ประสิทธิภาพของแคลเซียมคาร์บอเนตต่อการลดพิษของคาร์โบฟูแรนในไส้เดือนดินพันธุ์ขี้ตาแร่ *Pheretima peguana* (Stephenson, 1923) ด้วยการใช้จุลกายพยาธิวิทยาเป็นตัววัดทางชีวภาพ

Efficiency of Calcium Carbonate on Reducing Carbofuran Toxicity via Earthworm, *Pheretima peguana* (Stephenson, 1923) using Histopathological Biomarker

ประกายเพชร ปานแก้ว[1] หรรษิตา ชาฮิ[2] และวรรณีย์ จิรอังกูรสกุล[3]*

Prakaipet Pankaew[1], Harshita Shahi[2] and Wannee Jiraungkoorskul[3]*

[1]สาขาเทคนิคการสัตวแพทย์ คณะเทคนิคการสัตวแพทย์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ เขตจตุจักร กรุงเทพฯ 10900 ประเทศไทย

[2]วิทยาลัยนานาชาติ มหาวิทยาลัยมหิดล พุทธมณฑล นครปฐม 73170 ประเทศไทย

[3]ภาควิชาพยาธิชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล เขตราชเทวี กรุงเทพฯ 10400 ประเทศไทย

[1]Veterinary Technology Program, Faculty of Veterinary Technology, Kasetsart University, Bangkok 10900, Thailand

[2]Biological Science Program, Mahidol University International College, Nakhonpathom 73170, Thailand

[3]Department of Pathobiology, Faculty of Science, Mahidol University, Bangkok 10400, Thailand

*Corresponding Author, E-mail: wannee.jir@mahidol.ac.th

(Recieived: March 22, 2019; Revised: June 21, 2019; Accepted: June 26, 2019)

บทคัดย่อ

ปัจจุบันการใช้สารกำจัดแมลงนิยมใช้กันอย่างแพร่หลาย โดยเฉพาะแหล่งเกษตรกรรม เนื่องจากทำให้ได้รับผลผลิตปริมาณมากขึ้นและมีสภาพที่ดีจนเป็นที่ต้องการของผู้บริโภค แต่การใช้สารกำจัดแมลงเหล่านี้กลับพบว่ามีความเป็นพิษต่อสิ่งมีชีวิตที่ไม่ใช่เป้าหมายรวมทั้งมนุษย์ ในการศึกษาครั้งนี้สนใจใช้แคลเซียมคาร์บอเนตเพื่อทดสอบประสิทธิภาพในการลดความเป็นพิษของสารกำจัดแมลงชนิดคาร์โบฟูแรน ด้วยการใช้ไส้เดือนดินเป็นสัตว์ทดลองและใช้จุลกายพยาธิวิทยา เป็นตัววัดทางชีวภาพ (biomarker) แบ่งการทดลองออกเป็น 4 กลุ่ม ตามชนิดของสารเคมีที่ใช้ โดยผลการทดลองพบว่าเซลล์บุผิวของทางเดินอาหารของไส้เดือนดินในกลุ่มที่ 1 ซึ่งใช้น้ำกลั่นในการเลี้ยงและกลุ่มที่ 2 ใช้แคลเซียมคาร์บอเนตที่มีความเข้มข้น 80 มิลลิกรัมต่อลิตรในการเลี้ยง เซลล์เยื่อบุทางเดินอาหารมีสภาพปกติ แต่กลุ่มที่ 3 ซึ่งใช้คาร์โบฟูแรนความเข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์ในการเลี้ยงพบว่ามีความผิดปกติเกิดขึ้น คือ เซลล์เยื่อบุทางเดินอาหารแยกตัวออกจากเบสเมนท์ เมมเบรน การเรียงตัวของเซลล์เยื่อบุทางเดินอาหารผิดปกติ นอกจากนั้นยังมีการเพิ่มจำนวนของเซลล์เยื่อบุทางเดินอาหาร ส่วนกลุ่มที่ 4 ซึ่งใช้สารละลายผสมระหว่างแคลเซียมคาร์บอเนตความเข้มข้น 80 มิลลิกรัมต่อลิตรและคาร์โบฟูแรน ความเข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์ในอัตราส่วน 1:1 พบว่ามีความผิดปกติเกิดขึ้นเช่นเดียวกันแต่ในบางบริเวณยังพบการเรียงตัวของเซลล์ปกติ จึงเห็นได้ว่ากลุ่มที่ 3 เกิดจุลกายพยาธิวิทยามากที่สุดเนื่องจากไม่มีแคลเซียมคาร์บอเนตผสมอยู่น้ำที่ใช้ทดลอง สรุปได้ว่าแคลเซียมคาร์บอเนตมีประสิทธิภาพในการลดความเป็นพิษของสารกำจัดแมลงคาร์โบฟูแรนด้วยการใช้จุลกายพยาธิวิทยาเป็นตัววัดทางชีวภาพในไส้เดือนดิน

คำสำคัญ : จุลพยาธิวิทยา น้ำกระด้าง สารกำจัดแมลง ไส้เดือนดิน

Abstract

Currently, many insecticides are used worldwide in agriculture because they can help induce the quantity and quality of products. But they are toxic to other organisms especially humans being one of those affected. Therefore, there are laws to prohibit the use of some insecticides that are dangerous to human health. However, there are still detecting the illegal use of these insecticides. The aim of this research was analyzed the efficiency of calcium carbonate reducing carbofuran toxicity via earthworm

histopathology technique. There were 4 groups by chemical type: group 1 which exposed with distilled water; group 2 which exposed with 80 mg per liter calcium carbonate group 3 which exposed with 1% carbofuran; group 4 which exposed with a mixture of 80 mg per liter calcium carbonate and 1 % carbofuran (1:1). The enterocytes were appeared normal structure in group 1 and group 2. Nevertheless, they were separated from basement membrane, disorganization and hyperplasia in group 3. Moreover, the similar histopathological changes were found in group 4 in lower severity, and in some areas still found normal structure. It might be concluded that the hard water or calcium carbonate may be used to reduce the toxicity of carbofuran.

Keywords: Earthworm, Hard water, Histopathology, Insecticide

บทนำ

ในปัจจุบันสารกำจัดแมลงจัดเป็นสารเคมีกลุ่มที่นิยมใช้อย่างแพร่หลาย ทั้งแบบมาจากธรรมชาติ (Yadav et al., 2015) หรือมีการสังเคราะห์ขึ้น (Liu et al., 2018) เพื่อช่วยเพิ่มผลผลิตทางการเกษตรที่และทำให้เกษตรกรมีรายได้เพิ่มมากขึ้น แต่อย่างไรก็ตามกลับพบว่าสารกำจัดแมลงเหล่านี้มีอันตรายต่อสิ่งมีชีวิตที่ไม่ใช่เป้าหมาย (Target organisms) และมนุษย์ (Sabarwal et al., 2018) แม้ว่ามีการออกกฎห้ามใช้สารกำจัดแมลงบางชนิด เช่น ไพรีทรอยด์ (Pyrethroids) และ ดีดีที (DDTs) (Lan et al., 2019) เนื่องจากจัดเป็นสารก่อมะเร็ง (VoPham et al., 2015) และทำลายเนื้อเยื่อของสมอง เป็นต้น (Peter et al., 2008) แต่ยังมีการลักลอบใช้สารกำจัดแมลงเหล่านี้อยู่ (Guo et al., 2016) จึงจำเป็นอย่างยิ่งต้องหาวิธีในการแก้ปัญหาเพื่อลดสารพิษหรือฤทธิ์ของสารกำจัดแมลงเพื่อช่วยให้ผู้บริโภคไม่ได้รับอันตรายจากสารกำจัดแมลงเข้าไปโดยการรู้เท่าไม่ถึงการณ์ หนึ่งในวิธีการที่คนนิยมใช้กันคือ การล้างด้วยน้ำประปาให้สะอาดเท่านั้น แต่ในบางครั้งก็มักมีสารเคมีที่ไม่ได้เป็นอันตรายร้ายแรงต่อสุขภาพปะปนมาด้วย โดยเฉพาะแคลเซียมคาร์บอเนต ($CaCO_3$) (WHO, 2011)

แคลเซียมคาร์บอเนตเป็นสารชนิดหนึ่งที่พบได้ทั่วไปในน้ำกระด้าง (WHO, 2011) ซึ่งน้ำกระด้างจัดเป็นน้ำที่มีคุณภาพไม่ดี เนื่องจากทำให้เกิดตะกรัน จนเพิ่มความเสี่ยงในการเกิดนิ่วกับผู้บริโภค (Sengupta, 2013; Mitra et al., 2018) แต่ยังเป็นน้ำที่พบว่ายังมีการใช้อยู่ในบางประเทศ ทั้งอุปโภค บริโภค และใช้ผสมกับสารกำจัดศัตรูพืชเพื่อฉีดพ่น (Kadir et al., 2017)

สารกำจัดแมลงหลายชนิดทำให้เกิดผลกระทบต่อไส้เดือนดินซึ่งเป็นสิ่งมีชีวิตที่ไม่ใช่เป้าหมาย โดยสารกำจัดแมลงแต่ละชนิดมีความเป็นพิษต่อไส้เดือนดินไม่เท่ากันและสามารถก่อให้เกิดความผิดปกติต่อไส้เดือนดินได้ เช่น ยับยั้งการทำงานของระบบสืบพันธุ์ มีการแยกตัวของเซลล์เนื้อเยื่อผิวหนังและทางเดินอาหาร เกิดความเสียหายต่อเซลล์เนื้อเยื่อผิวหนังและทางเดินอาหาร (Wang et al., 2015) และทำให้เกิดการตายของไส้เดือนดิน (Das Gupta et al., 2011)

ในการศึกษาครั้งนี้เลือกสารกำจัดแมลงคาร์โบฟูแรน ซึ่งจัดอยู่ในกลุ่มคาร์บาเมต เนื่องจากมีการใช้อย่างแพร่หลาย เช่น การปลูกข้าว (Clasen et al., 2014) ข้าวโพด (Lewis et al., 1996) ผักผลไม้ชนิดต่าง ๆ (Dai et al., 2017) วัตถุประสงค์เพื่อทำการทดสอบประสิทธิภาพของแคลเซียมคาร์บอเนตในการลดพิษของคาร์โบฟูแรนต่อไส้เดือนดิน สายพันธุ์ *Pheretima peguana* ด้วยการใช้จุลกายพยาธิวิทยามาเป็นตัววัดทางชีวภาพ

วิธีดำเนินการวิจัย

1. การเตรียมตัวอย่างไส้เดือนขี้ตาแร่

ทำการแยกไส้เดือนขี้ตาแร่ออกมาจากดินที่ใช้ทำการเพาะเลี้ยง จากนั้นทำการคัดขนาดของไส้เดือนขี้ตาแร่แล้วนำไปใส่ไว้ในบีกเกอร์เพื่อรอการนำไปใช้สำหรับทำการทดลอง ไส้เดือนที่ไม่ได้นำมาใช้ในกรทดลองจะถูกนำกลับไปเลี้ยงในดินสำหรับเพาะเลี้ยงตามเดิม

2. วิธีการทดลอง

ทำการแบ่งการทดลองออกเป็น 4 กลุ่ม ได้แก่ กลุ่มที่ 1 คือ น้ำกลั่น (กลุ่มควบคุม) กลุ่มที่ 2 แคลเซียมคาร์บอเนตความเข้มข้น 80 มิลลิกรัมต่อลิตร กลุ่มที่ 3 คาร์โบฟูแรนความเข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์ กลุ่มที่ 4 สารละลายผสมระหว่างแคลเซียมคาร์บอเนตความเข้มข้น 80 มิลลิกรัมต่อลิตรผสมกับคาร์โบฟูแรนความเข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์ ในอัตราส่วน 1:1

เตรียมสารละลายแต่ละกลุ่มใส่ในจานเพาะเลี้ยงแบบวงกลมขนาด 90 X 20 มิลลิเมตร จำนวน 3 มิลลิลิตร หลังจากนั้นใส่ไส้เดือนดินขี้ตาแร่ขนาดเท่า ๆ กันลงไปจานละ 2 ตัว โดยทำซ้ำ 3 ชุด และเลี้ยงตัวอย่างไส้เดือนขี้ตาแร่ภายใต้อุณหภูมิห้องและมืดเป็นเวลา 24 ชั่วโมง ตรวจสอบลักษณะสัณฐานวิทยาภายนอกและบันทึกการตายของไส้เดือนดินสายพันธุ์ *Pheretima peguana*

3. การศึกษาทางด้านมิชญวิทยา

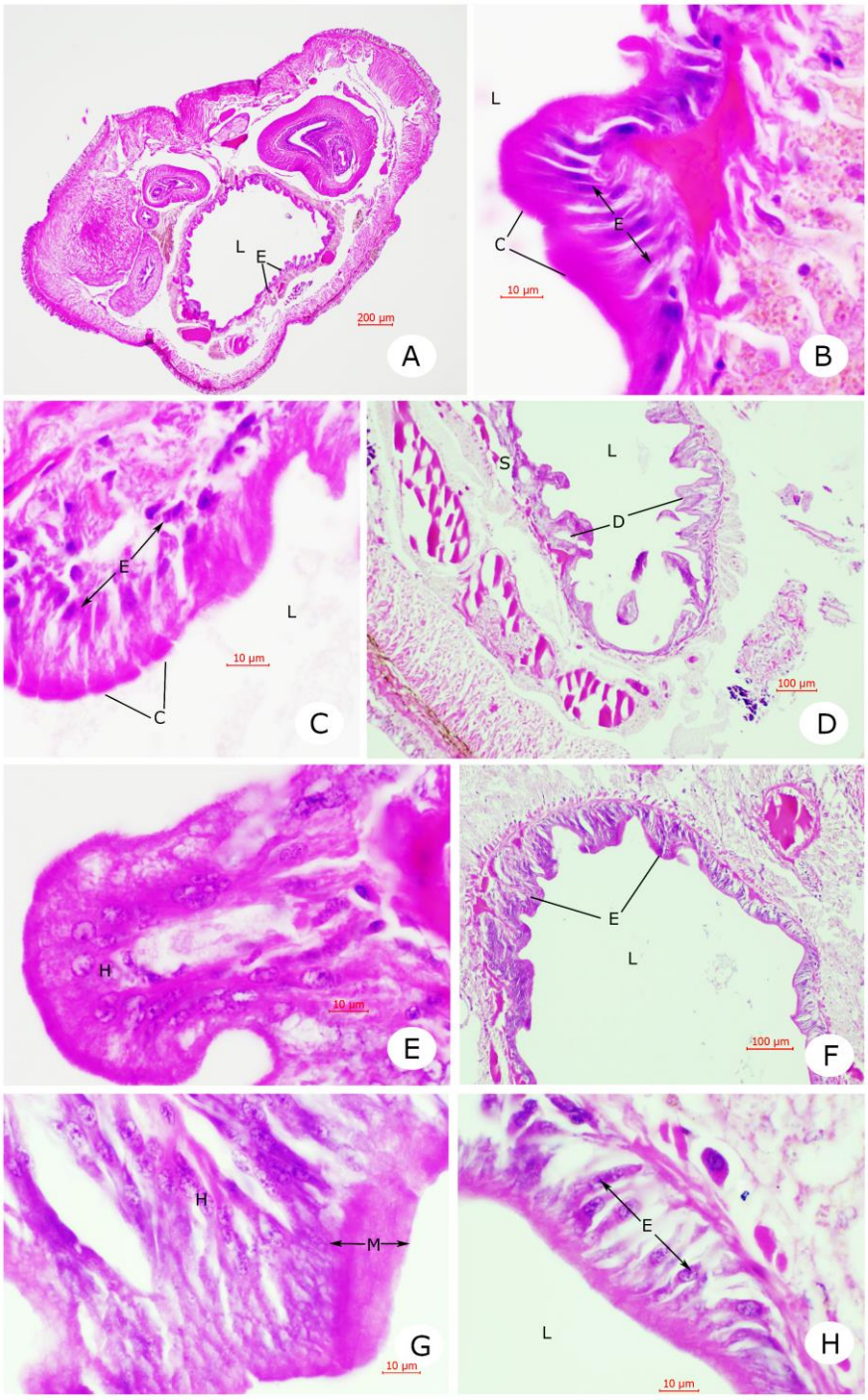
หลังจากเสร็จสิ้นการทดลองทำการเก็บตัวอย่างเนื้อเยื่อโดยแบ่งเป็นชิ้นๆใส่ลงในน้ำยาคงสภาพฟอร์มาลิน 10 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลาอย่างน้อย 24 ชั่วโมง และนำมาผ่านกระบวนการทางมิญชวิทยาตามวิธีมาตรฐานของ Presnell และ Schreibman (1997) โดยนำเนื้อเยื่อมาแช่ในแอลกอฮอล์ที่มีความเข้มข้นตั้งแต่ 70 เปอร์เซ็นต์, 80 เปอร์เซ็นต์, 95 เปอร์เซ็นต์ และ 100 เปอร์เซ็นต์ หลังจากนั้นนำกระบวนการแทรกซึมเนื้อเยื่อลงในพาราฟินเหลว (Paraffin wax) โดยใช้ไซลีนเป็นตัวกลางแล้วนำบล็อกเนื้อเยื่อมาตัดแผ่นบางด้วยความหนา 4-5 ไมโครเมตร ย้อมด้วยสีเมเยอร์ฮีมาท็อกไซลินและสีอีโอซิน และนำสไลด์เนื้อเยื่อมาศึกษารายละเอียดของเซลล์และเนื้อเยื่อ รวมถึงการปรากฏของจุลกายพยาธิวิทยาภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสง Olympus CX31 และถ่ายภาพด้วย Canon EOS 1100D Digital Camera (ประเทศญี่ปุ่น)

ผลและอภิปรายผล

จากการตรวจสอบลักษณะสัณฐานวิทยาภายนอกของไส้เดือนดินสายพันธุ์ *Pheretima peguana* พบว่ากลุ่มที่ 1 และกลุ่มที่ 2 ยังคงมีชีวิตและมีลักษณะปกติในขณะที่กลุ่มที่ 3 และกลุ่มที่ 4 พบภาวะที่มีเลือดออก (Hemorrhage) และการตาย เมื่อพิจารณาทางด้านมิญชวิทยาของไส้เดือนดินพันธุ์ขี้ตาแร่ในกลุ่มที่ 1 (แทนที่ 1A และ 1B) และกลุ่มที่ 2 (แทนที่ 1C) มีโครงสร้างเนื้อเยื่อปกติ พบว่าเซลล์เยื่อบุในระบบทางเดินอาหาร (Enterocyte) มีการจัดเรียงด้วยเซลล์บุผิวแบบทรงสูงชั้นเดียว (Simple columnar epithelium) แต่ละเซลล์บุผิวมีนิวเคลียสอยู่บริเวณฐานของเซลล์ ส่วนบน (Apical surface) ของเซลล์มีซิเลีย (Cilia) ปกคลุม สำหรับกลุ่มที่ 3 (ภาพที่ 1D และ 1E) พบความผิดปกติในหลายอาการ ได้แก่ เซลล์เยื่อบุผิวทางเดินอาหารแยกตัวออกจากเบสเมนท์ เมมเบรน (Separation from basement membrane) และความผิดปกติของการเรียงตัวของเซลล์เยื่อบุผิวทางเดินอาหาร (Disorganization) นอกจากนั้นยังสามารถพบการเพิ่มจำนวนของเซลล์เยื่อบุทางเดินอาหาร (Hyperplasia) และเกิดความเสียหายกับซิเลีย ส่วนกลุ่มที่ 4 (แทนที่ 1F-1H) มีการเพิ่มจำนวนของเซลล์เยื่อบุทางเดินอาหาร ด้วยเช่นกัน แต่พบว่ามีเยื่อเมือกหนาตัวขึ้น (Mucus hypersecretion) เนื่องจากเซลล์เยื่อบุทางเดินอาหารเป็นเซลล์ที่ต้องมีการสัมผัสกับสารต่างๆที่ไส้เดือนมีการรับเข้ามาทางการกิน

จากการศึกษาครั้งนี้ยืนยันได้ว่ากลุ่มที่ 2 ไม่พบสัณฐานวิทยาภายนอกที่ผิดปกติและการปรากฏรอยโรค แสดงให้เห็นว่าแคลเซียมคาร์บอเนตความเข้มข้น 80 มิลลิกรัมต่อลิตรเป็นระดับที่ปลอดภัยต่อไส้เดือนดินพันธุ์ขี้ตาแร่เมื่อทำการเลี้ยงเป็นเวลา 24 ชั่วโมง ความผิดปกติที่เกิดขึ้นในระดับเซลล์เกิดขึ้นทั้งในกลุ่มที่ 3 และกลุ่มที่ 4 ที่มีการใช้คาร์โบฟูแรนความเข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์ สอดคล้องกับการตายของไส้เดือนดินพันธุ์ขี้ตาแร่ภายใน 24 ชั่วโมง เช่นเดียวกันกับผลการทดลองของ De Silva et al. (2010) ทำการทดลองสารกำจัดแมลงชนิดสำคัญต่าง ๆ กับไส้เดือนดินสายพันธุ์ *Perionyx excavatus* พบว่าค่าความเข้มข้นที่ทำให้สัตว์ทดลองตายครึ่งหนึ่ง (LC_{50}) ของ คาร์โบฟูแรน (Carbofuran), คลอไพริฟอส (Chlorpyrifos) และ แมนโคเซบ (Mancozeb) คือ 9, 122 และ 541 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม ตามลำดับ นอกจากนั้น Nofyan et al. (2017) ได้ทำการทดสอบฤทธิ์ของคาร์โบฟูแรนที่ระดับความเข้มข้น 0.5 เปอร์เซ็นต์ ต่อไส้เดือนดินสายพันธุ์ *Pheretima javanica* ผลการทดลองชี้ให้เห็นว่าไส้เดือนดินมีอัตราการบริโภคเท่ากับ 90.09 เปอร์เซ็นต์ และอัตราการเจริญเติบโตเท่ากับ 36.47 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งลดลงอย่างชัดเจน เมื่อเทียบกับ จากกลุ่มควบคุม

ข้อมูลเกี่ยวกับแคลเซียมคาร์บอเนตในการลดความเป็นพิษของสารกำจัดแมลงในไส้เดือนดินมีน้อยมาก ดังนั้นผลการทดลองจากงานวิจัยฉบับนี้จึงให้ข้อมูลที่เป็นประโยชน์สำหรับประชาชนได้มาก แต่มีข้อมูลบางส่วนของ Altinok และคณะ (2006) ได้รายงานปริมาณแคลเซียมคาร์บอเนตในน้ำความเข้มข้น 19.0 มิลลิกรัมต่อลิตร เปรียบเทียบกับความเข้มข้น 138.5 มิลลิกรัมต่อลิตร สามารถลดอัตราการตายของปลาเรนโบว์เทราท์ซึ่งเลี้ยงในน้ำที่มีสารกำจัดแมลงกลุ่มคาร์บอเนตปนเปื้อนลดลงจาก 48.9% เหลือ 42.2% (Altinok et al., 2006) แสดงให้เห็นว่าแคลเซียมคาร์บอเนตสามารถลดความเป็นพิษของสารกำจัดแมลงได้เช่นเดียวกัน ซึ่งมีความสอดคล้องกับรายงานวิจัยฉบับนี้



ภาพที่ 1 ภาพตัดตามขวางของเนื้อเยื่อบริเวณทางเดินอาหารส่วนต้นของไส้เดือนสายพันธุ์ *Pheretima peguana* (A, B) กลุ่มที่ 1 (C) กลุ่ม 2 (D, E) กลุ่ม 3 (F-H) กลุ่มที่ 4 หมายเหตุ: C = Cilia, D = Disorganization of enterocytes, E = Enterocyte, H = Hyperplasia, L = Lumen, M = Mucus, S = Separation

สรุป

น้ำกระด้างหรือน้ำที่ผสมแคลเซียมคาร์บอเนตอาจสามารถนำมาใช้ในการลดความเป็นพิษของคาร์โบฟูแรนได้ แต่ต้องมีการทดลองเพิ่มเติมในระดับของโครงสร้างทางเคมีที่เกิดปฏิกิริยาต่อกัน เพื่อยืนยันว่าสามารถลดความเป็นพิษได้จริง ๆ และสามารถนำไปใช้ประโยชน์ได้อย่างสูงสุดและถูกต้อง

กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบคุณหน่วยปฏิบัติการพิษวิทยาสัตว์น้ำ ภาควิชาพยาธิชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล นายปิยะ โคสัย และ นายสมนึก กู๋ทะ ที่ให้คำปรึกษาและช่วยเหลือในการทำวิจัยครั้งนี้

เอกสารอ้างอิง

Altinok, I., Capkin, E., Karahan, S., & Boran, M. (2006). Effects of water quality and fish size on toxicity of methiocarb, a carbamate pesticide, to rainbow trout. *Environmental Toxicology and Pharmacology,* 22(1), 20-26. https://doi.org/10.1016/j.etap.2005.11.002

Clasen, B., Leitemperger, J., Murussi, C., Pretto, A., Menezes, C., Dalabona, F., et al. (2014). Carbofuran promotes biochemical changes in carp exposed to rice field and laboratory conditions. *Ecotoxicology and Environmental Safety,* 101, 77-82. doi:10.1016/j.ecoenv.2013.12.012

Dai, Y., Wang, T., Hu, X., Liu, S., Zhang, M., & Wang, C. (2017). Highly sensitive microcantilever-based immunosensor for the detection of carbofuran in soil and vegetable samples. *Food Chemisty,* 229, 432-438. doi:10.1016/j.foodchem.2017.02.093

Das Gupta, R., Chakravorty, P. P., & Kaviraj, A. (2011). Susceptibility of epigeic earthworm Eisenia fetida to agricultural application of six insecticides. *Chemosphere,* 84(5), 724-726. doi:https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2011.03.016

De Silva, P. M. C. S., Pathiratne, A., & van Gestel, C. A. M. (2010). Toxicity of chlorpyrifos, carbofuran, mancozeb and their formulations to the tropical earthworm Perionyx excavatus. *Applied Soil and Ecology,* 44(1), 56-60. https://doi.org/10.1016/j.apsoil.2009.09.005

Guo, T., Fang, P., Jiang, J., Zhang, F., Yong, W., Liu, J., & Dong, Y. (2016). Rapid screening and quantification of residual pesticides and illegal adulterants in red wine by direct analysis in real time mass spectrometry. *Journal of Chromatography A,* 1471, 27-33. https://doi.org/10.1016/j.chroma.2016.09.073

Kadir, N. N. A., Shahadat, M., & Ismail, S. (2017). Formulation study for softening of hard water using surfactant modified bentonite adsorbent coating. *Applied Clay Science,* 137, 168-175. doi:https://doi.org/10.1016/j.clay.2016.12.025

Lan, J., Jia, J., Liu, A., Yu, Z., & Zhao, Z. (2019). Pollution levels of banned and non-banned pesticides in surface sediments from the East China Sea. *Marine Pollution Bulletin,* 139, 332-338. https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2019.01.006

Lewis, L. C., Berry, E. C., Obrycki, J. J., & Bing, L. A. (1996). Aptness of insecticides (*Bacillus thuringiensis* and carbofuran) with endophytic *Beauveria bassiana*, in suppressing larval populations of the European corn borer. *Agriculture, Ecosystems and Environment,* 57(1), 27-34. https://doi.org/10.1016/0167-8809(95)01011-4

Liu, X., Zhang, Q., Li, S., Mi, P., Chen, D., Zhao, X., & Feng, X. (2018). Developmental toxicity and neurotoxicity of synthetic organic insecticides in zebrafish (*Danio rerio*): A comparative study of deltamethrin, acephate, and thiamethoxam. *Chemosphere,* 199, 16-25. https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2018.01.176

Mitra, P., Pal, D. K., & Das, M. (2018). Does quality of drinking water matter in kidney stone disease: A study in West Bengal, India.*Investigative and Clinical Urology,* 59(3), 158-165. doi:10.4111/icu.2018.59.3.158

Nofyan, E., Lamin, S., Patriot, I. T., & Kanedi, M. (2017). Physiological effects of carbofuran on earthworm *Pheretima javanica* Gates. *Advances in Life Sciences,* 7(2), 21-25. doi:10.5923/j.als.20170702.02

Peter, J. V., Prabhakar, A. T., & Pichamuthu, K. (2008). In-laws, insecticide—and a mimic of brain death. *The Lancet,* 371(9612), 622. https://doi.org/10.1016/S0140-6736(08)60273-1

Presnell, J. K., & Schreibman, M. P. (1997). *Humason's Animal Tissue Techniques* (5th ed. ed.): Baltimore (Md.) : Johns Hopkins University Press.

Sabarwal, A., Kumar, K., & Singh, R. P. (2018). Hazardous effects of chemical pesticides on human health–Cancer and other associated disorders. *Environmental Toxicology and Pharmacology,* 63, 103-114. https://doi.org/10.1016/j.etap.2018.08.018

Sengupta, P. (2013). Potential health impacts of hard water. *International Journal of Preventive Medicine,* 4(8), 866-875.

VoPham, T., Brooks, M. M., Yuan, J. M., Talbott, E. O., Ruddell, D., Hart, J. E., et al. (2015). Pesticide exposure and hepatocellular carcinoma risk: A case-control study using a geographic information system (GIS) to link SEER-Medicare and California pesticide data. *Environmental Research,* 143, 68-82. https://doi.org/10.1016/j.envres.2015.09.027

Wang, K., Pang, S., Mu, X., Qi, S., Li, D., Cui, F., & Wang, C. (2015). Biological response of earthworm, Eisenia fetida, to five neonicotinoid insecticides. *Chemosphere,* 132, 120-126. doi:https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2015.03.002

WHO. (2011). *Hardness in Drinking-water* (Vol. 2). Geneva, Switzerland: WHO Press

Yadav, A., Keval, R., & Choudhary, S. (2015). Biopesticide: the need for present and future agriculture. *Journal of Agroecology and Natural Resource Management*. 2, 57-60.