ผลของสารคลอร์ไพริฟอสต่อการทำงานของเอนไซม์อะเซทิลโคลินเอสเทอเรสในสมอง พลาสมา และเม็ดเลือดแดงของปลานิล

Effects of Chlorpyrifos on Acetylcholinesterase Activity in the Brain, Plasma and Red Blood Cell of Nile Tilapia (*Oreochromis niloticus*)

พิทยา นิตยาชิตร (Pittaya Nittayachit)[1]
ศักดิ์สิทธิ์ จันทร์ไทย (Saksit Chanthai)[2]
รักพงษ์ เพชรคำ (Rakpong Petkam)[3]

บทคัดย่อ

การศึกษาอิทธิพลของสารคลอร์ไพริฟอสที่มีผลกระทบต่อการทำงานของเอนไซม์อะเซทิลโคลินเอสเทอเรสในสมอง พลาสมา และเม็ดเลือดแดงของปลานิล ใช้ปลานิลคละเพศจำนวน 160 ตัว นำมาพักไว้ในตู้กระจกที่บรรจุน้ำ 30 ลิตรต่อตู้ จำนวนตู้ละ 10 ตัว แบ่งปลาออกเป็น 4 กลุ่มๆ ละ 4 ซ้ำ โดยเลี้ยงปลานิลในน้ำที่มีสารคลอร์ไพริฟอสที่ระดับความเข้มข้น 0, 0.025, 0.25 และ 2.5 ไมโครกรัมต่อลิตร เก็บตัวอย่างสมอง พลาสมา และเม็ดเลือดแดงของปลานิลภายหลังจากที่ได้ให้สารแก่สัตว์ทดลองแล้วเป็นเวลา 0, 24, 48, 72 และ 96 ชั่วโมง เพื่อวัดระดับการทำงานของเอนไซม์อะเซทิลโคลินเอสเทอเรสในตัวอย่างทั้ง 3 ชนิดพบว่า ระดับการทำงานของเอนไซม์อะเซทิลโคลินเอสเทอเรสในตัวอย่างดังกล่าวมีค่าลดลง โดยการทำงานของเอนไซม์อะเซทิลโคลินเอสเทอเรสจะลดลงมากขึ้นเมื่อปลาได้รับสารคลอร์ไพริฟอสในระดับความเข้มข้นที่สูงขึ้น

ABSTRACT

Effects of chlorpyrifos on acetylcholinesterase (AChE) activity in the brain, plasma and red blood cells of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) were investigated using 160 mixed sex Nile tilapia. Fish were allocated into glass aquaria using 10 fish each. Treatments were applied by exposing to chlorpyrifos at 0, 0.025, 0.25 and 2.5 microgram/liter with 4 replications. The brain, plasma and red blood cell samples were collected at 0, 24, 48, 72 and 96 hours after chlorpyrifos exposure, followed by determination of AChE activity. It was found that the AChE activity of samples exposed to chlorpyrifos was generally decreased and the degree of decrease correlated with dose applied.

คำสำคัญ: การทำงานของเอนไซม์อะเซทิลโคลินเอสเทอเรส, คลอร์ไพริฟอส, ปลานิล
Keywords: Acetylcholinesterase activity, Chlorpyrifos, Nile Tilapia

[1]*นักศึกษาหลักสูตรวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาการประมง คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น*
[2]*รองศาสตราจารย์ ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น*
[3]*ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ภาควิชาประมง คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น*

บทนำ

คลอร์ไพริฟอส (chlorpyrifos) จัดเป็นสารกำจัดแมลงที่อยู่ในประเภทออร์แกโนฟอสเฟต (organophosphate insecticides) กลุ่มฟอสโฟโรไธโอเนต (phosphorothionates) มีชื่อทางเคมีว่า *O*, *O*-diethyl-*O*-(3,5,6-trichloro-2-pyridyl) phosphorothioate มีสูตรโมเลกุล $C_9H_{11}Cl_3NO_3PS$ น้ำหนักโมเลกุล 350.6 คลอร์ไพริฟอสบริสุทธิ์มีลักษณะเป็นของแข็งไม่มีสีกลิ่นฉุน หลอมละลายที่อุณหภูมิ 42-43.5 องศาเซลเซียส ละลายน้ำได้น้อย ละลายได้ดีในตัวทำละลายอินทรีย์ (วินัย, 2535) จัดเป็นสารกำจัดแมลงประเภทไม่ดูดซึม สามารถใช้กำจัดแมลงได้หลายชนิด ทั้งชนิดที่อยู่ตามบ้านเรือน เช่น ยุง มด แมลงสาบ และแมลงศัตรูพืชต่างๆ เช่น หนอน เพลี้ย ด้วง อีกทั้งยังใช้กำจัดแมลงศัตรูในโรงเก็บและผลิตผลการเกษตรหลังการเก็บเกี่ยวด้วย เนื่องจากมีความคงทนและสลายตัวได้อย่างช้าๆ (รัตนา และคณะ, 2537) ด้วยเหตุผลที่มีความสามารถในการกำจัดแมลงได้หลายชนิดและราคาถูก จึงเป็นผลให้คลอร์ไพริฟอสเป็นสารกำจัดแมลงที่มีการนำเข้ามาใช้กันอย่างกว้างขวางและใช้ปริมาณมากในประเทศไทย โดยมีปริมาณการนำเข้าสูงถึง 1,300 ตัน ในปี พ.ศ. 2546 (กรมวิชาการเกษตร, 2548) ทั้งนี้การใช้สารกำจัดแมลงในปริมาณมากและติดต่อกันเป็นเวลานาน ทำให้มีความวิตกกังวลว่าอาจก่อให้เกิดการปนเปื้อนของสารเคมีเหล่านี้ในสิ่งแวดล้อม เป็นผลให้สิ่งมีชีวิตอื่นที่ไม่ใช่สิ่งมีชีวิตเป้าหมาย (non-target organisms) มีความเสี่ยงในการได้รับสารเคมีเหล่านี้เข้าสู่ร่างกาย (Venkateswara Rao, 2004) ซึ่งอาจเป็นผลให้สิ่งมีชีวิตเหล่านั้นตายหรืออาจเป็นสาเหตุทำให้เกิดการรบกวนกระบวนการทางสรีรวิทยาของสิ่งมีชีวิตเหล่านั้นได้ ในกรณีที่ได้รับสารเหล่านั้นในปริมาณต่ำและไม่ทำให้ตาย โดยเฉพาะอย่างยิ่ง สัตว์น้ำซึ่งมีความเสี่ยงต่อการได้รับสารเคมีเหล่านี้อย่างหลีกเลี่ยงไม่ได้จากการชะล้างของสารพิษที่ตกค้างในดินและหน้าดินลงสู่แหล่งน้ำ โดยการซึมผ่านน้ำใต้ดินและการไหลบ่าของน้ำเมื่อฝนตก (Bretaud et al., 2000)

คลอร์ไพริฟอสจัดได้ว่าเป็นสารกำจัดแมลงที่มีพิษต่อสัตว์น้ำสูง โดยมีค่าระดับความเข้มข้นที่ทำให้สัตว์ทดลองตายครึ่งหนึ่ง (median lethal concentration ; LC_{50}) ภายในระยะเวลาที่กำหนดอยู่ในระดับความเข้มข้นที่ต่ำ เช่น มีค่า LC_{50} ที่ 96 ชั่วโมง ในปลา Inland silverside (*Menidia beryllina*), Longnose killifish (*Fundulus similes*), Striped bass (*Morone saxatilis*) และ Fathead minnow (*Pimephales promelas*) ที่ระดับความเข้มข้น 4.2, 4.1, 0.58 และ 0.13 ไมโครกรัมต่อลิตร ตามลำดับ เป็นต้น (Odenkirchen and Eisler, 1988) เมื่อสัตว์น้ำได้รับและดูดซึมสารพิษชนิดนี้เข้าสู่ร่างกายจะก่อให้เกิดความเป็นพิษต่อระบบประสาท โดยสารพิษชนิดนี้จะไปยับยั้งการทำงานของเอนไซม์อะเซทิลโคลินเอสเทอเรส (acetylcholinesterase ; AChE) เป็นผลให้อะเซทิลโคลิน (acetylcholine ; ACh) ซึ่งเป็นสารสื่อสัญญาณประสาท (neurotransmitter) ไม่ถูกไฮโดรไลซ์ (hydrolyze) นำไปสู่การสะสมของอะเซทิลโคลินที่บริเวณเซนทรัลโคลินเนอจิคซินแนพส์ (central cholinergic synapses) ทำให้ตัวรับสัญญาณโคลิน (cholinergic receptors) บริเวณเซลล์ประสาทหลังซินแนพส์ถูกกระตุ้นอยู่ตลอดเวลา จึงทำให้ระบบประสาทส่วนต่างๆ ในร่างกายทำงานผิดปกติ และในกรณีที่มีการตกค้างของสารพิษนี้ในปริมาณมากอาจทำให้สัตว์น้ำตายได้ (Carvalho et al., 2003 ; Usmani et al., 2004) ตัวอย่างเช่น ในปลา Chinook salmon (*Oncorhynchus tshawytscha*) การทำงานของเอนไซม์อะเซทิลโคลินเอสเทอเรสจะเริ่มลดลงเมื่อปลาได้รับที่ระดับความเข้มข้น 1.2 ไมโครกรัมต่อลิตร แต่เมื่อได้รับที่ระดับความเข้มข้น 7.3 ไมโครกรัมต่อลิตร จะเป็นผลให้การทำงานของเอนไซม์อะเซทิลโคลินเอสเทอเรสในสมองและกล้ามเนื้อลดลงถึงร้อยละ 85 และ 92 ตามลำดับ (Wheelock et al., 2005) หรือในปลาหางนกยูง (*Poecilia reticulata*) เมื่อได้รับในระดับที่เกือบทำให้ตายต่อเนื่องกันเป็นเวลา 2 สัปดาห์ มีผลให้ระดับการทำงานของเอนไซม์อะเซทิลโคลินเอสเทอเรสลดลงถึงร้อยละ 80-90 (Van der Wel and Welling, 1989) เป็นต้น นอกจากความเป็นพิษต่อการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์อะเซทิลโคลินเอสเทอเรสแล้ว สารพิษชนิดนี้ยังมีผลต่อระบบการทำงานอื่นๆ ในสัตว์น้ำด้วย

เช่น มีผลทำให้เกิดความผิดปกติของรูปร่างของลูกปลาเพิ่มมากขึ้น สร้างความเสียหายและมีผลต่อการพัฒนาเซลล์กล้ามเนื้อในลูกปลา โดยเฉพาะอย่างยิ่ง การพัฒนาของเซลล์กล้ามเนื้อประสาท (neuromuscular) ทั้งยังทำให้จำนวนและการรอดตายของลูกปลาที่ได้จากพ่อแม่พันธุ์ที่ได้รับสารคลอร์ไพริฟอสลดต่ำลง (Jarvinen et al., 1983 ; Colombo et al., 2005 ; De Silva and Samayawardhena, 2005) เป็นต้น

การศึกษานี้จึงมุ่งเน้นที่จะศึกษาผลของสารคลอร์ไพริฟอสที่ระดับความเข้มข้นแตกต่างกันต่อระดับการทำงานของเอนไซม์อะเซทิลโคลินเอสเทอเรสในสมอง พลาสมา และเม็ดเลือดแดงของปลานิล ซึ่งใช้ปลานิลเป็นสัตว์ทดลองเนื่องจากเป็นปลาน้ำจืดเศรษฐกิจที่มีการเลี้ยงกันอย่างแพร่หลายและพบได้โดยทั่วไปในแหล่งน้ำธรรมชาติภายในประเทศ โดยใช้การเปลี่ยนแปลงของระดับการทำงานของเอนไซม์อะเซทิลโคลินเอสเทอเรสในเนื้อเยื่อหรืออวัยวะของปลาเป็นตัวบ่งชี้อย่างหนึ่งของการปนเปื้อนของสารพิษชนิดนี้ในแหล่งน้ำนั้นๆ ซึ่งอาจนำมาประยุกต์ใช้เป็นข้อมูลหนึ่งในการศึกษาด้านมลพิษทางสิ่งแวดล้อมและนิเวศวิทยา นอกจากนี้ ยังสามารถนำไปสู่การหาแนวทางการแก้ปัญหาสิ่งแวดล้อมได้ในอนาคตอีกด้วย

วัสดุ อุปกรณ์และวิธีการ

การเตรียมปลานิล

ใช้ปลานิลพันธุ์จิตรลดา 3 ที่มีน้ำหนักเฉลี่ย 84.34±18.62 กรัม ความยาวเฉลี่ย 17.15±1.60 เซนติเมตร นำมาพักไว้ในตู้กระจกขนาด 255030 เซนติเมตร ที่บรรจุน้ำ 30 ลิตรต่อตู้ จำนวนตู้ละ 10 ตัว ทั้งหมด 16 ตู้ เป็นเวลาอย่างน้อย 7 วันก่อนเริ่มการทดลอง เพื่อให้ปรับสภาพเข้ากับสภาพการทดลองในห้องปฏิบัติการ ภายใต้ช่วงแสงธรรมชาติ มีการเติมอากาศโดยใช้ปั๊มลม ให้อาหารเม็ดสำเร็จรูปขนาดกลาง วันละ 2 ครั้ง เช้า-เย็น มีการดูดตะกอนเปลี่ยนถ่ายน้ำทุกวัน วันละ 30 ลิตรต่อตู้ โดยใช้น้ำประปาที่พักไว้ในถังเก็บน้ำขนาด 200 ลิตร จำนวน 5 ถัง ที่มีการเติมอากาศและพักไว้อย่างน้อย 1 วัน เติมน้ำให้เต็มเท่าระดับเดิม

จากนั้นแบ่งปลาออกเป็น 4 ชุดการทดลอง ชุดละ 4 ซ้ำ โดยเลี้ยงปลานิลในน้ำที่มีสารคลอร์ไพริฟอสปนเปื้อนที่ระดับความเข้มข้น 0 (กลุ่มควบคุม), 0.025, 0.25 และ 2.5 ไมโครกรัมต่อลิตร ตามลำดับ

การเตรียมสารละลายคลอร์ไพริฟอส

เตรียมสารละลายคลอร์ไพริฟอส โดยเตรียมสารละลายเข้มข้นคลอร์ไพริฟอส (stock solution) นำสารคลอร์ไพริฟอส (เคก้า บริษัทเจียไต๋ จำกัด มีปริมาณสารออกฤทธิ์ร้อยละ 40) ปริมาตร 7.5 มิลลิลิตร มาเจือจางในน้ำกลั่นจนสารละลายเข้มข้นมีปริมาตรสุดท้ายเท่ากับ 120 มิลลิลิตร จะได้สารละลายเข้มข้นคลอร์ไพริฟอสที่มีความเข้มข้นของสารออกฤทธิ์เท่ากับ 0.025 ไมโครกรัมต่อไมโครลิตร ส่วนการให้สารคลอร์ไพริฟอสแก่สัตว์ทดลอง กระทำโดยเติมสารละลายเข้มข้นคลอร์ไพริฟอสปริมาตร 30, 300 และ 3,000 ไมโครลิตรต่อตู้ เพื่อให้น้ำที่ใช้ในการทดลองมีการปนเปื้อนของสารคลอร์ไพริฟอสที่ระดับความเข้มข้น 0.025, 0.25 และ 2.5 ไมโครกรัมต่อลิตร ในชุดการทดลองที่ 2, 3 และ 4 ตามลำดับ ในระหว่างการทดลองเป็นระยะเวลา 96 ชั่วโมง มีการดูดตะกอนและเปลี่ยนถ่ายน้ำทุกวัน วันละ 30 ลิตรต่อตู้ และมีการเติมสารละลายเข้มข้นคลอร์ไพริฟอสที่ปริมาตรเท่าเดิมในแต่ละชุดการทดลอง เพื่อให้น้ำที่ใช้ในแต่ละชุดการทดลองมีความเข้มข้นของสารคลอร์ไพริฟอสที่ต้องการศึกษาเท่าเดิม

การเก็บตัวอย่างพลาสมาและเม็ดเลือดแดงของปลานิล

ทำการสุ่มเก็บตัวอย่างพลาสมาของปลานิลตามวิธีการของ Chuiko et al. (2003) และสุ่มเก็บตัวอย่างเม็ดเลือดแดงของปลานิลโดยดัดแปลงวิธีการเก็บตัวอย่างจากวิธีการของ Thetkathuek et al. (2005) โดยทำการสุ่มเก็บตัวอย่างเลือดปลานิลทุกซ้ำๆ ละ 1 ตัว ในชั่วโมงที่ 0, 24, 48, 72 และ 96 หลังจากเริ่มการทดลอง ส่วนการเก็บตัวอย่างสมองนั้น กระทำหลังจากเมื่อเก็บตัวอย่างเลือดปลาแต่ละตัวเสร็จแล้ว โดยใช้มีดที่คมผ่าเปิดกะโหลกปลาจากด้านบน แล้วเก็บตัวอย่างสมองทั้งหมดตามวิธีการของ Chuiko (2000) ซึ่งใน

ทุกขั้นตอนการปฏิบัติงานจะกระทำภายใต้ความเย็น อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส หรือบนถาดน้ำแข็ง

ในระหว่างดำเนินการทดลองมีการตรวจสอบคุณสมบัติของน้ำ ซึ่งได้แก่ อุณหภูมิ ปริมาณออกซิเจนที่ละลายน้ำ (DO) และความเป็นกรดหรือด่าง (pH)

การวิเคราะห์การทำงานของเอนไซม์อะเซทิลโคลินเอสเทอเรส

รวบรวมตัวอย่างที่ได้มาวิเคราะห์หาระดับการทำงานของเอนไซม์อะเซทิลโคลินเอสเทอเรสโดยประยุกต์ใช้ตามวิธีการของ Ellman et al. (1961) ซึ่งอาศัยหลักในการวัดอัตราการผลิตสารไธโอโคลิน (thiocholine) จากการสลายตัวของอะเซทิลไธโอโคลิน (acetylthiocholine) ซึ่งจะทำปฏิกิริยาต่อเนื่องกับสารไดไธโอบิสไนโตรเบนโซเอท (dithiobisnitrobenzoate) จะได้ 2-ไนโตร-5-เมอร์แค็พโตเบนโซเอท (2-nitro-5-mercaptobenzoate) และเกิดสารสีเหลือง โดยมีการทำปฏิกิริยาในไมโครไทเทอเพลท 96 หลุม (96 well microtiter plate) สารสีเหลืองที่เกิดขึ้นจะนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่นแสง 412 นาโนเมตร ด้วยเครื่องอ่านไมโครเพลท (microplate reader) และนำค่าการดูดกลืนแสงที่ได้ไปคำนวณหาระดับการทำงานของเอนไซม์อะเซทิลโคลินเอสเทอเรสในตัวอย่างที่ต้องการศึกษาในลำดับต่อไป มีหน่วยเป็นไมโครโมลของไธโอโคลินต่อนาทีต่อมิลลิกรัมโปรตีน ส่วนการวิเคราะห์หาปริมาณโปรตีนที่ละลายอยู่ในสารละลายโดยใช้ Bradford Reagent ตามวิธีการของ Bradford (1976) ดำเนินการในไมโครไทเทอเพลท 96 หลุม เช่นเดียวกัน และวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่นแสง 595 นาโนเมตร

การวิเคราะห์ทางสถิติ

วิเคราะห์หาความแตกต่างทางสถิติโดยใช้วิธีวิเคราะห์ความแปรปรวน (Analysis of Variance: ANOVA) เมื่อพบว่ามีความแตกต่างทางสถิติระหว่างชุดการทดลอง จึงมีการเปรียบเทียบค่าความแตกต่างระหว่างค่าเฉลี่ยในแต่ละชุดการทดลองด้วยวิธี Duncan's New Multiple Range Test (DMRT) ที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 ($P<0.05$) โดยใช้โปรแกรมสำเร็จรูป SAS version 6.12 for Windows

ผลการทดลอง

ระดับการทำงานของเอนไซม์อะเซทิลโคลินเอสเทอเรสและร้อยละการลดลงของการทำงานของเอนไซม์อะเซทิลโคลินเอสเทอเรสในสมอง พลาสมา และเม็ดเลือดแดงของปลานิลเมื่อเปรียบเทียบระหว่างกลุ่มควบคุมกับกลุ่มที่ได้รับสารคลอร์ไพริฟอสที่ระดับความเข้มข้นแตกต่างกัน ตามระยะเวลาที่กำหนด แสดงไว้ในตารางที่ 1 ซึ่งพบว่าระดับการทำงานของเอนไซม์อะเซทิลโคลินเอสเทอเรสที่ตอบสนองต่อความเข้มข้นของคลอร์ไพริฟอสที่ระดับความเข้มข้นแตกต่างกันนั้นมีแนวโน้มว่า ที่ระดับความเข้มข้นของคลอร์ไพริฟอสที่สูงขึ้นระดับการทำงานของเอนไซม์อะเซทิลโคลินเอสเทอเรสจะลดลง หรือกล่าวอีกนัยหนึ่งว่า เมื่อระดับความเข้มข้นของคลอร์ไพริฟอสสูงขึ้นการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์อะเซทิลโคลินเอสเทอเรสจะสูงขึ้นตามไปด้วย อย่างไรก็ตามการลดลงของระดับการทำงานของเอนไซม์อะเซทิลโคลินเอสเทอเรสนั้น ไม่ได้เป็นสัดส่วนโดยตรงกับระดับความเข้มข้นของคลอร์ไพริฟอสที่เพิ่มขึ้นอย่างชัดเจน

ก่อนเริ่มการทดลองระดับการทำงานของเอนไซม์อะเซทิลโคลินเอสเทอเรสในสมองของปลานิลทุกกลุ่มการทดลองไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ ($P>0.05$) แต่เมื่อปลานิลได้รับสารคลอร์ไพริฟอสที่ระดับความเข้มข้นแตกต่างกัน ตามเวลาที่กำหนด ระดับการทำงานของเอนไซม์อะเซทิลโคลินเอสเทอเรสในสมองของปลานิลที่ได้รับสารคลอร์ไพริฟอสที่ระดับความเข้มข้น 2.5 ไมโครกรัมต่อลิตร มีความแตกต่างทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญ ($P<0.05$) กับกลุ่มควบคุมที่ไม่ได้รับสารคลอร์ไพริฟอส ทุกช่วงเวลาภายหลังจากได้รับสาร ในขณะที่กลุ่มที่ได้รับสารดังกล่าวที่ระดับความเข้มข้น 0.25 ไมโครกรัมต่อลิตร มีระดับการทำงานของเอนไซม์อะเซทิลโคลินเอสเทอเรสในสมองแตกต่างทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญ ($P<0.05$) กับกลุ่มควบคุม

ภายหลังจากได้รับสารเป็นเวลา 24 และ 96 ชั่วโมง แต่ไม่แตกต่างทางสถิติกับกลุ่มควบคุมในช่วงเวลา 48 และ 72 ชั่วโมงภายหลังจากได้รับสารพิษ และกลุ่มที่ได้รับสารคลอร์ไพริฟอสที่ระดับความเข้มข้น 0.025 ไมโครกรัมต่อลิตร ระดับการทำงานของเอนไซม์อะเซทิลโคลินเอสเทอเรสในสมองมีค่าลดลงเมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุมแต่ไม่มีความแตกต่างทางสถิติ ($P>0.05$) กับกลุ่มควบคุมทุกช่วงเวลาภายหลังจากได้รับสาร ส่วนระดับการทำงานของเอนไซม์อะเซทิลโคลินเอสเทอเรสในปลานิลทั้ง 3 กลุ่มที่ได้รับสารพิษนั้น การทำงานของเอนไซม์อะเซทิลโคลินเอสเทอเรสในสมองของปลานิลทั้ง 3 กลุ่มการทดลองมีความแตกต่างทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญทุกกลุ่มการทดลอง ($P<0.05$) ภายหลังจากปลานิลได้รับสารพิษเป็นเวลา 24 และ 96 ชั่วโมง แต่ไม่มีความแตกต่างทางสถิติของระดับการทำงานของเอนไซม์อะเซทิลโคลินเอสเทอเรสในสมองของปลานิลเมื่อปลานิลทั้ง 3 กลุ่มการทดลองได้รับสารพิษเป็นเวลา 48 และ 72 ชั่วโมง (ตารางที่ 1 และภาพที่ 1)

ในพลาสมาของปลานิล ก่อนเริ่มการทดลองระดับการทำงานของเอนไซม์อะเซทิลโคลินเอสเทอเรสไม่มีความแตกต่างทางสถิติ ($P>0.05$) ในทุกกลุ่มการทดลอง แต่ภายหลังจากที่ปลานิลได้รับสารคลอร์ไพริฟอสที่ระดับความเข้มข้นแตกต่างกัน ตามเวลาที่กำหนด ปลานิลที่ได้รับสารคลอร์ไพริฟอสที่ระดับความเข้มข้น 2.5 ไมโครกรัมต่อลิตร เป็นเวลา 48 ชั่วโมง มีผลทำให้ระดับการทำงานของเอนไซม์อะเซทิลโคลินเอสเทอเรสในพลาสมาของปลานิลมีความแตกต่างทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญ ($P<0.05$) กับกลุ่มควบคุม ในทำนองเดียวกัน เมื่อปลานิลได้รับสารคลอร์ไพริฟอสเป็นเวลา 72 ชั่วโมง มีผลทำให้ระดับการทำงานของเอนไซม์อะเซทิลโคลินเอสเทอเรสในพลาสมาของปลานิลทุกกลุ่มการทดลองที่ได้รับสารมีความแตกต่างทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญ ($P<0.05$) กับกลุ่มควบคุมเช่นเดียวกัน ในขณะที่ในช่วงเวลาอื่นนอกจากที่ได้กล่าวมาแล้วภายหลังจากที่ปลานิลได้รับสารคลอร์ไพริฟอส ค่าที่ได้ไม่มีความแตกต่างทางสถิติกับกลุ่มควบคุม ($P>0.05$) เช่น ในช่วงเลา 96 ชั่วโมงภายหลังจากได้รับสารพิษเป็นต้น และปลานิลกลุ่มที่ได้รับสารพิษทั้ง 3 กลุ่มการทดลองนั้น มีเพียงในช่วงเวลาที่ได้รับสารพิษแล้ว 24 ชั่วโมงเท่านั้น ที่ระดับการทำงานของเอนไซม์อะเซทิลโคลินเอสเทอเรสในพลาสมาของปลานิลกลุ่มที่ได้รับสารที่ระดับความเข้มข้นต่ำสุดมีความแตกต่างทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญ ($P<0.05$) กับกลุ่มที่ได้รับสารที่ระดับความเข้มข้นสูงสุด (ตารางที่ 1 และภาพที่ 2)

ก่อนเริ่มการทดลองระดับการทำงานของเอนไซม์อะเซทิลโคลินเอสเทอเรสในเม็ดเลือดแดงของปลานิลไม่มีความแตกต่างทางสถิติ ($P>0.05$) ในทุกกลุ่มการทดลอง ส่วนระดับการทำงานของเอนไซม์อะเซทิลโคลินเอสเทอเรสในเม็ดเลือดแดงของปลานิลภายหลังจากได้รับสารคลอร์ไพริฟอสเป็นเวลา 96 ชั่วโมงแล้วนั้น พบว่า ปลานิลที่ได้รับสารคลอร์ไพริฟอสที่ระดับความเข้มข้น 0.25 และ 2.5 ไมโครกรัมต่อลิตร มีระดับการทำงานของเอนไซม์อะเซทิลโคลินเอสเทอเรสในเม็ดเลือดแดงแตกต่างทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญ ($P<0.05$) กับกลุ่มควบคุมในทุกช่วงเวลาภายหลังจากได้รับสาร ในขณะที่กลุ่มที่ได้รับสารดังกล่าวที่ระดับความเข้มข้น 0.025 ไมโครกรัมต่อลิตร มีระดับการทำงานของเอนไซม์อะเซทิลโคลินเอสเทอเรสในเม็ดเลือดแดงแตกต่างทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญ ($P<0.05$) กับกลุ่มควบคุมภายหลังจากได้รับสารพิษเป็นเวลา 96 ชั่วโมงเท่านั้น โดยกลุ่มการทดลองทั้ง 3 ที่ได้รับสารพิษนั้น กลุ่มที่ได้รับสารที่ระดับความเข้มข้น 0.025 ไมโครกรัมต่อลิตร มีระดับการทำงานของเอนไซม์อะเซทิลโคลินเอสเทอเรสในเม็ดเลือดแดงแตกต่างทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญ ($P<0.05$) กับกลุ่มที่ได้รับสารที่ระดับความเข้มข้น 0.25 ไมโครกรัมต่อลิตร ในช่วงเวลา 24, 48 และ 96 ชั่วโมงภายหลังจากได้รับสาร และแตกต่างทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญ ($P<0.05$) กับกลุ่มที่ได้รับสารที่ระดับความเข้มข้น 2.5 ไมโครกรัมต่อลิตร ในทุกช่วงเวลาภายหลังจากได้รับสารดังกล่าว ในขณะที่กลุ่มที่ได้รับสารที่ระดับความเข้มข้น 0.25 ไมโครกรัมต่อลิตรนั้น มีระดับการทำงานของเอนไซม์อะเซทิลโคลินเอสเทอเรสในเม็ดเลือดแดงแตกต่างทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญ ($P<0.05$) กับกลุ่มที่ได้รับสารที่ระดับความเข้มข้น 2.5 ไมโครกรัมต่อลิตร ในช่วงเวลา 72 ชั่วโมงภายหลังจากได้รับสารพิษ (ตารางที่ 1 และภาพที่ 3)

สำหรับอัตราส่วนของระดับการทำงานของเอนไซม์อะเซทิลโคลินเอสเทอเรสในสมองต่อพลาสมาต่อเม็ดเลือดแดงของปลานิลก่อนและหลังได้รับสารคลอร์ไพริฟอสที่ระดับที่ต้องการศึกษา ตามเวลาที่กำหนด แสดงในตารางที่ 2 พบว่า ในตัวอย่างทั้ง 3 ส่วนของปลานิล ตัวอย่างสมอง เป็นตัวอย่างที่มีระดับการทำงานของเอนไซม์อะเซทิลโคลินเอสเทอเรสสูงที่สุด โดยมีค่าสูงกว่าตัวอย่างพลาสมาอย่างน้อย 10 เท่า และตัวอย่างเม็ดเลือดแดงอย่างน้อย 1,000 เท่า

วิจารณ์ผลการทดลอง

จากผลการทดลองพบการตอบสนองของการทำงานของเอนไซม์อะเซทิลโคลินเอสเทอเรสต่อสารคลอร์ไพริฟอสในสมอง พลาสมา และเม็ดเลือดแดงของปลานิลเมื่อปลานิลได้รับสารดังกล่าวภายในเวลาเพียง 24 ชั่วโมง แม้ในระดับความเข้มข้นที่ต่ำสุดก็ตาม ซึ่งสอดคล้องกับงานทดลองของ Karen et al. (1998) ที่ได้ทำการศึกษาในปลา *Fundulus heteroclitus* (mummichog) และพบว่าระดับการทำงานของเอนไซม์อะเซทิลโคลินเอสเทอเรสจะเริ่มถูกยับยั้งหลังจากปลาได้รับคลอร์ไพริฟอสแล้วประมาณ 6 ชั่วโมง ที่ความเข้มข้นต่ำเพียง 1.25 ไมโครกรัมต่อลิตร แต่ทั้งนี้การตอบสนองของการทำงานของเอนไซม์อะเซทิลโคลินเอสเทอเรสในตัวอย่างทั้ง 3 ส่วนของปลานิลต่อคลอร์ไพริฟอสถึงแม้จะเป็นไปในทิศทางเดียวกัน แต่ตัวอย่างทั้ง 3 ส่วนไม่ได้มีผลต่อการตอบสนองต่อสารเหมือนๆ กัน กล่าวคือ คลอร์ไพริฟอสมีผลต่อการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์อะเซทิลโคลินเอสเทอเรสในตัวอย่างทั้ง 3 ส่วนของปลานิล แต่ไม่มีผลทำให้การยับยั้งการทำงานของเอนไซม์อะเซทิลโคลินเอสเทอเรสในตัวอย่างทั้ง 3 ส่วนนั้นลดลงในปริมาณที่เท่ากัน ซึ่งเป็นผลมาจากการตอบสนองของเนื้อเยื่อของสิ่งมีชีวิตต่อสารพิษที่แตกต่างกันออกไป ดังการศึกษาของ Chuiko et al. (2003) และ Venkateswara Rao (2004) ที่แสดงให้เห็นว่า ปลาชนิดเดียวกันและต่างชนิดกัน หรือแม้กระทั่งในปลาตัวเดียวกันแต่ในเนื้อเยื่อที่แตกต่างกัน ล้วนมีผลต่อปริมาณและการตอบสนองของอะเซทิลโคลินเอสเทอเรสต่อสารพิษที่แตกต่างกันด้วยเช่นกัน

ในระหว่างการทดลอง ภายหลังจากปลานิลได้รับสารคลอร์ไพริฟอสในระดับความเข้มข้นที่กำหนด ถึงแม้ว่าปลานิลที่ได้รับสารกำจัดแมลงดังกล่าวจะมีผลให้ระดับการทำงานของเอนไซม์อะเซทิลโคลินเอสเทอเรสในตัวอย่างทั้ง 3 ส่วนของปลานิลลดลง แต่ไม่พบความผิดปกติในพฤติกรรมการกินอาหาร การว่ายน้ำ การหายใจ และการเปลี่ยนแปลงอื่นๆ ที่จะสังเกตเห็นได้จากความเป็นพิษของสารกำจัดแมลงในการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์อะเซทิลโคลินเอสเทอเรสในเนื้อเยื่อต่างๆ เช่น ชักกระตุกเกร็ง เสียการทรงตัว ซึม ไม่เคลื่อนไหวหรือเป็นอัมพาต ลำตัวมีสีคล้ำ มีจุดเลือดออกที่ครีบ มีเลือดคั่งที่เหงือก กระดูกสันหลังผิดรูป ลำตัวคด การกินอาหารลดลง หรือตายในที่สุด (Stoskopf, 1993 ; Osweiler, 1996 ; Aiello and Mays, 1998) ซึ่งสอดคล้องกับข้อมูลของ มาลินี (2527) และ วรา (2534) ที่กล่าวไว้ว่า หากพบว่าระดับการทำงานของเอนไซม์อะเซทิลโคลินเอสเทอเรสในเนื้อเยื่อลดต่ำลงกว่าร้อยละ 25 ของระดับปกติในสภาวะสัตว์ปกติ แสดงว่าสัตว์อาจเกิดความเป็นพิษจากสารกำจัดแมลงกลุ่มออร์แกโนฟอสเฟตและคาร์บาเมตได้ ทั้งที่ไม่ปรากฏอาการผิดปกติภายนอกแต่อย่างใด

ระดับการทำงานของเอนไซม์อะเซทิลโคลินเอสเทอเรสในพลาสมาของปลานิลภายหลังจากได้รับสารคลอร์ไพริฟอสที่ระดับความเข้มข้น 0.025 ไมโครกรัมต่อลิตร เป็นเวลา 24 ชั่วโมง โดยวิธีการผสมในน้ำที่ใช้เลี้ยงปลานั้น กลับพบว่า มีผลทำให้ระดับการทำงานของเอนไซม์อะเซทิลโคลินเอสเทอเรสเพิ่มขึ้น โดยมีร้อยละการลดลงของการทำงานของเอนไซม์อะเซทิลโคลินเอสเทอเรสเท่ากับ -9.19 เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม ซึ่งเป็นไปได้ว่า อาจเกิดจากการที่ปลานิลในกลุ่มนี้ที่ได้รับสารกำจัดแมลงในระดับความเข้มข้นต่ำมากมีการปรับตัวและสร้างเอนไซม์อะเซทิลโคลินเอสเทอเรสขึ้นมาทดแทนเพื่อให้ระดับการทำงานของเอนไซม์อะเซทิลโคลินเอสเทอเรสที่ลดลงให้กลับเข้าสู่ระดับที่สามารถดำรงชีวิตอยู่ได้ (Szabo et al., 1992) ทั้งนี้ยังไม่มีรายงานที่ระบุแน่ชัด

ถึงระดับความเข้มข้นต่ำของสารพิษที่ออกฤทธิ์ต่อเอนไซม์อะเซทิลโคลินเอสเทอเรสว่าจะเกิดผลทางตรงกันข้ามที่จะกระตุ้นให้ระดับการทำงานของเอนไซม์อะเซทิลโคลินเอสเทอเรสในเนื้อเยื่อของสิ่งมีชีวิตเพิ่มขึ้นได้

ระดับการทำงานของเอนไซม์อะเซทิลโคลินเอสเทอเรสในพลาสมาของปลานิลภายหลังจากได้รับสารคลอร์ไพริฟอสเป็นเวลา 96 ชั่วโมง มีระดับลดลงมากกว่าช่วงเวลาอื่น อาจเป็นผลมาจากในระหว่างทำการสุ่มดูดเก็บตัวอย่างเลือดนั้น ในระหว่างการปฏิบัติงานได้มีการนำตัวอย่างเลือดแช่เก็บรักษาไว้ในน้ำแข็งเพื่อรอทำการปั่นเหวี่ยงแยกพลาสมา ซึ่งมีบางตัวอย่างได้เกิดการแข็งตัวไปบางส่วน โดยทั้งนี้อาจเกิดเนื่องจากการมีปริมาณของเฮปารินในกระบอกฉีดยาไม่เพียงพอที่จะป้องกันไม่ทำให้เลือดแข็งตัวได้ จึงเป็นผลให้เมื่อนำตัวอย่างเลือดดังกล่าวไปปั่นเหวี่ยงแยกพลาสมา จึงอาจมีเม็ดเลือดแดงบางส่วนที่แตกมาปะปนกับส่วนของพลาสมาด้วยเช่นกัน จึงอาจทำให้ระดับการทำงานของเอนไซม์อะเซทิลโคลินเอสเทอเรสในพลาสมาที่ได้จากการอ่านค่าการดูดกลืนแสงต่างจากความเป็นจริงได้ (Thetkathuek et al., 2005) และการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์อะเซทิลโคลินเอสเทอเรสในตัวอย่างทั้ง 3 ส่วนของปลานิลภายหลังจากได้รับสารคลอร์ไพริฟอสแล้วนั้น พบว่า เมื่อปลานิลได้รับสารคลอร์ไพริฟอสที่ระดับความเข้มข้นหนึ่งๆ เป็นเวลานานขึ้น ไม่มีผลทำให้ระดับการทำงานของเอนไซม์อะเซทิลโคลินเอสเทอเรสในเนื้อเยื่อทั้ง 3 ลดลงมากขึ้น

จากผลการทดลองในครั้งนี้อาจยังไม่สามารถนำไปเปรียบเทียบหาปริมาณการปนเปื้อนของสารคลอร์ไพริฟอสในแหล่งน้ำตามธรรมชาติหรือสิ่งแวดล้อมได้ถูกต้องแม่นยำมากนัก เพียงสามารถบ่งบอกได้เพียงคร่าวๆ เท่านั้น โดยสังเกตได้จากการลดลงของระดับการทำงานของเอนไซม์อะเซทิลโคลินเอสเทอเรสในสัตว์น้ำตามธรรมชาติแล้วเทียบเคียงกับผลการทดลองในครั้งนี้ ซึ่งยังไม่สามารถระบุปริมาณที่แน่ชัดในการตกค้างของสารพิษชนิดนี้ในสิ่งแวดล้อมนั้นๆ ได้ เนื่องจากอาจมีปัจจัยอื่นๆ ในสิ่งแวดล้อมและในระหว่างดำเนินการทดลองเข้ามามีผลกระทบต่อการตอบสนองของสัตว์น้ำต่อสารชนิดนี้ได้ ตัวอย่างเช่น อาจมีสารพิษบางชนิดที่สามารถยับยั้งการทำงานของเอนไซม์อะเซทิลโคลินเอสเทอเรสในสัตว์น้ำตกค้างอยู่ในสิ่งแวดล้อมนั้นๆ ผลจากความบอบช้ำเนื่องจากการขนส่งปลานิลจากฟาร์มมาสู่ห้องทดลอง ความเครียดจากการที่ถูกจำกัดอยู่ในตู้เนื่องจากยังไม่สามารถปรับตัวได้ รวมไปถึงความเครียดจากการเลี้ยงอย่างหนาแน่น เป็นต้น ปัจจัยเหล่านี้อาจส่งผลต่อการตอบสนองของการทำงานของเอนไซม์อะเซทิลโคลินเอสเทอเรสต่อสารพิษได้ด้วยเช่นกัน (Barata et al., 2004)

สำหรับคุณภาพน้ำในระหว่างการทดลอง มีค่าเฉลี่ยดังนี้ อุณหภูมิของน้ำ 27.16 องศาเซลเซียส ปริมาณออกซิเจนที่ละลายในน้ำ 5.38 ส่วนในล้านส่วน (ppm) และความเป็นกรดด่าง 7.02 ซึ่งค่าที่ได้อยู่ในช่วงที่เหมาะสมต่อการดำรงชีวิตของสัตว์น้ำ (วิรัช, 2544)

สรุปผลการทดลอง

จากการทดลองเปรียบเทียบอิทธิพลของระดับความเข้มข้นที่แตกต่างกันของสารคลอร์ไพริฟอสต่อการทำงานของเอนไซม์อะเซทิลโคลินเอสเทอเรสในสมอง พลาสมา และเม็ดเลือดแดงของปลานิล สรุปได้ว่าในสภาวะปกติของปลานิล สมองเป็นตัวอย่างที่มีระดับการทำงานของเอนไซม์อะเซทิลโคลินเอสเทอเรสสูงที่สุด รองลงมาคือ พลาสมา และเม็ดเลือดแดงมีระดับการทำงานของเอนไซม์อะเซทิลโคลินเอสเทอเรสต่ำที่สุด โดยสารคลอร์ไพริฟอสมีผลทำให้ระดับการทำงานของเอนไซม์อะเซทิลโคลินเอสเทอเรสในสมอง พลาสมา และเม็ดเลือดแดงของปลานิลลดลงภายหลังจากปลานิลได้รับสารดังกล่าวตามช่วงเวลาที่กำหนด และโดยภาพรวมแล้วพบว่าระดับการทำงานของเอนไซม์อะเซทิลโคลินเอสเทอเรสในตัวอย่างทั้ง 3 ส่วนของปลานิลมีแนวโน้มลดลง เมื่อได้รับคลอร์ไพริฟอสในระดับความเข้มข้นที่สูงขึ้น ซึ่งการที่สามารถวัดความเป็นพิษของสารคลอร์ไพริฟอสโดยอาศัยการวัดระดับการทำงานของเอนไซม์อะเซทิลโคลินเอสเทอเรสในตัวอย่างทั้ง 3 ส่วนของปลานิลได้นั้น สามารถนำไปประยุกต์ใช้ประโยชน์ได้เป็นอย่างดี ในกรณีที่ต้องการตรวจสอบความเป็นพิษของสารคลอร์ไพริฟอสที่มีต่อสัตว์ โดย

ไม่ต้องการฆ่าสัตว์ทดลอง ซึ่งสามารถเก็บตัวอย่างเพียงพลาสมาอย่างเดียวก็สามารถตรวจสอบความเป็นพิษของสารดังกล่าวต่อปลาได้

กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบคุณบัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยขอนแก่น ภายใต้โครงการวิจัยประเภทเงินทุนอุดหนุนและส่งเสริมการทำวิทยานิพนธ์ ปีงบประมาณ 2549 และสำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย ภายใต้โครงการทุนวิจัยมหาบัณฑิต สกว. สาขาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี ปีงบประมาณ 2549 (MRG-W II) ที่ได้สนับสนุนเงินทุนในการวิจัยครั้งนี้ ขอขอบคุณคณาจารย์ภาควิชาประมง คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่นและคุณยุพาพร อังกูรขจร ที่มีส่วนช่วยให้งานวิจัยครั้งนี้สำเร็จด้วยดี

เอกสารอ้างอิง

กรมวิชาการเกษตร. 2548. **สถิติการนำเข้าวัตถุอันตรายทางการเกษตร**. [ออนไลน์]. 1 ธันวาคม 2548. เข้าถึงได้จาก: http://www.doa.go.th/toxic/toxic-46.pdf

มาลินี ลิ้มโภคา. 2527. **พิษวิทยาและปัญหาที่พบในสัตว์**. พิมพ์ครั้งที่ 2. กรุงเทพฯ: โรงพิมพ์จรัลสนิทวงศ์.

รัตนา สิตะยัง, นวลศรี ทยาพัชร และวิภา ตั้งนิพนธ์. 2537. ศึกษาปริมาณสารพิษตกค้างของคลอร์ไพริฟอสในกระบวนการผลิตน้ำมันถั่วเหลืองโดยใช้เทคนิคทางนิวเคลียร์. **ข่าวสารวัตถุมีพิษ** 21(2): 51-59.

วรา พานิชเกรียงไกร. 2534. **เภสัชวิทยาตามระบบทางสัตวแพทย์**. พิมพ์ครั้งที่ 2. กรุงเทพฯ: ภาควิชาเภสัชวิทยา คณะสัตวแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.

วินัย ปิติยนต์. 2535. วิธีวิเคราะห์สารออกฤทธิ์วัตถุมีพิษ วิธีวิเคราะห์คลอไพริฟอส (chlorpyrifos). **ข่าวสารวัตถุมีพิษ** 19(2): 80-84.

วิรัช จิ๋วแหยม. 2544. **ความรู้เบื้องต้นเกี่ยวกับคุณภาพน้ำและการวิเคราะห์คุณภาพน้ำในบ่อเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำ**.กรุงเทพฯ: สำนักพิมพ์แห่งจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.

Aiello, SE., and Mays, A. 1998. **The merck veterinary manual**. 8th editions. Philadelphia: MERCK & CO. INC.

Barata, C., Solayan, A., and Porte, C. 2004. Role of B-esterases in assessing toxicity of organophosphorus (chlorpyrifos, malathion) and cabamate (carbofuran) pesticides to *Daphnia magna*. **Aquatic toxicology** 66: 125-139.

Bradford, MM. 1976. A rapid sensitive for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry** 72: 248-254.

Bretaud, S., Toutant, J-P., and Saglino, P. 2000. Effect of carbofuran, diuron and nicosulfuron on acetylcholinesterase activity in goldfish (*Carassius auratus*). **Ecotoxicology and Environmental Safety** 47: 117-124.

Carvalho, FD., Machado, I., Sánchez Martínez, M., Soares, A., and Guilhermino, L. 2003. Use of atropine-treated *Daphnia magna* survival for detection of environmental contamination by acetylcholinesterase inhibitors. **Ecotoxicology and Environmental Safety** 53: 43-46.

Chuiko, GM. 2000. Comparative study of acetylcholinesterase and butyrylcholinesterase in brain and serum of several freshwater fish: specific activities and in vitro inhibition by DDVP, an organophosphorus pesticide. **Comparative Biochemistry and Physiology Part C** (127): 233-242.

Chuiko, GM., Podgornaya, VA., and Zhelnin, YY. 2003. Acetylcholinesterase and butyrylcholinesterase activities in brain and plasma of freshwater teleosts: cross-species and cross-family differences. **Comparative Biochemistry and Physiology Part B** (135): 56-61.

Colombo, A., Orsi, F., and Bonfanti, P. 2005. Exposure to the organophosphorus pesticide chlorpyrifos inhibits acetylcholinesterase activity and affects muscular integrity in *Xenopus laevis* larvae. **Chemosphere** 61(11): 1665-1671.

De Silva, PMCS., and Samayawardhena, LA. 2005. Effects of chlorpyrifos on reproductive performances of guppy (*Poecilia reticulate*). **Chemosphere** 58: 1293-1299.

Ellman, GL., Courtney, KD., Andres, V., and Featherstone, RM. 1961. A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. **Biochemical Pharmacology** 7: 88-95.

Jarvinen, AW., Nordling, BR., and Henry, ME. 1983. Chronic toxicity of dursban (chlorpyrifos) to the fathead minnow (*Pimephales promelas*) and the resultant acetylcholinesterase inhibition. **Ecotoxicology and Environmental Safety** 7(4): 423-434.

Karen, DJ., Draughn, R., Fulton, M., and Ross, P. 1998. Bone strength and acetylcholinesterase inhibition as endpoints in chlorpyrifos toxicity to *Fundulus heteroclitus*. **Pesticide Biochemistry and Physiology** 60: 167-175.

Odenkirchen, WE., and Eisler, R. 1988. **Chlorpyrifos hazards to fish, wildlife and invertebrates: a synoptic review**. U.S. Fish and Wildlife Service Biological Report.

Osweiler, GD. 1996. **Toxicology**. Philadelphia: Williams & Wilkins.

Stoskopf, MK. 1993. **Fish medicine**. Philadelphia: W.B. Saunders.

Szabo, A., Nemcsok, J., Asztalos, B., Rakonczay, Z., Kasa, P., and Hien, LH. 1992. The effect of pesticides on carp (*Cyprinus carpio*) acetylcholinesterase and its biochemical characterization. **Ecotoxicology and Environmental Safety** 23(1): 39-45.

Thetkathuek, A., Keifer, M., Fungladda, W., Kaewkungwal, J., Padungtod, C., Wilson, B., and Mankhetkorn, S. 2005. Spectrophotometric determination of plasma and red blood cell cholinesterase activity of 53 fruit farm workers pre- and post-exposed chlorpyrifos for one fruit crop. **Chemical and Pharmaceutical Bulletin** 53(4): 422-424.

Usmani, KA., Hodgson, E., and Rose, RL. 2004. In vitro metabolism of carbofuran by human, mouse and rat cytochrome P450 and interactions with chlorpyrifos, testosterone and estradiol. **Chemico-Biological Interactions** 150: 221-232.

Van der Wel, H., and Welling, W. 1989. Inhibition of acetylcholinesterase in guppies (*Poecilia reticulata*) by chlorpyrifos at sublethal concentrations: methodological aspects. **Ecotoxicology and Environmental Safety** 17(2): 205-215.

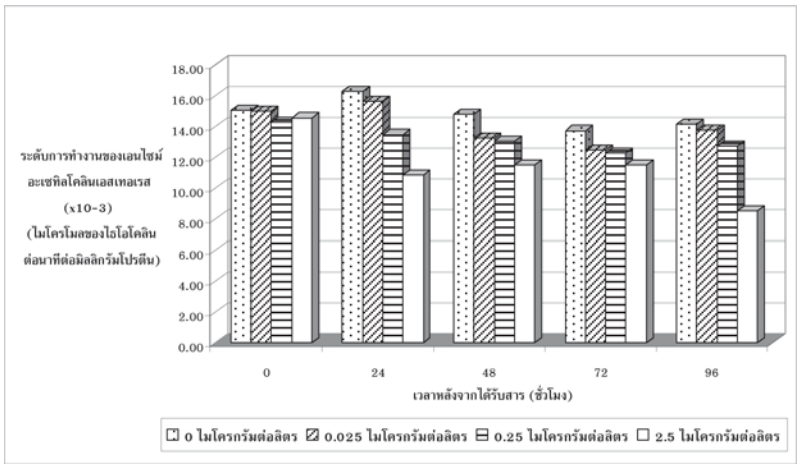
Venkateswara Rao, J. 2004. Effects of monocrotophos and its analogs in acetylcholinesterase activityอs inhibition and its pattern of recovery on euryhaline fish, *Oreochromis mossambicus*. **Ecotoxicology and Environmental Safety** 59: 217-222.

Wheelock, CE., Eder, KJ., Werner, I., Huang, H., Jones, PD., Brammell, BF., Elskus, AA., and Hammock, BD. 2005. Individual variability in esterase activity and CYP1A levels in Chinook salmon (*Oncorhynchus tshawytscha*) exposed to esfenvalerate and chlorpyrifos. **Aquatic Toxicology** 74: 172-192.

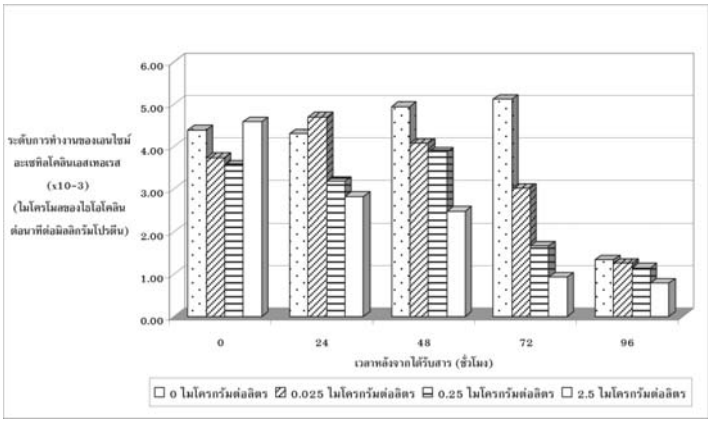
ตารางที่ 1. ระดับการทำงานของเอนไซม์อะเซทิลโคลินเอสเทอเรส และร้อยละการลดลงของการทำงานของเอนไซม์อะเซทิลโคลินเอสเทอเรสในสมอง พลาสมา และเม็ดเลือดแดงของปลานิลเมื่อได้รับสารคลอร์ไพริฟอสในระดับที่ต้องการศึกษา

ระยะเวลาของการได้รับสาร (ชม.)	ความเข้มข้นของสาร (ไมโครกรัม/ลิตร)	ระดับการทำงานของเอนไซม์อะเซทิลโคลินเอสเทอเรส (10^{-3})[1]			ร้อยละการลดลงของการทำงานของเอนไซม์อะเซทิลโคลินเอสเทอเรส		
		สมอง (n=4)	พลาสมา (n=4)	เม็ดเลือดแดง (n=4)	สมอง (n=4)	พลาสมา (n=4)	เม็ดเลือดแดง (n=4)
0	0	15.03±1.65^{a}	4.39±0.81^{a}	0.0035±0.0004^{a}	0.00	0.00	0.00
	0.025	14.97±1.74^{a}	3.73±0.78^{a}	0.0032±0.0003^{a}	0.45	15.05	7.62
	0.25	14.28±1.32^{a}	3.55±0.77^{a}	0.0035±0.0002^{a}	5.03	19.15	-2.33
	2.5	14.55±0.69^{a}	4.58±1.25^{a}	0.0033±0.0002^{a}	3.20	-4.35	3.15
24	0	16.25±1.22^{a}	4.30±1.10^{ab}	0.0030±0.0005^{a}	0.00	0.00	0.00
	0.025	15.60±1.84^{a}	4.69±1.32^{a}	0.0028±0.0004^{a}	3.96	-9.19	8.84
	0.25	13.46±0.50^{b}	3.18±0.50^{ab}	0.0018±0.0004^{b}	17.18	26.10	39.33
	2.5	10.83±0.57^{c}	2.82±0.75^{b}	0.0016±0.0002^{b}	33.35	34.46	46.69
48	0	14.78±2.35^{a}	4.93±2.11^{a}	0.0031±0.0004^{a}	0.00	0.00	0.00
	0.025	13.21±1.07^{ab}	4.08±1.17^{ab}	0.0028±0.0001^{a}	10.63	17.41	9.14
	0.25	13.01±2.24^{ab}	3.87±0.34^{ab}	0.0021±0.0002^{b}	11.99	21.57	32.70
	2.5	11.48±0.97^{b}	2.47±0.41^{b}	0.0018±0.0004^{b}	22.33	49.95	40.04
72	0	13.72±1.42^{a}	5.11±2.03^{a}	0.0033±0.0004^{a}	0.00	0.00	0.00
	0.025	12.44±0.93^{ab}	3.01±1.59^{b}	0.0029±0.0005^{ab}	9.32	41.14	12.12
	0.25	12.27±0.13^{ab}	1.66±0.57^{b}	0.0026±0.0004^{b}	10.55	67.50	21.22
	2.5	11.46±0.74^{b}	0.93±0.05^{b}	0.0020±0.0001^{c}	16.45	81.80	39.99
96	0	14.15±1.04^{a}	1.34±0.23^{a}	0.0038±0.0003^{a}	0.00	0.00	0.00
	0.025	13.73±0.51^{a}	1.26±0.48^{a}	0.0030±0.0002^{b}	2.96	5.81	23.03
	0.25	12.70±0.42^{b}	1.15±0.37^{a}	0.0019±0.0002^{c}	10.24	14.24	49.24
	2.5	8.51±0.45^{c}	0.79±0.21^{a}	0.0016±0.0003^{c}	39.81	41.28	58.32

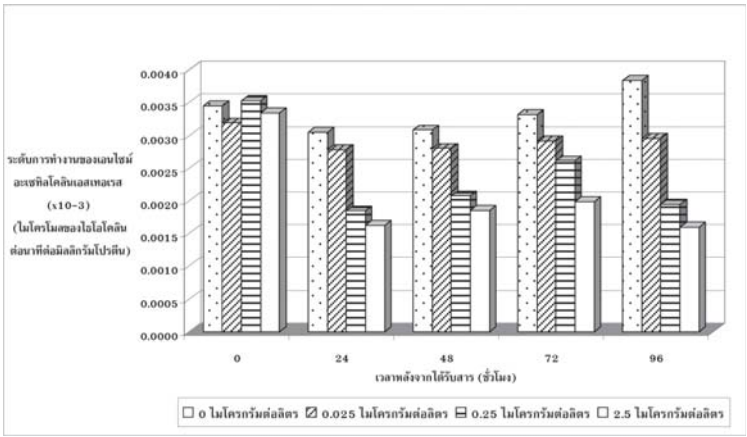
[1] ค่าเฉลี่ยที่กำกับด้วยตัวอักษรเหมือนกันในแนวตั้งเดียวกันของแต่ละช่วงเวลาหลังการได้รับสาร ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ (P>0.05, DMRT)



ภาพที่ 1. ร้อยละการลดลงของการทำงานของเอนไซม์อะเซทิลโคลินเอสเทอเรสในสมองของปลานิลเมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม ภายหลังจากได้รับสารคลอร์ไพริฟอสความเข้มข้นที่กำหนด เป็นเวลา 0 ถึง 96 ชั่วโมง



ภาพที่ 2. ร้อยละการลดลงของการทำงานของเอนไซม์อะเซทิลโคลินเอสเทอเรสในพลาสมาของปลานิลเมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม ภายหลังจากได้รับสารคลอร์ไพริฟอสความเข้มข้นที่กำหนด เป็นเวลา 0 ถึง 96 ชั่วโมง



ภาพที่ 3. ร้อยละการลดลงของการทำงานของเอนไซม์อะเซทิลโคลินเอสเทอเรสในเม็ดเลือดแดงของปลานิลเมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม ภายหลังจากได้รับสารคลอร์ไพริฟอสความเข้มข้นที่กำหนด เป็นเวลา 0 ถึง 96 ชั่วโมง

ตารางที่ 2. อัตราส่วนของระดับการทำงานของเอนไซม์อะเซทิลโคลินเอสเทอเรสในสมองต่อพลาสมาต่อเม็ดเลือดแดงของปลานิลที่ได้รับสารคลอร์ไพริฟอสความเข้มข้นที่กำหนด เมื่อได้รับสารเป็นเวลาต่างๆ กัน

ระยะเวลาของการได้รับสาร (ชม.)	ความเข้มข้นของสาร (ไมโครกรัม/ลิตร)	อัตราส่วนของระดับการทำงานของเอนไซม์อะเซทิลโคลินเอสเทอเรส		
		เม็ดเลือดแดง	พลาสมา	สมอง
0	0	1.00±0.00	1292.41±331.60	4384.20±622.29
	0.025	1.00±0.00	1162.67±159.03	4722.05±693.14
	0.25	1.00±0.00	1006.00±212.18	4067.29±614.43
	2.5	1.00±0.00	1373.70±378.97	4357.33±146.37
24	0	1.00±0.00	1483.68±639.12	5458.12±1049.26
	0.025	1.00±0.00	1723.98±549.46	5726.45±1177.06
	0.25	1.00±0.00	1811.11±604.30	7525.11±1545.99
	2.5	1.00±0.00	1749.50±459.90	6761.54±1009.24
48	0	1.00±0.00	1556.97±554.53	4826.07±795.12
	0.025	1.00±0.00	1446.58±377.72	4718.34±389.82
	0.25	1.00±0.00	1895.87±371.90	6382.28±1607.08
	2.5	1.00±0.00	1396.12±437.93	6359.59±1057.76
72	0	1.00±0.00	1560.77±628.22	4228.64±921.15
	0.025	1.00±0.00	1002.13±352.65	4341.62±518.08
	0.25	1.00±0.00	643.75±230.57	4775.19±689.36
	2.5	1.00±0.00	468.09±29.84	5764.27±334.88
96	0	1.00±0.00	351.43±72.50	3698.75±319.83
	0.025	1.00±0.00	420.33±128.72	4656.38±254.80
	0.25	1.00±0.00	597.59±214.90	6569.41±725.58
	2.5	1.00±0.00	513.47±200.51	5448.65±876.44