ผลกึ่งเรื้อรังของสารสกัดจากกากเมล็ดชากำจัดหอย *Camellia sinensis* L. ที่มีต่อเหงือกและเนื้อเยื่อตับของปลานิล *Oreochromis niloticus* L.

Sub- chronic effects of tea seed extract, *Camellia sinensis* L. on gill and liver of tilapia, *Oreochromis niloticus* L.

ดาราพร รินทะรักษ์ สมเกียรติ กล้าแข็ง ปราสาททอง พรหมเกิด

กลุ่มกีฏและสัตววิทยา สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช

รายงานความก้าวหน้า

ศึกษาการเปลี่ยนแปลงทางพยาธิสภาพของเหงือกและเนื้อเยื่อตับของปลานิล *Oreochromis niloticus* Linn. ภายหลังได้รับสารสกัดกากเมล็ดชากำจัดหอย *Camellia sinensis* L.โดยทำการทดลองหาค่าความเป็นพิษเฉียบพลันตามวิธี Acute Static Toxicity Test ใช้ลูกปลานิลอายุ 1 เดือน แบ่งการทดลองออกเป็น กลุ่มทดสอบสารสกัดกากเมล็ดชา กับกลุ่มควบคุม และกลุ่มสารเปรียบเทียบ metaldehde 80% WP ทำการทดลองกลุ่มละ 3 ซ้ำ ทดสอบด้วยการทำ range finding test กำหนดความเข้มข้นสารสกัดกากเมล็ดชาเป็นช่วง คือ 1, 10, 100 , 1,000 และ 10,000 ppm. ได้ความเข้มข้นที่ทำให้ลูกปลานิลตายใกล้ค่า 50% อยู่ระหว่าง 10 -100 ppm. จึงนำมาทดสอบด้วย definitive test ได้ความเข้มข้นที่ทำให้ลูกปลานิลตายใกล้ค่า 50% อยู่ระหว่าง 40 - 60 ppm. นำมาวิเคราะห์หาค่า LC_{50} โดยใช้โปรแกรม probit analysis ได้ค่า LC_{50} (ที่96 ชั่วโมง) 47.53 ppm. และจากค่าดังกล่าวนำมาคำนวณหาค่าความเข้มข้นของสารสกัดกากเมล็ดชา ที่จะใช้ในการทดสอบความเป็นพิษกึ่งเรื้อรังต่อไปในปี 2555

ผลการศึกษาการเปลี่ยนแปลงของเหงือกและเนื้อเยื่อตับปลานิล เมื่อนำมาผ่านกระบวนการทางฮิสโตเคมี ด้วย paraffin method และย้อมด้วยสี heamatoxylin & eosin (H & E) ศึกษาใต้กล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสง พบว่าเนื้อเยื่อเหงือกของปลานิลกลุ่มทดสอบสารสกัดกากเมล็ดชามีเซลล์เม็ดเลือดแดงจำนวนมากคั่งอัดแน่นอยู่ตามเส้นเลือดฝอยบริเวณซี่เหงือกและบริเวณ gill arch ซึ่งลักษณะดังกล่าวแตกต่างจากกลุ่มควบคุมที่เซลล์เม็ดเลือดแดงมีการเรียงตัวเดี่ยวๆ อย่างเป็นระเบียบอยู่ภายในเส้นเลือดฝอย ส่วนตับปลานิล ทุกกลุ่ม ไม่พบความแตกต่างของเนื้อเยื่อตับ

รหัสการทดลอง 03-04-54-02-03-02-01-54

คำนำ

กากเมล็ดชา (tea seed cake) เป็นสารสกัดจากเมล็ดชาพันธุ์ Camellia, *Camellia sinensis* L.) ซึ่งมีสารออกฤทธิ์ที่สำคัญคือ สารซาโปนิน (saponin) สามารถใช้กำจัดหอยเชอรี่ได้อย่างมีประสิทธิภาพ โดยซาโปนินมีกลไกการออกฤทธิ์ ทำลายเม็ดเลือดในสัตว์ ซาโปนินที่พบในพืช มี 2 ประเภท คือ steroidal saponins พบในพืชใบเลี้ยงเดี่ยว และ triterpenoid saponins ซึ่งพบในพืชใบเลี้ยงคู่ ตระกูล Leguminoceae และ Araliliaceae ซึ่งซาโปนินทั้ง 2 ประเภท มีฤทธิ์ทางเภสัชวิทยาคล้ายคลึงกัน

ปัจจุบันมีการนำกากเมล็ดชา มาใช้เพื่อป้องกันกำจัดศัตรูพืชมากขึ้น เพราะต้องการลดความเป็นพิษของสารเคมีที่มีผลกระทบต่อสุขภาพและสิ่งแวดล้อม กากเมล็ดชาที่มีการใช้ในปัจจุบัน มีซาโปนิน อยู่ประมาณ 10-13% มีความเป็นพิษรุนแรงกับสัตว์เลือดเย็น โดยซาโปนินจะมีผลต่อศูนย์ประสาทที่ควบคุมการหายใจ ทำให้ขาดออกซิเจนและเม็ดเลือดแดงเกิดการสลายตัว (heamolysis) แต่ในสัตว์เลือดอุ่น เช่น คนและสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม จะทำให้เกิดอาการระคายเคืองต่อเยื่อบุช่องจมูก ทำให้น้ำมูกไหล จาม และมึนงง นอกจากนี้ คุณสมบัติทางเคมีของซาโปนิน ยังพบว่ามีฤทธิ์ในการต้านเชื้อราและแบคทีเรีย โดยซาโปนินจะจับกับเยื่อหุ้มเซลล์ของเชื้อรา ซึ่งสารนี้จะแทรกซึมเข้าไปตามเยื่อหุ้มเซลล์จนทำให้เซลล์ของเชื้อราแตกในที่สุด

ด้านการศึกษาความเป็นพิษของกากเมล็ดชานั้น ยนต์ (2535) ได้ทดสอบความเป็นพิษของซาโปนินในกากเมล็ดชากับกุ้งก้ามกราม ปลาตะเพียนและปลาบู่ทราย โดยใช้กากเมล็ดกากชาอัตรา 30 มิลลิกรัม/ลิตร ในบ่อคอนกรีตที่ใช้เลี้ยงกุ้งก้ามกราม เป็นเวลานาน 2 เดือน พบว่าไม่มีผลกระทบต่ออัตราการเจริญเติบโตของกุ้งก้ามกราม แต่มีผลทำให้ปลาตะเพียนขาวและปลาบู่ทรายตาย 100 เปอร์เซ็นต์ภายในระยะเวลา 2 ชั่วโมง ชมพูนุทและคณะ (2547) สำรวจชนิดพืชที่มีในประเทศไทยและทดสอบประสิทธิภาพสารสกัดจากพืชชนิดต่างๆ ได้แก่ ประคำดีควาย (*Sapindus emerginatus*) สะเดา DOA (*Azadirachta* sp.) และหางไหล DOA (*Derris* sp.) พบว่า ผลประคำดีควายให้สารออกฤทธิ์ คือซาโปนิน และพบว่ากรรมวิธีที่สกัดด้วยน้ำ และสกัดด้วย ethyl alcohol ให้สารออกฤทธิ์ ไม่แตกต่างกัน และสารซาโปนิน ยังมีแนวโน้มที่เป็นพิษต่อหอยเชอรี่ โดยซาโปนิน 0.1% , 0.5% และ 1.0% มีผลทำให้หอยตาย 100% ภายใน 24 ชั่วโมง และเนื่องจากกากเมล็ดชามีความเป็นพิษสูงต่อหอยเชอรี่ จึงมีการนำเข้าจากประเทศจีนเพื่อใช้ในการกำจัดหอยเชอรี่ มีชื่อการค้าว่า แซปโปเคียว-วัน อัตราการใช้ 3 กิโลกรัม/ไร่ โดยหว่านลงในนาข้าวที่มีน้ำสูง 5 ซม.

แม้ว่า ปัจจุบัน จะมีการนำกากเมล็ดชา มาใช้เพื่อป้องกันกำจัดหอยศัตรูพืชมากขึ้น เพราะต้องการลดความเป็นพิษของสารเคมีที่มีผลกระทบต่อสิ่งแวดล้อม ดังที่กล่าวข้างต้น แต่จากรายงานการศึกษาเกี่ยวกับฤทธิ์ทางชีวภาพของสารสกัดจากกากเมล็ดชารวมถึงสารซาโปนินที่พบในเมล็ด บ่งชี้ให้เห็นว่ากากเมล็ดชาน่าจะมีผลกระทบต่อสิ่งมีชีวิตในน้ำ โดยเฉพาะอย่างยิ่งเมื่อมีการนำมาใช้เป็นสารป้องกันและกำจัดศัตรูพืช อาจมีการตกค้างและมีการปนเปื้อนลงในแหล่งน้ำเกษตรกรรมและเป็น

อันตรายต่อปลาได้ นอกจากนี้ ในการที่จะนำพืชชนิดใดมาใช้ประโยชน์ในด้านต่างๆ ควรมีการศึกษาผลกระทบต่อสิ่งมีชีวิตอื่นๆที่ไม่ใช่กลุ่มเป้าหมายด้วย ซึ่งการศึกษาผลตกค้างของสารสกัดต่างๆในแหล่งน้ำ นิยมศึกษาผลกระทบต่อปลาหลายชนิด เช่น ปลานิล ปลาไน ปลาหมอ ปลาหมอเทศ โดยดูการเปลี่ยนแปลงทางพยาธิสภาพของเนื้อเยื่อตับและไต เนื่องจากเป็นอวัยวะที่ได้รับผลกระทบโดยตรงที่สามารถบ่งชี้ความผิดปกติได้ดีที่สุด ซึ่งการเปลี่ยนแปลงที่เกิดขึ้นได้แก่ มีการสะสมไขมันเพิ่มขึ้นในเซลล์ตับ (fat vacuolation) เกิดการคั่งของเม็ดเลือดแดง (blood congestion) ตามเส้นเลือดขนาดต่างๆ จากนั้นนิวเคลียสจะสลายไปและทำให้เซลล์ตาย กระทั่งเห็นการเปลี่ยนแปลงหรือความผิดปกติในระดับอวัยวะในที่สุด

วิธีดำเนินการ

อุปกรณ์

1.อุปกรณ์สำหรับเลี้ยงปลานิล ได้แก่

- โหลแก้วกลมขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 9 นิ้ว สูง 14 นิ้ว ความจุ 12 ลิตร
- อ่างเลี้ยงปลาขนาดความกว้าง 20 นิ้ว ความยาว 42 นิ้ว และสูง 20 นิ้ว
- ชุดอุปกรณ์สำหรับให้ออกซิเจนในน้ำขณะทำการทดลอง ซึ่งประกอบด้วย เครื่องอัดอากาศ ท่อยางและลูกหินอากาศ
- ชุดอุปกรณ์สำหรับการเปลี่ยนถ่ายน้ำที่ใช้ในการทดลอง ซึ่งประกอบด้วย เครื่องดูดน้ำและสายยางขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 0.5 นิ้ว
- สวิงตักปลาขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง ~ 3 นิ้ว และ 12 นิ้ว

2. อุปกรณ์สำหรับวัดคุณสมบัติทางกายภาพของน้ำในอ่างเลี้ยงปลา ได้แก่

- เครื่องวัดความเป็นกรด- ด่าง
- เครื่องวัดอุณหภูมิ
- เครื่องวัดปริมาณออกซิเจนที่ละลายในน้ำ

3. อุปกรณ์สำหรับเก็บข้อมูลปลานิลที่ใช้ทดลอง ได้แก่

- เครื่องชั่งไฟฟ้า ทศนิยมสามตำแหน่ง
- ไม้บรรทัดและ เวอร์เนีย สำหรับวัดขนาดตัวปลา
- ขวดเก็บตัวอย่าง ขนาด 8 ออนซ์

4. อุปกรณ์สำหรับเตรียมเนื้อเยื่อเพื่อศึกษาทางอิสโตเคมี (paraffin method) ได้แก่

- ขวดแก้วสำหรับใส่น้ำยาเคมี
- สไลด์แก้ว และแผ่นแก้วปิดสไลด์
- บล๊อกเหล็ก สำหรับฝังชิ้นเนื้อเยื่อพาราฟิน
- บล๊อกไม้สำหรับติดชิ้นเนื้อเยื่อ
- ใบมีดสำหรับตัดเนื้อเยื่อพาราฟิน

- water bath หรือ warm plate อุณหภูมิ 38 – 40 ^{o}C
- กล่องไม้สำหรับเก็บสไลด์

5. อุปกรณ์สำหรับย้อมสีเนื้อเยื่อ ได้แก่

- ชุด Jar สำหรับย้อมสี
- ตะแกรงสำหรับใส่สไลด์ที่จะย้อมสี

6. สารเคมีที่ใช้ในการเตรียมเนื้อเยื่อเพื่อศึกษาทางฮิสโตเคมี ได้แก่

- 10 % Neutral buffer formalin
- 95 % Ethyl alcohol
- N-butanol
- xylene
- paraplast
- egg albumin
- haematoxylin
- 0.5 % eosin
- conc. acetic acid
- permount

วิธีการ

แผนการทดลอง แบบ CRD

<u>วิธีปฏิบัติการทดลอง</u>

<u>สัตว์ทดลอง</u> ใช้ปลานิลดำ *Oreochromis niloticus* Linn. ทั้ง 2 เพศจากบ่อปลา อ. บางเลน จ. นครปฐม โดยการนำลูกปลานิลดำที่มีอายุประมาณ 3 สัปดาห์ มาอนุบาลในอ่างซีเมนต์ ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางประมาณ 90 เซนติเมตร ให้อาหารผสมสำหรับปลานิล เลี้ยงเพื่อให้ปรับสภาพประมาณ 1 สัปดาห์ จากนั้นทำการคัดเลือกปลานิลที่มีลักษณะสมบูรณ์ แข็งแรง ขนาดใกล้เคียงกัน แล้วจึงทำการสุ่มตัวอย่างจากกลุ่มนี้เพื่อนำไปทำการทดลองต่อไป ปลานิลที่เริ่มทำการทดลองจะมีอายุ 1 เดือน น้ำหนักโดยเฉลี่ย 0.87 กรัม ความยาวโดยเฉลี่ย 2.64 เซนติเมตร (ภาพที่1ก.) และงดให้อาหารก่อนการทดลอง 24 ชั่วโมง

1. <u>การศึกษาความเป็นพิษเฉียบพลันของสารสกัดกากเมล็ดชา</u> (ดำเนินการในปี 2554)

เพื่อกำหนดค่า LC_{50} ที่ 96 ชั่วโมง (50 % lethal concentration at 96 hours) โดยการทำ Acute Static Toxicity Test (ASTM, 1980) และวิเคราะห์หาค่า LC_{50} ด้วยโปรแกรม Probit analysis (Finney, 1971) โดยทำการทดลองในตู้เลี้ยงปลาขนาดเล็กหรือโหลแก้วทรงกลม เติมน้ำสำหรับกลุ่มควบคุม หรือสารสกัดกากเมล็ดชาสำหรับกลุ่มทดลองตามความเข้มข้นที่ต้องการ ให้ได้

ปริมาตร 10 ลิตร จากนั้นจึงนำลูกปลานิลอายุ 1 เดือนที่ทำการคัดเลือกไว้มาทำ Range –finding test และ Definitive test ดังต่อไปนี้

range – finding test เป็นการหาช่วงความเข้มข้นของสารสกัดกากเมล็ดชาที่ทำให้ปลานิลตายมากกว่าและน้อยกว่า 50 % กำหนดความเข้มข้น 5 ระดับ ดังนี้ คือ 1, 10, 100 , 1,000 และ 10,000 ppm. รวมทั้งการทำการทดลองชุดควบคุมและสารเปรียบเทียบ metaldehyde 80% WP โดยแต่ละความเข้มข้นทำการทดลอง 3 ซ้ำๆละ 10 ตัว นับจำนวนปลาที่ตายภายในเวลา 24 , 48, 72 และ 96 ชั่วโมง พร้อมบันทึกผลการทดลอง

definitive test นำผลที่ได้จากการทำ range –finding test เลือกความเข้มข้นที่ทำให้ปลาตาย ช่วง 0 % และ 100 % มาทำการทดลองเพื่อหาความเข้มข้นที่ทำให้ปลาตาย 50 % โดยกำหนดระดับความเข้มข้นให้ละเอียดยิ่งขึ้น เปรียบเทียบกับสารฆ่าหอย metaldehyde 80% WP และชุดควบคุม ทำการทดลองเช่นเดียวกับการทำ range – finding test นับจำนวนปลาที่ตายและบันทึกผลการทดลองทุกๆ 24 ชั่วโมง จนครบ 96 ชั่วโมง จึงนำข้อมูลที่ได้มาหาค่า LC_{50} ที่ 96 ชั่วโมงโดยวิธี probit analysis ต่อไป

2. การศึกษาผลกึ่งเรื้อรังของสารสกัดกากเมล็ดชาที่มีต่อเหงือกและเนื้อเยื่อตับของปลานิล (ดำเนินการในปี 2555-2556)

การหาค่า Application Factor (AF) นำค่า LC_{50} ที่ได้มาคำนวณหาค่า AF เพื่อกำหนดค่าความเข้มข้นที่เหมาะสม ในการทดสอบความเป็นพิษกึ่งเรื้อรัง (sub-chronic level toxicity test) เป็นเวลานาน 8 เดือน ซึ่งค่า Application Factor สามารถคำนวณได้จากสูตรดังนี้

$$AF = MATC / LC_{50}\ 96\ hrs.$$

MATC = ค่าความเข้มข้นสูงสุดของสารพิษที่ยอมรับได้

ค่า MATC ได้จากการคำนวณโดยมีช่วงอยู่ระหว่างความเข้มข้น 2 ระดับ

คือ NOEC = ค่าความเข้มข้นสูงสุดที่ไม่มีผลต่อการตายของสัตว์ทดลอง

และ LOEC = ค่าความเข้มข้นสูงสุดที่มีผลต่อการตายของสัตว์ทดลองน้อยที่สุด

หลังจากได้รับสารที่อัตราความเข้มข้นต่ำเป็นเวลานาน 8 เดือน ทำการทดลองดังนี้

2.1 เริ่มการทดลองโดยใช้ปลานิลที่อายุประมาณ 1 เดือน แบ่งการทดลองออกเป็น 2 กลุ่ม คือ กลุ่มควบคุม จำนวน 1 ซ้ำและกลุ่มทดสอบสารสกัดกากเมล็ดชาจำนวน 3 ซ้ำๆ ละ 500 ตัว โดยเลี้ยงปลาในตู้ปลาขนาดกว้าง 20 นิ้ว ยาว 42 นิ้ว และสูง 20 นิ้ว ใส่น้ำปริมาตร 300 ลิตร ให้อาหารสำเร็จรูปชนิดเม็ดลอยน้ำทุกวันและทำการเปลี่ยนถ่ายน้ำใหม่ทุกๆ 3 วัน โดยใส่สารสกัดกากเมล็ดชา sub-chronic dose ทุกครั้งที่ทำการเปลี่ยนน้ำ เป็นเวลานาน 8 เดือน สังเกตอาการของปลานิล เช่นการว่ายน้ำ และการกินอาหารเปรียบเทียบระหว่างปลาทั้ง 2 กลุ่ม

2.2 ในแต่ละเดือน เก็บตัวอย่างปลาขึ้นมาจากตู้ปลาที่ทำการทดลองทั้งกลุ่มควบคุมและกลุ่มทดลอง โดยการสุ่มเก็บกลุ่มละ 30 ตัว นำมาวัดขนาดความยาว ความกว้าง ชั่งน้ำหนักตัวปลาและแยกเอาตับปลาทั้งหมดมาชั่งน้ำหนักเพื่อศึกษา % relative liver weight เปรียบเทียบค่าแตกต่างทางสถิติระหว่างตับปลากลุ่มควบคุมและกลุ่มทดลองโดยใช้ค่า T – Test

2.3 ทุกๆเดือนที่ทำการเก็บตัวอย่าง หลังจากชั่งน้ำหนักและวัดขนาดตัวปลาแล้ว นำเหงือกและตับมาดองด้วย 10 % buffer formalin ก่อนนำไปผ่านกระบวนการเตรียมเนื้อเยื่อเพื่อศึกษาภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสงต่อไป

3. <u>วิธีการเตรียมเนื้อเยื่อเพื่อศึกษาภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสง</u>

(ดำเนินการในปี 2554-2556)

เตรียมสไลด์ถาวรเนื้อเยื่อโดยวิธีพาราฟิน (paraffin method) โดยตัดแบ่งเนื้อเยื่อตับขนาด 1 ลูกบาศก์เซนติเมตรและเหงือกมาดองด้วย 10 % buffer formalin แล้วนำไปแช่ ในน้ำยาต่างๆดังนี้

70 % Ethyl alcohol (1 hr.)

↓

90 % Ethyl alcohol (1 hr.)

↓

95 % Ethyl alcohol (2 change over night)

↓

n- butanol (1 hr.)

↓

Xylene (1 hr.)

↓

Xylene + Wax I (1: 1) (½ hr.) ** ทำในตู้อบ

↓

Wax I (½ hr.) ** ทำในตู้อบ

↓

Wax II (1 hr.) ** ทำในตู้อบ

จากนั้นจึงฝังชิ้นเนื้อเยื่อลงใน Wax III หรือ paraplast แล้วจึงนำมาตัดด้วยเครื่องตัดเนื้อเยื่อ (rotary microtome) ให้บาง 5 ไมโครเมตร จากนั้นติดลงบนกระจกสไลด์ โดยใช้ egg albumin ช่วยให้แถบเนื้อเยื่อติดกับกระจกสไลด์ได้ดี วางสไลด์เนื้อเยื่อบน warm plate ที่อุณหภูมิ ประมาณ 40 องศาเซลเซียส เพื่อช่วยให้แถบเนื้อเยื่อยืดตัว ก่อนนำไปย้อมสี heamatoxylin & eosin (H & E) เพื่อศึกษาภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสงต่อไป

<u>การบันทึกข้อมูลและวิเคราะห์ผล</u>

ตลอดระยะเวลาที่ทำการทดลองเป็นเวลานาน 8 เดือน ทำการเก็บข้อมูลทางกายภาพของน้ำที่ใช้ทำการทดลองเพื่อศึกษาสมบัติบางประการของน้ำเลี้ยงปลา ดังนี้

1. วัดอุณหภูมิ (temperature) ของน้ำที่ใช้เลี้ยงปลาทั้ง 2 กลุ่ม เดือนละ 2 ครั้ง โดยการวัดวันที่ 1 และ วันที่ 3 ของการเปลี่ยนน้ำ
2. วัดปริมาณออกซิเจนที่ละลายน้ำ (dissolved oxygen) ของน้ำที่เลี้ยงปลาทั้ง 2 กลุ่ม โดยวัดเดือนละ 2 ครั้ง ในวันที่ 1 และวันที่ 3 ของการเปลี่ยนน้ำ
3. วัดค่าความเป็นกรด- ด่าง (pH) ของน้ำเลี้ยงปลา ทั้ง 2 กลุ่ม เดือนละ 2 ครั้ง ในวันที่ 1 และ วันที่ 3 ของการเปลี่ยนน้ำเช่นเดียวกัน
4. วิเคราะห์และเปรียบเทียบค่าแตกต่างทางสถิติของ % Relative liver weight ของตับปลา ระหว่างกลุ่มควบคุมและกลุ่มทดลองโดยใช้ T- Test
5. วิเคราะห์และศึกษาผลของการเปลี่ยนแปลงทางพยาธิสภาพของเหงือกและเนื้อเยื่อตับของปลานิล หลังได้รับสารสกัดกากเมล็ดชาที่อัตราความเข้มข้นต่ำ เปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม ตั้งแต่เดือนที่ 1 ถึงเดือนที่ 8 ของการทดลอง บันทึกผลพร้อมทั้งถ่ายภาพ

เวลา สถานที่

<u>ระยะเวลา</u> : เริ่มต้น ตุลาคม 2553 สิ้นสุด กันยายน 2556 รวม 3 ปี

<u>สถานที่</u> : ห้องปฏิบัติการกลุ่มงานวิจัยสัตววิทยาการเกษตร กลุ่มกีฏและสัตววิทยา สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช กรมวิชาการเกษตร

ผลและวิจารณ์ผลการทดลอง

1. <u>ผลการทดสอบความเป็นพิษเฉียบพลันของสารสกัดกากเมล็ดชา</u>

การหาค่า LC_{50} ที่ 96 ชั่วโมง ได้ทำ range – finding test โดยกำหนดความเข้มข้น 5 ระดับ ดังนี้ คือ 1, 10, 100, 1,000 และ 10,000 ppm. เปรียบเทียบกับสารฆ่าหอย metaldehyde 80% WP และชุดควบคุม พบว่าจำนวนลูกปลานิลที่ตายภายในเวลา 96 ชั่วโมง คิดเป็น 15%, 30% , 100%, 100%, 100%, 100% และกลุ่มควบคุม 0% ตามลำดับ จากผลการทดลองจะเห็นว่าความเข้มข้นที่มีผลทำให้ลูกปลานิลมีอัตราการตาย 50% อยู่ระหว่าง 10 -100 ppm. (ตารางที่ 1) ดังนั้นจึงนำความเข้มข้นดังกล่าวมากำหนดระดับความเข้มข้นให้ละเอียดยิ่งขึ้น (definitive test) ดังนี้ คือ 10, 20, 40, 60, 80 และ 100 ppm. เปรียบเทียบกับสารฆ่าหอย metaldehyde 80% WP และชุดควบคุม นับจำนวนปลาที่ตายและบันทึกผลการทดลองทุกๆ 24 ชั่วโมง พบว่าจำนวนลูกปลานิลที่ตายภายในเวลา 96 ชั่วโมง คิดเป็น 13.3%, 30.0% , 43.3%, 56.6%, 83.3%, 86.6%, 93.3% และกลุ่มควบคุม 0% ตามลำดับ (ตารางที่2) จึงนำข้อมูลที่ได้วิเคราะห์ค่า LC_{50} ด้วยโปรแกรม probit analysis

ซึ่ง ค่า LC_{50} (ที่ 96 ชั่วโมง) ของสารสกัดกากเมล็ดชา ที่ทดสอบกับลูกปลานิล อายุ 1 เดือน คือ 47.53 ppm. และนำค่า LC_{50} ที่ได้นำไปวิจัยต่อเนื่องในการคำนวณหาค่า Application Factor เพื่อศึกษาผลกระทบแบบกึ่งเรื้อรัง ของสารสกัดกากเมล็ดชา ในปี 2555 และ 2556 ต่อไป

2. <u>ผลการเปลี่ยนแปลงทางกายภาพและทางจุลกายวิภาคของเหงือกและเนื้อเยื่อตับของปลานิลเนื่องจากพิษเฉียบพลันของสารสกัดกากเมล็ดชา</u>

<u>การเปลี่ยนแปลงทางกายภาพ</u>

ความเป็นพิษเฉียบพลันของสารสกัดกากเมล็ดชา จากการสังเกตลักษณะทางกายภาพ พบว่า เมื่อใส่สารสกัดกากเมล็ดชาที่ความเข้มข้นสูง (มากกว่า1,000 ppm. ขึ้นไป) ประมาณ 5 นาที มีผลทำให้ปลานิลเสียการทรงตัวในการว่ายน้ำ (ภาพที่1ข.) เคลื่อนไหวและหายใจเร็วขึ้น และหลังจาก 10 นาที ปลานิล มีการว่ายน้ำช้าลงและบางตัวว่ายมาที่ผิวน้ำ และตายในที่สุด เมื่อสังเกตลักษณะปลานิลที่ตาย มีอาการอ้าปากค้าง ตาแดง บางตัวมีเลือดออกที่ครีบอกและครีบหางและบริเวณท้องมีสีเขียว ซึ่งลักษณะอาการเกิดพิษเฉียบพลัน (ภาพที่ 2 ก.-ข.) นอกจากนี้ ผลกระทบจากสารเคมีกลุ่มต่างๆ ที่มีต่อสัตว์น้ำ ก็ได้มีผู้ทำการศึกษาไว้ดังนี้

Grant and Mehrie (1970) พบว่าสารฆ่าแมลงกลุ่มออร์กาโนคลอรีน มีกลไกการออกฤทธิ์ยับยั้งการทำงานของเอนไซม์โซเดียมโพแตสเซียม เอ-ที-พี-เอส (Na-K-ATPase) ในผนังลำไส้ส่วนมิวโคซา (intestinal mucosa) ถึง 60% ในปลาไหล และ 38% ในปลาตาเดียว Tsigouri and Tyrnou (2000) พบว่าสารกลุ่มนี้ยับยั้งการรับออกซิเจนของไมโตคอนเดรียของตับปลา bluegill, *Lepomis macrochirus* ซึ่งส่งผลต่อระบบประสาทของปลาโดยทำให้การเคลื่อนไหวไม่ประสานกัน กระวนกระวายและหายใจขัด (hyper-excitability) โดยได้กล่าวว่าปัจจัยที่มีอิทธิพลต่อการออกฤทธิ์ของสารฆ่าแมลงกลุ่มนี้ ขึ้นอยู่กับความเข้มข้นของสาร ระยะเวลาที่ปลาสัมผัสกับสาร ชนิดของปลา คุณสมบัติทางเคมีของสาร

<u>การเปลี่ยนแปลงทางจุลกายวิภาค</u>

ลูกปลานิลที่ตายจากการศึกษาความเป็นพิษเฉียบพลันของสารสกัดกากเมล็ดชา นำมาผ่านกระบวนการทางฮิสโตเคมี ด้วย paraffin method และย้อมด้วยสี heamatoxylin & eosin (H & E) ศึกษาใต้กล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสง พบว่าเนื้อเยื่อเหงือกของปลานิลกลุ่มทดสอบสารสกัดกากเมล็ดชา พบเซลล์เม็ดเลือดแดงจำนวนมากคั่งอัดแน่นอยู่ตามเส้นเลือดฝอยบริเวณซี่เหงือกและบริเวณ gill arch ซึ่งลักษณะดังกล่าวแตกต่างจากกลุ่มควบคุม ที่เซลล์เม็ดเลือดแดงมีการเรียงตัวเดี่ยวๆ ภายในเส้นเลือดฝอย (ภาพที่ 3 ก.-ง.)

ส่วนเนื้อเยื่อตับของปลานิลกลุ่มควบคุมและกลุ่มทดลอง มีลักษณะไม่แตกต่างกัน คือ ตับปลานิลมีรูปร่างเรียวยาว ทอดไปตามช่องท้อง ไม่มีการแบ่งเป็นพูอย่างชัดเจน หุ้มด้วย simple squamous epithelium และจากการศึกษาเนื้อเยื่อตับภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสง พบว่า ตับปลานิล

ประกอบด้วยเซลล์ตับ (hepatpcytes) ที่มีรูปร่างหลายเหลี่ยม นิวเคลียสรูปร่างกลมและเห็นนิวคลีโอลัส (nucleolus) ชัดเจน มีการสะสมไกลโคเจนและไขมันอยู่ภายในไซโตพลาสซึม เซลล์ตับมีการเรียงตัวกันขนานกับช่องไซนูซอยด์ (sinusoid) ซึ่งเชื่อมต่อกับ central vein เรียกโครงสร้างนี้ว่า hepatic plate และมีเส้นเลือด hepatic portal vein แทรกอยู่ในเนื้อเยื่อตับ ภายในตับมีท่อน้ำดี ตับปลานิลจะพบเซลล์ตับอ่อนแทรกอยู่ระหว่างเซลล์ตับ โดยมักพบอยู่ใกล้กับเส้นเลือด โครงสร้างของตับปลานิลดังกล่าวแตกต่างจากตับของสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม ซึ่งจะประกอบด้วย structural unit ที่เรียกว่า hepatic lobule ที่มีลักษณะเป็น polyhedral prism (Weiss, 1988) พบว่าในตับปลานิลที่ศึกษาไม่มีโครงสร้างแบบนี้

3. <u>การศึกษาผลกึ่งเรื้อรังของสารสกัดกากเมล็ดชาที่มีต่อเหงือกและเนื้อเยื่อตับของปลานิล</u> (ดำเนินการในปี 2555-2556)

สรุปผลการทดลองและคำแนะนำ

จากผลการศึกษาความเป็นพิษเฉียบพลันของสารสกัดกากเมล็ดชา ที่มีต่อลูกปลานิล อายุ 1 เดือน โดยการหาค่า LC_{50} ที่ 96 ชั่วโมง กำหนดความเข้มข้นเริ่มต้นโดยการทำ range – finding test และ definitive test เพื่อให้ได้ความเข้มข้นที่มีผลให้ลูกปลานิล มีอัตราการตาย 50 % เมื่อนำไปวิเคราะห์ด้วยโปรแกรม probit analysis พบว่าค่า LC_{50} (ที่ 96 ชั่วโมง) ของสารสกัดกากเมล็ดชา ที่ทดสอบกับลูกปลานิล อายุ 1 เดือน คือ 47.53 ppm. และที่ความเข้มข้นสูง (มากกว่า1,000 ppm. ขึ้นไป) สังเกตพบว่าหลังจากใส่สารสกัดกากเมล็ดชาประมาณ 5 นาที มีผลทำให้ปลานิลเสียการทรงตัวในการว่ายน้ำ เคลื่อนไหวและหายใจเร็วขึ้น และหลังจาก 10 นาที ปลานิล มีการว่ายน้ำช้าลงและบางตัวว่ายมาที่ผิวน้ำ และตายในที่สุด ซึ่งเป็นลักษณะอาการที่เกิดจากพิษเฉียบพลัน และเมื่อนำมาศึกษาใต้กล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสง พบว่าเนื้อเยื่อเหงือกของปลานิลกลุ่มทดสอบสารสกัดกากเมล็ดชา มีเซลล์เม็ดเลือดแดงจำนวนมากคั่งอัดแน่นอยู่ตามเส้นเลือดฝอยบริเวณซี่เหงือกและบริเวณ gill arch ทั้งนี้ปัจจัยที่มีอิทธิพลต่อการออกฤทธิ์ของสารฆ่าแมลงกลุ่มนี้ขึ้นอยู่กับความเข้มข้นของสาร ระยะเวลาที่ปลาสัมผัสกับสาร ชนิดของปลา คุณสมบัติทางเคมีของสาร

จากผลการทดลองเบื้องต้น การทราบผลกระทบของสารสกัดกากเมล็ดชา *Camellia sinensis* L. ทั้งแบบเฉียบพลันและกึ่งเรื้อรัง สามารถใช้เป็นเป็นข้อมูลพื้นฐานสำหรับประเมินแนวโน้มและกำหนดปริมาณการนำสารสกัดจากกากเมล็ดชามาใช้เพื่อกำจัดหอยศัตรูพืช โดยคำนึงถึงความปลอดภัยต่อสัตว์น้ำอื่นๆ ตามความเหมาะสม เพื่อแก้ปัญหาการใช้สารสกัดจากธรรมชาติเกินความจำเป็น เพื่อประโยชน์ทางด้านเกษตรกรรมอย่างยั่งยืนต่อไป

คำขอบคุณ

ขอขอบคุณนางทัศวรรณ พุ่มกาหลง และนายปรีชา มีนาค พนักงานราชการประจำกลุ่มงานสัตววิทยาการเกษตร ที่ได้ช่วยเหลือในการเตรียมสารเคมีและบันทึกผลการทดลองทั้งในเวลาและนอกเวลาราชการ และขอขอบคุณนายโยฆินทร์ โพธ์ศรี ที่ช่วยดูแล ให้อาหารและเปลี่ยนน้ำสัตว์ทดลอง จึงขอขอบคุณไว้ ณ ที่นี้

เอกสารอ้างอิง

ยนต์ มุสิก. 2535. การใช้ซาโปนินจากเมล็ดชากำจัดปลาในบ่อเลี้ยงกุ้งก้ามกราม. สถาบันวิจัยและพัฒนา มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.กรุงเทพมหานคร. 12 หน้า.

American Society for Testing and Materials. 1980. Standard practice for conducting toxicity tests with fishes macroinvertebrates and amphibians. ASTM E 29-80,Philadelphia : ASTM.

Finney,D.J. 1971. Probit analysis. London: Cambridge Univ. Press.

Grant B.F. and Mehrle,P.M. 1970. Chronic endrin poisoning in goldfish, Carassius auratus. J. Fish. Res. Bd. Can. 27 : 2225-2232.

Tsigouri, A.D. and Tyrpnou, A.E. 2000. Determination of organochlorine compounds in fish oil and fish liver oil by capillary gas chromatography and electron capture detection. Bull. Environ. Contam. Toxicol. 65 : 244-252.

ภาคผนวก

ตารางที่ 1 ตารางแสดงจำนวนลูกปลานิลที่ตาย และเปอร์เซ็นต์การตาย ของการทำ Range - Finding Test ที่เวลา 96 ชั่วโมง

ความเข้มข้นของสารสกัดกากเมล็ดชา (ppm)	จำนานปลาทั้งหมด (ตัว)	จำนวนปลาที่ตาย (ตัว)	เปอร์เซ็นต์การตาย (%)
กลุ่มควบคุม	20	0	0
1	20	3	15.0
10	20	6	30.0
100	20	20	100.0
1,000	20	20	100.0
10,000	20	20	100.0
Metaldehyde 80% WP	20	20	100.0

ตารางที่ 2 ตารางแสดงจำนวนลูกปลานิลที่ตาย และเปอร์เซ็นต์การตาย ของการทำ Definitive Test ที่เวลา 96 ชั่วโมง

ความเข้มข้นของสารสกัดกากเมล็ดชา (ppm)	จำนานปลาทั้งหมด (ตัว)	จำนวนปลาที่ตาย (ตัว)	เปอร์เซ็นต์การตาย (%)
กลุ่มควบคุม	30	0	0
10	30	4	13.0
20	30	9	30.0
40	30	13	43.3
60	30	17	56.6
80	30	25	83.3
100	30	26	86.6
Metaldehyde 80% WP	30	28	93.3

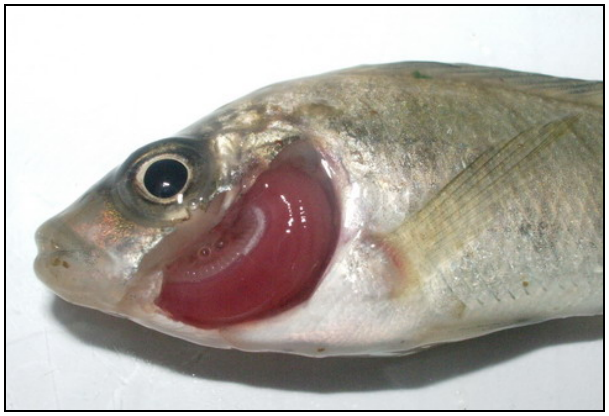
ก.

ข.

ภาพที่ 1 ก. แสดง การวัดขนาดปลานิลที่ใช้ทดลอง

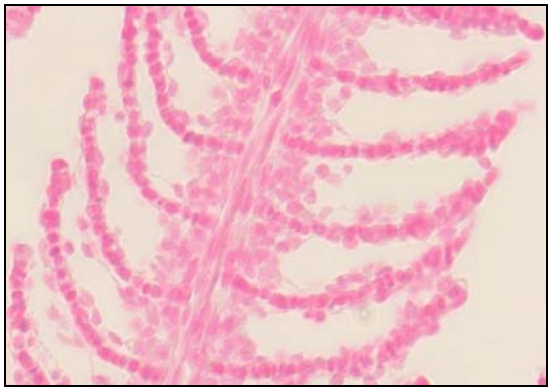
ข. ลักษณะอาการได้รับพิษเฉียบพลันของปลานิล หลังจากที่ได้รับสารสกัดกากเมล็ดชา ความเข้มข้น 1, 000 ppm. หลังใส่สารสกัด 10 นาที

ก.

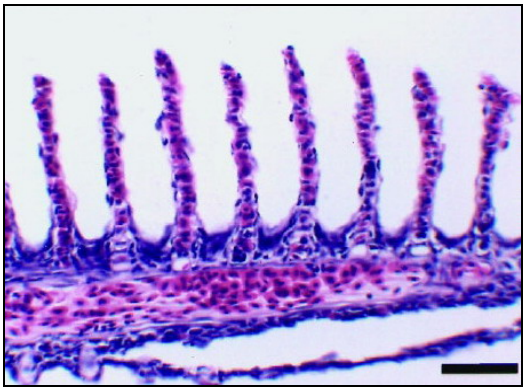


ข.

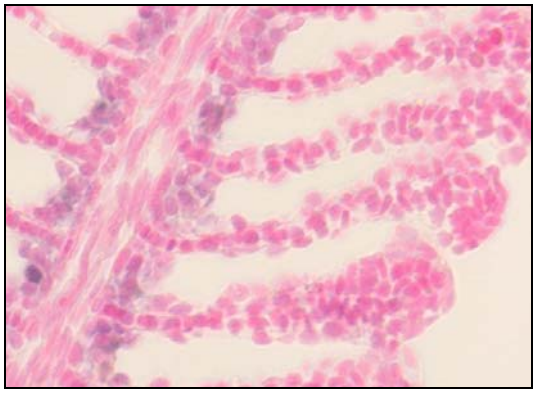
ภาพที่ 2 ก.-ข ภาพปลานิล ที่ตายหลังได้รับสารสกัดกากชา 1,000 ppm พบว่ามีเลือดออกตามครีบ แก้ม ครีบอก และบริเวณโคนหาง



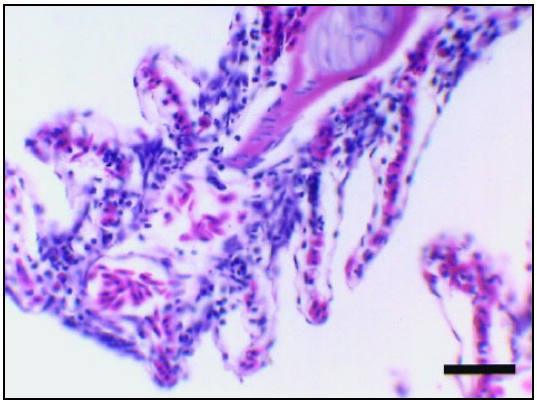
ก.



ข.



ค.



ง.

ภาพที่ 3 ก.-ข ภาพสไลด์ ซี่เหงือกปลานิล กลุ่มควบคุม เซลล์เม็ดเลือดแดงเรียงตัวกันอย่างเป็นระเบียบอยู่ในเส้นเลือดฝอย

ค-.ง ภาพสไลด์ ซี่เหงือกปลานิล กลุ่มสารสกัดกากเมล็ดชา 1,000 ppm เซลล์เม็ดเลือดแดง คั่ง อัดแน่นบริเวณเส้นเลือดฝอย

(ย้อมด้วยสี Heamatoxylin& Eosin)