พิษวิทยาของสารดีดีทีและกลไกการตอบสนองระดับชีวโมเลกุลของหอยนางรมปากจีบ (*Saccostrea cucullata*) ด้วยเทคนิคโปรตีโอมิกส์

สุภัททา เฉื่อยฉ่ำ

ดุษฎีนิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปรัชญาดุษฎีบัณฑิต
สาขาวิชาวิทยาศาสตร์สิ่งแวดล้อม
คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา
พฤศจิกายน 2564
ลิขสิทธิ์เป็นของมหาวิทยาลัยบูรพา

คณะกรรมการควบคุมดุษฎีนิพนธ์และคณะกรรมการสอบดุษฎีนิพนธ์ ได้พิจารณาดุษฎีนิพนธ์ของ สุภัททา เฉื่อยฉ่ำ ฉบับนี้แล้ว เห็นสมควรรับเป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปรัชญาดุษฎีบัณฑิต สาขาวิชาวิทยาศาสตร์สิ่งแวดล้อม ของมหาวิทยาลัยบูรพาได้

คณะกรรมการควบคุมดุษฎีนิพนธ์

.....อาจารย์ที่ปรึกษาหลัก
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.สุทิน กิ่งทอง)

.....อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม
(ดร.จันทรกานต์ ศรีสมทรัพย์)

คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์

.....ประธาน
(ดร.สิทธิรักษ์ รอยตระกูล)

.....กรรมการ
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.สุทิน กิ่งทอง)

.....กรรมการ
(ดร.จันทรกานต์ ศรีสมทรัพย์)

.....กรรมการ
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ถนอมศักดิ์ บุญภักดี)

คณะวิทยาศาสตร์อนุมัติให้รับดุษฎีนิพนธ์ฉบับนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปรัชญาดุษฎีบัณฑิต สาขาวิชาวิทยาศาสตร์สิ่งแวดล้อม ของมหาวิทยาลัยบูรพา

.....คณบดีคณะวิทยาศาสตร์
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.เอกรัฐ ศรีสุข)
วันที่ 25 เดือน พฤศจิกายน พ.ศ. 2564

กิตติกรรมประกาศ

ดุษฎีนิพนธ์ฉบับนี้ได้รับทุนสนับสนุนการวิจัยจากโครงการทุนวิจัยพัฒนาบัณฑิตศึกษา ประจำปีงบประมาณ 2563 ของสำนักงานการวิจัยแห่งชาติ (วช.) กระทรวงการอุดมศึกษา วิทยาศาสตร์ วิจัยและนวัตกรรม และทุนอุดหนุนดุษฎีนิพนธ์ของคณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา จึงขอขอบพระคุณ ณ ที่นี้

ดุษฎีนิพนธ์ฉบับนี้สำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยดี ด้วยความอนุเคราะห์อย่างดียิ่งจาก ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.สุทิน กิ่งทอง อาจารย์ที่ปรึกษาหลัก และดร.จันทรกานต์ ศรีสมทรัพย์ อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม ที่ได้เสียสละเวลาเป็นที่ปรึกษาดุษฎีนิพนธ์ ซึ่งท่านได้ให้คำแนะนำและความรู้ต่าง ๆ ตลอดจนช่วยปรับปรุงแก้ไขข้อบกพร่องต่าง ๆ ให้ถูกต้อง ด้วยความเอาใจใส่เป็นอย่างยิ่ง ผู้วิจัยตระหนักถึงความกรุณาของอาจารย์ จึงขอกราบขอบพระคุณเป็นอย่างสูงไว้ ณ ที่นี้

ขอขอบพระคุณ ดร.สิทธิรักษ์ รอยตระกูล ประธานกรรมการในการสอบดุษฎีนิพนธ์ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.สุทิน กิ่งทอง ดร.จันทรกานต์ ศรีสมทรัพย์ และผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. ถนอมศักดิ์ บุญภักดี คณะกรรมการสอบดุษฎีนิพนธ์ ที่ให้คำแนะนำตลอดจนตรวจทานข้อบกพร่อง

ขอขอบคุณน้อง ๆ สมาชิกห้องปฏิบัติการชีววิทยา BS-2110 ที่ได้ช่วยเหลือในการเก็บตัวอย่าง และแบ่งปันข้อมูลระหว่างการจัดทำดุษฎีนิพนธ์ฉบับนี้

ขอกราบขอบพระคุณ ศาสตราจารย์ เกียรติคุณ ดร.หม่อมราชวงศ์ ชิษณุสรร และคุณดารณี โชคชัยชำนาญกิจ ห้องปฏิบัติการชีวเคมี สถาบันวิจัยจุฬาภรณ์ ในความกรุณาและความอนุเคราะห์ ให้ใช้ห้องปฏิบัติการชีวเคมี ตลอดจนให้คำปรึกษา ทำให้การจัดทำดุษฎีนิพนธ์สมบูรณ์มากยิ่งขึ้น

คุณค่าและประโยชน์ของดุษฎีนิพนธ์ฉบับนี้ ผู้วิจัยขอมอบเป็นความกตัญญูกตเวทิตาแด่คุณพ่อมนตรี เฉื่อยฉ่ำ ผู้เป็นบิดา และคุณแม่นิภา เฉื่อยฉ่ำ ผู้เป็นมารดา ที่คอยให้กำลังใจ คำแนะนำสั่งสอนและสนับสนุนการศึกษาของลูกด้วยดีมาโดยตลอด รวมถึงคณาจารย์ และผู้มีพระคุณทุกท่าน

งานวิจัยนี้ได้ผ่านการอนุมัติให้ดำเนินการเลี้ยงและใช้สัตว์จากคณะกรรมการกำกับดูแลการเลี้ยงและใช้สัตว์ มหาวิทยาลัยบูรพา หมายเลข IACUC 007/2561

สุภัททา เฉื่อยฉ่ำ

58810176: สาขาวิชา: วิทยาศาสตร์สิ่งแวดล้อม; ปร.ด. (วิทยาศาสตร์สิ่งแวดล้อม)
คำสำคัญ: หอยนางรม/ ดีดีที/ โปรตีโอมมิกส์/ ตัวชี้วัดทางชีวภาพ/พิษวิทยา

สุภัททา เฉื่อยฉ่ำ: พิษวิทยาของสารดีดีทีและกลไกการตอบสนองระดับชีวโมเลกุลของหอยนางรมปากจีบ (*Saccostrea cucullata*) ด้วยเทคนิคโปรตีโอมิกส์ (TOXICITY OF DDT AND THE MOLECULAR RESPONSE IN THE HOODED OYSTER (*Saccostrea cucullata*) BY A PROTEOMIC APPROACH) คณะกรรมการควบคุมดุษฎีนิพนธ์: สุทิน กิ่งทอง, Ph.D., จันทรกานต์ ศรีสมทรัพย์, Ph.D. 156 หน้า. ปี พ.ศ. 2564.

งานวิจัยฉบับนี้ศึกษาพิษวิทยาของสารดีดีทีต่อหอยนางรมปากจีบ (*Saccostrea cucullata*) โดยการเลี้ยงทดสอบในห้องปฏิบัติการเพื่อประเมินผลกระทบต่อระยะตัวอ่อนและตัวเต็มวัย โดยศึกษาชีววิทยาการเจริญของตัวอ่อนและผลกระทบของสารดีดีทีต่อการเจริญของตัวอ่อน ที่ความเข้มข้น 0, 0.25, 0.5, 1 และ 10 ไมโครกรัมต่อลิตร ในระยะตัวเต็มวัย ศึกษาผลกระทบของสารดีดีทีต่ออัตราการตาย ที่ความเข้มข้น 0, 10, 50, 100, 500, 1,000 และ 2,000 ไมโครกรัมต่อลิตร จากนั้นศึกษาผลกระทบของสารดีดีทีต่อเนื้อเยื่อและกลไกการตอบสนองระดับโปรตีนโดยใช้เทคนิคมิญชวิทยาและโปรตีโอมิกส์ตามลำดับ ผลการศึกษาพบว่า สารดีดีทีส่งผลกระทบต่อพัฒนาการของตัวอ่อนในระยะแกสทรูลา ระยะโทรโคฟอร์ และระยะเวลิเจอร์ แม้ว่าจะได้รับความเข้มข้นเพียง 0.25 ไมโครกรัมต่อลิตร ผลการทดสอบในตัวเต็มวัย พบว่าสารดีดีทีส่งผลต่ออัตราการตาย โดยพบว่าอัตราการตายเพิ่มขึ้นตามความเข้มข้นของสารดีดีทีและระยะเวลาทดสอบ ค่า LC_{50} ณ เวลา 96 ชั่วโมง เท่ากับ 891.25 ไมโครกรัมต่อลิตร สำหรับการศึกษาในระดับเนื้อเยื่อและระดับโปรตีนทดสอบที่ระดับความเข้มข้น 10 และ 100 ไมโครกรัมต่อลิตร เป็นเวลา 96 ชั่วโมง เปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม ผลการศึกษาในระดับเนื้อเยื่อพบว่าสารดีดีทีกระตุ้นกลไกการป้องกันระดับเซลล์ เช่น พบว่ามีการสร้างเซลล์สร้างเมือกเพิ่มขึ้นในเนื้อเยื่อแมนเทิลและเหงือก พบการรวมกลุ่มของเซลล์เม็ดเลือดซึ่งแสดงถึงการอักเสบภายในเนื้อเยื่อ และส่งผลต่อเยื่อบุผิวภายในต่อมย่อยอาหาร ผลการศึกษาโปรตีโอมพบว่า สารดีดีทีกระตุ้นให้เกิดการเปลี่ยนแปลงปริมาณโปรตีนบนเจล 2D-gel จำนวน 51 จุด ($P>0.01$, ≥ 1.2 fold change) ระบุชนิดของโปรตีนได้ 29 จุด เป็นโปรตีนที่เกี่ยวข้องกับความเครียด โปรตีนโครงสร้าง โปรตีนในกระบวนการสร้างพลังงาน โปรตีนที่เกี่ยวข้องกับการขนส่งไอออน และโปรตีนกลุ่มอื่น ๆ ข้อมูลจากการศึกษาครั้งนี้เป็นการรายงานพิษวิทยาของสารดีดีทีต่อหอยนางรม และเผยให้เห็นกลไกการตอบสนองของเซลล์ในระดับโปรตีน นอกจากนี้ยังมีการวิเคราะห์โปรตีนที่มีแนวโน้มที่ดีสำหรับใช้เป็นตัวบ่งชี้การปนเปื้อนของสารดีดีทีอีกด้วย

58810176: MAJOR: ENVIRONMENTAL SCIENCE; Ph.D. (ENVIRONMENTAL SCIENCE)

KEYWORDS: OYSTER/ DDT/ PROTEOMICS /BIOMARKER/ TOXICOLOGY

SUPATTA CHUEYCHAM: TOXICITY OF DDT AND THE MOLECULAR RESPONSE IN THE HOODED OYSTER (SACCOSTREA CUCULLATA) BY A PROTEOMIC APPROACH. ADVISORY COMMITTEE: SUTIN KINGTONG, Ph.D., CHANTRAGAN SRISOMSAP, Ph.D. 156 P. 2021.

This study investigated the toxicological effect of DDT to the cup oyster *Saccostrea cucullata*. Experimental exposures were carried out to assess DDT effect to the larvae and adult. In the larvae, developmental biology of this species was primarily observed and the effect of DDT was later observed in the DDT experimental exposure with concentration of 0, 0.25, 0.5, 1, และ 10 µg/L. For the adult, mortality was examined by using the DDT experimental exposure with concentrations of 0, 10, 50, 100, 500, 1,000 and 2,000 µg/L. Histopathological effects and proteome responses were investigated by using histological and proteomic techniques, respectively. In larval stages, results showed that DDT highly affected the early life stages including gastrula, trochophore and D-shape veliger even in the lowest treated group as 0.25 µg/L. In adults, exposure to DDT led to mortality effects in the oyster. Mortalities increased with times and concentrations of DDT exposure. The 96 h LC_{50} value was 891.25 µg/L. For histopathological effect and proteome response, oysters were exposed to 0, 10 and 100 µg/L for 96 hours. Histological results showed that DDT induced cellular protective responses such as mucous cell production, hemolytic aggregation which indicates inflammation of tissues. DDT also particularly affected epithelium structure of digestive glands. Proteomic results showed that DDT regulated 51 differential protein spots on 2D-gel ($P>0.01$, fold change ≥ 1.2). Of these, 29 spots were identified. These proteins were categorized in various groups including stress response proteins, cytoskeletons, energy metabolism, ion transport, and others. Results obtained from this study revealed toxicological effects of the DDT to oyster and molecular basis of cellular response against DDT exposure in the oyster. Additionally, potential protein biomarkers of DDT exposure were also proposed in this study.

สารบัญ

หน้า

บทคัดย่อภาษาไทย..... ง

บทคัดย่อภาษาอังกฤษ..... จ

สารบัญ..... ฉ

สารบัญตาราง..... ฌ

สารบัญภาพ..... ญ

บทที่

1 บทนำ..... 1

ที่มาและความสำคัญของปัญหา..... 1

วัตถุประสงค์ของการวิจัย..... 3

ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับจากการวิจัย..... 3

ขอบเขตการวิจัย..... 4

สถานที่ดำเนินงานวิจัย..... 4

2 เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง..... 5

สารกลุ่มออร์กาโนคลอรีน (Organochlorine compounds)..... 5

ข้อมูลการนำเข้าสารเคมีป้องกันกำจัดศัตรูพืชในประเทศไทย..... 12

การแพร่กระจายของสารกลุ่มออร์กาโนคลอรีนในสิ่งแวดล้อม..... 15

การสะสมของสารกลุ่มออร์กาโนคลอรีนในห่วงโซ่อาหาร..... 20

พิษวิทยาของสารดีดีที (Toxicity of DDT)..... 28

การปนเปื้อนของสารกลุ่มออร์กาโนคลอรีน……..... 30

ข้อมูลทั่วไปของหอยนางรม..... 37

การใช้หอยนางรมปากจีบเป็นตัวบ่งชี้ทางชีวภาพ..... 52

โปรตีโอมิกส์ (Proteomics)..... 54

สารบัญ (ต่อ)

บทที่		หน้า
3	วิธีดำเนินการวิจัย	59
	หอยนางรมและการเลี้ยงปรับสภาพก่อนการทดสอบ	59
	การศึกษาชีววิทยาการเจริญของหอยนางรมปากจีบ	60
	การศึกษาผลกระทบของสารดีดีทีต่อชีววิทยาการเจริญหอยนางรมปากจีบ	64
	การทดสอบความเป็นพิษของสารดีดีทีต่อหอยนางรมตัวเต็มวัย	65
	การศึกษาผลกระทบของสารดีดีทีต่อเนื้อเยื่อหอยนางรมปากจีบด้วยเทคนิคมิญชวิทยา	67
	การศึกษาผลกระทบของสารดีดีทีต่อโปรตีโอมของหอยนางรม	71
4	ผลการศึกษา	75
	ชีววิทยาการเจริญของตัวอ่อนหอยนางรมปากจีบ	73
	ผลกระทบของสารดีดีทีต่อชีววิทยาการเจริญของตัวอ่อนหอยนางรมปากจีบ	79
	ผลกระทบของสารดีดีทีต่ออัตราการตายของหอยนางรมปากจีบตัวเต็มวัย	82
	ผลกระทบของสารดีดีทีต่อเนื้อเยื่อหอยนางรมปากจีบตัวเต็มวัย	85
	ผลกระทบของสารดีดีทีต่อโปรตีโอมของหอยนางรมปากจีบ	90
	การหาตัวชี้วัดชีวภาพโปรตีนเพื่อใช้เป็นตัวบ่งชี้การปนเปื้อนของสารดีดีที (protein biomarker of DDT exposure) ในหอยนางรมปากจีบ	97
5	อภิปรายและสรุปผลการศึกษา	101
	อภิปรายผลการศึกษา	101
	ชีววิทยาการเจริญของหอยนางรมปากจีบ	101
	ผลกระทบของสารดีดีทีต่อชีววิทยาการเจริญของตัวอ่อนหอยนางรมปากจีบ	103
	ผลกระทบของสารดีดีทีต่ออัตราการตายของหอยนางรมปากจีบตัวเต็มวัย	104
	ผลกระทบของสารดีดีทีต่อเนื้อเยื่อของหอยนางรมปากจีบตัวเต็มวัย	105
	ผลกระทบของสารดีดีทีต่อโปรตีโอมของหอยนางรมปากจีบ	107

สารบัญ (ต่อ)

หน้า

บทที่

การหาตัวชี้วัดชีวภาพระดับโปรตีนเพื่อใช้เป็นตัวบ่งชี้การปนเปื้อนของสารดีดีที (protein biomarker of DDT exposure) ในหอยนางรมปากจีบ..... 115

สรุปผลการศึกษา..... 116

บรรณานุกรม..... 117

ภาคผนวก..... 142

ภาคผนวก ก..... 143

ภาคผนวก ข..... 145

ภาคผนวก ค..... 149

ภาคผนวก ง..... 152

ประวัติย่อของผู้วิจัย..... 156

สารบัญตาราง

ตารางที่		หน้า
2-1	ปริมาณและมูลค่าการนำเข้าวัตถุอันตรายทางการเกษตร ปี 2553-2559.....	14
2-2	ค่าครึ่งชีวิตของสารกลุ่มออร์กาโนคลอรีนในดินตะกอน.....	15
2-3	ความสามารถในการละลายน้ำและความดันไอของสารกลุ่มออร์กาโนคลอรีนที่อุณหภูมิ 20-25 องศาเซลเซียส.....	19
2-4	ค่า LC_{50} ของสารกลุ่มออร์กาโนคลอรีนในสัตว์น้ำ.....	25
2-5	ฤทธิ์ก่อมะเร็งของสารกลุ่มออร์กาโนคลอรีน และอวัยวะที่เสี่ยงต่อการเป็นมะเร็งในคน.....	30
2-6	การตรวจพบสารดีดีทีในสิ่งแวดล้อมและสิ่งมีชีวิตจากบริเวณต่าง ๆ ทั่วโลก.....	33
2-7	ฤดูการปล่อยเซลล์สืบพันธุ์ของหอยนางรมบริเวณชายฝั่งภาคตะวันออกของประเทศไทย.....	51
2-8	การนำเทคนิคโปรตีโอมิกส์มาใช้ในการตรวจวิเคราะห์หาตัวบ่งชี้ทางชีวภาพการปนเปื้อนของสารเคมีในสิ่งแวดล้อม.....	58
3-1	คุณลักษณะของน้ำทะเลที่ใช้สำหรับเลี้ยงหอยนางรมในห้องปฏิบัติการ.....	59
4-1	การวิเคราะห์ differential proteins จำนวนโปรตีนที่สามารถระบุชนิดได้.....	93
4-2	การระบุชนิดของ differential protein ($P<0.01$, fold change ≥ 1.2) และการจัดจำแนกหน้าที่ของโปรตีน เรียงตามค่า fold change จากมากไปน้อย.....	95
ก-1	การเตรียมสารละลายดีดีที ความเข้มข้นต่าง ๆ.....	144
ข-1	การเปลี่ยนแปลงเปอร์เซ็นต์การตายเป็น Probit.....	147

สารบัญภาพ

ภาพที่ หน้า

2-1 ลักษณะโครงสร้างของสารดีดีที..... 5

2-2 การเปลี่ยนรูปของสารดีดีที..... 7

2-3 การสังเคราะห์สารคลอเดนจากปฏิกิริยา dieals-alder reaction..... 9

2-4 การแพร่กระจายของสารกลุ่มออร์กาโนคลอรีนในสิ่งแวดล้อม..... 20

2-5 การเกิด Biomagnification ของสารดีดีทีในสิ่งมีชีวิต..... 22

2-6 ความเป็นพิษของสารดีดีทีในมนุษย์..... 29

2-7 ความเป็นพิษของสารดีดีทีในสัตว์..... 29

2-8 สัณฐานวิทยาของเปลือกหอยนางรมปากจีบ และหอยตะโกรมกรามดำ..... 38

2-9 ลักษณะภายในของเปลือก..... 39

2-10 กายวิภาคอวัยวะภายในของหอยนางรมปากจีบ..... 40

2-11 องค์ประกอบแมนเทิลของหอยนางรม..... 41

2-12 โครงสร้างภายในต่อมย่อยอาหารของหอยนางรม..... 42

2-13 โครงสร้างภายในเหงือกของหอยนางรม..... 43

2-14 การกินแบบกรองกินในน้ำ (filter feeding) ของหอยนางรม..... 44

2-15 พัฒนาการหลังการปฏิสนธิของหอยนางรม *Crassostrea virginica*..... 48

2-16 ขั้นตอนการศึกษาโปรตีนด้วยเทคนิคโปรติโอมิกส์..... 55

3-1 การเตรียมเซลล์สืบพันธุ์หอยนางรมปากจีบและการปฏิสนธิ..... 61

3-2 ตำแหน่งการเก็บตัวอย่างชิ้นเนื้อเยื่อเพื่อศึกษาพยาธิสภาพของเนื้อเยื่อ..... 66

4-1 เซลล์ไข่และเซลล์อสุจิของหอยนางรมปากจีบ ภายใต้กล้องจุลทรรศน์..... 75

4-2 การปฏิสนธิและการแบ่งเซลล์ของเซลล์ไข่ในหอยนางรมปากจีบ..... 77

4-3 การแบ่งเซลล์ครั้งแรกในระยะคลีเวจ (first cleavage) ในหอยนางรมปากจีบ..... 78

4-4 ชีววิทยาการเจริญของตัวอ่อนหอยนางรมปากจีบ..... 80

สารบัญภาพ (ต่อ)

ภาพที่		หน้า
4-5	ผลของสารดีดีทีต่อชีววิทยาการเจริญของตัวอ่อนหอยนางรมปากจีบ.....	82
4-6	ชีววิทยาการเจริญของตัวอ่อนหอยนางรมปากจีบปกติและผิดปกติ เมื่อได้รับสัมผัสสารดีดีที ที่ระดับความเข้มข้นต่าง ๆ.....	83
4-7	ผลการทดสอบความเป็นพิษแบบกึ่งฉับพลันของสารดีดีทีต่ออัตราการตายของหอยนางรมปากจีบ.....	85
4-8	กราฟการทดสอบความเป็นพิษแบบกึ่งฉับพลันของสารดีดีทีต่ออัตราการตายของหอยนางรมปากจีบ.....	86
4-9	ผลกระทบของสารดีดีที ต่อเนื้อเยื่อแมนเทิลของหอยนางรมปากจีบ (*S. cucullata*) ย้อมด้วยสี Hematoxylin และ Eosin (H&E).....	89
4-10	ผลกระทบของสารดีดีที ต่อเนื้อเยื่อต่อมย่อยอาหารของหอยนางรมปากจีบ (*S. cucullata*) ย้อมด้วยสี Hematoxylin และ Eosin (H&E).....	90
4-11	ผลกระทบของสารดีดีที ต่อเนื้อเยื่อเหงือกของหอยนางรมปากจีบ (*S. cucullata*) ย้อมด้วยสี Hematoxylin และ Eosin (H&E).....	91
4-12	การแสดงออกของโปรตีนในแมนเทิลของหอยนางรมปากจีบที่ได้รับสารดีดีที.....	94
4-13	แผนภูมิวงกลม (pie chart) แบ่งกลุ่มโปรตีนตามหน้าที่.....	98
4-14	โปรตีนที่มีแนวโน้มสำหรับใช้เป็น potential protein biomarker ในการบ่งชี้การปนเปื้อนของสารดีดีที.....	100
ข-1	ตัวอย่างการกรอกข้อมูลอัตราการตาย.....	146
ข-2	การคำนวณหาค่า LC_{50}.....	147
ข-3	ค่าทางสถิติเพื่อใช้คำนวณหา LC_{50}.....	148
ข-4	คำนวณสมการเส้นตรงเพื่อหา LC_{50}.....	148

บทที่ 1
บทนำ

1.1 ที่มาและความสำคัญของปัญหา

ประเทศไทยจัดเป็นประเทศเกษตรกรรม ซึ่งมีศักยภาพในการผลิตผลผลิตทางการเกษตรส่งออกสร้างรายได้ให้กับประเทศจำนวนมาก ที่ผ่านมาประเทศไทยเน้นการส่งเสริมให้เกษตรกรใช้สารเคมีทางการเกษตรทั้งปุ๋ยสังเคราะห์และยาฆ่าแมลง โดยจะเห็นได้จากข้อมูลการนำเข้าสารเคมีกำจัดศัตรูพืชที่มีแนวโน้มสูงขึ้นทุกปี (กรมวิชาการเกษตร, 2559) จึงทำให้สารเคมีต่าง ๆ เกิดการตกค้างเกินกว่าค่ามาตรฐานความปลอดภัยที่กำหนด (Minimum Residue Limits: MRLs) และส่งผลกระทบต่อสิ่งแวดล้อมและสิ่งมีชีวิตที่ได้รับสารเคมีเข้าสู่ร่างกาย ซึ่งเป็นปัญหาสำคัญที่หลายประเทศทั่วโลกกำลังให้ความสนใจ รวมถึงประเทศไทยซึ่งเป็นหนึ่งในประเทศภาคีสมาชิกที่อยู่ในอนุสัญญาสต๊อกโฮล์มว่าด้วยสารมลพิษที่ตกค้างยาวนาน (stockholm convention on persistent organic pollutants) โดยสารเคมีกำจัดศัตรูพืชชนิดที่ทั่วโลกรวมถึงประเทศไทยให้ความสำคัญในการเฝ้าระวังและติดตามรายงานผลกระทบที่เกิดขึ้นต่อสิ่งมีชีวิตก็คือสารกลุ่มออร์กาโนคลอรีน (organochlorine compounds) ถูกนำมาใช้ในการกำจัดแมลงและศัตรูพืชอื่น ๆ เพราะแม้ว่าจะมีพระราชบัญญัติวัตถุอันตราย ซึ่งห้ามไม่ให้มีการผลิต นำเข้า ส่งออก หรือมีไว้ในครอบครอง (กรมควบคุมมลพิษ, 2563) แต่ก็ยังคงมีรายงานการตรวจพบสารตกค้างในกลุ่มออร์กาโนคลอรีนอยู่ในสิ่งแวดล้อม โดยเฉพาะในบริเวณพื้นที่ชายฝั่งทะเลภาคตะวันออกของประเทศไทย สารเคมีกำจัดศัตรูพืชในกลุ่มนี้ที่นิยมใช้กันมาก ได้แก่ ดีดีที (DDT) คลอเดน (chlordane) ดีลดริน (dieldrin) อัลดริน (aldrin) ท็อกซาฟีน (toxaphene) ลินเดน (lindane) เอนดริน (endrin) และเฮปตาครอร์ (heptachlor) เป็นต้น เนื่องจากสารกลุ่มออร์กาโนคลอรีนมีความคงทนสลายตัวได้ยาก จึงสามารถตกค้างในสิ่งแวดล้อมได้เป็นระยะเวลานาน (persistent organic pollutants) (มณเฑียร ส่งเสริม, มณจันทร์ เมฆธน และมุกดา อุตรพงศ์, 2540) ความสามารถในการละลายน้ำได้น้อย แต่ละลายได้ดีในไขมัน จึงสามารถสะสมในไขมันของสิ่งมีชีวิต การปนเปื้อนของสารกลุ่มออร์กาโนคลอรีนในสิ่งแวดล้อมทางทะเล ผ่านทางกระบวนการชะล้างหน้าดินลงสู่แหล่งน้ำ เข้าไปสะสมอยู่ในดินตะกอน ทำให้สิ่งมีชีวิตหรือสัตว์หน้าดินที่อาศัยอยู่ในบริเวณนั้น ๆ มีโอกาสที่จะได้รับสารเหล่านี้เข้าสู่ร่างกาย (bioaccumulation) และยังพบว่าสารเหล่านี้จะสามารถถ่ายทอดไปยังสิ่งมีชีวิตระดับที่สูงขึ้น ผ่านทางห่วงโซ่อาหาร (food chain) จึงมักจะพบการสะสมอยู่ในสิ่งมีชีวิตในปริมาณที่มากกว่าที่พบในสิ่งแวดล้อม ซึ่งมนุษย์จัดเป็นผู้บริโภคอันดับสุดท้าย จึงอาจส่งผลกระทบต่อสุขภาพ

ของมนุษย์และสิ่งมีชีวิตอื่น ๆ ในระบบห่วงโซ่อาหารอีกด้วย (Lushchak, Matviishyn, Husak, & Storey, 2018) ผลกระทบของสารกลุ่มออร์กาโนคลอรีนต่อสิ่งมีชีวิตในระบบนิเวศชายฝั่งมีการรายงานอย่างต่อเนื่อง โดยเฉพาะอย่างยิ่งในสิ่งมีชีวิตขนาดเล็ก ซึ่งมีประสิทธิภาพในการตอบสนองต่อสิ่งเร้าจากสิ่งแวดล้อมที่สิ่งมีชีวิตนั้น ๆ อาศัยอยู่ เช่นในสิ่งมีชีวิตประเภทมอลลัสก์ (mollusk) (Liu et al., 2010; Jiang et al., 2017) ครัสเตเชียน (crustaceans) (Smalling, Morgan, & Kuivila, 2010; Srinivasulu & Ramana, 1990) และปลาขนาดเล็ก (Unyimadu, Osibanjo, & Babayemi, 2018; Tiedeken & Ramsdell, 2009) พบว่าเมื่อสิ่งมีชีวิตได้รับสารกลุ่มออร์กาโนคลอรีน จะส่งผลให้เกิดการตอบสนองต่อสารเหล่านี้ในรูปของการเปลี่ยนแปลงทางชีวภาพและทางเคมี ได้แก่ เกิดความเป็นพิษต่อพัฒนาการของตัวอ่อน (embryo toxicity) เช่น หอยแมลงภู่ (*Perna viridis*) (Jiang et al., 2017) กุ้งตะกาด (*Metapenaeus monoceros*) (Srinivasulu & Ramana, 1990) และปลาม้าลาย (*Danio rerio*) (Tiedeken & Ramsdell, 2009) ที่ได้รับสารดีดีทีทำให้ตัวอ่อนมีการแบ่งเซลล์ที่ผิดปกติ อีกทั้งยังส่งผลต่อการชะลอการพัฒนาของตัวอ่อนในระยะต่าง ๆ เกิดการบาดเจ็บและการตายของเซลล์ (necrosis) นำไปสู่การเกิดพฤติกรรมและโครงสร้างทางสรีระวิทยาของร่างกายที่ผิดปกติ ซึ่งจะส่งผลต่อจำนวนประชากรของสัตว์เหล่านี้ต่อไปในอนาคต สารกลุ่มออร์กาโนคลอรีนที่ทางผู้วิจัยสนใจทำการศึกษาได้แก่ สารดีดีที เนื่องจากเป็นสารพิษที่มีฤทธิ์ตกค้างยาวนานสูงสุดในกลุ่ม อีกทั้งยังพบว่ามีรายงานการตกค้างอยู่ในสิ่งแวดล้อมอยู่ในปัจจุบัน แม้จะมีการประกาศห้ามใช้แล้วก็ตาม (กรมวิชาการเกษตร, 2553)

สำหรับหอยนางรม การศึกษาส่วนใหญ่เน้นศึกษาปริมาณการสะสมของสารดีดีทีในเนื้อเยื่อของหอยนางรมในสิ่งแวดล้อมบริเวณชายฝั่ง (Ferreira, Cortesao, Castro, & Vale, 1990; Gan, Jia, Jia, Lin, & Cai, 2009) สำหรับการศึกษาด้านพิษวิทยาของสารดีทีทีต่อหอยนางรมพบได้น้อยมาก งานวิจัยนี้จึงได้ออกแบบการทดลองเพื่อศึกษาพิษวิทยาของสารดีดทีต่อหอยนางรมต่อระยะตัวอ่อนและตัวเต็มวัย การศึกษาผลกระทบต่อตัวอ่อนมีวัตถุประสงค์เพื่อใช้เป็นข้อมูลพื้นฐานสำหรับการประเมินความเสี่ยงที่อาจจะเกิดขึ้นหากหอยนางรมได้รับสารดีดีทีโดยเฉพาะอย่างยิ่งในฤดูกาลผสมพันธุ์ การศึกษาผลกระทบในตัวเต็มวัยเพื่อต้องการระบุค่าความเป็นพิษต่ออัตราการตาย ผลกระทบต่อเนื้อเยื่อ รวมถึงกลไกการตอบสนองระดับโปรตีน และนอกจากนี้ยังต้องการระบุของโปรตีนที่มีแนวโน้มสำหรับใช้เป็นตัวบ่งชี้ทางชีวภาพสำหรับการปนเปื้อนของสารดีดีที (potential biomarker of exposure of DDT) เพื่อใช้เป็นข้อมูลเบื้องต้นในการเฝ้าระวังป้องกันและแก้ไขปัญหาการปนเปื้อนของสารเคมีในสิ่งมีชีวิตทางทะเลต่อไป

ในการศึกษาครั้งนี้ผู้วิจัยเลือกใช้หอยนางรมปากจีบ (*Saccostrea cucullata*) เป็นต้นแบบในการศึกษาเนื่องจากหอยนางรมมีถิ่นอาศัยและมีการเพาะเลี้ยงกันอย่างแพร่หลายในบริเวณชายฝั่งทะเลโดยเฉพาะภาคตะวันออก และมีความสำคัญทางเศรษฐกิจ นอกจากนี้หอยนางรมยังมีลักษณะสำคัญหลายประการที่เอื้อต่อการศึกษาพิษวิทยาของสารเคมีต่อสัตว์น้ำ ได้แก่ การดำรงชีวิตของหอยนางรมโดยการเกาะติดอยู่กับที่ (sessile organism) และกินอาหารแบบการกรอง (filter feeder) จึงมีโอกาสในการรับสัมผัสสารตกค้างต่าง ๆ และสิ่งปนเปื้อนในน้ำได้โดยตรง ทำให้เกิดการสะสมสารพิษไว้ภายในเนื้อเยื่อของอวัยวะต่าง ๆ อีกทั้งยังมีความทนต่อสารเคมีปนเปื้อนในแหล่งน้ำ จะเห็นได้จากมีงานวิจัยที่รายงานถึงปริมาณการสะสมของสารพิษในหอยนางรม แสดงให้เห็นถึงกลไกการปรับตัวเพื่อให้ทนกับสภาพการปนเปื้อนได้เป็นอย่างดี (Burge et al., 2016) ประกอบกับมีการแพร่กระจายทั่วไปในเขตชายฝั่งทะเลของประเทศไทย จึงเหมาะที่จะนำมาใช้เป็นต้นแบบในการศึกษาพิษวิทยาของสารพิษในระบบนิเวศทางทะเลสำหรับประเทศไทยต่อไปในอนาคต

1.2 วัตถุประสงค์ของการวิจัย

งานวิจัยครั้งนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อ

1. ศึกษาชีววิทยาการเจริญของตัวอ่อนหอยนางรมปากจีบ
2. ศึกษาผลกระทบของสารดีดีทีต่อชีววิทยาการเจริญของตัวอ่อนหอยนางรมปากจีบ
3. ศึกษาผลกระทบของสารดีดีทีต่ออัตราการตายของหอยนางรมปากจีบตัวเต็มวัย
4. ศึกษาผลกระทบของสารดีดีทีต่อเนื้อเยื่อหอยนางรมปากจีบตัวเต็มวัย
5. ศึกษากลไกการตอบสนองระดับโปรตีนด้วยเทคนิคโปรตีโอมิกส์
6. เพื่อหาโปรตีนที่มีแนวโน้มสำหรับเป็นตัวบ่งชี้ทางชีวภาพการปนเปื้อนสารดีดีที

1.3 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับจากการวิจัย

ทราบข้อมูลระดับความเป็นพิษของสารดีดีทีต่อหอยนางรมในระยะตัวอ่อนและตัวเต็มวัย ซึ่งข้อมูลที่ได้จะเป็นประโยชน์ในการประเมินความเสี่ยงและผลกระทบที่อาจเกิดขึ้นกับประชากรหอยนางรมที่มีถิ่นอาศัยในพื้นที่ที่มีการปนเปื้อนของสารดีดีทีและเพื่อเป็นข้อมูลเผยแพร่สู่ชุมชนในพื้นที่และประชาชนทั่วไปให้ได้รับทราบถึงปัญหาและเกิดความตระหนักต่อการร่วมแก้ไขป้องกัน นอกจากนี้การระบุโปรตีนที่มีแนวโน้มสำหรับใช้เป็นตัวบ่งชี้ทางชีวภาพการปนเปื้อนของสารดีดีที (potential biomarker of exposure of DDT) ยังเป็นองค์ความรู้ที่สามารถนำไปพัฒนาต่อยอดเพื่อการ

ผลิตชุดตรวจสอบสำหรับตรวจสอบการปนเปื้อนของสารดีดีทีในระบบนิเวศชายฝั่งได้อีกด้วย ซึ่งจะเป็นประโยชน์ในด้านการเฝ้าระวังมลพิษทางน้ำจากสารดีดีที

1.4 ขอบเขตการวิจัย

ศึกษาพิษวิทยาของสารดีดีทีต่อหอยนางรมปากจีบ (*S. cucullata*) ในห้องปฏิบัติการ โดยแบ่งการศึกษาออกเป็น 2 ระดับ ได้แก่ การศึกษาผลกระทบต่อตัวอ่อน และการศึกษาผลกระทบต่อตัวเต็มวัย การศึกษาผลกระทบของสารดีดีทีต่อตัวอ่อนครอบคลุมถึงการศึกษาชีววิทยาการเจริญขั้นต้นเพื่อให้ทราบระยะพัฒนาการตัวอ่อนแต่ละระยะในหอยชนิดนี้ จากนั้นจึงทดสอบผลของสารดีดีทีต่อตัวอ่อน เทคนิคที่ใช้สำหรับการศึกษาตัวอ่อนคือเทคนิคการผสมเทียมโดยการเตรียมตัวอย่างแบบ stripping method สำหรับการศึกษาผลกระทบต่อตัวเต็มวัยเริ่มจาก ทดสอบความเป็นพิษของสารดีดีทีต่อตัวเต็มวัยหอยนางรม โดยทำการทดสอบที่ระดับความเข้มข้นต่าง ๆ เพื่อหาระดับความเป็นพิษต่ออัตราการตายและคำนวณค่าความเข้มข้นที่ทำให้สัตว์ทดลองตายลงครึ่งหนึ่ง LC_{50} (lethal concentration for 50% mortality) จากนั้นจึงทำการเลือกความเข้มข้นของสารที่ระดับ sublethal toxic dose เพื่อศึกษาผลกระทบของสารดีดีทีต่อเนื้อเยื่อ และโปรตีโอมของหอยนางรมในกลุ่มทดสอบเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม การศึกษาเนื้อเยื่อจะทำการศึกษาในอวัยวะแมนเทิล เหงือก และต่อมย่อยอาหาร โดยใช้เทคนิคมิญชวิทยา (histological technique) ส่วนการศึกษาโปรตีโอมใช้เทคนิคโปรตีโอมิกส์ (proteomic technique) เพื่ออธิบายกลไกการตอบสนองของเซลล์ ต่อสารดีดีที นอกจากนี้ยังใช้สำหรับระบุโปรตีนที่มีแนวโน้มสำหรับใช้เป็นตัวบ่งชี้ทางชีวภาพการปนเปื้อนของสารดีดีที (potential biomarker of exposure of DDT) เพื่อใช้ในการติดตามตรวจสอบและเฝ้าระวังสถานการณ์การปนเปื้อนของสารดีดีทีในสิ่งแวดล้อมทางทะเล

1.5 สถานที่ดำเนินงานวิจัย

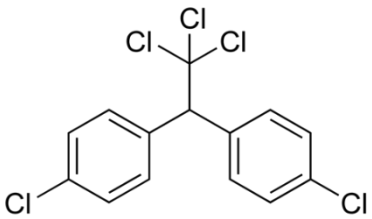
1. โรงเพาะเลี้ยงวาริชศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา
2. ห้องปฏิบัติการ 2110 ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา
3. ห้องปฏิบัติการชีวเคมี สถาบันวิจัยจุฬาภรณ์ กรุงเทพมหานคร

บทที่ 2
เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

2.1 สารกลุ่มออร์กาโนคลอรีน (Organochlorine compounds)

สารกลุ่มออร์กาโนคลอรีน (organochlorine compounds) จัดเป็นสารเคมีกำจัดแมลงที่มีประสิทธิภาพสูงที่สังเคราะห์ขึ้นโดยมนุษย์ ประกอบด้วยธาตุไฮโดรเจน (H) คาร์บอน (C) และคลอรีน (Cl) ซึ่งโดยทั่วไปจะมีคลอรีนมากกว่าหนึ่งอะตอมในโมเลกุล (ภาพที่ 2-1) โดยโมเลกุลของสารจะอยู่ในสภาพที่ไม่มีขั้ว (nonpolar molecule) จึงทำให้ละลายในน้ำได้น้อยแต่สามารถละลายได้ดีในไขมันและตัวทำละลายอินทรีย์ สารเคมีกลุ่มนี้มีการสลายตัวค่อนข้างช้า จึงทำให้พบการตกค้างในสิ่งแวดล้อม ตลอดจนห่วงโซ่อาหารของสิ่งมีชีวิต โดยเฉพาะอย่างยิ่งในร่างกายของมนุษย์ได้ในระยะเวลานาน สามารถจำแนกได้ 3 กลุ่มย่อย (Jayaraj, Megha, & Sreedev, 2016) ดังนี้

2.1.1 กลุ่มอนุพันธ์ของคลอริเนตอีเทนส์ (chlorinated Ethane derivatives)
กลุ่มอนุพันธ์ของคลอริเนตอีเทนส์ หรืออาจเรียกอีกชื่อหนึ่งว่า ดีดีที อนาลอกซ์ (DDT analog) สารในกลุ่มนี้ที่รู้จักกันดีได้แก่ สารดีดีที (DDT; dichlorodiphenyltrichloroethane) เมื่อเข้าสู่ร่างกายแล้วจะสามารถแตกตัวเป็นสารดีดีดี (DDD; dichlorodiphenyldichloroethane) และดีดีอี (DDE; dichlorodiphenyldichloroethylene) ได้ ซึ่งพบว่าดีดีอีไม่เป็นอันตรายต่อแมลง ในขณะที่ สารดีดีทีมีฤทธิ์ในการจำจัดแมลงศัตรูพืชได้อย่างมีประสิทธิภาพ ในอดีตจึงเป็นที่นิยมนำมาใช้ในการกำจัดแมลงศัตรูพืชกันอย่างแพร่หลาย ก่อนจะถูกประกาศห้ามใช้ในเวลาต่อมา สารอื่น ๆ ในกลุ่มนี้มี dicofol, methoxyclor, DMC และ chlorobenzelate เป็นต้น (Cohn, Wolff, Cirillo, & Sholtz, 2007)



ภาพที่ 2-1 ลักษณะโครงสร้างของสารดีดีที (Cohn et al., 2007)

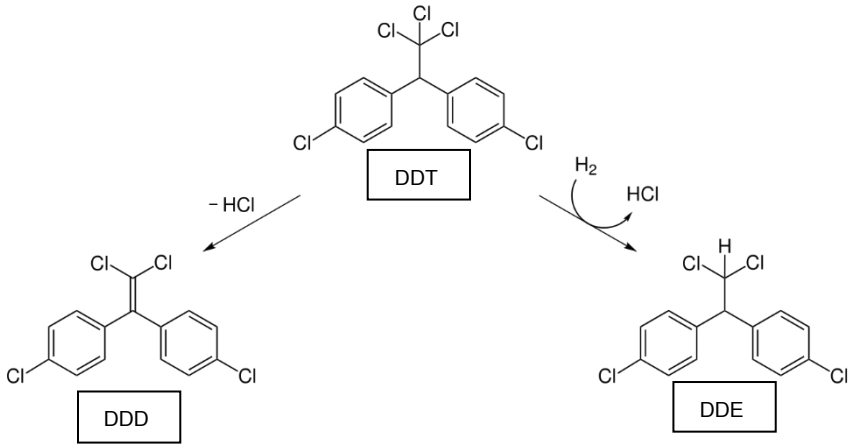
โครงสร้างของโมเลกุลของสารดีดีทีและอนุพันธ์ (DDT and derivatives) ประกอบด้วยเบนซีน 2 วง เชื่อมพันธะกันด้วยหมู่ อีเทนคลอรีน (chlorinated ethane group) วงแหวนแต่ละวงมีอะตอมคลอรีนแทนที่ไฮโดรเจน ชื่อ IUPAC ของโมเลกุลนี้คือ dichlorodiphenyltrichloroethane เป็นสารกำจัดศัตรูพืชประเภทสารสังเคราะห์ จัดอยู่ในกลุ่มออร์กาโนคลอรีน มีลักษณะเป็นผลึกละเอียด สีขาว จุดหลอมเหลว 108.5 ถึง 109 องศาเซลเซียส ความดันไอ 1.9×10^{-7} มิลลิเมตรปรอทที่ 20 องศาเซลเซียส นิยมใช้กันอย่างแพร่หลายทั่วโลก ถูกสังเคราะห์ขึ้นมาครั้งแรกในปี ค.ศ.1874 โดย Othmar Zeidler นักเคมีชาวออสเตรีย แต่ขณะนั้นยังไม่ทราบถึงคุณสมบัติของสาร ต่อมาในปี ค.ศ.1939 Paul Hermann Muller นักเคมีชาวสวิสเซอร์แลนด์ เป็นผู้ที่ค้นพบคุณสมบัติในการกำจัดแมลงของสารดีดีที (Bodor, Buchwald, & Huang, 1999) ในช่วงสงครามโลกครั้งที่สอง สารดีดีทีได้ถูกนำมาใช้ในการควบคุมโรคไข้รากสาดใหญ่ (typhus) ต่อมาทางองค์การอนามัยโลก (World Health Organization; WHO) จึงมีการนำมาใช้กำจัดยุงซึ่งเป็นพาหะของโรคไข้มาลาเรีย ภายหลังจึงถูกประกาศห้ามใช้เนื่องจากเป็นสารเคมีที่อันตรายต่อสิ่งมีชีวิตและสลายตัวได้ค่อนข้างช้า (Feachem & Sabot, 2007; Nasution & Bakti, 2018)

2.1.1.1 การเปลี่ยนรูปของสารดีดีทีเกิดขึ้นได้โดย 3 ปฏิกิริยา (Marcondes & Costa, 2014) ดังต่อไปนี้

1. ปฏิกิริยาดีไฮโดรคลอริเนชัน (dehydrochlorination) เป็นการนำหมู่คลอไรด์ออกจากโมเลกุล ซึ่งเราจะเห็นได้ทั่วไป จากยาฆ่าแมลงต่าง ๆ เช่น สารดีดีที เป็นต้น ผลจากปฏิกิริยาทำให้ได้สารดีดีอี ซึ่งสารดีดีที จะถูกเมทาบอไลท์โดยเอนไซม์ DDT-dehydrochlorinase (DDTase) จากแมลงและสัตว์ให้กลายเป็นดีดีอี (ภาพที่ 2-2) สะสมอยู่ในเนื้อเยื่อไขมันของสิ่งมีชีวิตที่ได้รับสารเข้าไป

2. ปฏิกิริยารีดักทีฟดีคลอริเนชัน (reductive dechlorination) เกิดขึ้นโดยจุลินทรีย์บางชนิดที่อยู่ในสิ่งแวดล้อม ผลจากปฏิกิริยาทำให้ได้สารดีดีดี

3. ปฏิกิริยาออกซิเดชัน (oxidation) เมื่อแมลงศัตรูพืชได้รับสารดีดีทีเข้าสู่ร่างกาย จะเกิดการเปลี่ยนรูปของสารโดยปฏิกิริยาออกซิเดชัน โดยอาศัยระบบเอนไซม์โมโนออกซิจีเนส (monooxygenase system) ได้เป็น dicofol ซึ่งสามารถเปลี่ยนรูปดีดีทีให้เป็นดีดีเอ (2, 2-bis (p-chlorophenyl) acetic acid; DDA) และดีบีพี (dichloro-benzo-phenone; DBP) ซึ่งมีคุณสมบัติเป็นสารกำจัดไร (acaricide) และแมลงศัตรูพืช (insecticide) (Patrick et al., 2009)



ภาพที่ 2-2 การเปลี่ยนรูปของสารดีดีที (ดัดแปลงจาก Marcondes & Costa, 2014)

การสลายตัวของสารกำจัดศัตรูพืชกลุ่มออร์กาโนคลอรีน พบว่าสารดีดีทีจะมีความเสถียรมากในดินที่มีความร่วนซุย มีการระบายอากาศที่ดี คืออยู่ในสภาวะที่มีออกซิเจน (aerobic conditions) ส่วนดินที่อยู่ในสภาวะขาดออกซิเจน (anaerobic conditions) เช่น ในกรณีที่มีน้ำท่วมขัง การสลายตัวของสารดีดีทีให้กลายเป็นดีดีดีจะเกิดได้เร็วขึ้น แต่การสลายตัวของสารดีดีทีให้กลายเป็นสารดีดีอีจะช้าลงในสภาพที่มีการระบายอากาศดี (Kengara, Doerfler, Welzl, Munch, & Schroll, 2019)

2.1.1.2 การใช้สารดีดีทีในประเทศไทย

ประเทศไทยได้ประกาศห้ามใช้สารดีดีที ซึ่งเป็นวัตถุอันตรายที่ห้ามให้มีการผลิต นำเข้า ส่งออก และมีไว้ในครอบครองเพื่อการเกษตรตั้งแต่ ปี พ.ศ. 2526 ต่อมากระทรวงสาธารณสุขได้ยกเลิกการใช้สารดีดีทีกำจัดยุงพาหะของโรคไข้มาเลเรีย โดยได้ยกเลิกการใช้ภายในประเทศ ในปี พ.ศ. 2539 (Cheevaporn, Duangkaew, & Tangkrock-Olan, 2005) ล่าช้ากว่าประเทศสหรัฐอเมริกา 27 ปี เนื่องจากเป็นสารพิษที่มีความคงทนในสิ่งแวดล้อมและสลายตัวค่อนข้างช้า สามารถละลายได้ในไขมัน ทำให้พบว่ามีการตกค้างในห่วงโซ่อาหาร และสะสมในดิน น้ำ และสิ่งแวดล้อมได้นานสูงสุดถึง 150 ปี (Zepp, Wolfe, Azarraga, Cox, & Pape, 1977) ซึ่งหากมนุษย์ได้รับสารดีดีทีในปริมาณที่มาก สามารถส่งผลต่อระบบประสาทส่วนกลาง กล้ามเนื้ออ่อนแรง ปวดศีรษะ และส่งผลต่อการทำงานของตับ หรือเกิดโลหิตจาง และเมื่อรับไปในปริมาณที่มาก พบว่าสามารถทำให้เกิดโรคมะเร็งได้ (Longnecker, Rogan, & Lucier, 1997) ซึ่งหลังจากมีการห้ามใช้สารดีดีทีในประเทศไทย พบว่าการปนเปื้อนของสารออร์กาโนคลอรีนในดิน โดยเฉพาะอย่างยิ่ง

สารดีดีทีในแม่น้ำสายหลักของประเทศยังคงมีการปนเปื้อนอยู่ แต่พบในปริมาณไม่สูงมากนัก (Thapinta & Hudak, 2003)

2.1.1.3 ความเป็นพิษของสารดีดีที

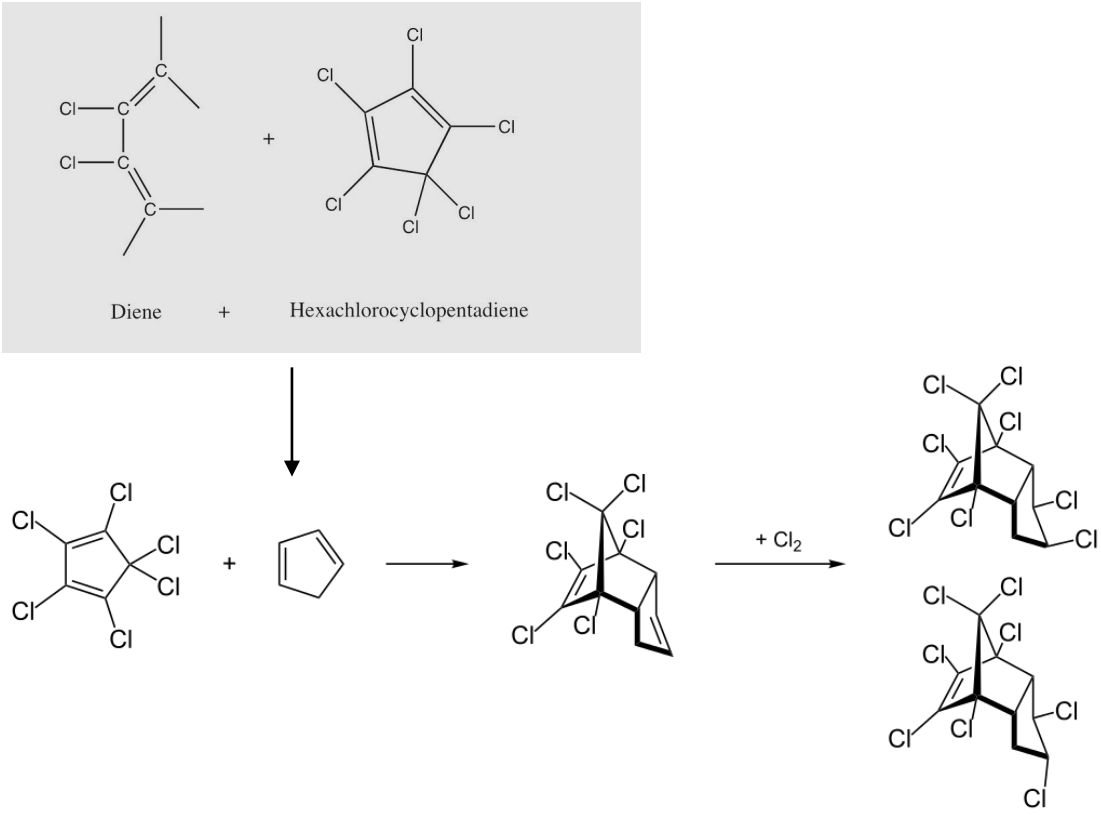
ความเป็นพิษของสารดีดีทีส่งผลให้เกิดความผิดปกติต่อระบบทางเดินอาหาร มีอาการเบื่ออาหาร คลื่นไส้ อาเจียน และเกิดอาการกล้ามเนื้ออ่อนแรง นอกจากนี้ยังพบว่าเมื่อสิ่งมีชีวิตได้รับสารพิษเป็นระยะเวลานาน อาจก่อให้เกิดมะเร็ง มีผู้รายงานว่าสารดีดีทีเป็นสารก่อมะเร็งตับ มะเร็งเม็ดเลือดขาว และทำให้เกิดโลหิตจางด้วย (Jukes et al., 1973) ผลการศึกษาทางระบาดวิทยาของการเกิดมะเร็งกับสารกำจัดแมลงในมนุษย์พบว่ามีความสัมพันธ์กันของการเกิดมะเร็งเต้านมในสตรีกับสารดีดีที ซึ่งคาดว่าสารดีดีทีอาจเข้าไปส่งผลกระทบโดยตรงต่อการแสดงของลักษณะเพศหญิง (estrogenic effect) และกระบวนการทำงานของสเตอรอยด์ฮอร์โมน (steroid hormone) อย่างไรก็ตามกลไกของการทำให้เกิดมะเร็งของสารดีดีทีโดยทั่วไปยังไม่ทราบแน่ชัด แต่เข้าใจว่าอาจเกิดเนื่องจากสารดีดีทีไปกระตุ้นเอนไซม์ที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการเมตาบอลิซึมของสารก่อมะเร็ง (Cohn et al., 2007)

มีรายงานถึงผลกระทบของสารดีดีทีต่อระบบการทำงานของฮอร์โมน (hormone) ที่ผลิตจากต่อมไร้ท่อ หรือที่เรียกว่า endocrine disrupting compounds (EDCs) ในสิ่งมีชีวิตออกมามากมายโดยเฉพาะอย่างยิ่งปลา การศึกษาของ Bitman และ Cecil (1970) พบว่าปลาที่ได้รับสารในกลุ่ม EDCs นี้ในปริมาณต่ำเป็นระยะเวลานาน ทำให้ปลาเพศผู้กลายพันธุ์และสร้างไข่ได้ (feminization) และ นำไปสู่การสูญพันธุ์ของปลาในสายพันธุ์นั้น ๆ เนื่องจากไม่มีการสืบพันธุ์เพื่อเพิ่มจำนวนประชากรต่อไป อย่างไรก็ตามผลกระทบของสารในกลุ่ม EDCs ต่อร่างกายมนุษย์ยังไม่มีการศึกษาที่ชัดเจน เนื่องจากไม่สามารถทำการศึกษาได้ในมนุษย์โดยตรง

2.1.2 กลุ่มไซโคลไดอีนส์ (cyclodienes)

สารในกลุ่มไซโคลไดอีนส์ เช่น คลอเดน เป็นสารเคมีในกลุ่มไดอีน (diene) ที่ถูกสังเคราะห์ขึ้น โดยอาศัยปฏิกิริยาดีลส์-อัลเดอร์ (dieals-alder reaction) ซึ่งเป็นปฏิกิริยาสังเคราะห์ที่มีวงแหวน ประกอบด้วยคาร์บอน 6 คาร์บอน จากไฮโดรคาร์บอนชนิดไม่อิ่มตัว มีลักษณะเป็นโซ่เปิด (ภาพที่ 2-3) ทำปฏิกิริยากันระหว่าง hexachlorocyclopentadiene กับ cyclopentadiene ได้เป็นคลอเดน เมื่อรวมกับคลอรีน ทำให้ได้เป็น technical chlordane (Dearth & Hites, 1991) ใช้ในการฉีดพ่นเคลือบเมล็ดเพื่อป้องกันแมลง และใช้ในการกำจัดปลวกในบ้านเรือน (Agency for Toxic Substances and Disease Registry [ATSDR], 2019) สารกำจัดศัตรูพืชกลุ่มไซโคลไดอีนส์จัดเป็นสารพิษที่คงทนในสิ่งแวดล้อมเป็นสารที่ละลายในไขมันสูง ละลายในน้ำได้เพียง 0.027 มิลลิกรัม

ต่อลิตร (Bloomquist, 1994) ทำให้คงตัวและเกิดการสะสมอยู่ในสิ่งแวดล้อมได้นาน ปัจจุบันถูกห้ามใช้เนื่องจากอนุสัญญาสตอกโฮล์มเกี่ยวกับสารมลพิษอินทรีย์ที่ย่อยสลายยาก (stockholm convention on persistent organic pollutants) ซึ่งในสหรัฐอเมริกา คลอเดนถูกยกเลิกห้ามใช้ในปี ค.ศ.1983 และห้ามไม่ให้ใช้ในทางการเกษตรในสหภาพยุโรป สารชนิดอื่น ๆ ในกลุ่มนี้ ได้แก่ อัลดริน (aldrine) ดีลดริน (dieldrin) และเอนดริน (endrin) และเฮปตะคลอร์ (heptachlor) (ภาพที่ 2-4) เป็นต้น



ภาพที่ 2-3 การสังเคราะห์สารคลอเดนจากปฏิกิริยา dieals-alder reaction (ดัดแปลงจาก Dearth & Hites, 1991)

2.1.2.1 การใช้สารกลุ่มไซโคลไดอีนส์ในประเทศไทย

สารกลุ่มไซโคลไดอีนส์ เป็นสารกำจัดศัตรูพืชที่ใช้อย่างแพร่หลายจนถึงปี พ.ศ. 2513 จึงถูกยกเลิกห้ามผลิต นำเข้า และห้ามจำหน่ายในหลายประเทศ สารกำจัดศัตรูพืชที่อยู่ในกลุ่มนี้ ได้แก่ คลอเดน เป็นสารในกลุ่มไซโคลไดอีนส์ชนิดแรกที่ผลิตออกขาย (Hargrave et al., 1992) มี

ฤทธิ์กำจัดแมลงโดยการสัมผัส การกิน และการหายใจ ใช้กำจัดแมลงหลากหลายชนิด แต่มีข้อจำกัดในการใช้ เนื่องจากมีพิษต่อพืช ปัจจุบันนำมาใช้กำจัดแมลงที่อยู่ในดิน เช่น มด และปลวก เป็นต้น ส่วนอัลดริน ดีลดริน และเอนดริน เป็นสารกำจัดแมลงกลุ่มไซโคลไดอีนส์ที่มีพิษตกค้างยาวนาน (persistent pesticides) (ATSDR, 2019) ในประเทศไทยมีห้ามใช้ในการเกษตรแต่ยังให้ใช้ในการป้องกันและกำจัดปลวกตามอาคารบ้านเรือน (สุธาสินี อั้งสูงเนิน, 2558) ส่วนเอนดรินเป็นไอโซเมอร์ของดีลดริน เป็นสารที่มีพิษต่อสัตว์เลือดอุ่นสูงปัจจุบันจึงมีการประกาศห้ามใช้ มีการศึกษาถึงการสลายตัวของอัลดรินไปเป็นดิลดริน และสาร metabolites อื่น ๆ โดยพบว่ากระบวนการที่ทำให้สารเปลี่ยนแปลงไปเกิดจากจุลินทรีย์ที่อยู่ในดินที่มีการเพาะปลูก สายพันธุ์ *Pseudomonas chrysgenum* รวมถึงจุลินทรีย์สายพันธุ์ *Trichoderma, Fusarium, Penicillium, Aspergillus, Nocardia, Streptomyces และ Micromonospora* ก็สามารถเปลี่ยนอัลดรินไปเป็นดิลดรินได้เช่นกัน (Korte, Ludwig, & Vogel, 1962)

2.1.2.2 ความเป็นพิษของสารกลุ่มไซโคลไดอีนส์

ความเป็นพิษของสารกำจัดแมลงกลุ่มไซโคลไดอีนส์ที่เกิดขึ้นนั้น คล้ายคลึงกับสารดีดีที แต่ต่างกันคือ อาการพิษของสารกำจัดแมลงกลุ่มนี้จะส่งผลต่อระบบประสาทส่วนกลางมากกว่าส่วนปลาย (neurotoxin effect) (Gadsden, 1977) จะทำให้เกิดอาการชักได้ในระยะแรก ๆ ของการได้รับพิษ บางครั้งอาจพบอาการชักโดยไม่พบอาการอื่น ๆ นำมาก่อนเลย (Mehrotra, Moorthy, Ravichandra-Reddy, & Desaiah, 1989) มีรายงานพบผู้เสียชีวิตจากสารกำจัดแมลงกลุ่มนี้มากกว่าจากสารดีดีที โดยพบว่าดีลดรินสามารถทำให้เกิดเนื้องอกในสัตว์ทดลองได้ ได้แก่ หนู ที่ได้รับดีลดรินในปริมาณ 10 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม เป็นเวลา 96 สัปดาห์ (Walker, Gale, Atkins, & Gadsden, 1977) พบงานวิจัยที่มีการทดสอบความเป็นพิษของคลอเดนในสัตว์น้ำ ได้แก่ ปลาซิวหัวโต (fathead minnow) พบว่า ที่ระดับความเข้มข้น 52 ไมโครกรัมต่อลิตร สามารถทำให้สัตว์ทดลองตายลงครึ่งหนึ่ง ที่ระยะเวลา 96 ชั่วโมง (96-h LC_{50}) (Holcombe, Phipps, & Fiandt, 1983) สารในกลุ่มไซโคลไดอีนส์ จะออกฤทธิ์แรงกว่าสารในกลุ่มสารดีดีที โดยจะออกฤทธิ์ยับยั้งสารสื่อประสาท (neurotransmitter) ประเภท GABA ทำให้สมองถูกกระตุ้นมากขึ้น (Bloomquist, 1994) มีงานวิจัยที่ศึกษาผลกระทบของดีลดรินต่อการยับยั้งสารสื่อประสาท ประเภท GABA ในปลาม้าลาย (zebra fish) พบความเป็นพิษของสารมีผลต่อระบบประสาท โดยจะเข้าไปรบกวนการทำงานของสารสื่อประสาท GABA และยับยั้งการจับกับ GABAA receptor (Thiffault, Langston, & Di Monte, 2001; Adibhatla & Hatcher, 2007)

สารกลุ่มไซโคลไดอีนส์ที่มีผลต่อคลอไรด์ไอออน (compounds affecting chloride channels) ได้แก่ คลอเดน ดีลดริน เอนดริน ลินเดน และเอนโดซัลแฟน ทั้งในแมลงและในสัตว์เลือดอุ่น ส่งผลให้ไปยับยั้งการส่งผ่านคลอไรด์ไอออน ในระบบประสาทส่วนกลาง (Central Nervous System; CNS) โดยจะเข้าไปยับยั้งการทำงานของสาร GABA โดยปกติ เมื่อ GABA ถูกปล่อยออกมาจาก presynaptic nerve สาร GABA จะไปจับกับ receptor บริเวณ postsynaptic nerve จะส่งผลให้ chloride channel เปิดออก ซึ่งทำให้คลอไรด์ไอออนสามารถผ่านไปยัง presynaptic nerve ได้ ทำให้กระแสประสาทสามารถส่งผ่านได้เป็นปกติ แต่เมื่อมีสารแปลกปลอมเข้ามารบกวนก็จะเข้าไปจับกับ chloride channel และเข้าไปยับยั้งการทำงานของ GABA (Koshlukova & Reed, 2014)

2.1.3 เฮกซะคลอโรไซโคลเฮกเซน (hexachlorocyclohexanes)

สารในกลุ่มนี้มีอยู่ชนิดเดียว ได้แก่ บีเอชซี (BHC) ซึ่งประกอบไปด้วย 4 ไอโซเมอร์ คือ แอลฟา เบต้า แกมมา และเดลต้า ซึ่งแต่ละไอโซเมอร์จะมีความเป็นพิษมากน้อยแตกต่างกันไป โดยแกมมาไอโซเมอร์มีค่าความเป็นพิษสูงสุด มีชื่อสามัญว่า ลินเดน (lindane หรือ gamma-hexachlorocyclohexane; γ-HCH) เป็นสารกำจัดศัตรูพืชกลุ่มออร์กาโนคลอรีน ที่เป็นอนุพันธ์ของเฮกซะคลอโรไซโคลเฮกเซน นิยมนำมาใช้ในทางการเกษตรและทางด้านสาธารณสุข ความสามารถในการละลายในน้ำได้ดีกว่าสารดีดีทีถึง 100 เท่า ค่าความดันไอค่อนข้างสูงจึงทำให้ระเหยเป็นไอได้ง่าย ด้วยเหตุนี้สิ่งมีชีวิตจึงสามารถได้รับพิษผ่านทางการหายใจได้อีกด้วย (Lay, Müller, Peichl, Lang, & Korte, 1987)

2.1.3.1 การใช้สารกลุ่มเฮกซะคลอโรไซโคลเฮกเซนในประเทศไทย

ในประเทศไทย ลินเดนได้ถูกประกาศให้เป็นวัตถุอันตรายชนิดที่ 4 ห้ามมิให้มีการผลิต การนำเข้า การส่งออก หรือการมีไว้ในครอบครองทางการเกษตร และเป็นวัตถุอันตรายชนิดที่ 4 ซึ่งเป็นการปฏิบัติตามพันธกรณีของอนุสัญญาสตอกโฮล์ม เกี่ยวกับสารมลพิษที่ตกค้างยาวนาน (Stockholm Convention on Persistent Organic Pollutants: POPs) ทางด้านสาธารณสุขมีการอนุญาตให้ใช้ภายใต้เงื่อนไขเฉพาะในผลิตภัณฑ์ที่ใช้ในการป้องกัน ควบคุม กำจัดแมลงและสัตว์อื่น ยกเว้นในผลิตภัณฑ์ยา สามารถใช้เป็น second line treatment ในการรักษาโรคหิดและเหาในมนุษย์(สำนักคณะกรรมการอาหารและยา, 2550)

2.1.3.2 ความเป็นพิษของสารกลุ่มเฮกซะคลอโรไซโคลเฮกเซน

ในอดีตช่วงปี ค.ศ.1950-2000 พบรายงานการใช้สารในกลุ่มนี้ประมาณ 600,000 ตันทั่วโลก เพื่อใช้ในการกำจัดแมลงศัตรูพืช ซึ่งในปัจจุบันนี้ยังมีบางประเทศที่ยังคงผลิตและใช้ลินเดน

ในการอบเมล็ดพันธุ์ทางการเกษตร ใช้กำจัดปลวก ใช้เป็นยารักษาโรคหิดและเหา เป็นต้น (Vijgen et al., 2011) ลินเดนเป็นสารที่มีความเป็นพิษเฉียบพลันค่อนข้างสูงในสัตว์น้ำ เช่น ในปลานิล (*Oreochromis mossambicus*) พบค่า LC_{50} ที่เวลา 48 ชั่วโมง เท่ากับ 22 ไมโครกรัมต่อลิตร (Geyer et al., 1993) และมีพิษเฉียบพลันปานกลางในสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม เช่น ในหนู พบค่า LD_{50} ที่เวลา 96 ชั่วโมง เท่ากับ 270 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม (Jayaraj et al., 2016) มีความเป็นพิษต่อระบบประสาทส่วนกลางและส่วนปลาย รบกวนการทำงานของสารสื่อประสาท GABA และการทำงานของ GABAA receptor ในมนุษย์ เช่นเดียวกับดีลดริน ทำให้เกิดอาการชัก หายใจติดขัด และมีผลต่อการทำงานของตับ ไต เนื่องจากลินเดนมีฤทธิ์ต่อระบบประสาท และสารรบกวนระบบต่อมไร้ท่อ (Anand et al., 1998) องค์การอนามัยโลก (WHO) จึงจัดให้ลินเดนเป็นสารที่เป็นอันตรายปานกลาง และจำเป็นต้องมีการควบคุม โดยในระดับนานาชาตินั้น ลินเดนถูกห้ามใช้แล้วใน 50 ประเทศ และในปี พ.ศ. 2552 จึงถูกจัดให้เป็นสารที่ห้ามผลิตและห้ามใช้ทั่วโลก (Humphreys et al., 2007)

2.2 ข้อมูลการนำเข้าสารเคมีป้องกันกำจัดศัตรูพืชในประเทศไทย

อุตสาหกรรมทางด้านการเกษตรของประเทศไทยที่ผ่านมา มีการส่งเสริมให้เกษตรกรใช้สารเคมีทางการเกษตรทั้งปุ๋ยสังเคราะห์และยาฆ่าแมลง โดยไม่ได้คำนึงถึงผลกระทบทางด้านลบที่มีต่อสิ่งแวดล้อมและสุขภาพของมนุษย์ โดยจะเห็นได้จากข้อมูลการนำเข้าสารเคมีป้องกันกำจัดศัตรูพืชที่มีแนวโน้มสูงขึ้นทุกปี เพื่อเพิ่มผลผลิตและรวมถึงรักษาคุณภาพและรายได้ทางการเกษตรเอาไว้ ซึ่งจะเห็นได้จากข้อมูลของกรมวิชาการเกษตร (2559) ที่แสดงในตารางที่ 2-2 พบว่า ระหว่างปี พ.ศ. 2553-2559 มีการนำเข้าสารเคมีป้องกันกำจัดศัตรูพืชมากถึง 120,000 ตัน โดยสารเคมีป้องกันกำจัดศัตรูพืชที่มีการใช้มากที่สุด ได้แก่ สารกำจัดวัชพืช ร้อยละ 74 สารกำจัดแมลง ร้อยละ 14 สารป้องกันกำจัดโรคพืช ร้อยละ 9 และอื่น ๆ ร้อยละ 3 มีมูลค่าการนำเข้าสารเคมีกำจัดศัตรูพืชในประเทศมากถึงปีละ 18,000 ล้านบาท จากการประเมินของ World bank และ FAO แสดงให้เห็นว่าการใช้สารเคมีกำจัดแมลงศัตรูพืชในประเทศไทยมีค่าสูงกว่าประเทศที่พัฒนาแล้ว เช่น ฝรั่งเศส โปรตุเกสถึงเท่าตัว เป็นผลให้ในระหว่างปี 2553-2554 RASFF (Rapid Alert System for Food) ซึ่งเป็นหน่วยงานของสหภาพยุโรป (EU) มีการตรวจพบสารเคมีตกค้างในพืชผักของไทยมากที่สุด ถึง 55 ครั้ง และรองลงมา ได้แก่ ตุรกี อินเดีย อียิปต์ เป็นต้น

สารเคมีกำจัดศัตรูพืชชนิดที่ทั่วโลกรวมถึงประเทศไทยให้ความสำคัญในการเฝ้าระวังและติดตามรายงานผลกระทบที่เกิดขึ้นต่อสิ่งมีชีวิตก็คือสารตกค้างในกลุ่มออร์กาโนคลอรีน เพราะแม้จะมีตามพระราชบัญญัติวัตถุอันตราย ห้ามไม่ให้ผลิต นำเข้า ส่งออก หรือมีไว้ในครอบครอง แต่

ก็ยังคงมีรายงานการตรวจพบสารตกค้างในกลุ่มออร์กาโนคลอรีนอยู่ในสิ่งแวดล้อมอยู่ โดยเฉพาะในบริเวณพื้นที่ทางผู้วิจัยสนใจทำการศึกษา คือบริเวณชายฝั่งทะเลภาคตะวันออกของประเทศไทย พบว่ายังมีสารบางตัวที่ยังมีการอนุญาติให้นำเข้ามาเพื่อใช้ในด้านสาธารณสุขได้ ได้แก่ เฮปตาครอร์ คลอเดน อัลดริน และดีลดริน ซึ่งยังอนุญาตให้ใช้ในด้านสาธารณสุขได้ (สุธาสินี อั้งสูงเนิน, 2558) โดยพบว่าถูกนำมาใช้เป็นสารประกอบในยากำจัดโรคหิดและเหาในมนุษย์และสัตว์ แม้จะพบในปริมาณที่น้อยและมีแนวโน้มที่ลดลง และอยู่ในระดับที่ต่ำกว่าค่าปริมาณสูงสุดของสารมีพิษตกค้าง (Maximum Residue Limits, MRL) ตามประกาศกระทรวงสาธารณสุขของประเทศไทย คือไม่เกิน 0.01 ppb (Boonyatumanond, Wattayakorn, Togo, & Takada, 2006) แต่ก็ยังต้องเฝ้าระวังและตรวจสอบการตกค้างในสิ่งแวดล้อมต่อไป เนื่องจากสารชนิดนี้สามารถถ่ายทอดตามลำดับในห่วงโซ่อาหารมาสู่ผู้บริโภคขั้นสูงได้ในแบบเพิ่มขยายทางชีวภาพ (bioaccumulation) ทำให้สิ่งมีชีวิตที่กินอาหารสืบทอดต่อ ๆ กันมาได้รับสารพิษสะสมในปริมาณที่มากขึ้น และก่อให้เกิดผลกระทบต่อสิ่งมีชีวิตตลอดจนมนุษย์ซึ่งเป็นลำดับผู้บริโภคขั้นสูงสุดของห่วงโซ่อาหาร

แม้ว่าปัจจุบันแทบจะไม่มีการนำสารปราบศัตรูพืชกลุ่มออร์กาโนคลอรีนมาใช้ในทางเกษตรกรรมแล้ว เนื่องจากมีสารหลายชนิดในกลุ่มนี้ที่จัดเป็นวัตถุอันตรายชนิดที่ 4 ตามพระราชบัญญัติวัตถุอันตราย พ.ศ.2535 ห้ามมิให้มีการผลิต นำเข้า ส่งออก หรือมีไว้ในครอบครอง เนื่องจากมีพิษต่อสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม ก่อให้เกิดมะเร็ง ตกค้างในสิ่งแวดล้อมยาวนาน (Persistent Organic Pollutants; POPs) แพร่กระจายและสะสมเพิ่มขึ้นในสัตว์ต่าง ๆ ตามลำดับในชั้นห่วงโซ่อาหาร และมีการใช้กันอย่างแพร่หลายในอดีต ปัจจุบันจึงยังคงมีการตรวจพบสารกำจัดศัตรูพืชกลุ่มนี้ปนเปื้อนในอากาศ ดิน น้ำ พืช และสัตว์ต่าง ๆ อยู่ (กรมวิชาการเกษตร, 2553)

ตารางที่ 2-1 ปริมาณและมูลค่าการนำเข้าวัตถุอันตรายทางการเกษตร ปี 2553-2559 (กรมวิชาการเกษตร, 2559)

ปริมาณ : ตัน / มูลค่า : ล้านบาท

ปี	สารกำจัดวัชพืช (herbicide)		สารกำจัดแมลง (insecticide)		สารป้องกันและกำจัดโรคพืช (fungicide)		อื่น ๆ		รวม	
	ปริมาณ	มูลค่า	ปริมาณ	มูลค่า	ปริมาณ	มูลค่า	ปริมาณ	มูลค่า	ปริมาณ	มูลค่า
2553	80,278	8,845	23,417	4,670	9,671	3,860	4,450	583	117,815	17,956
2554	112,177	11,480	34,672	5,938	12,179	3,875	5,511	777	164,538	22,070
2555	106,860	11,294	16,797	3,686	6,972	3,883	3,748	494	134,480	19,378
2556	137,049	14,873	21,485	4,201	10,350	4,828	3,942	514	172,826	24,416
2557	117,645	13,435	13,910	4,013	10,988	4,708	4,832	656	147,375	22,812
2558	119,971	11,016	12,927	3,684	11,088	3,839	5,560	787	149,546	19,326
2559	125,596	9,688	16,056	3,899	12,915	4,503	6,120	2,487	160,824	20,618

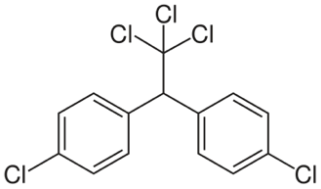
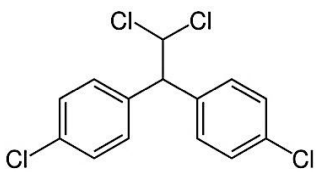
2.3 การแพร่กระจายของสารกลุ่มออร์กาโนคลอรีนในสิ่งแวดล้อม

สารกำจัดศัตรูพืชกลุ่มออร์กาโนคลอรีนไม่สามารถเกิดขึ้นได้เองตามธรรมชาติ แม้จะมีการออกพระราชบัญญัติวัตถุอันตราย ห้ามไม่ให้ผลิต นำเข้า ส่งออก หรือมีไว้ในครอบครองสารชนิดนี้ แต่ก็ยังคงพบรายงานการตกค้างของสารในกลุ่มออร์กาโนคลอรีนอยู่ในสิ่งแวดล้อม ทั้งในแหล่งน้ำ ตะกอนดิน และสิ่งมีชีวิต เนื่องจากสารในกลุ่มนี้มีคุณสมบัติตกค้างในสิ่งแวดล้อมยาวนาน โดยเส้นทางการแพร่กระจายของสารออร์กาโนคลอรีนนั้น สามารถปนเปื้อนสู่สิ่งแวดล้อมได้หลายเส้นทาง ดังต่อไปนี้

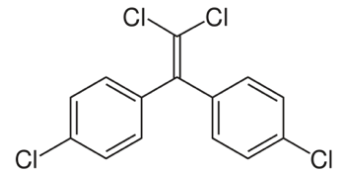
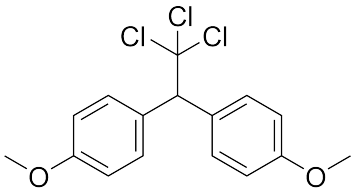
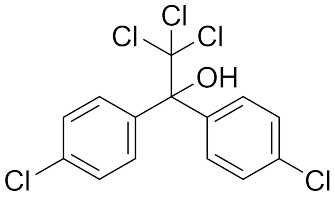
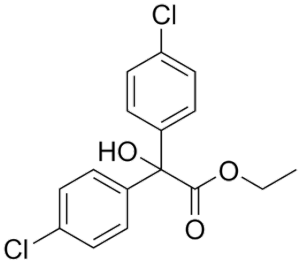
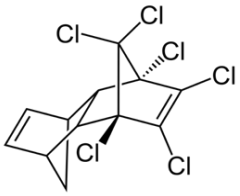
2.3.1 การแพร่กระจายของสารออร์กาโนคลอรีนในดิน

ในการทำเกษตรกรรมมักมีการใช้สารเคมีกำจัดศัตรูพืชในปริมาณความถี่ที่ค้อนข้างสูง ตั้งแต่ช่วงก่อนเพาะปลูกจนถึงระยะการเก็บเกี่ยวผลผลิต ดินจึงเป็นแหล่งรองรับสารเหล่านี้โดยตรง ส่งผลให้อินทรียวัตถุที่อยู่ภายในดินถูกทำลาย สารกลุ่มออร์กาโนคลอรีนนอกจากจะเป็นประโยชน์ในการนำมาใช้กำจัดแมลงศัตรูพืชแล้ว ยังก่อให้เกิดโทษ โดยส่วนใหญ่พบว่าสารในกลุ่มนี้มีจะคุณสมบัติในการทำลายหน้าดิน ทำให้องค์ประกอบในดินเปลี่ยนแปลงทั้งทางกายภาพและชีวภาพ ส่งผลต่อจุลินทรีย์ในดินที่เป็นประโยชน์ต่อต้นพืช (Gopalan & Chenicherry, 2018) สารพิษที่ตกค้างอยู่ในดินอาจมีการเปลี่ยนแปลงในหลายลักษณะ ขึ้นอยู่กับความคงทนของสารแต่ละชนิดที่สะสมอยู่ภายในดิน (ตารางที่ 2-2)

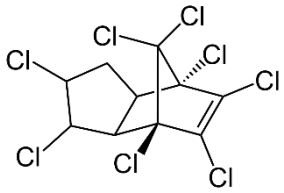
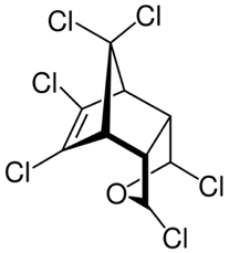
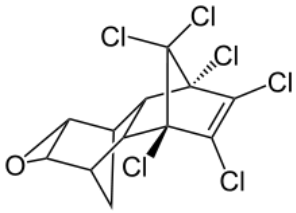
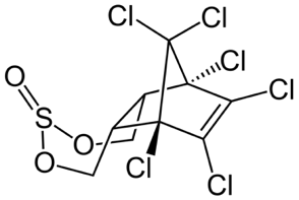
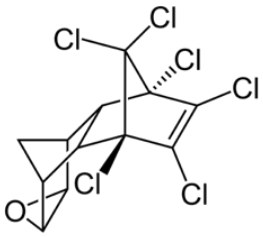
ตารางที่ 2-2 ค่าครึ่งชีวิตของสารกลุ่มออร์กาโนคลอรีนในดินตะกอน (Jayaraj et al., 2016)

ชื่อสารเคมี	สูตรโครงสร้าง	ความคงทนในดินตะกอน
1. สารดีดีทีและอนุพันธ์		
สารดีดีที (DDT) $C_{14}H_9Cl_5$		ค่า half-life: 2-15 ปี
สารดีดีดี (DDD) $C_{14}H_9Cl_4$		ค่า half-life: 5-10 ปี

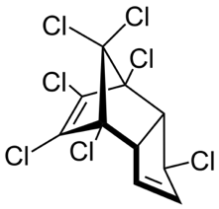
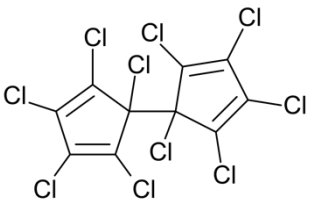
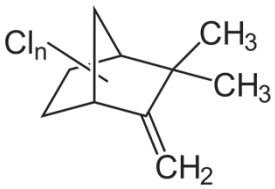
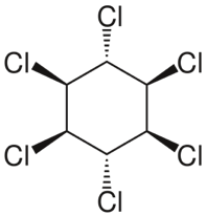
ตารางที่ 2-2 (ต่อ)

ชื่อสารเคมี	สูตรโครงสร้าง	ความคงทนในดินตะกอน
1. สารดีดีทีและอนุพันธ์		
สารดีดีอี (DDE) $C_{14}H_8Cl_4$		ค่า half-life: 10 ปี
สารเมทอกซีคลอร์ (methoxychlor) $C_{16}H_{15}Cl_3O_2$		ค่า half-life: < 120 วัน
สารไดโคฟอล (dicofol) $C_{14}H_9Cl_5O$		ค่า half-life: 60 วัน
สารคลอร์โรเบนซิเลท (chlorobenzilate) $C_{16}H_{14}Cl_2O_3$		ค่า half-life: 35 วัน
2. ไซโคลไดอีนส์ (cyclodienes)		
สารอัลดริน (aldrin) $C_{12}H_8C_{16}$		ค่า half-life: 2 ปี

ตารางที่ 2-2 (ต่อ)

ชื่อสารเคมี	สูตรโครงสร้าง	ค่าครึ่งชีวิตในดินตะกอน
2. ไซโคลไดอีนส์ (cyclodienes) (ต่อ)		
สารคลอเดน (chlordane) $C_{10}H_6C_{18}$		ค่า half-life: 10 ปี
สารไอโซเบนเซน (isobenzan) $C_9H_4C_{18}O$		ค่า half-life: 2.8 ปี
สารดิลดริน (dieldrin) $C_{12}H_8C_{16}O$		ค่า half-life: 9 เดือน
สารเอนโดซัลแฟน (endosulfan) $C_9H_6C_{16}O_3S$		ค่า half-life: 50 วัน
สารเอนดริน (endrin) $C_{12}H_8C_{16}O$		ค่า half-life: 12 ปี

ตารางที่ 2-2 (ต่อ)

ชื่อสารเคมี	สูตรโครงสร้าง	ค่าครึ่งชีวิตในดินตะกอน
2. ไซโคลไดอีนส์ (cyclodienes) (ต่อ)		
สารเฮปตาคลอร์ (heptachlor) $C_{10}H_5C_{17}$		ค่า half-life: 2 ปี
สารไดนาคลอร์ (dienochlor) $C_{10}Cl_{10}$		ค่า half-life: 2.8 ปี
สารทอกซาฟีน (toxaphene) $C_{10}H_{10}C_{18}$		ค่า half-life: < 120 วัน
3. เฮกซะคลอโรไซโคลเฮกเซน (hexachlorocyclohexanes)		
สารลินเดน (lindane) $C_6H_6C_{16}$		ค่า half-life: 15 เดือน

2.3.2 การแพร่กระจายของสารกลุ่มออร์กาโนคลอรีนในน้ำ

การแพร่กระจายของสารกลุ่มออร์กาโนคลอรีนมาจากสาเหตุต่าง ๆ ทั้งทางตรงและทางอ้อม ดังนี้ (นวลศรี ทยาพัชร, 2533)

1. การฉีดพ่นสารป้องกันกำจัดศัตรูพืชลงสู่แหล่งน้ำโดยตรง เพื่อกำจัดยุงและวัชพืชในน้ำ

2. การชะหน้าดินของฝนและน้ำไหล่บ่าหน้าดิน (runoff) ผ่านพื้นที่ที่มีการใช้สารกำจัดศัตรูพืชก่อนไหลลงสู่แหล่งน้ำ

3. น้ำทิ้งบ้านเรือนและโรงงานอุตสาหกรรมที่ใช้สารออร์กาโนคลอรีนลงสู่แหล่งน้ำ

4. การใช้สารกำจัดศัตรูพืชบริเวณพื้นที่เกษตรกรรมใกล้กับแหล่งน้ำ

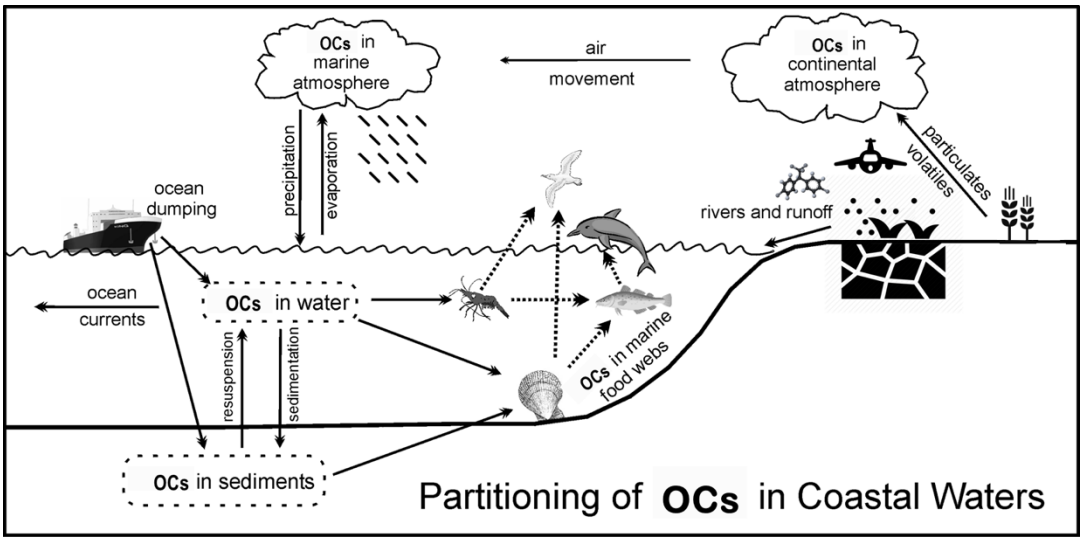
ซึ่งปัจจัยสำคัญที่มีผลต่อการตกค้างจะขึ้นอยู่กับคุณสมบัติในการละลายน้ำ การระเหย รวมถึงกำลังในการแยกส่วน K_{ow} (degree of partition) เนื่องจากสารกลุ่มนี้ประกอบด้วยหมู่ไฮโดรเจนอะตอม (H) คาร์บอนอะตอม (C) และคลอรีนอะตอม (Cl) ซึ่งคลอรีนอะตอมในสารประกอบจะมีผลต่อความสามารถในการละลายน้ำของสารประกอบ ถ้ามีจำนวนคลอรีนอะตอมมากอัตราการละลายก็จะลดลง (Hollis, 1991) ส่วนคุณสมบัติการระเหยมีผลต่อการแพร่กระจายและสะสมในสิ่งแวดล้อม อัตราการระเหยจะขึ้นกับความดันไอ สารฆ่าแมลงที่มีความดันไอสูงจะมีอัตราการระเหยได้สูงกว่าสารฆ่าแมลงที่มีความดันไอต่ำ พบว่า 43 เปอร์เซ็นต์ ของสารกลุ่มออร์กาโนคลอรีนมีอัตราการระเหยของสารในระดับต่ำ ส่วนอีก 57 เปอร์เซ็นต์ มีความดันไอในระดับปานกลางจนถึงระดับความดันไอสูง (ตารางที่ 2-3) จะพบว่าสารในกลุ่มนี้ความสามารถในการละลายน้อยมาก โดยลินเดนสามารถละลายน้ำได้ดีที่สุด

ตารางที่ 2-3 ความสามารถในการละลายน้ำและความดันไอของสารกลุ่มออร์กาโนคลอรีน ที่อุณหภูมิ 20-25 องศาเซลเซียส (นวลศรี ทยาพัชร, 2533)

ชนิดของสารฆ่าแมลง	สูตรเคมี	การละลายน้ำ (ppm)	ความดันไอ (mmHg)
สารดีดีที	$C_{14}H_9Cl_{15}$	0.0012	1.9×10^{-7}
สารดีดีอี	$C_{14}H_8Cl_4$	0.0013	4.0×10^{-5}
สารดีดีดี	$C_{14}H_{10}Cl_4$	0.002	4.68×10^{-6}
สารอัลดริน	$C_{12}H_8Cl_6$	0.027-0.20	1.8×10^{-7}
สารดิลดริล	$C_{12}H_8Cl_6O$	0.05-0.25	2.0×10^{-7}
สารเอนดริน	$C_{12}H_8Cl_6O$	0.06-0.23	3.0×10^{-4}
สารเฮปตาคลอร์	$C_{10}H_5Cl_7$	0.056	3.00×10^{-4}
สารคลอเดน	$C_{10}H_6Cl_8$	0.009	9.4×10^{-4}
สารลินเดน	$C_6H_6Cl_6$	7.3	9.46×10^{-6}

2.3.3 การแพร่กระจายของสารกลุ่มออร์กาโนคลอรีนในสิ่งมีชีวิต

เส้นทางการแพร่กระจายของสารเริ่มจากการฉีดพ่นสารป้องกันกำจัดศัตรูพืชในพื้นที่ทำการเกษตร เกิดการระเหยจากดินและน้ำผิวดินเข้าสู่บรรยากาศและเคลื่อนย้ายจากบรรยากาศกลับมาสู่พื้นดินและแหล่งน้ำ โดยฝนเป็นตัวนำพาลงมาเรียกว่า wet deposition และการเคลื่อนย้ายของไอระเหยหรือฝุ่นละอองขนาดเล็ก (airborne particle) ที่ปนเปื้อนสารกลุ่มออร์กาโนคลอรีนจากบรรยากาศสู่พื้นดินโดยไม่อาศัยน้ำฝน เรียกว่า dry deposition สารเหล่านี้สามารถเข้าสู่สิ่งแวดล้อมและสิ่งมีชีวิตโดยปนเปื้อนในดิน บรรยากาศ พืช ผักผลไม้ เมื่อฝนตกก็จะชะล้างสารเหล่านี้ลงสู่แหล่งน้ำอันเป็นที่อยู่ของสิ่งมีชีวิตในน้ำพวก กุ้ง หอย ปลา ฯลฯ (Zhang et al., 2002) แพลงก์ตอนพืชมักจะสะสมสารกลุ่มออร์กาโนคลอรีนจากน้ำได้ในปริมาณที่สูงมาก (Woodwell, Wurster, & Isacson, 1967; Lepine, Brochu, Milot, Mamer, & Pepin, 1994; กรรณิการ์ ดิษยวงศ์, 2522) สารกลุ่มออร์กาโนคลอรีนในแพลงก์ตอนพืชจะถูกถ่ายทอดสู่แพลงก์ตอนสัตว์และสิ่งมีชีวิตในลำดับที่สูงขึ้น ซึ่งมักจะเป็นแหล่งอาหารที่สำคัญของมนุษย์ (ภาพที่ 2-4)



ภาพที่ 2-4 การแพร่กระจายของสารกลุ่มออร์กาโนคลอรีนในสิ่งแวดล้อม (Percy, 2008)

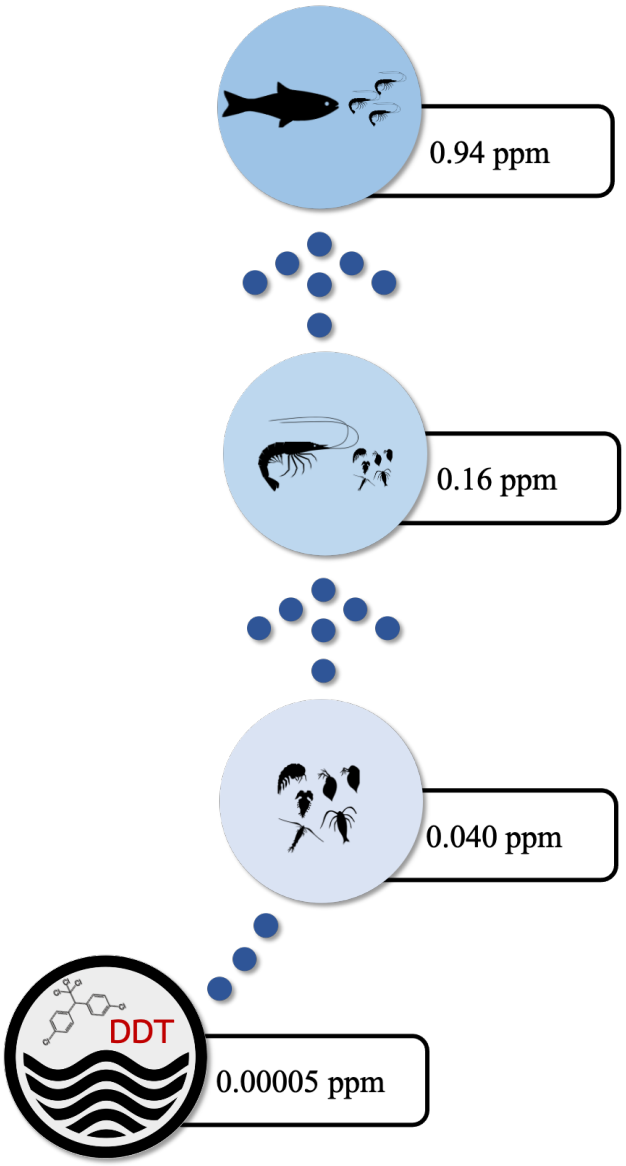
2.4 การสะสมของสารกลุ่มออร์กาโนคลอรีนในห่วงโซ่อาหาร

ความสัมพันธ์ของสิ่งมีชีวิตผ่านการกินในระบบห่วงโซ่อาหาร (food chain) นั้น เป็นปัจจัยสำคัญที่ทำให้สิ่งมีชีวิตได้รับสารพิษเข้าสู่ร่างกาย เนื่องจากอาหารเป็นสิ่งที่จำเป็นและสำคัญในการดำรงชีวิต เป็นทั้งแหล่งพลังงานและสารอาหาร ซึ่งจะถูกส่งต่อเช่นนี้ไปเรื่อย ๆ ตามลำดับขั้น

ของการกิน (trophic level) ในการถ่ายทอดพลังงานตามลำดับขั้นของการบริโภคนั้น สิ่งที่สิ่งมีชีวิตได้รับการถ่ายทอดผ่านห่วงโซ่อาหารและสายใยอาหารไม่ได้มีเพียงแต่สารอาหารเท่านั้น แต่พบว่ายังมีสารอื่นที่ปะปนมาด้วย เช่นในกรณีของสารเคมีกำจัดศัตรูพืชที่ทางผู้วิจัยสนใจศึกษา ได้แก่ สารในกลุ่มออร์กาโนคลอรีน ซึ่งมีความสามารถในการละลายน้ำได้น้อย แต่ละลายได้ดีในไขมันและตัวทำละลายอินทรีย์ สลายตัวค่อนข้างช้า จึงยังพบว่ามีการตกค้างอยู่ในสิ่งแวดล้อม และเมื่อสิ่งมีชีวิตได้รับสารพิษเข้าไป จะเกิดการสะสมอยู่ภายในร่างกาย (bioaccumulation) บริเวณอวัยวะเป้าหมาย ซึ่งจะมีอาการแสดงถึงความเป็นพิษหรือเจ็บป่วยแตกต่างกันออกไปขึ้นอยู่กับปัจจัยต่าง ๆ เช่น ชนิด ความเข้มข้น และระยะเวลาที่ได้รับสารพิษ เป็นต้น อีกทั้งยังพบว่าสารเหล่านี้ไม่ได้ถูกนำไปใช้ในกระบวนการสร้างพลังงานให้แก่เซลล์ จึงทำให้ยังมีการสะสมอยู่ภายในร่างกายของสิ่งมีชีวิต ซึ่งจะเพิ่มระดับความเข้มข้นขึ้นเรื่อย ๆ ตามลำดับขั้นของการกิน (biomagnification) โดยจะมีความเข้มข้นของสารพิษสูงที่สุดในร่างกายของผู้บริโภคลำดับสุดท้าย ซึ่งได้แก่มนุษย์นั่นเอง (Woodwell et al., 1967)

มีงานวิจัยที่รายงานถึงการปนเปื้อนของเอนดริน 0.903 ไมโครกรัมต่อกรัม ในแพลงก์ตอนจากอ่าวไทยตอนบน (ATSDR, 2019) พบว่าบริเวณแม่น้ำสิ่งมีชีวิตจำพวกแพลงก์สามารถสะสมแร่ธาตุและสารพิษได้ในปริมาณมาก อีกทั้งยังเป็นลำดับเริ่มต้นของห่วงโซ่อาหาร จึงมีแนวโน้มที่จะสามารถถ่ายทอดความเป็นพิษมาสู่มนุษย์ผ่านการอาหารกินได้ ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยของ วิภา พรพิพัฒน์ (2522) พบว่าสารกลุ่มออร์กาโนคลอรีนในน้ำ ตะกอนดิน และปลา ในอัตราส่วน 1 : 8,000 : 13,500 ตามลำดับ ซึ่งแสดงให้เห็นว่าสิ่งมีชีวิตสามารถสะสมสารพิษได้มากกว่าสิ่งแวดล้อมหลายพันเท่า การสะสมของสารพิษในห่วงโซ่อาหารนี้สามารถส่งผลกระทบต่อสิ่งมีชีวิตในระดับสูงขึ้น โดยเฉพาะมนุษย์ซึ่งเป็นผู้บริโภคอันดับสูงสุดในโซ่อาหาร มีโอกาสรับสารพิษสูงที่สุด มีการศึกษาที่พบว่า การปนเปื้อนของสารดีดีทีในน้ำ ปริมาณ 0.00005 ppm ส่งผลให้ปริมาณสารดีดีทีที่พบในแพลงก์ตอนมี 0.040 ppm กุ้งซึ่งกินแพลงก์ตอนเป็นอาหาร พบสารดีดีทีในปริมาณ 0.16 ppm และปลาที่กินกุ้งเป็นอาหาร ตรวจพบสารดีดีทีในปริมาณ 0.94 ppm (Woodwell et al., 1967) (ภาพที่ 2-5) ซึ่งจะเห็นได้ว่าระดับความเข้มข้นจะเพิ่มขึ้นเรื่อย ๆ ไปตามลำดับขั้นของการกิน (biomagnification) ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยที่พบในประเทศไทย จากการตรวจสอบการปนเปื้อนของสารกลุ่มออร์กาโนคลอรีน บริเวณแม่น้ำเจ้าพระยา พบดิลดริลในน้ำเพียง 0.09 ppm แต่พบสะสมอยู่ในสัตว์น้ำสูงถึง 0.105 ppm สูงกว่าที่พบในน้ำประมาณ 1000 เท่า (นวลศรี ทยาพัชร,

เสริม สีมา, สาวิตร วรรณพิณ และประยูร ดีมา, 2517) เช่นเดียวกับบริเวณแม่น้ำแม่กลอง (มณเฑียร ส่งเสริม และคณะ, 2540) พบปริมาณดิลดริลในน้ำ 0.07 ppm แต่พบในสัตว์น้ำถึง 0.358 ppm ซึ่งคิดเป็น 5,000 เท่าของปริมาณที่พบในน้ำ เช่นเดียวกับการศึกษาของชลีรัตน์ พะยอมแย้ม (2519) พบว่าการสะสมของสารดีดีที สารดีดีอี และสารดีดีดี ในปลา กุ้ง และนกบริเวณแม่น้ำเจ้าพระยาตอนล่างมีค่าเพิ่มขึ้นตามลำดับห่วงโซ่อาหาร โดยพบสารตกค้างในนกมากกว่าในตัวอย่างปลา 10 เท่า และในปลาตรวจพบมากกว่าในกุ้ง 2 เท่า



ภาพที่ 2-5 การเกิด Biomagnification ของสารดีดีทีในสิ่งมีชีวิต (Woodwell et al.,1967)

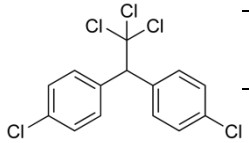
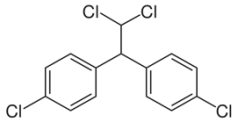
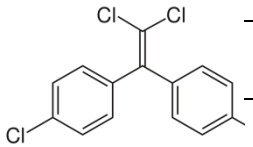
ซึ่งสอดคล้องกับรายงานของกรรณิการ์ ดิษยวงศ์ (2522) พบว่ามีการสะสมของสารกำจัดศัตรูพืชและสัตว์ตามห่วงโซ่อาหารในบริเวณโครงการชลประทานป่าสักใต้ โดยพบว่าการตกค้างของเฮปตาคลอร์ และ พารา,พารา-ดีดีอี เพิ่มมากขึ้นตามชั้นอาหารที่สูงขึ้น และพบว่าน้ำหนักของตัวอย่างมีความสัมพันธ์กับปริมาณของสารพิษ และมีการศึกษาพบว่าในปลา fathead minnow (*Pimephales promelas*) ซึ่งเป็นปลากินพืช อยู่ในแหล่งน้ำที่มีอัลดรินปนเปื้อน เป็นระยะเวลา 2-3 เดือน พบว่าสามารถสะสมอัลดรินในร่างกายได้มากกว่าที่ตรวจพบในน้ำถึง 10,000 เท่า (Herbert & Kearns, 1959)

นอกจากนี้ ยังพบว่าพฤติกรรมการกินอาหารที่แตกต่างกัน ก็มีผลต่อการสะสมสารที่แตกต่างกันด้วย พบการศึกษาสารตกค้างในนกที่กินสัตว์เป็นอาหารมีปริมาณสูงกว่าในนกที่กินพืช (Hoshi, Uchino, Kusanagi, Ihara, & Ueda, 1999) เช่นเดียวกับการศึกษาของ Guzzella และคณะ (2005) พบว่า ในผู้บริโภคอันดับสูงขึ้นไปของห่วงโซ่อาหารของสัตว์ไม่มีกระดูกสันหลังโดยเฉพาะหอยสองฝา สามารถสะสมสารพิษจากอาหารในปริมาณที่มาก โดยมีค่า concentration factor ของสารดีดีทีและสารพีซีบี เท่ากับ 690,000 (Guzzella et al., 2005) รวมถึงการทดสอบความเป็นพิษของสารกลุ่มออร์กาโนคลอรีน ทำได้โดยศึกษาค่าพิษเฉียบพลันของสารที่สะสมอยู่ในสิ่งมีชีวิตในห้องปฏิบัติการ เป็นระยะเวลา 96 ชั่วโมง โดยหาค่าความเข้มข้นที่ทำให้สัตว์ทดลองตายลงครึ่งหนึ่ง (96-hr LC_{50}) ค่า LC_{50} ของสารกลุ่มออร์กาโนคลอรีนในสัตว์น้ำ แสดงอยู่ในตารางที่ 2-4

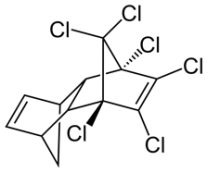
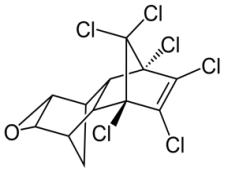
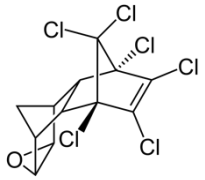
ในสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนมมีการศึกษาถึงรูปแบบการสะสมของสารกลุ่มนี้กันมาก โดยพบว่าสารกลุ่มออร์กาโนคลอรีนสามารถถ่ายทอดผ่านทางน้ำนมเข้าสู่ตัวอ่อนได้ โดยมีการตรวจพบ พารา,พารา-ดีดีที (p,p′-DDT), ออร์โธ, พารา-ดีดีที (o,p′-DDT) และเฮปตาคลอร์ ตกค้างในน้ำนมหญิงชาวจอร์แดน ปริมาณ 0.29, 0.4, 2.04 และ 0.7 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม ตามลำดับ (Alawi, Ammari, & Al-shuraiki, 1992) และในปี 1998 พบว่ายังคงมีการตกค้างของสารกลุ่มออร์กาโนคลอรีนในน้ำนมของหญิงชาวจอร์แดน โดยพารา,พารา-ดีดีอี เป็นสารที่ถูกตรวจพบมากที่สุด 80.30 เปอร์เซ็นต์ (Nasir, Bilto & Al-Shuraiki, 1998) ในสัตว์เพศผู้เพศเมียพบการสะสมที่แตกต่างกัน การศึกษาในตัวอย่างโลมา (*Platanista gangetica*) เพศเมียวัยเจริญพันธุ์ พบว่ามีปริมาณสารตกค้างในไตต่ำกว่าในวัยอื่น คือ 0.01 ไมโครกรัมต่อกรัมของน้ำหนักเปียก ในขณะที่โลมาวัยอ่อน พบปริมาณของสารตกค้างในไต 6.4 ไมโครกรัมต่อกรัมของน้ำหนักเปียก (Kannan, Sinha, Tanabe, Ichihashi, & Tatsukawa, 1993) ซึ่งแสดงให้เห็นว่าในสัตว์เพศเมียมีการส่งผ่านสารพิษที่สะสมไว้ไปยังลูกโดยผ่านทางน้ำนม ส่วนในเพศผู้ปริมาณการตกค้างของสารแปรผันไปตามอายุ ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยในตัวอย่างแมวน้ำเพศเมียในวัยเจริญพันธุ์ พบปริมาณสารพิษจะลดลงอย่างมากเช่นกัน

(Kannan, Tanabe, Giesy, & Tatsukawa, 1997) จากข้อมูลที่กล่าวมานี้แสดงให้เห็นถึงแนวโน้มผลกระทบที่จะเกิดขึ้นกับมนุษย์หากได้รับสารพิษเข้าสู่ร่างกาย เนื่องจากมนุษย์จัดเป็นสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม จึงเป็นหัวข้อศึกษาที่น่าสนใจว่าผลกระทบของสารในกลุ่มนี้อาจส่งผลต่อเด็กที่อยู่ในครรภ์มารดา (Jusko et al., 2006) ซึ่งสามารถสะสมของสารพิษเหล่านี้เอาไว้ได้ จากข้อมูลงานวิจัยที่ผ่านมาที่ได้ศึกษาทางผู้วิจัยจะนำมาใช้เป็นข้อมูลเบื้องต้น ในการเฝ้าระวังมลพิษจากการปนเปื้อนของสารกลุ่มออร์กาโนคลอรีนในสิ่งแวดล้อมและสิ่งมีชีวิตต่อไป

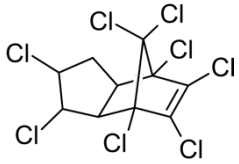
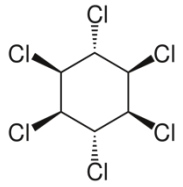
ตารางที่ 2-4 ค่า LC_{50} ของสารกลุ่มออร์กาโนคลอรีนในสัตว์น้ำ

ชื่อสารเคมี	ค่า LC_{50}	สปีชีส์	เวลาทดสอบ	อ้างอิง
DDT ($C_{14}H_9C_{15}$) 	LC_{50} 26 µg/l	ปลาเพิร์ช (*Micrometrus minimus*)	96 ชั่วโมง	Earnest and Benville (1971)
	LC_{50} 21 µg/l	ปลาทอง (*Carassius auratus*)	96 ชั่วโมง	Macek and McAllister (1970)
	LC_{50} 18 µg/l	ปลาแซลมอน (*Oncorhynchus tshawytscha*)	96 ชั่วโมง	Earnest and Benville (1971)
	LC_{50} 20.3 µg/l	ปลา Sheepshead Minnow (*Cyprinodon variegatus*)	96 ชั่วโมง	Keith, Anthony, and Colin (2013)
	LC_{50} 610 µg/l	หอยกาบเปลือกหนา (*Mercenaria mercenaria*)	24 ชั่วโมง	Renault (2011)
DDD ($C_{14}H_{10}C_{14}$) 	LC_{50} 14 µg/l	ปลา Rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*)	96 ชั่วโมง	Johnson and Finley (1980)
	LC_{50} 26 µg/l	ปลาซิวหัวโต (*Pimephales promelas*)	96 ชั่วโมง	Henderson, Pickering, and Tarzwell (1959)
	LC_{50} 23 µg/l	ปลาแซลมอน (*Oncorhynchus tshawytscha*)	96 ชั่วโมง	Henderson et al. (1959)
DDE ($C_{14}H_8C_{14}$) 	LC_{50} 32 µg/l	ปลา Rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*)	96 ชั่วโมง	Henderson et al. (1959)
	LC_{50} 240 µg/l	ปลาบลูกิล (*Lepomis macrochirus*)	96 ชั่วโมง	Henderson et al. (1959)
	LC_{50} 10 mg/l	หอยทากบก (*Potamopyrgus antipodarum*)	96 ชั่วโมง	Abdallah (2016)

ตารางที่ 2-4 (ต่อ)

ชื่อสารเคมี	ค่า LC_{50}	สปีชีส์	เวลาทดสอบ	อ้างอิง
aldrin ($C_{12}H_8Cl_6$) 	LC_{50} 170 µg/l	กุ้งแคระ Red Bee (*caridina africana*)	96 ชั่วโมง	Bello-Olusoji and Adebola (2006)
	LC_{50} 33 µg/l	ปลาซิวหัวโต (*Pimephales promelas*)	96 ชั่วโมง	Henderson et al. (1959)
	LC_{50} 43 µg/l	ปลา Rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*)	96 ชั่วโมง	Henderson et al. (1959)
dieldrin ($C_{12}H_8Cl_6O$) 	LC_{50} 57 µg/l	ปลาหมอเทศ (*Mozambique tilapia*)	96 ชั่วโมง	Henderson et al. (1959); Pickering et al. (1962)
	LC_{50} 6.8 µg/l	ปลาหางนกยูง (*Poecilia reticulate*)	96 ชั่วโมง	Henderson et al. (1959); Pickering et al. (1962)
	LC_{50} 47 µg/l	ปลาซิวหัวโต (*Pimephales promelas*)	96 ชั่วโมง	Henderson et al. (1959); Pickering et al. (1962)
	LC_{50} 15.3 µg/l	ปลา stickleback (*Gasterosteus aculeatus*)	96 ชั่วโมง	Henderson et al. (1959); Pickering et al. (1962)
endrin ($C_{12}H_8C_{16}O$) 	LC_{50} 17 µg/l	ปลาซิวหัวโต (*Pimephales promelas*)	96 ชั่วโมง	Perry, Yamamoto, Ishaaya, and Perry (2012)
	LC_{50} 19.9 mg/kg	ปลาคาร์ป (*Cyprinus carpio*)	96 ชั่วโมง	Keith et al. (2013)
	LC_{50} 47 µg/kg	กุ้งทราย (*Crangon septemspinosa*)	96 ชั่วโมง	McLeese and Metcalfe (1980)

ตารางที่ 2-4 (ต่อ)

ชื่อสารเคมี	ค่า LC_{50}	สปีชีส์	เวลาทดสอบ	อ้างอิง
chlordane ($C_{10}H_6Cl_8$) 	LC_{50} 52 µg/l	ปลาซิวหัวโต (*Pimephales promelas*)	96 ชั่วโมง	Holcombe et al. (1983)
	LC_{50} 22 µg/l	ปลาบลูกิล (*Lepomis macrochirus*)	96 ชั่วโมง	Henderson et al. (1959)
	LC_{50} 22 µg/l	ปลาทอง (*Carassius auratus*)	96 ชั่วโมง	Henderson et al. (1959)
	LC_{50} 36 µg/l	ปลา Sheepshead Minnow (*Cyprinodon variegatus*)	24 ชั่วโมง	Keith et al. (2013)
lindane ($C_6H_6C_{l6}$) 	LC_{50} 2,685 µg/l	หอยแมลงภู่น้ำจืด (*Lamellidens corrianus*)	96 ชั่วโมง	Henderson et al. (1959)
	LC_{50} 32 µg/l	ปลาเทราต์ทะเลสาบ (*Salvelinus namaycush*)	96 ชั่วโมง	Henderson et al. (1959)
	LC_{50} 130 µg/l	ปลาซิวหัวโต (*Pimephales promelas*)	96 ชั่วโมง	Henderson et al. (1959)
	LC_{50} 41 µg/l	ปลาแซลมอน (*Oncorhynchus tshawytscha*)	96 ชั่วโมง	Macek and McAllister (1970)
	LC_{50} 120 µg/l	ปลา Rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*)	96 ชั่วโมง	Macek and McAllister (1970)
	LC_{50} 50 µg/l	ปลา stickleback (*Gasterosteus aculeatus*)	96 ชั่วโมง	Macek and McAllister (1970)
	LC_{50} 131 µg/l	ปลาทอง (*Carassius auratus*)	96 ชั่วโมง	Macek and McAllister (1970)

2.5 พิษวิทยาของสารดีดีที

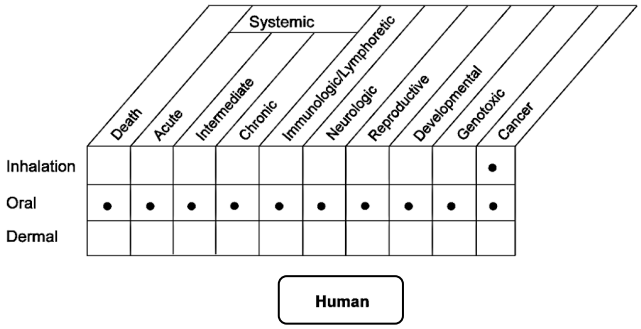
เนื่องจากสารดีดีทีมีคุณสมบัติละลายในไขมันได้ดีในร่างกาย ดังนั้นจึงสามารถรวมตัวกับฟอสโฟลิพิด (phospholipid; PL) ภายในเยื่อหุ้มเซลล์ โดยเฉพาะเซลล์ระบบประสาทหรือเอ็กซอน (exon)ได้ ซึ่ง PL ประกอบด้วย glycerol (phosphoglycerides) ที่มีหมู่ฟอสเฟตจับที่ C 3 และยังมีสารหลายชนิดมาจับ เช่น serine, choline ethanolamine และ inositol ทำให้เกิด PL ที่ชอบน้ำเรียกว่า polar lipid การรวมตัวกันระหว่างสารดีดีทีกับ axon membrane (Lordan, & Tsoupras, 2017)จะส่งผลให้เกิดการรบกวนการส่งกระแสประสาทภายในเซลล์ประสาท โดยจะเกิดการยังยั้งเอนไซม์ ATPase ซึ่งอาศัยไอออนของ Na^+ สารดีดีทีสามารถรวมตัวกับเอนไซม์ ATPase ภายใน synapses ของสมองหนูได้ (Ohyama, Takahashi & Ogawa, 1982) สารดีดีทีเป็นสารกำจัดศัตรูพืชแบบถูกตัว คือสามารถซึมผ่านผิวชั้นนอกซึ่งเป็นไคติน (chitin) เข้าไปยังระบบประสาทของแมลงได้ แต่จะสามารถซึมผ่านผิวหนังของมนุษย์ได้น้อยกว่าผิวของแมลง การดูดซึมของสารจะขึ้นอยู่กับตัวนำพาของตัวทำละลาย ได้แก่ น้ำมันก๊าด น้ำมันเบนซิน และน้ำมันปิโตรเลียม

การได้รับสารพิษแบบเฉียบพลัน (acute oral exposure) ในปริมาณมาก สามารถส่งผลกระทบต่อสิ่งมีชีวิตได้ โดยสารดีดีทีจะเข้าไปทำปฏิกิริยากับระบบประสาทส่วนกลางของมนุษย์และสัตว์ ทำให้เกิดอาการวิงเวียนศีรษะ หน้ามืด และท้องร่วง ต่อมาจึงเกิดอาการอ่อนเพลีย เมื่อยล้า มีอาการสั่นและชักกระตุกของกล้ามเนื้อเป็นแห่ง ๆ หัวใจอาจเต้นช้าและไม่สม่ำเสมอ ถ้าอาการรุนแรงมากอาจส่งผลถึงเสียชีวิตได้ (Hsieh, 1954; Velbinger, 1947a, 1947b) (ภาพที่ 2-6 และภาพที่ 2-7) เนื่องจากพิษของสารดีดีที จะเข้าไปทำลายระบบควบคุมการหายใจ ทำให้เซลล์ขาดออกซิเจน โดยพบว่า สารดีดีที 30 กรัม ต่อน้ำหนักร่างกาย 70 กิโลกรัม (Xu et al., 2016) สามารถทำให้เสียชีวิตได้ แต่ยังน้อยกว่า toxaphene aldrin และ dieldrin ซึ่งพบว่ามีพิษเฉียบพลันร้ายแรงกว่าสารดีดีทีถึง 6 เท่าตัว ผลกระทบของสารดีดีทีต่อสิ่งมีชีวิต ไม่ได้มีเพียงแต่ผลกระทบแบบพิษเฉียบพลันเท่านั้น แต่ยังมีการเกิดพิษระดับปานกลาง (intermediate) และระดับเรื้อรัง (chronic) อีกด้วย (Van Leeuwen, & de Boer, 2008) ซึ่งจะก่อให้เกิดการสะสมในร่ายกาย ส่งผลกระทบต่อเซลล์และเนื้อเยื่อ เป็นที่ยอมรับแล้วว่า สารกลุ่มดีดีทีและอนุพันธุ์ ที่ความเข้มข้น 10 มิลลิกรัมต่อลิตร มีฤทธิ์ในการยับยั้งการนำแคลเซียมจากเลือดบริเวณท่อรังไข่ของนก ใช้ในการสร้างเปลือกไข่ จึงส่งผลให้เปลือกไข่บอบบางและแตกง่าย ฟักไม่เป็นตัวเพราะขาดแคลเซียมคลอไรด์ (Jagannath, Shore, Walker, Ferns, & Gosler, 2007) ด้วยเหตุนี้จึงเป็นอีกปัจจัยหนึ่งที่ส่งผลให้นกบางชนิดสูญพันธุ์ นอกจากนี้สารดีดีทียังมีส่วนในการเปลี่ยนแปลงพฤติกรรมทางเพศการสืบพันธุ์แบบกะเทย (hermaphroditism) เป็นการสืบพันธุ์ที่สัตว์ตัวเดียวสามารถสร้างเซล์สืบพันธุ์ได้ทั้งสเปิร์มและไข่ ในนกกระจอกใหญ่ (*Passer domesticus*) ที่ได้รับสารดีดีที ความเข้มข้น 43.2 มิลลิกรัมต่อกรัม Elwood, William, &

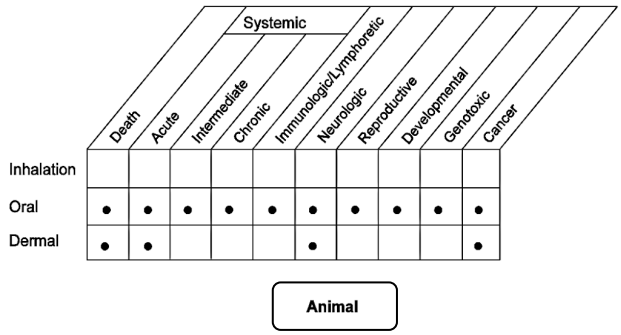
James, 1971) และสิ่งมีชีวิตอื่น ๆ อีกด้วย เช่น กบเสือดาว (*Rana pipiens*) ที่ได้รับสารดีดีที ความเข้มข้น 10 มิลลิกรัมต่อกรัมของน้ำหนักตัว (Axelsson, 2008) เนื่องจากมันมีฤทธิ์คล้ายเอสโตรเจน (estrogen) ในมนุษย์ จึงทำให้เกิดการสร้างโครงสร้างอวัยวะเพศผู้แบบผิดปกติ (ATSDR, 2002)

สารดีดีทียังสามารถเข้าไปรบกวนการสร้างและการใช้พลังงาน ATP อีกด้วย โดยพบว่าสารดีดีทีจะเข้าไปขัดขวางการสลายตัวของกลูโคส ลดการสังเคราะห์ฮอร์โมนอินซูลินในเซลล์ของตับอ่อน และขัดขวางการออกฤทธิ์ของอะดีโนซีนไตรฟอสฟาเตส หรือ ATPase ซึ่งเป็นสาเหตุของอาการเมื่อย อ่อนเพลีย เนื่องจากเซลล์ประสาทและเซลล์กล้ามเนื้อขาด ATP (Janicki & Kinter, 1971) ซึ่งเป็นสารสำคัญที่ให้พลังงานแก่เซลล์นั่นเอง

ส่วนความเป็นพิษแบบ chronic ของสารดีดีที เป็นสาเหตุของการเกิดโรคมะเร็ง มีผู้พบว่าสารดีดีทีเป็นสารก่อมะเร็งของตับ (VoPham et al., 2017) มะเร็งเม็ดเลือดขาว (Flodin, Fredriksson, Persson, & Axelson, 1988) และทำให้เกิดโรคโลหิตจางแบบ aplastic อีกด้วย (Prihartono et al., 2011)



ภาพที่ 2-6 ความเป็นพิษของสารดีดีทีในมนุษย์ (ATSDR, 2002)



ภาพที่ 2-7 ความเป็นพิษของสารดีดีทีในสัตว์ (ATSDR, 2002)

มีการประเมินฤทธิ์ก่อมะเร็งของสารเคมีในคนพบว่าสารดีดีที เป็นสารเคมีที่มีหลักฐานบ่งชี้พอสมควรว่าทำให้คนเป็นมะเร็งได้ (กลุ่ม 2B) (Chaklader, Das, Pereira, Chaudhuri, & Law, 2012) ดังตารางที่ 2-5 แสดงฤทธิ์ก่อมะเร็งของสารกำจัดศัตรูพืชและสัตว์กลุ่มออร์กาโนคลอรีน และอวัยวะที่เสี่ยงต่อการเป็นมะเร็งในคนโดยองค์การวิจัยโรคมะเร็งระหว่างประเทศ : IARC international agency research on cancer ได้แบ่งระดับการประเมินฤทธิ์ก่อมะเร็งของสารเคมีในคนเป็น 5 กลุ่ม ดังนี้

กลุ่ม 1 : สารเคมีที่มีหลักฐานบ่งชี้แน่ชัดว่าทำให้คนเป็นมะเร็งได้

กลุ่ม 2A : สารเคมีที่มีหลักฐานบ่งชี้ค่อนข้างแน่ชัดว่าทำให้คนเป็นมะเร็งได้

กลุ่ม 2B : สารเคมีที่มีหลักฐานบ่งชี้พอสมควรว่าทำให้คนเป็นมะเร็งได้

กลุ่ม 3 : สารเคมีที่ยังไม่สามารถบ่งชี้ว่าทำให้คนเป็นมะเร็งได้

กลุ่ม 4 : สารเคมีที่มีหลักฐานว่าไม่ทำให้คนเป็นมะเร็งได้

ตารางที่ 2-5 ฤทธิ์ก่อมะเร็งของสารกลุ่มออร์กาโนคลอรีนและอวัยวะที่เสี่ยงต่อการเป็นมะเร็งในคน (สุภาณี พิมพ์สมาน, 2537)

ชนิดสาร	กลุ่มฤทธิ์ก่อมะเร็ง	อวัยวะที่เสี่ยงต่อการเป็นมะเร็ง
DDT	2B	ปอด ตับ และเม็ดเลือดขาว
aldrin	3	ตับ
chlordane	3	ตับ
heptachlor	3	ตับ
dieldrin	3	ตับ
BHC	2B	ตับ และเม็ดเลือดขาว
methoxychlor	3	ตับ
toxaphene	2B	ตับ เม็ดเลือดขาว และต่อมไทรอยด์

2.6 การปนเปื้อนของสารกลุ่มออร์กาโนคลอรีน

สารกลุ่มออร์กาโนคลอรีน มีคุณสมบัติในการละลายน้ำได้น้อย มีความคงตัวและสลายตัวค่อนข้างยาก จึงทำให้มีการแพร่กระจายไปสู่แหล่งน้ำต่าง ๆ ได้อย่างทั่วถึง ผ่านการชะล้างหน้าดินบริเวณพื้นที่ที่ทำการเกษตรกรรม และในที่สุดก็จะไปสะสมอยู่ในสิ่งมีชีวิต ก่อให้เกิด

ผลกระทบต่อสิ่งแวดล้อมอย่างกว้างขวาง ทั้งทางตรงและทางอ้อม จะเห็นได้จากรายงานการตรวจพบสารกลุ่มออร์กาโนคลอรีน โดยเฉพาะสารดีดีทีในสิ่งแวดล้อมและสิ่งมีชีวิตจากบริเวณต่าง ๆ ทั่วโลก (ตารางที่ 2-6) ดังนั้นการศึกษาสารเคมีตกค้างในตะกอนดิน และน้ำ ของบริเวณที่มีการทำเกษตรกรรมจึงเป็นสิ่งสำคัญเพื่อเป็นแนวทางในการจัดการทรัพยากรดินและน้ำในการทำการเกษตรในอนาคตต่อไป ด้วยการตระหนักถึงผลกระทบที่ตามมาจากการใช้สารเคมีในการกำจัดศัตรูพืช โดยเฉพาะอย่างยิ่งจากบริเวณชายฝั่งทะเลภาคตะวันออก ซึ่งเป็นแหล่งอุตสาหกรรม ภาคการเกษตรที่ให้ผลผลิตทางการเกษตรค่อนข้างสูง และยังเป็นแหล่งเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำที่สำคัญของประเทศไทยอีกด้วย ทางผู้วิจัยจึงมีความสนใจที่จะเลือกพื้นที่นี้เป็นพื้นที่ศึกษาการสะสมของสารกำจัดศัตรูพืชกลุ่มออร์กาโนคลอรีนในสิ่งแวดล้อม โดยพบว่างานวิจัยที่ผ่านมา มีรายงานถึงการสะสมของสารดีดีทีบริเวณลุ่มน้ำย่อยในจังหวัดชลบุรี ในปี พ.ศ. 2531-2532 พบการปนเปื้อนค่อนข้างสูง คือ 37 นาโนกรัมต่อลิตร (ก่องกนก เมนะรุจิ, 2539) ต่อมาในปี พ.ศ. 2540 มีรายงานการตรวจพบสารดีดีทีในหอยแมลงภู่ (*P. viridis*) บริเวณชายฝั่งทะเลท่าเรือบ้านเพ จังหวัดระยอง ในปริมาณ 38 นาโนกรัมต่อกรัมของน้ำหนักเปียก (Kannan et al., 1977) 0.11-2.6 นาโนกรัมต่อกรัมของน้ำหนักเปียก การศึกษาของกิตติวดี ดวงแก้ว (2546) โดยทำการศึกษาในหอยแมลงภู่บริเวณอ่างศิลา จังหวัดชลบุรี ในปี พ.ศ. 2544 พบปริมาณสารดีดีที อยู่ในช่วง 5.85-19.29 นาโนกรัมต่อกรัมของน้ำหนักแห้ง เช่นเดียวกับการศึกษาของปิยะวรรณ ศรีวิลาศ (2545) ที่ศึกษาในหอยแมลงภู่บริเวณอ่างศิลา จังหวัดชลบุรีเช่นเดียวกัน พบปริมาณสารดีดีที อยู่ในช่วง 2.70-94.10 นาโนกรัมต่อกรัมของน้ำหนักแห้ง

มีการศึกษาปริมาณของสารดีดีทีในหอยแมลงภู่ตามแนวชายฝั่งทะเลของประเทศไทย ในหลายปีที่ผ่านมา พบว่า ในปี พ.ศ. 2532 พบปริมาณสารดีดีที อยู่ในช่วง 0.39-7.41 นาโนกรัมต่อกรัมของน้ำหนักเปียก (Siriwong et al., 2009) ปี พ.ศ. 2534 พบปริมาณสารดีดีที อยู่ในช่วง 0.74-5.38 นาโนกรัมต่อกรัมของน้ำหนักเปียก (Ruangwises & Saipan, 2009) ปี พ.ศ. 2537 พบปริมาณสารดีดีที อยู่ในช่วง 1.30-38.0 นาโนกรัมต่อกรัมของน้ำหนักเปียก (Kan-Atireklap, Tanabe, & Sanguansin, 1997) ปี พ.ศ. 2538 พบปริมาณสารดีดีที อยู่ในช่วง n.d.-4.6 นาโนกรัมต่อกรัมของน้ำหนักเปียก ต่อมาในปี พ.ศ. 2542 พบปริมาณการปนเปื้อนของสารดีดีทีในหอยแครง (*Anadara sp. Linnaeus)* และหอยนางรม (*Saccostrea sp.)* จากแหล่งเพาะเลี้ยงจังหวัดจันทบุรี บริเวณแม่น้ำจันทบุรี สถานีคลองขลุง ในเดือนสิงหาคม พ.ศ. 2542 พบว่าในหอยแครงตรวจพบสารดีดีทีในปริมาณ 0.003 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม และในหอยนางรมตรวจพบสารดีดีทีในปริมาณ 0.0056 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม ซึ่งในงานวิจัยที่มีการรายงานถึงการสะสมของสารออร์กาโนคลอรีนล่าสุด ปี พ.ศ. 2549 พบเฮปตาคลอร์และเอนโดซัลแฟน-ซัลเฟตในดินตะกอนแถบชายฝั่งทะเลภาคตะวันออกของประเทศไทย มี

ปริมาณอยู่ระหว่าง 7-11 ไมโครกรัมต่อกิโลกรัม และ 12-16 ไมโครกรัมต่อกิโลกรัม ตามลำดับ (ปิยะวรรณ ศรีวิลาศ และกานดา ใจดี, 2549) แสดงให้เห็นว่า แม้ปัจจุบันแทบจะไม่มีการนำสารกำจัดศัตรูพืชกลุ่มออร์กาโนคลอรีนมาใช้ในทางเกษตรกรรมแล้ว แต่ก็ยังคงมีการตรวจพบสารกำจัดศัตรูพืชกลุ่มนี้ปนเปื้อนในสิ่งแวดล้อม ไม่ว่าจะเป็น ดิน น้ำ และสิ่งมีชีวิตต่าง ๆ อยู่ เนื่องจากสารเคมีกลุ่มนี้มีการสลายตัวค่อนข้างช้า สามารถตกค้างในสิ่งแวดล้อม ตลอดจนห่วงโซ่อาหารของสิ่งมีชีวิต โดยเฉพาะมนุษย์ซึ่งเป็นลำดับสูงสุดของห่วงโซ่อาหาร

ตารางที่ 2-6 การตรวจพบสารดีดีทีในสิ่งแวดล้อมและสิ่งมีชีวิตจากบริเวณต่าง ๆ ทั่วโลก

ปี	ประเทศ	สถานี	ตัวอย่าง	DDT (µg/kg dw)	อ้างอิง
สัตว์น้ำจืด (freshwater organism)					
1995	Italy	Po River	ปลาคาร์พ (*Barbus plebejus*)	174	Viganò, Arillo, Bottero, Massari, and Mandich (2001)
2000	Germany	Rhine River	ปลาไหล (*Anguilla anguilla*)	75	Jürgens, Chaemfa, Hughes, Johnson, and Jones (2015)
2003	Spain	Ebro River	ปลาไน (*Cyprinus carpio*)	983	Lacorte et al. (2006)
2003	Spain	Ebro River	ปลา bleak (*Alburnus alburnus*)	487	Lacorte et al. (2006)
2004	Italy	Lake Maggiore	ปลากะพงขาว (*Perca fluviatilis*)	250	Bettinetti, Croce, Galassi, and Volta (2006)
2007	Scotland	Thames river	ปลาไหล (*Anguilla anguilla*)	186	Jürgens et al. (2015)
2008	Bangladesh	Bay of Bengal	ปลาดาบเงิน (*Largehead hairtail*)	556.3	Bhuiyan, Bhuiyan, Nath, and Ahmed (2009)
2008	Bangladesh	Bay of Bengal	ปลา bombay duck (*Harpadon nehereus*)	257.2	Bhuiyan et al. (2009)
2008	Bangladesh	Bay of Bengal	ปลา hilsa (*Tenualosa ilisha*)	279.1	Bhuiyan et al. (2009)
2012	UK	Thames River	ปลา roach (*Rutilus rutilus*)	88	Jürgens et al. (2015)
2012	Poland	Vistula River	ปลากะพง (*Abramis brama*)	121	Niewiadowska, Kiljanek, Semeniuk, and Zmudzki (2014)
2013	China	Taizhou	ปลาหมู (*Misgurnus anguillicaudatus*)	112	Nan et al. (2015)
2018	Thailand	Bangkok	กุ้งขาวแปซิฟิก (*Litopenaeus vannamei*)	10	Wittayanan, Srikote, and Chaimongkol (2019)

ตารางที่ 2-6 (ต่อ)

ปี	ประเทศ	สถานี	ตัวอย่าง	DDT (ng/g ww)	อ้างอิง
หอยสองฝา (bivalve)					
1986	Hong Kong	Coastal of Hong Kong	หอยแมลงภู่ green mussel (*Perna viridis*)	520	Phillips (1989)
1991	Germany	South West Baltic Sea	หอยแมลงภู่ blue mussel (*Mytilus edulis*)	18	Lee, Kruse, and Wassermann (1996)
1993	USA	South of America	หอยแมลงภู่ blue mussel (*Mytilus edulis*)	960	Sericano, Wade, Sweet, Ramirez, and Lauenstein (2014)
1995	India	Chennai Tamilnadu	หอยแมลงภู่ green mussel (*Perna viridis*)	40	Kan-atireklap et al. (1997)
1996	Brazil	Guanabara Bay	หอยแมลงภู่ green mussel (*Perna viridis*)	10	de Brito and Bruning (2002)
1997	Vietnam	Thi Nai (Aquaculture)	หอยแมลงภู่ green mussel (*Perna viridis*)	310	Monirith et al. (2003)
1997	Thailand	Ban Phe, Rayong	หอยแมลงภู่ green mussel (*Perna viridis*)	38	Tanabe, Prudente, Kan-atireklap, and Subramanian (2000)
1997	Thailand	Phang Nga	หอยแมลงภู่ green mussel (*Perna viridis*)	14	Tanabe et al. (2000)
1998	Japan	Tokyo Bay	หอยแมลงภู่ (*Mytilus gallorovincialis*)	8	Ueno et al. (2001)
1998	Taiwan	Eastern Coast	หอยนางรมแปซิฟิก (*Crassostrea gigas*)	54	Han et al. (2000)
1998	India	Subarnarekha, Orissa	หอยแมลงภู่ green mussel (*Perna viridis*)	15	Monirith et al. (2003)
1998	Hong Kong	Coastal of Hong Kong	หอยแมลงภู่ green mussel (*Perna viridis*)	1,000	Monirith et al. (2003)

ตารางที่ 2-6 (ต่อ)

ปี	ประเทศ	สถานี	ตัวอย่าง	DDT (ng/g ww)	อ้างอิง
หอยสองฝา (bivalve) (ต่อ)					
1999	China	Xiamen Long Hai	หอยแมลงภู่ green mussel (*Perna viridis*)	200	Klumpp, Huasheng, Humphrey, Xinhong, and Codi (2002)
2001	China	Fuzhou Lian Jian	หอยแมลงภู่ green mussel (*Perna viridis*)	630	Monirith et al. (2003)
2001	Thailand	Songkhla lake	ปลาหมอม้าลาย (*Zonichtys nigrofasciata*)	20	Kumblad, Olsson, Koutny, and Berg (2001)
2013	China	Taizhou	หอยแมลงภู่ green mussel (*Perna viridis*)	10.5	Nan (2015)
ปี	ประเทศ	สถานี	ตัวอย่าง	DDT (ng/g ww)	อ้างอิง
ครัสเตเชียน (crustaceans)					
2013	China	Taizhou	ปูทะเล (*Scylla serrata*)	49.8	Nan (2015)
ปี	ประเทศ	สถานี	ตัวอย่าง	DDT (ng/g dw)	อ้างอิง
ตะกอนดิน (sediment)					
2003	Spain	Ebro river	Sediment	20.6	Lacorte et al. (2006)
2003	Thailand	Mae Klong river	Sediment	1,830	Poolpak, Pokethitiyook, Kruatrachue, Arjarasirikoon, and Thanwaniwat (2008)
2004	Vietnam	Ha Long Bay	Sediment	274	Hong et al. (2008)

ตารางที่ 2-6 (ต่อ)

ปี	ประเทศ	สถานี	ตัวอย่าง	DDT (ng/L)	อ้างอิง
ตะกอนดิน (sediment) (ต่อ)					
2016	Ethiopia	Akaki river	Sediment	38.06	Kassegne et al. (2020)
2018	Rwanda	Nyabugogo river	Sediment	120	Umulisa et al. (2020)
ปี	ประเทศ	สถานี	ตัวอย่าง	DDT (ng/L)	อ้างอิง
น้ำ (water) (ต่อ)					
1988	Thailand	Chonburi	water	37	ก่องกนก เมนะรุจิ (2539)
1996	Spain	Ebro river	water	6.77	Fernández, Alonso, González, and Hernández (1999)
2006	China	Peacock river	Water	176	Chen (2010)
2003	Tanzania	Fiji river	Water	120	Mwevura, Kylin, Vogt, and Bouwman (2021)
2006	Egypt	Lake burullus	Water	726.77	Said, El Moselhy, Rashad, and Shreadah (2008)
2006	South Africa	Jukskei river	Water	3,250	Sibali, Okonkwo, and Zvinowanda (2009)
2016	Ethiopia	Akaki river (Lafto bridge)	Water	91.75	Kassegne et al. (2020)

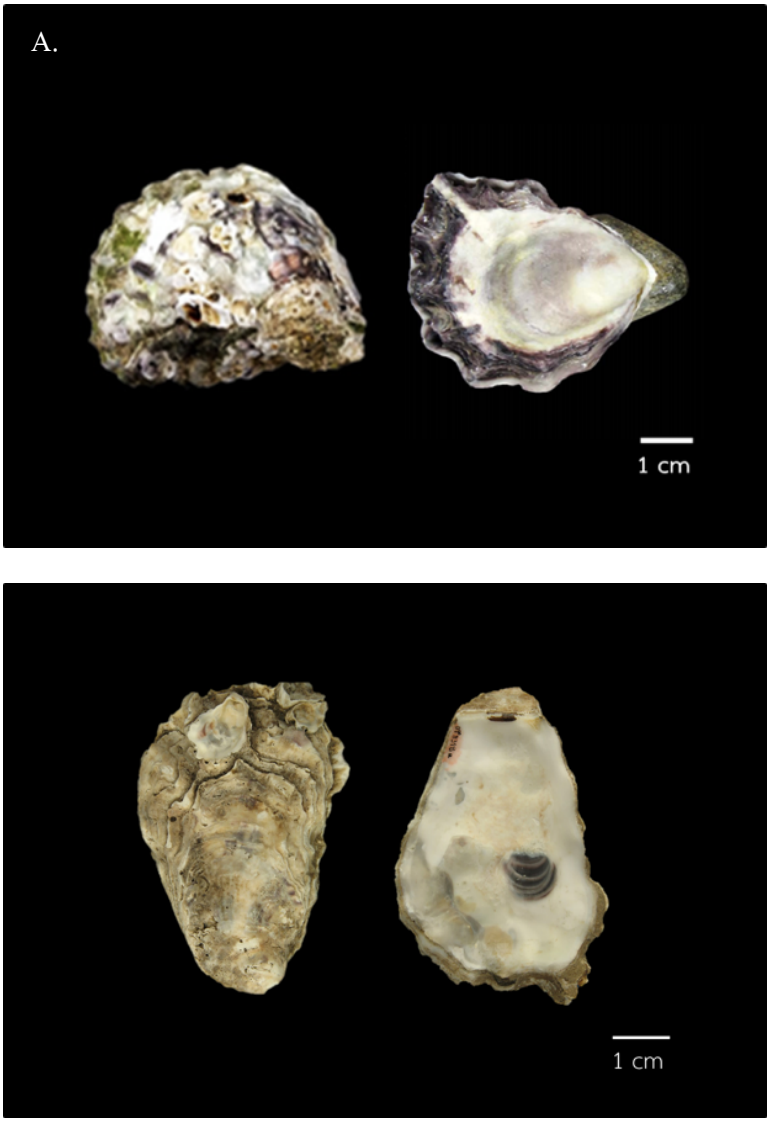
2.7 ข้อมูลทั่วไปของหอยนางรม

หอยนางรมเป็นสัตว์เศรษฐกิจโดยเฉพาะทางแถบชายฝั่งทะเลภาคตะวันออก ได้แก่ จังหวัดจันทบุรี ตราด และชลบุรี ภาคใต้ ได้แก่สุราษฎร์ธานี สงขลา ภูเก็ต เป็นต้น ดำรงชีวิตด้วยการเกาะอยู่กับที่โดยไม่มีการเคลื่อนที่อีกตลอดชีวิต ด้วยเหตุนี้หอยนางรมจึงไม่มีเท้า (foot) เหมือนกับหอยสองฝาชนิดอื่น ๆ หอยนางรมที่พบมากตามแถบชายฝั่งอ่าวไทยในประเทศไทย มี 2 กลุ่มใหญ่ คือ หอยนางรมปากจีบ (*Saccostrea* sp.) กับ หอยตะโกรม (*Crassostrea* sp.) (ภาพที่ 2-8) สำหรับชายฝั่งทะเลทางภาคตะวันออก พบหอยนางรมอยู่ 2 ชนิด คือ หอยนางรมปากจีบ (*Saccostrea cucullata*) และหอยตะโกรมกรามดำ (*Crassostrea iredalie*) โดยเฉพาะในเขตพื้นที่ในการศึกษาครั้งนี้คือ แถบชายฝั่งทะเลภาคตะวันออก ที่พบมากที่สุด คือ หอยนางรมปากจีบ จึงเหมาะสมต่อการนำมาเป็นตัวอย่างประชากรสัตว์น้ำในการศึกษาทางด้านพิษวิทยาทางสิ่งแวดล้อมบริเวณพื้นที่หอยนางรมอาศัยอยู่ ดังที่กล่าวไว้ข้างต้นแล้วว่า เมื่อหอยนางรมโตเต็มวัยมักเกาะติดอยู่กับที่ ไม่เคลื่อนที่ตลอดช่วงชีวิตของมัน

2.7.1 ชีววิทยาหอยนางรมปากจีบ

หอยนางรมปากจีบจัดอยู่ในกลุ่มของหอยสองฝา (bivalvia) อยู่ใน Phylum Mollusca พบมากบริเวณที่มีน้ำขึ้นน้ำลงอยู่เป็นประจำ (tidal current) เช่น บริเวณปากแม่น้ำ หรือชายฝั่งทะเลที่มีกระแสน้ำหมุนเวียนถ่ายเทตลอดเวลา อาศัยอยู่ได้ทั้งในน้ำเค็มและน้ำกร่อย (Loosanoff & Nomejko, 1946) เปลือกของหอยนางรมประกอบด้วยแคลเซียมคาร์บอเนต ($CaCO_3$) ร้อยละ 95 โครงสร้างเปลือกค่อนข้างหนา (Hamester, Balzer, & Becker, 2012) โดยเปลือกด้านส่วนเปลือกบนจะมีลักษณะแบนราบ เกาะติดกับโขดหิน หรือวัสดุที่ใช้ยึดติดกับเปลือก เช่น ไม้หลัก หรือแท่งเสาปูน ในกรณีที่เป็นฟาร์มเพาะเลี้ยง ส่วนเปลือกล่างจะมีลักษณะเว้าลึกลงไปคล้ายรูปถ้วย ซึ่งรูปร่างเปลือกของหอยนางรมจะขึ้นอยู่กับปัจจัยทางสภาพแวดล้อมที่หอยนางรมอาศัยอยู่ (Mizuta & Wikfors, 2018) เช่น หากเจริญเติบโตอยู่บนวัสดุที่มีพื้นที่กว้าง เปลือกจะสามารถแผ่ขยายไปตามพื้นผิววัสดุ ทำให้ตัวแบนไม่เป็นรูปถ้วย ในขณะเดียวกัน หากอาศัยอยู่กันเป็นกลุ่มอย่างหนาแน่น รูปร่างของเปลือกจะมีลักษณะที่บิดงอ ซึ่งเป็นปัจจัยสำคัญอย่างหนึ่ง ที่ผู้เพาะเลี้ยงหอยนางรมควรคำนึงถึง

เนื่องจากหอยนางรมเป็นอาหารทะเลที่มีคุณค่าทางโภชนาการสูง สารอาหารที่พบในหอยนางรม ได้แก่ โปรตีน ไกลโคเจน ไขมัน แร่ธาตุ และน้ำ (Berthelin, Kellner, & Mathieu, 2000) มีรสชาติอร่อยสามารถนำมารับประทานสด ๆ หรือนำไปประกอบอาหารได้หลายชนิด จึงทำให้เป็นที่นิยมบริโภคกันโดยทั่วไป หอยนางรมอาศัยอยู่ทั้งในน้ำกร่อยและในทะเล พบมากบริเวณที่มีน้ำขึ้นน้ำลงอยู่เป็นประจำ

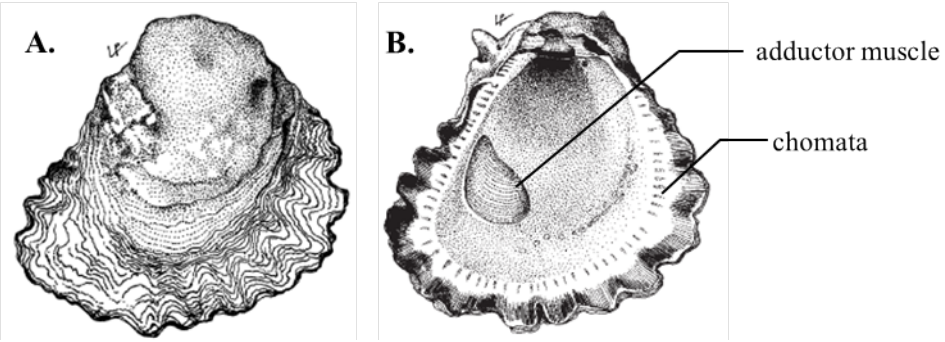


ภาพที่ 2-8 สัณฐานวิทยาของเปลือก (A.) หอยนางรมปากจีบ และ (B.) หอยตะโกรมกรามดำ

2.7.2 ลักษณะเปลือกของหอยนางรมปากจีบ

หอยนางรมปากจีบเป็นหอยสองฝา มีเปลือกหนา และเปลือกทั้งสองด้านมีขนาดไม่เท่ากัน โดยเปลือกด้านซ้ายเป็นเปลือกที่อยู่ด้านล่างจะเว้าลึกเป็นที่รองรับลำตัวของหอย ส่วนเปลือกด้านขวาเป็นเปลือกที่อยู่ด้านบนจะมีลักษณะค่อนข้างแบนและเรียบ เปลือกสองข้างถูกยึดติดกันด้วย hinge ligament ทำให้มีลักษณะคล้ายบานพับ ส่วนยอดสุดจะโค้งมนเรียกว่า umbo (Christo, Absher, & Boehs, 2010) ขอบเปลือกมีรอยหยักไม่สม่ำเสมอ ทำให้ขอบเปลือกมีลักษณะเป็นจีบ เปลือกอาจมีลักษณะแตกต่างกันไปเล็กน้อย ขึ้นอยู่กับอิทธิพลของพื้นที่ที่หอยยึดเกาะ ความแรงของ

คลื่นที่กระทบหาดหิน และปริมาณอาหารและแร่ธาตุในน้ำทะเล เปลือกด้านนอกมีสีขาวคล้ำ ขอบเปลือกมีสีม่วงเข้ม (ภาพที่ 2-9A) บริเวณนี้จะพบ chomata เรียงเป็นแนวยาวใกล้กับขอบเปลือกด้านใน ลักษณะสีของเปลือกด้านในเป็นสีขาวครีม พบรอยกล้ามเนื้อยึดเปลือก (adductor muscle) เป็นรูปไตและมีสีเข้มอยู่บริเวณด้านท้ายของเปลือก (Amaral & Simone, 2016) (ภาพที่ 2-9B) ซึ่งจะช่วยในการเปิด-ปิดเปลือกได้อย่างสมบูรณ์



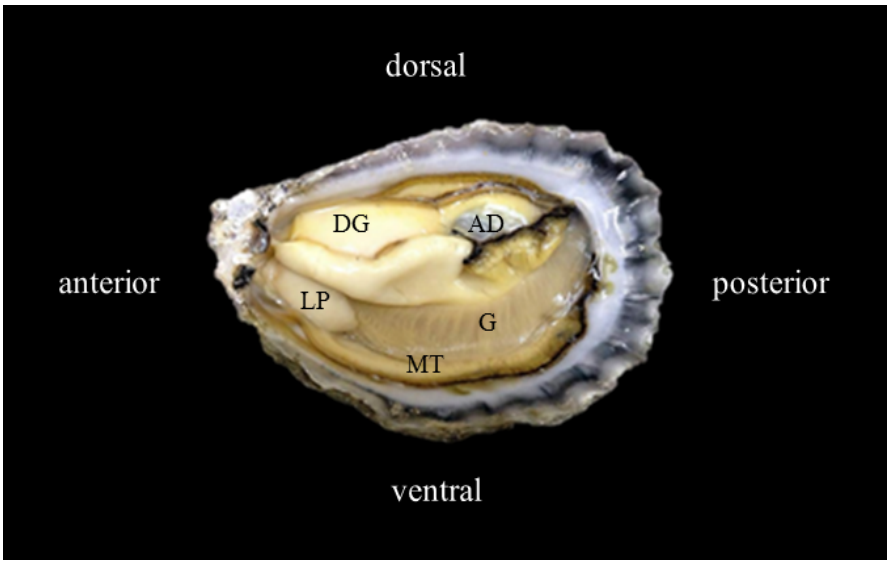
ภาพที่ 2-9 ลักษณะภายในของเปลือกด้านซ้าย (A) และลักษณะภายนอกของเปลือกด้านขวา (B) (Galtsoff, 1964)

2.7.3 ลักษณะทั่วไปภายในเปลือกของหอยนางรมปากจีบ

ภายในเปลือกของหอยนางรมปากจีบ ประกอบด้วยลำตัวของหอยมีเนื้อเยื่อบาง ๆ ห่อหุ้มตัวทั้งสองข้าง เรียกว่าแมนเทิล (mantle) มีลักษณะเป็นแผ่นบางแผ่คลุมถึงช่องปากและ labial palp เหงือกเป็นอวัยวะที่ใช้กรองอาหารมีอยู่ 2 คู่ หรือ 4 แถว (ภาพที่ 2-10) กินอาหารโดยการกรองอาหารจากน้ำ โดยน้ำจะไหลผ่านเข้ามาในช่องแมนเทิล ผ่านเหงือกและออกไปทางท่อน้ำออก อาหารต่าง ๆ ที่พัดพามากับน้ำ ก็จะติดอยู่บนซี่เหงือก อาหารที่มีขนาดใหญ่จะตกลงในช่องแมนเทิลตอนล่างและถูกขับออกทางท่อน้ำออก หอยนางรมมีประสิทธิภาพในการกรองอาหาร (Ehrich & Harris, 2015) โดยเฉพาะอาหารที่มีอนุภาคขนาดเล็กจะมีเมือกมาปกคลุมและมี cilia คอยโบกพัดให้อนุภาคเหล่านี้เข้าสู่ทางเดินอาหาร เหงือกนอกจากจะทำหน้าที่เป็นอวัยวะที่ใช้กรองอาหารจากน้ำแล้วยังทำหน้าที่ในการหายใจและช่วยในการขับถ่ายของเสียออกจากร่างกาย บริเวณกึ่งกลางลำตัวมีกล้ามเนื้อยึดเปลือก (adductor muscle) ซึ่งทำหน้าที่ช่วยปิดและเปิดเปลือก ส่วนต่อไปเป็นลำตัวที่รวมอวัยวะต่าง ๆ อยู่ภายใน ได้แก่ ระบบประสาท ระบบขับถ่ายของเสีย ระบบเลือด และระบบ

สืบพันธุ์ อวัยวะสืบพันธุ์จะเห็นเป็นเนื้อสีขาวปกคลุมกระเพาะอาหาร (สถาบันวิจัยทรัพยากรทางน้ำ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย, 2546) มีการศึกษาลักษณะโครงสร้างเซลล์บริเวณชั้นผิวของเนื้อเยื่อแมนเทิลของหอยนางรมปากจีบ มีลักษณะเป็นเยื่อบุผิวชั้นเดียวชนิด pseudostratified columnar epithelium ที่ประกอบด้วยเซลล์รูปทรงกระบอกสูงจัดเรียงตัวกันเป็นชั้นเดียว แต่มีลักษณะเหมือนกับมีหลายชั้น เนื่องจากเซลล์อยู่ชิดติดกันจนทำให้ดูเหมือนมีหลายชั้น ซึ่งบริเวณนี้จะพบเซลล์สร้างเมือก (mucous cell) แทรกอยู่ตลอดความยาวของเนื้อเยื่อแมนเทิล สอดคล้องกับรายงานการศึกษาในหอยมุก (*Pinctada margaritifera*) (Jabbour-Zahab, Chagot, Blanc, & Grizel, 1992) และหอยแมลงภู่สีน้ำตาล (*Perna indica*) (Sunil, 2015) ที่พบเยื่อบุผิวชั้นเดียวชนิด pseudostratified columnar epithelium บริเวณผิวของเนื้อเยื่อแมนเทิล

หอยนางรมปากจีบดำรงชีวิตอยู่ได้โดยการดูดน้ำรอบ ๆ ตัวเข้าไปทางด้านหนึ่งและปล่อยทิ้งออกอีกด้านหนึ่ง อาหารและก๊าซออกซิเจนจะเข้าไปพร้อมกับน้ำ (Ehrich & Harris, 2015) อาหารของหอยนางรมปากจีบ ได้แก่ แพลงก์ตอนพืชและแพลงก์ตอนสัตว์ที่ล่องลอยอยู่ในน้ำ หอยนางรมปากจีบเป็นสัตว์ที่มีเพศผู้และเพศเมียแยกกัน ในช่วงที่มีการผสมพันธุ์หอยตัวเมียจะปล่อยไข่ และหอยตัวผู้จะปล่อยน้ำเชื้อออกปฏิสนธิกันในน้ำ เป็นการผสมพันธุ์แบบภายนอกตัว (Lane et al., 1985)

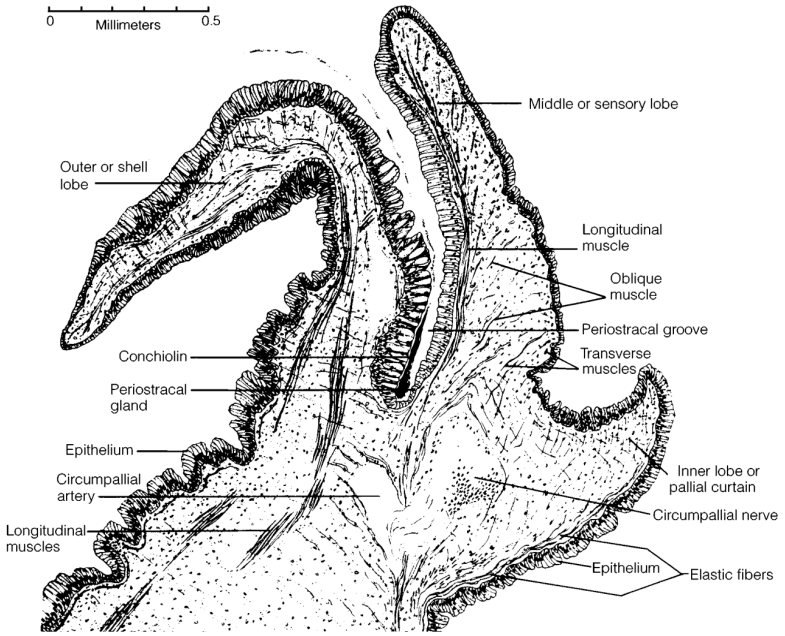


ภาพที่ 2-10 กายวิภาคอวัยวะภายในของหอยนางรมปากจีบ *Saccostrea cucullata* ประกอบด้วย LP = เลเบียลพัลพ์ (labial palp) DG = ต่อมย่อยอาหาร (digestive gland) G = เหงือก (gill) MT = แมนเทิล (mantle) AD = กล้ามเนื้อยึดเปลือก (adductor muscle)

2.7.4 อวัยวะของหอยนางรมปากจีบ

แมนเทิล (mantle)

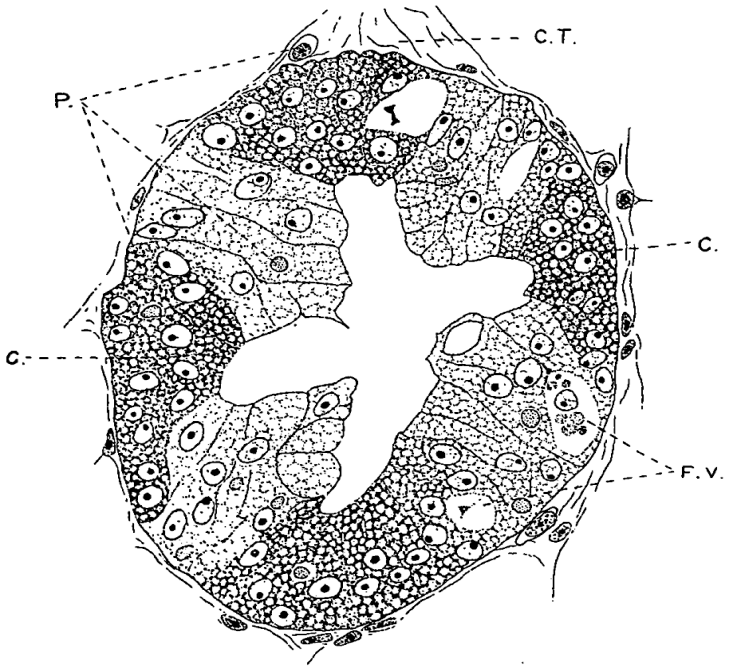
แมนเทิลเป็นอวัยวะที่ทำหน้าที่ปกคลุมตัวหอยทั้งหมด มีหน้าที่หลักในการสร้างเปลือกและสร้างเมือกปกคลุมร่างกายเพื่อป้องกันตนเองเมื่อถูกรบกวนจากสิ่งแวดล้อมภายนอก เนื้อเยื่อแมนเทิลประกอบด้วยเนื้อเยื่อบุผิวชั้นเดียวแบบ pseudostratified columnar epithelium (Sunil, 2015) ตั้งอยู่บน basement membrane ใต้ basement membrane จะพบเนื้อเยื่อเกี่ยวพันซึ่งประกอบด้วยเซลล์ขนาดใหญ่ พบแอ่งเลือด (blood sinus) กระจายอยู่ทั่วไป และอาจพบมัดกล้ามเนื้อ หลอดเลือด และระบบประสาทแทรกอยู่ภายในเนื้อเยื่อเกี่ยวพันด้วย ขอบล่างของแมนเทิลในหอยสองฝาจะแบ่งออกเป็น 3 ส่วน (ภาพที่ 2-11) นับจากด้านนอกสุดส่วนที่ติดกับเปลือกเข้ามาในลำตัว คือ outer fold ทำหน้าที่สร้างเปลือกเพื่อห่อหุ้มร่างกาย middle fold ทำหน้าที่รับความรู้สึก (sensory) (Audino, Marian, Wanninger, & Lopes, 2015) มักจะพบ cilia อยู่บริเวณนี้ค่อนข้างหนาแน่น และ inner fold เป็นส่วนที่พบกล้ามเนื้อ (muscle fiber) ที่ทำหน้าที่ช่วยในการยืดและหดตัว เพื่อให้เกิดการเคลื่อนไหวของกล้ามเนื้อ แมนเทิลจะมีการหลั่งเมือก เนื่องจากมีเซลล์ที่เรียกว่า mucous cell แทรกอยู่ทั่วไป ซึ่งเกี่ยวข้องกับกระบวนการป้องกันตัวเองจากอันตรายที่ได้รับจากสารเคมีหรือสิ่งแวดล้อมภายนอก (defensive mechanism)



ภาพที่ 2-11 องค์ประกอบแมนเทิลของหอยนางรม (Galtsoff, 1964)

ต่อมย่อยอาหาร (digestive gland)

ต่อมย่อยอาหารเป็นอวัยวะที่อยู่ล้อมรอบกระเพาะอาหาร โครงสร้างของต่อมย่อยอาหารประกอบด้วย ท่อรวม (collecting duct) เป็นท่อขนาดใหญ่ที่แตกแขนงออกกลายเป็นท่อขนาดเล็กลง บริเวณส่วนปลายของท่อตันและโป่งออกมีลักษณะคล้ายถุง เรียกว่า digestive diverticulum (ภาพที่ 2-12) ภายในถุงประกอบด้วยเนื้อเยื่อบุผิวเรียงตัวชั้นเดียว มีเซลล์ที่เป็นองค์ประกอบ 2 แบบ ได้แก่ เซลล์ทรงสูงหรือเซลล์รูปทรงกระบอก และเซลล์ทรงเตี้ย การเรียงตัวของกลุ่มเซลล์ทั้ง 2 แบบทำให้เกิดรู (lumen) ที่มีลักษณะเป็นแฉก โดยเซลล์รูปทรงกระบอก เรียกว่า เซลล์ย่อยอาหาร (digestive cell) ตัวเซลล์มีความยาวมากกว่าความกว้าง พบนิวเคลียสที่บริเวณฐานของเซลล์ ส่วนเซลล์ที่มีลักษณะทรงเตี้ย เรียก เซลล์คริปท์ (crypt cell) หรือ เซลล์แบโซฟิว (basophilic cell) (Trenholm & Mix, 1978) เนื่องจากไซโตพลาซึมย้อมติดสีเบสหรือสีฮีมาท็อกไซลิน ทำให้เห็นเป็นสีม่วงหรือน้ำเงินมากกว่าไซโทพลาซึมของ digestive cell



ภาพที่ 2-12 โครงสร้างภายในต่อมย่อยอาหารของหอยนางรม ประกอบด้วย

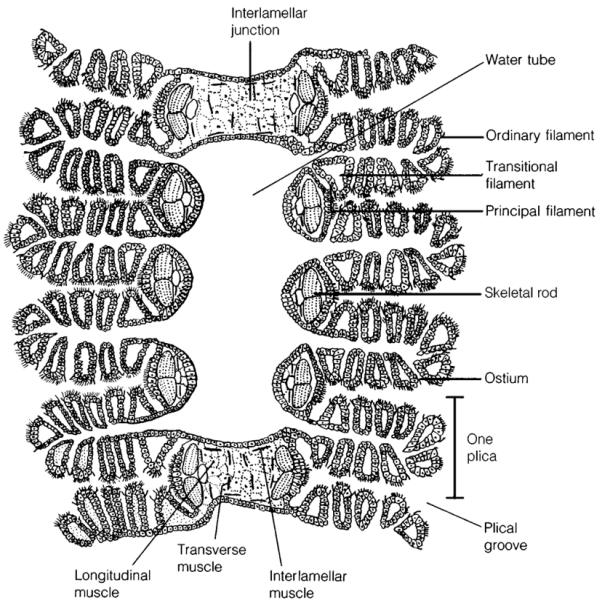
C= เซลล์คริปท์ (crypt cell) C.T. = เนื้อเยื่อเกี่ยวพัน (connective tissue)

F.V. = ถุงเก็บอาหาร (food vaouole) P = เซลล์ฟาโกไซต์ (phagocyte)

(Yonge, 1926)

เหงือก (gill)

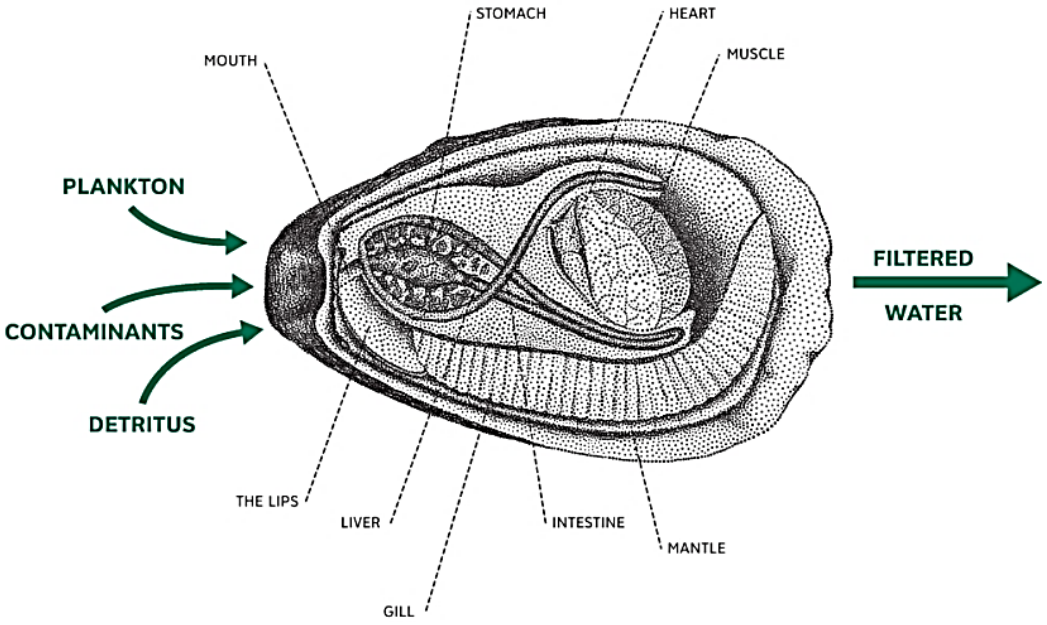
หอยนางรมปากจีบมีโครงสร้างเหงือกแบบ Pseudolamellibranch (Cannuel, Beninger, 2006) ประกอบด้วยแผ่นเหงือกจำนวน 2 คู่หรือ 4 แผ่น เชื่อมติดกับแมนเทิล โดยมีจุดเริ่มต้นจากแกนเหงือกบริเวณด้านล่างขนานกับความยาวของลำตัว แผ่นเหงือก ประกอบด้วยซี่เหงือกขนาดเล็ก โดยแต่ละซี่จะมีการพับเป็นจีบตามแนวดิ่งเพื่อช่วยเพิ่มพื้นที่ผิวในการแลกเปลี่ยนก๊าซ (gas exchange) ระหว่างระบบหมุนเวียนเลือดภายในร่างกายกับน้ำบริเวณรอบ ๆ ที่ไหลเวียนเข้ามายังเหงือก แผ่นเหงือกบริเวณชั้นใน (inner demibranch) จะม้วนขึ้นมาติดกับแกนลำตัว ส่วนแผ่นเหงือกชั้นนอก (outer demibranch) จะม้วนขึ้นมาติดกับแมนเทิล เรียกเหงือกลักษณะนี้ว่าเหงือกแบบจีบ (pleated ctenidia) และมีเนื้อเยื่อเชื่อมระหว่างซี่เหงือกแต่ละซี่ (Chaparro, Videla, & Thompson, 2001) โดยบริเวณด้านรอยพับของซี่เหงือก จะพบซิเลียที่ใช้สำหรับโบกพัดอาหารลำเลียงเข้าสู่ปาก ซี่เหงือกย่อย (gill filament) ที่พบใน 1 พลิกา (plica) มีจำนวน 12-14 หน่วย (Galtsoff, 1964) (ภาพที่ 2-13) นอกจากเหงือกจะมีหน้าที่ทีช่วยในการแลกเปลี่ยนก๊าซแล้ว เหงือกยังมีหน้าที่สำคัญอื่น ๆ อีกหลายประการได้แก่ ทำหน้าที่ควบคุมการไหลของน้ำภายในตัวหอยนางรม ซึ่งจะช่วยกรองอาหาร (filter feeding) ที่ติดมากับน้ำเพื่อส่งต่อไปยังแผ่นปากก่อนจะถูกส่งเข้าสู่ปาก ซึ่งจะช่วยในการกระจายเซลล์สืบพันธุ์ในขณะที่มีการปล่อยเซลล์สืบพันธุ์ออกจากร่างกาย



ภาพที่ 2-13 โครงสร้างภายในเหงือกของหอยนางรม (Rivera-Ingraham et al., 2016)

2.7.5 การกินอาหารและการเจริญเติบโต

หอยนางรมส่วนใหญ่จะกินอาหารโดยวิธีการกรอง เนื่องจากเป็นสัตว์ที่อาศัยอยู่กับที่ อวัยวะที่ใช้ในการกรองอาหารคือเหงือก น้ำที่ไหลผ่านเข้ามาในโพรงเยื่อหุ้ม (mantle cavity) ไหลผ่านเหงือกออกไปยังท่อน้ำออก (ภาพที่ 2-14) อาหารหรืออนุภาคต่าง ๆ ซึ่งถูกพัดพามากับน้ำ จะติดบนซี่เหงือก ซึ่งอาหารที่กรอง ได้แก่ ไดอะตอม (diatom) ซิลิโค-แฟลคเจลเลค (silico-flagellates) และแพลงตอนพืช (phytoplankton) จำพวกไดอะตอม (Egge & Aksnes, 1992) และสปอร์ของสาหร่ายทะเลเป็นหลัก (สุวัฒน์ ธนานุภาพไพศาล และคณะ, 2541) อาหารที่มีขนาดใหญ่เกินไปจะตกลงมาในโพรงเยื่อหุ้มตอนล่างและถูกขับออกทางท่อน้ำออก ส่วนที่มีขนาดเล็กจะมีเมือกมาปกคลุม และมีซิเลียคอยพัดโบกให้อนุภาคเหล่านั้นเข้าสู่ทางเดินอาหารต่อไปได้ อนุภาคที่ไม่สามารถถูกย่อยได้จะถูกขับออกมาทิ้งทางท่อน้ำออกภายหลัง กระบวนการกรองของหอยนางรมนี้จะเป็นไปได้ด้วยดีและมีประสิทธิภาพก็ต่อเมื่อปริมาณน้ำไหลผ่านเข้าสู่โพรงเยื่อหุ้มมากพอ และตัวหอยต้องอยู่ในน้ำตลอดเวลา ดังนั้นจากการสังเกตจะพบว่า หอยนางรมที่ถูกเลี้ยงอยู่ในน้ำตลอดเวลา จะมีการเจริญเติบโตเร็วกว่าหอยนางรมที่อยู่ในระดับน้ำขึ้นน้ำลง มีการสัมผัสอากาศเป็นบางเวลา (Galtsoff, 1964)



ภาพที่ 2-14 การกินแบบกรองกินในน้ำ (filter feeding) ของหอยนางรม (Galtsoff, 1964)

2.7.6 อวัยวะที่เกี่ยวข้องกับการสืบพันธุ์และการขยายพันธุ์

หอยนางรมมีเพศผู้และเพศเมียแยกกัน ยกเว้นในบางกรณีหอยตัวเดียวอาจมีทั้งไข่และเซลล์อสุจิ ลักษณะที่มีทั้งสองเพศอยู่ในตัวเดียวกันนี้เรียกว่ากระเทย (hermaphrodite) ซึ่งอาจพบได้ในหอยสองฝาชนิดอื่น ๆ ด้วย โดยที่มันอาจจะเปลี่ยนแปลงเพศได้ เมื่อเข้าสู่สภาวะใดสภาวะหนึ่ง แต่ส่วนใหญ่แล้วจะพบว่าแยกเพศอย่างชัดเจน การจำแนกเพศของหอยนางรมไม่สามารถดูได้จากลักษณะภายนอก จำเป็นต้องเปิดเปลือกหอยออกมา สังเกตจากอวัยวะสืบพันธุ์ (gonad) ซึ่งจะปกคลุมอยู่บริเวณรอบกระเพาะอาหาร นำมาส่องดูด้วยกล้องจุลทรรศน์ จึงจะสามารถแยกได้ว่าเป็นเพศผู้หรือเพศเมีย ความสมบูรณ์เพศของหอยนางรมเกิดขึ้นจากสิ่งแวดล้อมที่เป็นตัวกระตุ้นให้หอยปล่อยเซลล์สืบพันธุ์ออกมาผสมกันภายนอก (external fertilization) เช่น การเปลี่ยนแปลงของอุณหภูมิ ความเค็ม ระดับความลึกของน้ำ ความเป็นกรดด่างของน้ำหรือโดนสารเคมีบางชนิดเป็นตัวกระตุ้นให้หอยปล่อยเซลล์สืบพันธุ์ออกมา เมื่อไข่กับเซลล์อสุจิผสมกันจะมีการแบ่งตัว และพัฒนาเป็นตัวอ่อนซึ่งสามารถว่ายน้ำได้ (King, Jenkins, Seymour, & Labbate, 2018)

1. เซลล์อสุจิ (sperm)

เซลล์อสุจิของหอยสองฝามีลักษณะที่คล้ายคลึงกับเซลล์อสุจิของสัตว์ทั่ว ๆ ไป คือ ประกอบไปด้วยส่วนหัว ส่วนกลาง และส่วนหาง โดยส่วนหัวจะมีนิวเคลียสรูปร่างค่อนข้างยาว มีอะโครโซม (acrosome) ซึ่งมีเอนไซม์ที่ใช้ในการย่อยผนังของไข่ ส่วนกลางของเซลล์อสุจิจะพบไมโทคอนเดรีย ประมาณ 4-5 อัน ล้อมรอบเซนทริโอล (centriole) ส่วนหางของเซลล์อสุจิ เรียกว่าแฟคเจลลัม (flagellum)

เซลล์อสุจิของหอยสองฝาสปีชีส์ต่าง ๆ มีโครงสร้างละเอียดพื้นฐานที่คล้ายคลึงกัน กล่าวคือ มีแฟลเจลลัม เซนทริโอล และไมโทคอนเดรียซึ่งพบในส่วนกลางของเซลล์อสุจิ ไมโทคอนเดรียมักจะพบใกล้กับเยื่อหุ้มนิวเคลียส มีรูปร่างกลมหรือรูปไข่ และมีโครงสร้างภายในเหมือนกันกับไมโทคอนเดรียในเซลล์ร่างกายทั่วไป อย่างไรก็ตาม ตำแหน่งการเรียงตัวของไมโทคอนเดรีย สามารถนำมาใช้เป็นตัวบ่งชี้รูปแบบของการปฏิสนธิในหอยสองฝาได้ (Moraes & Meyers, 2018) กล่าวคือหอยสองฝามีการปฏิสนธิ 2 แบบ ได้แก่ การปฏิสนธิภายนอก (external fertilization) และการปฏิสนธิภายใน (internal fertilization) สำหรับเซลล์อสุจิของหอยสองฝาที่มีการปฏิสนธิภายนอกนั้น มีไมโทคอนเดรียรวมกันเป็นกลุ่มอยู่ส่วนปลายของหัวอสุจิซึ่งมีรูปร่างกลม ส่วนเซลล์อสุจิของหอยสองฝาที่มีการปฏิสนธิภายในนั้น มีส่วนหัวที่มีรูปร่างเรียวยาว ไมโทคอนเดรียเรียงกันเป็นเยื่อหุ้มส่วนกลางของเซลล์อสุจิ นอกจากนี้ส่วนหางยังมีไซโตพลาสซึมปริมาณมาก ลักษณะต่าง ๆ เหล่านี้ เป็นลักษณะเฉพาะของเซลล์อสุจิ ที่จะต้องเวียนว่ายในของเหลว

ภายในระบบสืบพันธุ์ที่มีความเข้มข้นมากกว่าน้ำทะเล นิวเคลียสของเซลล์อสุจิพบรูปร่างได้หลายลักษณะ แล้วแต่ชนิดของหอยสองฝา เช่น มีลักษณะเป็นรูปไข่ในหอยแมลงภู่ (*Mytilus edulis*) (Obata & Komaru, 2005) รูปกรวยสั้นในหอยทะเลกาบคู่ (*Lyrodus pedicellatus*) (Popham, 1974) รูปทรงกลมในหอยนางรมแปซิฟิก (*Crassostrea gigas*) (Kingtong et al., 2013; Xu et al., 2016) รูปแท่งดินสอในหอยกาบน้ำจืด (*Corbicula Megerle*) (Akira et al., 2009) และเป็นรูปโค้งยาวเรียวคล้ายเคียวในหอยลาย (*Venerupis corrugate*) (Healy, Mikkelsen, & Bieler, 2006) รูปร่างของนิวเคลียสนี้ สามารถใช้เป็นลักษณะอย่างหนึ่งในการจำแนกหอยสองฝาได้เช่นกัน ออร์กาเนลล์อีกหนึ่งชนิด ที่พบในไซโทพลาสซึมของเซลล์อสุจิ คือ อะโครโซม ซึ่งถูกสร้างมาจากกอลจิบอดี การสร้างอะโครโซมในหอยสองฝาต่างชนิดกัน จะมีรูปร่าง ขนาด ส่วนประกอบ และตำแหน่งที่อยู่ภายในไซโทพลาสซึมต่างกัน ซึ่งอยู่ที่ส่วนหัวของเซลล์อสุจิ ในอะโครโซมจะมีเอนไซม์ซึ่งใช้ในการย่อยผนังของไข่ (Thanormjit, Chueycham, Phraprasert, Sukparangsi, & Kingtong, 2020)

2. เซลล์ไข่ (Oocyte)

เซลล์ไข่ของหอยนางรมปากจีบ จะมีรูปร่างกลม ในระยะตัวอ่อนจะเจริญอยู่ภายนอก เซลล์ไข่จะเริ่มเปลี่ยนแปลงรูปร่างจากการสะสมอาหาร ได้แก่ ไข่แดง (yolk) ไขมัน (lipid) และไกลโคเจน (glycogen) มักมีไข่แดงขนาดเล็ก คือมีเส้นผ่านศูนย์กลางเล็กกว่า 150 ไมโครเมตร ส่วนหอยสองฝาที่มีระยะตัวอ่อนเจริญอยู่ภายในมักมีไข่ขนาดใหญ่ คือมีเส้นผ่านศูนย์กลางมากกว่า 150 ไมโครเมตร มีปริมาณไข่แดงร้อยละ 30 ของปริมาตรไข่ทั้งหมด ไข่แดงจะมีแกรนูลสองชนิดคือ ชนิดที่เป็นโปรตีนและชนิดที่เป็นไขมัน (สุชาติ อุปถัมภ์, มาลียา เครือตาชู, เยาวลักษณ์ จิตรามวงศ์ และศิริวรรณ์ จัณทเตมีย์, 2538)

การสร้างและพัฒนาของเซลล์ไข่ในระยะต่าง ๆ เกิดขึ้นภายในท่อสร้างเซลล์สืบพันธุ์ (Gonadal tubules) โดยเซลล์ต้นกำเนิดของเซลล์ไข่ หรือ Oogonium ซึ่งมีโครโมโซมสองชุด (2n) อยู่ติดกับฐานของท่อ เกิดการแบ่งตัวแบบไมโทซิส (Mitosis) เพื่อเพิ่มจำนวนกลายเป็น Primary oocyte (2n) หลังจากนั้น Primary oocyte จะเริ่มแบ่งเซลล์แบบไมโอซิส (Meiosis) ครั้งที่ 1 กลายเป็น Secondary oocyte (n) และแบ่งเซลล์แบบ Meiosis ครั้งที่ 2 เพื่อให้ได้เซลล์ไข่ 4 เซลล์ (Fukazawa, Kawamura, Takami, & Watanabe, 2007) ในสัตว์บางชนิดเช่น สัตว์เลี้ยงลูกด้วยน้ำนม เซลล์ไข่ทั้ง 4 เซลล์จะมีขนาดไม่เท่ากัน จะมีเซลล์ไข่ 1 ใบ ที่มีขนาดใหญ่ และพัฒนาไปเป็นไข่ที่สมบูรณ์ แต่ในหอยสองฝาเซลล์ไข่ทุกใบที่ได้จากการแบ่งเซลล์จะมีการพัฒนาไปเป็นเซลล์ไข่ที่สมบูรณ์ (Mature oocyte) พร้อมที่จะปล่อยออกสู่ภายนอกเพื่อให้เกิดการปฏิสนธิได้ โดยจะมีการ

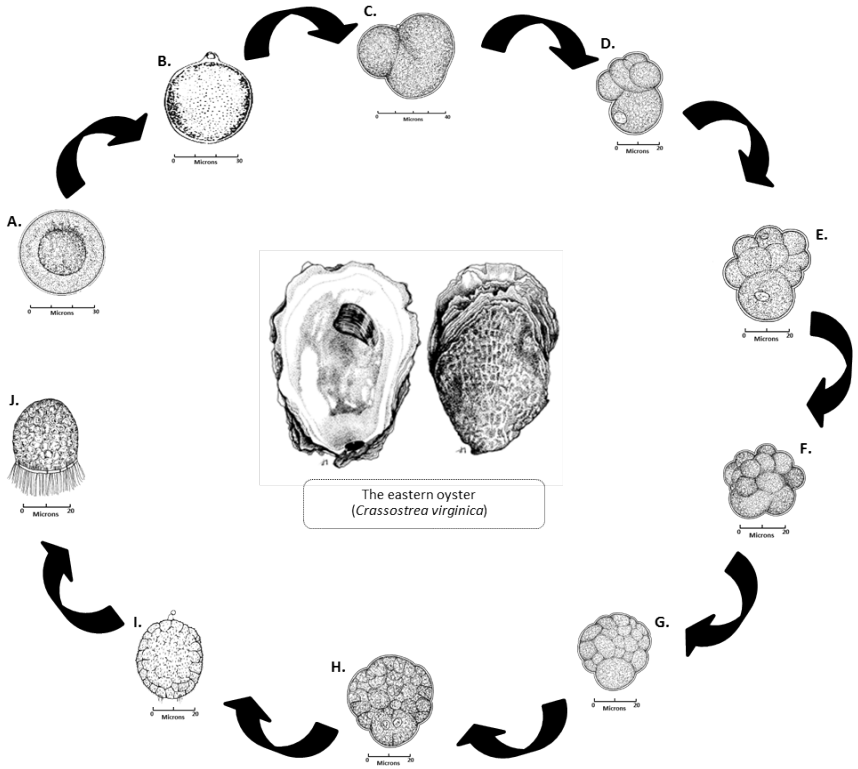
สะสมอาหารไว้ภายในไซโทพลาซึมมากขึ้น ทำให้ขนาดของเซลล์ไข่ใหญ่ขึ้นตามลำดับ (Lango-Reynoso, Chávez-Villalba, Cochard, & Le Pennec, 2000)

2.7.7 การปฏิสนธิและพัฒนาการของตัวอ่อนหอยนางรม

การปฏิสนธิและการพัฒนาของอวัยวะสร้างเซลล์สืบพันธุ์ของหอยนางรมมีหลักการคือ เมื่อหอยนางรมเข้าสู่ช่วงตัวเต็มวัย จะเริ่มมีการพัฒนาอวัยวะที่ใช้สร้างเซลล์สืบพันธุ์ (gonad) ขึ้นมาระหว่างเนื้อเยื่อเกี่ยวพันซึ่งอยู่ระหว่างแมนเทิลและต่อมย่อยอาหาร โดยการสร้างเซลล์สืบพันธุ์ระยะแรกจะเกิดที่บริเวณผนังของฟอลลิเคิล (follicle) จากนั้นจะพบว่ามีการแบ่งเซลล์แบบไมโทซิสเพื่อเพิ่มจำนวนเซลล์สืบพันธุ์ในระยะเริ่มต้น ตามด้วยการแบ่งเซลล์แบบไมโอซิส 2 ครั้ง เพื่อเพิ่มจำนวนเซลล์สืบพันธุ์และพัฒนาเป็นเซลล์สืบพันธุ์ที่สมบูรณ์ และเคลื่อนเข้าสู่ศูนย์กลางของฟอลลิเคิล จึงเริ่มปล่อยเซลล์สืบพันธุ์ออกมา โดยเซลล์สืบพันธุ์อาจถูกปล่อยจนหมดหรือสลายไปหรือยังค้าง อยู่ในอวัยวะสร้างเซลล์สืบพันธุ์จนถึงฤดูปล่อยเซลล์สืบพันธุ์อีกครั้งเพื่อดึงกลับมาใช้ใหม่ (คเชนทร เฉลิมวัฒน์, 2540)

ภายหลังการปฏิสนธิของเซลล์สืบพันธุ์ พบ polar body ภายใน 45 นาที และเข้าสู่ระยะ two-cell stage ภายใน 90 นาที จากนั้นจะแบ่งเซลล์และพัฒนาการจนมี cilia ซึ่งสามารถว่ายน้ำได้ เรียกตัวอ่อนระยะนี้ว่า trochophore larvae ในช่วงสุดท้ายของระยะ trochophore จะมีการสร้างเปลือกขึ้น เมื่อเปลือกถูกสร้างสมบูรณ์จะเข้าสู่ระยะ D-shape โครงร่างและอวัยวะต่าง ๆ จะสมบูรณ์มากขึ้นจนสังเกตเห็นจุดตา (eye spot) เป็นจุดสีดำที่กลางตัวลูกหอย ระยะนี้เป็นระยะที่พร้อมจะลงเกาะ

ช่วงที่ลูกหอยอยู่ในระยะ D-shape นั้นเป็นระยะที่มีการสร้างเปลือกขึ้นมาปกคลุมตัว เปลือกที่สร้างขึ้นนี้จะปกติสมบูรณ์ดีหรือไม่ขึ้นอยู่กับหลายปัจจัย เช่น สภาพของน้ำที่ใช้ในการเพาะเลี้ยง ความหนาแน่นและความสมบูรณ์ของไข่ (Wilson et al., 2009) จากนั้นจะมีการเปลี่ยนแปลงรูปร่างและมีอวัยวะต่าง ๆ มากขึ้น มี velum ทำหน้าที่ว่ายน้ำและพัดโบกอาหาร ระบบทางเดินอาหารพัฒนามากขึ้น มี aductor muscle และเปลือกที่ห่อหุ้มตัว รูปร่างคล้ายกับตัวอักษร D สามารเปิดและปิดฝาได้โดยใช้กล้ามเนื้อยึดเปลือกช่วย ขณะปิดฝาจะทำการหด Velum เข้าไว้ในเปลือกด้วย เป็นการป้องกันอันตรายจากภายนอก เมื่อลูกหอยเติบโตมากขึ้นเป็นระยะ late umbo เริ่มมีจุดตา มีเท้าที่พัฒนามากขึ้นเพื่อใช้ในการสำรวจวัตถุที่ลงเกาะ (Loosanoff & Davis, 1963)



ภาพที่ 2-15 พัฒนาการหลังการปฏิสนธิของหอยนางรม *Crassostrea virginica*
(ที่มา: ดัดแปลงมาจาก Galtsoff, 1964)

การปฏิสนธิของหอยนางรม เป็นการปฏิสนธิภายนอก (external Fertilization) ดังภาพที่ 2-15 อธิบายได้ดังนี้ (Galtsoff, 1964)

(A.) เมื่ออสุจิผสมกับไข่จะเกิดการปฏิสนธิขึ้น (fertilization)

(B.) เกิดการแบ่งเซลล์ พบ polar body ทางด้านบนของเซลล์

(C.) การแบ่งตัวในระยะแรก (first cleavage) ของเซลล์ไข่ เกิดขึ้นหลังจากการปฏิสนธิประมาณ 70 นาที หลังจากแบ่งเซลล์ครั้งที่ 2 จะได้บลาสโทเมียร์ (blastomere) จำนวน 4 เซลล์

(D.) การแบ่งตัวในระยะที่ 3 (third division) จะเกิดการแบ่งในแนวขวางได้เซลล์ขนาดแตกต่างกันจำนวน 8 เซลล์ เซลล์ด้านบนจะมีขนาดเล็ก เรียกว่าไมโครเมียร์ (micromeres) ส่วนเซลล์ด้านล่างจะมีขนาดใหญ่ เรียกว่ามาโครเมียร์ (macromeres) โดยไมโครเมียร์จะตั้งอยู่ด้านบนของมาโครเมียร์

(E.) การแบ่งในครั้งต่อไปมาโครเมียร์ 4 เซลล์ จะแบ่งได้มาโครเมียร์ 4 เซลล์กับไมโครเมียร์ 4 เซลล์ ส่วนไมโครเมียร์ 4 เซลล์ แบ่งได้ไมโครเมียร์ 8 เซลล์ จนได้เอ็มบริโอที่มีลักษณะเป็นกลุ่มเซลล์ที่เรียก มอรูลา (morula) ซึ่งเป็นลักษณะของเอ็มบริโอที่มีการจัดเรียงตัวของเซลล์เป็นรูปทรงกลมคล้ายผลน้อยหน่า

(F.) ระยะ Fifth cleavage และ (G.) ระยะ sixth cleavage เกิดการเรียงตัวของเซลล์ไข่

(H.) บริเวณมาโครเมียร์เกิดการเบียดกับช่องว่างบลาสโทซีล จนทำให้หายไป ทำให้ได้บลาสทูลาที่ไม่มีช่องว่าง เรียกบลาสทูลาชนิดนี้ว่า สเตรีโอบลาสทูลา (sterroblastula)

(I.) ระยะเวลาประมาณ 4-6 ชั่วโมงหลังจากการปฏิสนธิของเซลล์ไข่ จะสังเกตเห็นลักษณะการเปลี่ยนแปลงของเซลล์คือมีซิเลียปกคลุมทั่วเซลล์ มี 2 แขนโครมาทิด ออกเป็น second polar body

(J.) ระยะเวลาประมาณ 6 ชั่วโมง หลังการปฏิสนธิของเซลล์ไข่ จึงจะเข้าสู่ระยะ larva (Desrosiers, Désilets, & Dubé, 1996)

2.7.8 ฤดูปล่อยเซลล์สืบพันธุ์ของหอยนางรม

การปล่อยเซลล์สืบพันธุ์ของหอยนางรมขึ้นอยู่กับปัจจัยทางกายภาพ ได้แก่ อุณหภูมิและความเค็มของน้ำ ส่วนปัจจัยทางเคมี ได้แก่ ปริมาณแพลงก์ตอนพืช และฮอร์โมน (Lorio & Malone, 1994) นอกจากนี้ช่วงเวลาในการพัฒนาอวัยวะสืบพันธุ์เพื่อสร้างเซลล์สืบพันธุ์และปล่อยเซลล์สืบพันธุ์ยังแตกต่างกันออกไปตามถิ่นที่อยู่อาศัยและชนิดของหอยนางรม เช่น หอยนางรม *C. gigas* ที่เลี้ยงในประเทศฝรั่งเศส พบว่าเริ่มมีพัฒนาการของเซลล์สืบพันธุ์ตอนต้นประมาณปลายเดือนมีนาคม จากนั้นจึงจะเข้าสู่ระยะพัฒนาการของเซลล์สืบพันธุ์ตอนปลายในเดือนกรกฎาคม เซลล์สืบพันธุ์จะมีการพัฒนาสมบูรณ์ในเดือนสิงหาคม และเริ่มปล่อยเซลล์สืบพันธุ์ตั้งแต่เดือนสิงหาคมถึงปลายเดือนพฤศจิกายน (Díaz et al., 2009) หอยนางรม *C. gigas* ที่ชายฝั่งทางตอนใต้ของประเทศเกาหลีเริ่มมีการสร้างเซลล์สืบพันธุ์ในเดือนกุมภาพันธ์ เซลล์สืบพันธุ์พัฒนาสมบูรณ์ประมาณปลายเดือนพฤษภาคมถึงต้นเดือนมิถุนายน และเริ่มมีการปล่อยเซลล์สืบพันธุ์ครั้งแรกประมาณปลายเดือนมิถุนายนถึงต้นเดือนกรกฎาคม และครั้งที่สองประมาณปลายเดือนสิงหาคมถึงปลายเดือนตุลาคม และมีการปล่อยเซลล์สืบพันธุ์สูงสุดในเดือนกันยายน (Ngo, Sang-Gyun, & Kwang-Sik, 2002; Kang, Choi, Bulgakov, Kim, & Kim, 2003; Mondol, Kim, Kim, Kang & Choi, 2012) ส่วนหอยนางรม *C. virginica* ทางตอนเหนือของอ่าวเม็กซิโกมีการปล่อยเซลล์สืบพันธุ์ตั้งแต่ปลายเดือนเมษายนถึงเดือนธันวาคม และมีการปล่อยเซลล์สืบพันธุ์สูงสุดในเดือนกันยายนถึงตุลาคม (Hayes & Menzel, 1981) แต่หอยนางรม *C. virginica* ที่บริเวณชายฝั่งของจอร์เจียเริ่มมีการ

สร้างเซลล์สืบพันธุ์ในเดือนมกราคม เซลล์สืบพันธุ์จะมีการพัฒนาสมบูรณ์ในเดือนเมษายน และปล่อยเซลล์สืบพันธุ์ตั้งแต่เดือนเมษายนถึงตุลาคม (Bliss & Walker, 2012)

นอกจากนี้การศึกษาของ Cárdenas, Erick & Aranda, & Espinosa (2007) ยังแสดงให้เห็นว่าในเขตทะเลเดียวกันแต่ตำแหน่งที่อยู่อาศัยต่างกันก็ส่งผลต่อช่วงเวลาในการปล่อยเซลล์สืบพันธุ์ด้วย โดยที่สถานี Malagana หอยนางรม *C. virginica* มีการปล่อยเซลล์สืบพันธุ์สูงสุดในเดือนมิถุนายนถึงตุลาคม ส่วนที่สถานี Matacuay มีการปล่อยเซลล์สืบพันธุ์สูงสุดในเดือนกรกฎาคมถึงสิงหาคม เช่นเดียวกับการศึกษาของ Loor และ Sonnenholzner (2014) ในหอยนางรม *S. prismatica* บริเวณชายฝั่งทางตอนใต้ของประเทศเอกวาดอร์ หอยนางรมเริ่มสร้างเซลล์สืบพันธุ์ในเดือนกันยายน เซลล์สืบพันธุ์จะมีการพัฒนาสมบูรณ์ประมาณเดือนธันวาคมถึงมกราคม และเริ่มปล่อยเซลล์สืบพันธุ์ในเดือนกุมภาพันธุ์จนถึงเดือนกันยายน แต่พบว่าหอยนางรมจาก 2 สถานี มีช่วงเวลาในการปล่อยเซลล์สืบพันธุ์สูงสุดต่างกัน โดยที่สถานี General Villamil มีการปล่อยเซลล์สืบพันธุ์สูงสุดในเดือนเมษายน ในขณะที่สถานี Ayangue จะสูงสุดในเดือนมิถุนายน ซึ่งสอดคล้องกับข้อมูลฤดูปล่อยเซลล์สืบพันธุ์และช่วงการเกิดลูกหอยของหอยนางรมในประเทศไทย พบว่าหอยนางรมมีการปล่อยเซลล์สืบพันธุ์ตลอดทั้งปี โดยแตกต่างกันตามชนิดและแหล่งที่อยู่อาศัย เช่น หอยตะโกรม (*Crassostrea belcheri*) บริเวณแม่น้ำเวฬุ จังหวัดจันทบุรี พบการปล่อยเซลล์สืบพันธุ์มากที่สุดในเดือนตุลาคม-ธันวาคม หอยนางรมปากจีบ *S. cucullata* บริเวณตำบลอ่างศิลา จังหวัดชลบุรี แบ่งออกเป็น 3 ช่วง ได้แก่ ช่วงแรกเดือนมีนาคม-เมษายน ช่วงที่ 2 เดือนมิถุนายน-กรกฎาคม และช่วงที่ 3 เดือนกันยายน-ตุลาคม ตามลำดับ (วิสุทธิ์ พรมเล็ก, 2552) ส่วนหอยนางรมปากจีบ *S. cucullata* บริเวณจังหวัดตราด พบการปล่อยเซลล์สืบพันธุ์แบ่งออกเป็น 2 ช่วง ได้แก่ ช่วงแรกเดือนกุมภาพันธ์-มีนาคม ช่วงที่ 2 เดือนกันยายน-ตุลาคม ตามลำดับ (สถาบันวิจัยทรัพยากรทางน้ำ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย, 2546) แสดงข้อมูลตามตารางที่ 2-7

ตารางที่ 2-7 ฤดูกาลปล่อยเซลล์สืบพันธุ์ของหอยนางรมบริเวณชายฝั่งภาคตะวันออกของประเทศไทย (วิสุทธิ์ พรมเล็ก, 2552) (สถาบันวิจัยทรัพยากรทางน้ำ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย, 2546)

จังหวัด	เดือนที่หอยนางรมปากจีบมีการปล่อยเซลล์สืบพันธุ์											
	มกราคม	กุมภาพันธ์	มีนาคม	เมษายน	พฤษภาคม	มิถุนายน	กรกฎาคม	สิงหาคม	กันยายน	ตุลาคม	พฤศจิกายน	ธันวาคม
ชลบุรี			✓	✓		✓	✓		✓	✓		
จันทบุรี								✓	✓	✓	✓	
ตราด		✓	✓						✓	✓		

ฤดูฝน

2.7.9 การกระตุ้นให้หอยปล่อยเซลล์สืบพันธุ์

การปล่อยเซลล์สืบพันธุ์ของหอย ต้องอาศัยปัจจัยหลายอย่างทั้งจากภายนอกและภายในที่เกี่ยวข้องกับการควบคุมการทำงานของระบบสืบพันธุ์และส่งผลถึงฤดูกาลสืบพันธุ์ในรอบปี ปัจจัยภายในที่สำคัญที่ทำหน้าที่ควบคุมการทำงานของระบบสืบพันธุ์ ได้แก่ พันธุกรรมและฮอร์โมน ส่วนปัจจัยภายนอก มีหลายอย่างได้แก่ อุณหภูมิ สิ่งแวดล้อม ความเค็ม กระแสลม กระแสคลื่น ปริมาณอาหาร รวมถึงการปนเปื้อนของสารเคมีในแหล่งน้ำที่อาศัยอยู่ เป็นต้น อย่างไรก็ตาม สัตว์น้ำแต่ละชนิดมี การตอบสนองต่อปัจจัยดังกล่าวแตกต่างกัน โดยพบว่าหอยบางชนิดมีการปล่อยเซลล์สืบพันธุ์ตลอดทั้งปีในทุกฤดูกาล (Cronin, et al., 2000; Nakamura et al., 2010)

การกระตุ้นให้หอยปล่อยเซลล์สืบพันธุ์เป็นเทคนิคอย่างหนึ่งในการเพาะเลี้ยงเพื่อขยายพันธุ์ มีหลายวิธีด้วยกัน วิธีที่นิยมนำมาใช้ในการเพาะเลี้ยงลูกหอยนางรมซึ่งได้ผลค่อนข้างดี คือ การเปลี่ยนแปลงอุณหภูมิน้ำที่ใช้ในบ่อเพาะเลี้ยงพ่อพันธุ์แม่พันธุ์หอย (thermal shock) โดยอาศัยความแตกต่างของอุณหภูมิเป็นตัวกระตุ้นให้หอยปล่อยเซลล์สืบพันธุ์ โดยช่วงอุณหภูมิของน้ำที่ใช้แตกต่างกันไปตามสภาพภูมิอากาศที่สายพันธุ์นั้น ๆ อาศัยอยู่ (Joyce, Holthuis, Charrier, & Lindegarth, 2013)

2.8 การใช้หอยนางรมปากจีบเป็นตัวบ่งชี้ทางชีวภาพ

ทางผู้วิจัยเลือกใช้หอยนางรมปากจีบ (*S. cucullata*) มาเป็นต้นแบบในการศึกษาการปนเปื้อนของสารในกลุ่มออร์กาโนคลอรีนในสิ่งแวดล้อม เนื่องจากหอยนางรมมีการเพาะเลี้ยงกันอย่างแพร่หลายบริเวณชายฝั่งทะเล เป็นสัตว์น้ำที่มีความสำคัญทางเศรษฐกิจทั้งในระดับครัวเรือนและอุตสาหกรรม ในแง่ของอาหารที่มนุษย์นิยมนำมาบริโภค ซึ่งหากมีการบริโภคหอยที่มีการปนเปื้อนก็อาจก่อให้เกิดผลกระทบต่อสุขภาพได้

ในด้านนิเวศวิทยา ด้วยปัจจัยทางด้านการดำรงชีวิตของหอยนางรม ซึ่งดำรงชีวิตโดยการเกาะติดอยู่กับที่ (Sessile organism) กินอาหารแบบการกรอง (Filter feeder) จึงมีโอกาสในการรับสัมผัสสารตกค้างต่าง ๆ และสิ่งปนเปื้อนในน้ำได้โดยตรง ทำให้เกิดการสะสมสารพิษไว้ภายในเนื้อเยื่อของอวัยวะต่าง ๆ จึงนิยมนำมาใช้เป็นตัวบ่งชี้ทางชีวภาพ (biomarker) ในการตรวจสอบความเป็นพิษหรือมลภาวะทางสิ่งแวดล้อมในบริเวณพื้นที่ที่จะทำการศึกษาได้เป็นอย่างดี จะเห็นได้จากมีงานวิจัยที่รายงานถึงปริมาณการสะสมของสารพิษในหอยนางรม พบว่ามีความเข้มข้นสูงถึง 100 เท่า เมื่อเปรียบเทียบกับสารพิษที่ปนเปื้อนอยู่ในน้ำ (Enriquez et al., 1992) ด้วยคุณลักษณะเฉพาะตัวในการสะสมสารมลพิษของสัตว์ชนิดนี้ ทำให้หน่วยงานต่าง ๆ ที่ทำงานด้านการติดตามและตรวจสอบสถานการณ์การปนเปื้อนของสารมลพิษ มักจะใช้หอยสองฝาเป็นตัวชี้วัดคุณภาพของ

สิ่งแวดล้อม ในบริเวณที่มีการปนเปื้อน เช่น ในประเทศสหรัฐอเมริกาได้จัดตั้งโครงการ Mussel Watch (Goldberg, Keenan, Schrier, & Young, 1987) เพื่อจุดประสงค์ในการติดตามและตรวจสอบการปนเปื้อนของสารมลพิษต่าง ๆ ในสิ่งแวดล้อมทางทะเล ประกอบกับความชุกชุมและพบการแพร่กระจายในระบบนิเวศทางทะเลได้ทั่วไป จึงเหมาะสมอย่างยิ่งที่จะนำมาใช้เป็นดัชนีชี้วัดการปนเปื้อนในสิ่งแวดล้อม (Goldberg, 1986)

มีงานวิจัยที่ศึกษาถึงผลกระทบจากสารเคมีที่ปนเปื้อนอยู่ในสิ่งแวดล้อมต่อการปฏิสนธิและพัฒนาการของตัวอ่อนหอยสองฝา ซึ่งเป็นสิ่งมีชีวิตที่นิยมนำมาใช้เป็นตัวบ่งชี้ทางชีวภาพ ด้วยปัจจัยทางด้านการดำรงชีวิตของหอยสองฝา ซึ่งดำรงชีวิตโดยการเกาะติดอยู่กับที่ กินอาหารแบบการกรอง จึงมีโอกาสในการรับสัมผัสสารตกค้างต่าง ๆ และสิ่งปนเปื้อนในน้ำได้โดยตรง (Vignier et al., 2015) เช่นงานวิจัยที่ทำการศึกษาผลกระทบของน้ำมันดิบต่อการพัฒนาของตัวอ่อนหอยนางรม *C. Virginica* เนื่องจากการรั่วไหลของน้ำมันดิบส่งผลให้สารเคมีจำนวนมากไหลลงสู่ทะเลบริเวณอ่าวเม็กซิโก ซึ่งเป็นช่วงเวลาเดียวกันกับฤดูการวางไข่ของหอยนางรม *C. virginica* ทำให้ตัวอ่อนของหอยนางรมและเซลล์สืบพันธุ์ได้รับผลกระทบโดยตรง งานวิจัยนี้แสดงให้เห็นถึงความสำเร็จในการปฏิสนธิการพัฒนาของตัวอ่อน และอัตราการรอดชีวิตของตัวอ่อนหอยนางรมที่ได้รับการปนเปื้อนของน้ำมันดิบมีประสิทธิภาพลดลง

ในงานวิจัยนี้มีการนำเอาเทคโนโลยีทางด้านโปรตีโอมิกส์มาประยุกต์ใช้เพื่อหาตัวบ่งชี้ทางชีวภาพในระดับโปรตีน ที่มีการตอบสนองจำเพาะต่อการปนเปื้อนของสารกลุ่มนี้ โดยใช้หอยนางรมปากจีบ เป็นต้นแบบในการศึกษา เนื่องจากหอยนางรมเป็นสัตว์ที่มีพฤติกรรมการกินอาหารแบบกรองกิน ซึ่งใช้เหงือก (gill) ในการกรองอาหารและตะกอนที่เข้าสู่ช่องแมนเทิล (mantle) และระบบย่อยอาหาร (digestive gland) เมื่อน้ำผ่านเข้าสู่เหงือก หอยก็จะได้รับออกซิเจนจากน้ำที่ผ่านเข้าไป ดังนั้นจึงทำให้มีโอกาสสัมผัสกับน้ำและสารเคมีต่าง ๆ ที่อยู่ในน้ำได้โดยตรง ในส่วนของแมนเทิลนั้นเป็นอวัยวะที่ปกคลุมโครงสร้างภายในทั้งหมด หากหอยมีการเปิดเปลือกเพื่อกินอาหารหรือหายใจ อวัยวะส่วนนี้ก็จะเกิดการสัมผัสกับสารพิษภายนอกเป็นลำดับแรก ด้วยเหตุนี้เหงือก แมนเทิล และต่อมย่อยอาหารของหอยนางรมจึงเป็นอวัยวะที่มีความเหมาะสมสำหรับนำมาใช้เป็นอวัยวะเป้าหมาย เพื่อทำการศึกษาการปนเปื้อนในสิ่งแวดล้อมทางทะเล (Kingtong, Chitramvong, & Janvilisri, 2007)

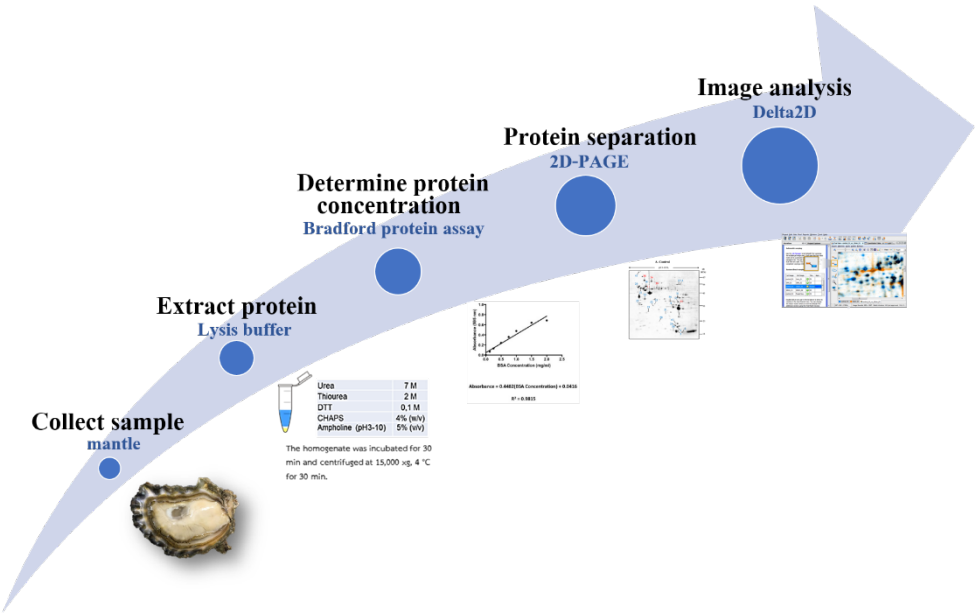
2.10 โปรตีโอมิกส์ (Proteomics)

โปรตีโอมิกส์ เป็นเทคนิคที่ถูกนำมาใช้ในการศึกษางานด้านโปรตีนโดยการศึกษาโมเลกุลของโปรตีนจำนวนมากทั้งระบบที่พบได้ในเซลล์ (whole proteome) และสามารถตรวจวัดโปรตีนได้หลายชนิดพร้อมกันในคราวเดียว เช่น ศึกษาการแสดงออกของโปรตีน การเปลี่ยนแปลงด้านโครงสร้างและคุณสมบัติเชิงเคมี-กายภาพของโปรตีน การนำเทคนิคโปรติโอมิกส์มาใช้เพื่อการศึกษาการแสดงออกของโปรตีนในสิ่งมีชีวิต เช่น two-dimensional (2D) polyacrylamide gel electrophoresis, mass spectrometry (MS) และ differential in gel electrophoresis ทำให้ทราบถึงการทำงานของโปรตีนทั้งในสภาวะปกติและผิดปกติ นอกจากการศึกษาการแสดงออกของโปรตีนแล้ว ยังมีการนำมาใช้ในการศึกษาการเปลี่ยนแปลงของโปรตีนในสิ่งมีชีวิต เพื่อใช้ในการระบุโปรตีนตัวบ่งชี้ทางชีวภาพ (biomarkers) บ่งบอกหรือทำนายผลกระทบที่เกิดขึ้นในสิ่งมีชีวิต ซึ่งปัจจุบันมีการนำมาใช้ศึกษากันอย่างแพร่หลาย ในทางการแพทย์ โดยเฉพาะอย่างยิ่งในโรคที่วินิจฉัยยากและมีความรุนแรงสูง เช่น โรคมะเร็ง ในทางสิ่งแวดล้อมนั้น พบว่าถูกนำมาใช้ในการศึกษาทางด้านพิษวิทยา เพื่อระบุชนิดของโปรตีนตัวบ่งชี้ทางชีวภาพ เนื่องจากเทคนิคโปรตีโอมิกส์ สามารถบ่งชี้การแสดงออกและหน้าที่ของยีนได้ใกล้เคียงกว่าการศึกษาในระดับ mRNA ของยีน อีกทั้งยังบอกข้อมูลสถานะของเซลล์ในสิ่งแวดล้อมโดยอาศัยจากการสังเกตและเปรียบเทียบโปรตีนที่แสดงออกในขณะนั้น ประกอบกับการพัฒนาในส่วนของเครื่องมือวิเคราะห์ที่มีประสิทธิภาพสูงและแม่นยำ จึงทำให้เทคนิคทางด้านโปรตีโอมิกส์ในปัจจุบันมีการพัฒนาและนำมาใช้ประโยชน์มากยิ่งขึ้น

อย่างไรก็ตาม การศึกษาทางด้านโปรตีโอมิกส์คงยังมีข้อจำกัดบางประการ เช่น ฐานข้อมูลจีโนม (genome database) เนื่องจากสิ่งมีชีวิตหลายชนิดยังไม่มีข้อมูลจีโนม อย่างไรก็ดีในการระบุชนิดของโปรตีนก็สามารถทำได้โดยเทียบกับฐานข้อมูลของสิ่งมีชีวิตชนิดอื่น เช่น เทียบกับสิ่งมีชีวิตที่มีความใกล้ชิดกันในสายวิวัฒนาการ เป็นต้น

2.11.1 ขั้นตอนการศึกษาทางด้านโปรตีโอมิกส์ (ภาพที่ 2-16) (Khondee et al., 2016)

1. การเตรียมตัวอย่างและการสกัดโปรตีน
2. การวัดปริมาณโปรตีน
3. การแยกโปรตีนโดยวิธีอิเล็กโตโฟริซิส
4. การเปรียบเทียบปริมาณโปรตีนในกลุ่มตัวอย่าง
5. การย่อยโปรตีนด้วยเอนไซม์ และการวิเคราะห์เปปไทด์ด้วยแมสสเปคโตรมิเตอร์ชนิด Liquid chromatography Mass spectrometry (LC-MS/MS)
6. การระบุชนิดของโปรตีนด้วยเทคโนโลยีชีวสารสนเทศศาสตร์



ภาพที่ 2-16 ขั้นตอนการศึกษาโปรตีนด้วยเทคนิคโปรติโอมิกส์ (Khondee et al., 2016)

ปัจจุบันเทคนิคทางด้านโปรตีโอมิกส์มีบทบาทสำคัญในการศึกษาหลายด้าน อาทิเช่น ด้านการแพทย์ สารชีววิทยาระดับโมเลกุล ด้านสิ่งแวดล้อมการสะสมของสารเคมีในห่วงโซ่อาหาร เป็นต้น การศึกษาทางด้านโปรตีโอมิกส์นั้น มีหลายขั้นตอนด้วยกันโดยแต่ละขั้นตอนยังมีความหลากหลายทางด้านวิธีการขึ้นอยู่กับลักษณะสิ่งที่สนใจหรือความเหมาะสมในการศึกษา ดังตัวอย่างการศึกษาที่มีการนำเอาเทคนิคโปรตีโอมิกส์มาใช้ในการตรวจวิเคราะห์หาตัวบ่งชี้ทางชีวภาพการปนเปื้อนของสารเคมีในสิ่งแวดล้อม (ตารางที่ 2-8) ปัจจุบันเทคนิคทางด้านโปรตีโอมิกส์มีบทบาทสำคัญในการศึกษาหลายด้าน อาทิเช่น ด้านการแพทย์ สารชีววิทยาระดับโมเลกุล ด้านสิ่งแวดล้อม การสะสมของสารเคมีในห่วงโซ่อาหาร เป็นต้น

การศึกษาทางด้านโปรตีโอมิกส์นั้น มีหลายขั้นตอนด้วยกันโดยแต่ละขั้นตอนยังมีความหลากหลายทางด้านวิธีการขึ้นอยู่กับลักษณะสิ่งที่สนใจหรือความเหมาะสมในการศึกษา ดังตัวอย่างการศึกษาโดยใช้เทคนิคโปรตีโอมิกส์ในหอยสองฝา เพื่อศึกษาความเป็นพิษของคอปเปอร์ (CuO) ซึ่งนำมาใช้ในอุตสาหกรรมไฟฟ้าอุปกรณ์อิเล็กทรอนิกส์ อุตสาหกรรมก่อสร้าง อุตสาหกรรมรถยนต์ หรือใช้เป็นส่วนประกอบสารเคมีทางการเกษตร น้ำเสียที่มีการปนเปื้อนของสารพิษชนิดนี้อาจเกิดการรั่วไหลสู่สิ่งแวดล้อม และก่อให้เกิดอันตรายต่อสัตว์น้ำที่อาศัยอยู่ในบริเวณที่มีการปนเปื้อนได้ การศึกษานี้มีวัตถุประสงค์เพื่อตรวจสอบการเปลี่ยนแปลงในรูปแบบการแสดงออกของโปรตีนในเหงือกของหอยแมลงภู่ *Mytilus galloprovincialis* ที่ได้รับสัมผัสสาร ที่ความเข้มข้น

10 ไมโครกรัมต่อลิตร เป็นเวลา 15 วัน โดยใช้เทคนิค 2-D gel electrophoresis ร่วมกับเครื่องแมสสเปกโตรมิเตอร์ชนิด MALDI–TOF–TOF MS พบโปรตีนที่เกี่ยวข้องกับการตอบสนองต่อโครงสร้าง (cytoskeleton) ได้แก่ actin, tubulin และ paramyosin โปรตีนที่เกี่ยวข้องกับการตอบสนองต่อความเครียด (stress response) ได้แก่ heat shock cognate 71 และ putative C1q domain containing protein โดยปริมาณของโปรตีนที่เพิ่มขึ้นนี้เกี่ยวข้องกับการตอบสนองต่อสภาวะความเครียดจากการได้รับสารพิษ (Gomes, Chora, Pereira, Cardoso, & Bebianno 2014) การศึกษาโปรตีนในเหงือกของหอยนางรม (*Crassostrea brasiliana*) ที่ได้รับ WAF น้ำมันดิบดีเซลส่วนที่ละลายน้ำ ที่ระดับความเข้มข้น 10% เป็นเวลา 24 และ 72 ชั่วโมง โดยใช้เทคนิค 2-D gel electrophoresis ร่วมกับเครื่องแมสสเปกโตรมิเตอร์ชนิด MALDI-TOF/TOF MS (Müller et al., 2018)

มีงานวิจัยที่นำเอาเทคนิคโปรตีโอมิกส์มาใช้ในการตรวจวิเคราะห์หาตัวบ่งชี้ทางชีวภาพการปนเปื้อนของสารเคมีในสิ่งแวดล้อมโดยใช้ปลาเป็นตัวอย่างในการศึกษา ได้แก่ การศึกษาโปรตีนในสมองของปลานิล (*Oreochromis niloticus*) ที่ได้รับ WAF น้ำมันดิบส่วนที่ละลายน้ำ ที่ระดับความเข้มข้น 1 กรัมต่อลิตร (ของน้ำหนักปลา) เป็นเวลา 96 ชั่วโมง โดยใช้เทคนิค 2-D gel electrophoresis ร่วมกับเครื่องแมสสเปกโตรมิเตอร์ชนิด MALDI-TOF/TOF MS (Salazar-Coria, Rocha-Gómez, Matadamas-Martínez, Yépez-Mulia, & Vega-López, 2019) การศึกษาโปรตีนในเหงือกของปลา rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) ปลา common carp (*Cyprinus carpio*) และปลา gibel carp (*Carassius auratus*) ที่ได้รับทองแดง ที่ระดับความเข้มข้น 50 ไมโครกรัมต่อลิตร เป็นเวลา 72 ชั่วโมง โดยใช้เทคนิค 2-D gel electrophoresis ร่วมกับเครื่องแมสสเปกโตรมิเตอร์ชนิด MALDI-TOF/TOF MS (Eyckmans et al., 2012)

นอกจากนี้ยังพบการศึกษาที่ผ่านมา ที่มีการนำเอาเทคโนโลยีทางด้านโปรตีโอมิกส์มาประยุกต์ใช้เพื่อหาตัวบ่งชี้ทางชีวภาพในระดับโปรตีน ที่มีการตอบสนองจำเพาะต่อการปนเปื้อนของสารเคมีกำจัดแมลงศัตรูพืช ได้แก่ การศึกษาโปรตีนในตับของปลาทอง goldfish (*Carassius auratus*) ที่ได้รับสารเมโทลาคลอร์ (metolachlor) ที่ระดับความเข้มข้น 8.4 และ 42 ไมโครกรัมต่อลิตร เป็นเวลา 96 ชั่วโมง โดยใช้เทคนิค 2-D gel electrophoresis ร่วมกับเครื่องแมสสเปกโตรมิเตอร์ชนิด NanoLC-MS-MS (Gandar et al., 2017) เช่นเดียวกับการศึกษาการแสดงออกของโปรตีน ในปลา guppy fish (*Poecilia reticulata*) ที่ได้รับสารไกลโฟเซต (glyphosate) โดยใช้เทคนิค 2-D gel electrophoresis ร่วมกับเครื่องแมสสเปกโตรมิเตอร์ชนิด MALDI-Q-TOF MS/MS และการศึกษาการแสดงออกและการเปลี่ยนแปลงของโปรตีนในปลา fathead minnows (*Pimephales promelas*)

เมื่อได้รับสารเพอร์เมทริน (permethrin) และสารเทอร์บูฟอส (terbufos) โดยพบว่าใช้เทคนิค 2-D gel electrophoresis ร่วมกับเครื่องแมสสเปกโตรมิเตอร์ชนิด LC-MS/MS ในการศึกษา

ตารางที่ 2-8 การนำเทคนิคโปรตีโอมิกส์มาใช้ในการตรวจวิเคราะห์หาตัวบ่งชี้ทางชีวภาพการปนเปื้อนของสารเคมีในสิ่งแวดล้อม

เทคนิค	สัตว์ทดลอง	สารเคมี	อ้างอิง
2D-PAGE /MALDI–TOF–TOF MS	mussels (*Mytilus galloprovincialis*)	copper	(Gomes et al., 2014)
2D-PAGE /NanoLC-MS-MS	goldfish (*Carassius auratus*)	metolachlor	(Gandar et al., 2017)
2D-PAGE /MALDI-TOF/TOF MS	Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*)	WAF of crude oil	(Salazar-Coria et al., 2019)
2D-PAGE /MALDI-TOF/TOF MS	rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*)	copper	(Eyckmans et al., 2012)
	common carp (*Cyprinus carpio*)		
	gibel carp (*Carassius auratus gibelio*)		
2D-PAGE /MALDI-TOF/TOF MS	oyster (*Crassostrea brasiliana*)	crude oil	(Müller et al., 2018)
2D-PAGE /MALDI-Q-TOF MS/MS	guppy fish (*Poecilia reticulata*)	glyphosate	(Rocha et al., 2015)
2D-PAGE /LC-MS/MS	fathead minnows (*Pimephales promelas*)	permethrin and terbufos	(Biales et al., 2011)

บทที่ 3
วิธีดำเนินการวิจัย

3.1 หอยนางรมและการเลี้ยงปรับสภาพก่อนการทดสอบ

3.1.1 ตัวอย่างหอยนางรม

สัตว์ทดลองที่ใช้ในงานวิจัยนี้คือ หอยนางรมปากจีบ (*S. cucullata*) จากบริเวณพื้นที่เพาะเลี้ยงหอยนางรม สะพานปลาอ่างศิลา ตำบลอ่างศิลา อำเภอเมืองชลบุรี จังหวัดชลบุรี (พิกัด: 13.19226, 100.54486) โดยคัดเลือกตัวอย่างหอยนางรมตัวเต็มวัยที่มีขนาดประมาณ 5-7 เซนติเมตร จากนั้นขนส่งกลับมายังโรงเพาะเลี้ยงวาริชศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา

3.1.2 การเลี้ยงปรับสภาพ (acclimatisation)

ก่อนทำการทดสอบ นำหอยนางรมมาเลี้ยงปรับสภาพในห้องปฏิบัติการของโรงเพาะเลี้ยง เพื่อให้หอยนางรมปรับตัวเข้ากับสภาพที่จะใช้สำหรับการทดสอบ การเลี้ยงปรับสภาพใช้เวลาประมาณ 2 สัปดาห์ ซึ่งดัดแปลงจากวิธีของ Kingtong et al. (2007) โดยเลี้ยงในน้ำทะเลที่มีคุณลักษณะตามที่กำหนด (ตารางที่ 3-1) มีการเปลี่ยนน้ำทะเลและให้อาหารทุกวัน อาหารที่ให้คือแพลงค์ตอนชนิด *Nannochloropsis* sp. ความเข้มข้น 1% v/v ของแพลงตอนหัวเชื้อ 2×10^7 cells/ml

งานวิจัยนี้ได้ผ่านการอนุมัติให้ดำเนินการเลี้ยงและใช้สัตว์จากคณะกรรมการกำกับดูแลการเลี้ยงและใช้สัตว์ มหาวิทยาลัยบูรพา หมายเลข IACUC 007/2561

ตารางที่ 3-1 คุณลักษณะของน้ำทะเลที่ใช้สำหรับเลี้ยงหอยนางรมในห้องปฏิบัติการ

คุณลักษณะของน้ำทะเล	หน่วย
อุณหภูมิ	25 องศาเซลเซียส
ความเค็ม	30 ppt
pH	7.8-8.2
Dissolved oxygen (DO)	7.0-7.3 mg/l

3.1.3 จำนวนสัตว์หอยนางรมที่ใช้ในการศึกษา

ในการศึกษาครั้งนี้ ใช้หอยนางรมทั้งสิ้น จำนวน 620 ตัว ในจำนวนนี้ มีการใช้หอยนางรมในการศึกษาแต่ละหัวข้อดังต่อไปนี้

การศึกษาชีววิทยาการเจริญของตัวอ่อน ใช้หอยนางรม 10 ตัว เพื่อเป็นพ่อพันธุ์ และแม่พันธุ์ โดยแบ่งเป็นเพศผู้และเพศเมียอย่างละ 5 ตัว

การศึกษาผลกระทบของสารดีดีทีต่อตัวอ่อน ใช้หอยนางรม 10 ตัว เพื่อเป็นพ่อพันธุ์ และแม่พันธุ์ โดยแบ่งเป็นเพศผู้และเพศเมียอย่างละ 5 ตัว

การศึกษาผลกระทบของสารดีดีทีต่ออัตราการตายของหอยนางรมตัวเต็มวัย (lethal toxicity test) ใช้หอยนางรม 420 ตัว ไม่จำแนกเพศ

การศึกษาผลกระทบของสารดีดีทีต่อเนื้อเยื่อและโปรตีโอมของหอยนางรมตัวเต็มวัย (sublethal toxic exposure) ใช้หอยนางรม 180 ตัว ไม่จำแนกเพศ

3.2 การศึกษาชีววิทยาการเจริญของหอยนางรมปากจีบ

ในการศึกษาผลกระทบของสารดีดีทีต่อชีววิทยาการเจริญของตัวอ่อนหอยนางรมปากจีบนั้น ในเบื้องต้นผู้วิจัยได้ทำการผสมเทียมในห้องปฏิบัติการ โดยใช้เซลล์สืบพันธุ์ที่ได้จากตัวเต็มวัยมาผสมเทียบม และศึกษาการเจริญขั้นต้นก่อน เมื่อได้ข้อมูลชีววิทยาการเจริญของตัวอ่อนและระยะเวลาการเจริญหอยนางรมชนิดนี้แล้ว จึงทำการทดสอบพิษวิทยาต่อชีววิทยาการเจริญต่อไป โดยขั้นตอนในการผสมเทียมมีดังต่อไปนี้ (Thanormjit et al., 2020)

3.2.1 การเก็บเซลล์สืบพันธุ์จากพ่อแม่พันธุ์

3.2.1.1 สุ่มคัดเลือกพ่อแม่พันธุ์จากหอยนางรมที่เลี้ยงปรับสภาพแล้ว โดยเลือกตัวที่มีขนาดประมาณ 6-7 เซนติเมตร

3.2.1.2 แกะเปลือกหอยออกตรงตำแหน่งด้านท้ายของบานพับ (hinge) โดยการใช้มีดแกะเปลือกหอยนางรมและทำการตัดกล้ามเนื้อยึดเปลือก (adductor muscle)

3.2.1.3 ใช้มีดผ่าตัดเขี่ยบริเวณอวัยวะสร้างเซลล์สืบพันธุ์ (gonad) นำเซลล์สืบพันธุ์ไปตรวจสอบเพศภายใต้กล้องจุลทรรศน์ กำลังขยาย 40-400 เท่า เพื่อแยกเพศของหอยนางรมและคัดเลือกพ่อแม่พันธุ์ที่สมบูรณ์ที่สุด โดยสังเกตจากเซลล์สืบพันธุ์ หากเป็นเพศเมียจะพบเซลล์ไข่ (oocyte) ขนาดใหญ่ หากเป็นเพศผู้จะพบเซลลอสุจิขนาดเล็กว่ายน้ำอยู่ตลอดเวลา

3.2.1.4 ทำการเก็บเซลล์สืบพันธุ์แยกตามเพศโดยใช้เทคนิค Stripping คือการกรีดด้วยมีดผ่าตัด บริเวณอวัยวะสร้างเซลล์สืบพันธุ์ (gonad) ของหอยนางรม ขั้นตอนนี้ต้องระวังไม่กรีดลึกเกิน เพื่อป้องกันไม่ให้โดนอวัยวะต่อมย่อยอาหาร (digestive gland)

3.2.1.5 นำเซลล์สืบพันธุ์ที่ได้ใส่บีกเกอร์ ที่บรรจุน้ำทะเลความเค็ม 30 ppt โดยแยกเพศ เพศ และรวมตัวอย่างแต่ละเพศในบีกเกอร์เดียวกัน (pooled sample) (ภาพที่ 3-1)

3.2.1.6 การกรองเซลล์สืบพันธุ์เพศเมีย

กรองเซลล์สืบพันธุ์เพศเมียด้วยตะแกรงไนลอน ขนาดรูกรอง 300 ไมโครเมตร และ 100 ไมโครเมตร ตามลำดับ เพื่อกรองเอาเศษเนื้อเยื่อขนาดใหญ่ที่ไม่ต้องการออก จากนั้นทำการกรองด้วยตะแกรงไนลอนขนาดรูกรอง 30 ไมโครเมตร อีกครั้ง เพื่อกรองเอาเซลล์ที่มีขนาดเล็กออกไป และ ให้เหลือเซลล์ไข่ที่ต้องการไว้ด้านบน เนื่องจากเซลล์ไข่ที่สมบูรณ์มีขนาดประมาณ 40-50 ไมโครเมตร ส่วนเซลล์ไข่ที่เล็กเกินไปจะผ่านรูกรองออกไป จากนั้นจึงทำการเก็บเซลล์ไข่ แยกในภาชนะต่างหาก

3.2.1.7 การกรองเซลล์สืบพันธุ์เพศผู้

เซลล์สืบพันธุ์เพศผู้หรืออสุจิมีขนาดเล็กประมาณ 3-5 ไมโครเมตร การกรองเซลล์สืบพันธุ์เพศผู้ใช้ตะแกรงไนลอน ขนาดรูกรอง 120 ไมโครเมตร เพื่อกรองเอาเศษเนื้อเยื่อขนาดใหญ่ที่ไม่ต้องการออก จากนั้นทำการกรองครั้งที่ 2 ด้วยตะแกรงไนลอน ขนาดรูกรอง 20 ไมโครเมตร อีกครั้ง เพื่อให้เซลล์อสุจิที่มีขนาดเล็กผ่านรูกรองลงมา จากนั้นทำการเก็บเซลล์สืบพันธุ์เพศผู้ แยกในภาชนะต่างหาก

3.2.1.8 การวัดความหนาแน่นของเซลล์สืบพันธุ์ เพื่อให้ทราบจำนวนที่แน่นอนสำหรับขั้นตอนการผสมเทียม โดยใช้ hemocytometer ในการนับเซลล์ไข่และเซลล์อสุจิ นับทั้งหมด 3 ซ้ำ เพื่อนำมาเฉลี่ยและคำนวณความหนาแน่นของเซลล์สืบพันธุ์ ในหน่วยจำนวนเซลล์สืบพันธุ์ต่อมิลลิลิตร

3.2.2 ขั้นตอนการผสมเทียมและการศึกษาชีววิทยาการเจริญของหอยนางรมปากจีบ

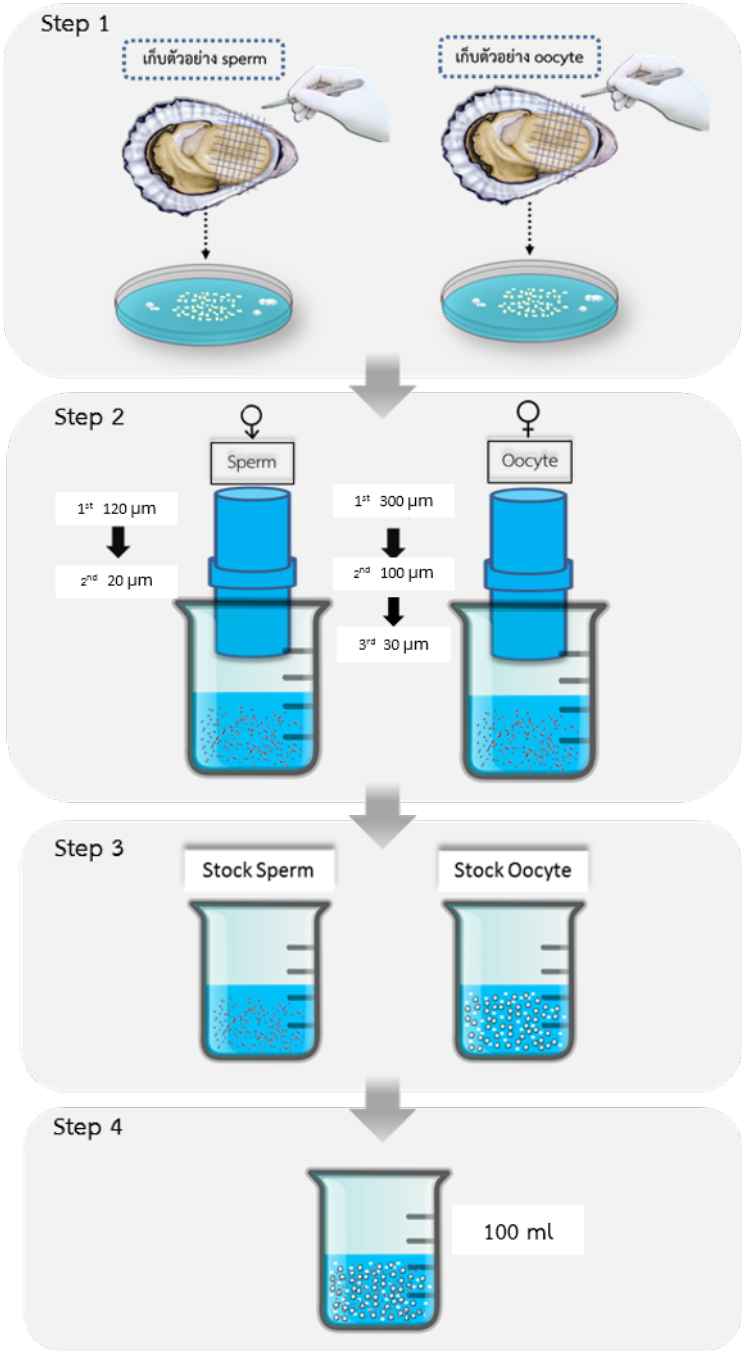
การผสมเทียมเซลล์สืบพันธุ์ของหอยนางรมปากจีบ ในการศึกษาครั้งนี้ ดัดแปลงมาจากวิธีของ Song, Suquet, Quéau, and Lebrun (2009) โดยใช้สัดส่วนเซลล์ไข่ต่อเซลล์อสุจิ 1: 400 เซลล์ ปริมาณเซลล์ไข่เริ่มต้น 40,000 เซลล์ ในปริมาตรน้ำทะเล 100 มิลลิลิตร ซึ่งมีวิธีการดังนี้คือ

3.2.2.1 เตรียมบีกเกอร์ขนาด 200 มิลลิลิตร เติมน้ำทะเลลงไป 50 มิลลิลิตร

3.2.2.2 ใช้สัดส่วนเซลล์ไข่ 1 เซลล์ ต่อเซลล์อสุจิ 400 เซลล์ (1/400) ในแต่ละบีกเกอร์จะใช้เซลล์ไข่จำนวนประมาณ 40,000 ฟอง และเซลล์อสุจิประมาณ 48,000,000 เซลล์ โดยคำนวณจากความหนาแน่นของเซลล์สืบพันธุ์ที่คำนวณไว้ข้างต้น

3.2.2.3 เติมน้ำทะเลลงไปให้มีปริมาตรครบ 100 มิลลิลิตร ทำทั้งหมด 3 ซ้ำ

3.2.3.4 ทำการศึกษาใต้กล้องจุลทรรศน์ เพื่อสังเกตการเปลี่ยนแปลงในระยะต่าง ๆ ภายใน 24 ชั่วโมง ทำการบันทึกผลและถ่ายภาพแต่ละระยะ



ภาพที่ 3-1 การเตรียมเซลล์สืบพันธุ์หอยนางรมปากจีบ และการปฏิสนธิ

Step 1 การเก็บเซลล์สืบพันธุ์จากบริเวณอวัยสืบพันธุ์

Step 2 ขั้นตอนการกรองเซลล์สืบพันธุ์

Step 3 การนับจำนวนเซลล์สืบพันธุ์

Step 4 การผสมเทียมและการศึกษาชีววิทยาการเจริญของหอยนางรมปากจีบ

3.3 การศึกษาผลกระทบของสารดีดีทีต่อชีววิทยาการเจริญของหอยนางรมปากจีบ

หลังจากที่ทราบข้อมูลชีววิทยาการเจริญของตัวอ่อนในหอยนางรมปากจีบแล้ว ขั้นต่อมาคือการศึกษาผลกระทบของสารดีดีทีต่อชีววิทยาการเจริญของหอยนางรมปากจีบ โดยเริ่มจากการเตรียมตัวอย่างเซลล์สืบพันธุ์ใหม่ตามวิธีการในหัวข้อ 3.2 (Thanormjit et al., 2020) จากนั้นจึงนำมาทดสอบกับสารดีดีทีที่ระดับความเข้มข้นต่าง ๆ ซึ่งมีขั้นตอนดังต่อไปนี้

3.3.1 การเตรียม stock solution ของสารดีดีที

เตรียม stock solution ของสารดีดีที เพื่อใช้ในการทดสอบความเป็นพิษ ทดสอบที่ความเข้มข้น $1x10^7$ ไมโครกรัมต่อลิตร โดยละลาย 0.10 กรัมของสารดีดีที ในเอทานอลและปรับปริมาตรเป็น 10 มิลลิลิตร

3.3.2 การทดสอบผลกระทบของสารดีดีทีต่อชีววิทยาการเจริญของตัวอ่อนหอยนางรมปากจีบ เพื่อหาค่า LC_{50}

ขั้นตอนที่หนึ่ง เตรียมตัวอย่างเซลล์สืบพันธุ์เพื่อใช้ในการผสมเทียมให้ได้ตัวอ่อน ตามวิธีการที่ระบุในหัวข้อ 3.2 ทำการผสมเทียมเพื่อปฏิสนธิและให้ได้ตัวอ่อน โดยใช้สัดส่วนเซลล์ไข่ต่อเซลล์อสุจิ 1: 400 เซลล์ ปริมาณเซลล์ไข่เริ่มต้น 40,000 เซลล์ ในปริมาตรน้ำทะเล 100 มิลลิลิตร เช่นเดียวกับที่ระบุในหัวข้อ 3.2 เตรียมตัวอย่างทั้งหมดจำนวน 15 บีกเกอร์ เพื่อใช้ทดสอบใน

ขั้นตอนที่สอง การเติมสารทดสอบโดยการเติม stock solution ของสารดีดีทีลงไปในตัวอย่างที่ทำการผสมเทียมในขั้นตอนที่หนึ่ง ความเข้มข้นของสารดีดีทีที่ใช้ในการทดสอบ เพื่อให้ได้ความเข้มข้นของสารดีดีทีที่ต่างกัน ได้แก่ 0, 0.25, 0.5, 1 และ 10 ไมโครกรัมต่อลิตร (ppb; part per billion) ทำการทดสอบ 3 ซ้ำ (15 บีกเกอร์)

ขั้นตอนที่สาม บันทึกผลใต้กล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสง เพื่อสังเกตความผิดปกติของตัวอ่อนในระยะต่าง ๆ ได้แก่ระยะ gastrula (ประมาณ 4 ชั่วโมงหลังการปฏิสนธิ) ระยะ trochophore (ประมาณ 7 ชั่วโมงหลังการปฏิสนธิ) และระยะ D-shape veliger (24 ชั่วโมงหลังการปฏิสนธิ) ถ่ายภาพและบันทึกผลการทดลอง เพื่อศึกษาความผิดปกติที่เกิดขึ้นกับตัวอ่อน

ข้อสังเกตเบื้องต้นสำหรับการบันทึกผลการศึกษา มีดังนี้

ตัวอ่อนระยะ Gastrula เป็นระยะที่ตัวอ่อนสร้างเนื้อเยื่อ 3 ชั้น ให้สังเกตว่าตัวอ่อนเริ่มเข้าสู่ระยะ Gastrula หรือไม่โดยการสังเกตว่ามีจากการเกิด blastopore ขึ้นหรือไม่ ขนาดและลักษณะเซลล์มีความผิดปกติหรือไม่

ตัวอ่อนระยะ trochophore ซึ่งเป็นระยะที่ตัวอ่อนว่ายน้ำได้ เนื่องจากมีการสร้าง cilia ล้อมรอบตัวอ่อน (velum) ให้สังเกตว่าตัวอ่อนระยะนี้มี cilia หรือไม่ มีการว่ายน้ำหรือไม่ ตัวอ่อนมีลักษณะผิดปกติหรือไม่

ตัวอ่อนระยะ D-shape veliger เป็นตัวอ่อนที่ตัวอ่อนสร้างเปลือกแข็งรูปคล้ายอักษร D ให้สังเกตว่าตัวอ่อนระยะนี้มีการสร้างเปลือกหรือไม่ เปลือกมีความผิดปกติหรือเจริญช้าหรือไม่ ตัวอ่อนที่อยู่ในเปลือก มีการเจริญผิดปกติหรือไม่ เป็นต้น

3.4 การทดสอบความเป็นพิษของสารดีดีทีต่อหอยนางรมตัวเต็มวัย

การทดสอบความเป็นพิษของสารดีดีทีต่อหอยนางรมทำในห้องปฏิบัติการ เนื่องจากยังไม่มีข้อมูลพิษวิทยาหรือระดับความรุนแรงของสารดีดีทีต่อหอยนางรมชนิดนี้ ดังนั้นผู้วิจัยจึงแบ่งการทดสอบความเป็นพิษของสารดีดีทีต่อหอยนางรมออกเป็น 2 การทดสอบ ได้แก่ การทดสอบผลกระทบของสารดีดีทีต่ออัตราการตายของหอยนางรม (lethal toxicity test) เพื่อให้ทราบความเข้มข้นที่ทำให้หอยนางรมตาย และคำนวณหาค่า LC_{50} เมื่อทราบความเข้มข้นที่ทำให้หอยนางรมตายแล้ว จากนั้นจึงเลือกระดับความเข้มข้นของสารดีดีทีที่มีความเข้มข้นประมาณ 1% และ 10% ของค่า LC_{50} เพื่อทดสอบผลกระทบของสารดีดีทีต่อเนื้อเยื่อและโปรตีโอมของหอยนางรม (sublethal toxic exposure)

3.4.1 การทดสอบผลกระทบของสารดีดีทีต่ออัตราการตายของหอยนางรม (lethal toxicity test)

ขั้นแรก เตรียมสารทดสอบ ความเข้มข้นของสารดีดีทีที่ใช้ทดสอบในการศึกษาครั้งนี้คือ 0, 1, 10, 50, 100, 500 และ 1,000 ไมโครกรัมต่อลิตร (ppb; part per billion) การเตรียมทำโดยการเตรียมน้ำทะเลปริมาตร 20 ลิตร (ใช้ตู้เลี้ยงปลาขนาดความจุ 40 ลิตร) โดยใช้น้ำทะเลที่มีคุณลักษณะตามที่กำหนด (ตารางที่ 3-1) จากนั้นเติม stock solution ของสารดีดีที (จากหัวข้อ 3.3.1) ลงในน้ำทะเลที่เตรียมไว้ เพื่อให้ได้ความเข้มข้นที่ระบุไว้ ทำการเตรียม 3 ซ้ำต่อ 1 ความเข้มข้น

ขั้นที่สอง ขั้นการทดสอบ ทำการเตรียมตัวอย่างหอยนางรมที่ผ่านการปรับสภาพแล้วใส่ลงในน้ำทะเลที่มีการปรับความเข้มข้นของสารไว้แล้วในขั้นแรก โดยใส่หอยนางรมจำนวน 20 ตัว/ตู้ การทดสอบในขั้นนี้ใช้หอยนางรมทั้งหมด 420 ตัว (7 ความเข้มข้น ๆ ละ 3 ซ้ำ ๆ ละ 20 ตัว)

ขั้นที่สาม บันทึกผลการทดสอบโดยตรวจสอบอัตราการตายทุก 24 ชั่วโมง เป็นระยะเวลา 96 ชั่วโมง โดยเมื่อครบ 24 ชั่วโมงจะนับจำนวนหอยที่ตายในทุกความเข้มข้น จากนั้นทำ

การเปลี่ยนน้ำทะเลที่มีสารดีดีทีที่ระดับความเข้มข้นเดิน และให้อาหารใหม่ โดยการเปลี่ยนน้ำและให้อาหารใหม่จะทำทุก ๆ 24 ชั่วโมง ตลอดจนครบการทดลอง

ขั้นที่สี่ การคำนวณค่า LC_{50} (lethal concentrations for 50% mortality) หลังจากได้ข้อมูลอัตราการตายที่เวลา 0, 24, 48, 72 และ 96 ชั่วโมงแล้ว นำข้อมูลมาพล็อตกราฟ และคำนวณหาค่า LC_{50} โดยใช้สมการ Probit Analysis ซึ่งค่า LC_{50} จะใช้ในการบ่งบอกระดับความเป็นพิษของสารดีดีทีในหอยนางรมชนิดนี้

3.4.2 การทดสอบผลกระทบของสารดีดีทีต่อเนื้อเยื่อและโปรตีโอมของหอยนางรม (sublethal toxic exposure)

3.4.2.1 การเลือกความเข้มข้นของสารทดสอบ

เมื่อทราบค่า LC_{50} แล้ว จากนั้นทำการเลี้ยงหอยนางรมซ้ำโดยเลือกระดับความเข้มข้นของสารดีดีทีที่มีความเข้มข้นประมาณ 1% และ 10% ของค่า LC_{50} เพื่อทดสอบผลกระทบของสารดีดีทีต่อเนื้อเยื่อและโปรตีโอมของหอยนางรม (sublethal toxic exposure) เนื่องจากผลการศึกษาครั้งนี้สามารถคำนวณค่า LC_{50} ที่เวลา 96 ชั่วโมง มีค่าเท่ากับ 891.25 ไมโครกรัมต่อลิตร ในการศึกษาครั้งนี้ผู้วิจัยเลือกกลุ่มทดสอบที่ระดับความเข้มข้นของสารดีดีทีที่ 1 และ 10 ไมโครกรัมต่อลิตร เพื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม เหตุผลที่เลือกกลุ่มทดสอบ 2 ความเข้มข้น เนื่องจากผู้วิจัยต้องการเห็นการเปลี่ยนแปลงแบบต่อเนื่องในระดับเนื้อเยื่อและระดับโปรตีน การเลี้ยงทดสอบทำเช่นเดียวกับหัวข้อ 3.3.1 ในขั้นตอนการทดสอบนี้ ใช้หอยนางรมจำนวน 20 ตัว/ตู้ การทดสอบในขั้นตอนนี้ใช้หอยนางรมทั้งหมด 180 ตัว (3 ความเข้มข้น ๆ ละ 3 ซ้ำ ๆ ละ 20 ตัว)

3.4.2.2 การเก็บตัวอย่างเพื่อการศึกษาพยาธิสภาพของเนื้อเยื่อ

ทำโดยการสุ่มเก็บตัวอย่างหอยนางรมจากกลุ่มควบคุมและกลุ่มทดลองที่ได้รับสารดีดีที ที่ระดับความเข้มข้น 10 และ 100 ไมโครกรัมต่อลิตร เป็นเวลา 96 ชั่วโมง โดยเก็บตัวอย่างกลุ่มละ 3 ตัว (N=3) เพื่อผ่าตัดเก็บเนื้อเยื่อ เริ่มจากการเปิดเปลือกและตัดเนื้อเยื่อตามขวางผ่านลำตัวของหอยนางรม โดยมีตำแหน่งตามเส้นประดังภาพที่ 3-2 เพื่อให้ได้ชิ้นเนื้อเยื่อที่มีอวัยวะเหงือก ต่อมย่อยอาหาร และ แมนเทิล ในชิ้นเดียวกัน จากนั้นนำชิ้นเนื้อเยื่อตัวอย่างที่แช่สารละลายบูแองส์เพื่อคงสภาพตัวอย่างสำหรับการศึกษาเนื้อเยื่อต่อไป

3.4.2.3 การเก็บตัวอย่างเพื่อการศึกษาโปรตีโอม

สุ่มเก็บตัวอย่างหอยนางรมจากกลุ่มควบคุมและกลุ่มทดลองที่ได้รับสารดีดีที ที่ระดับความเข้มข้น 10 และ 100 ไมโครกรัมต่อลิตร เป็นเวลา 96 ชั่วโมง โดยเก็บตัวอย่างกลุ่มละ 3 ตัว (N=3) เพื่อเก็บเนื้อเยื่อแมนเทิล ซึ่งอยู่ระหว่างแผ่นปาก (labial palps) กับกล้ามเนื้อยึดเปลือก

(adductor muscle) จากนั้นนำมาเก็บไว้ที่อุณหภูมิ -80 องศาเซลเซียส โดยขั้นตอนการเก็บตัวอย่างเพื่อวิเคราะห์โปรตีน ต้องทำบนน้ำแข็ง (on ice) และต้องใช้ความรวดเร็ว เพื่อป้องกันไม่ให้เนื้อเยื่อได้รับความเสียหายจากเอนไซม์โปรทีเอส

3.5 การศึกษาผลกระทบของสารดีดีทีต่อเนื้อเยื่อหอยนางรมปากจีบด้วยเทคนิคมิญชวิทยา

การศึกษาผลกระทบของสารดีดีทีต่อเนื้อเยื่อของหอยนางรมปากจีบโดยเทคนิคมิญชวิทยา (histological technique) มีขั้นตอนดังต่อไปนี้

3.5.1 การฝังเนื้อเยื่อในพาราพลาสต์

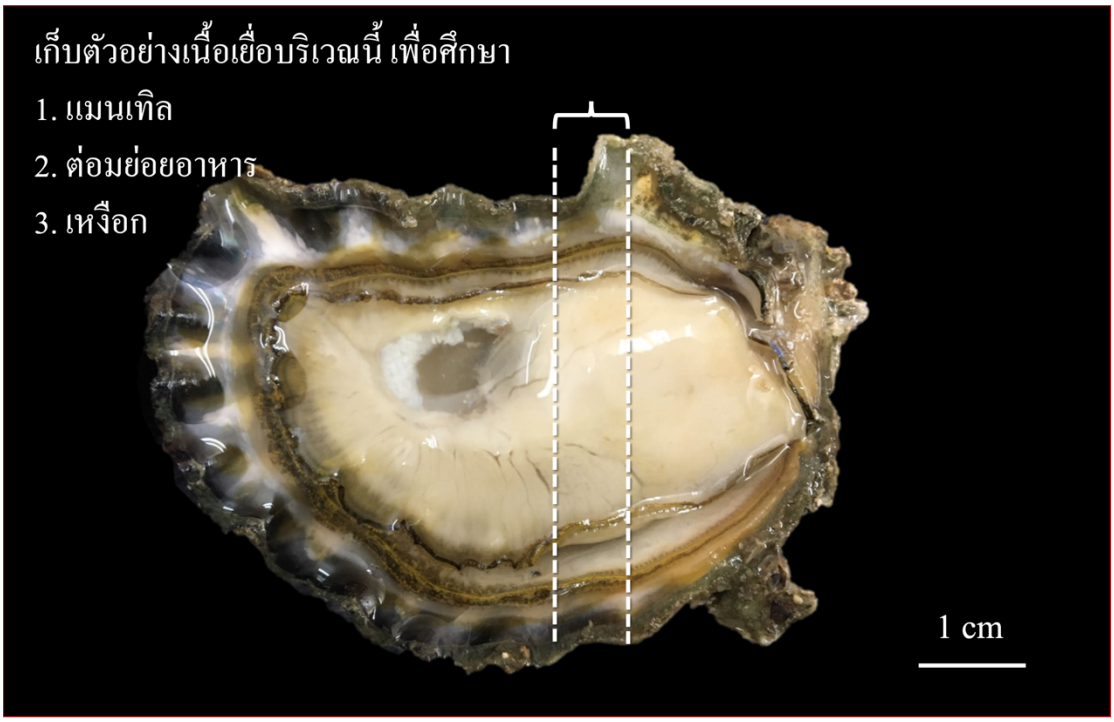
นำชิ้นเนื้อเยื่อตัวอย่างที่แช่สารละลายบูแองส์ จากหัวข้อ 3.3.2.2 เป็นเวลาครบ 24 ชั่วโมง นำมาล้างด้วยเอทานอลที่ความเข้มข้น 70% ครั้งละ 30 นาที 3 ครั้ง หรือล้างจนกระทั่งเนื้อเยื่อไม่มีสีเหลือง จากนั้นนำเนื้อเยื่อมาผ่านกระบวนการดึงน้ำออก (dehydration) ในเอทานอลที่มีความเข้มข้นต่ำไปยังเอทานอลที่มีความเข้มข้นสูง โดยเริ่มจากเอทานอลที่มีความเข้มข้น 80% 90% และ 95% ตามลำดับ ขั้นตอนละหนึ่งครั้ง ๆ ละ 1 ชั่วโมง แล้วจึงนำมาแช่ในเอทานอล 100% จำนวน 2 ครั้ง ๆ ละ 1 ชั่วโมง หลังจากนั้นนำไปแช่ในไดออกเซน 2 ครั้ง ๆ ละ 1 ชั่วโมง นำเนื้อเยื่อมาแช่ในพาราพลาสต์ที่อุณหภูมิ 58-60 องศาเซลเซียส 3 ครั้ง ๆ ละ 1 ชั่วโมง แล้วจึงนำมาฝังเนื้อเยื่อลงในพาราพลาสต์ ขั้นตอนต่อมาคือการตัดเนื้อเยื่อด้วยเครื่องตัดเนื้อเยื่อ (microtome รุ่น HESTION ERM 3000, Hestion, Australia) ความหนา 6 ไมโครเมตร นำเนื้อเยื่อที่ตัดแล้วมาติดลงบนแผ่นสไลด์โดยใช้สารละลายเจลาติน 1% เป็นตัวช่วยให้เนื้อเยื่อติดลงบนแผ่นสไลด์ นำสไลด์ที่ติดชิ้นเนื้อเยื่อแล้วมาวางให้แห้งบนเครื่องอุ่นแผ่นสไลด์ที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง หลังจากนั้นนำเนื้อเยื่อบนสไลด์ไปย้อมสี

3.5.2 การย้อมสีเนื้อเยื่อ

การย้อมสีเนื้อเยื่อในการศึกษาครั้งนี้ เป็นการย้อมสีพื้นฐานโดยใช้สีฮีมาทอกไซลีนและสีอีโอซิน (haematoxylin and eosin; H&E)

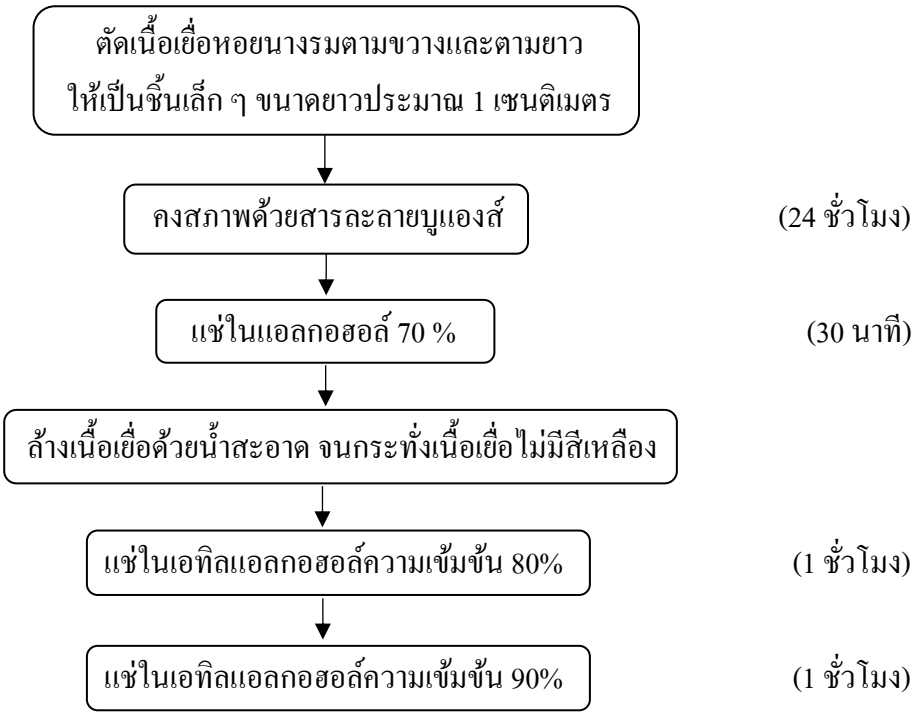
3.5.3 การศึกษาเนื้อเยื่อด้วยกล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสง (light microscopes)

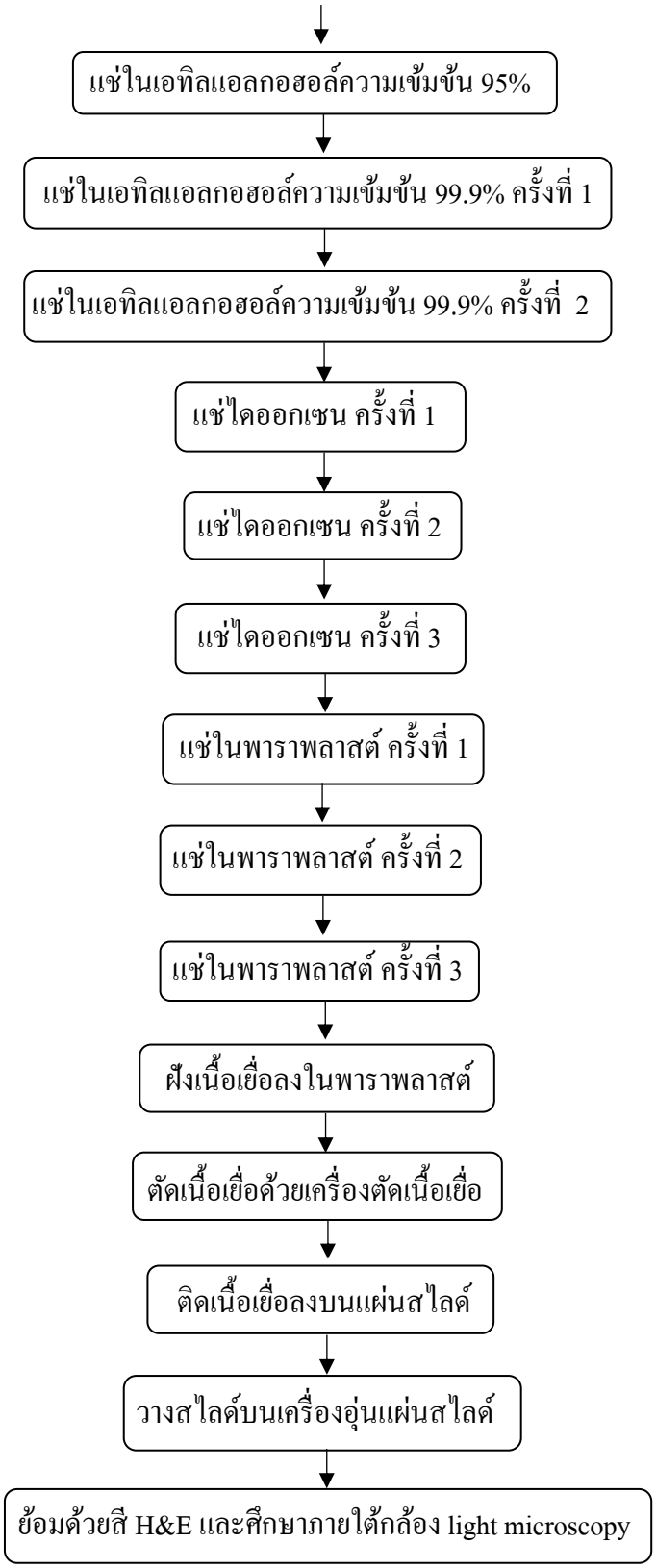
นำเนื้อเยื่อที่ผ่านการย้อมสีแล้วมาศึกษาลักษณะของเนื้อเยื่อโดยใช้กล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสง ยี่ห้อ Olympus รุ่น CH30 โดยใช้โปรแกรม Optikam B1, B3, B5, B9 Ver. 1.9 เพื่อถ่ายรูปเนื้อเยื่ออวัยวะของหอยนางรมปากจีบ



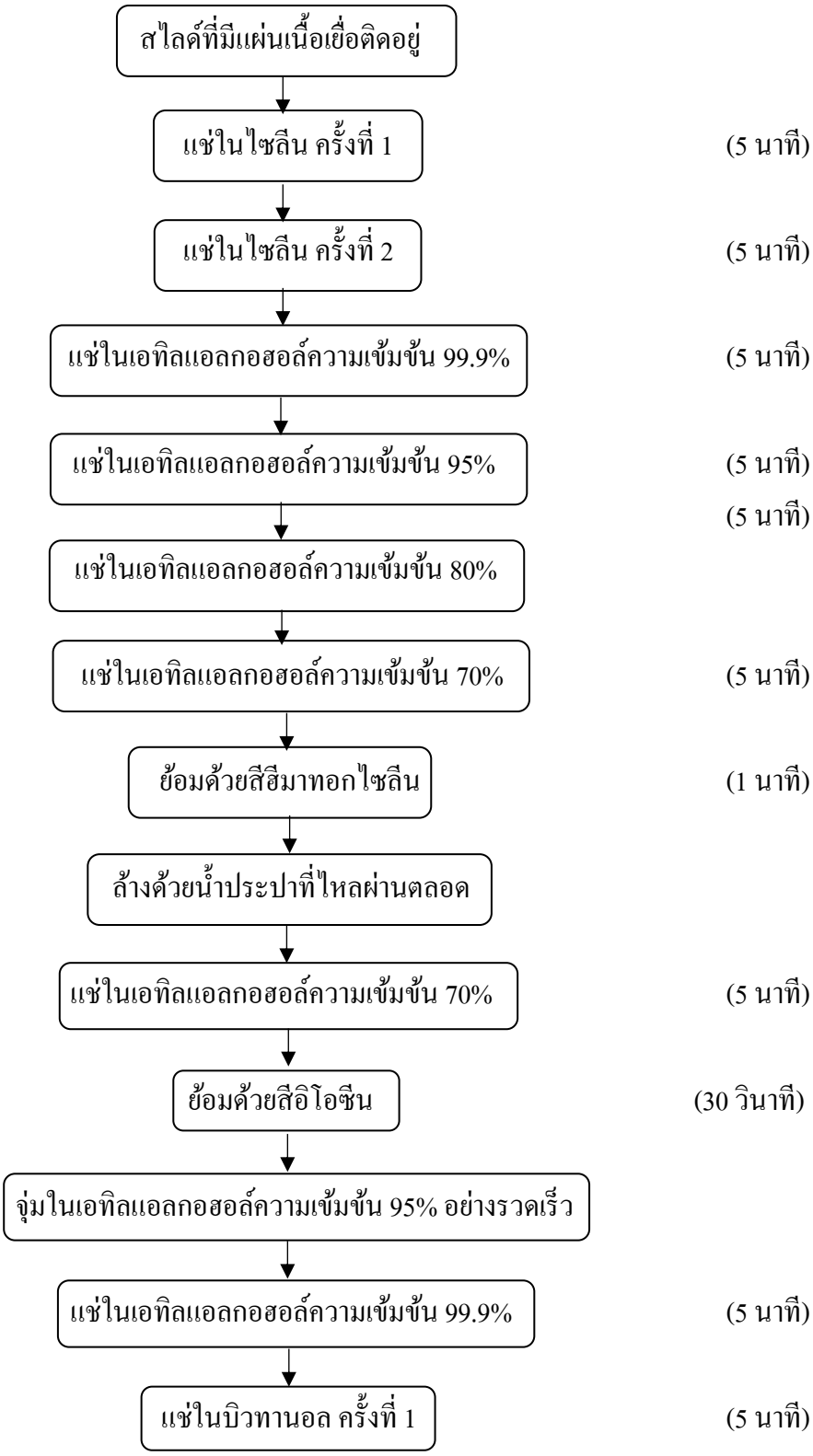
ภาพที่ 3-2 ตำแหน่งการเก็บตัวอย่างชิ้นเนื้อเนื้อเยื่อเพื่อศึกษาพยาธิสภาพของเนื้อเยื่อ

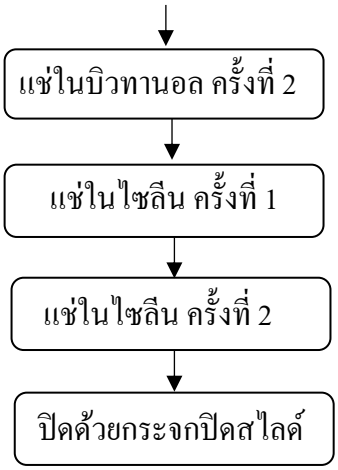
สรุปขั้นตอนการเตรียมเนื้อเยื่อ




แช่ในเอทิลแอลกอฮอล์ความเข้มข้น 95%
(1 ชั่วโมง)
แช่ในเอทิลแอลกอฮอล์ความเข้มข้น 99.9% ครั้งที่ 1
(1.30 ชั่วโมง)
แช่ในเอทิลแอลกอฮอล์ความเข้มข้น 99.9% ครั้งที่ 2
(1.30 ชั่วโมง)
แช่ไดออกเซน ครั้งที่ 1
(1 ชั่วโมง)
แช่ไดออกเซน ครั้งที่ 2
(1 ชั่วโมง)
แช่ไดออกเซน ครั้งที่ 3
(24 ชั่วโมง)
แช่ในพาราพลาสต์ ครั้งที่ 1
(1 ชั่วโมง)
แช่ในพาราพลาสต์ ครั้งที่ 2
(1 ชั่วโมง)
แช่ในพาราพลาสต์ ครั้งที่ 3
(24 ชั่วโมง)
ฝังเนื้อเยื่อลงในพาราพลาสต์
ตัดเนื้อเยื่อด้วยเครื่องตัดเนื้อเยื่อ
ติดเนื้อเยื่อลงบนแผ่นสไลด์
วางสไลด์บนเครื่องอุ่นแผ่นสไลด์
(24 ชั่วโมง)
ย้อมด้วยสี H&E และศึกษาภายใต้กล้อง light microscopy

สรุปขั้นตอนการย้อมสี





3.6 การศึกษาผลกระทบของสารดีดีทีต่อโปรตีโอมของหอยนางรม

การศึกษาครั้งนี้ทำการวิเคราะห์โปรตีโอมของเนื้อเยื่อแมนเทิลโดยใช้เทคนิคโปรตีโอมิกส์ (proteomics) เพื่อศึกษาผลกระทบของสารดีดีทีต่อกลไกการทำงานของเซลล์โดยติดตามระดับการแสดงออกของโปรตีนภายในเซลล์ และนอกจากนี้ยังใช้ระบุโปรตีนที่มีแนวโน้มสำหรับใช้เป็นตัวบ่งชี้ทางชีวภาพสำหรับการปนเปื้อนของสารดีดีที (potential biomarker of exposure of DDT) เพื่อนำไปประยุกต์ใช้ในการติดตามตรวจสอบและเฝ้าระวังสถานการณ์การปนเปื้อนของสารดีดีทีในสิ่งแวดล้อมทางทะเล รวมถึงสามารถนำมาใช้เป็นข้อมูลเบื้องต้นในการเฝ้าระวังป้องกันและแก้ไขปัญหาการปนเปื้อนของสารดีดีทีในสิ่งมีชีวิตทางทะเลต่อไป การศึกษาโปรตีนด้วยเทคนิคโปรตีโอมิกส์ในมีดังต่อไปนี้

3.6.1 การสกัดโปรตีน

นำเนื้อเยื่อของหอยนางรมปากจีบ ที่เก็บไว้ที่อุณหภูมิ -80 องศาเซลเซียส มาบดด้วยเครื่องบด tissue homogenizer ในสารละลาย lysis buffer (10 mM Tris-HCl, pH 7.2 ประกอบด้วย 150 mM NaCl, 0.5% Triton-X100, 1mM EDTA และ 1 mM cocktail protease inhibitor) จากนั้นจึงนำไปปั่นเหวี่ยงที่ 15,000 x g เป็นเวลา 30 นาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เพื่อช่วยให้เศษเซลล์หรือเนื้อเยื่อเกี่ยวพันตกตะกอน แล้วจึงดูดเอาเฉพาะส่วนใส (supernatant) ไปวิเคราะห์ปริมาณโปรตีน โดยใช้ bovine serum albumin (BSA) เป็น standard protein เนื่องจากเนื้อเยื่อหอยนางรมอาจมีน้ำทะเลติดมาด้วย อาจมีผลต่อการแยกโปรตีนในขั้นต่อไป การกำจัดปัญหาดังกล่าวจึงต้องเพิ่มความบริสุทธิ์ของโปรตีนที่จะใช้สำหรับการวิเคราะห์ขั้นต่อไปโดยใช้ 2D-clean up kit (GE Healthcare Life Science) เพื่อช่วยให้ได้ตัวอย่างโปรตีนที่บริสุทธิ์

3.6.2 การแยกโปรตีนด้วยเทคนิคเจล 2 มิติ (two-dimensional gel electrophoresis)

นำตัวอย่างโปรตีนที่สกัดแล้วมา 250 ไมโครกรัมต่อตัวอย่าง ผสมกับ rehydration buffer ซึ่งประกอบด้วย urea 7 M DTT 0.1 M CHAPS 4% IPG buffer 0.2% แล้วจึงนำมาโหลดลงใน isoelectric focusing gel (IEF) strip pH3-10, non-linear ขนาด 7 ซม. ของ GE Healthcare Life Science ทิ้งไว้ข้ามคืนเพื่อให้สารละลายทั้งหมดซึมเข้าไปภายในเจล เมื่อทิ้งไว้ข้ามคืนแล้วจึงทำการโฟกัสโปรตีน หลังจากนั้นนำ IEF strip ที่โฟกัสโปรตีนเรียบร้อยแล้วมาแช่ในสารละลาย equilibration buffer 1 (6 M urea, 50 mM Tris (pH 6.8), 2% (w/v) SDS, 30% (v/v) glycerol, 1% (w/v) DTT) เป็นเวลา 15 นาที ตามด้วย equilibration buffer 2 (6 M urea, 50 mMTris (pH 6.8), 2% (w/v) SDS, 30% (v/v) glycerol, 2.5 % (w/v) iodoacetamide เป็นเวลา 15 นาที ทำการแยกโปรตีนด้วยเทคนิค two-dimensional gel electrophoresis โดยมิติที่หนึ่งจะแยกโปรตีนด้วยไฟฟ้าตามค่า Isoelectric focusing ของโปรตีน เครื่องมือที่ใช้คือ IPGPhore3 จากนั้น ในมิติที่สองจะแยกโปรตีนตามมวลโมเลกุลโดยใช้ SDS-Polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) หลังจากกระบวนการ electrophoresis นำเจลที่ได้มาย้อมด้วยสี coomassie brilliant blue G-250 และล้างสีด้วย destain solution

3.6.3 การวิเคราะห์ภาพถ่ายโปรตีนบนเจล (gel image analysis)

นำเจลที่ล้างสีเรียบร้อยแล้วมาสแกนด้วยเครื่อง epson 10000XL scanner (Epson, China) ความละเอียด 600 dpi เพื่อสร้างแผนที่อ้างอิงโปรตีน (reference map) สำหรับข้อมูลโปรตีนในหอยนางรมปากจีบ และทำการเปรียบเทียบการแสดงออกของโปรตีนในหอยนางรมระหว่างกลุ่มทดลองที่ได้รับสารดีดีทีความเข้มข้น 10 และ100 ไมโครกรัมต่อลิตร และกลุ่มควบคุม จำนวนความเข้มข้นละ 3 ซ้ำ โดยใช้โปรแกรมวิเคราะห์แผ่นเจล Delta2D Version 4.8 (DECODON, Greifswald, Germany) ซึ่งโปรแกรมนี้จะทำหน้าที่เปรียบเทียบความเข้มของจุดโปรตีนบนเจลแล้ววิเคราะห์ผลเทียบความแตกต่างของปริมาณโปรตีน พร้อมทั้งคำนวณค่าความเชื่อมั่น ($p < 0.01$) ให้กับโปรตีนแต่ละจุดที่วิเคราะห์ ทำให้ทราบข้อมูลโปรตีนที่มีแนวโน้มเพิ่มขึ้น (up-regulated protein) หรือลดลง (down-regulated protein) แตกต่างกันโดยมีนัยสำคัญทางสถิติ จากนั้นเมื่อได้ข้อมูลจากการวิเคราะห์ปริมาณโปรตีนบนแผ่นเจลแล้ว จึงนำมาเลือกจุดโปรตีนที่มีแนวโน้มความแตกต่างกันเพิ่มขึ้นหรือลดลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ เพื่อใช้อธิบายกลไกการตอบสนองของเซลล์ และการระบุ protein biomarker สำหรับการปนเปื้อนของสารดีดีที ซึ่งจะต้องทำการระบุชนิดของโปรตีนให้ได้ก่อน โดยการตัดจุดโปรตีนที่สนใจเพื่อย่อยด้วยเอนไซม์ trypsin และนำไปวิเคราะห์ด้วย LC-MS/MS ต่อไป

3.6.4 การย่อยโปรตีนด้วยเอนไซม์ trypsin

ขั้นตอนการย่อยโปรตีน เริ่มจากทำการตัด spot โปรตีนที่สนใจจะวิเคราะห์ มาย่อยด้วยเอนไซม์ trypsin ให้เป็นเพปไทด์สายสั้นลง เอนไซม์ trypsin จะจดจำตำแหน่งและเข้าไปทำการตัดกรดอะมิโนหลังตำแหน่ง argenine และ lucien ทำให้ได้เพปไทด์ที่มีขนาดประมาณสายละ10 กรดอะมิโน ซึ่งเหมาะสมต่อการวิเคราะห์ด้วยเครื่องแมสสเปคโทมิเตอร์ชนิด LC-MS/MS โดยมีขั้นตอนดังนี้ นำเจลมาล้างด้วยสารละลาย 50% acetonitrile (ACN), 0.1 M ammonium bicarbonate ($NH_4 HCO_3$) 50 ไมโครลิตร ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 20 นาที หลังจากนั้นดูดสารละลายออกแล้วเติม 100% acetonitrile 200 ไมโครลิตร แล้วทิ้งไว้ประมาณ 15 นาที หรือจนกว่าเจลจะมีสีขาวแล้วจึงดูดสารละลายออก หลังจากนั้นนำมาย่อยด้วยเอนไซม์ทริปซินเพื่อให้สายเพปไทด์สั้นลง โดยการเติมสารละลายเอนไซม์ทริปซินที่เจือจางอัตราส่วน 0.006 ไมโครกรัมต่อไมโครลิตร ปริมาณ 10-15 ไมโครลิตร ลงในหลอดต่างๆ โดยใช้อุณหภูมิ 37 องศา เซลเซียส เป็นเวลา 3-5 ชั่วโมง

3.6.5 การวิเคราะห์ด้วยเครื่องแมสสเปคโทมิเตอร์ชนิด LC-MS/MS

นำเปปไทด์ซึ่งผ่านกระบวนการย่อยด้วยเอนไซม์ทริปซินจากขั้นตอนข้างต้นมาวิเคราะห์ต่อด้วยเทคนิค liquid chromatography-mass spectrometry (LC-MS/MS) (AmaZon™ speed ETD mass spectrometer) ประกอบด้วย liquid chromatography และ electrospray ionization (ESI)/ ion trap mass spectrometer มีขั้นตอนดังนี้ ตัวอย่างที่ผ่านการย่อยด้วยเอนไซม์ทริปซิน ถูกนำมาละลายในสารละลาย 0.1% formic acid in H_2O จากนั้นนำมาแยกเปปไทด์ด้วย nanoACQUITY UPLC system (Waters Corporation, Milford, MA, USA) สภาวะที่เหมาะสมในการแยกทางโครมาโทกราฟี จะใช้คอลัมน์ชนิด nanoACQUITY UPLC column (1.7 µm BEH, 75 µm × 200 mm C18) อัตราการไหล 300 นาโนลิตรต่อนาที ที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส ซึ่งตัวฉีด (Injector) จะทำหน้าที่ควบคุมปริมาตรและฉีดสารตัวอย่างเข้าสู่คอลัมน์ จากนั้นจึงทำการชะด้วยวิธีแกรเดียนท์ (LC gradient: 1–50% B in 70 min, 50–90% B in 5 min, followed by 15 min on 90% B) mobile phase สารละลาย A คือ 0.1% formic acid in H_2O และ สารละลาย B คือ 0.1% formic acid in ACN เปปไทด์ที่ได้จะถูกนำมาวิเคราะห์ด้วย MS/MS AmaZon™ speed ETD mass spectrometer (Bruker Billerica, MA, USA) ทำงานในระบบ positive mode กระบวนการเริ่มจากสารตัวอย่างที่เป็นของเหลว จะถูกสเปรย์ผ่านแคปพิลลารีที่มีสนามไฟฟ้าแรงสูง (1,300 V) ตั้งค่าที่อุณหภูมิ 150 องศาเซลเซียส และถูกทำ ให้เป็นละอองพ่นออกจากปลายแคปพิลลารี วิเคราะห์สารที่มีมวลในช่วง (Mass range) 50-3,000 m/z ข้อมูล MS/MS ถูกประมวลผลโดยซอฟต์แวร์ Bruker Compass 1.4 ออกมาเป็น chromatogram จากนั้นจึงนำผลมาเปรียบเทียบกับฐานข้อมูลชีวสารสนเทศ (bioinformatics) ต่อไป

การสืบค้นข้อมูล MS/MS ion ด้วยโปรแกรม MASCOT search นำไฟล์ mgf ซึ่งเป็นข้อมูลของ MS/MS ion ที่ได้ นำมาเปรียบเทียบกับข้อมูลโปรตีนที่อยู่ในฐานข้อมูลโปรตีน คือ NCBI เปรียบเทียบกับฐานข้อมูลจีโนมของหอยนางรม *Crassostrea gigas* และ *Crassostrea virginica* ชนิดของเอนไซม์ที่ใช้ในการย่อย เลือกเอนไซม์ทริปซิน (trypsin) ค่า peptide tolerant คือ 1.2 Da ค่า MS/MS tolerant คือ ± 0.6 Da ค่า peptide charge +1 +2 and +3 ส่วนของ fixed modifications คือ carbamidomethyl (C), phospho (ST) และ oxidation (M) ชนิดของ data format คือ mascot generic เครื่องมือที่ใช้วิเคราะห์ (instrument) คือ ESI-TRAP การวิเคราะห์ด้วยเครื่องแมสสเปคโทรมิเตอร์ชนิด LC-MS/MS นี้ เจ้าหน้าที่ห้องปฏิบัติการชีวเคมี สถาบันวิจัยจุฬาภรณ์ เป็นผู้ดำเนินการให้

3.5.6 วิเคราะห์ข้อมูลเพื่อหา potential protein biomarker

นำข้อมูลที่ได้มาวิเคราะห์หาโปรตีนที่ที่มีแนวโน้มสูงที่จะเป็น protein biomarker สำหรับสารดีดีที เกณฑ์การเปรียบเทียบจะใช้โปรตีนที่มีการแสดงออกแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ($p<0.01$) ข้อมูลจำนวนเท่าของการแสดงออกของโปรตีน (fold change) ระหว่างกลุ่มทดลองและกลุ่มควบคุม ซึ่งหลังจากทำการวิเคราะห์ผลแล้วจะได้โปรตีนที่มีแนวโน้มใช้เป็นตัวบ่งชี้ทางชีวภาพในการปนเปื้อนสารดีดีทีในสิ่งแวดล้อมต่อไป

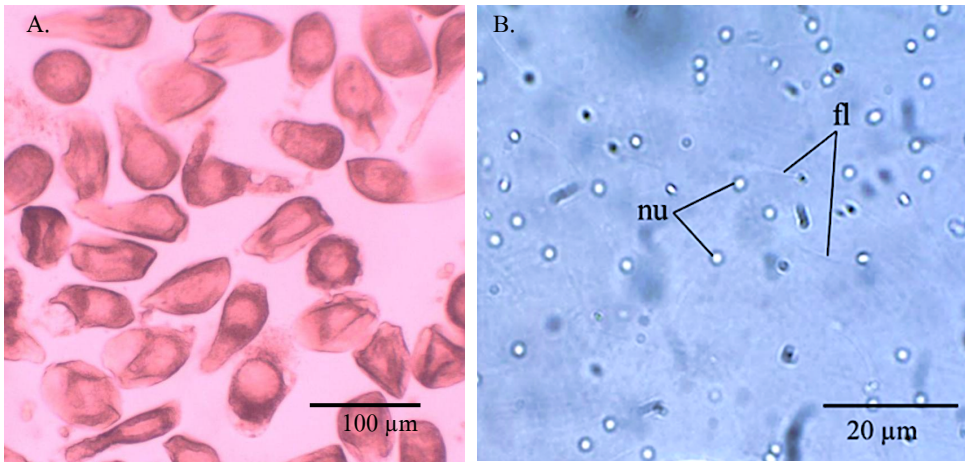
บทที่ 4
ผลการศึกษา

4.1 ชีววิทยาการเจริญของตัวอ่อนหอยนางรมปากจีบ

ในการศึกษาผลกระทบของสารดีดีทีต่อชีววิทยาการเจริญของตัวอ่อนหอยนางรมปากจีบอันดับแรกผู้วิจัยได้ทำการศึกษาชีววิทยาการเจริญขั้นต้นของตัวอ่อน (early developmental biology) เพื่อให้มีข้อมูลระยะการเจริญในหอยนางรมชนิดนี้ อีกทั้งยังทำให้ทราบเวลาที่ใช้สำหรับพัฒนาตัวอ่อนในแต่ละระยะ เพื่อจะได้เป็นต้นแบบสำหรับการศึกษาผลกระทบของสารดีดีทีต่อการเจริญของตัวอ่อน หลังจากทำการเก็บตัวอย่างโดยเอาเซลล์สืบพันธุ์จากอวัยสืบพันธุ์และทำการปฏิสนธิในสภาพที่เหมาะสม จะสังเกตเห็นลักษณะของเซลล์ไข่และเซลล์อสุจิของหอยนางรมปากจีบภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสง (ภาพที่ 4-1)

4.1.1 ลักษณะเซลล์ไข่และเซลล์อสุจิของหอยนางรมปากจีบ

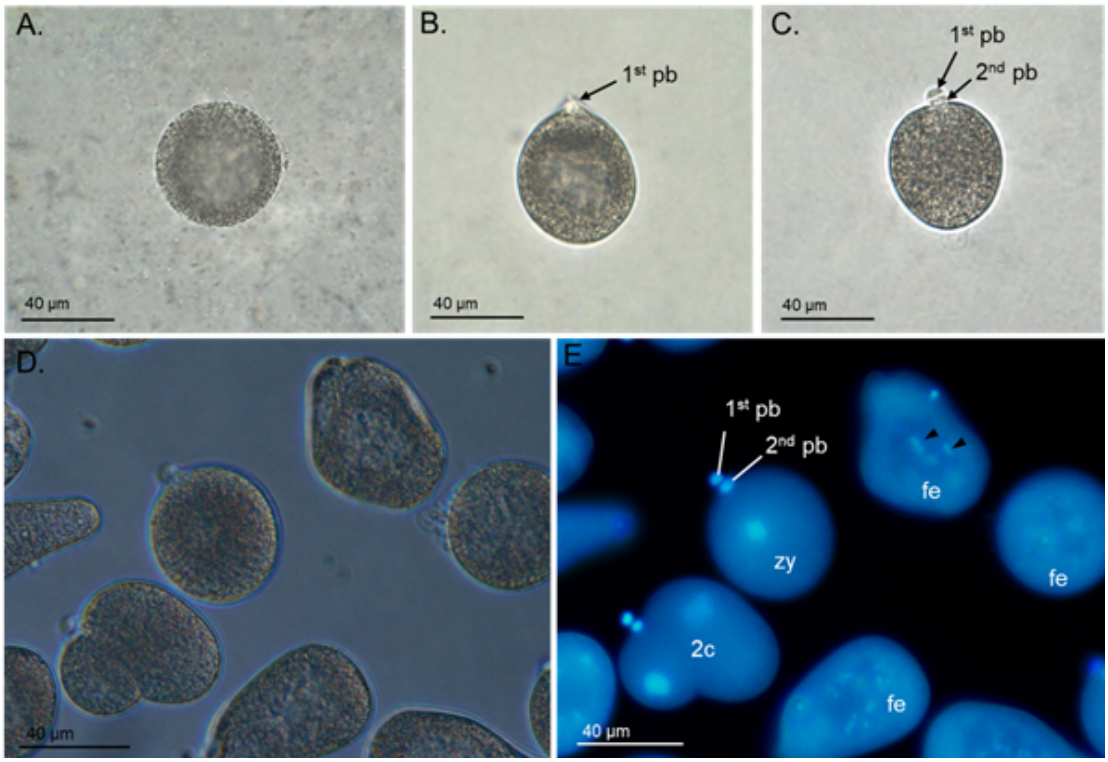
ผลการศึกษาพบเซลล์ไข่มีขนาดใหญ่ประมาณ 50 ไมโครเมตร พบนิวเคลียสขนาดใหญ่ ภายหลังจากกรีดออกมาจากอวัยวะสืบพันธุ์เซลล์จะมีรูปร่างคล้ายลูกแพร (ภาพที่ 4-1A) หลังจากพักไว้ในน้ำทะเลประมาณ 15-30 นาที เซลล์ไข่จะเริ่มกลมและนำมาใช้สำหรับการปฏิสนธิได้ ส่วนเซลล์อสุจิมีขนาดเล็ก เคลื่อนที่ตลอดเวลาโดยใช้การโบกพัดของ flagellum (ภาพที่ 4-1B)



ภาพที่ 4-1 เซลล์ไข่ (A.) และเซลล์อสุจิ (B.) ของหอยนางรมปากจีบ ภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสง

4.1.2 ผลการศึกษาพบการเจริญของตัวอ่อนของหอยนางรมปากจีบ ภายหลังจากการปฏิสนธิโดยการผสมเซลล์ไข่และเซลล์อสุจิแล้ว พบการเจริญของตัวอ่อนในระยะต่าง ๆ ดังนี้

1. ระยะปฏิสนธิ (fertilization)การปฏิสนธิเกิดขึ้นภายในเวลา 10-15 นาที หลังจากการผสมเซลล์ไข่และเซลล์อสุจิ สังเกตได้จากเซลล์ไข่จะมีการเปลี่ยนแปลงโดยเกิด first polar body ขึ้นในหอยนางรม ในเพศเมียนั้นเซลล์ไข่มีการสะสม yolk ภายในไซโทพลาซึมมากทำให้ไข่มีขนาดใหญ่และเจริญอยู่ในระยะ primary oocyte ซึ่งเป็นระยะที่พร้อมสำหรับการปฏิสนธิ หากเซลล์ไข่ได้รับการปฏิสนธิเซลล์ไข่จะมีการแบ่งเซลล์แบบไมโอซิสครั้งที่ 1 (meiosis I) ทำให้ได้เซลล์ใหม่ 2 เซลล์ คือ secondary oocyte (เซลล์ขนาดใหญ่) และ first polar body (เซลล์ขนาดเล็ก) จากนั้น secondary oocyte จึงจะแบ่งเซลล์แบบไมโอซิสครั้งที่ 2 (meiosis II) สมบูรณ์ และจึงเกิดการรวมนิวเคลียสของเซลล์ไข่กับนิวเคลียสของเซลล์อสุจิได้เป็นเซลล์ไซโกต (zygote) ซึ่งเป็นเซลล์ร่างกาย (2n) แล้วจึงเริ่มแบ่งเซลล์แบบไมโทซิส (mitosis) เพื่อพัฒนาเป็นตัวอ่อนระยะต่อไป (ภาพที่ 4-2) นอกจากนี้ยังพบว่ากระบวนการแบ่งเซลล์ไซโกตครั้งที่ 1 เพื่อกลายเป็นตัวอ่อนระยะคลีเวจ (first clevage) มีการแบ่งเซลล์ 1 ครั้ง ได้เป็น 3 lobes ได้แก่ lobe ขนาดเล็ก 2 lobes และ lobe ขนาดใหญ่ 1 lobe (polar lobe) แต่พบนิวเคลียสเพียง 2 นิวเคลียสใน lobe ขนาดเล็กเท่านั้น ใน lobe ขนาดใหญ่เป็นเพียงไซโทพลาซึม ปรากฏการณ์การเกิด 3 lobes ในนี้พบได้ในระยะเวลาอันสั้น หลังจากนั้น lobe ขนาดใหญ่จะเกิดการรวมไซโทพลาซึมเข้ากับ lobe ขนาดเล็ก 1 lobe กลายเป็นเซลล์ใหม่ 2 เซลล์ที่มีขนาดไม่เท่ากัน โดยเซลล์ขนาดเล็กด้าน animal pole และเซลล์ขนาดใหญ่ด้าน vegetal pole เรียกปรากฏการณ์นี้ว่า unequal holoblastic cleavage (ภาพที่ 4-3)



ภาพที่ 4-2 การปฏิสนธิและการแบ่งเซลล์ของเซลล์ไข่ในหอยนางรมปากจีบ *S. cucullata*

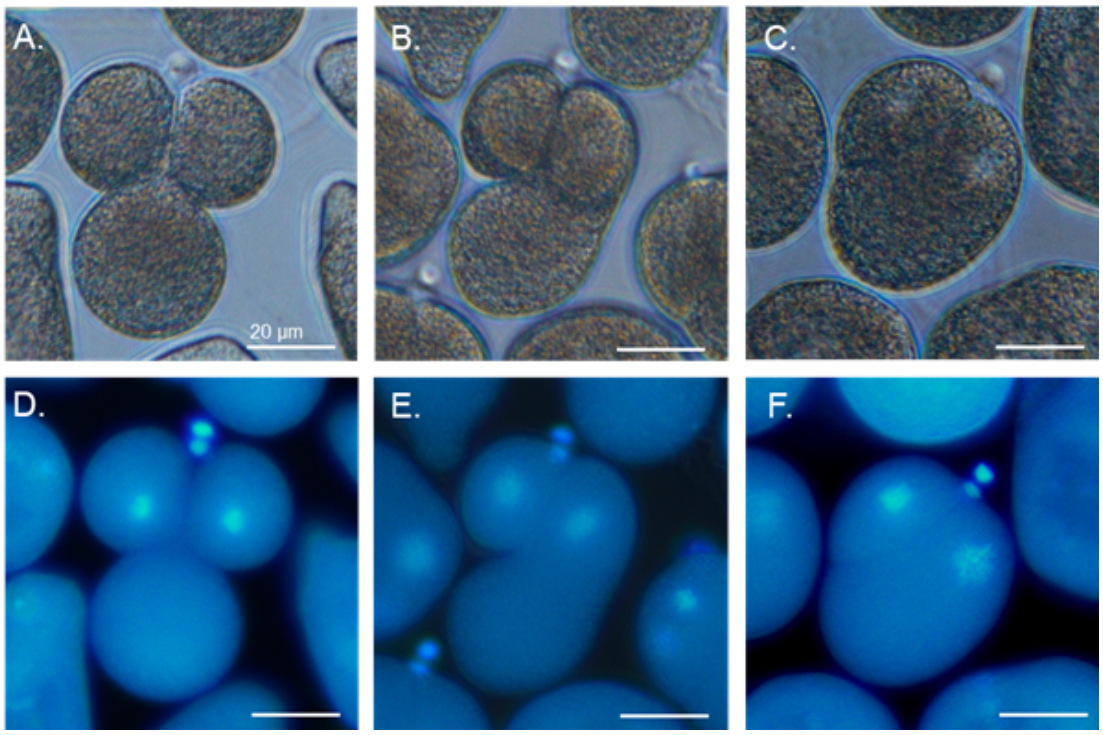
(A) เซลล์ไข่ที่ยังไม่ปฏิสนธิ

(B) เซลล์ไข่เมื่อได้รับการปฏิสนธิจะเริ่มแบ่งเซลล์แบบไมโอซิสครั้งที่ 1 ภายในเวลา 15 นาทีสังเกตเห็น first polar body เกิดขึ้น

(C) เกิดการแบ่งเซลล์แบบไมโอซิสครั้งที่ 2 ภายในเวลา 30 นาที สังเกตเห็น second polar body เกิดขึ้น

(D) โดยทั่วไป second polar body อาจเห็นได้ยากภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสง แต่สามารถพิสูจน์ได้โดยการย้อมนิวเคลียสด้วย Hoechst 33342 fluorescent ซึ่งจะแสดงให้เห็น first polar body และ second polar body ชัดเจน (D และ E)

fe, fertilized oocyte undergoing meiotic cell division; pb, polar body; zy, zygote; 2c, 2 cells stage.



ภาพที่ 4-3 การแบ่งเซลล์ครั้งแรกในระยะคลีเวจ (first cleavage) ในหอยนางรมปากจีบ *S. cucullata* (A และ D) ไซโกตแบ่งเซลล์แบบไมโทซิสครั้งแรกได้ไซโทพลาซึม 3 lobes เป็น lobe ขนาดเล็ก 2 lobes และ lobe ขนาดใหญ่ 1 lobe (lobe ขนาดใหญ่ เรียกว่า polar lobe) แต่พบนิวเคลียส 2 นิวเคลียส อยู่ใน lobe ขนาดเล็ก (B และ E) เกิดการรวมไซโทพลาซึมระหว่าง polar lobe เข้ากับ lobe ขนาดเล็ก 1 อัน (C และ F) ได้เซลล์ขนาดเล็ก 1 เซลล์ และเซลล์ขนาดใหญ่ 1 เซลล์ (unequal holoblastic cleavage)

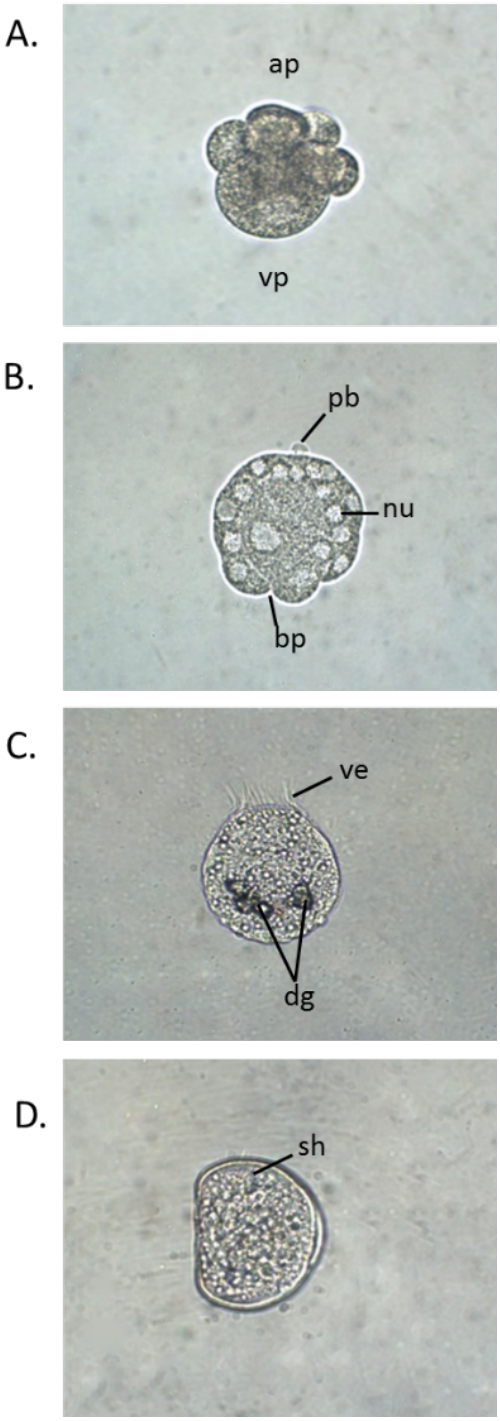
2. ระยะ cleavage (ภาพที่ 4-4A) เป็นระยะที่ไซโกตมีการแบ่งเซลล์เพื่อเพิ่มจำนวน ระยะนี้จะทำให้ตัวอ่อนมีจำนวนเซลล์เพิ่มขึ้น แต่ขนาดของตัวอ่อนไม่เปลี่ยนแปลง ด้านที่แบ่งเซลล์ได้เร็วกว่าทำให้เซลล์มีขนาดเล็กกว่า คือด้าน animal pole ส่วนนี้จะเจริญไปเป็นส่วนหลังของสัตว์ ส่วนด้านตรงข้ามพบเซลล์ขนาดใหญ่กว่า เรียกว่า vegetal pole ส่วนนี้จะเจริญไปเป็นด้านท้องของตัวสัตว์ต่อไป

3. ระยะ blastula และระยะ gastrula (ภาพที่ 4-4B) ในหอยนางรมปากจีบทั้ง 2 ระยะนี้มีความคล้ายคลึงกันมาก โดย ระยะ blastula เป็นระยะที่ตัวอ่อนมีการเจริญเพิ่มขึ้น และพบช่องว่างขึ้นภายในตัวอ่อน เรียกช่องนี้ว่า blastocoel โดยช่อง blastocoel นี้เกิดจากการแบ่งเซลล์ที่มากขึ้นและมีการเรียงตัวของเซลล์เป็นชั้นเดียวทำให้เกิดช่องว่างในตัวอ่อนขึ้น สำหรับหอยนางรมพบว่าช่อง

blastocoel มีขนาดเล็กสังเกตเห็นได้ยาก ส่วนระยะ gastrula เป็นระยะที่เกิดเนื้อเยื่อสามชั้นขึ้นในตัวอ่อน เกิดการเคลื่อนที่และเรียงตัวใหม่ของกลุ่มเซลล์ภายในตัวอ่อน โดยเซลล์ด้าน animal pole เป็นเซลล์ที่มีขนาดเล็กและแบ่งเซลล์ได้เร็วกว่าด้าน vegetal pole เป็นผลให้เซลล์ด้าน animal pole แผ่ลงมาคลุมด้าน vegetal pole ทำให้เกิดการม้วนตัวของเซลล์ด้าน vegetal pole เข้าไปข้างในตัวอ่อน อาจสังเกตุเห็นช่อง blastopore ได้จากภายนอก ในหอยนางรมเนื่องจากช่อง blastopore เป็นร่องขนาดเล็กและไม่เว้าลึกเข้าไปในตัวอ่อน จึงอาจเรียกได้ว่าเป็นช่อง psuedoblastopore ตัวอ่อนจะเข้าสู่ระยะนี้ภายหลังการปฏิสนธิประมาณ 4 ชั่วโมง

4. ระยะ trochophore (ภาพที่ 4-4C) เป็นระยะที่ตัวอ่อนที่เริ่มสร้างอวัยวะ (organogenesis) ตัวอ่อนมีการพัฒนาเซลล์และเนื้อเยื่อไปเป็นอวัยวะที่ทำหน้าที่เฉพาะ เช่น มีการพัฒนา velum ซึ่งมีลักษณะเป็นแผงซิเลียที่ล้อมรอบตัวอ่อน ทำให้ตัวอ่อนสามารถว่ายน้ำได้ ตัวอ่อนในระยะนี้มีการพัฒนาระบบทางเดินอาหารแล้ว สังเกตได้จากการพบ digestive glands ซึ่งเป็นต่อมย่อยอาหาร ตัวอ่อนจะเข้าสู่ระยะนี้ภายหลังการปฏิสนธิประมาณ 7 ชั่วโมงขึ้นไป ในระยะนี้ตัวอ่อนอาจมีความสามารถในการกินและการย่อยอาหารได้ ซึ่งมีความจำเป็นสำหรับนำพลังงานไปใช้ในการเจริญเติบโตและการสร้างเปลือกต่อไป

5. ระยะ veliger (ภาพที่ 4-3D) เป็นระยะที่ตัวอ่อนมีการสร้างเปลือก เนื่องจากหอยนางรมเป็นหอยสองฝา (class Bivalvia) จึงพบว่าตัวอ่อนเริ่มสร้างเปลือก 2 อัน คลุมลำตัว ตัวอ่อนในระยะระยะนี้ เมื่อมองด้านข้างจะเห็นตัวอ่อนมีลักษณะคล้ายตัวอักษร D จึงมักเรียกตัวอ่อนในระยะนี้ว่า D-shape veliger ในหอยนางรมปากจีบพบว่าตัวอ่อนจะเข้าสู่ระยะนี้ภายหลังการปฏิสนธิประมาณ 18 ชั่วโมงขึ้นไป หลังจากระยะ D-shape veliger แล้ว หอยนางรมปากจีบก็จะพัฒนาเข้าสู่ระยะ pediveliger หรือระยะที่ตัวอ่อนเริ่มมีเท้า (pedi หมายถึง ส่วนเท้า) ระยะนี้ของตัวอ่อนจะอาศัยชีวิตในน้ำทะเลล่องลอยและว่ายน้ำ (planktonic larva) จนกว่าจะลงเกาะกับที่ ซึ่งเมื่อหอยลงเกาะกับที่บนตำแหน่งที่เป็นของแข็ง เช่น ก้อนหิน รากต้นไม้ หรือวัสดุแข็งอื่น ๆ ในน้ำแล้ว หอยนางรมก็จะสร้างเปลือกด้านหนึ่งยึดติดกับวัสดุนั้น ๆ และเจริญเป็นตัวเต็มวัยโดยไม่เคลื่อนที่อีกตลอดชีวิต (sessile life)



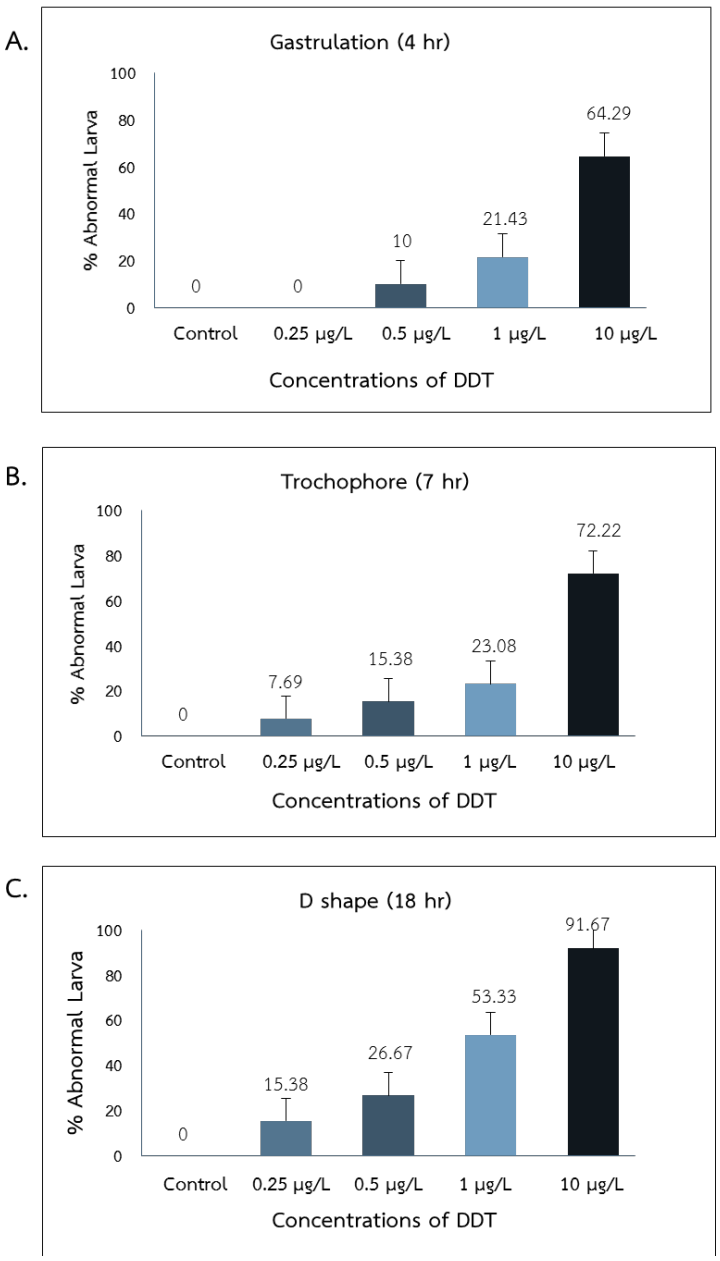
ภาพที่ 4-4 ชีววิทยาการเจริญของตัวอ่อนหอยนางรมปากจีบ *S. cucullata* A. ระยะ cleavage B. ระยะ gastrula ช่วงต้น C. ระยะ trochophore D. ระยะ D-shape veliger สัญลักษณ์ ap=animal pole, vp=vegetal pole, bp=blastopore (pseudoblastopore), nu=nucleus, pb=polar body, dg=digestive glands, sh=shell

4.2 ผลกระทบของสารดีดีทีต่อชีววิทยาการเจริญของตัวอ่อนหอยนางรมปากจีบ

การทดสอบในห้องปฏิบัติการโดยทำการปฏิสนธิเพื่อสร้างตัวอ่อนแล้วให้สัมผัสกับสารดีดีทีในน้ำทะเลที่ระดับความเข้มข้น 0, 0.25, 0.5, 1 และ 10 ไมโครกรัมต่อลิตร พบว่าในกลุ่มควบคุม (0 ไมโครกรัมต่อลิตร) ตัวอ่อนมีการพัฒนาปกติเข้าสู่ D-shape veliger larva ทั้งหมด (100%) ในกลุ่มทดสอบพบว่าสารดีดีทีในกลุ่มทดสอบที่ระดับความเข้มข้น 0.25-10 ไมโครกรัมต่อลิตร ไม่ทำให้ตัวอ่อนตาย แต่ส่งผลกระทบต่อชีววิทยาการเจริญของตัวอ่อนหอยนางรมปากจีบ ทำให้ตัวอ่อนพัฒนาการผิดรูปไปจากเดิมโดยมีจำนวนตัวอ่อนที่ผิดปกติแปรผันตามความเข้มขึ้นของสารทดสอบ ดังภาพที่ 4-3 การศึกษาครั้งนี้ทำการสำรวจผลกระทบต่อตัวอ่อนในระยะ gastrula, trochophore และ D-shape veliger เมื่อพิจารณาตัวอ่อนแต่ละระยะพบผลกระทบดังนี้

ระยะ gastrula (สำรวจ ณ เวลา 4 ชั่วโมงหลังการปฏิสนธิ) พบว่าสารดีดีทีทำให้ตัวอ่อนระยะ gastrula ผิดปกติ โดยกลุ่มควบคุมและกลุ่มที่ได้รับสารดีดีที ที่ระดับความเข้มข้น 0.25 ไมโครกรัมต่อลิตร ไม่พบความผิดปกติ แต่เริ่มสังเกตความผิดปกติได้ในกลุ่มทดสอบที่ได้รับสารดีดีที ตั้งแต่ความเข้มขึ้น 0.5 ไมโครกรัมต่อลิตรขึ้นไป และพบอัตราผิดปกติมากถึง 64.29% ในกลุ่มทดสอบที่ระดับความเข้มข้น 10 ไมโครกรัมต่อลิตร (ภาพที่ 4-5 A) โดยความผิดปกติที่พบได้ในระยะ gastrula คือ พบ blastomere มีการเรียงตัวไม่เป็นระเบียบ ทำให้ตัวอ่อนที่มีรูปร่างผิดปกติไปจากกลุ่มควบคุม (ภาพที่ 4-6 A และ B)

ระยะ trochophore (สำรวจ ณ เวลา 7 ชั่วโมงหลังการปฏิสนธิ) พบว่าสารดีดีที ทำให้ตัวอ่อนระยะ trochophore ผิดปกติเพิ่มขึ้น (ภาพที่ 4-5 B) ไม่พบความผิดปกติในกลุ่มควบคุม แต่สามารถพบความผิดปกติได้ในทุกกลุ่มทดสอบ โดยความผิดปกติเพิ่มขึ้นตามความเข้มข้นของสารดีดีที ที่ได้รับ และพบอัตราผิดปกติสูงถึง 72.22% ในกลุ่มทดสอบที่ระดับความเข้มข้น 10 ไมโครกรัมต่อลิตร โดยอาการผิดปกติที่พบได้มากคือ ตัวอ่อนพัฒนา velum ได้ช้า ทำให้ตัวอ่อนยังไม่เคลื่อนที่ และอาจพบตัวอ่อนที่มีรูปร่างผิดปกติไปจากกลุ่มควบคุม (ภาพที่ 4-6 C และ D)
ระยะ D-shape veliger (สำรวจ ณ เวลา 18 ชั่วโมงหลังการปฏิสนธิ) พบว่าสารดีดีที ทำให้ตัวอ่อนระยะ D-shape veliger ผิดปกติเพิ่มขึ้น (ภาพที่ 4-5 C) ไม่พบความผิดปกติในกลุ่มควบคุม แต่สามารถพบความผิดปกติได้ในทุกกลุ่มทดสอบ โดยความผิดปกติเพิ่มขึ้นตามความเข้มข้นของสารดีดีทีที่ได้รับ และพบอัตราผิดปกติสูงถึง 91.67% ในกลุ่มทดสอบที่ระดับความเข้มข้น 10 ไมโครกรัมต่อลิตร โดยอาการผิดปกติที่พบได้มากคือ ตัวอ่อนมีการสร้างเปลือกมีการเจริญผิดรูปและสร้างเปลือกได้ช้ากว่ากลุ่มควบคุม (ภาพที่ 4-6 E และ F)

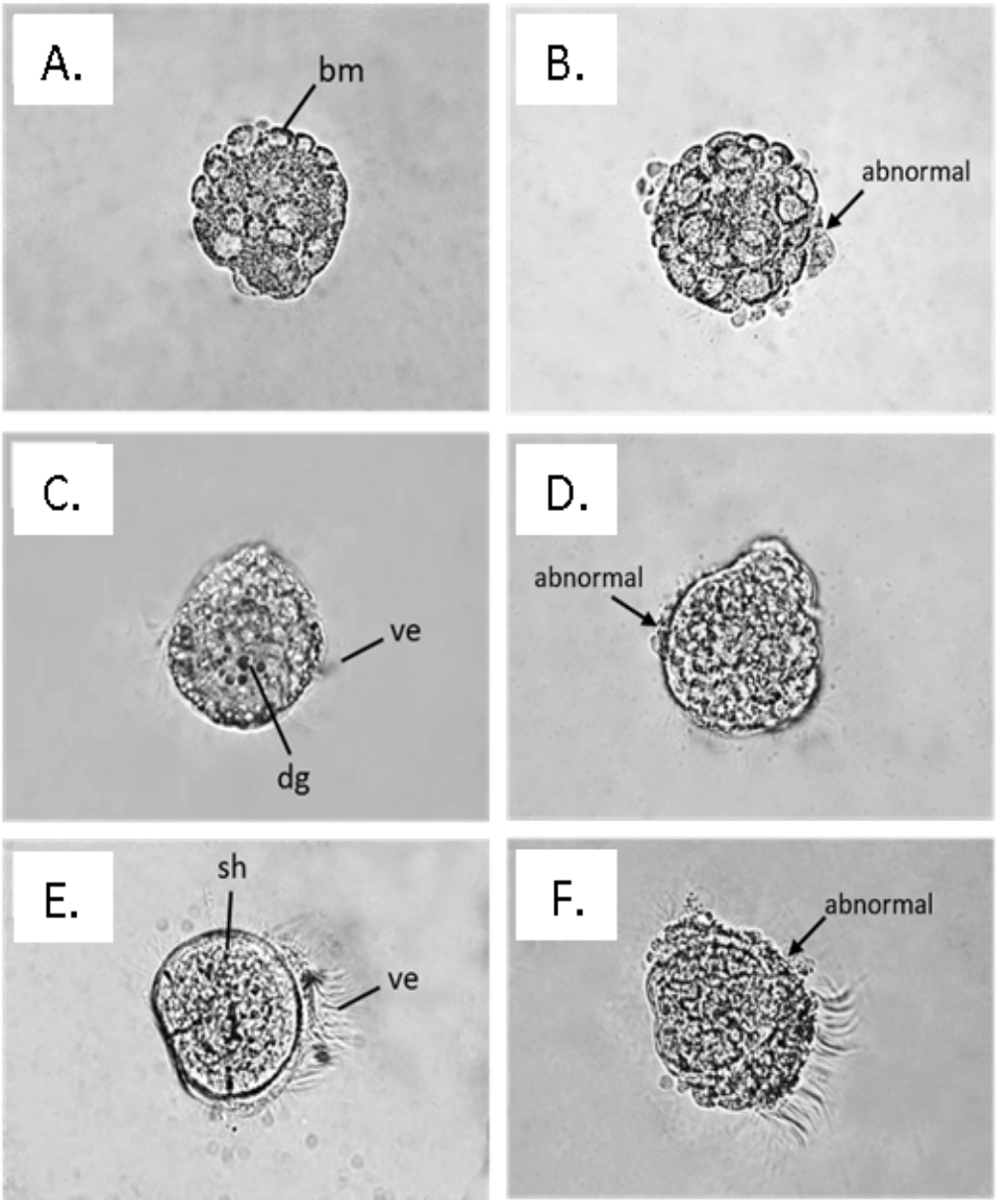


ภาพที่ 4-5 ผลของสารดีดีทีต่อชีววิทยาการเจริญของตัวอ่อนหอยนางรมปากจีบในระยะต่าง ๆ

A. ผลกระทบของสารดีดีทีต่อชีววิทยาการเจริญของตัวอ่อนในระยะ gastrula

B. ผลกระทบของสารดีดีทีต่อชีววิทยาการเจริญของตัวอ่อนในระยะ trochophore

C. ผลกระทบของสารดีดีทีต่อชีววิทยาการเจริญของตัวอ่อนในระยะ D-shape veliger



ภาพที่ 4-6 ชีววิทยาการเจริญของตัวอ่อนหอยนางรมปากจีบ *S. cucullata* ปกติและผิดปกติเมื่อได้รับสัมผัสสารดีดีที ที่ระดับความเขมข้นต่าง ๆ A. ระยะ gastrula ปกติ B. ระยะ gastrula ที่ผิดปกติ C. ระยะ trochophore ปกติ D. ระยะ trochophore ผิดปกติ E. ระยะ D-shape veliger ปกติ F. ระยะ D-shape veliger ผิดปกติ สัญลักษณ์ ap=animal pole, vp=vegetal pole, bm=blastomere, dg=digestive glands, ve=velum, sh=shell

4.3 ผลกระทบของสารดีดีทีต่ออัตราการตายของหอยนางรมปากจีบตัวเต็มวัย

จากการศึกษาความเป็นพิษเฉียบพลันของสารดีดีทีต่ออัตราการตายของหอยนางรมปากจีบโดยทำการทดสอบในห้องปฏิบัติการเพาะเลี้ยง โดยใช้นางรมปากจีบตัวเต็มวัยขนาดประมาณ 5-7 เซนติเมตร ที่ผ่านการเลี้ยงปรับสภาพแล้วมาทำการทดสอบความเป็นพิษของสารดีดีที โดยใช้ความเข้มข้น 0, 10, 50, 100, 500, 1,000 และ 2,000 ไมโครกรัมต่อลิตร ทำการเปลี่ยนน้ำและให้อาหารทุก 24 ชั่วโมง เป็นระยะเวลา 96 ชั่วโมง บันทึกสถิติการตายสะสม (% cumulative mortality) จนครบเวลา 96 ชั่วโมง วิธีการตรวจสอบว่าหอยตายหรือยังมีชีวิตอยู่ สามารถทำได้โดยการสังเกตการตอบสนองต่อสิ่งเร้าคือแรงสั่นสะเทือนจากการเคาะตู้กระจกที่ใช้เลี้ยงทดสอบได้เป็นอย่างดี โดยหอยที่ยังมีชีวิตจะปิดเปลือกทันทีเมื่อเคาะกระจกตู้กระจก เนื่องจากการปิดเปลือกเกิดจากการหดตัวของกล้ามเนื้อ adductor muscle ที่ยึดระหว่างเปลือกทั้งสองข้าง ทำให้หอยปิดเปลือกได้สนิท ส่วนหอยที่ตายแล้ว adductor muscle จะไม่ทำงาน ตัวหอยจะเปิดเปลือกอ้าออกและไม่ตอบสนองต่อแรงสั่นสะเทือน

ผลการทดสอบพบว่า กลุ่มควบคุมไม่พบอัตราการตายของหอยนางรมปากจีบตลอดระยะเวลาที่ใช้ทดสอบ หอยทุกตัวตอบสนองต่อแรงสั่นสะเทือนจากการเคาะตู้กระจกอย่างรวดเร็วตลอดระยะเวลาทดสอบ สำหรับกลุ่มทดสอบพบว่าหอยนางรมมีการตอบสองต่อการเคาะกระจกจะลดลงโดยจะปิดเปลือกช้าลงและพบอัตราการตายของหอยนางรมซึ่งมีแนวโน้มเพิ่มสูงขึ้นตามระยะเวลาและระดับความเข้มข้นของสารดีดีทีที่ใช้ทดสอบ (ภาพที่ 4-7) ดังนี้

ที่ระยะเวลา 24 ชั่วโมง ยังไม่พบการตายของหอยนางรมในทุกระดับความเข้มข้น แต่พบว่าหอยนางรมในกลุ่มทดสอบที่มีสารดีดีทีจะมีการตอบสนองต่อแรงสั่นสะเทือนลดลง มีการปิดเปลือกช้า โดยสามารถสังเกตได้ชัดเจนในกลุ่มทดสอบที่มีความเข้มข้นของสารดีดีทีสูง

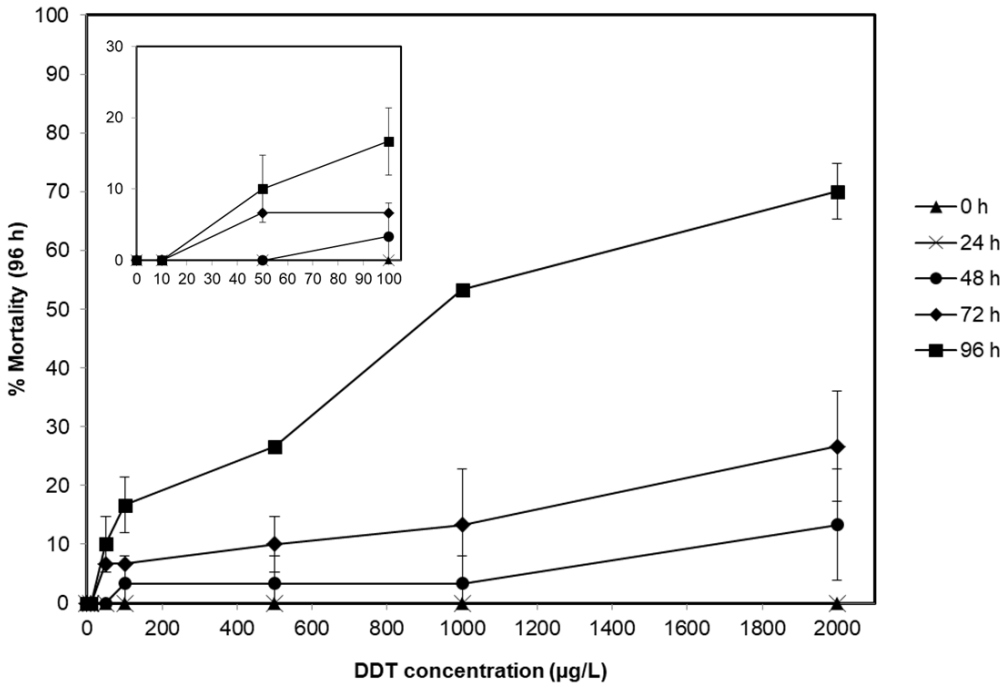
ที่ระยะเวลา 48 ชั่วโมง พบอัตราการตายของหอยนางรม โดยพบว่าอัตราการตายมีแนวโน้มเพิ่มขึ้นตามความเข้มข้นของสารดีดีทีและระยะเวลาที่ทดสอบ

ที่ระยะเวลา 72 ชั่วโมง พบแนวโน้มคล้ายกับที่ระยะเวลา 48 ชั่วโมง แต่มีอัตราการตายเพิ่มสูงขึ้นเมื่อเทียบกับผลการทดสอบที่ระยะเวลา 48 ชั่วโมง

ที่ระยะเวลา 96 ชั่วโมง พบอัตราการตายสะสมเพิ่มมากขึ้นในกลุ่มทดสอบสารดีดีที ที่ระดับความเข้มข้น 10 ไมโครกรัมต่อลิตร พบว่าหอยนางรมปากจีบมีอัตราการตายร้อยละ 3.33±4.71 ในกลุ่มทดสอบสารดีดีที ที่ระดับความเข้มข้น 50 ไมโครกรัมต่อลิตร พบว่าหอยนางรมปากจีบมีอัตราการตายร้อยละ 10.00±4.71 ในกลุ่มทดสอบสารดีดีที ที่ระดับความเข้มข้น 100 ไมโครกรัมต่อลิตร พบว่าหอยนางรมปากจีบมีอัตราการตายร้อยละ 16.67±4.71 ในกลุ่มทดสอบสาร

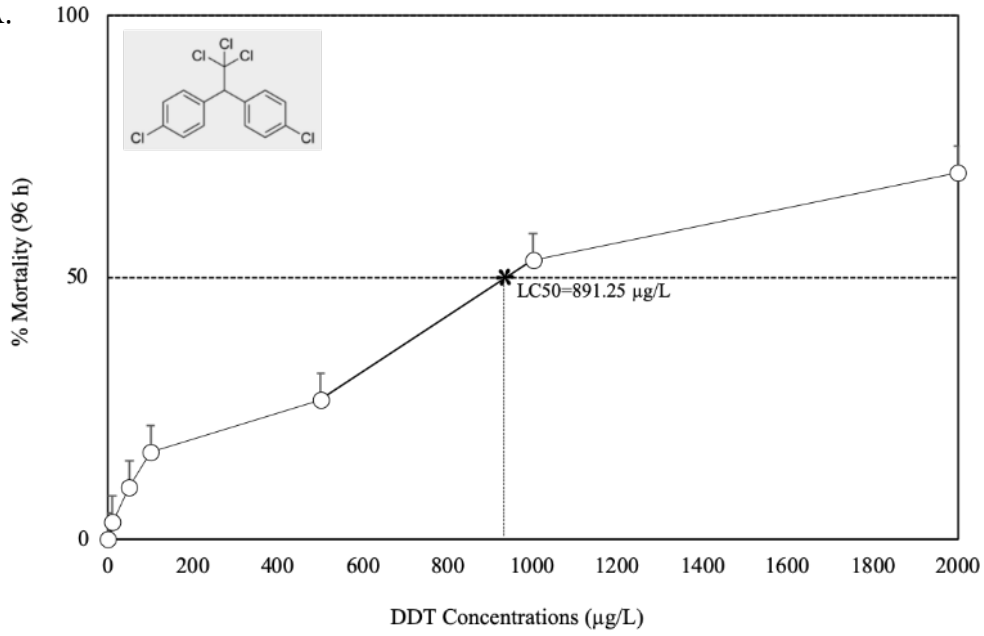
ดีดีที ที่ระดับความเข้มข้น 500 ไมโครกรัมต่อลิตร พบว่าหอยนางรมปากจีบมีอัตราการตายร้อยละ 26.67±0.00 ในกลุ่มทดสอบสารดีดีที ที่ระดับความเข้มข้น 1,000 ไมโครกรัมต่อลิตร พบว่าหอยนางรมปากจีบมีอัตราการตายร้อยละ 53.33±18.86 ในกลุ่มทดสอบสารดีดีที ที่ระดับความเข้มข้น 2,000 ไมโครกรัมต่อลิตร พบว่าหอยนางรมปากจีบมีอัตราการตายร้อยละ 70.00±4.71

จากผลการทดสอบพิษแบบกึ่งฉับพลันของสารดีดีทีต่อหอยนางรมปากจีบ เป็นเวลา 96 ชั่วโมง พบว่าอัตราการตายของกลุ่มทดสอบที่ความเข้มข้น 1,000 และ 2,000 ไมโครกรัมต่อลิตร แสดงอัตราการตายมากกว่าร้อยละ 50 ได้แก่ ร้อยละ 53 และ 70 ตามลำดับ ทำให้สามารถคำนวณหาค่า LC_{50} (lethal concentration for 50% mortality) หรือค่าความเข้มข้นของสารพิษที่ทำให้สัตว์ทดลองตายลงครึ่งหนึ่งภายในระยะเวลาที่กำหนดได้ โดยการนำจำนวนสัตว์ทดลองที่ตายในแต่ละความเข้มข้น ที่ระยะเวลา 24, 48, 72 และ 96 ชั่วโมง มาคำนวณเพื่อหาค่า LC_{50} ของสัตว์ทดลองด้วยการวิเคราะห์โพรบิท พบว่าค่า LC_{50} ที่เวลา 96 ชั่วโมงของหอยนางรมปากจีบที่ได้รับสัมผัสสารดีดีที มีค่า LC_{50} เท่ากับ 891.25 ไมโครกรัมต่อลิตร (ภาพที่ 4-8)

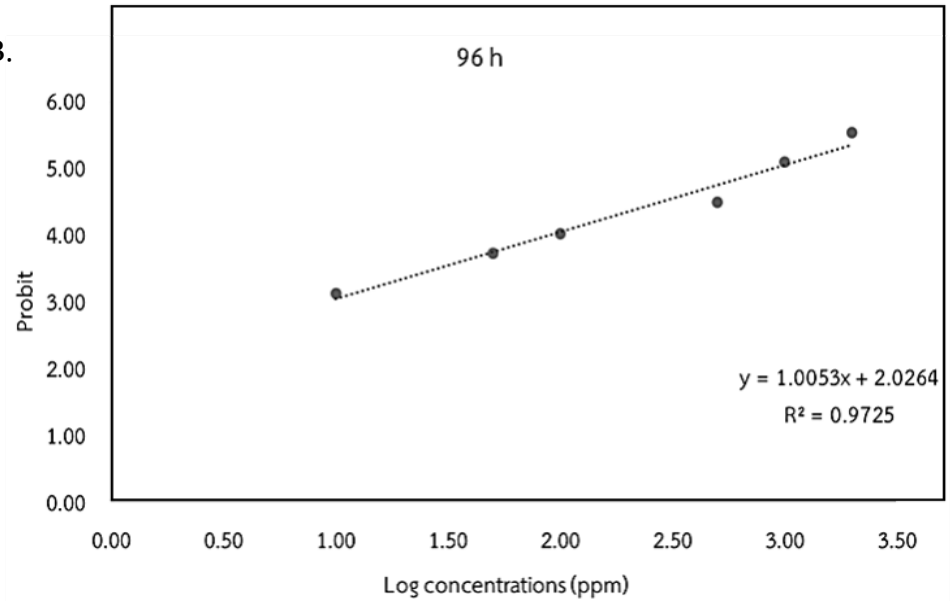


ภาพที่ 4-7 ผลการทดสอบความเป็นพิษแบบกึ่งฉับพลันของสารดีดีทีต่ออัตราการตายของหอยนางรมปากจีบ ที่ได้รับสัมผัสสารดีดีที ที่ระดับความเข้มข้น 0, 10, 50, 100, 500, 1000 และ 2000 ไมโครกรัมต่อลิตร ที่ระยะเวลา 24, 48, 72 และ 96 ชั่วโมง

A.



B.



ภาพที่ 4-8 ทดสอบความเป็นพิษแบบกึ่งฉับพลันของสารดีดีทีต่ออัตราการตายของหอยนางรมปากจีบ ที่ได้รับสัมผัสสารดีดีที ที่ระดับความเข้มข้น 0, 10, 50, 100, 500, 1000 และ 2000 ไมโครกรัมต่อลิตร เป็นระยะเวลา 96 ชั่วโมง

A. อัตราการตายของหอยนางรมปากจีบตัวเต็มวัยเมื่อทดสอบด้วยสารดีดีที

B. การหาค่า LC_{50} โดยใช้สมการ Probit

4.4 ผลกระทบของสารดีดีทีต่อเนื้อเยื่อหอยนางรมปากจีบตัวเต็มวัย

4.4.1 เนื้อเยื่อแมนเทิล (mantle)

เนื้อเยื่อแมนเทิลเป็นอวัยวะที่ทำหน้าที่ปกคลุมตัวหอยทั้งหมด มีหน้าที่หลักในการสร้างเปลือกและมีกลไกในการสร้างเมือก (mucous cell) มาปกคลุมร่างกายเพื่อป้องกันตนเอง เมื่อถูกรบกวนจากสิ่งแวดล้อมภายนอกที่อาศัยอยู่ (defensive machcanism) จากการศึกษาเนื้อเยื่อโดยใช้เทคนิคมิญชวิทยา พบว่าเนื้อเยื่อแมนเทิลประกอบด้วยเนื้อเยื่อบุผิวชั้นเดียว ตั้งอยู่บนเยื่อฐาน มีโครงสร้างไม่ซับซ้อน พบกล้ามเนื้อ หลอดเลือด และระบบประสาท ใต้เยื่อฐานพบเนื้อเยื่อเกี่ยวพันซึ่งเป็นเซลล์ขนาดใหญ่ซึ่งมีช่องว่างเป็นแอ่งเลือดขนาดเล็ก (blood sinus) กระจายอยู่ทั่วไป (ภาพที่ 4-9A)

ผลการทดสอบพบว่าหอยนางรมปากจีบที่ได้รับสารดีดีที พบเซลล์สร้างเมือก (mucous cell) จำนวนมาก บริเวณเยื่อบุผิว (epithelium) เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม การที่หอยนางรมมีการสร้างเมือกออกมาสัมพันธ์กับการเพิ่มขึ้นของจำนวน mucocytes ตามความเข้มข้นที่เพิ่มขึ้นไปด้วย สามารถอธิบายได้ว่าในสภาวะที่หอยนางรมเกิดความเครียดจากการได้รับสารเคมี จะตอบสนองโดยการหลั่งเมือกออกมาเป็นจำนวนมากเพื่อป้องกันตัวเอง แสดงให้เห็นถึงความผิดปกติในหอยที่ได้รับการปนเปื้อนจากสารดีดีที พบเซลล์สร้างเมือก (mucous cell) กระจายอยู่ทั่วบริเวณเยื่อบุผิว พบเซลล์มีลักษณะที่คล้ายกันทั้งในกลุ่มควบคุมและกลุ่มที่ได้รับสารดีดีที แต่มีจำนวนเซลล์สร้างเมือกเพิ่มมากขึ้นตามความเข้มข้นของสารที่เพิ่มขึ้น (ภาพที่ 4-9B-C) อีกทั้งยังพบการรวมกลุ่มของเซลล์ฮีโมไซท์ (hemocyte infiltration) แทรกอยู่ในเนื้อเยื่อเกี่ยวพัน ในกลุ่มที่ได้รับการสัมผัสสารดีดีทีที่ความเข้มข้น 100 ไมโครกรัมต่อลิตร เป็นเวลา 96 ชั่วโมง

4.4.2 เนื้อเยื่อต่อมย่อยอาหาร (digestive gland)

ต่อมย่อยอาหารเป็นอวัยวะที่แทรกอยู่ในบริเวณเนื้อเยื่อเกี่ยวพัน อยู่ล้อมรอบระหว่างกระเพาะอาหารและเนื้อเยื่อชั้นแมนเทิล โครงสร้างของต่อมย่อยอาหารจะประกอบด้วย ท่อแขนงขนาดเล็กที่แตกแขนงออกไป บริเวณปลายท่อตันมีลักษณะเป็นกระเปาะ เรียกว่า digestive diverticulum หอยนางรมจัดเป็นสิ่งมีชีวิตที่มีการย่อยภายในเซลล์ (intracellular digestion) โดยจะทำหน้าที่สร้างน้ำย่อยเพื่อย่อยอาหารที่เข้าสู่กระเพาะอาหาร ต่อมย่อยอาหารจะแทรกอยู่ในเนื้อเยื่อเกี่ยวพันโดยบริเวณปลายท่อจะมีลักษณะกลมตันคล้ายกระเปาะหรือถุง เรียกว่า digestive diverticulum ภายในถุงมีลักษณะเป็นเนื้อเยื่อบุผิวชั้นเดียวมีเซลล์ที่เป็นองค์ประกอบ 2 แบบ ได้แก่ เซลล์ย่อยอาหาร (digestive cell) มีลักษณะเซลล์รูปทรงกระบอกสูง โดยจะพบนิวเคลียสที่บริเวณฐานของเซลล์ และเซลล์แบโซฟิลิก (basophilic cell) หรือเซลล์คริปท์ (crypt cell) เป็นเซลล์ที่มี

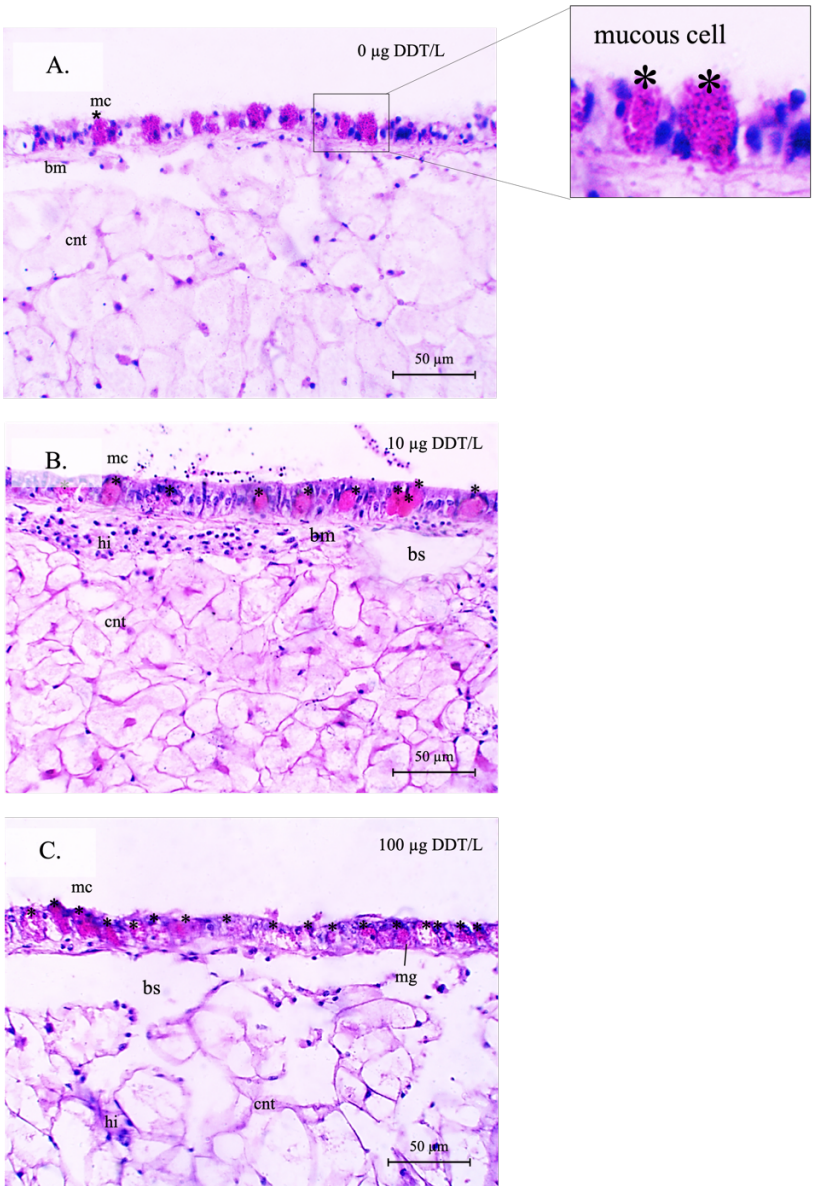
ลักษณะทรงเตี้ย โดยพบนิวเคลียสย้อมติดสีเบสหรือสีฮีมาท็อกไซลิน ที่มีลักษณะเข้มกว่าเนื้อเยื่อบริเวณอื่น ๆ โดยกลุ่มเซลล์จะรวมตัวกันอยู่บนบริเวณเยื่อฐาน (basement membrane) (ภาพที่ 4-10A)

จากการศึกษาผลกระทบของสารดีดีที ต่อเนื้อเยื่อต่อมย่อยอาหารของหอยนางรมปากจีบ พบว่าสารดีดีที ส่งผลกระทบต่อหอยนางรมผ่านทางการอักเสบและการตายของเนื้อเยื่อ โดยความรุนแรงต่อเนื้อเยื่อจะเพิ่มขึ้นตามความเข้มข้นของสารดีดีทีที่ใช้ในการทดสอบ โดยในกลุ่มที่ได้รับการสัมผัสสารดีดีที ที่ความเข้มข้น 100 ไมโครกรัมต่อลิตร เป็นเวลา 96 ชั่วโมง พบเซลล์เยื่อบุผิวภายในท่อ digestive diverticulum บางลงจนนิวเคลียสชิดกับขอบของท่อ เกิดเป็นพื้นที่ว่างขนาดใหญ่กลางท่อ และพบ basophilic cell มีจำนวนเพิ่มขึ้นอย่างมาก ซึ่งลักษณะดังกล่าวนี้ สามารถบ่งชี้ถึงความผิดปกติที่เกิดขึ้นกับระบบการสร้างเอนไซม์ที่ช่วยในการย่อยอาหารของหอยนางรมที่ได้รับสารดีดีที โดยระดับความผิดปกติจะเพิ่มขึ้นตามความเข้มข้นของสาร (ภาพที่ 4-10B-C)

4.4.3 เนื้อเยื่อเหงือก (gill)

หอยนางรมปากจีบมีเหงือกจำนวน 4 แผ่น เหงือกแต่ละแผนประกอบด้วยซี่เหงือกย่อย ที่มีลักษณะคล้ายจีบ ประกอบด้วยเยื่อบุผิวชั้นเดียว พบซิเลียด้านนอกที่สัมผัสกับน้ำ พบเซลล์สร้างเมือกในชั้นเยื่อบุผิว ภายในซี่เหงือกพบช่อง blood sinus เป็นแอ่งเลือดสำหรับให้เลือดไหลเวียนผ่านเหงือก สามารถพบเซลล์เม็ดเลือดในแอ่งเลือดบริเวณซี่เหงือกได้ (ภาพที่ 4-11A)

จากการศึกษาผลกระทบของสารดีดีที ที่ระดับความเข้มข้นต่าง ๆ ต่อเนื้อเยื่อเหงือกของหอยนางรมปากจีบ พบว่า สารดีดีทีส่งผลกระทบต่อหอยนางรมกลุ่มที่ได้รับการสัมผัสสารดีดีทีที่ความเข้มข้น 100 ไมโครกรัมต่อลิตร เป็นเวลา 96 ชั่วโมง เกิดการกระตุ้นให้เกิดเซลล์สร้างเมือก (mucous cell) เพิ่มมากขึ้นเมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุมและกลุ่มที่ได้รับสัมผัสสารดีดีทีที่ความเข้มข้น 10 ไมโครกรัมต่อลิตร เป็นเวลา 96 ชั่วโมง โดยจำนวนของเซลล์สร้างเมือกจะเพิ่มขึ้นตามความเข้มข้นของสาร นอกจากนี้ยังพบการรวมกลุ่มกันของเซลล์ฮีโมไซท์ (hemocyte infiltration) ภายในซี่เหงือกย่อยแต่ละซี่ ในกลุ่มที่ได้รับการสัมผัสสารดีดีทีที่ความเข้มข้น 10 และ 100 ไมโครกรัมต่อลิตร เป็นเวลา 96 ชั่วโมง พบการรวมกลุ่มกันของเซลล์ฮีโมไซท์ เพิ่มมากขึ้นเมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม พยาธิสภาพที่แสดงออกในระดับเนื้อเยื่อจากผลการศึกษา ที่กล่าวมาข้างต้นนั้น เป็นสัญญาณบ่งชี้ว่าเซลล์กำลังเกิดการอักเสบ (ภาพที่ 4-11B-C)



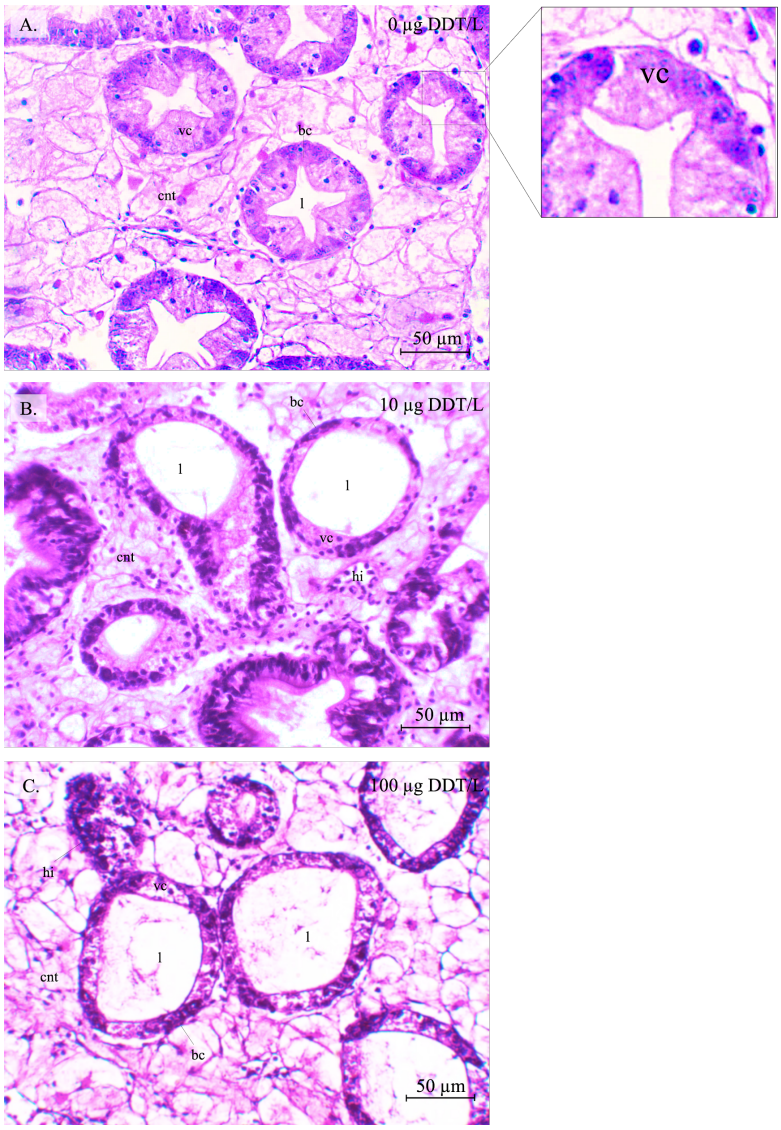
ภาพที่ 4-9 ผลกระทบของสารดีดีที ต่อเนื้อเยื่อแมนเทิลของหอยนางรมปากจีบ (*S. cucullata*) ย้อมด้วยสี Hematoxylin และ Eosin (H&E) (กำลังขยาย 400 เท่า)

A. กลุ่มควบคุม (0 ไมโครกรัมต่อลิตร)

B. กลุ่มทดสอบสารดีดีที ที่ระดับความเข้มข้น 10 ไมโครกรัมต่อลิตร

C. กลุ่มทดสอบสารดีดีที ที่ระดับความเข้มข้น 100 ไมโครกรัมต่อลิตร

สัญลักษณ์ bm = basement membrane, bs = blood sinus, ci = cilia, h = hemocyte, hi = hemocyte infiltration, mc (*) = mucous cell, mg = mucin granule และ ms = mucocyte secretion



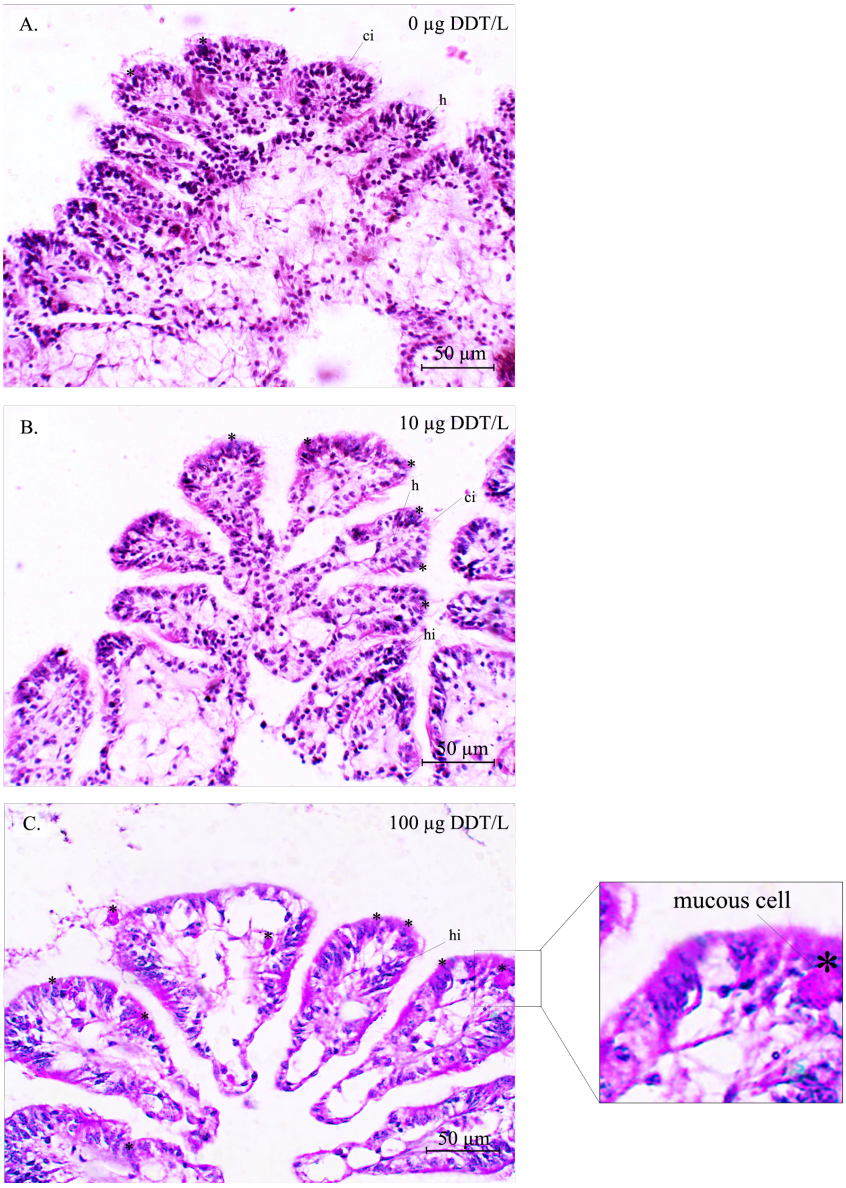
ภาพที่ 4-10 ผลกระทบของสารดีดีที ต่อเนื้อเยื่อต่อมย่อยอาหารของหอยนางรมปากจีบ (*S. cucullata*) ย้อมด้วยสี Hematoxylin และ Eosin (H&E) (กำลังขยาย 400 เท่า)

A. กลุ่มควบคุม (0 ไมโครกรัมต่อลิตร)

B. กลุ่มทดสอบสารดีดีที ที่ระดับความเข้มข้น 10 ไมโครกรัมต่อลิตร

C. กลุ่มทดสอบสารดีดีที ที่ระดับความเข้มข้น 100 ไมโครกรัมต่อลิตร

สัญลักษณ์ bm = basement membrane, bs = blood sinus, ci = cilia, h = hemocyte, hi = hemocyte infiltration, mc (*) = mucous cell, mg = mucin granule และ ms = mucocyte secretion



ภาพที่ 4-11 ผลกระทบของสารดีดีที ต่อเนื้อเยื่อเหงือกของหอยนางรมปากจีบ (*S. cucullata*) ย้อมด้วยสี Hematoxylin และ Eosin (H&E) (กำลังขยาย 400 เท่า)

A. กลุ่มควบคุม (0 ไมโครกรัมต่อลิตร)

B. กลุ่มทดสอบสารดีดีที ที่ระดับความเข้มข้น 10 ไมโครกรัมต่อลิตร

C. กลุ่มทดสอบสารดีดีที ที่ระดับความเข้มข้น 100 ไมโครกรัมต่อลิตร

สัญลักษณ์ bm = basement membrane, bs = blood sinus, ci = cilia, h = hemocyte, hi = hemocyte infiltration, mc (*) = mucous cell, mg = mucin granule และ ms = mucocyte secretion

4.5 ผลกระทบของสารดีดีทีต่อโปรตีโอมของหอยนางรมปากจีบ

4.5.1 2D-gel

การศึกษาพิษวิทยาระดับโมเลกุลและกลไกการทำงานของเซลล์ในระดับโปรตีนโดยการวิเคราะห์โปรตีโอมของหอยนางรมปากจีบเพื่อเปรียบเทียบระหว่างกลุ่มควบคุมและกลุ่มทดสอบที่ได้รับสารดีดีทีที่ความเข้มข้น 10 และ 100 ไมโครกรัมต่อลิตร เป็นเวลา 96 ชั่วโมง (sublethal exposure) หลังจากทำการสกัดโปรตีนจากเนื้อเยื่อแมนเทิล และแยกโปรตีนด้วยกระแสไฟฟ้าแบบเจลสองมิติ (2D-gel electrophoresis) แล้วได้ผลดังภาพ 4-12

4.5.2 Gel image analysis

การวิเคราะห์ protein spot บนเจล โดยใช้โปรแกรมวิเคราะห์ภาพเจล Delta2D Version 4.8 (DECODON, Greifswald, Germany) พบว่าสามารถระบุจำนวนโปรตีนที่พบในเจลของแต่ละกลุ่มได้ 406 จุด จากนั้นการเปรียบเทียบ spot volume โดยใช้ค่าเฉลี่ยจากเจล 3 เจล/กลุ่ม และผ่านกระบวนการ normalization เพื่อลดความคลาดเคลื่อนที่เกิดจากความเข้มพื้นหลังของแผ่นเจลก่อนการเปรียบเทียบ กระบวนการ normalization ทำได้โดยการแปลงค่า spot volume ที่ได้จากโปรแกรมให้เป็นค่า % spot volume ดังสมการ

$$\% \text{ spot volume} = \frac{\text{spot volume of protein spot}}{\text{spot volume of all protein spots on gel}}$$

ในการพิจารณาโปรตีนที่มีการแสดงออกแตกต่างกัน (differential protein) ในกลุ่มควบคุมและกลุ่มที่ทดสอบด้วยสารดีดีทีที่มีความเข้มข้น 10 และ 100 ไมโครกรัมต่อลิตร เป็นเวลา 96 ชั่วโมง ใช้การเปรียบเทียบ % spot volume ในแต่ละกลุ่มตัวอย่าง โดยมีหลักเกณฑ์ดังต่อไปนี้

1. % spot volume ของโปรตีนมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.01$)

2. มีปริมาณโปรตีนแตกต่างกันมากกว่า 1.2 เท่าขึ้นไป เมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม (fold change$\geq$1.2)

เมื่อพิจารณาตามหลักเกณฑ์ข้างต้น พบ differential protein ($P<0.01$, fold change$\geq$1.2) ทั้งหมด 51 spot โดยแบ่งเป็น 3 กลุ่ม (ตารางที่ 4-1) ดังนี้

กลุ่มที่ 1 โปรตีนที่มีปริมาณเพิ่มขึ้น (up-regulated protein)

เมื่อทดสอบด้วยสารดีดีที โปรตีนในกลุ่มนี้จะมีปริมาณเพิ่มขึ้นในกลุ่มทดสอบที่ได้รับสารดีดีทีที่ความเข้มข้น 10 และ 100 ไมโครกรัมต่อลิตร เป็นเวลา 96 ชั่วโมง เมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม โปรตีนในกลุ่มนี้มีทั้งหมด 27 จุด

กลุ่มที่ 2 โปรตีนที่มีปริมาณลดลง (down-regulated protein)

เมื่อทดสอบด้วยสารดีดีที โปรตีนในกลุ่มนี้จะมีปริมาณลดลงในกลุ่มทดสอบที่ได้รับสารดีดีทีที่ความเข้มข้น 10 และ 100 ไมโครกรัมต่อลิตร เป็นเวลา 96 ชั่วโมง เมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม โปรตีนในกลุ่มนี้มีทั้งหมด 14 จุด

กลุ่มที่ 3 โปรตีนที่มีปริมาณเพิ่มลดแบบไม่คงที่ (fluctuated protein) โปรตีนในกลุ่มนี้จะมีปริมาณเพิ่มขึ้นหรือลดลงไม่สัมพันธ์กับความเข้มข้นของสารดีดีทีที่ทดสอบ โปรตีนในกลุ่มนี้มีทั้งหมด 10 จุด

จากนั้นนำ differential protein ทั้ง 51 spots นี้ไปย่อยด้วยเอนไซม์ทริปซิน (Promega™ Sequencing Grade Modified Trypsin, Promega™ V5111) เพื่อระบุชนิดของโปรตีน ผลการศึกษาพบว่าสามารถระบุชนิดของโปรตีนได้ทั้งหมด 29 จุด

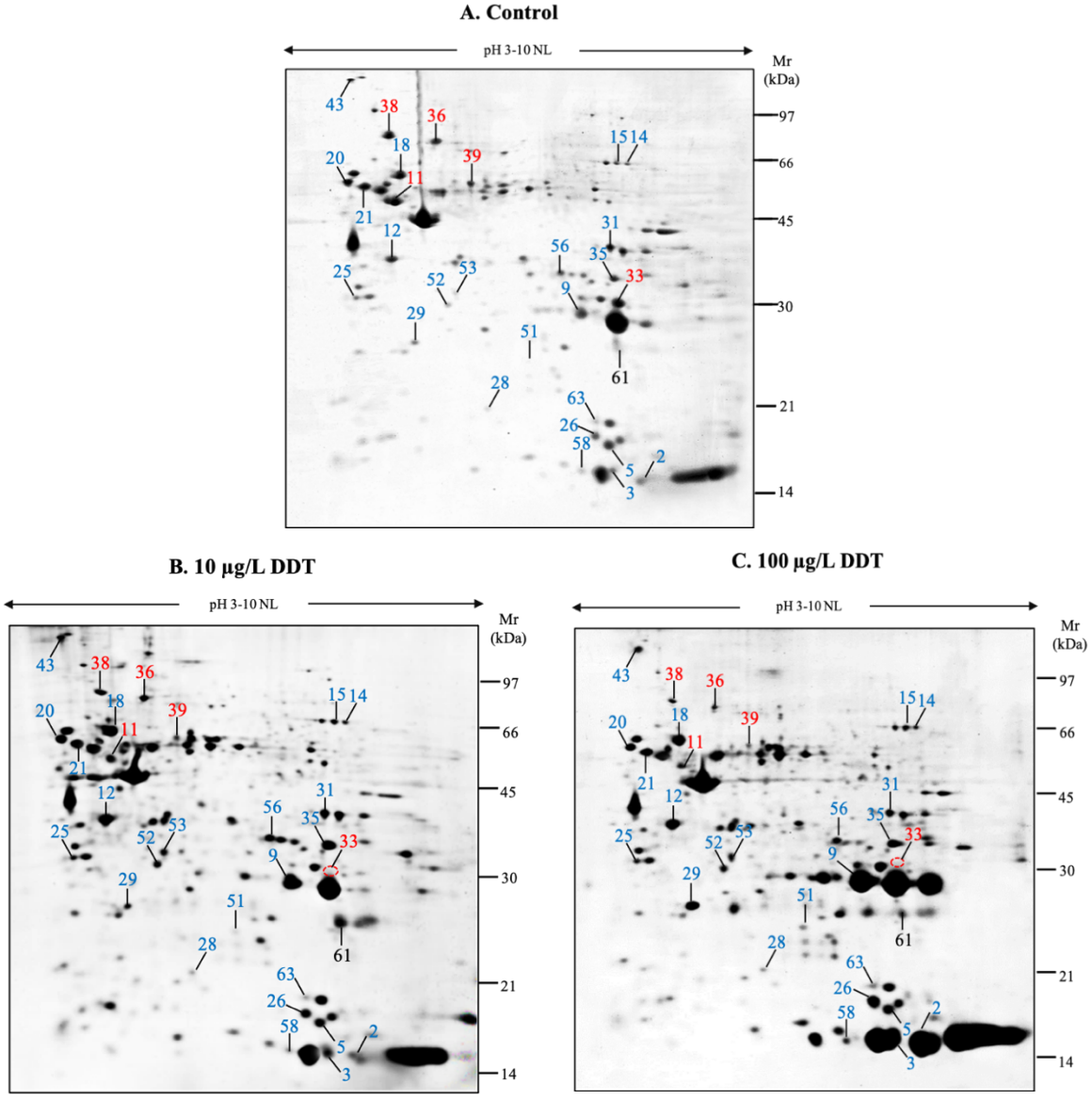
ตารางที่ 4-1 การวิเคราะห์ differential proteins จำนวนโปรตีนที่สามารถระบุชนิดได้

กลุ่ม	%spot volume: P<0.01 และ fold change≥1.2	สามารถระบุชนิดได้ (identified proteins)
up-regulated protein	27 จุด	23 จุด
down-regulated protein	14 จุด	5 จุด
fluctuated protein	10 จุด	1 จุด
รวม	51 จุด	29 จุด

4.5.3 การระบุชนิดของโปรตีน และการจัดจำแนกโปรตีนตามหน้าที่

จากการระบุชนิดของโปรตีนโดยใช้เทคนิค liquid chromatography-mass spectrometry (LC-MS/MS) จะได้ข้อมูล MS/MS ของเปปไทด์แต่ละชิ้น และเมื่อนำไปเปรียบเทียบกับฐานข้อมูลจีโนมของของสัตว์ในกลุ่มหอยนางรมที่พบใน NCBI โดยใช้โปรแกรม mascot ผลการศึกษาพบว่าสามารถระบุชนิดของโปรตีนได้ทั้งหมด 29 จุด จากโปรตีนทั้งหมด 51 จุด (ตารางที่ 4-1, 4-2 และภาพที่ 4-12) โปรตีนได้ทั้ง 29 จุด เมื่อระบุหน้าที่ของโปรตีนแล้วจากนั้นทำการการจัดกลุ่มของโปรตีนตามหน้าที่โดยอาศัยข้อมูล (gene ontology, GO) ร่วมกับการศึกษาจากข้อมูลงานวิจัยที่มีการตีพิมพ์หน้าที่ของโปรตีนชนิดนั้น ได้ผลดังตารางที่ 4-2 และภาพที่ 4-13 ซึ่งผลที่พบในตาราง

นอกจากจะแบ่งกลุ่มโปรตีนตามหน้าที่แล้วยังมีการเรียงลำดับโปรตีนตามปริมาณการเปลี่ยนแปลงของโปรตีนเมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม (fold change)



ภาพที่ 4-12 การแสดงออกของโปรตีนในแมนเทิลของหอยนางรมปากจีบที่ได้รับสารดีดีทีที่ความเข้มข้นต่าง ๆ เป็นเวลา 96 ชั่วโมง ($P<0.01$) โดยเทคนิค 2D-PAGE ลูกศรสีน้ำเงิน = up-regulated protein, ลูกศรสีแดง = down-regulated protein, ลูกศรสีดำ = Fluctuated protein A. กลุ่มควบคุม B. กลุ่มทดสอบสารดีดีที ที่ระดับความเข้มข้น 10 ไมโครกรัมต่อลิตร และ C. กลุ่มทดสอบสารดีดีที ที่ระดับความเข้มข้น 100 ไมโครกรัมต่อลิตร

ตารางที่ 4-2 การระบุชนิดของ differential protein (P<0.01, fold change≥1.2) และการจัดจำแนกหน้าที่ของโปรตีน เรียงตามค่า fold change จากมากไปน้อย

spot no.	NCBI accession no.	putative identification	functional annotation	theor. pI/Mr (kDa)	exp. pI/Mr (kDa)	masscot Score	no. of matches[a]	fold change			*p*-value	emPAI
								CT	10 μg/L	100 μg/L		
stress response												
up-regulated protein												
*3	ref|XP_022298339.1|*Crassostrea virginica*	universal stress protein PHOS32-like	cell apoptosis	7.60/14.43	6.32/16.78	217	107(26)	1.00	15.31	36.16	3.09E-07	2.62
9	ref|XP_022337710.1|*Crassostrea virginica*	carbonyl reductase [NADPH] 1-like	oxidoreductase activity	7.20/32.05	9.02/31.33	44	3(1)	1.00	3.24	4.78	1.86E-07	0.12
2	ref|XP_022320948.1|*Crassostrea virginica*	sjoegren syndrome nuclear autoantigen 1-like	primary autoimmune disease	8.20/13.91	7.74/13.32	74	7(3)	1.00	1.46	2.70	1.25E-04	0.98
25	ref|XP_011440316.1|*Crassostrea gigas*	14-3-3-like protein 2 isoform X1	apoptotic signaling	4.10/34.46	4.85/30.07	389	42(26)	1.00	1.53	1.83	2.18E-04	3.14
15	gb|ADZ93495.1|*Crassostrea hongkongensis*	catalase	protect cells from the toxic effects	7.80/67.44	6.74/58.34	475	39(22)	1.00	1.30	1.32	1.07E-03	0.86
20	dbj|BAF63639.1|*Crassostrea gigas*	calreticulin	calcium-binding chaperone	4.53/48.15	4.76/50.01	309	25(15)	1.00	1.20	1.39	2.12E-04	0.82
14	gb|ADZ93495.1|*Crassostrea hongkongensis*	catalase	protect cells from the toxic effects	7.90/67.44	6.74/58.34	263	28(11)	1.00	1.22	1.28	4.06E-03	0.45
down-regulated protein												
*36	ref|XP_022328101.1|*Crassostrea gigas*	heat shock cognate 71 kDa protein	protection against oxidative stress	5.20/73.84	5.38/72.10	1306	77(46)	1.00	-1.26	-2.95	3.08E-05	1.73
39	ref|XP_022332719.1|*Crassostrea gigas*	retinal dehydrogenase 1-like	oxidation-reduction reaction	5.60/60.48	5.76/53.63	370	14(9)	1.00	-1.22	-2.26	4.00E-06	0.31
38	ref|XP_022323882.1|*Crassostrea gigas*	78 kDa glucose-regulated protein	protein folding	4.40/76.57	5.02/73.03	686	37(25)	1.00	-1.20	-2.01	6.80E-05	0.91
fluctuated protein												
61	ref|XP_011441202.1|*Crassostrea gigas*	proteasome subunit beta type-5 isoform X1	proteolytic degradation	7.80/26.73	6.07/30.53	322	34(14)	1.00	33.95	-1.02	2.71E-07	2.46
cytoskeleton activity												
up-regulated protein												
*51	dbj|BAB84579.1|*Crassostrea gigas*	actin 2	cellular structure and support	5.40/25.32	5.30/41.72	3845	302(171)	1.00	11.72	25.99	6.73E-04	10.46
29	gb|AVF19946.1|*Crassostrea brasiliana*	beta-actin	cellular structure and support	5.70/27.72	5.29/41.86	79	3(2)	1.00	3.04	6.86	2.34E-08	0.19
53	gb|AVF19946.1|*Crassostrea brasiliana*	actin type 1, partial	cellular structure and support	5.40/35.74	5.05/24.68	1082	120(56)	1.00	3.12	4.32	6.16E-03	4.93
28	ref|XP_022291680.1|*Crassostrea virginica*	transgelin-3-like isoform X2	actin-binding protein	5.40/19.64	6.33/18.70	205	27(11)	1.00	1.71	3.03	3.68E-06	0.76
21	ref|XP_022299451.1|*Crassostrea virginica*	gelsolin-like protein 2	calcium-regulated, actin-binding protein	4.00/59.40	4.76/40.66	832	48(32)	1.00	1.74	2.09	7.73E-06	1.42
58	gb|ANB49595.1|*Crassostrea brasiliana*	actin	cellular structure and support	6.90/14.69	5.30/41.75	211	17(9)	1.00	1.28	2.05	6.89E-04	0.58
5	ref|XP_022291680.1|*Crassostrea virginica*	transgelin-3-like isoform X2	actin-binding protein	7.50/16.68	6.33/18.70	231	41(19)	1.00	1.33	1.51	8.61E-04	2.09
18	gb|AVF19943.1|*Crassostrea brasiliana*	alpha-tubulin	microtubule-based movement	4.50/63.87	4.94/50.13	239	12(9)	1.00	1.25	1.45	1.99E-05	0.54
12	ref|XP_022313912.1|*Crassostrea gigas*	actin, cytoplasmic 1-like	cellular structure and support	4.40/42.08	5.29/41.78	1173	100(53)	1.00	1.25	1.40	1.16E-03	2.63
down-regulated protein												
11	dbj|BAB84579.1|*Crassostrea gigas*	actin 2	cellular structure and support	4.40/14.69	5.30/41.72	64	3(2)	1.00	-1.59	-2.38	1.90E-01	0.19

exp. pI/Mr (kDa): molecular weight from database entry for protein identified by mass spectrometry.
theor. pI/Mr (kDa): molecular weight predicted from migration position on 2DE.
a: number of matched peptides (number of significant matched peptides).
*: potential protein biomarkers of DDT exposure.

ตารางที่ 4-2 (ต่อ)

spot no.	NCBI accession no.	putative identification	functional annotation	theor. pI/Mr (kDa)	exp. pI/Mr (kDa)	masscot Score	no. of matches[a]	fold change			*p*-value	emPAI
								CT	10 µg/L	100 µg/L		
energy metabolism												
up-regulated protein												
*43	ref|XP_011448420.1|*Crassostrea gigas*	NADH-ubiquinone oxidoreductase 75 kDa subunit, mt	transfer of electrons from NADH to the respiratory chain	3.80/102.37	5.84/80.45	112	5(2)	1.00	2.38	3.15	3.11E-05	0.09
63	ref|XP_011436228.1|*Crassostrea gigas*	enolase-like	the glycolytic enzyme	7.30/18.94	5.70/47.20	3704	371(161)	1.00	1.57	2.70	3.96E-06	5.2
31	ref|XP_011441422.1|*Crassostrea gigas*	fructose-bisphosphate aldolase	oxidative damage of the glycolytic enzymes	7.50/44.43	6.56/39.46	211	8(7)	1.00	1.31	1.79	1.02E-07	0.49
35	gb|AFK73701.1|*Ostrea edulis*	receptor of activated kinase C	receptor signaling pathway	7.60/38.43	6.69/34.98	95	5(4)	1.00	1.26	1.34	6.56E-03	0.51
down-regulated protein												
*33	ref|XP_011448026.1|*Crassostrea gigas*	glycine receptor subunit alpha-3	extracellular-glycine-gated chloride channel activity	7.60/33.84	8.24/45.13	35	3(1)	1.00	N.D.	N.D.	3.44E-05	0.08
ion transport												
up-regulated protein												
*52	ref|XP_011441836.2|*Crassostrea gigas*	16 kDa calcium-binding protein	calcium transport	6.40/33.24	5.11/27.29	448	114(31)	1.00	2.69	5.01	3.26E-03	2.98
others												
up-regulated protein												
26	ref|XP_022299964.1|*Crassostrea virginica*	uncharacterized protein LOC111108402	unknown	7.30/17.61	6.79/17.47	502	20(13)	1.00	1.29	2.62	2.06E-05	0.49
56	ref|XP_019926296.1|*Crassostrea gigas*	uncharacterized protein LOC105336555	unknown	6.80/39.13	5.31/23.97	1186	106(37)	1.00	1.24	1.37	1.46E-05	2.69

exp. pI/Mr (kDa): molecular weight from database entry for protein identified by mass spectrometry.
theor. pI/Mr (kDa): molecular weight predicted from migration position on 2DE.
a: number of matched peptides (number of significant matched peptides).
*: potential protein biomarkers of DDT exposure.

ผลการศึกษาในครั้งนี้พบว่าสารดีดีทีมีผลต่อการแสดงออกของโปรตีนโดยกระตุ้นให้มีการสร้างโปรตีนบางชนิดเพิ่มขึ้น ในขณะเดียวกันก็ทำให้มีการสร้างโปรตีนบางชนิดลดลง ดังนี้

1. stress response

พบว่า สารดีดีทีมีผลต่อปริมาณโปรตีนในกลุ่มที่เกี่ยวข้องกับกับภาวะเครียด (stress response) เป็นกลุ่มที่มีจำนวนมากที่สุด สามารถระบุชนิดโปรตีนได้ทั้งหมด 11 spot ได้แก่

1.1 กระตุ้นการสร้างโปรตีนในกลุ่มที่เกี่ยวข้องกับกับภาวะเครียด 7 spot ได้แก่ sjoegren syndrome nuclear autoantigen 1-like (spot # 2), universal stress protein PHOS32-like (spot # 3), carbonyl reductase [NADPH] 1-like (spot # 9), catalase (spot # 14 และ 15), calreticulin (spot # 20) และ14-3-3-like protein 2 isoform x1 (spot # 25)

1.2 ยับยั้งการสร้างโปรตีนในกลุ่มที่เกี่ยวข้องกับกับภาวะเครียด 3 spot ได้แก่ heat shock cognate 71 kDa protein (spot # 36), 78 kDa glucose-regulated protein (spot # 38) และ retinal dehydrogenase 1-like (spot # 39)

1.3 มีผลรบกวนการสร้างโปรตีนแบบเพิ่มลดไม่คงที่ (fluctuated protein) 1 spot ได้แก่ proteasome subunit beta type-5 isoform x1 (spot # 61)

2. cytoskeleton activity

พบว่า สารดีดีทีมีผลต่อปริมาณโปรตีนที่เกี่ยวข้องกับโครงสร้างของเซลล์ (cytoskeleton) เป็นกลุ่มรองลงมา ซึ่งสามารถระบุชนิดของโปรตีนในกลุ่มนี้ได้ทั้งหมด 10 spot ได้แก่

2.1 กระตุ้นการสร้างโปรตีนในกลุ่มที่เกี่ยวข้องกับโครงสร้างของเซลล์ 9 ชนิด ได้แก่ transgelin-3-like isoform x2 (spot # 5), actin, cytoplasmic 1-like (spot # 12), alpha-tubulin (spot # 18), gelsolin-like protein 2 (spot # 21), transgelin-3-like isoform x2 (spot # 28), beta-actin (spot # 29), actin 2 (spot # 51), actin type 1, partial (spot # 53) และ actin (spot # 58)

2.2 ยับยั้งการสร้างโปรตีนในกลุ่มที่เกี่ยวข้องกับโครงสร้างของเซลล์ 1 spot ได้แก่ actin 2 (spot # 11)

3. energy metabolism

พบว่า สารดีดีทีมีผลต่อปริมาณโปรตีนในกลุ่มที่เกี่ยวข้องกับการสร้างพลังงาน (energy metabolism) สามารถระบุชนิดโปรตีนได้ทั้งหมด 5 spot ได้แก่

3.1 สารดีดีทีกระตุ้นการสร้างโปรตีนที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการสร้างพลังงาน (energy metabolism) ซึ่งสามารถระบุชนิดโปรตีนได้ทั้งหมด 4 spot ได้แก่ fructose-bisphosphate aldolase (spot # 31), receptor of activated kinase c (spot # 35) NADH-ubiquinone oxidoreductase 75 kDa subunit, mt (spot # 43) และ enolase-like (spot # 63)

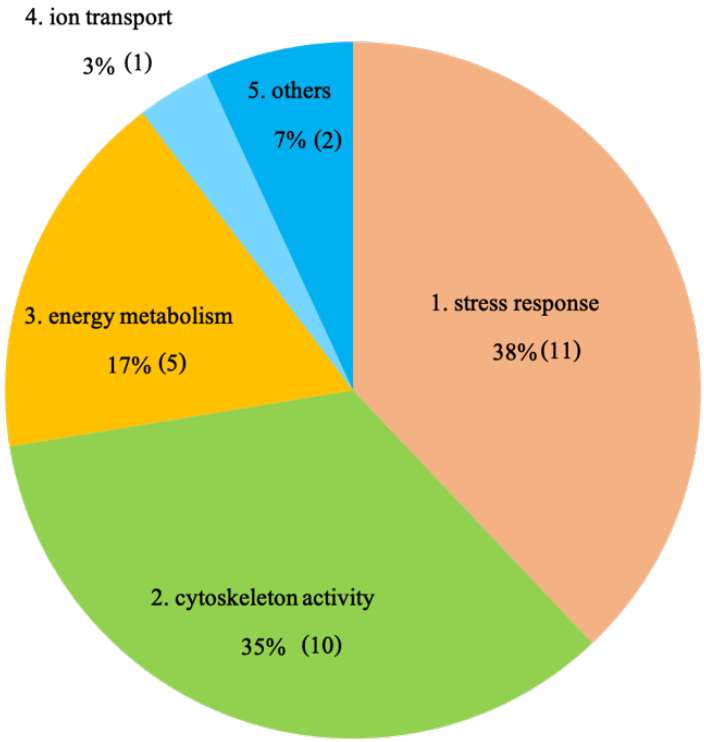
3.2 สารดีดีทียับยั้งการสร้างโปรตีนที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการสร้างพลังงาน (energy metabolism) ซึ่งสามารถระบุชนิดโปรตีนได้ทั้งหมด 1 spot ได้แก่ glycine receptor subunit alpha-3 (spot # 33)

4. ion transport

สารดีดีทีกระตุ้นการสร้างโปรตีนที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการขนส่งไอออน(ion transport) ซึ่งสามารถระบุชนิดโปรตีนได้ทั้งหมด 1 spot ได้แก่ และ 16 kDa calcium-binding protein (spot # 52)

5. โปรตีนกลุ่มอื่น ๆ (others)

นอกจากนี้ยังพบว่าสารดีดีทีกระตุ้นการสร้างโปรตีนที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการอื่น ๆ ซึ่งสามารถระบุชนิดโปรตีนได้ทั้งหมด 2 spot ได้แก่ uncharacterized protein LOC105329795 isoform x1 (spot # 17), uncharacterized protein LOC111108402 (spot # 26) และ uncharacterized protein LOC105336555 (spot # 56)



ภาพที่ 4-13 แผนภูมิวงกลม (pie chart) แบ่งกลุ่มโปรตีนที่ระบุชนิดได้ 29 ชนิด ตามหน้าที่ของโปรตีน

4.6 การหาตัวชี้วัดชีวภาพโปรตีนเพื่อใช้เป็นตัวบ่งชี้การปนเปื้อนของสารดีดีที (protein biomarker of DDT exposure) ในหอยนางรมปากจีบ

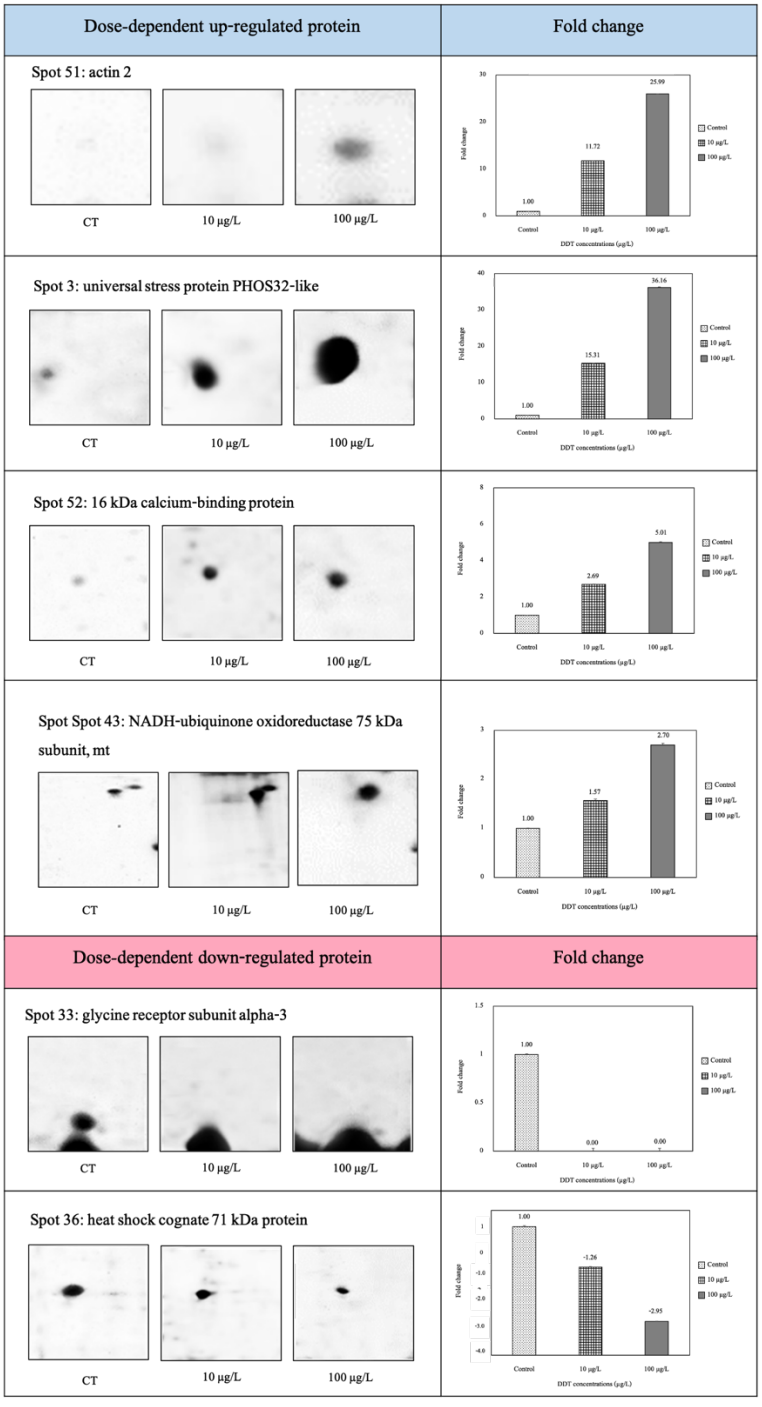
เนื่องจากในการศึกษาครั้งนี้ทางผู้วิจัย สนใจที่จะศึกษากลุ่มโปรตีนที่มีแนวโน้มนำมาใช้เป็น potential biomarker เพื่อตรวจสอบการปนเปื้อนของสารดีดีทีในสิ่งแวดล้อม โดยใช้หอยนางรมปากจีบเป็นตัวชี้วัดทางชีวภาพ ซึ่งจะต้องเป็นโปรตีนที่ถูกกระตุ้นและยับยั้งเมื่อได้รับความเข้มข้นของสารดีดีทีที่เพิ่มขึ้น โปรตีนที่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.01$) และที่มีแนวโน้มการแสดงออกของโปรตีนสัมพันธ์กับความเข้มข้นของสารดีดีมีทั้งสิ้น 6 จุดโดยใช้เกณฑ์ตามหัวข้อที่ 4.5 พบว่าโปรตีนกลุ่มที่น่าสนใจและมีแนวโน้มที่ดีสำหรับใช้เป็น potential biomarker เพื่อตรวจสอบการปนเปื้อนของสารดีดีทีในสิ่งแวดล้อม มี 2 กลุ่ม ดังนี้

กลุ่มที่ 1 โปรตีนที่มีการแสดงออกแปรผันตามความเข้มข้นของสารดีดีที (dose-dependent up-regulated protein) หมายถึงโปรตีนกลุ่มที่ถูกกระตุ้นให้สร้างเพิ่มขึ้นในหอยนางรมที่ได้รับสัมผัสกับสารดีดีที มีระดับความเข้มข้นสูงขึ้น โปรตีนในกลุ่มนี้มีจำนวน 4 จุด ดังภาพที่ 4-14A

กลุ่มที่ 2 โปรตีนที่มีการแสดงออกแปรผกผันตามความเข้มข้นของสารดีดีที (dose-dependent down-regulated protein) หมายถึงโปรตีนกลุ่มที่มีการสร้างลดลงในหอยนางรมที่ได้รับสัมผัสกับสารดีดีที ที่มีระดับความเข้มข้นสูงขึ้น โปรตีนในกลุ่มนี้มีจำนวน 2 จุด ดังภาพที่ 4-14B ซึ่งโปรตีนดังกล่าวแสดงการเปรียบเทียบปริมาณโปรตีนคิดเป็นจำนวน fold change ระหว่าง กลุ่มทดสอบสารดีดีทีที่ระดับความเข้มข้น 10 และ 100 ไมโครกรัมต่อลิตร เปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม (0 ไมโครกรัมต่อลิตร) โดยใช้ค่า % spot volume

สำหรับโปรตีนบางจุดมีปริมาณแตกต่างจากกลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.01$) แต่ทิศทางหรือรูปแบบการเปลี่ยนแปลงปริมาณไม่สัมพันธ์กับความเข้มข้นของสารทดสอบ (fluctuated protein) นั้นไม่ควรใช้เป็น potential protein biomarker เนื่องจากมีปริมาณขึ้น ๆ ลง ๆ เมื่อความเข้มข้นของสารเพิ่มขึ้น

A.



ภาพที่ 4-14 โปรตีนที่มีแนวโน้มสำหรับใช้เป็น potential protein biomarker ในการบ่งชี้การปนเปื้อนของสารดีดีที

A. ในกลุ่ม dose-dependent up-regulated protein

B. ในกลุ่ม dose-dependent down-regulated protein

บทที่ 5
อภิปรายและสรุปผลการศึกษา

5.1 อภิปรายผล

5.1.1 ชีววิทยาการเจริญของหอยนางรมปากจีบ

ผลการศึกษาชีววิทยาการเจริญขั้นต้นของหอยนางรมปากจีบ *S. cucullata* ครั้งนี้ พบว่าเซลล์ไข่เจริญอยู่ในระยะ primary oocyte และเมื่อปฏิสนธิกับเซลล์อสุจิจึงจะเริ่มแบ่งเซลล์แบบไมโอซิสที่ 1 ได้เซลล์ 2 เซลล์ คือเซลล์ขนาดใหญ่ซึ่งเป็นเซลล์ไข่ในระยะ secondary oocyte และเซลล์ขนาดเล็กอยู่ที่ด้านใดด้านหนึ่งของเซลล์ เรียกว่า first polar body หลังจากนั้น secondary oocyte จึงแบ่งเซลล์แบบไมโอซิสครั้งที่ 2 ได้เซลล์ขนาดเล็กอีก 1 เซลล์เรียกว่า secondary oocyte และเซลล์ไข่ขนาดใหญ่ที่พร้อมรวมนิวเคลียสกับเซลล์อสุจิกลายเป็นเซลล์ไซโกต (zygote; 2n) ซึ่งเป็นเซลล์ร่างกายเซลล์แรกที่เป็นเซลล์เริ่มต้นแห่งชีวิต โดยปกติเซลล์ไข่จะไม่แบ่งเซลล์แบบไมโอซิสหากไม่มีการปฏิสนธิกับเซลล์อสุจิ ซึ่งผลการศึกษานี้ตรงกับที่รายงานในหอยสองฝาบางชนิดที่ระบุว่าเซลล์ไข่จะพักตัวอยู่ในระยะ prophase I (Deguchi and Osanai 1994a; 1994b) และจะไม่ไม่เปลี่ยนแปลงหาไม่ถูกกระตุ้นด้วยเซลล์อสุจิ

การแบ่งเซลล์ไซโกตครั้งแรกในระยะคลีเวจ (first cleavege) การแบ่งเซลล์ในระยะคลีเวจเป็นการแบ่งเซลล์ร่างกาย (mitosis) เพื่อเพิ่มจำนวนเซลล์ของตัวอ่อน สำหรับหอยนางรม การแบ่งเซลล์ไซโกตครั้งแรกจะแบ่งเป็น 2 ขั้นตอน ขั้นตอนแรกคือการแบ่งไซโทพลาซึมของเซลล์ออกเป็น 3 lobe ได้เป็น lobe ขนาดล็ก 2 lobe ซึ่งมีนิวเคลียสอยู่ภายใน และ lobe ขนาดใหญ่ 1 lobe เรียกว่า polar lobe ภายใน polar lobe นี้ ไม่พบนิวเคลียส ขั้นที่สอง เกิดการเชื่อรวมของไซโทพลาซึมด้าน polar lobe เข้ากับ lobe ขนาดเล็ก 1 lobe ทำให้ได้เซลล์ 2 เซลล์ที่มีขนาดไม่เท่ากัน เรียกการแบ่งแบบนี้ว่า holoblastic cleavage

สำหรับสิ่งมีชีวิตในไฟลัมมอลลัสกา (mollusca) การเกิด polar lobeในช่วง first cleavage สารมารถพบได้ในบางกลุ่ม (Dorresteijn, 1990) โดยพบรายงานการเกิด polar lobe ในหอยนางรมชนิด *C. gigas* (Deno, 1998; Longo et al., 1993) หอยนางรมชนิด *C. virginica* (Masaru, Komaru, Sousa, & Allen, 2017) และหอยชนิด *Crepidula fornicate* (Henry, Perry, & Martindale, 2006) แต่ไม่พบในหอยแมลงภู่ชนิด *Dreissena polymorpha* (Luetjens & Dorresteijn, 1998) และหอยลาย *Corbicula sandai* (Obata & Komaru, 2005) โดยพบรายงานว่าการเกิด polar lobe เกิดจากการ

ทำงานของ microtubule ในการแบ่งเซลล์ในระยะ first clevage (Longo et al., 1993; Masaru et al., 2017) จากข้อมูลรายงานการศึกษาจะพบว่าการเกิด polar lobe ในสิ่งมีชีวิตที่เป็นสมาชิกของไฟลลัมมอลลัสกามีความหลากหลาย อาจจะพบหรือไม่พบ polar lobe ก็ได้ อย่างไรก็ดีผลการศึกษาในครั้งนี้เป็นการยืนยันการเกิด polar lobe ในหอยนางรมปากจีบชนิด *S. cucullata* และลักษณะดังกล่าวอาจเป็นลักษณะที่พบได้ทั่วไปในกลุ่มหอยนางรม (Family Ostreidea) (Thanormjit et al., 2020)

เมื่อตัวอ่อนแบ่งเซลล์เพิ่มขึ้นจะพบว่าเซลล์มีขนาดเล็กลง ตัวอ่อนมีขนาดเท่าเดิม หลังจากนั้นตัวอ่อนจะเข้าสู่ระยะ blastula และ gastrula ตามลำดับ ในหอยนางรมเมื่อศึกษาด้วยกล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสงจะพบว่าตัวอ่อนทั้ง 2 ระยะมีลักษณะภายนอกคล้ายกันมาก ยากต่อการระบุระยะที่แน่นอน เพราะมองจากภายนอกจะเห็นตัวอ่อนที่มีลักษณะกลม จนกระทั่งเริ่มสังเกตเห็น blastopore ซึ่งเป็นตำแหน่งที่เริ่มเกิดการม้วนตัวของเซลล์เข้าไปด้านในเพื่อเกิดเป็นเนื้อเยื่อ 3 ชั้น ในระยะที่เกิดเนื้อเยื่อ 3 ชั้นนี้เอง จึงจะสามารถระบุได้ว่าเป็นระยะ gastrula ซึ่งจะใช้ระยะเวลาประมาณ 4 ชั่วโมงหลังการปฏิสนธิ

ตัวอ่อนระยะ trochophore เป็นตัวอ่อนที่เริ่มเกิดการเปลี่ยนปลงรูปร่าง (metamophosis) มีการพัฒนาอวัยวะเกิดขึ้น สังเกตเห็นอวัยวะภายในเกิดขึ้นในตัวอ่อน (อาจเรียกตัวอ่อนในระยะนี้ว่า prototorch) ลักษณะเด่นของตัวอ่อนระยะนี้คือสามารถว่ายน้ำได้ เนื่องจากมีการพัฒนา cilia ล้อมรอบลำตัว เรียกว่า velum ซึ่งจะใช้ระยะเวลาประมาณ 6-7 ชั่วโมงหลังการปฏิสนธิ

ตัวอ่อนระยะ D-shaped veliger เป็นตัวอ่อนที่เจริญมากขึ้น พบการสร้างเปลือกเกิดขึ้นในหอยสองฝาหลายชนิดรวมถึงหอยนางรม เปลือกในระยะนี้จะมีลักษณะคล้ายอักษร D จึงนิยมเรียกว่า D-shaped veliger larvae หรือ D-larvae ซึ่งจะใช้ระยะเวลาประมาณ 18-24 ชั่วโมงหลังการปฏิสนธิ เมื่อเปรียบเทียบกับหอยนางรมชนิดอื่นที่มีการศึกษาแล้ว จากข้อมูลการศึกษาในกลุ่มหอยนางรม (Family Ostreidea) พบว่าระยะเวลาที่ใช้ในการเจริญเข้าสู่ระยะ D-larvae มีความแตกต่างกันในแต่ละจีนัส (genus) โดยพบว่าหอยนางรมในจีนัส *Saccostrea* จะใช้เวลาประมาณ 18-24 ชั่วโมง (Kakoi et al., 2008, Nowland, O'Connor, & Southgate, 2008; Kalyanasundaram and Ramamoorthi, 1987) ในขณะที่ จีนัสใช้เวลาตั้งแต่ *Crassostrea* พบตั้งแต่ 16-52 ชั่วโมง (Galtsoff, 1964; Wallace, Waters, & Rikard, 2008; Nor Idayu et al., 2015; Ver, 1986)

ข้อมูลจากการศึกษาชีววิทยาการเจริญในหอยนางรมปากจีบในครั้งนี้ นอกจากจะนำไปใช้สำหรับการศึกษาพิษวิทยาในขั้นตอนต่อไปแล้ว ยังสามารถนำองค์ความรู้ไปพัฒนาเพื่อปรับปรุงระบบอนุบาลและระบบเพาะฟัก เพื่อใช้เลี้ยงตัวอ่อนสำหรับใช้ในการเพาะเลี้ยงเชิงพาณิชย์สำหรับประเทศไทยต่อไปได้ในอนาคต เพราะในปัจจุบันยังไม่มีระบบเพาะเลี้ยงตัวอ่อนหอยนางรม

การเพาะเลี้ยงจะอาศัยการเก็บลูกอ่อนจากธรรมชาติทั้งหมด ซึ่งในบางปีประสบปัญหาจำนวนตัวอ่อนไม่เพียงพอ ทำให้ต้นทุนในการซื้อตัวอ่อนสูงขึ้น

5.1.2 ผลกระทบของสารดีดีทีต่อชีววิทยาการเจริญของตัวอ่อนหอยนางรมปากจีบ

ผลการทดสอบพิษวิทยาของสารดีดีทีต่อตัวอ่อนในห้องปฏิบัติการโดยใช้สารดีดีทีในน้ำทะเลที่ระดับความเข้มข้น 0, 0.25, 0.5, 1 และ 10 ไมโครกรัมต่อลิตร แสดงให้เห็นว่าสารดีดีทีส่งผลกระทบต่อตัวอ่อนในระยะ gastrula, trochophore และ D-shape veliger ทำให้ตัวอ่อนในแต่ละระยะเกิดความผิดปกติ และเจริญเข้าสู่ระยะต่าง ๆ ได้ช้าลงเมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม โดยระดับความรุนแรงจะแปรผันตามความเข้มข้นของสารดีดีทีที่ใช้ทดสอบ

ในระยะ gastrula พบว่าสารดีดีทีมีผลกระทบต่อรูปร่างของตัวอ่อน กล่าวคือ พบ blastomere (ซึ่งเป็นเซลล์ของตัวอ่อนในระยะนี้) มีการเรียงตัวไม่เป็นระเบียบ ทำให้ตัวอ่อนที่มีรูปร่างผิดปกติไปจากกลุ่มควบคุม เนื่องจากระยะ gastrula เป็นระยะที่ตัวอ่อนมีการแบ่งเซลล์เพิ่มมากขึ้นเซลล์ blastomere เริ่มจะมีการเคลื่อนที่เพื่อจัดเรียงเนื้อเยื่อของตัวอ่อนให้กลายเป็นเนื้อเยื่อ 3 ชั้น ได้แก่ เนื้อเยื่อชั้นนอก (ectoderm) เนื่อเยื่อชั้นกลาง (mesoderm) และ เนื้อเยื่อชั้นใน (endoderm) (Thanormjit et al., 2020)

การพบลักษณะรูปร่างที่ผิดปกติของตัวอ่อนในกลุ่มทดสอบแสดงให้เห็นว่าสารดีดีทีมีผลกระทบต่อการเกิดเนื้อเยื่อ 3 ชั้น ของตัวอ่อนในระยะ gastrula โดยเริ่มสังเกตความผิดปกติได้ในกลุ่มทดสอบที่ได้รับสารดีดีทีตั้งแต่ความเข้มขึ้น 0.5 ไมโครกรัมต่อลิตรขึ้นไป และพบอัตราผิดปกติสูงถึง 64.29% ในกลุ่มทดสอบที่ระดับความเข้มข้น 10 ไมโครกรัมต่อลิตร

ในระยะ trochophore พบว่าสารดีดีที ทำให้ตัวอ่อนระยะ trochophore ผิดปกติ โดยอาการผิดปกติที่พบได้มากคือ ตัวอ่อนพัฒนา velum ได้ช้า ทำให้ตัวอ่อนยังไม่เคลื่อนที่หรือเคลื่อนที่ได้ช้า และพบตัวอ่อนที่มีรูปร่างผิดปกติ โดยพบอัตราผิดปกติสูงถึง 72.22% ในกลุ่มทดสอบที่ระดับความเข้มข้น 10 ไมโครกรัมต่อลิตร เนื่องจาก velum เป็นอวัยวะที่พัฒนามาจากซิเลีย (cilia) ที่รวมกันเป็นกลุ่มเพื่อช่วยโบกพัดให้ตัวอ่อนว่ายน้ำและเคลื่อนที่ได้ ผลจากการศึกษาในครั้งนี้แสดงให้เห็นว่าสารดีดีทีนอกจากจะยับยั้งการเจริญของตัวอ่อนแล้ว อาจยับยั้งการทำงานของซิเลียด้วย ในระยะ D-shape veliger พบว่าสารดีดีที ทำให้ตัวอ่อนระยะ D-shape veliger ผิดปกติ โดยอาการผิดปกติที่พบคือ ตัวอ่อนมีการสร้างเปลือกมีการเจริญผิดรูปและสร้างเปลือกได้ช้ากว่ากลุ่มควบคุม พบอัตราผิดปกติสูงถึง 91.67% ในกลุ่มทดสอบที่ระดับความเข้มข้น 10 ไมโครกรัมต่อลิตร กระบวนการสร้างเปลือกในหอยนางรมเป็นกระบวนการที่เกี่ยวข้องกับการสะสมแคลเซียม ซึ่งพบรายงานการศึกษาว่าสารปนเปื้อนในสิ่งแวดล้อมบางชนิด เช่น สาร TBT (tributyltin) ส่งผลกระทบ

ต่อการสร้างเปลือกของหอยนางรม (Higuera-Ruiz & Elorza, 2011) โดยคาดว่าไปรบกวน calcium metabolism ผ่านโปรตีน vdac (voltage-dependent anion channel) (Khondee et al., 2016) ซึ่งสอดคล้องกับการศึกษาผลการทดสอบสารดีดีทีในตัวอ่อนสิ่งมีชีวิตชนิดอื่น พบว่าเมื่อสิ่งมีชีวิตได้รับสารดีดีที สามารถตอบสนองต่อสารเหล่านี้ในรูปแบบของการเปลี่ยนแปลงทางชีวภาพและทางเคมี กล่าวคือทำให้เกิดความเป็นพิษต่อพัฒนาการการเจริญของตัวอ่อน (embryo toxicity) เช่น ในหอยแมลงภู่ (*P. viridis*) (Jiang et al., 2017) กุ้งตะกาด (*M. monoceros*) (Srinivasulu & Ramana, 1990) และปลาม้าลาย (*D. rerio*) (Tiedeken & Ramsdell, 2009) ที่ได้รับสารดีดีทีทำให้ตัวอ่อนมีการแบ่งเซลล์ที่ผิดปกติ อีกทั้งยังส่งผลต่อการชะลอการพัฒนาของตัวอ่อนในระยะต่าง ๆ อีกด้วย

การทดสอบในห้องปฏิบัติการในครั้งนี้แสดงให้เห็นว่าสารดีดีที สามารถส่งผลกระทบต่อชีววิทยาการเจริญของตัวอ่อนหอยนางรม โดยพบว่าแม้ความเข้มข้นในน้ำทะเลต่ำเพียง 0.25 -10 ไมโครกรัมต่อลิตร ก็ส่งผลกระทบต่อตัวอ่อนหอยนางรมปากจีบได้ ทำให้ตัวอ่อนเจริญผิดรูป และเข้าสู่ระยะ D-larva ลดลง โดยความรุนแรงจะแปรผันตามระยะเวลาและความเข้มข้นของสารดีดีที โดยการศึกษาเพื่อตรวจวัดสารดีทีที่ในแม่น้ำสายบุรี จังหวัดปัตตานี พบปริมาณของสารดีดีที 0.04 ไมโครกรัมต่อลิตร (Siriwong et al., 2009) อย่างไรก็ตามแม้ว่าปริมาณการสะสมของสารดีดีที ที่ตกค้างอยู่ในสิ่งแวดล้อมและสิ่งมีชีวิตจะอยู่ในระดับที่ปลอดภัยกว่าที่ค่ามาตรฐานกำหนด แต่ก็ควรจะมีการติดตามตรวจสอบต่อไปเนื่องจากความเข้มข้นดังกล่าวอาจส่งผลกระทบต่อสุขภาพประชากรของหอยนางรมปากจีบรวมถึงสัตว์น้ำชนิดอื่น ซึ่งในระยะยาวอาจส่งผลต่อโครงสร้างของประชากรได้ จึงควรทำการศึกษาต่อไปในอนาคต

5.1.3 ผลกระทบของสารดีดีทีต่ออัตราการตายของหอยนางรมปากจีบตัวเต็มวัย

ผลจากการศึกษาความเป็นพิษเฉียบพลันของสารดีดีทีต่ออัตราการตายของหอยนางรมปากจีบตัวเต็มวัยในครั้งนี้ พบว่าสารดีดีทีมีพิษต่อหอยนางรมปากจีบทำให้หอยในกลุ่มทดสอบการตาย โดยอัตราการตายขึ้นอยู่กับความเข้มข้นของสารดีดีทีที่ใช้ทดสอบ นอกจากนี้ยังมีผลต่อพฤติกรรมการตอบสนองของหอยนางรมอีกด้วย เมื่อทำการวิเคราะห์หาค่า LC_{50} (lethal concentration for 50% mortality) สามารถคำนวณหาค่า LC_{50} ณ เวลา 96 ชั่วโมง ได้เท่ากับ 891.25 ไมโครกรัมต่อลิตร ซึ่งหมายความว่า เมื่อหอยนางรมปากจีบได้รับสัมผัสสารที่ระดับความเข้มเข้น 891.25 ไมโครกรัมต่อลิตร เป็นเวลา 96 ชั่วโมง จะทำให้หอยนางรมปากจีบตายลงครึ่งหนึ่ง เมื่อทำการเปรียบเทียบกับสัตว์น้ำชนิดอื่น พบว่าในปลาเพิร์ช (*M. minimus*) ค่า LC_{50} เท่ากับ 26 ไมโครกรัมต่อลิตร (Earnest & Benville, 1971) ในปลาทอง (*C. auratus*) ค่า LC_{50} เท่ากับ 21 ไมโครกรัมต่อลิตร (Macek & McAllister, 1970) ปลา Sheepshead Minnow (*C. variegatus*) ค่า

LC_{50} เท่ากับ 20.3 ไมโครกรัมต่อลิตร (Keith et al., 2013) และปลาแซลมอน (*O. tshawytscha*) พบค่า LC_{50} เท่ากับ 18 ไมโครกรัมต่อลิตร (Earnest & Benville, 1971) เมื่อทดสอบเป็นระยะเวลา 96 ชั่วโมง ซึ่งต่ำกว่าที่พบในการศึกษาครั้งนี้มาก แสดงให้เห็นว่าสารดีดีทีมีผลกระทบต่อปลามากกว่าในหอยนางรมปากจีบ ทั้งนี้อาจเนื่องมาจากหอยนางรมมีเปลือกที่แข็งแรงและหนา สามารถปิดเปลือกเพื่อป้องกันอันตรายจากสิ่งแวดล้อมได้ ทำให้มีความทนทานต่อความเป็นพิษของสารเคมีมากกว่าในปลา สอดคล้องกับการศึกษาความเป็นพิษของสารดีดีทีในหอยกาบเปลือกหนา (*M. mercenaria*) พบค่า LC_{50} เท่ากับ 610 ไมโครกรัมต่อลิตร เมื่อทดสอบเป็นระยะเวลา 24 ชั่วโมง (Cohn et al., 2007) นอกจากนี้เมื่อเปรียบเทียบผลการศึกษาความเป็นพิษของสารดีดีทีกับสารปนเปื้อนบริเวณชายฝั่งชนิดอื่น เช่น ทีบีที (TBT, tributyltin) ซึ่งเป็นสารปนเปื้อนที่พบได้ทั่วไปในบริเวณชายฝั่ง พบว่าสารดีดีทีนี้มีระดับความเป็นพิษน้อยกว่าสารทีบีที เนื่องจากมีค่า LC_{50} ที่เวลาทดสอบ 96 ชั่วโมง ของสารทีบีที มีเท่ากับ 59.69 ไมโครกรัมต่อลิตร (Kingtong, 2009) ซึ่งทำการศึกษาในหอยนางรมปากจีบชนิด *S. cucullata* เช่นเดียวกับการศึกษาครั้งนี้

5.1.4 ผลกระทบของสารดีดีทีต่อเนื้อเยื่อของหอยนางรมปากจีบตัวเต็มวัย

การศึกษาผลกระทบสารดีดีทีต่อเนื้อเยื่อของหอยนางรมปากจีบตัวเต็มวัยในทุกกลุ่มที่ได้รับสารดีดีที เป็นเวลา 96 ชั่วโมง พบว่าสารดีดีทีก่อให้เกิดการเปลี่ยนแปลงทางพยาธิสภาพในหอยนางรมทุกกลุ่มที่ได้รับสาร และรุนแรงมากขึ้นตามระดับความเข้มข้นของสารดีดีที โดยพบว่าในกลุ่มที่ได้รับสารดีดีทีเซลล์สร้างเมือกบริเวณเนื้อเยื่อแมนเทิลเพิ่มมากขึ้น ซึ่งในสภาวะปกติเซลล์สร้างเมือกจะทำหน้าที่สร้างและหลั่งสารเมือกหรือมิวซินออกมาปกคลุมร่างกาย เพื่อป้องกันอวัยวะต่าง ๆ การหลั่งเมือกในสภาวะปกติจะพบการสร้างและหลั่งเมือกอยู่แล้ว แต่ในสภาวะที่หอยนางรมถูกกระตุ้นจากการได้รับสารเคมี จะทำให้เกิดการสร้างเมือกออกมามากขึ้น นอกจากนี้ยังพบ blood sinus และhemocyte infiltration ภายในเนื้อเยื่อเกี่ยวพัน กลุ่มที่ได้รับการสัมผัสสารดีดีทีที่ความเข้มข้น 100 ไมโครกรัมต่อลิตร เป็นเวลา 96 ชั่วโมง ซึ่งลักษณะดังกล่าวเป็นกลไกของสิ่งมีชีวิตในระดับสรีรวิทยา เพื่อตอบสนองต่อสภาวะเครียดจากการได้รับความเป็นพิษจากสารเคมี

เช่นเดียวกันกับในเหงือกของหอยนางรม กลุ่มที่ได้รับสารดีดีที ความเข้มข้น 10 และ 100 ไมโครกรัมต่อลิตร พบว่ามีการจัดเรียงตัวของเซลล์บุผิวไม่เป็นระเบียบ และมีขนาดเซลล์ใหญ่ขึ้นในกลุ่มทดลองที่ได้รับสัมผัสจากสารดีดีที ที่ระดับความเข้มข้น 100 ไมโครกรัมต่อลิตร ซึ่งอาจส่งผลให้ประสิทธิภาพในการแลกเปลี่ยนแก๊สลดลง นอกจากนี้ยังพบอาการบวมบริเวณเซลล์เยื่อบุผิว รวมถึงมีการหลั่งเมือกเพิ่มขึ้นเมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม แสดงให้เห็นว่าในสภาวะที่สัตว์ทดลองเกิดความเครียดจากการได้รับสารเคมี จะมีการตอบสนองโดยการหลั่งเมือกออกมาเพื่อป้องกัน

ตัวเอง (defensive organism) ซึ่งกิจกรรมดังกล่าวนี้โดยส่วนใหญ่พบได้มากในสิ่งมีชีวิตจำพวกปลา เช่นในปลาหมอสี (*Sarotherodon melanotheron*) ที่ได้รับสัมผัสกับสารดีดีที แสดงให้เห็นถึงลักษณะที่โป่งพองของ lamellae และเส้น เกิดการขยายตัวที่หนาขึ้นของเยื่อบุผิว ซึ่งจะส่งผลให้เกิดการรวมตัวกันของเซลล์ที่อยู่ใกล้กัน ในส่วนของ Secondary lamellae พบเยื่อบุผิวมีบวมส่งผลทำให้แยกออกจากเยื่อฐาน (basement membrane) อีกทั้งยังพบว่ามีการสร้างเมือกเป็นจำนวนมากซึ่งแตกต่างจากกลุ่มควบคุมที่ไม่ได้รับการปนเปื้อนจากสารดีดีที (Riou et al., 2012)

อีกทั้งจากงงานวิจัยครั้งนี้ แสดงให้เห็นถึงผลกระทบของสารดีดีทีต่อระบบย่อยอาหารของหอยนางรมอีกด้วย โดยสังเกตจากผลกระทบที่เกิดขึ้นต่อเนื้อเยื่อต่อมย่อยอาหารในกลุ่มที่ได้รับสารดีดีที โดยความรุนแรงต่อเนื้อเยื่อจะเพิ่มขึ้นตามความเข้มข้นของสารดีดีทีที่ใช้ในการทดสอบ โดยในกลุ่มที่ได้รับการสัมผัสสารดีดีที ที่ความเข้มข้น 100 ไมโครกรัมต่อลิตร เป็นเวลา 96 ชั่วโมง พบเซลล์เยื่อบุผิวภายในท่อ digestive diverticulum บางลงจนนิวเคลียสชิดกับขอบของท่อ เกิดเป็นพื้นที่ว่างขนาดใหญ่กลางท่อและพบ basophilic cell มีจำนวนเพิ่มขึ้นอย่างมาก ซึ่งสอดคล้องกับการศึกษาในหอยแมลงภู่ยักษ์ (*Crenomytilus grayanus*) พบการอักเสบของเนื้อเยื่อต่อมย่อยอาหารที่ได้รับสารดีดีที โดยพบเซลล์เยื่อบุผิวภายในท่อ digestive diverticulum บางลงจนสังเกตเห็นนิวเคลียสชิดกับขอบท่อ เกิดเป็นพื้นที่ว่างขนาดใหญ่กลางท่อลูเมน (Usheva, Vaschenko, & Durkina, 2006) เช่นเดียวกับการศึกษาในหอยแมลงภู่น้ำจืด (*Lamellidens corrianus*) ที่พบการอักเสบของเนื้อเยื่อต่อมย่อยอาหารเมื่อได้รับสาร โดยพบว่าจำนวนของ basophilic cell เพิ่มมากขึ้น ซึ่งลักษณะดังกล่าวนี้สามารถบ่งชี้ได้ถึงความผิดปกติที่เกิดขึ้นกับระบบการสร้างเอนไซม์ที่ช่วยในการย่อยอาหาร (Kamble, 2015)

จากผลการศึกษาแสดงให้เห็นว่าหอยนางรมมีกลไกในการป้องกันตัวเองจากปัจจัยรบกวนภายนอกที่ได้รับ เช่น การปนเปื้อนของสารเคมีในสิ่งแวดล้อม แต่ในขณะเดียวกันเมื่อเปรียบเทียบกับสัตว์น้ำในกลุ่มปลาซึ่งถึงแม้ว่าจะเป็นสัตว์ที่มีกระดูกสันหลัง แต่อาศัยในน้ำ ซึ่งมีแนวโน้มที่จะได้รับการปนเปื้อนเช่นเดียวกัน กลับพบว่าสารดีดีทีสามารถส่งผลกระทบต่อปลามากกว่าในหอยนางรม อาจเนื่องมาจากพฤติกรรมในการกรองกิน (filter feeder) รวมถึงการอยู่อาศัยโดยการเกาะอยู่กับที่ (sessile organism) และการมีเปลือกที่แข็งแรง ดังนั้นจึงทำให้มีกลไกการปรับตัวด้านสรีรวิทยา (physiological adaptation) ที่ดีเพื่อความอยู่รอด โดยการสร้างเมือกออกมาเพื่อปกคลุมลำตัวเมื่อถูกรบกวนจากปัจจัยที่ทำให้เกิดความเครียดจากสิ่งแวดล้อมที่อาศัยอยู่ ซึ่งกลไกดังกล่าวที่กล่าวมานี้อาจเป็นปัจจัยสำคัญที่ทำให้หอยนางรมทนต่อความเป็นพิษของสารเคมีได้มากกว่ากลุ่มปลาที่ได้รายงานไปข้างต้น

5.1.5 ผลกระทบของสารดีดีทีต่อโปรตีโอมของหอยนางรมปากจีบ

ในการศึกษาครั้งนี้ผู้วิจัยใช้เทคนิคโปรตีโอมิกส์ในการศึกษาโปรตีโอมในหอยนางรม เพื่อวัตถุประสงค์หลัก 2 ประการ ได้แก่ ประการแรก เพื่ออธิบายกลไกการตอบสนองของเซลล์ในระดับโมเลกุลโดยการวิเคราะห์โปรตีนที่เปลี่ยนแปลงไปเมื่อได้รับสารดีดีที ซึ่งจะเป็นประโยชน์ในการอธิบายกลไกที่เกี่ยวข้องกับการเกิดพิษในระดับโมเลกุล (molecular toxicology) ต่อสัตว์ทดลอง ประการที่ 2 เพื่อหาโปรตีนที่ใช้เป็นดัชนีชี้วัดเพื่อตรวจสอบการปนเปื้อนของสารดีดีทีในแหล่งน้ำ (protein biomarker of DDT exposure) การศึกษาการเปลี่ยนแปลงในระดับโปรตีนของกลุ่มตัวอย่างแมนเทิลของหอยนางรมที่ได้รับการสัมผัสกับสารดีดีที เพื่อนำมาเปรียบเทียบกับแมนเทิลของหอยนางรมในกลุ่มควบคุมที่ไม่ได้รับการสัมผัสกับสารดีดีที โดยใช้เทคนิคโปรทีโอมิกส์ (Proteomics) ซึ่งเป็นการตรวจสอบโปรตีนที่มีการแสดงออกภายในเซลล์ของสิ่งมีชีวิต โดยใช้ หลักการที่ว่า การทำงานของเซลล์จะถูกควบคุมโดยยีนซึ่งการทำงานของยีนจะอาศัยการสร้าง mRNA เพื่อแปลรหัสให้กลายเป็นโปรตีน จากนั้นโปรตีนจึงจะทำหน้าที่ต่าง ๆ ภายในเซลล์ต่อไป ในกรณีที่สิ่งมีชีวิตได้รับผลกระทบจากปัจจัยภาพนอก เช่น การปนเปื้อนของสารเคมีในสิ่งแวดล้อม ซึ่งจะส่งผลต่อการทำงานของเซลล์ โดยอาจส่งผลให้เกิดการกระตุ้นหรือยับยั้งการทำงานของยีน ซึ่งจะทำให้โปรตีนที่สร้างจากยีนนั้น ๆ มีระดับการแสดงออกของโปรตีนที่เพิ่มขึ้นหรือลดลงไปจากระดับปกติ การศึกษาพิษวิทยาของสารดีดีทีต่อโปรตีโอมของหอยนางรมปากจีบในครั้งนี้เป็นข้อมูลที่แสดงถึงกลไกการตอบสนองของเซลล์ในระดับโปรตีน ผลการวิเคราะห์โปรตีโอมของหอยนางรมปากจีบโดยการเปรียบเทียบระหว่างกลุ่มควบคุมและกลุ่มทดสอบที่ได้รับสารดีดีทีที่ความเข้มข้น 10 และ 100 ไมโครกรัมต่อลิตร เป็นเวลา 96 ชั่วโมง (sublethal exposure)

การศึกษาในครั้งนี้เมื่อเปรียบเทียบโปรตีนในกลุ่มทดสอบและกลุ่มควบคุม พบว่ามีโปรตีนที่มีปริมาณแตกต่างจากกลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.01$) และมีความแตกต่าง 1.2 เท่าขึ้นไป (fold change$\geq$1.2) จำนวน 59 spot เมื่อวิเคราะห์ด้วย LC-MC/MS และ bioinformatic search แล้ว สามารถระบุจำนวนโปรตีนได้ทั้งหมด 29 spot โดยสามารถแบ่งเป็นกลุ่มได้ 5 กลุ่ม ดังนี้

1. stress response

พบว่า สารดีดีทีมีผลต่อปริมาณโปรตีนในกลุ่มที่เกี่ยวข้องกับกับภาวะเครียด (stress response) เป็นกลุ่มที่มีจำนวนมากที่สุด สามารถระบุชนิดโปรตีนได้ทั้งหมด 11 spot ได้แก่

1.1 กระตุ้นการสร้างโปรตีนในกลุ่มที่เกี่ยวข้องกับกับภาวะเครียด 7 ชนิด ได้แก่

- universal stress protein PHOS32-like

universal stress protein PHOS32-like เป็นโปรตีนที่เกี่ยวข้องกับ cell apoptosis pathway โปรตีนชนิดนี้เป็นชนิดที่มีปริมาณเพิ่มขึ้นสูงที่สุดเมื่อเทียบกับกลุ่มทดสอบ โดยเพิ่มขึ้นถึง 15.31 และ 36.16 เท่า ในกลุ่ม ที่ได้รับสารดีดีทีที่ความเข้มข้น 10 และ 100 ไมโครกรัมต่อลิตร ตามลำดับ หน้าที่ของโปรตีนชนิดนี้เป็นโปรตีนที่เกี่ยวข้องกับระบบภูมิคุ้มกัน (immune defense) โดยจะแสดงกลไกการต้านการอักเสบในเซลล์ที่ได้รับอันตรายจากสิ่งแปลกปลอมเข้าสู่ร่างกาย มีรายงานถึงการแสดงออกของโปรตีนชนิดนี้ในเมือกของหอยนางรม *Ostrea edulis* (Fernández-Boo et al., 2019) ที่ติดเชื้อโบนาเมีย ออสตริเอ เป็นโรคระบาดที่เกิดกับหอยนางรม โดยมีสาเหตุจากเชื้อโปรโตซัว *Bonamia ostreae* ซึ่งจะเข้าไปทำอันตรายกับเซลล์เม็ดเลือดของหอยนางรม แสดงให้เห็นว่าเมื่อหอยนางรมดำรงชีวิตอยู่ภายใต้สภาวะเครียดจากสารดีดีทีที่ปนเปื้อนอยู่ในน้ำ อาจเกิดการกระตุ้นให้หอยนางรมหลั่งเมือกออกมาปกคลุมร่างกายเพิ่มขึ้น ซึ่งจะเป็นตัวบ่งชี้ถึงการตอบสนองต่อภาวะเครียดภายหลังจากการสัมผัสกับสารดีดีที ซึ่งอาจเกี่ยวข้องกับการเกิดกระบวนการ exocytosis เป็นการลำเลียงสารออกนอกเซลล์ โดยแสดงออกมาในรูปแบบของการหลั่งเมือก

- carbonyl reductase [NADPH] 1-like

carbonyl reductase เป็นเอนไซม์ที่อยู่ในกลุ่มของ oxidoreductases หรือเรียกอีกอย่างว่า เอนไซม์ aldehyde reductase (ALDH) เป็นเอนไซม์ที่ช่วยกระตุ้นให้เกิดปฏิกิริยา aldehyde oxidation ซึ่งเกี่ยวข้องกับกลไกการกำจัดพิษของแอลดีไฮด์ทั้งภายนอกและภายในเซลล์ ช่วยลดความเป็นพิษของสารประกอบไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ต่อเซลล์ ทำหน้าที่ต้านอนุมูลอิสระ และปกป้องเซลล์จากความเครียดที่เกิดจากสารเคมี นิยมใช้เป็นตัวดัชนีชี้วัดสภาวะความเครียดออกซิเดชันที่เกิดจากการตอบสนองของสิ่งมีชีวิตเมื่อได้รับสารพิษและเกิดการเหนี่ยวนำให้สิ่งมีชีวิตเกิดความเครียด (Rashid et al., 2010) สอดคล้องกับการศึกษาในหอยแมลงภู่ *Mytilus sp.* ที่ติดเชื้อ herpesvirus-1 microVar พบว่ามีการกระตุ้นการสร้างโปรตีนชนิดนี้เช่นเดียวกัน (O' Reilly et al., 2017)

- sjoegren syndrome nuclear autoantigen 1-like

sjoegren syndrome nuclear autoantigen 1-like เป็นโปรตีนที่เกี่ยวข้องกับระบบภูมิคุ้มกันในตัวเอง (autoimmune disease) เป็นความผิดปกติของระบบภูมิคุ้มกัน โดยภูมิคุ้มกันจะทำลายเซลล์ของร่างกายแทนการทำลายไวรัสและแบคทีเรีย จะส่งผลกระทบต่ออวัยวะส่วนที่ทำหน้าที่ผลิตของเหลว ทำให้เกิดการตายของเซลล์ เกิดอาการสูญเสียน้ำ เนื่องจากร่างกายผลิตสารคัดหลั่งได้น้อยกว่าปกติ (Watanabe et al., 2018) จากรายงานข้างต้นนี้ สามารถอธิบายได้ว่าเมื่อหอยนางรมถูกรบกวนจากสารดีดีทีจึงก่อให้เกิดส่งผลต่อการกระตุ้นการทำงานของโปรตีนในกลุ่มนี้ ให้มี

ประสิทธิภาพในการทำงานที่เพิ่มขึ้นได้ แสดงให้เห็นว่าเมื่อหอยนางรมดำรงชีวิตอยู่ภายใต้สภาวะเครียดจากสารดีดีทีที่เจือปนอยู่ในน้ำ อาจไปกระตุ้นให้หอยนางรมกำจัดหรือทำลายสิ่งแปลกปลอมที่ร่างกายไม่ต้องการ โดยการทำงานของระบบภูมิคุ้มกันในตัวเองให้สร้างแอนติบอดีเพิ่มขึ้นเพื่อตอบสนองต่อสารดีดีที ซึ่ง เป็นเครื่องบ่งชี้ถึงการตอบสนองต่อภาวะเครียดทางชีวภาพ

- 14-3-3-like protein 2 isoform x1

มีรายงานถึงโปรตีน 14-3-3 proteins family สามารถยับยั้งการทำงานของโปรตีน kinase c ซึ่งจะพบในสภาวะที่มีแคลเซียม (Hondermarck, 2010) มีหน้าที่ในการรักษาสมดุลก็จะส่งผลต่อการควบคุมเมแทบอซึมของ Ca^{2+} ซึ่งมีความสำคัญต่อระบบการสร้างเปลือกของหอยนางรม การกระตุ้นให้เกิดการสร้างโปรตีน 14-3-3-like protein 2 isoform x1 แสดงให้เห็นว่าเซลล์มีการตอบสนองตัวต่อภาวะเครียด ภายหลังจากการสัมผัสกับสารดีดีที จึงมีการกระตุ้นให้สร้างโปรตีนขึ้นมาเพิ่มขึ้น เพื่อรักษาเสถียรภาพของเซลล์ให้ปกติ ซึ่งมีความจำเป็นสำหรับการเจริญเติบโตและการสร้างเปลือกต่อไป

- proteasome subunit alpha type-4-like

proteasome เป็น multisubunit enzyme ทำหน้าที่สลายโปรตีนที่เหลือใช้หรือไม่ต้องการภายในเซลล์ โปรตีนที่จะถูกทำลายโดย proteasome จะต้องถูกติดสลากด้วยโปรตีน ubiquitin ซึ่งสอดคล้องกับการศึกษาการแสดงออกของยีนภูมิคุ้มกันในหอยนางรม *Ostrea edulis* ในการตอบสนองต่อโรคโบนาเมีย (bonamiosis) ซึ่งเป็นโรคระบาดในสัตว์น้ำ พบการแสดงออกของ proteasome ถูกกระตุ้นให้สร้างเพิ่มขึ้นในหอยนางรมที่ติดเชื้อโรคโบนาเมีย ซึ่งจากกลไกการตอบสนองต่อสิ่งแปลกปลอมข้างต้นนี้ แสดงให้เห็นถึงสภาวะที่หอยนางรมเกิดความเครียด จึงพยายามสร้างภูมิคุ้มกันในตัวเอง โดยการกำจัดออกจากร่างกาย

- catalase

เป็นเอนไซม์ที่เกี่ยวข้องกับกลไกการกำจัดพิษของแอลดีไฮด์ทั้งภายนอกและภายในเซลล์ โดยจะเปลี่ยนปฏิกิริยา $2H_2O_2 \rightarrow 2H_2O + O_2$ ซึ่งจะช่วยลดความเป็นพิษของสารประกอบไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ต่อเซลล์ ทำหน้าที่ต้านอนุมูลอิสระ และปกป้องเซลล์จากความเครียดที่เกิดจากสารเคมี นิยมใช้เป็นตัวดัชนีชี้วัดสภาวะความเครียดออกซิเดชันที่เกิดจากการตอบสนองของสิ่งมีชีวิตเมื่อได้รับสารพิษและเกิดการเหนี่ยวนำให้สิ่งมีชีวิตเกิดความเครียด โดยปกติแล้วสารพิษจะเข้าไปชักนำ ให้มีการสร้างสารอนุมูลอิสระขึ้นได้แก่ Superoxide anion radical และ H_2O_2 ซึ่งเป็นสารที่มีความไวในการเกิดปฏิกิริยา และเป็นอันตรายต่อส่วนประกอบของเซลล์ ได้แก่ โปรตีน ไขมัน คาร์โบไฮเดรต และดีเอ็นเอ ร่างกายจึงจำเป็นต้องมีกลไกในการกำจัดสารอนุมูลอิสระนี้

(antioxidant defense system) ซึ่งเกิดจากการทำงานของสารต้านอนุมูลอิสระต่าง ๆ ตัวอย่างเช่น เอนไซม์ catalase เพื่อควบคุมอนุมูลอิสระต่าง ๆ ให้อยู่ในระดับสมดุล ในสัตว์กลุ่มหอยสองฝามีรายงานว่าเอนไซม์กลุ่มนี้จะถูกกระตุ้นเมื่อได้รับสัมผัสจากสารพิษจากสิ่งแวดล้อม เช่น bisphenol-A (Apraiz, Mi, & Cristobal, 2006) และแคดเมียม (Jo et al., 2008) นอกจากนี้ยังพบรายงานถึงเอนไซม์ชนิดนี้ในปลาที่ถูกกระตุ้นเมื่อได้รับสัมผัสจากสารพิษจากสิ่งแวดล้อม เช่น แคดเมียม (Meng, Wang, Li, Yin, & Zhang, 2017) ในภาพรวมจะเห็นได้ว่าเอนไซม์ในกลุ่มนี้มีความสำคัญต่อการป้องกันผลกระทบต่อเซลล์ที่เกิดจากสารดีดีที เป็นตัวบ่งชี้ถึงการตอบสนองต่อภาวะเครียดทางชีวภาพของหอยนางรมปากจีบ ที่มีการกระตุ้นการทำงานของระบบภูมิคุ้มกัน เพื่อต่อต้านอันตรายจากการได้รับสารดีดีทีเข้าสู่ร่างกาย

- calreticulin (spot # 20)

เป็นโปรตีนที่ทำหน้าที่ควบคุมการทำงานของเซลล์ โดยเฉพาะในส่วนของระบบภูมิคุ้มกัน โดยจะมีหน้าที่ในการรับส่งสัญญาณ ควบคุมการทำงานของ gene expression และการจับตัวของเซลล์ (cell adhesion) มีรายงานถึงโปรตีนชนิดนี้ ว่ามีส่วนเกี่ยวข้องกับกระบวนการควบคุมสมดุล Ca^{2+} ในการตอบสนองต่อระบบภูมิคุ้มกันการเปลี่ยนแปลงและการสร้างเปลือก (Di et al., 2020) จากรายงานข้างต้นนี้ สามารถอธิบายได้ว่าเมื่อหอยนางรมถูกรบกวนจากการปนเปื้อนของสารดีดีที จะส่งผลให้มีการสร้างโปรตีนกลุ่มนี้เพิ่มขึ้น แสดงให้เห็นถึงการบาดเจ็บของเซลล์ (cellular injury) เมื่อหอยนางรมเกิดภาวะเครียดจากการได้รับสารดีดีทีที่ปนเปื้อนอยู่ในน้ำ อาจไปรบกวนการทำงานของกระบวนการควบคุมสมดุล Ca^{2+} ซึ่งหากระดับของแคลเซียมไอออนที่เข้าสู่เซลล์นั้นมีปริมาณที่สูงเกินกว่าที่กระบวนการขับแคลเซียมไอออนออกนอกเซลล์จะสามารถทำงานได้ แคลเซียมไอออนอิสระที่อยู่ภายในไซโตพลาสซึมจะกระตุ้นกระบวนการต่าง ๆ อันเป็นผลเสียต่อเซลล์ ดังนั้นหอยนางรมจึงมีการตอบสนองโดยการกระตุ้นการทำงานของระบบภูมิคุ้มกัน เพื่อกำจัดหรือทำลายสิ่งแปลกปลอมที่ร่างกายไม่ต้องการ

1.2 ยับยั้งการสร้างโปรตีนในกลุ่มที่เกี่ยวข้องกับกับภาวะเครียด 3 ชนิด ได้แก่ heat shock cognate 71 kDa protein (spot # 36), 78 kDa glucose-regulated protein (spot # 38) และ retinal dehydrogenase 1-like (spot # 39)

โปรตีนในกลุ่มนี้ทำหน้าที่สำคัญในการรักษาสภาพของโปรตีนในเซลล์ไม่ให้ถูกทำลายจากสภาวะความเป็นพิษจากสารเคมี เนื่องจากจะช่วยคืนสภาพและซ่อมแซมให้กับโปรตีนที่เกิดการเสียสภาพ เมื่อหอยนางรมถูกรบกวนจากสารดีดีทีจึงสามารถส่งผลต่อการยับยั้งทำงานของโปรตีนในกลุ่มนี้ ให้มีประสิทธิภาพในการทำงานที่ลดลงได้ งานวิจัยที่ทำการศึกษาโปรตีนที่พบในเนื้อเยื่อ

แมนเทิลของหอยนางรม European oyster (*O. edulis*) ที่ได้รับสารประกอบแคดเมียมคลอไรด์ พบการกระตุ้นการสร้างโปรตีนในกลุ่ม Hsp70 family (Piano, Valbonesi, & Fabbri, 2004) เช่นเดียวกับในหอยสองฝา *Ruditapes decussatus* มีรายงานพบว่าสารดีดีทีสามารถกระตุ้นการทำงานของโปรตีนในกลุ่ม heat shock (hsp; 60, 70 and 90 kDa) (Dowling et al., 2006) ในการศึกษาครั้งนี้พบว่าสารดีดีทีสามารถยับยั้งการสร้างโปรตีนในกลุ่ม heat shock ได้แก่ heat shock cognate 71 kDa protein ที่ลดลง อาจเป็นผลมาจากการที่เซลล์ต้องเผชิญกับสภาวะความเครียด อันเนื่องจากการได้รับสารเคมีจึงทำให้ประสิทธิภาพในการทำงานลดลง ซึ่งโปรตีนในกลุ่มนี้จะทำหน้าที่สำคัญในการรักษาสภาพของโปรตีนในเซลล์ไม่ให้ถูกทำลายและช่วยคืนสภาพให้กับโปรตีนที่เสียสภาพจากสภาวะความเป็นพิษที่ได้รับจากสารเคมี

1.3 มีผลรบกวนการสร้างโปรตีนแบบเพิ่มลดไม่คงที่ (fluctuated protein) 1 ชนิด ได้แก่ proteasome subunit beta type-5 isoform x1 (spot # 61)

2. cytoskeleton activity

พบว่า สารดีดีทีมีผลต่อปริมาณโปรตีนที่เกี่ยวข้องกับโครงสร้างของเซลล์ (cytoskeleton) เป็นกลุ่มรองลงมา ซึ่งสามารถระบุชนิดของโปรตีนในกลุ่มนี้ได้ทั้งหมด 10 spot ได้แก่

2.1 กระตุ้นการสร้างโปรตีนในกลุ่มที่เกี่ยวข้องกับโครงสร้างของเซลล์ 9 ชนิด ได้แก่ transgelin-3-like isoform x2 (spot # 5), actin, cytoplasmic 1-like (spot # 12), actin (spot # 58), alpha-tubulin (spot # 18), gelsolin-like protein 2 (spot # 21), transgelin-3-like isoform x2 (spot # 28), beta-actin (spot # 29), actin 2 (spot # 51) และ actin type 1, partial (spot # 53)

actin และ tubulin เป็นโปรตีนที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการสร้าง microtubule ซึ่งจำเป็นต่อการเคลื่อนย้ายของโครโมโซมในกระบวนการแบ่งเซลล์ การที่สารดีดีทีรบกวนสมดุลของโปรตีนโครงสร้างเหล่านี้จะส่งผลกระทบต่อโครงสร้างของเซลล์และเนื้อเยื่อได้ เนื่องจากโปรตีนในกลุ่มนี้เกี่ยวข้องกับการเคลื่อนไหวของร่างกายโดยตรง โดยพบว่ามีรายงานในสัตว์กลุ่มหอยสองฝามีรายงานว่าโปรตีนโครงสร้างจะถูกกระตุ้นเมื่อได้รับสัมผัสจากสารพิษจากสิ่งแวดล้อม เช่น หอยกาบ (*Chamaelea gallina*) ที่ได้รับ arsenic และ TBT (Rodríguez-Ortega, Grøsvik, RodríguezAriza, Goksøyr, & López-Barea, 2003) ทองแดง (Geret, Serafim, Barreira, & Bebianno, 2004) bisphenol-A (Apraiz et al., 2006) และแคดเมียม (Jo et al., 2008) ซึ่งผลการทดลองนี้สอดคล้องกับผลการศึกษาเนื้อเยื่อของหอยนางรมที่ได้รับสัมผัสกับสารดีดีที ส่งผลกระทบต่อเนื้อเยื่อทำให้โครงสร้างเนื้อเยื่อผิดปกติในทุกอวัยวะที่ทำการศึกษา กล่าวคือสารดีดีทีจะเข้าไปกระตุ้นให้เกิดการเพิ่มจำนวนของเซลล์ (hyperplasia) เมื่อสิ่งมีชีวิตได้รับสารเคมีที่ปนเปื้อนในสิ่งแวดล้อม

1.2 ยับยั้งการสร้างโปรตีนในกลุ่มที่เกี่ยวข้องกับโครงสร้างของเซลล์ 1 ชนิด ได้แก่ actin 2 (spot # 11)

หอยนางรมที่ได้รับสารดีดีทีพบความผิดปกติของโครงสร้างเซลล์ เนื่องมีการยับยั้งการสร้างโปรตีน actin 2 ซึ่งเป็นองค์ประกอบสำคัญของโครงร่างเซลล์ นอกจากนี้กิจกรรมการเคลื่อนที่ระดับเซลล์อาจลดลง ซึ่งโปรตีนดังกล่าวทำหน้าที่สำคัญในการเคลื่อนที่ระดับเซลล์ เช่น การเคลื่อนไหวของกล้ามเนื้อ เป็นต้น

แสดงให้เห็นว่าสารดีดีทีสามารถยับยั้งการสร้างโปรตีนในกลุ่มโครงสร้างของเซลล์หรือ cytoskeleton โดยพบโปรตีน actin 2 ถูกยับยั้งให้สร้างน้อยลง ซึ่งจะมีผลต่อการสร้างไมโครทิวบูล และส่งผลต่อโครงสร้างของเซลล์ เช่น ซิเลียหายไป นอกจากนี้ยังอาจส่งผลกระทบต่อกิจกรรมอื่น ๆ ที่เกี่ยวข้องกับการทำงานของ microtubule เคยมีรายงานการศึกษาผลกระทบของสารดีดีทีต่อโครงสร้างเหงือกของปลากระเบน (Dwivedi & Trombetta, 2006) และ หอยแมลงภู่ชนิด *Mytilus galloprovicialis* (Mici**ć**, Bihari, Labura, Müller, & Batel, 2001) แต่ยังไม่ทราบกลไกที่แน่ชัด งานวิจัยครั้งนี้เผยให้เห็นว่าสาเหตุที่โครงสร้างเหงือกถูกทำลาย เกิดจากการที่สารดีดีทีไปยับยั้งการสร้าง microtubule นั่นเอง

3. energy metabolism

3.1 สารดีดีทีกระตุ้นการสร้างโปรตีนที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการสร้างพลังงาน (energy metabolism) ซึ่งสามารถระบุชนิดโปรตีนได้ทั้งหมด 4 spot ได้แก่ fructose-bisphosphate aldolase (spot # 31), receptor of activated kinase c (spot # 35), NADH-ubiquinone oxidoreductase 75 kDa subunit, mt (spot # 43) และ enolase-like (spot # 63) ซึ่งโปรตีนที่พบในไมโทคอนเดรียส่วนใหญ่เป็นโปรตีนที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการสร้างพลังงาน ATP แสดงให้เห็นว่าหอยนางรมปากจีบมีความต้องการใช้พลังงานเป็นอย่างมาก ข้อมูลดังกล่าวนี้สอดคล้องกับผลการศึกษาอื่น ๆ ซึ่งอธิบายข้อมูลของแต่ละโปรตีนได้ดังนี้

- fructose-bisphosphate aldolase

เป็นโปรตีนที่เกี่ยวข้องกับการสลายโมเลกุลของน้ำตาลกลูโคสในกระบวนการไกโคไลซิส (glycolysis) ได้ออกมาเป็นพลังงานทั้งในรูป ATP และ NADH มีการศึกษาในเต่าแก้มแดง (*Trachemys scripta*) ที่มีภาวะขาดออกซิเจน (anoxia) พบว่ามีการกระตุ้นการสร้างโปรตีนดังกล่าวเพิ่มขึ้นเช่นกัน (Dawson, Biggar, & Storey, 2013)

- receptor of activated kinase c

เป็นโปรตีนตัวรับ (receptor protein) ที่ช่วยบ่งบอกว่าเซลล์มีความต้องการพลังงานเพิ่มมากขึ้นในการทำกิจกรรมต่าง ๆ ที่จำเป็นต่อการดำรงชีวิตและความอยู่รอด ตลอดจนการแบ่งตัว การเพิ่มจำนวน การพัฒนาไปทำหน้าที่เฉพาะ และการตายของเซลล์ เป็นต้น (Van Hoof et al., 2009) โดย kinase จะเป็นเอนไซม์ที่ช่วยย้ายหมู่ฟอสเฟตจากแหล่งพลังงานสูง เช่น ATP ไปให้ส่วนต่าง ๆ โดยเอนไซม์ PKC (protein kinase c) จะทำงานในสภาวะที่มีแคลเซียม โดยทำหน้าที่เติมหมู่ฟอสเฟตที่กรดอะมิโนซีรีนและทรีโอนีนให้กับโปรตีนเป้าหมาย จึงอาจเรียก PKC อีกชื่อหนึ่งว่า protein-serine/ threonine kinase (Newton, 1995) การแสดงออกที่เพิ่มขึ้นของโปรตีนชนิดนี้ในแมนเทิลเมื่อหอยนางรมปากจีบได้รับสัมผัสกับสารดีดีทีที่ระดับ 10 และ 100 ไมโครกรัมต่อลิตร เป็นระยะเวลา 96 ชั่วโมง บ่งบอกว่าเซลล์มีความต้องการพลังงานสูงมาก จึงมีการแสดงออกของโปรตีนที่เกี่ยวข้องกับการสร้างพลังงานออกมามากขึ้น การกระตุ้นให้เกิดการสร้างโปรตีน receptor of activated kinase c แสดงให้เห็นว่าเซลล์มีความต้องการในการใช้พลังงานมากขึ้น พลังงานที่สร้างขึ้นนี้อาจถูกนำมาใช้สำหรับรักษาเสถียรภาพของเซลล์ให้ปกติ ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยที่ทำการศึกษาในหอยนางรมตะวันออก (*C. virginica*) พบโปรตีน receptor of activated kinase c ถูกกระตุ้นให้มีการสร้างเพิ่มขึ้นในเมือกที่หลั่งออกมาจากพาเลียลออร์แกน ได้แก่ แมนเทิล เหงือก และเลเบียลพัลพ์ (Pales Espinosa, Koller, & Allam, 2016)

- enolase-like

เอนไซม์ enolase เป็นเอนไซม์ในกระบวนการ glycolysis ซึ่งจะเร่งปฏิกิริยา เปลี่ยนแปลง 2-phosphoglycerate เป็น phosphoenol pyruvate (PEP) เมื่อสิ่งมีชีวิตถูกรบกวนจากสารเคมีหรือสิ่งแวดล้อมภายนอก ทำให้กระบวนการ glycolysis ไม่สมบูรณ์ ส่งผลให้พลังงาน ATP ไม่เพียงพอต่อการดำรงชีวิต จากการศึกษาครั้งนี้ แสดงให้เห็นว่าหอยนางรมปากจีบมีความต้องการใช้พลังงานเป็นอย่างมาก ข้อมูลดังกล่าวสอดคล้องกับผลการศึกษาอื่น ๆ ซึ่งได้รายงานถึงการแสดงออกของโปรตีน enolase-like ที่เพิ่มขึ้นในหอยสองฝา ได้แก่ หอยแมลงภู่ *M. edulis* ที่ถูกเลี้ยงภายใต้สภาวะอุณหภูมิสูง (Péden et al., 2016) หอยนางรม *C. angulata* และ *C. gigas* ที่ปนเปื้อนสารหนู (arsenic) (Moreira et al., 2018) และในหอยนางรมปากจีบเช่นเดียวกันกับการศึกษาครั้งนี้ ที่ปนเปื้อนสารทีบีที พบว่ามีการกระตุ้นการสร้างโปรตีน enolase เพิ่มขึ้นเช่นเดียวกัน (Khondee et al., 2016)

- NADH-ubiquinone oxidoreductase 75 kDa subunit, mt

เป็นโปรตีนที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการหายใจระดับเซลล์ เพื่อผลิตพลังงาน ATP เนื่องจาก NADH เป็นสารที่มีพลังงานสูง มีสมบัติเป็นตัวให้อิเล็กตรอน (reducing agent) เข้าสู่กระบวนการถ่ายทอดอิเล็กตรอน เพื่อนำพลังงานที่อยู่ใน NADH มาใช้ในการสร้าง ATP ต่อไป

ดังนั้นการศึกษาครั้งนี้ที่พบการกระตุ้นให้สร้างโปรตีน NADH-ubiquinone oxidoreductase 75 kDa subunit, mt ในแมนเทิลของหอยนางรมปากจีบที่ได้รับสารดีดีที บ่งบอกว่าหอยนางรมปากจีบมีการใช้พลังงาน ATP จำนวนมาก และมีการผลิตพลังงานตลอดเวลา ซึ่งอาจเกี่ยวข้องกับกลไกการป้องกันตัว (defensive mechanism) เมื่อได้รับสิ่งแปลกปลอมเข้าสู่ร่างกาย สอดคล้องกับการศึกษาในเหงือกหอยนางรมแปซิฟิก (*C. gigas*) ที่ทำการทดสอบในสภาวะเครียดจากความร้อน ที่อุณหภูมิ 38 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง พบการกระตุ้นให้สร้างโปรตีน NADH-ubiquinone oxidoreductase 75 kDa subunit, mt เพิ่มขึ้น (Zhang et al., 2014) ซึ่งคาดว่าความต้องการในการสร้างพลังงานที่เพิ่มขึ้นมานี้ อาจเกี่ยวข้องกับกลไกการป้องกันตัวเอง เมื่อได้รับผลกระทบจากจากสภาวะแวดล้อมที่สัตว์อาศัยอยู่

3.2 สารดีดีทียับยั้งการสร้างโปรตีนที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการสร้างพลังงาน (energy metabolism) ซึ่งสามารถระบุชนิดโปรตีนได้ทั้งหมด 1 spot ได้แก่ glycine receptor subunit alpha-3 (spot # 33)

4. ion transport

สารดีดีทีกระตุ้นการสร้างโปรตีนที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการขนส่งไอออน (ion transport) ซึ่งสามารถระบุชนิดโปรตีนได้ทั้งหมด 1 spot ได้แก่ และ 16 kDa calcium-binding protein (spot # 52)

- 16 kDa calcium-binding protein

เป็นโปรตีนที่พบในไมโทคอนเดรีย สอดคล้องกับงานวิจัยนี้ที่พบว่าสารดีดีทีสามารถกระตุ้นการแสดงออกของโปรตีน 16 kDa calcium-binding protein ซึ่งจัดว่าเป็นโปรตีนกลุ่มที่มีความสำคัญต่อการรักษาสมดุลของ Ca^{2+} ภายในเซลล์ โดยทำหน้าที่จับกับแคลเซียมไอออน หากโปรตีน 16 kDa calcium-binding protein ถูกรบกวน อาจทำให้เสียสมดุลภายในเซลล์และทำให้เกิดการตายของเซลล์ได้ ในการศึกษาครั้งนี้ผู้วิจัยได้แสดงให้เห็นว่าหากโปรตีน 16 kDa calcium-binding protein เสียสมดุลก็จะส่งผลต่อการควบคุมการขนส่งไอออนของ Ca^{2+} ซึ่งมีความสำคัญต่อกระบวนการสร้างเปลือกของหอยนางรม เนื่องจากเปลือกหอยนางรมประกอบด้วยแคลเซียมคาร์บอเนตเคลือบปกคลุมไปบนเปลือกเดิม (Hamester et al., 2012) โดยอวัยวะที่ทำหน้าที่สร้างเปลือก ได้แก่ แมนเทิล สอดคล้องกับการศึกษาในหอยนางรมแปซิฟิก (*C. gigas*) พบว่า เมื่อหอยนางรมได้รับผลกระทบจากความเค็มของน้ำทะเล ส่งผลให้เกิดกากระตุ้นการสร้าง 16 kDa calcium-binding protein (Zhao, Yu, Kong, & Li, 2012) แสดงถึงการถูกรบกวนจากสภาวะแวดล้อมภายนอกทำให้หอยแสดงกลไกการควบคุมแคลเซียมไอออน ซึ่งส่งผลกระทบต่อกระบวนการสร้างเปลือกของหอยนางรมโดยตรง

5. โปรตีนกลุ่มอื่น ๆ (others)

นอกจากนี้ยังพบว่าสารดีดีทีกระตุ้นการสร้างโปรตีนที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการอื่น ๆ ซึ่งสามารถระบุชนิดโปรตีนได้ทั้งหมด 2 spot ได้แก่ uncharacterized protein LOC111108402 (spot # 26) และ uncharacterized protein LOC105336555 (spot # 56)

5.1.6 การหาตัวชี้วัดชีวภาพระดับโปรตีนเพื่อใช้เป็นตัวบ่งชี้การปนเปื้อนของสารดีดีที (protein biomarker of DDT exposure) ในหอยนางรมปากจีบ

ผลการศึกษาในครั้งนี้แสดงให้เห็นว่ามีโปรตีนที่น่าสนใจและมีแนวโน้มที่ดีสำหรับนำมาใช้เป็น potential biomarker เพื่อตรวจสอบการปนเปื้อนของสารดีดีทีในสิ่งแวดล้อม โดยใช้หอยนางรมปากจีบ ซึ่งจะต้องเป็นโปรตีนที่มีปริมาณเปลี่ยนแปลงไปเมื่อหอยนางรมได้รับสารดีดีที และควรมีความจำเพาะต่อชนิดของสารที่ทดสอบ จากผลการศึกษาในครั้งนี้ผู้วิจัยเสนอให้เลือกโปรตีนที่มีแนวโน้มที่ดีสำหรับใช้เป็น potential biomarker โดยใช้หลักเกณฑ์การพิจารณาคือ โปรตีนดังกล่าวมีการเปลี่ยนแปลงปริมาณโปรตีน (fold change) มากที่สุดระหว่างในกลุ่มทดสอบสารดีดีที (ที่ระดับความเข้มข้น 10 และ 100 ไมโครกรัมต่อลิตร) เทียบกับกลุ่มควบคุม โดยเลือกจากตัวแทนในแต่ละกลุ่มโปรตีน ซึ่งพบว่าโปรตีนที่มีแนวโน้มที่ดี 5 ชนิดที่มีความเหมาะสมสำหรับใช้เป็น potential biomarker เพื่อตรวจสอบการปนเปื้อนของสารดีดีทีในสิ่งแวดล้อม ดังนี้

กลุ่มที่ 1 โปรตีนที่มีการแสดงออกแปรผันตามความเข้มข้นของสารดีดีที (Dose-dependent up-regulated protein) หมายถึงโปรตีนกลุ่มที่ถูกกระตุ้นให้สร้างเพิ่มขึ้นในหอยนางรมที่ได้รับสัมผัสกับสารดีดีทีที่มีระดับความเข้มข้นสูงขึ้น โปรตีนในกลุ่มนี้มีจำนวน 3 ชนิด ได้แก่ actin 2 (spot # 51), universal stress protein PHOS32-like (spot # 3) และ 16 kDa calcium-binding protein (spot # 52)

กลุ่มที่ 2 โปรตีนที่มีการแสดงออกแปรผกผันตามความเข้มข้นของสารดีดีที (Dose-dependent down-regulated protein) หมายถึงโปรตีนกลุ่มที่มีการสร้างลดลงในหอยนางรมที่ได้รับสัมผัสกับสารดีดีทีที่มีระดับความเข้มข้นสูงขึ้น โปรตีนในกลุ่มนี้มีจำนวน 2 ชนิด ได้แก่ glycine receptor subunit alpha-3 (spot # 33) และ heat shock cognate 71 kDa protein (spot #36)

ส่วนโปรตีนในกลุ่ม fluctuated protein นั้นไม่ควรใช้เป็น protein biomarker เนื่องจากมีความแปรปรวนต่อปริมาณสารทดสอบ

5.2 สรุปผลการศึกษา

1. สารดีดีทีส่งผลกระทบต่อพัฒนาการของตัวอ่อนหอยนางรมปากจีบ ในระยะ gastrula ระยะ trochophore และ ระยะ D-shape veliger พบการเจริญผิดรูปและมีพัฒนาการช้าลง แม้ว่าจะได้รับความเข้มข้นเพียง 0.25 ไมโครกรัมต่อลิตร โดยความรุนแรงของผลกระทบจะแปรผันตามระยะเวลาและความเข้มข้นของสารทดสอบ

2. แม้ว่าปริมาณสารดีดีทีที่ตรวจพบในน้ำบริเวณทะเลชายฝั่งทะเลภาคตะวันออก จังหวัดชลบุรี จะมีรายงานการปนเปื้อนในน้ำค่อนข้างต่ำ คือ 0.04 ไมโครกรัมต่อลิตร แต่สารดังกล่าวเป็นสารที่มีความเป็นพิษสูงต่อสัตว์น้ำ โดยพิจารณาจากค่าความเข้มข้นที่ทำให้เกิดพิษเฉียบพลันต่อสัตว์น้ำที่ค่อนข้างต่ำมาก โดยเฉพาะการทดสอบในหอยสองฝา หอยกาบเปลือกหนา (M. mercenaria) พบค่า LC50 เท่ากับ 610 ไมโครกรัมต่อลิตร เมื่อทดสอบเป็นระยะเวลา 24 ชั่วโมง (Cohn et al., 2007) และจากการศึกษานี้ พบว่าสารดีดีทีทำให้หอยนางรมปากจีบในกลุ่มทดสอบตาย และมีค่า LC50 เท่ากับ 891.25 ไมโครกรัมต่อลิตร เมื่อทดสอบเป็นระยะเวลา 96 ชั่วโมง จึงควรจะมีการติดตามตรวจสอบต่อไป เนื่องจากความเข้มข้นดังกล่าวอาจส่งผลกระทบต่อสุขภาพประชากรของหอยนางรมปากจีบรวมถึงสัตว์น้ำชนิดอื่น ซึ่งในระยะยาวอาจส่งผลต่อโครงสร้างของประชากรได้

3. ผลการศึกษาในระดับเนื้อเยื่อพบว่าสารดีดีทีกระตุ้นกลไกการป้องกันระดับเซลล์ เช่น พบว่ามีการสร้างเซลล์สร้างเมือกเพิ่มขึ้นในเนื้อเยื่อแมนเทิลและเหงือก พบการรวมกลุ่มของเซลล์เม็ดเลือดซึ่งแสดงถึงการอักเสบภายในเนื้อเยื่อ และส่งผลต่อเยื่อบุผิวภายในต่อมย่อยอาหาร ในกลุ่มทดสอบที่ได้รับสัมผัสสารดีดีทีที่ระดับความเข้มข้น 10 และ 100 ไมโครกรัมต่อลิตร

4. สารดีดีทีส่งผลกระทบต่อโปรตีนที่เกี่ยวข้องกับความเครียด โปรตีนโครงสร้าง โปรตีนในกระบวนการสร้างพลังงาน โปรตีนที่เกี่ยวข้องกับการขนส่งไอออน และโปรตีนกลุ่มอื่น ๆ

5. โปรตีนที่มีแนวโน้มที่ดีสำหรับใช้เป็นตัวบ่งชี้การปนเปื้อนของสารดีดีที โดยเลือกจากตัวแทนในแต่ละกลุ่มโปรตีน ซึ่งพบว่าโปรตีนที่มีแนวโน้มที่ดี 5 ชนิด ที่มีความเหมาะสมสำหรับใช้เป็น potential biomarker เพื่อตรวจสอบการปนเปื้อนของสารดีดีทีในสิ่งแวดล้อม ดังนี้

กลุ่มที่ 1 โปรตีนกลุ่มที่ถูกกระตุ้นให้สร้างเพิ่มขึ้นในหอยนางรมที่ได้รับสัมผัสกับสารดีดีทีที่มีระดับความเข้มข้นสูงขึ้น โปรตีนในกลุ่มนี้มีจำนวน 3 ชนิด ได้แก่ actin 2, universal stress protein PHOS32-like และ 16 kDa calcium-binding protein

กลุ่มที่ 2 โปรตีนกลุ่มที่มีการสร้างลดลงในหอยนางรมที่ได้รับสัมผัสกับสารดีดีทีที่มีระดับความเข้มข้นสูงขึ้น โปรตีนในกลุ่มนี้มีจำนวน 2 ชนิด ได้แก่ glycine receptor subunit alpha-3 และ heat shock cognate 71 kDa protein

บรรณานุกรม

กรมควบคุมมลพิษ. (2563). *การจัดการสารมลพิษที่ตกค้างยาวนานในโลกตามแนวทางของอนุสัญญาสตอกโฮล์มว่าด้วยสารมลพิษที่ตกค้างยาวนาน*. กรุงเทพฯ: กระทรวงทรัพยากรธรรมชาติและสิ่งแวดล้อม.

กรมวิชาการเกษตร. (2553). *วัตถุอันตรายทางการเกษตร*. กรุงเทพฯ: กระทรวงทรัพยากรธรรมชาติและสิ่งแวดล้อม.

กรมวิชาการเกษตร. (2559). *การนำเข้าสารเคมีป้องกันกำจัดศัตรูพืช*. กรุงเทพฯ: กระทรวงทรัพยากรธรรมชาติและสิ่งแวดล้อม.

กรมอนามัย. (2554). *รายงาน สถานการณ์สารเคมีปนเปื้อนในอาหาร ปี 255-2554*. กรุงเทพฯ: กระทรวงสาธารณสุข.

กรรณิการ์ ดิษยวงศ์. (2522). *การศึกษาปริมาณตกค้างของวัตถุมีพิษที่ใช้ในการป้องกันและกำจัดศัตรูพืชในบริเวณโครงการชลประทานป่าสักใต้*. วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต, สาขาวิชาวิทยาศาสตร์ทางทะเล, คณะวิทยาศาสตร์, จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.

ก่องกนก เมนะรุจิ. (2536). *สารฆ่าแมลงกลุ่มออร์กาโนคลอรีนในน้ำในบริเวณลุ่มน้ำย่อยของภาคตะวันออกในจังหวัดชลบุรีระยองและจันทบุรี*. วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต, สาขาวิชาวิทยาศาสตร์สิ่งแวดล้อม, คณะวิทยาศาสตร์, มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

กองควบคุมโรคพืชและวัสดุการเกษตร. (2558). *ชนิดของสารเคมีในกลุ่ม Organochlorine ที่ห้ามนำเข้ามาใช้ทางการเกษตรในประเทศไทย*. เข้าถึงได้จาก http://www.oae.go.th

กิตติวดี ดวงแก้ว. (2546). *สารตกค้างกลุ่มออร์กาโนคลอรีน พีซีบี และพีเอเอช ในหอยทะเลและดินตะกอนบริเวณชายฝั่งทะเลภาคตะวันออกของประเทศไทย*. วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต, สาขาวิชาวิทยาศาสตร์สิ่งแวดล้อม, คณะวิทยาศาสตร์, มหาวิทยาลัยบูรพา.

คเชนทร เฉลิมวัฒน์. (2540). *การเพาะเลี้ยงหอย = mollusk aquaculture*. ชลบุรี: มหาวิทยาลัยบูรพา.

ชลีรัตน์ พยอมแย้ม. (2519). *การศึกษาการกระจายของ ดีดีที และ พีซีบี ในบริเวณแม่น้ำเจ้าพระยาตอนล่าง*. วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต, สาขาวิชาวิทยาศาสตร์ทางทะเล, คณะวิทยาศาสตร์, จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.

นวลศรี ทยาพัชร. (2533). *ปัญหาสารพิษทางการเกษตรในประเทศไทย*. กรุงเทพฯ:สำนักหอสมุด มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

นวลศรี ทยาพัชร, เสริม สีมา, สาวิตร วรรณพิณ และประยูร ดีมา. (2517). การศึกษาและวิจัยวัตถุมีพิษตกค้างในสิ่งแวดล้อม. ใน *เอกสารประกอบการประชุมวิชาการเกษตรศาสตร์และชีววิทยาแห่งชาติ ครั้งที่ 13 ณ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ 4-6 กุมภาพันธ์ 2517* (หน้า 294-302). กรุงเทพฯ: มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ สำนักหอสมุด.

ปิยะวรรณ ศรีวิลาศ. (2545). *รูปแบบการสะสมตัวของสารกำจัดพืชและสัตว์กลุ่มออร์กาโนคลอรีนในหอยแมลงภู่ บริเวณอ่างศิลา จังหวัดชลบุรี*. ชลบุรี: มหาวิทยาลัยบูรพา.

ปิยะวรรณ ศรีวิลาศ และกานดา ใจดี. (2547). *การปนเปื้อนของสารฆ่าแมลงกลุ่มออร์กาโนคลอรีนในดินตะกอนบริเวณชายฝั่งทะเลภาคตะวันออก*. ชลบุรี: สถาบันวิทยาศาสตร์ทางทะเล. มหาวิทยาลัยบูรพา.

ปิยะวรรณ ศรีวิลาศ และสุวรรณา ภาณุตระกูล. (2546). รูปแบบการสะสมตัวของสารกำจัดศัตรูพืชและสัตว์กลุ่มออร์กาโนคลอรีนในหอยแมลงภู่ บริเวณอ่างศิลา จังหวัดชลบุรี. ใน *การประชุมวิชาการทรัพยากรและสิ่งแวดล้อมทางน้ำ "การจัดการมลภาวะชายฝั่งทะเลแบบบูรณาการ"*. กรุงเทพฯ: กรมควบคุมมลพิษ กระทรวงทรัพยากรธรรมชาติและสิ่งแวดล้อม.

มณเฑียร ส่งเสริม, มณจันทร์ เมฆธน และมุกดา อุตรพงศ์. (2540). การศึกษาพิษตกค้างของสารฆ่าแมลงกลุ่มออร์กาโนคลอรีนในแม่น้ำแม่กลอง. ใน *เอกสารประกอบการประชุมวิชาการครั้งที่ 35 สาขาประมง วิทยาศาสตร์ วิศวกรรมศาสตร์ การจัดการทรัพยากรและสิ่งแวดล้อม คหกรรมศาสตร์ ศึกษาศาสตร์ และเศรษฐศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ เมื่อวันที่ 3-5 กุมภาพันธ์ พ.ศ.2540* (หน้า 559-566). กรุงเทพฯ: *บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์*.

วิภา พรพิพัฒน์. (2522). การศึกษาสารมีพิษตกค้างในปลา, น้ำ และดินตะกอน บริเวณอ่างเก็บน้ำเขื่อนอุบลรัตน์. ใน *การประชุมวิชาการและเสนอผลงานวิจัย ระดับชาติ "สาขาสัตว์ (หมวดประมง) ครั้งที่ 19" เมื่อวันที่ 3-5 กุมภาพันธ์ พ.ศ.2524* (หน้า 7-8). กรุงเทพฯ: มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

วิสุทธิ์ พรมเล็ก. (2552). *ศึกษาคุณภาพน้ำในแหล่งเลี้ยงหอยนางรม บริเวณอ่าวบ้านดอน จังหวัดสุราษฎร์ธานี*. วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตรบัณฑิต, สาขาวิชาการประมง, คณะเทคโนโลยีการประมงและทรัพยากรทางน้ำ, มหาวิทยาลัยแม่โจ้.

สถาบันวิจัยทรัพยากรทางน้ำ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย. (2546). *คู่มือการเพาะและอนุบาลหอยนางรมสำหรับการเลี้ยง*. กรุงเทพฯ: สถาบันวิจัยทรัพยากรทางน้ำ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.

สำนักคณะกรรมการอาหารและยา. (2550). *ผลิตภัณฑ์วัตถุอันตรายที่ใช้ในบ้านเรือนหรือทางสาธารณสุข*. กรุงเทพฯ: สำนักคณะกรรมการอาหารและยา.

สำนักงานสถิติจังหวัดจันทบุรี. (2554). *รายงานวิเคราะห์สถานการณ์กลุ่มจังหวัดภาคตะวันออก*. เข้าถึงได้จาก http://osthailand.nic.go.th

สุชาติ อุปถัมภ์, มาลียา เครือตาชู, เยาวลักษณ์ จิตรามวงศ์ และศิริวรรณ์ จัณฑเตมีย์. (2538). *สังขวิทยา*. กรุงเทพฯ: โรงพิมพ์ศักดิโสภาการพิมพ์.

สุธาสินี อั้งสูงเนิน. (2558). ผลกระทบต่อสิ่งแวดล้อมจากการใช้สารเคมีกำจัดศัตรูพืช. *วารสารวิชาการ มหาวิทยาลัยอีสเทิร์นเอเชีย ฉบับวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี*, *9*(1), 50–63.

สุภาณี พิมพ์สมาน. (2537). *สารฆ่าแมลง*. กรุงเทพฯ: มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

Abdallah, M. A. M. (2016). Endocrine Disruptors as Pollutants in Marine Ecosystem: A Case Study in Egypt. *The Open Biotechnology Journal*, *10*(11), 131–150. https://doi.org/10.2174/1874070701610010131

Adibhatla, R. M., & Hatcher, J. F. (2007). Role of lipids in brain injury and diseases. *Future Lipidology, 2*(4)*,* 403–422. https://doi.org/10.2217/17460875.2.4.403

Akira, K. (2009). Non-reductional Spermatozoa in Three Shell Color Types of the Freshwater Clam Corbicula fluminea in Taiwan. *Zoological Science*, *16*, 105–108. https://doi.org/10.2108/zsj.16.105.

Alawi, M. A., Ammari, N., & al-Shuraiki, Y. (1992). Organochlorine pesticide contaminations in human milk samples from women living in Amman, Jordan. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, *23*(2), 235–239. https://doi.org/10.1007/BF00212281

Amaral, V., & Simone, L. (2016). Comparative anatomy of five species of *Saccostrea* Dollfus and Dautzenberg, 1920 (Bivalvia: Ostreidae) from the Pacific Ocean. *Amaral&Simone*, *130*(2), 53–71.

Anand, M., Agrawal, A. K., Rehmani, B. N. H., Gupta, G. S. D., Rana, M. D., & Seth, P. K. (1998). Role of Gaba Receptor Complex in Low Dose Lindane (HCH) Induced Neurotoxicity: Neurobehavioural, Neurochemical and Electrophysiological Studies. *Drug and Chemical Toxicology*, *21*(1), 35–46. https://doi.org/10.3109/01480549809017849

Anderson, N. L., & Anderson, N. G. (1998). Proteome and proteomics: new technologies, new concepts, and new words. *Electrophoresis*, *19*, 1853–1861. https://doi.org/10.1002/elps.1150191103

Apraiz, I., Mi, J., & Cristobal, S. (2006). Identification of proteomic signatures of exposure to marine pollutants in mussels (*Mytilus edulis*). *Molecular & Cellular Proteomics*, *5*, 1274–1285. https://doi.org/10.1074/mcp.M500333-MCP200

ATSDR. (2002). *Toxicological Profile for DDT, DDE, and DDD*. US Agency for Toxic Substances and Disease Registry. Retrieved from https://www.atsdr.cdc.gov/toxprofiles/tp35.pdf

ATSDR. (2019). *Toxicological profile for endrin*. US Agency for Toxic Substances and Disease Registry. Retrieved from http://www.atsdr.cdc.gov/ToxProfiles/tp89.pdf

Audino, J. A., Marian, J. E. A. R., Wanninger, A., & Lopes, S. G. B. C. (2015). Mantle margin morphogenesis in *Nodipecten nodosus* (Mollusca: Bivalvia): new insights into the development and the roles of bivalve pallial folds. *BMC Developmental Biology*, *15*(1). https://doi.org/10.1186/s12861-015-0074-9

Axelsson, J. (2008). *Differentiation of Brain and Reproductive Organs in Birds: Effects of Environmental Contaminants.* Doctoral dissertation, Philosophy in Biology, Acta University of Upsaliensis. Retrieved from http://urn.kb.se/resolve?urn=urn:nbn:se:uu:diva-8592

Bello-Olusoji, O. A., & Adebola, B. A. (2006). Toxic-effect of Aldrin and Copper Sulphate on Freshwater Prawn - *Caridina africana*. *Journal* of *Fisheries International*, *1*, 12–16.

Berthelin, C., Kellner, K., & Mathieu, M. (2000). Storage metabolism in the Pacific oyster *(Crassostrea gigas)* in relation to summer mortalities and reproductive cycle (West Coast of France). *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology*, *125*(3), 359–369. https://doi.org/10.1016/s0305-0491(99)00187-x

Bettinetti, R., Croce, V., Galassi, S., & Volta, P. (2005). pp´DDT and pp´DDE Accumulation in a Food Chain of Lake Maggiore (Northern Italy): Testing Steady-State Condition. *Environmental Science and Pollution Research - International*, *13*(1), 59–66. https://doi.org/10.1065/espr2006.01.010

Bharti, S., Barman, S., & Kumar, N. (2020). Organochlorine Pesticides (OCPs) in Atmospheric Particulate Matter: Sources and Effects. *Environmental Concerns and Sustainable Development*, 97–111. https://doi.org/10.1007/978-981-13-5889-0_4

Bhuiyan, N., Bhuiyan, H., Nath, K., Ahmed, K., Hassan, M., & Mohammad, B. (2009). Organochlorine Insecticides (DDT And Heptachlor) In dry fish available in Bangladesh: seasonal trends and species variability. *Journal of The Chilean Chemical Society*, *54*(1), 278–281. https://doi.org/10.4067/S0717-97072009000300016

Biales, A. D., Bencic, D. C., Flick, R. L., Blocksom, K. A., Lazorchak, J. M., & Lattier, D. L. (2011). Proteomic analysis of a model fish species exposed to individual pesticides and a binary mixture. *Aquatic Toxicology, 101*(1), 196–206. https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2010.09.019

Bitman, J., & Cecil, H.C. (1970). Estrogenic activity of DDT analogs and polychlorinated biphenyls. *Agricultural and Food Chemistry*, *18*(6), 1108–1112. https://doi.org/10.1021/jf60172a019

Bliss, T.K., & Walker, R. (2012). *Reducing the Minimal-Legal Harvest Size of Oysters in Georgia*. Athens: University of Georgia - Public Service and Outreach.

Bloomquist, J. R. (1994). Cyclodiene resistance at the insect GABA receptor/chloride channel complex confers broad cross resistance to convulsants and experimental phenylpyrazole insecticides. *Archives of Insect Biochemistry and Physiology*, *26*(1), 69–79. https://doi.org/10.1002/arch.940260106

Boonyatumanond, R., Wattayakorn, G., Togo, A., & Takada, H. (2006). Distribution and origins of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) in riverine, estuarine, and marine sediments in Thailand. *Marine Pollution Bulletin*, *52*, 942–956. https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2005.12.015

Burge, C. A., Closek, C. J., Friedman, C. S., Groner, M. L., Jenkins, C. M., Shore-Maggio, A., & Welsh, J. E. (2016). The Use of Filter-feeders to Manage Disease in a Changing World. *Integrative and Comparative Biology*, *56*(4), 573–587. https://doi.org/10.1093/icb/icw048

Cannuel, R., & Beninger, P. G. (2006). Gill development, functional and evolutionary implications in the Pacific oyster *Crassostrea gigas* (Bivalvia: Ostreidae). *Marine Biology*, *149*(3), 547–563. https://doi.org/10.1007/s00227-005-0228-6

Capkin, E., Altinok, I., & Karahan, S. (2006). Water quality and fish size affect toxicity of endosulfan, an organochlorine pesticide, to rainbow trout. *Chemosphere*, *64*(10),

1793–1800.

Cárdenas, E. R. B., Erick, A. D. A., & Espinosa, R. (2007). Variations in the reproductive cycle of the oyster *Crassostrea virginica* (Gmelin, 1791), Pueblo Viejo lagoon, Veracruz, Mexico. *Transitional Waters Bulletin*, *2*, 37–46. https://doi.org/10.1285/i1825229Xv1n2p37

Chaklader, M., Das, P., Pereira, J. A., Chaudhuri, S., & Law, S. (2012). Altered canonical hedgehog-gli signalling axis in pesticide-induced bone marrow aplasia mouse model. *Archives of Industrial Hygiene and Toxicology*, *63*(3), 271–282. https://doi.org/10.2478/10004-1254-63-2012-2255

Chaparro, O. R., Videla, J. A., & Thompson, R. J. (2001). Gill morphogenesis in the oyster *Ostrea chilensis*. *Marine Biology*, *138*(1), 199–207. https://doi.org/10.1007/s002270000447

Cheevaporn, V., Duangkaew, K., & Tangkrock-Olan, N. (2005). Environmental Occurrence of Organochlorines in the East Coast of Thailand. *Journal of Health Science*, *51*(1), 80–88. https://doi.org/10.1248/jhs.51.80

Chen, W., Jing, M., Bu, J., Ellis Burnet, J., Qi, S., Song, Q., Ke, Y., Miao, J., Liu, M., & Yang, C. (2010). Organochlorine pesticides in the surface water and sediments from the Peacock River Drainage Basin in Xinjiang, China: a study of an arid zone in Central Asia. *Environmental Monitoring and Assessment*, *177*(1-4), 1–21. https://doi.org/10.1007/s10661-010-1613-2

Christo, S., Absher, T. M., & Boehs, G. (2010). Morphology of the larval shell of three oyster species of the genus *Crassostrea* Sacco, 1897 (Bivalvia: Ostreidae). *Brazilian journal of biology*, *70*, 645–50. https://doi.org/10.1590/S1519-69842010000300023

Cohn, B. A., Wolff, M. S., Cirillo, P. M., & Sholtz, R. I. (2007). DDT and breast cancer in young women: new data on the significance of age at exposure. *Environmental Health Perspectives*, *115*(10), 1406–1414. https://doi.org/10.1289/ehp.10260

Cronin, M., Myers, A., & O'Riordan, R. (2000). The reproductive cycle of the intertidal gastropod *Melarhaphe neritoides* on the west and south coasts of Ireland. In *Proceedings of the Royal*

Irish Academy. Section B. Biological, geological and chemical science (pp. 97-106). Dublin: Royal Irish Academy.

Dawson, N. J., Biggar, K. K., & Storey, K. B. (2013). Characterization of Fructose-1,6-Bisphosphate Aldolase during Anoxia in the Tolerant Turtle, *Trachemys scripta elegans*: An Assessment of Enzyme Activity, Expression and Structure. *PLoS ONE*, *8*(7), e68830. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0068830

Dearth, M. A., & Hites, R. A. (1991). Complete analysis of technical chlordane using negative ionization mass spectrometry. *Environmental Science and Technology*, *25*(2), 245–254. https://doi.org/10.1021/es00014a005

Deguchi, R., & Osanai, K. (1994a). Repetitive intracellular Ca^{2+} increases at fertilization and the role of Ca^{2+} in meiosis reinitiation from the first metaphase in oocytes of marine bivalves. *Developmental biology*, *163*(1), 162–174. https://doi.org/10.1006/dbio.1994.1132

Deguchi, R., & Osanai, K. (1994b). Meiosis Reinitiation from the First Prophase Is Dependent on the Levels of Intracellular Ca2+ and pH in Oocytes of the Bivalves Mactra chinensis and Limaria hakodatensis. *Developmental Biology*, *166*(2), 587–599. https://doi.org/10.1006/dbio.1994.1339

Deno, T. (1998). Autonomous fluorescence localized at the polar lobe of eggs of Japanese oyster, *Crassostrea gigas*. *Natural Sciences*, *46*, 195–207.

Desrosiers, R. R., Désilets, J., & Dubé, F. (1996). Early developmental events following fertilization in the giant scallop *(Placopecten magellanicus). Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, *53*(6), 1382–1392. https://doi.org/10.1139/f96-071

Di, G., Xiao, X., Tong, M.H., Chen, X., Li, L., Huang, M., Zhou, L., & Ke, C. (2020). Proteome of larval metamorphosis induced by epinephrine in the Fujian oyster *Crassostrea angulata*. *BMC Genomics*, *21*, 675. https://doi.org/10.1186/s12864-020-07066-z

Dorresteijn, A. W. C. (1990). Quantitative analysis of cellular differentiation during early embryogenesis of *Platynereis dumerilii. Roux's Archives of Developmental Biology*, *199*, 14–30.

Dowling, V., Hoarau, P. C., Halloran, J. O., Pelt, F. Van, Brien, N. O., & Sheehan, D. (2006). Protein carbonylation and heat shock response in *Ruditapes decussatus* following p, p-

dichlorodiphenyldichloroethylene (DDE) exposure: A proteomic approach reveals that DDE causes oxidative stress. *Aquatic Toxicology*, *77*, 11–18. https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2005.10.011

Díaz, M., Pouvreau, S., Chávez-Villalba, J., & Le Pennec, M. (2009). Gametogenesis, reproductive investment, and spawning behavior of the Pacific giant oyster *Crassostrea gigas*: evidence of an environment-dependent strategy. *Aquaculture International*, *17*(5), 491–506. https://doi.org/10.1007/s10499-008-9219-1

Dwivedi, J., & Trombetta, L. (2006). Acute toxicity and bioaccumulation of Tributyltin in tissues of *Urolophus jamaicensis* (Yellow Stingray). *Journal of toxicology and environmental health. Part A*, *69*, 1311–1323. https://doi.org/110.1080/15287390500356800

Earnest, R. D., & Benville, P. E. (1971). Correlation of DDT and lipid levels for certain San Francisco Bay fish. *Pesticides monitoring journal*, *5*(3), 235–241.

Edwards, J.G. (2004). DDT: A Case Study in Scientific Fraud. *Journal of American Physicians and Surgeons*, *9*(3), 83–88.

Elwood, F., H., William, E. D., & James W. M. (1971). DDT intoxication in birds: Subchronic effects and brain residues. *Toxicology and Applied Pharmacology*, *20*(4), 502–514. https://doi.org/10.1016/0041-008x(71)90254-7

Egge, J. K., & Aksnes, D. (1992). Silicate as Regulating Nutrient in Phytoplankton Competition. *Marine Ecology-Progress Series*, *83*, 281–289. https://doi.org/10.3354/meps083281

Ehrich, M. K., & Harris, L. A. (2015). A review of existing eastern oyster filtration rate models. *Ecological Modelling*, *297*, 201–212. https://doi.org/10.1016/j.ecolmodel.2014.11.023

Enriquez, R., Frösner, G. G., Hochstein-Mintzel, V., Riedemann, S., & Reinhardt, G. (1992). Accumulation and persistence of hepatitis A virus in mussels. *Journal of Medical Virology*, *37*(3), 174–179. https://doi.org/10.1002/jmv.1890370305

Eyckmans, M., Benoot, D., Van Raemdonck, G. A. A., Zegels, G., Van Ostade, X. W. M., Witters, E., Blust, R., & De Boeck, G. (2012). Comparative proteomics of copper exposure and toxicity in rainbow trout, common carp and gibel carp. *Comparative Biochemistry and Physiology Part D: Genomics and Proteomics*, *7*(2), 220–232.

https://doi.org/10.1016/j.cbd.2012.03.001

Feachem, R. G. A., & Sabot, O. J. (2007). Global Malaria Control in the 21st Century. *Journal of the American Medical Association*, *297*(20), 2281–2284. https://doi.org/10.1001/jama.297.20.2281

Fernández-Boo, S., Gervais, O., Prado-Alvarez, M., Chollet, B., Claverol, S., Lecadet, C., Dubreuil, C., & Arzul, I. (2019). Is pallial mucus involved in *Ostrea edulis* defenses against the parasite *Bonamia ostreae*?. *Journal of Invertebrate Pathology*, *169*, 107259. https://doi.org/10.1016/j.jip.2019.107259

Fernández, M. A., Alonso, C., González, M. J., & Hernández, L. M. (1999). Occurrence of organochlorine insecticides, PCBs and PCB congeners in waters and sediments of the Ebro River (Spain). *Chemosphere*, *38*(1), 33–43. https://doi.org/10.1016/s0045-6535(98)00167-2

Ferreira, A., Cortesao, C., Castro, O., & Vale, C. (1990). Accumulation of metals and organochlorines in tissues of the oyster *Crassostrea angulata* from the Sado Estuary, Portugal. *Science of The Total Environment*, *97*(98), 627–639. https://doi.org/10.1016/0048-9697(90)90266-w

Flodin, U., Fredriksson, M., Persson, B., & Axelson, O. (1988). Chronic lymphatic leukaemia and engine exhausts, fresh wood, and DDT: a case-referent study. *Occupational and Environmental Medicine*, *45*(1), 33–38. https://doi.org/10.1136/oem.45.1.33

Food and Agriculture Organization (FAO). (2010). *International Code of Conduct on the Distribution and Use of Pesticides: Guidelines for the Registration of Pesticides*. Retrieved from http://www.who.int/whopes/resources/resources_2010/en/

Fukazawa, H., Kawamura, T., Takami, H., & Watanabe, Y. (2007). Oogenesis and relevant changes in egg quality of abalone *Haliotis discus* during a single spawning season. *Aquaculture*, *270*, 265–275. https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2007.03.015

Gadsden, R. H. (1977). Some Effects of Dieldrin and Mirex on Ehrlich Ascites Tumor Cells in Vivo and in Vitro. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, *5*, 333–341.

Galtsoff, P.S. (1964). *The American oyster Crassostrea virginica Gmelin*. Washington, D.C.: United States Government Printing Office.

Gan, J. L., Jia, X. P., Jia, T., Lin, Q., & Cai, W. G. (2009). Distribution and change of DDT and HCH levels in oysters (*Crassostrea rivularis*) from coast of Guangdong, China between 2003 and 2007. *Journal of Environmental Science and Health, Part B*, *44*(8), 817–822. https://doi.org/10.1080/03601230903238657

Gandar, A., Laffaille, P., Marty-Gasset, N., Viala, D., Molette, C., & Jean, S. (2017). Proteome response of fish under multiple stress exposure: Effects of pesticide mixtures and temperature increase. *Aquatic Toxicology*, *184,* 61–77. https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2017.01.004

Geret, F., Serafim, A., Barreira, L., & Bebianno, M.J. (2004). Response of antioxidant systems to copper in the gills of the clam *Ruditapes decussatus*. *Marine Environmental Research*, *54*(3–5), 413–417. https://doi.org/10.1016/S0141-1136(02)00164-2

Geyer, H. J., Steinberg, C. E., Scheunert, I., Brüggemann, R., Schütz, W., Kettrup, A., & Rozman, K. (1993). A review of the relationship between acute toxicity (LC50) of γ-hexachlorocyclohexane (γ-HCH, Lindane) and total lipid content of different fish species. *Toxicology*, *83*(1-3), 169–179. https://doi.org/10.1016/0300-483x(93)90100-7

Goldberg, E.D. (1986). The Mussel Watch concept. *Environmental Monitoring and Assessment*, *7*, 91–103. https://doi.org/10.1007/BF00398031

Goldberg, L. G., Keenan, M., Schrier, L., & Young, A. (1987). The response of the securities industry to deregulation. *The Financial Review*, *22*(3), 54. https://doi.org/10.1111/j.1540-6288.1987.tb01188.x

Gomes, T., Chora, S., Pereira, C. G., Cardoso, C., & Bebianno, M. J. (2014). Proteomic response of mussels *Mytilus galloprovincialis* exposed to CuO NPs and Cu2+: An exploratory biomarker discovery. *Aquatic Toxicology*, *155*, 327–336. https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2014.07.015

Gopalan, N. K., & Chenicherry, S. (2018). Fate and distribution of organochlorine insecticides (OCIs) in Palakkad soil, India. *Sustainable Environment Research*, *28*(4), 179–185. https://doi.org/10.1016/j.serj.2018.01.007

Guzzella, L., Roscioli, C., Viganò, L., Saha, M., Sarkar, S. K., & Bhattacharya, A. (2005).

Evaluation of the concentration of HCH, DDT, HCB, PCB and PAH in the sediments along the lower stretch of Hugli estuary, West Bengal, northeast India. *Environment International*, *31*(4), 523–534. https://doi.org/10.1016/j.envint.2004.10.014

Hamester, M. R. R., Balzer, P. S., & Becker, D. (2012). Characterization of calcium carbonate obtained from oyster and mussel shells and incorporation in polypropylene. *Materials Research, 15*(2), 204–208. https://doi.org/10.1590/s1516-14392012005000014 .

Han, B.-C., Jeng, W.-L., Hung, T.-C., Ling, Y.-C., Shieh, M.-J., & Chien, L.-C. (2000). Estimation of metal and organochlorine pesticide exposures and potential health threat by consumption of oysters in Taiwan. *Environmental Pollution*, *109*(1), 147–156. https://doi.org/10.1016/s0269-7491(99)00236-5

Hargrave, B. T., Harding, G. C., Vass, W. P., Erickson, P. E., Fowler, B. R., & Scott, V. (1992). Organochlorine pesticides and polychlorinated biphenyls in the Arctic Ocean food web. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, *22*(1), 41–54. https://doi.org/10.1007/bf00213301

Hayes, P. F., & Menzel, R. W. (1981). The *reproductive cycle* of *early setting Crassostrea virginica* (*Gmelin*) in the *northern Gulf* of *Mexico*, and *its implications* for *population recruitment*. *The Biological Bulletin*, *160*(1), 80–88. https://doi.org/10.2307/1540902

Healy, J. M., Mikkelsen, P. M., & Bieler, R. (2006). Sperm ultrastructure in *Glauconome plankta* and its relevance to the affinities of the Glauconomidae (Bivalvia: Heterodonta). *Invertebrate Reproduction & Development*, *49*(1-2), 29–39. https://doi.org/10.1080/07924259.2006.9652191

Henderson, C., Pickering, Q.H., & Tarzwell, C. M. (1959). Relative toxicity of ten chlorinated hydrocarbon insecticides to four species of fish. *Journal of the American Fisheries Society*, *88*, 23–32.

Henry, J.Q., Perry, K.J., & Martindale, M.Q. (2006). Cell specification and the role of the polar lobe in the gastropod mollusc *Crepidula fornicate*. *Journal of Developmental Biology*, *297*(2), 295–307. https://doi.org/10.1016/j.ydbio.2006.04.441

Herbert, L., & Kearns, C. W. (1959). DDT Dehydrochlorinase. Isolation, chemical properties, and spectrophotometric assay. *Journal of Biological Chemistry*, *234*(25), 2123–2128.

Higuera-Ruiz, R., & Elorza, J. (2011). Shell thickening and chambering in the oyster *Crassostrea gigas*: natural and anthropogenic influence of tributyltin contamination. *Environmental Technology*, *32*(6), 583–591. https://doi.org/10.1080/09593330.2010.506201

Holcombe, G. W., Phipps, G. L., & Fiandt, J. T. (1983). Toxicity of selected priority pollutants to various aquatic organisms. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, *7*(4), 400–409. https://doi.org/10.1016/0147-6513(83)90005-2

Hollis, J.M. (1991). Mapping the vulnerability of aquifers and surface waters to pesticide contamination at the national/regional scale. *Pesticides in Soil and Water*, *47*, 165–174.

Hondermarck, H. (2010). 14-3-3 Proteins. *Handbook of Cell Signaling*, *2*(1), 1367–1374. https://doi.org/10.1016/b978-0-12-374145-5.00169-8

Hoshi, S., Uchino, A., Kusanagi, K., Ihara, T., & Ueda, S. (1999). Uptake of orally administered polystyrene latex and poly (D,L-lactic/glycolic acid) microspheres into intestinal lymphoid tissues in chickens. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, *70*, 33–42. https://doi.org/10.1016/S0165-2427(99)00067-7

Hsieh, H. (1954). DDT intoxication in a family of Southern Taiwan. *Journal of American Industrial Hygiene Association*, *10*, 344–346.

Humphreys, E. H., Janssen, S., Heil, A., Hiatt, P., Solomon, G., & Miller, M. D. (2007). Outcomes of the California Ban on Pharmaceutical Lindane: Clinical and Ecologic Impacts. *Environmental Health Perspectives*, *116*(3), 297–302. https://doi.org/10.1289/ehp.10668

Jabbour-Zahab, R., Chagot, D., Blanc, F., & Grizel, H. (1992). Mantle histology, histochemistry and ultrastructure of the pearl oyster *Pinctada margaritifera (L.)*. *Aquatic Living Resources*, *5*(4), 287–298. https://doi.org/10.1051/alr:1992027

Jagannath, A., Shore, R. F., Walker, L. A., Ferns, P. N., & Gosler, A. G. (2007). Eggshell pigmentation indicates pesticide contamination. *Journal of Applied Ecology*, *45*(1), 133–140. https://doi.org/10.1111/j.1365-2664.2007.01386.x

Janicki, R. H., & Kinter, W. B. (1971). DDT inhibits Na^{+}, K^{+}, Mg^{2+}-ATPase in the Intestinal Mucosae and Gills of Marine Teleosts. *Nature New Biology*, *233*(39), 148–149. https://doi.org/10.1038/newbio233148a0

Jayaraj, R., Megha, P., & Sreedev, P. (2016). Review Article. Organochlorine pesticides, their toxic effects on living organisms and their fate in the environment. *Interdisciplinary Toxicology*, *9*(3-4), 90–100. https://doi.org/10.1515/intox-2016-0012

Jiang, X., Tang, T., Zhao, H., Song, Q., Zhou, H., Han, Q., & Diao, X. (2017). Differential gene responses in the embryo of the green mussel *Perna viridis* exposed to dichlorodiphenyltrichloroethane (DDT). *Toxicology Research*, *6*(4), 477–486. https://doi.org/10.1039/c7tx00087a

Johnson, W., & Finley, M. (1980). *Handbook of Acute Toxicity of Chemicals to Fish and Aquatic Invertebrates*. Washington, DC: Fish and wildlife service.

Joyce, A., Holthuis, T. D., Charrier, G., & Lindegarth, S. (2013). Experimental Effects of Temperature and Photoperiod on Synchrony of Gametogenesis and Sex Ratio in the European Oyster *Ostrea edulis* (*Linnaeus*). *Journal of Shellfish Research*, *32*(2), 447–458. https://doi.org/10.2983/035.032.0225

Jukes, T., Wolfe, H. R., Morgan, D. P., Roan, C., Poland, A., Hayes, W. J., Gilpin, W. A., Woodwell, G. M., Rogers, L. J., & Cox, J. L. (1973). Effects of DDT on Man and Other Mammals: Papers. In G.L. Henderson (Ed.), *Handbook of congress cataloging in publication data* (pp. 73–289). New York: Ardent Media.

Jürgens, M. D., Chaemfa, C., Hughes, D., Johnson, A. C., & Jones, K. C. (2015). PCB and organochlorine pesticide burden in eels in the lower Thames River (UK). *Chemosphere*, *118*, 103–111. https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2014.06.088

Jusko, T. A., Koepsell, T. D., Baker, R. J., Greenfield, T. A., Willman, E. J., Charles, M. J., Teplin, S. W., Checkoway, H., & Hertz-Picciotto, I. (2006). Maternal DDT Exposures in Relation to Fetal and 5-Year Growth. *Epidemiology*, *17*(6), 692–700. https://doi.org/10.1097/01.ede.0000232226.06807.90

Kamble, V. (2015). Effect of Sub- lethal treatment of organochlorine pesticide thiodan on hepatopancreas of fresh water mollusc *L. Corrianus* during winter. *World Journal of Pharmaceutical research*, *2*(4), 1031–1035. https://doi.org/10.13140/RG.2.1.4061.6488

Kan-Atireklap, S., Tanabe, S., & Sanguansin, J. (1997). Contamination by butyltin compounds in sediments from Thailand. *American Journal of Marine Science*, *34*, 894–899. https://doi.org/10.1016/s0025-326x(97)00053-2

Kang, S.-G., Choi, K.-S., Bulgakov, A. A., Kim, Y., & Kim, S. Y. (2003). Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) used in quantification of reproductive output in the pacific oyster, *Crassostrea gigas,* in Korea. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, *282*(1-2), 1–21. https://doi.org/10.1016/s0022-0981(02)00444-6

Kannan, K., Sinha, R., Tanabe, S., Ichihashi, H., & Tatsukawa, R. (1993). Heavy metals and organochlorine residues in Ganges River dolphins from India. *Marine Pollution Bulletin*, *26*(3), 159–162. https://doi.org/10.1016/0025-326x(93)90128-7

Kannan, K., Tanabe, S., Giesy, J. P., & Tatsukawa, R. (1997). Organochlorine Pesticides and Polychlorinated Biphenyls in Foodstuffs from Asian and Oceanic Countries. *Reviews of Environmental Contamination and Toxicology*, *152*, 1–55. https://doi.org/10.1007/978-1-4612-1964-4_1

Keith, B. T., Anthony P. F., & Colin J. B. (2013). *Handbook of Fish Physiology: Organic Chemical Toxicology of Fishes*. New York: Elsevier.

Khondee, P., Srisomsap, C., Chokchaichamnankit, D., Svasti, J., Simpson, R. J., & Kingtong, S. (2016). Histopathological effect and stress response of mantle proteome following TBT exposure in the Hooded oyster *Saccostrea cucullata. Environmental Pollution*, *218*, 855–862. https://doi.org/10.1016/j.envpol.2016.08.011

King, W. L., Jenkins, C., Seymour, J. R., & Labbate, M. (2018). Oyster disease in a changing environment: Decrypting the link between pathogen, microbiome and environment. *Marine Environmental Research*, *143*, 124–140. https://doi.org/10.1016/j.marenvres.2018.11.007

Kingtong, S., Chitramvong, Y., & Janvilisri, T. (2007). ATP-binding cassette multidrug transporters in Indian-rock oyster *Saccostrea forskali* and their role in the export of an environmental organic pollutant tributyltin. *Aquatic Toxicology*, *85*, 124–132. https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2005.01.016

Kingtong, S. (2009). *The effect of Tributyltin on proteomic expression of indian-rock oyster, Saccostrea forskali.* Doctoral dissertation, Philosophy in Biology, Mahidol University.

Kingtong, S., Kellner, K., Bernay, B., Goux, D., Sourdaine, P., & Berthelin, C.H. (2013). Proteomic identification of protein associated to mature spermatozoa in the Pacific oyster *Crassostrea gigas*. *Proteomics Journal*, *82*, 81–91. https://doi.org/10.1016/j.jprot.2013.02.009

Klumpp, D., Huasheng, H., Humphrey, C., Xinhong, W., & Codi, S. (2002). Toxic contaminants and their biological effects in coastal waters of Xiamen, China. *Marine Pollution Bulletin*, *44*(8), 752–760. https://doi.org/10.1016/s0025-326x(02)00053-x

Korte, F., Ludwig, G., & Vogel, J. (1962). Insektizide im Stoffwechsel, II. Umwandlung von Aldrin-[14C] und Dieldrin-[14C] durch Mikroorganismen, Leberhomogenate und Moskito-Larven. *Chemistry Europe*, *656*(1), 135–140. https://doi.org/10.1002/jlac.19626560121

Kumblad, L., Olsson, A., Koutny, V., & Berg, H. (2001). Distribution of DDT residues in fish from the Songkhla Lake, Thailand. *Environmental Pollution*, *112*(2), 193–200. https://doi.org/10.1016/s0269-7491(00)00118-4

Lacorte, S., Raldúa, D., Martínez, E., Navarro, A., Diez, S., Bayona, J. M., & Barceló, D. (2006). Pilot survey of a broad range of priority pollutants in sediment and fish from the Ebro river basin (NE Spain). *Environmental Pollution*, *140*(3), 471–482. https://doi.org/10.1016/j.envpol.2005.08.008

Lane, D. J., Pace, B., Olsen, G. J., Stahl, D. A., Sogin, M. L., & Pace, N. R. (1985). Rapid determination of 16S ribosomal RNA sequences for phylogenetic analyses. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *82*(20), 6955–6959. https://doi.org/10.1073/pnas.82.20.6955

Lango-Reynoso, F., Chávez-Villalba, J., Cochard, J. C., & Le Pennec, M. (2000). Oocyte size, a means to evaluate the gametogenic development of the Pacific oyster, *Crassostrea gigas* (Thunberg). *Aquaculture*, *190*(1-2), 183–199. https://doi.org/10.1016/s0044-8486(00)00392-6

Lee, K. M., Kruse, H., & Wassermann, O. (1996). The pattern of organochlorines in mussels *Mytilus edulis L.* from the south west Baltic Sea. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, *31*, 68–76. https://doi.org/10.1007/BF00203909

Lepine, F. L., Brochu, F., Milot, S., Mamer, O. A., & Pepin, Y. (1994). gamma.-Irradiation-Induced Degradation of DDT and its Metabolites in Organic Solvents. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *42*(9), 2012–2018. https://doi.org/10.1021/jf00045a034

Longnecker, M. P., Rogan, W. J., & Lucier, G. (1997). The human health effects of DDT (dichlorodiphenyltrichloroethane) and PCBS (polychlorinated biphenyls) and an overview of organochlorines in public health. *Annual review of public health*, *18*, 211–244. https://doi.org/10.1146/annurev.publhealth.18.1.211

Loor, A., & Sonnenholzner, S. (2014). Reproductive cycle of the Rock oyster, *Striostrea prismatica* (Gray, 1825) from two locations on the southern coast of Ecuador. *Aquaculture Research*, *47*(5), 1432–1442. https://doi.org/10.1111/are.12601

Loosanoff, V. L., & Davis, H. C. (1963). Rearing of Bivalve Mollusks. *Advances in Marine Biology*, *1*(1), 1–136. https://doi.org/10.1016/s0065-2881(08)60257-6

Lordan, R., & Tsoupras, A. (2017). Phospholipids of Animal and Marine Origin: Structure, Function, and Anti-Inflammatory Properties. *Molecules*, *22*(11), 1964. https://doi.org/10.20944/preprints201711.0038.v1

Luetjens, C. M., & Dorresteijn, A. W. C. (1998). The site of fertilisation determines dorsoventral polarity but not chirality in the zebra mussel embryo. *Zygote*, *6*(2), 125–135. https://doi.org/10.1017/s0967199498000045

Macek, K. J., & Mcallister, W. A. (1970). Insecticide Susceptibility of Some Common Fish Family Representatives. *Transactions of the American Fisheries Society, 99*(1), 20–27. https://doi.org/10.1577/1548-8659(1970)99<20:isoscf>2.0.co;2

Marcondes, C. B., & Costa, C. H. N. (2014). Visceral leishmaniasis control in Brazil: time to reevaluate DDT?. *Terrestrial Arthropod Reviews*, *7*(1), 21–39. https://doi.org/10.1163/18749836-00001072.

Masaru, H., Komaru, A., Sousa, J. T. D., & Allen, S. K. (2017). Meiotic and Early Zygotic Development in *Crassostrea virginica* Observed through Confocal Microscopy. *Journal of Shellfish Research*, *36*(3), 699–706. https://doi.org/10.2983/035.036.0319

McLeese, D. W., & Metcalfe, C. D. (1980). Toxicities of eight organochlorine compounds in sediment and seawater to *Crangon septemspinosa*. *The Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, *25*(6), 921–928. https://doi.org/10.1007/BF01985632

Meng, J., Wang, W., Li, L., Yin, Q., & Zhang, G. (2017). Cadmium effects on DNA and protein metabolism in oyster *(Crassostrea gigas)* revealed by proteomic analyses. *Scientific Reports*, *7*(1). https://doi.org/10.1038/s41598-017-11894-7

Mici**ć**, M., Bihari, N., Labura, Ž., Müller, W., & Batel, R. (2001). Induction of apoptosis in the blue mussel *Mytilus galloprovincialis* by tri-n-butyltin chloride. *Aquatic Toxicology*, *55*, 61–73. https://doi.org/10.1016/S0166-445X(01)00156-4

Mizuta, D. D., & Wikfors, G. H. (2018). Seeking the perfect oyster shell: a brief review of current knowledge. *Reviews in Aquaculture*, *11*(3), 586–602. https://doi.org/10.1111/raq.12247

Mondol, M. R., Kim, C. W., Kim, B. K., Kang, C. K., & Choi, K. S. (2012). Early growth and reproduction of hatchery-produced Pacific oyster Crassostrea gigas in Gamakman Bay off the southern coast of Korea. *Fisheries Science*, *78*(6), 1285–1292. https://doi.org/10.1007/s12562-012-0553-x

Monirith, I., Ueno, D., Takahashi, S., Nakata, H., Sudaryanto, A., Subramanian, A., Karuppiah, S., Ismail, K., Muchtar, M., Zheng, J., Richardson, B. J., Prudente, M., Hue, N. D., Tana, T. S., Tkalin, A. V., & Tanabe, S. (2003). Asia-Pacific mussel watch: monitoring contamination of persistent organochlorine compounds in coastal waters of Asian countries. *Marine Pollution Bulletin*, *46*(3), 281–300. https://doi.org/10.1016/s0025-326x(02)00400-9

Moraes, C. R., & Meyers, S. (2018). The sperm mitochondrion: Organelle of many functions. *Animal Reproduction Science*, *194*, 71–80. https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2018.03.024

Moreira, A., Figueira, E., Mestre, N. C., Schrama, D., Soares, A. M. V. M., Freitas, R., & Bebianno, M. J. (2018). Impacts of the combined exposure to seawater acidification and arsenic on the proteome of *Crassostrea angulata* and *Crassostrea gigas*. *Aquatic Toxicology*, *203*, 117–129. https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2018.07.021

Müller, G. do A. e S., Lüchmann, K. H., Razzera, G., Toledo-Silva, G., Bebianno, M. J., Marques, M. R. F., & Bainy, A. C. D. (2018). Proteomic response of gill microsomes of *Crassostrea brasiliana* exposed to diesel fuel water-accommodated fraction. *Aquatic Toxicology*, *201*, 109–118. https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2018.06.001

Nakamura, Y., Nakano, T., Yurimoto, T., Maeno, Y., Koizumi, T., & Tamaki, A. (2010). Reproductive cycle of the venerid clam *Meretrix lusoria* in Ariake Sound and Tokyo Bay, Japan. *Fisheries Science*, *76*(6), 931–941. https://doi.org/10.1007/s12562-010-0289-4

Nasir, K., Bilto, Y. Y., & Al-Shuraiki, Y. (1998). Residues of chlorinated hydrocarbon insecticides in human milk of Jordanian women. *Environmental Pollution*, *99*(2), 141–148. https://doi.org/10.1016/S0269-7491(97)00195-4

Newton, A. C. (1995). Protein Kinase C: Structure, Function, and Regulation. *Journal of Biological Chemistry*, *270*(48), 28495–28498. https://doi.org/10.1074/jbc.270.48.28495

Ngo, T. T., Sang-Gyun, K., Kwang-Sik, C. (2002). Seasonal change in reproduction condition of the Pacific oyster, *Crassostrea gigas* from suspended culture in Gosung Bay, Korea. *Korean journal of environmental biology*, *20*(3), 268–275. https://doi.org/10.1080/00288330.2003.9517155

Niewiadowska, A., Kiljanek, T., Semeniuk, S., & Zmudzki, J. (2014). Contamination of Omnivorous Freshwater Fish Species and Sediments by Chlorinated Hydrocarbons in Poland. *Bulletin of the Veterinary Institute in Pulawy*, *58*(3), 405–411. https://doi.org/10.2478/bvip-2014-0063

Nor Idayu, A.W., MohdSaleh, M.T., Zainodin, J., NatrahFatin, M.I., Annie, C., Cob, C.Z., Aziz, A. (2015). Early development of tropical oyster *Crassostrea iredalei* (Faustino 1932). *Advances in Environmental Biology*, *9*, 1–8.

Nowland, S. J., O'Connor, W., & Southgate, P. C. (2018). Embryonic, Larval, and Early Postlarval Development of the Tropical Black-Lip Rock Oyster *Saccostrea echinata*. *Journal of Shellfish Research*, *37*(1), 73–77. https://doi.org/10.2983/035.037.0106

Obata, M., & Komaru, A. (2005). Specific location of sperm mitochondria in mussel *Mytilus galloprovincialis* zygotes stained by MitoTracker. *Development, growth & differentiation*, *47*(4), 255–263. https://doi.org/10.1111/j.1440-169X.2005.00801.x

Ohyama, T., Takahashi, T., & Ogawa, H. (1982). Effects of dichlorodiphenyltrichloroethane and its analogues on rat liver mitochondria. *Biochemical Pharmacology*, *31*, 397–404. https://doi.org/10.1016/0006-2952(82)90188-5

O' Reilly, A. J., Laide, C., Maloy, A., Hutton, S., Bookelaar, B., O' Sullivan, K., Lynch, S. A., & Culloty, S. C. (2017). The role of the mussel Mytilus spp. in the transmission of ostreid herpesvirus-1 microVar. *Parasitology*, *145*(8), 1095–1104. https://doi.org/10.1017/s0031182017002244

Pales Espinosa, E., Koller, A., & Allam, B. (2016). Proteomic characterization of mucosal secretions in the eastern oyster, *Crassostrea virginica. Journal of Proteomics*, *132*, 63–76. https://doi.org/10.1016/j.jprot.2015.11.018

Patrick, S., Kiremire, B., Kishimba, M., Wandiga, S., Nyanzi, S., & Wasswa, J. (2009). DDT and metabolites in fish from Lake Edward, Uganda. *Chemosphere*, *76*, 212–215. https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2009.03.049.

Péden, R., Rocher, B., Chan, P., Vaudry, D., Poret, A., Olivier, S., Foll, F. E., & Bultelle, F. (2016). Consequences of acclimation on the resistance to acute thermal stress: Proteomic focus on mussels from pristine site. *Marine Environmental Research*, *121*, 64–73. https://doi.org/10.1016/j.marenvres.2016.02.006

Percy, J. A. (2008). Parlous POPs: persisent organic pollutants in the Bay of Fundy. *Environment Canada*, *27*(12).

Perry, A. S., Yamamoto, I., Ishaaya, I., & Perry, R. (2012). *Insecticides in Agriculture and Environment: Retrospects and Prospects*. *Handbook of Applied Agriculture* (pp.202–204). Berlin, Germany: Springer Press.

Phillips, D. J. (1989). Trace metals and organochlorines in the coastal waters of Hong Kong. *Marine Pollution Bulletin*, *20*(7), 319–327. https://doi.org/10.1016/0025-326x(89)90154-9

Piano, A., Valbonesi, P., & Fabbri, E. (2004). Expression of cytoprotective proteins, heat shock protein 70 and metallothioneins, in tissues of *Ostrea edulis* exposed to heat and heavy metals. *Cell stress & chaperones*, *9*(2), 134–142. https://doi.org/10.1379/483.1

Poolpak, T., Pokethitiyook, P., Kruatrachue, M., Arjarasirikoon, U., & Thanwaniwat, N. (2008). Residue analysis of organochlorine pesticides in the Mae Klong River of Central Thailand. *Journal of hazardous materials*, *156*(1-3), 230–239. https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2007.12.078

Popham, W. J. (1974). Minimal Competencies for Objectives-Oriented Teacher Education Programs. *Journal of Teacher Education*, *25*(1), 68–73. https://doi.org/10.1177/002248717402500117

Prihartono, N., Kriebel, D., Woskie, S., Thetkhathuek, A., Sripaung, N., Padungtod, C., & Kaufman, D. (2011). Risk of Aplastic Anemia and Pesticide and Other Chemical Exposures. *Asia Pacific Journal of Public Health*, *23*(3), 369–377. https://doi.org/10.1177/1010539511403605

Rashid, M. A., Lee, S., Tak, E., Lee, J., Choi, T. G., Lee, J. W., Kim, J. B., Youn, J. H., Kang, I., Ha, J., & Kim, S. S. (2010). Carbonyl reductase 1 protects pancreatic β-cells against oxidative stress-induced apoptosis in glucotoxicity and glucolipotoxicity. *Free Radical Biology and Medicine*, *49*(10), 1522–1533. https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2010.08.015

Renault, T. (2011). Effects of Pesticides on Marine Bivalves: What Do We Know and What Do We Need to Know?, *Pesticides in the Modern World - Risks and Benefits*, *12*(1), 227–240. https://doi.org/10.5772/19155

Riou, V., Ndiaye, A., Budzinski, H., Dugué, R., Le Ménach, K., Combes, Y., Bossus, M., Durand, J. D., Charmantier, G., & Lorin-Nebel, C. (2012). Impact of environmental DDT concentrations on gill adaptation to increased salinity in the tilapia Sarotherodon melanotheron. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology*, *156*(1), 7–16. https://doi.org/10.1016/j.cbpc.2012.03.002

Rivera-Ingraham, G. A., Rocchetta, I., Bickmeyer, U., Meyer, S., & Abele, D. (2016). Spatial

compartmentalization of free radical formation and mitochondrial heterogeneity in bivalve gills revealed by live-imaging techniques. *Frontiers in Zoology*, *13*(4) 1–17. https://doi.org/10.1186/s12983-016-0137-1

Rocha, T. L., Santos, A. P. R. dos, Yamada, Á. T., Soares, C. M. de A., Borges, C. L., Bailão, A. M., & Sabóia-Morais, S. M. T. (2015). Proteomic and histopathological response in the gills of *Poecilia reticulata* exposed to glyphosate-based herbicide. *Environmental Toxicology and Pharmacology*, *40*(1), 175–186. https://doi.org/10.1016/j.etap.2015.04.016

Rodríguez-Ortega, M.J., Grøsvik, B.E., RodríguezAriza, A., Goksøyr, A., & López-Barea, J. (2003). Changes in protein expression profiles in bivalve molluscs (*Chamaelea gallina*) exposed to four model environmental pollutants. *Proteomics*, *3*(8), 1535–1543. https://doi.org/10.1002/pmic.200300491

Ruangwises, S., & Saipan, P. (2009). Determination of Arsenic Intake by Duplicate Diet Portion Sampling Method among Ronphibun Residents. *Applied Environmental Research*, *31*(2), 25–33. Retrieved from https://ph01.tci-thaijo.org/index.php/aer/article/view/9691

Said, T. O., El Moselhy, K. M., Rashad, A. A. M., Shreadah, M. A. (2008). Organochlorine contaminants in water, sediment and fish of Lake Burullus, Egyptian Mediterranean Sea. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, *81*, 136–146. https://doi.org/10.1007/s00128-008-9422-9

Salazar-Coria, L., Rocha-Gómez, M. A., Matadamas-Martínez, F., Yépez-Mulia, L., & Vega-López, A. (2019). Proteomic analysis of oxidized proteins in the brain and liver of the Nile tilapia (*Oreochromis niloticmus*) exposed to a water-accommodated fraction of Maya crude oil. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, *171*(1), 609–620. https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2019.01.033

Sericano, J. L., Wade, T. L., Sweet, S. T., Ramirez, J., & Lauenstein, G. G. (2014). Temporal trends and spatial distribution of DDT in bivalves from the coastal marine environments of the continental United States, 1986–2009. *Marine Pollution Bulletin*, *81*(2), 303–316. https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2013.12.049

Song, Y. P., Suquet, M., Quéau, I., & Lebrun, L. (2009). Setting of a procedure for experimental fertilisation of Pacific oyster (*Crassostrea gigas*) oocytes. *Aquaculture*, *287*(3-4),

311–314. https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2008.10.018

Siriwong, W., Thirakhupt, K., Sitticharoenchai, D., Rohitrattana, J., Thongkongowm, P., Borjan, M., & Robson, M. (2009). DDT and derivatives in indicator species of the aquatic food web of Rangsit agricultural area, Central Thailand. *Ecological Indicators*, *9*(5), 878–882. https://doi.org/10.1016/j.ecolind.2008.10.004

Srinivasulu, R. M., & Ramana Rao, K. V. (1990). Effects of sublethal concentrations of phosphamidon, methyl parathion, DDT, and lindane on tissue nitrogen metabolism in the penaeid prawn, *metapenaeus monoceros* (Fabricius). *Ecotoxicology and Environmental Safety*, *19*(1), 47–54. https://doi.org/10.1016/0147-6513(90)90077-i

Sunil, K. P. (2015). Histological and UltraStructural Changes in the Mantle of *Perna indica* (Brown Mussel, Kuriakose and Nair, 1976) Infested by Bioeroding Sponges. *Aquaculture Marine Biology*, *2*(6), 00051. https://doi.org/10.15406/jamb.2015.02.00051

Tanabe, S., Prudente, M. S., Kan-atireklap, S., & Subramanian, A. (2000). Mussel watch: marine pollution monitoring of butyltins and organochlorines in coastal waters of Thailand, Philippines and India. *Ocean & Coastal Management*, *43*(8-9), 819–839. https://doi.org/10.1016/s0964-5691(00)00060-0

Thanormjit, K., Chueycham, S., Phraprasert, P., Sukparangsi, W., & Kingtong, S. (2020). Gamete characteristics and early development of the hooded oyster *Saccostrea cucullata* (Born, 1778). *Aquaculture Reports*, *18*, 2352–5134. https://doi.org/10.1016/j.aqrep.2020.100473

Thiffault, C., Langston, W. J., & Di Monte, D. A. (2001). Acute exposure to organochlorine pesticides does not affect striatal dopamine in mice. *Neurotoxicity Research*, *3*, 537–343. https://doi.org/10.1007/BF03033209

Thapinta, A., & Hudak, P. F. (2003). Use of geographic information systems for assessing groundwater pollution potential by pesticides in Central Thailand. *Environment International*, *29*(1), 87–93. https://doi.org/10.1016/s0160-4120(02)00149-6

Tiedeken, J. A., & Ramsdell, J. S. (2009). DDT exposure of Zebrafish embryos enhances seizure

susceptibility: Relationship to fetal p,p'-DDE burden and domoic acid exposure of California Sea Lions. *Environmental Health Perspectives*, *117*(1), 68–73. https://doi.org/10.1289/ehp.11685

Trenholm, S. R., & Mix, M. C. (1978). Regeneration of radiation-damaged digestive tissues in juvenile Pacific oysters (*Crassostrea gigas*). *Journal of Invertebrate Pathology*, *32*(3), 249–257. https://doi.org/10.1016/0022-2011(78)90187-8

Ueno, D., Takahashi, S., Tanabe, S., Ikeda, K., Koyama, J., & Yamada, H. (2001). Variations of Organochlorine Concentrations in Blue Mussels Associated with Season, Size and Vertical Habitat. *NIPPON SUISAN GAKKAISHI*, *67*(5), 887–893. https://doi.org/2331/suisan.67.887

Usheva, L. N., Vaschenko, M. A., & Durkina, V. B. (2006). Histopathology of the Digestive Gland of the Bivalve Mollusk *Crenomytilus grayanus* (Dunker, 1853) from Southwestern Peter the Great Bay, Sea of Japan. *Russian Journal of Marine Biology*, *32*(3), 166–172. https://doi.org/10.1134/S1063074006030047

Van Hoof, D., Muñoz, J., Braam, S. R., Pinkse, M. W. H., Linding, R., Heck, A. J. R., Mummery, C. L., & Krijgsveld, J. (2009). Phosphorylation Dynamics during Early Differentiation of Human Embryonic Stem Cells. *Cell Stem Cell*, *5*(2), 214–226. https://doi.org/10.1016/j.stem.2009.05.021

Van Leeuwen, S. P. J., & de Boer, J. (2008). Advances in the gas chromatographic determination of persistent organic pollutants in the aquatic environment. *Journal of Chromatography A*, *1186*(1-2), 161–182. https://doi.org/10.1016/j.chroma.2008.01.044

Ver, L. M. M. (1986). Early development of *Crassostrea iredalei* (Faustino, 1932) (Bivalvia: Ostreidae), with notes on the structure of the larval hinge. *Veliger*, *29*(1), 78–85. https://doi.org/20.500.12066/3154

Velbinger, H. (1947a). On the question of DDT toxicity of man. *Dtsch Gesundheitwes*, *2*, 355–358.

Velbinger, H. (1947b.) Contribution to the toxicology of "DDT" agent, dichlorodiphenyltrichloromethylmethane. *Journal of pharmaceutical*, *2*, 268–274.

Viganò, L., Arillo, A., Bottero, S., Massari, A., & Mandich, A. (2001). First observation of intersex cyprinids in the Po River (Italy). *Science of The Total Environment, 269*(1-3), 189–194. https://doi.org/10.1016/s0048-9697(00)00821-4

Vignier, J., Donaghy, L., Soudant, P., Chu, F. L. E., Morris, J. M., Carney, M. W., Lay, C. R., Krasnec, M., Robert, R., & Volety, A. K. (2015). Impacts of Deepwater Horizon oil and associated dispersant on early development of the Eastern oyster *Crassostrea virginica. Marine Pollution Bulletin*, *100*(1), 426–437. https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2015.08.011

VoPham, T., Bertrand, K. A., Hart, J. E., Laden, F., Brooks, M. M., Yuan, J.-M., Talbott, E. O., Ruddell, D., Chang, C. C. H., & Weissfeld, J. L. (2017). Pesticide exposure and liver cancer: a review. *Cancer Causes & Control*, *28*(3), 177–190. https://doi.org/10.1007/s10552-017-0854-6

Walker, E.M., Gale, G.R., Atkins, L.M., & Gadsden, R. H. (1977). Some effects of dieldrin and mirex on Ehrlich ascites tumor cells *in vivo* and *in vitro*. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, *5***,** 333–341. https://doi.org/10.1007/BF02220915

Wallace, R. K., Waters, P., & Rikard, F. S. (2008). Oyster Hatchery Techniques. *Southern Regional Aquaculture Center*, *16*(4302), 1–6.

Watanabe, K., Murakami, S., Misago, M., Yoshikawa, M., Tamai, D., Nakao, S., Ueoka, T., Ito, M., Shinomura, Y., & Kajiwara, N. (2018). Sjögren's syndrome concurrent with protein-losing gastroenteropathy with secondary systemic capillary leak syndrome : A case report. *Clinical Case Reports*, *6*(9), 1829–1833. https://doi.org/10.1002/ccr3.1675

Wilson, P., & Scotto, L., Scarpa, J., Volety, A., Laramore, S., & Haunert, D. (2009). Survey of water quality, oyster reproduction and oyster health status in the St. Lucie Estuary. *Journal of Shellfish Research*, *24*, 157–165. https://doi.org/10.2983/0730-8000(2005)24[157:SOWQOR]2.0.CO;2

Wittayanan, W., Srikote, R., & Chaimongkol, T. (2019). Determination of Organochlorine Pesticide and Polychlorinated Biphenyl as POPs Residues in Freshwater Animals in Thailand during 2017-2018. *Science & Technology Asia*, *24*(3), 27-38. Retrieved from https://ph02.tci-thaijo.org/index.php/SciTechAsia/article/view/206337

Woodwell, G. M., Wurster, C. F., & Isaacson, P. A. (1967). DDT Residues in an East Coast Estuary: A Case of Biological Concentration of a Persistent Insecticide. *Science*, *156*(3776), 821–824. https://doi.org/10.1126/science.156.3776.821

Xu, J., Jiang, S., Li, Y., Li, M., Cheng, Q., Zhao, D., Yang, B., Jia, Z., Wang, L., & Song, L. (2016). Caspase-3 serves as an intracellular immune receptor specific for lipopolysaccharide in oyster *Crassostrea gigas*. *Developmental & Comparative Immunology*, *61*, 1–12. https://doi.org/10.1016/j.dci.2016.03.015

Zepp, R. G., Wolfe, N. L., Azarraga, L. V., Cox, R. H., & Pape, C. W. (1977). Photochemical transformation of the DDT and methoxychlor degradation products, DDE and DMDE, by sunlight. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, *6*(1), 305–314. https://doi.org/10.1007/bf02097771

Zhang, Y., Sun, J., Mu, H., Li, J., Zhang, Y., Xu, F., Xiang, Z., Qian, P. Y., Qiu, J. W., & Yu, Z. (2014). Proteomic Basis of Stress Responses in the Gills of the Pacific Oyster *Crassostrea gigas*. *Journal of Proteome Research*, *14*(1), 304–317. https://doi.org/10.1021/pr500940s

Zhao, X., Yu, H., Kong, L., & Li, Q. (2012). Transcriptomic Responses to Salinity Stress in the Pacific Oyster *Crassostrea gigas. PLoS ONE*, *7*(9), e46244. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0046244

ภาคผนวก

ภาคผนวก ก

การเตรียมสารละลายดีดีที ความเข้มข้นต่าง ๆ

ตารางภาคผนวก ก-1 การเตรียมสารละลายดีดีที ความเข้มข้นต่าง ๆ

ความเข้มข้นของสารดีดีที (µg/L)	Stock solution of DDT (ml)	Ethanol (ml)	น้ำทะเลเทียม 30 ppt (ml)	ปริมาตรรวม (ml)
0	0	2	9998	10000
10	0.01	1.99	9998	10000
100	0.1	1.9	9998	10000
500	0.5	1.5	9998	10000
1000	1	1	9998	10000
2000	2	0	9998	10000

ตัวอย่างการคำนวณ DDT stock solution

สารดีดีที ความเข้มข้น 1000 µg/L

$C_1V_1 = C_2V_2$

$10^7 \times V_1 = 1{,}000\ \mu g/L \times 10\ L$

$$V_1 = \frac{1{,}000\ \mu g/L \times 10\ L}{10^7\ \mu g/L}$$

$$= \frac{10^4\ L}{10^7}$$

$= 10^4 \times 10^7\ L$

$= 10^{-3}\ L$

$= 10^{-3} \times 10^3\ ml$

$= 1\ ml$

ภาคผนวก ข

การหาค่า LC_{50} โดยใช้วิธีวิเคราะห์แบบ Probit

การหาค่า LC_{50} โดยใช้วิธีวิเคราะห์แบบ Probit

จากข้อมูลความเข้มข้นของสารละลายดีดีทีและอัตราการตายในแต่ละระดับ นำมาประเมินหาค่าความเข้มข้นของสารละลายดีดีทีที่ทำให้หอยนางรมปากจีบตายลง 50 เปอร์เซ็นต์ (LC_{50}) โดยวิธีวิเคราะห์แบบโพรบิท (Probit Analysis) ตามวิธีของ Finney (1971) มีขั้นตอนดังต่อไปนี้

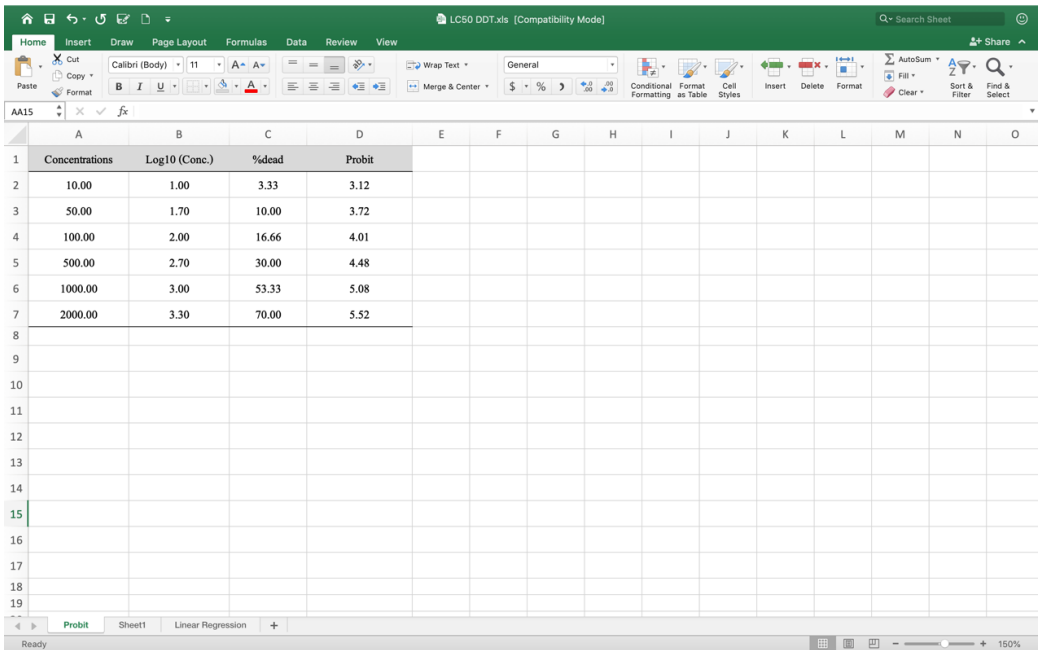
ขั้นตอนที่ 1 เปิดโปรแกรมและทำการกรอกข้อมูลตามภาพที่ ข-1

คอลัมน์ A คือความเข้มข้นที่ได้ทำการทดลอง

คอลัมน์ B คือค่าลอการิทึมฐาน 10 (log_{10}) ของความเข้มข้นที่ได้ทำการทดลอง

คอลัมน์ C คือการคำนวณจำนวนเปอร์เซ็นต์ของสัตว์ทดลองที่ได้ทำการศึกษาคำนวณจากจำนวนตัวที่ตาย × 100/จำนวนของสัตว์ทดลองในระดับความเข้มข้นนั้น ๆ

คอลัมน์ D คือค่า Probit ที่ได้จากตารางที่ ข-1



	A	B	C	D
1	Concentrations	Log10 (Conc.)	%dead	Probit
2	10.00	1.00	3.33	3.12
3	50.00	1.70	10.00	3.72
4	100.00	2.00	16.66	4.01
5	500.00	2.70	30.00	4.48
6	1000.00	3.00	53.33	5.08
7	2000.00	3.30	70.00	5.52

ภาพภาคผนวก ข-1 ตัวอย่างการกรอกข้อมูลอัตราการตาย

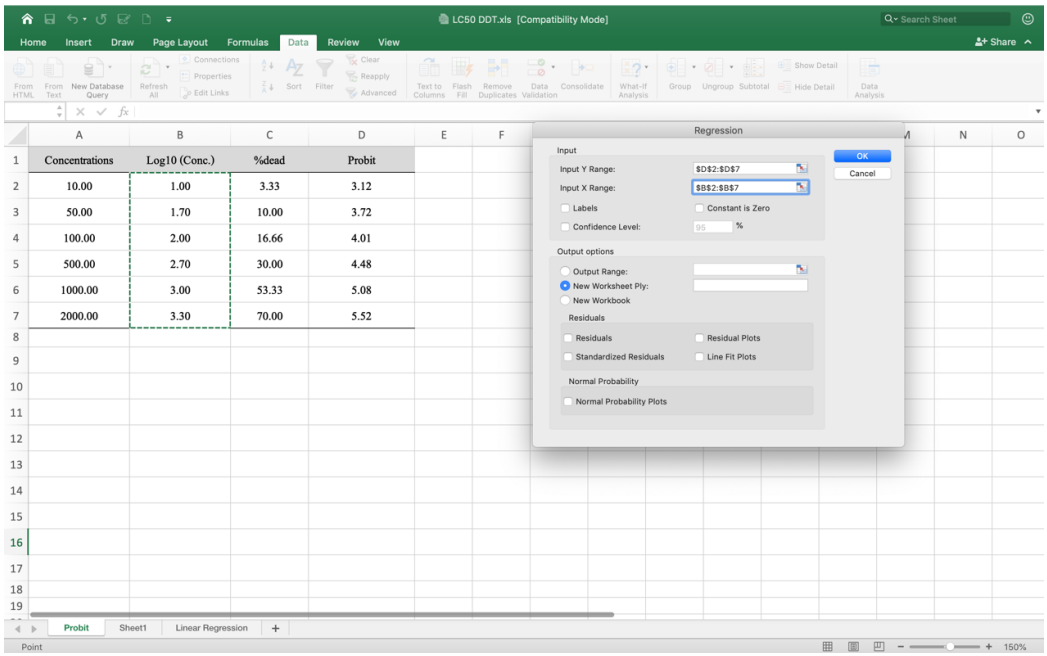
ตารางภาคผนวก ข-1 การเปลี่ยนแปลงเปอร์เซ็นต์การตายเป็น Probit

Transformation of percentage to probits

%	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9
0	–	2.67	2.95	3.12	3.25	3.36	3.45	3.52	3.59	3.66
10	3.72	3.77	3.82	3.87	3.92	3.96	4.01	4.05	4.08	4.12
20	4.16	4.19	4.23	4.26	4.29	4.33	4.36	4.39	4.42	4.45
30	4.48	4.50	4.53	4.56	4.59	4.61	4.64	4.67	4.69	4.72
40	4.75	4.77	4.80	4.82	4.85	4.87	4.90	4.92	4.95	4.97
50	5.00	5.03	5.05	5.08	5.10	5.13	5.15	5.18	5.20	5.23
60	5.25	5.28	5.31	5.33	5.36	5.39	5.41	5.44	5.47	5.50
70	5.52	5.55	5.58	5.61	5.64	5.67	5.71	5.74	5.77	5.81
80	5.84	5.88	5.92	5.95	5.99	6.04	6.08	6.13	6.18	6.23
90	6.28	6.34	6.41	6.48	6.55	6.64	6.75	0.88	7.05	7.33
–	0.00	0.10	0.20	0.30	0.40	0.50	0.60	0.70	0.80	0.90
99	7.33	7.37	7.41	7.46	7.51	7.58	7.65	7.75	7.88	8.09

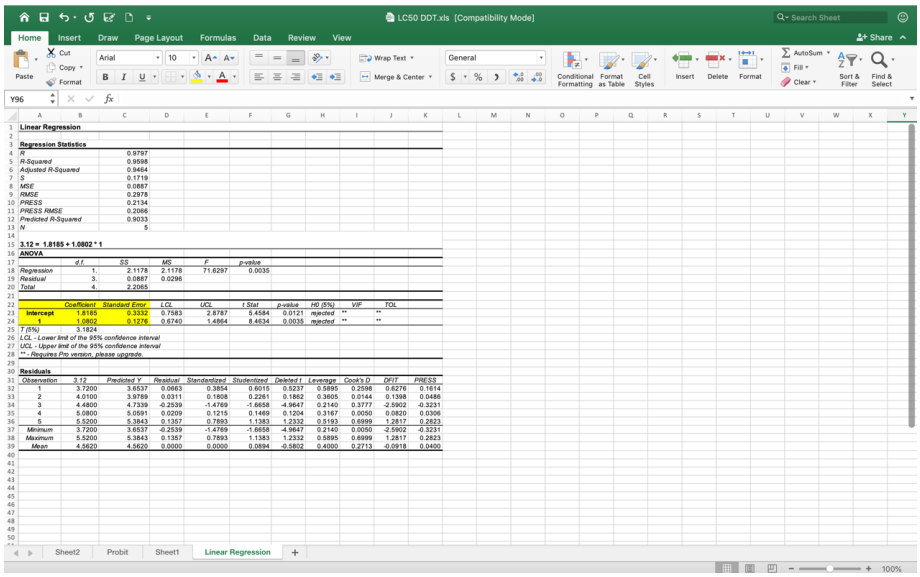
ขั้นตอนที่ 2 หาค่า LC_{50}

โดยเข้าไปที่ Data Analysis (รูปที่ 9.3) → Regression → Input Y range ให้ใส่ค่าของคอลัมน์ Probit → Input X range ให้ใส่ค่าของคอลัมน์ log10 ก็จะได้ข้อมูลดังภาพที่ ข-3



	A	B	C	D
1	Concentrations	Log10 (Conc.)	%dead	Probit
2	10.00	1.00	3.33	3.12
3	50.00	1.70	10.00	3.72
4	100.00	2.00	16.66	4.01
5	500.00	2.70	30.00	4.48
6	1000.00	3.00	53.33	5.08
7	2000.00	3.30	70.00	5.52

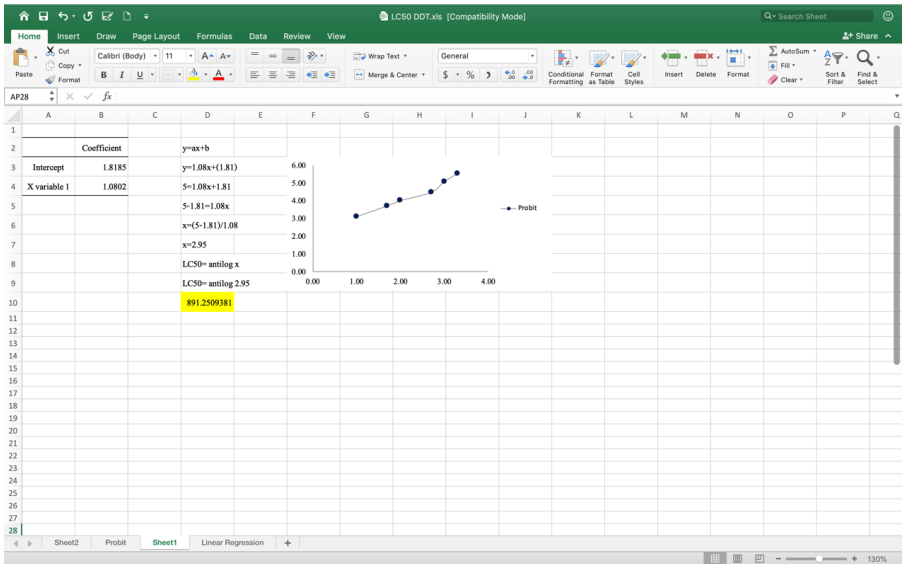
ภาพภาคผนวก ข-2 การคำนวณหาค่า LC_{50}



ภาพภาคผนวก ข-3 ค่าทางสถิติเพื่อใช้คำนวณหา LC_{50}

ขั้นตอนที่ 3 นำค่า intercept และ X variable มาคำนวณสมการเส้นตรง Y=ax+b โดย a= ค่า X variable, b= intercept และกำหนดให้ค่า Y=5 ตามตารางโพรบิท 50= 5

ขั้นตอนที่ 4 เมื่อได้ค่า x แล้วนำมาถอด antilog ก็จะได้ค่า LC_{50} ดังภาพที่ ข-4



	Coefficient	y=ax+b	
Intercept	1.8185	y=1.08x+(1.81)	
X variable 1	1.0802	5=1.08x+1.81	
		5-1.81=1.08x	
		x=(5-1.81)/1.08	
		x=2.95	
		LC50= antilog x	
		LC50= antilog 2.95	
		891.2509381	

ภาพภาคผนวก ข-4 คำนวณสมการเส้นตรงเพื่อหา LC_{50}

ภาคผนวก ค

การเตรียมสารละลายสำหรับศึกษาด้วยเทคนิคมิญชวิทยา

การเตรียมสารเพื่อคงสภาพเนื้อเยื่อ

Bouin's fluid

- สารละลายอิ่มตัวของกรดพิคริกในน้ำ 75 ml
- ฟอร์มาลิน 25 ml
- กรดแอซีติก 5 ml

วิธีการ

1. ชั่งกรดพิคริก จำนวน 1.2 g ละลายในน้ำ 100 ml
2. คนให้ละลาย ตวงมาใช้เพียง 75 ml
3. เติมฟอร์มาลิน จำนวน 25 ml และกรดแอซีติก จำนวน 5 ml ลงไปตามลำดับ

การเตรียมสีย้อม

Harris Haematoxylin (Apply for 50 ml)

Stock I

Potassium or ammonium (alum) 5 g

Distilled water 50 ml

Mixture, heat 90 °C stir 550

Stock II

Absolute alcohol 5 ml

Haematoxylin 0.5 g

Mix heat 100°C stir 550 until deep purple ~ 10 min

Mix stockI and stockII

Add (prepare for 50-100 ml, Use stockIII 1.5 ml) ต้มต่อจนเป็นสีม่วง ~ 2-3 min

StockIII (1% Sodium Iodate)

Sodium Iodate 0.1 g

Distilled water 10 ml

Boiling until deep purple

Cooling under Ice or water bath

Add glacial acid 1 ml

Filter Before in use

Eosin

Counterstain Eosin (stock 100 ml)

Eosin 0.5 % in 70 % ethanol

Preparation 50 ml/time

Eosin Yellowish 0.25 g

70 ethanol alcohol 50 ml

ภาคผนวก ง

ขั้นตอนการย่อยเจลด้วยทริปซิน

ขั้นตอนการย่อยเจลด้วยทริปซิน

Cut protein spot on gel and put in microcentrifuge tube

⇓

Wash with 100µl distilled water twice

⇓

Cut gel into small pieces

⇓

Add 50µl 0.1M NH_4HCO_3/50% ACN

⇓

Vortex and incubate at 30ºC for 20 minutes to destain

(Repeat if necessary)

⇓

Pipet out solution and discard

⇓

Dry gel using speed-vac

⇓

Add 50µl 0.1 M NH_4HCO_3/10mM DTT/1mM EDTA to reduce

⇓

Incubate at 60ºC for 45 minutes

⇓

Pipet out solution and discard

⇓

Add 50µl 100mM IAA/0.1M NH_4HCO_3

⇓

Incubate at room temperature for 30 minutes in the dark

⇓

Pipet out solution and discard

⇓

Wash gel with 50µl 0.05M Tris-HCl, pH 8.5/50% ACN (3 times)

⇓

Dry gel using speed-vac

⇓

Prepare digestion buffer

(1 part trypsin solution: 5µl 0.2 mg/ml stock, 1µl 10% acetic acid, 4µl water

9 parts buffer: 90µl 0.05M Tris-HCl, pH 8.5/10% ACN/1mM $CaCl_2$)

⇓

Add 30µl digestion buffer

⇓

Incubate at 37ºC overnight

⇓

Remove solution from microcentrifuge tube into a new tube (master tube)

⇓

Add 20µl 2% TFA to old tube

⇓

Incubate at 60ºC for 30 minutes to stop reaction

⇓

Remove solution and add to master tube

⇓

Add 40µl 0.05M Tris-HCl, pH 8.5/1mM $CaCl_2$ to gel in old tube

⇓

Incubate at 30ºC for 10 minutes

⇓

Sonicate for 5 minutes

⇓

Add 40µl ACN to gel in old tube

⇓

Incubate at 30ºC for 10 minutes

⇓

Sonicate for 5 minutes

⇓

Remove solution and add to master tube

⇓

Add 40µl 5% formic acid/ACN (1:1) to gel in old tube

⇓

Incubate at 30ºC for 10 minutes

⇓

Sonicate for 5 minutes

⇓

Remove solution and add to master tube

⇓

Dry solution in master tube using speed-vac

⇓

Prepare to run MS

DTT (mw 154.25):	1.54mg/100µl = 100mM
IAA (mw 184.96):	1.84mg/100µl = 100mM
	3.699mg/100µl = 200mM
EDTA.2H_2O (mw 372.24):	37.224mg/10ml = 10mM
$CaCl_2$ (mw 110.99):	11.099mg/10ml = 10mM
$CaCl_2$.2H_2O (mw 147.02):	14.702mg/10ml = 10mM
NH_4HCO_3(mw 79.06):	0.7906g/50ml = 200mM
Tris-HCl, pH 8.5	
Tris (mw 121.14):	0.6057g/50ml = 100mM