# การศึกษาความเป็นพิษของไกลโฟเซตทางการค้าต่อการเคลื่อนที่ ขนาดของลำตัว การสืบพันธุ์ และกิจกรรมของเอนไซม์ Catalase ของไรแดง *Moina macrocopa*

**หัทยา จิตรพัสตร์[1] ณัฐยา วธาวนิชกุล[1] และ ปทุมพร เมืองพระ[2*]**
มหาวิทยาลัยศิลปากร วิทยาเขตพระราชวังสนามจันทร์ จังหวัดนครปฐม 73000

## บทคัดย่อ

สารกำจัดวัชพืชชนิดไกลโฟเซตในชื่อการค้าว่าราวด์อัพ เป็นที่นิยมใช้ในประเทศไทยและมีการชะลงสู่แหล่งน้ำ ก่อให้เกิดความเป็นพิษต่อสิ่งมีชีวิต แต่ข้อมูลผลกระทบต่อสรีระ ชีวเคมี และการสืบพันธุ์ของแพลงก์ตอนสัตว์น้ำจืดยังมีน้อย งานวิจัยนี้จึงมุ่งศึกษาความเป็นพิษเฉียบพลันของราวด์อัพต่อการเคลื่อนที่ และพิษเรื้อรังของราวด์อัพต่อการเจริญเติบโต ต่อกิจกรรมของเอนไซม์ต้านอนุมูลอิสระ catalase ที่ใช้เป็นดัชนีชี้วัดสภาวะความเครียดออกซิเดชัน และความดกของลูกไรแดง (*Moina macrocopa*) โดยนำตัวอ่อนไรแดงอายุไม่เกิน 1 วันไปสัมผัสราวด์อัพความเข้มข้น < EC25 (2, 20, 200 และ 2000 ไมโครกรัมต่อลิตร) เป็นเวลา 7 วัน ผลการศึกษาพบว่า ค่า EC50 ของราวด์อัพต่อการเคลื่อนที่ของไรแดงในเวลา 48 ชั่วโมงมีค่า 3.97 มิลลิกรัมต่อลิตร สำหรับความเป็นพิษเรื้อรัง พบว่าความเข้มข้นและเวลามีผลต่อขนาดของไรแดง โดยความยาวลำตัวของไรแดงมีค่าเพิ่มขึ้น ยกเว้นในวันที่ 7 ส่วนผลการทดสอบจำนวนลูกทั้งหมดที่เกิดหลังได้รับสาร 7 วันพบว่า ความเข้มข้นที่เพิ่มขึ้นไม่มีผลต่อความดกของลูก แต่ที่ความเข้มข้น 2 ไมโครกรัมต่อลิตร มีผลทำให้จำนวนลูกครอกแรกเพิ่มขึ้นสูงสุด และราวด์อัพมีผลต่อกิจกรรมของเอนไซม์ catalase เมื่อตัวอ่อนไรแดงสัมผัสสารเป็นเวลา 48 ชั่วโมงตั้งแต่ความเข้มข้น 200 ไมโครกรัมต่อลิตร แสดงให้เห็นว่าการปนเปื้อนของราวด์อัพปริมาณน้อยในแหล่งน้ำส่งผลกระทบต่อขนาดไรแดง และกิจกรรมของเอนไซม์ catalase แต่ไม่มีผลต่อความดกของลูก

**คำสำคัญ :** ไกลโฟเซต / ราวด์อัพ / ไรแดง / ความเป็นพิษ / ความดกของลูก / Catalase

* *Corresponding author: muangphra__p@su.ac.th*

1 *นักศึกษาปริญญาตรี ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยศิลปากร วิทยาเขตพระราชวังสนามจันทร์ นครปฐม*

2 *รองศาสตราจารย์ ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยศิลปากร วิทยาเขตพระราชวังสนามจันทร์ นครปฐม*

# Toxicity of Commercial Glyphosate on Mobilization, Growth, Reproduction and Catalase Activity of Water Flea *Moina macrocopa*

**Hattaya Jitrapat[1] Nuttaya Watawanichakul[1] and Ptumporn Muangphra[2*]**

Silpakorn University, Nakorn Phathom 73000

## Abstract

Glyphosate-based herbicide under the trade name Roundup® has a high account of volume use in Thailand and leaches into aquatic systems causing harmful effects to animals. However, limited studies are available on the effect of Roundup® on physiology, biochemistry and reproduction of freshwater zooplankton. The aim of this study was therefore to assess the impact of Roundup® on zooplankton. Acute toxicity of Roundup® in terms of mobilization and chronic toxicity to growth, antioxidant catalase activity, which is used as a biomaker for oxidative stress, and fecundity of zooplankton were assessed in neonate water fleas (*Moina macrocopa*) exposed to concentrations < EC25 (2, 20, 200 and 2000 µg/L) of Roundup® in deionized water for 7 days. The results showed that the 48h-EC50 of Roundup® in *M. macrocopa* was 3.97 mg/L. The size of water fleas depended on the concentration and time of contact. The body length of neonates significantly increased except on day 7. There was no significant difference in neonate number after exposure to increasing concentration of Roundup®. However, the neonate number of first brood significantly increased at the lowest concentration of Roundup® (2 µg/L). There was a significant difference in catalase activity of neonates following the exposure to chemicals for 48 h at and above the concentration of 200 µg/L. The results indicated that very low contamination of Roundup® in aquatic ecosystems can affect neonates in terms of growth and catalase activity but not in terms of reproduction.

**Keywords :** Glyphosate / Roundup® / Water Flea / Toxicity / Fecundity / Catalase

* *Corresponding author: muangphra__p@su.ac.th*

1 *Undergraduate student, Department of Biology, Faculty of Science, Silpakorn University, Sanam Chandra Palace, Nakhorn Phathom*

2 *Associate Professor, Department of Biology, Faculty of Science, Silpakorn University, Sanam Chandra Palace, Nakhorn Phathom*

## 1. บทนำ

ไกลโฟเซต (Glyphosate หรือ N-(phosphonomethyl) glycine) เป็นสารกำจัดวัชพืชที่มีปริมาณการใช้เพิ่มสูงขึ้นอย่างต่อเนื่อง ตั้งแต่เริ่มต้นมีการผลิตสารชนิดนี้ออกมาเมื่อปี 1970 ประเทศไทยมีการนำเข้าสารกำจัดวัชพืชในปริมาณสูงขึ้นทุกปี โดยในปี 2012 มีข้อมูลการนำเข้าในปริมาณถึง 100,000 ตัน ซึ่งสูงกว่าการนำเข้าสารกำจัดแมลงถึง 5 เท่า [1] ปริมาณการใช้ส่วนใหญ่อยู่ในด้านเกษตรกรรม มากกว่าด้านป่าไม้ งานสวน รวมถึงการควบคุมพืชในแหล่งน้ำ

สำหรับสูตรของไกลโฟเซตที่ใช้กันทั่วไปในประเทศไทย มีชื่อทางการค้าว่าราวด์อัพ (Roundup®) ซึ่งสารออกฤทธิ์หลักคือ ไกลโฟเซตในรูปของเกลือไอโซโพรพิลเอมีน (Isopropylamine salt) ไกลโฟเซตเป็นสารที่มีบทบาทในการยับยั้งการเจริญเติบโตของพืช ผ่านการเข้าแทรกแซงในกระบวนการสังเคราะห์กรดอะมิโนฟีนิลอะลานิน (Phenylalanine), ไทโรซิน (Tyrosine) และทริปโตเฟน (Tryptophan) โดยไปยับยั้งเอนไซม์ 5-enolpyruvyl shikimic acid-3-phosphate (EPSP) synthase ในกระบวนการ Shikimate pathway [2] ซึ่งพบกระบวนการนี้ได้ในพืชและจุลินทรีย์ แต่ไม่พบในสัตว์ [3] อย่างไรก็ตาม มีการรายงานว่าสารกำจัดศัตรูพืชชนิดนี้มีความเป็นพิษสูงต่อสัตว์ครึ่งบกครึ่งน้ำ สาหร่ายขนาดเล็ก โพรโทซัว และครัสตาเซียนในระบบนิเวศแหล่งน้ำ [4] ประกอบกับปัจจุบันในเขตเกษตรกรรมมีการใช้ไกลโฟเซตอย่างแพร่หลาย และใช้อย่างต่อเนื่องเป็นเวลานาน ซึ่งอาจจะทำให้เกิดการสะสมในแหล่งน้ำและส่งผลกระทบต่อสิ่งมีชีวิตในแหล่งน้ำได้ [5]

สิ่งมีชีวิตที่นิยมใช้ในการทดสอบความเป็นพิษของสารและเป็นตัวบ่งชี้คุณภาพในแหล่งน้ำ ได้แก่ ไรน้ำในสกุล *Daphnia* sp. เนื่องจากเป็นสิ่งมีชีวิตลำดับต้นๆ ของห่วงโซ่อาหารที่มีความสำคัญและส่งผลต่อลำดับสิ่งมีชีวิตชนิดอื่นต่อไป มีความไวต่อสารพิษสูง และสามารถขยายพันธุ์ได้รวดเร็ว [6] การประเมินความเป็นพิษเฉียบพลันของไกลโฟเซตที่ทำให้ *Daphnia* จำนวน 50% ไม่เคลื่อนที่ (EC50) มีค่าอยู่ในช่วงค่อนข้างกว้างคือ 4.2-117 มิลลิกรัมต่อลิตร ขึ้นอยู่กับ pH อุณหภูมิ และวิธีการเลี้ยง [7] นอกจากนี้ การตรวจสอบผลกระทบต่อการเจริญเติบโตและการสืบพันธุ์ พบว่าที่ความเข้มข้นต่ำๆ ของสารจะไปลดขนาดของ *Daphnia* และส่งผลกระทบต่อการเจริญเติบโต และความดกของไข่ [8] รวมทั้งกิจกรรมของเอนไซม์ต้านอนุมูลอิสระ ซึ่งเป็นที่ยอมรับว่าเป็นดัชนีชี้วัดที่ดี สำหรับการวัดความเครียดออกซิเดชันที่เกิดจากการตอบสนองของสิ่งมีชีวิตเมื่อสัมผัสกับสารพิษ [9] วิธีที่ดังกล่าวล้วนเป็นตัวบ่งชี้ทางชีวภาพที่สำคัญในการประเมินความเสี่ยงของสิ่งแวดล้อม และผลกระทบของมลพิษกับประชากรในระบบนิเวศ [10]

การศึกษานี้เป็นการทดสอบความเป็นพิษทั้งเฉียบพลันและเรื้อรังของสารกำจัดวัชพืชที่มีชื่อทางการค้าว่าราวด์อัพต่อไรแดง *Moina macrocopa* ซึ่งพบทั่วไปในประเทศไทย โดยศึกษาความเป็นพิษต่อการเจริญเติบโต การสืบพันธุ์ และกิจกรรมของเอนไซม์ catalase (CAT) ในไรแดง เพื่อใช้ทำนายผลกระทบต่อระบบนิเวศในแหล่งน้ำ และใช้ประเมินความเสี่ยงของสิ่งแวดล้อมต่อไป

## 2. วัสดุอุปกรณ์และวิธีการ

### 2.1 สิ่งมีชีวิตที่ใช้ทดสอบ

ใช้ไรแดง *Moina macrocopa* อายุน้อยกว่า 24 ชั่วโมง (neonate) ซึ่งได้แม่พันธุ์มาจากแหล่งจำหน่ายอาหารปลา และนำมาเพาะเลี้ยงภายในห้องปฏิบัติการที่ให้ความสว่างต่อช่วงมืด 16:8 ชั่วโมง ที่ความเข้มแสง 17000 ลักซ์ อุณหภูมิ 25±2 องศาเซลเซียส ซึ่งเป็นสภาวะที่ใช้ทดสอบเลี้ยงไรแดงตลอดการศึกษานี้ และให้สาหร่ายสีเขียว *Chlorella* sp. เป็นอาหาร ทำการคัดแยกไรแดงที่มีสุขภาพดี และเลี้ยงต่อไปอีก 2 รุ่น เพื่อนำไปใช้ในการทดสอบ

### 2.2 สารเคมี

สารกำจัดวัชพืชไกลโฟเซตที่มีชื่อทางการค้าว่าราวด์อัพ ของบริษัทมอนซานโต้ (มาเลเซีย) จำกัด ประเทศมาเลเซีย ประกอบด้วยสารสำคัญเป็น N-(phosphonomethyl) glycine 36% โดยมวลต่อปริมาตร เตรียมสารละลายที่ใช้ทดสอบด้วยน้ำกลั่น

**2.3 การทดสอบความเป็นพิษเฉียบพลันของราวด์อัพ ดัดแปลงจาก OECD [6]**

neonate จำนวน 30 ตัวต่อหนึ่งความเข้มข้น ให้อาหารก่อนนำไปทดสอบเป็นเวลา 3-4 ชั่วโมง หลังจากนั้นย้ายลงในหลุม 6-well plate ที่มีสารละลายราวด์อัพปริมาตร 10 มิลลิลิตรต่อหลุม หลุมละ 5 ตัว โดยความเข้มข้นที่ใช้ทดสอบแสดงในตารางที่ 1 (2250, 3150, 4050, 4950 และ 5400 ไมโครกรัมต่อลิตร) กลุ่มควบคุมใช้น้ำกรองในทุกการทดลอง ระยะเวลาที่ใช้ทดสอบคือ 48 ชั่วโมง และงดการให้อาหารตลอด 48 ชั่วโมง ทำการทดสอบ 3 ซ้ำ แล้วตรวจสอบการเคลื่อนที่ที่เวลา 24 และ 48 ชั่วโมง โดยทำการนับจำนวนไรแดงที่ไม่เคลื่อนที่ภายใน 15 วินาที หลังจากเขย่า plate หลังจากนั้นบันทึกจำนวนในแต่ละความเข้มข้น หาค่าความเข้มข้นของสารที่ทำให้ไรแดงจำนวน 50% ไม่เคลื่อนที่ (EC50) ด้วยโปรแกรมสำเร็จรูป SPSS 11.5 ด้วยวิธี Probit analysis

**2.4 การศึกษาความเป็นพิษเรื้อรังของราวด์อัพต่อการเจริญเติบโตและการสืบพันธุ์ ดัดแปลงจาก OECD [11]**

neonate จำนวน 30 ตัวต่อหนึ่งความเข้มข้น ย้ายลงในหลุม 24-well plate ที่มีสารละลายราวด์อัพที่ความเข้มข้นไม่เกินค่า EC25 (2, 20, 200 และ 2000 ไมโครกรัมต่อลิตร) ปริมาตร 1.5 มิลลิลิตรต่อหลุม ความเข้มข้นที่เลือกใช้เป็นความเข้มข้นที่ได้จากการทดลองในข้อ 2.3 และเป็นความเข้มข้นที่สิ่งมีชีวิตสามารถอยู่รอดได้ในจำนวนที่พอที่จะศึกษาผลของสารต่อไป เลี้ยง neonate แบบแยกเดี่ยว 1 ตัวต่อ 1 หลุม เป็นระยะเวลา 7 วัน ทำการเปลี่ยนสารละลายราวด์อัพ และให้สาหร่าย *Chlorella* sp. เป็นอาหารทุกวัน ความเข้มข้น $5.0 \times 10^6$ เซลล์ต่อมิลลิลิตร วันละ 20 ไมโครลิตรต่อหลุม การตรวจสอบผลการสืบพันธุ์ วัดความดกของลูกที่เกิดโดยทำการนับจำนวนลูก บันทึกผลทุกวันจนกว่าแม่ไรแดงตาย และสำหรับผลการเจริญเติบโต ทำการวัดความยาวทุกวันที่ 1, 3, 5, และ 7 ภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบเลนส์ประกอบ ถ่ายรูปด้วยกล้อง Dino-Eye รุ่น AM423X และใช้โปรแกรมวิเคราะห์ภาพ Dino capture 2.0 ในการวัดความยาว โดยความยาวที่ใช้ในการวัดผล ได้แก่ ความยาวลำตัว (body length) ความยาวส่วนหัว (head length) และความกว้างของลำตัว (body height) [12]

**2.5 การศึกษาผลกระทบของราวด์อัพต่อกิจกรรมของเอนไซม์ CAT**

หลังจาก neonate จำนวน 30 ตัวถูกทดสอบในสารละลายราวด์อัพที่ความเข้มข้น 2, 20, 200 และ 2000 ไมโครกรัมต่อลิตร เป็นเวลา 48 ชั่วโมง นำมาทำการสกัดเอนไซม์หยาบ นำตัวไรแดงมาล้างด้วยสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ pH 7.0 (50 มิลลิโมลาร์) จากนั้นทำการปั่นบด เป็นเวลา 3 นาที ในสารละลายพีบีเอส pH 7.0 (50 มิลลิโมลาร์) ปริมาตร 1.2 มิลลิลิตร บนน้ำแข็ง และนำไปปั่นเหวี่ยงที่ 5,000g เป็นเวลา 20 นาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เก็บสารส่วนใสไว้ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส เพื่อนำไปวัดปริมาณโปรตีนและวิเคราะห์กิจกรรมของเอนไซม์ CAT ต่อไป

**2.5.1 การวิเคราะห์กิจกรรมของเอนไซม์ CAT ดัดแปลงจาก Jemec [13] และ Aebi [14]**

เจือจางสารส่วนใสปริมาตร 0.5 มิลลิลิตร ด้วยสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ pH 7.0 (50 มิลลิโมลาร์) ปริมาตร 1.5 มิลลิลิตร นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงด้วยเครื่อง spectrophotometer ที่ความยาวคลื่น 240 นาโนเมตร light path (b) 1 เซนติเมตร ปรับค่าแสดงให้เป็นศูนย์ จากนั้นเติมสารละลาย $H_2O_2$ 1 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันทันที และวัดค่าการดูดกลืนแสง ในโหมด time scan เป็นเวลา 4 นาที ทำการบันทึกผลการลดลงของ $H_2O_2$ ที่ทำปฏิกิริยากับเอนไซม์ นำค่าความแตกต่างการดูดกลืนแสง มาคำนวณจำนวนโมลของ $H_2O_2$ ที่ถูกใช้ไปในการทำปฏิกิริยา (c) หน่วยเป็นโมลต่อลิตร โดยกำหนดค่า $\varepsilon$ (Extinction coefficient) = 43.6 โมล$^{-1}$ เซนติเมตร$^{-1}$ คำนวณหากิจกรรมของเอนไซม์ CAT (ไมโครโมล/มิลลิกรัมโปรตีน/นาที) ปริมาณโปรตีนได้จากการคำนวณโดยเทียบกับกราฟโปรตีนมาตรฐาน

$$\text{CAT activity} = \frac{c}{\text{เวลา (นาที)} \times \text{มิลลิกรัมโปรตีน}}$$

$$c = \frac{\Delta A240 \text{ นาโนเมตร}}{\varepsilon b}$$

**2.5.2 การวิเคราะห์ปริมาณโปรตีนโดยวิธี Lowry assay [13, 15]**

เตรียมหลอดสารละลายโปรตีนมาตรฐาน Bovine serum albumin (BSA) (1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร) และหลอดสารส่วนใส ปริมาตร 0.5 มิลลิลิตร แล้วเติม Lowry's solution 0.7 มิลลิลิตร ลงในหลอดทดลองนำไปผสมให้เข้ากันด้วยเครื่อง vortex เป็นเวลาสั้นๆ เก็บไว้ในที่มืด อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 20 นาที แล้วนำตัวอย่างออกมาเติม Folin Reagent (50% (v/v)) 0.1 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันด้วยเครื่อง vortex และเก็บไว้ในที่มืดเป็นเวลา 30 นาที จึงนำออกมาผสมให้เข้ากันด้วยเครื่อง vortex และนำตัวอย่างใส่ลงใน cuvette นำไปบันทึกค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 750 นาโนเมตร นำค่าที่ได้มาเขียนกราฟมาตรฐาน สำหรับสารละลายตัวอย่างให้บันทึกค่าที่ได้ นำมาเทียบกับกราฟมาตรฐานเพื่อคำนวณปริมาณโปรตีนตัวอย่าง

**2.6 การวิเคราะห์สถิติ**

การศึกษาผลของสารต่อความยาวลำตัวของไรแดงที่ความเข้มข้นต่างๆ นำไปทดสอบทางสถิติโดยใช้ One-Way ANOVA และในการพิจารณาความแตกต่างเชิงพหุใช้ Duncan ใน Post Hoc Multiple Comparisons และใช้สถิติเดียวกันนี้ในการวิเคราะห์ผลของสารต่อจำนวน neonate และกิจกรรมของเอนไซม์ CAT การทดสอบทางสถิติทั้งหมดใช้โปรแกรมสำเร็จรูป SPSS 11.5 for windows

## 3. ผลการทดลองและวิจารณ์ผล

**3.1 การทดสอบความเป็นพิษเฉียบพลันของราวด์อัพ**

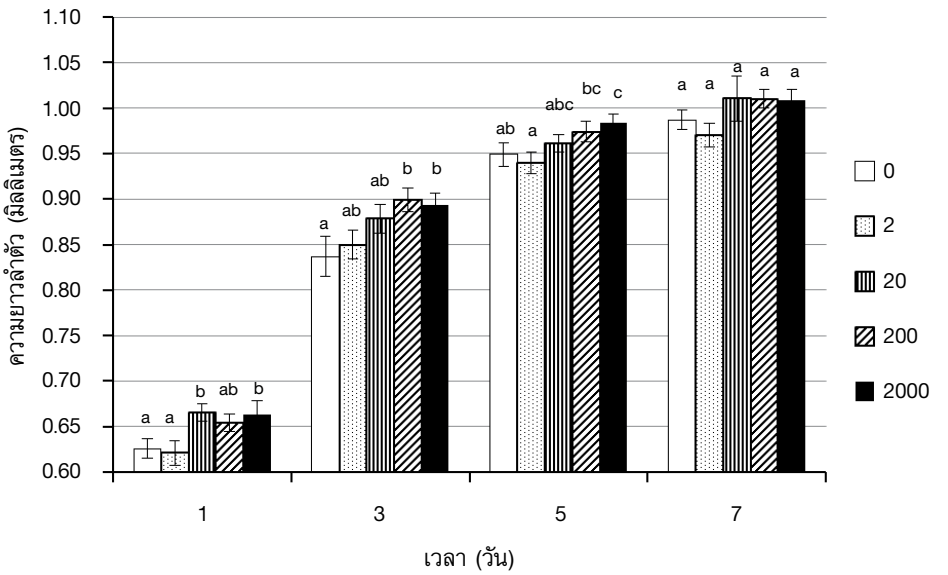
*Daphnia* sp. และ *Ceriodaphnia* sp. เป็นครัสตาเซียนในแหล่งน้ำที่นิยมใช้ในการศึกษาความเป็นพิษของสารเคมีต่อระบบนิเวศแหล่งน้ำ [16] การทดลองครั้งนี้จึงใช้ไรแดง *M. macrocopa* ซึ่งเป็นครัสตาเซียนสายพันธุ์ที่พบทั่วไปในประเทศไทย ทดสอบกับสารละลายราวด์อัพต่อการเคลื่อนที่ พบว่าสารมีผลต่อการเคลื่อนที่ของไรแดง ดังแสดงในตารางที่ 1 โดยมีค่า 48h-EC50 ของสารเท่ากับ 3970 ไมโครกรัมต่อลิตร ซึ่งมีค่าต่ำกว่าการทดสอบของ Tsui และ Chu [16] ที่ทดสอบกับ *Ceriodaphnia dubia* มีค่า 48h-EC50 ของสาร 5390 ไมโครกรัมต่อลิตร นอกจากนี้ยังมีการรายงานค่า 48h-EC50 ของสารที่ทดสอบกับ *Daphnia magna* มีค่าเป็น 4000 และ 7400 ไมโครกรัมต่อลิตร [17, 18] และใน *Daphnia pulex* มีค่าเป็น 5900 และ 7900 ไมโครกรัมต่อลิตร [19, 20] จากผลการทดสอบจะเห็นได้ว่า 48h-EC50 ของราวด์อัพต่อไรแดง *M. macrocopa* มีค่าความเป็นพิษค่อนข้างสูงเมื่อเทียบกับ *C. dubia, D. magna* และ *D. pulex* เนื่องจาก *M. macrocopa* เป็นครัสตาเซียนที่มีขนาดลำตัวที่เล็กกว่า จึงมีความไวต่อสารพิษสูงและทนต่อสารพิษได้ต่ำกว่า แต่อย่างไรก็ตาม ไกลโฟเซต ยังเป็นสารกำจัดวัชพืชที่มีความเป็นพิษที่ต่ำเมื่อเทียบกับสารกำจัดวัชพืชกลุ่มอื่นๆ ได้แก่ กลุ่ม paraquat และ 2,4-D ซึ่งมีความเป็นพิษสูงกว่าไกลโฟเซตถึง 30 เท่า และ 15 เท่าตามลำดับ [21]

**ตารางที่ 1** ผลของราวด์อัพต่อการเคลื่อนที่ของ *Moina macrocopa* หลังจากสัมผัสสารเป็นเวลา 24 และ 48 ชั่วโมง

| ความเข้มข้นของราวด์อัพ (ไมโครกรัมต่อลิตร) | จำนวน *Moina macrocopa* ที่ไม่เคลื่อนที่สะสม | | | |
|---|---|---|---|---|
| | 24 ชั่วโมง | | 48 ชั่วโมง | |
| | ตัว | % | ตัว | % |
| 2250 | 3.0 | 15.0 | 5.7 | 28.5 |
| 3150 | 5.0 | 25.0 | 7.0 | 35.0 |
| 4050 | 7.0 | 35.0 | 11.3 | 56.5 |
| 4950 | 10.0 | 50.0 | 12.7 | 63.5 |
| 5400 | 10.0 | 50.0 | 13.3 | 66.5 |

**3.2 การศึกษาความเป็นพิษของราวด์อัพต่อการเจริญเติบโตและการสืบพันธุ์**

การศึกษาความเป็นพิษเรื้อรังของราวด์อัพความเข้มข้นน้อยกว่า EC25 (2, 20, 200 และ 2000 ไมโครกรัมต่อลิตร) ต่อการเจริญเติบโตของไรแดง โดยพิจารณาจากความยาวลำตัว ความยาวส่วนหัว และความกว้างลำตัว ผลการศึกษาพบว่า สารมีผลต่อความยาวลำตัวแต่ไม่มีผลต่อความยาวส่วนหัวและความกว้างลำตัว เมื่อไรแดงสัมผัสสารที่ความเข้มข้นสูงขึ้น ส่งผลให้มีความยาวลำตัวเพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ เมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม ($p$<0.05) ได้แก่ กลุ่มความเข้มข้น 20 และ 200 ไมโครกรัมต่อลิตร เมื่อสัมผัสสารเป็นเวลา 1 และ 3 วัน ตามลำดับ และความเข้มข้น 2000 ไมโครกรัมต่อลิตร เมื่อสัมผัสสารเป็นเวลา 1, 3 และ 5 วัน ส่วนในวันที่ 7 พบว่าความยาวลำตัวไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p$>0.05) (รูปที่ 1)




**รูปที่ 1** ผลของราวด์อัพที่ความเข้มข้น 2, 20, 200 และ 2000 ไมโครกรัมต่อลิตร ต่อขนาดความยาวลำตัวของ *Moina macrocopa* หลังจากสัมผัสสารเป็นเวลา 1, 3, 5 และ 7 วัน (mean±SE)
หมายเหตุ อักษรภาษาอังกฤษตัวพิมพ์เล็กที่เหมือนกันในกราฟแต่ละแท่งในแต่ละวัน แสดงว่าไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ($p$>0.05)

แสดงถึงระดับความเข้มข้นของสารที่ใช้ในการทดสอบ ไม่ส่งผลทำให้การเคลื่อนที่ลดลง ไรแดงจึงยังสามารถใช้รยางค์ในการเคลื่อนที่ และกรองกินอาหารได้ จึงมีการเจริญเติบโตสูงขึ้นซึ่งดูได้จากความยาวลำตัวที่เพิ่มขึ้น นอกจากนี้ การสัมผัสสารในระยะแรก พบขนาดความยาวลำตัวไรแดงเพิ่มขึ้นจากกลุ่มควบคุม ซึ่งเกิดจากการปรับตัวให้กินอาหารที่มากขึ้นเพื่อให้สามารถอยู่รอดได้ แต่เมื่อได้รับสารเป็นเวลานานขึ้นจะส่งผลให้การเคลื่อนที่ของรยางค์ช้าลง การกรองกินอาหารลดลง ทำให้ช่วงความยาวลำตัวที่เพิ่มขึ้นจากกลุ่มควบคุมมีค่าลดลงในวันที่ 7

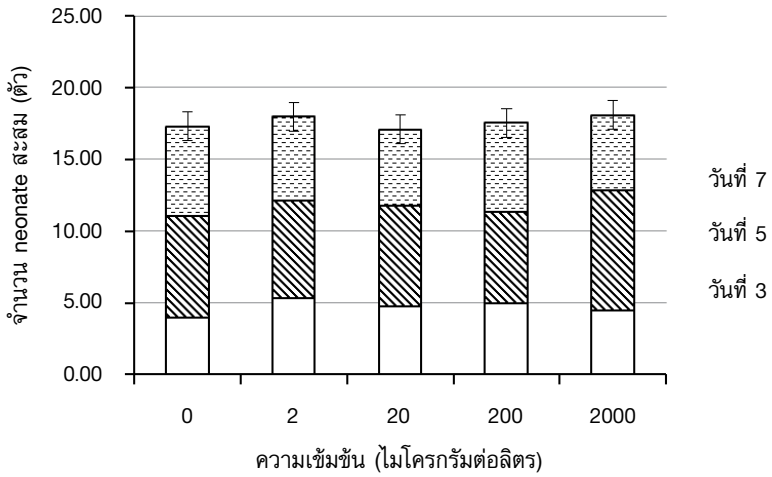
ผลการทดลองนี้ไม่สอดคล้องกับรายงานของ Cuhra และคณะ [8] ที่ทดสอบ Roundup Weed & Grass Killer Concentrate plus กับ *D. magna* ซึ่งพบว่ามีความยาวลำตัวลดลงที่ความเข้มข้น 1350 ไมโครกรัมต่อลิตร เมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุมในวันที่ 36 และในรายงานของ Papchenkova [22] ทดสอบ ราวด์อัพกับ *D. magna* พบว่าความยาวลำตัวลดลงที่ความเข้มข้น 2000 ไมโครกรัมต่อลิตร

ผลการทดลองที่แตกต่างกัน อธิบายได้จากความแตกต่างของสายพันธุ์สิ่งมีชีวิตที่ใช้ทดสอบ นอกจากนี้

ระยะเวลาในการสัมผัสสารเป็นอีกปัจจัยหนึ่ง เนื่องจาก *Moina* มีช่วงชีวิตที่สั้นกว่า *Daphnia* มาก โดยไรแดงที่เพาะเลี้ยงในห้องปฏิบัติการมีอายุเฉลี่ย 11 วัน ในขณะที่ *Daphnia* มีอายุเฉลี่ย 40-56 วัน [23] ระยะเวลาการสัมผัสสารในงานวิจัยครั้งนี้ จึงใช้เวลาที่สั้นกว่า ทำให้ผลการทดสอบต่างกัน รวมทั้งความแตกต่างของชนิดสูตรราวด์อัพ เนื่องจากสารกำจัดวัชพืชที่ใช้แต่ละสูตร มีชนิดและปริมาณของสารเพิ่มเติมอื่นๆ ที่แตกต่างกัน ซึ่งอาจทำให้ความเป็นพิษของไกลโฟเซตเพิ่มขึ้น (synergism) เช่น การทดลองของ Tsui และ Chu [16] กับ *C. dubia* ที่พบว่าค่าความเป็นพิษของสารราวด์อัพมีค่าสูงกว่าไกลโฟเซตบริสุทธิ์ [18]

อย่างไรก็ตาม ผลจากการที่มีขนาดความยาวลำตัวที่เพิ่มขึ้นใน 5 วันแรก อาจทำให้ความเป็นพิษของราวด์อัพต่อไรแดงเพิ่มขึ้น เพราะจากรายงานของ Adams และ Moss อธิบายว่า การเจริญเติบโตที่รวดเร็วอาจไปเพิ่มความเป็นพิษของสารเคมีที่ทดสอบ เนื่องจากเซลล์ที่มีการแบ่งตัวอย่างรวดเร็วมักไวต่อความเครียดจากสิ่งแวดล้อม [24]

การศึกษาความเป็นพิษเรื้อรังของราวด์อัพต่อการสืบพันธุ์ของไรแดง โดยพิจารณาจากจำนวน neonate ที่ฟักทั้งหมด หลังจากได้รับสารเป็นเวลา 7 วัน พบว่าความเข้มข้นของสารที่เพิ่มขึ้น ไม่มีผลต่อจำนวน neonate สะสมทั้งหมดที่ฟักออกมา (รูปที่ 2) ซึ่งสอดคล้องกับรายงานของ Achiorno และคณะ [25] ที่ทำการทดสอบไกลโฟเซต และราวด์อัพกับ *C. nobilii* ในระยะเอ็มบริโอ พบว่า สารทั้งสองไม่มีผลต่อระบบสืบพันธุ์และการเจริญพัฒนาของเอ็มบริโอ และจากรายงานผลของสารในสัตว์กลุ่มอื่นๆ ได้แก่ หนู และกระต่ายพบว่า ทั้งไกลโฟเซตและราวด์อัพไม่มีผลต่อระบบสืบพันธุ์ของสัตว์ [26] และที่ความเข้มข้น 2 ไมโครกรัมต่อลิตร ทำให้จำนวน neonate ครอกแรกเพิ่มสูงสุดซึ่งอาจเป็นผลมาจาก hormesis



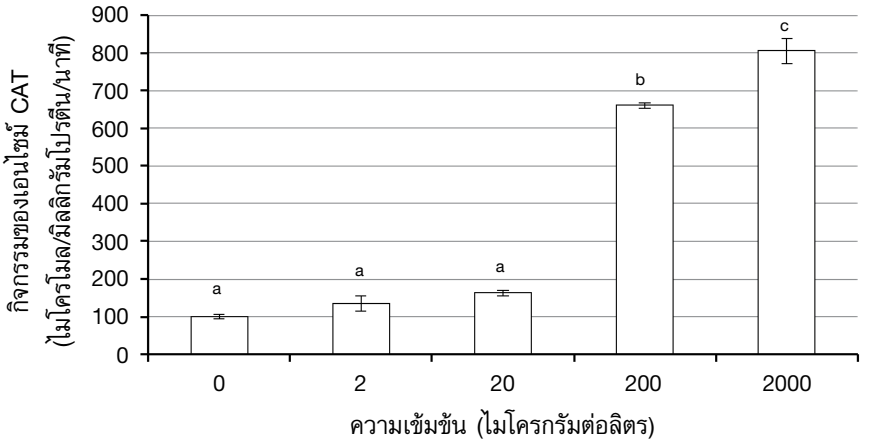

**รูปที่ 2** ผลของราวด์อัพที่ความเข้มข้น 2, 20, 200 และ 2000 ไมโครกรัมต่อลิตร ต่อจำนวน neonate ทั้งหมดของ *Moina macrocopa* ในเวลา 7 วัน (mean±SE)

อย่างไรก็ตาม มีรายงานว่าลูกที่เกิดขึ้นมานั้นมีการรอดชีวิตต่ำ เช่น จากการทดลองของ Achiorno และคณะ [25] ราวด์อัพมีผลไปลดอัตราการอยู่รอดของตัวอ่อน *C. nobilii* ถึง 50% จากรายงานของ Cuhra และคณะ [8] พบว่าตั้งแต่ความเข้มข้น 450 ไมโครกรัมต่อลิตร ส่งผลให้จำนวน neonate ที่มีชีวิตของ *D. magna* ลดลง และความเข้มข้น 1350 ไมโครกรัมต่อลิตร ส่งผลให้ neonate ที่ฟักออกมาตายเกือบทั้งหมด และรายงานของ Papchenkova [22] ทดสอบกับ *D. magna* เช่นกัน พบว่ามีการลดลงของ neonate ที่มีชีวิตที่ความเข้มข้น

2000 ไมโครกรัมต่อลิตร จึงสรุปได้ว่าราวด์อัพมีผลทำให้เกิดการเจริญพัฒนาของ neonate ในตัวแม่เป็นไปอย่างปกติ แต่ neonate ที่ฟักออกมาอาจไม่สมบูรณ์และอาจตายได้ เนื่องจากสารเคมีมีผลต่อความสามารถในการอยู่รอดของ neonate

### 3.3 การศึกษาผลกระทบของราวด์อัพต่อกิจกรรมของเอนไซม์ CAT

ผลการทดสอบการศึกษากิจกรรมของเอนไซม์ CAT หลังจากไรแดงสัมผัสสารราวด์อัพเป็นเวลา 48 ชั่วโมง ที่ความเข้มข้นต่ำกว่า EC25 โดยพิจารณาจากกิจกรรมของเอนไซม์ CAT ที่ทำปฏิกิริยากับ $H_2O_2$ พบว่ากิจกรรมของเอนไซม์ CAT มีค่าเพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม ($p$<0.05) (รูปที่ 3) ที่ความเข้มข้น 200 และ 2000 ไมโครกรัมต่อลิตร โดยมีกิจกรรมของเอนไซม์ CAT เพิ่มสูงขึ้นจากกลุ่มควบคุมคิดเป็น 7 และ 8 เท่า ตามลำดับ แสดงว่าสารราวด์อัพไปเหนี่ยวนำให้สิ่งมีชีวิตเกิดความเครียด โดยปกติสารพิษจะเข้าไปชักนำให้มีการสร้างสารอนุมูลอิสระขึ้นได้แก่ Superoxide anion radical และ $H_2O_2$ ซึ่งเป็นสารที่มีความว่องไวในการเกิดปฏิกิริยา และทำอันตรายกับส่วนประกอบของเซลล์ ได้แก่ โปรตีน ไขมัน คาร์โบไฮเดรต หรือดีเอ็นเอ [27] ร่างกายจึงมีกลไกกำจัดสารอนุมูลอิสระ (antioxidant defense system) ซึ่งเกิดจากการทำงานของสารต้านอนุมูลอิสระต่างๆ ตัวอย่างเช่น เอนไซม์ superoxide dismutase (SOD) และ CAT เพื่อควบคุมอนุมูลอิสระต่างๆ ให้อยู่ในระดับสมดุล [28] จากการทดลองแสดงให้เห็นว่า เมื่อไรแดงสัมผัสกับสารราวด์อัพทำให้มีการสร้างสารอนุมูลอิสระ $H_2O_2$ เพิ่มขึ้นเนื่องมาจากความเครียด เอนไซม์ CAT จึงถูกสร้างเพิ่มขึ้นเพื่อทำหน้าที่กำจัดสารอนุมูลอิสระ [29, 30] ซึ่งเป็นกลไกส่วนหนึ่งที่เกิดจากการควบคุมภายในสิ่งมีชีวิตเมื่อเซลล์ได้รับความเครียดจากสารเคมีหรือสิ่งแปลกปลอม โดยการทำงานของเอนไซม์ CAT จะเปลี่ยน $H_2O_2$ ให้กลายเป็นน้ำและออกซิเจนที่ไม่มีความเป็นพิษต่อร่างกาย [28]




**รูปที่ 3** กิจกรรมของเอนไซม์ CAT หลังจาก *Moina macrocopa* สัมผัสราวด์อัพเป็นเวลา 48 ชั่วโมง

หมายเหตุ อักษรภาษาอังกฤษตัวพิมพ์เล็กที่เหมือนกันในกราฟแต่ละแท่ง แสดงว่าไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ($p$>0.05)

ผลการทดลองครั้งนี้ สอดคล้องกับการศึกษากิจกรรมเอนไซม์ CAT ในปลาของ Topal และคณะ [31] ได้ศึกษาผลของสารไกลโฟเซตต่อปลา *Oncorhynchus mykiss* พบว่า กิจกรรมเอนไซม์ถูกชักนำให้เพิ่มขึ้นหลังจากสัมผัสสารเป็นเวลา 12 ชั่วโมง ที่ความเข้มข้น 2.5 มิลลิกรัมต่อลิตร และ Samanta และคณะ [32] ทดสอบความเป็นพิษของสารกำจัดวัชพืช Excel Mera 71 (ไกลโฟเซตในรูปของเกลือแอมโมเนียม) ในปลา *Anabas testudineus* และพบว่ากิจกรรมเอนไซม์ CAT เพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญ ในตับ กล้ามเนื้อ เหงือก และสมองของ *A. testudineus* ที่ความเข้มข้น 17.2 มิลลิกรัมต่อลิตร

นอกจากนี้ Contaedo-Jara และคณะ [33] ได้ทำการศึกษาผลกระทบของไกลโฟเซตบริสุทธิ์ และ ราวด์อัพ อัลทราต่อไส้เดือนดิน *Lumbriculus variegates* พบว่ากิจกรรมของเอนไซม์ CAT เพิ่มขึ้น เมื่อได้รับการสัมผัสสารที่ความเข้มข้น 0.05 และ 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร แสดงว่า กิจกรรมของเอนไซม์ CAT นั้นสามารถใช้เป็นตัวบ่งชี้ทางชีวภาพในการศึกษาสภาวะความเป็นพิษในสิ่งมีชีวิตอื่นๆ อีกมากมายรวมทั้งในไรแดง

เมื่อเปรียบเทียบผลการทดลองในงานวิจัยทั้ง 3 วิธี ได้แก่ ความยาวลำตัว จำนวน neonate สะสม และกิจกรรมของเอนไซม์ CAT พบว่าวิธีที่ดีที่สุดในการประเมินความเป็นพิษของราวด์อัพด้วยไรแดง คือวิธีวัดขนาดความยาวลำตัว เนื่องจากเป็นวิธีที่มีความไวมากที่สุด เพราะพบความแตกต่างจากกลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญ ($p$<0.05) ตั้งแต่ความเข้มข้น 20 ไมโครกรัมต่อลิตร ในวันที่ 1 ส่วนการวัดกิจกรรมของเอนไซม์ CAT พบความแตกต่างจากกลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญ ($p$<0.05) ตั้งแต่ความเข้มข้น 200 ไมโครกรัมต่อลิตร ในวันที่ 2 ส่วนผลจำนวน neonate สะสมไม่พบว่ามีความสัมพันธ์กับความเข้มข้นของสาร แสดงให้เห็นว่า การศึกษาการเปลี่ยนแปลงขนาดความยาวลำตัวร่วมกับกิจกรรมของ CAT สามารถใช้คาดการณ์ความเป็นพิษของราวด์อัพต่อไรแดงได้ และ *M. macrocopa* สามารถใช้เป็นโมเดลในการตรวจสอบความเป็นพิษได้เช่นเดียวกับ *D. magna* ซึ่งเป็นที่ยอมรับในต่างประเทศ

## 4. สรุปผลการทดลอง

จากการทดสอบความเป็นพิษของราวด์อัพต่อไรแดง *M. macrocopa* พบว่าผลการทดสอบความเป็นพิษเฉียบพลัน มีค่า 48h-EC50 เท่ากับ 3970 ไมโครกรัมต่อลิตร การทดสอบความเป็นพิษเรื้อรังต่อการเจริญเติบโต พบว่าสารส่งผลต่อขนาดความยาวของลำตัว ตั้งแต่ความเข้มข้น 20 ไมโครกรัมต่อลิตร และส่งผลต่อกิจกรรมของเอนไซม์ CAT ตั้งแต่ความเข้มข้น 200 ไมโครกรัมต่อลิตร เมื่อสัมผัสสารเป็นเวลา 24 และ 48 ชั่วโมง ตามลำดับ แต่พบว่าราวด์อัพไม่มีผลต่อจำนวน neonate สะสม

## 5. เอกสารอ้างอิง

1. Office of Agricultural Economics, 2012, Agricultural Economics Data: Production Factors, [Online], Available: http://www.oae.go.th/ewt__news.php?nid=146 [30 August 2014]. (In Thai).

2. Weed Science Society of America, 2002, Herbicide Handbook, Lawrence, Kansas, USA.

3. Steinrucken, H.C. and Amrhein, N., 1980, "The Herbicide Glyphosate is a Potent Inhibitor of 5-Enolpyruvyl-Shikimicacid-3-Phosphate Synthase", *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 94, pp. 1207-1212.

4. Sihtmae, M., Blinova, I., Kunnis-Beres, K., Kanarbik, L., Heinlaan, M. and Kahru, A., 2013, "Ecotoxicological Effects of Different Glyphosate Formulations", *Applied Soil Ecology*, 72, pp. 215-224.

5. Romero, D.M., Ros de Molina, M.C. and Juarez, A.B., 2011, "Oxidative Stress Induced by a Commercial Glyphosate Formulation in a Tolerant Strain of Chlorella kessleri", *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 74, pp. 741-747.

6. OECD, 2004, Guideline for Testing of Chemicals. In: Test No. 202: *Daphnia* sp. Acute Immobilisation Test, Paris, France.

7. Melnichuk, S.D., Sherban, E.P. and Lokhanskaya, V.I., 2007, "Estimation of Toxicity of Glyphosate-based Herbicides by Biotesting Method Using Cladocera", *Hydrobiological Journal*, 43, pp. 80-91.

8. Cuhra, M., Traavik, T. and Bohn, T., 2012, "Clone and Age-dependent Toxicity of a Glyphosate Commercial Formulation and Its Active Ingredient in Daphnia magna", *Ecotoxicology*, 22, pp. 251-262.

9. Feret, F., Serafim A. and Bebianno, M.J., 2003, "Antioxidant Enzyme Activities, Metallothioneins and Lipid Peroxidant as Biomarker in *Ruditapes decussates*", *Ecotoxicity*, 12, pp. 417-426.

10. Lagadic, L., Caquet, T., and Ramade, F., 1994, "The Role of Biomarker in Environmental Assessment. Invertebrate Populations and Communities", *Ecotoxicology*, 3, pp. 193-208.

11. OECD, 2008, Guidelines for Testing of Chemicals. In: Test No. 211: *Daphnia magna* Reproduction Test, Paris, France.

12. Mensah, P.K., Muller, W.J. and Palmer, C.G., 2012, "Using Growth Measures in the Freshwater Shrimp *Caridina nilotica* as Biomarkers of Roundup® Pollution of South African Freshwater Systems", *Physics and Chemistry of the Earth*, 50, pp. 262-268.

13. Jemec, A., Tislera, T., Drobneb, D., Sepcicb, K., Fournierc, D. and Trebsed, P., 2007, "Comparative Toxicity of Imidacloprid, of Its Commercial Liquid Formulation and of Diazinon to a Non-target Arthropod, the Microcrustacean *Daphnia magna*", *Chemosphere*, 68, pp. 1408-1418.

14. Aebi, H., 1974, Catalases Methods of Enzymatic Analysis, Academic Press, pp. 673-684.

15. Lowry, O.H., Roseberough, N.J., Farr, A.L. and Randall, R.J., 1951, "Protein Measurement with the Folin Phenol Reagent", *Biological Chemistry*, 193, pp. 265-275.

16. Tsui, M.T. and Chu, L.M., 2003, "Aquatic Toxicity of Glyphosate-based Formulations: Comparison between Different Organisms and the Effects of Environmental Factors", *Chemosphere*, 52, pp. 1189-1197.

17. EG & G Bionomics, 1980a, Toxicity of Roundup to the Water Flea (*Daphnia magna*), Wareham, Massachusetts.

18. EG & G Bionomics, 1980b, Toxicity of Roundup to the Water Flea (*Daphnia magna*) with and without Continuous Aeration, Wareham, Massachusetts.

19. Hartman, W.A. and Martin, D.B., 1984, "Effect of Suspended Bentonite Clay on the Acute Toxicity of Glyphosate to *Daphnia pulex* and *Lemna minor*", Environmental Contamination and Toxicology, 33, pp. 355-361.

20. Servizi, J.A., Gordon, R.W. and Marten, D.W., 1987, "Acute Toxicity of Garlon 4 and Roundup Herbicides to Salmon, Daphnia, and Trout", *Environmental Contamination and Toxicology*, 39, pp. 15-22.

21. Weed Science Society of America, 1994, Herbicide Handbook, Lawrence, Kansas, USA.

22. Papchenkova, G.A., 2007, "Study of Chronic Toxicity of the Herbicide Roundup in a Series of Generations of *Daphnia magna*", *Toksikologiya Vestnik*, 5, pp. 14-17.

23. Pennak, R., 1978, Freshwater Invertebrates of the United State, 2nd ed., John Wiley & Sons, New York, p. 803.

24. Adams, M.R. and Moss, M.O., 2000, Food Microbiology, United Kingdom.

25. Achiorno, C.L., Villalobos, C. and Ferrari, L., 2008, "Toxicity of the Herbicide Glyphosate to *Chordodes nobilii* (Gordiida, Nematomorpha)", *Chemosphere*, 71, pp. 1816-1822.

26. Williams, G.M., Kroes, R. and Munro, I.C, 2000, "Safety Evaluation and Risk Assessment of

the Herbicide Roundup and Its Active Ingredient, Glyphosate, for Humans," *Regulatory Toxicology and Pharmacology*, 31, pp. 117-165.

27. Kadsanit, S., Pinitsoontorn, C., Loilome, W. and Yongvanit, P., 2011, "Adverse Effects Caused by Adaptive Imbalance to Genotoxic Stress after Infection and Inflammation," *Srinagarind Medical Journal*, 26, pp. 127-135.

28. Ames, B.M., Shigena, M.K. and Hagen, T.M., 1993, "Oxidants, Antioxidants and the Degenerative Diseases of Aging", *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 90, pp. 7915-7922.

29. Almeida, E.A. and Mascio, P.D., 2011, "Hypometabolism and Antioxidative Defense Systems in Marine Invertebrates", *Research Signpost*, 37, pp. 39-55.

30. Sies, H., 1993, "Strategies of Antioxidant Defense", *European Journal of Biochemistry*, 215, pp. 213-219.

31. Topal, A., Atamanalp, M., Uçar, A., Oruç, E., Kocaman, E.M., Sulukan, E., Akdemir, F., Beydemir, Ş., Kilinç, N., Erdoğan, O. and Ceyhun, S.B., 2015, "Effects of Glyphosate on Juvenile Rainbow Trout (*Oncorhynchus mykiss*): Transcriptional and Enzymatic Analyses of Antioxidant Defence System, Histopathological Liver Damage and Swimming Performance", *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 111, pp. 206-214.

32. Samanta, P., Pal, S., Mukherjee, A.K. and Ghosh, A.R., 2014, "Biochemical Effects of Glyphosate Based Herbicide, Excel Mera 71 on Enzyme Activities of Acetylcholinesterase (AChE), Lipid Peroxidation (LPO), Catalase (CAT), Glutathione-S-transferase (GST) and Protein Content on Teleostean Fishes", *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 107, pp. 120-125.

33. Contardo-Jara, V., Klingelmannb, E. and Wieganda, C., 2009, "Bioaccumulation of Glyphosate and Its Formulation Roundup Ultra in Lumbriculus variegatus and Its Effects on Biotransformation and Antioxidant Enzymes", *Environmental Pollution*, 157, pp. 57-63.