษาและช่วยเหลือในด้านการวิเคราะห์ข้อมูลต่างๆ

ขอขอบคุณโครงการวิทยาเพื่อพื้นถิ่น ในแผนพัฒนาวิชาการ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย (พ.ศ. 2551-2555) (S4LB-M52-16 (H11)) และโครงการผลิตนักวิจัยด้านความหลากหลายทางชีวภาพ ระดับปริญญาโท-เอก (CEB_M_68_2011) ที่มอบทุนในการศึกษาโครงงานวิจัยนี้

สุดท้ายขอขอบพระคุณ คุณแม่อนุสรา เพชรสุข และครอบครัว ที่เป็นกำลังใจสำคัญในการศึกษาเล่าเรียนมาโดยตลอด

สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อภาษาไทย..	ง
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ..	จ
กิตติกรรมประกาศ..	ฉ
สารบัญ..	ช
สารบัญตาราง..	ฌ
สารบัญภาพ..	ฎ
บทที่ 1 บทนำ	
1.1 ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา..	1
1.2 วัตถุประสงค์ของการวิจัย..	4
บทที่ 2 เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง	
2.1 จังหวัดน่าน..	5
2.2 แม่น้ำน่าน..	5
2.3 การใช้สารฆ่าวัชพืชในจังหวัดน่าน..	7
2.4 การใช้สัตว์เฝ้าระวัง (sentinel species)..	17
2.5 ปลากะมัง *Puntioplites proctozysron*..	18
2.6 ตับปลากระดูกแข็ง..	21
2.7 ไตปลากระดูกแข็ง..	22
2.8 ตัวชี้วัดทางชีวภาพ (biomarker)..	24
บทที่ 3 การปนเปื้อนของสารฆ่าวัชพืชในดินตะกอน น้ำ และปลากะมังในแม่น้ำน่าน อำเภอเวียงสา จังหวัดน่าน	
3.1 บทนำ..	26
3.2 วิธีดำเนินการวิจัย..	28
3.3 ผลการศึกษาและวิเคราะห์ผลการศึกษา..	40
บทที่ 4 สหสัมพันธ์ระหว่างสุขภาวะโดยรวมและความสมบูรณ์ของตับและไตของปลากะมังกับปริมาณการปนเปื้อนของสารฆ่าวัชพืชในแม่น้ำน่าน อำเภอเวียงสา จังหวัดน่าน	
4.1 บทนำ..	59

หน้า

4.2 วิธีดำเนินการวิจัย.. 60
4.3 ผลการศึกษาและวิเคราะห์ผลการศึกษา... 64
บทที่ 5 สหสัมพันธ์ระหว่างการปนเปื้อนสารฆ่าวัชพืชกับพยาธิสภาพของตับและไตของ ปลากะมัง ในแม่น้ำน่าน อำเภอเวียงสา จังหวัดน่าน
5.1 บทนำ.. 73
5.2 วิธีดำเนินการวิจัย.. 75
5.3 ผลการศึกษาและวิเคราะห์ผลการศึกษา... 80
บทที่ 6 สรุปผลการศึกษา.. 114
รายการอ้างอิง.. 120
ภาคผนวก... 138
ประวัติผู้เขียนวิทยานิพนธ์... 146

สารบัญตาราง

ตารางที่		หน้า
3.1	ระดับการปนเปื้อนของสารฆ่าวัชพืชในดินตะกอนและน้ำที่เก็บตัวอย่างจากแม่น้ำน่าน อำเภอเวียงสา จังหวัดน่าน ตั้งแต่เดือนกรกฎาคม พ.ศ. 2553 จนถึงเดือนเมษายน พ.ศ. 2554	44
3.2	ระดับการปนเปื้อนของสารฆ่าวัชพืชในปลากะมังที่เก็บตัวอย่างจากแม่น้ำน่าน อำเภอเวียงสา จังหวัดน่าน ตั้งแต่เดือนกรกฎาคม พ.ศ. 2553	46
3.3	ระดับการปนเปื้อนของอะทราซีนในเนื้อเยื่อตับที่เก็บตัวอย่างจากแม่น้ำน่าน อำเภอเวียงสา จังหวัดน่าน ตั้งแต่เดือนตุลาคม พ.ศ. 2553 จนถึงเดือนเมษายน พ.ศ. 2554	49
3.4	ระดับการปนเปื้อนของไกลโฟเซตในเนื้อเยื่อตับที่เก็บตัวอย่างจากแม่น้ำน่าน อำเภอเวียงสา จังหวัดน่าน ตั้งแต่เดือนตุลาคม พ.ศ. 2553 จนถึงเดือนเมษายน พ.ศ. 2554	51
3.5	ระดับการปนเปื้อนของพาราควอทในเนื้อเยื่อตับที่เก็บตัวอย่างจากแม่น้ำน่าน อำเภอเวียงสา จังหวัดน่าน ตั้งแต่เดือนตุลาคม พ.ศ. 2553 จนถึงเดือนเมษายน พ.ศ. 2554	53
3.6	ระดับการปนเปื้อนของสารฆ่าวัชพืชในเนื้อเยื่อไตที่เก็บตัวอย่างจากแม่น้ำน่าน อำเภอเวียงสา จังหวัดน่าน ตั้งแต่เดือนตุลาคม พ.ศ. 2553 จนถึงเดือนเมษายน พ.ศ. 2554	55
3.7	ระดับช่วงของการปนเปื้อนของสารฆ่าวัชพืชในปลา ตับ และไต กับค่ามาตรฐานความปลอดภัยต่อการบริโภคในอาหาร	58
4.1	ค่าสุขภาวะโดยรวม ของปลากะมัง *Puntioplites proctozysron* ที่เก็บตัวอย่างจากแม่น้ำน่าน อำเภอเวียงสา จังหวัดน่าน ตั้งแต่เดือนตุลาคม พ.ศ. 2553 จนถึงเดือนเมษายน พ.ศ. 2554	65
4.2	ค่าความสมบูรณ์ของตับ (Hepatosomatic index; HSI) และค่าความสมบูรณ์ของไต (renosomatic index; RSI) ของปลากะมัง *Puntioplites proctozysron* ที่เก็บตัวอย่างจากแม่น้ำน่าน อำเภอเวียงสา จังหวัดน่าน ตั้งแต่เดือนตุลาคม พ.ศ. 2553 จนถึงเดือนเมษายน พ.ศ. 2554	68

ตารางที่		หน้า

4.3 สหสัมพันธ์ระหว่างสุขภาวะโดยรวม (CF) ค่าความสมบูรณ์ของตับ (HSI) และค่าความสมบูรณ์ของไต (RSI) ของปลากะมังกับปริมาณการปนเปื้อนของสารฆ่าวัชพืช.. 69

5.1 การประเมินอาการความผิดปกติทางพยาธิสภาพในเนื้อเยื่อตับของปลากะมัง *Puntioplites proctozysron* ที่เก็บตัวอย่างจากแม่น้ำน่าน อำเภอเวียงสา จังหวัดน่าน ตั้งแต่เดือนกรกฎาคม พ.ศ. 2553 จนถึงเดือนเมษายน พ.ศ. 255... 93

5.2 ค่าอุบัติการณ์ (prevalence) ของพยาธิสภาพที่พบในเนื้อเยื่อตับของปลากะมัง *Puntioplites proctozysron* ที่เก็บตัวอย่างจากแม่น้ำน่าน อำเภอเวียงสา จังหวัดน่าน ตั้งแต่เดือนกรกฎาคม พ.ศ. 2553 จนถึงเดือนเมษายน พ.ศ. 2554.. 94

5.3 สหสัมพันธ์ระหว่างผลทางพยาธิสภาพที่พบในเนื้อเยื่อตับของปลากะมังกับปริมาณการปนเปื้อนของสารฆ่าวัชพืช.. 97

5.4 การประเมินอาการความผิดปกติทางพยาธิสภาพในเนื้อเยื่อไตของปลากะมัง *Puntioplites proctozysron* ที่เก็บตัวอย่างจากแม่น้ำน่าน อำเภอเวียงสา จังหวัดน่าน ตั้งแต่เดือนกรกฎาคม พ.ศ. 2553 จนถึงเดือนเมษายน พ.ศ. 2554.. 109

5.5 ค่าอุบัติการณ์ (prevalence) ของพยาธิสภาพที่พบในเนื้อเยื่อไตของปลากะมัง *Puntioplites proctozysron* ที่เก็บตัวอย่างจากแม่น้ำน่าน อำเภอเวียงสา จังหวัดน่าน ตั้งแต่เดือนกรกฎาคม พ.ศ. 2553 จนถึงเดือนเมษายน พ.ศ. 2554.. 110

6.1 สรุปผลสหสัมพันธ์ระหว่างสุขภาวะโดยรวม (CF) ค่าความสมบูรณ์ของตับ (HSI) และค่าความสมบูรณ์ของไต (RSI) ของปลากะมังกับปริมาณการปนเปื้อนของสารฆ่าวัชพืช... 118

6.2 สรุปผลสหสัมพันธ์ระหว่างอาการความผิดปกติที่พบในเนื้อเยื่อตับและไตของปลากะมังกับปริมาณการปนเปื้อนของสารฆ่าวัชพืช...................................... 119

สารบัญภาพ

ภาพที่		หน้า
2.1	(A) แผนที่ประเทศไทย และ (B) แผนที่ของจังหวัดน่าน....................................	6
2.2	แผนที่แสดงระบบของเส้นน้ำของแม่น้ำน่านในจังหวัดน่าน..............................	6
2.3	โครงสร้างของอะทราซีน..	9
2.4	โครงสร้างของไกลโฟเซต..	12
2.5	โครงสร้างของพาราควอท..	15
2.6	ปลากะมัง *Puntioplites proctozysron*..	18
2.7	แสดงลักษณะปลากะมังเพศผู้และเพศเมีย..	20
3.1	(A) พื้นที่ศึกษาบริเวณแม่น้ำน่าน ใกล้กับพื้นที่เกษตร ตั้งอยู่ที่ ตำบลส้าน อำเภอ เวียงสา จังหวัดน่าน (B-C) พื้นที่การเกษตร มีการปลูกพืชสวนและพืชไร่ โดยเฉพาะข้าวโพด..	19
3.2	การเก็บตัวอย่างดินตะกอนและน้ำจากแม่น้ำน่านโดยเก็บดินตะกอนและน้ำใน ขวดพอลีเอทิลีน..	30
3.3	เก็บตัวอย่างปลากะมังจากแม่น้ำน่าน โดยวิธีลงข่ายจับปลา..............................	31
4.1	การวัดความยาวลำตัวของปลากะมัง..	61
5.1	(A) การลงข่ายเก็บตัวอย่างปลากะมังในแม่น้ำน่าน (B) ข่ายที่ใช้ในการเก็บ ตัวอย่าง (C) การเก็บตัวอย่างปลากะมังในถังน้ำที่ให้ออกซิเจน.......................	76
5.2	การผ่าตัดเปิดช่องท้องและตำแหน่งของอวัยวะภายในของปลากะมัง..................	77
5.3	โครงสร้างพื้นฐานของเนื้อเยื่อตับของปลากะมัง *Puntioplites proctozysron*.......	81
5.4	(A-D) เนื้อเยื่อตับของปลากะมัง *P. proctozysron* ที่เก็บจากแม่น้ำน่าน ตั้งแต่ เดือนกรกฎาคม 2553 (A), ตุลาคม 2553 (B), มกราคม 2554 (C) และเมษายน 2554 (D) แสดงการเกิด necrosis และ leukocyte infiltration (ลูกศรสีแดง) H&E stain..	84
5.5	เนื้อเยื่อตับของปลากะมัง *P. proctozysron* ที่เก็บจากแม่น้ำน่าน แสดงการเกิด pyknosis (ลูกศรสีดำ), necrosis (*), leukocyte infiltration (ลูกศรสีแดง) และ karyolysis (ลูกศรสีฟ้า) H&Estain...	85

ภาพที่		หน้า
5.6	(A-B) เนื้อเยื่อตับของปลากะมัง (*P. proctozysron*) ที่เก็บจากแม่น้ำน่าน แสดงอาการ vacuolization (ลูกศรสีดำ) มากผิดปกติ และอาการ blood congestion ใน sinusoid (*) (C-F) การเกิด malano-macrophage center (MMCs) (ลูกศรสีดำ), leukocyte infiltration (ลูกศรสีแดง), necrosis (ลูกศรสีน้ำเงิน) และอาการ blood congestion ใน sinusoid (*)..	86
5.7	เนื้อเยื่อตับของปลากะมัง *P. proctozysron* ที่เก็บจากแม่น้ำน่าน แสดงการเกิด karyomegaly (ลูกศรสีแดง), leukocyte infiltration (ลูกศรสีน้ำเงิน) และ necrosis (*) H&E stain..	87
5.8	เนื้อเยื่อตับของปลากะมัง *P. proctozysron* ที่เก็บจากแม่น้ำน่าน แสดงการเกิด syncytial cell (ลูกศรสีแดง) ในเนื้อเยื่อตับของปลากะมัง H&E stain.................	88
5.9	เนื้อเยื่อตับของปลากะมัง *P. proctozysron* ที่เก็บจากแม่น้ำน่าน แสดงการเกิด syncytial cell (ลูกศรสีแดง) และ edema (*) ในเนื้อเยื่อตับของปลากะมัง H&E stain...	89
5.10	(A-E) เนื้อเยื่อตับของปลากะมัง *P. proctozysron* ที่เก็บจากแม่น้ำน่าน ตั้งแต่เดือนกรกฎาคม 2553 (A), ตุลาคม 2553 (B-C), มกราคม 2554 (D) และเมษายน 2554 (E) แสดงเนื้อเยื่อตับที่ผ่านขั้นตอนการย้อมสี PAS พบจุดสีแดงของการสะสมไกลโคเจนในจำนวนมาก PAS stain.......................................	90
5.11	(A-C) เนื้อเยื่อตับของปลากะมัง *P. proctozysron* ที่เก็บจากแม่น้ำน่าน แสดงการพร่อง glycogen (*) (D-F) การเกิดการอักเสบ (Inflammation; ลูกศรชี้) H&E stain..	91
5.12	(A-C) เนื้อเยื่อตับของปลากะมัง *P. proctozysron* ที่เก็บจากแม่น้ำน่าน แสดงการการเกิด edema (*) H&E stain...	92
5.13	ไดอะแกรมแสดงโครงสร้างพื้นฐานของไตปลากะมัง *Puntioplites proctozysron* (A) ลักษณะการวางตัวของไตตามแนวกระดูกสันหลังทอดยาวไปทางด้านท้ายของลำตัวปลา (B) ไดอะแกรมแสดงรูปร่างและการแบ่งส่วนต่าง ๆ ของไต (C) ส่วนต่าง ๆ ของท่อไต (Ostrander, 2000)..	100

ภาพที่ **หน้า**

5.14 โครงสร้างพื้นฐานของเนื้อเยื่อไตของปลากะมัง *Puntioplites proctozysron* ที่เก็บจากแม่น้ำน่าน ในเดือนกรกฎาคม 2553 ถึงเมษายน 2554 (A-B) เนื้อเยื่อไตส่วนต้นประกอบด้วย hematopoietic cell (he) จำนวนมาก (C)เนื้อเยื่อไตประกอบด้วยหน่วยไตส่วนท้ายประกอบด้วย nephron ซึ่งมีขดเลือด glomerulus (G), proximal tubule (PT) บุด้วย tall cuboidal epithelium, distal tubule (DT) บุด้วย low cuboidal epithelium, collecting duct (CD) และ hematopoietic cell (he) แทรกระหว่างท่อไต H&E และ PAS stain)...................................... 101

5.15 เนื้อเยื่อไตของปลากะมัง *Puntioplites proctozysron* ที่เก็บจากแม่น้ำน่าน ในเดือนกรกฎาคม 2553 ถึงเมษายน 2554 (A-F) ลักษณะโครงสร้างที่ผิดปกติ พบ MMCs (ลูกศรชี้), renal tubular cell degeneration (d) และ glomerulus shrinkage (sh) H&E และ PAS stain.. 104

5.16 เนื้อเยื่อไตของปลากะมัง *Puntioplites proctozysron* ที่เก็บจากแม่น้ำน่าน ที่เก็บจากแม่น้ำน่าน ในเดือนกรกฎาคม 2553 ถึงเมษายน 2554 (A) การเกิดอาการ renal tubular cell degeneration (d) ทำให้ไม่เห็นขอบเขตของเซลล์ (B) การเกิดอาการ glomerulus swelling (gs) ทำให้มีการบวมและขยายออกจนไม่เห็นพื้นที่ระหว่าง glomerulus กับ Bowmann's capsule ทำให้มี Bowmann's space ลดลง (*) (C) การเกิดอาการ glomerulus shrinkage (sh) มีการหดตัวแน่นของขดเลือด glomerulus ทำให้เกิดช่องว่างระหว่าง glomerulus กับ Bowmann's capsule กว้างกว่าปกติ(*) (D) การเกิดอาการ glomerulus swelling (gs) ทำให้มี Bowmann's space ลดลง (b) (*) (E) การเกิดอาการ renal tubular cell degeneration (d) ทำให้ไม่เห็นขอบเขตของเซลล์ ท่อไตเสียรูปร่างไปและไม่เห็นโครงสร้างเดิม(F) การเกิด glomerulus shrinkage (sh) H&E และ PAS stain.. 106

5.17 (A-C) เนื้อเยื่อไตของปลากะมัง *Puntioplites proctozysron* ที่เก็บจากแม่น้ำน่าน ที่เก็บจากแม่น้ำน่าน ในเดือนกรกฎาคม 2553 ถึงเมษายน 2554 (A) การเกิด MMCs ใน hematopoietic tissue ของไต (ลูกศรชี้) (B) การเกิด renal tubular cell degeneration (d) (C) การเกิด MMCs (ลูกศรชี้) และ renal tubular cell degeneration (d) PAS stain... 108

บทที่ 1
บทนำ

จังหวัดน่านเป็นจังหวัดที่ตั้งอยู่ทางภาคเหนือของประเทศไทย ถือเป็นจังหวัดที่ประชาชนทำการเกษตรเป็นหลัก (สุวัฒนา ธาดานิติ และวิพรรณ ประจวบเหมาะ, 2548) โดยพืชที่นิยมปลูกกันมากคือพืชไร่ ได้แก่ ข้าว และข้าวโพด การดูแลข้าวโพดเพื่อให้ได้ผลดี ปลอดภัยจากศัตรูพืชนั้นเป็นไปได้ยาก เกษตรกรจึงนิยมหันมาใช้สารเคมีทางการเกษตรมากขึ้น โดยสารเคมีทางการเกษตรที่ใช้กันอย่างแพร่หลาย คือ สารฆ่าวัชพืช (Wongwichit และคณะ, 2010) ข้อมูลจากการสัมภาษณ์เกษตรกรในจังหวัดน่าน ทำให้ทราบว่าวัชพืชเป็นปัญหาสำคัญที่ส่งผลเสียต่อแปลงเกษตรมากกว่าแมลงศัตรูพืช และสารฆ่าวัชพืชที่เกษตรกรในจังหวัดน่านนิยมใช้ มี 3 ชนิด ได้แก่ พาราควอท ไกลโฟเซต และอะทราซีน สารเหล่านี้มีองค์ประกอบที่มีคุณสมบัติละลายน้ำได้แตกต่างกันแต่สามารถถูกพัดพาไปถึงแหล่งน้ำต่าง ๆ และอาจยึดเกาะกับอนุภาคดินตะกอนได้อย่างแน่นหนา ทำให้จุลินทรีย์ย่อยสลายได้ยาก และถ้ามีการใช้ติดต่อกันเป็นระยะเวลานานก็สามารถสะสมในสิ่งแวดล้อมได้ (ภิญญา จำรัสกุล, 2539) เมื่อทำการฉีดพ่นในปริมาณมาก สารเหล่านี้จะฟุ้งกระจายในชั้นบรรยากาศ ตกลงสู่พื้นดิน และถูกพัดพาไปตามแหล่งน้ำต่างๆ เป็นบริเวณกว้างและลงสู่แม่น้ำ แม่น้ำน่านเป็นแม่น้ำสายหลักของจังหวัดน่าน ถือเป็นแม่น้ำสายสำคัญในบรรดาแม่น้ำ 4 สาย คือ แม่น้ำปิง แม่น้ำวัง แม่น้ำยม และแม่น้ำน่าน ที่ไหลมารวมกันเป็นแม่น้ำเจ้าพระยา มีความสำคัญต่อการดำรงชีวิตของประชาชนที่ตั้งถิ่นฐานในพื้นที่ลุ่มน้ำ และเป็นแหล่งน้ำในการอุปโภคบริโภคและเกษตรกรรม รวมทั้งการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำที่สำคัญของหลายจังหวัดในภาคเหนือ แม่น้ำน่านมีพื้นที่โดยรอบเป็นแหล่งเกษตรกรรม จึงมีโอกาสได้รับและสะสมสารฆ่าวัชพืชที่ใช้กันในปริมาณสูงได้

โดยทั่วไปสารฆ่าวัชพืชเมื่อมีการใช้โดยการฉีดพ่นจะมีความเป็นพิษเฉียบพลันต่อผู้ใช้หากมีการสัมผัสโดยตรงกับสารนั้น โดยอาจออกฤทธิ์ต่อผิวหนัง ต่อระบบประสาท และระบบทางเดินหายใจ แล้วอาจส่งผลก่อให้เกิดความเป็นพิษในระยะยาวต่ออวัยวะต่าง ๆ เช่น ตับ และไต (Cotran และคณะ, 1994; Ecobichon, 2001) การสะสมของสารฆ่าวัชพืช ทำให้สัตว์มีความอ่อนแอและไม่ทนต่อโรค ส่งผลต่อห่วงโซ่อาหารและระบบนิเวศ และสารฆ่าวัชพืชที่มีการใช้ในปริมาณมากสามารถส่งผลกระทบต่อสิ่งมีชีวิตได้ โดยสิ่งมีชีวิตที่อาศัยอยู่ในน้ำที่มีการปนเปื้อนของสารฆ่าวัชพืชสามารถได้รับผลกระทบโดยตรงจากการอาศัยในน้ำและสัมผัสผิวน้ำ สารฆ่าวัชพืชที่กล่าวถึงข้างต้น ได้แก่ ไกลโฟเซต พาราควอท และอะทราซีน เคยมีรายงานว่าทำให้ระบบหายใจ

ล้มเหลว สามารถส่งผลเสียต่อระบบทางเดินอาหาร ส่งผลเสียต่อตับและไต จนอาจทำให้ไตวายถ้าได้รับในปริมาณมาก รวมถึงส่งผลเสียต่อเซลล์ตับและไต (Ecobichon, 2001)

ในปัจจุบัน มีการใช้สัตว์เป็นตัวเฝ้าระวังผลกระทบการปนเปื้อนสารพิษในสิ่งแวดล้อมกันอย่างแพร่หลาย โดยระบบสัตว์เฝ้าระวัง (animal sentinel system) เป็นการใช้ข้อมูล อาจเป็นการปนเปื้อนหรือผลกระทบที่เกิดในร่างกายสัตว์ชนิดใดชนิดหนึ่งที่ดำรงชีวิตอยู่ในสิ่งแวดล้อมที่ได้รับสารปนเปื้อนเป็นระยะเวลายาวนาน แล้วนำข้อมูลที่ได้มาวิเคราะห์ถึงอันตรายที่อาจมีได้กับสัตว์ชนิดอื่น ๆ รวมทั้งมนุษย์ โดยสัตว์ที่จะใช้เป็นสัตว์เฝ้าระวัง (sentinel species) อาจเป็นสัตว์ที่อาศัยอยู่ในพื้นที่ปนเปื้อนอยู่แล้ว หรืออาจเป็นการนำมาไว้ในพื้นที่เพื่อศึกษาผลกระทบโดยเฉพาะ (NRC, 1991) สำหรับปัญหาการปนเปื้อนสารพิษในแหล่งน้ำนิยมใช้ปลาที่อาศัยอยู่ในแหล่งน้ำนั้นเป็นสัตว์เฝ้าระวังผลกระทบการปนเปื้อนสารพิษในแหล่งน้ำ (Frame และ Dickerson, 2006; Louiz และคณะ, 2009) ปัจจุบันมีปลาหลายชนิดที่ใช้เป็นสัตว์เฝ้าระวัง (sentinel species) ตัวอย่างเช่น ปลาเทศบาล (sucker), ปลาแกมบูเซียหรือปลากินยุง (mosquito fish), ปลาซิวข้าวสาร (medaka), ปลาตาเดียว (flounder), ปลาคิลลี่หรือปลาหัวตะกั่ว (killifish) และปลาม้าลาย (zebrafish) (Norris และ Carr, 2006) ปลาถือเป็นสัตว์เศรษฐกิจที่สำคัญอันดับต้นที่มนุษย์นิยมบริโภคเป็นอาหาร โดยปลาพื้นถิ่นที่สามารถพบได้ทั่วไปในแม่น้ำน่าน คือ ปลากะมัง *Puntioplites proctozysron* ในจังหวัดน่านปลากะมังถือเป็นปลาที่มีความสำคัญมากเพราะเป็นปลาเศรษฐกิจของชุมชน สามารถพบได้ในแม่น้ำน่านเป็นจำนวนมากตลอดทั้งปี ชาวบ้านส่วนใหญ่บริโภคปลากะมังที่จับได้จากแม่น้ำ หากชาวบ้านบริโภคปลากะมังที่มีการปนเปื้อนจากสารพิษอาจก่อให้เกิดผลเสียต่อสุขภาพได้ นอกจากนี้สารพิษที่ปนเปื้อนเข้าสู่ตัวปลา อาจส่งผลกระทบต่อสุขภาวะของปลา และมีผลในระดับประชากรได้ด้วยเช่นกัน

ในการประเมินผลกระทบการปนเปื้อนสารพิษต่อสัตว์ โดยใช้ระบบสัตว์เฝ้าระวัง มักเลือกใช้ตัววัดทางชีวภาพ (biomarker) ที่คาดว่าจะมีการเปลี่ยนแปลงสอดคล้องสัมพันธ์กับปริมาณการปนเปื้อน และจะต้องมีการใช้ตัววัดทางชีวภาพหลาย ๆ ตัวประกอบกัน โดยส่วนใหญ่จะต้องมีทั้งตัววัดทางชีวภาพที่สะท้อนถึงการได้รับสารปนเปื้อน (biomarker of exposure) และตัววัดทางชีวภาพที่สะท้อนถึงผลที่สัตว์ได้รับจากการรับสารนั้นเข้าสู่ร่างกาย (biomarker of effect) การวัดปริมาณสารปนเปื้อนในตัว ถือเป็น biomarker of exposure ที่เป็นที่นิยมใช้กันในงานวิจัยด้านนี้ (ATSDR, 2007) เนื่องจากปลาส่วนใหญ่เป็นสัตว์ที่ดำรงชีวิตอยู่ในน้ำตลอดเวลา การพบสารชนิดใด ๆ อยู่ในตัวปลา ก็มีความเป็นไปได้สูงว่ามีการปนเปื้อนของสารนั้นในน้ำ ส่วนการศึกษาผลกระทบที่เกิดขึ้นกับตัวปลา เช่น การเปลี่ยนแปลงน้ำหนักตัว น้ำหนักอวัยวะ หรือ

ความผิดปกติที่เกิดกับเนื้อเยื่ออวัยวะภายใน สามารถเป็น biomarker of effect ที่สะท้อนถึงผลของการได้รับสารปนเปื้อนนั้นเข้าไปในร่างกายได้ (Kendall และคณะ, 2001; van der Oost และคณะ, 2003)

ดังนั้น ในการศึกษานี้จึงให้ความสนใจศึกษาถึงการปนเปื้อนของสารฆ่าวัชพืชทั้งสามชนิดที่กล่าวมา และผลกระทบที่อาจเกี่ยวข้องกับการปนเปื้อนของสารฆ่าวัชพืชต่อปลาที่อาศัยในแม่น้ำน่าน โดยมุ่งวิเคราะห์หาชนิดและปริมาณของสารฆ่าวัชพืชที่ปนเปื้อนในสิ่งแวดล้อมและในตัวของปลากะมัง และมีการเลือกใช้ biomarker of exposure ได้แก่ ปริมาณการปนเปื้อนของสารฆ่าวัชพืชในเนื้อเยื่อปลา และ biomarker of effects ได้แก่ สุขภาวะโดยรวมหรือ condition factor (CF) ความสมบูรณ์ของตับหรือ hepatosomatic index (HSI) ความสมบูรณ์ของไตหรือ renosomatic index (RSI) และพยาธิสภาพของตับและไต (histopathology) เพื่อศึกษาถึงความผิดปกติของตับและไตของปลากะมังที่อาศัยอยู่ในแม่น้ำน่านในบริเวณใกล้พื้นที่เกษตร ตำบลส้าน อำเภอเวียงสา จังหวัดน่าน และหาความสัมพันธ์ระหว่างการปนเปื้อนของสารฆ่าวัชพืช กับความผิดปกติที่พบในตับและไตของปลากะมัง เพื่อนำข้อมูลที่ได้มาใช้ในการประเมินความเสี่ยงจากการปนเปื้อนของสารฆ่าวัชพืชต่อปลากะมังและสัตว์น้ำอื่น ๆ ที่อาศัยในแม่น้ำน่าน นอกจากนี้ยังเป็นแนวทางในการใช้ปลากะมัง เพื่อเป็นสัตว์เฝ้าระวังการปนเปื้อนของสารฆ่าวัชพืชในแหล่งน้ำธรรมชาติต่อไป

ผลที่ได้จากการศึกษานี้ จะทำให้ทราบข้อมูลการปนเปื้อนของสารฆ่าวัชพืชในน้ำและในเนื้อเยื่อ และความเกี่ยวข้องกับความผิดปกติของตับและไตของปลากะมังที่อาศัยในแม่น้ำน่าน เพื่อใช้ในการประเมินความเสี่ยงจากการปนเปื้อนสารฆ่าวัชพืชต่อประชากรสัตว์ และประชาชนที่อาศัยแม่น้ำน่านในการดำรงชีวิต และสามารถเผยแพร่ความรู้ต่อชุมชนชาวน่านเพื่อสร้างความเข้าใจอย่างถูกต้องเกี่ยวกับการใช้สารฆ่าวัชพืชอย่างเหมาะสมและไม่ส่งผลเสียต่อสิ่งแวดล้อม

วัตถุประสงค์

1. เพื่อวิเคราะห์หาชนิดและปริมาณของสารฆ่าวัชพืชที่ปนเปื้อนในน้ำ ตับ และไตของปลากะมังที่อาศัยในแม่น้ำน่าน บริเวณใกล้พื้นที่เกษตร ตำบลส้าน อำเภอเวียงสา จังหวัดน่าน
2. เพื่อศึกษาสุขภาวะโดยรวม และความผิดปกติของเนื้อเยื่อตับและไตของปลากะมังที่อาศัยอยู่ในแม่น้ำน่าน บริเวณใกล้พื้นที่เกษตร ตำบลส้าน อำเภอเวียงสา จังหวัดน่าน
3. เพื่อศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณการปนเปื้อนของสารฆ่าวัชพืชกับผลต่อตับและไตของปลากะมังที่อาศัยอยู่ในแม่น้ำน่านบริเวณใกล้พื้นที่เกษตร ตำบลส้าน อำเภอเวียงสา จังหวัดน่าน

บทที่ 2
เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

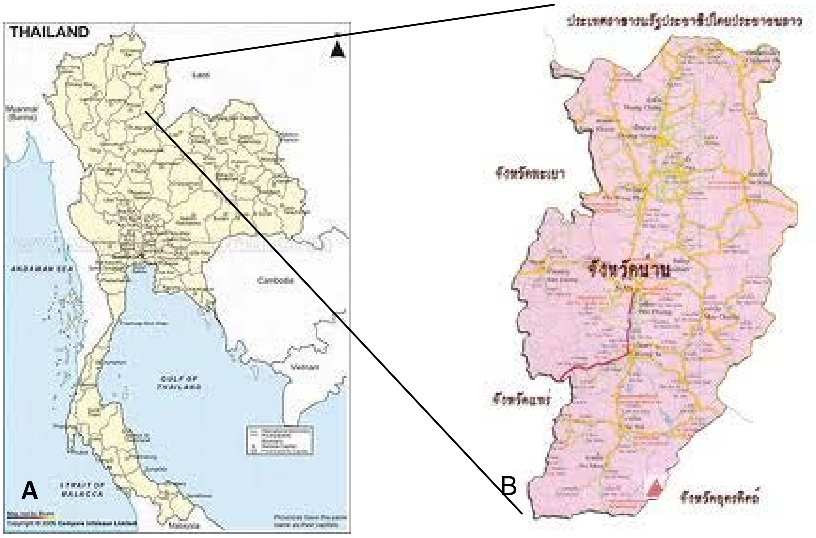
2.1 จังหวัดน่าน

จังหวัดน่านตั้งอยู่ติดกับชายแดนทางด้านทิศตะวันออกของภาคเหนือตอนบน ติดกับสาธารณรัฐประชาธิปไตยประชาชนลาว ระดับความสูงของพื้นที่อยู่สูง 2,112 เมตรจากระดับน้ำทะเลปานกลาง มีพื้นที่ 11,472.076 ตารางกิโลเมตร หรือประมาณ 7,170,045 ไร่ (ภาพที่ 2.1A และ 2.1B)

ลักษณะของภูมิอากาศของจังหวัดน่าน จะมีความแตกต่างกันมากในช่วงฤดูร้อนกับฤดูหนาว โดยในฤดูร้อนอากาศจะร้อนอบอ้าว และอากาศจะหนาวเย็นในช่วงฤดูหนาว แบ่งออกเป็นสามฤดู ได้แก่ ฤดูฝน ตั้งแต่เดือนพฤษภาคมถึงเดือนตุลาคม ซึ่งได้รับอิทธิพลจากลมมรสุมตะวันตกเฉียงใต้ พัดพาเอาความชุ่มชื้นมาสู่ภูมิภาค จึงทำให้มีผลตกชุก ฝนตกเฉลี่ยประมาณ 1,300 มิลลิเมตรต่อปี ฤดูหนาว ตั้งแต่เดือนพฤศจิกายนถึงกุมภาพันธ์ ซึ่งได้รับอิทธิพลจากลมมรสุมตะวันออกเฉียงเหนือ พัดพาเอาความหนาวเย็นสู่ภูมิภาค ทำให้บริเวณยอดมีอุณหภูมิต่ำกว่า 0 องศาเซลเซียส และฤดูร้อน ตั้งแต่ เดือนมีนาคมถึงพฤษภาคม ซึ่งได้รับอิทธิพลจากลมมรสุมตะวันออกเฉียงใต้ ทำให้มีสภาพอากาศร้อน อุณหภูมิเฉลี่ยประมาณ 27 องศาเซลเซียส และจะร้อนที่สุดในเดือนเมษายน อุณหภูมิประมาณ 40 องศาเซลเซียส (Nan Province, 2009)

2.2 แม่น้ำน่าน

แม่น้ำน่านมีต้นกำเนิดมาจากลำห้วยหลายสายไหลมารวมกับต้นแม่น้ำที่เทือกเขากิ่งศาลา แล้วไหลลงสู่ที่ราบต่ำทางภาคเหนือในเขตอำเภอทุ่งช้าง แม่น้ำน่านได้ไหลเข้าสู่พื้นที่ในจังหวัดน่าน กลายเป็นแม่น้ำสายหลักของจังหวัดน่าน จากนั้นผ่านอำเภอเชียงกลาง อำเภอปัว อำเภอท่าวังผา อำเภอเมือง อำเภอเวียงสา อำเภอนาน้อย สุดท้ายไหลผ่านจังหวัดอุตรดิตถ์ พิษณุโลก และพิจิตร ไปบรรจบกับแม่น้ำปิง วัง ยม ที่ปากน้ำโพ จังหวัดนครสวรรค์ แม่น้ำน่านจึงเป็นแม่น้ำที่ใหญ่ที่สุดในจังหวัดน่าน ซึ่งอยู่ทางตอนเหนือของประเทศไทย แม่น้ำน่านมีความยาวประมาณ 1,809 กิโลเมตร (Nan Province, 2009) จึงถือว่าแม่น้ำน่านเป็นต้นน้ำของแม่น้ำสายสำคัญอื่น ๆ และยังคงเป็นแม่น้ำสายย่อยของแม่น้ำเจ้าพระยาอีกด้วย (ภาพที่ 2.2)



ภาพที่ 2.1 (A) แผนที่ประเทศไทย และ (B) แผนที่ของจังหวัดน่าน

ภาพที่ 2.2 แผนที่แสดงระบบของเส้นน้ำของแม่น้ำน่านในจังหวัดน่าน

2.3 การใช้สารฆ่าวัชพืชในจังหวัดน่าน

สารฆ่าวัชพืช (herbicide) ถือเป็นกลุ่มหนึ่งของสารกำจัดศัตรูพืชและสัตว์ (pesticide) ที่นิยมใช้กันมากในปัจจุบัน สารฆ่าวัชพืชถูกนำมาใช้สำหรับควบคุมวัชพืชในระบบเกษตรกรรม ระบบเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำ และระบบชลประทาน ซึ่งการใช้สารฆ่าวัชพืชก็มีทั้งประโยชน์และโทษ การใช้สารฆ่าวัชพืชอย่างไม่เหมาะสม เช่น ใช้มากเกินไป ก็จะส่งผลต่อสภาพแวดล้อมได้ นอกจากนี้สารฆ่าวัชพืชอาจจะส่งผลทางอ้อมต่อระบบนิเวศการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำ โดยการชะล้างจากการเกษตรลงสู่แหล่งเพาะเลี้ยง เมื่อสารฆ่าวัชพืชมีการปนเปื้อนในระบบนิเวศน้ำอาจจะส่งผลเสียต่อสิ่งมีชีวิตที่อาศัยอยู่ในแหล่งน้ำนั้น เช่น สภาพแวดล้อมมีคุณภาพต่ำลง ทำลายสายพันธุ์และโครงสร้างสิ่งมีชีวิต ห่วงโซ่อาหารเปลี่ยนแปลง เปลี่ยนรูปแบบการไหลของพลังงานและวงจรสารอาหาร และเปลี่ยนแปลงเสถียรภาพและความยืดหยุ่นของระบบนิเวศ (Perez และคณะ, 2011)

ในปี ค.ศ. 2001 มีการใช้สารฆ่าวัชพืชกันอย่างแพร่หลายทั่วโลก โดยพบว่าทั้งโลกมีการใช้สารฆ่าวัชพืชถึง 1.14 พันล้านกิโลกรัม และในประเทศสหรัฐอเมริกาพบมากถึง 28 เปอร์เซ็นต์ ส่วนที่เหลือกระจายกันตามประเทศต่าง ๆ (U.S. EPA, 2004) ในประเทศไทยพบว่ามีการใช้สารฆ่าวัชพืชอย่างมากเช่นกัน โดยกระทรวงเกษตรและสหกรณ์รายงานไว้ในปี ค.ศ. 1992 ว่ามีการใช้สารฆ่าวัชพืช 33 เปอร์เซ็นต์ และเพิ่มสูงขึ้นเป็น 49 เปอร์เซ็นต์ในปี ค.ศ. 1998 โดยพบว่ามีการใช้สารฆ่าวัชพืชสามชนิดคือ อะทราซีน (atrazine) ไกลโฟเซต (glyphosate) และพาราควอท (paraquat) สารฆ่าวัชพืชสามชนิดนี้ถูกจัดอยู่ในอันดับต้น ๆ ของสารฆ่าวัชพืชที่พบมากในประเทศไทย โดยพบว่ามีการใช้มากกว่า 50 ล้านกิโลกรัมในปี ค.ศ. 1995 (Thailand National Statistical Office, 2002; Thapinta และ Hudak, 2000)

ในจังหวัดน่านพื้นที่เกษตรกรรมโดยทั่วไปใช้สำหรับการเพาะปลูกพืชเป็นส่วนใหญ่ โดยพืชที่นิยมเพาะปลูก ได้แก่ ข้าวโพด ข้าว ผลไม้ และพืชผักต่าง ๆ ซึ่งพืชพันธุ์เหล่านี้จะปลูกสลับสับเปลี่ยนหมุนเวียนกันไปตามฤดูกาล จากการสำรวจถึงลักษณะการปลูกพืชในแต่ละช่วงเดือนของจังหวัดน่าน ในช่วงปีที่สำรวจพบว่า มีการปลูกข้าวโพดเป็นจำนวนมากตลอดทั้งปี ส่วนในเดือนมกราคมพบว่ามีการปลูกพืชผักสวนครัวร่วมด้วย อาทิเช่น แตงกวา ถั่วลิสง และพริก เป็นจำนวนมาก ส่วนข้าวจะปลูกปีละหนึ่งถึงสองครั้ง ดังนั้นการดูแลพืชผลทางเศรษฐกิจเพื่อให้ได้ผลดีปลอดภัยจากศัตรูพืชต่าง ๆ และเพื่อให้ได้ผลผลิตสูงสุด จึงนิยมหันมาใช้สารฆ่าวัชพืช การควบคุมวัชพืชในพื้นที่เกษตรกรรมจึงเป็นสิ่งจำเป็น เกษตรกรในจังหวัดน่านจึงนิยมใช้สารเคมีทางการเกษตรมากขึ้น โดยมีการใช้กันตลอดทั้งปี โดยสารเคมีทางการเกษตรที่ใช้กันอย่างแพร่หลาย

ได้แก่ สารฆ่าวัชพืช เนื่องจากเกษตรกรนิยมใช้ฆ่าวัชพืชในการปลูกพืชไร่ (Wongwichit และคณะ, 2010) จากรายงานในปี ค.ศ. 2008 พบว่ามีการใช้สารฆ่าวัชพืชถึง 1274.1 ตัน หรือประมาณ 232.1 ล้านกิโลกรัม โดย 1,172.7 ตัน หรือประมาณ 94.04% เป็นสารฆ่าวัชพืชนำเข้า (Office of Agriculture Nan Province, 2011) นอกจากนี้ยังมีรายงานว่าจังหวัดน่านมีการใช้สารฆ่าวัชพืชชนิดอะทราซีน ไกลโฟเซต และพาราควอท กันในปริมาณมากอีกด้วย (Wongwichit และคณะ, 2010)

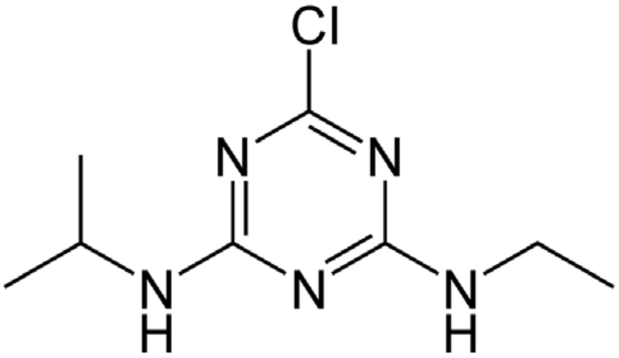
2.3.1 **อะทราซีน** (atrazine)

อะทราซีนเป็นสารฆ่าวัชพืชที่ใช้กันอย่างแพร่หลาย โดยมากมักใช้ในการควบคุมวัชพืชใบกว้าง โดยการเข้าไปขัดขวางกลไกการสังเคราะห์แสง สารชนิดนี้ใช้กันอย่างกว้างขวางในการเพาะปลูกพืช เช่น ข้าวโพด ถั่วเหลือง มันฝรั่ง ข้าวฟ่าง อ้อย สับปะรด เป็นต้น (Giddings และคณะ, 2005; Ribaudo และ Bouzaher, 1994; Solomon และคณะ, 1996) อะทราซีนที่มีจำหน่ายในท้องตลาดมีหลายสูตร เช่น แบบน้ำ แบบผง ทั้งยังสามารถใช้ก่อนหรือหลังการเพาะปลูกก็ได้ (Giddings และคณะ, 2005) อัตราส่วนของการใช้งานนั้นขึ้นอยู่กับสภาพอากาศและชนิดของดิน เช่น ควรจะใช้อะทราซีนจำนวนน้อยๆ เมื่อเป็นสภาพดินทราย (Ribaudo และ Bouzaher, 1994) แม้ว่าอะทราซีนจะสามารถใช้เดี่ยวได้ แต่ก็สามารถใช้ควบคู่กับสารฆ่าวัชพืชชนิดอื่น ๆ ได้ด้วยเหมือนกัน โดยใช้ที่อัตราส่วนมากกว่า 0.75 ปอนด์ต่อ 1 เอเคอร์ (Johnson และคณะ, 2004)

ในประเทศสหรัฐอเมริการะหว่างปี ค.ศ. 1998-2002 มีการใช้อะทราซีนถึง 35,286 เมตริกตัน (Giddings และคณะ, 2005) ส่วนในประเทศไทย มีการนำเข้าอะทราซีนปี ค.ศ.1994 โดยพบอะทราซีนเป็นจำนวนทั้งหมด 1,640 เมตริกตัน (Department of Agriculture, 1995)

2.3.1.1 **คุณสมบัติทางกายภาพและเคมี**

อะทราซีนเป็นสารฆ่าวัชพืชจำพวกไตรอะซีน (triazine) มีลักษณะเป็นผงแป้งที่ไม่มีสี หรือมีลักษณะเป็นผลึก นอกจากนี้อาจพบเป็นของเหลวที่ตกผลึกที่อุณหภูมิห้องที่น้ำหนักโมเลกุล 215.69 อะทราซีนสามารถละลายน้ำได้ดีที่ 34.7 มิลลิกรัม/ลิตร ที่อุณหภูมิ 22 องศาเซลเซียส และละลายได้ดียิ่งขึ้นด้วยตัวทำละลายอินทรีย์ เช่น อะซิโตน, คลอโรฟอร์ม, ไดเอทิลอีเทอร์ และไดเมทิลซัลฟอกไซด์ สูตรโมเลกุลของอะทราซีน คือ $C_8H_{14}C_1N_5$ (ภาพที่ 2.3)



ภาพที่ 2.3 โครงสร้างของอะทราซีน (U.S. HHS, 2003)

2.3.1.2 การย่อยสลายในสิ่งแวดล้อม

การย่อยสลายของอะทราซีนในดิน โดยทั่วไปการย่อยสลายจะเกิดจากจุลินทรีย์พวกแบคทีเรียและเชื้อรา ซึ่งช่วยให้เกิดการย่อยสลายทางชีวภาพ (biodegradation) ในขณะที่กระบวนการยอยสลายแบบอะไบโอติก (abiotic degradation) เช่น ไฮโดรไลซิส (hydrolysis) และโฟโตไลซิส (photolysis) จะมีความสำคัญน้อยกว่า (Giddings และคณะ, 2005; Solomon และคณะ, 2008; Sene และคณะ, 2010; Wackett, 2002) อย่างไรก็ตามกระบวนการ hydrolysis จะเกิดขึ้นได้อย่างรวดเร็วในสภาวะที่เป็นกรด แต่จะช้าลงเมื่อสิ่งแวดล้อมมีสภาวะเป็นกลาง การย่อยสลายทางชีวภาพของอะทราซีนใต้ผิวดินจะช้ากว่าบริเวณหน้าดิน เนื่องจากมีอุณหภูมิต่ำกว่าและมีสิ่งมีชีวิตที่ช่วยในการย่อยสลายน้อยกว่า (Radosevich และคณะ, 1996) มีงานวิจัยจำนวนมากรายงานถึงค่าครึ่งชีวิตของอะทราซีนในดินว่ามีอายุระหว่าง 20-146 วัน โดยมีค่าเฉลี่ยอยู่ที่ 44 วัน (Giddings และคณะ, 2005) ในดินพบสารหลัก ๆ ไม่กี่ชนิด ได้แก่ 2-hydroxyatrazine, 2-hydroxyterbutylazine, desethylhydroxyatrazine, และ desisopropylhydroxyatrazine นอกจากนี้ยังพบว่า ผลผลิตการย่อยสลายตระกูล hydroxyl จะอยู่คงทนกว่า desethylatrazine เพราะว่าถูกย่อยสลายจากสิ่งมีชีวิตในดิน

วงแหวนไตรอะซีน จะทำให้โมเลกุลของอะทราซีนทนทานต่อการย่อยสลายโดยจุลินทรีย์ใต้น้ำ ในกรณีนี้การย่อยสลายทางชีวภาพอาจจะมีความสำคัญน้อยกว่าการย่อยสลายทางเคมี (Solomon และคณะ, 1996) การย่อยสลายทางเคมีนั้นจะรวมถึง hydrolysis, N-dealkylation และการแตกของวงแหวนไตรอะซีน รวมถึง photolysis (Chan และคณะ, 1992; Giddings และคณะ, 2005; Gressel และคณะ, 1983; Solomon และคณะ, 1996; Prosen และ

Zupancic-Kralj, 2005) แม้ว่า photolysis ของอะทราซีน ไม่พบในน้ำที่มีความยาวของคลื่นมากกว่า 300 nm ก็ตาม (Pape และ Zabik, 1970) จากการศึกษางานวิจัยพบว่า ค่าครึ่งชีวิตของอะทราซีนเมื่ออยู่ใต้น้ำอยู่ระหว่าง 41-237 วัน และมีค่าเฉลี่ย 159 วัน (Giddings และคณะ, 2005) กระบวนการย่อยสลายหลักในน้ำจะทำให้เกิดเป็นสารพวก dealkylated chlorometabolite, desetlydesisopropylatrazine และ desethylatrazine (Thurman และคณะ, 1994) นอกจากนี้ยังพบว่า deisopropylatrazine และ deethylatrazine ซึ่งได้มาจากการก่อรูปของจุลินทรีย์ และสารทั้งสองชนิดนี้พบได้บริเวณผิวน้ำและใต้น้ำ (Thurman และคณะ, 1994)

2.3.1.3 **การปนเปื้อนในสิ่งแวดล้อม**

อะทราซีนในสิ่งแวดล้อม ส่วนมากมักจะเคลื่อนตัวออกไปมากกว่าที่จะเกาะอยู่กับอนุภาคของดิน เนื่องจากคุณสมบัติทางเคมีของอะทราซีน ทำให้อะทราซีนค่อนข้างไวต่อการชะล้างและการไหล โดยเฉพาะอย่างยิ่งเวลาที่ฝนตกหนัก (Johnson และคณะ, 2004; Ribaudo และ Bouzaher, 1994) ดังนั้นจะพบอะทราซีนมากบริเวณผิวน้ำและใต้น้ำที่ความเข้มข้นสูงสุดที่ 3 µg/L (U.S. EPA, 2012; Solomon และคณะ, 2008) เช่น พบอะทราซีนในน้ำบริเวณ Mid-western state ประเทศสหรัฐอเมริกาที่ความเข้มข้น 1-25 µg/L (Gilliom และคณะ, 2006) และจากการสำรวจน้ำดื่มเป็นระยะเวลา 5 ปี พบอะทราซีนประมาณ 1.7% ของระบบน้ำดื่มชุมชน และ 0.7% บริเวณชนบท (U.S. EPA, 1990) ประเทศไทยพบอะทราซีนในแม่น้ำเจ้าพระยาที่ความเข้มข้น 58-86 ng/L (Kruawal และคณะ, 2005) และจากแม่น้ำป่าสักที่ความเข้มข้น 1.83 µg/L (Chanchek, 2007) และพบอะทราซีนจากกลุ่มตัวอย่างน้ำที่เก็บมาจากภาคกลางและภาคตะวันออกเฉียงเหนือที่ความเข้มข้น 0.5-4 µg/L (Sakunthengtong และคณะ, 2001)

2.3.1.4 **ความเป็นพิษของอะทราซีน**

อะทราซีนเป็นสารฆ่าวัชพืชชนิดหนึ่ง ซึ่งเป็นสารกลุ่ม triazine สามารถส่งผลเสียต่อระบบทางเดินหายใจ มีความเป็นพิษต่ออวัยวะต่าง ๆ ในร่างกายรวมถึงส่งผลเสียต่อเซลล์ตับและไต (Ecobichon, 2001) โดยมีการรายงานการสะสมของอะทราซีนในตัวปลาและความเป็นพิษต่อปลาไว้มากมาย มีการศึกษาการสะสมของอะทราซีนในปลาหมอสี *Tilapia sparrmanii* โดยปลาได้รับอะทราซีนในระดับความเข้มข้นที่ต่ำกว่าระดับที่ทำให้ปลาถึงตาย ผลที่ได้นั้นพบว่าอะทราซีนสามารถสะสมในอยู่ในเนื้อเยื่อตับได้ (Du Preez และคณะ, 1992) จากรายงานผล

ของอะทราซีนต่อเนื้อเยื่อตับของปลา *Hoplias malabaricus* (Miranda และคณะ, 2008) พบว่าสารนี้ทำให้เซลล์ตับได้รับความเสียหาย มีการตายของเซลล์เป็นบริเวณกว้าง เกิด fibrosis และมีการเข้ามาของเซลล์เม็ดเลือดขาว นอกจากนี้ยังมีรายงานของ Segnini de Bravo และคณะ ในปี ค.ศ. 2005 เกี่ยวกับผลของอะทราซีนในปลา *Caquetaia kraussii* และ *Colossoma macropomum* ระยะก่อนตัวเต็มวัย พบว่าปลาที่ได้รับสารนี้มีเนื้อเยื่อไตที่ได้รับความเสียหาย โดยท่อไตสูญเสียรูปร่าง

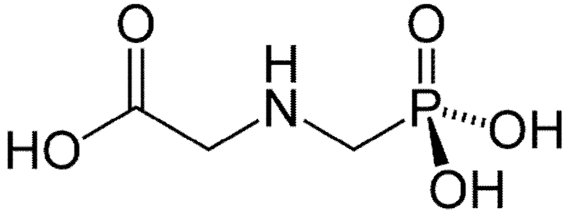
2.3.2 ไกลโฟเซต

ไกลโฟเซตเป็นสารฆ่าวัชพืชที่ถูกจัดให้อยู่ในอันดับต้นๆ ที่มีการใช้ในประเทศสหรัฐอเมริกา (U.S. EPA, 1999) และพบว่ามีการใช้มากในประเทศไทยด้วยเช่นกัน (Thailand National Statistical Office, 2001) ในปัจจุบันไกลโฟเซตมีขายอยู่ในท้องตลาดแล้วถึง 130 ประเทศ ในปี ค.ศ. 1995 มีการนำเข้าไกลโฟเซตเข้ามาในประเทศไทยประมาณ 6,187 เมตริกตัน (Thapinta และ Hudak, 2000) ไกลโฟเซตใช้สำหรับกำจัดวัชพืชจำพวกพืชยืนต้นรากลึก พืชล้มลุก พืชที่มีใบกว้าง หญ้า และกก สามารถนำมาใช้ได้ทั้งในพื้นที่เกษตรกรรม บริเวณป่า และบริเวณที่ไม่ใช่พื้นที่เกษตรกรรม เช่น บริเวณที่มีการชะล้างและการระบายน้ำ บริเวณสวนสาธารณะ ถนน หรือแม้แต่สวนในบ้าน (Grossbard และ Atkinson, 1985) อัตราการใช้ไกลโฟเซตขึ้นอยู่กับสูตรของไกลโฟเซต ฤดูกาลที่จะนำไปใช้ และสิ่งแวดล้อมบริเวณที่จะใช้สารฆ่าวัชพืชชนิดนี้ โดยทั่วไปใช้ไกลโฟเซต 5 เปอร์เซ็นต์ผสมกับน้ำเพื่อใช้ในการฉีดพ่น และใช้ไกลโฟเซต 10-15 เปอร์เซ็นต์ผสมกับน้ำเพื่อใช้ในการเช็ดล้าง สารฆ่าวัชพืชชนิดนี้สามารถใช้ก่อนหรือหลังการเก็บเกี่ยวก็ได้ เช่น ไกลโฟเซตสามารถใช้กับมันฝรั่ง และหน่อไม้ฝรั่ง ก่อนการเก็บเกี่ยวได้ (U.S. EPA, 1993)

2.3.2.1 คุณสมบัติทางกายภาพและเคมี

ไกลโฟเซต เป็นกรดอินทรีย์แบบอ่อน ประกอบไปด้วยไกลซีน (glycine) และ phosphonomethyl moieties (Knuuttila และ Knuuttila, 1979) สูตรโมเลกุลของไกลโฟเซต คือ $C_3H_8NO_5P$ (ภาพที่ 2.4) มีมวลโมเลกุลเท่ากับ 169.07 ส่วนความบริสุทธิ์ทางเทคนิคนั้นมากกว่า 90 เปอร์เซ็นต์ ไกลโฟเซตมักจะอยู่ในรูปเกลือของกรดดีโพโตเนท (deprotonated) ของไกลโฟเซตและไอโซโพรพิวเอมีน (Isopropylamine) (Roundup®, CAS registry number 38641-94-0) การ

ลดแรงตึงผิวสามารถเพิ่มเข้าไปในสูตรไกลโฟเซตได้ เช่น โพลีไซเอททีลีนเอมีน (polyxyethylene amine) สำหรับ Roundup® (WHO, 1994)



ภาพที่ 2.4 โครงสร้างของไกลโฟเซต (WHO, 1994)

2.3.2.2 **การย่อยสลายในสิ่งแวดล้อม**

ไกลโฟเซตมีอัตราส่วนการสลายตัว โดยขึ้นอยู่กับชนิดของจุลินทรีย์ในสิ่งแวดล้อม และความสามารถในการเกาะติดกับอนุภาคของดิน (Borggaard และ Gimsing, 2008; Thailand National Statistical Office, 2001) จุลินทรีย์ในดินที่สามารถย่อยสลายไกลโฟเซตได้ เช่น แบคทีเรียกลุ่ม *Pseudomonas* และรากลุ่ม filamentous fungi (Castro, 2007; Jacob และคณะ, 1988; Kishore และ Jocob, 1987)

ได้มีการทำการทดลองการย่อยสลายไกลโฟเซตโดยจุลินทรีย์ในดินมี 2 วิธี วิธีแรก คือ การก่อรูปของกรดอะมิโนเมทธิล ฟอสโฟนิค (aminomethyl phosphonic acid; AMPA) และส่วนของคาร์บอนตำแหน่งที่ 2 ที่อาจจะเข้าสู่วัฏจักรไกลออกซีเลต (glyoxylate) วิธีนี้ขั้นแรกจะเป็นการแยกพันธะ C-N ส่วนวิธีที่สองคือ การย่อยสลายผ่าน sarcosine และ orthophosphate sarcrosine จะถูกย่อยสลายเป็นไกลซีน และคาร์บอนหนึ่งตัวจะก่อรูปเป็นคาร์บอนไดออกไซด์ (CO_2) โดยฟอร์มัลดีไฮด์ (formaldehyde) (Jacob, 1988; Kishore และ Jacob, 1987)

ในสิ่งแวดล้อมของแหล่งน้ำ ไกลโฟเซตจะถูกย่อยสลายโดยถูกดูดซับไว้ในดินตะกอนของแหล่งน้ำ แล้วถูกย่อยสลายโดยการทำงานของเอนไซม์ของจุลินทรีย์ในดิน (Zaranyka และ Nyandoro, 1993) หรืออาจถูกย่อยสลายโดยกระบวนการ abiotic degradation โดยไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์และรังสียูวี (Manassero และคณะ, 2010) อัตราการย่อยสลายในน้ำนั้นจะต่ำกว่าในดินเนื่องจากในน้ำมีจุลินทรีย์น้อยกว่าในดิน (Ghassemi, 1981) ไกลโฟเซตมีครึ่งชีวิต

ที่ค่อนข้างยาวถึง 47 วันในดิน และ 49-70 วันในน้ำ ซึ่งทำให้มีผลค่อนข้างคงทนถาวรในสภาพแวดล้อม (Borggaard และ Gimsing, 2008) ตัวอย่างเช่น มีรายงานการพบไกลโฟเซตในดินบริเวณพื้นที่เกษตรกรรม ในประเทศฟินแลนด์ถึง 249 วัน ส่วนในพื้นที่ป่าไม้ประเทศบริติชโคลัมเบียพบถึง 360 วัน และในพื้นที่ป่าไม้ประเทศสวีเดนพบมากกว่า 1 ปี (Cox, 1995)

2.3.2.3 **การปนเปื้อนของไกลโฟเซตในสภาพแวดล้อม**

อนุภาคดินจะดูดซับไกลโฟเซตไว้ได้ดี แต่น้ำอาจจะชะไกลโฟเซตลงปนเปื้อนในแหล่งน้ำได้ นอกจากนี้ไกลโฟเซตมีคุณสมบัติกำจัดวัชพืชใต้น้ำได้จึงสามารถนำมาใช้กับแหล่งน้ำได้ (Borggaard และ Gimsing, 2008; Solomon และคณะ, 2007; WHO, 1994) การตรวจสอบปริมาณไกลโฟเซตในสิ่งแวดล้อมนั้นเป็นไปได้ยาก เนื่องจากคุณสมบัติของไกลโฟเซตที่มีน้ำหนักโมเลกุลต่ำ มีขั้วสูง ทำให้มีความสามารถในการละลายน้ำสูง มีความสามารถในการละลายสารอินทรีย์ต่ำ (amphoteric behavior) และเกิดปฏิกิริยากับโลหะหนักได้ง่าย (Sanchis และคณะ, 2012) จากรายงานพบการปนเปื้อนของไกลโฟเซตได้ในหลาย ๆ ประเทศ (Solomon และคณะ, 2007) เช่น ประเทศทางตะวันออกกลาง สหรัฐอเมริกาพบไกลโฟเซตถึง 55 จุดของน้ำตัวอย่างที่เก็บมาจากลำธาร 51 แหล่ง (Scribner และคณะ, 2003) และสังเกตได้ว่า ไกลโฟเซตมีแนวโน้มที่จะอยู่คงอยู่ได้ดีในบริเวณลำธารตลอดฤดูกาลเพาะปลูก (Coupe และคณะ, 2011) นอกจากนี้ยังพบไกลโฟเซตในแหล่งน้ำใต้ดินมากบริเวณรางรถไฟใต้ดิน เช่นในประเทศสวีเดน พบไกลโฟเซตที่มีความเข้มข้นมากกว่าค่ามาตรฐานที่ยุโรปได้ที่ 0.1 μg/L (Torstensson และคณะ, 2005) กลุ่มตัวอย่างน้ำใต้ดินที่เก็บมาจากรัฐแคลิฟอเนียและประเทศสเปน ก็พบการปนเปื้อนซึ่งมีค่าความเข้มข้นมากถึง 2.5 μg/L และมีค่าความเข้มข้นเฉลี่ยที่ 200 ng/L (Sanchis และคณะ, 2012)

2.3.2.4 **ความเป็นพิษของไกลโฟเซต**

ไกลโฟเซท เป็นสารฆ่าวัชพืชกลุ่ม phosphonomethyl amino acid ที่สามารถส่งผลเสียต่อระบบทางเดินอาหาร ทำให้ระบบหายใจล้มเหลว ส่งผลเสียต่อตับและไต จนอาจทำให้ไตวาย ถ้าได้รับในปริมาณมาก (Ecobichon, 2001) มีการรายงานถึงการตกค้างของไกลโฟเซตในเนื้อเยื่อของปลา โดยทำการวิเคราะห์สารไกลโฟเซตที่ตกค้างในเนื้อเยื่อปลาคาร์ฟ *Cyprinus carpio* และปลานิล *Oreochromis mossambicus* โดยให้สารที่ระดับความเข้มข้นที่ 0.05 และ

0.005 mg/L เป็นเวลา 14 วัน พบว่าไกลโฟเซตสามารถเข้าสะสมในตัวปลาได้ แต่สะสมในปริมาณน้อย โดยปริมาณของไกลโฟเซตที่เข้าไปสะสมที่ระดับความเข้มข้นที่ 0.05 และ 0.005 mg/L ไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (Wang และคณะ, 1993) มีการรายงานผลของไกลโฟเซตต่อเนื้อเยื่อของปลาหลายชนิดได้แก่ ปลา *Claris gariepinus* (Ayoola และคณะ, 2008A) และปลา *Oreochromis niloticus* (Ayoola และคณะ, 2008B) พบความผิดปกติที่เนื้อเยื่อตับโดยพบแวคคิวโอลในเซลล์ตับและเกิดการตายของเซลล์ตับ ส่วนท่อไตก็ได้รับความเสียหายด้วยเช่นกัน

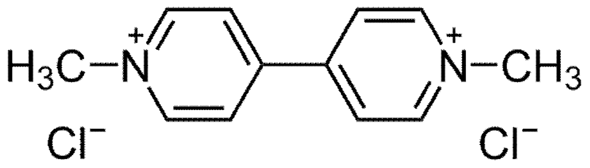
2.3.3 พาราควอท

พาราควอทเป็นสารฆ่าวัชพืชอีกชนิดหนึ่งที่นิยมใช้กันอย่างแพร่หลาย พบว่ามีการใช้พาราควอทถึง 130 ประเทศทั่วโลก (Eisler, 1990) โดยในปี ค.ศ. 1995 พบว่ามีการนำเข้าพาราควอทมาในประเทศไทยมากกว่า 21 ล้านกิโลกรัม และยังคงนำเข้าเรื่อยมาจนปัจจุบัน (Thailand National Statistical Office, 2000)

พาราควอทมีคุณสมบัติสามารถใช้งานได้กับวัชพืชหลายชนิด แต่ที่สามารถใช้และได้ผลดีที่สุดคือ หญ้า พาราควอทสามารถใช้ได้ทั้งการฉีดเพื่อการกำจัดวัชพืชและเพื่อป้องกันการเกิดวัชพืชในการปลูกข้าวฟ่างหรือข้าวโพด พาราควอทยังสามารถใช้ได้ก่อนการเก็บเกี่ยวพืชจำพวกฝ้าย มันฝรั่ง และ ถั่วลันเตา (Kiingman และคณะ, 1975) อีกด้วย พาราควอทสามารถนำมาฉีดพ่นเพื่อควบคุมวัชพืช หรือจะใช้กำจัดวัชพืชใต้น้ำโดยตรงก็ได้ นอกจากนี้พาราควอทยังสามารถใช้ร่วมกับสารฆ่าวัชพืชชนิดอื่น ๆ ได้อีกด้วย (Fletcher, 1974)

2.3.3.1 คุณสมบัติทางกายภาพและเคมี

พาราควอทเป็นสารประกอบไอออนิก โดยสูตรโมเลกุลของพาราควอทคือ $C_{12}H_{14}C_{12}N_2$ (ภาพที่ 2.5) (Calderbank, 1975) พาราควอทพบได้หลายรูปแบบ เกลือพาราควอทที่พบบ่อยจะแตกตัวเป็นไอออนประจุลบและไม่ส่งผลกระทบต่อความเป็นพิษของพาราควอท (Fletcher, 1974)



ภาพที่ 2.5 โครงสร้างของพาราควอท (Fletcher, 1974)

2.3.3.2 การย่อยสลายในสิ่งแวดล้อม

การสลายตัวของพาราควอท ต้องอาศัยกระบวนการ Photolysis เป็นสำคัญ (Smith และ Mayfild, 1978) โดยหลักของการย่อยสลายพาราควอทในดินนั้น ในส่วนบริเวณหน้าดิน พาราควอทจะย่อยสลายโดย Photolysis ได้ประมาณ 20 เปอร์เซ็นต์ และเพิ่มเป็น 50 เปอร์เซ็นต์ภายในสามสัปดาห์ (Watt, 2011) จากการทดลองในห้องปฏิบัติการ พาราควอทในดินสามารถย่อยสลายไปได้โดยรังสียูวี (Kearney และคณะ, 1985) มีงานวิจัยมากมายได้กล่าวว่าจุลินทรีย์ในดินสามารถย่อยสลายพาราควอทได้ (Roberts และคณะ, 2002) การย่อยสลายทางชีวภาพมีความสำคัญอย่างยิ่งต่อการเผาผลาญพลังงานไนโตรเจนของจุลินทรีย์ และอัตราการย่อยสลายภายใต้สภาวะที่มีออกซิเจนจะมากกว่าสภาวะที่ไร้ออกซิเจน (Lee และคณะ, 1995) สำหรับการย่อยสลายในน้ำ มีงานวิจัยกล่าวว่าเมื่อนำพาราควอทใส่ลงไปในน้ำจะสลายตัวได้อย่างรวดเร็ว โดยใช้เวลาเพียง 8-27 วัน สาเหตุเนื่องมาจากการดูดซับของตะกอนและการดูดซึมของพืช โดยพาราควอทที่มีความเข้มข้นเท่ากับ 0.5 mg/L หากไม่มีตะกอนหรือพืชคอยช่วยดูดซึมจะใช้เวลาย่อยสลายประมาณ 35 สัปดาห์ แต่ถ้ามีตะกอนเข้ามาช่วยดูดซึมจะใช้เวลาประมาณ 6-8 สัปดาห์ และหากมีตะกอนและพืชเข้ามาช่วยดูดซึมจะใช้เวลาเพียง 3-4 สัปดาห์ (Eisler และคณะ, 1990)

2.3.3.3 การปนเปื้อนของพาราควอทในสภาพแวดล้อม

พาราควอทสามารถพบว่ามีการปนเปื้อนได้ในน้ำผิวดิน โดยอาจเกิดจากการพังทลายหรือการชะล้างจากดิน พบได้ในน้ำดื่ม และน้ำบาดาล (Watt, 2011) แม้ว่าพาราควอทจะไม่ได้มีการใช้มาเป็นระยะเวลานานหรือไม่ได้ถูกชะล้างลงสู่น้ำบาดาล แต่ความสามารถในการยึดเกาะกับอนุภาคของดินก็ยังคงอยู่เป็นระยะเวลานาน (Smith และ Mayfield, 1978; U.S. EPA,

2009) ในประเทศสเปนพบพาราควอทถึง 6.6 เปอร์เซ็นต์ของน้ำตัวอย่างที่เก็บมาจากทะเลสาบ โดยพบมีความเข้มข้น 3.95 μg/L ส่วนตัวอย่างที่เก็บจากบึงน้ำ 9.35 เปอร์เซ็นต์ของกลุ่มตัวอย่างพบมีความเข้มข้น 1.45 μg/L (Fernandez และคณะ, 1998) และยังพบว่าน้ำดื่มที่มาจากก๊อกน้ำจากแม่น้ำและเขื่อนบนเกาะคาริบเบียนมีการปนเปื้อนของพาราควอทที่ความเข้มข้นเท่ากับ 1 μg/L (Boodram, 2002) ทั้งนี้ยังพบพาราควอทจากตัวอย่างน้ำบาดาลทั้งหมด 399 ตัวอย่าง โดยเก็บได้จากรัฐแคลลิฟอร์เนียมีระดับความเข้มข้นที่ 0.24 μg/L (U.S. EPA, 2009) มีการรายงานถึงการปนเปื้อนของพาราควอทในน้ำและดินตามแม่น้ำและคลองสายหลักในหลาย ๆ บริเวณเกษตรกรรมของประเทศไทยอยู่ที่ระดับ 0.01-1.37 μg/L และ 0.045-8.41 mg/L ตามลำดับ แหล่งน้ำจากอำเภอฝางและชัยปราการ จังหวัดเชียงใหม่พบการปนเปื้อนของพาราควอทที่ระดับ 0.027-0.128 mg/L (DOA, 204) และยังพบในน้ำบาดาลที่ระดับ 18.9 μg/L ด้วย (Amondham และคณะ, 2006)

2.3.2.4 ความเป็นพิษของพาราควอท

พาราควอทซึ่งเป็นสารฆ่าวัชพืชกลุ่ม bipyridyl derivatives สามารถส่งผลเสียต่อระบบทางเดินหายใจอย่างรุนแรง เป็นพิษต่ออวัยวะต่าง ๆ ในร่างกาย รวมทั้งทำให้เกิดการตายของเซลล์ตับและไต (Ecobichon, 2001) มีการศึกษาก่อนหน้านี้ศึกษาถึงการสะสมของพาราควอทในปลาเทร้าท์ *Salmo gairdneri* ในน้ำที่มีความเข้มข้นของพาราควอท 1 mg/L เป็นเวลา 1 สัปดาห์ ผลที่ได้คือ พบปริมาณความเข้มข้นในตัวปลา 0.5-0.6 mg/L (Calderbank, 1972 อ้างถึงใน ปภาศิริ กาญจโนภาศ, 2527) รายงานถึงการปนเปื้อนพาราควอทในเนื้อเยื่อของปลาน้ำจืดซึ่งปลานั้นได้รับพาราควอทที่มีเข้มข้นข้นเท่ากับ 1.14 mg/L เป็นเวลานาน 48 ชั่วโมง ผลที่ได้คือพบปริมาณของพาราควอทตกค้างอยู่ในเนื้อเยื่อมีค่าเท่ากับ 0.58-1.06 mg/L (Earnest, 1971) และยังมีรายงานผลของพาราควอทต่อเนื้อเยื่อตับและไตของปลา *Claris gariepinus* (Omitoyin และคณะ, 2006) พบว่าทำให้เกิดความผิดปกติที่เซลล์ตับและไต

2.4 การใช้สัตว์เฝ้าระวัง (sentinel species)

การศึกษาทางด้านชีววิทยาในปัจจุบันมีการนำสัตว์เฝ้าระวัง หรือเรียกอีกอย่างหนึ่งว่า sentinel species มาใช้ โดยการใช้สัตว์เฝ้าระวังนี้ นิยมกันอย่างแพร่หลายในการประเมินสุขภาพสิ่งแวดล้อม (NRC, 1991) Stahl ได้เคยพูดถึงแนวคิดของการนำสัตว์เฝ้าระวังมาใช้ในการประเมินสุขภาพแวดล้อมว่า “สิ่งมีชีวิตที่ไม่ใช้มนุษย์นั้นตอบสนองต่อการปนเปื้อนในสิ่งแวดล้อม ก่อนที่จะส่งผลถึงมนุษย์เสียอีก” เนื่องจากสามารถให้ข้อมูลที่เกี่ยวข้องเชื่อมโยงกับการปนเปื้อนในสิ่งแวดล้อม แนวคิดนี้ยังช่วยทำให้มนุษย์เข้าใจและรู้จักวิธีปฏิบัติต่อสิ่งแวดล้อมได้เป็นอย่างดี นอกจากนี้การใช้สัตว์เฝ้าระวัง ยังเป็นสิ่งที่สามารถบ่งชี้ถึงอันตรายต่อมนุษย์และยังเป็นประโยชน์ต่อมนุษย์อีกหลายประการ เช่น สัตว์เฝ้าระวังจะสามารถเตือนล่วงหน้าถึงความเสี่ยงที่มนุษย์จะได้รับจากโรคร้ายสายพันธุ์ใหม่ เป็นต้น อย่างไรก็ตาม สารพิษบางชนิดอาจจะมีผลทั้งต่อมนุษย์และสัตว์เฝ้าระวัง เช่นกัน (Van der Schalie และคณะ, 1999)

สิ่งมีชีวิตที่เหมาะสมในการใช้เป็นสัตว์เฝ้าระวังมีมากมาย ซึ่งหลักการเลือกสิ่งมีชีวตมาใช้นั้นขึ้นอยู่กับผลกระทบจากมลพิษและสารพิษ (xenobiotic) โดย Beeby (2001), Frame และ Dickerson (2006) รวมถึง NRC (1991) ได้กำหนดลักษณะที่เหมาะสมให้กับชนิดที่จะนำมาเป็นสัตว์เฝ้าระวังดังนี้

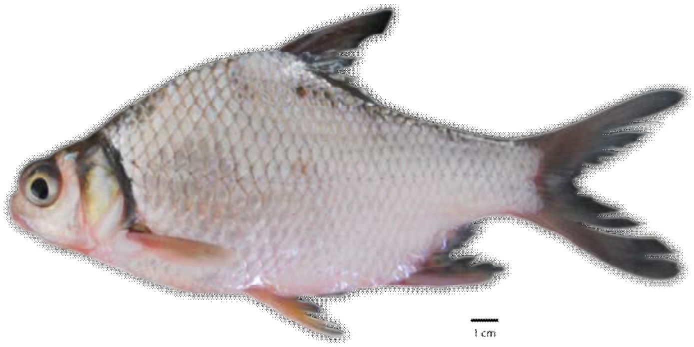
1. ต้องมีการตอบสนองต่อสารที่ปนเปื้อน
2. ต้องมีการกระจายอย่างกว้างขวางในทางภูมิศาสตร์
3. ต้องมีขอบเขตที่อยู่อาศัยที่ทับซ้อนกับพื้นที่ที่ต้องการตรวจสอบ
4. ต้องง่ายต่อการจับ
5. ต้องมีช่วงอายุชีวิตที่เหมาะสมต่อระยะเวลาในการศึกษา แต่สายพันธุ์ที่มีอายุไม่ยืนยาวก็สามารถนำมาใช้ได้หากใช้เพื่อการประเมินความรุนแรงที่เกิดขึ้น ในขณะที่สายพันธุ์อายุยืนยาวกว่าก็สามารถใช้ในการศึกษาผลกระทบจากการปนเปื้อนเรื้อรัง

ในการศึกษาการปนเปื้อนของสารพิษในน้ำ สัตว์เฝ้าระวังที่มีความสำคัญมาก ได้แก่ ปลา เนื่องจากปลามีลักษณะที่ง่ายต่อการบ่งชี้ถึงระบบนิเวศวิทยา และสรีรวิทยาซึ่งเป็นที่รู้จักเป็นอย่างดี นอกจากนี้ ปลายังเป็นห่วงโซ่อาหารที่สำคัญอีกด้วย (Mason, 1981) ชนิดที่นิยมนำมาใช้ในการศึกษาทดสอบความเป็นพิษในน้ำ ได้แก่ ปลาเทร้าท์, คาร์ฟ, ปลาเทศบาล, ปลาซิว, ปลาตาเดียว และปลาม้าลาย (Adams, 1995; Frame และ Dickerson, 2006)

2.5 ปลากะมัง *Puntioplites proctozysron*

2.5.1 อนุกรมวิธานของปลากะมัง

ปลากะมังเป็นปลากระดูกแข็งมีเกล็ดอยู่ในอันดับ Cyprinifromes วงศ์ Cyprinidae สกุล *Puntioplite* เช่นเดียวกับปลาตะเพียนขาว มีชื่อวิทยาศาสตร์ว่า *Puntioplites proctozysron* ชื่อสามัญคือ Smith' barb ชื่อท้องถิ่นคือ ปลากะมัง (ภาพที่ 2.6)



ภาพที่ 2.6 ปลากะมัง *Puntioplites proctozysron*

2.5.2 ลักษณะสัณฐาน

ลักษณะทั่วไปของปลากะมังคือ มีลำตัวแบนราบ รูปร่างค่อนข้างเหลี่ยมมากกว่าปลาตะเพียนขาว จะเห็นเป็นเหลี่ยมอย่างชัดเจนบริเวณหน้าครีบหลังและครีบก้น ตรงรอยต่อระหว่างกะโหลกกับส่วนหลังจะหักเว้าเล็กน้อยก่อนเฉียงขึ้นไปยังโคนครีบหลัง จงอยปากทู่ ไม่มีฟันที่ริมฝีปากและเพดาน ไม่มีหนวด ซี่เหงือกยาวเรียวและบอบบางกว่าปลาตะเพียนขาว ลำตัวปกคลุมด้วยเกล็ดสีเงิน เกล็ดในแนวเส้นข้างตัวมีจำนวน 33-35 เกล็ด หน้าครีบหลัง 13-15 เกล็ด และรอบคอดหาง 16-18 เกล็ด ครีบหลังประกอบด้วยก้านครีบเดี่ยวจำนวน 3 อัน และก้านครีบแขนง 8 อัน ครีบก้นประกอบด้วยก้านครีบเดี่ยวจำนวน 3 อัน ซึ่งมีหนามแหลมสามารถพบได้ในปลาตะเพียน

เพียง 2-3 ชนิดเท่านั้น (Smith, 1945; Bleeker, 1865) และก้านครีบแขนง 5 อัน ลักษณะของปลากะมังดังแสดงในภาพที่ 2.6

ความแตกต่างระหว่างเพศของปลาแยกได้จาก 2 ลักษณะ คือ เพศภายใน (primary sexual characters) และลักษณะเพศภายนอก (secondary sexual characters) (Lagler และคณะ, 1962) โดยลักษณะภายนอกปลาเพศผู้และเพศเมียมีลักษณะคล้ายกันมาก (ภาพที่ 2.7) แต่สามารถสังเกตความแตกต่างได้คือ ลักษณะรูปร่าง ลำตัวของปลากะมังเพศผู้มีลำตัวเล็กว่าเพศเมีย มีลักษณะคล้ายสี่เหลี่ยมคางหมู มีลำตัวเรียวกว่าเพศเมีย ติ่งเพศ ช่องเพศ ความยาวครีบ และสี (สุพร วัชรวิภา, 2508) ซึ่งตัวเต็มวัยของปลากะมังจะมีความยาวตั้งแต่ 11 เซนติเมตรขึ้นไป

2.5.3 การสืบพันธุ์และวางไข่

ช่วงฤดูสืบพันธุ์ของปลากะมังอยู่ในช่วงฤดูฝนตั้งแต่เดือนมิถุนายนถึงเดือนกรกฎาคม และในช่วงสืบพันธุ์ปลาจะมีความยาวและลำตัวใหญ่ขึ้น ปลากะมังเพศเมียท้องจะนิ่มและอูมเปง จะขยายออกมาด้านข้าง และช่องเปิดของระบบสืบพันธุ์ (urogenital pore) กว้างกว่าปกติ ส่วนตัวผู้เมื่อเอามือรีดเบา ๆ จากท้องไปทางทวารจุมีน้ำเชื้อสีขาวขุ่นคล้ายน้ำนมไหลออกมาจากช่องเพศ ปลากะมังเพศผู้มีน้ำเชื้อพร้อมที่จะผสมพันธุ์ได้ตั้งแต่เดือนมีนาคมถึงกันยายน ส่วนเพศเมียเริ่มมีไข่แก่เต็มท้อง ตั้งแต่เดือนพฤษภาคมและเริ่มวางไข่ตั้งแต่เดือนมิถุนายน และพร้อมผสมพันธุ์วางไข่ได้มากที่สุดในเดือนกรกฎาคม ถึงกันยายน ปลาจะวางไข่หมดในเดือนตุลาคม หลังจากนี้จะไม่พบปลาที่มีไข่แก่เต็มท้องเลย ปลาจะปรับตัวเตรียมพร้อมเพื่อฤดูกาลใหม่ต่อไป (Banyen, 1988; Duangsawadi, 1988)

ปลากะมังจะวางไข่มากที่สุดบริเวณที่มีน้ำไหลแรง (ครรชิต วัฒนาดิลกกุล, 2528) แต่บางรายงานพบว่าปลากะมังชอบวางไข่ในที่มีโคลนหนาและมีน้ำไหล่ผ่าน ไข่มีลักษณะเป็นแบบครึ่งจมครึ่งลอย (semibouyant egg) โดยเริ่มแรกเมื่อปล่อยไข่ออกจากตัวแม่ปลา ไข่จะจมและดูดน้ำเข้าช่องว่างระหว่างไข่แดง (perivitelline space) ของไข่ จึงทำให้ไข่มีขนาดเพิ่มขึ้น และมีความถ่วงจำเพาะใกล้เคียงกับน้ำจึงลอยตามกระแสน้ำ แต่จะจมเมื่ออยู่ในน้ำนิ่ง ไข่ปลากะมังมีลักษณะโปร่งแสงสามารถเห็นไข่แดงเป็นจุดสีเหลืองสดชัดเจน (สุวีณา และคณะ, 2532)

ภาพที่ 2.7 แสดงลักษณะปลากะมังเพศผู้และเพศเมีย

2.5.4 แหล่งกำเนิดและการแพร่กระจาย

ปลากะมังเป็นปลาน้ำจืดในเขตร้อน มีถิ่นอาศัยและการกระจายตัวอย่างกว้างขวาง พบได้ลำคลอง แม่น้ำทั่วไปหรือกระทั่งแม่น้ำสายใหญ่ เช่น แม่น้ำปิง แม่น้ำโขง แม่น้ำมูล โดยปลากะมังจะพบมากในประเทศลาว กัมพูชา พม่า และตอนเหนือของประเทศไทย (Smith, 1945; สมศักดิ์ เจนศิริศักดิ์, 2515) ปลาชนิดนี้ชอบอาศัยอยู่บริเวณป่าพงและป่าอ้อ ที่ขึ้นอยู่ตามริมฝั่งคลองที่น้ำสามารถท่วมถึงที่มีระดับน้ำเฉลี่ย 80 – 100 เซนติเมตร (ยงยุทธ ทักษิณ, 2529)

2.5.5 นิสัยการกินอาหาร

ปลากะมังเป็นพวก cyprinid (Nikolsky, 1963) ปลากินอาหารได้ทั้งประเภทพืชและสัตว์ คือ สามารถกินพืชน้ำ แพลงตอน หรือเศษซากอินทรีย์ที่ย่อยสลายแล้ว และแมลงเป็นหลัก (สวัสดิ์ วงศ์ถิรวัฒน์, 2524) และสามารถออกหากินได้ตลอดทั้งวัน รวมทั้งหากินได้ดีในฤดูฝน (Banyen, 1988; ยงยุทธ ทักษิณ, 2529) โดยมีนิสัยการกินจะว่ายรวมกันเป็นฝูง ว่ายโฉบเฉี่ยวลัดเลาะกินอาหารตามพื้นท้องน้ำ โดยเฉพาะบริเวณพื้นที่เป็นกรวดเล็กๆ

2.6 ตับปลากระดูกแข็ง

2.6.1 ลักษณะทางกายวิภาค

ในกลุ่มปลากระดูกแข็ง ตับถือเป็นอวัยวะที่มีขนาดใหญ่ที่สุดเมื่อเทียบกับอวัยวะอื่น ตำแหน่งของตับอยู่ด้านหน้าสุดของช่องท้อง อาจอยู่ตามแนวยาวหรืออยู่แนบกับอวัยวะอื่นๆ ภายในช่องท้อง (Robert, 1978) ยึดติดกับเนื้อเยื่อกั้นช่องอกออกจากช่องท้อง ตับปลาจะมีเนื้อเยื่อเกี่ยวพันปกคลุมอยู่ ในปลากลุ่มพวกกินสัตว์ ตับจะมีสีออกน้ำตาลแดงหรือน้ำตาลสว่าง ส่วนในปลาที่กินพืชจะมีสีอ่อนกว่า เลือดที่มาหล่อเลี้ยงตับคือเลือดจากหลอดเลือดดำที่ทำหน้าที่รับเลือดมาจากอวัยวะต่าง ๆ ในระบบย่อยอาหาร ได้แก่ กระเพาะอาหาร ลำไส้ ตับอ่อน ม้าม ถุงน้ำดี และจากอวัยวะสืบพันธุ์ (วิมล เหมาะจันทร, 2528) เข้าสู่ตับผ่าน hepatic portal vein และระบบเส้นเลือดฝอยภายในตับหรือ sinusoid ต่อไป ดังนั้นสิ่งที่ถูกส่งมากับเลือดจะมีทั้งสารอาหารและสิ่งปนเปื้อนที่มาจากสิ่งแวดล้อมอาทิเช่น มากับดินตะกอนและน้ำ สิ่งที่ปนเปื้อนที่ปนเปื้อนมาอาจจะเป็นสารพิษต่าง ๆ เป็นต้น และสารเหล่านี้อาจแพร่ผ่านเยื่อหุ้มเซลล์ของผนังหลอดเลือด sinusoid เข้าสู่เซลล์ตับและเกิดการสะสมอยู่ภายในต่อไป

2.6.2 ลักษณะโครงสร้างของเนื้อเยื่อ

โครงสร้างของเนื้อเยื่อตับปลาจะมีลักษณะแตกต่างจากสัตว์เลี้ยงลูกด้วยน้ำนมทั่วไป โดยมีความแตกต่างทั้งในเรื่องแนวการเรียงตัว (hepatic plate) ของเซลล์ตับ และการแบ่งส่วนหรือพูตับ เนื้อเยื่อตับมีหน่วยทำงาน (function unit) เรียกว่า hepatic lobule ประกอบด้วย หลอดเลือดดำขนาดเล็กคือ central vein อยู่ตรงกลางและมีเซลล์ตับ (hepatocyte) มีรูปร่างลักษณะเป็นรูปร่างหลายเหลี่ยม พบนิวเคลียสลักษณะกลมอยู่บริเวณกลางเซลล์ ถ้าพบว่ามีไขมันสะสมอยู่ในเซลล์มาก นิวเคลียสอาจถูกเบียดไปอยู่บริเวณขอบเซลล์ โครงสร้างของเซลล์ตับประกอบด้วย hepatic plate ซึ่งลักษณะของ hepatic plate ของตับปลานั้นจะมีลักษณะของการเรียงตัวของเซลล์เป็นสองชั้น และมี bile duct cell แทรกตัวอยู่ระหว่างเซลล์ตับสองชั้นนี้ ส่วนผนังเซลล์ตับจะติดยู่กับผนังหลอดเลือด sinusoid ซึ่งประกอบด้วยเซลล์บุผิวหลอดเลือด (endothelial cell) ลักษณะแบนบาง พบนิวเคลียสนูนชัดเรียงตัวชั้นเดียว ส่วนบริเวณระหว่างเซลล์ตับกับ sinusoid จะมีช่องว่างที่เรียกว่า space of Disse (Nopanitaya, 1979) sinusoid ของตับแตกต่างจากหลอดเลือดฝอยทั่วไป คือ พบว่ามีขนาดใหญ่กว่าและอาจมีช่องที่ไม่เห็น basal laminar โดยเซลล์ที่บุ

ผนังมี 2 ชนิด ชนิดแรกเป็นเซลล์รูปร่างแบนขนาดเล็กเรียกว่า endothelial cell ส่วนชนิดที่สองคือ Kuffer cell เป็น macrophage ขนาดใหญ่ ที่ทำหน้าที่เก็บกินซากเซลล์ที่ตายแล้วหรือสิ่งแปลกปลอม เซลล์ตับทำหน้าที่ในการผลิตน้ำดีเพื่อส่งออกนอกเซลล์เข้าสู่ bile canaliculi และส่งต่อไปยัง bile duct ไปรวมตัวกันที่ hepatic duct เพื่อส่งออกนอกเซลล์ตับและไปเก็บรวมไว้ที่ถุงน้ำดี เซลล์ตับยังทำหน้าที่สำคัญในกระบวนการเมทาบอลิซึม โปรตีน คาร์โบไฮเดรต และไขมัน อีกทั้งยังกำจัดสารพิษ (detoxification) และเป็นแหล่งสะสม โปรตีน คาร์โบไฮเดรต วิตามินและไขมันบางชนิดอีกด้วย (สุปราณี และคณะ, 2536; Takashima และ Hibiya, 1995)

2.7 ไตปลากระดูกแข็ง

2.7.1 ลักษณะทางกายวิภาค

ไตของปลาอยู่ด้านล่างของกระดูกสันหลัง มีสีแดงเข้มหรือสีน้ำตาลแดง ไตของปลาแบ่งออกเป็น 2 ส่วน คือส่วนต้นและส่วนท้าย ไตส่วนต้น หรือ anterior kidney มีลักษณะแยกออกเป็นสองพูอยู่ด้านข้างซ้ายและขวาของกระดูกสันหลังบริเวณเหนือคอหอย แล้วทอดตัวยาวไปทางด้านท้ายของลำตัวจนถึงจุดที่ไตทั้งสองข้างมารวมกันใต้กระดูกสันหลังบริเวณกลางลำตัว และไตส่วนท้ายหรือ posterior kidney มีลักษณะเป็นแผ่นบาง ๆ มีรอยเว้าเป็นกระเปาะเล็ก ๆ ยื่นออกมา 2 ข้าง ทอดตัวไปทางด้านท้ายของลำตัว และสิ้นสุดที่บริเวณเลยด้านหลังของช่องเปิดทวารหนักเล็กน้อย ไตทำหน้าที่ในการกรองของเสียออกจากเลือด ควบคุมสมดุลของของเหลวและอิเล็กโทรไลท์ในร่างกาย (สุปราณี และคณะ, 2536; Jiraungkoorskul และคณะ, 2002)

2.7.2 ลักษณะโครงสร้างของเนื้อเยื่อ

ไตส่วนต้น โครงสร้างภายในเนื้อเยื่อประกอบด้วย hemopoietic tissue กระจายอยู่บริเวณไตส่วนต้นเป็นจำนวนมาก และยังพบ melanomacrophage center (เป็นกลุ่มเซลล์ติดสีน้ำตาลอ่อนเมื่อย้อมด้วยสี Hematoxylin and Eosin) กระจายอยู่ทั่วไป ไตส่วนท้ายโครงสร้างเนื้อเยื่อภายในประกอบด้วยหน่วยทำงานของไตที่เรียกว่า nephron โดย nephron จะประกอบด้วย renal corpuscle และ renal tubule และมีการแทรกของ hemopoietic tissue ระหว่างท่อไต ในปลาขนาดเล็กเซลล์จะมีรูปร่างหลายเหลี่ยม แต่เมื่อปลามีขนาดที่ใหญ่ขึ้นลักษณะของเซลล์มีลักษณะ

เป็นรูปสี่เหลี่ยมทรงสูงเรียงกันเป็นกลุ่ม (สุปราณี และคณะ, 2536; Jiraungkoorskul และคณะ, 2002)

renal corpuscle จะประกอบด้วย glomerulus ซึ่งเป็นกลุ่มหลอดเลือดฝอยขนาดเล็ก ประกอบด้วย endothelial cell ของหลอดเลือดฝอย basal lamina และ visceral epithelium (podocyte) ซึ่งเป็นชั้นในของ Bowman's capsule ที่ล้อมรอบ glomerulus อยู่ Bowman's capsule ประกอบไปด้วยผนัง 2 ชั้น โดยมีชั้นนอกประกอบด้วยเซลล์เยื่อบุผิวรูปแบนหนาเพียงหนึ่งชั้นเรียกว่า parietal epithelium ส่วนชั้นในติดกับผนังด้านนอกของ glomerulus เรียกว่า visceral epithelium และระหว่างสองชั้นนี้มีช่องว่างเรียกว่า Bowman's space กั้นอยู่

renal tubule คือท่อไตที่เชื่อมต่อระหว่าง renal corpuscle กับ collecting duct เปิดออกสู่ ureter renal tubule โดย ureter renal tubule แบ่งออกเป็นส่วนต่าง ๆ ดังนี้ ส่วนแรกเป็นท่อไตสั้น ๆ ที่ต่อมาจาก renal corpuscle มีเซลล์บุผิวรูปร่างเป็นสี่เหลี่ยมทรงเตี้ย เรียกว่า neck segment มี brush border ลักษณะเป็นขนสั้น ๆ ยื่นเข้าไปใน lumen ของท่อแต่ไม่ชัดเจน โดยผนังท่อในส่วนนี้จะบางที่สุดและมีนิวเคลียสขนาดใหญ่อยู่กลางเซลล์ ท่อไตส่วนที่สองต่อจาก neck segment เรียกว่า first proximal segment เซลล์ในช่วงแรกเป็นทรงสี่เหลี่ยมค่อนข้างเตี้ย แต่ตอนปลาย ๆ จะเป็นรูปทรงสูง มี brush border และมีนิวเคลียสกลมอยู่กลางเซลล์ ท่อไตส่วนที่สาม ยังคงพบเซลล์เยื่อบุผิวเป็นรูปทรงสูง แต่มี brush border น้อยกว่า เส้นผ่านศูนย์กลางของ lumen เล็กกว่า first proximal segment เรียกส่วนนี้ว่า second proximal segment และสุดท้ายคือ distal segment เป็นท่อไตส่วนปลาย พบเซลล์เยื่อบุผิวมีลักษณะเป็นสี่เหลี่ยมทรงเตี้ยแต่ยังคงสูงกว่าส่วน neck segment และไม่มี brush border พบนิวเคลียสกลมกลางเซลล์หรืออาจพบบริเวณฐานของเซลล์ ส่วนไซโตพลาสซึมติดสีชมพูเข้มกว่าส่วนอื่นเมื่อย้อมด้วยสี H&E (สุปราณี และคณะ, 2536)

2.8 ตัวชี้วัดทางชีวภาพ (biomarker)

ในสังคมปัจจุบันนี้มีการปนเปื้อนของสารเคมีหลากหลายชนิดอย่างกว้างขวางและเกิดการปนเปื้อนในสิ่งแวดล้อมทุกวัน โดยมาจากหลายแหล่งด้วยกัน อาทิ เช่น ของเสียที่ถูกปล่อยจากบ้านพักอาศัย สังคมการค้า การเกษตร รวมไปถึงโรงงานอุตสาหกรรมต่าง ๆ และสิ่งปฏิกูลของเสียเหล่านี้ที่ถูกปล่อยออกมา ส่งผลเสียต่อสังคมมนุษย์และสิ่งแวดล้อม ในการตรวจสอบผลกระทบเหล่านี้ ปัจจุบันนักวิทยาศาสตร์ได้พัฒนาวิธีการต่าง ๆ มากมาย เพื่อใช้ในการตรวจสอบเบื้องต้นโดยมีสัญญาณเตือนในเบื้องต้นอย่างเหมาะสมถึงผลกระทบดังกล่าวที่กำลังจะเกิดขึ้น โดยสารปนเปื้อนเหล่านี้จะถูกตรวจสอบได้ก่อนที่จะส่งผลเสียไปยังมนุษย์ หนึ่งในวิธีทางชีววิทยา ตัวชี้วัดที่เหมาะสมคือ ตัวชี้วัดทางชีวภาพ หรือเรียกกันว่า biomarker ซึ่งมีศักยภาพเป็นตัวแทนที่ดี เพียงพอที่จะวัดการปนเปื้อนของสารเมื่อสารนั้นเข้าสู่ร่างกาย ด้วยการเกิดปฏิกิริยาภายในร่างกายและมีการตอบสนองออกมาในรูปแบบที่ตรวจวัดได้ มีการแสดงให้เห็นว่าสารพิษนั้นเข้าสู่ร่างกายและมีการแสดงหรือตอบสนองออกมาให้เห็นถึงตำแหน่งที่เกิดพิษในอวัยวะที่ได้รับผลกระทบ หรือแสดงถึงตำแหน่งที่เกิดพิษในอวัยวะของสิ่งมีชีวิตนั้น ๆ ทำให้เรารู้ถึงตำแหน่งที่เกิดความเสียหายจากสารปนเปื้อนเหล่านั้น (Shugart และคณะ, 1992; Lam และ Gary, 2003; Van der Oost และคณะ, 2003)

สภาวิจัยแห่งชาติ National Research Council (NRC, 1987) ของประเทศสหรัฐอเมริกาได้กำหนดนิยามตัวชี้วัดทางชีวภาพว่า เป็นการเปลี่ยนแปลงในระดับเซลล์ หรือการเปลี่ยนแปลงทางเคมีภายในเซลล์ รวมไปถึงหน้าที่หรือกระบวนการทางโครงสร้างต่าง ๆ ที่ถูกกระตุ้นโดยสารพิษหรือสารแปลกปลอมหรือสารประกอบทางเคมี ที่สามารถวัดได้โดยใช้ biomarker ในระบบทางชีวภาพ ข้อตกลงที่มักใช้ในการอ้างอิงถึงการตอบสนองของสิ่งมีชีวิตในระดับโมเลกุล, กายภาพพื้นฐาน และการตอบสนองของออแกนต่อการปนเปื้อน สามารถวัดได้ในแหล่งอาศัยของสิ่งมีชีวิตนั้นหรือจากระบบสิ่งแวดล้อม (Di Giulio and Newman, 2008)

ตัวชี้วัดทางชีวภาพสามารถแบ่งออกได้ 3 ชนิด (NRC, 1987; WHO, 1993)

1. Biomarker of exposure คือ ตัววัดทางชีวภาพที่สะท้อนถึงการได้รับสารปนเปื้อน เช่น การวัดปริมาณสารปนเปื้อนในตัว
2. Biomarker of effect คือ ตัววัดทางชีวภาพที่สะท้อนถึงผลที่สัตว์ได้รับจากการรับสารนั้นเข้าสู่ร่างกายอาจจะเป็นผลกระทบที่เกิดขึ้นกับตัวปลา เช่น การเปลี่ยนแปลงน้ำหนักตัว, น้ำหนักอวัยวะ หรือความผิดปกติที่เกิดกับเนื้อเยื่ออวัยวะภายใน

3. Biomarker of susceptibility คือ ตัวบ่งชี้ความสามารถที่มีมาแต่กำเนิดของสิ่งมีชีวิตนั้นในการตอบสนองต่อสารเคมีที่จำเพาะ

อย่างไรก็ตาม biomarker of exposure กับ biomarker of effect ยังมีความคล้ายคลึงกันอยู่ โดย biomarker หลายตัวสามารถเป็นได้ทั้งสองชนิด (Hanson, 2008; Wallace, 2007)

ตัววัดทางชีวภาพในปลานำมาใช้ในการศึกษาทาง ecotoxicological เพื่อศึกษาถึงการปนเปื้อนในน้ำที่พบในสิ่งแวดล้อมเป็นระยะเวลานาน (Hanson, 2009; van der Oost และคณะ, 2003) เพราะปลาเป็นสัตว์ที่สามารถพบเจอในน้ำได้ตลอดเวลา และยังมีบทบาทหลักในห่วงโซ่อาหารตั้งแต่นักล่าอันดับต้น ๆ และมีการสะสมสารพิษจากระดับต่ำสุดจนถึงสูงสุดในระบบห่วงโซ่อาหาร โดยสารพิษสามาสะสมในตัวปลาและส่งผ่านไปยังมนุษย์เพราะปลามีความสำคัญในระบบห่วงโซ่อาหาร และปลาเป็นแหล่งอาหารที่สำคัญของมนุษย์ van der Oost และคณะ, 2003 แนะนำว่า ตัวแปรทาง biological และ biochemical สามารถตรวจสอบได้ในปลาเพื่อประเมินการปนเปื้อนทางเคมีในสิ่งแวดล้อม

บทที่ 3
การปนเปื้อนของสารฆ่าวัชพืชในดินตะกอน น้ำ และปลากะมัง ในแม่น้ำน่าน อำเภอเวียงสา จังหวัดน่าน

3.1 บทนำ

การใช้สารฆ่าวัชพืชในพื้นที่เกษตรกรรม อาจส่งผลเสียต่อสิ่งแวดล้อมและสิ่งมีชีวิตในบริเวณนั้น จังหวัดน่านถือเป็นจังหวัดที่ประชาชนทำการเกษตรเป็นหลัก (สุวัฒนา ธาดานิติ และวิพรรณ ประจวบเหมาะ, 2548) โดยมีพื้นที่เกษตรรวม 703,173 ไร่ เฉพาะในอำเภอเวียงสา มีพื้นที่เกษตรทั้งหมด 360,161 ไร่ ถือเป็นพื้นที่กว่าครึ่งหนึ่งของพื้นที่เกษตรทั้งจังหวัด โดยเป็นพื้นที่ปลูกพืชไร่ เช่น ข้าวโพด ถึง 55,135 ไร่ การดูแลข้าวโพดเพื่อให้ได้ผลดีปลอดภัยจากศัตรูพืชนั้นเป็นไปได้ยาก เกษตรกรจึงนิยมหันมาใช้สารเคมีทางการเกษตรมากขึ้น โดยสารเคมีทางการเกษตรที่ใช้กันอย่างแพร่หลายได้แก่ สารฆ่าวัชพืช (Wongwichit และคณะ, 2010) จากการบอกเล่าของเกษตรกรในจังหวัดน่าน วัชพืชเป็นปัญหาสำคัญที่ส่งผลเสียต่อแปลงเกษตรมากกว่าแมลงศัตรูพืช สารฆ่าวัชพืชที่เกษตรกรชาวน่านนิยมใช้ มี 3 ชนิด ได้แก่ อะทราซีน ไกลโฟเซต และพาราควอท ดังนั้นในพื้นที่และบริเวณใกล้เคียงอาจมีปริมาณการปนเปื้อนของสารฆ่าวัชพืชทั้ง 3 ชนิดนี้ตกค้างในดินตะกอนและเกิดการชะล้างลงสู่แหล่งน้ำใกล้เคียง สารเหล่านี้มีองค์ประกอบที่มีคุณสมบัติละลายน้ำได้แตกต่างกันแต่สามารถถูกพัดพาไปถึงแหล่งน้ำต่าง ๆ และยึดเกาะกับอนุภาคดินเหนียวได้อย่างแน่นหนา ทำให้จุลินทรีย์ย่อยสลายได้ยากขึ้น และถ้ามีการใช้ติดต่อกันเป็นระยะเวลานานก็สามารถสะสมในสิ่งแวดล้อมได้ (ภิญญา จำรัสกุล, 2539) เมื่อทำการฉีดพ่นในปริมาณมาก สารเหล่านี้จะฟุ้งกระจายในชั้นบรรยากาศ ตกลงสู่พื้นดิน และถูกพัดพาไปตามแหล่งน้ำต่าง ๆ เป็นบริเวณกว้าง รวมทั้งแม่น้ำน่านซึ่งเป็นแม่น้ำสายหลักของจังหวัดน่านและถือเป็นแม่น้ำสายสำคัญ ในบรรดาแม่น้ำ 4 สาย คือ ปิง วัง ยม น่าน ที่ไหลมารวมกันเป็นแม่น้ำเจ้าพระยา มีความสำคัญต่อการดำรงชีวิตของประชาชนที่ตั้งถิ่นฐานในพื้นที่ลุ่มน้ำ และเป็นแหล่งน้ำในการอุปโภคบริโภคและเกษตรกรรม รวมทั้งการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำ

ในประเทศไทยมีการนำเข้าสารฆ่าวัชพืชเป็นจำนวนมาก สารฆ่าวัชพืชสามชนิดคือ อะทราซีน ไกลโฟเซต และพาราควอท ถูกจัดอยู่ในอันดับต้น ๆ ของสารฆ่าวัชพืชที่พบว่ามีการใช้ในปริมาณมากในพื้นที่เกษตรกรรมในประเทศไทย แต่พบว่าไม่ค่อยมีการรายงานถึงการปนเปื้อนของสารฆ่าวัชพืชทั้งสามชนิดนี้มากนักเมื่อเปรียบเทียบกับการนำเข้า อาจจะมีการรายงานถึงผลการ

ปนเปื้อนของสารฆ่าวัชพืชเหล่านี้อยู่บ้างแต่ยังพบว่ามีผู้ศึกษาน้อย มีตัวอย่างการรายงานถึงระดับการปนเปื้อนของสารฆ่าวัชพืชในดินตะกอนและน้ำที่พบในประเทศไทย จากการเก็บตัวอย่างน้ำและดินตะกอนจากลำธารบริเวณห้วยกะโปะ จังหวัดเพชรบูรณ์ พื้นที่นี้เป็นบริเวณเพาะปลูกข้าวโพด มีการทำไร่ข้าวโพดและมีการใช้อะทราซีนในพื้นที่ การศึกษานี้ใช้เทคนิค HPLC ผลการศึกษาพบปริมาณการปนเปื้อนของอะทราซีนในน้ำและดินมีค่าเท่ากับ 4.7 µg/L และ 27.42 µg/kg ตามลำดับ (Phewnil และคณะ, 2012) นอกจากนี้ยังมีการรายงานการวิเคราะห์ตัวอย่างน้ำจากไร่ข้าวโพดที่ได้รับอะทราซีนในอัตรา 1.25-1.56 kg/ha บริเวณห้วยกะโปะ จังหวัดเพชรบูรณ์ มีค่าเกินกว่าค่ามาตรฐานของการปนเปื้อนอะทราซีนในน้ำดื่มที่กำหนดไว้โดย U.S. Environmental Protection Agency (U.S. EPA) โดยพบการปนเปื้อนของอะทราซีนมีค่าเท่ากับ 3 µg/L (Phewnil และคณะ, 2010) นอกจากนี้ยังมีรายงานการศึกษาการปนเปื้อนอะทราซีนในดินตะกอนที่เก็บตัวอย่างมาจากลำธารบริเวณห้วยกะโปะ จังหวัดเพชรบูรณ์ เป็นเวลาทั้งหมด 4 เดือน คือตั้งแต่เดือนสิงหาคมจนถึงพฤศจิกายน พ.ศ. 2551 และนำมาวิเคราะห์การปนเปื้อนโดยใช้เทคนิค HPLC พบการปนเปื้อนอะทราซีนในดินมีค่าเท่ากับ 44.9, 26.0, 8.4 และ 30.4 µg/kg (Siripat, 2010) สำหรับในต่างประเทศ ก็มีการรายงานการปนเปื้อนของสารฆ่าวัชพืชทั้งสามชนิดนี้ในสิ่งแวดล้อมออกมามากมาย โดยเฉพาะอย่างยิ่งในน้ำและดินตะกอน รายงานการศึกษาก่อนหน้านี้เกี่ยวกับการปนเปื้อนขอสารฆ่าวัชพืชในประเทศต่าง ๆ ตัวอย่างเช่น มีการศึกษาพบการปนเปื้อนของไกลโฟเซตในระดับสูงในตัวอย่างน้ำ ที่เก็บได้จากพื้นที่ใกล้เคียงกับบริเวณที่มีการเพาะปลูกในประเทศบราซิล (da Silva และคณะ, 2003) อีกรายงานเป็นการศึกษาในพบปริมาณการปนเปื้อนของอะทราซีนในน้ำใกล้กับพื้นที่ทำการเกษตรมีค่าเท่ากับ 40 µg/L (Rohr และคณะ, 2006; Storrs และ Kiesecker, 2004) อีกทั้งยังมีการรายงานการปนเปื้อนของไกลโฟเซตในน้ำบาดาลที่ประเทศเดนมาร์กมีค่า 0.1-4.7 mg/L (Rohr และคณะ, 2006) การวิเคราะห์ตัวอย่างน้ำทิ้งจากโรงงานในเมืองปักกิ่ง ประเทศจีน พบอะทราซีนที่ระดับแตกต่างกัน มีค่าตั้งแต่ 0.12-5.16 µg/L (Jing Ge และคณะ, 2010)

การปนเปื้อนของสารฆ่าวัชพืชในสิ่งแวดล้อม สามารถส่งผลต่อสิ่งมีชีวิตที่ไม่ใช่กลุ่มเป้าหมายที่อาศัยอยู่ในน้ำ โดยเฉพาะปลาที่อาศัยอยู่ในแหล่งน้ำและสัมผัสกับน้ำโดยตรง มีการศึกษาก่อนหน้านี้ศึกษาถึงการปนเปื้อนของสารฆ่าวัชพืชทั้ง 3 ชนิดนี้ ที่การตกค้างในเนื้อเยื่อของปลา โดยทำการวิเคราะห์สารไกลโฟเซตที่ตกค้างในเนื้อเยื่อปลาคาร์ฟ *Cyprinus carpio* และปลานิล *Oreochromis mossambicus* โดยให้สารที่ระดับความเข้มข้นที่ 0.05 และ 0.005 mg/L เป็นเวลา 14 วัน พบว่าไกลโฟเซตสามารถเข้าสะสมในตัวปลาได้ แต่สะสมในปริมาณน้อย โดย

ปริมาณของไกลโฟเซตที่เข้าไปสะสมที่ระดับความเข้มข้นที่ 0.05 และ 0.005 mg/L ไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (Wang และคณะ, 1993) การศึกษาการสะสมของพาราควอทในปลาเทร้าท์ *Salmo gairdneri* ในน้ำที่มีความเข้มข้นของพาราควอท 1 mg/L เป็นเวลา 1 สัปดาห์ ผลที่ได้คือ พบปริมาณความเข้มข้นในตัวปลา 0.5-0.6 mg/L (Calderbank, 1975 อ้างถึงใน ปภาศิริ กาญจโนภาศ, 2527) รายงานถึงการปนเปื้อนพาราควอทในเนื้อเยื้อของปลาน้ำจืด ซึ่งปลานั้นได้รับพาราควอทที่มีเข้มข้นข้นเท่ากับ 1.14 mg/L เป็นเวลานาน 48 ชั่วโมง ผลที่ได้คือ พบปริมาณของพาราควอทตกค้างอยู่ในเนื้อเยื่อมีค่าเท่ากับ 0.58-1.06 mg/L (Earnest, 1971) การศึกษาการสะสมของอะทราซีนในปลาหมอสี *Tilapia sparrmanii* โดยปลาได้รับอะทราซีนในระดับความเข้มข้นที่ต่ำกว่าระดับที่ทำให้ปลาถึงตาย ผลที่ได้นั้นพบว่าอะทราซีนสามารถสะสมในอยู่ในเนื้อเยื่อตับได้ (Du Preez และคณะ, 1992)

จากรายงานต่างๆ ที่ผ่านมาข้างต้น เป็นการยืนยันว่ามีการใช้สารฆ่าวัชพืชทั้ง 3 ชนิดนี้อย่างมาก และอาจก่อให้เกิดการปนเปื้อนของสารฆ่าวัชพืชเหล่านี้ในสิ่งแวดล้อม และส่งผลกระทบต่อสิ่งมีชีวิตที่อาศัยอยู่ในสิ่งแวดล้อมนั้นได้ ดังนั้นในการศึกษาครั้งนี้จึงทำการวิเคราะห์ถึงชนิดและปริมาณของสารฆ่าวัชที่ปนเปื้อนในสิ่งแวดล้อมได้แก่ ดินตะกอน น้ำ และเนื้อเยื่อของปลา ในแม่น้ำน่าน ใกล้พื้นที่ที่พบว่ามีการใช้สารฆ่าวัชพืชทั้งสามชนิดนี้ในปริมาณมากในการทำการเกษตรบริเวณใกล้เคียงกับพื้นที่ทำการเกษตรบริเวณพื้นที่ตำบลส้าน อำเภอเวียงสา จังหวัดน่าน เพื่อใช้ในการเฝ้าระวังและเป็นการป้องกันผลกระทบที่อาจเกิดขึ้นกับมนุษย์ที่อาศัยอยู่ในบริเวณพื้นที่นั้นได้

3.2 วิธีดำเนินการวิจัย

3.2.1 พื้นที่ศึกษาและการเก็บตัวอย่าง

พื้นที่ศึกษาคือแม่น้ำน่าน บริเวณใกล้กับพื้นที่เกษตร ตั้งอยู่ที่ ตำบลส้าน อำเภอเวียงสา จังหวัดน่าน พื้นที่โดยรอบแม่น้ำบริเวณนี้มีลักษณะเป็นที่ราบลุ่มสองฝั่งแม่น้ำ มีการทำเกษตรกรรมตลอดปี มีการปลูกพืชสวนและพืชไร่ โดยเฉพาะข้าวโพดเป็นบริเวณกว้าง และในบริเวณนี้ยังเป็นบริเวณที่ชาวบ้านมีการประกอบอาชีพประมงหาปลาควบคู่กันไป จากการสำรวจพบว่าในพื้นที่มีการฉีดพ่นสารฆ่าวัชพืชตลอดช่วงเวลาที่ทำการเกษตร (ภาพที่ 3.1)

ภาพที่ 3.1 (A) พื้นที่ศึกษาบริเวณแม่น้ำน่าน ใกล้กับพื้นที่เกษตร ตั้งอยู่ที่ ตำบลส้าน อำเภอเวียงสา จังหวัดน่าน (B-D) พื้นที่เกษตร มีการปลูกพืชสวนและพืชไร่ โดยเฉพาะข้าวโพด

ในการศึกษาครั้งนี้ มีการเก็บตัวอย่างดินตะกอนและน้ำจากแม่น้ำน่าน ในช่วงฤดูฝน 2 ครั้ง ในเดือนกรกฎาคมและตุลาคม พ.ศ. 2553 และฤดูแล้ง 2 ครั้ง ในเดือนมกราคม และเมษายน พ.ศ. 2554 โดยเก็บดินตะกอนและน้ำในขวดพอลีเอทิลีน ที่ผ่านการชะด้วยสารละลายอะซิโตน ปิดฝาสนิท (ภาพที่ 3.2) เก็บที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เพื่อนำไปวิเคราะห์หาชนิดและปริมาณการปนเปื้อนของสารฆ่าวัชพืชด้วยเครื่อง High Performance Liquid Chromatography (HPLC) ในห้องปฏิบัติการต่อไป ในระหว่างการเก็บตัวอย่างดินตะกอนและน้ำ ทำการตรวจวัดและเก็บข้อมูลทางกายภาพ ได้แก่ ค่าปริมาณออกซิเจนที่ละลายอยู่ในน้ำ (dissolved oxygen: DO), ค่าความเป็นกรด-ด่าง (pH) และอุณหภูมิ

ภาพที่ 3.2 การเก็บตัวอย่างดินตะกอนและน้ำจากแม่น้ำน่าน โดยเก็บดินตะกอนและน้ำ ในขวดพอลีเอทิลีน

รูปที่ 3.3 การเก็บตัวอย่างปลากะมัง *Puntioplites proctozysron* จากแม่น้ำน่าน
โดยวิธีลงข่ายจับปลา

การเก็บตัวอย่างปลากะมัง *Puntioplites proctozysron* จากแม่น้ำน่าน ใช้วิธีลงข่ายจับปลา เก็บตัวอย่างปลาตัวเต็มวัยที่มีความยาวลำตัวมากกว่า 11 เซนติเมตร (ดูจำนวนตัวอย่างทั้งหมดได้จากตารางที่ 4.1) โดยเก็บให้ได้อย่างน้อยครั้งละ 10 ตัว โดยเลือกเพศผู้ 5 ตัว และเพศเมีย 5 ตัว เป็นเวลา 1 ปี ในช่วงฤดูฝนในเดือนกรกฎาคม และตุลาคม พ.ศ. 2553 และฤดูแล้ง ในเดือนมกราคม และเมษายน พ.ศ. 2554 การเคลื่อนย้ายปลาจากแม่น้ำน่าน ทำโดยเก็บปลาที่ยังมีชีวิตในถังน้ำที่ให้อากาศ แล้วนำมาที่ห้องปฏิบัติการพื้นที่ป่าอนุรักษ์และสถานีวิจัยของจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย อำเภอเวียงสา จังหวัดน่าน แล้วจึงสลบปลาด้วยการแช่ในน้ำแข็งเย็นจัด (rapid cooling method; Wilson และคณะ, 2009) แล้วทำการุณยฆาตด้วยการตัดคอ ผ่าตัดเปิดช่องท้องเก็บตับและไตมาชั่งน้ำหนักและบันทึกข้อมูล จากนั้นห่ออวัยวะในแผ่นอะลูมิเนียมฟลอยด์แล้วเก็บในตู้เย็นที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เพื่อนำไปวิเคราะห์หาชนิดและปริมาณของสารฆ่าวัชพืชต่อไป (ภาพที่ 3.3) วิธีการที่กระทำต่อปลาทั้งหมด ได้ผ่านความเห็นชอบจากคณะกรรมการกำกับดูแลการเลี้ยงและใช้สัตว์ทดลอง คณะวิทยาศาสตร์ (Protocal Review No. 1123011)

3.2.2 การวิเคราะห์ชนิดและปริมาณของสารฆ่าวัชพืช

3.2.2.1 การวิเคราะห์การปนเปื้อนของสารฆ่าวัชพืชในดินตะกอนและน้ำ

นำดินตะกอนและน้ำที่เก็บรักษาที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส มาสกัดตามวิธีการของ Basantia และคณะ, 2010 แล้วนำไปวิเคราะห์หาปริมาณสารฆ่าวัชพืชด้วยเครื่อง HPLC ตามวิธีการมาตรฐานของ USEPA (U.S. Environmental Protection Agency) (Stafford, และคณะ, 1992) ได้แก่ อะทราซีน (Atrazine EPA-3, August 1982) ไกลโฟเซต (Glyphosate EPA-1, October 1987) และพาราควอท (Paraquat EPA-1, August 1982) โดยในการวิจัยนี้ได้วิเคราะห์โดยบริษัท ห้องปฏิบัติการกลาง (ประเทศไทย) จำกัด (Central Laboratory (Thailand) Co., Ltd.) ซึ่งได้รับรองเป็นศูนย์วิจัยเฉพาะสำหรับการทดสอบอาหาร ISO/IEC 17025 จากมาตรฐานของ the National Bureau of Laboratory (National Bureau of Laboratory Quality Standards) กระบวนการสำหรับการวิเคราะห์สารกำจัดวัชพืชกล่าวโดยสรุปได้ดังนี้

อะทราซีน

การสกัดจากตัวอย่างน้ำและดินตะกอนของอะทราซีน: นำตัวอย่างน้ำมาเติมโซเดียมคลอไรด์ (NaCl) และสกัดด้วยไดคลอโรมีเทน (CH_2Cl_2) จากนั้นทำการระเหยแห้งตัวอย่างภายใต้แก๊สไนโตรเจน นำสารสกัดตัวอย่างแห้งที่ได้มาปรับปริมาตรโดยเอทิลแอซีเทตก่อนนำไปวิเคราะห์ในขั้นตอนต่อไป สำหรับตัวอย่างดินนำมาเติมโซเดียมคลอไรด์ จากนั้นทำการสกัดโดยแอซีโตไนไทร์ล ก่อนเติมสารแมกนีเซียมซัลเฟตที่ปราศจากน้ำ (anhydrous $MgSO_4$) ลงไป นำตัวอย่างดินตะกอนที่สกัดเรียบร้อยแล้ว เข้าเครื่องหมุนเหวี่ยงเพื่อแยกตะกอน (centrifuge) ที่อุณหภูมิ 5 °C เก็บแยกชั้นน้ำมาระเหยแห้งภายใต้แก๊สไนโตรเจน จากนั้นนำสารสกัดตัวอย่างดินตะกอนแห้งที่ได้มาปรับปริมาตรด้วยเอทิลแอซีเทต จากนั้นเติมแมกนีเซียมซัลเฟตที่ปราศจากน้ำและสาร primary secondary amine (PSA) จากนั้นกรองสารสกัดผ่านตัวกรองขนาด 0.22 µm ก่อนนำไปวิเคราะห์ในขั้นตอนต่อไป

วิเคราะห์ปริมาณการปนเปื้อนของอะทราซีน ทำการวิเคราะห์ปริมาณของอะทราซีนจากตัวอย่างที่สกัดแล้ว โดย gas chromatography-mass spectrometry (GC-MS; Agilent Technologies 6890 N) ภาวะของ GC-MS ในการวิเคราะห์ ได้แก่ คอลัมน์ DB-5ms

capillary เส้นผ่านศูนย์กลางภายใน 0.25 µm และยาว 30 m, ปริมาตรการฉีด 2 µm โดยค่าขีดจำกัดการตรวจวัด (limit of detection: LOD) สำหรับการวิเคราะห์ของอะทราซีนในน้ำเท่ากับ 0.01 mg/L และในดินตะกอนเท่ากับ 0.01 mg/kg

ไกลโฟเซต

การสกัดจากตัวอย่างน้ำและดินตะกอนของไกลโฟเซต: ดำเนินกระบวนการสกัดและการเตรียมตัวอย่างตาม Borjesson และ Torstensson (2000) โดยปรับค่า pH ของตัวอย่างน้ำให้มีค่าเท่ากับ 2 และนำมาผ่านกระบวนการ ion-exchange และ clean-up ใน Chelex 100 คอลัมน์ และ AG1-X8 คอลัมน์ จากนั้นระเหยแห้งตัวอย่างภายใต้สูญญากาศ นำมาละลายน้ำ และระเหยแห้งอีกครั้งแล้วละลายในสารละลาย water-methanol-HCl สุดท้ายระเหยแห้งภายใต้แก๊สไนโตรเจน จากนั้น derivate สารตัวอย่างด้วยไตรฟลูออโรแอซิติกที่ปราศจากน้ำ (trifluoacetic anhydride) และไตรฟลูออโรเอทานอล (trifluoroethanol) เป็นเวลา 1 ชั่วโมงที่อุณหภูมิ 100 ºC แล้วทำการระเหยแห้งสารตัวอย่างภายใต้แก๊สไนโตรเจนและละลายอีกครั้งในเอทิลแอซีเทต ก่อนทำการวิเคราะห์ต่อไป สำหรับตัวอย่างดินตะกอนนำมาสกัดสองครั้งด้วยโซเดียมไฮดรอกไซด์ (1M NaOH) และปั่นเหวี่ยงเพื่อเก็บเอาสารละลายในชั้นน้ำ จากนั้นน้ำสารละลายมากรองด้วย F1 Whatman filter นำสารสกัดกรดไฮโดรคลอริก (HCl) เข้มข้น และเจือจางในน้ำก่อนจะปรับค่า pH ให้มีค่าเท่ากับ 2 จากนั้นทำการสกัดส่วนน้ำใสเช่นเดียวกับขั้นตอนของตัวอย่างน้ำ แล้วทำการบ่มทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 1 ชั่วโมง

วิเคราะห์ปริมาณการปนเปื้อนของไกลโฟเซต ทำการวิเคราะห์ด้วย HPLC (Agilent HPLC 1100 series) ที่ใช้ post-column derivatizer (Pickering PCX 5200) โดยค่า LOD สำหรับการวิเคราะห์ปริมาณของไกลโฟเซตในน้ำเท่ากับ 0.005 mg/L และในดินตะกอนเท่ากับ 0.01 mg/kg

พาราควอท

การสกัดจากตัวอย่างน้ำและดินตะกอนของพาราควอท: นำตัวอย่างน้ำมาปรับค่า pH ให้มีค่าเท่ากับ 9 และทำให้สะอาดด้วย solid phase extraction (SPE) silica และเก็บในของผสมของสารละลายไฮโดรคลอริกและเมทานอล อัตราส่วน 9:1 จากนั้นนำตัวอย่างมาระเหยให้แห้งและปรับปริมาตรด้วย 100 mM ammonium formate pH 3.7 และแอซีโตไนไทร์ล โดยมีอัตราส่วนเท่ากับ 3:2 นำสารตัวอย่างมากรองด้วย syringe nylon filter (0.22 µm) ก่อนนำไปวิเคราะห์ในขั้นตอนต่อไป ส่วนตัวอย่างดินตะกอนนำมาเติมน้ำกลั่น (octane-2), กรดซัลฟิวริกและเม็ดแก้วลงไปก่อนนำไปกลั่นไหลกลับ (reflux) ภายใต้ระบบปิดเป็นเวลา 5 ชั่วโมงและปล่อยให้เย็นลง จากนั้นกรองตัวอย่างด้วยกระดาษกรองและ Celite และกำจัดสิ่งรบกวนด้วย solid phase extraction (SPE) silica ต่อมานำตัวอย่างมาระเหยแห้งและปรับปริมาตรด้วยสารละลาย 100 mM ammonium formate pH 3.7 กับแอซีโตไนไทร์ล อัตราส่วน 3:2 จากนั้นกรองตัวอย่างด้วย syringe nylon filter (0.22 µm) ก่อนนำไปวิเคราะห์ในขั้นตอนต่อไป

วิเคราะห์ปริมาณการปนเปื้อนของพาราควอท วิเคราะห์ปริมาณการปนเปื้อนของพาราควอทโดย HPLC-DAD; Agilent 1100 โดยใช้คอลัมน์ Atlantis HILIC silica column (3µm, 2.1x150 mm) ปริมาตรการฉีดสารตัวอย่าง 10 µL อัตราการไหลของเฟสเคลื่อนที่ 0.2 mL/min โดยค่า LOD สำหรับการวิเคราะห์พาราควอทในน้ำเท่ากับ 0.01 mg/L และสำหรับดินตะกอนเท่ากับ 0.01 mg/kg

3.2.2.2 การวิเคราะห์การปนเปื้อนของสารฆ่าวัชพืชในเนื้อเยื่อตับและไตของปลากะมัง

ในการศึกษานี้ใช้ Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA) ซึ่งมีความจำเพาะต่ออนุภาคของสารฆ่าวัชพืช โดยใช้ atrazine kit และ glyphosate kit จากบริษัท Abraxis และ paraquat kit จาก Abnova การวิเคราะห์ปริมาณการปนเปื้อนโดยชุดเครื่องมือ ELISA นั้น ต้องทำการสกัดให้อยู่ในรูปของสารละลาย เนื่องจากชุดเครื่องมือถูกออกแบบสำหรับวิเคราะห์การปนเปื้อนในน้ำเท่านั้น ดังนั้นก่อนทำการวิเคราะห์จึงต้องสกัดตัวอย่างเนื้อเยื่อตับและไตให้อยู่ในรูปของสารละลาย

อะทราซีน

การสกัดของอะทราซีนในเนื้อเยื่อ

นำเนื้อเยื่อตับและไตที่ผ่านกระบวนการดึงน้ำออกโดย freeze drier ชั่งน้ำหนักแห้งและบันทึกข้อมูล จากนั้นบดตัวอย่างให้ละเอียดโดยโกร่งบดยา นำตัวอย่างแห้งของเนื้อเยื่อตับและไตมาจำนวนละ 0.1 กรัม นำมาสกัดโดยปรับเปลี่ยนจากวิธีของ Jacomini และคณะ, 2003 ทำการสกัดเนื้อเยื่อโดยเติม dH_2O ปริมาตร 1 mL และไดคลอโรมีเทน ปริมาตร 4 mL และปรับ pH โดยการเติม 1.5 M NaOH ปริมาตร 200 mL เขย่าเป็นเวลา 20 นาที จากนั้นนำไปปั่นแยกที่อุณหภูมิห้อง (25 ^{o}C) ด้วยความเร็ว 1,800 X g เป็นเวลา 5 นาที แยกส่วนสารละลายใสออกมาใส่ในหลอดใหม่ปริมาตร 3 mL นำสารละลายที่ได้ไปทำให้แห้งโดยก๊าซไนโตรเจน ด้วยเครื่อง TurboVap® II นำสารสกัดแห้งมาเติมเมทานอลกับน้ำในอัตราส่วน 1:9 ปรับปริมาตรสุดท้ายเป็น 1 mL และเก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4 ^{o}C เพื่อนำไปวิเคราะห์ปริมาณการปนเปื้อนของอะทราซีนโดยวิธี ELISA

การวิเคราะห์ปริมาณการปนเปื้อนของอะทราซีนด้วย ELISA: นำบัฟเฟอร์ปริมาตร 25 µL ใส่ลงในหลุมของเพลตที่ถูกเคลือบด้วย rabbit anti-triazine antibody จากนั้นนำสารละลายมาตรฐานอะทราซีนปริมาตร 25 µL (0, 0.05, 0.1, 0.25, 1.0, 2.5 และ 5.0 ng/mL) และตัวอย่างที่ได้จากการสกัดเติมใส่ลงในหลุม ต่อมาเติม triazine-horse radish peroxidase conjugate ปริมาตร 50 µL ลงในแต่ละหลุมและบ่มที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 30 นาที เมื่อครบตามเวลา นำเพลตมาล้างทำความสะอาดโดยใช้สารละลาย washing buffer จำนวน 3 ครั้งและเติม substrate/color solution (hydrogen peroxide and 3,3’,5,5’–tetramethylbenzidine; TMB) ปริมาตร 100 µL วางเพลตทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 15 นาที สุดท้ายเติมกรดซัลฟิวริกปริมาตร 50 µL เพื่อหยุดการทำปฏิกิริยายับยั้งกระบวนการการทำงานทั้งหมด จากนั้นนำเพลตมาวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 450 nm โดยใช้เครื่องอ่าน microplate ELISA (Multiskan EX)

การคำนวณหาความเข้มข้นของอะทราซีน สามารถหาได้จากการคำนวณหาค่าเฉลี่ยการดูดกลืนแสงของสารสะลายมาตรฐานและตัวอย่าง จากนั้นคำนวณค่า percent bound (%B/B_0) ของแต่ละสารละลายมาตรฐานและตัวอย่าง โดยนำค่าเฉลี่ยการดูดกลืนแสงของสารละลายมาตรฐานและตัวอย่างหารด้วยค่าเฉลี่ยการดูดกลืนของมาตรฐานศูนย์ (standard 0; 0 ng/mL) จากนั้นสร้างกราฟมาตรฐาน (standard curve) โดยกำหนด %B/B_0 เป็นแกน y และ log

ความเข้มข้นของอะทราซีน เป็นแกน x กราฟมาตรฐานของอะทราซีนเป็นเส้นตรงตั้งแต่ 0-0.5 ng/mL โดยค่า r^2 เท่ากับ 0.99064 ความเข้มข้นของอะทราซีนในแต่ละตัวอย่าง กำหนดจากการประมาณค่าของช่วงกราฟมาตรฐาน (ng/mL, ppb) จากการประเมินโดยวิธีดังกล่าว ตรวจสอบการปนเปื้อนของอะทราซีนในเนื้อเยื่อมีค่าขีดจำกัดการตรวจวัด (limit of detection: LOD) สำหรับการปนเปื้อนของอะทราซีนเท่ากับ 0.53 ng/g (น้ำหนักแห้ง) และค่าร้อยละการกลับคืนของอะทราซีนในปลา ตับ และไต (recovery of extraction) มีค่าเท่ากับ 140.492%, 196.063% และ 33.761% ตามลำดับ

ไกลโฟเซต

การสกัดของไกลโฟเซตในเนื้อเยื่อ

นำเนื้อเยื่อตับและไตที่ผ่านกระบวนการดึงน้ำออกโดย freeze drier ชั่งน้ำหนักแห้งและบันทึกข้อมูล จากนั้นบดตัวอย่างให้ละเอียดโดยโกร่งบดยา นำตัวอย่างแห้งของเนื้อเยื่อตับและไตมาจำนวนละ 0.1 กรัม นำมาสกัดโดยปรับเปลี่ยนตามวิธีของ Alferness และ Iwata ในปี 1994 ชั่งตัวอย่างใส่ลงในหลอด microtube ขนาด 1.5 mL เติมน้ำ 200 µL เขย่าให้เข้ากัน เติมคลอโรฟอร์ม (chloroform) ปริมาตร 100 µL และ 0.1 N HCl ปริมาตร 400 µL ปิดฝาหลอดให้สนิทแล้วจึงนำไปเขย่าเป็นเวลา 5 นาที นำมาเติมด้วยโซเดียมซัลเฟต (sodium sulfate) 0.004 กรัม ปิดฝาหลอดให้สนิทและนำไปเขย่าเป็นเวลา 2 นาที จากนั้นนำไปปั่นแยกที่อุณหภูมิห้อง (25 °C) ด้วยความเร็ว 1,000 X g เป็นเวลา 10 นาที ดูดแยกส่วนสารละลายที่เป็นน้ำออกมาใส่หลอด microtube หลอดใหม่ปริมาตร 400 µL และเติมคลอโรฟอร์มปริมาตร 400 µL ปิดฝาหลอดให้สนิทและนำไปเขย่าเป็นเวลา 2 นาที จากนั้นนำไปปั่นแยกที่อุณหภูมิห้อง (25 °C) ด้วยความเร็ว 1,000 X g เป็นเวลา 10 นาที ดูดแยกส่วนสารละลายที่เป็นน้ำออกมาใส่หลอด microtube หลอดใหม่ปริมาตร 350 µL ตรวจวัด pH ด้วยกระดาษวัดค่า pH ในกรณีที่ยังคงมีสภาพเป็นกรดอยู่ให้เติม 6N NaOH ประมาณ 2-9 µL เพื่อปรับสภาพให้เป็นเบส และเก็บไว้ที่อุณหภูมิ -20 °C เพื่อนำไปวิเคราะห์ปริมาณการปนเปื้อนของไกลโฟเซตโดย ELISA

ขั้นตอน Derivartization

นำตัวอย่างที่สกัดแล้ว มาตั้งทิ้งไว้จนละลายที่อุณหภูมิ 4 °C แล้วเขย่าให้เข้ากันด้วย vortex จากนั้นเตรียม derivatization reagent โดย นำ derivatization reagent เจือจาง 3.5 mL เติมลงใน derivatization reagent เขย่าด้วย vortex แล้วตั้งทิ้งไว้ เตรียมหลอดทดลองเท่าจำนวนตัวอย่างและสารละลายมาตรฐาน (standards) อีก 6 หลอด นำตัวอย่างทั้งหมดที่ได้จากการสกัดและสารละลายมาตรฐานปริมาตร 250 µL (200 และ 50 µL ของกลุ่มตัวอย่าง และสารละลายมาตรฐานไกลโฟเซต (0.075, 0.2, 0.5, 1.0 และ 4.0 ng/mL)) ใส่ในหลอดทดลอง เติม assay buffer 1 mL เขย่าด้วย vortex ให้เข้ากัน จากนั้นเติม derivatization reagent ปริมาตร 100 µL นำไปเขย่าทันทีหลังจากเติมสารโดยต้องไม่มีการแยกชั้นของสารละลาย ตั้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 10 นาที เพื่อนำไปลงเพลตทำ ELISA

การวิเคราะห์ปริมาณการปนเปื้อนของไกลโฟเซตด้วยชุดเครื่องมือ ELISA: นำตัวอย่างของ Derivatized ปริมาตร 50 mL และสารละลายมาตรฐาน เติมลงไปในหลุมของ microplate 96 หลุม ซึ่งหลุมทั้งหมดถูกเคลือบด้วย anti-rabbit antibody จากนั้นเติมสารละลาย anti-glyphosate antibody ปริมาตร 50 µL ตามลงไปและผสมให้เข้ากันโดยการหมุนวนไปมาประมาณ 30 วินาที และปล่อยทิ้งไว้ 30 นาทีที่อุณหภูมิห้อง จากนั้นเติม glyphosate horse raddish peroxidase conjugate ปริมาตร 50 µL ลงไปและผสมให้เข้ากัน 30 วินาที ก่อนปล่อยทิ้งไว้ 60 นาที ที่อุณหภูมิห้อง เมื่อครบตามเวลานำเพลตมาล้างทำความสะอาดโดยใช้ washing buffer ปริมาตร 250 µL จำนวน 3 ครั้ง จากนั้นเติมสารละลาย substrate/color ปริมาตร 150 µL โดยใช้เวลาประมาณ 20-30 นาที สุดท้ายเติม stop solution ปริมาตร 100 µL เพื่อจะหยุดการทำปฏิกิริยายับยั้งกระบวนการการทำงานทั้งหมด จากนั้นนำเพลตมาวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 450 nm โดยใช้ microplate ELISA

การคำนวณหาความเข้มข้นของไกลโฟเซต สามารถหาได้จากการคำนวณหาค่าเฉลี่ยการดูดกลืนแสงของสารสะลายมาตรฐานและตัวอย่าง จากนั้นคำนวณค่า percent bound (%B/B_0) ของแต่ละสารละลายมาตรฐานและตัวอย่าง โดยนำค่าเฉลี่ยการดูดกลืนแสงของสารละลายมาตรฐานและตัวอย่างหารด้วยค่าเฉลี่ยการดูดกลืนของมาตรฐานศูนย์ (standard 0; 0 ng/mL) จากนั้นสร้างกราฟมาตรฐาน (standard curve) โดยกำหนด %B/B_0 เป็นแกน y และ log ความเข้มข้นของไกลโฟเซต เป็นแกน x กราฟมาตรฐานของไกลโฟเซตเป็นเส้นตรงตั้งแต่ 0-4.0

ng/mL โดยค่า r^2 เท่ากับ 0.99935 ความเข้มข้นของไกลโฟเซตในแต่ละตัวอย่าง กำหนดจากการประมาณค่าของช่วงกราฟมาตรฐาน (ng/mL, ppb) จากการประเมินโดยวิธีดังกล่าว ตรวจสอบการปนเปื้อนของไกลโฟเซตในเนื้อเยื่อมีค่าขีดจำกัดการตรวจวัด (limit of detection: LOD) สำหรับการปนเปื้อนของไกลโฟเซตเท่ากับ 0.21 ng/g (น้ำหนักแห้ง) และค่าร้อยละการกลับคืนของไกลโฟเซทในปลา ตับ และไต (recovery of extraction) มีค่าเท่ากับ 53.176%, 34.71% และ 66.478% ตามลำดับ

พาราควอท

การสกัดของพาราควอทในเนื้อเยื่อ

การวิเคราะห์ปริมาณการปนเปื้อนพาราควอทโดย ELISA kit จาก Abnova เนื่องจากชุด kit ถูกออกแบบให้วิเคราะห์ปริมาณการปนเปื้อนพาราควอทในน้ำเท่านั้น ดังนั้นการวิเคราะห์ปริมาณการปนเปื้อนพาราควอทในเนื้อเยื่อตับและไตต้องนำเนื้อเยื่อมาผ่านการสกัดให้อยู่ในรูปของสารละลาย

นำเนื้อเยื่อตับและไตที่ผ่านกระบวนการดึงน้ำออกโดย freeze drier มาชั่งน้ำหนักแห้งและบันทึกข้อมูล จากนั้นบดตัวอย่างให้ละเอียดโดยโกร่งบดยา นำตัวอย่างแห้งที่ได้มาอย่างละ 0.1 กรัม นำมาสกัดโดยปรับเปลี่ยนจากวิธีของ Brown และคณะ, (1996) และ Quick และคณะ, (1990) โดยชั่งตัวอย่างใส่สงในหลอด microtube ขนาด 1.5 mL เติมน้ำ 200 µL เขย่าให้เข้ากัน และเขย่าด้วยเครื่อง vortex 1 นาที เติมเฮกเซน (hexane) ปริมาตร 200 µL และ 10% TCA ปริมาตร 600 µL ปิดฝาหลอดให้สนิทแล้วจึงนำไปเขย่าด้วยเครื่อง vortex เป็นเวลา 5 นาที นำไปปั่นแยกที่อุณหภูมิห้อง (25 °C) ด้วยความเร็ว 2,000 X g เป็นเวลา 15 นาที ดูดแยกส่วนสารละลายที่เป็นน้ำออกมา 550 µL ใส่หลอด microtube หลอดใหม่ ตะกอนส่วนที่เหลือนำมาสกัดใหม่ โดยเติม 10% TCA ปริมาตร 250 µL ปิดฝาหลอดให้สนิทแล้วจึงนำไปเขย่าด้วยเครื่อง vortex เป็นเวลา 5 นาที นำไปปั่นแยกที่อุณหภูมิห้อง (25 °C) ด้วยความเร็ว 2,000 X g เป็นเวลา 15 นาที ดูดแยกส่วนสารละลายที่เป็นน้ำออกมา 200 µL ใส่รวมกับสารละลายที่ดูดออกมาก่อนหน้านี้ในหลอด microtube หลอดเดิม รวมปริมาตรสารสกัดที่ได้ทั้งหมดเท่ากับ 750 µL นำมาสกัดไขมันอีกครั้งด้วยเฮกเซนปริมาตร 400 µL ปิดฝาหลอดให้สนิทแล้วจึงนำไปเขย่าด้วยเครื่อง vortex เป็นเวลา 5 นาที นำไปปั่นแยกที่อุณหภูมิห้อง (25 °C) ด้วยความเร็ว 2,000 X g เป็นเวลา 15 นาที ดูดแยกส่วนที่เป็นน้ำ 700 µL ปรับ pH ให้มีค่าเท่ากับ 1 จากนั้นจึงเติม Tris buffer ปริมาตร 300

µL แล้วตรวจสอบค่า pH ด้วยกระดาษวัดค่า pH เพื่อปรับ pH อีกให้มีค่า อยู่ในช่วง 7 โดยเติม 6N HCl ปริมาตร 20 µL เก็บไว้ที่อุณหภูมิ -20 °C เพื่อนำไปวิเคราะห์ปริมาณการปนเปื้อนของพาราควอทโดย ELISA ต่อไป

การวิเคราะห์ปริมาณการปนเปื้อนของพาราควอทด้วย ELISA: นำตัวอย่างตับและไตที่ผ่านการสกัดเรียบร้อยแล้วมาสกัดจากที่อุณหภูมิ -20 °C โดยนำมาตั้งทิ้งไว้จนละลายที่อุณหภูมิ 4 °C แบ่งสารสกัดมาปริมาตร 25 µL มารวมกับสารละลายมาตรฐานของพาราควอท (0, 0.375, 0.75, 2.5, 7.5 ng/mL) เติมใส่ลงในหลุมของเพลตที่ถูกเคลือบด้วย anti-paraquat antibody ต่อมาเติม paraquat horse raddish peroxidase conjugate ปริมาตร 100 µL ลงในแต่ละหลุมและบ่มที่อุณหภูมิห้อง (25 °C) เป็นเวลา 30 นาที เมื่อครบตามเวลานำเพลตมาล้างทำความสะอาดโดยใช้ washing buffer ปริมาตร 250 µL จำนวน 3 ครั้ง จากนั้นเติมสารละลาย substrate/color ปริมาตร 150 µL เพื่อเป็นการล้าง non-bound conjugate ออก จากนั้นเติม hydrogen neroxide ปริมาตร 100 µL และ stabited tetramethybenzidine (TMB) วางเพลตทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 15 นาที สุดท้ายเติม 3N HCl (stop solution) ปริมาตร 100 µL เพื่อหยุดปฏิกิริยา แล้วนำเพลตมาวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 450 nm โดยใช้เครื่อง microplate reader

การคำนวณหาความเข้มข้นของพาราควอท สามารถหาได้จากการคำนวณหาค่าเฉลี่ยการดูดกลืนแสงของสารสะลายมาตรฐานและตัวอย่าง จากนั้นคำนวณค่าเปอร์เซ็นต์ของการยับยั้ง (% inhibition) จากสมการด้านล่าง

$$\%\ \text{inhibition} = 100 - \left(\frac{\text{ค่าเฉลี่ยการดูดกลืนแสงของมาตรฐาน}}{\text{ค่าเฉลี่ยการดูดกลืนแสงของมาตรฐานศูนย์}} \right) \text{x}100$$

จากนั้นสร้างกราฟมาตรฐานได้โดยกำหนด % inhibition บนแกน y และ log ความเข้มข้นของพาราควอท เป็นแกน x กราฟมาตรฐานของพาราควอทเป็นเส้นตรงตั้งแต่ 0-0.75 ng/mL โดยค่า r^2 เท่ากับ 0.99938 ความเข้มข้นของพาราควอทในแต่ละตัวอย่าง กำหนดจากการประมาณค่าของช่วงกราฟมาตรฐานและแสดงในหน่วย ng/mL, ppb ของการปนเปื้อนของพาราควอท จากการประเมินโดยวิธีดังกล่าว ตรวจสอบการปนเปื้อนของพาราควอทในเนื้อเยื่อมีค่าขีดจำกัดการตรวจวัด (limit of detection: LOD) สำหรับการปนเปื้อนของพาราควอทเท่ากับ 9.89

ng/g (น้ำหนักแห้ง) และค่าร้อยละการกลับคืนของพาราควอทในปลา ตับ และไต (recovery of extraction) มีค่าเท่ากับ 176.865%, 329.330% และ 186.516% ตามลำดับ

3.2.3 การวิเคราะห์ข้อมูล

นำข้อมูลการปนเปื้อนของสารฆ่าวัชพืชที่วิเคราะห์ได้ในทั้งสองเพศมาหา normal distribution โดย Kolmogorov–Smirnov test และ homogeneity of variance เพื่อเปรียบเทียบความแตกต่างระหว่างเพศในแต่ละเดือน โดยใช้ Student’s t-test จากนั้นนำข้อมูลมาเปรียบเทียบความแตกต่างของปริมาณการปนเปื้อนในเนื้อเยื่อปลากะมังในแต่ละช่วงเวลา ด้วยสถิติ Analysis of Variance (ANOVA) โดย Student-Newman-Keuls multiple comparison (แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ $p < 0.05$) การวิเคราะห์ข้อมูลทั้งหมดใช้โปรแกรม SPSS (Windows version 17.0) จากนั้นวิเคราะห์ความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณการปนเปื้อนของสารฆ่าวัชพืชในดินตะกอนและน้ำกับปริมาณการปนเปื้อนของสารฆ่าวัชพืชในเนื้อเยื่อตับและไตของปลากะมัง ด้วยสถิติ Pearson’s correlation matrices เพื่อหาค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ (correlation coefficient; r) ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์ โดยใช้โปรแกรม SPSS for Windows version 17.0

3.3 ผลการศึกษาและวิเคราะห์ผลการศึกษา

3.3.1 ชนิดและปริมาณการปนเปื้อนของสารฆ่าวัชพืชในดินตะกอนและน้ำ

จากผลการวิเคราะห์ชนิดและปริมาณการปนเปื้อนของสารฆ่าวัชพืชด้วยเทคนิค HPLC และ GC-MS ในดินตะกอนและน้ำ ที่เก็บตัวอย่างจากแม่น้ำน่าน ในช่วงฤดูฝน เดือนกรกฎาคม และเดือนตุลาคม พ.ศ. 2553 และในช่วงฤดูแล้ง เดือนมกราคม และเดือนเมษายน พ.ศ. 2554 ตรวจพบปริมาณการปนเปื้อนของอะทราซีนในดินตะกอนในเดือนกรกฎาคม พ.ศ. 2553 มีค่าเท่ากับ 0.01 mg/kg และในเดือนมกราคม พ.ศ. 2554 พบมีค่าสูงถึง 0.24 mg/kg นอกจากนี้สามารถตรวจพบการปนเปื้อนของอะทราซีนในน้ำมีค่าเท่ากับ 0.15 mg/L ดังแสดงในตารางที่ 3.1 ผลที่ได้จากการศึกษานี้ เป็นการยืนยันถึงระดับการปนเปื้อนของอะทราซีนที่อยู่ในระดับของการปนเปื้อนที่สูงมาก ซึ่งระดับการปนเปื้อนของอะทราซีนในตัวอย่างน้ำนี้มีค่าเกินกว่าค่า maximum contamination level goals (MCLG) ของอะทราซีนในน้ำดื่มที่กำหนดไว้โดย U.S. EPA ซึ่งไม่ควรมีค่าเกินกว่า 0.003 mg/L (U.S. EPA, 2012 และ WHO (2011) ได้กำหนดปริมาณที่ยอมรับ

ได้มากที่สุดของอะทราซีนและการเผาผลาญของ chloro-s-triazine ในน้ำไว้ที่ 0.1 mg/L แต่อย่างไรก็ตามแม่น้ำน่านไม่ใช่แหล่งน้ำที่นำไปใช้ในการบริโภคโดยตรง รายงานเกี่ยวกับระดับการปนเปื้อนของอะทราซีนในแหล่งน้ำประเทศไทย ได้มีการรายงานไว้ไม่มากนัก ตัวอย่างเช่น การศึกษาของ Chanchek (2007) รายงานการปนเปื้อนของอะทราซีนในน้ำที่เก็บจากแม่น้ำป่าสัก ภาคกลางของประเทศไทย มีค่าเท่ากับ 1.83 µg/L และการศึกษาของ Sakunthengtong และคณะ (2001) ในภาคกลางและภาคตะวันออกเฉียงเหนือพบการปนเปื้อนของอะทราซีนในน้ำใต้ดิน มีค่าตั้งแต่ 0.5-4.0 µg/L ระดับการปนเปื้อนของอะทราซีนในตัวอย่างน้ำจากแม่น้ำน่านที่ตรวจพบจากการศึกษานี้ มีค่าสูงกว่าค่ามาตรฐานคุณภาพน้ำใต้ดินที่กำหนดไว้โดยกรมควบคุมมลพิษ ซึ่งไม่ควรมีค่าเกินกว่า 3 µg/L

การตรวจพบระดับการปนเปื้อนของอะทราซีนในน้ำนั้น เป็นการบ่งชี้ว่ามีการใช้สารฆ่าวัชพืชคือ อะทราซีน อย่างมากในพื้นที่ทำการเกษตรในบริเวณติดกับแม่น้ำน่าน เพราะด้วยคุณสมบัติของอะทราซีนที่มีการสลายตัวในสิ่งแวดล้อมอย่างรวดเร็ว มีองค์ประกอบที่มีคุณสมบัติละลายน้ำได้ แต่ก็สามารถถูกพัดพาไปถึงแหล่งน้ำต่างๆ และยึดเกาะกับอนุภาคดินเหนียวได้อย่างแน่นหนาเช่นเดียวกัน ทำให้จุลินทรีย์ย่อยสลายได้ยากขึ้น และถ้ามีการใช้ติดต่อกันเป็นระยะเวลานานก็สามารถสะสมในสิ่งแวดล้อมได้ (ภิญญา จำรัสกุล, 2539) อีกทั้งการปนเปื้อนของอะทราซีนในระดับที่สูงในเดือนมกราคม พ.ศ. 2554 นั้นมีความสัมพันธ์กับกิจกรรมทางการเกษตรบริเวณพื้นที่ทำการเกษตรตลอดสองฝั่งแม่น้ำน่านในจังหวัดน่าน โดยในช่วงเดือนมกราคมเป็นช่วงของการเพาะปลูกในช่วงปี (Homsby และคณะ, 1995; Meister, 1999) สะท้อนให้เห็นถึงความสัมพันธ์ว่าในช่วงทำการเพาะปลูก เกษตรกรมีการนำสารฆ่าวัชพืชมาใช้ในพื้นที่เกษตรกรรมอย่างมาก จึงเกิดการชะลงสู่แม่น้ำและปนเปื้อนอยู่ในแม่น้ำน่านและเกิดการปนเปื้อนอยู่ในดินตะกอน และในน้ำ ดังนั้นจึงตรวจพบอะทราซีนในระดับที่สูง อีกทั้งการตรวจพบอะทราซีนในระดับสูงในเดือนมกราคม พ.ศ. 2554 อาจขึ้นอยู่กับปัจจัยทางกายภาพต่าง ๆ เช่น ระดับของปริมาตรน้ำในแม่น้ำ ในเดือนกรกฎาคมและตุลาคม พ.ศ. 2553 เป็นช่วงฤดูฝน ระดับน้ำในแม่น้ำมีปริมาตรสูงขึ้นมากกว่าในเดือนมกราคมและเมษายน พ.ศ. 2554 ซึ่งเป็นฤดูแล้งที่มีปริมาตรน้ำต่ำ การตรวจพบระดับการปนเปื้อนของอะทราซีนที่สูงในเดือนมกราคม พ.ศ. 2554 จึงอาจเกี่ยวข้องกับปริมาตรน้ำที่น้อยในฤดูแล้งกับมีการใช้อะทราซีนในพื้นที่ทำการเกษตรในปริมาณมาก ปริมาตรน้ำที่ต่ำในเดือนมกราคม พ.ศ. 2554 อาจทำให้อนุภาคของอะทราซีนมีการแพร่กระจายในเม่น้ำอย่างเข้มข้น ส่วนในเดือนกรกฎาคม พ.ศ. 2553 เป็นช่วงฤดูฝน ปริมาตรน้ำในแม่น้ำน่านสูงขึ้นอาจส่งผลให้อะทราซีนถูกเจือจางสูงโดยน้ำในแม่น้ำน่านได้ ตัวผลการวิเคราะห์ที่พบระดับความ

เข้มข้นของอะทราซีนลดลงจนต่ำมากหรือไม่สามารถตรวจวัดค่าการปนเปื้อนได้ อย่างไรก็ตามข้อสมมติฐานที่กล่าวมานั้น ไม่สามารถอธิบายถึงการที่ตรวจไม่พบอะทราซีนในเดือนเมษายน พ.ศ. 2554 ทั้งที่เป็นฤดูแล้ง อาจเป็นไปได้ว่า การที่ไม่สามารถตรวจพบอะทราซีนในเดือนเมษายนได้นั้น เป็นเพราะ ในเดือนเมษายนอาจไม่มีการทำการเกษตร อย่างไรก็ตามปัจจัยกายภาพต่าง ๆ ของแต่ละสถานที่มีความแตกต่างกันไป ปัจจัยทางกายภาพที่จำเพาะของสถานที่นั้น ๆ อาจกระทบต่อปริมาณการปนเปื้อนของอะทราซีนที่ตรวจพบ เช่น ภูมิอากาศ ปริมาณแสงแดด ลักษณะของการทำการเกษตร ชนิดพืชผลที่เพาะปลูก หรือลักษณะการนำอะทราซีนมาใช้ในแปลงเกษตร เป็นต้น

อย่างไรก็ตาม มีการรายงานก่อนหน้านี้ถึงการปนเปื้อนอะทราซีนที่ตรวจพบได้ในดินตะกอนในประเทศไทย เมื่อนำมาเปรียบเทียบกับปริมาณการปนเปื้อนอะทราซีนที่ตรวจพบในการศึกษานี้ พบว่าผลที่ได้จากการศึกษานี้อยู่ในระดับต่ำกว่ารายงาน โดย Chanchek ในปี 2007 รายงานผลของอนุภาคอะทราซีน ที่ตรวจพบในดินตะกอนที่เก็บตัวอย่างจากแม่น้ำป่าสักในฤดูฝน มีค่าเท่ากับ 0.62 μg/kg และในฤดูแล้งมีค่าเท่ากับ 0.53 μg/kg อีกทั้งยังมีการรายงานอนุภาคของอะทราซีนที่ตรวจพบในดินตะกอนทีเก็บตัวอย่างจากห้วยกะโปะ น้ำหนาว จังหวัดเพชรบูรณ์ โดยเก็บในช่วงที่มีน้ำไหล่บ่า ปริมาตรน้ำสูงขึ้น ระหว่างเดือนสิงหาคมถึงพฤศจิกายน มีค่าเฉลี่ยการปนเปื้อนเท่ากับ 44.9, 26.0, 8.0, และ 30.4 μg/kg (Siripat, 2009) มีรายงานการปนเปื้อนของอะทราซีนในน้ำและดินตะกอนจากลำธารบริเวณห้วยกะโปะ จังหวัดเพชรบูรณ์ มีค่าเท่ากับ 4.7 μg/L และ 27.42 μg/kg ตามลำดับ (Phewnil และคณะ, 2012)

เป็นที่น่าสังเกตว่า การปนเปื้อนของอะทราซีนในฤดูแล้งมีค่าสูงกว่าฤดูฝน Frank และคณะ, 1982 รายงานการปนเปื้อนอะทราซีนในดินมีค่าระหว่าง 1.1-1.6 μg/kg การพบระดับอะทราซีนในฤดูแล้งสูงกว่าฤดูฝน เนื่องจากเหตุผลที่ว่า ในฤดูแล้งระดับปริมาตรน้ำที่ลดต่ำลง ส่งผลให้อนุภาคของอะทราซีนที่ถูกชะล้างลงมาจากแหล่งการเกษตรไม่สามารถเคลื่อนที่ได้ดี จึงเกิดการยึดเกาะกับอนุภาคดินตะกอนได้ดีกว่าในฤดูฝนที่มีปริมาตรน้ำสูงกว่า ทำให้อนุภาคของอะทราซีนที่ถูกชะล้างลงมาถูกพัดพาไปกับกระแสน้ำ สอดคล้องกับงานของ Trzedsi และ Kowalski ในปี 1975 โดยรายงานว่าปริมาณของน้ำฝนเป็นปัจจัยหลักที่ช่วยทำให้อนุภาคของสารฆ่าวัชพืชในดินเคลื่อนที่ได้ดียิ่งขึ้น เมื่อปริมาณน้ำเพิ่มขึ้นทำให้การเคลื่อนย้ายของเหล่าอนุภาคของสารฆ่าวัชพืชดีขึ้น และส่งผลให้การดูดซึมของอะทราซีนเข้าสู่อนุภาคดินลดน้อยลง

จากผลการวิเคราะห์การปนเปื้อนไกลโฟเซตและพาราควอทในตัวอย่างดินตะกอนและน้ำในการศึกษาครั้งนี้ ไม่สามารถตรวจพบปริมาณการปนเปื้อนของไกลโฟเซตและพาราควอทได้ เป็นไปได้ว่าระดับการปนเปื้อนของไกลโฟเซตและพาควอท อยู่ในระดับที่ต่ำกว่า limit of detection

หรือสารฆ่าวัชพืชทั้งสองชนิดได้สลายตัวไประหว่างถูกชะลงสู่แม่น้ำ เนื่องด้วยคุณสมบัติทางกายภาพและโครงสร้างของไกลโฟเซตที่มีคุณสมบัติที่สลายตัวได้อย่างรวดเร็วเมื่อถูกชะลงสู่แหล่งน้ำ อีกทั้งคุณสมบัติของไกลโฟเซตมีความสัมพันธ์กับการเกาะยึดกับติดตะกอน เมื่อไกลโฟเซตสลายตัวได้อย่างรวดเร็วในน้ำ โอกาสที่อนุภาคของไกลโฟเซตจะไปยึดเกาะกับอนุภาคของดินตะกอนก็ลดน้อยลง ดังนั้นเป็นไปได้ว่าปริมาณการสะสมของไกลโฟเซตในสิ่งแวดล้อมก็ลดน้อยลงไปด้วย (Borggaard และ Gimsing 2008; Sanchis และ 2012) พาราควอทก็เช่นเดียวกัน มีคุณสมบัติในการยึดเกาะกับอนุภาคดินได้ดี (Smith และ Mayfieid, 1978; U.S. EPA 2009) แต่เมื่อถูกชะลงสู่แหล่งน้ำ พาราควอทจะสลายได้อย่างรวดเร็วตัวภายใน 8-27 วัน (Eisler, 1990) ถึงอย่างไรก็ตาม แม้ในการวิเคราะห์การปนเปื้อนของสารฆ่าวัชพืชครั้งนี้จะไม่พบการปนเปื้อนในดินตะกอนและน้ำจากแม่น้ำน่าน แต่ก็ไม่สามารถสรุปได้ว่าไม่มีการตกค้างของสารฆ่าวัชพืชในสิ่งแวดล้อมในพื้นที่ เพราะในบริเวณพื้นที่ยังคงมีการใช้สารฆ่าวัชพืชกันเป็นจำนวนมาก (Wongwichit และคณะ, 2010)

ตารางที่ 3.1 ระดับการปนเปื้อนของสารฆ่าวัชพืชในดินตะกอนและน้ำที่เก็บตัวอย่างจากแม่น้ำน่าน อำเภอเวียงสา จังหวัดน่าน ตั้งแต่เดือนกรกฎาคม พ.ศ. 2553 จนถึงเดือนเมษายน พ.ศ. 2554

	กรกฎาคม 2553			ตุลาคม 2553			มกราคม 2554			เมษายน 2554		
	Paraquat	Glyphosate	Atrazine	Paraquat	Glyphosate	Atrazine	Paraquat	Glyphosate	Atrazine	Paraquat	Glyphosate	Atrazine
ดินตะกอน (mg/kg)	ND	ND	0.01	ND	ND	ND	ND	ND	0.24	ND	ND	ND
น้ำ (mg/L)	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	0.15	ND	ND	ND

หมายเหตุ

ND = ไม่สามารถตรวจวัดได้หรือระดับการตรวจวัดต่ำกว่าค่าขีดจำกัดการตรวจวัดที่สามารถตรวจวัดได้

ค่าขีดจำกัดการตรวจวัด (limit of detection: LOD) สำหรับการปนเปื้อนของพาราควอทในดินตะกอนเท่ากับ 0.01 mg/kg และในน้ำเท่ากับ 0.01 mg/L

ค่าขีดจำกัดการตรวจวัด (limit of detection: LOD) สำหรับการปนเปื้อนของไกลโฟเซตในดินตะกอนเท่ากับ 0.01 mg/kg และในน้ำเท่ากับ 0.005 mg/L

ค่าขีดจำกัดการตรวจวัด (limit of detection: LOD) สำหรับการปนเปื้อนของอะทราซีนในดินตะกอนเท่ากับ 0.01 mg/kg และในน้ำเท่ากับ 0.01 mg/L

3.3.2 ชนิดและปริมาณการปนเปื้อนของสารฆ่าวัชพืชในปลากะมัง

ผลการวิเคราะห์ชนิดและปริมาณการปนเปื้อนของสารฆ่าวัชพืชในปลากะมัง ที่เก็บตัวอย่างจากแม่น้ำน่าน ในช่วงฤดูฝน เดือนกรกฎาคม พ.ศ. 2553 พบสารฆ่าวัชพืชที่มีการปนเปื้อนในปลากะมังทั้ง 3 ชนิด ได้แก่ อะทราซีน ไกลโฟเซต และพาราควอท ดังนี้

3.3.4.1 การปนเปื้อนของอะทราซีนในปลากะมัง

ผลการวิเคราะห์ปริมาณการปนเปื้อนของอะทราซีน ในปลากะมังที่เก็บตัวอย่างจากแม่น้ำน่าน ในช่วงฤดูฝน เดือนกรกฎาคม พ.ศ. 2553 ในเพศผู้พบปริมาณการปนเปื้อนของอะทราซีน มีค่าเท่ากับ 33.046 ng/g ส่วนในเพศเมียพบการปนเปื้อนของอะทราซีน มีค่าเท่ากับ 10.068±0.988 ng/g และผลการวิเคราะห์ปริมาณการปนเปื้อนของอะทราซีนในปลากะมังโดยการรวมเพศพบปริมาณการปนเปื้อนของอะทราซีน มีค่าเท่ากับ 14.663±4.659 ดังแสดงในตารางที่ 3.2

3.3.4.2การปนเปื้อนของไกลโฟเซตในปลากะมัง

ผลการวิเคราะห์ปริมาณการปนเปื้อนของไกลโฟเซต ในปลากะมังที่เก็บตัวอย่างจากแม่น้ำน่าน ในช่วงฤดูฝน เดือนกรกฎาคม พ.ศ. 2553 ในเพศผู้พบปริมาณการปนเปื้อนของไกลโฟเซต มีค่าเท่ากับ 1.255 ng/g ส่วนในเพศเมียพบการปนเปื้อนของไกลโฟเซต มีค่าเท่ากับ 1.076±0.060 ng/g และผลการวิเคราะห์ปริมาณการปนเปื้อนของไกลโฟเซตในปลากะมังโดยการรวมเพศพบปริมาณการปนเปื้อนของไกลโฟเซต มีค่าเท่ากับ 1.121±0.062 ดังแสดงในตารางที่ 3.2

3.3.4.3 การปนเปื้อนของพาราควอทในปลากะมัง

ผลการวิเคราะห์ปริมาณการปนเปื้อนของพาราควอท ในปลากะมังที่เก็บตัวอย่างจากแม่น้ำน่าน ในช่วงฤดูฝน เดือนกรกฎาคม พ.ศ. 2553 ในเพศผู้พบปริมาณการปนเปื้อนของพาราควอท มีค่าเท่ากับ 68.169 ng/g ส่วนในเพศเมียพบการปนเปื้อนของพาราควอท มีค่าเท่ากับ 42.059±1.324 ng/g และผลการวิเคราะห์ปริมาณการปนเปื้อนของพาราควอทในปลากะมังโดยการรวมเพศพบปริมาณการปนเปื้อนของพาราควอท มีค่าเท่ากับ 48.586±6.594 ดังแสดงในตารางที่ 3.2

ตารางที่ 3.2 ระดับการปนเปื้อนของสารฆ่าวัชพืชในปลากะมังที่เก็บตัวอย่างจากแม่น้ำน่าน อำเภอเวียงสา จังหวัดน่าน ในเดือนกรกฎาคม พ.ศ. 2553

	อะทราซีน (ng/g)	ไกลโฟเซต (ng/g)	พาราควอท (ng/g)
เพศ			
ผู้	33.046 (n=1)	1.255 (n=1)	68.169 (n=1)
เมีย	10.068±0.988 (n=4)	1.076±0.060 (n=3)	42.059±1.324 (n=3)
รวมเพศ	14.663±4.659 (n=5)	1.121±0.062 (n=4)	48.586±6.594 (n=4)

หมายเหตุ

- ค่าร้อยละการกลับคืนของอะทราซีนเท่ากับ 140.492%
- ค่าขีดจำกัดการตรวจวัด (limit of detection: LOD) สำหรับการปนเปื้อนของอะทราซีนเท่ากับ 0.53 ng/g
- ค่าร้อยละการกลับคืนของไกลโฟเซตเท่ากับ 53.176 %
- ค่าขีดจำกัดการตรวจวัด (limit of detection: LOD) สำหรับการปนเปื้อนของไกลโฟเซตเท่ากับ 0.21 ng/g
- ค่าร้อยละการกลับคืนของพาราควอทเท่ากับ 176.865 %
- ค่าขีดจำกัดการตรวจวัด (limit of detection: LOD) สำหรับการปนเปื้อนของพาราควอทเท่ากับ 9.89 ng/g

3.3.3 ชนิดและปริมาณการปนเปื้อนของสารฆ่าวัชพืชในเนื้อเยื่อตับของปลากะมัง

ผลการวิเคราะห์ชนิดและปริมาณการปนเปื้อนของสารฆ่าวัชพืช ในเนื้อเยื่อตับของปลากะมัง ที่เก็บตัวอย่างจากแม่น้ำน่าน ในช่วงฤดูฝน เดือนกรกฎาคมและเดือนตุลาคม พ.ศ. 2553 และในช่วงฤดูแล้ง เดือนมกราคม และเดือนเมษายน พ.ศ. 2554 เนื่องจากในการเก็บตัวอย่างจริงในเดือนกรกฎาคม พ.ศ. 2553 ทำการเก็บตัวอย่างเนื้อเยื่อปลาทั้งตัว โดยไม่ได้มีการผ่าตัดเปิดช่องท้องเพื่อเก็บอวัยวะออกมา ดังนั้นจึงไม่มีผลการวิเคราะห์ชนิดและปริมาณการปนเปื้อนของสารฆ่าวัชพืชในเนื้อเยื่อตับของปลากะมังในเดือนกรกฎาคม พ.ศ. 2553 ผลที่ได้จากการวิเคราะห์ชนิดและปริมาณการปนเปื้อนของสารฆ่าวัชพืชในเนื้อเยื่อตับของปลากะมังจึงแสดงผลเพียง 3 เดือนเท่านั้น คือ ในช่วงฤดูฝน คือเดือนตุลาคม พ.ศ. 2553 และในช่วงฤดูแล้ง คือเดือนมกราคม และเมษายน พ.ศ. 2554 จากผลที่ได้ตรวจพบชนิดของสารฆ่าวัชพืชที่มีการปนเปื้อนในเนื้อเยื่อตับของปลากะมังทั้ง 3 ชนิด ได้แก่ อะทราซีน ไกลเซต และพาราควอท

3.3.3.1 การปนเปื้อนของอะทราซีนในเนื้อเยื่อตับของปลากะมัง

เนื่องจากในการศึกษานี้จำนวนตัวอย่างของปลากะมัง *Puntioplites proctozysron* ที่เก็บได้ในแต่ละเดือนนั้นมีจำนวนไม่เท่ากันโดยทำการเลือกเก็บตัวอย่างปลาตัวเต็มวัยที่มีความยาวลำตัวมากกว่า 11 เซนติเมตร (ดูจำนวนตัวอย่างทั้งหมดได้จากตารางที่ 4.1) เก็บให้ได้อย่างน้อยครั้งละ 10 ตัว โดยเลือกเพศผู้ 5 ตัว และเพศเมีย 5 ตัว หลังจากที่ทำการผ่าเก็บเนื้อเยื่อและนำเนื้อเยื่อไปผ่านกระบวนการดึงน้ำออกโดย freeze drier แล้ว น้ำหนักที่ได้หลังจากการผ่านกระบวนการดึงน้ำออกส่งผลให้เนื้อเยื่อมีน้ำหนักน้อยมาก จึงทำการรวมตัวอย่างเข้าด้วยกันเพื่อรวมน้ำหนักให้ได้ตัวอย่างละ 0.1 กรัม เพื่อนำมาผ่านขั้นตอนการสกัดและนำไปวิเคราะห์หาชนิดและปริมาณของสารฆ่าวัชพืช (ดูจำนวนตัวอย่างที่ได้จากการรวมน้ำหนักเข้าด้วยกันได้จากตารางที่ 3.3)

จากการวิเคราะห์ข้อมูล โดยใช้ Student's t-test เพื่อเปรียบเทียบความแตกต่างระหว่างเพศในเดือนตุลาคม พ.ศ. 2553 และเดือนมกราคม พ.ศ. 2554 พบว่าปริมาณการปนเปื้อนอะทราซีนในเนื้อเยื่อตับไม่มีความแตกต่างระหว่างเพศผู้และเพศเมีย ($P>0.05$) ส่วนปริมาณการปนเปื้อนอะทราซีนในเนื้อเยื่อตับในเดือนเมษายน พ.ศ. 2554 ไม่สามารถวิเคราะห์ผลได้ จึงทำการรวมข้อมูลเพศผู้และเพศเมีย จากนั้นนำไปวิเคราะห์เพื่อเปรียบเทียบความแตกต่างในแต่ละช่วงเวลา โดย Analysis of Variance (ANOVA)

ผลการวิเคราะห์ปริมาณการปนเปื้อนของอะทราซีน ในเนื้อเยื่อตับของปลากะมัง ที่เก็บตัวอย่างจากแม่น้ำน่าน ในช่วงฤดูฝน เดือนตุลาคม พ.ศ. 2553 และในช่วงฤดูแล้ง เดือน มกราคม และเดือนเมษายน พ.ศ. 2554 ในเพศผู้พบปริมาณการปนเปื้อนของอะทราซีนในทุก ช่วงเวลาที่ทำการเก็บตัวอย่าง โดยที่พบการปนเปื้อนสูงในเดือนตุลาคม พ.ศ. 2553 และมกราคม 2554 มีค่าเท่ากับ 26.035±5.013 ng/g และ 26.035±1.683 ng/g ตามลำดับ ส่วนในเพศเมียพบ การปนเปื้อนของอะทราซีนในทุกช่วงเวลาที่ทำการเก็บตัวอย่างเช่นกัน แต่พบการปนเปื้อนมีค่าสูง ถึง 27.314±11.153 ng/g ในเดือนมกราคม พ.ศ. 2554 และผลการวิเคราะห์ปริมาณการปนเปื้อน ของอะทราซีนในเนื้อเยื่อตับของปลากะมังโดยการรวมเพศ พบปริมาณการปนเปื้อนของอะทราซีน มีค่าสูงในเดือนมกราคม พ.ศ. 2554 เท่ากับ 26.802±6.140 ng/g ดังแสดงในตารางที่ 3.3

จากการวิเคราะห์ทางสถิติโดยใช้ Analysis of Variance (ANOVA) พบว่า ระดับการปนเปื้อนของอะทราซีนไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P>0.05$) ระหว่าง เดือนตุลาคม พ.ศ. 2553 มกราคม พ.ศ. 2554 และเมษายน พ.ศ. 2554

ตารางที่ 3.3 ระดับการปนเปื้อนของอะทราซีนในเนื้อเยื่อตับที่เก็บตัวอย่างจากแม่น้ำน่าน อำเภอเวียงสา จังหวัดน่าน ตั้งแต่เดือนตุลาคม พ.ศ. 2553 จนถึงเดือนเมษายน พ.ศ. 2554

อะทราซีน (ng/g)			
เพศ	ตุลาคม 2553	มกราคม 2554	เมษายน 2554
ผู้	26.035±5.013 (n=3)	26.035±1.683 (n=2)	22.410 (n=1)
เมีย	9.633±0.270 (n=2)	27.314±11.153 (n=3)	11.950±1.707 (n=2)
ค่าเฉลี่ย	19.486±4.816 (n=5)	26.802±6.140 (n=5)	15.434±3.624 (n=3)

หมายเหตุ

- ไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (one way ANOVA, $p > 0.05$) ระหว่างเดือน
- ค่าร้อยละการกลับคืนของอะทราซีนเท่ากับ 196.063%
- ค่าขีดจำกัดการตรวจวัด (limit of detection: LOD) สำหรับการปนเปื้อนของอะทราซีนเท่ากับ 0.530 ng/g

3.3.3.2 การปนเปื้อนของไกลโฟเซตในเนื้อเยื่อตับของปลากะมัง

เนื่องจากในการศึกษานี้จำนวนตัวอย่างของปลากะมัง *Puntioplites proctozysron* ที่เก็บได้ในแต่ละเดือนนั้นมีจำนวนไม่เท่ากันโดยทำการเลือกเก็บตัวอย่างปลาตัวเต็มวัยที่มีความยาวลำตัวมากกว่า 11 เซนติเมตร (ดูจำนวนตัวอย่างทั้งหมดได้จากตารางที่ 4.1) เก็บให้ได้อย่างน้อยครั้งละ 10 ตัว โดยเลือกเพศผู้ 5 ตัว และเพศเมีย 5 ตัว หลังจากที่ทำการผ่าเก็บเนื้อเยื่อและนำเนื้อเยื่อไปผ่านกระบวนการดึงน้ำออกโดย freeze drier แล้ว น้ำหนักที่ได้หลังจากการผ่านกระบวนการดึงน้ำออกส่งผลให้เนื้อเยื่อมีน้ำหนักน้อยมาก จึงทำการรวมตัวอย่างเข้าด้วยกันเพื่อรวมน้ำหนักให้ได้ตัวอย่างละ 0.1 กรัม เพื่อนำมาผ่านขั้นตอนการสกัดและนำไปวิเคราะห์หาชนิดและปริมาณของสารฆ่าวัชพืช (ดูจำนวนตัวอย่างที่ได้จากการรวมน้ำหนักเข้าด้วยกันได้จากตารางที่ 3.4)

จากการวิเคราะห์ข้อมูล โดยใช้ Student’s t-test เพื่อเปรียบเทียบความแตกต่างระหว่างเพศในเดือนตุลาคม พ.ศ. 2553 และเดือนมกราคม พ.ศ. 2554 พบว่าปริมาณการปนเปื้อนไกลโฟเซตในเนื้อเยื่อตับไม่มีความแตกต่างระหว่างเพศผู้และเพศเมีย ($P>0.05$) ส่วนปริมาณการปนเปื้อนไกลโฟเซตในเนื้อเยื่อตับในเดือนเมษายน พ.ศ. 2554 ไม่สามารถวิเคราะห์ผลได้ จึงทำการรวมข้อมูลเพศผู้และเพศเมีย จากนั้นนำไปวิเคราะห์เพื่อเปรียบเทียบความแตกต่างในแต่ละช่วงเวลา โดย Analysis of Variance (ANOVA)

ผลการวิเคราะห์ปริมาณการปนเปื้อนของไกลโฟเซต ในเนื้อเยื่อตับของปลากะมังที่เก็บตัวอย่างจากแม่น้ำน่าน ในช่วงฤดูฝน เดือนตุลาคม พ.ศ. 2553 และในช่วงฤดูแล้ง เดือนมกราคม และเดือนเมษายน พ.ศ. 2554 ในเพศผู้พบปริมาณการปนเปื้อนของไกลโฟเซตในทุกช่วงเวลาที่ทำการเก็บตัวอย่าง โดยที่พบการปนเปื้อนสูงในเดือนมกราคม พ.ศ. 2554 มีค่าเท่ากับ 0.593±0.028 ng/g ส่วนในเพศเมียพบการปนเปื้อนของไกลโฟเซตในทุกช่วงเวลาที่ทำการเก็บตัวอย่างเช่นกัน แต่พบการปนเปื้อนมีค่าสูง 0.606±0.035 ng/g ในเดือนเมษายน พ.ศ. 2554 และผลการวิเคราะห์ปริมาณการปนเปื้อนของไกลโฟเซตในเนื้อเยื่อตับของปลากะมัง โดยการรวมเพศพบปริมาณการปนเปื้อนของไกลโฟเซตมีค่าสูงในเดือนมกราคม พ.ศ. 2554 เท่ากับ 0.590±0.032 ng/g ดังแสดงในตารางที่ 3.4

จากการวิเคราะห์ทางสถิติโดยใช้ Analysis of Variance (ANOVA) พบว่าระดับการปนเปื้อนของไกลโฟเซตไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P>0.05$) ระหว่างเดือนตุลาคม พ.ศ. 2553 มกราคม พ.ศ. 2554 และเมษายน พ.ศ. 2554

ตารางที่ 3.4 ระดับการปนเปื้อนของไกลโฟเซตในเนื้อเยื่อตับที่เก็บตัวอย่างจากแม่น้ำน่าน อำเภอเวียงสา จังหวัดน่าน ตั้งแต่เดือนตุลาคม พ.ศ. 2553 จนถึงเดือนเมษายน พ.ศ. 2554

ไกลโฟเซต (ng/g)			
เพศ	ตุลาคม 2553	มกราคม 2554	เมษายน 2554
ผู้	0.533±0.130 (n=2)	0.593±0.028 (n=2)	0.384 (n=1)
เมีย	0.438±0.019 (n=2)	0.587±0.072 (n=2)	0.606±0.035 (n=2)
ค่าเฉลี่ย	0.485±0.061 (n=4)	0.590±0.032 (n=4)	0.532±0.077 (n=3)

หมายเหตุ

- ไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (one way ANOVA, $p > 0.05$) ระหว่างเดือน
- ค่าร้อยละการกลับคืนของไกลโฟเซตเท่ากับ 34.71%
- ค่าขีดจำกัดการตรวจวัด (limit of detection: LOD) สำหรับการปนเปื้อนของไกลโฟเซตเท่ากับ 0.21 ng/g

3.3.3.3 การปนเปื้อนของพาราควอทในเนื้อเยื่อตับของปลากะมัง

เนื่องจากในการศึกษานี้จำนวนตัวอย่างของปลากะมัง *Puntioplites proctozysron* ที่เก็บได้ในแต่ละเดือนนั้นมีจำนวนไม่เท่ากันโดยทำการเลือกเก็บตัวอย่างปลาตัวเต็มวัยที่มีความยาวลำตัวมากกว่า 11 เซนติเมตร (ดูจำนวนตัวอย่างทั้งหมดได้จากตารางที่ 4.1) เก็บให้ได้อย่างน้อยครั้งละ 10 ตัว โดยเลือกเพศผู้ 5 ตัว และเพศเมีย 5 ตัว หลังจากที่ทำการผ่าเก็บเนื้อเยื่อและนำเนื้อเยื่อไปผ่านกระบวนการดึงน้ำออกโดย freeze drier แล้ว น้ำหนักที่ได้หลังจากการผ่านกระบวนการดึงน้ำออกส่งผลให้เนื้อเยื่อมีน้ำหนักน้อยมาก จึงทำการรวมตัวอย่างเข้าด้วยกันเพื่อรวมน้ำหนักให้ได้ตัวอย่างละ 0.1 กรัม เพื่อนำมาผ่านขั้นตอนการสกัดและนำไปวิเคราะห์หาชนิดและปริมาณของสารฆ่าวัชพืช (ดูจำนวนตัวอย่างที่ได้จากการรวมน้ำหนักเข้าด้วยกันได้จากตารางที่ 3.5)

จากการวิเคราะห์ข้อมูล โดยใช้ Student's t-test เพื่อเปรียบเทียบความแตกต่างระหว่างเพศในเดือนตุลาคม พ.ศ. 2553 และเดือนมกราคม พ.ศ. 2554 พบว่าปริมาณการปนเปื้อนพาราควอทในเนื้อเยื่อตับไม่มีความแตกต่างระหว่างเพศผู้และเพศเมีย ($P>0.05$) ส่วนปริมาณการปนเปื้อนพาราควอทในเนื้อเยื่อตับในเดือนเมษายน พ.ศ. 2554 ไม่สามารถวิเคราะห์ผลได้ จึงทำการรวมข้อมูลเพศผู้และเพศเมีย จากนั้นนำไปวิเคราะห์เพื่อเปรียบเทียบความแตกต่างในแต่ละช่วงเวลา โดย Analysis of Variance (ANOVA)

ผลการวิเคราะห์ปริมาณการปนเปื้อนของพาราควอท ในเนื้อเยื่อตับของปลากะมังที่เก็บตัวอย่างจากแม่น้ำน่าน ในช่วงฤดูฝน เดือนตุลาคม พ.ศ. 2553 และในช่วงฤดูแล้งเดือนมกราคม และเดือนเมษายน พ.ศ. 2554 ในเพศผู้พบปริมาณการปนเปื้อนของพาราควอทในทุกช่วงเวลาที่ทำการเก็บตัวอย่าง โดยที่พบการปนเปื้อนสูงในเดือนตุลาคม พ.ศ. 2553 มีค่าเท่ากับ 31.291±7.456 ng/g ส่วนในเพศเมียพบการปนเปื้อนของพาราควอทในทุกช่วงเวลาที่ทำการเก็บตัวอย่างเช่นกัน แต่พบการปนเปื้อนมีค่าสูง ถึง44.267±2.350 ng/g ในเดือน เมษายน พ.ศ. 2554 และผลการวิเคราะห์ปริมาณการปนเปื้อนของพาราควอทในเนื้อเยื่อตับของปลากะมังโดยการรวมเพศ พบปริมาณการปนเปื้อนของพาราควอทมีค่าสูงในเดือนเมษายน พ.ศ. 2554 เท่ากับ 44.267±2.350 ng/g ดังแสดงในตารางที่ 3.5

จากการวิเคราะห์ทางสถิติโดยใช้ Analysis of Variance (ANOVA) พบว่าระดับการปนเปื้อนของพาราควอทไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P>0.05$) ระหว่างเดือนตุลาคม พ.ศ. 2553 มกราคม พ.ศ. 2554 และเมษายน พ.ศ. 2554

ตารางที่ 3.5 ระดับการปนเปื้อนของพาราควอทในเนื้อเยื่อตับที่เก็บตัวอย่างจากแม่น้ำน่าน อำเภอเวียงสา จังหวัดน่าน ตั้งแต่เดือนตุลาคม พ.ศ. 2553 จนถึงเดือนเมษายน พ.ศ. 2554

พาราควอท (ng/g)			
เพศ	ตุลาคม 2553	มกราคม 2554	เมษายน 2554
ผู้	31.291±7.456 (n=2)	30.687±8.841 (n=2)	-
เมีย	39.176±7.309 (n=2)	27.198±9.219 (n=2)	44.267±2.350 (n=2)
ค่าเฉลี่ย	35.233±4.832 (n=2)	28.943±5.311 (n=2)	44.267±2.350 (n=2)

หมายเหตุ

- ไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (one way ANOVA, $p > 0.05$) ระหว่างเดือน
- ค่าร้อยละการกลับคืนของพาราควอทเท่ากับ 329.330%
- ค่าขีดจำกัดการตรวจวัด (limit of detection: LOD) สำหรับการปนเปื้อนของพาราควอทเท่ากับ 9.89 ng/g
- (-) ไม่มีตัวอย่างมาวิเคราะห์

3.3.4 ชนิดและปริมาณการปนเปื้อนของสารฆ่าวัชพืชในเนื้อเยื่อไตของปลากะมัง

ผลการวิเคราะห์ชนิดและปริมาณการปนเปื้อนของสารฆ่าวัชพืช ในเนื้อเยื่อไตของปลากะมัง ที่เก็บตัวอย่างจากแม่น้ำน่าน ในช่วงฤดูฝน เดือนกรกฎาคม และตุลาคม พ.ศ. 2553 และในช่วงฤดูแล้ง เดือนมกราคม และเมษายน พ.ศ. 2554 เนื่องจากในการเก็บตัวอย่างจริงในเดือนกรกฎาคม 2553 ทำการเก็บตัวอย่างเนื้อเยื่อปลาทั้งตัว โดยไม่ได้มีการผ่าตัดเปิดช่องท้องเพื่อเก็บอวัยวะไตออกมา ดังนั้นจึงไม่มีผลการวิเคราะห์ชนิดและปริมาณการปนเปื้อนของสารฆ่าวัชพืชในเนื้อเยื่อไตของปลากะมังในเดือนกรกฎาคม พ.ศ. 2553 และในขั้นตอนการสกัด ไตที่ผ่านกระบวนการดึงน้ำออกโดย freeze drier แล้ว มีน้ำหนักไม่เพียงพอ จึงทำการรวมตัวอย่างโดยไม่มีการแยกเพศเพื่อให้ได้น้ำหนักรวมทั้งหมดเท่ากับ 0.1 กรัมต่อการนำไปสกัดเพื่อใช้ในการวิเคราะห์ปริมาณการปนเปื้อน (ดูจำนวนตัวอย่างที่ได้จากการรวมน้ำหนักเข้าด้วยกันได้จากตารางที่ 3.6) ผลที่ได้จากการวิเคราะห์ชนิดและปริมาณการปนเปื้อนของสารฆ่าวัชพืช ในเนื้อเยื่อไตของปลากะมัง แสดงผลเพียง 3 เดือนเท่านั้น คือ ในช่วงฤดูฝน คือ เดือนตุลาคม พ.ศ. 2553 และในช่วงฤดูแล้ง คือ เดือนมกราคม และเมษายน พ.ศ. 2554 และตรวจพบชนิดของสารฆ่าวัชพืชที่มีการปนเปื้อนในเนื้อเยื่อตับของปลากะมัง 3 ชนิด ได้แก่ อะทราซีน ไกลเซต และพาราควอท

3.3.4.1 การปนเปื้อนของอะทราซีนในเนื้อเยื่อไตของปลากะมัง

ผลการวิเคราะห์ปริมาณการปนเปื้อนของอะทราซีน ที่เก็บตัวอย่างจากแม่น้ำน่าน ในช่วงฤดูฝน เดือนตุลาคม พ.ศ. 2553 และในช่วงฤดูแล้ง เดือนมกราคม และเดือนเมษายน พ.ศ. 2554 พบปริมาณการปนเปื้อนของอะทราซีนในทุกช่วงเวลาที่ทำการเก็บตัวอย่าง โดยที่พบการปนเปื้อนสูงในเดือนตุลาคม พ.ศ. 2553 มีค่าเท่ากับ 46.524 ng/g ดังแสดงในตารางที่ 3.6

3.3.4.2 การปนเปื้อนของไกลโฟเซตในเนื้อเยื่อไตของปลากะมัง

ผลการวิเคราะห์ปริมาณการปนเปื้อนของไกลโฟเซต ที่เก็บตัวอย่างจากแม่น้ำน่าน ในช่วงฤดูฝน เดือนตุลาคม พ.ศ. 2553 และฤดูแล้ง เดือนมกราคม และเดือนเมษายน พ.ศ. 2554 พบปริมาณการปนเปื้อนของไกลโฟเซตในทุกช่วงเวลาที่ทำการเก็บตัวอย่าง โดยที่พบการปนเปื้อนสูงในเดือนเมษายน 2554 มีค่าเท่ากับ 0.478 ng/g ดังแสดงในตารางที่ 3.6

3.3.4.3 การปนเปื้อนของพาราควอทในเนื้อเยื่อไตของปลากะมัง

ผลการวิเคราะห์ปริมาณการปนเปื้อนของพาราควอท ที่เก็บตัวอย่างจากแม่น้ำน่าน ในช่วงฤดูฝน เดือนตุลาคม พ.ศ. 2553 และฤดูแล้ง เดือนมกราคม และเดือนเมษายน พ.ศ. 2554 พบปริมาณการปนเปื้อนของพาราควอทในทุกช่วงเวลาที่ทำการเก็บตัวอย่าง โดยที่พบการปนเปื้อนสูงในเดือนมกราคม พ.ศ. 2554 มีค่าเท่ากับ 44.442 ng/g ดังแสดงในตารางที่ 3.6

ตารางที่ 3.6 ระดับการปนเปื้อนของสารฆ่าวัชพืชในเนื้อเยื่อไตที่เก็บตัวอย่างจากแม่น้ำน่าน อำเภอเวียงสา จังหวัดน่าน ตั้งแต่เดือนตุลาคม พ.ศ. 2553 จนถึงเดือนเมษายน พ.ศ. 2554

	ตุลาคม 2553	มกราคม 2554	เมษายน 2554
อะทราซีน (ng/g)	46.524 (n=1)	35.398 (n=1)	44.134 (n=1)
ไกลโฟเซต (ng/g)	0.457 (n=1)	0.454 (n=1)	0.478 (n=1)
พาราควอท (ng/g)	25.082 (n=1)	63.528 (n=1)	44.442 (n=1)

หมายเหตุ

- ค่าร้อยละการกลับคืนของอะทราซีนเท่ากับ 33.769%
- ค่าขีดจำกัดการตรวจวัด (limit of detection: LOD) สำหรับการปนเปื้อนของอะทราซีน เท่ากับ 0.530 ng/g
- ค่าร้อยละการกลับคืนของไกลโฟเซตเท่ากับ 66.478 %
- ค่าขีดจำกัดการตรวจวัด (limit of detection: LOD) สำหรับการปนเปื้อนของไกลโฟเซต เท่ากับ 0.21 ng/g
- ค่าร้อยละการกลับคืนของพาราควอทเท่ากับ 186.516%
- ค่าขีดจำกัดการตรวจวัด (limit of detection: LOD) สำหรับการปนเปื้อนของพาราควอท เท่ากับ 9.89 ng/g

3.3.5 สหสัมพันธ์ระหว่างปริมาณการปนเปื้อนของสารฆ่าวัชพืชในสิ่งแวดล้อมและในเนื้อเยื่อตับและไตของปลากะมัง

จากผลการวิเคราะห์หาสหสัมพันธ์ระหว่างปริมาณการปนเปื้อนของสารฆ่าวัชพืช ในสิ่งแวดล้อมและเนื้อเยื่อตับและไตของปลากะมังด้วยสถิติ Pearson's correlation matrices พบว่าไม่มีสหสัมพันธ์ระหว่างกัน

จากผลการวิเคราะห์ชนิดและปริมาณการปนเปื้อนของสารฆ่าวัชพืชทั้ง 3 ชนิดด้วย ELISA assay ในเนื้อเยื่อตับของปลากะมัง ที่เก็บตัวอย่างจากแม่น้ำน่าน ในช่วงฤดูฝน เดือนตุลาคม พ.ศ. 2553 และฤดูแล้ง เดือนมกราคม และเดือนเมษายน พ.ศ. 2554 ตรวจพบเจอปริมาณการปนเปื้อนสารฆ่าวัชพืชทั้ง 3 ชนิดในระดับที่แตกต่างกันไป

จากผลการวิเคราะห์ปริมาณการปนเปื้อนอะทราซีนในเนื้อเยื่อตับ ตรวจพบอะทราซีนได้ทั้งสองเพศ ในเพศเมียมีค่าการปนเปื้อนอยู่ระหว่าง 9.633-27.314 ng/g ในเพศผู้มีค่าการปนเปื้อนอยู่ระหว่าง 22.410-26.035 ng/g และผลการวิเคราะห์ปริมาณการปนเปื้อนของอะทราซีนในเนื้อเยื่อตับของปลากะมังโดยการรวมเพศ พบปริมาณการปนเปื้อนของอะทราซีนมีค่าสูงในเดือนมกราคม พ.ศ. 2554 เท่ากับ 26.802±6.140 ng/g ส่วนในเนื้อเยื่อไตมีค่าการปนเปื้อนอยู่ระหว่าง 35.398-46.524 ng/g พบว่าระดับการปนเปื้อนของอะทราซีนในเนื้อเยื่อตับและไตของปลากะมังมีค่าต่ำกว่าที่พบในปลาชนิดอื่น ๆ ที่อาศัยในแม่น้ำ โดยมีการรายงานในงานวิจัยต่างๆก่อนหน้านี้ อาทิเช่น การวิเคราะห์การปนเปื้อนของอะทราซีนในเนื้อเยื่อปลาทั้งตัวของปลา *Ictalurus mefas* (Ellgehause, 1978) มีค่าเท่ากับ 58.0 μg/g จากการรายงานของ Klassen และ Kadoum ปี 1979 รายงานค่าการปนเปื้อนของอะทราซีนที่พบในเนื้อเยื่อปลาทั้งตัวของปลา *Lepomis machrochirus* มีค่าเท่ากับ 0.3 μg/g ค่าการปนเปื้อนในเนื้อเยื่อปลาทั้งตัวมีค่าเท่ากับ 4 μg/g (Gluth และคณะ, 1985), ค่าการปนเปื้อนอะทราซีนในเนื้อเยื่อรังไข่และเนื้อเยื่อตับของปลา *Tilapia sparrmanii* มีค่าเท่ากับ 50.6 และ 40.1 μg/g (Du Preez และ Van Vuren, 1992)

ปัจจัยหลักที่ทำให้เกิดการปนเปื้อนของอะทราซีนอยู่ภายในเนื้อเยื่อนั้นเนื่องมาจากตับเป็นแหล่งของกระบวนการเมแทบอลิซึมของสารต่าง ๆ ที่เข้าสู่ร่างกาย และยังมีการสะสมพวกลิปิดอยู่ภายในเนื้อเยื่อ เพราะเมื่ออะทราซีนหรือสารจากภายนอกทุกชนิดเข้าสู่ร่างกายก็จะไปที่ตับเพื่อผ่านกระบวนการเมแทบอลิซึม เป็นเหตุผลให้พบอะทราซีนอยู่ที่เซลล์ตับ

กลไกทางชีวภาพ เช่น กระบวนการเมแทบอลิซึม ภายในตัวปลามีความเกี่ยวข้องและสำคัญกับปริมาณการปนเปื้อนของอะทราซีน กระบวนการนี้เป็นหนึ่งในปัจจัยที่สำคัญของการ

กำจัดและการสะสมและขับของของเสียของสิ่งมีชีวิต อย่างไรก็ตามมีการศึกษาเพียงเล็กน้อยเกี่ยวกับกระบวนการเมแทบิลิซึมของอะทราซีนในปลา จากการรายงานของ Simoneaux ในปี 1996 ได้ตั้งสมมติฐานถึงกระบวนการเมแทบิลิซึมของอะทราซีนในตัวปลาว่ากระบวนการนี้เกิดขึ้นโดยมีขั้นตอนกระบวนการเดียวกับในหนู สารอะทราซีนสามารถสะสมในเนื้อเยื่อปลาได้ภายใน 24 ชั่วโมงหลังจากที่ปลาได้รับอะทราซีน (Gunkel, 1981) โดยเมื่ออะทราซีนเข้าสู่ตัวปลา จะเกิด metabolized N-dealkylation และเกิดเป็น dealkylated ที่ไปจับกับ glutathione (GSH) เกิดเป็น glutathione-S-transferease เพราะฉะนั้น ปฏิกริยานี้จะเกิดขึ้นเมื่อมีการดูดซึมอะทราซีนเข้าสู่ร่างกาย

สำหรับผลการวิเคราะห์ปริมาณการปนเปื้อนของไกลโฟเซต ปริมาณการปนเปื้อนไกลโฟเซตในเนื้อเยื่อตับพบได้ทั้งสองเพศ ในเพศเมียมีค่าการปนเปื้อนอยู่ระหว่าง 0.438-0.606 ng/g ในเพศผู้มีค่าการปนเปื้อนอยู่ระหว่าง 0.384-0.593 ng/g และผลการวิเคราะห์ปริมาณการปนเปื้อนของไกลโฟเซตในเนื้อเยื่อตับของปลากะมัง โดยการรวมเพศ พบปริมาณการปนเปื้อนของไกลโฟเซตมีค่าสูงในเดือนมกราคม พ.ศ. 2554 เท่ากับ 0.590±0.032 ng/g ส่วนในเนื้อเยื่อไตมีค่าการปนเปื้อนอยู่ระหว่าง 0.454-0.5478 ng/g ส่วนผลการวิเคราะห์ปริมาณการปนเปื้อนพาราควอทในเนื้อเยื่อตับ ตรวจพบพาราควอทได้ทั้งสองเพศเช่นเดียวกัน โดยในเพศเมียมีค่าการปนเปื้อนอยู่ระหว่าง 27.198-44.267 ng/g ในเพศผู้มีค่าการปนเปื้อนอยู่ระหว่าง 30.687-31.291 ng/g และผลการวิเคราะห์ปริมาณการปนเปื้อนของพาราควอทในเนื้อเยื่อตับของปลากะมังโดยการรวมเพศ พบปริมาณการปนเปื้อนของพาราควอทมีค่าสูงในเดือนเมษายน พ.ศ. 2554 เท่ากับ 44.267±2.350 ng/g ส่วนในเนื้อเยื่อไตมีค่าการปนเปื้อนอยู่ระหว่าง 25.082-63.528 ng/g จากปริมาณการปนเปื้อนที่ตรวจพบดังกล่าวมานี้ พบว่าปริมาณการปนเปื้อนไกลโฟเซต มีปริมาณการปนเปื้อนที่มีค่าต่ำมาก ๆ เมื่อเปรียบเทียบกับปริมาณการปนเปื้อนของการศึกษาก่อนหน้านี้ อย่างไรก็ตาม การตรวจพบปริมาณการปนเปื้อนในระดับที่มีค่าต่ำ ๆ นี้ก็มาจากปัจจัยต่าง ๆ เช่นเดียวกับที่มีการตรวจพบอะทราซีนในเนื้อเยื่อตับและไตเช่นเดียวกัน เนื่องด้วยคุณสมบัติของสารฆ่าวัชพืชเหล่านี้ที่มีคุณสมบัติคล้ายคลึงกันและสลายตัวได้อย่างรวดเร็ว แต่กลับสามารถยึดเกาะกับอนุภาคของดินได้เป็นอย่างดี และยังมีคุณสมบัติสามารถละลายและดูดซึมได้ดีในไขมันอีกด้วย ด้วยคุณสมบัติของสารฆ่าวัชพืชเหล่านี้ จึงทำให้เกิดการปนเปื้อนของสารฆ่าวัชพืชภายในเนื้อเยื่อนั้น ได้ ถึงแม้จะตรวจพบในปริมาณต่ำ ๆ

เมื่อนำค่าปริมาณการปนเปื้อนของสารฆ่าวัชพืชทั้ง 3 ชนิด ที่ตรวจพบในปลา ตับ และไต มาเปรียบเทียบกับค่ามาตรฐานความปลอดภัยต่อการบริโภค พบว่าปริมาณการปนเปื้อนของ

พาราควอทในปลา ตับ และไต มีค่าเกินมาตรฐานความปลอดภัย จึงไม่เหมาะสมต่อการบริโภคปลากะมังที่เก็บได้จากแม่น้ำน่าน (ตารางที่ 3.7)

ตารางที่ 3.7 ระดับช่วงของการปนเปื้อนของสารฆ่าวัชพืชในปลา ตับ และไต กับค่ามาตรฐานความปลอดภัยต่อการบริโภคในอาหาร

	อะทราซีน (ng/g)		ไกลโฟเซต (ng/g)		พาราควอท (ng/g)	
	range	HCPMRA, 2010	range	CODEX, 2006	range	CODEX, 2006
ปลา	1.381-10.906	40	0.138-0.242	50	6.081-12.544	5
ตับ	1.148-9.683	40	0.051-0.175	50	3.155-13.294	5
ไต	7.362-12.822	40	0.072-0.145	50	3.950-20.260	5

บทที่ 4
สหสัมพันธ์ระหว่างสุขภาวะโดยรวมและความสมบูรณ์ของตับและไตของปลากะมังกับปริมาณการปนเปื้อนของสารฆ่าวัชพืช ในแม่น้ำน่าน อำเภอเวียงสา จังหวัดน่าน

4.1 บทนำ

ในอำเภอเวียงสา จังหวัดน่าน ประชาชนในพื้นที่ส่วนใหญ่ประกอบอาชีพเกษตรกรเป็นหลัก พื้นที่ที่ใช้ในการทำเกษตรกรรมตั้งอยู่บริเวณริมฝั่งแม่น้ำน่าน โดยพบว่ามีการใช้สารฆ่าวัชพืช คือ ไกลโฟเซต พาราควอท และอะทราซีน กันเป็นอย่างมาก ในการควบคุมกำจัดวัชพืชเพื่อเพิ่มผลผลิต ซึ่งการใช้สารฆ่าวัชพืชในปริมาณมากอาจส่งผลกระทบต่อสิ่งมีชีวิตได้ ดังนั้นสิ่งมีชีวิตที่อาศัยอยู่บริเวณพื้นที่ใกล้เคียง โดยเฉพาะสัตว์น้ำ อาจได้รับอันตรายโดยตรงจากการปนเปื้อนของสารฆ่าวัชพืชเหล่านั้นที่ถูกชะล้างลงสู่แหล่งน้ำ สัตว์น้ำเช่น ปลา ที่พบได้ทั่วไปในแม่น้ำน่านก็อาจจะได้รับผลกระทบจากการปนเปื้อนของสารฆ่าวัชพืชในแม่น้ำได้

ก่อนหน้านี้มีรายงานถึงผลของสารฆ่าวัชพืชที่มีต่อปลา ที่เกิดจากการใช้สารฆ่าวัชพืชในพื้นที่เกษตรกรรมและถูกชะล้างลงสู่แหล่งน้ำมากมาย เช่น มีรายงานเกี่ยวกับผลของอะทราซีนต่อพฤติกรรมของปลาหลายชนิด ตัวอย่างเช่นรายงานของ Davies และคณะ (1994) และรายงานของ Steinberg และคณะ (1995) อีกทั้งมีรายงานถึงอัตราการเจริญเติบโตของปลา *Salvelinus fontinalis* ที่ได้รับอะทราซีนที่ความเข้มข้น 120 μg/L ส่งผลให้ปลามีอัตราการเจริญเติบโตลดลง และส่งผลต่อค่าสุขภาวะโดยรวมของปลา (Deway, 1986) และมีการรายงานถึงค่าความสมบูรณ์ของตับ (HSI) ที่ลดลงในปลาที่ได้รับการปนเปื้อน จากการชะล้างของสิ่งปฏิกูลที่มาจากครัวเรือนและโรงงานอุตสาหกรรม (Olfat และคณะ, 2007; Lindesjoeoe และคณะ, 1996) ก่อนหน้านี้มีการศึกษาถึงอัตราการเจริญเติบโตของปลา *Galaxies maculates* หลังจากได้รับอะทราซีนในระดับต่ำๆ (Davies และคณะ, 1994) จากรายงานที่ผ่านมาแสดงให้เห็นว่าเมื่อปลาได้รับสารฆ่าวัชพืชเหล่านี้ จะส่งผลให้เกิดการรบกวนต่อสุขภาวะโดยรวมและความสมบูรณ์ของตับและไตของปลาได้

ค่าสุขภาวะโดยรวมของปลาสามารถประเมินได้จากค่า condition factor (CF) ซึ่งเป็นค่าที่แสดงถึงอัตราการเจริญเติบโตของปลา โดยแสดงถึงความสัมพันธ์ระหว่างความยาวตัวและ

น้ำหนักตัวของปลา เป็นตัวชี้วัดถึงสุขภาพของปลาที่นิยมใช้กันอย่างกว้างขวาง สามารถบ่งบอกสุขภาพปลาได้ เช่น การปนเปื้อนของสารต่างๆ ในสภาพแวดล้อมอาจทำให้ปลาเกิดภาวะเครียด ส่งผลให้ค่า CF ลดลง (Adams และ Ryon, 1994; Munkittrick 1992; Goede และ Barton, 1990) นอกจากนี้อาจใช้ประมาณค่าผลการปนเปื้อนเรื้อรังของมลพิษได้ (Holm และคณะ, 2006) ส่วนค่าความสมบูรณ์ของตับและไตของปลาสามารถประเมินได้จากค่า hepatosomatic index (HSI) และ renosamatic index (RSI) ซึ่งเป็นค่าที่แสดงสุขภาวะของตับและไตของปลา โดยแสดงถึงความสัมพันธ์ระหว่างน้ำหนักตัวและน้ำหนักตับ (HSI) และความสัมพันธ์ระหว่างน้ำหนักตัวและน้ำหนักไต (RSI) เป็นตัวชี้วัดที่สามารถบ่งบอกสุขภาพตับและไตได้ โดยเมื่อปลาได้รับสารปนเปื้อนต่าง ๆ อาจส่งผลให้ค่า HSI และ RSI เพิ่มขึ้นหรือลดลงได้

ปลากะมัง *Puntioplites proctozysron* เป็นปลาที่พบได้ทั่วไปในแม่น้ำน่านและสามารถสัมผัสกับน้ำตลอดเวลา และอาจได้รับสารฆ่าวัชพืชที่ปนเปื้อนมากับน้ำและดินตะกอนได้โดยตรง ดังนั้นในงานวิจัยนี้ จึงเลือกใช้ปลาปลากะมังเป็นสัตว์เฝ้าระวังผลกระทบของการปนเปื้อนของสารฆ่าวัชพืชในแม่น้ำน่าน โดยจุดประสงค์ของการศึกษานี้ เราจะศึกษาถึงสุขภาพโดยรวมของปลาเลือกศึกษาจากตัววัดทางชีวภาพ ได้แก่ สุขภาวะโดยรวม และความสมบูรณ์ของตับและไตของปลากะมังที่อาศัยอยู่ในแม่น้ำน่าน บริเวณใกล้พื้นที่เกษตร ตำบลส้าน อำเภอเวียงสา จังหวัดน่าน และนำตัววัดทางชีวภาพเหล่านั้นมาหาสหสัมพันธ์กับการปริมาณปนเปื้อนของสารฆ่าวัชพืชที่พบ

4.2 วิธีการดำเนินงานวิจัย

4.2.1 พื้นที่ศึกษาและการเก็บตัวอย่าง

พื้นที่ศึกษาคือแม่น้ำน่าน บริเวณใกล้กับพื้นที่เกษตร ตั้งอยู่ที่ ตำบลส้าน อำเภอเวียงสา จังหวัดน่าน พื้นที่โดยรอบแม่น้ำบริเวณนี้มีลักษณะเป็นที่ราบลุ่มสองฝั่งแม่น้ำ มีการทำเกษตรกรรมตลอดแนว มีการปลูกพืชสวนและพืชไร่ โดยเฉพาะข้าวโพดเป็นบริเวณกว้าง และในบริเวณนี้ยังเป็นบริเวณที่ชาวบ้านมีการประกอบอาชีพประมงหาปลาควบคู่กันไป จากการสำรวจพบว่าในพื้นที่มีการฉีดพ่นสารฆ่าวัชพืชตลอดช่วงเวลาที่ทำการเกษตร

เก็บตัวอย่างปลากะมัง *Puntioplites proctozysron* จากแม่น้ำน่าน ในช่วงฤดูฝน 2 ครั้ง ในเดือนกรกฎาคม และตุลาคม พ.ศ. 2553 และในช่วงฤดูแล้ง 2 ครั้ง ในเดือนมกราคม และเมษายน พ.ศ. 2554 โดยวิธีลงข่ายจับปลา เก็บตัวอย่างปลาตัวเต็มวัยที่มีความยาวลำตัวมากกว่า 11 เซนติเมตร (ดูจำนวนตัวอย่างทั้งหมดได้จากตารางที่ 4.1) สุ่มเก็บตัวอย่างครั้งละ 10 ตัวต่อ

เดือน โดยเลือกเพศผู้ 5 ตัว และเพศเมีย 5 ตัว รวมตลอดระยะเวลา 1 ปี เก็บปลาทั้งหมด 40 ตัว โดยเก็บตัวอย่างปลากะมังในถังที่น้ำออกซิเจน แล้วนำมาที่ห้องปฏิบัติการพื้นที่ป่าอนุรักษ์และสถานีวิจัยของจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย อำเภอเวียงสา จังหวัดน่าน

4.2.2 การวัดทางสัณฐานและเก็บตัวอย่างเนื้อเยื่อในห้องปฏิบัติการ

ในแต่ละครั้งที่ทำการเก็บตัวอย่าง นำปลากะมังมาสลบและการุณยฆาตด้วยการแช่ในน้ำแข็งเย็นจัด (rapid cooling method; Wilson และคณะ, 2009) จากนั้นเก็บข้อมูลทางสัณฐานวิทยาพื้นฐานของปลา ได้แก่ ความยาวลำตัว โดยวัดตั้งแต่ปากจนถึงหาง (ภาพที่ 4.1) และน้ำหนักตัว แล้วทำการตัดคอ ผ่าตัดเปิดช่องท้อง เก็บตับและไตมาชั่งน้ำหนักและบันทึกข้อมูล จากนั้นนำมาเก็บรักษาสภาพเนื้อเยื่อใน Davidson's fixative ในภาชนะแก้วปิดสนิท แล้วเก็บรักษาไว้ใน 70% ethanol เพื่อนำไปศึกษาผลต่อเนื้อเยื่อ วิธีการที่กระทำต่อปลาทั้งหมด ได้ผ่านความเห็นชอบจากคณะกรรมการกำกับดูแลการเลี้ยงและใช้สัตว์ทดลอง คณะวิทยาศาสตร์ (Protocal Review No. 1123011)

ภาพที่ 4.1 การวัดความยาวลำตัวของปลากะมัง

4.2.3 การประเมินสุขภาวะโดยรวมของปลากะมัง

การประเมินสุขภาวะโดยรวมของปลากะมัง ทำโดยอาศัยค่า condition factor (CF) ของ Le Cren (1951) ซึ่งเป็นค่าที่แสดงความสมบูรณ์ของร่างกายของปลา ค่า CF คำนวณจากความสัมพันธ์ระหว่างน้ำหนักตัวและความยาวลำตัว โดยหาจากสูตรดังต่อไปนี้ (Eastwood และ Couture, 2002)

$$\text{Condition factor} = \frac{W}{aL^{b}}$$

จากสูตร W/a L^{b} เมื่อ W = น้ำหนักตัว (กรัม) a = อัตราการเปลี่ยนแปลงน้ำหนักกับความยาว L = ความยาวตัว (เซนติเมตร) b = สัมประสิทธิ์เส้นแนวถดถอย

โดยหากราฟแสดงสมการเพื่อหาค่า CF นำค่า W และ L ทั้ง 4 เดือน มาใส่ค่า log จะได้ log(w) และ log(L) จากนั้นนำมาหาสมการเส้นตรง y = bx + c สมการที่ได้คือ

$$y = 2.5455x - 1.05$$

จากนั้นหาค่า a และ b จากสมการที่ได้ โดยค่า b คือ 2.5455 และค่า a หาได้จาก 10^{C} แล้วเข้าสูตรหา CF โดยแทน W, L, a, b ในสมการ CF = (W) / (aL^{b}) ดังนี้

$$CF = (w) / (0.089125L^{2.5455})$$

4.2.4 การประเมินความสมบูรณ์ของตับและไตของปลากะมัง

การประเมินสุขภาวะของตับและไตของปลาในเบื้องต้น อาจทำได้โดยอาศัยค่า hepatosomatic index (HSI) และ renosomatic index (RSI) ค่า HSI และ RSI สามารถคำนวณได้จากการนำข้อมูลที่ได้จากการวัดทางสัณฐาน มาหาดัชนีความสัมพันธ์ระหว่างน้ำหนักตัวและน้ำหนักตับ (HSI) และดัชนีความสัมพันธ์ระหว่างน้ำหนักตัวและน้ำหนักไต (RSI) โดยใช้สูตรต่อไปนี้

$$HSI = \frac{\text{น้ำหนักตับ}}{\text{น้ำหนักตัว}} \times 100 \qquad RSI = \frac{\text{น้ำหนักไต}}{\text{น้ำหนักตัว}} \times 100$$

การวิเคราะห์ข้อมูล ทำโดยนำข้อมูลค่า CF, HSI และ RSI ที่หาได้ในทั้งสองเพศมาหา normal distribution โดย Kolmogorov–Smirnov test และ homogeneity of variance เพื่อเปรียบเทียบความแตกต่างระหว่างเพศในแต่ละเดือน โดยใช้ Student’s t-test จากนั้นนำข้อมูลมาเปรียบเทียบความแตกต่างในแต่ละช่วงเวลา ด้วยสถิติ Analysis of Variance (ANOVA) เพื่อศึกษาแนวโน้มการเปลี่ยนแปลงค่า HSI และ RSI ของปลากะมังในรอบปีโดย Student-Newman-Keuls multiple comparison (แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ $p < 0.05$) การวิเคราะห์ข้อมูลทั้งหมดใช้โปรแกรม SPSS (Windows version 17.0) จากนั้นวิเคราะห์ความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณการปนเปื้อนของสารฆ่าวัชพืชที่พบในเนื้อเยื่อกับค่า CF, HSI และ RSI โดยนำข้อมูลปริมาณการปนเปื้อนสารฆ่าวัชพืชมาวิเคราะห์ความสัมพันธ์ด้วยสถิติ Pearson’s correlation matrices เพื่อหาค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ (correlation coefficient; r) ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์ โดยใช้โปรแกรม SPSS (Windows version 17.0)

4.3 ผลการศึกษาและวิเคราะห์ผลการศึกษา

4.3.1 การประเมินสุขภาวะโดยรวมของปลากะมัง

ผลการศึกษาสุขภาวะโดยรวมโดยอาศัยค่า condition factor (CF) ในปลากะมังที่เก็บตัวอย่างจากแม่น้ำน่าน ในช่วงฤดูฝน เดือนกรกฎาคม และเดือนตุลาคม พ.ศ. 2553 และในช่วงฤดูแล้ง เดือนมกราคม และเดือนเมษายน พ.ศ. 2554 ดังแสดงในตารางที่ 4.1 ได้ผลดังนี้

จากการวิเคราะห์ข้อมูล เพื่อเปรียบเทียบความแตกต่างระหว่างเพศในแต่ละเดือน โดยใช้ Student's t-test พบว่า ค่า CF ในเดือนมกราคม พ.ศ. 2554 มีความแตกต่างระหว่างเพศผู้และเพศเมียอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ $P<0.05$ จึงทำการแยกข้อมูลเพศผู้และเพศเมียเพื่อนำไปวิเคราะห์เปรียบเทียบความแตกต่างในแต่ละช่วงเวลา โดย Analysis of Variance (ANOVA)

เพศผู้

จากผลการศึกษาพบว่า ค่า CF ในเพศผู้มีค่าต่ำสุดในเดือนกรกฎาคม พ.ศ. 2553 มีค่าเท่ากับ 0.498±0.033 แล้วค่อยเพิ่มขึ้นในเดือนตุลาคม พ.ศ. 2553 จนมีค่าสูงสุดในเดือนมกราคม พ.ศ. 2554 มีค่าเท่ากับ 1.173±0.025 และลดลงเล็กน้อยในเดือนเมษายน พ.ศ. 2554

การวิเคราะห์ทางสถิติโดยใช้ Analysis of Variance (ANOVA) พบว่าค่าเฉลี่ยของ CF แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.05$) ตั้งแต่เดือนกรกฎาคม พ.ศ. 2553 จนถึงเดือนมกราคม พ.ศ. 2554 หลังจากนั้นจึงลดลงเล็กน้อยในเดือนเมษายน พ.ศ. 2554 โดยไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P>0.05$) จากค่าเฉลี่ยของเดือนตุลาคม พ.ศ. 2553

เพศเมีย

จากผลการศึกษาพบว่า ค่า CF ในเพศเมียมีค่าต่ำสุดในเดือนกรกฎาคม พ.ศ. 2553 มีค่าเท่ากับ 0.486±0.033 แล้วค่อยเพิ่มขึ้นในเดือนตุลาคม พ.ศ. 2553 จนมีค่าสูงสุดในเดือนมกราคม พ.ศ. 2554 มีค่าเท่ากับ 1.390±0.144 และลดลงเล็กน้อยในเดือนเมษายน พ.ศ. 2554

การวิเคราะห์ทางสถิติโดยใช้ Analysis of Variance (ANOVA) พบว่าค่าเฉลี่ยของ CF แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.05$) ระหว่างเดือนกรกฎาคม พ.ศ. 2553 และเดือนมกราคมและเมษายน พ.ศ. 2554 ซึ่งมีค่าเพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญ

ผลของค่า CF ที่ได้ในทั้งสองเพศ แสดงให้เห็นถึงสุขภาวะที่ต่ำของปลากะมังในเดือนกรกฎาคม พ.ศ. 2553 และสูงในเดือนมกราคม พ.ศ. 2554

ตารางที่ 4.1 ค่าสุขภาวะโดยรวม (condition factor; CF) ของปลากะมัง *Puntioplites proctozysron* ที่เก็บตัวอย่างจากแม่น้ำน่าน อำเภอเวียงสา จังหวัดน่าน ตั้งแต่เดือนตุลาคม พ.ศ. 2553 จนถึงเดือนเมษายน พ.ศ. 2554

	กรกฎาคม 2553	ตุลาคม 2553	มกราคม 2554	เมษายน 2554
CF (เพศผู้)	0.498±0.033[a] (n=4)	0.932±0.021[b] (n=21)	1.173±0.025[c] (n=16)	0.996±0.033[b] (n=12)
CF (เพศเมีย)	0.486±0.033[a] (n=7)	0.901±0.027[ab] (n=17)	1.390±0.144[b] (n=31)	1.068±0.029[b] (n=13)

หมายเหตุ: ตัวอักษร a, b และ c แสดงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (one way ANOVA, $p < 0.05$) ระหว่างเดือนของแต่ละเพศ โดยบ่งชี้ความแตกต่างได้ด้วยสัญลักษณ์ที่อยู่เหนือค่านั้น

จากผลการวิเคราะห์หาสหสัมพันธ์ด้วยสถิติ Pearson's correlation matrices ระหว่างสุขภาวะโดยรวมของปลากะมังกับปริมาณการปนเปื้อนของสารฆ่าวัชพืชในเนื้อเยื่อตับของปลากะมัง พบว่าค่า CF มีสหสัมพันธ์ในทางเดียวกันกับปริมาณการปนเปื้อนของอะทราซีนที่ $P<0.05$ แต่ค่า CF กลับไม่มีสหสัมพันธ์กับปริมาณการปนเปื้อนของไกลโฟเซตและพาราควอทที่ $P>0.05$ ดังแสดงในตารางที่ 4.3

4.3.2 การศึกษาความสมบูรณ์ของตับของปลากะมัง

ผลการศึกษาความสมบูรณ์ของตับโดยอาศัยค่า hepatosomatic index (HSI) ของปลากะมังที่เก็บตัวอย่างจากแม่น้ำน่าน ในช่วงฤดูฝน เดือนกรกฎาคมและเดือนตุลาคม พ.ศ. 2553 และในช่วงฤดูแล้ง เดือนมกราคม และเดือนเมษายน พ.ศ. 2554 แสดงในตารางที่ 4.2

จากการวิเคราะห์ข้อมูลโดยใช้ Student’s t-test เพื่อเปรียบเทียบความแตกต่างระหว่างเพศในแต่ละเดือน พบว่า ค่า HSI ไม่มีความแตกต่างระหว่างเพศผู้และเพศเมีย ($P>0.05$) จึงทำการรวมข้อมูลเพศผู้และเพศเมีย จากนั้นนำไปวิเคราะห์เพื่อเปรียบเทียบความแตกต่างในแต่ละช่วงเวลา โดย Analysis of Variance (ANOVA)

จากผลการศึกษาพบว่า ค่า HSI มีค่าต่ำสุดในเดือนมกราคม พ.ศ. 2554 มีค่าเท่ากับ 0.635 ± 0.019 แล้วสูงขึ้นโดยมีค่าสูงสุดในเดือนตุลาคม พ.ศ. 2553 มีค่าเท่ากับ 0.915 ± 0.051 จากนั้นลดลงอย่างมีนัยสำคัญในเดือนมกราคม พ.ศ. 2554 แล้วเพิ่มขึ้นเล็กน้อยในเดือนเมษายน พ.ศ. 2554

การวิเคราะห์ทางสถิติโดยใช้ Analysis of Variance (ANOVA) พบว่าค่าเฉลี่ยของ HSI แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติระหว่างเดือนตุลาคม พ.ศ. 2553 กับเดือนมกราคม พ.ศ. 2554 ที่ $P<0.05$

จากผลการวิเคราะห์หาสหสัมพันธ์ด้วยสถิติ Pearson’s correlation matrices ระหว่างค่า HSI กับปริมาณการปนเปื้อนของสารฆ่าวัชพืชในเนื้อเยื่อตับของปลากะมังพบว่าค่า HSI มีสหสัมพันธ์ในทางตรงกันข้ามกับปริมาณการปนเปื้อนของไกลโฟเซตที่ $P<0.05$ แต่ค่า HSI กลับไม่มีสหสัมพันธ์กับปริมาณการปนเปื้อนของอะทราซีนและพาราควอทที่ $P>0.05$ ดังแสดงในตารางที่ 4.3

4.3.3 การศึกษาความสมบูรณ์ของไตของปลากะมัง

ผลการศึกษาความสมบูรณ์ของไตโดยอาศัยค่า renosomatic index (RSI) ในปลากะมังที่เก็บตัวอย่างจากแม่น้ำน่าน ในช่วงฤดูฝน เดือนกรกฎาคมและตุลาคม พ.ศ. 2553 และในช่วงฤดูแล้ง เดือนมกราคม และเมษายน พ.ศ. 2554 แสดงในตารางที่ 4.2 ได้ผลดังนี้

จากการวิเคราะห์ข้อมูลโดยใช้ Student's t-test เพื่อเปรียบเทียบความแตกต่างระหว่างเพศในแต่ละเดือน พบว่า ค่า RSI ไม่มีความแตกต่างระหว่างเพศผู้และเพศเมีย ($P>0.05$) จึงทำการรวมข้อมูลเพศผู้และเพศเมีย จากนั้นนำไปวิเคราะห์เพื่อเปรียบเทียบความแตกต่างในแต่ละช่วงเวลา โดย Analysis of Variance (ANOVA)

จากผลการศึกษาพบว่า ค่า RSI มีค่าต่ำสุดในเดือนมกราคม พ.ศ. 2554 มีค่าเท่ากับ 0.308 ± 0.023 โดยก่อนหน้านี้มีค่าสูงกว่าเล็กน้อยในเดือนกรกฎาคม พ.ศ. 2553 แล้วค่อยเพิ่มขึ้นเล็กน้อยในเดือนตุลาคม พ.ศ. 2553 จนมีค่าสูงสุดในเดือนเมษายน พ.ศ. 2554 มีค่าเท่ากับ 0.407 ± 0.033

การวิเคราะห์ทางสถิติโดยใช้ Analysis of Variance (ANOVA) พบว่าค่าเฉลี่ยของ RSI ไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P>0.05$) ตั้งแต่เดือนกรกฎาคม พ.ศ. 2553 จนถึงเดือนเมษายน พ.ศ. 2554

จากผลการวิเคราะห์หาสหสัมพันธ์ด้วยสถิติ Pearson's correlation matrices ระหว่างค่าความสมบูรณ์ของไตของปลากะมังกับปริมาณการปนเปื้อนของสารฆ่าวัชพืชในเนื้อเยื่อไตของปลากะมังพบว่าค่า RSI มีสหสัมพันธ์ในทางเดียวกันกับปริมาณการปนเปื้อนของอะทราซีนที่ $P<0.05$ แต่ค่า RSI กลับไม่มีสหสัมพันธ์กับปริมาณการปนเปื้อนของไกลโฟเซตและพาราควอทที่ $P>0.05$ ดังแสดงในตารางที่ 4.3

ตารางที่ 4.2 ค่าความสมบูรณ์ของตับ (hepatosomatic index; HSI) และค่าความสมบูรณ์ของไต (renosomatic index; RSI) ของปลากะมัง *Puntioplites proctozysron* ที่เก็บตัวอย่างจากแม่น้ำน่าน อำเภอเวียงสา จังหวัดน่าน ตั้งแต่เดือนตุลาคม พ.ศ. 2553 จนถึงเดือนเมษายน พ.ศ. 2554

	กรกฎาคม 2553	ตุลาคม 2553	มกราคม 2554	เมษายน 2554
HSI	0.829±0.112 [ab] (n=6)	0.915±0.051 [b] (n=36)	0.635±0.019 [a] (n=46)	0.823±0.056 [ab] (n=25)
RSI	0.328±0.077 [a] (n=6)	0.363±0.016 [a] (n=37)	0.308±0.023 [a] (n=47)	0.407±0.033 [a] (n=25)

หมายเหตุ: ตัวอักษร a, b แสดงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (one way ANOVA, $p < 0.05$) ระหว่างเดือนของแต่ละเพศ โดยบ่งชี้ความแตกต่างได้ด้วยสัญลักษณ์ที่อยู่เหนือค่านั้น

ตารางที่ 4.3 สหสัมพันธ์ระหว่างสุขภาวะโดยรวม (CF) ค่าความสมบูรณ์ของตับ (HSI) และค่าความสมบูรณ์ของไต (RSI) ของปลากะมังกับปริมาณการปนเปื้อนของสารฆ่าวัชพืช

	CF	HSI	RSI	อะทราซีน	ไกลโฟเซต	พาราควอท
พาราควอท	r = -0.079 P = 0.828 (n=10)	r = -0.027 P = 0.940 (n=10)	r = -0.959 P = 0.183 (n=3)	r = 0.066 P = 0.856 (n=10)	r = 0.349 P = 0.323 (n=10)	
ไกลโฟเซท	r = 0.461 P = 0.154 (n=11)	r = -0.754* P = 0.007 (n=11)	r = 0.388 P = 0.746 (n=3)	r = 0.543 P = 0.085 (n=11)		
อะทราซีน	r = 0.678* P = 0.011 (n=13)	r = -0.389 P = 0.190 (n=13)	r = 0.999* P = 0.022 (n=3)			
RSI	r = 0.996 P = 0.059 (n=3)	r = 0.904 P = 0.281 (n=3)				
HSI	r = -0.435 P = 0.138 (n=13)					
CF						

หมายเหตุ:

* แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.05$)

r = correlation coefficient

P = p value

n = จำนวนตัวอย่าง

การผลการศึกษาครั้งนี้ มีจุดประสงค์เพื่อประเมินสุขภาวะโดยรวมของปลาที่อาศัยอยู่ในแม่น้ำน่าน โดยอาศัยค่า CF และประเมินสุขภาวะเบื้องต้นของตับและไตของปลาโดยอาศัยค่า HSI และ RSI

จากผลการศึกษาถึงสหสัมพันธ์ระหว่างการปนเปื้อนของสารฆ่าวัชพืช ที่ตรวจพบในเนื้อเยื่อตับและไตของปลากะมัง กับค่า CF, HSI และ RSI พบว่าการปนเปื้อนของอะทราซีนมีสหสัมพันธ์ในทางเดียวกันกับค่า CF และ RSI แต่ไม่มีสหสัมพันธ์กับค่า HSI และการปนเปื้อนของไกลโฟเซตมีสหสัมพันธ์ในทางตรงกันข้ามกับค่า HSI แต่กลับไม่มีสหสัมพันธ์กับค่า CF และ RSI ส่วนการปนเปื้อนของพาราควอทนั้นพบว่าไม่มีสหสัมพันธ์กับทั้ง 3 ค่า

ค่า CF เป็นค่าที่ใช้สำหรับประเมินสุขภาวะที่ดีโดยรวมของสัตว์น้ำจำพวกปลาได้ (Goede และ Barton 1990) โดยสามารถใช้เป็นตัวแทนที่แสดงถึงผลกระทบของสิ่งแวดล้อมที่มีต่อการเจริญเติบโตของปลาและให้ข้อมูลของสุขภาพของปลาในขณะนั้น (Adams และคณะ, 1993) จากผลการศึกษาครั้งนี้ ค่า CF ในเพศผู้มีค่าต่ำสุดในเดือนกรกฎาคม พ.ศ. 2553 มีค่าเท่ากับ 0.498±0.033 แล้วค่อยเพิ่มขึ้นในเดือนตุลาคม พ.ศ. 2553 จนมีค่าสูงสุดในเดือนมกราคม พ.ศ. 2554 มีค่าเท่ากับ 1.173±0.025 และลดลงเล็กน้อยในเดือนเมษายน พ.ศ. 2554 ในเพศเมียมีค่าต่ำสุดในเดือนกรกฎาคม พ.ศ. 2553 มีค่าเท่ากับ 0.486±0.033 แล้วค่อยเพิ่มขึ้นในเดือนตุลาคม พ.ศ. 2553 จนมีค่าสูงสุดในเดือนมกราคม พ.ศ. 2554 มีค่าเท่ากับ 1.390±0.144 และลดลงเล็กน้อยในเดือนเมษายน พ.ศ. 2554

สิ่งที่น่าสนใจคือ การปนเปื้อนของอะทราซีนมีสหสัมพันธ์ในทางเดียวกันกับค่า CF ในเดือนมกราคม พ.ศ. 2554 ซึ่งพบปริมาณการปนเปื้อนของอะทราซีนในเนื้อเยื่อตับที่มีค่าสูงสุดแปรผันตรงกับค่า CF ที่มีค่าสูงสุดในเดือนเดียวกัน ซึ่งสหสัมพันธ์ของค่า CF ที่เกิดขึ้นนี้ไม่ได้ขึ้นอยู่กับปริมาณการปนเปื้อนของอะทราซีนที่ตรวจพบในเนื้อเยื่อตับของปลากะมัง เนื่องจากมีการศึกษาก่อนหน้านี้รายงานว่า อะทราซีนสามารถส่งผลต่อค่า CF โดยส่งผลให้ค่า CF มีค่าลดลงเมื่อได้รับอะทราซีนเมื่อทำปฏิบัติการในห้องทดลอง (Fortin และคณะ, 2008) มีการรายงานของ Dewey ในปี 1986 รายงานถึงการปนเปื้อนของอะทราซีนในระดับต่ำ ๆ อาจจะส่งผลต่อความยาวลำตัวของปลา โดยเมื่อปลาสัมผัสกับอะทราซีนปริมาณต่ำ ๆ เป็นเวลานาน ๆ จะส่งผลให้ค่า CF ต่ำลง จึงจำเป็นต้องมีการศึกษาค่า CF จนกระทั่งครบปีจึงจะสรุปผลการศึกษานี้ได้ ซึ่งทั้งสองการทดลองนี้สามารถนำมาสนับสนุนในการศึกษานี้ได้ แต่สำหรับผลการศึกษาเกี่ยวกับปริมาณการปนเปื้อนของไกลโฟเซตและพาราควอทพบว่าไม่ได้มีความสัมพันธ์กับค่า CF ของปลากะมัง ซึ่ง

เป็นที่น่าสังเกตว่าปริมาณการปนเปื้อนของสารฆ่าวัชพืชทั้งสองชนิดอยู่ในระดับความเข้มข้นต่ำ ๆ ไม่ได้ส่งผลต่อค่า CF ของปลากะมัง

จากการศึกษานี้พบว่าค่า CF มีความแปรผันตามความสมบูรณ์เพศของระบบสืบพันธุ์ โดยจากรายงานก่อนหน้านี้ กล่าวว่าในเดือนกรกฎาคม ปลากะมังเป็นตัวเต็มวัยและเข้าสู่ช่วงสืบพันธุ์ ในเพศเมียไข่จะแก่เต็มที่ ส่งผลให้น้ำหนักตัวเพิ่มมากขึ้นส่งผลต่อค่า CF ที่สูงขึ้นจากนั้นค่า CF จะลดต่ำลง เนื่องจากปลากะมังเริ่มวางไข่ และจะสูงขึ้นอีกครั้งในเดือนตุลาคมและสูงขึ้นเรื่อย ๆ เมื่ออยู่ในสภาวะที่เหมาะสม และปลาจะเริ่มสะสมอาหารทำให้น้ำหนักตัวเพิ่มขึ้นจึงส่งผลให้ค่า CF สูงขึ้นอีกครั้ง ในเพศผู้ มีความสมบูรณ์เพศตั้งแต่เดือนกุมภาพันธ์จนถึงมิถุนายน สามารถปล่อยน้ำเชื้อเพื่อผสมพันธุ์อยู่ตลอดในช่วงฤดูผสมพันธุ์ ทำให้น้ำหนักตัวลดลงส่งผลต่อค่า CF ที่ลดลง (ศุภมาศ เทียนหอม, 2540; สุวิณา และคณะ, 2532 และ Senarat, 2011) และเมื่อเปรียบเทียบกับผลการศึกษาพบว่า ค่า CF ของปลากะมังในเดือนกรกฎาคม พ.ศ. 2553 กลับมีค่าต่ำสุด ซึ่งไม่สอดคล้องกับการรายงานก่อนหน้านี้ อาจเป็นได้ว่า ยังมีปัจจัยอื่นที่ส่งผลต่อค่า CF ของปลากะมัง หรืออาจเป็นได้ว่า ฤดูกาล สภาพแวดล้อม และแหล่งที่อยู่อาศัยอาจจะส่งผลต่อค่า CF ที่แตกต่างกันไป หรืออีกกรณีหนึ่ง ปลาที่จับได้มีขนาดเล็กและปลาเพศเมียจะวางไข่หมดภายในเดือนกรกฎาคม ส่งผลต่อน้ำหนักตัวที่ต่ำลง ค่า CF จึงอาจลดลงต่ำมากก็เป็นได้ และหลังจากนั้นค่า CF จะกลับมาสูงขึ้นเรื่อย ๆ เนื่องมาจากปลาเริ่มสะสมอาหารอีกครั้ง

นอกจากนี้ ยังพบการรายงานอีกว่า ค่า CF มีความแปรผันในแต่ละช่วงฤดูกาล โดยมีค่าต่ำในฤดูฝนและมีค่าสูงในฤดูแล้ง มีรายงานก่อนหน้านี้รายงานว่า ฤดูกาลมีผลต่อสุขภาวะโดยรวมของปลาอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ เนื่องมาจากการเปลี่ยนแปลงของปริมาณอาหาร และอัตราเมแทบอลิซึม (Chellappa และคณะ, 1995; Griffiths และ Kirkwood, 1995; Saeborowski และ Buchholz, 1996) ค่า CF ที่พบในงานนี้ มีค่าต่ำสุดในเดือนกรกฎาคม พ.ศ. 2553 อาจเนื่องมาจากเป็นช่วงฤดูฝนน้ำหลาก ทำให้มีปริมาณน้ำในแม่น้ำน่านสูงขึ้น ส่งผลให้การจับปลาทำไปได้ยากและขนาดของปลาที่จับได้มีขนาดเล็ก อีกทั้งปริมาณน้ำที่สูงขึ้น ถือเป็นปัจจัยที่สำคัญอีกอย่างหนึ่งที่ส่งผลทำให้ค่า CF ลดต่ำลง โดย Goede และ Barton ในปี 1990 กล่าวว่า ปริมาณน้ำที่สูงขึ้นในช่วงฤดูฝนส่งผลให้น้ำหนักปลาลดลงเนื่องมาจากสูญเสียพลังงานที่เก็บสะสมไว้เอาไปใช้ในการว่ายในกระแสน้ำที่ไหลบ่า ดังนั้นปริมาณของน้ำที่ไหลในแม่น้ำน่านในช่วงฤดูฝน พ.ศ. 2553 อาจมีส่วนทำให้ค่า CF ของปลากะมังลดต่ำลง

เมื่อทำการเปรียบเทียบค่า CF กับการศึกษาก่อนหน้านี้ พบว่าค่า CF ของปลากะมังมีค่าต่ำกว่า โดยจากการรายงานก่อนหน้านี้ ค่า CF ของปลากะมังเพศผู้และเพศเมียมีค่าเท่ากับ 1.399

และ 1.477 ตามลำดับ (สุวีณา บานเย็น และคณะ, 2532) ซึ่งจากผลการศึกษานี้ ค่า CF ของปลากะมังเพศผู้และเพศเมียมีค่าเท่ากับ 0.987±0.027 และ 1.113±0.075 ตามลำดับ การที่ค่า CF ของปลากะมังในการศึกษานี้มีค่าต่ำกว่านั้น อาจเนื่องมาจากปัจจัยของสภาพแวดล้อม ที่อยู่อาศัย แหล่งอาหาร ฤดูกาลที่แตกต่างกันและช่วงเวลาที่เก็บตัวอย่าง จึงอาจส่งผลให้ค่า CF ของปลาชนิดเดียวกันแตกต่างกันไปในแต่ละพื้นที่

ค่า HSI เป็นค่าที่ใช้ในการประเมินสุขภาพตับเบื้องต้น จากผลการศึกษาครั้งนี้พบว่า ค่า HSI มีค่าสูงสุดในเดือนตุลาคม พ.ศ. 2553 มีค่าเท่ากับ 0.915±0.051 และมีค่าต่ำสุดในเดือนมกราคม พ.ศ. 2554 มีค่าเท่ากับ 0.635±0.019 จะเห็นได้ว่า ค่า HSI ที่ลดต่ำลงในเดือนมกราคม พ.ศ. 2554 มีความสอดคล้องกับปริมาณการปนเปื้อนของอะทราซีนที่สูงในดินตะกอน น้ำ และเนื้อเยื่อตับของปลากะมัง โดยมีรายงานที่ผ่านมาแสดงสนับสนุนให้เห็นว่า เมื่อปลาได้รับสารฆ่าวัชพืชเหล่านี้ส่งผลให้เกิดการรบกวนต่อความสมบูรณ์ของตับของปลา (Kime, 1998; Kleinkauf และคณะ, 2004) และยังมีการรายงานถึงค่าความ HSI ในปลาที่มีค่าลดลงเนื่องมาจากได้รับการปนเปื้อนจากการชะล้างของสิ่งปฏิกูลที่มาจากครัวเรือนและโรงงานอุตสาหกรรม (Olfat และคณะ, 2007; Lindesjoeoe และคณะ, 1996) แต่จากการวิเคราะห์หาสหสัมพันธ์ของการปนเปื้อนของอะทราซีนกลับไม่มีสหสัมพันธ์กับค่า HSI แต่อย่างไรก็ตามค่า HSI ยังคงแสดงแนวโน้มให้เห็นว่ามีแนวโน้มลดลงใน 7 เดือน ซึ่งอาจเกิดจากผลของการปนเปื้อนของอะทราซีนเป็นระยะเวลานาน ๆ ดังนั้นจึงจำเป็นต้องมีศึกษาทางด้านอื่น ๆ เพิ่มเติมต่อไป

บทที่ 5
สหสัมพันธ์ระหว่างการปนเปื้อนสารฆ่าวัชพืชกับพยาธิสภาพของตับและไตของปลากะมัง ในแม่น้ำน่าน อำเภอเวียงสา จังหวัดน่าน

5.1 บทนำ

แม่น้ำน่านเป็นแม่น้ำสายหลักที่ไหลผ่านจังหวัดน่าน ตั้งอยู่ติดกับพื้นที่เกษตรกรรม ทำให้ไม่สามารถหลีกเลี่ยงจากการปนเปื้อนของสารฆ่าวัชพืช ที่ใช้กันอย่างมากในพื้นที่เกษตรกรรมได้ แม่น้ำน่านจึงกลายเป็นแหล่งรองรับสารฆ่าวัชพืชโดยตรง สารฆ่าวัชพืชที่นิยมใช้เป็นจำนวนมาก ได้แก่ ไกลโฟเซต พาราควอท และอะทราซีน เมื่อเกิดการใช้ในพื้นที่ก็จะถูกชะล้างและตกค้างในบริเวณใกล้เคียง หรืออาจถูกพัดพาไปได้ไกลตามกระแสน้ำแล้วเกิดการปนเปื้อนและสะสมสู่สิ่งแวดล้อมที่ห่างไกลออกไปจากแหล่งที่ใช้ การปนเปื้อนนี้ไม่เพียงแต่จะส่งผลเสียต่อสภาวะแวดล้อมในแม่น้ำเท่านั้น แต่ยังส่งผลถึงสุขภาพของสิ่งมีชีวิตในน้ำ โดยเฉพาะปลาที่อาศัยอยู่ในพื้นที่นั้นด้วย ก่อนหน้านี้มีการรายงานการศึกษาถึงผลเสียของไกลโฟเซต พาราควอท และอะทราซีน ต่อเนื้อเยื่อของปลาทั้งในห้องทดลองและในธรรมชาติ โดยสารฆ่าวัชพืชเหล่านี้ส่งผลเสียและทำลายเนื้อเยื่อและอวัยวะบางอย่างให้ได้รับความเสียหาย

ไกลโฟเซต เป็นสารฆ่าวัชพืชกลุ่ม phosphonomethyl amino acid ที่สามารถส่งผลเสียต่อระบบทางเดินอาหาร ทำให้ระบบหายใจล้มเหลว ส่งผลเสียต่อตับและไต จนอาจทำให้ไตวายถ้าได้รับในปริมาณมาก (Ecobichon, 2001) มีการรายงานผลของไกลโฟเซตต่อเนื้อเยื่อของปลาหลายชนิดได้แก่ ปลาดุกแอฟริกา *Claris gariepinus* (Ayoola และคณะ, 2008A) และปลานิล *Oreochromis niloticus* (Ayoola และคณะ, 2008B) พบความผิดปกติที่เนื้อเยื่อตับ โดยพบแวคคิวโอลในเซลล์ตับและเกิดการตายของเซลล์ตับ ส่วนท่อไตก็ได้รับความเสียหายด้วยเช่นกัน

พาราควอทซึ่งเป็นสารฆ่าวัชพืชกลุ่ม bipyridyl derivatives สามารถส่งผลเสียต่อระบบทางเดินหายใจอย่างรุนแรง เป็นพิษต่ออวัยวะต่าง ๆ ในร่างกาย รวมทั้งทำให้เกิดการตายของเซลล์ตับและไต (Ecobichon, 2001) มีรายงานผลของพาราควอทต่อเนื้อเยื่อตับและไตของปลาดุก

แอฟริกา *Claris gariepinus* (Omitoyin และคณะ, 2006) พบว่าทำให้เกิดความผิดปกติที่เซลล์ตับและไต

นอกจากนี้สารฆ่าวัชพืชที่ใช้มากอีกชนิดหนึ่งคืออะทราซีน ซึ่งเป็นสารกลุ่ม triazine สามารถส่งผลเสียต่อระบบทางเดินหายใจ มีความเป็นพิษต่ออวัยวะต่าง ๆ ในร่างกายรวมถึงส่งผลเสียต่อเซลล์ตับและไต (Ecobichon, 2001) จากรายงานผลของอะทราซีนต่อเนื้อเยื่อตับของปลาวูฟฟิส มาลาบาริคัส *Hoplias malabaricus* (Miranda และคณะ, 2008) พบว่าสารนี้ทำให้เซลล์ตับได้รับความเสียหาย มีการตายของเซลล์เป็นบริเวณกว้าง เกิด fibrosis และมีการเข้ามาของเซลล์เม็ดเลือดขาว นอกจากนี้ยังมีรายงานของ Segnini de Bravo และคณะ ในปี ค.ศ. 2005 เกี่ยวกับผลของอะทราซีนในปลาหมอ *Caquetaia kraussii* และ ปลาคู้ดำ *Colossoma macropomum* ระยะก่อนตัวเต็มวัย พบว่าปลาที่ได้รับสารนี้มีเนื้อเยื่อไตที่ได้รับความเสียหาย โดยท่อไตสูญเสียรูปร่าง

ปลากะมัง *Puntioplites proctozysron* เป็นปลาที่พบได้ทั่วไปในแม่น้ำน่าน เมื่อแม่น้ำน่านมีการปนเปื้อนของสารฆ่าวัชพืชเหล่านี้ก็อาจส่งผลโดยตรงต่อปลากะมังในพื้นที่ได้ ดังนั้นในการศึกษาครั้งนี้ จึงเลือกใช้ปลากะมังเป็นสัตว์เฝ้าระวังผลกระทบของการปนเปื้อนของสารฆ่าวัชพืชในแม่น้ำน่าน รวมไปถึงผลของสารฆ่าวัชพืชที่มีต่อเนื้อเยื่อของปลากะมัง ดังนั้นจุดประสงค์ของการศึกษาครั้งนี้คือ ศึกษาการเปลี่ยนแปลงทางด้านพยาธิสภาพที่เกิดขึ้นในตับและไตของปลากะมังที่อาศัยอยู่ในแม่น้ำน่าน ใกล้กับพื้นที่เกษตร ตั้งอยู่ที่ ตำบลส้าน อำเภอเวียงสา จังหวัดน่าน และหาสหสัมพันธ์ระหว่างผลทางพยาธิสภาพที่เกิดขึ้นในตับและไตของปลากะมังกับปริมาณการปนเปื้อนของสารฆ่าวัชพืชที่พบ

5.2 วิธีการดำเนินงานวิจัย

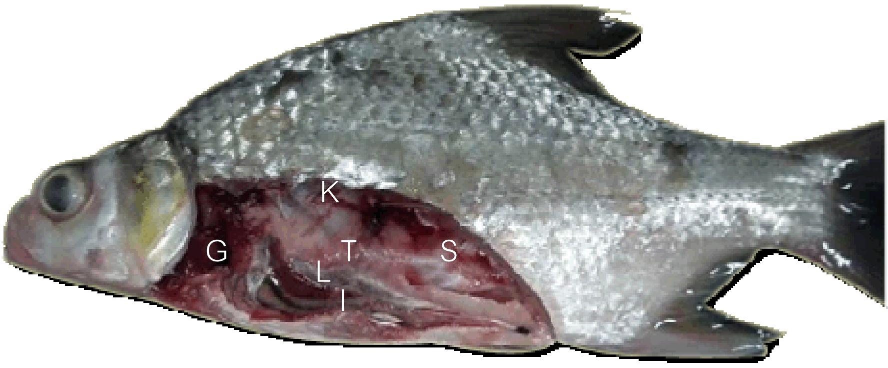
5.2.1 การเก็บตัวอย่าง

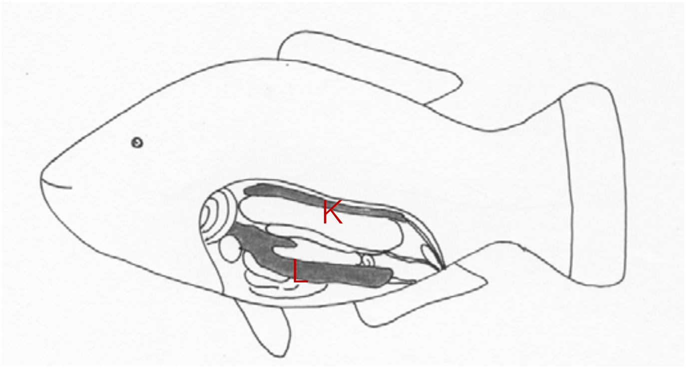
เก็บตัวอย่างปลากะมัง *Puntioplites proctozysron* จากแม่น้ำน่าน ในช่วงฤดูฝน 2 ครั้ง ในเดือนกรกฎาคม และเดือนตุลาคม พ.ศ. 2553 และในช่วงฤดูแล้ง 2 ครั้ง เดือนมกราคม และเดือนเมษายน พ.ศ. 2554 โดยวิธีลงข่ายจับปลา สุ่มเก็บตัวอย่างครั้งละ 10 ตัวต่อเดือน โดยเลือกเพศผู้ 5 ตัว และเพศเมีย 5 ตัว รวมตลอดระยะเวลา 1 ปี เก็บปลาทั้งหมด 40 ตัว โดยเก็บตัวอย่างปลากะมังในถังน้ำที่ให้ออกซิเจน (ภาพที่ 5.1) แล้วนำมาที่ห้องปฏิบัติการพื้นที่ป่าอนุรักษ์และสถานีวิจัยของจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย อำเภอเวียงสา จังหวัดน่าน วิธีการที่กระทำต่อปลาทั้งหมด ได้ผ่านความเห็นชอบจากคณะกรรมการกำกับดูแลการเลี้ยงและใช้สัตว์ทดลอง คณะวิทยาศาสตร์ (Protocal Review No. 1123011)

5.2.2 การเก็บตัวอย่างเนื้อเยื่อในห้องปฏิบัติการ

ในแต่ละครั้งที่ทำการเก็บตัวอย่าง นำปลากะมังมาสลบและการุณยฆาตด้วยการแช่ในน้ำแข็งเย็นจัด (rapid cooling method; Wilson และคณะ, 2009) แล้วตัดคอ ผ่าตัดเปิดช่องท้อง เก็บตับและไตมาชั่งน้ำหนักและบันทึกข้อมูล (ภาพที่ 5.2 และ 5.3) จากนั้นนำอวัยวะมาเก็บรักษาสภาพเนื้อเยื่อใน Davidson’s fixative ในภาชนะแก้วปิดสนิทเป็นเวลา 24 ชั่งโมง แล้วเก็บรักษาไว้ใน 70% ethanol

ภาพที่ 5.1 (A) การลงข่ายเก็บตัวอย่างปลากะมังในแม่น้ำน่าน (B) ข่ายที่ใช้ในการเก็บตัวอย่าง (C) การเก็บตัวอย่างปลากะมังในถังน้ำที่ให้ออกซิเจน





ภาพที่ 5.2 การผ่าตัดเปิดช่องท้องและตำแหน่งของอวัยวะภายในของปลากะมัง

Puntioplites proctozysron

(G=เหงือก I=ลำไส้ L=ตับ S=ถุงลม T=อวัยวะสร้างเซลล์สืบพันธุ์ K= ไต)

5.2.3 การเตรียมตัวอย่างเนื้อเยื่อตับและไตเพื่อศึกษาภายใต้กล้องจุลทรรศน์

การเตรียมตัวอย่างเนื้อเยื่อทำโดย นำตับและไตที่เก็บรักษาไว้ใน 70% ethanol มาผ่านกระบวนการเตรียมสไลด์ถาวรโดยวิธี paraffin method ตัด section ด้วยเครื่อง rotary microtome ที่ความหนา 5 µm แล้วย้อมสี hematoxylin และ eosin (H&E stain) และ Periodic Acid Schiff (PAS stain) ตามวิธีมาตรฐาน (Humason, 1979)

5.2.4 การศึกษาโครงสร้างพื้นฐานของเนื้อเยื่อตับและไตของปลากะมัง

การศึกษาโครงสร้างพื้นฐานของเนื้อเยื่อทำโดย นำสไลด์ถาวรที่ย้อมสีแล้วมาศึกษาจุลกายวิภาคพื้นฐานของตับและไตภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสง โดยเทียบเคียงกับลักษณะพื้นฐานของเนื้อเยื่อตับและไตของปลาโดย Ostrander ในปี ค.ศ. 2000

5.2.5 การศึกษาพยาธิสภาพของเนื้อเยื่อตับและไตของปลากะมัง

การศึกษาพยาธิสภาพของเนื้อเยื่อทำโดย นำสไลด์ถาวรมาวิเคราะห์หาความผิดปกติของเนื้อเยื่อตับและไตของปลากะมัง ภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสง สำหรับเนื้อเยื่อตับสังเกตลักษณะของ hepatic lobule การเรียงตัวของเซลล์ตับ หลอดเลือด รวมทั้งลักษณะของเซลล์ตับ สำหรับเนื้อเยื่อไตสังเกตลักษณะการเรียงตัวของเซลล์ ลักษณะของท่อไตส่วนต่าง ๆ และขดเลือด glomerulus โดยมีขั้นตอนดังนี้

- ศึกษาเบื้องต้นเพื่อจำแนกกลุ่มอาการ โดยสังเกตรูปร่างลักษณะของเซลล์พื้นฐานของตับและไต สังเกตการเรียงตัวของเซลล์เพื่อดูการเสียโครงสร้างพื้นฐานของอวัยวะ การเกิดเลือดคั่ง (blood congestion) การตายของเซลล์ (necrosis) การสะสมสารภายในเซลล์ เช่น ไขมัน (vacuolization) รวมทั้งสังเกตการเข้ามาของเม็ดเลือดขาว ในเนื้อเยื่อตับ (leukocyte infiltration) การอักเสบ (inflammation) เป็นต้น สรุปอาการต่าง ๆ ดังที่กล่าวข้างต้น หรือพยาธิสภาพอื่นๆ ที่อาจพบได้ออกเป็นกลุ่มอาการหลัก

- ศึกษาแต่ละกลุ่มอาการหลัก โดยตรวจสอบสไลด์เนื้อเยื่อ ภายใต้กล้องจุลทรรศน์อีกครั้งหนึ่งอย่างละเอียด โดยทำทีละกลุ่มอาการ เพื่อประเมินความรุนแรงออกมาเป็นตัวเลข ตามวิธีการที่ดัดแปลงจาก Bernet และคณะ, 1999 โดยระดับของความรุนแรงในเนื้อเยื่อตับและไตประเมินออกมาเป็นคะแนนตั้งแต่ 0 ถึง +3 โดยมีความหมายดังนี้

0 หมายถึง ไม่พบอาการความผิดปกติในเนื้อเยื่อ

+1 หมายถึง พบอาการความผิดปกติเล็กน้อย หรือพบอาการความผิดปกติในเนื้อเยื่อน้อยกว่า 10%

+2 หมายถึง พบอาการความผิดปกติปานกลาง หรือพบอาการความผิดปกติในเนื้อเยื่อระหว่าง 10-50%

+3 หมายถึง พบอาการความผิดปกติรุนแรง หรือพบอาการความผิดปกติในเนื้อเยื่อมากกว่า 50%

การวิเคราะห์ข้อมูล ใช้การวิเคราะห์ข้อมูลแบบ semiquantitative โดยการคำนวณหาค่าอุบัติการณ์ (prevalence) ซึ่งเป็นค่าสัดส่วนของจำนวนตัวที่พบความผิดปกติต่อจำนวนตัวทั้งหมดออกมาเป็นผลของข้อมูลในรูปร้อยละทางอุบัติการณ์ (% prevalence)

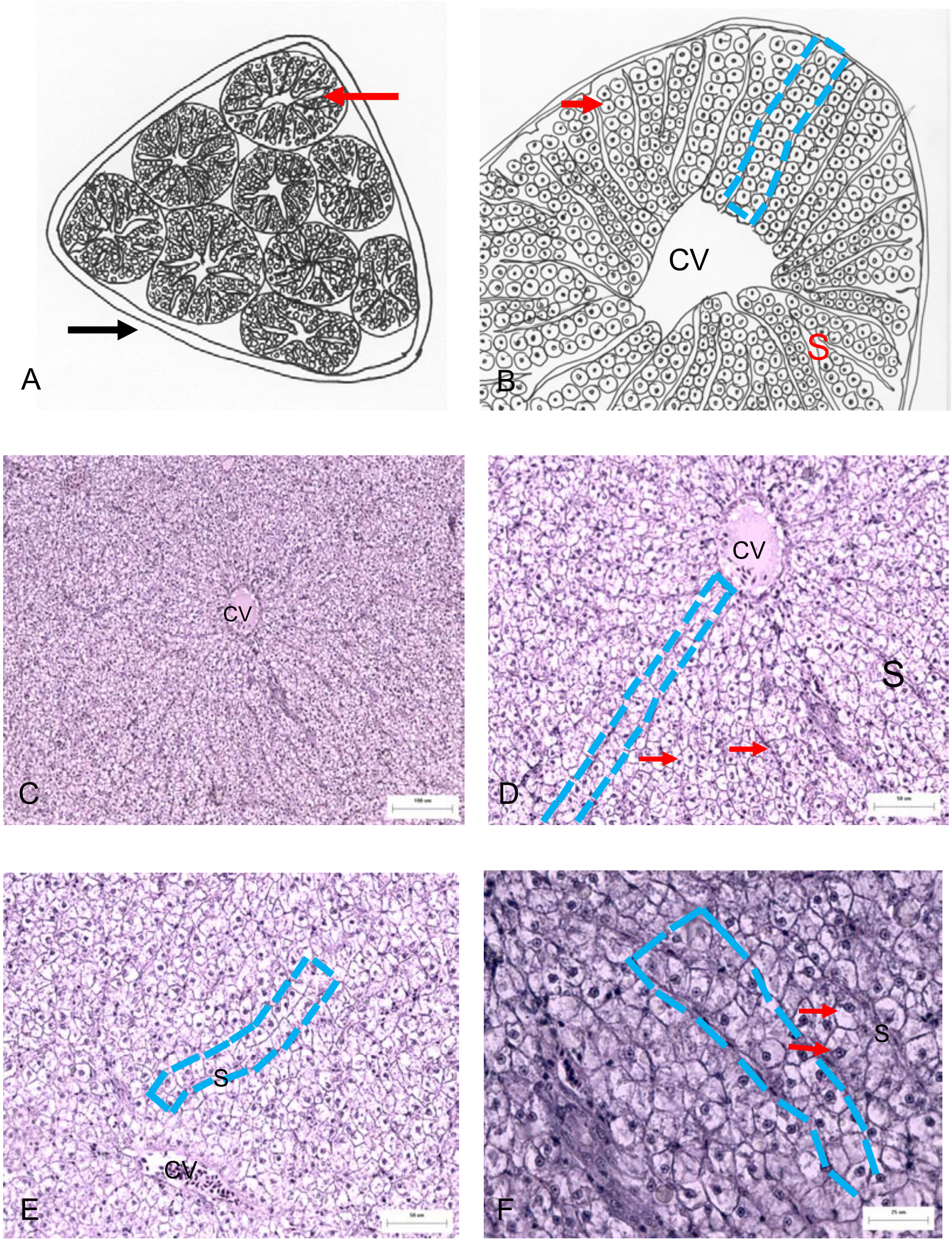
5.2.6 การวิเคราะห์ทางสถิติ

วิเคราะห์ความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณการปนเปื้อนของสารฆ่าวัชพืชกับความผิดปกติ ที่พบในเนื้อเยื่อตับและไตของปลากะมัง โดยนำข้อมูลปริมาณการปนเปื้อนสารฆ่าวัชพืชและความผิดปกติที่พบในเนื้อเยื่อตับและไตของปลากะมัง มาวิเคราะห์ความสัมพันธ์ด้วยสถิติ Spearman's correlation coefficient เพื่อหาค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ (correlation coefficient; r) ที่ระดับความเชื่อมั่น 99 เปอร์เซ็นต์ และนำมาพิจารณาว่าตัวแปรใดมีความสัมพันธ์อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติกับข้อมูลการปนเปื้อน

5.3 ผลการศึกษาและวิเคราะห์ผลการศึกษา

5.3.1 โครงสร้างพื้นฐานของตับของปลากะมัง

จากการศึกษาโครงสร้างเนื้อเยื่อตับ จากสไลด์การย้อมสี H&E ภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสง พบว่าลักษณะโครงสร้างพื้นฐานของเนื้อเยื่อตับปลากะมังมีลักษณะแตกต่างจากสัตว์เลี้ยงลูกด้วยน้ำนมทั่วไป (Wolf และ Wolfe, 2005) ลักษณะของเนื้อเยื่อตับภายนอกมีชั้นแคปซูลห่อหุ้ม ประกอบด้วยเนื้อเยื่อเกี่ยวพัน (connective tissue) แทรกตรงเข้าไปโอบล้อมโครงสร้างภายใน ภายในตับประกอบด้วยเซลล์ hepatocyte มากมาย มีขอบเขตเซลล์ชัดเจน มีลักษณะเป็นเซลล์รูปร่างหลายเหลี่ยม (polygonal cell) เรียงตัวเป็นแนวขนาน เรียกว่า hepatic plate โดยมีการเรียงตัวของเซลล์เป็นสองชั้น (two-cell layers) ตรงกลางระหว่าง hepatic plate มีช่องแอ่งเลือด sinusoid แทรกอยู่ และจะไหลเข้าสู่เส้นเลือดดำใหญ่ที่เรียกว่า central vein มีการแตกแขนงของ sisusoid คล้ายรัศมีออกจาก central vein ลักษณะของ hepatocyte เมื่อย้อมสี H&E พบว่านิวเคลียสมีลักษณะกลม ย้อมติดสีม่วงของ hematoxylin เห็นนิวคลีโอลัสชัดเจน ส่วนไซโตพลาสซึมจะติดสีชมพูของ eosin หากย้อมด้วยสี PAS จะเห็นลักษณะคล้ายกัน แต่ภายในไซโทพลาสซึมอาจเห็น glycogen granule เป็นสีชมพูเข้มสะสมอยู่ และสามารถสังเกตเห็น basement membrane ได้ด้วย ดังแสดงในภาพที่ 5.3



ภาพที่ 5.3

ภาพที่ 5.3 โครงสร้างพื้นฐานของเนื้อเยื่อตับของปลากะมัง *Puntioplites proctozysron*

(A) ไดอะแกรมแสดงโครงสร้างพื้นฐานของเนื้อเยื่อตับทั้งอวัยวะซึ่งมีแคปซูลห่อหุ่ม (ลูกศรสีดำ) ภายในประกอบด้วย hepatic lobule (ลูกศรสีแดง)

(B) ไดอะแกรมแสดงโครงสร้างพื้นฐานของ hepatic lobule แสดงให้เห็นเซลล์ตับ (ลูกศรสีแดง) เรียงตัวเป็น hepatic plate (เส้นประสีน้ำเงิน) มีช่องแอ่งเลือด (sinusoid; S) และ central vein (CV)

(C) เนื้อเยื่อของ hepatic lobule แสดงโครงสร้างพื้นฐาน ที่มี central vein (CV) อยู่ตรงกลาง (PAS stain)

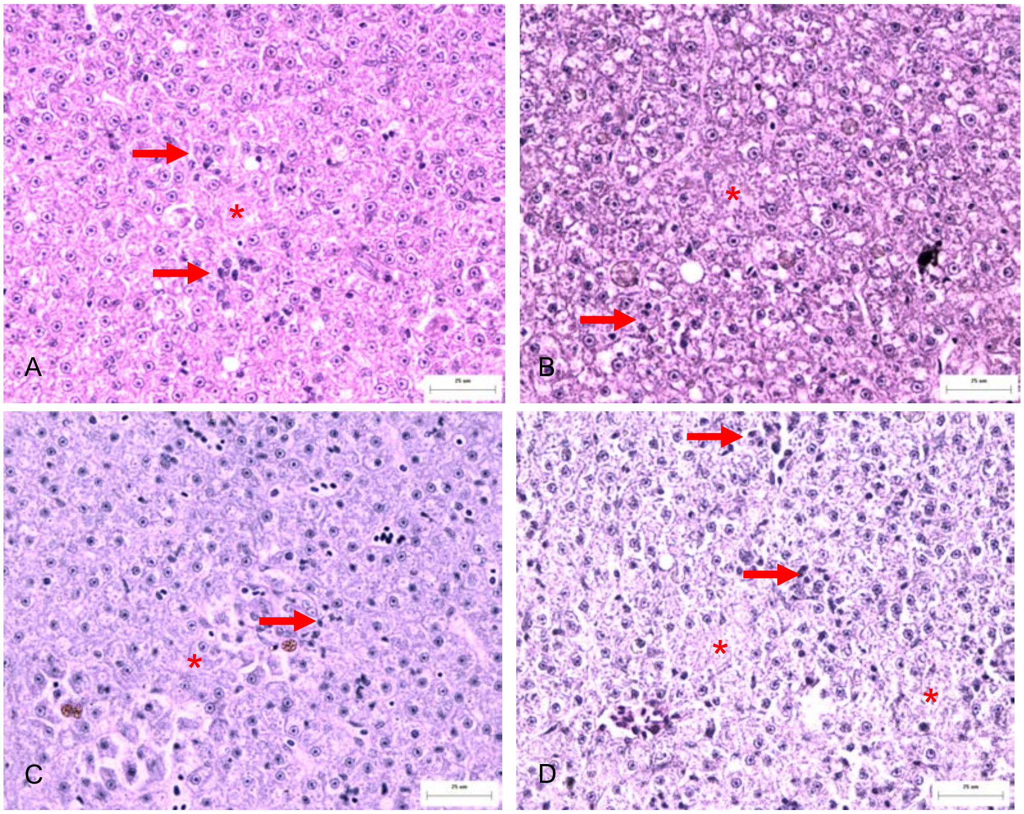
(D-E) เนื้อเยื่อเซลล์ hepatic lobule ขยายให้เห็นโครงสร้างของ hepatic plate (เส้นประสีน้ำเงิน) ที่มี sinusoid (s) คั่น (PAS stain)

(F) โครงสร้างของ hepatic plate ประกอบด้วย hepatocyte (ลูกศรสีแดง) เรียงตัวเป็นแถวตามแนว sisusoid (s) (PAS stain)

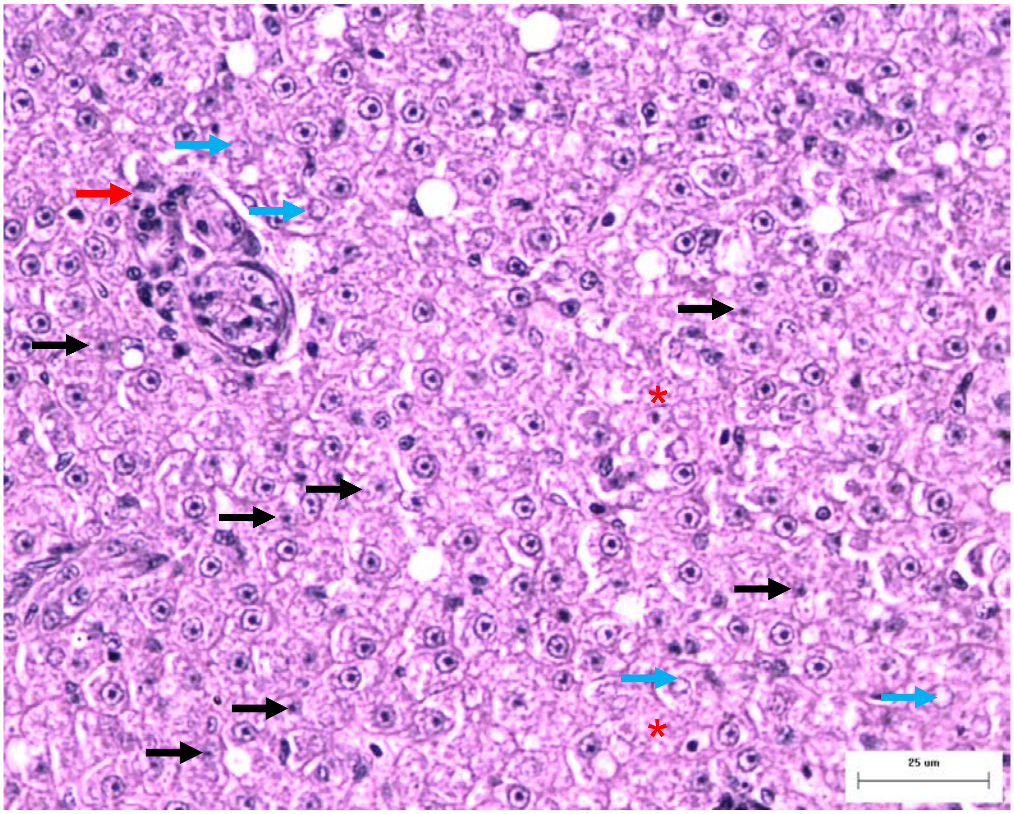
5.3.2 พยาธิสภาพของเนื้อเยื่อตับของปลากะมัง

จากผลการศึกษาทางด้านพยาธิสภาพในเนื้อเยื่อตับของปลากะมัง ที่เก็บตัวอย่างจากแม่น้ำน่าน อำเภอเวียงสา จังหวัดน่าน ตั้งแต่เดือนกรกฎาคม พ.ศ. 2553 จนถึงเดือนเมษายน พ.ศ. 2554 พบลักษณะอาการความผิดปกติทั้งหมด 13 อาการ ได้แก่ เซลล์ตับในบางบริเวณมีขอบเขตเซลล์ไม่ชัดเจน มีลักษณะที่ผิดปกติ คือ เกิดการตายของเซลล์ (necrosis) ซึ่งสังเกตได้จากลักษณะนิวเคลียสมีการสลายตัว ขอบเขตของเซลล์หายไป และเกิดเป็นบริเวณกว้าง, การเกิด pyknosis เป็นอาการที่มีลักษณะของโครมาตินภายในนิวเคลียสรวมตัวกันแน่น และนิวเคลียสหดตัวย้อมติดสีเข้ม, การเกิดแวคคิวโอลภายในเซลล์ (vacuolization), การเกิด malano-macrophage center (MMCs) โดย MMCs เป็นลักษณะของอาการที่มีกลุ่มเซลล์เข้ามาเก็บกินซากของเซลล์ที่ตายแล้ว สังเกตเห็นเป็นสีน้ำตาลเข้ม, การเกิด karyomegaly โดยนิวเคลียสของเซลล์ตับมีขนาดใหญ่ผิดปกติ, การเกิด syncytial cell โดยอาจเกิดจากการแบ่งเซลล์โดยไม่แบ่งนิวเคลียสของเซลล์ตับมากกว่า และเมื่อนำเนื้อเยื่อตับไปผ่านขั้นตอนการย้อมสี PAS พบการสะสมของไกลโคเจนในตับจำนวนมาก, นอกจากนี้ยังพบอาการความผิดปกติอื่น ๆ ได้แก่ การอักเสบ (inflammation), พบภาวะ edema คือมีของเหลวแทรกอยู่ภายในช่องว่างระหว่างเนื้อเยื่อ (interstitial tissue), มีการเข้ามาของเม็ดเลือดขาวหลายชนิด (leukocyte infiltration) การสลายตัวของนิวเคลียส (karyolysis) และอาการเลือดคั่งใน sinusoid ดังแสดงในภาพที่ 5.4 - 5.12

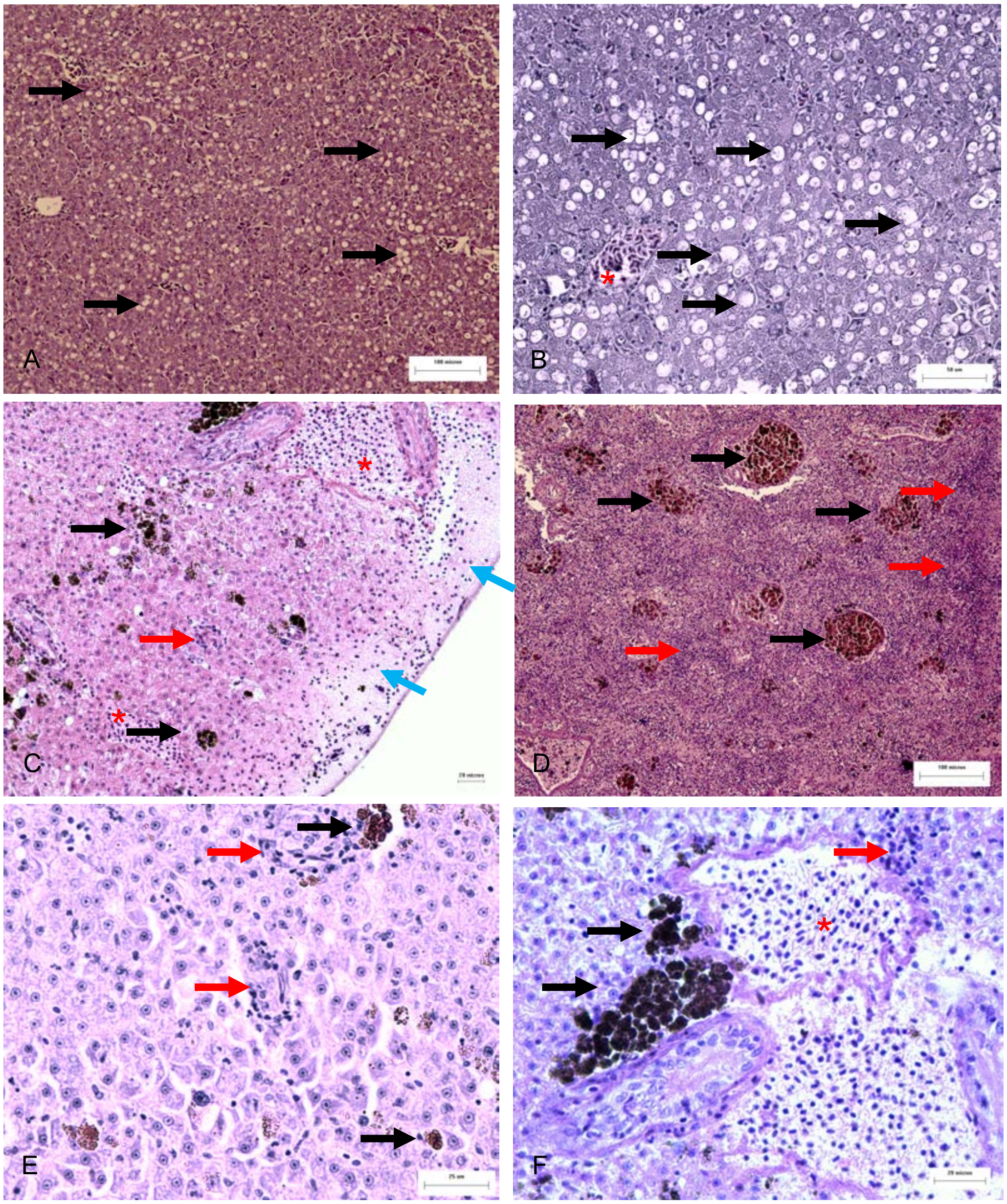
จากการประเมินผลการศึกษาพบลักษณะอาการความผิดปกติที่เด่นชัดอยู่ 6 ลักษณะอาการ ได้แก่ necrosis, pyknosis, vacuolization, malano-macrophage center (MMCs), leukocyte infiltration และ karyolysis ดังแสดงในตารางที่ 5.1



ภาพที่ 5.4 (A-D) เนื้อเยื่อตับของปลากะมัง *Puntioplites proctozysron* ที่เก็บจากแม่น้ำน่าน ตั้งแต่เดือนกรกฎาคม พ.ศ. 2553 (A), ตุลาคม พ.ศ. 2553 (B), มกราคม พ.ศ. 2554 (C) และ เมษายน พ.ศ. 2554 (D) แสดงการเกิด necrosis และ leukocyte infiltration (ลูกศรสีแดง) H&E stain

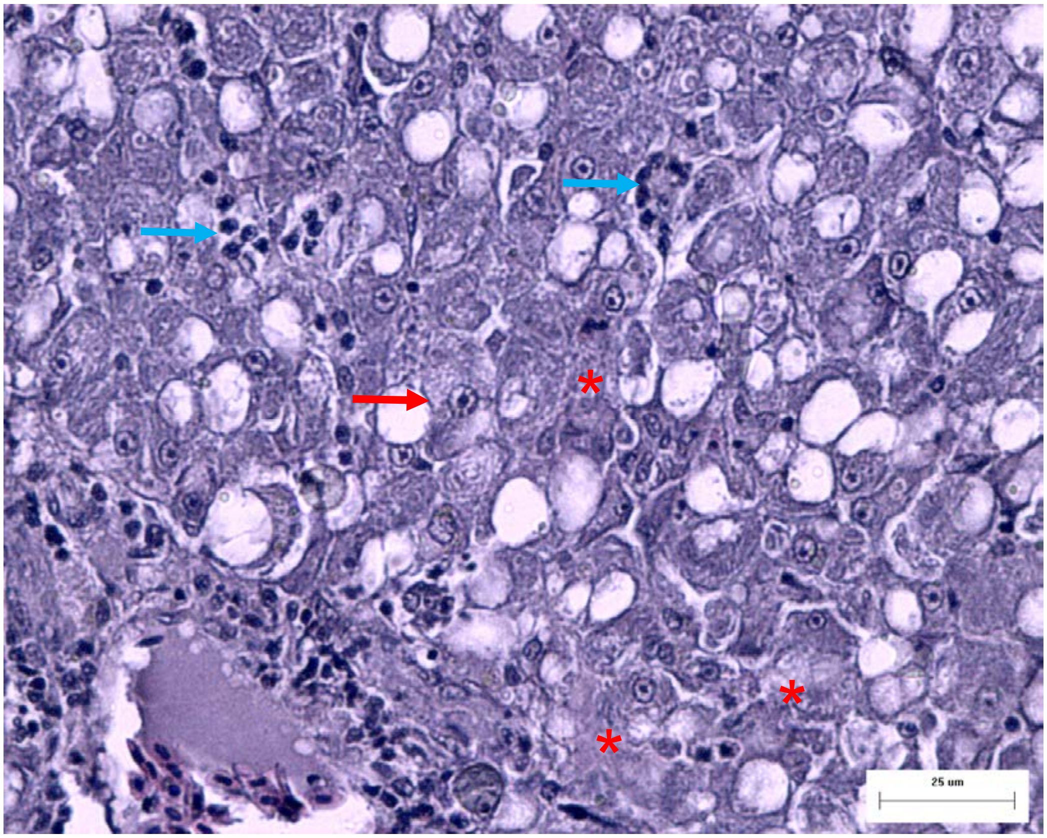


ภาพที่ 5.5 เนื้อเยื่อตับของปลากะมัง *Puntioplites proctozysron* ที่เก็บจากแม่น้ำน่าน แสดงการเกิด pyknosis (ลูกศรสีดำ), necrosis (*), leukocyte infiltration (ลูกศรสีแดง) และ karyolysis (ลูกศรสีฟ้า) H&E stain

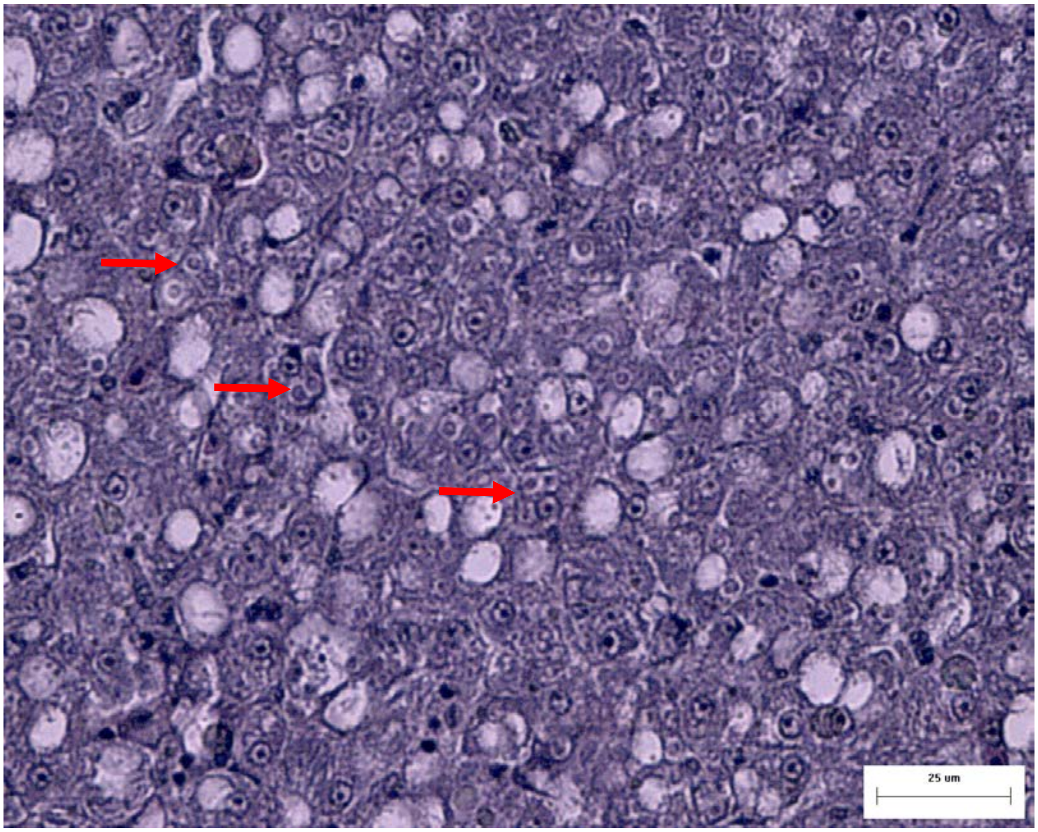


ภาพที่ 5.6 **(A-B)** เนื้อเยื่อตับของปลากะมัง *Puntioplites proctozysron* ที่เก็บจากแม่น้ำน่าน แสดงอาการ vacuolization (ลูกศรสีดำ) มากผิดปกติ และอาการ blood congestion ใน sinusoid (*) **(C-F)** การเกิด malano-macrophage center (MMCs) (ลูกศรสีดำ), leukocyte infiltration (ลูกศรสีแดง), necrosis (ลูกศรสีน้ำเงิน) และอาการ blood congestion ใน sinusoid (*)

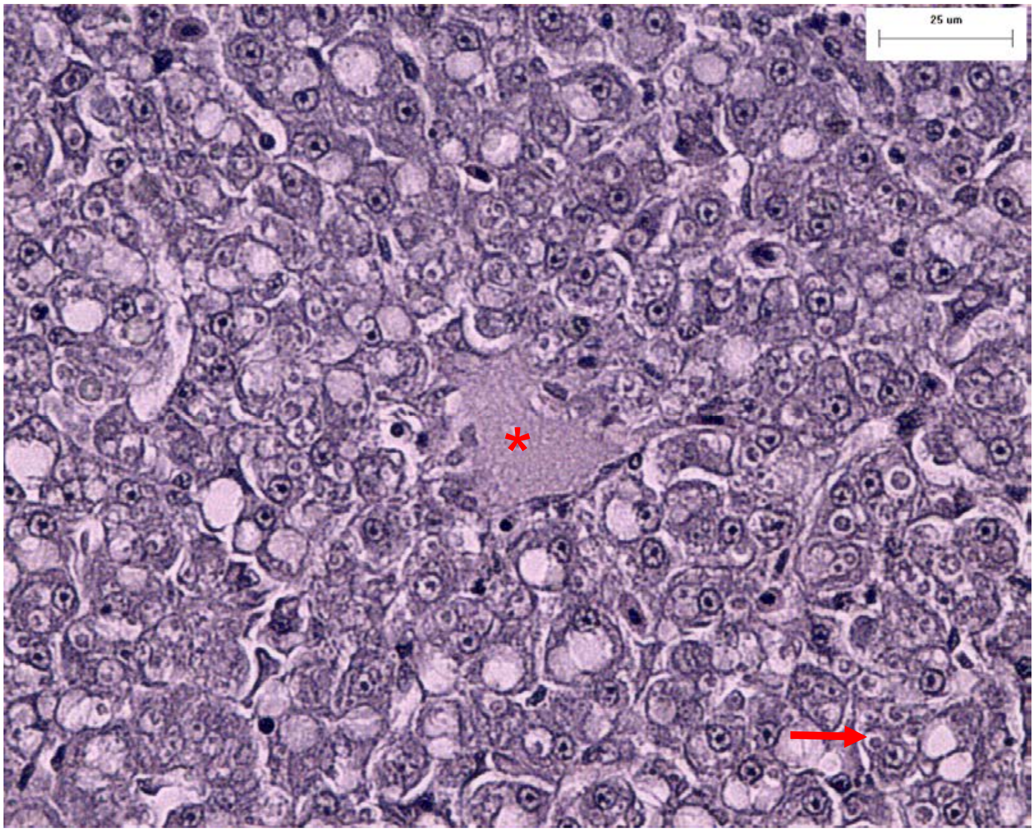
(A, B, C, D และ F: H&E และ E: PAS stain)



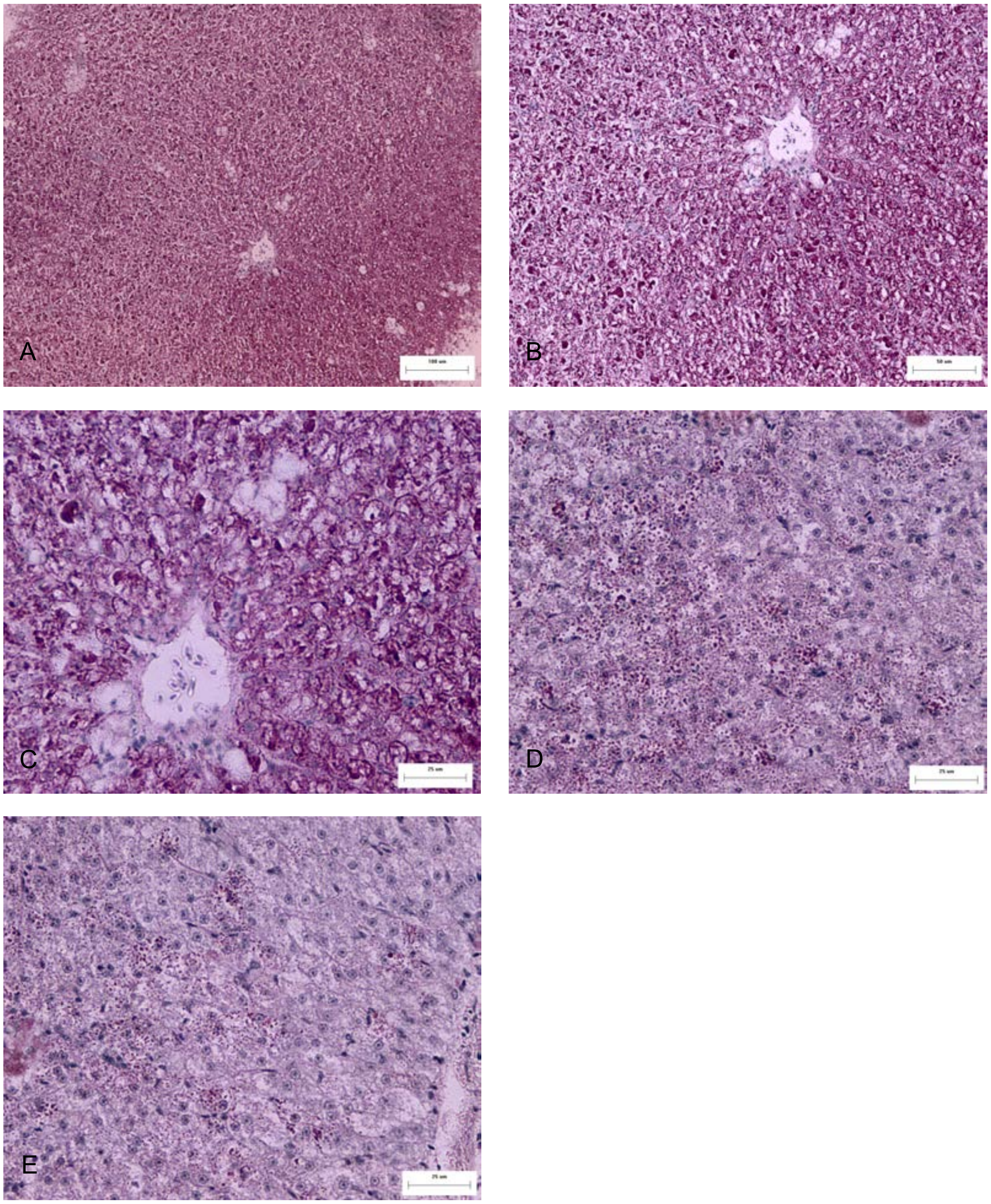
ภาพที่ 5.7 เนื้อเยื่อตับของปลากะมัง *Puntioplites proctozysron* ที่เก็บจากแม่น้ำน่าน แสดงการเกิด karyomegaly (ลูกศรสีแดง), leukocyte infiltration (ลูกศรสีน้ำเงิน) และ necrosis (*) H&E stain



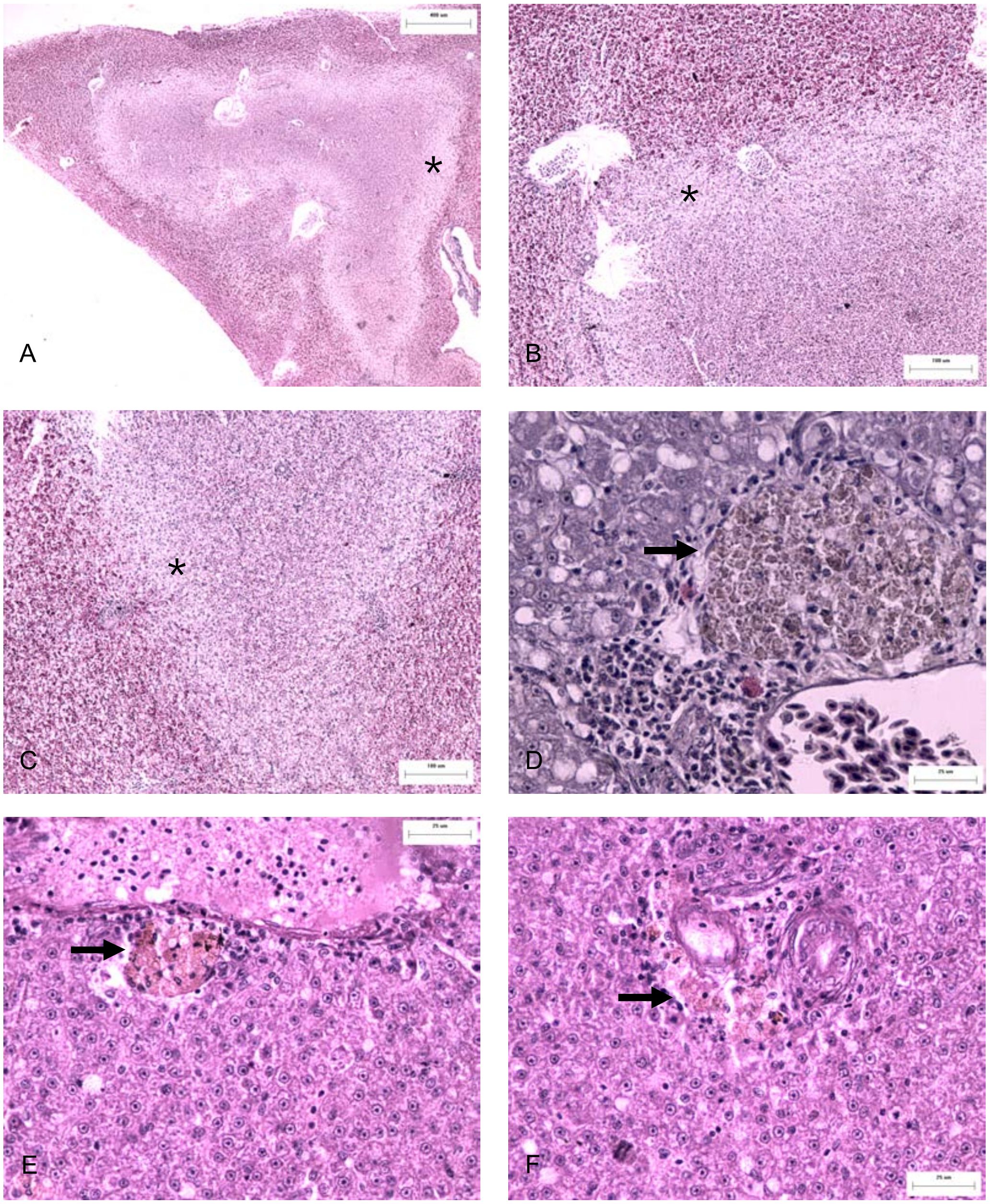
ภาพที่ 5.8 เนื้อเยื่อตับของปลากะมัง *Puntioplites proctozysron* ที่เก็บจากแม่น้ำน่าน แสดงการเกิด syncytial cell (ลูกศรสีแดง) ในเนื้อเยื่อตับของปลากะมัง H&E stain



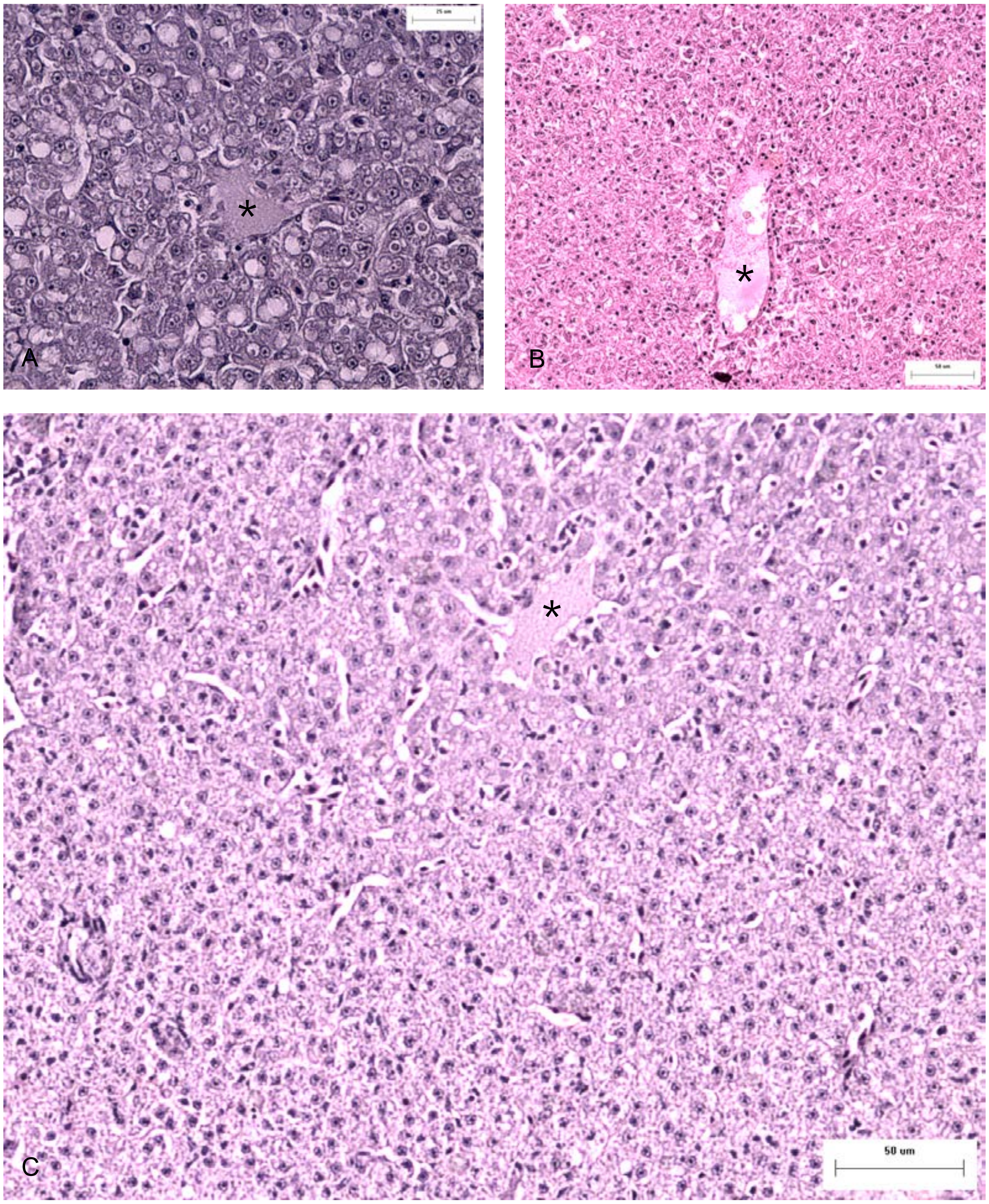
ภาพที่ 5.9 เนื้อเยื่อตับของปลากะมัง *Puntioplites proctozysron* ที่เก็บจากแม่น้ำน่าน แสดงการเกิด syncytial cell (ลูกศรสีแดง) และ edema (*) ในเนื้อเยื่อตับของปลากะมัง H&E stain



ภาพที่ 5.10 (A-E) เนื้อเยื่อตับของปลากะมัง *Puntioplites proctozysron* ที่เก็บจากแม่น้ำน่าน ตั้งแต่เดือนกรกฎาคม พ.ศ. 2553 (A), ตุลาคม พ.ศ. 2553 (B-C), มกราคม พ.ศ. 2554 (D) และเมษายน พ.ศ. 2554 (E) แสดงเนื้อเยื่อตับที่ผ่านขั้นตอนการย้อมสี PAS พบจุดสีแดงของการสะสมไกลโคเจนจำนวนมาก PAS stain



ภาพที่ 5.11 (A-C) เนื้อเยื่อตับของปลากะมัง *Puntioplites proctozysron* ที่เก็บจากแม่น้ำน่าน แสดงการพร่อง glycogen (*) **(D-F)** การเกิดการอักเสบ (inflammation; ลูกศรชี้) H&E stain



ภาพที่ 5.12 (A-C) เนื้อเยื่อตับของปลากะมัง *Puntioplites proctozysron* ที่เก็บจากแม่น้ำน่าน แสดงการการเกิด edema (*) H&E stain

ตารางที่ 5.1 การประเมินอาการความผิดปกติทางพยาธิสภาพในเนื้อเยื่อตับของปลากะมัง *Puntioplites proctozysron* ที่เก็บตัวอย่างจากแม่น้ำน่าน อำเภอเวียงสา จังหวัดน่าน ตั้งแต่เดือนกรกฎาคม พ.ศ. 2553 จนถึงเดือนเมษายน พ.ศ. 2554

	จำนวนตัวที่พบพยาธิภาพในเนื้อเยื่อตับ																							
	Necrosis				pyknosis				vacuolizatoin				malano-macrophage center (MMCs)				leukocyte infiltration				karyolysis			
	+3	+2	+1	0	+3	+2	+1	0	+3	+2	+1	0	+3	+2	+1	0	+3	+2	+1	0	+3	+2	+1	0
กรกฎาคม 2553 (n=6)	1	1	3	1	-	2	3	1	2	4	-	-	-	-	-	6	1	2	2	1	-	3	1	2
ตุลาคม 2553 (n=10)	1	4	5	-	-	9	-	1	4	4	2	-	1	1	-	8	-	2	8	-	-	-	5	5
มกราคม 2554 (n=10)	4	2	4	-	-	5	1	4	2	5	2	1	3	3	-	4	3	4	3	-	-	-	6	4
เมษายน 2554 (n=10)	2	5	3	-	2	5	3	-	1	1	7	1	4	2	2	2	5	1	4	-	-	-	3	7

หมายเหตุ: การให้คะแนนระดับความรุนแรงของอาการความผิดปกติที่พบในเนื้อเยื่อ +3 = พบอาการความผิดปกติในเนื้อเยื่อ > 50%, +2 = พบอาการความผิดปกติในเนื้อเยื่อระหว่าง 10-50%, +1 = พบอาการความผิดปกติในเนื้อเยื่อ < 10%, 0 = ไม่พบอาการความผิดปกติในเนื้อเยื่อ

ตารางที่ 5.2: ค่าอุบัติการณ์ (prevalence) ของพยาธิสภาพที่พบในเนื้อเยื่อตับของปลากะมัง *Puntioplites proctozysron* ที่เก็บตัวอย่างจากแม่น้ำน่าน อำเภอเวียงสา จังหวัดน่าน ตั้งแต่เดือนกรกฎาคม พ.ศ. 2553 จนถึงเดือนเมษายน พ.ศ. 2554

	necrosis	pycknosis	vacuolization	MMCs	leukocyte infiltration	karyolysis
กรกฎาคม 2553 (n=6)	83.33%	83.33%	100%	0	83.33%	66.66%
ตุลาคม 2553 (n=10)	100%	90%	100%	20%	100%	50%
มกราคม 2554 (n=10)	100%	60%	90%	60%	100%	60%
เมษายน 2554 (n=10)	100%	100%	90%	80%	100%	30%

จากผลการศึกษาทางพยาธิสภาพพบว่า ความผิดปกติของเนื้อเยื่อตับที่พบในปลากะมังที่เก็บตัวอย่างจากแม่น้ำน่าน ตั้งแต่เดือนกรกฎาคม พ.ศ. 2553 จนถึงเดือนเมษายน พ.ศ. 2554 ที่เด่นชัดมี 6 ลักษณะ คือ necrosis, pyknosis, vacuolization, MMCs, leukocyte infriltration และ karyolysis ดังแสดงในตารางที่ 5.1 เป็นที่น่าสังเกตว่า การเกิด vacuolation ในเซลล์ตับของปลากะมังพบระดับสูงสุดในเดือนตุลาคม พ.ศ. 2553 แสดงถึงการมีไขมันสะสมในเซลล์ตับมากผิดปกติและสอดคล้องกับค่า HSI ที่สูงขึ้นในเดือนเดียวกัน

การพบ vacuolation ในระดับที่ผิดปกตินี้อาจมีความเชื่อมโยงกับสารฆ่าวัชพืชที่ตรวจพบทั้ง 3 ชนิด ได้แก่ อะทราซีน ไกลโฟเซต และพาราควอท ซึ่งสารฆ่าวัชพืชเหล่านี้อาจสามารถเกิดการสะสมในไขมันได้ ปลาอาจมีการตอบสนองโดยการสะสมสารพิษไว้ในไขมัน เพื่อปรับตัวต่อการได้รับสารพิษ อาการนี้เป็นการตอบสนองขั้นพื้นฐานที่พบได้เร็วหลังจากปลาได้รับสารพิษ หลังจากนั้นถ้าปลาสามารถทนต่อสารพิษได้ ตับของปลาจะเข้าสู่ขั้นตอนการสลายไขมัน ส่งผลให้เกิดการตายของเซลล์ตับต่อมาได้ (Biagianti-Risbourge และ Bastide, 1995)

จากการประเมินค่าอุบัติการณ์ของความผิดปกติที่ตรวจพบในเนื้อเยื่อตับ พบว่า อาการ vacuolation เป็นอาการที่พบมีค่าสูงในปลาทุกตัวที่ทำการศึกษา (90-100% prevalence; ตารางที่ 5.2) อาการนี้อาจเป็นผลมาจากการสัมผัสสารฆ่าวัชพืชในเดือนก่อนหน้า ซึ่งตรวจพบระดับการปนเปื้อนของอะทราซีนที่สูงในดินตะกอน แต่อย่างไรก็ตามการเกิด vacuolation ในเซลล์ตับนั้นอาจเกิดจากปัจจัยอื่นๆ ได้อีกหลายปัจจัย อาทิเช่น อาหาร, การใช้พลังงาน และ species (Wolf และ Wolfe, 2005) เนื่องจากตับปลาที่ได้รับสารพิษอาจจะพบการสะสมไขมันเพิ่มขึ้นหรือลดลงก็ได้ อีกทั้งไม่มีข้อกำหนดที่เป็นที่ยอมรับในการวินิจฉัยอาการ lipidosis ดังนั้น การสรุปผลจากอาการ vacuolization เพียงอย่างเดียวจึงอาจไม่เพียงพอ (Ferguson, 1989; Risbourg และ Bastide, 1995)

การพบระดับของ MMCs ในระดับเล็กน้อยไปจนถึงระดับสูงในเนื้อเยื่อตับของปลากะมังที่เก็บตัวอย่างได้ตั้งแต่เดือนกรกฎาคม พ.ศ. 2553 จนถึงเดือนเมษายน พ.ศ. 2554 (0, 20%, 60% และ 80% prevalence) อาจเป็นการตอบสนองต่อสารพิษที่พบหรือการรบกวนต่อระบบภูมิคุ้มกันในปลา การพบอาการนี้อาจจะสัมพันธ์กับการตรวจพบสารฆ่าวัชพืชอะทราซีนที่มีระดับสูงในเดือนมกราคม พ.ศ. 2554 อาการนี้อาจจะบ่งชี้ถึงการตอบสนองทางภูมิคุ้มกันต่อการได้รับสารพิษ (Boorman และคณะ, 1997)

สำหรับการตายของเซลล์ทั้งแบบ necrosis และ pyknosis พบในระดับต่ำถึงเล็กน้อยและปานกลางในทั้ง 4 เดือนที่ทำการศึกษา (83.33%, 100%, 100% และ 100% prevalence;

83.33%, 90%, 60% และ 100% prevalence) การที่เซลล์ตายและเกิดการสลายตัวหรือการฝ่อของเซลล์ตับนั้น เป็นการเปลี่ยนแปลงที่บ่งบอกถึงภาวะเสี่ยงอันตรายของตับ ถึงแม้จะพบน้อย แต่ก็ถือเป็นการตอบสนองที่รุนแรงที่ตรวจพบในเนื้อเยื่อตับ เป็นที่น่าสังเกตว่าระดับการปนเปื้อนของอะทราซีนที่มีระดับต่ำ ๆ ในเดือนกรกฎาคม พ.ศ. 2553 ก่อนที่จะมีระดับการปนเปื้อนที่สูงขึ้นในเดือนมกราคม พ.ศ. 2554 อาจมีความสอดคล้องกับระดับและค่าอุบัติการณ์ที่เพิ่มขึ้นของการตายของเซลล์ตับในช่วงเดือนตุลาคม พ.ศ. 2553 ถึงเมษายน พ.ศ. 2554

นอกจากนี้ยังพบอาการความผิดปกติอื่น ๆ ได้แก่ การเกิด karyomegaly โดยนิวเคลียสของเซลล์ตับมีขนาดใหญ่ผิดปกติ, การเกิด syncytial cell โดยเกิดการแบ่งนิวเคลียสโดยไม่แบ่งไซโทพลาสซึมภายในเซลล์ตับ, การพร่อง glycogen, การเกิด inflammation และพบภาวะ edema คือมีของเหลวแทรกอยู่ภายในช่องว่างระหว่างเนื้อเยื่อ (interstitial tissue) ซึ่งลักษณะอาการเหล่านี้เป็นลักษณะของอาการที่บ่งบอกถึงความผิดปกติที่เกิดขึ้นในเนื้อเยื่อ โดยเป็นสภาวะที่บ่งบอกว่าเซลล์นั้นได้รับการรบกวนบางอย่าง เช่น ได้รับสารพิษ หรืออาจเป็นอาการที่เกิดมาจากสาเหตุอื่น ๆ เช่น การติดเชื้อโรค สารเคมี และปฏิกิริยาของระบบภูมิคุ้มกัน การเกิดภาวะ edema อาจเป็นผลมาจากผลกระทบต่อการควบคุมสมดุลของของเหลวภายในร่างกาย ไม่ว่าจะเป็นของเหลวในเซลล์ ของเหลวระหว่างเนื้อเยื่อ หรือของเหลวในหลอดเลือด สังเกตได้จากการที่พบของเหลวย้อมติดสีชมพูของ eosin แทรกตัวเข้ามาอยู่ภายใน interstitial tissue ของอวัยวะที่เกิดอาการนี้

จากผลการประเมินค่าอุบัติการณ์ (prevalence) ของความผิดปกติที่ตรวจพบในเนื้อเยื่อตับ พบว่า necrosis, pyknosis, vacuolization และ MMCs คือ อาการหลักที่พบในเนื้อเยื่อตับของปลากะมัง พบค่าอุบัติการณ์ดังแสดงในตารางที่ 5.2 necrosis, pyknosis และ vacuolization มีเปอร์เซ็นใกล้เคียงกันในทั้ง 4 เดือน โดยมีเปอร์เซ็นสูงสุด 100% ส่วน MMCs มีแนวโน้มของเปอร์เซ็นที่เพิ่มขึ้น ตั้งแต่เดือนกรกฎาคม พ.ศ. 2553 จนถึงเดือนเมษายน พ.ศ. 2554

ตารางที่ 5.3 สหสัมพันธ์ระหว่างผลทางพยาธิสภาพที่พบในเนื้อเยื่อตับของปลากะมังกับปริมาณการปนเปื้อนของสารฆ่าวัชพืช

พยาธิสภาพ	Spearman's correlation coefficient		
	อะทราซีน	ไกลโฟเซต	พาราควอท
Necrosis	N/D	N/D	N/D
Pyknosis	r = -1.000** P = 0.000 (n=3)	r = -0.500 P = 0.667 (n=3)	N/D
vacuolization	r = 0.000 P = 1.000 (n=3)	r = -0.866 P = 0.333 (n=3)	r = 0.000 P = 1.000 (n=3)
malano-macrophage center (MMCs)	r = -0.500 P = 0.667 (n=3)	r = 0.500 P = 0.667 (n=3)	r = 0.500 P = 0.667 (n=3)
leukocyte infiltration	N/D	N/D	N/D
karyolysis	N/D	r = 0.500 P = 0.667 (n=3)	r = -1.000** P = 0.000 (n=3)

หมายเหตุ

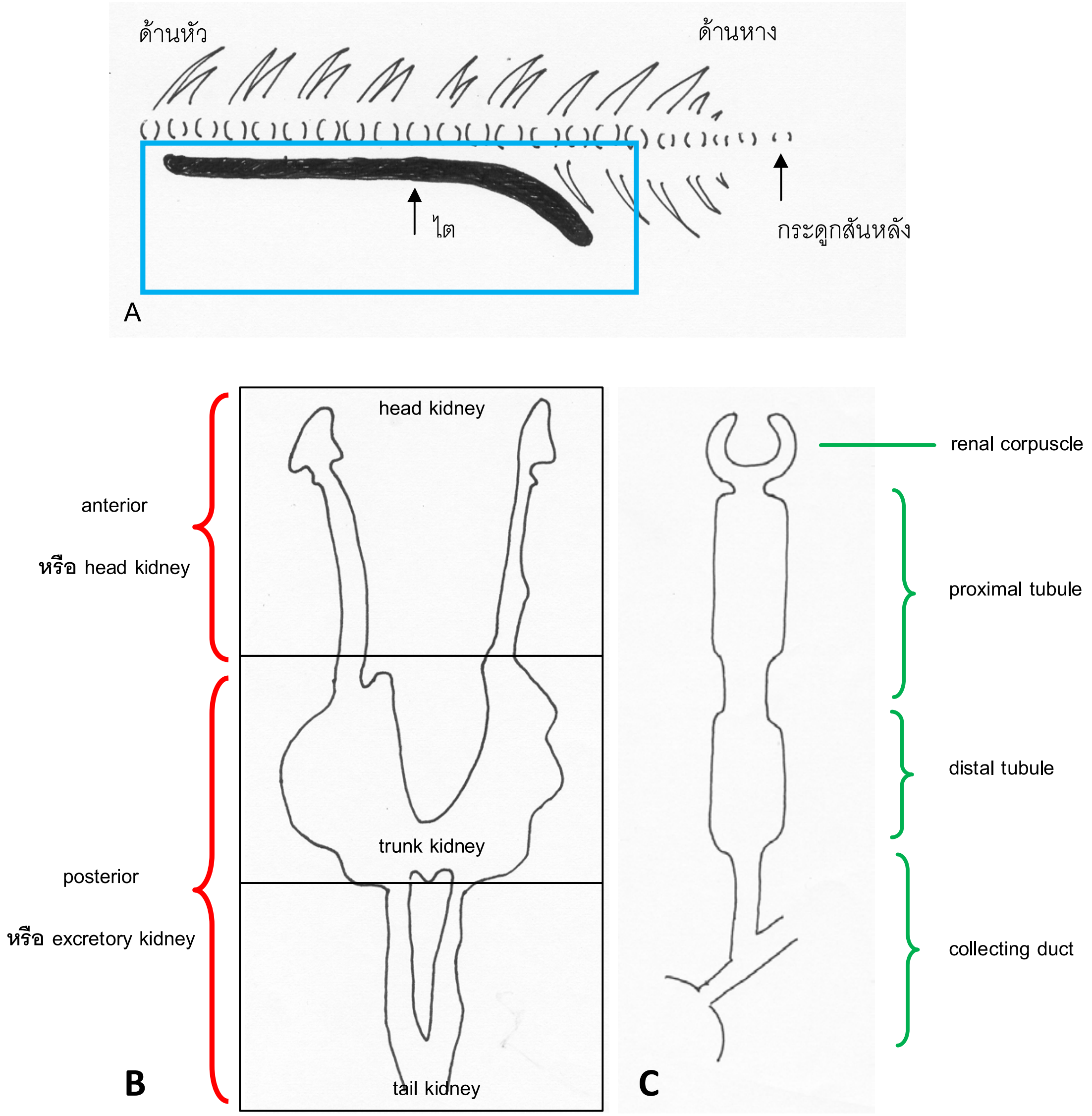
** แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.01$)

N/D คือ ไม่สามารถวิเคราะห์ผลทางสถิติได้ เนื่องจากพบอาการในระดับเท่ากันทุกกลุ่ม

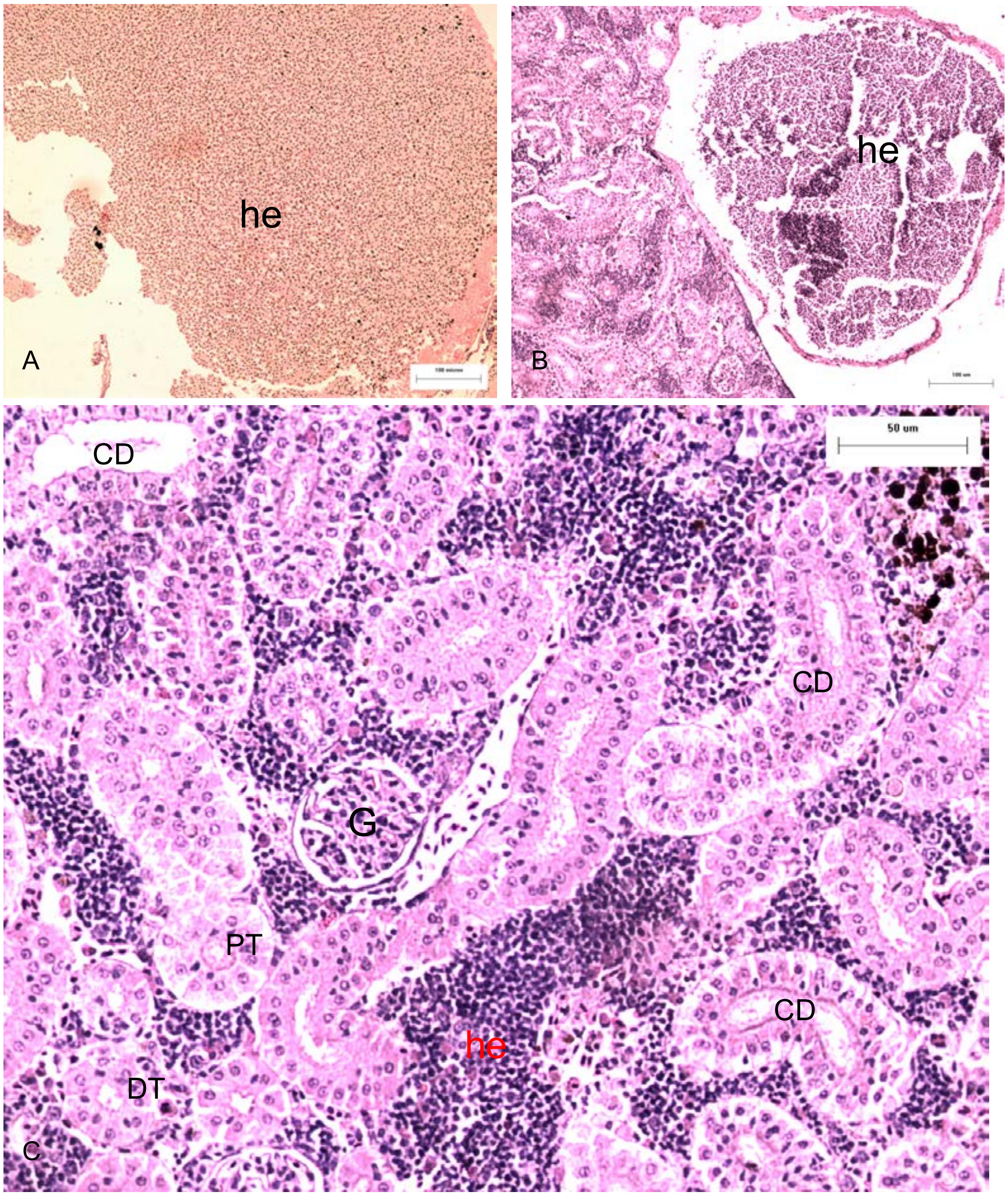
จากผลการวิเคราะห์สหสัมพันธ์ระหว่างปริมาณการปนเปื้อนของสารฆ่าวัชพืช กับความผิดปกติที่พบในเนื้อเยื่อตับปลากะมัง โดยนำข้อมูลปริมาณการปนเปื้อนสารฆ่าวัชพืชและความผิดปกติที่พบในเนื้อเยื่อตับปลากะมัง มาวิเคราะห์ด้วยสถิติ Spearman's correlation coefficient เพื่อหาค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ได้ผลการวิเคราะห์ดังแสดงในตารางที่ 5.3 จากผลที่ได้พบว่า อะทราซีนมีสหสัมพันธ์ในทางตรงกันข้ามกับการพบ pyknosis ไกลโฟเซตไม่มีสหสัมพันธ์กับการพบอาการใดเลย และพาราควอทมีสหสัมพันธ์ในทางตรงกันข้ามกับการพบ karyolysis

5.3.3 โครงสร้างพื้นฐานของไตของปลากะมัง

จากการศึกษาโครงสร้างเนื้อเยื่อไตของปลากะมัง จากสไลด์ถาวรภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสง พบว่าลักษณะโครงสร้างพื้นฐานของเนื้อเยื่อไตปลากะมังประกอบด้วย 3 ส่วน ได้แก่ ส่วนหัว (head kidney) ส่วนกลาง (trunk kidney) และส่วนหาง (tail kidney) และสามารถแบ่งแยกตามหน้าที่และเซลล์ที่พบได้ 2 ส่วน คือ ไตส่วนต้น (anterior หรือ head kidney) และไตส่วนท้าย (posterior หรือ excretory kidney) ไตส่วนต้นประกอบด้วยเซลล์ต้นกำเนิดเม็ดเลือด (hematopoietic cell) จำนวนมาก ซึ่งเกี่ยวข้องกับระบบภูมิคุ้มกัน (innate immunity) และทำหน้าที่ในการสร้างเม็ดเลือดแดง ไตส่วนท้าย ทำหน้าที่ในการกรองสารต่าง ๆ โครงสร้างเนื้อเยื่อภายในประกอบด้วยหน่วยไต (nephron) ซึ่งประกอบด้วย renal corpuscle ที่มี glomerulus ขนาดใหญ่ และกลุ่มหลอดเลือดฝอยขนาดเล็กขดรวมกันเป็นก้อน มีแคปซูลหุ้มเรียกว่า Bowman’s capsule ล้อมรอบ glomerulus อยู่ และมีช่องว่างระหว่าง glomerulus และ Bowman’s capsule เรียกว่า Bowman’s space นอกจากนี้ไตส่วนท้ายยังประกอบด้วยท่อไตส่วน proximal tubule ซึ่งบุด้วย tall cuboidal epithelium ที่มี brush border และท่อไตส่วน distal tubule บุด้วย low cuboidal epithelium ที่ไม่มี brush border และท่อไตส่วน collecting duct ระหว่างท่อไตพบมี hematopoietic cell รวมกันเป็นกลุ่ม เรียกว่า nest of hematopoietic tissue ดังแสดงในภาพที่ 5.13 - 5.14



ภาพที่ 5.13 ไดอะแกรมแสดงโครงสร้างพื้นฐานของไตปลากะมัง *Puntioplites proctozysron* (A) ลักษณะการวางตัวของไตตามแนวกระดูกสันหลังทอดยาวไปทางด้านท้ายของลำตัวปลา (B) รูปร่างและการแบ่งส่วนต่าง ๆ ของไต (C) ส่วนต่าง ๆ ของท่อไต (ดัดแปลงจาก Ostrander, 2000)



ภาพที่ 5.14

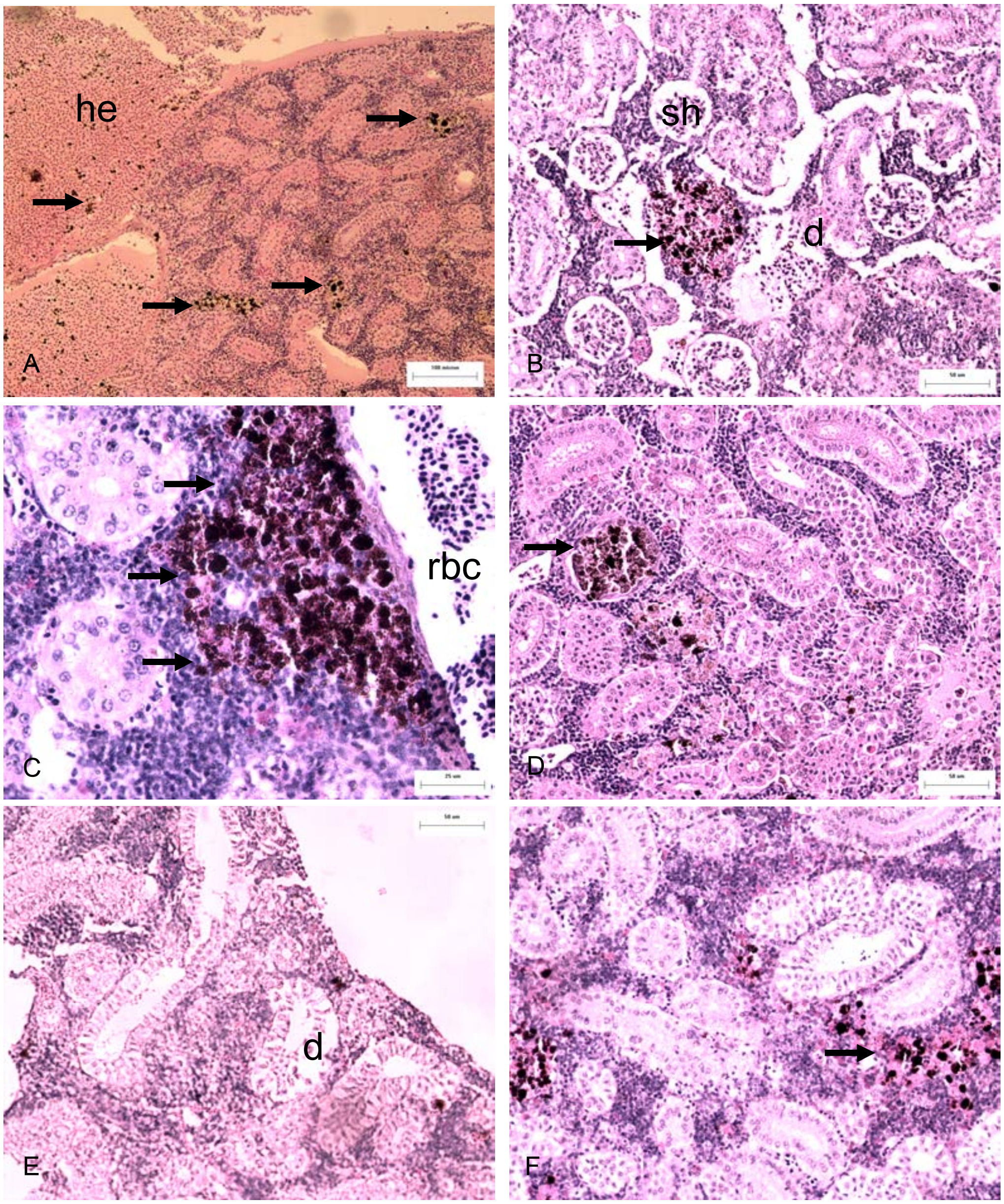
ภาพที่ 5.14 โครงสร้างพื้นฐานของเนื้อเยื่อไตของปลากะมัง *Puntioplites proctozysron* ที่เก็บจากแม่น้ำน่าน ในเดือนกรกฎาคม พ.ศ. 2553 ถึงเมษายน พ.ศ. 2554

(A-B) เนื้อเยื่อไตส่วนต้นประกอบด้วย hematopoietic cell (he) จำนวนมาก (A: H&E stain, B: PAS stain)

(C) เนื้อเยื่อไตประกอบด้วยหน่วยไตส่วนท้ายประกอบด้วย nephron ซึ่งมีขดเลือด glomerulus (G), proximal tubule (PT) บุด้วย tall cuboidal epithelium, distal tubule (DT) บุด้วย low cuboidal epithelium, collecting duct (CD) และ hematopoietic cell (he) แทรกระหว่างท่อไต (H&E stain)

5.3.4 พยาธิสภาพของเนื้อเยื่อไตของปลากะมัง

ผลการศึกษาทางด้านพยาธิสภาพในเนื้อเยื่อไตของปลากะมัง ที่เก็บตัวอย่างจากแม่น้ำน่าน อำเภอเวียงสา จังหวัดน่าน ตั้งแต่เดือนกรกฎาคม พ.ศ. 2553 จนถึงเดือนเมษายน พ.ศ. 2554 พบอาการความผิดปกติ ได้แก่ glomerulus swelling โดยพบการบวมและขยายออกจนไม่เห็น Bowmann’s space หรือมีขนาดของ Bowmann’s space ลดลง, glomerulus shrinkage คือการหดตัวแน่นของขดเลือด glomerulus ทำให้เกิดช่องว่าง Bowmann’s space กว้างกว่าปกติ เยื่อบุผิวท่อไตตายไม่เห็นขอบเขตของเซลล์ เซลล์ท่อไตเกิดการฝ่อลีบและเกิดการสลายตัว (renal tubular cell degeneration) ท่อไตเสียรูปร่างไปและไม่เห็นโครงสร้างเดิม นอกจากนี้ยังพบ MMCs มีสีน้ำตาลเหลืองกระจายอยู่ หลังจากศึกษาพยาธิสภาพเบื้องต้นแล้ว พบกลุ่มอาการหลักที่เด่นชัด 4 อาการ ได้แก่ renal tubular cell degeneration, glomerulus swelling, glomerulus shrinkage และ MMCs ดังแสดงในภาพที่ 5.15 – 5.17

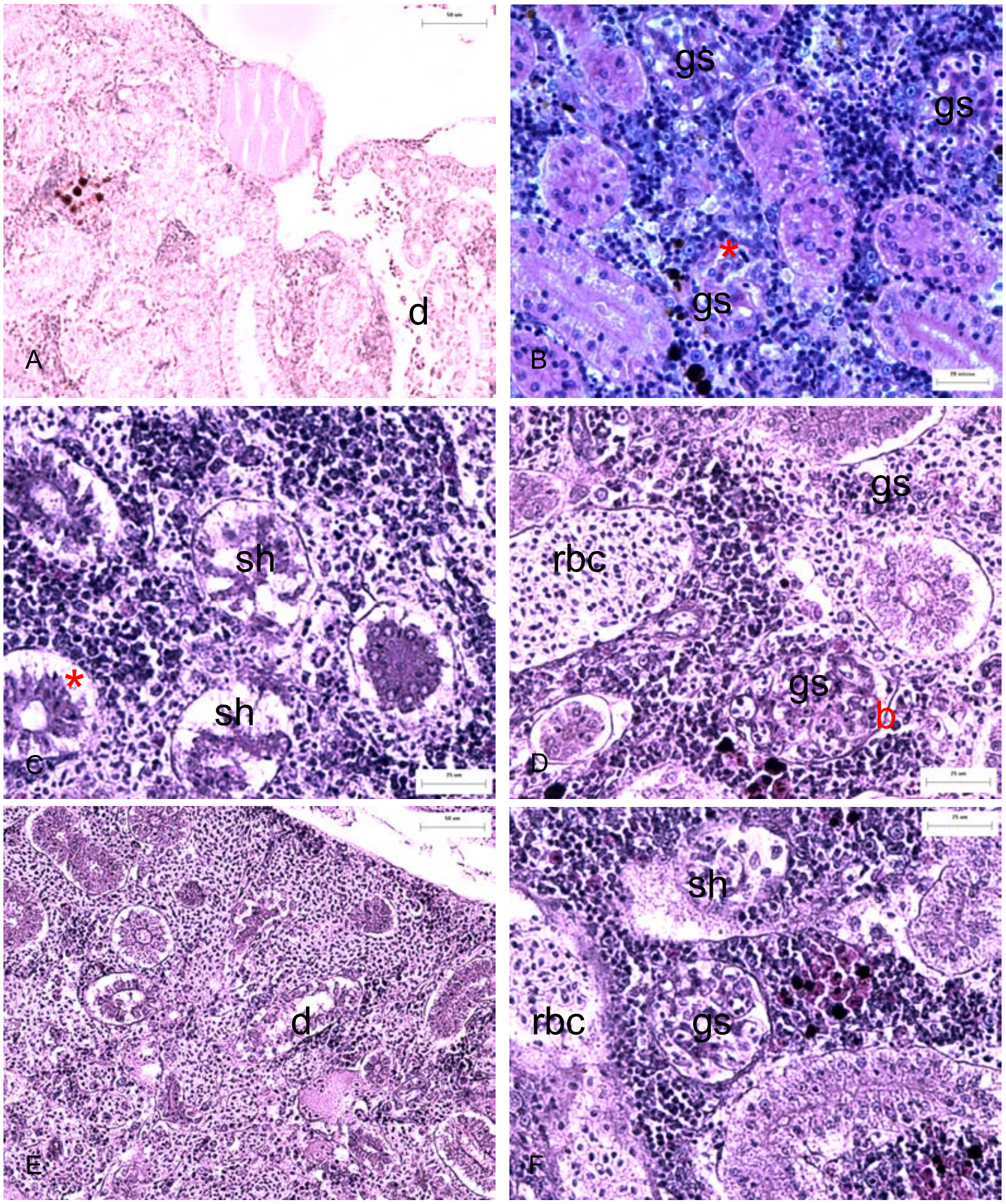


ภาพที่ 5.15

ภาพที่ 5.15 เนื้อเยื่อไตของปลากะมัง *Puntioplites proctozysron* ที่เก็บจากแม่น้ำน่าน ในเดือนกรกฎาคม พ.ศ. 2553 ถึงเมษายน พ.ศ. 2554

(A-F) ลักษณะโครงสร้างที่ผิดปกติ พบ MMCs (ลูกศรชี้), renal tubular cell degeneration (d) และ glomerulus shrinkage (sh)

(A: H&E stain, B-F: PAS stain)



ภาพที่ 5.16

ภาพที่ 5.16 เนื้อเยื่อไตของปลากะมัง *Puntioplites proctozysron* ที่เก็บจากแม่น้ำน่าน ที่เก็บจากแม่น้ำน่าน ในเดือนกรกฎาคม พ.ศ. 2553 ถึงเมษายน พ.ศ. 2554

(A) การเกิดอาการ renal tubular cell degeneration (d) ทำให้ไม่เห็นขอบเขตของเซลล์ (PAS stain)

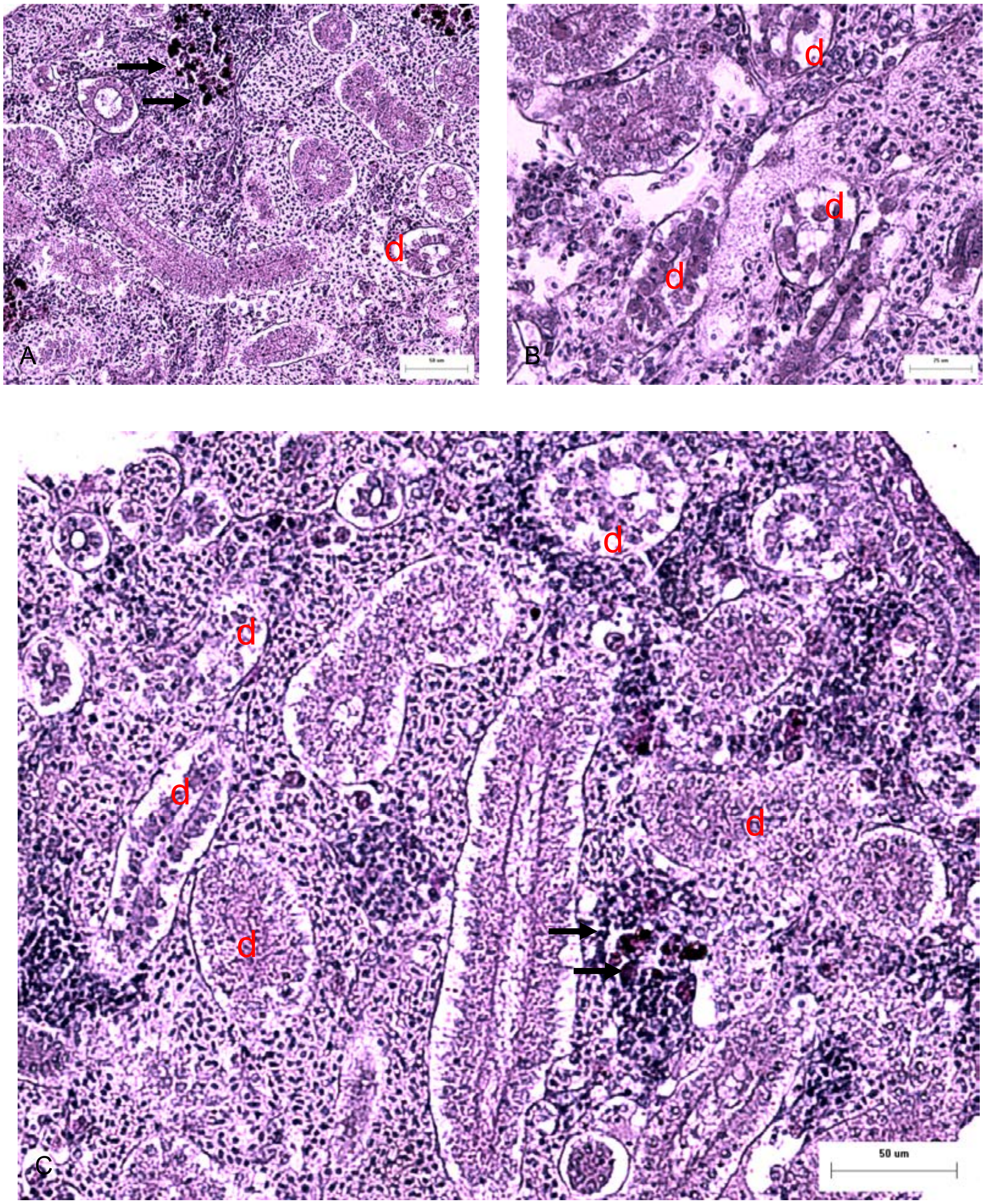
(B) การเกิดอาการ glomerulus swelling (gs) ทำให้มีการบวมและขยายออกจนไม่เห็นพื้นที่ระหว่าง glomerulus กับ Bowmann's capsule ทำให้มี Bowmann's space ลดลง (*) (H&E stain)

(C) การเกิดอาการ glomerulus shrinkage (sh) มีการหดตัวแน่นของขดเลือด glomerulus ทำให้เกิดช่องว่างระหว่าง glomerulus กับ Bowmann's capsule กว้างกว่าปกติ (*) (PAS stain)

(D) การเกิดอาการ glomerulus swelling (gs) ทำให้มี Bowmann's space ลดลง (b) (*) (PAS stain)

(E) การเกิดอาการ renal tubular cell degeneration (d) ทำให้ไม่เห็นขอบเขตของเซลล์ ท่อไตเสียรูปร่างไปและไม่เห็นโครงสร้างเดิม (PAS stain)

(F) การเกิด glomerulus shrinkage (sh) (PAS stain)



ภาพที่ 5.17 (A-C) เนื้อเยื่อไตของปลากะมัง *Puntioplites proctozysron* ที่เก็บจากแม่น้ำน่าน ที่เก็บจากแม่น้ำน่าน ในเดือนกรกฎาคม พ.ศ. 2553 ถึงเมษายน พ.ศ. 2554

(A) การเกิด MMCs ใน hematopoietic tissue ของไต (ลูกศรชี้)

(B) การเกิด renal tubular cell degeneration (d)

(C) การเกิด MMCs (ลูกศรชี้) และ renal tubular cell degeneration (d)

PAS stain

ตารางที่ 5.4: การประเมินอาการความผิดปกติทางพยาธิสภาพในเนื้อเยื่อไตของปลากะมัง *Puntioplites proctozysron* ที่เก็บตัวอย่างจากแม่น้ำน่าน อำเภอเวียงสา จังหวัดน่าน ตั้งแต่เดือนกรกฎาคม พ.ศ. 2553 จนถึงเดือนเมษายน พ.ศ. 2554

	จำนวนตัวที่พบพยาธิภาพในเนื้อเยื่อไต															
	renal tubular cell degeneration				glomerulus swelling				glomerulus shrinkage				MMCs			
	+3	+2	+1	0	+3	+2	+1	0	+3	+2	+1	0	+3	+2	+1	0
กรกฎาคม 2553 (n=6)	1	1	3	1	-	-	4	2	-	-	1	5	-	2	3	1
ตุลาคม 2554 (n=10)	-	-	6	4	-	-	7	3	-	-	5	5	-	1	9	-
มกราคม 2554 (n=10)	5	3	1	1	1	1	2	6	4	2	-	4	-	4	6	-
เมษายน 2554 (n=10)	-	3	4	3	-	2	3	5	-	-	1	9	-	3	7	-

หมายเหตุ:

การให้คะแนนระดับความรุนแรงของอาการความผิดปกติที่พบในเนื้อเยื่อ

+3 = พบอาการความผิดปกติในเนื้อเยื่อ > 50%

+2 = พบอาการความผิดปกติในเนื้อเยื่อระหว่าง 10-50%

+1 = พบอาการความผิดปกติในเนื้อเยื่อ < 10%

0 = ไม่พบอาการความผิดปกติในเนื้อเยื่อ

ตารางที่ 5.5: ค่าอุบัติการณ์ (prevalence) ของพยาธิสภาพที่พบในเนื้อเยื่อไตของปลากะมัง *Puntioplites proctozysron* ที่เก็บตัวอย่างจากแม่น้ำน่าน อำเภอเวียงสา จังหวัดน่าน ตั้งแต่เดือนกรกฎาคม พ.ศ. 2553 จนถึงเดือนเมษายน พ.ศ. 2554

	renal tubular cell degeneration	glomerulus swelling	glomerulus shrinkage	malano-macrophage center (MMCs)
กรกฎาคม 2553 (n=6)	83.33%	66.66%	16.66%	83.33%
ตุลาคม 2553 (n=10)	60%	70%	50%	100%
มกราคม 2554 (n=10)	90%	40%	60%	100%
เมษายน 2554 (n=10)	70%	50%	10%	100%

จากผลการศึกษาทางพยาธิสภาพพบ ความผิดปกติที่เกิดขึ้นในเนื้อเยื่อไตของปลากะมังที่เก็บตัวอย่างจากแม่น้ำน่าน ตั้งแต่เดือนกรกฎาคม พ.ศ. 2553 จนถึงเดือนเมษายน พ.ศ. 2554 ที่เด่นชัดมี 4 ลักษณะ นำมาประเมินความรุนแรง โดยแบ่งเป็น 4 ระดับความรุนแรง ดังแสดงในตารางที่ 5.4 แล้วนำไปคำนวณค่าอุบัติการณ์ ดังแสดงในตารางที่ 5.5

จากผลการประเมินค่าอุบัติการณ์ (prevalence) ของความผิดปกติที่ตรวจพบในเนื้อเยื่อไต พบว่า renal tubular cell degeneration, glomerulus swelling, glomerulus shrinkage และ MMCs คือ อาการหลักที่พบในเนื้อเยื่อไตของปลากะมัง renal tubular cell degeneration มีเปอร์เซ็นใกล้เคียงกันในทั้ง 4 เดือน โดยมีเปอร์เซ็นสูงสุด 90% ในเดือนมกราคม พ.ศ. 2554 ส่วน glomerulus swelling มีแนวโน้มของเปอร์เซ็นค่อยๆ ลดลง ในขณะที่ glomerulus shrinkage มีแนวโน้มของเปอร์เซ็นที่เพิ่มขึ้น ตั้งแต่เดือนกรกฎาคม พ.ศ. 2553 จนถึงเดือนเมษายน พ.ศ. 2554 และพบว่า MMCs มีเปอร์เซ็นสูงในทั้ง 4 เดือน

อาการหลักทั้ง 4 อาการเหล่านี้เป็นการแสดงอาการความผิดปกติพื้นฐานเหมือนปลาได้รับสารพิษบางอย่างเข้าไป เนื่องจากไต เป็นอวัยวะที่ทำหน้าที่ในการกรองและกำจัดของเสีย ดังนั้นไตจึงเป็นเป้าหมายต่อมาที่ได้รับผลกระทบ โดยพบว่าเซลล์ท่อไตสลายตัว (renal tubular cell degeneration) โดยท่อไตมีลักษณะสูญเสียรูปร่างไป มีการสลายตัวของนิวเคลียส ซึ่งเป็นสัญญาณบ่งบอกว่าเกิดการตายของเซลล์ในบริเวณนั้น (Olsson และคณะ, 1999)

การพบ glomerulus swelling และ glomerulus shrinkage อยู่ในระดับเล็กน้อยตลอดช่วงเดือนกรกฎาคม พ.ศ. 2553 จนถึงเดือนเมษายน พ.ศ. 2554 (66.66%, 70%, 40% และ 50% prevalence; 16.66%, 50%, 60% และ 10% prevalence ตามลำดับ) โดยอาการ glomerulus shrinkage นั้นพบในระดับสูงในเดือนมกราคม พ.ศ. 2554 ลักษณะผิดปกติที่เกิดขึ้นกับ glomerulus ทั้งสองนี้ อาจมีผลต่อการทำงานของไต ทำให้ประสิทธิภาพในการกรองสารต่าง ๆ ลดลง นอกจากนี้การพบ MMCs กระจายอยู่ทั่วไปในเนื้อเยื่อไต ถึงแม้พบในระดับน้อยตลอดช่วงเวลาที่เก็บตัวอย่าง แต่ก็พบในปลาทุกตัว ตั้งแต่เดือนตุลาคม พ.ศ. 2553 จนถึงเมษายน พ.ศ. 2554 การที่พบ MMCs กระจายอยู่ทั่วไป เป็นอีกสิ่งที่บ่งชี้ว่า ท่อไตและ glomerulus ได้รับความเสียหาย เพราะเซลล์จะปล่อย cytokines และอนุมูลอิสระ ชักนำ macrophage ให้มาบริเวณที่มี cytokines และอนุมูลอิสระ เพื่อทำหน้าที่เก็บกินสิ่งแปลกปลอม (Casarett และคณะ, 2001) โดยการพบ MMCs ในปลาทุกตัวนี้ อาจบ่งบอกว่าไตกำลังได้รับความเสียหาย

เป็นที่น่าสังเกตว่า การเกิด renal tubular cell degeneration ในไตของปลากะมังพบมากที่สุดในเดือนมกราคม พ.ศ. 2554 (90% prevalence) และอยู่ในระดับที่รุนแรงที่สุดด้วย ผล

การศึกษานี้สอดคล้องกับค่า RSI ที่ต่ำสุดและการตรวจพบอะทราซีนมีค่าสูงในเดือนเดียวกัน การพบ renal tubular cell degeneration และอาการอื่น ๆ ในระดับที่ผิดปกตินี้อาจมีความเชื่อมโยงไปถึงสารฆ่าวัชพืชที่ตรวจพบทั้ง 3 ชนิด ได้แก่ อะทราซีน ไกลโฟเซต และพาราควอท และจากพยาธิสภาพที่พบในเนื้อเยื่อไตดังที่กล่าวมานั้นจะเห็นได้ว่าทั้ง glomerulus และที่ไตถูกทำลายอาจส่งผลให้การทำงานของไตผิดปกติได้

จากผลการวิเคราะห์สหสัมพันธ์ระหว่างปริมาณการปนเปื้อนของสารฆ่าวัชพืชกับความผิดปกติที่พบในเนื้อเยื่อไตปลากะมัง โดยนำข้อมูลปริมาณการปนเปื้อนสารฆ่าวัชพืชและความผิดปกติที่พบในเนื้อเยื่อไตปลากะมัง มาวิเคราะห์ด้วยสถิติ Spearman’s correlation coefficient เพื่อหาค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ดังแสดงในตารางที่ 5.6 พบว่า อะทราซีนมีสหสัมพันธ์ในทางตรงกันข้ามกับการพบ renal tubular cell degeneration ไกลโฟเซตมีสหสัมพันธ์ในทางตรงกันข้ามกับการพบ glomerulus shrinkage และพาราควอทไม่มีสหสัมพันธ์กับการพบอาการใดเลย

ตารางที่ 5.6 สหสัมพันธ์ระหว่างผลทางพยาธิสภาพที่พบในเนื้อเยื่อไตของปลากะมังกับปริมาณการปนเปื้อนของสารฆ่าวัชพืช

พยาธิสภาพ	Spearman's correlation coefficient		
	อะทราซีน	ไกลโฟเซต	พาราควอท
renal tubular cell degeneration	r = -1.000** P = 0.000 (n=3)	r = -0.500 P = 0.667 (n=3)	N/D
glomerulus swelling	r = -0.500 P = 0.667 (n=3)	r = 0.500 P = 0.667 (n=3)	r = 0.500 P = 0.667 (n=3)
glomerulus shrinkage	r = -0.500 P = 0.667 (n=3)	r = -1.000** P = 0.000 (n=3)	r = 0.500 P = 0.667 (n=3)
malano-macrophage center (MMCs)	N/D	N/D	N/D

หมายเหตุ

** แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.01$)

N/D คือ ไม่สามารถวิเคราะห์ผลทางสถิติได้ เนื่องจากพบอาการในระดับเท่ากันทุกกลุ่ม

บทที่ 6
สรุปผลการศึกษา

แม่น้ำน่านเป็นแม่น้ำสายสำคัญในจังหวัดน่าน พื้นที่ส่วนใหญ่ใช้ทำการเกษตรอยู่บริเวณริมฝั่งแม่น้ำ และมีการใช้สารฆ่าวัชพืชในแปลงเกษตร สารฆ่าวัชพืชเหล่านั้นจะถูกชะล้างลงสู่แม่น้ำโดยตรง และสิ่งมีชีวิตที่อาศัยอยู่ในแม่น้ำใกล้กับพื้นที่ทำการเกษตร อาจได้รับผลกระทบจากการปนเปื้อนของสารฆ่าวัชพืช และส่งผลให้สัตว์น้ำเหล่านี้ตกอยู่ในสภาวะเสี่ยงจากการปนเปื้อนสารฆ่าวัชพืช

ในการศึกษานี้ ทำการประเมินสุขภาวะของปลากะมัง *Puntioplites proctozysron* ที่อาศัยอยู่ในแม่น้ำน่าน โดยใช้ biomarker ต่าง ๆ ทั้ง biomarker of exposure และ biomarker of effect ได้แก่ ปริมาณสารฆ่าวัชพืชในเนื้อเยื่อปลา, condition factor (CF), hepatosomatic index (HSI), renosomatic index (RSI) และการเกิดพยาธิสภาพในเนื้อเยื่อตับและไต รวมไปถึงศึกษาความสัมพันธ์ของ biomarker เหล่านี้กับการปนเปื้อนสารฆ่าวัชพืชในสิ่งแวดล้อม ได้แก่ ดินตะกอนและน้ำ และการปนเปื้อนในเนื้อเยื่อตับและไตของปลากะมัง

ผลจากการวิเคราะห์สารฆ่าวัชพืชในสิ่งแวดล้อม พบการปนเปื้อนของอะทราซีนในดินตะกอน และน้ำในช่วงฤดูแล้งสูงกว่าฤดูฝน โดยในดินตะกอนพบการปนเปื้อนของอะทราซีนในเดือนกรกฎาคม พ.ศ. 2553 มีค่าเท่ากับ 0.01 mg/kg และในเดือนมกราคม พ.ศ. 2554 มีค่าสูงถึง 0.24 mg/kg และนอกจากนี้ยังสามารถตรวจพบการปนเปื้อนของอะทราซีนในน้ำมีค่าเท่ากับ 0.15 mg/L ในเดือนมกราคม พ.ศ. 2554 ผลการศึกษานี้เป็นการยืนยันว่ามีการปนเปื้อนของอะทราซีนอยู่ในระดับที่สูงมากในสิ่งแวดล้อม ดังนั้นจึงอาจใช้ข้อมูลนี้ เสนอแนะได้ว่า น้ำในแม่น้ำน่านนั้นมีการปนเปื้อนของอะทราซีนเนื่องมาจากการใช้สารฆ่าวัชพืชในพื้นที่

สารฆ่าวัชพืชที่ปนเปื้อนในสิ่งแวดล้อมนี้ อาจเข้าไปสะสมในเนื้อเยื่อปลาแล้วก่อให้เกิดความเป็นพิษได้ เมื่อทำการวิเคราะห์สารฆ่าวัชพืชในเนื้อเยื่อตับและไตของปลากะมัง สามารถตรวจพบการปนเปื้อนของสารฆ่าวัชพืชทั้ง 3 ชนิด ในเนื้อเยื่อตับและไตของปลากะมังในระดับที่แตกต่างกันไปในปลาทั้งสองเพศ แม้ว่าจะอยู่ในระดับต่ำเมื่อเทียบกับปริมาณการปนเปื้อนที่มีผู้ศึกษามาก่อนหน้านี้ จากผลการวิเคราะห์หาสหสัมพันธ์ระหว่างปริมาณการปนเปื้อนของสารฆ่าวัชพืชในสิ่งแวดล้อมกับการปนเปื้อนในเนื้อเยื่อตับและไต พบว่าไม่มีสหสัมพันธ์ระหว่างกัน เพราะในตัวปลาอาจมีการสะสมสารเหล่านี้มาเป็นระยะเวลานาน จึงสามารถตรวจพบการปนเปื้อนของ

สารฆ่าวัชพืชได้ทั้ง 3 ชนิด ในขณะที่อะทราซีนเพียงชนิดเดียวที่ตรวจพบในสิ่งแวดล้อมในเดือนกรกฎาคม พ.ศ. 2553 และมกราคม พ.ศ. 2554 เท่านั้น ด้วยสมบัติของสารฆ่าวัชพืชทั้ง 3 ชนิดที่คล้ายคลึงกันในแง่ที่สามารถสลายตัวได้อย่างรวดเร็วในน้ำ แต่กลับสามารถยึดเกาะกับอนุภาคของดินได้เป็นอย่างดี และสามารถละลายและสะสมได้ดีในไขมัน มีแนวโน้มว่าสารฆ่าวัชพืชเหล่านี้จะสะสมภายในเนื้อเยื่อได้ ถึงแม้ว่าการวิเคราะห์การปนเปื้อนจะตรวจพบในปริมาณต่ำ ๆ แต่ถือเป็นการยืนยันที่สำคัญว่ามีการใช้และมีการปนเปื้อนของสารฆ่าวัชพืชทั้ง 3 ชนิดนี้จริงในพื้นที่ เมื่อนำค่าปริมาณการปนเปื้อนของสารฆ่าวัชพืชทั้ง 3 ชนิด ที่ตรวจพบในปลามาเปรียบเทียบกับค่ามาตรฐานความปลอดภัยต่อการบริโภค พบว่าปริมาณการปนเปื้อนของพาราควอทในปลา มีค่าเกินมาตรฐานความปลอดภัยที่ได้กำหนดไว้ดังแสดงในตารางที่ 3.7 ดังนั้นจึงสามารถเสนอแนะได้ว่าบริโภคปลากะมังที่เก็บได้จากแม่น้ำน่านอาจไม่ปลอดภัยต่อสุขภาพของผู้บริโภค การศึกษาถือเป็นการรายงานครั้งแรกที่มีการวิเคราะห์ผลการปนเปื้อนของสารฆ่าวัชพืชทั้ง 3 ชนิดนี้ในปลาที่อาศัยในแม่น้ำในประเทศไทย

เพื่อเป็นการพิสูจน์ว่า การปนเปื้อนของสารฆ่าวัชพืชที่สามารถทำให้เกิดการสะสมในเนื้อเยื่อตับและไตของปลากะมัง จะมีความสอดคล้องกับความผิดปกติในร่างกายของปลาหรือไม่ จึงมีการวิเคราะห์สุขภาวะโดยรวมโดยอาศัยค่า condition factor (CF) และความสมบูรณ์ของตับและไตของปลากะมัง โดยอาศัยค่า hepatosomatic index (HSI) และ renosomatic index (RSI) เนื่องจากค่าเหล่านี้สามารถใช้ในการประเมินสุขภาวะโดยรวมของสัตว์น้ำจำพวกปลาได้ดี (Goede และ Barton 1990) และเป็น biomarker ที่แสดงถึงผลกระทบของสิ่งแวดล้อมที่มีต่อการเจริญเติบโตของปลาและให้ข้อมูลของสุขภาพของปลา ณ ขณะนั้น (Adams และคณะ, 1993) จากผลการศึกษาค่า CF, HSI และ RSI ในปลากะมังที่อาศัยอยู่ในแม่น้ำน่าน แสดงให้เห็นถึงแนวโน้มของ CF ที่มีค่าสูงขึ้นและ HSI และ RSI ที่มีแนวโน้มต่ำลงเล็กน้อยในแต่ละฤดูกาล แต่ RSI ไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ อย่างไรก็ตามความสัมพันธ์ระหว่างค่าการปนเปื้อนของสารฆ่าวัชพืชทั้งสามชนิดกับค่า CF, HSI และ RSI นั้น ให้ผลที่เด่นชัดคือ ค่า CF มีค่าสูงที่สุดในเดือนมกราคม พ.ศ. 2554 ซึ่งขัดแย้งกับการพบปริมาณการปนเปื้อนของอะทราซีนที่สูงในดินตะกอน น้ำ และเนื้อเยื่อตับของปลากะมัง ทั้งนี้เนื่องมาจาก CF ที่เกิดขึ้นนี้ไม่ได้ขึ้นอยู่กับปริมาณการปนเปื้อนของอะทราซีนที่ตรวจพบในเนื้อเยื่อตับของปลากะมัง แต่อาจสอดคล้องกับปัจจัยต่าง ๆ ที่เกี่ยวข้องอีกหลายปัจจัย เช่น ฤดูกาล สภาพแวดล้อม แหล่งที่อยู่อาศัย ปริมาณอาหาร และอัตราเมแทบอลิซึม และปัจจัยที่น่าสังเกตคือ ค่า CF มีความแปรผันตามความสมบูรณ์เพศของระบบสืบพันธุ์ โดยในเดือนมกราคมเป็นช่วงที่ปลามีการสะสมอาหารเพื่อเข้าสู่ช่วงสืบพันธุ์

ค่า HSI ที่สูงสุดในเดือนตุลาคม พ.ศ. 2553 มีความสอดคล้องกับการพบ vacuolation ที่มากผิดปกติ อาการนี้อาจเป็นผลมาจากการสัมผัสสารฆ่าวัชพืชในเดือนก่อนหน้า ซึ่งตรวจพบระดับการปนเปื้อนของอะทราซีนที่สูงในดินตะกอน ส่วนค่า HSI ที่ลดต่ำลงในเดือนมกราคม พ.ศ. 2554 มีความสอดคล้องกับปริมาณการปนเปื้อนของอะทราซีนที่สูงในดินตะกอน น้ำ และเนื้อเยื่อตับของปลากะมัง แต่จากการวิเคราะห์หาสหสัมพันธ์ของการปนเปื้อนของอะทราซีนกลับไม่มีสหสัมพันธ์กับค่า HSI แต่อย่างไรก็ตามค่า HSI ยังคงแสดงแนวโน้มให้เห็นในทั้งสองเพศว่ามีแนวโน้มลดลงใน 7 เดือน ซึ่งอาจเกิดจากผลของการปนเปื้อนของอะทราซีนเป็นระยะเวลานาน ๆ ส่วนการเกิด vacuolation ในเซลล์ตับนั้น อาจเกิดจากปัจจัยอื่น ๆ ได้อีกหลายปัจจัย อาทิเช่น อาหาร, การใช้พลังงาน และ species (Wolf และ Wolfe, 2005) เนื่องจากตับปลาที่ได้รับสารพิษอาจจะพบการสะสมไขมันเพิ่มขึ้นหรือลดลงก็ได้ อีกทั้งไม่มีข้อกำหนดที่เป็นที่ยอมรับในการวินิจฉัยอาการ lipidosis ดังนั้นจึงจำเป็นต้องมีศึกษาทางด้านอื่นๆ ประกอบกัน

ผลการศึกษาทางพยาธิสภาพของเนื้อเยื่อตับและไตของปลากะมัง ในเนื้อเยื่อตับพบพยาธิสภาพที่เด่นชัดได้แก่ การเกิด necrosis และ pyknosis, การเกิดแวคคิวโอลภายในเซลล์ (vacuolization), การเกิด malano-macrophage center (MMCs), มีการเข้ามาของเม็ดเลือดขาวหลายชนิด (leukocyte infiltration) และการสลายตัวของนิวเคลียส (karyolysis) ในเนื้อเยื่อไตพบพยาธิสภาพที่เด่นชัด ได้แก่ renal tubular cell degeneration, glomerulus swelling, glomerulus shrinkage และ MMCs จากการวิเคราะห์สหสัมพันธ์ในเนื้อเยื่อตับพบว่าอะทราซีนมีสหสัมพันธ์ในทางตรงกันข้ามกับอาการ pyknosis ส่วนพาราควอทมีสหสัมพันธ์ในทางตรงกันข้ามกับอาการ karyolysis ในเนื้อเยื่อไตพบว่า อะทราซีนมีสหสัมพันธ์ในทางตรงกันข้ามกับ renal tubular cell degeneration และไกลโฟเซตมีสหสัมพันธ์ในทางตรงกันข้ามกับ glomerulus shrinkage ซึ่งสหสัมพันธ์เหล่านี้แสดงให้เห็นความสัมพันธ์ที่น่าสนใจ โดยเห็นได้ว่าอาการความผิดปกติต่าง ๆ ที่พบในเนื้อเยื่อตับและไตของปลากะมัง เป็นอาการสะสมที่แสดงถึงความผิดปกติพื้นฐานเมื่อปลาได้รับสารพิษและสะสมอยู่ภายในเป็นระยะเวลายาวนาน อาการจะพบในระดับสูงในขณะที่พบสารพิษตกค้างอยู่ในเนื้อเยื่อต่ำ หรืออีกนัยหนึ่งคือ ในขณะที่สารพิษสะสมอยู่สูงอาการจะยังแสดงให้เห็นในระดับต่ำ แล้วจึงค่อย ๆ พัฒนาขึ้น ในขณะที่ปริมาณสารพิษในเนื้อเยื่อค่อย ๆ ลดลง

จากผลการศึกษาทั้งหมดในการศึกษาครั้งนี้สรุปได้ว่า ค่า CF, HSI และ RSI สามารถบ่งบอกสุขภาวะของปลา (ตารางที่ 6.1) และใช้สำหรับประเมินสุขภาวะที่ดีโดยรวมของสัตว์น้ำจำพวกปลาในเบื้องต้นได้แต่อาจไม่ใช่ biomarker ที่ดีมากนัก จึงต้องมีการศึกษาด้านอื่นเพิ่มเติม

ร่วมกันด้วย โดยเฉพาะอย่างยิ่งการศึกษาทางพยาธิสภาพทางเนื้อเยื่อของตับและไต จากอาการที่พบเด่นชัดแสดงสหสัมพันธ์ในทางตรงกันข้ามกับสารฆ่าวัชพืชทั้ง 3 ชนิด ได้แก่ อาการ pyknosis, karyolysis, renal tubular cell degeneration และ glomerulus shrinkage (ตารางที่ 6.2) น่าจะเป็น biomarker ที่ดีที่จะใช้ในการเฝ้าระวังภาวะการปนเปื้อนของสารฆ่าวัชพืชในแม่น้ำน่าน และทำให้ทราบถึงแนวโน้มของอันตรายที่อาจส่งผลถึงประชากรสัตว์ และประชาชนที่อาศัยแม่น้ำน่านในการดำรงชีวิตได้ และข้อมูลที่ได้สามารถนำมาใช้ในการการประเมินความเสี่ยงจากการปนเปื้อนของสารฆ่าวัชพืชต่อปลากะมังและสัตว์น้ำอื่น ๆ ที่อาศัยในแม่น้ำน่าน นอกจากนี้ผลการศึกษานี้ยังชี้ให้เห็นว่าการเกิดพยาธิสภาพในเนื้อเยื่อสามารถใช้เป็นตัววัดทางชีวภาพที่บ่งบอกสภาวะของตับและไตในปลาเพื่อใช้ในระบบเฝ้าระวังได้

ตารางที่ 6.1 สรุปผลสหสัมพันธ์ระหว่างสุขภาวะโดยรวม (CF) ค่าความสมบูรณ์ของตับ (HSI) และค่าความสมบูรณ์ของไต (RSI) ของปลากะมังกับปริมาณการปนเปื้อนของสารฆ่าวัชพืช

	CF	HSI	RSI	อะทราซีน	ไกลโฟเซต	พาราควอท
พาราควอท	r = -0.079 P = 0.828 (n=10)	r = -0.027 P = 0.940 (n=10)	r = -0.959 P = 0.183 (n=3)	r = 0.066 P = 0.856 (n=10)	r = 0.349 P = 0.323 (n=10)	
ไกลโฟเซต	r = 0.461 P = 0.154 (n=11)	r = -0.754* P = 0.007 (n=11)	r = 0.388 P = 0.746 (n=3)	r = 0.543 P = 0.085 (n=11)		
อะทราซีน	r = 0.678* P = 0.011 (n=13)	r = -0.389 P = 0.190 (n=13)	r = 0.999* P = 0.022 (n=3)			
RSI	r = 0.996 P = 0.059 (n=3)	r = 0.904 P = 0.281 (n=3)				
HSI	r = -0.435 P = 0.138 (n=13)					
CF						

หมายเหตุ:

* แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.05$)

r = correlation coefficient

P = p value

n = จำนวนตัวอย่าง

ตารางที่ 6.2 สรุปผลสหสัมพันธ์ระหว่างอาการความผิดปกติที่พบในเนื้อเยื่อตับและไตของปลากะมังกับปริมาณการปนเปื้อนของสารฆ่าวัชพืช

	pyknosis	karyolysis	renal tubular cell degeneration	glomerulus shrinkage
อะทราซีน	r = -1.000** P = 0.000 (n=3)		r = -1.000** P = 0.000 (n=3)	
ไกลโฟเซต				r = -1.000** P = 0.000 (n=3)
พาราควอท		r = -1.000** P = 0.000 (n=3)		

หมายเหตุ

** แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.01$)

รายการอ้างอิง

ภาษาไทย

ครรชิต วัฒนาดิลกกุล. 2528. แหล่งวางไข่ของปลาบางชนิดในอ่างเก็บน้ำเขื่อนอุบลรัตน์. รายงานประจำปี หน่วยงานพัฒนาประมงแหล่งน้ำขนาดใหญ่ (เขื่อนอุบลรัตน์). กองประมงน้ำจืด กรมประมง กระทรวงเกษตรและสหกรณ์, กรุงเทพมหานคร. 38 หน้า.

ปภาศิริ กาญจโนภาศ. 2527. ผลกระทบของสารพาราควอทต่อปลาช่อน (*Ophicephalus striatus*, Bloch). วิทยานิพนธ์ปริญญามหาบัณฑิต, สาขาวิชาวิทยาศาสตร์ประมง, คณะประมง มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

ภิญญา จำรัสกุล, บังเอิญ สีมา และสุวิมล เลิศวีระศิริกุล. 2539. วิจัยชนิดและปริมาณสารพิษตกค้างกลุ่มออร์กาโนฟอสเฟตและคาร์บาเมทในน้ำ ดินตะกอนจากแม่น้ำท่าจีนคลองแยก. ข่าวสารวัตถุมีพิษ 23: 101-112.

ยงยุทธ ทักษิณ. 2529. การศึกษาชีวประวัติของปลากะมังเพื่อเพิ่มผลผลิตการประมงในแหล่งน้ำ. รายงานประจำปีสถานีประมงน้ำจืดจังหวัดนครสวรรค์. กองประมงน้ำจืด กรมประมง กระทรวงเกษตรและสหกรณ์, กรุงเทพมหานคร. 19-29 หน้า.

วิมล เหมาะจันทร. 2528. ชีววิทยาปลา กรุงเทพมหานคร จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.

ศุภมาศ เทียนหอม, 2540. ปรสิตในปลากะมัง *Puntioplites proctozysron* (Bleeker) อ่างเก็บน้ำเขื่อนศรีนครินทร์ จังหวัดกาญจนบุรี. วิทยานิพนธ์ปริญญามหาบัณฑิต, สาขาวิชาวิทยาศาสตร์ประมง คณะประมง, มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

สุปราณี ชินบุตร, กัลยา จำเริญรัตนะ และชะลอ ลิ้มสุวรรณ. 2536. เนื้อเยื่อของปลาช่อน ฟันนี่ พับบลิชชิ่ง, กรุงเทพฯ.

สุพร วัชรวิภา. 2508. การศึกษาลักษณะเพศภายนอกของปลาน้ำจืดบางชนิด. วิทยานิพนธ์ปริญญาตรี. คณะประมง มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพมหานคร.

สุวีณา บานเย็น, ครรชิต วัฒนาดิลกกุล, บุญเลิศ เกิดโกมุต และ เพียงใจ แก้วจรูญ. 2532. ชีววิทยาของปลากระมังในอ่างเก็บน้ำเขื่อนอุบลรัตน์. เอกสารวิชาการฉบับที่ 111. สถาบันประมงน้ำจืดแห่งชาติ, กรุงเทพมหานคร. 46 หน้า.

สุวัฒนา ธาดานิติ และวิพรรณ ประจวบเหมาะ. 2548. การศึกษาวิเคราะห์ศักยภาพชุมชนเพื่อการพัฒนาอย่างยั่งยืน. รายงานฉบับสมบูรณ์เงินทุนวิจัยงบประมาณแผ่นดิน, สถาบันวิจัยสังคม วิทยาลัยประชากรศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.

สวัสดิ์ วงศถิรวัฒน์. 2524. การศึกษาอุปนิสัยการกินอาหารของปลาน้ำจืดที่มีคุณค่าทางเศรษฐกิจบางชนิดในอ่างเก็บน้ำเขื่อนอุบลรัตน์ จังหวัดขอนแก่น. วิทยานิพนธ์ปริญญามหาบัณฑิต, มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพมหานคร.

สมศักดิ์ เจนศิริศักดิ์. 2515. ชีวประวัติของปลากะมัง. รายงานประจำปีหน่วยงานพัฒนาการประมงในอ่างเก็บน้ำเขื่อนอุบลรัตน์. กองบำรุงพันธุ์สัตว์น้ำ กรมประมง กระทรวงเกษตรและสหกรณ์, กรุงเทพมหานคร. 22-32 หน้า .

ภาษาอังกฤษ

Adams, W.J. 1995. Aquatic toxicology testing methods. In D. J. Hoffman, B. A. Rattner, G. A. Burton, Jr. and J. Cairn, Jr., (eds), Handbook of Ecotoxicology pp. 25-46. CRC Press Lewis, Boca Raton, FL.

Adams, S. M., Brown, A. M., and Goede, R. W. 1993. Aquantitative health assessment index for rapid evaluation of fish condition in the field. Transactions of the American Fisheries Society 122: 63-73.

Adams, S. M., and Ryon, M. G. 1994. A comparison of health assessment approaches for evaluating the effects of contaminant-related stress on fish populations. Journal of Aquatic Ecosystem Health 3: 15-25.

Alferness, P.L., and Iwata, Y. 1994. Determination of glyphosate and (amino methyl) phosphonic acid in soil, plant and animal matrices, and water by capillary gas chromatography with mass-selective detection. Journal of Agricultural and Food Chemistry 42: 2751-2759.

Amondham, W., Parkpian, P., Polprasert, C., Delaune, R. D., and Jugsujinda, A. 2006. Paraquat adsorption, degradation, and remobilization in tropical soils of Thailand. Journal of Environmental Science and Health, Part B. 41: 485-507.

Authum, M. M. N. 2008. *Oreochromis niloticus* as a biomonitor of heavy metal pollution with emphasis on potential risk and relation to some biological aspects. Global Veterinaria 2: 104-109.

Ayoola, S.O. 2008. Histopathological effects of glyphosate on juvenile african catfish (*Claris gariepinus*). American-Eurasian Journal of Agricultural & Environmental Science 4: 362-367.

Ayoola, S.O. 2008. Toxicity of glyphosate herbicide on Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) juvenile. African Journal of Agricultural Research 3: 825-834.

Banyen, S. 1988. Reproductive biology of pla-kamung *Puntioplites proctozysron* (Bleekers) in Ubolratana Reservoir. Master's Thesis, Deparment of Fishery Biology, Faculty of Fisheries, Kasetsart University.

Beeby, A. 2001. What do sentinels stand for ?. Environmental Pollution 112: 285-298.

Bernet, D., Schmidt, H., Meier, W., Burkhardt-Holm, P., and Wahli, T. 1999. Histopathology in fish: proposal for a protocol to assess aquatic pollution. Journal of Fish Diseases 22: 25-34.

Bleeker, P. 1865. Poissons inédits indo-achipélaques de l'ordre des Murènes. Nederlandsch Tijdschrift voor de Dierkunde 2:33-37.

Boorman, G.A., et al. 1997. Diagnostic criteria for degenerative, inflammatory, proliferative nonneoplastic and neoplastic liver lesions in medaka (*Oryzias latipes*): consensus of a National Toxicology Program Pathology Working Group. Toxicologic Pathology. 25: 202-210.

Borggaard, O. K., and Gimsing, A. L. 2008. Fate of glyphosate in soil and the possibility of leaching to ground and surface waters: A review. Pest Management Science 64: 441-456.

Borjesson, E., and Torstensson, L. 2000. New method for determination of glyphosate and (amino methyl) phosphonic acid in water and soil. Journal of Chromatography A 886: 207-216.

Brown, P. Charlto, A. Cuthbert, M. Barnett, L. Ross, L. Green, M. Gillies, L. Shaw, K., and Fletcher, M. 1996. Identification of pesticide poisoning in wildlife. Journal of Chromatography A 745: 463-478.

Calderbank, A. 1975. Environmental considerations in the development of diquat and paraquat as aquatic herbicides. Outlook on Agriculture 7: 51-54.

Casarett, L.J., Doull., and Klaasen, C.D. 2001. Casarett and Doull's Toxicology: The Basic science of Poisons, 6ed. McGraw-Hill Medical Pub: New York.

Castro, J. V., Peralba, M. C. R., and Ayub, M. A. Z. 2007. Biodegradation of the herbicide glyphosate by filamentous fungi in platform shaker and batch bioreactor. Journal of Environmental Science and Health Part B. 42: 883-886.

Chan, G. Y. S., Hudson, M. J., and Isaacs, N. S. 1992. Degradation of atrazine by hydrolysis and by hydroxyl redicals. Journal of Physical Organic Chemistry 5: 600-608.

Chanchek, S. 2007. Endosulfan and atrazine residues in water and sediment in Pasak River. Master's Thesis. Environmental Science Department of Environmental Science , Thammasat University.

Chang, F., Simcik, M. F., and Capel, P. D. 2011. Occurrence and fate of the herbicide glyphosate and its degradate aminomethylphosphonic acid in the atmosphere. Environmental Toxicology and Chemistry 30: 548-555.

Chellappa, S., Huntingford, F.A., Strang, R.H.C., and Thomson, R.Y. 1995. Condition factor and hepato-somatic index as estimates of energy status in male three-spined stickleback. Journal of Fish Biology 47: 775-787.

Christiansen, T., Korsgaard, B., and Jespersen, A. 1998. Effects of nonylphenol and 17beta-oestradiol on vitellogenin synthesis, testicular structure and cytology in male eelpout *Zoarces viviparus*. Journal of Experimental Biolology 20: 179-192.

Codex alimentarius (CODEX). 2006. Pesticide Residues in Food and Feed [online]. FAO/WHO Food Standard. Available from: http://www.codexalimentarius.net/pestres/data/pesticides/details.html [Accessed: 1 October 2010]

Cotran, R.S., Kumar, V., and Collins, T. 1994. Robbins Pathologic Basis of Disease, 6th. Philadelphia: Saunder.

Coupe, R. H., Kalkhoff, S. J., Capel, P. D., and Gregoire, C. 2011. Fate and transport of glyphosate and aminomethylphosphonic acid in surface waters of agricultural basins. Pest Management Science 68: 16-30.

Cox, C. 1995 Glyphosate, Part 2: Human Exposure and Ecological Effects. Journal of Pesticide Reform 15: 14-20.

Da Silva, M. D., Peralba, M. D. R., and Mattos, M. L. T. 2003. Determinação de glifosato e ácido aminometilfosfônico em águas superficiais do arroio passo do pilão. Pesticidas: Revista de Ecotoxicologia e Meio Ambiente 13: 19-28.

Davies, P. E., Cook, L. S. J., and Barton J. L. 1994 Triazine herbicide contamination of tasmanian streams: sources, concentrations and effects on Biota. Australian Journal of Marine and Freshwater Research 45: 209-226.

Department of Agriculture 1995. Report of imported hazardous materials in agriculture 2011 [Online]. Ministry of Agriculture and Cooperatives, Thailand. Available from: http://m.doa.go.th/ard/stat.php [2012, April 23]

Dewey, S. L. 1986. Effects of the herbicide atrazine on aquatic insect community structure and emergence. Ecology 67:148-162

Di Giulio, R. T., and Newman, M. C. 2008. Ecotoxicology. In Klaassen, C. D. (ed.), Casarett & Doull's toxicology: The basic science of poisons. 7th . pp. 1157-1187. New York: McGraw Hill.

Doyon, J. F., Downing, J. A., and Manin, E. 1988. Variation in the condition of northern pike, *Esox lucius*. Canadian Journal of Fisheries Aquatic Science. 45: 479-483.

Duangsawasdi, S. 1988. Reproductive biology of some economic freshwater fishes in the Lower Chao Phraya River. Proceeding of the Seminar on Fisheries 1988, pp. 296-303. Bangkok: Department of Fisheries.

Du Preez, H. H., and Van Vuren, J. H. J. 1992. Bioconcentration of atrazine in the banded tilapia, *Tilapia sparrmanii*. Comparative Biochemistry and Physiology 101: 651-655.

Earnest, R. D. 1971. The effects of paraquat on fish in a Colorado farm pond. Progressive Fish-Culturist 33: 27-31.

Eastwood, S., and Couture, P. 2002. Seasonal variations in condition and liver metal concentrations of yellow perch (*Perca flavescens*) from a metal-contaminated environment. Aquatic Toxicology. 58: 43-56.

Ecobichon, D.J. 2001. Toxic effects of pesticides. In Klaassen, C.D. (ed), Casarett and Doull's Toxicology, New York: McGraw-Hill. pp. 763-810.

Eisler, R. 1990. Paraquat hazards to fish, wildlife, and invertebrates: A synoptic review. [Online] U.S. Fish and Wildlife Service, Contaminant Hazard Reviews, Report 22. Available from: http://www.pwrc.usgs.gov/infobase /eisler/ chr_22_paraquat.pdf [2012, April 23]

Ellgehausen, H. 1978. Uptake and transfer of atrazine (Gesaprim-R) by aquatic organisms. Project No. 37/87AC 2, 52 Biochemistry Department R and D Plant Protection. Agrochemicals Division Ciba-Geigy, Basle, Switzerland.

Ferguson, H.W. 1989. Systemic Pathology of Fish: A Text and Atlas of Comparative Tissue Responses in Diseases of Teleosts. Iowa State University Press, Ames, IA, 263 pp.

Fernández, M., Ibáñez, M., Picó, Y., and Mañes, J. 1998. Spatial and temporal trends of paraquat, diquat, and difenzoquat contamination in water from marsh areas of the Valencian Community (Spain). Archives of Environmental Contamination and Toxicology 35: 377-384.

Fisher, S. J., Willis, D. W., and Pope, K. L. 1996. An assessment of burbot (*Lota lota*) weight-length data from North American populations. Canadian Journal of Zoology 74: 570-575.

Fletcher, K. 1974. Paraquat poisoning. In Ballantyne, B. (Ed.), Forensic toxicology, pp. 86-98 Bristol: John Wright.

Frame, L., and Dickerson, R. L. 2006. Fish and wildlife as sentinels of environment contamination. In Norris, D. O. and Carr, J. A. (eds.), Endocrine disruption: biological bases for health effects in wildlife and humans, pp. 202-222. New York: Oxford University Press.

Fortin, M.G., Couillard, C.M., Pellerin, J., and Lebeuf, M. 2008. Effects of salinity on sublethal toxicity of atrazine to mummichog (*Fundulus heteroclitus*) larvae. Marine Environmental Research 65: 158-170.

Ghassemi, M., Fargo, L., Painter, P., Quinlivan, S., Scofield, R., and Takata. A. 1981. Environmental fates and impacts of major forest use pesticides. p. A-149-168. Washington D.C.: U.S. EPA. Office of Pesticides and Toxic Substances.

Giddings, J. M., et al. 2005. Atrazine in North American surface waters: A probabilistic aquatic ecological risk assessment. Pensacola, FL: Society of Environmental Toxicology and Chemistry.

Gilliom, B. J., et al. 2006. The quality of our nation's waters – Pesticides in the nation's streams and ground Water, 1992–2001. Circular 1291. Verginia: U.S. Geological Survey.

Gingerich, W.H. 1982. Hepatic toxicology of fishes. In Aquatic Toxicology (L.J. Weber, ed). New York: Raven Press. pp 55-105.

Gluth, G., Freitag D., Hanke W., and Korte F. 1985. Accumulation of pollutants in fish. Comparative Biochemistry and Physiology: Part C. 81: 273-277.

Goede, R. W., and Barton, B. A. 1990. Organismic indices and an autopsy-based asswssment as indicators of health and condition of fish. American Fisheries Society Symposium 8: 93-108.

Gressel, J., Shimabukuro, R. H., and Duysen, M. E. 1983. N-Dealkylation of atrazine and simazine in senecio vulgaris biotypes: A major degradation pathway. Pesticide Biochemistry and Physiology 19: 361–370.

Griffiths, D., and Kirikwood, R. C. 1995. Seasonal variation in growth, mortality and fat stores of roach and perch in Lough Neagh, Northern Ireland. Journal of Fish Biology 47: 537-554.

Grossbard, E., and Atkinson, D. 1985. The herbicide glyphosate. Boston: Butterworths.

Gunkel, G. 1981. Bioaccumulation of a herbicide (atrazine, s-triazine) in the whitefish (*Corrgonus fera* J): uptake and disturbution of the residue in fish. Arch hydrobiology 59: 252-283.

Hanson, N. 2008. Does fish health matter? The utility of biomarkers in fish for environmental assessment. Doctor's Thesis. Applied Environmental Science, Department of Plant and Environmental Sciences, Faculty of Science, University of Gothenburg.

Hanson, N. 2009. Utility of biomarkers in fish for environmental monitoring. Integrated Environmental Assessment and Management 5:180-181.

Health Canada's Pest Management Regulatory Agency (HCPMRA). 2010. Proposed Maximum Residue Limit PMRL2010-59 Atrazine [online]. Health Canada. Available from: http://www.hc-sc.gc.ca/cps-spc/oest/part/consulations/_pmrl2010-59/pmrl2010-59-eng.php [Accessed: 1 October 2010]

Holm, G., Norrgren, L., and Lindin, O. 2006. Reproductive and histopathological effects of long-term experimental exposure to bis(tributyltin) oxide (TBTO) on the threespined stickleback, Gasterosteus aculeatus Linnaeus. Journal of Fish Biology 38: 373-386.

Homsby, A. G., Wauchope, R. D., and Hemer, A. E. 1995. Pesticide properties in the environment. New York: Springer. Heidelberg.

Humason, G.L. 1979. Animal Tissue Techniques. 4th. San Francisco : Freeman.

Jacob, G. B., Garbow, J. R., Hallas, L. E., Zkimack, N. M., Kishore, G. M., and Schaefer, J. 1988. Metabolism of glyphosate in *Pseudomonas* sp. Strain LBr. Applied and Environmental Microbiology 54: 2953-2958.

Jacomini, A. E., Bonato, P. S , Avelar, W. E. P. 2003. HPLC method for the analysisof atrazine in freshwater bivalves. Journal of Liquid Chromatography and Related Technologies 26: 1885-1894.

Jing, Ge., Jian, Cong., Ying, Sun., Guoxue, Li., Zhiqiang, Zhou., Chuanfan, Qian. et al. 2010. Determination of Endocrine Disrupting Chemicals in Surface Water and Industrial Wastewater from Beijing, China. Bulletin of Environmental Contamination Toxicology 84:401–405

Jiraungkoorskul, W., Upatham, E.S., Kruatrachue, M., Sahaphong, S., Vichasri-Grams S., and Pokethitiyook, P. 2002. Histopathological Effects of Roundup, a Glyphosate Herbicide,on Nile Tilapia (*Oreochromis niloticus*). Science Asia 28: 121-127.

Johnson, F., et al. 2004. Atrazine use and weed management strategies to protect surface water quality. Purdue extensiion. PPP-67 . Purdue University.

Kearney, R C., Ruth, J. M., Zeng, Q., and Mazzocchi., R. 1985. UV-ozonation of paraquat. Journal of Agricultural and Food Chemistry 33:953 -957.

Kendall, R.J., Anderson, T.A., Baker, R.J., Bens, C.M., Carr, J.A., Chiodo, L.A., and et al. 2001. Ecotoxicology . In Klaassen, C.D. (ed), Casarett and Doule's Toxicology The Basic Science of Poisons, New York: McGraw-Hill. pp. 1013-1046.

Kime, D. E. 1998. Endocrine disruption in fish. London: Kluwer Academic Publishers.

Kishore, G. M. and Jacob, G. S. 1987. Degradation of glyphosate by *Pseudomona*s sp. PG2982 via a sarcosine intermediate. The Journal of Biological Chemistry 262: 12164-12168.

Klassen H. E. and Kadoum A. M. 1979. Distribution and retention of atrazine and carbofuran in farm pond ecosystems. Archives of Environmental Contamination and Toxicology. 8: 345-353.

Kleinkauf, A., Scott, A. P., Stewart, C., Simpson, M. G., and Leah, R.T. 2004. Abnormally elevated VTG concentrations in flounder (*Platichthys flesus*) from the Mersey Estuary (UK) a continuing problem. Ecotoxicology and Environmental Safety 58:356 -364.

Knuuttila, P., and Knuuttila, H. 1979. The crytal and molecular structure of N-(phosphonomethy) glycine (glyphosate). Acta Chemica Scandinavica 33: 623-626.

Knusli, K. 1994. Atrazine. In G. Zweig and J. Sherma (eds), Analytical method for pesticides and plant growth regulators 4 th . New Yolk: Academic Press.

Kruawal, K., Sacher, F., Werner; A., Müller, J. and Knepper, T. P. 2005. Chemical water quality in Thailand and its impacts on the drinking water production in Thailand. Science of the Total Environment 340: 57-70

Lagler, K.F., J.E. bardach and R.R. Miller. 1962. Ichthyology. John willey and Son, Inc. New York. 545 pp.

Lam, P. K. S., and Gray, J. S. 2003. The use of biomarkers in environmental monitoring programmes. Marine Pollution Bulletin 46: 182-186.

Le Cren, E. D. 1951. The length-weight relationship and seasonal cycle in gonad weight and condition in the perch (*Perca fluviatilis*). Journal of Animal Ecology 20: 201-219.

Lee, A. J., Katayama, A., and Kimura, M. 1995. Microbial degradation of paraquat sorbed to plant residues. Journal of Agriculture and Food Chemistry 43: 1343-1 347.

Lindesjoeoe, E., Husoey, A.M., and Petterson, I.1996. Pollutant responses in marine organisms. Marine Environmental Research 424: 229-233.

Louiz, I., Ben-Attia, M., and Ben-Hassine, O.K. 2009. Gonadosomatic index and gonad histopathology of *Gobius niger* (Gobiidea, Teleost) from Bizerta lagoon (Tunisia): Evidence of reproduction disturbance. Fisheries Research and Development Corporation 100: 266-273.

Manassero , A., Passalia, C., Negro, A. C., Cassano, A. E., and Zalazar, C. S. 2010. Glyphosate degradation in water employing the H_2O_2/UVC process. Water Research 44: 3875-3882.

Mason, C. F. 1981. Biology of freshwater pollution. 2 nd. London: Longman.

Meister, R. T. 1999. Farm Chemicals Handbook. Willoughby, OH: Meister Publishing Company.

Miranda, A.L., Roche, H., Randi, M.A.F., Menezes, M.L., and Oliveira Ribeiro, C.A. 2008. Bioaccumulation of chlorinated pesticides and PCBs in the tropical freshwater fish *Hoplias malabaricus*: Histopathological, physiological, and immunological findings. Environment International Journal 34: 939-946

Munkittrick, K.R. 1992. A review and evaluation of study design considerations for site-specifically assessing the health of fish populations. Journal of Aquatic EcosyHealth 1: 283-293.

Nan Province. 2009. Nan guidebook [Online]. Available from: http://www.nan. go.th [2012, April 23]

National Reserch Council (NRC). 1987. Biological marker in environmental health research. Environmental Health Perspectives 74: 3-9.

National Research Council (NRC). 1991. Animals as sentinel of environmental health hazards. Washington, D.C.: National Academy Press.

Nikolsky, G.V. 1963. The Ecology of Fishes. Academic Press, London. 463 pp.

Nopanitaya, W., Carson, J.L., Grisham, J.W., Aghajanian, J.G. 1979. New observations on the fine structure of the liver in gold fish (*Carassius auratus*). Cell and Tissue Research. 196: 249-261.

Norris, D.O., and Carr, J.A. 2006. Endocrine Disruption: Biological Bases for Health Effects in Wildlife and Humans. New York: Oxford University Press.

Office of Agriculture Nan Province. 2011. Information for consideration in the reducing chemical use project, Nan Province. [Online] Office of Agriculture, Nan Province Available from: www.nan.doae.go.th/scanbook2554/pkk.doc [2012 April 21]

Olfat, M., Wahbi., and Zeinab., A. El-Greisy. 2007. Comparative Impact of Different Waste Sources on the Reproductive Parameters and Histology of Gonads, Liver and Pituitary Gland of Siganus rivulatus. Journal of Applied Sciences Research 3(3): 236-244, 2007

Olsson, P., Westerlund, L., The, S.J., Billson, K., Berg, A.H., Tysklind, M., Nilsson, J.,

Eriksonn, L., and Hinton, D.E. 1999. Effects of maternal exposure to estrogen and PCB on different life stages of zebra fish (*Danio rerio*). A Journal of the Human Environment 28: 100-106.

Omitoyin, B.O., Ajani, E.K., and Fajimi, O.A. 2006. Toxicity of gramoxone (paraquat) to juvenile African catfish, *Claris gariepinus* (Burchell, 1822). American-Eurasian Journal of Agricultural & Environmental Science 1: 26-30.

Pape, B. E., and Zabik, M. J. 1970. Photochemistry of selected 2-Chloro- and 2-Methylthio-4,6-di-(Alkylamino) -*S*-Triazine Herbicides. Journal of Agricultural and Food Chemistry 18:202-207.

Parveen, A. and Javed, M. 2010. Effect of water-borne copper on the growth performance of fish *Catla catla*. International Journal of Agriculture and Biolology 12: 950-952.

Pérez, G. L., Vera, M. S., and Miranda, L. A. 2011. Effects of herbicide glyphosate and glyphosate-based formulations on aquatic ecosystems. In A. Kortekamp (ed), Herbicides and environment, pp. 343-368. Willoughby, OH: Meister Publishing Company.

Phewnil, O., Tungkananurak, N., Panichsakpatana, S., Pitiyont, B., Siripat, N., and Watanabe, H. 2012. The Residues of Atrazine Herbicide in Stream Water and Stream Sediment in Huay Kapo Watershed, Phetchabun Province, Thailand. Research Article 42-45

Phewnil, O., Panichsakpatana, S., Tungkananuruk, N., and Pitiyont, B. 2010. Atrazine Transport from The Maize (*Zea mays* L.) Cultivated Upland Soil in Huay Kapo Watershed, Nam Nao District, Phetchabun Province, Thailand. Thai Journal of Agricultural Science 43(3): 119-127

Prosen, H., and Zupančič-Kralj, L. 2005. Evaluation of photolysis and hydrolysis of atrazine and its first degradation products in the presence of humic acids Environmental Pollution 133: 517-529.

Radosevich, M., Traina, S. J., and Tuovinen, O. H. 1996. Biodegradation of atrazine in surface soils and subsurface sediments collected from an agricultural research farm. Biodegradation 7:137-49.

Ribaudo, M. O., and Bouzaher, A. 1994. Atrazine: environmental characteristics and economics of management, Agricultural Economic. Agricultural Economic Report Number 699. Economic Research Service, U. S. Department of Agriculture.

Risbourg, S.B., and Bastide, J. 1995. Hepatic perturbations induced by a herbicide (atrazine) in juvenile grey mullet *Liza ramada* (Mugilidae, Teleostei): An ultrastructural study. Aquatic Toxicology 31: 217-229.

Roberts, T. R., Dyson, J. S., and Lane, C. G. 2002. Deactivation of the biological activity of paraquat in the soil environment: A review of long-term environmental fate. Journal of Agricultural and food Chemistry 50: 3623-3631.

Robert, R.J. 1978. Fish pathology. 1st. New York: MacMillan.

Rohr, J. R., Sager, T., Sesterhenn, T. M., and Palmer, B. D. 2006. Exposure, postexposure and density-mediated effects of atrazine on amphibians: breaking down net effects into their parts. Environmental Health Perspectives 114: 46-50.

Saeborowski, R., and Buchholz, R. 1996. Annual changes in the nutritive state of North Sea dab.Journal of Fish Biology 49: 173-194.

Sakunthengtong, S., Biadol, P., Watchayanol, M., and Haruthaithanasan , P. 2001. Pesticide contamination in Groundwater. Department of Agriculture Ministry of Agricultural and Cooperatives.

Sanchís, J., et al. 2012. Determination of glyphosate in groundwater samples using an ultrasensitive immunoassay and confirmation by on-line solid-phase extraction followed by liquid chromatography coupled to tandem mass spectrometry. Analytical and Bioanalytical Chemistry 402: 2335-2345.

Scribner, E. A., Battaglin, W. A., Dietze, J. E., and Thurman, E. M. 2003. Reconnaissance data for glyphosate, other selected herbicides, their degradation. Products and Antibiotics in 51 Streams in Nine Midwestern States, 2002. USGS open-file report 03-217. Lawrence, KS: U.S. Geological Survey.

Segnini de Bravo, M.I., Medina, J., Marcano, S., Finol, H.J., and Boada-Sucre, A. 2005. Effects of herbicide on the kidneys of two Venezuelan cultured fish: *Caquetaia kraussii* and *Colossoma macropomum* (Pisces: Ciclidae and Characeae). Revista de Biologia Tropical 1:55-60.

Sene, L ., Converti, A., Secchi, G. A. R., and Simão, R. C. G. 2010. New aspects on atrazine biodegradation. Brazilian Archives of Biology and Technology 53: 487-496.

Senarat, S. 2011 Correlation between herbicide contamination and effects on reproductive system of Cyprinid fish *Puntioplites proctozysron* in Nan River, Wiangsa District, Nan Province. Master's Thesis. Deparment of Biology, Faculty of Science, Chulalongkorn University.

Shugart, L. R., Mc-carthy, J. F., and Halbrook, R. S. 1992. Biological markers of environmental and ecotoxicological contamination: an overview. Risk Analysis 12: 353-360.

Simoneaux, B. J. 1996. Reserch scientist for Ciba Geigy. New Orleans: Personal Interview.

Steinberg, C.E.W., Lorenz, R., and Spieser, O.H. 1995. Effects of atrazine on swimming behavior of zabrafish, Brachydanio rerio. Water Restoration 29

Smith, H.M. 1945. The freshwater fish of Siam or Thailand. Washington: United States Government Office.

Smith, E. A., and Mayfield, C. I. 1978. Paraquat:determination, degradation and mobility in soil, water, air and soil. Pollution 9: 439-452.

Solomon, K.R., et al. 1996. Ecological risk assessment of atrazine in north American surface waters. Environmental Toxicology and Chemistry 15: 31-76.

Solomon, K, R., et al. 2007. Coca and poppy eradication in colombia: Environmental and human health assessment of aerially applied glyphosate. Reviews of Environmental Contamination & Toxicology 190:43-125.

Solomon, K.R., et al. 2008. Effects of Atrazine on Fish, Amphibians, and Aquatic Reptiles. A Critical Review Critical Reviews in Toxicology 38:721-72.

Stahl, G. Jr. C. 1997. An mammalian and non-mammalian "sentinel species" data be used to evaluate the human health application of environmental contaminants? Human and Ecological Risk Assessment 3: 329–335.

Storrs, S. I., and Kiesecker, J. M. 2004. Survivorship patterns of larval amphibians exposed to low concentrations of atrazine. Environmental Health Perspectives 112: 1054-1057.

Takashima, F., and Hibiya, T. 1995. An Atlas of Fish Histology Normal and Pathological Features. 2nd. Kodansha: Tokyo.

Thailand National Statistical Office. 2001. Satistical Yearbook Thailand. 2000. no. 47 Bangkok: Statistical Publication section, Nation Statistical Office.

Thapinta, A., and Hudak, P. F. 2000. Pesticide use and residual occurrence in Thailand. Environmental Monitoring and Assessment 60: 103-114.

Thurman, E. M., Meyer, M. T., Mills, M. S., Zimmerman, L. R., Perry, C. A., And Goolsby, D.A. 1994. Formation and transport of deethylatrazine and deisopropylatrazine in surface water. Environmental Science and Technology, 28: 2267-2277.

Torstensson, L., Börjesson, E., and Stenström, J. 2005. Efficacy and fate of glyphosate on Swedish railway embankments. Pest Management Science 61: 881-886.

Trzudsi, S., and Kowalski, E. 1975. The mobility of gesatop and gesapin (simazine and atrazine) under different conditions of precipitation, soil type and soil compaction. Weed Science 24: 543-550.

Tyler, A. V., and Dunn, R. S. 1976 Ration, growth and measurement of somatic and organic condition in relation to meal frequency in white flounder, Pseudopleuronectes americanus, with hypothesis regarding population homeostasis. Journal of the Fisheries Research Board of Canada 33: 63-75

United States Environmental Protection Agency (U.S. EPA). 1990. National survey of pesticides in drinking water wells, phase I report. EPA- 570/9-90-015 Office of Water. Office of Pesticides, and Toxic Substances.

United States Environmental Protection Agency (U. S. EPA). 1993. Reregistration eligibility decision: Glyphosate. EPA- 738-R-93-014. Office of Prevention, Pesticides and Toxic Substances.

United States Environmental Protection Agency (U. S. EPA). 1999. Pesticide industry sales and usage: 1996 and 1997 market estimates. EPA-733-R-99-001. Office of Prevention, Pesticides and Toxic Substances.

United States Environmental Protection Agency (U.S. EPA). 2004. Pesticide industry sales and usage: 2000 and 2001 market estimates. EPA-733-R-04-001. Office of Pesticide Programs. Office of Prevention, Pesticides, and Toxic Substances.

United States Environmental Protection Agency (U.S. EPA). 2009. Risks of Paraquat Use to Federally Threatened California Red-legged Frog (*Rana aurora draytonii*) Environmental Fate and Effects Division, Office of Pesticide Programs.

United States Environmental Protection Agency (U. S. EPA). 2012 2012 Edition of the drinking water standards and health advisories. EPA 822-S-12-001. Office of Water.

United States Departmet of Health and Human Service (U. S. HHS). 2003. Toxicological profile for atrazine. Public Health Service, Agency for Toxic Substances and Disease Registry.

Van der Oost, R., Beyer, J., and Vermeulen, N. P. E. 2003. Fish bioaccumulation and biomarkers in environmental risk assessment review. Environmental Toxicology and Pharmacology 13: 57-149.

Van der Schalie, W. H., et al. 1999. Animals as sentinels of human health hazards of environmental chemicals. Environmental Health hazard Perspectives 107: 309-315.

Wackett, L. P., Sadowsky, M. J., Martinez, B., and Shapir, N. 2002. Biodegradation of atrazine and related s-triazine compounds:from enzymes to field studies. Applied Microbiology and Biotechnology 58:39-45

Wallace, L. A. 2007 Biomarkers of exposure. In Wallace. A. L.; Steinemann., A. C. and Ott W. R. (Eds), Exposure Analysis., pp. 396-407.London: Talor and Francis.

Watts, M. 2011. Paraquat. [Online] Pesticide Action Network Asia and the Pacific. Available from: http://www.pananz.net/resources/Div_Loaded_Files/Documents/Paraquat/Paraquat%20monograph%20final%202011.pdf [2012, April 23]

Wang, Y.S., Jaw, C.G., and Chen, Y.L. 1993. Accumulation of 2,4-D and glyphosate in fish and water hyacinth. Water, Air, & Soil Pollution 74: 397-403.

Wilson, J.M., Bunte, R.M., and Carty, A.J. 2009. Evalution of rapid cooling and tricaine methanesulfonate (MS222) as methods of euthanasia in zebrafish *(Danio rerio)*. American Association For Laboratory Animal Science 48:785-789.

Wolf, J.C., and Wolfe, M.J. 2005. A brief overview of nonneoplastic hepatic toxicity in fish. Toxicologic Pathology 33: 75-85.

World Health Organization (WHO). 1993. Biomakers and risk assessment: concept and principle. [Online] International Program on Chemical Safety (IPCS). Environmental Health Criteria 155: World Health Organization. Available from http://www.inchem.org/documents/ehc/ehc/ehc155.htm. [2012 April 21].

World Health Organization (WHO). 1994 Glyphosate. [online] Environmental health criteria no. 159. The International Labour Organization. Geneva, Switzer Available from http://www.inchem.org/documents/ehc/ech/ehc159.htm [2012 April 21].

World Health Organization (WHO). 2011. Guideline for Drinking Water Quality. 4th ed. [Online] Available from: http://whqlibdoc.who.int/publications/2011/9789241548151_eng.pdf [2012, April 21]

Wongwichit, D., Robson, M. G., and Siriwong, W. 2010. Herbicide exposure to maize farmers in Northern Thailand: Knowledge, attitude and practices. Abstract. In Public Health: Implications from a Compromised Environment, Improve Environmental Quality in Developing Countries, 1-5 March 2010, Ho Chi Minh City, Vietnam.

Zaranyika, M. F., and Nyandoro, M. G. 1993. Degradation of glyphosate in the aquatic environment: An enzymatic kinetic model that takes into account microbial degradation of both free and colloidal (or sediment) particle adsorbed glyphosate. Journal of Agricultural and Food Chemistry 41: 838-842.

ภาคผนวก

ภาคผนวก ก
สูตรการเตรียมสารเคมีและสีย้อม

การเตรียม Davidson's fixative

1. Formaldehyde (37-40%) 200 ml.
2. Glycerol 100 ml.
3. Glacial acetic acid 100 ml.
4. Absolute ethanol 300 ml.

การเตรียม Hematoxylin

1. Hematoxylin 4.0 g.
2. Absolute Ethanol 25 ml.
3. Aluminum ammonium NH_4 Al $(SO_4)_2.12H_2O$ ประมาณ 6 g/ น้ำกลั่น 400 ml.

นำสารที่เตรียมได้เก็บใส่ flask นำไปตั้งทิ้งไว้ในที่ที่มีแสง 3-5 วัน นำมากรอง แล้วเติม glycerin 100 ml. และ methanol 100ml. ตั้งทิ้งไว้เป็นเวลา 6 สัปดาห์ เพื่อให้สีย้อมคงตัว และเก็บสีย้อมไว้ในขวดเก็บสารเคมีที่ปิดสนิท

การเตรียม Eosin 1%

1. Eosin Y 1.0 g.
2. 70% Ethanol 1000 ml.
3. Glacial acetic acid 5 ml.

การเตรียม Periodic acid solution

1. Periodic acid 1 g.
2. น้ำกลั่น 100 ml.

การเตรียม Schiff reagent

1. น้ำกลั้น 400 ml.
2. Basic fuchsine 1 g.
3. Sodium metabisulphite ($Na_2S_2O_5$) 1 g.
4. Conc. HCl 2 ml.
5. Coal 2 g.

ต้มน้ำกลั่นจนเดือดจัด จากนั้นใส่ Basic fuchsine คนจนละลาย และตั้งทิ้งไว้ให้เย็นที่อุณหภูมิห้อง แล้วค่อย ๆ ใส่ Sodium metabisulphite กรองด้วยกระดาษกรอง แล้วเติม Conc. HCl ใส่ขวดปิดฝาให้สนิท ทิ้งไว้ข้ามคืน เมื่อต้องการใช้ให้เติม Coal คนประมาณ 2 นาที กรองด้วยกระดาษกรอง แล้วนำไปใช้ได้ (สารจะมีสีน้ำตาลส้ม)

การเตรียม Differentiator

1. 70% Ethanol 100 ml.
2. Conc. HCl 4 drops

ภาคผนวก ข

ขั้นตอนการทำสไลด์ถาวร ด้วยวิธี Paraffin method **การย้อมสี** Hematoxylin **และ** Eosin **และการย้อมสี** PAS

ขั้นตอนการทำ Paraffin method

1. Fixation

นำตัวอย่างที่รักษาสภาพไว้ใน 70% Ethanol มาผ่าตัดเอาอวัยวะตับและไต

2. Dehydration

เป็นขั้นตอนการดึงน้ำออกจากเนื้อเยื่อโดยผ่านแอลกอฮอล์จากความเข้มข้นต่ำไปสูงขึ้นดังต่อไปนี้

1. 90% Ethanol	1 ชั่วโมง
2. 95% Ethanol	1 ชั่วโมง
3. 95% Ethanol	1 ชั่วโมง
4. N-butanol	1 ชั่วโมง

3. Clearing

การทำให้เนื้อเยื่อใส โดยการย้ายตัวอย่างลงใน Xylene เป็นเวลา 1 ชั่วโมง

4. Infiltration

การดึง wax เข้าไปแทนที่ xylene ในเนื้อเยื่อ โดยการย้ายตัวอย่างลงสารละลายตามขั้นตอนต่อไปนี้

1. Xylene + wax (อัตราส่วน 1:1)	1 ชั่วโมง
2. Wax I	1 ชั่วโมง
3. Wax II	30 นาที

* ทั้ง 3 ขั้นตอนทำในตู้อบที่มีอุณหภูมิประมาณ 59-62 องศาเซลเซียส

**ในกรณีที่เนื้อเยื่อชิ้นเล็ก จะใช้เวลาในแต่ละขั้นตอนลดลงเหลือ 20 นาที และ wax II ใช้เวลา 10 นาที ทั้งนี้ระยะเวลาที่ใช้จะขึ้นอยู่กับขนาดและความหนาของเนื้อเยื่อด้วย

5. Embedding

   เป็นขั้นตอนการเติม wax เข้าไปแทนที่เนื้อเยื่อ เพื่อฝังเนื้อเยื่อเข้าไปในวัสดุที่แข็ง (wax ในการใช้ขึ้นรูป เพือให้ง่ายต่อกระบวนการตัด section ในขั้นตอนต่อไป) โดยทำตามขั้นตอนดังนี้

   1. เติม wax III ลงใน embeddind ring ที่วางบนแม่พิมพ์
   2. นำชิ้นเนื้อตัวอย่างวางลงใน embedding ring (ขั้นตอนนี้ต้องทำอย่างรวดเร็วและระมัดระวัง เพื่อไม่ให้เกิดฟองอากาศในเนื้อ wax โดย wax ที่ใช้จะต้องร้อนพอประมาณ)
   3. ทิ้ง wax ในแข็งตัวโดยวางในตู้เย็นที่อุณหภูมิประมาณ 4 องศาเซลเซียส เมื่อ wax แข็งตัวแล้วจึงแกะออกจากแม่พิมพ์ได้
   4. ตัดแต่งบล็อกโดยการเฉือนเนื้อ wax ด้านข้างออก และทำให้ทุกด้านเสมอกันเป็นรูปสี่เหลี่ยม

6. Section cutting

   นำบล็อกมาตัดด้วยเครื่อง Rotary microtome ด้วยความหนา 5 - 7 ไมโครเมตร ตัดต่อเนื่องจนได้เป็นสาย ribbon

<u>การทำสไลด์ถาวร</u>

1. นำ ribbon ที่ได้จากการตัด มาตัดเป็นชิ้นสั้น ๆ ให้สามารถติดลงบนกระจกสไลด์ได้
2. ติดชิ้น paraffin section ลงบนกระจกสไลด์ โดยการหยดสารละลาย albumin ลงบนกระจกสไลด์ จากนั้นวางชิ้น paraffin section ลงบนสารละลาย
3. ย้ายกระจกสไลด์ไปวางบน worm plate ที่อุณหภูมิประมาณ 40 องศาเซลเซียส เพื่อให้แผ่นเนื้อเยื่อมีการยืดออกได้เต็มที่
4. เมื่อชิ้น paraffin section มีการยืดตัวเต็มที่แล้ว ยึดให้ชิ้น paraffin section ติดกับกระจกสไลด์ โดยใช้ปลายพู่กันกดลงอย่างเบา จากนั้นเอียงสไลด์ เช็ดสารละลาย albumin ออก แล้วทิ้งให้แห้ง

<u>การย้อมสี Hematoxylin และ Eosin</u>

Histochoice I	5	min.
Histochoice II	3	min.
N-butanol I	3	min.
95% Ethanol	3	min.
90% Ethanol	3	min.
70% Ethanol	3	min.
Distilled water	3	min.
Hematoxylin	5	min.
Distilled water	3	min.
Differentiator	10-20	sec.
Tap water	1-3	min.
70% Ethanol	3	min.
90% Ethanol	3	min.
Eosin	2.5	min.
95% Ethanol	3	min.
N-butanol II	3	min.
N-butanol III	3	min.
Histochoice III	3	min.
Histochoice IV	5	min.

Mouth ด้วย Permountant

การย้อมสี PAS

Histochoice I	5	min.
Histochoice II	3	min.
Propanol I	3	min.
95% Ethanol	3	min.
90% Ethanol	3	min.
70% Ethanol	3	min.
Distilled water	3	min.
Periodic acid	15	min.
Tap water	3	min
Schiff reagent	25	min.
Tap water	10	min
Hematoxylin	5	min.
Distilled water	3	min.
Differentiator	10-20	sec.
Tap water	1-3	min.
70% Ethanol	3	min.
90% Ethanol	3	min.
95% Ethanol	3	min.
Propanol II	3	min.
Propanol III	3	min.
Histochoice III	3	min.
Histochoice IV	5	min.

Mouth ด้วย Permountant

การแปลหน่วย

ค่า ppm คือ 1 ในล้านส่วน เช่น ในเนื้อปลามีไกลโฟเซทตกค้าง 0.1 ppm คือ ในเนื้อปลา 1 ล้านกรัมมีไกลโฟเซทอยู่ 0.1 กรัม

ประวัติผู้เขียนวิทยานิพนธ์

นางสาวอรสา อัชยะพันธ์วนิช เกิดที่อำเภอเมือง จังหวัดสระบุรี เมื่อวันที่ 3 สิงหาคม พ.ศ. 2528 สำเร็จการศึกษาระดับมัธยมศึกษาตอนปลายที่โรงเรียนสระบุรีวิทยาคม จังหวัดสระบุรี และสำเร็จการศึกษาระดับปริญญาตรี ภาควิชา ชีววิทยา จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย เมื่อปีการศึกษา 2551

บทคัดย่อ

Orasa Achayapunwanich, Sinlapachai Senarat, Noppadon Kitana, Puttaruksa Varanusupakul and Jirarach Kitana. Health Assessment based on Liver of a Cyprinid Fish *Puntioplites proctozysron* living in a rAbstract, the 5th International Congress of Chemistry and Environment (ICCE), (27-29 May 2011), Port Dickson, Malaysia.