ตัววัดทางชีวภาพสำหรับติดตามผลกระทบของสารกำจัดศัตรูพืชกลุ่มออร์กาโนคลอรีนที่ตกค้างในสิ่งแวดล้อมของหอยกาบน้ำจืด

นางสาวชญาธร บุญลือ

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต
สาขาวิชาวิทยาศาสตร์สิ่งแวดล้อม (สหสาขาวิชา)
บัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
ปีการศึกษา 2550
ลิขสิทธิ์ของจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

BIOMARKERS FOR MONITORING ENVIRONMENTAL IMPACTS OF ORGANOCHLORINE PESTICIDE RESIDUES ON FRESHWATER MUSSELS

Miss Chayathorn Boonlue

A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements
for the Degree of Master of Science Program in Environmental science
(Interdisciplinary Program)
Graduate School
Chulalongkorn University
Academic Year 2007
Copyright of Chulalongkorn University

501464

Thesis Title	BIOMARKERS FOR MONITORING ENVIRONMENTAL IMPACTS OF ORGANOCHLORINE PESTICIDE RESIDUES ON FRESHWATER MUSSELS
By	Miss Chayathorn Boonlue
Field of Study	Environmental science
Thesis Advisor	Noppadon Kitana, Ph.D.
Thesis Co-advisor	Assistant Professor Pakorn Varanusupakul, Ph.D.

Accepted by the Graduate School, Chulalongkorn University in Partial Fulfillment of the Requirements for the Master's Degree

Vice President
..... Acting Dean of the Graduate School
(Assistant Professor M.R. Kalaya Tingsabadh, Ph.D.)

THESIS COMMITTEE

..... Chairman
(Assistant Professor Charnwit Khositanon, Ph.D.)

..... Thesis Advisor
(Noppadon Kitana, Ph.D.)

..... Thesis Co-advisor
(Assistant Professor Pakorn Varanusupakul, Ph.D.)

..... Member
(Associate Professor Nattaya Ngamrojanavanich, Ph.D.)

..... Member
(Jirarach Srijunngam, Ph.D.)

ชญาธร บุญลือ : ตัววัดทางชีวภาพสำหรับติดตามผลกระทบของสารกำจัดศัตรูพืชกลุ่มออร์กาโนคลอรีนที่ตกค้างในสิ่งแวดล้อมของหอยกาบน้ำจืด. (BIOMARKERS FOR MONITORING ENVIRONMENTAL IMPACTS OF ORGANOCHLORINE PESTICIDE RESIDUES ON FRESHWATER MUSSELS) อาจารย์ที่ปรึกษา: อ.ดร. นพดล กิตนะ, อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม: ผศ.ดร. ปกรณ์ วรานุศุภากุล, 89 หน้า.

ประเทศไทยเป็นประเทศเกษตรกรรมที่มีพื้นที่ทางการเกษตรมากถึง 53% ของพื้นที่ประเทศ ทำให้มีการใช้สารเคมีทางการเกษตรปริมาณมากเพื่อป้องกันและกำจัดศัตรูพืช การใช้สารกำจัดศัตรูพืชกลุ่มออร์กาโนคลอรีน (Organochlorine pesticides; OCPs) ในอดีต ได้ก่อปัญหาทางสิ่งแวดล้อมในปัจจุบัน เพราะเป็นสารที่ย่อยสลายตามธรรมชาติได้ยากและสามารถสะสมอยู่ในร่างกายของสิ่งมีชีวิตได้ ข้อมูลการปนเปื้อนของ OCPs ในระบบนิเวศจึงมีความสำคัญต่อการติดตามปัญหาสิ่งแวดล้อม ในงานวิจัยนี้ได้ศึกษาตัววัดทางชีวภาพ (Biomarker) 2 ชนิด คือ โปรตีนไวเทลโลจีนิน (Vitellogenin; vtg) และ เอนไซม์กลูตาไทโอนเอสทรานสเฟอร์เรส (glutathione S-transferase; GST) ในหอยกาบน้ำจืด ที่พบในพื้นที่เกษตรกรรมรังสิต คลอง 7 จังหวัดปทุมธานี ตั้งแต่เดือนมีนาคม 2549 ถึงเดือนมีนาคม 2550 โดยศึกษาการปนเปื้อนของสารในกลุ่ม OCPs 7 กลุ่ม ได้แก่ กลุ่มเอชซีเอช เฮปตาคลอร์ อัลดริน และ ดีลดริน เอ็นดริน เอ็นโดซัลแฟน ดีดีที และ เมทอกซีคลอร์ ที่ตกค้างอยู่ในตัวอย่างดินตะกอนและหอยกาบน้ำจืดที่เก็บได้ 3 ชนิด ได้แก่ *Uniandra contradens ascia*, *Pilsbryoconcha exilis exilis* และ *Hyriopsis* (*Limnoscapha*) *desowitzi* พบว่ามีปริมาณการตกค้างของสารกลุ่ม OCPs ในทุกตัวอย่างและพบตกค้างในตัวหอยกาบน้ำจืดมากกว่าในดิน กลุ่มที่พบในปริมาณมากของทุกช่วงการเก็บตัวอย่าง คือ กลุ่มเอชซีเอช กลุ่มดีดีที กลุ่มเฮปตาคลอร์ และ กลุ่มเอ็นโดซัลแฟน โดยปริมาณที่พบอยู่ระหว่าง 6.93-15.33 μg/kg ในดินตะกอน และระหว่าง 6.93-15.33 μg/kg ในตัวอย่างหอยกาบน้ำจืดทั้ง 3 ชนิด ซึ่งปริมาณการปนเปื้อนในฤดูฝน (เดือนมิถุนายน-พฤศจิกายน) จะสูงกว่าในช่วงฤดูหนาวและฤดูร้อน (ธันวาคม-มีนาคม) อย่างมีนัยสำคัญ ทั้งนี้ปริมาณของสารกลุ่ม OPCs ที่พบในหอยมีค่าต่ำกว่าระดับมาตรฐานการปนเปื้อนตามประกาศของกระทรวงสาธารณสุข ในการศึกษาปริมาณโปรตีนไวเทลโลจีนิน และ เอนไซม์กลูตาไทโอนเอสทรานสเฟอร์เรสในหอยกาบน้ำจืดทั้ง 3 ชนิด ด้วยวิธี ELISA และ สเปคโตรโฟโตเมตรี ตามลำดับ พบว่าปริมาณโปรตีน vtg และ เอนไซม์ GST มีการเปลี่ยนแปลงไปตามช่วงระยะเวลาที่เก็บตัวอย่าง และมีความสอดคล้องอย่างมีนัยสำคัญกับปริมาณสารกำจัดศัตรูพืชที่ตกค้างในดินและในหอยกาบน้ำจืด แสดงให้เห็นว่าหอยกาบน้ำจืดที่พบในแหล่งน้ำใกล้พื้นที่เกษตรกรรมมีศักยภาพในการใช้เป็นตัวเฝ้าระวังการปนเปื้อนของสารกำจัดศัตรูพืชกลุ่มออร์กาโนคลอรีนได้

สาขาวิชา วิทยาศาสตร์สิ่งแวดล้อม ลายมือชื่อนิสิต .....ชญาธร.....

ปีการศึกษา .....2550..... ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา .....

ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษาร่วม .....

4789137920 : MAJOR ENVIRONMENTAL SCIENCE

KEY WORD: ORGANOCHLORINE PESTICIDE / VITELLOGENIN / GLUTATHIONE-S-TRANSFERASE / BIOMARKER / FRESHWATER MUSSELS

CHAYATHORN BOONLUE: BIOMARKERS FOR MONITORING ENVIRONMENTAL IMPACTS OF ORGANOCHLORINE PESTICIDE RESIDUES ON FRESHWATER MUSSELS. THESIS ADVISOR: NOPPADON KITANA, Ph.D. THESIS CO-ADVISOR: ASSIST. PROF. PAKORN VARANUSUPAKUL, Ph.D., 89 pp.

Thailand is known as an agricultural country with more than 53% of the total area. Uses of organochlorine pesticides (OCPs) to control pests have been carried out intensively. Due to their persistence in the field and their abilities to be biomagnified through food chain, the extent of OCPs contamination in ecosystem is crucial for environmental monitoring program. In this study, we used freshwater mussels to monitor the OCPs contamination in a freshwater ecosystem at Khlong 7 canal Rangsit agricultural area. Three species of freshwater mussels (*Uniandra contradens ascia*, *Pilsbryoconcha exilis exilis* and *Hyriopsis* (*Limnoscapha*) *desowitzi*) and the surrounding sediment were collected during March 2006-March 2007. The concentrations of OCPs namely ΣHCH, ΣHeptachlor, aldrin and dieldrin, ΣEndrin, ΣEndosulfan, ΣDDT, and methoxychlor were quantified by gas chromatography with micro-electron capture detector (GC-μECD). The results showed that low levels of OCPs residues were contaminated in sediment and mussels. The concentrations of ΣHCH, ΣDDT, ΣHeptachlor and ΣEndosulfan were the most prevalent OCPs with the range of 6.93-15.33 μg/kg in sediment and 19.48-68.44 μg/kg in mussels. There were significant differences in OCPs contamination among sampling periods with the highest levels found during June-November. The OCPs residues found in mussel tissue were below the maximum residue limits by the Ministry of Public Health of Thailand. Vitellogenin (vtg) in mussel gonad and specific activity of glutathione-s-transferase (GST) in mussel hepatopancreas were determined by ELISA and spectrophotometry, respectively. It was found that the levels of vtg and GST in mussels showed seasonal difference and significantly correlated with the levels of OCP residues in sediment and mussels. This indicates that the freshwater mussels living nearby the agricultural field could potentially be used as sentinel species for environmental contamination of organochlorine pesticides.

Field of study ....Environmental Science...

Academic year .....2007.....

Student's signature .....Chayathorn.....

Advisor's signature .....N. Noppadon.....

Co-advisor's signature .....Pakorn Varanusupakul.....

Acknowledgements

I would like to express my sincere gratitude and thanks to many people who contributed and supported in various ways during my study period.

First, I would like to give deep gratitude and appreciation to my mentor thesis advisor, Dr. Noppadon Kitana, for his invaluable suggestion, guidance and support my thesis throughout the study and the opportunity to pursue my research freely. I am grateful to my thesis co-advisor, Asst. Prof. Dr. Pakorn Varanusupakul, for his kind guidance and suggestion.

I am grateful to the thesis committee, Asst. Prof. Dr. Charnwit Khositanon, Asst. Prof. Dr. Nattaya Ngamrojanavanich and Dr. Jirarach Srijunngam, for their time and kind suggestions since the beginning of my thesis proposal. Their comments and suggestions not merely provided valuable knowledge but broadened perspective in practical applications as well. I would like to thanks Professor Dr. Somsak Panha for his expert advice on mussel identification.

To my friends in environmental science (Interdisciplinary Program) Teay, Ae, Sine, and Aan, I would like to thanks for their help and friendship. Special thanks to Namwan, Chompunuch Songkhaw, for her encouragement including her helping on the field trips. Very special thanks to Dr. Wattasit Siriwong for his guidance, help and suggestions for OCP analysis techniques.

I fully acknowledge the generosity of Department of Biology, Faculty of Science, Chulalongkorn University and the National Center of Excellence for Environmental and Hazardous Waste Management (NCE-EHWM) for allowing me to use their facilities for OCP analyses.

This thesis was supported by the 90th Anniversary of Chulalongkorn University research grant (Ratchadaphiseksompot Endownment Fund) and partially supported by the Thai government budget 2007, under the Research Program on Conservation and Utilization of Biodiversity and the Center of Excellence in Biodiversity, Faculty of Science, Chulalongkron University.

Finally, I would like to dedicate all the best of my thesis to my departed father, my beloved mother, everyone in Boonlue families, and Mr. Touchkorn Thanawattanadumrong for their love, patient support and understanding during my study because my success would not be possible without all of them.

CONTENTS

Pages

Abstract (In Thai)..... iv

Abstract (In English)..... v

Acknowledgements..... vi

Contents..... vii

List of Tables..... ix

List of Figures..... x

Chapter I Introduction.....1

Chapter II Literature Review.....5

Organochlorine pesticides.....5

Freshwater mussels.....13

Biomarker.....18

Vitellogenin.....21

Glutathione S-Transferase.....24

Study area.....26

Chapter III Methodology 27

Freshwater Mussels and Sediment Collection.....27

Organochlorine Residue Analysis.....28

Vitellogenin Assay.....33

Glutathione S-Transferase Assay.....35

Chapter IV Results and Discussion.....38

Residue of organochlorine pesticides in sediment.....38

Residue of organochlorine pesticides in freshwater mussel.....42

Pages

Vitellogenin.....51

Glutathione S-Transferase.....57

Chapter V Conclusion and Recommendations.....65

References.....66

Appendices.....75

Appendix I Chemical reagents.....76

Appendix II Quantitative control data of organochlorine pesticides.....80

Appendix III Pearson's correlation coefficients tables.....83

Biography.....87

LIST OF TABLES

Tables Pages

Table 2-1 Structural classification of organochlorine pesticides.....12

Table 4.1 The average concentration of OCPs residues in sediment during four sampling periods at Khlong 7 canal, Rangsit agricultural area, Pathum Thani Province.....40

Table 4.2 Pearson's correlation coefficients correlating organochlorine pesticide residue in sediment at Khlong 7 canal, Rangsit agricultural area, Pathum Thani Province. Shaded cells indicate significant correlation ($p < 0.05$).....41

Table 4.3 The average concentration of OCP residues in *Uniandra contradens ascia* collected from the upper stream site during four sampling periods at Khlong 7 canal, Rangsit agricultural area, Pathum Thani Province.....43

Table 4.4 The average concentration of OCPs residues in *Pilsbryoconcha exilis exilis* during four sampling periods: Period I (March-May 2006), Period II (June-August 2006), Period III (September- November 2006), and Period IV (December 2006-March 2007), at Khlong 7 canal, Rangsit agricultural area, Pathum Thani Province. 46

Table 4.5 The average concentration of OCPs residues in *Hyriopsis* (*Limnoscapha*) *desowitzi* during four sampling periods: Period I (March-May 2006), Period II (June-August 2006), Period III (September- November 2006), and Period IV (December 2006-March 2007), at Khlong 7 canal, Rangsit agricultural area, Pathum Thani Province.....49

Table 4-6 The average concentration of vitellogenin from gonad extract of three species of freshwater mussels collected during four sampling periods: Period I (March-May 2006), Period II (June-August 2006), Period III (September-November 2006), and Period IV (December 2006-March 2007) at Khlong 7 canal, Rangsit agricultural area, Pathum Thani Province.....53

Table 4.7 The average specific activity of GST from 3 species of freshwater mussels collected during four sampling periods: period I (March-May 2006), period II (June-August 2006), period III (September- November 2006), and period IV (December 2006-March 2007) at Khlong 7 canal, Rangsit agricultural srea, Pathum Thani Province.....58

LIST OF FIGURES

Figure Pages

Figure 2.1 Organs of freshwater mussels.....14

Figure 2.2 *Pilbryoconcha exilis exilis* collected from the study site at Khlong 7, Rangsit agricultural area, Pathum Thani Province.....16

Figure 2.3 *Hyriopsis (Limnoscapha) desowetzi* collected from the study site at Khlong 7, Rangsit agricultural area, Pathum Thani Province 17

Figure 2.4 *Uniandra contradens ascia* collected from the study site at Khlong 7, Rangsit agricultural area, Pathum Thani Province.....18

Figure 3.1 Map of Rangsit agricultural area, Pathum Thani Province. The study area is situated at Khlong 7 where (U) = upper stram, (M) = the middle stram, and (L) = lower stream.....27

Figure 4.1 The concentration of OCPs residues in *Uniandra contradens ascia* from the upper stream site at Khlong 7 canal, Rangsit agricultural area, Pathum Thani Province. 44

Figure 4.2 The concentrations of OCPs residues in *Pilsbryoconcha exilis exilis* from the middle stream site at Khlong 7 canal, Rangsit agricultural area, Pathum Thani Province.....47

Figure 4.3 The concentrations of OCPs residues in *Hyriopsis* (*Limnoscapha*) *desowitzi* from the lower stream site at Khlong 7 canal, Rangsit agricultural area, Pathum Thani Province.....50

Figure 4.4 The average concentrations of vitellogenin in gonad extract of *Uniandra contradens ascia* and average concentration of OCP residues in the mussels during four sampling periods at Khlong 7, Rangsit agricultural area.....54

Figure 4.6 The average concentrations of vitellogenin in gonad extract of *Hyriopsis* (*Limnoscapha*) *desowitzi* and average concentrations of OCP residues in mussel tissue during four sampling periods at Khlong 7, Rangsit agricultural area.....56

Figure 4.7 The average of specific activity of GST in hepatopancreas extract of

Figure Pages

Uniandra contradens ascia and average of OCP concentrations in the mussels during four sampling periods at Khlong 7, Rangsit agricultural area.....59

Figure 4.8 The average of specific activity of GST in hepatopancreas extract of *Pilsbryoconcha exilis exilis* and average of the OCP concentrations in mussels during four sampling periods at Khlong 7, Rangsit agricultural area. 60

Figure 4.9 The average of specific activity of GST in hepatopancreas extract of *Hyriopsis* (*Limnoscapha*) *desowitzi* and average of the OCP concentrations in the mussels during four sampling periods at Khlong 7, Rangsit agricultural area.....61