# รายงานการวิจัย

# มหาวิทยาลัยแม่โจ้

**เรื่อง** การใช้ปลาเป็น Biomarker ในการติดตามตรวจสอบผลกระทบด้านสารรบกวนระบบฮอร์โมนจากสารเคมีทางการเกษตรบางกลุ่ม

Using freshwater Fish as Biomarker for Assessment Environmental Impacts on Enodocrine Drsrupters after Applying some Agrochemical Substances

**โครงการย่อยภายใต้ชุดโครงการ** : กลยุทธ์การเพื่อลดการใช้สารพิษทางการเกษตรเชิงบูรณาการโดยการมีส่วนร่วมของชุมชนอย่างยั่งยืนในลุ่มน้ำปิงจังหวัดเชียงใหม่

**ได้รับการจัดสรรงบประมาณวิจัย** ประจำปี 2548 - 2549

จำนวน 401,500 บาท

**หัวหน้าโครงการ** ชนกันต์ จิตมนัส

**ผู้ร่วมโครงการ** กระสินธุ์ หังสพฤกษ์

น้ำเพชร ประกอบศิลป์

งานวิจัยเสร็จสิ้นสมบูรณ์

31 ธันวาคม 2550

# คำขอบคุณ

คณะผู้วิจัยขอขอบคุณสำนักวิจัยและส่งเสริมวิชาการการเกษตร มหาวิทยาลัยแม่โจ้ และสภาวิจัยแห่งชาติ ที่ให้การสนับสนุนในการจัดสรรงบประมาณวิจัยประจำปี 2548 – 2549 จำนวนเงิน 401,500 บาท สำหรับงานวิจัยในครั้งนี้และขอขอบคุณคณาจารย์ ข้าราชการ พนักงาน และเจ้าหน้าที่ คณะเทคโนโลยีการประมงและทรัพยากรทางน้ำ มหาวิทยาลัยแม่โจ้และบุคคลอื่นที่มิได้กล่าวถึงในที่นี้ ที่ได้ให้ความเกื้อหนุน ทำให้การวิจัยในครั้งนี้เสร็จสิ้นอย่างสมบูรณ์

คณะผู้วิจัย

มีนาคม 2551

# สารบัญเรื่อง


| | หน้า |
|---|---|
| บทคัดย่อ | 1 |
| Abstract | 3 |
| คำนำ | 5 |
| วัตถุประสงค์ของการวิจัย | 14 |
| วัน เวลา และสถานที่ทำการวิจัย | 14 |
| อุปกรณ์การวิจัย และวิธีการวิจัย | 15 |
| ผลของการวิจัย | 18 |
| วิจารณ์และสรุปผลการวิจัย | 25 |
| เอกสารอ้างอิง | 30 |
| ภาคผนวก | 33 |

# การใช้ปลาเป็นตัวบ่งชี้ทางชีวภาพในการติดตามตรวจสอบผลกระทบด้านสารรบกวนระบบฮอร์โมนจากสารเคมีทางการเกษตรบางกลุ่ม

# Using Freshwater Fish as Biomarker for Assessment Environmental Impacts on Endocrine Disrupters after Applying some Agrochemical Substances

**ชนกันต์ จิตมนัส กระสินธุ์ หังสพฤกษ์ น้ำเพชร ประกอบศิลป์**

CHANAGUN CHITMANAT, KRASINDH HANGSAPREURKE, NUMPET PRAKOBSIN

คณะเทคโนโลยีการประมงและทรัพยากรทางน้ำ
มหาวิทยาลัยแม่โจ้ เชียงใหม่

## บทคัดย่อ

สารป้องกันกำจัดศัตรูพืชทางการเกษตรหลายชนิดได้มีการพิสูจน์หรือสงสัยว่าเป็นสารที่มีผลรบกวนระบบการทำงานของฮอร์โมน งานวิจัยนี้มีจุดประสงค์เพื่อศึกษาความเป็นไปได้ในการใช้ปลาที่อาศัยอยู่ในแหล่งน้ำเป็นดัชนีชีวภาพในการประเมินผลกระทบสิ่งแวดล้อมจากสารป้องกันกำจัดศัตรูพืชทางการเกษตร โดยแบ่งการทดลองเป็น 4 ส่วน ส่วนที่หนึ่งศึกษาผลของปลาตะเพียนขาวต่อสารกำจัดศัตรูพืช 2 ชนิด พบว่า ปลาตะเพียนขาวที่แช่ในสารกำจัดหอยแอสไปรส์ 40 มิลลิกรัมต่อลิตรและสารกำจัดแมลงเฟมวอส (ไดคลอร์วอส) 16 พีพีเอ็ม นาน 24 ชั่วโมงมีปริมาณเม็ดเลือดแดงอัดแน่นลดลง ส่วนที่ 2 เป็นการตรวจสอบการแสดงออกของยีนที่ควบคุมการสังเคราะห์วิเทลโลจินินจากตับปลา เพื่อเป็นเครื่องหมายทางชีวภาพตรวจวัดปลาน้ำจืดที่ปนเปื้อนสารกำจัดศัตรูพืชที่เกี่ยวข้องกับสารรบกวนฮอร์โมน ด้วยวิธี RT-PCR อย่างไรก็ตาม เมื่อตรวจสอบปลาที่สัมผัสกับสารปราบศัตรูพืชที่ความเข้มข้นต่าง ๆ ยังไม่สามารถหายีนดังกล่าวได้ ส่วนที่สามเป็นการใช้การยับยั้งทำงานของเอนไซม์ Acetylcholinesterase (AChE) โดยใช้หอยขมที่จุ่มในน้ำที่คาดว่ามีการปนเปื้อนของสารปราบศัตรูพืชเป็นตัวบ่งชี้ทางชีวภาพ พบว่า หอยขมชุดควบคุมที่นำมาเลี้ยงในห้องปฏิบัติการมีค่าของการทำงานของเอนไซม์อะซิติลคลอรีนเอสเตอเรสที่สูงกว่าชุดที่นำไปจุ่มในแม่น้ำปิงช่วงฤดูฝน (9.47 เปรียบเทียบกับ 1.04 – 1.60 μmole/min/g tissue ตามลำดับ) โดยการทำงานของเอนไซม์จะมีความสัมพันธ์โดยตรงกับอุณหภูมิน้ำ โดยการทำงานของเอนไซม์อะซิติลคลอรีนเอสเตอเรสของหอยขมในหน้าหนาวมีค่าต่ำที่สุด ส่วนที่ 4 เป็นการ

ตรวจสอบการปนเปื้อนของสารเคมีทางการเกษตรในแหล่งน้ำ โดยผลที่ได้จากการตรวจสอบมีการเปรียบเทียบกับผลจากกรมควบคุมมลพิษ ข้อมูลที่ได้เหล่านี้จะเป็นประโยชน์ในการใช้อ้างอิงในอนาคต เพื่อดูว่ามีการเปลี่ยนแปลงอย่างไร รายงานเล่มนี้ยังได้รวบรวมเอกสารวิจัยที่เกี่ยวข้องกับการใช้เครื่องหมายชีวภาพตัวอื่น ๆ เพื่อใช้ประเมินความเสี่ยงจากการปนเปื้อนของสารปราบศัตรูพืชในแหล่งน้ำ

**คำสำคัญ**: สารรบกวนการทำงานของฮอร์โมน ยาปราบศัตรูพืช เครื่องหมายชีวภาพ วิทิลโลจินิน

# Using Freshwater Fish as Biomarker for Assessment Environmental Impacts on Endocrine Disrupters after Applying some Agrochemical Substances

CHANAGUN CHITMANAT, KRASINDH HANGSAPREURKE, NUMPET PRAKOBSIN

The Faculty of Fisheries Technology and Aquatic Resources. Maejo University, Chiangmai 50290

## Abstract

Pesticides are widely used to kill unwanted organisms in agricultural fields, public areas, homes and gardens Many are proven or suspected to be endocrine disruptors. These compounds alter the normal functioning of the endocrine system, potentially causing disease or deformity in organisms and their offspring. The purpose of this research was to determine the possibilities of the use of indigenous fish as biomarkers for pesticide contamination monitoring in aquatic environment. The experiment was divided into 4 parts. For the first part, Common silver barbs (*Puntius gonionotus*) were exposed to pesticides for 24 h The result showed the decrease in % hematocrit. The second trial was to determine the expression of the vitellogenin (vtg) gene, the major precursor of the egg-yolk proteins, from fish livers by RT-PCR. Unfortunately, the expression of this gene was not a success in this study. A modified method is underway and will include consultations with specialists. The third part included the study of acetylcholinesterase (AChE) inhibition by using transplanted river snails. The result showed the control snails acclimated in the laboratory possessed the higher AChE activities (9.47 μmole/min/g tissue) than transplanted river snails (1.04 – 1.60 μmole/min/g tissue). The last part was the determination of pesticide contamination in the Upper Ping River. The results from several laboratories were compared and reported. These data will be used as a reference for future studies in monitoring pesticides and their impact on the water quality in the Upper Ping River. In this paper,

the hazardous properties of pesticides which are known to have endocrine disruption properties are also reviewed in order to assess the implications for risk assessment.

Keywords: Endocrine disruptors; Pesticides; Biomarker; Vitellogenin

# คำนำ

สารรบกวนการทำงานของระบบฮอร์โมน (endocrine disrupter) เป็นสารที่ทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงของระบบฮอร์โมน ทำให้ลูกพันธุ์มีรูปร่างผิดปกติ เกิดโรค ซึ่งก่อให้เกิดผลเสียต่อสิ่งมีชีวิตและเผ่าพันธุ์ สารรบกวนระบบฮอร์โมนอาจจะไปทำหน้าที่คล้ายกับฮอร์โมน ยับยั้งการสร้าง และ/หรือ การทำงานของฮอร์โมน หรือไปปรับเปลี่ยนตัวรับฮอร์โมน ประชาชนเริ่มให้ความสำคัญเกี่ยวกับสารรบกวนระบบฮอร์โมนตั้งแต่ปี พ.ศ.2539 เป็นต้นมา มีการตรวจพบการปนเปื้อนของสารรบกวนฮอร์โมนในแหล่งน้ำจืด น้ำกร่อยและน้ำเค็ม เพราะแหล่งน้ำมักจะเป็นแหล่งจมตัวสุดท้ายสำหรับสารเคมีที่เกิดขึ้นในธรรมชาติและที่มนุษย์สร้างขึ้น ทำให้เกิดการคาดการณ์ได้ว่า สารเหล่านี้จะมีผลกระทบต่อสิ่งมีชีวิตที่อาศัยอยู่ในทะเลและปากแม่น้ำ (Obersorster and Cheek, 2000) เนื่องจากปลาเป็นทรัพยากรสัตว์น้ำที่มีคุณค่าทางเศรษฐกิจ หากปล่อยให้เหตุการณ์นี้เกิดขึ้นโดยไม่มีการป้องกันแก้ไข อาจจะทำให้ประชากรสัตว์น้ำสูญพันธุ์ได้

สารเคมีหลายกลุ่มที่มีผลรบกวนระบบฮอร์โมน โดยกลุ่มที่ปนเปื้อนในแหล่งน้ำ ได้แก่ 17$\beta$-estradiol, estrone, estriol สารเหล่านี้มักพบในน้ำทิ้งชุมชนระบบความเข้มข้นต่ำเพียง ng/L (Baronti *et al.*, 2000) สารกลุ่มเอสโตรเจนจะไปเกาะกับตัวรับฮอร์โมนเอสโตรเจนในสัตว์น้ำที่สัมผัสหรืออาศัยอยู่ในแหล่งน้ำที่ปนเปื้อนโดยมีประสิทธิภาพและทำหน้าที่เหมือนกันฮอร์โมนเอสโตรเจนในตัวสัตว์นั้น ๆ สารเคมีที่ใช้ในการเกษตรเป็นอีกกลุ่มหนึ่งที่เสี่ยงต่อการชะล้างลงสู่แหล่งน้ำ ซึ่งทำให้เกิดผลกระทบทั้งทางตรงและทางอ้อมต่อสิ่งมีชีวิตที่อาศัยอยู่ในแหล่งน้ำ ผลของสารพิษที่มีต่อสิ่งมีชีวิตอาจไม่ทำให้สิ่งมีชีวิตที่อาศัยอยู่ตายในทันที แต่จะไปมีผลทำให้เกิดผลกระทบต่อสิ่งมีชีวิตอย่างใดอย่างหนึ่ง เช่น การเปลี่ยนแปลงพฤติกรรม อัตราการเจริญเติบโตหรือระบบสืบพันธุ์

กรมอนามัย (http://members.thai.net/craftostro/anamai/html/endocrine_system.htm) รายงานว่า สารเคมีกำจัดศัตรูพืชและสัตว์หลายชนิด ได้รับการยืนยันว่าเป็นสารเคมีรบกวนทำลายฮอร์โมน (Endocrine disruption chemical, EDC) ได้แก่

1. **ดีดีที** (DDT)

มีการห้ามใช้ (banned) สารเคมีกำจัดแมลงดีดีทีในประเทศพัฒนาแล้วมานาน แต่ในประเทศกำลังพัฒนาหลายประเทศยังใช้สารนี้อย่างกว้างขวาง โดยเฉพาะอย่างยิ่งเพื่อการควบคุมยุง สารเมตะโบไลท์จากดีดีทีหลายตัวมีผลต่อฮอร์โมน อาทิ ยับยั้งการทำงานของฮอร์โมนเพศชาย

มีการรณรงค์ของ UNEP เรื่อง สารมลพิษอินทรีย์ที่คงอยู่นาน (POPs : Persistent Organic Pollutants) เพื่อเลิกใช้ดีดีที

สารดีดีทีในทางการค้าที่มีหลายรูป (ไอโซเมอร์) ที่มากที่สุดร้อยละ 70 – 80 คือ p, p'-ดีดีที ในร่างกายจะถูกเมตะโลไลท์เป็นดีดีที (DDE) และทั้งสองตัวนี้ จะคงอยู่ในไขมันในร่างกาย การห้ามใช้ดีดีทีในสหรัฐอเมริกา ทำให้ความเข้มข้นในไขมันในร่างกายลดลงจาก 15 มก./กก ในปี 1955 เป็น 5 มก./กก. ในปี 1980 ซึ่งยังจัดว่า มีค่าค่อนข้างสูง (IEH, 1995) การตกค้างของดีดีทีมีผลต่อพรรณสัตว์ป่า ทำให้เปลือกไข่บางลง ความสามารถสืบพันธุ์ของตัวผู้ถูกทำลายเสียหาย

ผลต่อกระบวนการเมตะบอลิซึมของฮอร์โมนเอสโตรเจนในผู้หญิงในผู้หญิง ฮอร์โมนเอสตราไดออลจะถูกเมตะโบไลท์ แตกทำลายไปเป็น 16 แอลฟา ไฮดรอกเอสโตรน (16 AOHE) และ 2-ไฮดรอกซีเอสโตรน (2-OHE) ซึ่งหากระดับของ 16 AOHE 2-OHE สูงจะทำให้โอกาสเสี่ยงของมะเร็งเต้านมสูงขึ้น ซึ่งอาจเป็น เพราะ 16 AOHE โดยตัวมันเองนั้นเป็นฮอร์โมนในกลุ่มเอสโตรเจนตัวหนึ่ง ในทางตรงกับ หากระดับ 2- AOHE สูงโอกาสเสี่ยงของมะเร็งเต้านมจะลดลง เพราะ 2 – OHE เป็นฮอร์โมนที่อ่อน (Bradlow *et al.*, 1995)

อัตราส่วนของสารทั้งสองนี้ไม่ตายตัว แต่สามารถเปลี่ยนแปลงได้ด้วยการออกกำลัง (ยิ่งออกกำลังมาก ระดับ 2 – OHE ยังมาก) และระดับไขมันในอาหาร (ไขมันยิ่งน้อย ระดับ 2-OHE ยิ่งมาก) อย่างไรก็ดี มีสารเคมีบางชนิดที่กระทบต่อสมดุลของ 16 aOHE และ 2- aOHE คือ อินโดล-3-คาร์บินอล พบใน กะหล่ำปลีและบรอกโคลี่ จะช่วยเพิ่มระดับ 2- OHE ซึ่งอาจช่วยลดโอกาสที่จะเป็นมะเร็งเต้านมลง อนึ่ง มีการศึกษาเซลล์เพาะเลี้ยงมะเร็งเต้านมที่ได้รับสัมผัส กับดีดีที ดีดีอี อะทราซีน ลินเดน และเอนโดซัลเฟน พบว่าทำให้ระดับของ 16 aOHE เพิ่มขึ้น ซึ่งมีความเป็นไปได้ที่โอกาสเสี่ยงเป็นมะเร็งเต้านมเพิ่มขึ้น ทั้งนี้ อะทราซีน ทราบกันโดยตัวไปว่าทำให้เกิดมะเร็งเต้านมในหนู

รายงานวิจัยหลายฉบับพบระดับ p,p'-ดีดีอี ในผู้หญิงที่เป็นมะเร็งเต้านมสูงกว่าในผู้มิได้เป็นและระดับฮอร์โมนที่บทบาทต่อมะเร็งเต้านมจะสัมพันธ์กับระดับดีดีอีในไขมัน (adipose tissue) และในพลาสมา (IEH, 1995)

**ผลต่อฮอร์โมน**

สารเคมีกำจัดศัตรูพืชและสัตว์ชนิดคลอริเนเตดเป็นสารเคมีเอสโตรเจนิก ซึ่งมีผลต่อฮอร์โมน โดยเลียนแบบการทำงานของฮอร์โมนเอสตราไดออล สารกลุ่มนี้ ได้แก่ O, p'-ดีดีที p, p'-ดีดีที ดีลดริน เอนโดวัลเฟน เมทธอกซีคลอร์ และทอกซาฟีน (Soto *et al.*, 1995) ทั้งนี้ จะมีผลต่อฮอร์โมนตั้งแต่ระดับความ เข้มข้น 10 ไมโครโมล แต่หากผสมกัน 10 ชนิด แต่ละชนิดเข้มข้น 1 ไมโครโมล ก็จะกระทบต่อฮอร์โมนได้ในลักษณะเดียวกัน ซึ่งหมายความว่าผลต่อฮอร์โมน นั้นเพิ่มเมื่อ

มีสารกลุ่มนี้เพิ่มขึ้น สำหรับผลที่ต้านฮอร์โมนกลุ่มแอนโดรเจน คือ p, p'-ดีดีอี จะยับยั้งไม่ให้ฮอร์โมนแอนโดรเจนเข้าร่วมกับแอนโดรเจนรีเซฟเตอร์ (ณ อวัยวะเป้าหมาย) ไม่ให้อ่านแบบแผนการเรียงตัวของฮอร์โมนแอนโดรเจน ไม่ให้เกิดพัฒนาการในหนูวัยกระเตาะและโตเต็มวัย ซึ่งหมายความว่า p,p'-ดีดีอี ทำให้เกิดความผิดปกติในพัฒนาการของเพศผู้ (Kelce *et al.*, 1995) หรือกล่าวอีกนัยหนึ่งว่า p, p'-ดีดีอี สับสวิทช์ความเป็นเพศผู้ (maleness) พบว่าตะโขง (alligator) เพศผู้ในฟลอริดาที่มีระดับ p, p'-ดีดีอีสูง จะมีอวัยะเพศเล็กผิดปกติ และระบบสืบพันธุ์ทำงานไม่ปกติ (Sharpe, 1995) ทั้งนี้ เป็นที่ทราบดีกว่า p, p'-ดีดีอี ผ่านทางรกไปสู่ทารกในครรภ์ได้ และหยุดการอ่านแบบแผนการเรียงตัวของฮอร์โมนแอนโดรเจน จึงอาจกล่าวได้ว่า p,p'-ดีดีอี เพิ่มอุบัติการของความผิดปกติในระบบสืบพันธุ์ในเพศผู้ทั้งในพรรณสัตว์และในมนุษย์ (Kelce *et al.*, 1995)

2. **ลินแดน** (Lindane)

ลินเดนเป็นสารเคมีกำจัดศัตรูพืชและสัตว์กลุ่มออร์กาโนคลอรีน และทั่วโลกเป็นสารที่ต้องปฏิบัติตามกฎเกณฑ์ข้อบังคับ วันที่ 13 กรกฎาคม ค.ศ. 2000 กลุ่มประเทศสหภาพยุโรป (EU) ได้ห้ามการใช้ลินเดนในเกษตรกรรม แต่อาจใช้ในผลิตภัณฑ์อื่นได้ เช่น เป็นสารฆ่ามด ลินเดนเป็นสารมลพิษที่คงอยู่นานและพบได้ในน้ำนมของมนุษย์ ผลต่อมนุษย์จะเป็นลักษณะของสารเคมีเอสโตรเจนิก คือ มีผลทำให้ความเข้มข้นของตัวอสุจิลดลง และผลต่อพรรณสัตว์ เช่น มีผลต่อโปรตีนของไข่แดงและโปรตีนในเปลือกไข่ และต่อเฮพปาโตไซท์ในเซลล์ตับของปลาแซลมอนจากมหาสมุทรแอตแลนติก

3. **วินโคลโซลิน** (Vinclozolin)

วินโคลโซลินเป็นสารกำจัดรา (fungicide) ที่ได้รับการยืนยันว่าเป็นสารรบกวนทำลายฮอร์โมน Bayley *et al.* (2002) ได้ทดลองให้ปลาหางนกยูงวัยรุ่นได้รับสาร vinclozolin, p,p -DDE และ flutamide พบว่า ปลาจะมีการเจริญพันธุ์ที่ช้าลงและอัตราส่วนการพัฒนาเป็นเพศเมียจะสูงขึ้น

4. **คาร์เบนดาซิม** (Carbendazim)

คาร์เบนดาซิมเป็นสารกำจัดรา มีผลรบกวนทำลายการผลิตอสุจิและต่อมพัฒนาการของอัณฑะในหนูที่โตเต็มวัย (อาจโดยการทำลายเซลล์ที่คล้ายกันในเนื้อเยื่อทำนองเดียวกับที่คาร์เบนดาวิมกำจัดรา) คาร์เบนดาซิมยังทำให้พัฒนาการของสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนมในมดลูกเสียหาย โดยทำให้นัยน์ตารูปร่างผิดปกติหรือไม่มีนัยน์ตา และทำให้มีน้ำในสมอง (hydrocephalus)

5. **เบโนมิล** (Benomyl)

เบโนบิลเป็นสารกำจัดรา ซึ่งเมื่อถูกเมตะโบไลท์จะเปลี่ยนเป็นคาร์แบนดาซิม มีผลทำให้เพิ่มโอเอสโตรเจน (Morinaga *et al.*, 2004)

6. **โปรชัยมิโดน** (Procymidone)

โปรชัยมิโดนเป็นสารต้านฮอร์โมนแอนโดรเจน มีสมบัติต้านความเป็นเพศผู้คล้ายกับวินโคลโซลิน โดยยับยั้งฮอร์โมนแอนโดรเจน ไม่ให้เข้ารวมกับ แอนโดรเจนรีเซพเตอร์ ลูกหลานเพศผู้ของหนูที่ได้รับ/สัมผัสกับโปรชัยมิโดนระหว่างตั้งท้อง และช่วงแรกของระยะให้นม (lactation) อวัยวะสืบพันธุ์จะผิดรูปผิดร่าง เช่น หัวนมและอวัยวะเพศ จะรูปร่างพิกลพิการ

7. **คลอร์พัยริฟอส** (chlorpyrifos)

คลอร์พัยริฟอสเป็นสารกำจัดแมลงกลุ่มออร์กาโนฟอสเฟต มีถูกจัดเป็นสารรบกวนทำลายฮอร์โมนที่สำคัญ โดยหน่วยงานสิ่งแวดล้อมของรัฐบาลกลางแห่งเยอรมนี (German Federal Environment Agency) ว่าทำให้อวัยวะสืบพันธุ์ของเพศผู้และเพศเมียผิดรูปร่าง คลอร์พัยริฟอสเป็นพิษต่อประสาท (neurotoxin) ที่แม้ได้รับในความเข้มข้นต่ำ ๆ ก็มีผลต่อพัฒนาการทางสมองของหนู และพบว่ามีผลต่อระบบชัยรอยด์ในแกะตัวเมีย (ewes) ทำให้ความเข้มข้นของฮอร์โมนธัยรอกซินในเลือดลดลง

8. **เดลตาเมทธริน** (Deltamethrin)

เดลตาเมทะรินเป็นสารกำจัดแมลงกลุ่มไพรีทรอยด์ ที่ถูกจัดเป็นสารรบกวนทำลายฮอร์โมน ว่ามีผลต่ออสุจิและรก และการได้รับ/สัมผัสสารเดลตาเมทธรินแบบเรื้อรังของหนูโตเต็มวัยมีผลให้เซลล์บางชนิดของอัณฑะตายลง

9. **ไดเมทโธเอต** (Dimethoate)

ไดเมทโธเอตเป็นสารเคมีกำจัดแมลงกลุ่มออร์กาโนฟอสเฟต ซึ่งถูกจัดเป็นสารรบกวนทำลายฮอร์โมนสำคัญเช่นเดียวกันเมื่อให้ไดเมทโธเอตกับหนูโตเต็มวัยจะทำให้อัณฑะเสียหาย ทำลายการผลิตอสุจิ ลดระดับฮอร์โมนเตสโตสโตโรน ทั้งยังทำให้ระดับความเข้มข้นของฮอร์โมนธัยรอกซิน ในแกะตัวเมียลดลง รวมทั้งมีผลต่อกระบวนการเมตะโบลิซึมของธัยรอยด์ในหนู

10. **คาร์โบฟิวแรน** (Carbofuran)

คาร์โบฟิวเรนเป็นสารเคมีกำจัดแมลงกลุ่มคาร์บาเมท ซึ่งถูกจัดเป็นสารรบกวนทำลายฮอร์โมนสำคัญสารหนึ่งเมื่อให้คาร์โบฟิวแรนกับหนูทั้งที่โตเต็มวัย และที่กำลังมีพัฒนาการในมดลูก พบว่าอสุจิและระบบสืบพันธุ์เสียหาย ความเสียหายของการผลิตอสุจิยังพบในกระต่าย ที่ได้รับ/สัมผัสกับคาร์โบฟิวแรนด้วย และเช่นเดียวกันพบผลของคาร์โบฟิวแรนต่อระบบธัยรอยด์ในแกะตัวเมีย โดยมีผลทำให้ความเข้มข้นฮอร์โมนธัยรอกวินเพิ่มขึ้น

11. **อะมิทราช** (Amitraz)

สารกำจัดแมลอะมิทราชรบกวนทำลาย (estrus) ในหนู โดยอะมิทราชจะเข้ารวมกับธีเซพเตอร์ (a-noradrenergic) และยับยั้งการทำงานของฮอร์โมนนอร์อิฟิเนฟริน (nerepinephrine)

12. **ไตรคลอร์ฟอน** (Trichlorfor)

ไตรคลอร์ฟอนสารกำจัดแมลงกลุ่มออร์กาโนฟอสเฟตซึ่งถูกจัดเป็นสารรบกวนทำลายฮอร์โมนสำคัญอีกสารหนึ่ง ว่ามีผลทำให้เกิดเนื้องอกในสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม มีผลต่อการผลิตอสุจิและการสร้างไข่ เด็กที่มีอาการดาวน์ (Down' s syndrome) ในประเทศฮังการี จะบริโภคปลาที่เลี้ยงในท้องถิ่น โดยปลานั้นมี สารไตรคลอร์ฟอนปนเปื้อนอยู่ สารที่ได้จากการสลายตัวของไตรคลอร์ฟอนและไดคลอร์วอสจะทำให้ของระบบภูมิคุ้มกันเสียหาย และเฉพาะไตรคลอร์ฟอน จะทำให้หน้าที่ของระบบภูมิคุ้มกันในปลาคาร์พเสียหาย

13. **เพนโคนาโซล** (Penconazole)

เพนโคนาโซลเป็นสารกำจัดราที่ถูกจัดเป็นสารรบกวนทำลายฮอร์โมนที่สำคัญ ที่มีผลต่อน้ำหนักของต่อมธัยรอยด์ต่อมโพรสเตตและอัณฑะ

14. **โปรคลอราซ** (Prochloraz)

โปรคลอราซเป็นสารกำจัดราในกลุ่มโคนาโซลซึ่งถูกจัดเป็นสารรบกวนทำลายฮอร์โมนที่สำคัญเช่นกันว่ามีผลต่อน้ำหนักของต่อมใต้สมอง

15. **โพรพิโคนาโซล** (Propiconazole)

โพรพิโคนาโซลเป็นสารกำจัดรากลุ่มโคนาโซล และถูกชี้นบัญชีเป็นสารรบกวนการทำลายฮอร์โมนที่สำคัญเช่นกันว่ามีผลต่อเมตะบอลิซึมของสารสเตอรอยด์

16. **ไตรดีมอร์ฟ** (Tridemorph)

ไตรดีมอร์ฟเป็นการกำจัดรากลุ่มมอร์โพลีน (morpholine) และถูกจัดเป็นสารรบกวนทำลายฮอร์โมนที่สำคัญ เพราะมีผลต่อรังไข่โดยยับยั้งเอนไซม์สเตอรอลไอโซเมอเรสในกระบวนการสังเคราะห์โคเลสเตอรอลทางชีววิทยาในมนุษย์

17. **อีปอกซีโคนาโซล** (Epoxyconazole)

อีปอกซีโคนาโซลเป็นสารกำจัดราที่ได้รับการยืนยันขึ้นบัญชีเป็นสารรบกวนออร์โมนที่สำคัญอีกสารหนึ่งว่ามีผลต่อสมดุลของฮอร์โมนเพศ ทำให้แอนโดเจนเพิ่มสูงขึ้น (Trosken *et al.*, 2004) และเป็นสาเหตุของเนื้องอกรังไข่

18. **เมทธิแรม** (Metiram)

เมทธิแรมเป็นสารเคมีกำจัดศัตรูพืชและสัตว์กลุ่มไดไธโอคาร์บาเมต และยืนยันขึ้นบัญชีเป็น

สารรบกวนทำลายฮอร์โมนที่สำคัญเช่นกัน ว่ามีผลทำให้ระดับฮอร์โมนต่าง ๆ จากธัยรอยด์ลดลง (Cocco, 2002)

19. **อะทราซีน** (Atrazine)

อะทราซีนเป็นสารกำจัดวัชพืช (herbicide) ที่มีผลต่อพัฒนาการของระบบสืบพันธุ์ในหนู และมีผลต่อเมตะบอลิซึมของฮอร์โมนในผู้หญิงที่อาจแทรกซ้อนไปสู่การเป็นมะเร็งเต้านมได้ กบวัยอ่อนเพศผู้ที่ได้รับสารกำจัดวัชพืชอะทราซีนในความเข้มข้น 0.1 – 4 ppb จะมีการพัฒนาไข่ขึ้นในถุงอัณฑะ

20. **ไลนูรอน** (Linuron)

ไลนูรอนเป็นสารกำจัดวัชพืชที่มีกลุ่มยูเรียเป็นส่วนประกอบหลัก การศึกษาในหนูหลายรุ่นพบว่าการให้ไลนูรอนมีผลต่อเนื้อเยื่อของระบบสืบพันธุ์ในเพศผู้ในรุ่นลูกหลาน ทำให้อัณฑะผิดรูปร่างและลดขนาดของเนื้อเยื่อแอนโดรเจน

21. **สารไพรีทรอยด์อื่น ๆ** (Other pyrethroids)

การศึกษาเซลล์มะเร็งเต้านมจากมนุษย์พบว่าสารกำจัดแมลงเช่น กลุ่มไพรีทรอยด์ สารเฟนวาเลอเรต (fenvalerate) มีผลลักษณะเดียวกับ ฮอร์โมนแอสโตเจน ขณะที่สารเปอร์เมทธวิน (permetrin) จะมีบทบาท เช่น ฮอร์โมนเอสโตรเจน แต่อ่อน (weak) ส่วนดี-ทรานส์ อัลเลทธ์รัน (d-trans allethrin) อาจมีผลเชิงต้านฮอร์โมนเอสโตรเจน

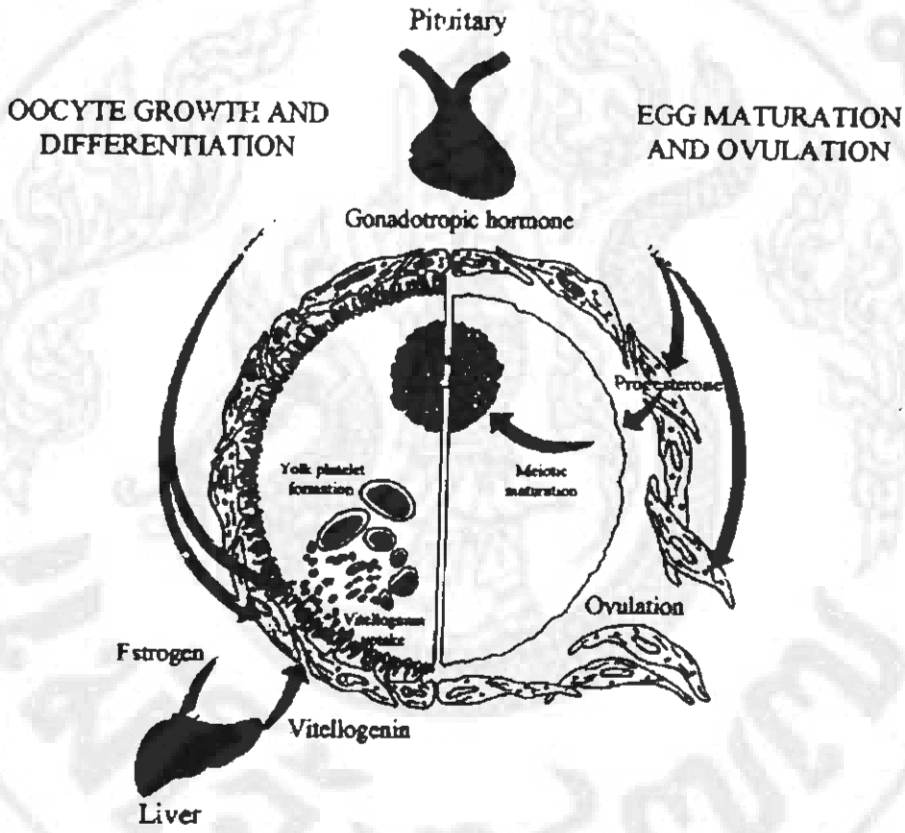
ได้มีการนำตัวบ่งชี้ทางชีวภาพที่เกี่ยวกับความเป็นพิษของระบบประสาท (neurotoxicity biomarker) มาใช้เพื่อประเมินความเป็นพิษของยาฆ่าแมลงที่มีต่อสิ่งมีชีวิตในน้ำโดยใช้การทำงานของเอนไซม์ Acetylcholinesterase และ Choline Acetyltransferase ซึ่งเป็นเอนไซม์ที่ตัวควบคุมการทำงานของระบบประสาทและเมื่อเกิดการยับยั้งการทำงานจากสารกำจัดศัตรูพืชกลุ่มออร์แกโนฟอสเฟต (Organophosphate) และคาร์บาเมต (Carbamate) เป็นสาเหตุการตายในสิ่งมีชีวิตหลายชนิด เอนไซม์โคลีนเอสเทอเรสเป็นสารมิวโคโปรตีน (mucoprotein) มีเวลาครึ่งชีวิต 3 – 4 วัน มีน้ำหนักโมเลกุลอยู่ระหว่าง 300,000 – 348,000 kDa พบในเนื้อเยื่อของสัตว์แทบทุกชนิด มี 2 ประเภท คือ Acetylcholinesterase (AChE) และ serum cholinesterase หรือ Pseudocholinesterase (PChE) โดยการทำงานของเอนไซม์โคลีนเอสเตอเรสถูกยับยั้งด้วยตัวยับยั้งหลายชนิด เช่น กลุ่มออร์แกโนฟอสเฟตและคาร์บาเมตในร่างกายคน (ภาคภูมิ, 2541) ประจวบ (2546) ได้ศึกษาการทำงานเอนไซม์โคลีนเอสเตอเรสจากสมองและซีรั่มของปลานิลจากแหล่งเลี้ยงต่างกัน พบว่าระดับของเอนไซม์โคลีนเอสเตอเรสในปลาที่มีอายุ เพศ และขนาดที่เท่ากันแต่อยู่แหล่งเลี้ยงต่างกันมีความแตกต่างกัน Kumar and Chapman (1998) กล่าวว่า การที่ปลาสายรุ้ง (*Melanotaenia duboulayi*) สัมผัสกับ profenofos ในความเข้มข้นที่ต่ำกว่าที่ทำให้ปลา

เหล่านี้ตาย (sublethal levels) เป็นเวลานานมาก ๆ จะทำให้การทำงานของเอนไซม์โคลีนเอสเตอเรสลดลง 70% และมีผลทำให้อัตราการเจริญเติบโต อัตราการกินอาหารและประสิทธิภาพในการเปลี่ยนอาหารเป็นเนื้อลดต่ำลง

การปนเปื้อนของสารป้องกันและกำจัดศัตรูพืชในแหล่งน้ำธรรมชาติเป็นปัญหาที่ควบคุมได้ยาก เนื่องจากแหล่งทำการเกษตรมักจะกระจายอยู่ตามพื้นที่ลุ่มน้ำและแหล่งน้ำตามธรรมชาติส่วนมากจะเป็นแหล่งน้ำขนาดใหญ่ เช่น แม่น้ำ อ่างเก็บน้ำ เขื่อน เป็นต้น รวมการติดตามตรวจสอบคุณภาพน้ำเป็นเพียงข้อมูลเบื้องต้นที่สามารถประเมินผลกระทบได้เพียงบางส่วนเท่านั้น แม่น้ำปิงเป็นอีกสายน้ำหนึ่งที่ไหลผ่านแหล่งเกษตรกรรมโดยเฉพาะในเขตจังหวัดเชียงใหม่กว่าร้อยละ 50 ของแหล่งการทำการเกษตรทั้งหมด ทำให้โอกาสของการปนเปื้อนของสารป้องกันและกำจัดศัตรูพืชลงสู่แหล่งน้ำมีสูง ดังนั้นจึงควรมีการเฝ้าระวังอย่างสม่ำเสมอ

วิเทลโลจินิน (Vitellogenin, Vtg) เป็นสารตั้งต้นหลักในการสร้างโปรตีนสำหรับไข่แดงในสัตว์กลุ่มที่ออกลูกเป็นไข่ ซึ่งจะเป็นแหล่งพลังงานสะสมให้กับตัวอ่อน การสร้าง Vtg ในเพศเมียที่มีความสมบูรณ์เพศจะเกิดขึ้นโดยตับจะเป็นอวัยวะที่ทำหน้าที่ในการสร้างวิเทลโลจินินและเป็นการตอบสนองต่อการกระตุ้นของฮอร์โมนเอสโตรเจน (estrogen) แล้วปลดปล่อยสู่ระบบไหลเวียนโลหิต และต่อมาจะถูกดูดเข้าไปในเซลล์ไข่ที่กำลังพัฒนาโดยขบวนการเอนโดไซโตซิส ปริมาณของ Vtg เพิ่มขึ้นในเพศเมียที่มีความสมบูรณ์เพศ ส่วนเพศผู้แม้จะมียีนสร้าง Vtg แต่ยีนนี้ไม่ได้แสดงออก อย่างไรก็ตามหากได้รับการรบกวนจากสารแอสโตเจน ยีนอาจจะมีการสร้างสาร Vtg ได้เช่นกัน (Flouriot *et al.*, 1995) โดยสารที่รบกวนระบบฮอร์โมนได้แก่ ฮอร์โมนแอสโตเจนจากธรรมชาติ [17b-estradiol (E2), estrone, estriol] และสารเคมีสังเคราะห์ เช่น สาร polychlorinated byphenyls (PCBs) และยาปราบศัตรูพืช (Marin and Matozzo, 2004) Singha and Canariob (2004) ได้เลี้ยงปลาจีด (*Heteropneustes fossilis*) ในน้ำที่มี γ-hexachlorocyclohexane เข้มข้น 0.1, 1.0 และ 10 มก. /ลิตร นาน 4 สัปดาห์ พบว่า ปริมาณ testostosterone (T) และ 11-ketotestosterone (11-KT) ในปลาเพศผู้มีปริมาณลดลง ในขณะที่ปริมาณ 17β-estradiol (E2) ลดลงในปลาเพศเมีย ซึ่งแหล่งที่มาของสารปนเปื้อนเหล่านี้ในแหล่งน้ำ ได้แก่ น้ำทิ้งโรงงานและชุมชน กิจกรรมการเกษตร ของเสียจากฟาร์มเลี้ยงสัตว์ น้ำทิ้งจากระบบบำบัดน้ำเสียชุมชน สารประกอบแอสโตรเจนทำหน้าที่ป้องกันการรวมตัวของฮอร์โมนกับตัวรับฮอร์โมนหรืออาจจะสามารถรวมตัวกับตัวรับฮอร์โมนได้อย่างเหมาะสมแล้วกระตุ้นการทำงานของเอนไซม์ ทำให้เกิดการสร้าง Vtg ในปลาเพศผู้ ในกรณีนี้ทำให้สามารถใช้ปลาเพศผู้เป็นตัวบ่งชี้ในการตรวจสอบการปนเปื้อนของสารพิษในแหล่งน้ำได้เช่นกัน โดยแผนงานในการติดตามตรวจสอบการปนเปื้อนของสารอันตรายในอนาคตจะต้องคำนึงถึงสิ่งต่อไปนี้ (1) ปริมาณ Vtg อาจจะเพิ่มขึ้น

เมื่อสัตว์ได้รับสารพิษหลากหลายชนิดซึ่งจะให้ผลแสดงออกลักษณะเพศเมียเหมือนกัน (2) การใช้เครื่องหมายทางชีวภาพจะต้องมีความสามารถที่จะลดวิธีการการวิเคราะห์ที่ยุ่งยากและต้นทุนสูง วิธีการที่ใช้จะต้องมีความไวและแม่นยำในการตรวจสอบ (3) การเปลี่ยนแปลงของฮอร์โมนเพศ จะมีผลทำให้สัดส่วนระหว่างเพศผู้และเพศเมียมีความแปรปรวน ซึ่งอาจจะทำให้สัตว์บางชนิดสูญพันธุ์ได้




**ภาพที่ 1** การสร้างวิเทลโลจินินและกลไกควบคุม (Browder *et al.*, 1991)

Millsa and Chichester (2005) กล่าวว่า ความเชื่อมโยงระหว่างสารรบกวนการทำงานของฮอร์โมน ความผิดปกติของการทำงานของระบบสืบพันธุ์และผลกระทบทางนิเวศวิทยาในแง่ของความยั่งยืนของประชากรสัตว์น้ำเป็นสิ่งที่ท้าทายสำหรับนักวิจัยเป็นอย่างมาก ในขณะที่ Breitholtz *et al.* (2006) รายงานว่า สิบประเด็นที่มีความจำเป็นในการปรับปรุงวิธีการในการประเมินผลกระทบสิ่งแวดล้อมให้มีประสิทธิภาพสูง ประกอบด้วย (1) สิ่งมีชีวิตที่เป็นตัวแทนในการประเมินที่เหมาะสม (2) การพัฒนาระบบการตรวจสอบที่มีความเกี่ยวข้องกับระบบนิเวศน์ที่สามารถนำไปปรับใช้ได้ทั่วโลกและได้ผลที่ไม่แตกต่างกัน (3) มีการศึกษาที่ครอบคลุมทุกระยะของ

สิ่งมีชีวิตโดยเฉพาะในระยะวิกฤต (4) ขจัดปัญหาในแง่ของความแปรปรวนของพันธุกรรมของกลุ่มประชากรที่นำมาศึกษา (5) เข้าใจถึงกลไกการทำงานของสารพิษเพื่อที่จะนำมาใช้พัฒนาระบบการตรวจสอบที่มีประสิทธิภาพ (6) ศึกษาถึงการรบกวนฮอร์โมนในสัตว์ไม่มีกระดูกสันหลัง เนื่องจากอาจจะมีความแตกต่างอย่างมากกับสัตว์มีกระดูกสันหลัง (7) พัฒนาวิธีการที่เป็นมาตรฐานในการตรวจสอบสารพิษที่ละลายน้ำได้น้อย (8) คำนึงหลักจริยธรรม โดยเฉพาะการลดการใช้สัตว์มาทดสอบทางด้านพิษวิทยาสิ่งแวดล้อม (9) ใช้วิธีการทางสถิติมาช่วยในการประเมินผลกระทบ (10) พัฒนาการประเมินความเสี่ยงผลกระทบสิ่งแวดล้อมเพื่อที่จะนำไปเป็นข้อมูลที่ใช้ในการตัดสินใจในการป้องกันปัญหาและความเสียหายที่อาจจะเกิดขึ้นได้ในอนาคต

## วัตถุประสงค์ของการวิจัย

1. เพื่อศึกษาการใช้ปลาที่อาศัยอยู่ในแหล่งน้ำเป็นดัชนีชีวภาพในการประเมินผลกระทบสิ่งแวดล้อมจากสารป้องกันกำจัดศัตรูพืชทางการเกษตร
2. เพื่อศึกษาสถานภาพทรัพยากรชีวภาพทางน้ำในพื้นที่ลุ่มน้ำจังหวัดเชียงใหม่ อันเป็นข้อมูลเบื้องต้นในการกำหนดพื้นที่ในการใช้ประโยชน์ของพื้นที่ลุ่มน้ำ

## วัน เวลา และสถานที่ทำการวิจัย

ระยะเวลาที่ทำการวิจัย ตั้งแต่เดือนตุลาคม พ.ศ. 2548 – ธันวาคม พ.ศ. 2549

สถานที่ทำการทดลอง คณะเทคโนโลยีการประมงและทรัพยากรทางน้ำ
มหาวิทยาลัยแม่โจ้ อำเภอสันทราย จังหวัดเชียงใหม่

# อุปกรณ์การวิจัยและวิธีการวิจัย

**1) การติดตามตรวจสอบผลของการปนเปื้อนของสารกำจัดศัตรูพืช โดยการตรวจ Vitellogenin ในปลาตัวอย่าง: การทดสอบในห้องปฏิบัติการ**

1.1 ให้ปลาได้รับสารเคมีที่เกษตรกรนิยมใช้ในความเข้มข้นต่าง ๆ กันเป็นเวลา 0 – 96 ชั่วโมง บันทึกพฤติกรรมของปลา สุ่มปลาตัวอย่างเพื่อวัด VTG mRNA จากตับปลา โดยวิธี RT – PCR ซึ่งดัดแปลงมาจาก Fent *et al.* (2000) หาความสัมพันธ์ของ VTG mRNA กับระยะเวลาและความเข้มข้นที่ปลาสัมผัสกับสารนั้น ๆ สร้างแบบจำลองเพื่อเป็นต้นแบบในการศึกษาภาคสนาม

1.2 สกัดอาร์เอ็นเอ (RNA) จากปลาที่อาศัยอยู่ในน้ำที่มีการปนเปื้อนของสารเคมีทางเกษตร (การทดลองในห้องปฏิบัติการ) พร้อมทั้งปรับเปลี่ยนวิธีการเพื่อให้ได้สารสกัดอาร์เอ็นเอมากที่สุด

สกัดอาร์เอ็นเอ (Total RNA) จากตับปลาปลา โดยใช้ TRIZOL® Reagent (Invitrogen life technologies, U.S.A.) และตรวจสอบการแสดงออกของยีน VTG โดยใช้ Reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR) ด้วย One-Step RT-PCR Kit (Qiagen, Inc., U.S.A) ในการแสดงออกของยีนวิทิลโลจินีนจะใช้ยีนเบต้าแอคตินเป็นยีนอ้างอิง โดยไพรเมอร์ที่ใช้แสดงในข้อ 1.3 โดยคาดหวังว่าไพรเมอร์นี้จะทำให้เกิดการเพิ่มปริมาณของดีเอ็นเอ ประมาณ 300 คู่เบส ปฏิกิริยา RT-PCR ประกอบด้วยขั้นตอนดังต่อไปนี้ เริ่มจากอุณหภูมิ 50 $^{o}$C ตามด้วย 95 $^{o}$C นาน 15 นาทีแล้วจึงเข้าสู่กระบวนการ PCR จำนวน 30 รอบ ซึ่งประกอบด้วยการทำให้ดีเอ็นเอต้นแบบที่เป็นสายคู่ (double strand) จะถูกทำให้เป็นสายเดี่ยว (single strand) ที่ความร้อนประมาณ 94 องศาเซลเซียส 1 นาที และ Annealing step ซึ่งขั้นตอนนี้ไพรเมอร์ที่สังเคราะห์ขึ้น จะจับกับดีเอ็นเอต้นแบบที่แยกเป็นสายเดี่ยวทั้งสองเส้นที่เป็นคู่สมกัน โดยใช้อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส นาน 1 นาที จากนั้นตามด้วยExtension step ขั้นตอนนี้จะมีการเติมนิวคลีโอไทด์เพื่อสร้างสายดีเอ็นเอสายคู่จากปลาย 5' ไป 3' ของดีเอ็นเอ โดยอาศัยเอนไซม์ polymerase ที่ทนต่อความร้อน อุณหภูมิที่ 72 องศาเซลเซียส เมื่อครบสามสิบรอบ จะอุ่นที่ 72 องศาเซลเซียสต่อไปอีก 10 นาที จึงสิ้นสุดปฏิกิริยา

1.3 สร้างไพรเมอร์เพื่อที่จะตรวจวัดปริมาณ VTG mRNA จากตับปลาน้ำจืด

**Primer sequence data**

| Gene | Forward primer | Reverse primer |
|---|---|---|
| CYP1A | 5'-gttcgataccgtctctactg-3' | 5'-aggaagcgatctgggttgaag-3' |
| VTG | 5'-ctgaccttcgtggatattgag-3' | 5'-atctgagcctcggcattg-3' |

1.4 ตรวจสอบความแตกต่างของเนื้อเยื่อปลา โลหิตวิทยาและการเปลี่ยนแปลงของดีเอ็นเอ เมื่อปลาได้รับสัมผัสกับสารเคมีทางการเกษตร

**2) ใช้ตัวชี้วัดชนิดอื่นมาประกอบการพิจารณาผลกระทบของสารเคมีทางการเกษตร ตัวอย่าง เช่น การใช้เอนไซม์** Acetylcholinesterase (AChE)

2.1 สัตว์ทดลอง

เตรียมตัวอย่างหอยขมจากบ่อเลี้ยงที่ไม่มีการปนเปื้อนของสารป้องกันและกำจัดศัตรูพืช น้ำหนักเฉลี่ย 6.27 $\pm$ 1.21 กรัม ความยาวเฉลี่ย 2.24 $\pm$ 0.62 เซนติเมตร นำไปวางบริเวณจุดเก็บตัวอย่าง ทั้งหมด 3 จุด โดยทุกจุดเก็บตัวอย่างเป็นพื้นที่ที่มีการเลี้ยงปลานิลดำและปลาทับทิมในกระชัง ระยะเวลาการศึกษาทั้งหมด 96 ชั่วโมง

จุดเก็บตัวอย่างที่ 1 บ้านวังขามป้อม กิ่งอำเภอดอยหล่อ จังหวัดเชียงใหม่

จุดเก็บตัวอย่างที่ 2 วัดวังปลาสร้อย อำเภอฮอด จังหวัดเชียงใหม่

จุดเก็บตัวอย่างที่ 3 บ้านวังผา อำเภอบ้านโฮ่ง จังหวัดลำพูน

2.2 การเก็บตัวอย่างเนื้อเยื่อและวิเคราะห์หาปริมาณเอนไซม์

เก็บตัวยย่างหอยขมจากจุดเก็บตัวอย่างละ 10 ตัว ทำการเก็บตัวอย่างส่วนเท้าซึ่งเป็นส่วนที่สัมผัสกับแหล่งน้ำมากที่สุดเพื่อตรวจสอบ Acetylcholinesterase Enzyme (AChE)

บดตัวอย่างเนื้อเยื่อให้ละเอียดแล้วเติม 0.1 M PBS นำไปปั่นที่ 3,500 rpm 10 นาที เก็บส่วนใสไปวิเคราะห์ปริมาณ AChE Activity ด้วยวิธีการที่รวดเร็ว ซึ่งดัดแปลงจาก Ellman's *et al.* (1961) คำนวณค่า Enzyme activity จากสูตร

Enzyme activity = $(A_{test} - A_{blank})$ x Factor

Factor = Enzyme coefficient (103/13500) x (Total volume/sample volume) x dilution factor x (1/Incubation time)

เปรียบเทียบค่าเฉลี่ยการทำงาน Acetylcholinesterase Enzyme ของหอยขม

**3) การหาปริมาณยาปราบศัตรูพืชและสัตว์ประเภทออร์แกโนคลอรีนและออร์แกโนฟอสเฟตในแม่น้ำปิงตอนบน**

ตรวจหาปริมาณยาปราบศัตรูพืชและสัตว์ประเภทออร์แกโนคลอรีนและออร์แกโนฟอสเฟตในตัวอย่างน้ำและตะกอนดินที่เก็บมาจากแม่น้ำปิงตอนบน โดยวิธีแก๊สลิควิดโครมาโทกราฟี เลือกเก็บตัวอย่างทั้งหมด 4 สถานี ในฤดูฝน (เดือนสิงหาคม 2549) พบว่า ตรวจไม่พบสารปราบศัตรูพืชกลุ่มออร์กาโนคลอรีน $\alpha$-BHC, $\beta$-BHC, $\gamma$-BHC, $\delta$-BHC, เฮพตาคลอร์ (HEPTACHLOR), เฮพ

ตาคลอร์อีพอกไซด์ (HEPTACHLOR EPOXIDE), อัลดริน (ALDRIN), เอนโดซัลแฟน (ENDOSULFAN), p,p-DDE, ดีลดริน (DIELDRIN), เอนดริน (ENDRIN), p,p-DDD และ p,p-DDT ในตัวอย่างดินและน้ำ รวมทั้งตรวจไม่พบสารปราบศัตรูพืชกลุ่มออร์กาโนฟอสเฟต คือ เมทามิโดฟอส (METHAMIDOPHOS) โมโนโครโทฟอส (MONOCROTOPHOS) คลอร์ไพริฟอส (CHLORPYRIFOS) โพรฟิโนฟอส (PROFENOFOS) ไตรอะโซฟอส (TRIAZOPHOS) โฟซาโลน (PHOSALONE) ไดเมโทเอต (DIMETHOATE) เมทิลพาราไทออน (METHYL PARATHION) เมวินฟอส (MEVINPHOS) มาลาไทออน (MALATHION) อีโทโพรฟอส (ETHOPROPHOS) เมทิดาไทออน (METHIDATHION) และ EPN ดังนั้นจะมีการตรวจสอบปริมาณยาปราบศัตรูพืชดังกล่าวเพิ่มเติมในฤดูหนาวและฤดูร้อน รวมทั้งมีการศึกษาการตกค้างของสารดังกล่าวในห่วงโซ่อาหารอีกด้วย (ข้อมูลแสดงในภาคผนวก)

# ผลการวิจัย

**1. ปริมาณเม็ดเลือดแดงอัดแน่น (%packed cell volume: PCV) หรือ ฮีมาโตคริต (%Hematocrit)**

ปลาตะเพียนขาวที่สัมผัสสารกำจัดหอยแอสไปรส์ 40 มิลลิกรัมต่อลิตรและสารกำจัดแมลงเฟมวอส (ไดคลอร์วอส) 16 พีพีเอ็ม นาน 24 ชั่วโมงมีปริมาณเม็ดเลือดแดงอัดแน่นลดลง (ตารางที่ 1)

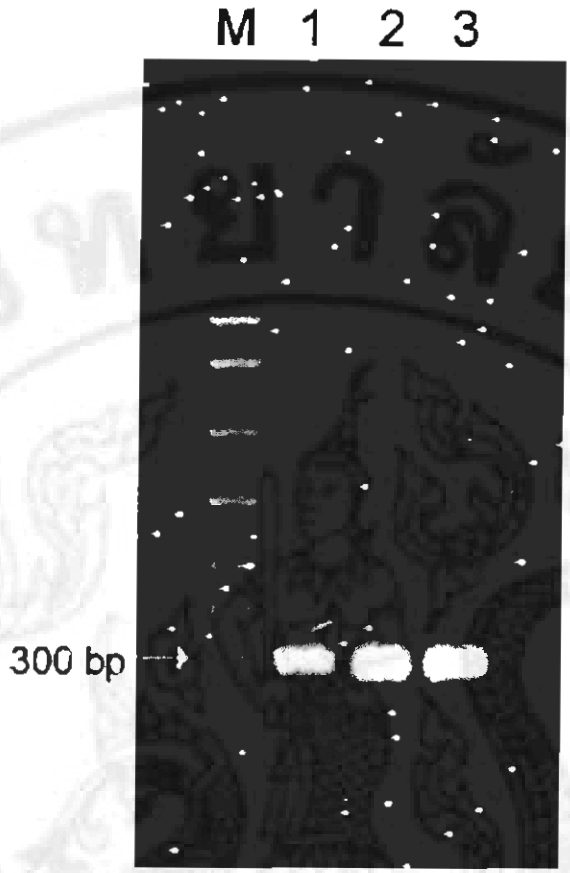
**ตารางที่** 1 ปริมาณเม็ดเลือดแดงอัดแน่น (%PCV) ของปลาตะเพียนขาวหลังจากแช่ในสารกำจัดหอยแอสไปรส์และสารกำจัดแมลงเฟมวอส (ไดคลอร์วอส)

| สารกำจัดศัตรูพืช | %PCV |
|---|---|
| น้ำ (ชุดควบคุม) | 55.46 ± 3.72 |
| สารกำจัดหอยแอสไปรส์ | 51.10 ± 8.04 |
| สารกำจัดแมลงเฟมวอส (ไดคลอร์วอส) | 40.17 ± 4.17 |

**2. การตรวจสอบวิเทลโลจินินจากตับปลาที่แช่ในยาปราบศัตรูพืช**

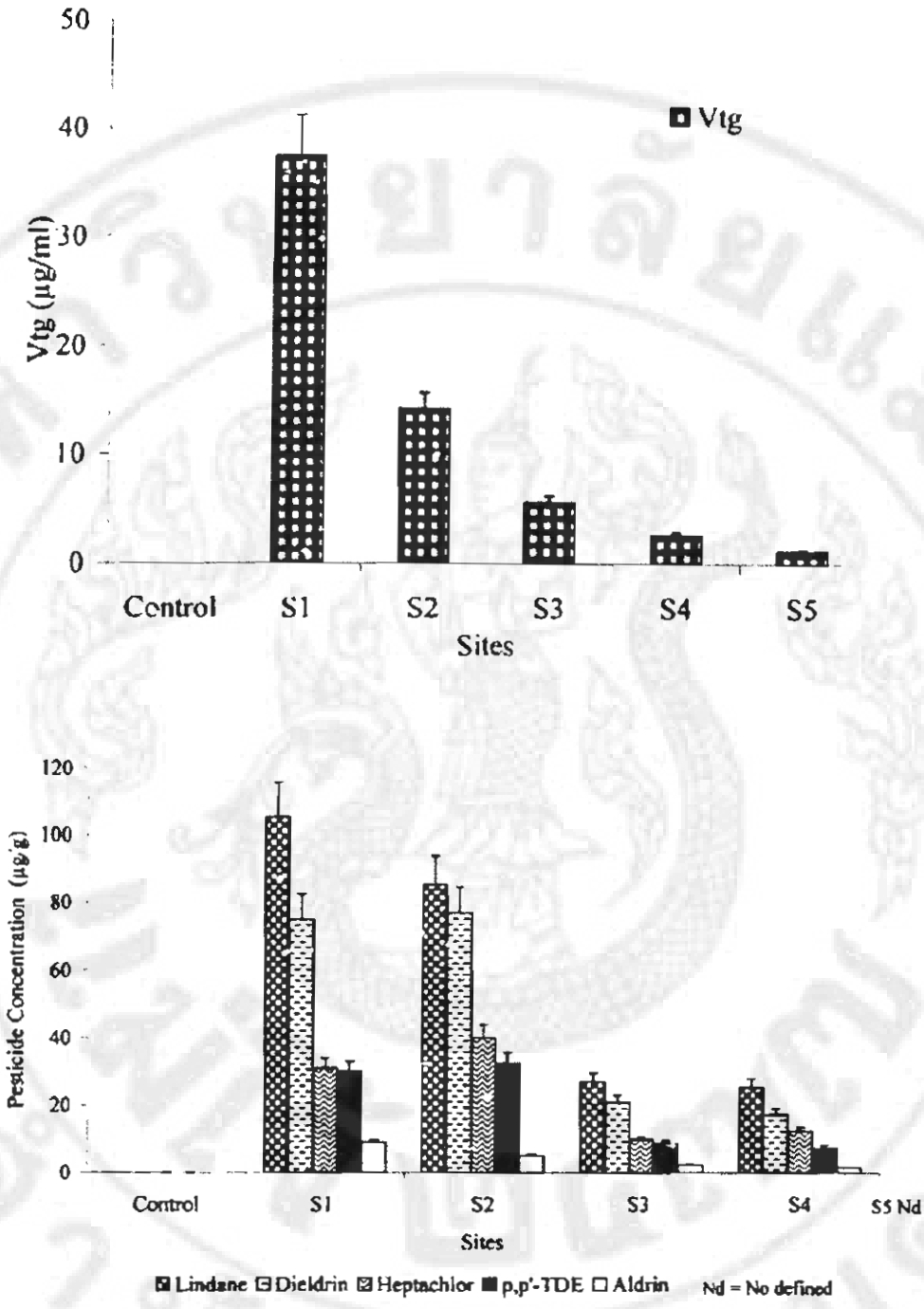
จากการทดลองยังไม่สามารถตรวจหายีนที่ควบคุมการสังเคราะห์วิเทลโลจินิน เพื่อเป็นเครื่องหมายทางชีวภาพในปลาน้ำจืด เพื่อใช้ตรวจวัดการสัมผัสสารกำจัดศัตรูพืช โดยสมมุติฐานที่ตั้งไว้ คือ สารกำจัดศัตรูพืชจะทำให้การแสดงออกของยีนวิเทลโลจินินแตกต่างกันไป การทดลองเริ่มจากการหายีนวิเทลโลจินิน ด้วยวิธี RT-PCR โดยการสร้าง cDNA จาก RNA ที่สกัดจากตับปลา ด้วย degenerate primers ที่ออกแบบจากบริเวณ conserve ของยีนวิเทลโลจินินที่มีรายงานในปลาสปีชีส์ต่าง ๆ จากนั้นจึงสร้าง specific primers เพื่อใช้ในการหาการเปลี่ยนแปลงของการแสดงออกของยีน อย่างไรก็ตามเมื่อตรวจสอบปลาที่สัมผัสกับสารปราบศัตรูพืชที่ความเข้มข้นต่าง ๆ ยังไม่สามารถหายีนดังกล่าวได้

Canapa *et al.* (2002) ได้ศึกษาการเพิ่ม Vitellogenin fragments โดยวิธี RT-PCR จากอาร์เอ็นเอที่สกัดจากตับปลาเพศเมีย (ภาพที่ 2)




**ภาพที่** 2 Vitellogenin fragments ที่ได้จาก RT-PCR จากอาร์เอ็นเอที่สกัดจากตับปลาเพศเมีย M, molecular marker (50–2000 bp ladder); (1) *Mugil cephalus*; (2) *Mullus barbatus*; (3) *Thunnus thynnus* (Canapa *et al.* 2002)

Okoumassoun *et al.* (2002) รายงานให้เห็นถึงความแตกต่างของปริมาณ Vtg ในปลาที่อาศัยอยู่ในแหล่งน้ำที่ปนเปื้อนยาปราบศัตรูพืชกลุ่มออร์กาโนคลอรีน และจากการตรวจสอบของนักวิจัยกลุ่มนี้พบว่า มีการปนเปื้อนของสารเคมีดังกล่าวในแหล่งน้ำ เขาได้ตั้งข้อสังเกตว่าการบริโภคปลาในแม่น้ำ Ouémé ประเทศเบนิน อาจจะทำให้เกิดการสะสมของสารพิษในร่างกายผู้บริโภคและอาจส่งผลเสียต่อระบบฮอร์โมนในร่างกายได้ (ภาพที่ 3)




**ภาพที่** 3 ปริมาณวิเทลโลจินิน (Vtg) ในเลือดปลาเพศผู้ที่จับจากแม่น้ำ Oueme จากจุดเก็บตัวอย่าง S1, S2, S3, S4 และ S5 โดยเก็บตัวอย่างปลาจุดละ 10 ตัว (ภาพบน) ปริมาณสารปราบศัตรูพืชในเนื้อปลานิล (ภาพล่าง) (Okoumassoun *et al.*, 2002)

3. **การยับยั้งทำงานของเอนไซม์** Acetylcholinesterase **ในหอยขม** เพื่อใช้เปรียบเทียบพื้นที่ที่ได้รับผลกระทบจากสารป้องกันและกำจัดศัตรูพืชที่ปนเปื้อนในแม่น้ำปิง บริเวณพื้นที่เขตกิ่งอำเภอดอยหล่อและอำเภอฮอด จังหวัดเชียงใหม่

การยับยั้งทำงานของเอนไซม์ Acetylcholinesterase (AChE) ของหอยขมที่จุ่มในน้ำที่คาดว่ามีการปนเปื้อนของสารปราบศัตรูพืช แสดงในตารางที่ 2 หอยขมชุดควบคุมที่นำมาเลี้ยงในห้องปฏิบัติการมีค่าของการทำงานของเอนไซม์อะซิติลคลอรีนเอสเตอเรสที่สูงกว่าชุดที่นำไปจุ่มในแม่น้ำปิงช่วงฤดูฝน (9.47 เปรียบเทียบกับ 1.04 – 1.60 μmole/min/g tissue ตามลำดับ) อย่างไรก็ตามปัจจัยสิ่งแวดล้อมอาจจะมีผลต่อเอนไซม์และการทำงานของเอนไซม์ดังกล่าว ดังนั้นในงานวิจัยนี้จึงศึกษาถึงผลของฤดูกาลต่อการทำงานของเอนไซม์ด้วย จากการศึกษาพบว่า การทำงานของเอนไซม์จะมีความสัมพันธ์โดยตรงกับอุณหภูมิน้ำ โดยการทำงานของเอนไซม์อะซิติลคลอรีนเอสเตอเรสของหอยขมในหน้าหนาวมีค่าต่ำที่สุด ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยของ Abdel-Halim *et al.* (2006) ซึ่งชี้ว่า เอนไซม์อะซิติลคลอรีนเอสเตอเรสที่สกัดจากสมองและตับปลานิลในฤดูหนาวจะมีค่าต่ำกว่าในฤดูใบไม้ผลิและฤดูใบไม้ร่วง อย่างไรก็ตามงานทดลองของเราจะขัดแย้งกับงานวิจัยของ Pfeifer *et al.* (2005) ที่รายงานว่า เอนไซม์อะซิติลคลอรีนเอสเตอเรสมีค่าสูงสุดในหน้าร้อน

**ตารางที่ 2** Season variation in activities of acetylcholinesterase of river snail samples dipped in the Upper Ping River

| Station | AChE Activity (Mean ± SD; μmole/min/g tissue) | | |
|---|---|---|---|
| | rainy season | winter season | summer season |
| Control (Lab) | 9.4740 ± 2.7968 | 10.2585 ± 1.7756 | 4.8395 ± 1.4822 |
| Wangkhampom | 1.0450 ± 0.0367 | 0.0030 ± 0.0092 | 1.3053 ± 0.4078 |
| Wangpha | 1.0428 ± 0.0074 | 0.0011 ± 0.0030 | 0.3212 ± 0.2541 |
| Wangplasoi | 1.6002 ± 0.0051 | 0.0012 ± 0.0025 | 0.4888 ± 0.3584 |
| Water temperature | 25.39 ± 0.98 | 22.82 ± 0.55 | 33.36 ± 1.26 |

**4. ปริมาณยาปราบศัตรูพืชและสัตว์ที่ปนเปื้อนในแม่น้ำปิงตอนบน**

ปริมาณยาปราบศัตรูพืชและสัตว์ประเภทออร์แกโนคลอรีนในตัวอย่างน้ำที่เก็บมาจากแม่น้ำปิง ในปี 2548 – 2549 (ตารางที่ 3) โดยข้อมูลที่ได้รับการอนุเคราะห์จากกลุ่มระบบฐานข้อมูลคุณภาพแหล่งน้ำผิวดิน สำนักจัดการคุณภาพน้ำ กรมควบคุมมลพิษ (http://iwis.pcd.go.th/IWIS/index.php)

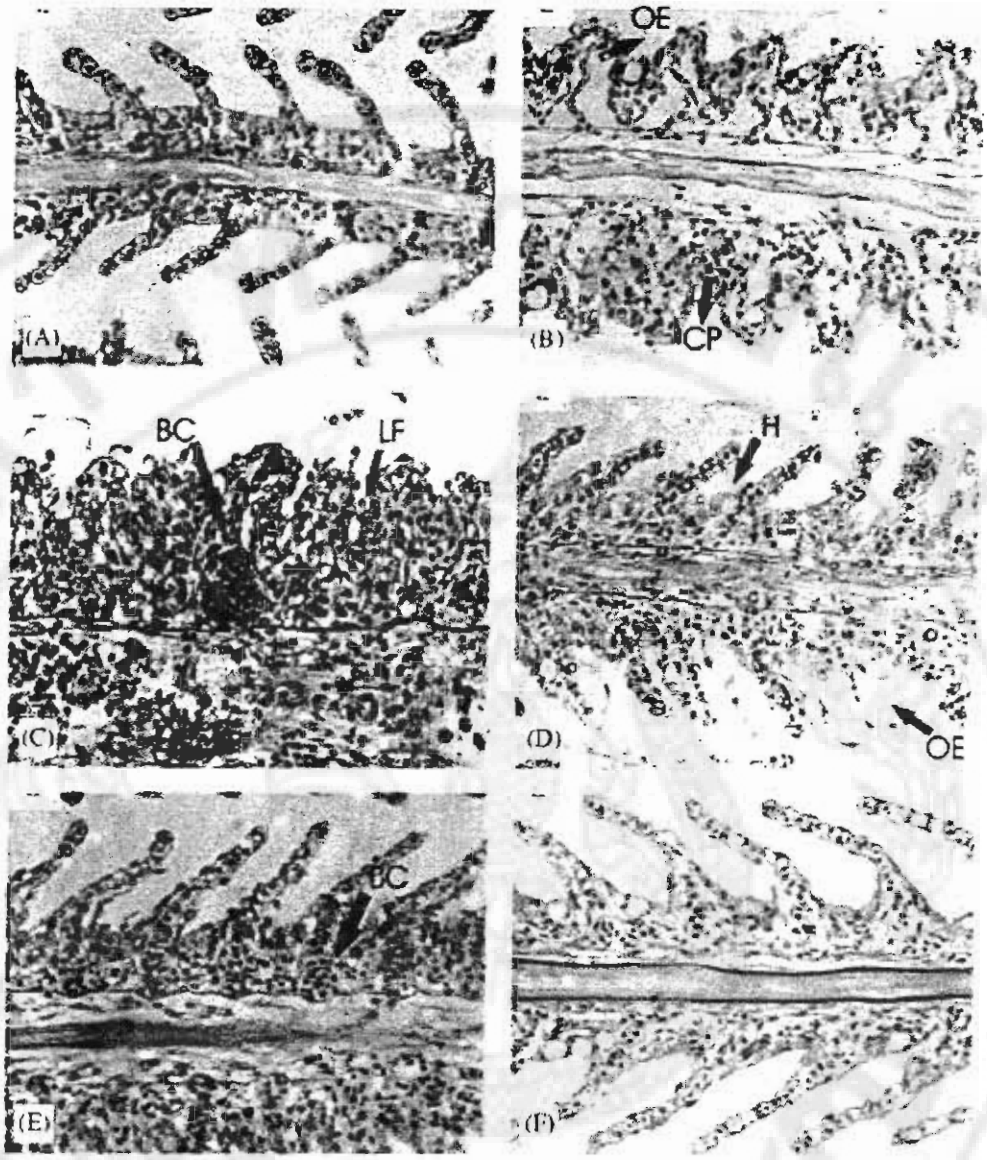
Table 3 ปริมาณยาปราบศัตรูพืชและสัตว์ประเภทออร์แกโนคลอรีนในตัวอย่างน้ำที่เก็บมาจากแม่น้ำปิง ในปี 2548 – 2549 (http://iwis.pcd.go.th/IWIS/index.php)

| ปี | Heptachlor (ug/l) | alpha-BHC (ug/l) | Aldrin (ug/l) | Heptachlor-epoxide (ug/l) | Dieldrin (ug/l) | Endrin (ug/l) | p,p'-DDT (ug/l) | p,p'-DDD (ug/l) | p,p'-DDE (ug/l) | delta-BHC (ug/l) | gamma-BHC (ug/l) | Endosulfan Sulfate (ug/l) |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| 2548 | - | 0.01 | 0.01 | 0.01 | 0.01 | 0.01 | 0.01 | - | 0.01 | 0.01 | - | 0.02 |
| 2549 | 0.01 | 0.01 | 0.01 | 0.01 | 0.01 | 0.01 | 0.01 | 0.01 | 0.01 | 0.01 | 0.01 | 0.01 |

**5. การเปลี่ยนแปลงของเนื้อเยื่อปลาในแหล่งน้ำที่มีการปนเปื้อนของสารปราบศัตรูพืช**

การเปลี่ยนแปลงจุลกายวิภาคศาสตร์ของเนื้อเยื่อ (histological changes) ของปลา เป็นตัวบ่งชี้ว่าปลาได้สัมผัสสารพิษเป็นเวลานาน โดยเฉพาะบริเวณเหงือกปลาซึ่งว่าเป็นอวัยวะที่ไวและสัมผัสกับสิ่งแวดล้อมโดยตรง ส่วนไตทำหน้าที่สำคัญในการรักษาสมดุลของน้ำและเกลือแร่ในขณะที่ตับทำหน้าที่เก็บสะสมสารอาหาร เปลี่ยนสภาพและขจัดสารพิษออกจากร่างกาย อวัยวะต่าง ๆ เหล่านี้ถือว่าเป็นตัวบ่งชี้สำคัญว่า ปลาได้รับสารพิษหรือไม่

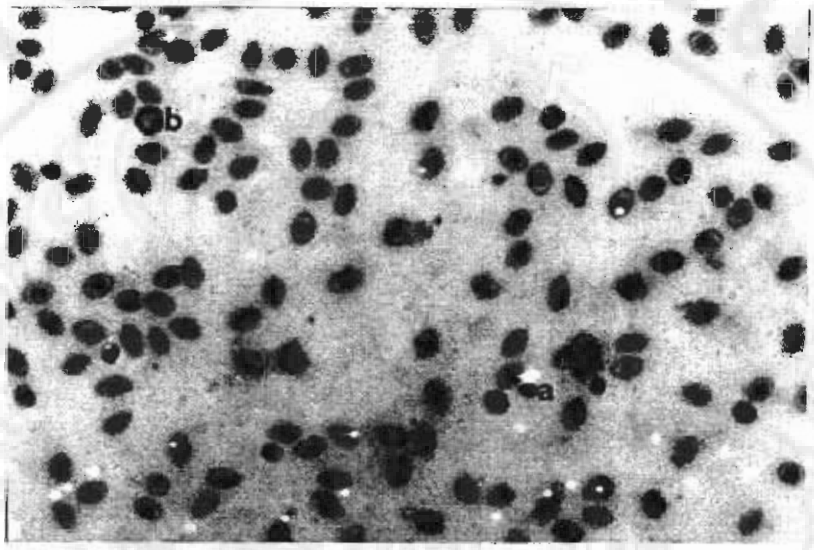
หลังจากปลานิลได้สัมผัสกับไตรคลอฟอน (trichlorfon) นาน 4, 8 และ 24 ชั่วโมงจะสามารถสังเกตเห็นการเปลี่ยนแปลงของเนื้อเยื่อของเหงือก โดยหลังจาก 4 ชั่วโมงผ่านไป ปลาจำนวน 75% พบการเปลี่ยนแปลงในเหงือกคือ เซลล์ฟิลาเมนต์มีจำนวนเพิ่มขึ้นมากผิดปกติ มีการรวมตัวกัน ของ secondary lamellae และมีการบวมน้ำ (edema) ในบริเวณดังกล่าว (ภาพที่ 4B) โดยพบการรวมตัวกันของเซลล์และการเพิ่มจำนวนของเซลล์ในปลากลุ่มทดลองให้สัมผัสกับสารปราบศัตรูพืชมีค่ามากกว่า กลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญ ($P<0.05$) (Guimarães *et al.*, 2007)




**ภาพที่** 4 รูปตัดตามยาว (Longitudinal section) ของ secondary gill lamellae ของปลานิล (HE, bar=20 μm): (A) ชุดควบคุมจากน้ำสะอาด, (B–F) เหงือกจากปลาที่สัมผัสกับน้ำที่ปนเปื้อนไตรคลอฟอน, (B) หลังจากปลาสัมผัสสารเคมี 4 ชั่วโมง, (C) หลังจากปลาสัมผัสสารเคมี 8 ชั่วโมง, (D) หลังจากปลาสัมผัสสารเคมี 48 ชั่วโมง 48, (E) หลังจากปลาสัมผัสสารเคมี 72 ชั่วโมง, (F) หลังจากปลาสัมผัสสารเคมี 96 ชั่วโมง; OE, edema (การบวมน้ำ); CP, cell proliferation (การเพิ่มจำนวนของเซลล์) ; BC, blood congestion (เลือดคั่ง); LF, lamellar fusion (การหลอมรวมตัวกันของซี่เหงือก); H, hypertrophy cell (เซลล์ที่โตผิดปกติ)

จากการตรวจสอบการปนเปื้อนของสารพิษในตะกอนดินบริเวณอ่าวรอยต่อระหว่างเมกซิโกและเบลิซ (Belize) โดยการสกัดสารพิษจากตะกอนดินซึ่งเป็นกลุ่มสารประกอบศัตรูพืชออร์กาโนคลอรีน โพลีคลอลิเนตเทตไบฟีนิลหรือพีซีบี (polychlorinated biphenyls: PCBs) และ

สารพอลินิวเคลียร์อะโรแมติกไฮโดรคาร์บอน (พีเอเอช) (polynuclear aromatic hydrocarbons :PAHs) แล้วฉีดเข้าช่องท้องปลานิล จากนั้นจึงตรวจผลทางโลหิตวิทยา พบว่า มีการผิดปกติของเซลล์เม็ดเลือดขาว (ภาพที่ 5) และพบว่า ปริมาณของเม็ดเลือดขาวปลาได้เพิ่มขึ้นประมาณ 1.6 – 2.4 เท่า (Zapata-Pérez *et al.*, 2000)




**ภาพที่** 5 เม็ดเลือดขาว (Leukocytes) จากปลานิลที่สัมผัสกับตะกอนที่สกัดจาก Bahía de Chetumal ประเทศเมกซิโก แสดงให้เห็นถึงเซลล์ที่มีนิวเคลียส 2 อัน (binucleated cells, a) และเซลล์ (cell degeneration, b) (Zapata-Pérez *et al.*, 2000)

# วิจารณ์และสรุปผลการวิจัย

เป็นการยากที่จะศึกษาหาสาเหตุที่แท้จริงว่า ความผิดปกติของระบบสืบพันธุ์ของสัตว์น้ำมีผลมาจากสารเคมีทางการเกษตรที่ปนเปื้อนหรือสารเคมีอย่างอื่นกันแน่ วิธีการในการป้องกันอันตรายที่เกิดจากการใช้สารเคมีทางการเกษตรหรือการปนเปื้อนของสารเคมีลงสู่สิ่งแวดล้อมยังไม่ได้คำนึงถึงผลกระทบที่มีต่อระบบสืบพันธุ์ของสิ่งมีชีวิตมากนัก รวมทั้งในการวิจัยในห้องปฏิบัติการมักจะทดสอบในความเข้มข้นที่สูงกว่าปริมาณที่พบปนเปื้อนในแหล่งน้ำธรรมชาติมาก อาจจะเนื่องจากศักยภาพหรือขีดจำกัดของเครื่องมือที่ใช้ในการตรวจสอบปริมาณของสารเคมีที่ต้องการตรวจ

Van der Oost (2003) รายงานว่า การใช้ปลาเป็นเครื่องหมายในการสะสมทางชีวภาพจะช่วยประเมินการปนเปื้อนของสารพิษในแหล่งน้ำ เนื่องจากปลาจะสัมผัสกับสารปนเปื้อนในแหล่งน้ำตลอดเวลา อย่างไรก็ตามเป็นการยากที่จะคาดเดาการเปลี่ยนแปลงของสารปนเปื้อนเพียงชนิดเดียวในสิ่งแวดล้อม จึงต้องคำนึงถึงความซับซ้อนของการสะสมสารพิษ ไม่ว่าจะเป็นจลนศาสตร์ของพิษวิทยา (toxicokinetic) การเปลี่ยนแปลงซึ่งเกิดในร่างกายทำให้อาหารกลายเป็นกำลังและเนื้อหนัง (metabolism) ปัจจัยที่มีผลต่อการสะสมสารปนเปื้อนในดินตะกอนและในสิ่งมีชีวิต (biota-sediment accumulation factors: BSAFs) ความจำเพาะของเนื้อเยื่อเป้าหมายในการสะสมสารปนเปื้อนและกาก เนื่องจากเป็นการยากที่จะคาดเดาการสะสมสารปนเปื้อนในปลาอย่างถูกต้องแม้ว่าจะใช้แบบจำลองสมัยใหม่ ดังนั้นการวิเคราะห์สารตกค้างในระดับเนื้อเยื่อยังเป็นสิ่งจำเป็น การใช้ปลาเป็นตัวบ่งชี้ในการสะสมทางชีวภาพที่ดีคือการศึกษาการสะสมของสารอินทรีย์ที่เป็นมลพิษที่สลายตัวยาก เช่น สารประกอบ PCBs และ DDTs ส่วนสารประกอบที่สลายตัวได้ง่าย เช่น PAHs และ chlorinated phenols มีแนวโน้มที่จะไม่มีการสะสมในเนื้อเยื่อปลา ในการประเมินการสัมผัสกับสารมลพิษหรือผลของสารปนเปื้อนในสิ่งแวดล้อมที่มีต่อระบบนิเวศวิทยาทางน้ำ เครื่องหมายทางชีวภาพในปลาเหล่านี้อาจจะมีความเหมาะสมในการใช้ตรวจสอบ ได้แก่ เอนไซม์ต่าง ๆ เป็นต้นว่า biotransformation enzymes (phase I and II), oxidative stress parameters, biotransformation products, stress proteins, metallothioneins (MTs), MXR proteins, ค่าทางโลหิตวิทยา (hematological parameters) ค่าต่าง ๆ เกี่ยวกับระบบภูมิคุ้มกัน (immunological parameters) ตัวแปรที่เกี่ยวกับฮอร์โมนและระบบสืบพันธุ์ (reproductive and endocrine parameters) ตัวบ่งชี้ด้านความเป็นพิษต่อระบบพันธุกรรม (genotoxic parameters) ตัวแปรด้านระบบประสาท (neuromuscular parameters)

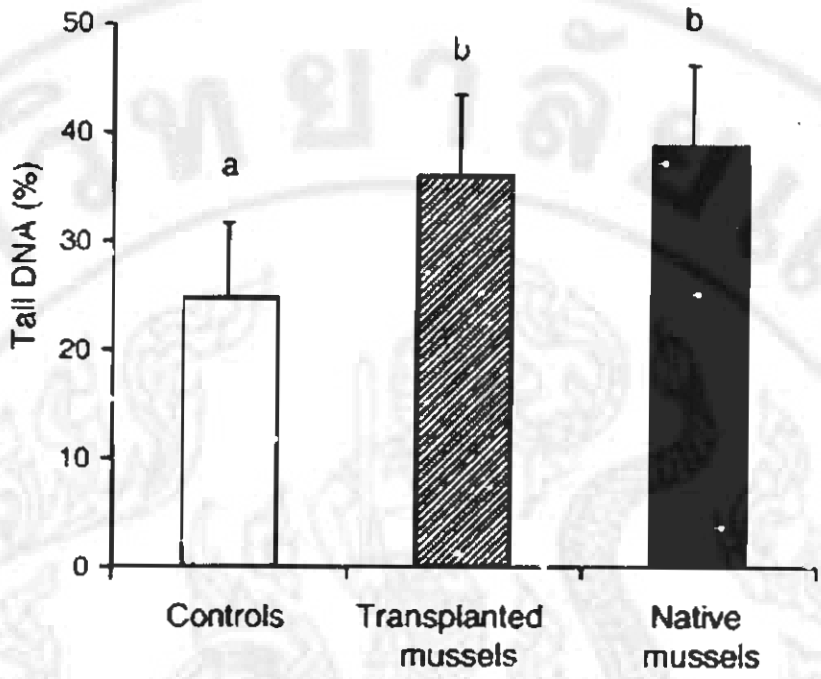
ตัวแปรด้านสรีรวิทยา จุลกายภาควิทยาและสัณฐานวิทยาที่เปลี่ยนแปลงไป (physiological, histological and morphological parameters) การใช้ปลาเป็นเครื่องหมายทางชีวภาพในการประเมินความเสี่ยงของสารพิษที่มีต่อสิ่งแวดล้อม สามารถจำแนกได้ดังนี้ phase I enzymes (e.g. hepatic EROD and CYP1A), biotransformation products (e.g. biliary PAH metabolites), reproductive parameters (e.g. plasma VTG) และ genotoxic parameters (e.g. hepatic DNA adducts) การใช้วิธีการทางชีวภาพในการประเมินและควบคุมการปนเปื้อนของสารพิษมีข้อดีกว่าการตรวจสอบโดยวิธีการทางเคมี เพราะวิธีการนี้สามารถประเมินผลร่วมกันของกระบวนการต่าง ๆ ภายในกลุ่มสิ่งมีชีวิต การสะสมของสารในอวัยวะเป้าหมายและความเป็นพิษที่แท้จริง อย่างไรก็ตาม ข้อจำกัดในการติดตามตรวจสอบสารปนเปื้อนโดยวิธีการทางชีวภาพก็คือตัวแปรที่อาจจะทำให้เกิดความสับสนที่ไม่ได้เกี่ยวข้องกับตัวสารมลพิษ ซึ่งจะต้องมีการพิจารณาอย่างรอบคอบ

Nigro *et al.* (2006) ได้แนะนำให้ใช้หอยแมลงภู่ที่พบในแหล่งน้ำ (native mussel) และหอยที่นำไปวางในบริเวณที่จะตรวจสอบสารพิษนาน 1 เดือน (1 month transplanted mussel) ควบคู่กันไปเพื่อทดสอบความเป็นพิษทางพันธุกรรม (genotoxic effect) โดยการประเมินจากการแตกหักของขั้นสายของดีเอ็นเอ (strand breaks) ด้วยวิธี single cell gel electrophoresis (หรือ Comet assay) ซึ่งจากการประเมินผลแสดงให้เห็นถึงการแตกหักของดีเอ็นเอ (ภาพที่ 6) อย่างไรก็ตามปัจจัยที่ก่อให้เกิดผลดังกล่าวนี้อาจจะมีหลายปัจจัยร่วมกันก็ได้

Petri *et al.* (2006) ได้ทดลองให้อาหารที่ปนเปื้อนเอนโดซัลแฟนแก่ปลาแซลมอน ในระดับที่สหภาพยุโรปกำหนด (5 μg/kg) และในระดับที่เพิ่มขึ้น 10 กับ 100 เท่า นาน 49 วัน ไม่พบปลาตาย แต่พบว่าปริมาณฮีมาโตไซคริตเพิ่มขึ้นหลังจากได้รับสารเคมีดังกล่าวในเวลา 14 และ 35 วัน แต่ปริมาณฮีมาโตไซคริตจะลดลงในวันที่ 49

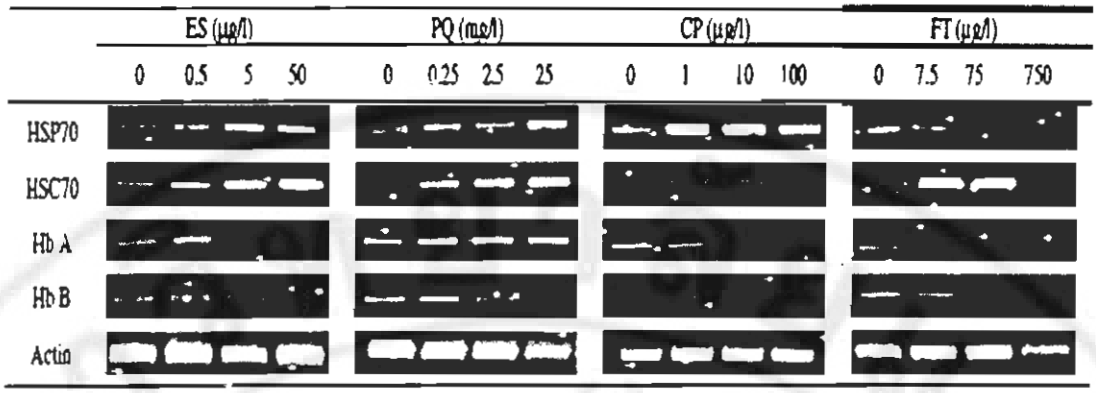
จากรายงานของสถาบันป้องกันสิ่งแวดล้อมสหรัฐอเมริกา กล่าวว่า การที่เอนไซม์อะซิติลโคลินเอสเตอเรสถูกยับยั้งในปริมาณ 20% หรือสูงกว่าแสดงให้เห็นว่า สัตว์ชนิดนั้นมีการปนเปื้อนหรือได้รับสัมผัสกับสารประกอบศัตรูพืชกลุ่มออการ์โนฟอสเฟต แม้ว่าสัตว์น้ำบางชนิดสามารถอาศัยอยู่ได้เมื่อเอนไซม์นี้ถูกยับยั้งมากกว่า 50% ดังจะเห็นได้จากปลานิลที่สัมผัสกับไตรคลอฟอนมีการทำงานของเอนไซม์อะซิติลคลอรินเอสเตอเรสสูงถึง 85% ก็ยังสามารถดำรงชีพอยู่ได้ (Guimaraes *et al.* in press) นอกจากนั้นปลาแรนโบว์เทร้าต์ (*Melanotaenia duboulayi*) ได้รับสาร profenofos ทำให้การทำงานของเอนไซม์นี้ลดลงถึง 70% ซึ่งมีผลทำให้การกินอาหารของปลาลดลง อันทำให้การเจริญของปลาลดลงด้วย (Kumar and Chapman, 1998)

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยแม่โจ้



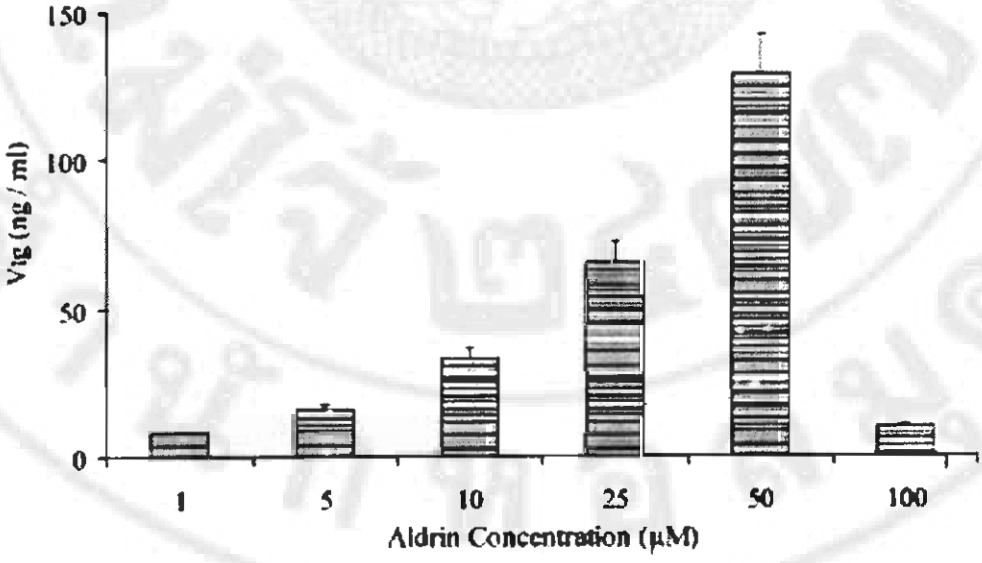

**ภาพที่** 6 ความสมบูรณ์ของดีเอ็นเอ (DNA integrity) ที่ทดสอบจากการเคลื่อนที่ของดีเอ็นเอผ่านสนามกระแสไฟฟ้า (electrophoretic DNA migration; %tail DNA) ที่สกัดจากเซลล์เหงือกหอยแมลงภู่ในป่ากแม่น้ำ Cecina ประเทศอิตาลี (ตัวอักษรภาษาอังกฤษที่แตกต่างกันแสดงความแตกต่างของค่าเฉลี่ยอย่างมีนัยสำคัญ ($P < 0.01$) (Nigro *et al.*, 2006)

นอกจากปลาและหอยที่มักจะถูกนำมาใช้เป็นตัวบ่งชี้ สัตว์ไม่มีกระดูกสันหลังที่อาศัยอยู่ในน้ำและดินอีกหลายชนิดที่สามารถนำมาใช้เป็นตัวบ่งชี้ของการปนเปื้อนสารพิษในแหล่งน้ำ เช่น Lee *et al.* (2006) ได้ใช้การแสดงออกของยีน heat shock proteins (HSPs) และยีน hemoglobins (Hbs) ในตัวอ่อนของริ้น (aquatic midge, *Chironomus tentans*) โดยพบว่าการแสดงออกของยีนนี้จะไวมาก เมื่อสัตว์พวกนี้สัมผัสกับน้ำที่มาการปนเปื้อนของสารปราบศัตรูพืช การแสดงออกของยีนดังกล่าวจะลดลง

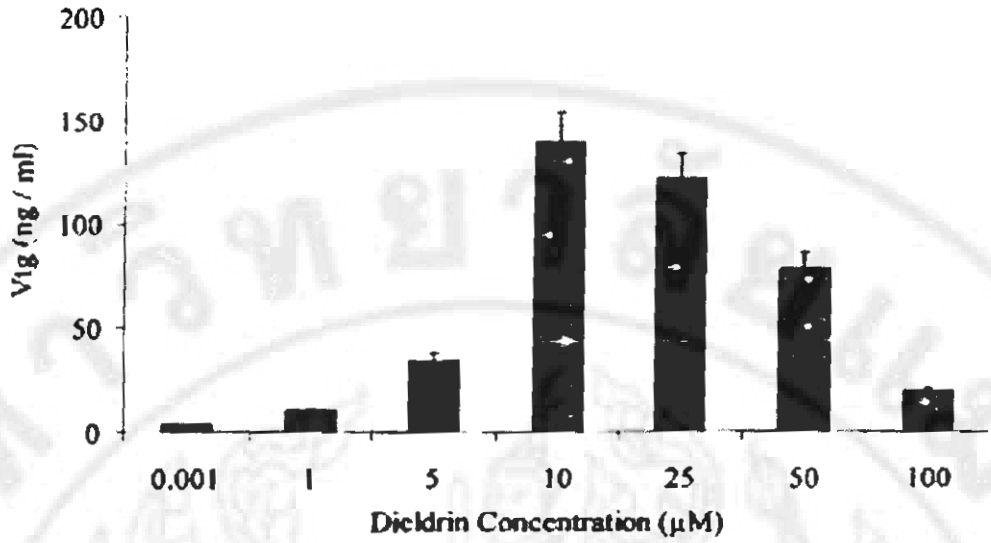



**ภาพที่** 7 การแสดงออกของ HSP และ Hb mRNA in the fourth instar larvae of *C. tentans* ที่สัมผัสกับสารปราบศัตรูพืชนาน 24 ชั่วโมง [endosulfan (ES); paraquat dichloride (PQ); chloropyriphos (CP); fenitrothion (FT)] (Lee *et al.*, 2006)

Okoumassoun *et al.* (2002) รายงานว่า เซลล์ตับปลาเทร้าต์สัมผัสกับแอนดริน (aldrin) จะมีปริมาณ Vtg เพิ่มสูงขึ้นตามลำดับความเข้มข้นของสารที่สัมผัส แต่การตอบสนองนี้จะลดลงอย่างมากในเซลล์ที่สัมผัสกับสารเคมี 100 μM (ภาพที่ 8) ซึ่งปรากฏนี้เหมือนกับเซลล์ตับปลาที่สัมผัสกับแดนดริน (dieldrin) (ภาพที่ 9)




**ภาพที่** 8 Vtg ในเซลล์ตับของปลาแรนโบว์เทร้าต์ที่สัมผัส aldrin นาน 5 วัน (Okoumassoun *et al.*, 2002)




**ภาพที่** 9 Vtg ในเซลล์ตับของปลาแรนโบว์เทร้าต์ที่สัมผัส Dieldrin นาน 5 วัน (Okoumassoun *et al.*, 2002)

เราสามารถใช้ปลาและหอยขมเพื่อตรวจสอบการปนเปื้อนของสารเคมีทางการเกษตรในแหล่งน้ำได้ โดยดูจากเอนไซม์อะซิติลโคลินเอสเตอเรสที่ลดลง การเปลี่ยนแปลงของเนื้อเยื่อ เม็ดเลือด ความผิดปกติของดีเอ็นเอและเอนไซม์ชนิดต่าง ๆ ปรากฏการณ์นี้มีประโยชน์ในแง่ของการใช้เป็นสัญญาณเตือนเบื้องต้นที่มีราคาประหยัด เหมาะสำหรับนำไปใช้ในพื้นที่ที่ขาดเครื่องมือราคาแพง อย่างไรก็ตามผลของอุณหภูมิและปัจจัยสิ่งแวดล้อมอื่น ๆ ควรนำมาพิจารณาประกอบด้วยเมื่อใช้เอนไซม์ที่เป็นเครื่องมือตรวจวัดทางชีวภาพ

# เอกสารอ้างอิง


Bayley, M., M. Junge, and E. Baatrup. 2002. Exposure of juvenile guppies to three antiandrogens causes demasculinization and a reduced sperm count in adult males. Aquatic Toxicology 56: 227 – 239.

Breitholtz, M., C. Ruden, S.O. Hansson, and B. Bengtsson. 2006. Ten challenges for improved ecotoxicological testing in environmental risk assessment. Ecotoxicology and Environmental Safety 63: 324 – 335.

Browder, L.W., Erickson C.A., and Jeffery, W.R., 1991. Oogenesis. In: Developmental Biology, 3rd ed. Saunders College Publishing, USA, pp. 55 – 115.

Canapa, A., M. Barucca, A. Celeste, E. Olmo, and F. Regoli. 2002. Preliminary investigations on vitellogenin mRNA induction in some bioindicator Mediterranean fish species. Marine Environmental Research 54: 673 – 677.

Fernandez-Vega, C., E. Sancho, M.D. Ferrando, and E. Andreu. 2002. Thiobencarb-Induced Changes in Acetylcholinesterase Activity of the Fish, *Anguilla anguilla*. Pesticide Biochemistry and Physiology 72: 55-63.

Flouriot, G., Pakdel, F., Ducouret. B., and Valotaire, Y. 1995. Influence of xenobiotics on rainbow trout liver estrogen receptor and vitellogenin gene expression. Journal of Molecular Endocrinology 15: 143 – 151.

Gill, T.A. 2001. Pesticides poisoning villages in Thailand. Asheville Global Report No. 14. http://www.agrnews.org/issues/140/environment.html.

Guimarães, A.T.B., H.C. Silva de Assis, and W. Boeger. 2007 The effect of trichlorfon on acetylcholinesterase activity and histopathology of cultivated fish *Oreochromis niloticus*. Ecotoxicology and Environmental Safety 68: 57 – 62.

Kok, F.N. and V. Hasirci. 2003. Determination of binary pesticide mixtures by an acetyl cholinesterase–choline oxidase biosensor. Biosensors and Bioelectronics 19: 661 – 665.

Lee, S., S. Lee, C. Park, and J. Choi. 2006. Expression of heat shock protein and hemoglobin genes in *Chironomus tentans* (Diptera, chironomidae) larvae

exposed to various environmental pollutants: A potential biomarker of freshwater monitoring. Chemosphere 65: 1074 – 1081.

Marin, M.G. and V. Matozzo. 2004. Vitellogenin induction as a biomarker of exposure to estrogenic compounds in aquatic environments. Marine Pollution Bulletin 48: 835 – 839.

McKinlay, R., J.A. Plant, J.N.B. Bell, and N. Voulvoulis. 2008. Endocrine disrupting pesticides: Implications for risk assessment. Environment International 34: 168 – 183.

Millsa, L.J. and C. Chichester. 2005. Review of evidence: Are endocrine-disrupting chemicals in the aquatic environment impacting fish populations? Science of the Total Environment 343: 1 – 34.

Nigro, M., A. Falleni, I. Del Barga, V. Scarcelli, P. Lucchesi, F. Regoli, and G. Frenzilli. 2006. Cellular biomarkers for monitoring estuarine environments: Transplanted versus native mussels. Aquatic Toxicology 77: 339 – 347.

Okoumassoun, L., C. Brochu, C. Deblois, S. Akponan, M. Marion, D. Averill-Bates, and F. Denizeau. 2002. Vitellogenin in tilapia male fishes exposed to organochlorine pesticides in Oueme River in Republic of Benin. The Science of the Total Environment 299: 163 – 172.

Okoumassoun, L., D. Averill-Bates, F. Gagne´, M. Marion, and F. Denizeau. 2002. Assessing the estrogenic potential of organochlorine pesticides in primary cultures of male rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) hepatocytes using vitellogenin as a biomarker. Toxicology 178: 193 – 207.

Zapata-Pérez, O., R. Simá-Alvarez, E. Noreña-Barroso, J. Güemes, G. Gold-Bouchot, A. Ortega, and A. Albores-Medina. 2000. Toxicity of sediments from Bahia de Chetumal, México, as assessed by hepatic EROD induction and histology in nile tilapia *Oreochromis niloticus*. Marine Environmental Research 50: 385 – 391.

Petri, D., C. N. Glover, S. Ylving, K. Kolås, G. Fremmersvik, R. Waagbø, and M.H.G. Berntssen. 2006. Sensitivity of Atlantic salmon (*Salmo salar*) to dietary endosulfan as assessed by haematology, blood biochemistry, and growth parameters. Aquatic Toxicology 80: 207 – 216.

Singha, P.B. and A.V.M. Canariob. 2004. Reproductive endocrine disruption in the freshwater catfish, *Heteropneustes fossilis*, in response to the pesticide γ-hexachlorocyclohexane. Ecotoxicology and Environmental Safety 58: 77 – 83.

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

# ภาคผนวก

Submitted to INTERNATIONAL JOURNAL OF AGRICULTURE & BIOLOGY
http://www.fspublishers.org

The Use of Acetylcholinesterase Inhibition in River Snails (*Sinotaia ingallsiana*) to Determine the Pesticide Contamination in the Upper Ping River

CHANAGUN CHITMANAT[1,2] , NUMPET PRAKOBSIN[2] ,
PRACHUAB CHAIBU[2] AND SIRIPEN TRAICHAIYAPORN[3]

[1] *International Postgraduate Program in Environmental Management,*
*The National Center of Excellence for Environmental and Hazardous Waste Management,*
*Chulalongkorn University, Thailand 10330*

[2] *Faculty of Fisheries Technology and Aquatic Resources, Maejo University, Chiangmai Thailand*

[3] *Biology Department, Faculty of Science, Chiang Mai University, Chiang Mai, Thailand*

[1] Corresponding author's e-mail: chanagun@hotmail.com

ABSTRACT

The purpose of this study was to monitor the organophosphorus and carbamate pesticide contamination in an aquatic environment using the indigenous river snail (*Sinotaia ingallsiana*) as the bioindicator. The river snails were dipped in the Ping River in the Chiangmai area where agricultural sites are densely located. The study was carried out from October 2006 to March 2007. One day after exposure, the samples were sacrificed and analyzed for acetylcholinesterase activity. Results indicated that the AchE activity detected in river snails collected from several sites of the Ping River was low compared to laboratory controls. In rainy season, unexposed snails exhibited significantly higher AChE activity when compared to those of the other three specimens derived from contaminated sites ($P < 0.05$) (1.78 ± 0.28, 0.04 ± 0.06, 0.02 ± 0.03, and 0.04 ± 0.02 μmole $min^{-1}$ $g^{-1}$ tissue, respectively). The AChE activity showed seasonal differences with minimum activities during the winter period. In summary, the AChE activity of the river snail could be a good early indicator of pesticide contamination in an aquatic environment. Besides AchE activity, this research is underway to determine the other biochemical markers as well as histopathology effects, growth, reproduction, and survival of aquatic organisms living in these contaminated areas.

Key Words: Pesticide; Acetylcholinesterase; Biomarker; Risk Assessment; River Snail

## INTRODUCTION

There are increasing concerns about the potential of pesticide use to be harmful to human and non-target populations since pesticides are able to enter waterways from agricultural and urban run-off, movement through soil into water courses and after direct application (Schulz and Leiss, 1999). The organophosphorous and carbamate pesticides, the most used due to their high insecticidal activity, are also acutely neurotoxic. They are designed to be effective inhibitors of the enzyme acetylcholinesterase located at neuromuscular junctions in the central and peripheral nervous system (Walker *et al.*, 2001). As a result, the inhibition of these peripheral enzymes provides a convenient means of monitoring exposure to pesticides. Reductions in acetylcholinesterase activity have been widely used to indicate exposure to organophosphorous and carbamate pesticides in vertebrate and invertebrate species (Moulton *et al.*, 1996; Fulton and Key, 2001; Van Erp *et al.*, 2002) including freshwater bivalves (Moulton *et al.*, 1996; Doran *et al.*, 2001).

Although many methods are available for pesticide detection, there are several drawbacks which include the skilled personnel required and the complex and time-consuming treatments of the samples, i.e., extraction of pesticides, extract cleaning, and solvent substitution. In addition, measured concentrations of agricultural pesticides in large rivers and lakes often fall to concentrations below the instrument detection limit; for this reason, biomarkers might be an alternative way to obtain early-warning signals of environmental risk and they can detect either exposure to or the effects of pesticides.

The river snail was chosen as the study organism because of its general abundance, the ease with which it could be collected and because it shares some basic life history characteristics with native freshwater organisms in that it is a filter feeder. The goal of this study was to determine if the reduction in enzyme activity of the river snails can be used as a biomarker for pesticide contamination in aquatic environments. However, when interpreting AChE activities in relation to pesticide exposure the possible effects of natural factors have to be taken into account, since environmental variables may also have a direct or indirect effect on AChE activity. In a study, the seasonal differences in the AChE activity of river snails were also determined.

## MATERIALS AND METHODS

Sample preparation: River snails (*Sinotaia ingallsiana*) with average weight of 6.27 ± 1 gram were collected from a population in the Maejo University, Chiangmai. Prior to testing, snails were held in 40 L temperature controlled (26 ± 2 °C) aerated tanks containing dechlorinated laboratory water for ten days to allow acclimation to laboratory conditions.

Exposure conditions: Following acclimation, snails were dipped into Ping River in Chiangmai area where agricultural sites are densely located (Fig. 1) for 24 h. Three sites were used in this study. In order to investigate the seasonal course of AChE activity, river snails were dipped in the river in three different seasons.

Acetylcholinesterase activity: Analysis of AChE activity followed procedures described by Ellman *et al.* (1961) with modifications for multiwell plate readers. Snail tissues were homogenized in 0.1M phosphate buffer saline (pH 8). Samples were then centrifuged at 3,500 rpm for 10 min. A 40 µL sample of the supernatant was then added to three replicate wells of a 96-well plate (also held on ice) followed by the addition of 200 µL of reagent solution [3mL buffered Ellman's reagent (17.85 mmol $L^{-1}$ DNTB), 20 µL acetylthiocholine iodide (75 mmol $L^{-1}$) and 100 µL of 0.1M phosphate buffer saline]. The plate was read on a GDV Microplate Reader. AChE activity was expressed as µmol $min^{-1}$ $g^{-1}$ tissue.

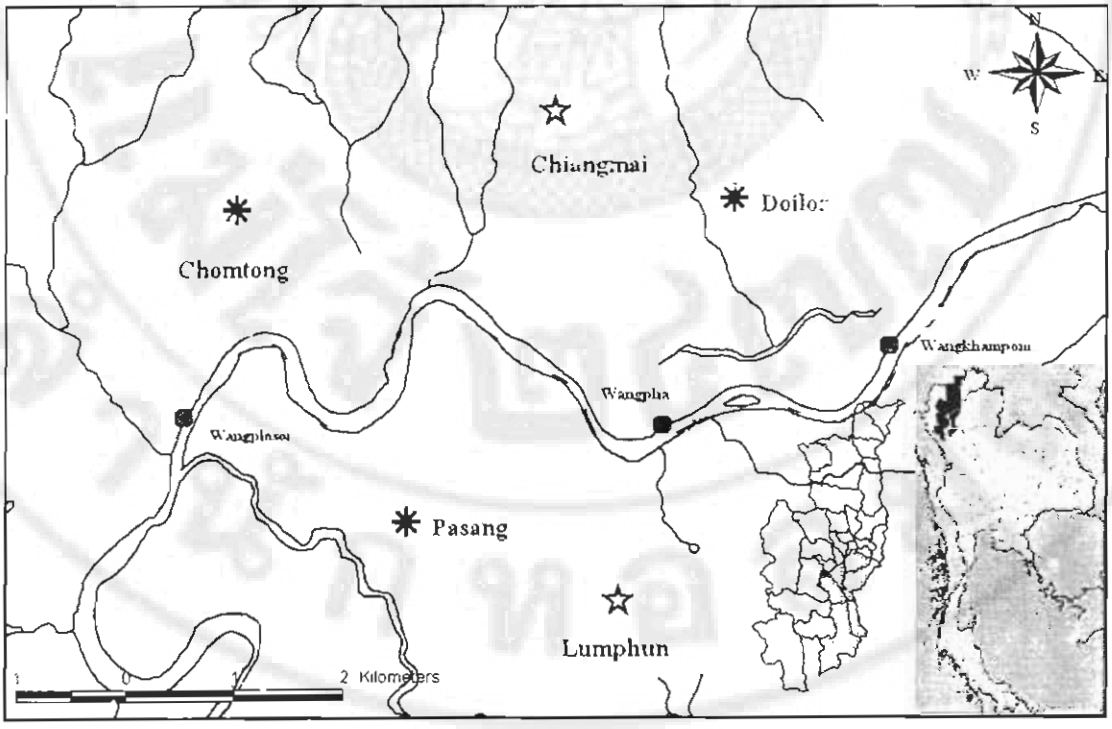



Fig. 1. Three sampling sites (Wangkhampom, Wangpha, and Wangplasoi) in the Upper Ping River

Pesticide analysis: Water sample extraction and GC analysis was carried out by Water Quality Management Bureau. Detection limits of Heptachlor, Aldrin, Dialorin, and Endosulfan Sulfate were 0.004, 0.004, 0.008, and 0.012 $\mu g\ L^{-1}$, respectively for water.

Statistical analyses: All data were first tested for normality and homogeneity of variance after which an analysis of variance (ANOVA), and/or Tukey's Multiple Regression mooel was used to determine whether there were any significant differences between the controls and treatments in acetylcholinesterase activity.

## RESULTS AND DISCUSSION

The average of pesticide concentration ($\mu g$ L-1) in Upper Ping River of year 2005 - 2007 is shown in Table I while acetylcholinesterase (AChE) activity of exposed snails is shown in Table II. The AChE activity of unexposed control snails showed higher AChE activity than that in the control group (9.47 against 1.04 – 1.60 $\mu$mole $min^{-1}$ $g^{-1}$ tissue, respectively) in rainy season. Results obtained in the Upper Ping River indicated a homogeneous pollution by the AChE inhibitors in these aquatic ecosystems except in summer season. In addition to interpreting AChE activities in relation to pesticide exposure, the possible effects of natural factors have to be taken into account, since environmental variables may also have a direct or indirect effect on AChE activity. In this study, seasonal differences in the AChE activity have been shown which might be related to seasonal changes in water temperature. Although the possibility of pesticide contamination into the aquatic environment through runoff might be higher in the rainy period, the dilution of toxic substances could result in the reduction of AChE activity. In winter, the AChE activity was lower than other seasons due to lower temperature. This result was consistent with the study of Abdel-Halim *et al.* (2006) who stated that activity of cholinesterase in brain and liver of tilapia fish samples collected from New Damietta drainage canal in winter was lower than the ones in spring and autumn. The AChE activity of controls in summer periods was lowest. This contrasted with Pfeifer *et al.* (2005) who showed that the maximum AChE activities were found during the summer period. This possible explanation relating to low AChE activities in laboratory snails might be due to background pesticide pollution. Therefore, our results will be annually repeated in order to confirm the results and see the trend of contamination. The concentrations of Heptachlor, Aldrin, Dieldrin, and Endosulfan Sulfate in water were shown in Table II.

Table I. The Average of Pesticide Concentration ($\mu g\ L^{-1}$) in Upper Ping River of Year 2005 – 2007 (Water Quality Management Bureau, 2008)

| Year | Heptachlor | Aldrin | Dieldrin | Endosulfan Sulfate |
|---|---|---|---|---|
| 2005 | ND – 0.1 | ND – 0.01 | ND – 0.01 | ND – 0.02 |
| 2006 | ND – 0.01 | ND – 0.01 | ND – 0.01 | ND – 0.01 |
| 2007 | ND – 0.01 | ND – 0.01 | ND – 0.01 | ND – 0.01 |

Table II. Season variation in activities of acetylcholinesterase of river snail samples dipped in the Upper Ping River

| Station | AChE Activity (Mean ± SD; $\mu mole\ min^{-1}\ g^{-1}$ tissue) | | |
|---|---|---|---|
| | rainy season | winter season | summer season |
| Control (Lab) | 9.4740 ± 2.7968 | 10.2585 ± 1.7756 | 4.8395 ± 1.4822 |
| Wangkhampom | 1.0450 ± 0.0367 | 0.0030 ± 0.0092 | 1.3053 ± 0.4078 |
| Wangpha | 1.0428 ± 0.0074 | 0.0011 ± 0.0030 | 0.3212 ± 0.2541 |
| Wangplasoi | 1.6002 ± 0.0051 | 0.0012 ± 0.0025 | 0.4888 ± 0.3584 |
| Water temperature | 25.39 ± 0.98 | 22.82 ± 0.55 | 33.36 ± 1.26 |

In accordance with the US Environmental Protection Agency, the inhibition of AChE activity inhibition of 20% or greater indicates exposure to OP pesticides. However, some aquatic animals are

able to survive with more than 50% of AChE inhibition. For example, a reduction of about 85% in AChE activity of tilapia exposed to trichlorfon when compared to the control group did not cause the death (Guimaraes *et al.*, 2007). The chronic exposure of the eastern rainbow fish (*Melanotaenia duboulayi*) to sublethal levels of profenofos resulted not only in a 70% reduction in acetylcholinesterase (AChE) activity but also associated decreases in growth rates, food consumption rates, and food conversion efficiency. Future laboratory studies on biochemical and immunological responses in using the river snail should set out the environmental quality classes more accurately, as well as the interference effects of other competitive factors. In addition, the recovery of AChE from exposure to organophosphorous and carbamate pesticides should be further investigated. The selection of endpoints and organisms to be used in risk assessment is still one of the challenging tasks. Additionally aquatic organisms living in agricultural areas, however, are exposed to a multitude of toxicologically and structurally different pesticides which are a challenging task for management and regulatory purposes while most of the published results for pesticide toxicity are assessed from the single substance toxicity. The possible synergism and/or antagonism among the pesticides must be considered.

## CONCLUSIONS

The present study reveals that exposure of *Sinotaia ingallsiana* to contaminated aquatic environment produced a significant decrease in AChE activity in the tissue. These responses may be useful as early indicators of toxicity by pesticides in the tissues of river snails, particularly where it is difficult to get contamination information with very expensive analysis. However, the influence of temperature on AChE activity in river snails has to be assessed when applying this AChE activity as biomarker to monitor pesticide contamination effects.

Acknowlegements: We would like to thank Dr. Ralph Cooper for his helpful suggestions throughout this paper writing. Thanks to the National Research Council of Thailand and the office of agricultural research and extension, Maejo University for financial assistance.

## REFERENCES

Abdel-Halim, K.Y., A.K. Salama, E.N. El-khateeb, and N.M. Bakry. 2006. Organophosphorus pollutants (OPP) in aquatic environment at Damietta Governorate, Egypt: Implications for monitoring and biomarker responses. *Chemosphere* 63: 1491 – 1498.

Doran, W.J., W.G. Cope, R.G. Rada, and M.B. Sandheinrich. 2001. Acetylcholinesterase inhibition in the three ridge mussel (*Amblema plicata*) by chlorpyrifos: implications for biomonitoring. *Ecotoxicol. Environ. Safety* 49: 91 – 98.

Fulton, M.H., and P.B. Key. 2001. Acetylcholinesterase inhibition in estuarine fish and invertebrates as an indicator of organophosphorus insecticide exposure and effects. *Environ. Toxicol. Chem.* 20: 37 – 45.

Guimaraes, A.T.B., H.C. Silva de Assis, and W. Boeger. 2007. The effect of trichlorfon on acetylcholinesterase activity and histopathology of cultivated fish *Oreochromis niloticus*. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 68: 57 – 62.

Moulton, C.A., W.J. Fleming, and C.E. Purnell. 1996. Effects of two cholinesterase inhibiting pesticides on freshwater mussels. *Environ.Toxicol. Chem.* 15: 131 – 137.

Pfeifer, S., D. Schiedek, and J.W. Dippner. 2005. Effect of temperature and salinity on acetylcholinesterase activity, a common pollution biomarker, in *Mytilus* sp. from the south-western Baltic Sea. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology* 320: 93 – 103.

Schulz, R., and M. Leiss. 1999. A field study of the effects of agriculturally derived insecticide input on stream invertebrate dynamics. *Aquat. Toxicol.* 46: 155 – 176.

Van Erp, S., L. Booth, R. Gooneratne, and K. O'Halloran. 2002. Sublethal responses of wolf spiders (Lycosidae) to organophosphorous insecticides. *Env. Toxicol.* 17: 449 – 456.

Walker, C.H., S.P. Hopkin, R.M. Sibly, and D.B. Peakall. 2001. *Principles of Ecotoxicology*, 2nd ed. Taylor and Francis, London.

Water Quality Management Bureau. 2008. Inland Water Quality Information System. http://iwis.pcd.go.th

**United Analyst and Engineering Consultant Co.,Ltd.**
17 Yotha Road, Talad Noi, Sampanthawong, Bangkok 10100
Tel. 0-2233-4027, 0-2235-5485, 0-2234-5115, 0-2639 0601-4 Fax: (66) 2639-0605
E-mail : uaecon@samart.co.th

# ANALYSIS REPORT

CUSTOMER NAME : FACULTY OF FISHERIES TECHNOLOGY AND AQUATIC SCIENCES, MAEJO UNIVERSITY
ADDRESS : FACULTY OF FISHERIES TECHNOLOGY AND AQUATIC SCIENCES, MAEJO UNIVERSITY SANSAI, CHIANG MAI 50210 THAILAND.
SAMPLING SOURCE : SURFACE WATER
SAMPLING DATE : AUGUST 16, 2006
SAMPLING TIME : 11:00-14:00 HOUR
SAMPLING METHOD : GRAB
SAMPLING BY : CUSTOMER
FILE NAME : \\L1\r_task\Programme\ผลวิเคราะห์\เดือน\Surface Water\2006\Aug.DOC
RECEIVED DATE : AUGUST 17, 2006
ANALYTICAL DATE : AUGUST 17-29, 2006
ANALYSIS NO : LJ948/2006
REPORT NO. : L08029/2006

| PARAMETER | UNIT | METHOD OF ANALYSIS | RESULT บ้านวังชามปิลม LJ948/2006 | DETECTION LIMIT |
|---|---|---|---|---|
| **ORGANOPHOSPHATE PESTICIDES** | | | | |
| METHAMIDOPHOS | mg/L | GAS CHROMATOGRAPHIC (PFPD) METHOD | ND | 0.02 |
| MONOCROTOPHOS | mg/L | GAS CHROMATOGRAPHIC (PFPD) METHOD | ND | 0.02 |
| CHLORPYRIFOS | mg/L | GAS CHROMATOGRAPHIC (PFPD) METHOD | ND | 0.02 |
| PROFENOFOS | mg/L | GAS CHROMATOGRAPHIC (PFPD) METHOD | ND | 0.02 |
| TRIAZOPHOS | mg/L | GAS CHROMATOGRAPHIC (PFPD) METHOD | ND | 0.02 |
| PHOSALONE | mg/L | GAS CHROMATOGRAPHIC (PFPD) METHOD | ND | 0.02 |
| DIMETHOATE | mg/L | GAS CHROMATOGRAPHIC (PFPD) METHOD | ND | 0.02 |
| METHYL PARATHION | mg/L | GAS CHROMATOGRAPHIC (PFPD) METHOD | ND | 0.02 |
| MEVINPHOS | mg/L | GAS CHROMATOGRAPHIC (PFPD) METHOD | ND | 0.02 |
| MALATHION | mg/L | GAS CHROMATOGRAPHIC (PFPD) METHOD | ND | 0.02 |
| ETHOPROPHOS | mg/L | GAS CHROMATOGRAPHIC (PFPD) METHOD | ND | 0.02 |
| METHIDATHION | mg/L | GAS CHROMATOGRAPHIC (PFPD) METHOD | ND | 0.02 |
| EPN | mg/L | GAS CHROMATOGRAPHIC (PFPD) METHOD | ND | 0.02 |
| **ORGANOCHLORINE PESTICIDES** | | | | |
| α-BHC | µg/L | GAS CHROMATOGRAPHIC (ECD) METHOD | ND | 0.004 |
| β-BHC | µg/L | GAS CHROMATOGRAPHIC (ECD) METHOD | ND | 0.004 |
| γ-BHC | µg/L | GAS CHROMATOGRAPHIC (ECD) METHOD | ND | 0.004 |
| δ-BHC | µg/L | GAS CHROMATOGRAPHIC (ECD) METHOD | ND | 0.004 |
| HEPTACHLOR | µg/L | GAS CHROMATOGRAPHIC (ECD) METHOD | ND | 0.004 |
| ALDRIN | µg/L | GAS CHROMATOGRAPHIC (ECD) METHOD | ND | 0.004 |
| HEPTACHLOR EPOXIDE | µg/L | GAS CHROMATOGRAPHIC (ECD) METHOD | ND | 0.004 |
| ENDOSULFAN I | µg/L | GAS CHROMATOGRAPHIC (ECD) METHOD | ND | 0.008 |
| p,p-DDE | µg/L | GAS CHROMATOGRAPHIC (ECD) METHOD | ND | 0.008 |
| DIELDRIN | µg/L | GAS CHROMATOGRAPHIC (ECD) METHOD | ND | 0.008 |
| ENDRIN | µg/L | GAS CHROMATOGRAPHIC (ECD) METHOD | ND | 0.008 |
| ENDOSULFAN II | µg/L | GAS CHROMATOGRAPHIC (ECD) METHOD | ND | 0.008 |
| p,p-DDD | µg/L | GAS CHROMATOGRAPHIC (ECD) METHOD | ND | 0.012 |
| ENDRIN ALDEHYDE | µg/L | GAS CHROMATOGRAPHIC (ECD) METHOD | ND | 0.012 |
| ENDOSULFAN SULFATE | µg/L | GAS CHROMATOGRAPHIC (ECD) METHOD | ND | 0.012 |
| p,p-DDT | µg/L | GAS CHROMATOGRAPHIC (ECD) METHOD | ND | 0.012 |
| SAMPLE CONDITION | | | YELLOW, BROWN SEDIMENT | |

ND : NON-DETECTABLE.

Benjawan V.
(MS. BENJAWAN VIRIYOTHAI)
UNIT MANAGER
AUGUST 30, 2006

Patchara C.
(MS. PATCHAREE CHAROENSILPANITH)
TECHNICAL MANAGEMENT
AUGUST 30, 2006

(DR. PINITI RATANANUKUL)
LABORATORY SUPERVISOR
AUGUST 30, 2006

- DO NOT COPY PARTIAL OF THIS ANALYSIS REPORT WITHOUT OFFICIAL APPROVAL.
- REPORTED ANALYSIS REFERS TO SUBMITTED SAMPLE ONLY.

United Analyst and Engineering Consultant Co.,Ltd.
17 Yotha Road, Talad Noi, Sampanthawong, Bangkok 10100
Tel. 0-2233-4027, 0-2235-5485, 0-2234-8115, 0-2639-0601-4 Fax. (66) 2639-0605
E-mail : uaecon@samart.co.th

# ANALYSIS REPORT

CUSTOMER NAME : FACULTY OF FISHERIES TECHNOLOGY AND AQUATIC SCIENCES, MAEJO UNIVERSITY
ADDRESS : FACULTY OF FISHERIES TECHNOLOGY AND AQUATIC SCIENCES, MAEJO UNIVERSITY, SANSAI, CHIANG MAI 50210 THAILAND.
SAMPLING SOURCE : SURFACE WATER
SAMPLING DATE : AUGUST 16, 2006
SAMPLING TIME : 11:00-14:00 HOUR
SAMPLING METHOD : GRAB
SAMPLING BY : CUSTOMER
FILE NAME : \\LI\#_task\Programme\ผลวิเคราะห์\Surface Water\2006\Aug.DOC

RECEIVED DATE : AUGUST 17, 2006
ANALYTICAL DATE : AUGUST 17-29, 2006
ANALYSIS NO : LJ949/2006
REPORT NO. : L08030/2006

| PARAMETER | UNIT | METHOD OF ANALYSIS | RESULT วัตถุวิเคราะห์ LJ949/2006 | DETECTION LIMIT |
|---|---|---|---|---|
| **ORGANOPHOSPHATE PESTICIDES** | | | | |
| METHAMIDOPHOS | mg/L | GAS CHROMATOGRAPHIC (PFPD) METHOD | ND | 0.02 |
| MONOCROTOPHOS | mg/L | GAS CHROMATOGRAPHIC (PFPD) METHOD | ND | 0.02 |
| CHLORPYRIFOS | mg/L | GAS CHROMATOGRAPHIC (PFPD) METHOD | ND | 0.02 |
| PROFENOFOS | mg/L | GAS CHROMATOGRAPHIC (PFPD) METHOD | ND | 0.02 |
| TRIAZOPHOS | mg/L | GAS CHROMATOGRAPHIC (PFPD) METHOD | ND | 0.02 |
| PHOSALONE | mg/L | GAS CHROMATOGRAPHIC (PFPD) METHOD | ND | 0.02 |
| DIMETHOATE | mg/L | GAS CHROMATOGRAPHIC (PFPD) METHOD | ND | 0.02 |
| METHYL PARATHION | mg/L | GAS CHROMATOGRAPHIC (PFPD) METHOD | ND | 0.02 |
| MEVINPHOS | mg/L | GAS CHROMATOGRAPHIC (PFPD) METHOD | ND | 0.02 |
| MALATHION | mg/L | GAS CHROMATOGRAPHIC (PFPD) METHOD | ND | 0.02 |
| ETHOPROPHOS | mg/L | GAS CHROMATOGRAPHIC (PFPD) METHOD | ND | 0.02 |
| METHIDATHION | mg/L | GAS CHROMATOGRAPHIC (PFPD) METHOD | ND | 0.02 |
| EPN | mg/L | GAS CHROMATOGRAPHIC (PFPD) METHOD | ND | 0.02 |
| **ORGANOCHLORINE PESTICIDES** | | | | |
| α-BHC | µg/L | GAS CHROMATOGRAPHIC (ECD) METHOD | ND | 0.004 |
| β-BHC | µg/L | GAS CHROMATOGRAPHIC (ECD) METHOD | ND | 0.004 |
| γ-BHC | µg/L | GAS CHRDMATOGRAPHIC (ECD) METHOD | ND | 0.004 |
| δ-BHC | µg/L | GAS CHROMATOGRAPHIC (ECD) METHOD | ND | 0.004 |
| HEPTACHLOR | µg/L | GAS CHROMATOGRAPHIC (ECD) METHOD | ND | 0.004 |
| ALDRIN | µg/L | GAS CHROMATOGRAPHIC (ECD) METHOD | ND | 0.004 |
| HEPTACHLOR EPOXIDE | µg/L | GAS CHROMATOGRAPHIC (ECD) METHOD | ND | 0.004 |
| ENDOSULFAN I | µg/L | GAS CHROMATOGRAPHIC (ECD) METHOD | ND | 0.008 |
| p,p-DDE | µg/L | GAS CHROMATOGRAPHIC (ECD) METHOD | ND | 0.008 |
| DIELDRIN | µg/L | GAS CHROMATOGRAPHIC (ECD) METHOD | ND | 0.008 |
| ENDRIN | µg/L | GAS CHROMATOGRAPHIC (ECD) METHOD | ND | 0.008 |
| ENDOSULFAN II | µg/L | GAS CHROMATOGRAPHIC (ECD) METHOD | ND | 0.008 |
| p,p-DDD | µg/L | GAS CHROMATOGRAPHIC (ECD) METHOD | ND | 0.012 |
| ENDRIN ALDEHYDE | µg/L | GAS CHROMATOGRAPHIC (ECD) METHOD | ND | 0.012 |
| ENDOSULFAN SULFATE | µg/L | GAS CHROMATOGRAPHIC (ECD) METHOD | ND | 0.012 |
| p,p-DDT | µg/L | GAS CHROMATOGRAPHIC (ECD) METHOD | ND | 0.012 |
| SAMPLE CONDITION | | | YELLOW, BROWN SEDIMENT | |

ND : NON-DETECTABLE.

Benjawan V.

(MS. BENJAWAN VIRIYOTHAI)
UNIT MANAGER
AUGUST 30, 2006

Patcharee C.

(MS. PATCHAREE CHAROENSILPANITH)
TECHNICAL MANAGEMENT
AUGUST 30, 2006

(DR. PINITI RATANANUKUL)
LABORATORY SUPERVISOR
AUGUST 30, 2006

- DO NOT COPY PARTIAL OF THIS ANALYSIS REPORT WITHOUT OFFICIAL APPROVAL.
- REPORTED ANALYSIS REFERS TO SUBMITTED SAMPLE ONLY.

United Analyst and Engineering Consultant Co.,Ltd.
17 Yotha Road, Talad Noi, Sampanthawong, Bangkok 10100
Tel. 0-2233-4027, 0-2235-5465 0-2234-5115, 0-2639-0801-4 Fax: (66) 2639-0808
E-mail : uaecon@samart.co.th

# ANALYSIS REPORT

CUSTOMER NAME : FACULTY OF FISHERIES TECHNOLOGY AND AQUATIC SCIENCES, MAEJO UNIVERSITY
ADDRESS : FACULTY OF FISHERIES TECHNOLOGY AND AQUATIC SCIENCES, MAEJO UNIVERSITY, SANSAI, CHIANG MAI 50210 THAILAND.

SAMPLING SOURCE : SURFACE WATER
SAMPLING DATE : AUGUST 16, 2006
SAMPLING TIME : 11:00-14:00 HOUR
SAMPLING METHOD : GRAB
SAMPLING BY : CUSTOMER
FILE NAME : \\LI\#_task\Programme\เคมีน้ำ\Surface Water\2006\Aug.DOC

RECEIVED DATE : AUGUST 17, 2006
ANALYTICAL DATE : AUGUST 17-29, 2006
ANALYSIS NO : LJ950/2006
REPORT NO. : L08031/2006

| PARAMETER | UNIT | METHOD OF ANALYSIS | RESULT บ้านท่าราลา LJ950/2006 | DETECTION LIMIT |
|---|---|---|---|---|
| **ORGANOPHOSPHATE PESTICIDES** | | | | |
| METHAMIDOPHOS | mg/L | GAS CHROMATOGRAPHIC (PFPD) METHOD | ND | 0.02 |
| MONOCROTOPHOS | mg/L | GAS CHROMATOGRAPHIC (PFPD) METHOD | ND | 0.02 |
| CHLORPYRIFOS | mg/L | GAS CHROMATOGRAPHIC (PFPD) METHOD | ND | 0.02 |
| PROFENOFOS | mg/L | GAS CHROMATOGRAPHIC (PFPD) METHOD | ND | 0.02 |
| TRIAZOPHOS | mg/L | GAS CHROMATOGRAPHIC (PFPD) METHOD | ND | 0.02 |
| PHOSALONE | mg/L | GAS CHROMATOGRAPHIC (PFPD) METHOD | ND | 0.02 |
| DIMETHOATE | mg/L | GAS CHROMATOGRAPHIC (PFPD) METHOD | ND | 0.02 |
| METHYL PARATHION | mg/L | GAS CHROMATOGRAPHIC (PFPD) METHOD | ND | 0.02 |
| MEVINPHOS | mg/L | GAS CHROMATOGRAPHIC (PFPD) METHOD | ND | 0.02 |
| MALATHION | mg/L | GAS CHROMATOGRAPHIC (PFPD) METHOD | ND | 0.02 |
| ETHOPROPHOS | mg/L | GAS CHROMATOGRAPHIC (PFPD) METHOD | ND | 0.02 |
| METHIDATHION | mg/L | GAS CHROMATOGRAPHIC (PFPD) METHOD | ND | 0.02 |
| EPN | mg/L | GAS CHROMATOGRAPHIC (PFPD) METHOD | ND | 0.02 |
| **ORGANOCHLORINE PESTICIDES** | | | | |
| α-BHC | µg/L | GAS CHROMATOGRAPHIC (ECD) METHOD | ND | 0.004 |
| β-BHC | µg/L | GAS CHROMATOGRAPHIC (ECD) METHOD | ND | 0.004 |
| γ-BHC | µg/L | GAS CHROMATOGRAPHIC (ECD) METHOD | ND | 0.004 |
| δ-BHC | µg/L | GAS CHROMATOGRAPHIC (ECD) METHOD | ND | 0.004 |
| HEPTACHLOR | µg/L | GAS CHROMATOGRAPHIC (ECD) METHOD | ND | 0.004 |
| ALDRIN | µg/L | GAS CHROMATOGRAPHIC (ECD) METHOD | ND | 0.004 |
| HEPTACHLOR EPOXIDE | µg/L | GAS CHROMATOGRAPHIC (ECD) METHOD | ND | 0.004 |
| ENDOSULFAN I | µg/L | GAS CHROMATOGRAPHIC (ECD) METHOD | ND | 0.008 |
| p,p-DDE | µg/L | GAS CHROMATOGRAPHIC (ECD) METHOD | ND | 0.008 |
| DIELDRIN | µg/L | GAS CHROMATOGRAPHIC (ECD) METHOD | ND | 0.008 |
| ENDRIN | µg/L | GAS CHROMATOGRAPHIC (ECD) METHOD | ND | 0.008 |
| ENDOSULFAN II | µg/L | GAS CHROMATOGRAPHIC (ECD) METHOD | ND | 0.008 |
| p,p-DDD | µg/L | GAS CHROMATOGRAPHIC (ECD) METHOD | ND | 0.012 |
| ENDRIN ALDEHYDE | µg/L | GAS CHROMATOGRAPHIC (ECD) METHOD | ND | 0.012 |
| ENDOSULFAN SULFATE | µg/L | GAS CHROMATOGRAPHIC (ECD) METHOD | ND | 0.012 |
| p,p-DDT | µg/L | GAS CHROMATOGRAPHIC (ECD) METHOD | ND | 0.012 |
| SAMPLE CONDITION | | | YELLOW, BROWN SEDIMENT | |

ND : NON-DETECTABLE.

Benjawan V.
(MS. BENJAWAN VIRIYOTHAI)
UNIT MANAGER
AUGUST 30, 2006

Patcharee C.
(MS. PATCHAREE CHAROENSILPANITH)
TECHNICAL MANAGEMENT
AUGUST 30, 2006

P. Ratananukul
(DR. PINITI RATANANUKUL)
LABORATORY SUPERVISOR
AUGUST 30, 2006

- DO NOT COPY PARTIAL OF THIS ANALYSIS REPORT WITHOUT OFFICIAL APPROVAL.
- REPORTED ANALYSIS REFERS TO SUBMITTED SAMPLE ONLY.

United Analysis and Engineering Consultant Co.,Ltd.
17 Yotha Road Talad Noi Sam [illegible] Bangkok 10 [illegible]
Tel. [illegible] Fax. [illegible]
E-mail : [illegible]

# ANALYSIS REPORT

CUSTOMER NAME : FACULTY OF FISHERIES TECHNOLOGY AND AQUATIC SCIENCES, MAEJO UNIVERSITY
ADDRESS : FACULTY OF FISHERIES TECHNOLOGY AND AQUATIC SCIENCES, MAEJO UNIVERSITY, SANSAI, CHIANG MAI 50210 THAILAND.

SAMPLING SOURCE : SURFACE WATER
SAMPLING DATE : AUGUST 16, 2006
SAMPLING TIME : 11:00-14.00 HOUR
SAMPLING METHOD : GRAB
SAMPLING BY : CUSTOMER
FILE NAME : \\LI\#_task\Programme\[illegible]\Surface Water\2006\Aug.DOC

RECEIVED DATE : AUGUST 17, 2006
ANALYTICAL DATE : AUGUST 17-29, 2006
ANALYSIS NO : LJ951/2006
REPORT NO. : L08032/2006

| PARAMETER | UNIT | METHOD OF ANALYSIS | RESULT ข้าเมืองผา (ล้าพูน) LJ951/2006 | DETECTION LIMIT |
|---|---|---|---|---|
| **ORGANOPHOSPHATE PESTICIDES** | | | | |
| METHAMIDOPHOS | mg/L | GAS CHROMATOGRAPHIC (PFPD) METHOD | ND | 0.02 |
| MONOCROTOPHOS | mg/L | GAS CHROMATOGRAPHIC (PFPD) METHOD | ND | 0.02 |
| CHLORPYRIFOS | mg/L | GAS CHROMATOGRAPHIC (PFPD) METHOD | ND | 0.02 |
| PROFENOFOS | mg/L | GAS CHROMATOGRAPHIC (PFPD) METHOD | ND | 0.02 |
| TRIAZOPHOS | mg/L | GAS CHROMATOGRAPHIC (PFPD) METHOD | ND | 0.02 |
| PHOSALONE | mg/L | GAS CHROMATOGRAPHIC (PFPD) METHOD | ND | 0.02 |
| DIMETHOATE | mg/L | GAS CHROMATOGRAPHIC (PFPD) METHOD | ND | 0.02 |
| METHYL PARATHION | mg/L | GAS CHROMATOGRAPHIC (PFPD) METHOD | ND | 0.02 |
| MEVINPHOS | mg/L | GAS CHROMATOGRAPHIC (PFPD) METHOD | ND | 0.02 |
| MALATHION | mg/L | GAS CHROMATOGRAPHIC (PFPD) METHOD | ND | 0.02 |
| ETHOPROPHOS | mg/L | GAS CHROMATOGRAPHIC (PFPD) METHOD | ND | 0.02 |
| METHIDATHION | mg/L | GAS CHROMATOGRAPHIC (PFPD) METHOD | ND | 0.02 |
| EPN | mg/L | GAS CHROMATOGRAPHIC (PFPD) METHOD | ND | 0.02 |
| **ORGANOCHLORINE PESTICIDES** | | | | |
| α-BHC | µg/L | GAS CHROMATOGRAPHIC (ECD) METHOD | ND | 0.004 |
| β-BHC | µg/L | GAS CHROMATOGRAPHIC (ECD) METHOD | ND | 0.004 |
| γ BHC | µg/L | GAS CHROMATOGRAPHIC (ECD) METHOD | ND | 0.004 |
| δ BHC | µg/L | GAS CHROMATOGRAPHIC (ECD) METHOD | ND | 0.004 |
| HEPTACHLOR | µg/L | GAS CHROMATOGRAPHIC (ECD) METHOD | ND | 0.004 |
| ALDRIN | µg/L | GAS CHROMATOGRAPHIC (ECD) METHOD | ND | 0.004 |
| HEPTACHLOR EPOXIDE | µg/L | GAS CHROMATOGRAPHIC (ECD) METHOD | ND | 0.004 |
| ENDOSULFAN I | µg/L | GAS CHROMATOGRAPHIC (ECD) METHOD | ND | 0.008 |
| p,p-DDE | µg/L | GAS CHROMATOGRAPHIC (ECD) METHOD | ND | 0.008 |
| DIELDRIN | µg/L | GAS CHROMATOGRAPHIC (ECD) METHOD | ND | 0.008 |
| ENDRIN | µg/L | GAS CHROMATOGRAPHIC (ECD) METHOD | ND | 0.008 |
| ENDOSULFAN II | µg/L | GAS CHROMATOGRAPHIC (ECD) METHOD | ND | 0.008 |
| p,p DDD | µg/L | GAS CHROMATOGRAPHIC (ECD) METHOD | ND | 0.012 |
| ENDRIN ALDEHYDE | µg/L | GAS CHROMATOGRAPHIC (ECD) METHOD | ND | 0.012 |
| ENDOSULFAN SULFATE | µg/L | GAS CHROMATOGRAPHIC (ECD) METHOD | ND | 0.012 |
| p,p-DDT | µg/L | GAS CHROMATOGRAPHIC (ECD) METHOD | ND | 0.012 |
| SAMPLE CONDITION | | | YELLOW, BROWN SEDIMENT | |

ND : NON-DETECTABLE.

Benjawan V.
(MS. BENJAWAN VIRIYOTHAI)
UNIT MANAGER
AUGUST 30, 2006

Patcharee C.
(MS. PATCHAREE CHAROENSILPANITH)
TECHNICAL MANAGEMENT
AUGUST 30, 2006

(DR. PINITI RATANANUKUL)
LABORATORY SUPERVISOR
AUGUST 30, 2006

• DO NOT COPY PARTIAL OF THIS ANALYSIS REPORT WITHOUT OFFICIAL APPROVAL.
• REPORTED ANALYSIS REFERS TO SUBMITTED SAMPLE ONLY.

Laboratory and Environmental Consultancy Co.,Ltd.
17 Soi Ramkhamhaeng 39 (Thepleela 1), Wangthonglang, Bangkok 10310
Tel: 0-2539-4087, 0-2539-4088, 0-2539-4089, 0-2539-4090 Fax: 0-2539-4095
E-mail: ...

# ANALYSIS REPORT

| | | | |
|---|---|---|---|
| CUSTOMER NAME | : FACULTY OF FISHERIES TECHNOLOGY AND AQUATIC SCIENCES, MAEJO UNIVERSITY | | |
| ADDRESS | : FACULTY OF FISHERIES TECHNOLOGY AND AQUATIC SCIENCES, MAEJO UNIVERSITY, SANSAI, CHIANG MAI 50210 THAILAND. | | |
| SAMPLING SOURCE | : SOIL SAMPLES | | |
| SAMPLING DATE | : AUGUST 16, 2006 | RECEIVED DATE | : AUGUST 17, 2006 |
| SAMPLING TIME | : 11:00-14:00 HOUR | ANALYTICAL DATE | : AUGUST 17-29, 2006 |
| SAMPLING METHOD | : GRAB | ANALYSIS NO | : LJ944/2006 |
| SAMPLING BY | : CUSTOMER | REPORT NO. | : L07990/2006 |
| FILE NAME | : \\L1\e_task\Programmie\...\Soil\2006\Aug.DOC | | |

| PARAMETER | UNIT | METHOD OF ANALYSIS | RESULT บ้านวังจามปอม LJ944/2006 | DETECTION LIMIT |
|---|---|---|---|---|
| **ORGANOPHOSPHATE PESTICIDES** | | | | |
| METHAMIDOPHOS | mg/kg (dry weight) | GAS CHROMATOGRAPHIC (PFPD) METHOD | ND | 0.2 |
| MONOCROTOPHOS | mg/kg (dry weight) | GAS CHROMATOGRAPHIC (PFPD) METHOD | ND | 0.2 |
| CHLORPYRIFOS | mg/kg (dry weight) | GAS CHROMATOGRAPHIC (PFPD) METHOD | ND | 0.2 |
| PROFENOFOS | mg/kg (dry weight) | GAS CHROMATOGRAPHIC (PFPD) METHOD | ND | 0.2 |
| TRIAZOPHOS | mg/kg (dry weight) | GAS CHROMATOGRAPHIC (PFPD) METHOD | ND | 0.2 |
| PHOSALONE | mg/kg (dry weight) | GAS CHROMATOGRAPHIC (PFPD) METHOD | ND | 0.2 |
| DIMETHOATE | mg/kg (dry weight) | GAS CHROMATOGRAPHIC (PFPD) METHOD | ND | 0.2 |
| METHYL PARATHION | mg/kg (dry weight) | GAS CHROMATOGRAPHIC (PFPD) METHOD | ND | 0.2 |
| MEVINPHOS | mg/kg (dry weight) | GAS CHROMATOGRAPHIC (PFPD) METHOD | ND | 0.2 |
| MALATHION | mg/kg (dry weight) | GAS CHROMATOGRAPHIC (PFPD) METHOD | ND | 0.2 |
| ETHOPROPHOS | mg/kg (dry weight) | GAS CHROMATOGRAPHIC (PFPD) METHOD | ND | 0.2 |
| METHIDATHION | mg/kg (dry weight) | GAS CHROMATOGRAPHIC (PFPD) METHOD | ND | 0.2 |
| EPN | mg/kg (dry weight) | GAS CHROMATOGRAPHIC (PFPD) METHOD | ND | 0.2 |

United Analytical Engineering Consultant Co.,Ltd.
Samutprakarn, Bangkok 10109

| PARAMETER | UNIT | METHOD OF ANALYSIS | RESULT บ้านวังชวนป้อม LJ944/2006 | DETECTION LIMIT |
|---|---|---|---|---|
| **ORGANOCHLORINE PESTICIDES** | | | | |
| α-BHC | µg/kg (dry weight) | GAS CHROMATOGRAPHIC (ECD) METHOD | ND | 0.4 |
| β-BHC | µg/kg (dry weight) | GAS CHROMATOGRAPHIC (ECD) METHOD | ND | 0.4 |
| γ-BHC | µg/kg (dry weight) | GAS CHROMATOGRAPHIC (ECD) METHOD | ND | 0.4 |
| δ-BHC | µg/kg (dry weight) | GAS CHROMATOGRAPHIC (ECD) METHOD | ND | 0.4 |
| HEPTACHLOR | µg/kg (dry weight) | GAS CHROMATOGRAPHIC (ECD) METHOD | ND | 0.4 |
| ALDRIN | µg/kg (dry weight) | GAS CHROMATOGRAPHIC (ECD) METHOD | ND | 0.4 |
| HEPTACHLOR EPOXIDE | µg/kg (dry weight) | GAS CHROMATOGRAPHIC (ECD) METHOD | ND | 0.4 |
| ENDOSULFAN I | µg/kg (dry weight) | GAS CHROMATOGRAPHIC (ECD) METHOD | ND | 0.8 |
| p,p-DDE | µg/kg (dry weight) | GAS CHROMATOGRAPHIC (ECD) METHOD | ND | 0.8 |
| DIELDRIN | µg/kg (dry weight) | GAS CHROMATOGRAPHIC (ECD) METHOD | ND | 0.8 |
| ENDRIN | µg/kg (dry weight) | GAS CHROMATOGRAPHIC (ECD) METHOD | ND | 0.8 |
| ENDOSULFAN II | µg/kg (dry weight) | GAS CHROMATOGRAPHIC (ECD) METHOD | ND | 0.8 |
| p,p-DDD | µg/kg (dry weight) | GAS CHROMATOGRAPHIC (ECD) METHOD | ND | 1.2 |
| ENDRIN ALDEHYDE | µg/kg (dry weight) | GAS CHROMATOGRAPHIC (ECD) METHOD | ND | 1.2 |
| ENDOSULFAN SULFATE | µg/kg (dry weight) | GAS CHROMATOGRAPHIC (ECD) METHOD | ND | 1.2 |
| p,p-DDT | µg/kg (dry weight) | GAS CHROMATOGRAPHIC (ECD) METHOD | ND | 1.2 |
| SAMPLE CONDITION | | | BROWN MUD | |

ND . NON-DETECTABLE.

Benjawan V.

(MS. BENJAWAN VIRIYOTHAI)
UNIT MANAGER
AUGUST 30, 2006

Patcharee

(MS PATCHAREE CHAROENSILPANITH)
TECHNICAL MANAGEMENT
AUGUST 30, 2006

(DR. PINITI RATANANUKUL)
LABORATORY SUPERVISOR
AUGUST 30, 2006

• DO NOT COPY PARTIAL OF THIS ANALYSIS REPORT WITHOUT OFFICIAL APPROVAL.
• REPORTED ANALYSIS REFERS TO SUBMITTED SAMPLE ONLY.

United Analysis and Engineering Consultant Co., Ltd.
17 Yotha Road, Talat Nuea, Muang, Chiang Mai 50100
Tel. 0-2238-4027, 0-2235-5[illegible] Fax. 0-2[illegible]
E-mail : u[illegible]

# ANALYSIS REPORT

| | | | |
|---|---|---|---|
| CUSTOMER NAME ADDRESS | : FACULTY OF FISHERIES TECHNOLOGY AND AQUATIC SCIENCES, MAEJO UNIVERSITY FACULTY OF FISHERIES TECHNOLOGY AND AQUATIC SCIENCES, MAEJO UNIVERSITY, SANSAI, CHIANG MAI 50210 THAILAND. | | |
| SAMPLING SOURCE | : SOIL SAMPLES | | |
| SAMPLING DATE | : AUGUST 16, 2006 | RECEIVED DATE | : AUGUST 17, 2006 |
| SAMPLING TIME | : 11:00-14:00 HOUR | ANALYTICAL DATE | : AUGUST 17-29, 2006 |
| SAMPLING METHOD | : GRAB | ANALYSIS NO | : LJ945/2006 |
| SAMPLING BY | : CUSTOMER | REPORT NO. | : L07091/2006 |
| FILE NAME | : \\LI\#_task\Programme\[illegible]\Soil\2006\Aug.DOC | | |

| PARAMETER | UNIT | METHOD OF ANALYSIS | RESULT ผัดังปลาสวัย LJ945/2006 | DETECTION LIMIT |
|---|---|---|---|---|
| **ORGANOPHOSPHATE PESTICIDES** | | | | |
| METHAMIDOPHOS | mg/kg (dry weight) | GAS CHROMATOGRAPHIC (PFPD) METHOD | ND | 0.2 |
| MONOCROTOPHOS | mg/kg (dry weight) | GAS CHROMATOGRAPHIC (PFPD) METHOD | ND | 0.2 |
| CHLORPYRIFOS | mg/kg (dry weight) | GAS CHROMATOGRAPHIC (PFPD) METHOD | ND | 0.2 |
| PROFENOFOS | mg/kg (dry weight) | GAS CHROMATOGRAPHIC (PFPD) METHOD | ND | 0.2 |
| TRIAZOPHOS | mg/kg (dry weight) | GAS CHROMATOGRAPHIC (PFPD) METHOD | ND | 0.2 |
| PHOSALONE | mg/kg (dry weight) | GAS CHROMATOGRAPHIC (PFPD) METHOD | ND | 0.2 |
| DIMETHOATE | mg/kg (dry weight) | GAS CHROMATOGRAPHIC (PFPD) METHOD | ND | 0.2 |
| METHYL PARATHION | mg/kg (dry weight) | GAS CHROMATOGRAPHIC (PFPD) METHOD | ND | 0.2 |
| MEVINPHOS | mg/kg (dry weight) | GAS CHROMATOGRAPHIC (PFPD) METHOD | ND | 0.2 |
| MALATHION | mg/kg (dry weight) | GAS CHROMATOGRAPHIC (PFPD) METHOD | ND | 0.2 |
| ETHOPROPHOS | mg/kg (dry weight) | GAS CHROMATOGRAPHIC (PFPD) METHOD | ND | 0.2 |
| METHIDATHION | mg/kg (dry weight) | GAS CHROMATOGRAPHIC (PFPD) METHOD | ND | 0.2 |
| EPN | mg/kg (dry weight) | GAS CHROMATOGRAPHIC (PFPD) METHOD | ND | 0.2 |

| PARAMETER | UNIT | METHOD OF ANALYSIS | RESULT | DETECTION LIMIT |
|---|---|---|---|---|
| | | | ไม่ริเริ่มสรัล LJ945/2006 | |
| **ORGANOCHLORINE PESTICIDES** | | | | |
| α-BHC | µg/kg (dry weight) | GAS CHROMATOGRAPHIC (ECD) METHOD | ND | 0.4 |
| β-BHC | µg/kg (dry weight) | GAS CHROMATOGRAPHIC (ECD) METHOD | ND | 0.4 |
| γ-BHC | µg/kg (dry weight) | GAS CHROMATOGRAPHIC (ECD) METHOD | ND | 0.4 |
| δ-BHC | µg/kg (dry weight) | GAS CHROMATOGRAPHIC (ECD) METHOD | ND | 0.4 |
| HEPTACHLOR | µg/kg (dry weight) | GAS CHROMATOGRAPHIC (ECD) METHOD | ND | 0.4 |
| ALDRIN | µg/kg (dry weight) | GAS CHROMATOGRAPHIC (ECD) METHOD | ND | 0.4 |
| HEPTACHLOR EPOXIDE | µg/kg (dry weight) | GAS CHROMATOGRAPHIC (ECD) METHOD | ND | 0.4 |
| ENDOSULFAN I | µg/kg (dry weight) | GAS CHROMATOGRAPHIC (ECD) METHOD | ND | 0.8 |
| p,p-DDE | µg/kg (dry weight) | GAS CHROMATOGRAPHIC (ECD) METHOD | ND | 0.7 |
| DIELDRIN | µg/kg (dry weight) | GAS CHROMATOGRAPHIC (ECD) METHOD | ND | 0.8 |
| ENDRIN | µg/kg (dry weight) | GAS CHROMATOGRAPHIC (ECD) METHOD | ND | 0.8 |
| ENDOSULFAN II | µg/kg (dry weight) | GAS CHROMATOGRAPHIC (ECD) METHOD | ND | 0.8 |
| p,p-DDD | µg/kg (dry weight) | GAS CHROMATOGRAPHIC (ECD) METHOD | ND | 1.2 |
| ENDRIN ALDEHYDE | µg/kg (dry weight) | GAS CHROMATOGRAPHIC (ECD) METHOD | ND | 1.2 |
| ENDOSULFAN SULFATE | µg/kg (dry weight) | GAS CHROMATOGRAPHIC (ECD) METHOD | ND | 1.2 |
| p,p-DDT | µg/kg (dry weight) | GAS CHROMATOGRAPHIC (ECD) METHOD | ND | 1.2 |
| SAMPLE CONDITION | | | BROWN MUD | |

ND : NON-DETECTABLE.

Benjawan V.

(MS. BENJAWAN VIRIYOTHAI)
UNIT MANAGER
AUGUST 30, 2006

Patcharee C.

(MS. PATCHAREE CHAROENSILPANITH)
TECHNICAL MANAGEMENT
AUGUST 30, 2006

(DR. PINITI RATANANUKUL)
LABORATORY SUPERVISOR
AUGUST 30, 2006


- DO NOT COPY PARTIAL OF THIS ANALYSIS REPORT WITHOUT OFFICIAL APPROVAL.
- REPORTED ANALYSIS REFERS TO SUBMITTED SAMPLE ONLY.

United Analyst and Engineering
17 Yotha Road, Talad Noi, Samphanthawong, Bangkok 10100
Tel. 0-2233-4027, 0-2235-5415, 0-2236-7[illegible] Fax. [illegible]
E-mail : uaecon@uaeth.com

# ANALYSIS REPORT

| | | | |
|---|---|---|---|
| CUSTOMER NAME | : FACULTY OF FISHERIES TECHNOLOGY AND AQUATIC SCIENCES, MAEJO UNIVERSITY | | |
| ADDRESS | : FACULTY OF FISHERIES TECHNOLOGY AND AQUATIC SCIENCES, MAEJO UNIVERSITY SANSAI, CHIANG MAI 50210 THAILAND. | | |
| SAMPLING SOURCE | : SOIL SAMPLES | | |
| SAMPLING DATE | : AUGUST 16, 2006 | RECEIVED DATE | : AUGUST 17, 2006 |
| SAMPLING TIME | : 11:00-14:00 HOUR | ANALYTICAL DATE | : AUGUST 17-29, 2006 |
| SAMPLING METHOD | : GRAB | ANALYSIS NO | : LJ946/2006 |
| SAMPLING BY | : CUSTOMER | REPORT NO. | : L07992/2006 |
| FILE NAME | : \\LI\#_task\Programme\[illegible]\Soil\2006\Aug DOC | | |

| PARAMETER | UNIT | METHOD OF ANALYSIS | RESULT บ้านท่าศาลา LJ946/2006 | DETECTION LIMIT |
|---|---|---|---|---|
| **ORGANOPHOSPHATE PESTICIDES** | | | | |
| METHAMIDOPHOS | mg/kg (dry weight) | GAS CHROMATOGRAPHIC (PFPD) METHOD | ND | 0.2 |
| MONOCROTOPHOS | mg/kg (dry weight) | GAS CHROMATOGRAPHIC (PFPD) METHOD | ND | 0.2 |
| CHLORPYRIFOS | mg/kg (dry weight) | GAS CHROMATOGRAPHIC (PFPD) METHOD | ND | 0.2 |
| PROFENOFOS | mg/kg (dry weight) | GAS CHROMATOGRAPHIC (PFPD) METHOD | ND | 0.2 |
| TRIAZOPHOS | mg/kg (dry weight) | GAS CHROMATOGRAPHIC (PFPD) METHOD | ND | 0.2 |
| PHOSALONE | mg/kg (dry weight) | GAS CHROMATOGRAPHIC (PFPD) METHOD | ND | 0.2 |
| DIMETHOATE | mg/kg (dry weight) | GAS CHROMATOGRAPHIC (PFPD) METHOD | ND | 0.2 |
| METHYL PARATHION | mg/kg (dry weight) | GAS CHROMATOGRAPHIC (PFPD) METHOD | ND | 0.2 |
| MEVINPHOS | mg/kg (dry weight) | GAS CHROMATOGRAPHIC (PFPD) METHOD | ND | 0.2 |
| MALATHION | mg/kg (dry weight) | GAS CHROMATOGRAPHIC (PFPD) METHOD | ND | 0.2 |
| ETHOPROPHOS | mg/kg (dry weight) | GAS CHROMATOGRAPHIC (PFPD) METHOD | ND | 0.2 |
| METHIDATHION | mg/kg (dry weight) | GAS CHROMATOGRAPHIC (PFPD) METHOD | ND | 0.2 |
| EPN | mg/kg (dry weight) | GAS CHROMATOGRAPHIC (PFPD) METHOD | ND | 0.2 |

United Analytical Engineering Consultants Co., Ltd.
17 Yotha Road, Talad Kwan, Min Buri, Bangkok 10510
Tel. 0-2203-0027, 0-2... Fax 0-2375-0004, E-mail : uaecon...

| PARAMETER | UNIT | METHOD OF ANALYSIS | RESULT ผ้า เท่าตาย LJ946/2006 | DETECTION LIMIT |
|---|---|---|---|---|
| **ORGANOCHLORINE PESTICIDES** | | | | |
| α-BHC | µg/kg (dry weight) | GAS CHROMATOGRAPHIC (ECD) METHOD | ND | 0.4 |
| β-BHC | µg/kg (dry weight) | GAS CHROMATOGRAPHIC (ECD) METHOD | ND | 0.4 |
| γ-BHC | µg/kg (dry weight) | GAS CHROMATOGRAPHIC (ECD) METHOD | ND | 0.4 |
| δ-BHC | µg/kg (dry weight) | GAS CHROMATOGRAPHIC (ECD) METHOD | ND | 0.4 |
| HEPTACHLOR | µg/kg (dry weight) | GAS CHROMATOGRAPHIC (ECD) METHOD | ND | 0.4 |
| ALDRIN | µg/kg (dry weight) | GAS CHROMATOGRAPHIC (ECD) METHOD | ND | 0.4 |
| HEPTACHLOR EPOXIDE | µg/kg (dry weight) | GAS CHROMATOGRAPHIC (ECD) METHOD | ND | 0.4 |
| ENDOSULFAN I | µg/kg (dry weight) | GAS CHROMATOGRAPHIC (ECD) METHOD | ND | 0.8 |
| p,p-DDE | µg/kg (dry weight) | GAS CHROMATOGRAPHIC (ECD) METHOD | ND | 0.8 |
| DIELDRIN | µg/kg (dry weight) | GAS CHROMATOGRAPHIC (ECD) METHOD | ND | 0.8 |
| ENDRIN | µg/kg (dry weight) | GAS CHROMATOGRAPHIC (ECD) METHOD | ND | 0.8 |
| ENDOSULFAN II | µg/kg (dry weight) | GAS CHROMATOGRAPHIC (ECD) METHOD | ND | 0.8 |
| p,p-DDD | µg/kg (dry weight) | GAS CHROMATOGRAPHIC (ECD) METHOD | ND | 1.2 |
| ENDRIN ALDEHYDE | µg/kg (dry weight) | GAS CHROMATOGRAPHIC (ECD) METHOD | ND | 1.2 |
| ENDOSULFAN SULFATE | µg/kg (dry weight) | GAS CHROMATOGRAPHIC (ECD) METHOD | ND | 1.2 |
| p,p-DDT | µg/kg (dry weight) | GAS CHROMATOGRAPHIC (ECD) METHOD | ND | 1.2 |
| SAMPLE CONDITION | | | BROWN MUD | |

ND : NON-DETECTABLE.

Benjawan V.

(MS. BENJAWAN VIRIYOTHAI)
UNIT MANAGER
AUGUST 30, 2006

Patcharee C.

(MS. PATCHAREE CHAROENSILPANITH)
TECHNICAL MANAGEMENT
AUGUST 30, 2006

(DR. PINITI RATANANUKUL)
LABORATORY SUPERVISOR
AUGUST 30, 2006

• DO NOT COPY PARTIAL OF THIS ANALYSIS REPORT WITHOUT OFFICIAL APPROVAL.
• REPORTED ANALYSIS REFERS TO SUBMITTED SAMPLE ONLY.

United Analyst and Engineering Consultant Co.,Ltd.
17 Vutha Road, Talad Noi Sub-district, Samphanthawong District, Bangkok 10100
Tel. 0 2723-4027, 0 2235-5445, 0 2237-0177, 0 2639 6004 Fax. (66) 2639-6005
E-mail: uae@uae.co.th

# ANALYSIS REPORT

| | | | |
|---|---|---|---|
| CUSTOMER NAME | : FACULTY OF FISHERIES TECHNOLOGY AND AQUATIC SCIENCES, MAEJO UNIVERSITY | | |
| ADDRESS | : FACULTY OF FISHERIES TECHNOLOGY AND AQUATIC SCIENCES, MAEJO UNIVERSITY, SANSAI, CHIANG MAI 50210 THAILAND. | | |
| SAMPLING SOURCE | : SOIL SAMPLES | | |
| SAMPLING DATE | : AUGUST 16, 2006 | RECEIVED DATE | : AUGUST 17, 2006 |
| SAMPLING TIME | : 11:00-14:00 HOUR | ANALYTICAL DATE | : AUGUST 17-29, 2006 |
| SAMPLING METHOD | : GRAB | ANALYSIS NO | : LJ947/2006 |
| SAMPLING BY | : CUSTOMER | REPORT NO. | : L07993/2006 |
| FILE NAME | : \\LI\#_task\Programme\[illegible]\Soil\2006\Aug.DOC | | |

| PARAMETER | UNIT | METHOD OF ANALYSIS | RESULT บ้านวังผา (ต้าพูน) LJ947/2006 | DETECTION LIMIT |
|---|---|---|---|---|
| **ORGANOPHOSPHATE PESTICIDES** | | | | |
| METHAMIDOPHOS | mg/kg (dry weight) | GAS CHROMATOGRAPHIC (PFPD) METHOD | ND | 0.2 |
| MONOCROTOPHOS | mg/kg (dry weight) | GAS CHROMATOGRAPHIC (PFPD) METHOD | ND | 0.2 |
| CHLORPYRIFOS | mg/kg (dry weight) | GAS CHROMATOGRAPHIC (PFPD) METHOD | ND | 0.2 |
| PROFENOFOS | mg/kg (dry weight) | GAS CHROMATOGRAPHIC (PFPD) METHOD | ND | 0.2 |
| TRIAZOPHOS | mg/kg (dry weight) | GAS CHROMATOGRAPHIC (PFPD) METHOD | ND | 0.2 |
| PHOSALONE | mg/kg (dry weight) | GAS CHROMATOGRAPHIC (PFPD) METHOD | ND | 0.2 |
| DIMETHOATE | mg/kg (dry weight) | GAS CHROMATOGRAPHIC (PFPD) METHOD | ND | 0.2 |
| METHYL PARATHION | mg/kg (dry weight) | GAS CHROMATOGRAPHIC (PFPD) METHOD | ND | 0.2 |
| MEVINPHOS | mg/kg (dry weight) | GAS CHROMATOGRAPHIC (PFPD) METHOD | ND | 0.2 |
| MALATHION | mg/kg (dry weight) | GAS CHROMATOGRAPHIC (PFPD) METHOD | ND | 0.2 |
| ETHOPROPHOS | mg/kg (dry weight) | GAS CHROMATOGRAPHIC (PFPD) METHOD | ND | 0.2 |
| METHIDATHION | mg/kg (dry weight) | GAS CHROMATOGRAPHIC (PFPD) METHOD | ND | 0.2 |
| EPN | mg/kg (dry weight) | GAS CHROMATOGRAPHIC (PFPD) METHOD | ND | 0.2 |

United Analysis and Engineering Consultants
17 Yo... Road, Tambon ... Amphur ... Bangkok ...
Tel. ... Fax. ...
E-mail: ...

| PARAMETER | UNIT | METHOD OF ANALYSIS | RESULT ท้ายน้ำเขา (ล้าหุบ) LJ947/2006 | DETECTION LIMIT |
|---|---|---|---|---|
| **ORGANOCHLORINE PESTICIDES** | | | | |
| α-BHC | µg/kg (dry weight) | GAS CHROMATOGRAPHIC (ECD) METHOD | ND | 0.4 |
| β-BHC | µg/kg (dry weight) | GAS CHROMATOGRAPHIC (ECD) METHOD | ND | 0.4 |
| γ-BHC | µg/kg (dry weight) | GAS CHROMATOGRAPHIC (ECD) METHOD | ND | 0.4 |
| δ-BHC | µg/kg (dry weight) | GAS CHROMATOGRAPHIC (ECD) METHOD | ND | 0.4 |
| HEPTACHLOR | µg/kg (dry weight) | GAS CHROMATOGRAPHIC (ECD) METHOD | ND | 0.4 |
| ALDRIN | µg/kg (dry weight) | GAS CHROMATOGRAPHIC (ECD) METHOD | ND | 0.4 |
| HEPTACHLOR EPOXIDE | µg/kg (dry weight) | GAS CHROMATOGRAPHIC (ECD) METHOD | ND | 0.4 |
| ENDOSULFAN I | µg/kg (dry weight) | GAS CHROMATOGRAPHIC (ECD) METHOD | ND | 0.8 |
| p,p-DDE | µg/kg (dry weight) | GAS CHROMATOGRAPHIC (ECD) METHOD | ND | 0.8 |
| DIELDRIN | µg/kg (dry weight) | GAS CHROMATOGRAPHIC (ECD) METHOD | ND | 0.8 |
| ENDRIN | µg/kg (dry weight) | GAS CHROMATOGRAPHIC (ECD) METHOD | ND | 0.8 |
| ENDOSULFAN II | µg/kg (dry weight) | GAS CHROMATOGRAPHIC (ECD) METHOD | ND | 0.8 |
| p,p-DDD | µg/kg (dry weight) | GAS CHROMATOGRAPHIC (ECD) METHOD | ND | 1.2 |
| ENDRIN ALDEHYDE | µg/kg (dry weight) | GAS CHROMATOGRAPHIC (ECD) METHOD | ND | 1.2 |
| ENDOSULFAN SULFATE | µg/kg (dry weight) | GAS CHROMATOGRAPHIC (ECD) METHOD | ND | 1.2 |
| p,p-DDT | µg/kg (dry weight) | GAS CHROMATOGRAPHIC (ECD) METHOD | ND | 1.2 |
| SAMPLE CONDITION | | | BROWN MUD | |

ND : NON-DETECTABLE

Benjawan V.

(MS BENJAWAN VIRIYOTHAI)
UNIT MANAGER
AUGUST 30, 2006

Patcharee C.

(MS. PATCHAREE CHAROENSILPANITH)
TECHNICAL MANAGEMENT
AUGUST 30, 2006

(DR. PINITI RATANANUKUL)
LABORATORY SUPERVISOR
AUGUST 30, 2006

• DO NOT COPY PARTIAL OF THIS ANALYSIS REPORT WITHOUT OFFICIAL APPROVAL.
• REPORTED ANALYSIS REFERS TO SUBMITTED SAMPLE ONLY.