วารสารวิทยาศาสตร์บูรพา ปีที่ 26 (ฉบับที่ 1) มกราคม – เมษายน พ.ศ. 2564
BURAPHA SCIENCE JOURNAL Volume 26 (No.1) January – April 2021 บทความวิจัย

ผลกระทบของแคดเมียมคลอไรด์ ($CdCl_2$) ที่มีต่อการเพาะฟักของไข่หอยเชอรี่และการประยุกต์ใช้อะซิทิลโคลีนเอสเทอเรสเป็นตัวชี้วัดการได้รับสัมผัสในหอยเชอรี่

Adverse Effect of $CdCl_2$ on Hatching Rate of Egg's Golden Apple Snail (*Pomacea canaliculata*) and Application Acetylcholinesterase (AChE) as Biomarker of Exposure on Golden Apple Snail

น้ำทิพย์ จันถาวร[1], ไชยวัตน์ นวลขาว[2], ปราง กาญจนสาร[2], ปวีณา สาลีทอง[3], จันทร์พิมพ์ กังพานิช[4], พอจิต นันทนาวัฒน์[5] และ ชุติมา ถนอมสิทธิ์[1*]

Namthip Cantawon[1], Chaiwat Nuankaew[2], Prang Khanchanasal[2], Paweena Saleethong[3], Chanpim Kangpanich[4], Phochit Nanthanawat[5] and Chutima Thanomsit[1*]

[1] *สาขาวิชาประมง คณะเกษตรศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลอีสาน วิทยาเขตสุรินทร์*

[2]*หลักสูตรเทคโนโลยีเกษตร คณะเกษตรศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลอีสาน วิทยาเขตสุรินทร์*

[3] *สาขาวิชาวิทยาศาสตร์และคณิตศาสตร์ คณะเกษตรศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลอีสาน วิทยาเขตสุรินทร์*

[4] *สาขาวิชาประมง คณะเกษตรศาสตร์และทรัพยากรธรรมชาติ มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลตะวันออก บางพระ*

[5] *ภาควิชาเทคโนโลยีชีวภาพ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา*

[1]*Department of Fisheries, Faculty of Agriculture and Technology, Rajamangala University of Technology Isan Surin Campus*

[2]*Agriculture and Technology program, Faculty of Agriculture and Technology, Rajamangala University of Technology Isan Surin Campus*

[3]*Department of Mathematic and Science, Faculty of Agriculture and Technology, Rajamangala University of Technology Isan Surin Campus,*

[4]*Department of Fisheries, Faculty of Agriculture and Natural resources, Rajamangala University of Technology Tawan-ok*

[5] *Department of Biotechnology, Faculty of Science, Burapha University*

Received : 28 June 2020

Revised : 21 August 2020

Accepted : 9 February 2020

บทคัดย่อ

งานวิจัยนี้มีเป้าหมายเพื่อศึกษาผลของแคดเมียมคลอไรด์ ($CdCl_2$) ที่มีต่อการเพาะฟักของไข่หอยเชอรี่ ระดับความเป็นพิษที่ก่อให้เกิดการตายของหอยเชอรี่และการประยุกต์ใช้อะซิทิลโคลีนเอสเทอเรสในหอยเชอรี่ที่ได้รับสัมผัสกับแคดเมียมคลอไรด์มาเป็นตัวบ่งชี้ถึงการได้รับสัมผัส ผลการศึกษาพบว่าแคดเมียมคลอไรด์ส่งผลต่ออัตราการเพาะฟักของหอยเชอรี่ โดยในทุกกลุ่มของไข่หอยเชอรี่ที่ได้รับสัมผัสกับแคดเมียมคลอไรด์ความเข้มข้น 0.05, 0.10, 0.20, 0.30 และ 0.40 mg/L พบว่าที่ความเข้มข้น 0.40 mg/L มีอัตราการเพาะฟักต่ำที่สุด (39.61%) และทุกความเข้มข้นมีอัตราเพาะฟักน้อยกว่ากลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.05$) ความผิดปกติที่ตรวจสอบได้เมื่อไข่ได้รับสัมผัสกับแคดเมียมคลอไรด์พบว่าที่ความเข้มข้นของแคดเมียม 0.40 mg/L มีลักษณะของเซลล์ไข่ผิดปกติมากที่สุด (61.12%) และเกิดความผิดปกติของตัวอ่อนมากที่สุดเช่นกัน (63.83%) ยิ่งไปกว่านั้นเมื่อนำหอยเชอรี่ขนาดกลางมาทดสอบถึงค่าความเป็นพิษของแคดเมียมคลอไรด์ที่ก่อให้เกิดการตาย 50% ที่เวลา 96 ชั่วโมง พบว่ามีค่าประมาณ 1.25 (7.143 – 2.234) mg/L เมื่อตรวจสอบรูปแบบของอะซิทิลโคลีนเอสเทอเรส พบว่ามี 1 isoform ที่มีขนาด 71 kDa เมื่อศึกษาโดยใช้เทคนิค SDS-PAGE การแสดงออกของอะซิทิลโคลีนเอสเทอเรส พบว่าจะลดลงตามระดับความเข้มข้นที่หอยเชอรี่ได้รับสัมผัสแคดเมียมคลอไรด์ในระดับความเข้มข้นที่ไม่ก่อให้เกิดการตาย คือ 0, 0.05, 0.10, 0.20, 0.30 และ 0.40 mg/L เมื่อได้รับสัมผัสสารเป็นเวลา 96 ชั่วโมง ขีดจำกัดการตรวจสอบ คือ 0.156, 0.312, 0.625, 2.5 และ 5 µg/µl ส่วนในระดับที่ก่อให้เกิดการตาย คือ ระดับความเข้มข้น 0, 0.50, 1.00, 1.50, 2.0 และ 2.50 mg/L ขีดจำกัดของการตรวจสอบโดยใช้เทคนิคดอทบลอท คือ 10, 10, 10, 10, 10 , 20 µg/µl

คำสำคัญ : แคดเมียมคลอไรด์ ; ตัวชี้วัดทางชีวภาพ ; หอยเชอรี่ ; อะซิทิลโคลีนเอสเทอเรส

Abstract

This study aimed to evaluate the effects of cadmium chloride ($CdCl_2$) on the hatching rate of golden apple snail eggs and its lethal toxicity level, as well as to apply acetylcholinesterase (AChE) in golden apple snail exposed to $CdCl_2$ to be an indicator of exposure. The results showed that $CdCl_2$ affected the hatching rate of the golden apple snails in all groups of golden apple snail eggs exposed to $CdCl_2$ in the concentration levels of 0.05, 0.10, 0.20, 0.30 and 0.40 mg/L. $CdCl_2$ at 4.0 mg/L had the lowest hatching rate (39.61%) and their hatching rates were significantly lower than the control group ($p<0.05$). Abnormalities being observed after the eggs exposing to $CdCl_2$ were abnormal egg cell and embryo. We also found that $CdCl_2$ at 4.0 mg/L affected the egg cell and embryo at the highest hatching rates with abnormalities at 61.12% and 63.83%, respectively. Moreover, when the medium sized golden apple snail was tested for the toxicity of $CdCl_2$, which caused 50% mortality at 96 h, the concentration was approximately at 1.77 (1.71-1.83) mg/L. Additionally, an isoform of AChE had the molecular weight of 71 kDa when investigating by SDS-PAGE technique. AChE expression was lowered with an increasing in concentration of $CdCl_2$. At the sub-lethal concentration levels at 0, 0.05, 0.10, 0.20, 0.30 and 0.40 mg/L after 96 h of exposure, detection limits by dot blot technique were found at 0.156, 0.312, 0.625, 2.5 and 5 µg/µl, respectively. Besides, for lethal concentration levels at 0, 0.50, 1.00, 1.50, 2.00 and 2.50 mg/L, the detection limits of dot blot technique were consecutively 10, 10, 10, 10, 10, 20 µg/µl.

Keywords : cadmium chloride ; biomarker ; golden apple snail ; acetylcholinesterase

***Corresponding author. E-mail** : Chutima.tn@rmuti.ac.th

บทนำ

หอยเชอรี่ (Golden apple snail) มีชื่อเรียกอีกอย่างหนึ่งว่าเป๋าฮื้อน้ำจืดหรือหอยโข่งอเมริกาใต้ หอยเชอรี่จัดว่าเป็นสัตว์ต่างถิ่นซึ่งมีรายงานว่ามีถิ่นกำเนิดในทวีปอเมริกาใต้ และมีการนำเข้ามาในประเทศไทยผ่านจากประเทศญี่ปุ่นและประเทศฟิลิปปินส์ ในปี พ.ศ. 2553 มีรายงานว่าหอยเชอรี่ถูกจัดเป็นสัตว์ต่างถิ่นในลำดับที่ 11 ซึ่งสร้างความเสียหายให้กับสัตว์พื้นเมืองต่าง ๆ เช่น หอยโข่งเนื่องจากหอยเชอรี่มีการขยายพันธุ์ที่รวดเร็ว เจริญเติบโตไว สามารถกินอาหารได้หลากหลายประเภท และสามารถปรับตัวให้เข้ากับสิ่งแวดล้อมได้ดีมากทำให้พบหอยเชอรี่ได้ตามสิ่งแวดล้อมทั่วไป หอยเชอรี่เพศเมียสามารถวางไข่ได้ตลอดทั้งปี โดยเฉพาะในฤดูฝนจะวางไข่ได้ 10-14 ครั้งต่อเดือน ลักษณะของไข่หอยเชอรี่คือไข่จะเป็นเม็ดเล็ก ๆ เกาะติดกันเป็นกลุ่ม ๆ ละประมาณ 300-3,000 ฟอง และไข่สามารถฟักเป็นตัวหอยได้ภายใน 7-12 วัน จึงทำให้หอยเชอรี่เพิ่มปริมาณได้อย่างรวดเร็วและสามารถแพร่กระจายไปสู่แหล่งน้ำและนาข้าวในพื้นที่ต่าง ๆ ได้ (Thanomsit *et al*., 2019)

ปัจจุบันหน่วยงานที่เกี่ยวข้องได้เข้ามาช่วยเหลือเกษตรกร ในการหาทางกำจัดหอยเชอรี่ เช่น กองกีฏและสัตววิทยาได้ให้คำแนะนำวิธีที่ได้ให้คำแนะนำวิธีที่ได้ประสิทธิภาพและปลอดภัยต่อผู้ใช้และสิ่งแวดล้อม คือ การป้องกันและกำจัดแบบวิธีผสมผสาน หลักการก็คือให้ใช้วัสดุกั้นทางที่ให้น้ำเข้านาทำลายไข้และตัวหอย และควบคุมระดับน้ำร่วมกับการใช้สารฆ่าหอยเพื่อทำลายหอยที่จำศีลอยู่ในนา ดังนั้นจึงมีการศึกษาป้องกันและกำจัดอื่น ๆ นอกเหนือจากคำแนะนำของกีฏและสัตววิทยา เป็นต้นว่า การนำหอยมาใช้ประโยชน์ในเรื่องของทำเป็นส่วนผสมอาหารสัตว์ เช่น อาหารของปลาหมอ (Tanee *et al*., 2015) และการใช้การใช้หอยเชอรี่ทดแทนปลาข้างเหลืองในการเลี้ยงปลากะพงขาว (Champasri *et al*., 2018) แต่ขณะเดียวกันมักพบปัญหาเกี่ยวกับการเกิดโรคและปัญหาการปนเปื้อนของสารพิษต่าง ๆ ยกตัวอย่าง เช่น สารกำจัดแมลงศัตรูพืชชนิดต่าง ๆ และโลหะหนัก เช่น แคดเมียม และปรอท เป็นต้น จึงทำให้ต้องมีการศึกษาเพิ่มเติมต่อไป

โลหะหนัก เช่น แคดเมียม เมื่ออยู่ในแหล่งน้ำสามารถอาศัยอยู่ในตัวกลาง เช่น ดินตะกอน พืชน้ำ สัตว์น้ำ แขวนลอยอยู่ในน้ำอย่างอิสระได้ในปริมาณที่แตกต่างกัน ซึ่งแคดเมียมที่อยู่ในตัวกลางเหล่านี้สามารถเปลี่ยนรูปหรือเคลื่อนย้ายเข้าสู่ห่วงโซ่อาหารได้ โดยทั่วไปแล้วแคดเมียมจะมาจาก 2 แหล่งที่สำคัญ คือ การเคลื่อนที่ของแคดเมียมในแม่น้ำเนื่องจากกระบวนการผุพังตามธรรมชาติ หรือการเปลี่ยนแปลงทางเคมีและกายภาพของเปลือกโลก และมาจากกิจกรรมของมนุษย์ โดยเฉพาะในโรงงานอุตสาหกรรมที่นำเอาแคดเมียม มาใช้ในกระบวนการผลิต แหล่งที่มาอีกแหล่งหนึ่งก็คือการเคลื่อนที่มาจากชั้นบรรยากาศในรูปของ ฝุ่นละออง ซึ่งเมื่อน้ำฝนไหลผ่านก็จะชะล้างลงสู่แหล่งน้ำได้ (Jaileung, 2019) แคดเมียมเป็นธาตุที่ไม่ละลายน้ำ โดยทั่วไปจะไม่ค่อยพบแคดเมียมในรูปของแคดเมียมบริสุทธิ์ แต่มักจะพบในรูปของสารประกอบของเกลือ เช่น cadmium sulfate ($CdSO_4$) cadmium nitrate ($CdNO_3$) และ cadmium chloride ($CdCl_2$) ซึ่งเป็นสารประกอบที่ไม่มีสีและละลายได้ดีในน้ำ นอกจากนี้ยังสามารถรวมตัวกับสารอื่น ๆ เป็นสารประกอบเชิงซ้อนที่ละลายน้ำได้โดยเฉพาะเมื่อรวมกับ cyanides และ amines (Walker *et al*., 2006; Neerattanapun, 2011; Jaileung, 2019)

โคลีนเอสเทอเรสเป็นดัชนีชี้วัดทางชีวภาพที่แสดงถึงการได้รับสัมผัสสารในกลุ่มกำจัดแมลงศัตรูพืช เอนไซม์โคลีนเอสเทอเรสที่สำคัญในร่างกายมี 2 ชนิด คือ ชนิดที่พบในเม็ดเลือดแดงและพบในเนื้อเยื่อระบบประสาท เรียกว่า อะซิทิลโคลีนเอสเทอเรส (acetylchoinesterase; AChE) หรือ ทรูโคลีนเอสเทอเรส (true cholinesterase) มีหน้าที่ในการย่อยอะซิทิลโคลีน (acetylcholine; ACh) และชนิดที่พบในซีรัมและเนื้อเยื่อนอกระบบประสาท เรียกว่า บิวทิริลโคลีนเอสเทอเรส

(buterylcholinesterase; BuChE) หรือ ซูโดโคลีนเอสเทอเรส (pseudo-cholinesterase) มีบทบาทในการกำจัดสารพิษและไฮโดรไลซ์อะซิทิลโคลีน ในปัจจุบันมีการใช้สารกำจัดศัตรูพืชจำนวนมากส่งผลให้เกิดการปนเปื้อนลงสู่แหล่งน้ำ และเกิดการสะสมในสัตว์น้ำ ดังนั้นจึงมีการประยุกต์ใช้อะวิทิลโคลีนโคลีนเอสเทอเรสบ่งชี้ถึงการปนเปื้อนของสารดังกล่าวในสัตว์น้ำ โดยเฉพาะอย่างยิ่งอะซิทิลโคลีนเอสเทอเรส (Anandhan *et al*., 2012, Menendez - Helman *et al*., 2012; Colovic *et al*., 2013)

อะซิทิลโคลีนเอสเทอเรสเป็นเอนไซม์ที่อยู่ในสมองของสัตว์ทำหน้าที่เร่งปฏิกิริยาการเปลี่ยน อะซิทิลโคลีนซึ่งเป็นสารสื่อประสาทไปเป็นโคลีนและอะซิเตท อะซิทิลโคลีนเอสเทอเรสเป็นตัวชี้วัดทางชีวภาพของการได้รับสารกำจัดศัตรูพืชมีรายงานไว้ในหอยเชอรี่และหอยขม (Thanomsit *et al*., 2017; Thanomsit *et al*., 2018) และในปลาชนิดต่าง ๆ มากมาย เช่น Durieux *et al*. (2011) ได้ศึกษาถึงปัจจัยทางธรรมชาติที่ส่งผลต่อกิจกรรมของอะซิทิลโคลีนเอสเทอเรส ในปลา Striped bass และ Menendez-Helman *et al*. (2012) ทำการศึกษาถึงพิษและผลกระทบของไกลโฟเสทในปลา *Cnesterodon decemmaclatus* เป็นต้น แต่ก็มีรายงานวิจัยหลายงานที่แสดงให้เห็นว่าอะซิทิลโคลีนเอสเทอเรสสามารถเปลี่ยนแปลงได้หากได้รับสัมผัสกับสารในกลุ่มโลหะหนัก เช่น ในรายงานการศึกษาผลของโลหะหนักตะกั่ว (Pb), แคดเมียม (Cd), แมงกานีส (Mn), และเหล็ก (Fe) ที่ปนเปื้อนในหอยโดยประเมินจากการแสดงออกของอะซิทิลโคลีนเอสเทอเรส (Larba & Soltani, 2014) และการศึกษาของ Jebali *et al*.(2006) ที่พบว่าแคดเมียมและมาลาไธออนมีผลต่อการแสดงออกของอะซิทิลโคลีนเอสเทอเรสในปลา *Seriola dumerilli* เป็นต้น การตรวจสอบอะซิทิลโคลีนเอสเทอเรสสามารถตรวจสอบได้หลายวิธี ได้แก่ เทคนิคทางด้านแอนติบอดี เช่น เทคนิค Immunohistochemistry (IHC) เทคนิค Enzyme Linked Immunosorbent Assay (ELISA) และเทคนิค Western blot เป็นต้น (Thanomsit *et al*., 2017; Thanomsit *et al*., 2018)

การวิจัยในครั้งนี้เป้าหมายเพื่อศึกษาการเพาะฟักของไข่หอยเชอรี่หลังจากสัมผัสกับ $CdCl_2$ ศึกษาถึงระดับความเป็นพิษของ $CdCl_2$ ที่ก่อให้เกิดการตายของหอยเชอรี่จำนวน 50% เมื่อได้รับสัมผัสสารเป็นเวลา 96 ชั่วโมง และการประยุกต์ใช้เทคนิคแอนติบอดีมาตรวจสอบการแสดงออกของอะซิทิลโคลีนเอสเทอเรสในหอยเชอรี่เพื่อบ่งชี้ถึงการได้รับสัมผัส $CdCl_2$

วิธีดำเนินการวิจัย

สารเคมีที่ใช้ในการศึกษา

สารเคมีที่ใช้ทดสอบคือ $CdCl_2$ สารเคมีทั่วไปที่ใช้ในการศึกษาเป็นชนิดเกรดวิเคราะห์ และสารเคมีที่ใช้ในการศึกษารูปแบบของโปรตีนคืออะคริลาไมด์ และการศึกษาอะซิทิลโคลีนเอสเทอเรสสารเคมีที่ใช้และแอนติบอดีที่ใช้จากบริษัท Raybiotech© และ บริษัท Bio-Rad

สัตว์ทดลอง

ในการศึกษาครั้งนี้นำไข่หอยเชอรี่และหอยเชอรี่จากสำนักงานประมงจังหวัดสุรินทร์มาใช้ในการศึกษา โดยหอยเชอรี่ที่นำมาใช้เป็นหอยเชอรี่ขนาดโตเต็มวัยที่มีความยาวเฉลี่ย 4.1±1.1 เซนติเมตร ความกว้างเฉลี่ย 2.9±0.4 เซนติเมตร และน้ำหนักเฉลี่ย 22.66±2.3 กรัม นำมาปรับสภาพในบ่อคอนกรีตขนาด 200 ลิตรเป็นเวลา 7 วันก่อนทำการศึกษา

การศึกษาความเป็นพิษของ $CdCl_2$ ต่ออัตราการตายของหอยเชอรี่

การทดสอบความเป็นพิษใช้หอยเชอรี่จำนวน 16 ตัว มาใส่ในโหลแก้ว ที่มีความเข้มข้นของ $CdCl_2$ 0, 0.50, 1.00, 1.50, 2.00 และ 2.50 mg/L หลังจากนั้นตรวจสอบการตายที่เวลา 24, 48, 72 และ 96 ชั่วโมง คำนวณเปอร์เซ็นต์การตายสะสม และหาระดับความเป็นพิษที่ก่อให้เกิดการตายของหอยเชอรี่จำนวน 50% (LC_{50}) ที่เวลา 96 ชั่วโมง โดยใช้การวิเคราะห์แบบโพรบิท (Probit analysis)

การศึกษาเปอร์เซ็นต์อัตราการฟักของไข่หอยเชอรี่และการศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาของไข่หอยเชอรี่

การศึกษาเปอร์เซ็นต์อัตราการฟักของหอยเชอรี่ นำไข่หอยเชอรี่ระยะแรกเริ่มของการวางไข่ (ฝักไข่สีชมพูเข้ม) มาสัมผัสกับสารโลหะหนัก คือ $CdCl_2$ ที่ความเข้มข้น 0, 0.05, 0.10, 0.20, 0.30, 0.40 mg/L เปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม โดยในการศึกษาถึงเปอร์เซ็นต์การเพาะฟักนี้ไข่หอยเชอรี่ถูกนำมาวางบนจานแก้วเพาะเชื้อและเตรียมน้ำที่มี $CdCl_2$ ปริมาตรของน้ำคือ 40 ml ลงไปในจานเพาะเชื้อ ทำการศึกษาทั้งหมด 6 ซ้ำ ตรวจสอบการฟักของไข่ทุก ๆ 24 ชั่วโมง แล้วเปรียบเทียบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยของเปอร์เซ็นต์การฟักไข่จากแต่ละชุดการทดลองด้วยการวิเคราะห์ความแปรปรวนแบบปัจจัยเดียว (One Way Aanalysis of Variance ; ANOVA) ที่ระดับความเชื่อมั่น 95% โดยใช้โปรแกรม Minitab 18 สำหรับการศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาของไข่หอยเชอรี่นั้นทำการตรวจสอบภายในกล้องจุลทรรศน์ที่กำลังขยาย 4 เท่า ทำการสุ่มไข่ที่มีการฟักครั้งละ 100 ฟอง จำนวน 3 ซ้ำ เพื่อประเมินลักษณะของไข่และตัวอ่อนที่ผิดปกติหลังจากที่ได้สัมผัสกับ $CdCl_2$ วิเคราะห์ความแปรปรวนแบบปัจจัยเดียว (One Way Aanalysis of Variance ; ANOVA) ที่ระดับความเชื่อมั่น 95% โดยใช้โปรแกรม Minitab 18 เช่นเดียวกับการศึกษาเปอร์เซ็นต์การฟักของไข่หอยเชอรี่

การสกัดหอยเชอรี่เพื่อศึกษารูปแบบของโปรตีนการหาปริมาณโปรตีน

การศึกษารูปแบบของโปรตีนด้วยการนำกล้ามเนื้อหอยเชอรี่ทั้งที่ได้รับสัมผัสกับ $CdCl_2$ ทั้งระดับที่ไม่ก่อให้เกิดการตาย ระดับที่ก่อให้เกิดการตายและชุดควบคุม มาสกัดโปรตีนโดยดัดแปลงจากจากวิธีการของ Thanomsit *et al.* (2017) โดยหอยเชอรี่นำมาล้างให้สะอาด หลังจากนั้นแกะเปลือก และนำเฉพาะบริเวณส่วนหัวและเท้ามาบดให้ละเอียดและเติม ทริสไฮโดรคลอไรด์บัฟเฟอร์ (Tris-HCl) ที่มีความเข้มข้น 0.02 M pH 7.2 และมีสารละลาย Phenylmethylsulfonyl fluoride (PMSF) เป็นส่วนประกอบโดยอัตราส่วนที่ใช้คือเนื้อเยื่อ 1 กรัม ต่อฟอสเฟตบัฟเฟอร์ 1.5 ml นำไปปั่นเหวี่ยงที่อุณหภูมิ 4°C ความเร็ว 3,500 รอบ/นาที เป็นเวลา 1 ชั่วโมง นำส่วนใสมาใช้ในการวิเคราะห์ปริมาณโปรตีนเปรียบเทียบกับ Bovine serum albumin (BSA)

การวัดปริมาณโปรตีน

นำโปรตีนมาตรฐาน BSA มาเจือจางให้มีปริมาณโปรตีน 0.03125, 0.0625, 0.25, 0.5 และ 1 mg/ml ปริมาณ 0.5 ml นำตัวอย่างโปรตีนที่สกัดได้จากไข่และจากหอยเชอรี่ที่ต้องการวัดปริมาณโปรตีนมาเจือจางตัวอย่างด้วยน้ำกลั่น 1:10 เท่า นำสารละลาย BSA และตัวอย่างโปรตีนจากไข่หอยเชอรี่และจากหอยเชอรี่ ตัวอย่างละ 10 ไมโครลิตร 2 ซ้ำ เติมสารละลาย Dye Reagent เจือจาง ที่ปริมาตร 200 ไมโครลิตร ทุกหลุม ผสมให้เข้ากัน ตั้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 5 นาที นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 595 นาโนเมตร บันทึกค่าการดูดกลืนแสงของสารละลาย BSA ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ มาสร้างกราฟมาตรฐานระหว่างปริมาณ BSA กับค่าการดูดกลืนแสง และนำค่าการดูดกลืนแสงของตัวอย่างมาเปรียบเทียบกับโปรตีน

จากกราฟมาตรฐาน การศึกษาปริมาณโปรตีนในหอยเชอรี่กลุ่มที่รับสัมผัส $CdCl_2$ เปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุมโดยใช้สถิติ T-test ในการวิเคราะห์ ($p< 0.05$) ที่ระดับความเชื่อมั่น 95% โดยใช้โปรแกรม Minitab 18

การศึกษารูปแบบของโปรตีนที่พบในหอยเชอรี่โดยใช้เทคนิค โซเดียมโดดีคริลซัลเฟต เจล อิเลคโทรโฟรีซีส Sodium Dodecyl Polycrymind Gel electrophoresis (SDS-PAGE)

เตรียมส่วนผสมของสารละลายอะคริลาไมด์ (acrylamide) ให้ separating gel มีความเข้มข้น 10% (H_2O 4.85 ml, 30% acrylamide mix 3.35 ml, 1.5 M Tris (pH 8.8) 1.65 ml, 10% SDS 100 µl, TEMED 3.5 µl) เทสารละลายอะคริลาไมด์ลงในช่องวางระหว่างแผ่นกระจกของชุดอิเลคโทรโฟเรซีสให้เหลือส่วนของ stacking gel ไว้ประมาณ 1 เซนติเมตร เติมน้ำกลั่นลงบนเจลเพื่อป้องกันการเกิดปฏิกิริยาโพลีเมอไรเซชั่น แล้วทิ้งไว้ให้เจลแข็งตัวประมาณ 30 นาที เตรียมส่วนผสม stacking gel 4% (H_2O 3.05 ml, 30% acrylamide mix 670 µl, 1.5 M Tris (pH 6.8) 1.25 ml, 10% SDS 50 µl, 10% APS 60 µl, TEMED 5 µl) วางซี่หวีลงในช่องกระจกเพื่อให้เกิดเป็นช่องเติมตัวอย่าง เทส่วนผสมของ stacking Gel ลงบน separating Gel ทิ้งไว้ให้เจลแข็งตัวประมาณ 20 นาที แล้วประกอบเจลลงในชุดอิเลคโทรโฟเรซีส เติมสารละลาย tank buffer ให้ท่วมช่องเติมตัวอย่าง ดึงหวีออกแล้วเติมตัวอย่างที่ผสมกับ 2X buffer และต้มในน้ำเดือน 5 นาทีแล้วมาใส่ในช่องเติมตัวอย่างแต่ละช่องปริมาตร 10 µl (ปริมาณโปรตีนเท่ากับ 80 µg) ใช้ไฟฟ้าที่ 120 โวลต์ จนกระทั่งสังเกตว่าสีของ bromophenol Blue ปล่อยให้แถบสีเคลื่อนที่ลงไปจนเกือบถึงปลายสุดของแผ่นเจล นำแผ่นเจลออกจากชุดกระจก ตัดส่วนของแผ่นเจลที่เป็น stacking Gel ออก นำเป็นไปย้อมสี 0.1 % Coomassie brilliant blue R-250 เป็นเวลา 2 ชั่วโมง ล้างสีส่วนที่ไม่ต้องการออกด้วยน้ำยาล้าง จากนั้นล้างสีออกด้วย destaining solution I และ destaining solution II จนกระทั่งเห็นแถบสีของโปรตีนชัดเจนแต่เนื้อเจลค่อนข้างใส

การศึกษาแสดงออกของอะซิทิลโคลีนเอสเทอเรสด้วยเทคนิคดอทบลอท

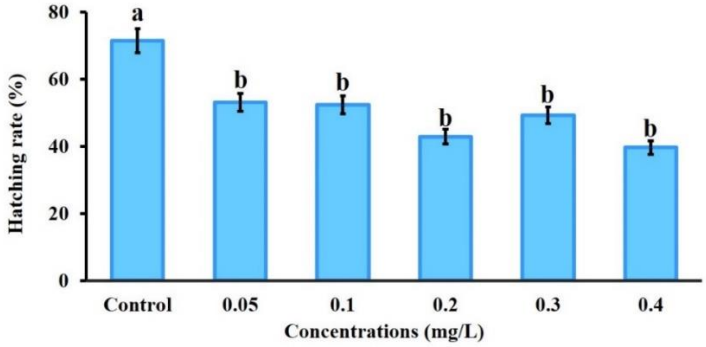
เตรียมตัวอย่างให้มีความเข้มข้นของโปรตีนเท่ากับ 40, 20, 10, 5, 2.5, 1.25, 0.625, 0.312, 0.156 และ 0.078 µg/µl หยดตัวอย่าง 1 µl ลงบนกระดาษไนโตรเซลลูโลส ทิ้งไว้ให้แห้งที่อุณหภูมิห้อง จากนั้นนำมาแช่ใน 5% ของนมพร่องมันเนยใน PBS เป็นเวลา 1 ชั่วโมง ล้างออกด้วย PBS/0.5% Tween 20 ครั้งละ 5 นาที จำนวน 3 ครั้ง จากนั้นบ่มในแอนติบอดีที่จำเพาะต่ออะซิทิลโคลีนเอสเทอเรส (PAb-AChE ระดับการเจือจาง 1:200) นาน 12 ชั่วโมง ล้างออกด้วย PBS/0.5%Tween 20 ครั้งละ 5 นาที จำนวน 3 ครั้ง นำกระดาษไนโตรเซลลูโลสไปแช่ใน Secondary antibody (GAR-HRP) ที่ระดับความเจือจาง 1:1,000 ทิ้งไว้ข้ามคืนที่อุณหภูมิ 4 °C ล้างโปรตีนส่วนเกินออกด้วยสารละลาย PBS/0.5%Tween 20 ครั้งละ 5 นาที จำนวน 3 ครั้ง เป็นเวลา 5 นาที และนำกระดาษไนโตรเซลลูโลสมาทำให้เกิดสีปฏิกิริยาในสารละลายสับสเตรท (0.03% 3, 3'-diaminobenzidine tetrahydrochloride (DAB), 0.06% H_2O_2 และ 0.05% $CoCl_2$ ใน 0.15 M PBS, pH = 7.4) และบันทึกผลของจุดโปรตีนสีน้ำตาลเทาที่เกิดขึ้นบนกระดาษไนโตรเซลลูโลส

ผลการวิจัย

การเพาะฟักของไข่หอยเชอรี่และลักษณะทางสัณฐานวิทยา

เมื่อไข่หอยเชอรี่ได้รับสัมผัสกับ $CdCl_2$ ที่ระดับความเข้มข้นต่างๆ คือ 0.05, 0.10, 0.20, 0.30 และ 0.40 mg/L พบว่าอัตราการเพาะฟักของทุกความเข้มข้นจะเกิดขึ้นต่ำกว่ากลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.0.5$) โดยการเพาะฟัก

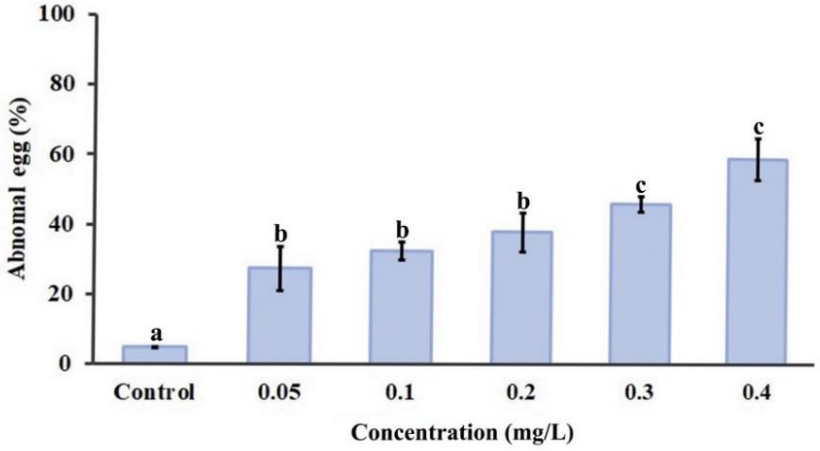
ครั้งแรกจะเกิดขึ้นเมื่อไข่หอยเชอรี่ได้รับสัมผัสสารประมาณ 5 วัน โดยเมื่อทำการประเมินการเพาะฟัก พบว่า การเพาะฟักของไข่หอยเชอรี่ในชุดควบคุม คิดเป็น 71.44±10.36% ส่วนไข่หอยเชอรี่ที่ได้รับสัมผัส $CdCl_2$ ความเข้มข้น 0.05, 0.10, 0.20, 0.30 และ 0.40 mg/L มีอัตราการเพาะฟักประมาณ เท่ากับ 53.14±41.84%, 52.34±18.74%, 42.86±32.54%, 49.22±27.74% และ 39.61±14.81% ตามลำดับ (ภาพที่ 1)



ภาพที่ 1 การเพาะฟักของไข่หอยเชอรี่หลังจากที่สัมผัสกับ CdCl2 ความเข้มข้น 0.05, 0.10, 0.20, 0.30 และ 0.40 mg/L เปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม อักษรภาษาอังกฤษ หมายถึง แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติกลับกลุ่มควบคุม ($p<0.05$)

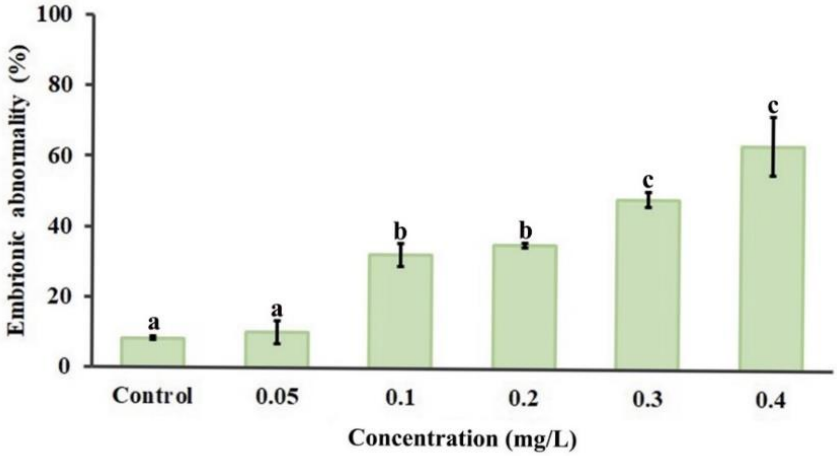
<u>การศึกษาการเปลี่ยนแปลงลักษณะสัณฐานวิทยาของไข่หอยเชอรี่เมื่อได้รับสัมผัส $CdCl_2$</u>

หลังจากทำการศึกษาถึงการเพาะฟักของไข่หอยเชอรี่เมื่อรับสัมผัส $CdCl_2$ ในการศึกษาครั้งนี้ได้ทำการประเมินถึงการเปลี่ยนแปลงทางสัณฐานวิทยาของไข่หอยเชอรี่ (ภาพที่ 2-8) ซึ่งจากการศึกษาพบว่าการเปลี่ยนแปลงไข่หอยเชอรี่หลังจากสัมผัสกับ $CdCl_2$ ที่ระดับความเข้มข้นต่าง ๆ คือ 0.05, 0.10, 0.20, 0.30 และ 0.40 mg/L เปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม มีการเปลี่ยนแปลงของรูปร่างของไข่และลักษณะของไข่ที่ผิดปกติ โดยความผิดปกติจะพบเพิ่มขึ้นตามระดับความเข้มข้นของ $CdCl_2$ ซึ่งไข่ที่ได้รับสัมผัส ที่ระดับความเข้มข้น 0.05, 0.10 และ 0.20 mg/L จะแตกต่างจากกลุ่มที่ได้รับสัมผัสกับ $CdCl_2$ ที่ระดับความเข้มข้น 0.30 และ 0.40 mg/L และแตกต่างจากกลุ่มควบคุม ลักษณะสัณฐานวิทยาของไข่ที่ผิดปกติในชุดควบคุมและชุดที่ได้รับสัมผัสกับ $CdCl_2$ ที่ความเข้มข้น 0.05, 0.10, 0.20, 0.30 และ 0.40 mg/L มีค่าเท่ากับ 4.80±0.28%, 27.68±6.29%, 33.10±2.66%, 38.83±5.72%, 47.34±2.21% และ 61.12±6.13% (ภาพที่ 2 และภาพที่ 4-8)

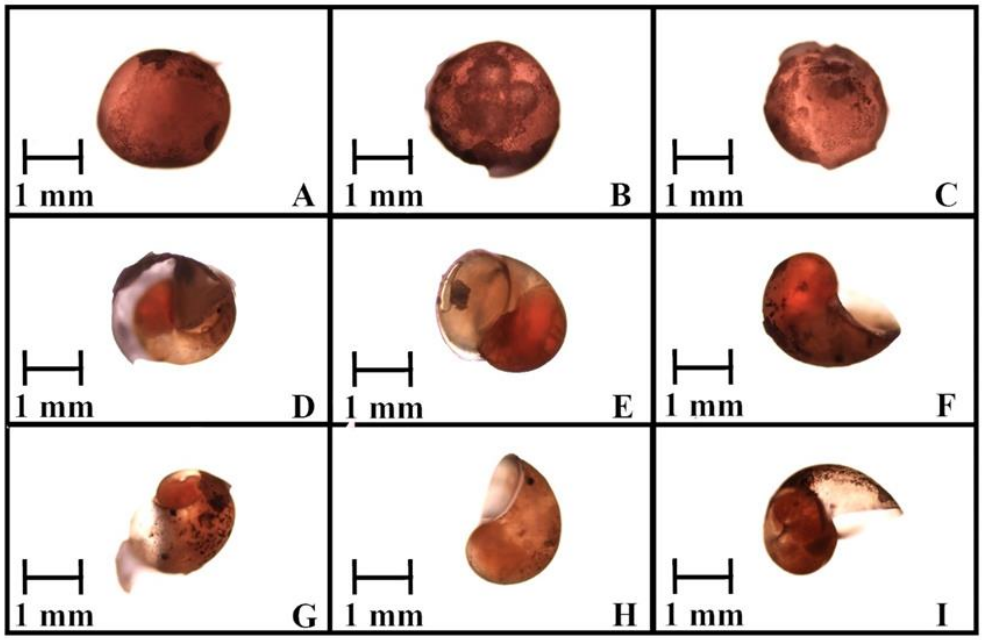


ภาพที่ 2 การแสดงออกของไข่หอยเชอรี่ที่ผิดปกติเมื่อสัมผัสกับ $CdCl_2$ ความเข้มข้น 0.05, 0.10, 0.20, 0.30 และ 0.40 mg/L เปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม อักษรภาษาอังกฤษหมายถึงแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.05$)

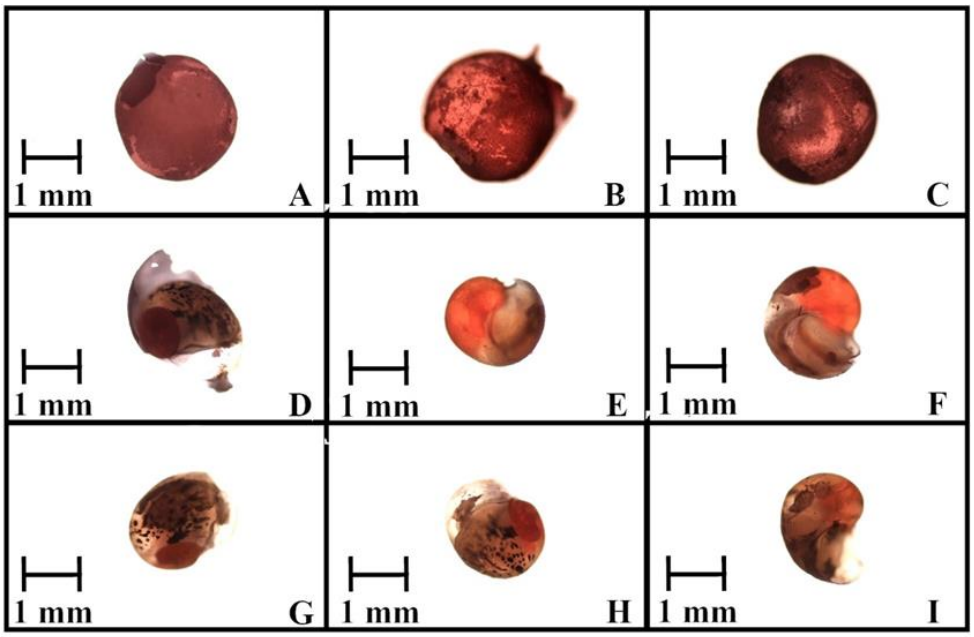
ยิ่งไปกว่านั้นในการศึกษาครั้งนี้ยังทำการประเมินถึงลักษณะของตัวอ่อนที่ผิดปกติด้วย (ภาพที่4-9) โดยพบว่าความเข้มข้นมีผลต่อความผิดปกติของตัวอ่อนโดยเพิ่มขึ้นตามความเข้มข้นที่ได้รับสัมผัสและแตกต่างจากกลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.05$) (ภาพที่ 3) โดยลักษณะของตัวอ่อนที่ผิดปกติที่เกิดจากไข่ที่ได้รับสัมผัสกับ $CdCl_2$ ความเข้มข้น 0.05, 0.10, 0.20, 0.30 และ 0.40 mg/L มีค่าประมาณ 10.23±3.30%, 32.38±3.39%, 35.29±0.54%, 48.42±2.14%, 63.83±8.42% ส่วนในชุดควบคุมนั้นลักษณะของตัวอ่อนที่ผิดปกติคิดเป็น 8.30±0.57%



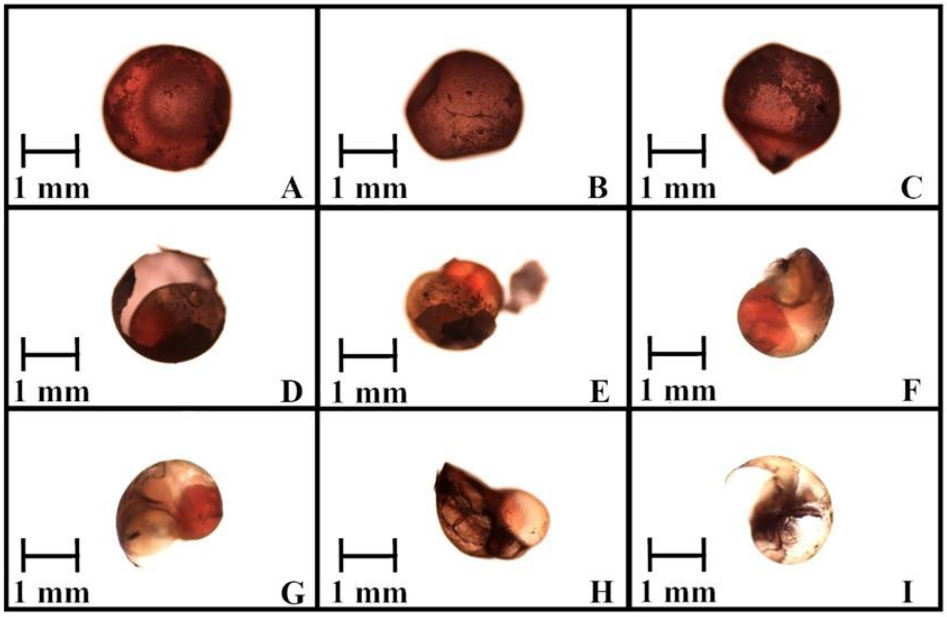
ภาพที่ 3 การแสดงออกของตัวอ่อนของหอยเชอรี่ที่ผิดปกติเมื่อสัมผัสกับ $CdCl_2$ความเข้มข้น 0.05, 0.10, 0.20, 0.30 และ 0.40 mg/L เปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม อักษรภาษาอังกฤษหมายถึงแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.05$)



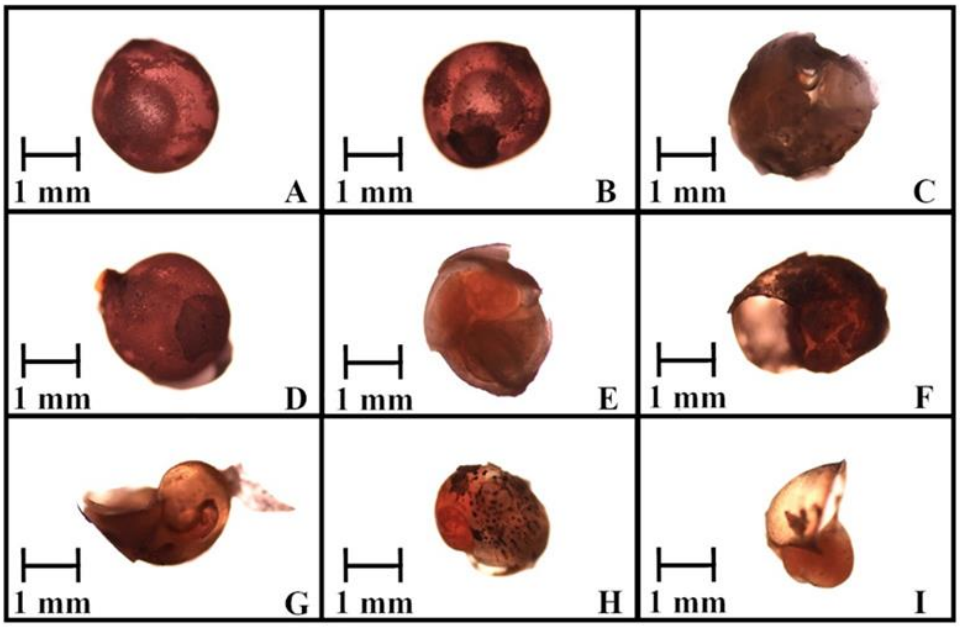
ภาพที่ 4 การพัฒนาการของไข่หอยเชอรี่ในกลุ่มควบคุม กำลังขยาย 4 เท่า



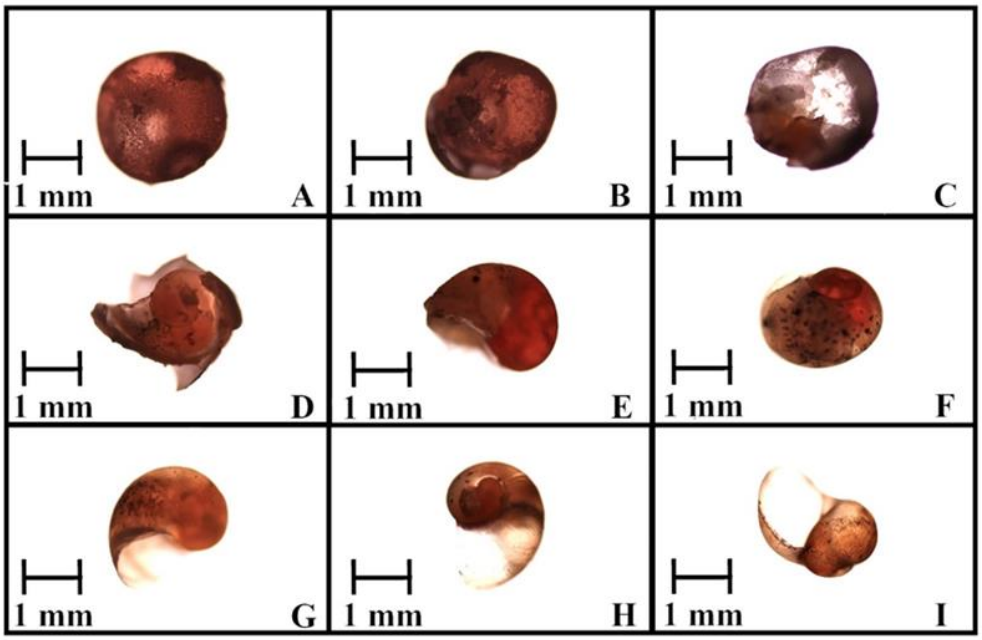
ภาพที่ 5 การพัฒนาการของไข่หอยเชอรี่ในกลุ่มที่ได้รับสัมผัสกับ $CdCl_2$ ความเข้มข้น 0.05 mg/L กำลังขยาย 4 เท่า



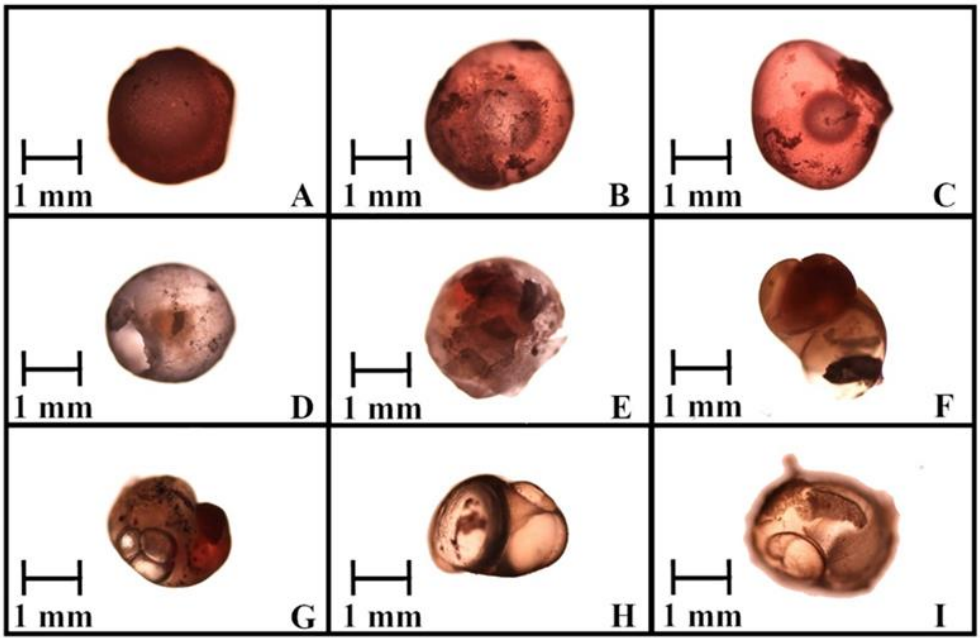
ภาพที่ 6 การพัฒนาการของไข่หอยเชอรี่ในกลุ่มที่ได้รับสัมผัสกับ $CdCl_2$ ความเข้มข้น 0.10 mg/L กำลังขยาย 4 เท่า



ภาพที่ 7 การพัฒนาการของไข่หอยเชอรี่ในกลุ่มที่ได้รับสัมผัสกับ $CdCl_2$ ความเข้มข้น 0.20 mg/L กำลังขยาย 4 เท่า



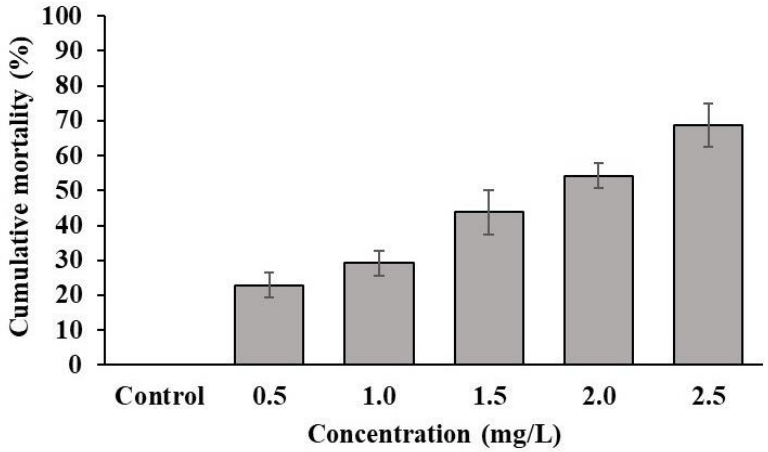
ภาพที่ 8 การพัฒนาการของไข่หอยเชอรี่ในกลุ่มที่ได้รับสัมผัสกับ $CdCl_2$ ความเข้มข้น 0.10 mg/L กำลังขยาย 4 เท่า



ภาพที่ 9 การพัฒนาการของไข่หอยเชอรี่ในกลุ่มที่ได้รับสัมผัสกับ $CdCl_2$ ความเข้มข้น 0.40 mg/L กำลังขยาย 4 เท่า

การศึกษาความเป็นพิษของ $CdCl_2$

การศึกษาถึงความเป็นพิษของ $CdCl_2$ ต่อการตายของหอยเชอรี่ พบว่าความเป็นพิษของ $CdCl_2$ จะเพิ่มตามระดับความเข้มข้นที่ได้รับสัมผัส โดยที่เวลา 96 ชั่วโมง ที่ระดับความเข้มข้น 0.50, 1.00, 1.50, 2.00 และ 2.50 mg/L พบว่า มีการตายสะสมเป็น 22.92±3.61%, 29.17±3.61%, 43.75±6.25%, 54.17±3.61% และ 68.75±6.25% ตามลำดับ (ภาพที่ 10) และเมื่อทำการวิเคราะห์โพรบิท พบว่าที่เวลา 96 ชั่วโมงค่ามีค่า LC_{50} เท่ากับ 1.7 (1.7 - 1.88) mg/L

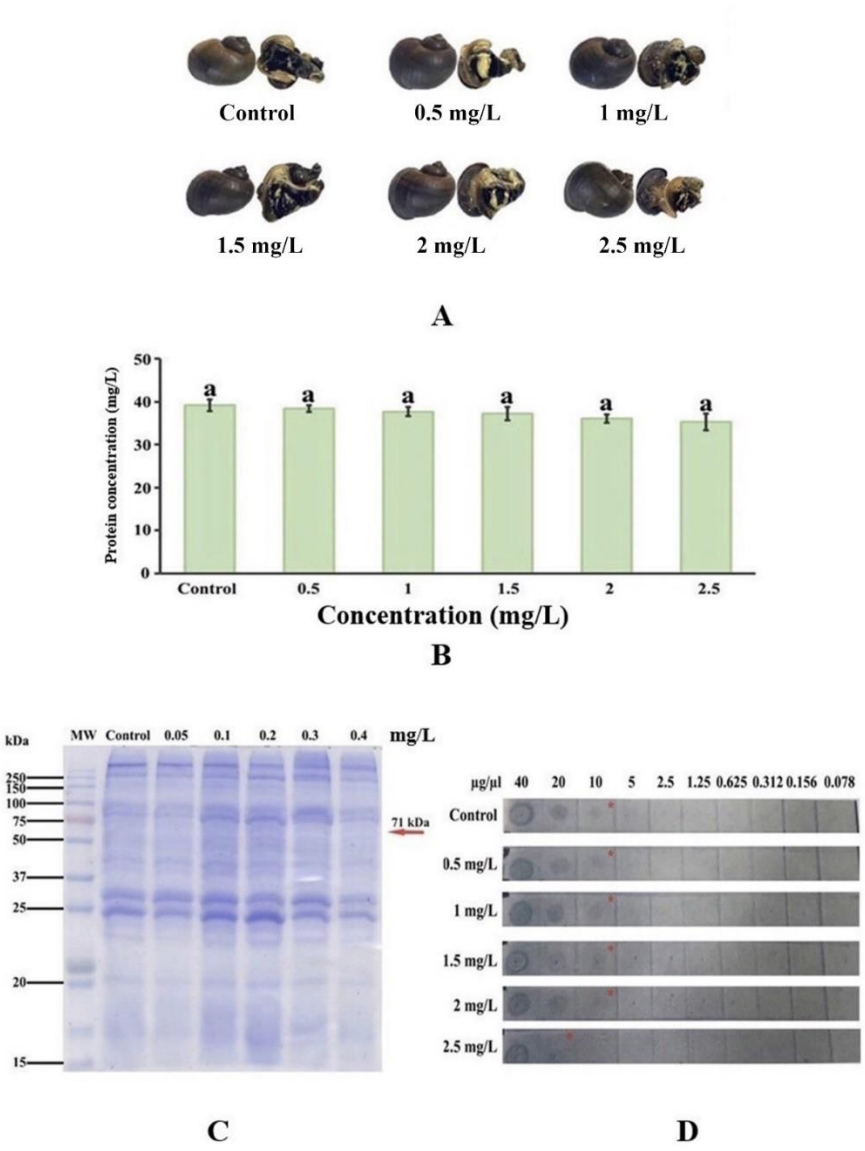


ภาพที่ 10 อัตราการตายสะสมของหอยเชอรี่เมื่อสัมผัสกับ $CdCl_2$ เป็นเวลา 96 ชั่วโมง ที่ระดับความเข้มข้น 0 (control), 0.50, 1.00, 1.50, 2.00 และ 2.50 mg/L

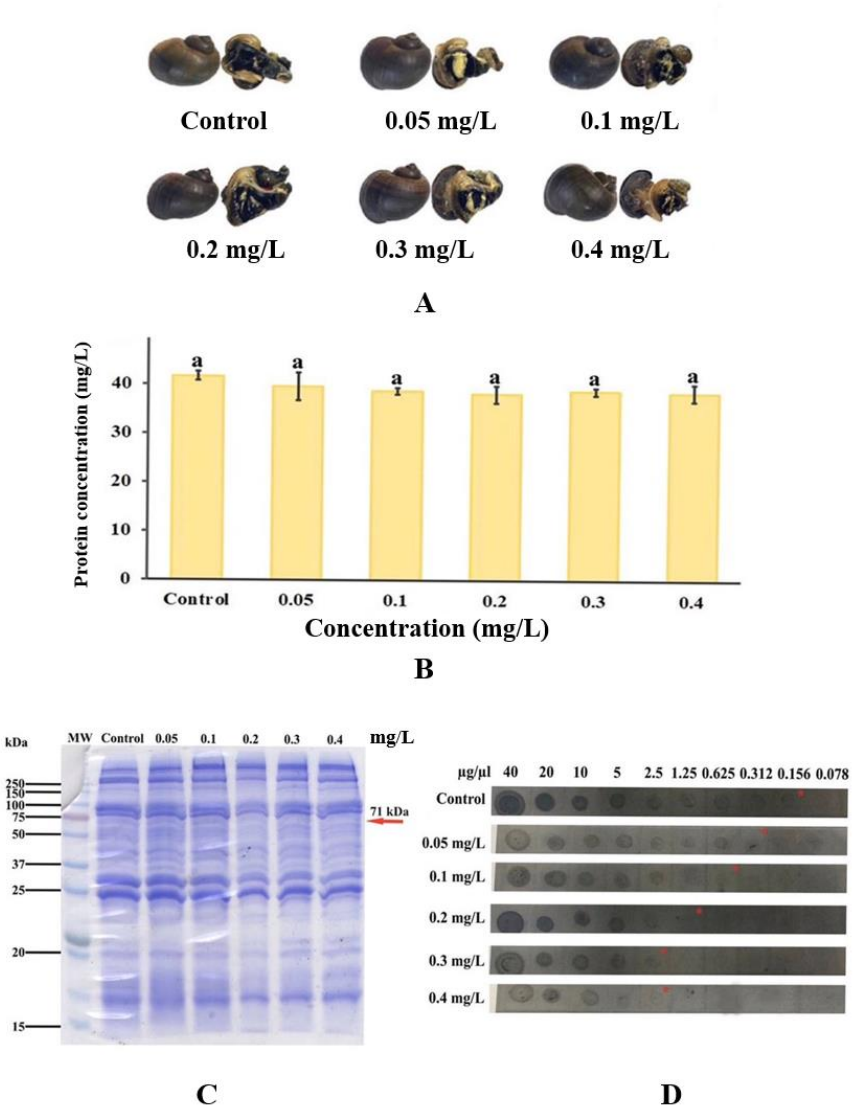
การศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยา รูปแบบของโปรตีน ปริมาณโปรตีน และการแสดงออกของอะซิทิลโคลีนเอสเทอเรส หลังจากที่หอยเชอรี่สัมผัสกับ $CdCl_2$

หอยเชอรี่ถูกนำมาศึกษาถึงลักษณะสัณฐานวิทยาหลังจากที่ได้รับสัมผัสกับ $CdCl_2$ ในระดับความเข้มข้นที่ก่อให้เกิดการตาย คือ 0.50 , 1.00, 1.50, 2.00 และ 2.50 mg/L เปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม พบว่า ลักษณะของเนื้อเยื่อ และสีไม่มีความแตกต่างกัน (ภาพที่ 11 A) และเมื่อนำหอยเชอรี่ไปสกัดและวัดปริมาณโปรตีนทั้งหมด พบว่าไม่มีความแตกต่างกันในทุกชุดการทดลอง ($p>0.05$) (ภาพที่ 11 B) รูปแบบของโปรตีนที่พบมีแนวโน้มที่จะลดลงตามระดับความเข้มข้นของ $CdCl_2$ ที่เพิ่มขึ้น อะซิทิลโคลีนเอสเทอเรส พบมี 1 isoform ที่มีขนาด 71 kDa (ภาพที่ 11 C) และเมื่อศึกษาถึงการแสดงออกของอะซิทิลโคลีนเอสเทอเรสโดยใช้เทคนิคดอทบลอท พบว่า อะซิทิลโคลีนเอสเทอเรสจะลดลง และมีขีดจำกัดของการตรวจสอบใกล้เคียงกันเมื่อหอยเชอรี่ได้รับสัมผัส $CdCl_2$ เป็นเวลา 96 ชั่วโมงในกลุ่มควบคุม กลุ่มหอยเชอรี่ได้รับสัมผัส $CdCl_2$ 0.50, 1.00, 1.50, และ 2.00 mg/L มีขีดจำกัดของการตรวจสอบ คือ 10 µg/µl ส่วนในระดับความเข้มข้นสูงสุด คือ 2.50 mg/L ขีดจำกัดของการตรวจสอบ คือ 20 µg/µl (ภาพที่ 11 D)

การศึกษาครั้งนี้ยังศึกษาถึงผลกระทบและความเป็นพิษของ $CdCl_2$ ในระดับที่ไม่ก่อให้เกิดการตายด้วย คือ ศึกษาที่ระดับความเข้มข้น 0, 0.50, 0.10, 0.20, 0.30 และ 0.40 mg/L เปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุมที่ไม่ได้รับสัมผัส ซึ่งจากการศึกษาพบว่าลักษณะสัณฐานวิทยาไม่มีความแตกต่างกันในทุกกลุ่มที่ทำการศึกษา (ภาพที่ 12 A) และเมื่อศึกษาถึงปริมาณโปรตีนทั้งหมดพบว่า ไม่มีความแตกต่างกันในทุกกลุ่มที่ทำการศึกษาเช่นเดียวกันกับการศึกษาผลของ $CdCl_2$ ในระดับที่ก่อให้เกิดการตาย (lethal concentration) ($p>0.05$) (ภาพที่ 12 B) และยิ่งไปกว่านั้นเมื่อศึกษาถึงรูปแบบของโปรตีนพบว่าก็ไม่มีความแตกต่างกันอะซิทิลโคลีนเอสเทอเรสที่พบซึ่งมี 1 isoform ที่มีขนาด 71 kDa (ภาพที่ 12 C) การแสดงออกของอะซิทิลโคลีนเอสเทอเรสในหอยเชอรี่ที่ได้รับสัมผัสกับ $CdCl_2$ ในระดับที่ไม่ก่อให้เกิดการตาย พบว่า ขีดจำกัดของการตรวจสอบในกลุ่มควบคุมกลุ่มที่ได้รับสัมผัสกับ $CdCl_2$ ความเข้มข้น 0.05, 0.10, 0.20, 0.30 และ 0.40 mg/L มีค่าประมาณ 0.078, 0.312, 0.625, 1.25, 2.5 และ 5 µg/µl ตามลำดับ (ภาพที่ 12 D)



ภาพที่ 11 (A) ลักษณะสัณฐานวิทยาของหอยเชอรี่ที่ได้รับสัมผัสกับ $CdCl_2$ ในระดับที่ก่อให้เกิดการตายคือความเข้มข้น 0 (control), 0.50, 1.00, 1.50, 2.00 และ 2.50 mg/L เป็นเวลา 96 ชั่วโมง (B) ปริมาณโปรตีนทั้งหมดที่สกัดจากหอยเชอรี่ (อักษรภาษาอังกฤษคือแตกต่างกับกลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ; $p<0.05$) (C) SDS-PAGE (10%) แสดงถึงรูปแบบของโปรตีนที่พบในหอยเชอรี่ที่สัมผัสกับ $CdCl_2$ เป็นเวลา 96 ชั่วโมง (D) การศึกษาการแสดงออกของอะซิทิลโคลีนเอสเทอเรสโดยใช้เทคนิคดอทบลอท (ระดับการเจือจางของ PAb-AChE 1: 200)



ภาพที่ 12 (A) ลักษณะสัณฐานวิทยาของหอยเชอรี่ที่ได้รับสัมผัสกับ $CdCl_2$ ในระดับที่ไม่ก่อให้เกิดการตาย (sublethal concentration) คือความเข้มข้น 0 (control), 0.50, 0.10, 0.20, 0.30 และ 0.40 mg/L เป็นเวลา 96 ชั่วโมง (B) ปริมาณโปรตีนทั้งหมดที่สกัดจากหอยเชอรี่ (อักษรภาษาอังกฤษคือแตกต่างกับกลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ; $p<0.05$) (C) SDS-PAGE (10%) แสดงถึงรูปแบบของโปรตีนที่พบในหอยเชอรี่ที่สัมผัสกับ $CdCl_2$ เป็นเวลา 96 ชั่วโมง (D) การศึกษาการแสดงออกของอะซิทิลโคลีนเอสเทอเรสโดยใช้เทคนิคดอทบลอท (ระดับการเจือจางของ PAb-AChE 1:200)

จากการศึกษาเปรียบเทียบลักษณะสัณฐานวิทยาของหอยเชอรี่ ที่ได้รับสัมผัสกับ $CdCl_2$ ทั้งในระดับที่ก่อให้เกิดการตายและระดับที่ไม่ก่อให้เกิดการตายพบว่า ลักษณะที่พบไม่มีความแตกต่างกัน ปริมาณโปรตีนรวมไม่แตกต่างกัน แต่อะซิทิลโคลีนเอสเทอเรสมีแนวโน้มที่จะลดลงเมื่อได้รับสัมผัสกับ $CdCl_2$ ในระดับความเข้มข้นที่สูงขึ้น

วิจารณ์ผลการวิจัย

โลหะหนักหลายชนิด เช่น แคดเมียม เกิดจากกิจกรรมของมนุษย์ที่สำคัญมีหลายแหล่งด้วยกัน เช่น ปุ๋ย และสารเคมีในการเกษตร โรงถลุงแร่ การเผาไหม้ของน้ำมัน โรงงานอุตสาหกรรม ของเหลือใช้จากโรงงานและชุมชน การรั่วซึมจากพื้นที่ฝังกลบของเสียต่าง ๆ หรือจากปุ๋ยคอก ที่สามารถเป็นแหล่งกำเนิดของโลหะหนักแล้วนำมาสู่การสะสมในดินในปริมาณที่แตกต่างกันไป เมื่อเปรียบเทียบกับปริมาณที่พบตามธรรมชาติ พบว่าจะมีความแตกต่างกันอย่างเห็นได้ชัด นับว่ากิจกรรมของมนุษย์เป็นแหล่งกำเนิดของโลหะหนักที่มีบทบาทสูงมาก โดยเฉพาะจากการปลดปล่อยจากโรงงาน อุตสาหกรรม น้ำเสียจากเหมืองแร่ กิจกรรมเหล่านี้สามารถนำมาซึ่งการแพร่กระจายสู่บรรยากาศและพื้นที่ดินได้ เป็นบริเวณกว้าง ถ้าหากนำวัสดุเหลือใช้ที่มีการปนเปื้อนของโลหะหนักมาใช้จะเท่ากับเป็นการส่งผลกระทบโดยตรง และเป็นวงกว้างมากยิ่งขึ้น ดังในปัจจุบันพบว่ามีการนำกากตะกอนน้ำเสียไปผลิตเป็นปุ๋ย ซึ่งทำให้เกิดการแพร่กระจายของโลหะหนักสู่พื้นที่การเกษตรโดยตรง ก่อให้เกิดความเสี่ยงต่อการปนเปื้อนในผลผลิตมากยิ่งขึ้น (Jaileung, 2019) สำหรับแคดเมียมนั้นจัดว่าเป็นสารพิษในลำดับที่เจ็ดในจำนวนสารพิษ 20 ชนิดที่พบว่ามีความรุนแรงและก่อให้เกิดปัญหาใหญ่โดยทั่วไปจะพบแคดเมียมในระดับความเข้มข้น 1 ส่วนในล้านส่วน (Neerattanapun, 2011)

หอยเชอรี่ถูกนำมาใช้ในการศึกษาครั้งนี้เนื่องจากหอยเชอรี่มีความทนทาน พบได้ทั่วไปและที่สำคัญคนนิยมมาบริโภค มีรายงานว่าไข่หอยเชอรี่ที่ฟักออกมาใหม่ ๆ จากร่างกายจะอ่อนนิ่มและมีเมือกติดทุกใบ แต่ละครั้งจะประกอบด้วยไข่จำนวน 388-3,000 ฟอง ไข่จะมีสีชมพูสดและซีดจางลงจนเกือบเป็นสีขาวภายใน 7-14 วัน อัตราการฟักของไข่ 77-91% ที่อุณหภูมิ 34 °C จากนั้นเปลือกไข่จะแตกออก ลูกหอยที่ออกมาใหม่ ๆ จะมีขนาดประมาณหัวเข็มหมุดเล็ก ๆ มีลักษณะทุกประการเหมือนกับหอยที่โตเต็มที่แล้ว เพียงแต่เปลือกของลูกหอยจะยังนิ่มอยู่ แต่ภายหลังออกจากไข่ประมาณ 2 วัน เปลือกก็จะแข็งสามารถกินอาหารได้ทันที ส่วนแม่หอยนั้นหลังจากที่วางไข่แล้ว ทิ้งช่วงห่างประมาณ 4-10 วัน ก็จะสามารถวางไข่ได้อีก และสามารถวางไข่ได้ตลอดทั้งปี แม่หอยสามารถวางไข่ได้จนถึงอายุ 2-3 ปี (Thanomsit *et al.*, 2019) สำหรับการศึกษาครั้งนี้พบว่าเมื่อนำไข่หอยเชอรี่มาทดสอบการเพาะฟักเมื่อสัมผัสกับ $CdCl_2$ พบว่า การเพาะฟักครั้งแรกจะเกิดขึ้นเมื่อไข่หอยเชอรี่ได้รับสัมผัสสารประมาณ 5-7 วัน Horn *et al.* (2008) รายงานว่า น้ำมีผลต่ออัตราการฟักของไข่หอยเชอรี่ ในสภาวะที่ไข่ไม่สัมผัสกับน้ำอัตราการพักจะสูงกว่ากลุ่มที่สัมผัสกับน้ำอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p< 0.05$) ดังนั้นในการศึกษาครั้งนี้จึงมีเป้าหมายถึงการศึกษาผลของ $CdCl_2$ ที่ละลายในน้ำต่อการเพาะฟักของไข่หอยเชอรี่และศึกษาถึงผลของ $CdCl_2$ ที่มีต่อลักษณะทางสัณฐานวิทยาของไข่หอยเชอรี่และระยะพัฒนาการของตัวอ่อน จากการศึกษา พบว่า $CdCl_2$ ส่งผลต่อการฟักของไข่หอยเชอรี่ โดยอัตราการเพาะฟักจะลดลงหลังจากที่ได้รับสัมผัส $CdCl_2$ ในระดับความเข้มข้นที่สูงขึ้นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม ($p<0.05$) ทั้งนี้อาจจะเนื่องมาจาก $CdCl_2$ มีความเป็นพิษสูงจึงส่งผลต่อการฟักตัวของไข่และทำให้ตัวอ่อนอยู่ในลักษณะที่ผิดปกติ ในปัจจุบันการศึกษาถึงผลของ $CdCl_2$ นั้นจะเป็นการศึกษาถึงปริมาณของ $CdCl_2$ หรือ

แคดเมียมที่สะสมอยู่ในเนื้อเยื่อหอย และการปนเปื้อนในสิ่งแวดล้อม เช่น ในน้ำและในดิน (Mclaren *et al.*, 2004; Weeraprapan *et al.*, 2015) แต่ข้อมูลในเรื่องของความเป็นพิษหรือการตกค้างของ $CdCl_2$ ในสิ่งแวดล้อมและส่งผลต่อการฟักของไข่หอยเชอรี่ รวมทั้งผลกระทบต่อการพัฒนาของตัวอ่อนยังมีอยู่น้อยมากจึงต้องมีการศึกษาเพิ่มเติมต่อไปโดยเฉพาะอย่างยิ่งในไข่หอยเชอรี่และหอยน้ำจืดต่าง ๆ

เมื่อไข่หอยเชอรี่ได้รับสัมผัสกับ $CdCl_2$ พบว่า $CdCl_2$ ส่งผลต่อการเพาะฟักของไข่หอยเชอรี่และลักษณะทางสัณฐานวิทยาคล้ายคลึงกับการศึกษาของ Thanomsit *et al*. (2019) ที่พบว่าลักษณะทางสัณฐานวิทยาเมื่อไข่หอยเชอรี่ได้รับสัมผัสสารเคมีทางการเกษตรจะเกิดการเปลี่ยนแปลงที่สำคัญ คือ ไข่มีลักษณะผิดปกติ โดยเปลือกไข่มีอาการผิดปกติ โดยการมีเปลือกที่บางมาก และการพัฒนาของตัวอ่อนผิดปกติ แต่ลักษณะการเปลี่ยนแปลงของแต่ละอาการที่ประเมินได้นั้นมีค่าไม่เกิน 10 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งอาจจะแตกต่างจากการศึกษาครั้งนี้ที่พบว่า $CdCl_2$ ส่งผลต่อการเปลี่ยนแปลงของไข่หอยสูงมากคือมีค่าประมาณ 10.01±2.8% - 49.27±6.15% ทั้งที่ไข่หอยเชอรี่นั้นมีระบบการป้องกันตัวเองจากศัตรูและสิ่งแวดล้อมต่าง ๆ โดยไข่หอยเชอรี่นั้นมีโปรตีนที่สำคัญคือ ลิโพโพรทีน (lipoprotein) เช่น เพอริไวเทลลิน 2 (perivitellin 2) และโอโวรูบิน (ovorubin) (Dreon *et al.*, 2013) และเมื่อศึกษาถึงการวิเคราะห์เรื่องหน้าที่ของ เพอริไวเทลลิน 2 และโอโวรูบิน พบว่าเป็นโปรตีนหลักที่มีความคงตัวสูง ทนทานต่อการถูกย่อยสลาย และทนทานต่อการเปลี่ยนแปลงในช่วง pH ค่อนข้างกว้างคือ 4-10 (Cadierno *et al.*, 2016) และยิ่งไปกว่านั้นในการศึกษาครั้งนี้ยังพบว่า $CdCl_2$ ส่งผลต่อการพัฒนาของตัวอ่อนของหอยเชอรี่สูงมากเช่นกัน ซึ่งทำให้เห็นได้ชัดถึงความเป็นพิษ

Piyatiratitivorakula & Boonchamoib (2008) ศึกษาผลของแคดเมียมในหอยน้ำจืด *Filopaludina martensi martensi* โดยค่า LC_{50} ที่เวลา 24, 48, 72 และ 96 ชั่วโมง คือ 27.76 (25.87, 33.67), 5.01 (3.08, 7.20), 3.96 (3.34, 4.81) และ 2.33 (2.02, 2.63) ตามลำดับ ซึ่งแตกต่างจากการศึกษาครั้งนี้ที่พบว่าเมื่อหอยเชอรี่ได้รับสัมผัสกับ $CdCl_2$ ค่า LC_{50} ที่เวลา 96 ชั่วโมงมีค่า 1.77 (1.71-1.83) ซึ่งในการศึกษาในหอยเชอรี่นี้ก็แตกต่างกับการศึกษาของ Shuhaimi-Othman *et al*. (2012) ที่พบว่าความเป็นพิษของแคดเมียม (LC_{50}) ที่มีผลต่อหอยน้ำจืด *Melanoides tuberculata* ที่เวลา 96 ชั่วโมงมีค่าประมาณ 0.56 (0.611) และแตกต่างจาการศึกษาของ Dhara *et al*. (2017) ที่ศึกษาถึงผลของแคดเมียมในหอยน้ำจืด *Lymnaea acuminata* (Lamarck) ซึ่งพบว่ามีค่า LC_{50} เป็น 9.66, 7.69, 6.26 และ 5.54 mg/L ที่เวลา 24, 48, 72 และ 96 ชั่วโมง ตามลำดับ

อะซิทิลโคลีนเอสเทอเรสและบิวทิริลโคลีนเอสเทอเรสเป็นเอนไซม์ที่พบในสัตว์ โดยเฉพาะในเนื้อเยื่อส่วนต่าง ๆ ของสัตว์ เช่น เม็ดเลือดแดงและเนื้อเยื่อสมองของสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม และยังมีรายงานว่าพบในแมลงต่าง ๆ อีกด้วย เอนไซม์โคลีนเอสเทอเรสสามารถสกัดได้จากสัตว์หลายชนิด เช่น นก ปลา และสัตว์เลื้อยคลาน เป็นต้น น้ำหนักโมเลกุล (molecular weight) ของเอนไซม์อะซิทิลโคลีนเอสเทอเรสและบิวทิริลโคลีนเอสเทอเรสมีค่าอยู่ประมาณ 50-500 กิโลดาลตัน (kDa) รูปร่างเป็นแบบก้อนกลม (globular) หรืออาจจะมีรูปแบบที่ไม่แน่นอน (asymmetric) โครงสร้างประกอบด้วยโพลิเมอร์ของตัวเร่งในหน่วยย่อย (catalytic subunit) มีขนาดตั้งแต่ 1 ถึง 12 หน่วยย่อย (subunit) ทำให้น้ำหนักโมเลกุลของเอนไซม์มีขนาดแตกต่างตามจำนวนของหน่วยย่อย (Clarke *et al.*, 1985) อะซิทิลโคลีนเอสเทอเรสถูกนำมาใช้ในการประเมินถึงการได้รับสัมผัสสารเคมีในหอยหลายชนิด เช่น Thanomsit *et al*. (2017) ศึกษาถึงอะซิทิลโคลีนเอสเทอเรสในหอยขมและหอยเชอรี่ทุกขนาด คือ

ขนาดเล็ก ขนาดกลาง และขนาดใหญ่ พบว่าการแสดงออกของอะซิทิลโคลีนเอสเทอเรสสูงกว่าชุดควบคุมอะซิทิลโคลีนเอสเทอเรสมีน้ำหนักโมเลกุล 71 kDa และ Thanomsit *et al*. (2018) ศึกษาการแสดงออกของอะซิทิลโคลีนเอสเทอเรสในไข่หอยเชอรี่และหอยเชอรี่ (*Pomacea canaliculata*) พบว่าไข่เป็นสีชมพูนั้นจะปรากฏแถบโปรตีนสอง 2 isoform ที่มีขนาด 71 kDa และ 66 kDa ส่วนในตัวหอยเชอรี่ที่นำมาสกัดพบว่าอะซิทิลโคลีนเอสเทอเรสมีน้ำหนักโมเลกุลประมาณ 71 kDa

Grara *et al*. (2012) รายงานว่าโลหะหนักส่งผลต่อการแสดงออกของอะซิทิลโคลีนเอสเทอเรสในหอย *Helix aspersa* ซึ่งจากการศึกษาพบว่า ปริมาณอะซิทิลโคลีนเอสเทอเรสจะลดลงเมื่อได้รับสัมผัสโลหะหนักในระดับความเข้มข้นสูง กล่าวคือ เมื่อหอย (*Helix aspersa*) ได้รับสัมผัสกับโลหะหนักปริมาณ 100, 500, 1000 และ 1500 µg/g การแสดงออกของอะซิทิลโคลีนเอสเทอเรสจะพบสูงสุดในกลุ่มควบคุม และลดลงต่ำสุดเมื่อหอยได้รับสัมผัสกับโลหะที่ระดับความเข้มข้นสูงสุดคือ 1500 µg/g และยังมีรายงานในหอยแมลงภู่ซึ่งเป็นหอย 2 ฝาถึงการศึกษาปริมาณอะซิทิลโคลีนเอสเทอเรสเพื่อใช้ในการประเมินถึงการได้รับสัมผัสโลหะหนัก โดยการประเมินจากกิจกรรมของเอนไซม์อะซิทิลโคลีนเอสเทอเรส ซึ่งจากการศึกษาพบว่ากิจกรรมของเอนไซม์ดังกล่าวไม่แตกต่างจากกลุ่มควบคุมเมื่อได้รับสัมผัสกับเหล็ก (Fe) และคอปเปอร์ (Cu) ตรงกันข้ามกับหอยแมลงภู่ที่ได้รับสัมผัสกับแคดเมียม (Cd) และตะกั่ว (Pb) เป็นเวลา 72 ชั่วโมง และ 12 ชั่วโมงที่พบว่าปริมาณอะซิทิลโคลีนเอสเทอเรส มีค่าสูงขึ้นกว่ากลุ่มควบคุมเมื่อได้รับสัมผัส ซึ่งแตกต่างกับการศึกษาในหอยเชอรี่ในครั้งนี้ที่พบว่าเมื่อหอยเชอรี่ที่ได้รับสัมผัส $CdCl_2$ มีแนวโน้มที่จะตรวจพบอะซิทิลโคลีนเอสเทอเรสลดลงเมื่อได้รับสัมผัสสารที่ระดับความเข้มข้นสูงมากขึ้น และ $CdCl_2$ ส่งผลต่ออัตราการเพาะฟักคือมีแนวโน้มลดลง รูปร่างและการพัฒนาของไข่หอยเชอรี่และหอยเชอรี่เปลี่ยนแปลงไปและก่อให้เกิดอัตราการตายที่สูงขึ้น การที่อะซิทิลโคลีนเอสเทอเรสที่ตรวจประเมินได้ในหอยเชอรี่แตกต่างจากในหอยแมลงภู่อาจจะเนื่องมาจากมีการตรวจสอบในสิ่งมีชีวิตต่างชนิดกัน ชนิดของสารและรูปแบบของสารที่ใช้ศึกษามีความแตกต่างกัน แต่ถึงอย่างไรก็ตามการแสดงออกของอะซิทิลลีนเอสเทอเรสในหอยเชอรี่ที่ทำการศึกษาในครั้งนี้มีความคล้ายคลึงกับการศึกษาการของ Mleiki *et al*. (2015) ที่ได้ทำการศึกษาถึงการแสดงออกของอะซิทิลโคลีนเอสเทอเรสในหอย *Canareus apertus* (Born, 1778) ที่ได้รับอาหารที่มีการปนเปื้อน Pb และ Cd จากการศึกษาพบว่าโลหะหนักทั้งสองชนิดคือ Pb และ Cd ส่งผลต่อการแสดงออกของอะซิทิลโคลีนเอสเทอเรสในเนื้อเยื่อโดยมีแนวโน้มที่ลดลงเมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุมเมื่อหอยได้รับสัมผัสสารในระยะเวลาสั้น ๆ แต่ถึงอย่างไรก็ตามระดับความเข้มข้นของโลหะหนักก็มีผลต่อการแสดงออกของอะซิทิลโคลีนเอสเทอเรสด้วย

สรุปผลการวิจัย

แคดเมียมคลอไรด์ ($CdCl_2$) ส่งผลต่อการเพาะฟักของไข่หอยเชอรี่ โดยในทุกกลุ่มของไข่หอยเชอรี่ที่ได้รับสัมผัสกับ $CdCl_2$ มีอัตราการเพาะฟักต่ำที่สุด คือ กลุ่มที่ได้รับ $CdCl_2$ 0.40 mg/L ลักษณะความผิดปกติที่ตรวจสอบได้เมื่อไข่ได้รับสัมผัสกับ $CdCl_2$ คือ พบว่า ที่ระดับของแคดเมียม 4.0 mg/L ส่งผลให้ไข่ของหอยเชอรี่มีความผิดปกติมากที่สุด (61.12%) และมีความผิดปกติของตัวอ่อนมากที่สุด (63.83%) และเกิดความผิดปกติของตัวอ่อน ยิ่งไปกว่านั้น $CdCl_2$ ก่อเกิดการตาย 50% (LC_{50}) ที่เวลา 96 ชม. ในหอยเชอรี่ขนาดกลางด้วย โดยค่า LC_{50}ที่คำนวณได้จากการวิเคราะห์โพรบิทคือ 1.25 (7.143 – 2.234) mg/L เมื่อตรวจสอบรูปแบบของอะซิทิลโคลีนเอสเทอเรส พบว่ามี 1 isoform ที่มีขนาด 71 kDa เมื่อศึกษาโดยใช้เทคนิค SDS-PAGE

การแสดงออกของอะซิทิลโคลีนเอสเทอเรส พบว่าจะลดลงตามระดับความเข้มข้นและระยะเวลาที่ได้รับสัมผัส $CdCl_2$ เทคนิคดอทบลอทสามารถนำมาประยุกต์ใช้ในการตรวจสอบการแสดงออกของอะซิทิลโคลีนเอสเทอเรสในหอยเชอรี่ได้จึงเป็นประโยชน์อย่างยิ่งที่จะนำไปประยุกต์ใช้ในการตรวจสอบโลหะหนัก เช่น แคดเมียมที่ปนเปื้อนในแหล่งน้ำและส่งผลกระทบต่อสัตว์น้ำ เช่น หอยชนิดต่าง ๆ ต่อไป

กิตติกรรมประกาศ

งานวิจัยนี้ได้รับการสนับสนุนจากสาขาวิชาประมง คณะเกษตรศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลอีสาน วิทยาเขตสุรินทร์

เอกสารอ้างอิง

Anandhan, R., Bhuyan, G., Kavitha, V., & Selvam, A., (2012). Studies on the acetylcholinesterase (AChE) activity of two freshwater teleost *Channa striatu*s and *Oreochromis massambicus* in reference to Kedilamriver, cuddalore district, Tamil Nadu. *Toxicology and Applied Pharmacology, 2* (4), 52-56.

Bainy, A. C. D., Gennari de Medeiros, M.H, Mascio, P. D. & de Almeida, E. A. (2006). In vivo effects of metals on the acetylcholinesterase activity of Perna perna mussel's digestive gland. *Biotermas, 19*(1), 35-39.

Cadierno, T., Ibarratxe-Antunano, I., & Hijazo-Gascón, A. (2016). Semantic categorization of placement verbs in L1 and L2 Danish and Spanish. *Language Learning*, *66*(1), 191–223.

Clarke, P. B.S., Schwartz, R. D., Paul, S. M., Pert, C. B., & Pert, A. (1985). Nicotinic Binding in Rat Brain: Autoradiographic Comparison of [3H] Acetylcholine, [3H] Nicotine, and ['251]-~-Bungarotoxin[1]. *The Journal of Neuroscience, 5*(5), 1307-1315.

Champasri, S., Kulkham, J., Vanichakul, K., Suksamai, P., & Vinaipreecha, P. (2018). Effect of Replacement Yellow Stripe Trevally Flesh by Golden Apple Snail Flesh for Sea Bass (*Lates calcarifer* (Bloch*)) Culture. Khon Kaen Agriculture Journal, 46* (Supply 1), 1054-1058. (in Thai)

Colović, M. B., Krstić, D. Z., Lazarević-Pašti, T. D., Bondžić, A. M. & Vasić, V. M. (2013). Acetylcholinesterase Inhibitors: Pharmacology and Toxicology. *Current Neuropharmacology, 11*, 315-335.

Dhara, K., Saha, N. C., & Maiti, A. K. (2017). Studies on acute and chronic toxicity of cadmium to freshwater snail *Lymnaea acuminata* (Lamarck) with special reference to behavioral and hematological changes. *Environmental Science and Pollution Research*, *1-9*.

Dreon, M., S., Frassa, M., v., Ceolin, M., Ituarte, S., Qiu, J., Sun, J., Fernandez, P., E. & Heras, H. (2013). Novel Animal Defenses Against Predation: A Snail Egg Neurotoxin Combining Lectin and Pore – Forming Chains That Resembles Plant Defense And Bacteria Attract Toxins. *PLUS /ONE,* 8*(5)*, e63782.

Durieux, J., Wolff, S., & Dillin, A. (2011).The cell-non-autonomous nature of electron transport chain-mediated longevity. *Cell*, *144*(1), 79-91.

Grara, N., Atailia, A., Boucenna, M., Khaldi, F., Berrebbah, H. & Djebar, M. R. (2012). Effects of heavy metals on the Snails (*Helix aspersa*) bioindicators of the environment pollution for human health. *International Conference on Applied Life Sciences*, *11-12*, 241-246.

Horn, K. C., Johnson, S. D., Boles, K. M., Moore, A., Siermann, E., & Gabler, C. A. (2008). Factors affecting hatching success of golden apple snail eggs: effects of water immersion and cannibalism. *Wetlands, 28*(2), 544-549.

Jaileung, S. (2019). Health impact from consuming fish contaminated with heavy metals, *Proceeding of 14th* Innovative way for research development into the community economy to stand (pp. 133-137). Pathum Thani: Western University. (in Thai)

Jebali, J., Banni, M., Guerbej, H., Almeida, E. A., Banaoui, A., & Boussetta, H. (2006). Effects of malathion and cadmium on acetylcholinesterase activity and metallothionein levels in the fish *Seriola dumerilli*. *Fish physiology biochemistry*, *13*, 1-4.

Larba, L. & Soltani, N. (2014). Use of the land snail *Helix aspersa* for monitoring heavy metal soil contamination in Northeast Algeria. *Environmental Monitoring and Assessment,* 186*(8)*, 498-4995.

Mclaren, R. G., Kanjanapa, K., Navasumrit, P., Gooneratne, R. S., & Ruchirawat, M. (2004). Cadmium in the water and sediments of the Chao phraya river and associated waterways, Bangkok, Thailand. *Water, Air, and Soil Pollution, 154*, 385–398.

Menėndez Helman, R., Ferrey, G. V., Santos Afonso, M., & Salibian, A. (2012). Glyphosate As an acetylcholinesterase inhibitor in *Cnesterodon decemmaculatus*. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology, 88*, 6-9.

Mleiki, A., Marigómez, I. & Trigui, N. (2015). Effects of Dietary Pb and Cd and their Combination on Acetyl Cholinesterase Activity in Digestive Gland and Foot of the Green Garden Snail, *Cantareus apertus* (Born, 1778). *International Journal of Environmental Research, 9*(3), 943-952.

Neerattanapun, L. (2011). Effect of Heavy Metals on Mollusk. *KKU Science Journal, 39(3)*, 375-386. (in Thai)

Piyatiratitivorakula, P. & Boonchamoib, P. (2008). Comparative toxicity of mercury and cadmium to thejuvenile freshwater snail, *Filopaludina martensi martensi*. *ScienceAsia*, *34*, 367-370.

Shuhaimi-Othman, M., Nur-Amalina, R. & Nadzifah, Y. (2012). Toxicity of Metals to a Freshwater Snail, *Melanoides tuberculata, The Scientific World Journal, 2012*, 1-10.

Tanee, S., Sangrattanakul, J., Seajonk, S. & Puycha, K. (2015). Effects of the Golden Apple Snail Supplemented Diet on Nursing Climbing Perch (*Anabas testudineus* Bloch). *Rajabhat Agriculture, 14* (1), 37-45. (in Thai)

Thanomsit, C., Maprajuab, A., Prasartkaew, W., Ocharoen, Y., Wattakornsiri, A., Nanuam, J., & Nanthanawat, P. (2017). Application of Acetylcholinesterase as biomarker for pesticide exposure to reduce health risk in consuming Pond snail and Golden apple snail. *Proceeding of 8th Innovation and Technology conferences* (pp. A221-A227). Surin: Rajamangala University of Technology Isan Surin Campus. (in Thai)

Thanomsit, C., Maprajub, A., Saowakoon, S., Prasatkaew, W., Ocharore, Y. Wattanakornsiri, A., Nanuam, J., & Nanthanawat, P. (2018). Acetylcholinesterase (AChE): Potential Biomarker for Evaluating Pesticide Exposure on Egg and Tissue of Golden Apple Snail (*Pomacea Canaliculata*) from Huai-Saneng Reservoir, Surin Province, Thailand. *Thai Journal of Agricurture Sci*ence, *51*(3), 104-117.

Thanomsit, C., Boonpok, L., Preabsenadee, T., Wattanakornsiri, A., Ocharoen, Y., Nanuam, J., Prasatkaew, W., & Nanthanawat, P. (2019). Hatching rate, morphological characteristic and alteration of golden apple snail's egg (*Pomacea canailculata*) after being exposed to agricultural chemicals. *Journal of Fisheries Technology Research*, *13*(1), 24-40. (in Thai)

Weeraprapan, P., Phalaraksh, C., Chantara, S. & Kawashima, M. (2015). Water Quality Monitoring and Cadmium Contamination in the Sediments of Mae Tao Stream, Mae Sot District, Tak Province, Thailand. *International Journal of Environmental Science and Development, 6*(2), 142-146.