

บทที่ 4

ผลการทดลอง

ผลการทดลองหาค่า LC_{50} ที่ 96 ชั่วโมง

จากการทดลองหาค่าความเข้มข้นของเมทิลพาราไรออนที่ทำให้ปลากระพงขาว ตาย 50 % ในระยะเวลา 96 ชั่วโมง ได้ผลดังตารางที่ 7 และ ตารางที่ 8 โดยปลากระพงขาวในกลุ่มที่สัมผัสเมทิลพาราไรออนชนิด laboratory grade มีอัตราการตาย 100 % ที่ 4 mg/l ทั้ง 2 replications และต่ำสุดคือไม่ตายเลยในกลุ่มควบคุม (0 mg/l) ค่าพารามิเตอร์ LC_{50} ที่ 96 ชั่วโมง ได้เท่ากับ 0.85 mg/l ส่วนผลของเมทิลพาราไรออนชนิด technical grade ปลาที่มีอัตราการตายสูงสุดที่ 4 mg/l และไม่มีการตายในกลุ่มควบคุม (0 mg/l) ทั้ง 3 replications จากการวิเคราะห์พบว่า LC_{50} 96 hr เท่ากับ 1.83 mg/l (ภาคผนวกที่ 2) ปลากระพงขาวที่ได้รับเมทิลพาราไรออนเริ่มแสดงอาการผิดปกติโดยการลอยน้ำนิ่งในแนวตั้งบริเวณใกล้ผิวน้ำ และลอยตัวนิ่งไม่เคลื่อนไหวบริเวณพื้นตู้ ต่อมาจะเริ่มตะแคงตัว และมีอาการตื่นตกใจง่ายเมื่อถูกรบกวน ปลาแสดงอาการผิดปกติดังกล่าวในกลุ่มทดลองที่ระดับความเข้มข้นตั้งแต่ 1 mg/l ขึ้นไป อาการที่ปลาตายมีลักษณะครีบกางออกและกางครีบจนสุด แผ่นปิดเหงือกทั้งสองข้างเปิดออกเต็มที่ สภาพน้ำในตู้ปลาจะมีความขุ่นมาก โดยเพิ่มขึ้นตามความเข้มข้น และระยะเวลาที่ทดลอง

ตารางที่ 7 อัตราตายสะสมของปลากะพงขาวเมื่อได้รับเมทิลพาราไรออนในระยะเวลา
96 ชั่วโมง (laboratory grade)



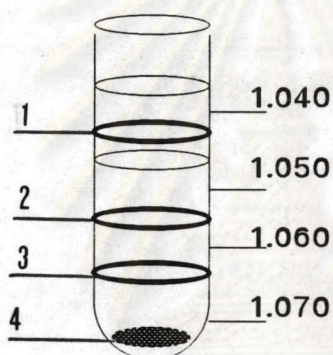
ความเข้มข้น (mg/l)	จำนวนปลา เริ่มต้น(ตัว)	จำนวนปลาทายสะสม 4 วัน							
		ชุดที่ 1				ชุดที่ 2			
		1	2	3	4	1	2	3	4
0	10	0	0	0	0	0	0	0	0
1	10	0	0	1	5	0	1	3	5
2	10	1	5	9	10	0	0	6	9
3	10	4	7	8	10	0	1	3	9
4	10	2	9	10	10	5	8	9	10

ตารางที่ 8 อัตราตายสะสมของปลากะพงขาวเมื่อได้รับเมทิลพาราไรออนในระยะเวลา
96 ชั่วโมง (technical grade)

ความเข้มข้น (mg/l)	จำนวนปลา เริ่มต้น(ตัว)	จำนวนปลาทายสะสม 4 วัน											
		ชุดที่ 1				ชุดที่ 2				ชุดที่ 3			
		1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4
0	20	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
1	20	0	2	2	3	1	1	1	0	0	0	0	0
2	20	2	9	11	13	4	11	12	13	4	12	12	12
3	20	3	20	20	20	1	11	11	17	1	10	13	13
4	20	1	20	20	20	0	11	14	20	1	10	18	19

ผลการแยกและศึกษา viability ของ phagocyte

การแยก phagocyte โดยใช้วิธี discontinuous gradient centrifugation ที่ความถ่วงจำเพาะระหว่าง 1.040-1.070 พบ band ที่สามารถแยกได้ 3 ชั้น ในแต่ละชั้นมีเซลล์แต่ละชนิดที่แตกต่างกัน โดยพบว่าชั้นของ phagocyte ซึ่งประกอบด้วย macrophage และ monocyte มี band อยู่ระหว่างชั้นความถ่วงจำเพาะที่ 1.050-1.060 (รูปที่ 6) ตรวจสอบ viability ของเซลล์ที่แยกได้เท่ากับ 100 % ภายในระยะเวลา 2 ชั่วโมง



รูปที่ 6 band ของเซลล์ที่แยกได้จากเนื้อเยื่อไตส่วนต้น (1) cell debris

- (2) macrophage , lymphocyte (3) lymphocyte และเม็ดเลือดขาวอื่นๆ
(4) เม็ดเลือดแดง

ผลการศึกษา phagocytosis และ chemotaxis

จากการให้ปลากะพงขาวได้รับเมทิลพาราไรออน ที่ระดับความเข้มข้น 0.6, 1.2 , 1.8 และ 2.4 mg/l เป็นเวลา 96 ชั่วโมง เพื่อศึกษาผลกระทบต่อภูมิคุ้มกันชนิดเซลล์ โดยวัด %chemotaxis พบว่าปลากะพงขาวกลุ่มที่ไม่ได้สัมผัสสารมี %chemotaxis สูงกว่า ปลากะพงขาวกลุ่มอื่นๆ โดยมีค่าเฉลี่ย %chemotaxis เท่ากับ 32.647 แตกต่างจากกลุ่มที่

สัมผัสเมทิลพาราไรออนทุกกลุ่มอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.0001$) ซึ่งแต่ละกลุ่มมีค่าเฉลี่ย %chemotaxis เรียงตามลำดับความเข้มข้นจากน้อยไปมากตามลำดับความเข้มข้นดังนี้ 0.6, 1.2, 1.8 และ 2.4 mg/l เท่ากับ 9.14, 5.068, 5.457 และ 5.208 (ตารางที่ 9)

สำหรับผล phagocytosis พบว่ากลุ่มที่ได้รับเมทิลพาราไรออนความเข้มข้นสูงมี %phagocytosis ต่ำกว่ากลุ่มที่ได้รับสัมผัสน้อยและกลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเช่นเดียวกัน โดยมี %phagocytosis 52.245, 46.123, 33.347, 24.968 และ 20.123 เรียงตามลำดับความเข้มข้นสารจากต่ำไปสูง (ตารางที่ 9)

ผลการตรวจคุณภาพน้ำ

การวัดค่าออกซิเจนละลายน้ำ ความเป็นกรดต่าง และอุณหภูมิในตู้ปลาแต่ละกลุ่ม ได้ผลดังตารางที่ 10 สำหรับชุดที่ 1 และตารางที่ 12 สำหรับชุดที่ 2 โดยค่า DO, pH และอุณหภูมิที่วัดได้ไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P > 0.05$)

ผลของอัตราตายและอาการผิดปกติของปลา

อัตราตายของปลาจะพวงขาวในแต่ละความเข้มข้น แสดงให้เห็นดังตารางที่ 11 และตารางที่ 13 โดยแสดงเป็นอัตราตายสะสมที่ 4 วัน ซึ่งปลาจะตายมากที่สุดในกลุ่มที่สัมผัสสารในความเข้มข้นสูงสุด ที่ความเข้มข้น 2.4 mg/l มีอัตราการตายเฉลี่ย 8 ตัว ในชุดที่ 1 และอัตราการตายเฉลี่ย 13 ตัว ในชุดที่ 2

จากการสังเกตอาการปลา พบว่าก่อนการเติมเมทิลพาราไรออนลงในน้ำ ปลาทุกกลุ่มกินอาหารได้ดี และมีความตื่นตัวต่อสิ่งกระตุ้นภายนอกดีในระดับเดียวกัน เช่น เมื่อให้อาหารจะว่ายน้ำไปหลบมุมตู้ก่อนแล้วจะค่อยๆ ว่ายน้ำออกมากินเมื่อหายตื่นกลัว ถ้ามีการเคาะหรือทำให้น้ำในตู้กระเพื่อม ปลาก็จะรีบว่ายน้ำไปรวมกันที่มุมตู้ โดยมีลักษณะเช่นนี้ในทุกตู้ก่อนทดลอง เมื่อเติมเมทิลพาราไรออนลงในน้ำ พบว่า ปลาแสดงอาการตื่นตกใจเหมือน

การทำน้ำกระเพื่อมก่อนใส่สาร ไม่พบความผิดปกติของปลาแต่อย่างใดในระยะแรกที่ใส่สารดังกล่าว แต่ในวันต่อมาพบว่าปลาในกลุ่มที่ได้รับสารในความเข้มข้นสูง 1.2 mg/l ขึ้นไป แสดงอาการผิดปกติ โดยแยกตัวจากฝูง ลอยตัวนิ่งที่ใกล้ผิวน้ำ ไม่หลบหนีเมื่อมีสิ่งกระตุ้น บางตัวจะนอนตะแคงอยู่ที่พื้นตู้ บางตัวลอยนิ่งที่ขอบตู้ในลักษณะส่วนหัวตั้งสูงชันกว่าลำตัว อาการก่อนตายจะว่ายน้ำกระตุก 1-2 ครั้ง คล้ายอาการชักเกร็งแล้วจึงตายในสภาพปากและแผ่นปิดเหงือกเปิดออกเต็มที่ โดยจะสังเกตอาการผิดปกติชัดเจนในกลุ่มที่ได้รับเมทิลพาราไรออนตั้งแต่ 1.8 mg/l ขึ้นไป แต่ไม่พบอาการผิดปกติในกลุ่มควบคุม

ตารางที่ 9 %chemotaxis และ%phagocytosis ของ phagocyte ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ กันของ เมทิลพาราไรออน

ความเข้มข้น (mg/l)	%chemotaxis ± SD	%phagocytosis ± SD
0	32.647 ^a ± 35.709	52.245 ^a ± 11.137
0.6	9.141 ^b ± 5.706	46.123 ^a ± 13.649
1.2	5.068 ^b ± 5.794	33.347 ^b ± 9.797
1.8	5.457 ^b ± 3.759	24.968 ^c ± 10.249
2.4	5.208 ^b ± 4.121	20.123 ^c ± 11.372

ค่า superscript ที่แตกต่างกันในแต่ละแถว แสดงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่น 95%

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 10 ผลการวัด DO,pH และอุณหภูมิของน้ำในตู้ทดลองในวันที่ 0,1,2,3,4 (ชุดที่ 1)

ความเข้มข้น (mg/l)	DO					pH					Temp				
	0	1	2	3	4	0	1	2	3	4	0	1	2	3	4
0	5.0	6.2	6.5	5.9	7	8.0	8.4	8.2	8.1	7.7	28	27	28	28	28
0	4.9	5.2	6.2	6.0	6.5	7.8	8.2	8.2	8.2	7.6	28	27	28	28	28
0.6	6.0	6.0	6.5	5.6	6.6	7.8	8.1	8.0	8.1	7.6	28	27	28	28	28
0.6	5.0	4.6	4.8	5.7	6.3	7.5	7.8	7.8	8.0	7.6	28	27	28	28	28
1.2	5.2	5.9	5.9	5.9	6.8	7.8	8.1	7.9	8.1	7.7	28	27	28	28	28
1.2	4.9	5.0	4.5	5.5	5.8	7.7	8.0	7.8	7.9	7.5	28	27	28	28	28
1.8	5.1	5.2	5.1	5.9	8.0	7.7	8.0	7.8	8.0	7.6	28	27	28	28	28
1.8	5.0	4.7	4.2	5.2	6.7	7.7	7.9	7.7	7.9	7.5	28	27	28	28	28
2.4	5.3	2.9	2.5	5.3	8.1	7.5	7.8	7.8	7.9	7.6	28	27	28	28	28
2.4	5.0	5.5	3.5	5.7	7.4	7.8	7.9	7.8	7.9	7.7	28	27	28	28	28

ตารางที่ 11 จำนวนปลาตายสะสมที่ 4 วัน ของการทดลองชุดที่ 1

ความเข้มข้น (mg/l)	จำนวนปลา (ตัว)	ซ้ำที่ 1				ซ้ำที่ 2			
		1	2	3	4	1	2	3	4
0	20	0	0	0	0	0	0	0	0
0.6	20	0	0	0	0	0	1	1	1
1.2	20	0	0	0	0	0	1	1	1
1.8	20	0	2	3	3	0	1	6	6
2.4	20	2	6	9	9	1	6	7	7

ตารางที่ 12 ผลการวัด DO,pH และอุณหภูมิของน้ำในตู้ทดลองในวันที่ 0,1,2,3,4 (ชุดที่ 2)

ความเข้มข้น (mg/l)	DO					pH					Temp				
	0	1	2	3	4	0	1	2	3	4	0	1	2	3	4
0	6.8	7.1	8.0	6.8	7.4	8.0	8.2	7.7	7.8	7.7	28	28	28	28	27
0	5.5	6.2	7.1	6.6	5.5	8.2	8.1	7.6	7.7	7.8	28	28	28	28	26
0.6	6.9	5.0	6.5	6.0	5.9	8.2	7.8	7.5	7.7	7.6	28	28	28	28	26
0.6	6.7	5.4	7.0	6.4	6.8	8.0	7.8	7.5	7.6	7.7	28	28	28	28	26
1.2	7.8	6.5	8.3	6.4	7.6	8.0	8.2	7.6	7.9	8.0	28	28	28	28	26
1.2	7.1	6.0	7.2	6.0	6.9	8.2	8.1	7.4	7.8	7.9	28	28	28	28	26
1.8	7.7	6.3	7.9	6.1	7.3	8.0	8.2	7.5	7.4	7.9	28	28	28	28	27
1.8	7.5	6.5	7.5	5.9	6.9	8.2	8.1	7.5	7.4	7.9	28	28	28	28	27
2.4	7.0	5.5	5.8	6.0	6.4	8.3	7.9	7.3	7.8	7.9	28	28	28	28	27
2.4	6.7	5.6	5.6	5.1	6.4	8.2	7.8	7.3	7.6	7.9	28	28	28	28	27

ตารางที่ 13 จำนวนปลาตายสะสมที่ 4 วัน ของการทดลองชุดที่ 2

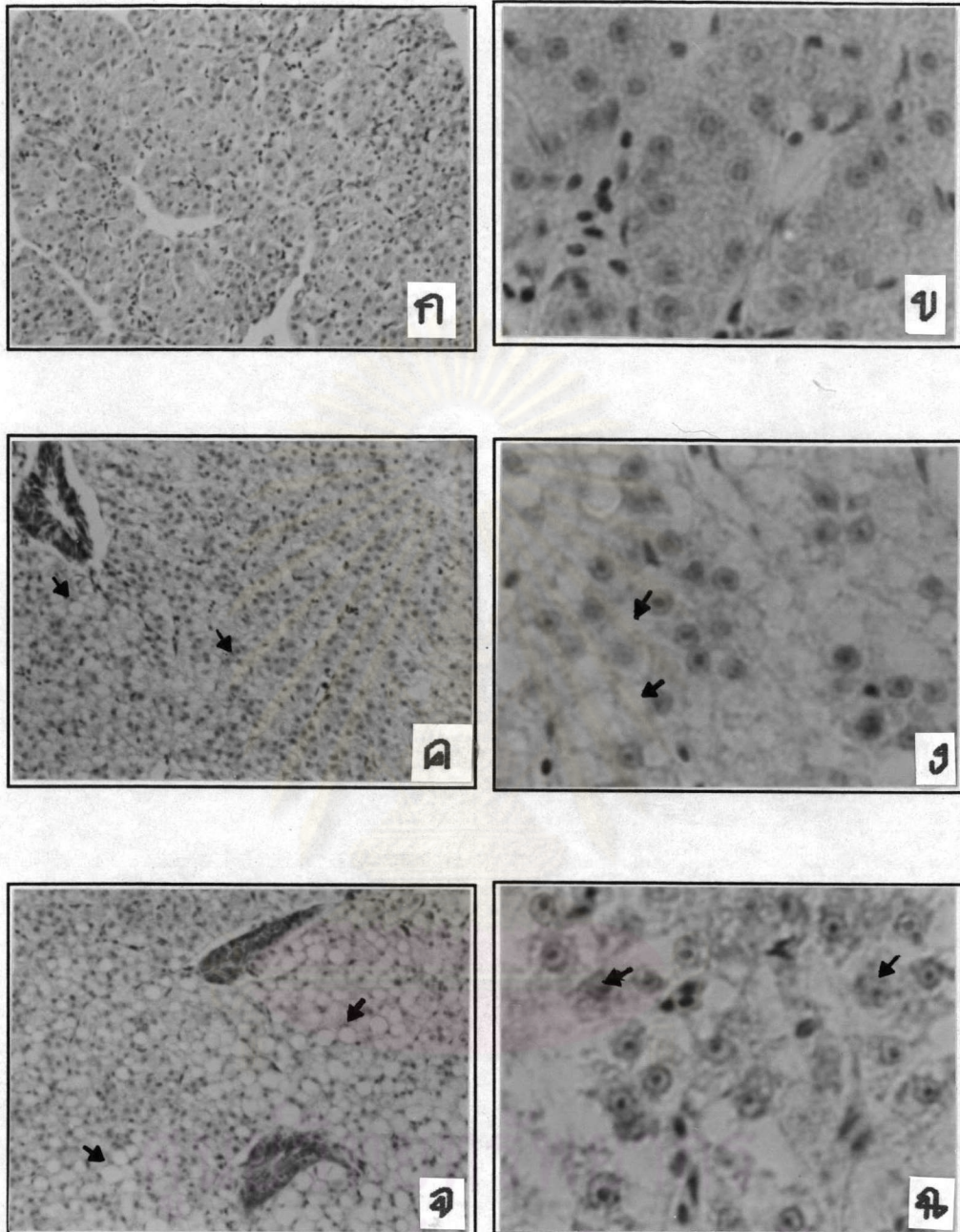
ความเข้มข้น (mg/l)	จำนวนปลา (ตัว)	ซ้ำที่ 1				ซ้ำที่ 2			
		1	2	3	4	1	2	3	4
0	20	0	0	0	0	0	0	0	0
0.6	20	0	0	0	1	0	0	0	0
1.2	20	0	0	0	0	0	0	0	0
1.8	20	0	0	0	2	0	0	1	3
2.4	20	3	10	11	12	3	9	11	13

ผลการศึกษากลุ่พยาธิสภาพ

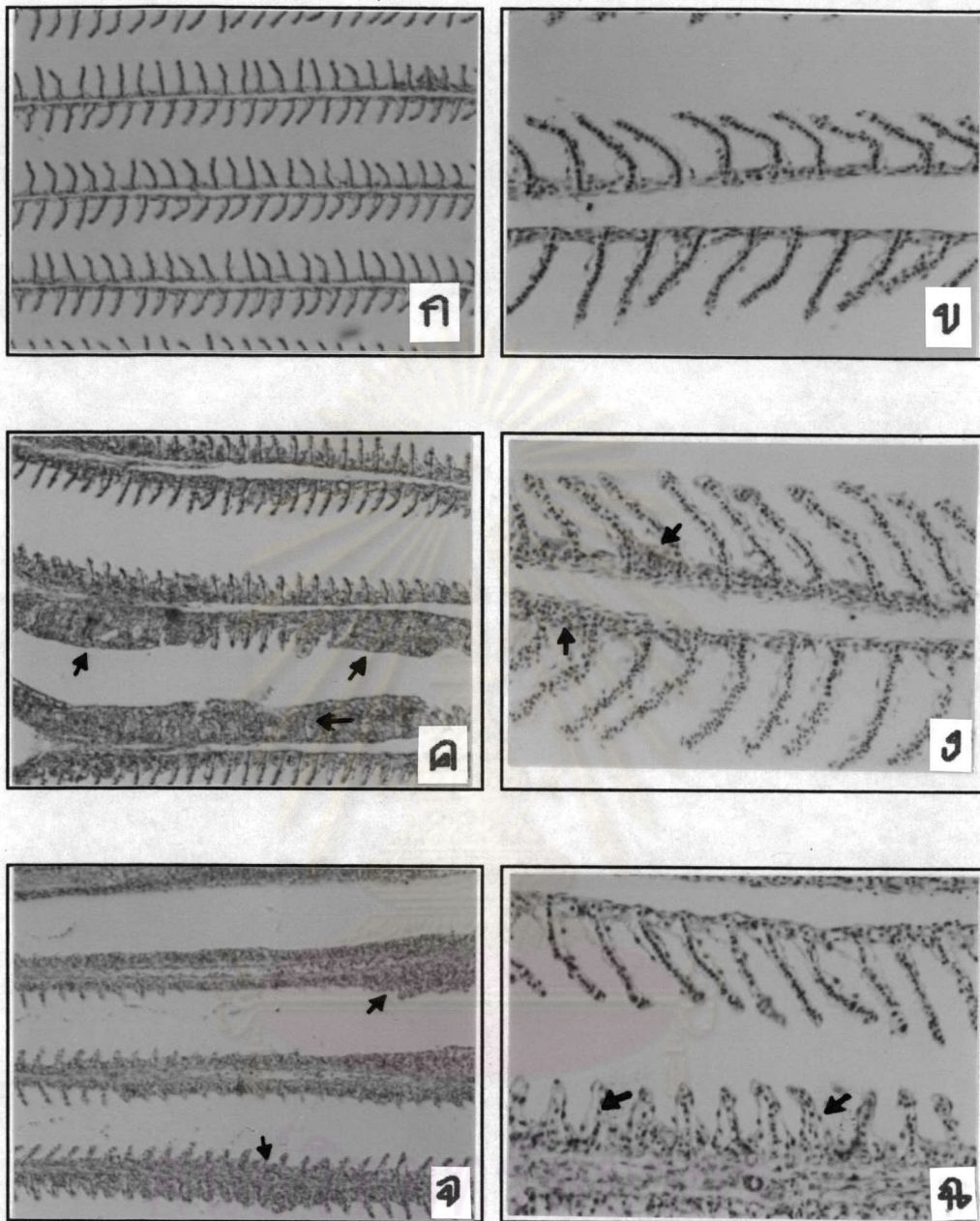
ดับของปลากะพงขาวที่สัมผัสเมทิลพาราไรออนในระดับความเข้มข้น 0, 0.6 และ 1.2 mg/l ไม่พบความผิดปกติทางจุลพยาธิวิทยา แต่ในความเข้มข้น 1.8 mg/l และ 2.4 mg/l พบช่องว่างในไซโตพลาสซึมของเซลล์ตับมากขึ้น (vacuolation) มีนิวเคลียสที่แสดงถึงการเสื่อมของเซลล์ เปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุมที่มีสภาพดังกล่าวน้อยกว่า (รูปที่ 7)

เหงือกของปลาในกลุ่มควบคุมมีสภาพปกติ การเรียงตัวของซี่เหงือกขนานกันอย่างเป็นระเบียบ ซี่เหงือกฝอยแยกกันอย่างเด่นชัด แต่ในกลุ่มที่สัมผัสเมทิลพาราไรออน พบว่าการเรียงตัวของซี่เหงือกไม่เป็นระเบียบ มีการเชื่อมรวมกันของซี่เหงือกฝอย เซลล์เยื่อบุผิวเหงือกเกิดสภาพบวมและอักเสบ บางส่วนของเยื่อบุเกิดการลอกหลุดมีการหนาตัวและจำนวนชั้นเพิ่มขึ้น (hyperplasia) เซลล์เมือกมีขนาดใหญ่กว่าปกติ โดยสังเกตเห็นจุลพยาธิสภาพได้ชัดเจนในระดับความเข้มข้นของเมทิลพาราไรออนที่สูงขึ้น (รูปที่ 8,9)

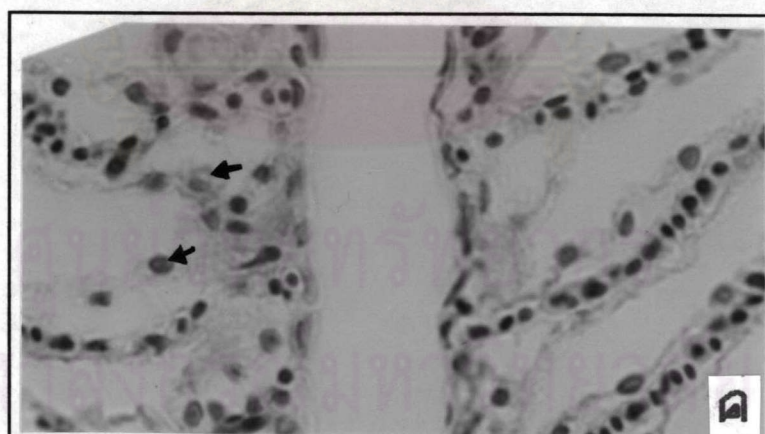
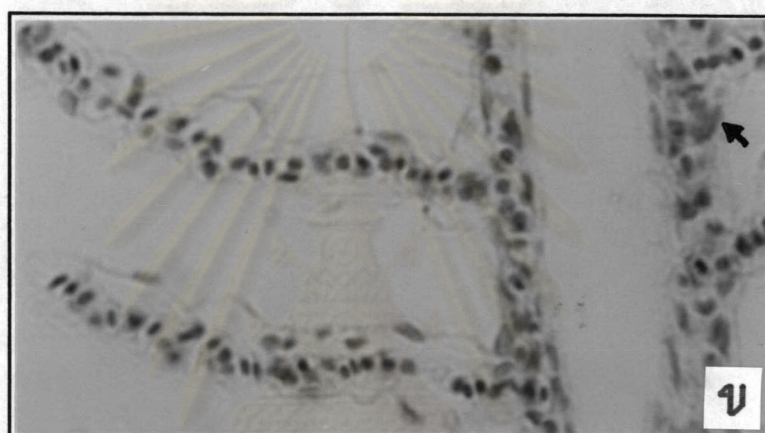
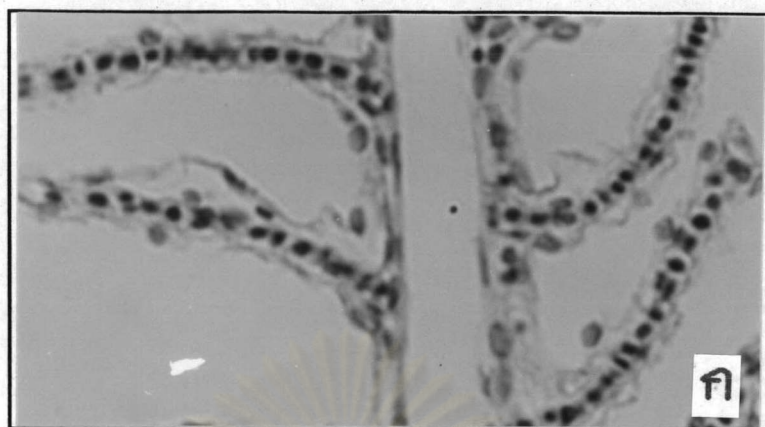
ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



รูปที่ 7 จุลพยาธิสภาพของเซลล์ตับปลากะพงขาวที่ความเข้มข้นของเมทิลพาราไรออนต่างๆ
กัน (ก)เนื้อเยื่อตับปกติ(x100) (ข)เนื้อเยื่อตับปกติ(x400) (ค)vacuolation of
hepatocytes ที่ 1.8 mg/l(x100) (ง)vacuolation of hepatocytes 1.8 mg/l
(x400) (จ)vacuolation of hepatocyte ที่ 2.4mg/l(x100) (ฉ)hepatocytes
necrosis ที่ 2.4 mg/l (x400)



รูปที่ 8 จุลพยาธิสภาพของเนื้อเยื่อเหงือกปลากระพงขาวที่ความเข้มข้นของเมทิลพาราไรออน
 ต่างๆกัน(ก)เนื้อเยื่อเหงือกปลาปกติ(x40) (ข)เนื้อเยื่อเหงือกปลาปกติ (x100)
 (ค)secondary gill lamellae inflammation and fusion ที่ 1.8 mg/l (x40)
 (ง)inflammation and thickening of primary gill lamellae ที่ 1.8mg/l (x100)
 (จ)secondary gill lamellae fusion ที่ 2.4 mg/l (x40) (ฉ)secondary gill
 lamellae fusion and enlargement with slightly edematous swelling ที่ 2.4 mg/l(x100)



รูปที่ 9 จุลพยาธิสภาพของเนื้อเยื่อเหงือกปลากระพงขาวที่ความเข้มข้นของเมทิลพาราไรออน
 ต่างๆกัน x400 (ก)เนื้อเยื่อเหงือกของปลาปกติ (ข)gill epithelium cell
 hyperplasia ที่ 1.8 mg/l (ค)mucous cells hypertrophy ที่ 2.4 mg/l