

ผลกระทบของ Linear Alkylbenzene Sulfonate (LAS) ต่อการตอบสนอง
ระดับเซลล์ของปูม้า

วิภาดา กิตยารักษ์

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต
สาขาวิชาวิทยาศาสตร์สิ่งแวดล้อม
บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยบูรพา
มิถุนายน 2550
ลิขสิทธิ์เป็นของมหาวิทยาลัยบูรพา

คณะกรรมการควบคุมวิทยานิพนธ์และคณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์ ได้พิจารณา
วิทยานิพนธ์ของ วิชาดา กิตยารักษ์ ฉบับนี้แล้ว เห็นสมควรรับเป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตาม
หลักสูตรวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาวิทยาศาสตร์สิ่งแวดล้อม ของมหาวิทยาลัยบูรพาได้

คณะกรรมการควบคุมวิทยานิพนธ์

.....อาจารย์ที่ปรึกษาหลัก

(ดร.กรประภา กาญจนะ)

.....อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.พิชาญ สว่างวงศ์)

.....อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม

(ดร.พอลิต นันทนาวัฒน์)

คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์

.....ประธาน

(ดร.นันทิกา คงเจริญพร)

.....กรรมการ

(ดร.กรประภา กาญจนะ)

.....กรรมการ

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.พิชาญ สว่างวงศ์)

.....กรรมการ

(ดร.พอลิต นันทนาวัฒน์)

.....กรรมการ

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.สมรรถชัย สารถวัลย์แพศย์)

บัณฑิตวิทยาลัยอนุมัติให้รับวิทยานิพนธ์ฉบับนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตร
วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาวิทยาศาสตร์สิ่งแวดล้อม ของมหาวิทยาลัยบูรพา

.....คณบดีบัณฑิตวิทยาลัย

(รองศาสตราจารย์ ดร.ประทุม ม่วงมี)

วันที่ 15 เดือน สิงหาคม พ.ศ. 2550

ประกาศคุณูปการ

วิทยานิพนธ์ฉบับนี้สำเร็จลงได้ด้วยดี เนื่องจากได้รับความกรุณาให้คำปรึกษาและแนะนำ
แนวทางในการศึกษา แก่ไขข้อบกพร่องต่าง ๆ เป็นอย่างดียิ่งจาก ดร.กรประภา กาญจนะ อาจารย์
ที่ปรึกษาหลัก ดร.พอลิต นันทนาวัฒน์ และผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.พิชญ์ สว่างวงศ์ อาจารย์
ที่ปรึกษาร่วม ซึ่งทำให้ผู้วิจัยได้รับแนวทางในการศึกษาค้นคว้าหาความรู้ และประสบการณ์
อย่างกว้างขวางในการทำวิทยานิพนธ์ในครั้งนี้ ผู้วิจัยรู้สึกซาบซึ้งเป็นอย่างยิ่ง จึงขอกราบ
ขอบพระคุณเป็นอย่างสูงไว้ ณ โอกาสนี้

ขอขอบคุณภาควิชาเทคโนโลยีชีวภาพ และภาควิชาวาริชศาสตร์ ที่ให้ความอนุเคราะห์
สถานที่ และอุปกรณ์บางส่วนในการทำวิทยานิพนธ์

ขอกราบขอบพระคุณ คุณพ่อ คุณแม่ และพี่ ๆ เพื่อน ๆ ทุกคนที่ให้อำลังใจ และ
คำแนะนำ สนับสนุนผู้วิจัยตลอดมา

วิภาดา กิตยารักษ์

45912027: สาขาวิชา: วิทยาศาสตร์สิ่งแวดล้อม; วท.ม (วิทยาศาสตร์สิ่งแวดล้อม)

คำสำคัญ: ลิเนียร์อัลคิลเบนซีนซัลโฟเนต/ คะตะเลส/ กลูตาไรโอนเอสทรานเฟอเรส/ อะซิติวโคลินเนสเตอเรส/ ความเสถียรภาพของเยื่อหุ้มไลโซโซม/ ดัชนีชี้วัดทางชีวภาพ

วิภาดา กิตยารักษ์: ผลกระทบของ LINEAR ALKYL BENZENE SULFONATES (LAS)

ต่อการตอบสนองระดับเซลล์ของปูม้า (EFFECT OF LINEAR ALKYL BENZENE SULFONATES (LAS) ON CELLULAR RESPONSE OF THE BLUE SWIMMING CRAB (*Portunus Pelagicus*) คณะกรรมการควบคุมวิทยานิพนธ์: กรประภา กาญจนะ, Ph.D., พิชญสว่างวงศ์, Ph.D., พอลิต นันทนาวัฒน์, Ph.D. 92 หน้า. ปี พ.ศ. 2550

การวิจัยครั้งนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาถึงการใช้การตอบสนองระดับเซลล์ของปูม้า เพื่อใช้เป็นดัชนีชี้วัดถึงการปนเปื้อนของ LAS ในแหล่งน้ำ โดยวัดการตอบสนองของปูม้าเพศผู้ เมื่อได้รับสาร LAS ที่ความเข้มข้น 0, 10, 20, 30, 40 และ 50 มิลลิกรัมต่อลิตร ที่ระยะเวลา 3, 6, 12 และ 24 ชั่วโมง ศึกษาถึงการทำงานของเอนไซม์ต้านอนุมูลอิสระ ได้แก่ เอนไซม์กะตะเลส (EC 1.11.1.6) เอนไซม์กลูตาไรโอนเอสทรานเฟอเรส (EC 2.5.1.18) เอนไซม์อะซิติวโคลินเนสเตอเรส (EC 3.1.1.7) ในตับอ่อน เหนือก และเลือด ตามลำดับ และวัดความเสถียรภาพของเยื่อหุ้มไลโซโซม ปริมาณฮีโมไซยานิน แบบแผนโปรตีนในเลือด ซึ่งผลของการศึกษาพบว่าการทำงานของเอนไซม์กะตะเลสเพิ่มสูงขึ้นในเหงือกและตับอ่อน ที่ความเข้มข้นของ LAS ตั้งแต่ 20 และ 30 มิลลิกรัมต่อลิตร ที่ระยะเวลาการได้รับ LAS ตั้งแต่ 12 ชั่วโมง อีกทั้งการทำงานของเอนไซม์อะซิติวโคลินเนสเตอเรส เพิ่มสูงขึ้นในเลือดและเหงือกที่ความเข้มข้น LAS ตั้งแต่ 30 มิลลิกรัมต่อลิตร ที่เวลาการได้รับที่ 12 และ 24 ชั่วโมง แต่ไม่พบการเปลี่ยนแปลงของเอนไซม์กลูตาไรโอนเอสทรานเฟอเรส ทั้งในเลือด เหงือก และตับอ่อน ส่วนการวัดความเสถียรภาพของเยื่อหุ้มไลโซโซม พบว่า มีการตอบสนองต่อ LAS ที่รวดเร็ว ตั้งแต่ความเข้มข้น LAS เท่ากับ 10 มิลลิกรัมต่อลิตร ที่ระยะเวลา 6 ชั่วโมงเป็นต้นไป แต่อย่างไรก็ตาม ปริมาณฮีโมไซยานิน และแบบแผนโปรตีน ไม่พบความแตกต่าง เมื่อเทียบกับชุดควบคุมในทุก ๆ ความเข้มข้น และทุกเวลาการได้รับ LAS

45912027: MAJOR: ENVIRONMENTAL SCIENCE; M.Sc. (ENVIRONMENTAL SCIENCE)

KEYWORDS: LINEAR ALKYL BENZENE SULFONATES/ CATALASE/ GLUTATHIONE-S-TRANSFERASE/ ACETYLCHOLINEARASE/ LYSOSOMAL MEMBRANE STABILITY/ BIOMARKER.

WIPADA KITAYARUK: EFFECT OF LINEAR ALKYL BENZENE SULFONATES (LAS) ON CELLULAR RESPONSE OF THE BLUE SWIMMING CRAB (*Portunus Pelagicus*).

ADVISORY COMMITTEE: KORNPRABHA KHANCHANA, Ph.D., PICHAN

SAWANGWONG, Ph.D., PHOCHIT NANTANAWAT, Ph.D. 92 P. 2007.

The objective of this study was to investigate the potential use of cellular responses of *Portunus pelagicus* as a biomarker for the presence of LAS in an aquatic environment. The male blue swimming crabs were exposed to an anion surfactant linear alkylbenzene sulfonates (LAS) at 10, 20, 30, 40 and 50 mg-LAS/ L for 3, 6, 12 and 24 hours respectively, with one control group. The activity of the antioxidant defense enzymes catalase (CAT, EC 1.11.1.6) and glutathione-s-transferase (GST, EC 2.5.1.18) and acetylcholinesterase (AChE, EC 3.1.1.7) were determined in hepatopancreas, gill and blood. The lysosomal stability, hemocyanin concentration and protein pattern in haemolymph were also measured. An increase in catalase activity in both gill and hepatopancreas was observed when exposed to 20 and 30 mg/ L LAS for 12 hour, respectively. In addition, the elevated level of acetylcholinesterase activity was shown in blood and gill at 30 mg-LAS/ L for 12 and 24 hour exposures while no alteration of glutathione-s-transferase activity was obtained in blood, gill, or hepatopancreas. The lysosomal stability was shown as the earliest response. The alteration could be observed at 10 mg-LAS/ L and only 6 hour exposure. However, the hemocyanin concentration and protein pattern showed a similar pattern as the control set.

สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อภาษาไทย.....	ง
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ.....	จ
สารบัญ.....	ฉ
สารบัญตาราง.....	ซ
สารบัญภาพ.....	ณ
บทที่	
1 บทนำ.....	1
ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา.....	1
วัตถุประสงค์ของการวิจัย.....	3
สมมติฐานของการวิจัย.....	3
ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ.....	3
ขอบเขตของการวิจัย.....	4
2 เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง.....	5
Linear Alkylbenzene Sulfonates (LAS).....	5
ดัชนีชี้วัดทางชีวภาพ.....	15
ปูมมา.....	24
3 วิธีดำเนินการวิจัย.....	26
สถานที่ในการวิจัย.....	26
อุปกรณ์สำหรับวิจัย.....	26
สารเคมี.....	26
ตัวอย่างสัตว์วิจัย.....	26
การดำเนินการวิจัย.....	27
วิธีเตรียมตัวอย่างสำหรับวิเคราะห์.....	27
การวิเคราะห์เอนไซม์.....	28
การวิเคราะห์ Lysosomal Membrane Stability ด้วยวิธี Neutral Red Retention.....	29
การวิเคราะห์ปริมาณ โปรตีน.....	30
การวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ.....	31

สารบัญ (ต่อ)

บทที่	หน้า
4 ผลการวิจัย.....	32
การทดสอบเปรียบเทียบระหว่างระยะเวลาการพักปรับสภาพปฐมา ที่ 0 และ 3 วัน.....	32
การเปลี่ยนแปลงการทำงานของเอนไซม์อะซิetyl โคลิเนสเทอเรส ในเลือด ตับอ่อน และเหงือกของปฐมา เมื่อได้รับ LAS ที่ความเข้มข้น และเวลาต่างกัน.....	33
การเปลี่ยนแปลงการทำงานของเอนไซม์กลูตาไรโอนเอสเทอเรส ในเลือด ตับอ่อน และเหงือก ของปฐมา เมื่อได้รับ LAS ที่ความเข้มข้น และเวลาต่างกัน.....	39
การเปลี่ยนแปลงการทำงานของเอนไซม์อะซิetyl โคลิเนสเทอเรส ใน เลือด ตับอ่อน และเหงือก ของปฐมาเพศผู้ เมื่อได้รับ LAS ที่ความเข้มข้น และเวลาต่างกัน...	45
การเปลี่ยนแปลงเสถียรภาพของเยื่อหุ้มไลโซโซมในเลือด โดยวิธี Neutral Red Retention Time เมื่อได้รับ LAS ที่ความเข้มข้นและเวลาต่างกัน.....	51
ปริมาณของฮีโมไซยานินในเลือดของปฐมา เพศผู้ ที่ได้รับ LAS ที่ความเข้มข้น และเวลาต่างกัน.....	54
5 อภิปรายและสรุปผล.....	58
ผลของ LAS ต่อการทำงานของเอนไซม์อะซิetyl โคลิเนสเทอเรสในปฐมา เพศผู้.....	58
ผลของ LAS ต่อการทำงานของเอนไซม์กลูตาไรโอนเอสเทอเรส	64
ผลของ LAS ต่อการทำงานของเอนไซม์อะซิetyl โคลิเนสเทอเรส.....	65
ผลของ LAS ต่อความเสถียรภาพของเยื่อหุ้มไลโซโซม.....	65
ผลของ LAS ต่อความเข้มข้นของฮีโมไซยานิน และแบบแผนในเลือดปฐมา.....	67
ข้อเสนอแนะ.....	68
บรรณานุกรม.....	69
ภาคผนวก.....	80
ภาคผนวก ก	81
ภาคผนวก ข	86
ภาคผนวก ค	90
ประวัติย่อของผู้วิจัย.....	92

สารบัญตาราง

ตารางที่	หน้า
1 ปริมาณการใช้ LAS ต่อคนต่อวัน ในแต่ละประเทศ.....	7
2 เปรียบเทียบระหว่างระยะเวลาการพักปรับสภาพปอด ที่ 0 และ 3 วัน.....	33

สารบัญภาพ

ภาพที่		หน้า
1	โครงสร้างของ LAS	5
2	เปอร์เซ็นต์การใช้ LAS ปี 1990 ในประเทศแถบต่าง ๆ.....	6
3	การใช้ LAS เป็นส่วนประกอบของผงซักฟอก.....	7
4	กระบวนการย่อยสลายของ LAS.....	9
5	การตอบสนองที่ระดับต่างกันของสิ่งมีชีวิตต่อสารพิษ.....	16
6	กลไกการกำจัดสารพิษของกูดราโร โอนเอสทรานเพอเรส.....	19
7	การเปลี่ยนแปลงการทำงานของเอนไซม์อะซิทีล โคลิเนสเทอเรส ในสิ่งมีชีวิตที่ได้รับสารพิษ.....	20
8	ผลกระทบของความเครียดต่อไลโซโซม.....	22
9	โครงสร้างของอีโมโซยานินซึ่งประกอบด้วยทองแดง.....	23
10	ลักษณะของปูม้า.....	25
11	การตอบสนองของการเปลี่ยนแปลงการทำงานของเอนไซม์อะตะเลส ในตับอ่อนของปูม้า เมื่อได้รับความเข้มข้นของ LAS ที่ระยะเวลา 3 ชั่วโมง.....	35
12	การตอบสนองของการเปลี่ยนแปลงการทำงานของเอนไซม์อะตะเลส ในตับอ่อนของปูม้า เมื่อได้รับความเข้มข้นของ LAS ที่ระยะเวลา 6 ชั่วโมง.....	36
13	การตอบสนองของการเปลี่ยนแปลงการทำงานของเอนไซม์อะตะเลส ในตับอ่อนของปูม้า เมื่อได้รับความเข้มข้นของ LAS ที่ระยะเวลา 12 ชั่วโมง.....	36
14	การตอบสนองของการเปลี่ยนแปลงการทำงานของเอนไซม์อะตะเลส ในตับอ่อนของปูม้า เมื่อได้รับความเข้มข้นของ LAS ที่ระยะเวลา 24 ชั่วโมง.....	37
15	การตอบสนองของการเปลี่ยนแปลงการทำงานของเอนไซม์ อะตะเลส ในเหงือกของปูม้า เมื่อได้รับความเข้มข้นของ LAS ที่ระยะเวลา 3 ชั่วโมง.....	37
16	การตอบสนองของการเปลี่ยนแปลงการทำงานของเอนไซม์ อะตะเลส ในเหงือกของปูม้า เมื่อได้รับความเข้มข้นของ LAS ที่ระยะเวลา 6 ชั่วโมง.....	38
17	การตอบสนองของการเปลี่ยนแปลงการทำงานของเอนไซม์อะตะเลส ในเหงือกของปูม้า เมื่อได้รับความเข้มข้นของ LAS ที่ระยะเวลา 12 ชั่วโมง.....	38
18	การตอบสนองของการเปลี่ยนแปลงการทำงานของเอนไซม์อะตะเลส ในเหงือกของปูม้า เมื่อได้รับความเข้มข้นของ LAS ที่ระยะเวลา 24 ชั่วโมง.....	39

สารบัญภาพ (ต่อ)

ภาพที่	หน้า
19 การตอบสนองของการเปลี่ยนแปลงการทำงานของเอนไซม์กลูตาไรโอนเอส ทรานเฟอร์ส ในเลือดของปูม้า เมื่อได้รับความเข้มข้นของ LAS ระยะเวลา 6 ชั่วโมง.....	41
20 การตอบสนองของการเปลี่ยนแปลงการทำงานของเอนไซม์กลูตาไรโอนเอส ทรานเฟอร์ส ในเลือดของปูม้า เมื่อได้รับความเข้มข้นของ LAS ที่ ระยะเวลา 12 ชั่วโมง.....	41
21 การตอบสนองของการเปลี่ยนแปลงการทำงานของเอนไซม์กลูตาไรโอนเอส ทรานเฟอร์ส ในเลือดของปูม้า เมื่อได้รับความเข้มข้นของ LAS ที่ระยะเวลา 24 ชั่วโมง.....	42
22 การตอบสนองของการเปลี่ยนแปลงการทำงานของเอนไซม์กลูตาไรโอนเอส ทรานเฟอร์ส ในตับอ่อนของปูม้า เมื่อได้รับความเข้มข้นของ LAS ที่ระยะเวลา 6 ชั่วโมง.....	42
23 การตอบสนองของการเปลี่ยนแปลงการทำงานของเอนไซม์กลูตาไรโอนเอส ทรานเฟอร์ส ในตับอ่อนของปูม้า เมื่อได้รับความเข้มข้นของ LAS ที่ระยะเวลา 12 ชั่วโมง.....	43
24 การตอบสนองของการเปลี่ยนแปลงการทำงานของเอนไซม์กลูตาไรโอนเอส ทรานเฟอร์ส ในตับอ่อนของปูม้า เมื่อได้รับความเข้มข้นของ LAS ที่ระยะเวลา 24 ชั่วโมง.....	43
25 การตอบสนองของการเปลี่ยนแปลงการทำงานของเอนไซม์กลูตาไรโอนเอส ทรานเฟอร์ส ในเหงือกของปูม้า เมื่อได้รับความเข้มข้นของ LAS ที่ระยะเวลา 6 ชั่วโมง.....	44
26 การตอบสนองของการเปลี่ยนแปลงการทำงานของเอนไซม์กลูตาไรโอนเอส ทรานเฟอร์ส ในเหงือกของปูม้า เมื่อได้รับความเข้มข้นของ LAS ที่ระยะเวลา 12 ชั่วโมง.....	44
27 การตอบสนองของการเปลี่ยนแปลงการทำงานของเอนไซม์กลูตาไรโอนเอส ทรานเฟอร์ส ในเหงือกของปูม้า เมื่อได้รับความเข้มข้นของ LAS ที่ระยะเวลา 24 ชั่วโมง.....	45

สารบัญญภาพ (ต่อ)

[illegible]

สารบัญภาพ (ต่อ)

ภาพที่	หน้า
43 ปริมาณของฮีโมโกลบินในเลือด ของผู้ป่วยเมื่อได้รับความเข้มข้นของ LAS ที่ระยะเวลา 12 ชั่วโมง.....	56
44 ปริมาณของฮีโมโกลบินในเลือด ของผู้ป่วยเมื่อได้รับความเข้มข้นของ LAS ที่ระยะเวลา 24 ชั่วโมง.....	56
45 แบบแผนโปรตีนฮีโมโกลบินในเลือดของผู้ที่ได้รับ LAS ความเข้มข้น ต่างกัน.....	57
46 เปรี่เซนต์การเพิ่มขึ้นของเอนไซม์อะสพาร์เตต ในตับอ่อนและเหงือกของผู้ป่วย ในสภาวะ ที่มี LAS.....	63
47 การวัดค่าการดูดกลืนแสงของการทำงานของเอนไซม์อะสพาร์เตต.....	87
48 การวัดค่าการดูดกลืนแสงของการทำงานของเอนไซม์กลูตาไรโอนเอสทรานเฟอเรส.....	88
49 การวัดค่าการดูดกลืนแสงของเอนไซม์อะซีทิลโคไลน์เอสเทอเรส.....	89
50 โปรตีนมาตรฐานระหว่างค่าน้ำหนักโมเลกุล และค่าการเคลื่อนที่สัมพัทธ์.....	91