



การแสดงออกของยีน Metallothionein และ Vitellogenin ต่อปริมาณโลหะหนัก (แคดเมียม ปรอท
สารหนู และทองแดง) ในตับกุ้งก้ามแดง

METALLOTHIONEIN AND VITELLOGENIN GENES EXPRESSIONS IN
HEPATOPANCREAS OF CRAYFISH (*Cherax quadricarinatus*) EXPOSED TO CADMIUM,
MERCURY, ARSENIC AND COPPER

เปรมสุดา สุนทรพิธ

บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ

การแสดงออกของยีน Metallothionein และ Vitellogenin ต่อปริมาณโลหะหนัก
(แคดเมียม ปปรอท สารหนู และทองแดง) ในตับกึ่ง้ามแดง



เปรมสุดา สุนทรพิธ

ปริญญานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตร
วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาเทคโนโลยีสิ่งแวดล้อมและการจัดการทรัพยากร
คณะพัฒนธรรมสิ่งแวดล้อมและการท่องเที่ยวเชิงนิเวศ มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ
ปีการศึกษา 2561
ลิขสิทธิ์ของมหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ

METALLOTHIONEIN AND VITELLOGENIN GENES EXPRESSIONS IN
HEPATOPANCREAS OF CRAYFISH (*Cherax quadricarinatus*) EXPOSED TO
CADMIUM, MERCURY, ARSENIC AND COPPER



A Thesis Submitted in partial Fulfillment of Requirements
for MASTER OF SCIENCE (Environmental Technology & Resources Management)
Faculty of Environmental Culture and Ecotourism Srinakharinwirot University

2018

Copyright of Srinakharinwirot University

ปริญญานิพนธ์

เรื่อง

การแสดงออกของยีน Metallothionein และ Vitellogenin ต่อปริมาณโลหะหนัก (แคดเมียม ปรอท สารหนู และทองแดง) ในตับกุ้งก้ามแดง

ของ

เปรมสุตา สุนทรพิธ

ได้รับอนุมัติจากบัณฑิตวิทยาลัยให้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตร
ปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาเทคโนโลยีสิ่งแวดล้อมและการจัดการทรัพยากร
ของมหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ

คณบดีบัณฑิตวิทยาลัย

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ นายแพทย์ฉัตรชัย เอกปัญญาสกุล)

อาจารย์ที่ปรึกษาปริญญานิพนธ์

คณะกรรมการสอบปากเปล่าปริญญานิพนธ์

..... ที่ปรึกษาหลัก

..... ประธาน

(รองศาสตราจารย์ ดร.อรินท์ งามนิยม)

(อาจารย์ ดร.ศรัญญา มณีทอง)

..... ที่ปรึกษาร่วม

..... กรรมการ

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. ทายาท ศรียาภัย)

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ภัทรพงษ์ เกริกสกุล)

..... ที่ปรึกษาร่วม

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. กัญจน์ ศิลป์ประสิทธิ์)

ชื่อเรื่อง	การแสดงออกของยีน Metallothionein และ Vitellogenin ต่อปริมาณโลหะหนัก (แคดเมียม ปรอท สารหนู และทองแดง) ในตับกุ่มก้ามแดง
ผู้วิจัย	เปรมสุดา สุนทรพิธ
ปริญญา	วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต
ปีการศึกษา	2561
อาจารย์ที่ปรึกษา	รองศาสตราจารย์ ดร. อรินทร์ งามนิยม
อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม	ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. ทายาท ศรียามัย

การศึกษาการแสดงออกของยีน (Gene Expression) ที่ได้รับผลกระทบจากสิ่งแวดล้อมเป็นวิธีหนึ่งที่สามารถนำมาใช้ในการตรวจสอบการปนเปื้อนได้ ซึ่งให้ผลรวดเร็วและใช้ตัวอย่างปริมาณไม่มากในการตรวจสอบ ในสิ่งมีชีวิตที่มีการแสดงออกเมื่อถูกกระตุ้นด้วยโลหะหนักคือ ยีน Metallothionein (MT) และ Vitellogenin (VTG) ผู้วิจัยสนใจศึกษาการแสดงออกของยีน Metallothionein (MT) รวมทั้ง Vitellogenin (VTG) ในตับกุ่มก้ามแดงต่อปริมาณโลหะหนัก (แคดเมียม ปรอท สารหนู และทองแดง) จากแหล่งน้ำธรรมชาติ พื้นที่ ต. องครักษ์ อ.องครักษ์ จ.นครนายก โดยใช้เทคนิค real-time polymerase chain reaction (real-time PCR) จากการศึกษาพบว่า ยีน MT ตอบสนองต่อโลหะแคดเมียม รองลงมาคือ ปรอท สารหนู และทองแดง ตามลำดับ โดยมีระดับการตอบสนองที่ 3.08, 0.92, 0.91, และ 0.69 และยีน VTG ตอบสนองต่อโลหะปรอท รองลงมาคือ แคดเมียม สารหนู และทองแดง ตามลำดับ โดยมีระดับการตอบสนองที่ 1,176.33, 36.20, 8.16, และ 1.02 และการตอบสนองของยีน MT และ VTG ต่อตัวอย่างน้ำจากแหล่งน้ำธรรมชาติทั้ง 4 จุด พบการแสดงออกของยีน ในจุดที่ 2 มากที่สุด โดยมีระดับการแสดงออกอยู่ที่ 1.18 และ 5.25 ตามลำดับ จากผลการวิเคราะห์หา Pesticides ในตัวอย่างน้ำจากแหล่งน้ำธรรมชาติทั้ง 4 จุด ด้วยเทคนิค GC-MS พบเฉพาะสาร Procymidone ในตัวอย่างน้ำจุดที่ 1 ซึ่งเมื่อเทียบกับมาตรฐานของ NIST/EPA/NIH Mass Spectral Library (NIST14) มีความเหมือนอยู่ที่ 52 เปอร์เซ็นต์ การศึกษาการตอบสนองของยีน MT และ VTG ต่อโลหะแคดเมียม ปรอท สารหนู และทองแดงในตับกุ่มก้ามแดงเป็นองค์ความรู้ใหม่ที่ใช้เป็นตัวบ่งชี้ในระดับอนุพันธุศาสตร์ และเป็นข้อมูลพื้นฐานที่จะเป็นประโยชน์ต่อการศึกษาการตอบสนองของยีนในตับกุ่มก้ามแดงต่อโลหะชนิดอื่นๆต่อไป

คำสำคัญ : การแสดงออกของยีน/ กุ่มก้ามแดง/ เมทัลโลไธโอนีน

Title	METALLOTHIONEIN AND VITELLOGENIN GENES EXPRESSIONS IN HEPATOPANCREAS OF CRAYFISH (<i>Cherax quadricarinatus</i>) EXPOSED TO CADMIUM, MERCURY, ARSENIC AND COPPER
Author	PREMSUDA SOONTORNPIIT
Degree	MASTER OF SCIENCE
Academic Year	2018
Thesis Advisor	Associate Professor Arin Ngamniyom
Thesis Co-Advisor	Assistant Professor Dr.Thayat Sriyapai

The study of gene expression which is affected by environmental factors is one effective way to quickly detect contamination and reduce sample quantity. In general, the genes that respond the most to heavy metals include Metallothionein (MT) and Vitellogenin (VTG). This research is focus on studying gene expressions of MT and VTG in the hepatopancreas of crayfish exposed to cadmium, mercury, arsenic and copper from river located T. Ongkharak and A. Ongkharak in the Nakhon Nayok province. The technology employed in this study included real-time polymerase chain reaction (real-time PCR). The results of this study found that MT reacted primarily with cadmium, then mercury, arsenic and copper respectively, at levels of 3.08, 0.92, 0.91 and 0.69. The VTG gene reacted first with mercury, followed by cadmium, arsenic and copper at levels of 1,176.33, 36.20, 8.16 and 1.02, respectively. The expression of gene MT and VTG with sample of water from all four points of the river found that the expression of the gene at point No. 2 was the most reactive of all at 1.18 and 5.25 level orderly. Based on the results of the pesticides in water samples from four natural water sources using GC-MS technique found Procymidone only in water source No. 1, which was compared with the NIST/EPA/NIH Mass Spectral Library (NIST14). The results similar at fifty-two percent. The research of the expression of the MT and VTG gene with cadmium, mercury, arsenic and copper in the hepatopancreas of crayfish provided new knowledge that indicates the level of molecular genetics and helpful, basic knowledge about the expression of genes in hepatopancreas in red claw crayfish with other heavy metals.

Keyword : *C. quadricarinatus*/ MT expression/ heavy metal

กิตติกรรมประกาศ

ปริญญานิพนธ์ฉบับนี้สำเร็จลุล่วงด้วยดี โดยได้รับความกรุณา ความช่วยเหลือ การเอาใจใส่ การให้คำปรึกษา การอบรมสั่งสอน รวมทั้งกำลังใจอย่างดียิ่งจากรองศาสตราจารย์ ดร.อรินทน์ งามนิยม ที่ปรึกษาหลัก ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ทนายาท ศรียาภัย และผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.กัญจน์ ศิลป์ประสิทธิ์ ที่ปรึกษาร่วม ที่ได้สละเวลาอันมีค่าให้ความรู้ ให้คำปรึกษาแนะแนวทางในการจัดทำปริญญานิพนธ์ทุกขั้นตอน และกราบขอบพระคุณผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ภัทรพงษ์ เกริกสกุล ซึ่งท่านได้ให้คำแนะนำ แนวทางการแก้ไขและปรับปรุงข้อบกพร่องต่างๆ ทุกประการในการทำปริญญานิพนธ์นี้จนสำเร็จด้วยดี ผู้วิจัยขอกราบขอบพระคุณอาจารย์ทุกท่านเป็นอย่างสูงยิ่งไว้ ณ ที่นี้

กราบขอบพระคุณอาจารย์ ดร.ศรัญญา มณีทอง ผู้ทรงคุณวุฒิภายนอกจากมหาวิทยาลัยราชภัฏบุรีรัมย์ ซึ่งให้เกียรติมาเป็นประธานคณะกรรมการสอบปากเปล่า รองศาสตราจารย์ ดร.อรินทน์ งามนิยม ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ทนายาท ศรียาภัย ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ภัทรพงษ์ เกริกสกุล และผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.กัญจน์ ศิลป์ประสิทธิ์ ที่กรุณาเป็นคณะกรรมการสอบปากเปล่าปริญญานิพนธ์ ซึ่งท่านได้ให้คำแนะนำในการปรับปรุงปริญญานิพนธ์จนสมบูรณ์อย่างยิ่ง และประสาทวิชาความรู้แก่ผู้วิจัยจนสำเร็จการศึกษา

ขอขอบคุณผู้บริหาร อาจารย์ และเจ้าหน้าที่ภาควิชาเทคโนโลยีสิ่งแวดล้อมและการจัดการทรัพยากร คณะวิศวกรรมสิ่งแวดล้อมและการท่องเที่ยวเชิงนิเวศ มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ ที่ให้ความช่วยเหลือและคำแนะนำเสมอมา ขอขอบคุณผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.พิชาภัค ศรียาภัย คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ ที่เชื้อเชิญสถานที่ห้องวิจัยทางจุลชีววิทยา (ห้อง 19-1101) ในทำวิจัยจนสำเร็จลุล่วงเป็นอย่างดี

ขอกราบขอบพระคุณคุณพ่อ คุณแม่ พี่สาว ทุกคนในครอบครัว เพื่อนๆ พี่ๆ และน้องๆ ที่เป็นกำลังใจและมีส่วนช่วยในการทำปริญญานิพนธ์ให้สำเร็จลุล่วงและทำให้ประสบความสำเร็จในการศึกษา

ท้ายที่สุดนี้ข้าพเจ้าขอณาเอาผลประโยชน์อันเกิดจากปริญญานิพนธ์ฉบับนี้ทั้งหมดมอบเป็นกุศลแก่ผู้ล่วงลับทุกคน ที่ได้สละชีวิตเพื่อการทำปริญญานิพนธ์ของข้าพเจ้า

เปรมสุตา สุนทรพิธ

สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อภาษาไทย	ง
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ	จ
กิตติกรรมประกาศ.....	ฉ
สารบัญ	ช
สารบัญตาราง.....	ฌ
สารบัญรูปภาพ	ญ
บทที่ 1 บทนำ.....	1
ภูมิหลัง	1
ความมุ่งหมายของการวิจัย	4
ความสำคัญของการวิจัย	4
ขอบเขตของการวิจัย	4
สมมุติฐานของงานวิจัย.....	5
ผลที่คาดว่าจะได้รับจากงานวิจัย.....	5
บทที่ 2 เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง.....	6
ดัชนีทางชีวภาพ (Biological Indicators)	6
กุ้งก้ามแดง (Crayfish)	7
เมทัลโลไธโอนีน (Metallothionein) และ ไวเทลโลจีนิ (Vitellogenin)	15
โลหะหนัก (Heavy Metal)	19
แหล่งน้ำ.....	24
ข้อมูลพื้นฐานของพื้นที่ศึกษา	27
บทที่ 3 วิธีการดำเนินการวิจัย.....	31

สารเคมี	31
เครื่องมือ	32
สัตว์ที่ใช้ในการทดลอง.....	32
ลำดับดีเอ็นเอของ primer	32
วิธีดำเนินการวิจัย.....	33
บทที่ 4 ผลการทดลอง.....	43
การวิเคราะห์คุณภาพน้ำจากแหล่งน้ำธรรมชาติ ในพื้นที่ ต.องค์กรักษ์ อ.องค์กรักษ์ จ.นครนายก จำนวน 4 จุด	43
การทดลองเลี้ยงกุ้งก้ามแดง	45
การออกแบบโปรแกรมเพื่อการยืนยันขนาดผลิตภัณฑ์	46
การศึกษาการแสดงออกของยีน MT และ VTG ต่อปริมาณโลหะหนัก (แคดเมียม ปรอท สารหนู และทองแดง) ในเนื้อเยื่อตับกุ้งก้ามแดงด้วยเทคนิค real-time PCR	47
บทที่ 5 สรุปผล อภิปรายผล และข้อเสนอแนะ	53
สรุปผลการวิจัย.....	53
อภิปรายผล	54
ข้อเสนอแนะ	55
บรรณานุกรม	57
ภาคผนวก.....	64
ประวัติผู้เขียน.....	80

สารบัญตาราง

หน้า

ตาราง 1 ความแตกต่างระหว่างกุ้งก้ามแดง <i>Procambarus clarkii</i> กับ <i>Cherax</i> spp.....	10
ตาราง 2 แสดงสภาวะของการวิเคราะห์โลหะหนัก โดยใช้เครื่อง ICP-MS	36
ตาราง 3 แสดงสภาวะของการวิเคราะห์ pesticides โดยใช้เครื่อง GC-MS.....	37
ตาราง 4 แสดงชนิดของตัวอย่างน้ำ โดยแต่ละตัวอย่างทำ 3 ซ้ำ	39
ตาราง 5 คุณภาพน้ำทางกายภาพและเคมี	43
ตาราง 6 ขนาดและน้ำหนักของกุ้งก้ามแดงในแต่ละตัวอย่าง	45
ตาราง 7 ชนิดและลำดับดีเอ็นเอของ primer ที่ใช้ในการทดลองจากบริษัท Bio Basic Inc.....	47
ตาราง 8 การแสดงออกของยีน MT ในเนื้อเยื่อตับกุ้งก้ามแดงต่อโลหะหนักแต่ละชนิดด้วยเทคนิค real time-PCR ($*P<0.05$)	48
ตาราง 9 การแสดงออกของยีน MT ในเนื้อเยื่อตับกุ้งก้ามแดงในแหล่งน้ำธรรมชาติทั้ง 4 จุด ด้วยเทคนิค real time-PCR ($*P<0.05$)	48
ตาราง 10 การแสดงออกของยีน VTG ในเนื้อเยื่อตับกุ้งก้ามแดงต่อโลหะหนักแต่ละชนิดด้วยเทคนิค real time-PCR ($*P<0.05$)	49
ตาราง 11 การแสดงออกของยีน VTG ในเนื้อเยื่อตับกุ้งก้ามแดงในแหล่งน้ำธรรมชาติทั้ง 4 จุดด้วยเทคนิค real time-PCR ($*P<0.05$)	50

สารบัญรูปภาพ

หน้า

ภาพประกอบ 1 ภาพกุ้งก้ามแดงอเมริกัน (<i>Procambarus Clarkii</i>).....	8
ภาพประกอบ 2 ภาพผลกระทบของกุ้งก้ามแดงอเมริกันต่อระบบนิเวศ	9
ภาพประกอบ 3 ภาพการจำแนกชนิดของกุ้งก้ามแดงสกุล <i>P. alleni</i> และ <i>P. clarkii</i>	11
ภาพประกอบ 4 ภาพแสดงลักษณะอวัยวะภายในของกุ้งก้ามแดง.....	11
ภาพประกอบ 5 ภาพตับกุ้งก้ามแดง (Hepatopancreas)	12
ภาพประกอบ 6 ภาพกระบวนการขนส่ง การรักษาสมดุล และการลดพิษของธาตุทองแดงภายในเซลล์พืช.....	15
ภาพประกอบ 7 จุดเก็บตัวอย่างน้ำจากแหล่งน้ำธรรมชาติในพื้นที่ ต.องครักษ์ อ.องครักษ์ จ. นครนายก.....	34
ภาพประกอบ 8 โครงสร้างของ Procymidone ที่ได้จากการวิเคราะห์ด้วยเครื่อง GC-MS.....	44
ภาพประกอบ 9 Mass Spectrum ของ Procymidone เมื่อเทียบกับ NIST Standard Reference Database (NIST14)	44
ภาพประกอบ 10 ภาพแถบผลิตรัณฑ์ของยีน MT, Elf1, VTG (ก) และภาพแถบผลิตรัณฑ์ยีน MT (ข).....	46
ภาพประกอบ 11 กราฟการแสดงออกของยีน MT ในตับกุ้งก้ามแดงในตัวอย่างน้ำทั้งหมด 10 ตัวอย่าง ทำ 3 ซ้ำ	50
ภาพประกอบ 12 กราฟแสดง melting curve ของยีน Elf1 VTG และ MT	51
ภาพประกอบ 13 กราฟแสดง melting curve ระหว่างยีน Elf1 และ VTG	51
ภาพประกอบ 14 กราฟแสดง melting curve ระหว่างยีน Elf1 และ MT	52
ภาพประกอบ 15 กราฟมาตรฐานของยีน Elf1 ที่ความเข้มข้นต่างๆ	52

บทที่ 1

บทนำ

ภูมิหลัง

ยีน Metallothionein (MT) เป็นโปรตีนน้ำหนักโมเลกุลต่ำ 6-7 kDa มีหมู่ thiol (-SH) อยู่ใน cysteine ทำให้สามารถจับกับโลหะหนัก (ดวงใจ พิสุทธิธรราชชัย & ธนากร เหมาะสม, 2560) ทำหน้าที่เกี่ยวข้องกับการรักษาสมดุลของร่างกาย ป้องกันเซลล์จากโลหะหนักที่อันตราย และสภาวะความเครียด (ดุจฤดี ปานพรหมมินทร์ & สุภาวดี พุ่มพวง, 2556) นอกจากนี้การลดพิษจากโลหะยังสามารถนำมาประยุกต์ใช้รักษาผู้ป่วยที่มีความผิดปกติทางพันธุกรรมซึ่งอาจได้รับอันตรายจากโลหะแม้เข้าสู่ร่างกายในปริมาณเพียงเล็กน้อยได้ เช่น ในการรักษาผู้ป่วยโรควิลสัน (Wilson's disease) (เมธา มีแต้ม, 2554) และโปรตีน MT ยังช่วยปกป้องเซลล์จากพิษของแคดเมียม (วาจาทิพย์ บุณยวิจิต, ธนากร เกิดอินทร์, อีรพงศ์ ชัยมี, & ธาทิพย์ บุญส่ง, 2557) ยีน Vitellogenin (VTG) เป็นพลาสมาโปรตีน (plasma protein) ที่สังเคราะห์โดยตับ ภายใต้การควบคุมของฮอร์โมนและเป็นสารตั้งต้นที่สำคัญของโปรตีนโยลค (yolk protein) ของสัตว์มีกระดูกสันหลัง เช่น ปลาชนิดต่างๆ สัตว์ครึ่งบกครึ่งน้ำ (amphibian) สัตว์เลื้อยคลาน (reptile) และสัตว์ปีก (avian) (พีรพงษ์ พึ่งแย้ม, 2545) กระบวนการไวเทลโลเจนีซิสเกี่ยวข้องกับการผลิตโปรตีนไข่แดงและกระบวนการพัฒนาเซลล์ไข่ ซึ่งเป็นกระบวนการสำคัญในขั้นตอนการสืบพันธุ์ของสัตว์ที่ออกลูกเป็นไข่ (oviparous animals) (Tseng, Chen, Kou, Lo, & Kuo, 2001) Vitellogenin (VTG) เป็นโปรตีนตั้งต้นที่ทำหน้าที่ในการผลิตโปรตีนไวเทลลิน (vitellin) หรือโปรตีนไข่แดง ซึ่งเป็นโปรตีนที่จำเป็นต่อการพัฒนาเซลล์ไข่และตัวอ่อน (Tiu, Benzie, & Chan, 2008) นอกจากการมีบทบาทในแง่โภชนาการสำหรับการสืบพันธุ์และการพัฒนาเอมบริโอแล้ว โปรตีนไวเทลโลเจนีซิน ยังมีส่วนเกี่ยวข้องในการนำแร่ธาตุ ไขมัน และสารอื่นๆ เข้าไปในเซลล์ไข่ที่กำลังมีพัฒนาการอีกด้วย (Wilder, Okumura, & Tsutsui, 2010) จากการศึกษาแบบการแสดงออกของยีนที่เกี่ยวข้องกับการผลิตโปรตีนไวเทลโลเจนีซินในอวัยวะที่แตกต่างกัน ในเฮฟาโตแพนแครีซและรังไข่ของกิ้งก่าเหี้ย และกิ้งก่าดำ อวัยวะหลักที่เป็นแหล่งผลิตโปรตีนไวเทลโลเจนีซินในกิ้งก่า คือทั้งเฮฟาโตแพนแครีซและรังไข่ ซึ่งมีความแตกต่างจากครัสเตเชียนชนิดอื่น เช่น ปูและกุ้งมังกร ที่บริเวณที่มีการผลิตโปรตีนไวเทลโลเจนีซินจะจำกัดอยู่ที่เฮฟาโตแพนแครีซเพียงอวัยวะเดียว (รชนิมุข หิรัญสัจจาเลิศ, 2556)

ปัจจุบันได้มีการนำสิ่งมีชีวิตต่าง ๆ มาใช้เป็นตัวบ่งชี้การปนเปื้อนของโลหะหนักในสิ่งแวดล้อม เช่น การประเมินคุณภาพน้ำโดยใช้สัตว์ไม่มีกระดูกสันหลังหน้าดิน ประยุกต์ใช้วิธี Belgian Biotic Index (BBI) บริเวณลำน้ำใกล้โรงงานผลิตน้ำมันปาล์มใน อำเภอหนองใหญ่ จังหวัดชลบุรี (ณัฐธิดา คลังกลาง & เรวดี โรจนกานนท์, 2554) และการประเมินโลหะหนักบริเวณพื้นที่อ่าวบ้านดอน จังหวัดสุราษฎร์ธานี โดยใช้หอยนางรมเป็นตัวบ่งชี้ (สมทิพย์ ด้านธีรวิทย์, สุวัฒน์ ธนานุภาพไพศาล, วัสสา คงนคร, เจิดจรรย์ ศิริวงศ์, & อัญชลี ฤกษ์ดี, 2556) การศึกษาคุณลักษณะของยีน MT ในปลาดุกอุย โดยวิธี Real-time PCR พบว่า การแสดงออก ของยีน MT ในเนื้อเยื่อตับและเหงือกสามารถใช้เป็นดัชนีชีวภาพการสัมผัสแคดเมียมในน้ำ (ดุจฤดี ปานพรหมมินทร์ & สุภาวดี พุ่มพวง, 2556) และการศึกษาการแสดงออกของ ยีน MT ในปลานิล โดยได้ทำการเปรียบเทียบผลของแคดเมียมและคอปเปอร์ที่ความเข้มข้นและระยะเวลาแตกต่างกัน ซึ่งแคดเมียม 0.25 µg/Lสามารถกระตุ้นให้เกิดการแสดงออกของยีนภายใน 1 ชั่วโมง ขณะที่คอปเปอร์ 25 µg/L จะมีการแสดงออกของยีนเมื่อได้รับนาน 2 ชั่วโมง (ดวงใจ พิสุทธิธำราช & ธนากร เหมะสถล, 2560) การใช้เทคนิค qRT-PCR ในการหาปริมาณข้อมูลการแสดงออกของยีนอย่างรวดเร็วและแม่นยำ โดยใช้ยีนอ้างอิงในการทำมาตรฐานเพื่อศึกษาระดับการแสดงออกในกุ้งสายพันธุ์ *P. clarkii* พบว่า EIF และ 18S เป็นยีนอ้างอิงที่เหมาะสมที่สุดสำหรับข้อมูลการแสดงออกจากเนื้อเยื่อต่างๆ ในขณะที่ TBP และ EIF มีความเหมาะสมกับข้อมูลการแสดงออกจากระยะพัฒนาการของรังไข่ที่ต่างกัน (Jiang et al., 2015) การเปลี่ยนแปลงรูปแบบการแสดงออกของ multi-transcript ของตับ ซึ่งถูกแยกออกมาจาก *Cherax quadricarinatus* ตัวผู้ โดยวิธี cDNA microarray hybridisations มีการแสดงออกของยีนแตกต่างกัน (Yudkovski et al., 2007) และการหาความเข้มข้นของโลหะหนักในเนื้อเยื่อกุ้ง โดยวิเคราะห์หาปริมาณของโลหะหนัก (ตะกั่ว ทองแดง แคดเมียม โครเมียม สังกะสี) ในกล้ามเนื้อ ตับ และเปลือก ของ *Cherax* ของกุ้งที่มีขนาดต่างกัน 2 ขนาด (Juveniles และ Adults) โดยพบปริมาณตะกั่วและสังกะสีในตะกอนและพีช(ที่เป็นแหล่งอาหารของสัตว์) สูงกว่าในเนื้อเยื่อและอวัยวะต่างๆ ซึ่งชี้ให้เห็นว่าไม่เกิดการส่งผ่านทางชีวภาพในโลหะหนัก 2 ชนิดนี้ ส่วนทองแดงและโครเมียมแสดงการเปลี่ยนแปลงทางชีวภาพในเนื้อเยื่อทั้งหมด ในขณะที่แคดเมียมพบเฉพาะในตับ (hepatopancreas) (Bruno, Volpe, De Luise, & Paolucci, 2006)

กุ้งก้ามแดงเป็นสัตว์น้ำต่างถิ่นที่กระทรวงเกษตรและสหกรณ์ได้กำหนดให้กิจการการเพาะเลี้ยงกุ้งก้ามแดง (*Procambarus clarkii* หรือ *Cherax* spp.) เป็นกิจการการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำควบคุม ตามกฎกระทรวง เมื่อวันที่ 3 พฤษภาคม 2559 เพื่อเป็นการป้องกันปัญหาและ

ผลกระทบที่อาจเกิดขึ้นจากการเพาะเลี้ยงพันธุ์สัตว์น้ำต่างถิ่น ตามมติคณะรัฐมนตรีเมื่อวันที่ 28 เมษายน 2552 เรื่อง มาตรการป้องกัน ควบคุม และกำจัดชนิดพันธุ์ต่างถิ่น โดยได้กำหนดให้กุ้งก้ามแดงชนิด *Cherax quadricarinatus* และกุ้งก้ามแดงชนิด *Procambarus clarkii* อยู่ในทะเบียนชนิดพันธุ์ต่างถิ่นที่ควรป้องกัน ควบคุม และกำจัดของประเทศไทย เนื่องจากเป็นชนิดพันธุ์ต่างถิ่นที่มีแนวโน้มรุกราน โดยกำหนดแนวทางปฏิบัติให้หน่วยงานที่รับผิดชอบดำเนินการติดตามการแพร่กระจาย และควบคุม ทั้งนี้ จากการศึกษารวบรวมข้อมูล พบว่า สัตว์น้ำต่างถิ่นดังกล่าวมีการรุกรานและส่งผลกระทบต่อสิ่งแวดล้อมและสัตว์น้ำพื้นเมืองในหลายประเทศ เช่น เบลเยียม อิตาลี ญี่ปุ่น เป็นต้น สำหรับประเทศไทยมีการเพาะเลี้ยงอย่างแพร่หลายและมีรายงานพบการแพร่กระจายในอ่างเก็บน้ำและแม่น้ำในจังหวัดสระแก้ว บุรีรัมย์ ศรีสะเกษ กาญจนบุรี และเชียงใหม่ แสดงให้เห็นว่ากุ้งก้ามแดงสามารถอาศัยอยู่ในแหล่งน้ำธรรมชาติของไทย และอาจมีแนวโน้มที่จะรุกรานสัตว์น้ำพื้นเมือง ดังนั้นจึงต้องมีการติดตามสถานการณ์อย่างใกล้ชิด นอกจากนี้ ยังต้องติดตามเฝ้าระวังโรคที่อาจพบในกุ้งก้ามแดง ซึ่งกุ้งก้ามแดง *Cherax quadricarinatus* และ *Procambarus clarkii* มีความเสี่ยงที่จะเป็นพาหะของโรคเครย์ฟิชเพลก (Crayfish plague) และโรคจุดขาว (White spot disease) ด้วย (กองนโยบายและยุทธศาสตร์พัฒนาประมง (กนป.), 2560) ซึ่งข้อมูลการศึกษาวิจัยเกี่ยวกับผลกระทบต่อสิ่งแวดล้อมจากกุ้งก้ามแดงยังมีไม่มากนัก

ประเทศไทยเป็นประเทศหนึ่งที่มีความเสี่ยงต่อการปนเปื้อนโลหะหนัก เนื่องจากมีกิจกรรมหลายประเภทที่เป็นแหล่งกำเนิด และนำโลหะหนักมาใช้กันมาก เช่น ในด้านอุตสาหกรรม ด้านเกษตรกรรม ส่วนใหญ่โลหะหนักที่ปนเปื้อนในดิน เช่น สารหนู (As), โคบอลต์ (Co), แคดเมียม (Cd), โครเมียม (Cr), ทองแดง (Cu), ปรอท (Hg), นิกเกิล (Ni), ตะกั่ว (Pb), และสังกะสี (Zn) โลหะหนักสามารถถ่ายทอดสู่สิ่งมีชีวิต โดยผ่านไปตามห่วงโซ่อาหารแพร่กระจายในสิ่งแวดล้อม เมื่อมนุษย์ได้รับจะเข้าไปสะสมในเนื้อเยื่อ ทำให้เกิดอันตรายอาจพิการหรือเสียชีวิตได้ (ดวงกมล คำสอน & ชมพูนุท ไชยรักษ์, 2556) ซึ่งในปี พ.ศ. 2545 และ พ.ศ. 2547 ประเทศไทยประสบปัญหาการปนเปื้อนของแคดเมียมเกินค่ามาตรฐาน CODEX ในดินและข้าวบริเวณลุ่มน้ำแม่ตาบ จังหวัดตาก (ธนภัทร ปลื้มพวง, ธงชัย มาลา, & อรุณศิริ กำลัง, 2557) อำเภอองครักษ์ จังหวัดนครนายก เป็นพื้นที่ที่ประชาชนประกอบอาชีพเกษตรกรรมเป็นหลัก ทำนามากกว่า 2 ครั้งในรอบปี และมีพื้นที่นาสูงถึงร้อยละ 77 ของพื้นที่ทั้งหมดของอำเภอ ชวนนาในพื้นที่ที่มีพฤติกรรมการใช้สารเคมีในการกำจัดศัตรูพืช (กฤติญา แสงภักดี et al., 2557) จากสภาพปัญหาข้างต้น ผู้วิจัยสนใจที่จะศึกษาการแสดงออกของยีน Metallothionein และ Vitellogenin ในตับกุ้งก้ามแดง (*Cherax*

quadricarinatus) ต่อปริมาณโลหะหนัก (แคดเมียม ปรอท สารหนู และทองแดง) โดยเก็บตัวอย่างน้ำจากแหล่งน้ำธรรมชาติในพื้นที่ ต.องครักษ์ อ.องครักษ์ จ.นครนายก มาทดลองเลี้ยงกุ้งก้ามแดง โดยใช้เทคนิค real-time PCR

ความมุ่งหมายของการวิจัย

เพื่อศึกษาการตอบสนองของยีน Metallothionein และ Vitellogenin ในตับกุ้งก้ามแดง ต่อปริมาณแคดเมียม ปรอท สารหนู และทองแดง ในตัวอย่างน้ำตามธรรมชาติโดยใช้เทคนิค real-time PCR

ความสำคัญของการวิจัย

จากการวิจัยนี้จะได้องค์ความรู้ใหม่เกี่ยวกับการแสดงออกของยีน Metallothionein และ Vitellogenin ต่อปริมาณโลหะหนัก (แคดเมียม ปรอท สารหนู และทองแดง) ในตับกุ้งก้ามแดง ในแหล่งน้ำธรรมชาติ พื้นที่ ต.องครักษ์ อ.องครักษ์ จ.นครนายก โดยใช้เทคนิค real-time PCR ในปัจจุบันการศึกษาการแสดงออกของยีน MT ในกุ้งก้ามแดงยังมีน้อย ซึ่งงานวิจัยนี้สามารถใช้เป็นข้อมูลในการศึกษาโลหะชนิดอื่นๆ ในกุ้งก้ามแดงต่อไป นอกจากนี้ยังใช้เป็นตัวบ่งชี้ในระดับอนุพันธุศาสตร์ให้แก่ผู้ที่สนใจศึกษาและหน่วยงานที่เกี่ยวข้อง นำไปพัฒนาองค์ความรู้ใหม่ๆ หรือใช้เป็นข้อมูลในการแก้ปัญหาการปนเปื้อนในสิ่งแวดล้อมต่อไป

ขอบเขตของการวิจัย

การศึกษากการแสดงออกของยีน Metallothionein และ Vitellogenin ในตับกุ้งก้ามแดงต่อปริมาณโลหะหนัก (แคดเมียม ปรอท สารหนู และทองแดง) ในแหล่งน้ำธรรมชาติ พื้นที่ ต.องครักษ์ อ.องครักษ์ จ.นครนายก เริ่มจากการสำรวจสภาพแวดล้อมและแหล่งน้ำธรรมชาติในพื้นที่ศึกษา เก็บตัวอย่างน้ำ โดยตัวอย่างน้ำที่เก็บได้จะนำมาตรวจวัดอุณหภูมิ ค่า pH ค่าการละลายของออกซิเจนในน้ำ ค่าการนำไฟฟ้า ค่าความขุ่น แคดเมียม ปรอท สารหนู และทองแดง เพื่อใช้เป็นข้อมูลในการออกแบบการทดลองเลี้ยงกุ้งก้ามแดง สกุล *Cherax quadricarinatus* จากนั้นนำตับกุ้งก้ามแดงมาตรวจวัดปริมาณยีน MT และ VTG เพื่อศึกษากการแสดงออกของยีน MT และ VTG ต่อปริมาณโลหะหนัก (แคดเมียม ปรอท สารหนู และทองแดง)

สมมุติฐานของงานวิจัย

ยีน Metallothionein และ Vitellogenin ในตับกึ่งกำแดงมีการแสดงออกต่อปริมาณโลหะหนัก (แคดเมียม ปปรอท สารหนู และทองแดง) โดยเก็บตัวอย่างน้ำจากแหล่งน้ำธรรมชาติ พื้นที่ ต.องครักษ์ อ.องครักษ์ จ.นครนายก

ผลที่คาดว่าจะได้รับจากงานวิจัย

1. ทราบการแสดงออกของยีน Metallothionein และ Vitellogenin ในตับกึ่งกำแดงต่อปริมาณโลหะหนัก (แคดเมียม ปปรอท สารหนู และทองแดง) โดยเก็บตัวอย่างน้ำจากแหล่งน้ำธรรมชาติ พื้นที่ ต.องครักษ์ อ.องครักษ์ จ.นครนายก วิเคราะห์โดยเทคนิค real-time PCR
2. ทราบปริมาณโลหะหนัก (แคดเมียม ปปรอท สารหนู และทองแดง) ในแหล่งน้ำธรรมชาติ พื้นที่ ต.องครักษ์ อ.องครักษ์ จ.นครนายก



บทที่ 2

เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

ดรชนีทางชีวภาพ (Biological Indicators)

ความหมายของดรชนีทางชีวภาพ

การอาศัยหลักการวิเคราะห์ทางเคมีจากตัวอย่างที่สุ่มเก็บคุณภาพสิ่งแวดล้อมยังไม่เพียงพอ ทั้งนี้มีสัตว์และพืชหลายชนิดที่ใช้เป็นประโยชน์ในการเป็นตัวคอยเตือนภัยจากมลพิษในสภาพแวดล้อมได้เป็นอย่างดี สิ่งมีชีวิตเหล่านี้เรียกว่า “ดรชนีทางชีวภาพ (Biological Indicators or Bio-indicators or Bio-monitors) สัตว์มีข้อดีที่จะใช้เป็นตัวดรชนีบ่งชี้ระดับมลพิษในสิ่งแวดล้อมหลายประการ ซึ่งจะรับมลพิษเข้าสู่ร่างกายได้ตลอดเวลา และระดับมลพิษภายในตัวจะเพิ่มขึ้นตามระยะเวลาและพฤติกรรมที่จะได้รับมลพิษ ในขณะที่การวิเคราะห์ทางเคมีต้องใช้การเก็บตัวอย่างที่ถูกเวลาและสถานที่เท่านั้นจึงสามารถวิเคราะห์ได้ สัตว์จะแสดงพฤติกรรมหรืออาการที่เกิดจากมลพิษให้เห็นภายนอกลำตัวได้ง่าย อีกทั้งการประเมินการสะสมของมลพิษในสิ่งแวดล้อมโดยผ่านทางห่วงโซ่อาหาร (Food chain) สามารถทำได้ในสัตว์เท่านั้น ข้อดีอีกประการหนึ่งคือ ปริมาณมลพิษที่เก็บสะสมอยู่ในเนื้อเยื่อของสัตว์จะมีปริมาณสูงเพียงพอที่จะตรวจสอบได้ยาวนาน ถึงแม้ว่าบางครั้งในสภาพแวดล้อมมลพิษจะสูญหายไปหมดแล้ว (จารุจินต์ นกัตะภฏ, 2548)

งานวิจัยเกี่ยวกับการใช้ดรชนีทางชีวภาพ

ณัฐธิดาและเวรดี (2554) ได้ศึกษาการใช้สัตว์ไม่มีกระดูกสันหลังหน้าดิน เพื่อเป็นดัชนีชี้วัดคุณภาพน้ำทางชีวภาพโดยการประยุกต์ใช้ Belgian Biotic Index (BBI) กรณีศึกษาลำน้ำไถ้โรงงานผลิตน้ำมันปาล์มใน อำเภอนองใหญ่ จังหวัดชลบุรี พบว่าน้ำเสียจากโรงงานผลิตน้ำมันปาล์มที่บริเวณท้ายน้ำมีค่าความเข้มข้นของสารอินทรีย์สูง แม้น้ำที่ผ่านการบำบัดแล้ว ก็ยังมีค่าสูงเกินกว่าค่ามาตรฐานคุณภาพน้ำทิ้งที่กำหนด ทั้งนี้มีความสัมพันธ์กับการวิเคราะห์คุณภาพน้ำทางกายภาพและเคมี ซึ่งพบว่า สถานีท้ายน้ำมีปริมาณออกซิเจนละลายน้ำต่ำและมีการปนเปื้อนของสารอินทรีย์สูงกว่าสถานีต้นน้ำ จึงกล่าวได้ว่า การใช้ BBI สามารถประเมินคุณภาพน้ำได้อย่างมีประสิทธิภาพ ซึ่งหากมีการปนเปื้อนของน้ำทิ้งดังกล่าวลงสู่แหล่งน้ำ ในปริมาณที่มากพอจะทำให้คุณภาพน้ำเสื่อมโทรมลงและส่งผลถึงสิ่งมีชีวิตที่อาศัยอยู่ในแหล่งน้ำได้ (ณัฐธิดา คลังกลาง & เวรดี โรจนกนันท, 2554)

สมทิพย์และคณะ (2556) ได้ประเมินผลกระทบประเด็นปัญหาโลหะหนักในระบบนิเวศของบริเวณพื้นที่อ่าวบ้านดอน จังหวัดสุราษฎร์ธานี และการใช้หอยนางรมเป็นตัวบ่งชี้ ซึ่งการ

ปนเปื้อนโลหะหนักในหอยนางรมที่เลี้ยงบริเวณอ่าวบ้านดอน พบว่าหอยที่เลี้ยงที่ไซยามีอัตราการเติบโตช้ากว่าหอยที่เลี้ยงที่ท่าทองและกะเต๊ะ และเมื่อมีการเลี้ยงหอยนางรมนานขึ้นจะเกิดการสะสมของ Cd และ Pb ในเนื้อหอยมากขึ้น อัตราการสะสมของ Cd ในเนื้อหอยนางรมพบว่า มีค่าคงที่ในช่วง 0.2859-0.4189 $\mu\text{gCd/g}$ เนื้อหอยต่อเดือน (นน.แห้ง) ส่วน Pb พบว่ามีค่าในช่วง 0.0544-0.131 $\mu\text{gPb/g}$ เนื้อหอยต่อเดือน (นน.แห้ง) และเมื่อพิจารณาค่าคงที่ของการสะสมของ Pb และ Cd พบว่าค่าคงที่ของการสะสมของ Cd ในเนื้อหอยมีค่าสูงกว่า Pb และเมื่อเปรียบเทียบกับระดับการปนเปื้อนของโลหะหนักในหอยนางรมกับค่ามาตรฐานของค่าระดับโลหะหนักที่อนุญาตให้มีได้ในสัตว์น้ำ พบว่าต่ำกว่าเกณฑ์มาตรฐานแคดเมียมในหอยนางรมของมาตรฐานคณะกรรมการการประชาคมยุโรป (สมทิพย์ ด้านธีรวิชัย et al., 2556)

กุ้งก้ามแดง (Crayfish)

ชีววิทยาของ Crayfish

Crayfish เป็นชื่อสามัญที่ใช้เรียกกุ้งน้ำจืดใน Infraorder Astacdea Latreille, 1802 ลักษณะทั่วไปคือ เป็นกุ้งที่มีรูปร่างลำตัวใหญ่ เปลือกหนา ก้ามใหญ่แข็งแรง มีถิ่นกำเนิดในทวีปอเมริกาเหนือ ทวีปยุโรป โอเชียเนีย และบริเวณใกล้เคียง เช่น อียิปต์ และเอเชียตะวันออกเฉียงใต้ ในประเทศไทยเรียกกุ้งกลุ่มนี้ว่า กุ้งก้ามแดง

การเรียงลำดับทางอนุกรมวิธาน

Kingdom: Animalia

Phylum: Arthropoda

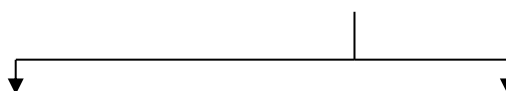
Subphylum: Crustacea

Class: Malacostraca

Order: Decapoda

Suborder: Pleocyemata

Infraorder: Astacidea



Superfamily Astacoidea Latreille, 1802

Superfamily Parastacoidea Huxley, 1879

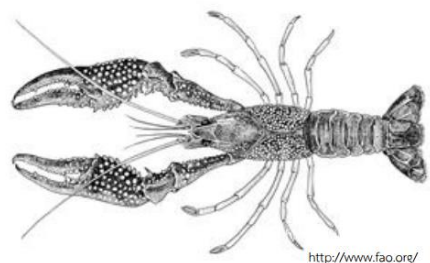
Family Astacidae

Family Parastacidae: *Cherax* spp.

Family Cambaridae : *Procambarus clarkii*

ที่มาจาก: http://www.fisheries.go.th/if-trang/images/download/cherex_manual.pdf

กุ้งก้ามแดงอเมริกัน (*Procambarus clarkii*)



ภาพประกอบ 1 ภาพกุ้งก้ามแดงอเมริกัน (*Procambarus Clarkii*)

ที่มาจาก: http://www.fisheries.go.th/if-trang/images/download/cherex_manual.pdf

ถิ่นกำเนิด : ตะวันออกเฉียงเหนือของเม็กซิโก และภาคกลางตอนใต้ของสหรัฐอเมริกา
ปัจจุบันมีรายงานการนำเข้าและรุกรานในหลายประเทศ เช่น เบลเยียม อียิปต์ อิตาลี ญี่ปุ่น

การแพร่กระจายในไทย : ปัจจุบันมีรายงานการแพร่กระจายในธรรมชาติบริเวณ
แม่น้ำแควใหญ่ และแม่น้ำแควน้อย จังหวัดกาญจนบุรี

นำเข้ามาจาก : สหรัฐอเมริกา ในปี พ.ศ. 2530

วัตถุประสงค์ : เพื่อเป็นสัตว์เลี้ยงสวยงามและการเพาะเลี้ยงเป็นอาหาร

ลักษณะเด่น : เป็นกุ้งก้ามแดงน้ำจืด ส่วนใหญ่สามารถพบได้ในน้ำจืดที่มีอุณหภูมิ
ค่อนข้างอุ่น เช่น ในแหล่งน้ำที่ไหลเอื่อยๆ เช่น แม่น้ำ บึง อ่างเก็บน้ำ ระบบชลประทาน และนาข้าว
สามารถเจริญเติบโตได้เร็วในช่วงฤดูที่มีน้ำ อาจมีน้ำหนักถึง 50 กรัม และมีขนาดความยาว 5.5 –
12 เซนติเมตร

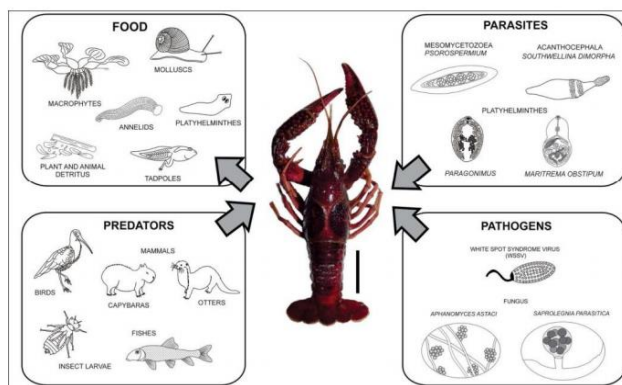
ขนาดสูงสุด : 20 เซนติเมตร

การสืบพันธุ์ : จับคู่ในปลายฤดูใบไม้ร่วง ไข่เจริญพันธุ์มีอายุประมาณ 3 เดือน เพศผู้
มีขนาด 10 เซนติเมตร อาจสามารถผลิตไข่ได้ถึง 500 ใบ ปฏิสนธิภายในตัวโดยสเปิร์มจะผ่านเข้าไป
ในเพศเมียตรงขาเดินคู่ที่ 3 ขณะที่เพศเมียบอกปล่อยไข่ออกมาพร้อมๆกัน

อาหาร : ตัวอ่อนแมลง ลูกอ๊อด และหอย

พฤติกรรมทั่วไป : เป็นสัตว์หากินกลางคืน เวลากลางวันมันซุกซ่อนตัวตามซอกโพรง
หลืบหิน นิยส์ก้าวร้าวกับพวกเดียวกัน ลอกคราบหลายครั้ง

ผลกระทบ : พฤติกรรมการขุดรูของมันก่อให้เกิดความเสียหายแก่คันดิน เขื่อน ฝาย กั้นน้ำ รวมทั้งเป็นพาหะของปรสิตหลายชนิด ซึ่งอาจก่อให้เกิดปัญหาด้านสุขภาพในพื้นที่ที่มีสัตว์ชนิดนี้อาศัยอยู่ อีกทั้งเป็นสัตว์ที่มีก้ามแข็งแรง ถ้าหลุดรอดไปในธรรมชาติอาจมีการทำลายระบบนิเวศท้องถิ่น ถ้าไม่มีการควบคุมการเลี้ยงอาจกระทบต่อห่วงโซ่อาหารทางธรรมชาติได้



ภาพประกอบ 2 ภาพผลกระทบของกิ้งก่าแดงอเมริกันต่อระบบนิเวศ

ที่มาจาก: http://www.fisheries.go.th/if-trang/images/download/cherex_manual.pdf

กิ้งก่าแดงสกุล *Cherax* (*Cherax* spp.)

ถิ่นกำเนิด : ออสเตรเลียและเกาะนิวกีนิ

การแพร่กระจายในไทย : มีรายงานว่ามีการแพร่พันธุ์แล้วในอ่างเก็บน้ำแถบจังหวัดบุรีรัมย์ จังหวัดศรีสะเกษ กาญจนบุรี และเชียงใหม่

นำเข้าจาก ภาคเอกชนออสเตรเลียในปี พ.ศ. 2538 (ไม่สามารถระบุชนิดได้) และโครงการหลวนน้ำเข้ากิ้งก่าแดงชนิด *Cherax quadricarinatus* เพื่อวิจัยและเพาะพันธุ์ ตั้งแต่ปี 2548 โดยทดลองเลี้ยงกิ้งก่าแดงในนาข้าวของเกษตรกรชาวเขา ที่บ้านแม่กลางหลวง ดอยอินทนนท์ อ.จอมทอง จ.เชียงใหม่

วัตถุประสงค์ : เพื่อเลี้ยงเป็นสัตว์สวยงาม และการเพาะเลี้ยงเป็นอาหาร

ขนาดสูงสุด : 20 เซนติเมตร

การสืบพันธุ์ : เพศเมียวางไข่ปีละ 3 ครั้ง และลอกคราบปีละ 2 ครั้งโดยเฉลี่ย ส่วนใหญ่การวางไข่จะเกิดขึ้นในช่วงฤดูใบไม้ผลิและฤดูร้อน

อาหาร : กินซากพืชซากสัตว์

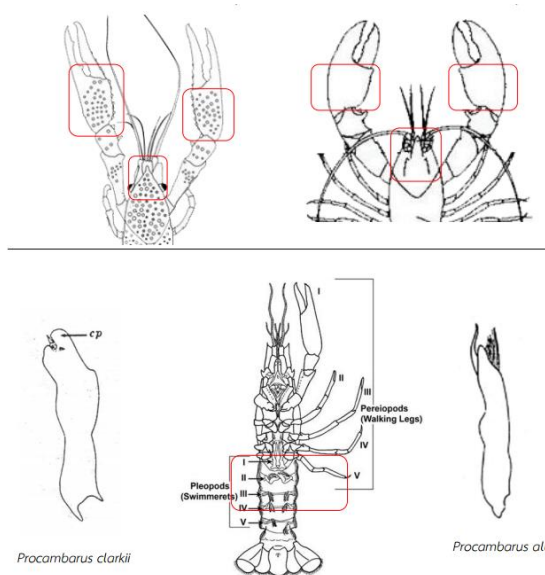
พฤติกรรมทั่วไป : มันอาศัยอยู่ตามโคลนดินหรือใต้ขอนไม้ตามหนองน้ำหรือลำธาร

ผลกระทบ : เป็นพาหะของปรสิตหลายชนิด ซึ่งอาจก่อให้เกิดปัญหาด้านสุขภาพในพื้นที่ที่มีสัตว์ชนิดนี้อยู่ และเป็นสัตว์ที่มีก้ามแข็งแรง ถ้าหลุดรอดไปในธรรมชาติอาจมีการทำลายระบบนิเวศท้องถิ่น ถ้าไม่มีการควบคุมการเลี้ยงอาจกระทบต่อห่วงโซ่อาหารทางธรรมชาติได้ (กรมประมง กระทรวงเกษตรและสหกรณ์, 2558)

ปัจจุบันมีการเพาะเลี้ยงกันอย่างแพร่หลาย เนื่องจากเป็นกุ้งที่มีเนื้อและรสชาติคล้ายกับกุ้งล็อบสเตอร์น้ำจืด อีกทั้งยังเป็นสายพันธุ์ที่ทนต่อสภาพภูมิอากาศ เลี้ยงง่าย และเจริญเติบโตได้ดี ขนาดโตเต็มวัย 8.5 - 12 นิ้ว ลำตัวสีฟ้าอมเขียว เพศผู้จะมีสีแดงตรงปลายก้ามด้านนอก จึงเป็นที่มา ของ “กุ้งก้ามแดง” ทั้งนี้ สีและขนาดของกุ้งขึ้นอยู่กับ สภาพแวดล้อมและอาหาร หากเลี้ยงในบ่อดินกุ้งจะมีสีเขียวปนน้ำตาลและมีขนาดใหญ่กว่าเลี้ยงในตู้ (กองนโยบายและยุทธศาสตร์พัฒนาประมง (กนป.), 2560)

ตาราง 1 ความแตกต่างระหว่างกุ้งก้ามแดง *Procambarus clarkii* กับ *Cherax* spp.

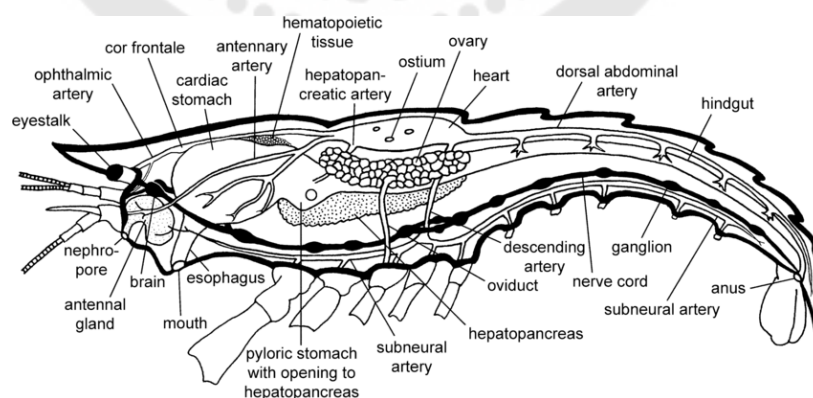
<i>Procambarus clarkii</i>	<i>Cherax</i> spp.
ไม่มีกิริ	มีกิริ
ก้ามมีหนาม	ก้ามไม่มีหนาม
มีขาว่ายน้ำ (pleopods หรือ swimmeret) คู่แรก	ไม่มีขาว่ายน้ำ (pleopods หรือ swimmeret) คู่แรก



ภาพประกอบ 3 ภาพการจำแนกชนิดของกุ้งก้ามแดงสกุล *P. allenii* และ *P. clarkii*

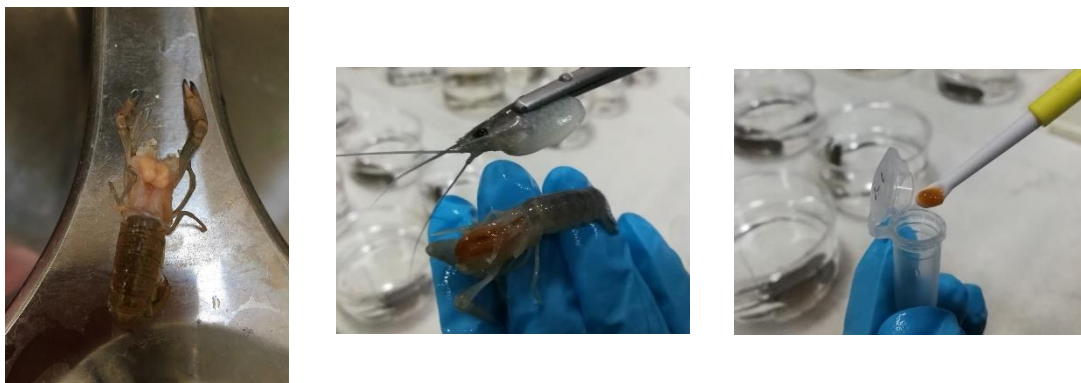
ที่มาจาก: http://www.fisheries.go.th/if-trang/images/download/cherex_manual.pdf

จากรายงานการส่งออก มีการส่งออกกุ้งก้ามแดง สกุล *Procamburus* 2 ชนิด คือ *P. allenii* และ *P. clarkii* การจำแนกชนิดระหว่าง 2 ชนิดนี้ พิจารณาจากรูปร่างของขาว่ายน้ำคู่แรก (กรมประมง กระทรวงเกษตรและสหกรณ์, 2558)



ภาพประกอบ 4 ภาพแสดงลักษณะอวัยวะภายในของกุ้งก้ามแดง

ที่มาจาก: https://www.researchgate.net/figure/Schematic-illustration-of-crayfish-anatomy-showing-main-organs-except-musculature_fig3_48414290



ภาพประกอบ 5 ภาพตัดกึ่งก้ามแดง (Hepatopancreas)

กึ่งก้ามแดงกับชนิดพันธุ์บุกรุก (Invasive species)

ชนิดพันธุ์ต่างถิ่น (alien species/ nonindigenous species/ exotic species/ adventives species/ introduces species) หมายถึง ชนิดพันธุ์ของสิ่งมีชีวิตที่ไม่เคยปรากฏในถิ่นใดถิ่นหนึ่งมาก่อน แล้วถูกนำมาหรือเดินทางเข้ามายึดครองและดำรงชีพอยู่อีกถิ่นหนึ่ง โดยอาจอยู่ได้อย่างดีหรือเลวขึ้นอยู่กับความเหมาะสมของปัจจัยแวดล้อมและการปรับตัวของชนิดพันธุ์นั้นๆ ส่วนสิ่งมีชีวิตที่มีอยู่ดั้งเดิมในพื้นที่นั้นๆมาก่อนตามธรรมชาติเรียกกันว่า พันธุ์พื้นเมือง (native species/ indigenous species/ endemic species) ซึ่งหมายถึง สิ่งมีชีวิตที่มีถิ่นกำเนิดอยู่ในพื้นที่กำเนิดดั้งเดิมภายในศูนย์กำเนิดและเขตแพร่กระจายตามธรรมชาติที่รายรอบและใกล้เคียง ซึ่งโดยทั่วไปแล้วมักจะมีหลากหลายของชนิดพันธุ์ใกล้เคียงอื่นในพื้นที่นั้นๆด้วย ทั้งนี้ชนิดพันธุ์ต่างถิ่นที่มีความก้าวร้าวหรือคุกคามต่อระบบนิเวศแหล่งที่อยู่อาศัยหรือชนิดพันธุ์พื้นเมือง มักถูกเรียกว่าชนิดพันธุ์บุกรุก (invasive species) หรืออาจเรียกชนิดพันธุ์ต่างถิ่นที่เป็นอันตราย (harmful non-indigenous species) (บัณฑิต ไทยผลิตเจริญ, 2553)

กึ่งก้ามแดงเป็นสัตว์น้ำต่างถิ่นที่กระทรวงเกษตรและสหกรณ์ได้กำหนดให้ กิจกรรมการเพาะเลี้ยงกึ่งก้ามแดง (*Procambarus clarkii* หรือ *Cherax* spp.) เป็นกิจกรรมการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำควบคุม ตามกฎกระทรวง เมื่อวันที่ 3 พฤษภาคม 2559 เพื่อเป็นการป้องกันปัญหาและผลกระทบที่อาจเกิดขึ้นจากการเพาะเลี้ยงพันธุ์สัตว์น้ำต่างถิ่น ตามมติคณะรัฐมนตรี เมื่อวันที่ 28 เมษายน 2552 เรื่อง มาตรการป้องกัน ควบคุม และกำจัดชนิดพันธุ์ต่างถิ่น ได้กำหนดให้กึ่งก้ามแดงชนิด *Cherax quadricarinatus* และกึ่งก้ามแดงชนิด *Procambarus clarkii* อยู่ในทะเบียนชนิดพันธุ์ต่างถิ่นที่ควรป้องกัน ควบคุมและกำจัดของประเทศไทย เนื่องจากเป็นชนิดพันธุ์ต่างถิ่นที่

มีแนวโน้มรุกราน โดยกำหนดแนวทางปฏิบัติให้หน่วยงานที่รับผิดชอบดำเนินการติดตามการแพร่กระจาย และควบคุม ทั้งนี้จากการศึกษารวบรวมข้อมูล พบว่า สัตว์น้ำต่างถิ่นดังกล่าวมีการรุกรานและส่งผลกระทบต่อสิ่งแวดล้อมและสัตว์น้ำพื้นเมืองในหลายประเทศ เช่น เบลเยียม อิตาลี ญี่ปุ่น เป็นต้น สำหรับประเทศไทยมีการเพาะเลี้ยงอย่างแพร่หลายและมีรายงานพบการแพร่กระจายในอ่างเก็บน้ำและแม่น้ำในจังหวัดสระแก้ว บุรีรัมย์ ศรีสะเกษ กาญจนบุรี และเชียงใหม่ แสดงให้เห็นว่ากุ้งก้ามแดงสามารถอาศัยอยู่ในแหล่งน้ำธรรมชาติของไทย และอาจมีแนวโน้มที่จะรุกรานสัตว์น้ำพื้นเมือง ดังนั้นจึงต้องมีการติดตามสถานการณ์อย่างใกล้ชิด นอกจากนี้ยังต้องติดตามเฝ้าระวังโรคที่อาจพบในกุ้งก้ามแดง ซึ่งกุ้งก้ามแดง *Cherax quadricarinatus* และ *Procambarus clarkii* มีความเสี่ยงที่จะเป็นพาหะของโรคเครย์ฟิชเพลก (Crayfish plague) และโรคจุดขาว (White spot disease) ด้วย

กฎหมายหรือระเบียบเกี่ยวกับการเพาะเลี้ยง

1. พระราชกำหนดการประมง พ.ศ. 2558
2. กฎกระทรวง กำหนดกิจการการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำให้เป็นกิจการการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำ ควบคุม พ.ศ. 2559 เมื่อวันที่ 3 พฤษภาคม พ.ศ. 2559 ให้กิจการการเพาะเลี้ยงกุ้งก้ามแดงอเมริกัน (*Procambarus clarkii*) และการเพาะเลี้ยงกุ้งก้ามแดงทุกชนิดในสกุล *Cherax* (*Cherax* spp.) เป็นกิจการการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำควบคุม
3. ประกาศกรมประมง เรื่อง กำหนดให้ผู้ประกอบกิจการการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำควบคุม (กุ้งก้ามแดง *Procambarus clarkii* หรือ *Cherax* spp. ต้องปฏิบัติ พ.ศ. 2559 เมื่อวันที่ 25 เมษายน พ.ศ. 2559
4. ประกาศกรมประมง เรื่อง กำหนดให้ผู้ประกอบกิจการการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำควบคุม (กุ้งก้ามแดง *Procambarus clarkii* หรือ *Cherax* spp. ต้องปฏิบัติ (ฉบับที่ 2) พ.ศ. 2559 เมื่อวันที่ 13 พฤษภาคม พ.ศ. 2559
5. ประกาศกรมประมง เรื่อง กำหนดให้ผู้ประกอบกิจการการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำควบคุม (กุ้งก้ามแดง *Procambarus clarkii* หรือ *Cherax* spp. ต้องปฏิบัติ (ฉบับที่ 3) พ.ศ. 2560 เมื่อวันที่ 14 มิถุนายน พ.ศ. 2560
6. ประกาศกรมประมง เรื่อง กำหนดให้ผู้ประกอบกิจการการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำควบคุม (กุ้งก้ามแดง *Procambarus clarkii* หรือ *Cherax* spp. ต้องปฏิบัติ (ฉบับที่ 4) พ.ศ. 2560 เมื่อวันที่ 21 สิงหาคม พ.ศ. 2560

7. ประกาศคณะกรรมการประมงประจำจังหวัด เรื่อง กำหนดเขตเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำสำหรับกิจการการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำควบคุม ประเภทการเพาะเลี้ยงกุ้งก้ามแดง *Procambarus clarkii* หรือ *Cherax* spp. (กองนโยบายและยุทธศาสตร์พัฒนาประมง (กนป.), 2560)

งานวิจัยที่เกี่ยวข้องกับกุ้งก้ามแดง

มีนักวิจัยให้ความสนใจนำกุ้งก้ามแดงมาศึกษาและใช้เป็นสัตว์ทดลองในงานวิจัยต่างๆมากมาย เช่น

Jiang และคณะ (2015) ได้ใช้เทคนิค qRT-PCR ในการหาปริมาณข้อมูลการแสดงออกของยีนอย่างรวดเร็วและแม่นยำ โดยใช้ยีนอ้างอิงในการทำมาตรฐานเพื่อศึกษาระดับการแสดงออก ในการศึกษานี้ได้เลือกยีนอ้างอิงครัสเตเซียน 8 ชนิด ซึ่งได้จากข้อมูลการถอดรหัสของ *P. clarkii* โดยใช้เทคนิค qRT-PCR และวิเคราะห์ความเสถียรของการแสดงออกโดยใช้สถิติ 3 ตัว ได้แก่ GeNorm, NormFinder และ BestKeeper พบว่า EIF และ 18S เป็นยีนอ้างอิงที่เหมาะสมที่สุดสำหรับข้อมูลการแสดงออกจากเนื้อเยื่อต่างๆ ในขณะที่ TBP และ EIF มีความเหมาะสมกับข้อมูลการแสดงออกจากระยะพัฒนาการของรังไข่ที่ต่างกัน (Jiang et al., 2015)

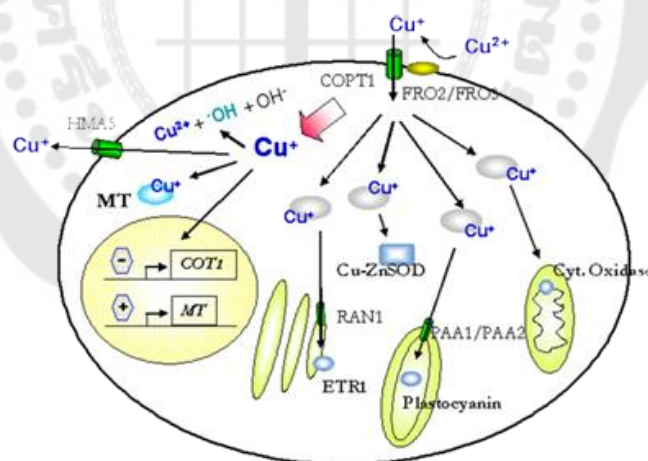
Yudkovski และคณะ (2007) ได้ศึกษาการเปลี่ยนแปลงรูปแบบการแสดงออกของ multi-transcript ของตับ ซึ่งถูกแยกออกมาจาก *Cherax quadricarinatus* ตัวผู้ โดยวิธี cDNA microarray hybridisations ในการถอดรหัส เพิ่มจำนวน RNA hepatopancreatic พบว่าในการลอกคราบ ซึ่งถูกเร่งใน X-organ sinus gland หรือโดยการฉีด 20-hydroxyecdysone ซ้ำ มีการเปลี่ยนแปลงเกิดขึ้น ก่อนการลอกคราบหรือหลังการลอกคราบ และจำนวน RNA ลดลง ระหว่างการลอกคราบ ซึ่งมีการแสดงออกของยีนแตกต่างกัน (Yudkovski et al., 2007)

Bruno และคณะ (2006) ได้ตรวจหาความเข้มข้นของโลหะหนักในเนื้อเยื่อกุ้ง โดยวิเคราะห์หาปริมาณของโลหะหนัก (ตะกั่ว ทองแดง แคดเมียม โครเมียม สังกะสี) ในกล้ามเนื้อ ตับ และเปลือก ของ *Cherax* ของกุ้งที่มีขนาดต่างกัน 2 ขนาด (Juveniles และ Adults) นอกจากนี้ยังวิเคราะห์หาความเข้มข้นของโลหะในน้ำ ตะกอน และในพืช จากการศึกษาพบว่ามีค่าความเข้มข้นของตะกั่ว ทองแดง แคดเมียม โครเมียมและสังกะสีสูง ในเนื้อเยื่อที่มีน้ำเป็นส่วนประกอบ แสดงให้เห็นว่ามีการสะสมทางชีวภาพใน *Cherax destructor* และพบปริมาณตะกั่วและสังกะสีในตะกอน และพืช(ที่เป็นแหล่งอาหารของสัตว์) สูงกว่าในเนื้อเยื่อและอวัยวะต่างๆ ซึ่งชี้ให้เห็นว่าไม่เกิดการส่งผ่านทางชีวภาพในโลหะหนัก 2 ชนิดนี้ ส่วนทองแดงและโครเมียมแสดงการเปลี่ยนแปลงทางชีวภาพในเนื้อเยื่อทั้งหมด ในขณะที่แคดเมียมพบเฉพาะในตับ (hepatopancreas) (Bruno et al., 2006)

เมทัลโลไธออนิน (Metallothionein) และ ไวเทลโลจีนิน (Vitellogenin)

เมทัลโลไธออนิน (Metallothionein)

Metallothionein เป็นโปรตีนที่จับกับโลหะหนัก โดยมีมวลโมเลกุลต่ำและประกอบด้วย กรดอะมิโนซีสเทอีนสูง ทำหน้าที่รักษาสมดุลของร่างกาย ป้องกันเซลล์จากโลหะหนักที่อันตราย และสภาวะความเครียด (ดูจุดดี ปานพรหมมินทร์ & สุภาวดี พุ่มพวง, 2556) การศึกษาที่ผ่านมา ในยีสต์ สัตว์ และพืชต้นแบบ พบยีนจำนวนมากที่ทำหน้าที่ควบคุมมิให้ความเข้มข้นของโลหะธาตุใดธาตุหนึ่งภายในเซลล์มีระดับสูงเกินควร โดยเมื่อเซลล์ตรวจพบการสะสมของโลหะ ก็จะลดการแสดงออกของยีนที่ช่วยในการนำธาตุโลหะนั้นเข้าสู่เซลล์ ในการขจัดโลหะที่มีปริมาณระดับเป็นพิษนั้น สิ่งมีชีวิตอาจขับโลหะออกนอกเซลล์ผ่านทางกระบวนการขนส่งบนเยื่อหุ้มเซลล์ (plasma membrane efflux transporter) หรือเก็บกักไว้ในแวคิวโอล (vacuole) ซึ่งมีหน้าที่ในการเก็บของเสียภายในเซลล์ นอกจากนี้ เซลล์ยังสามารถสังเคราะห์สารประกอบอินทรีย์น้ำหนักต่ำ และโปรตีนบางชนิดเพื่อจับกับไอออนของโลหะอิสระที่อยู่ในไซโทพลาซึม (cytoplasm) ได้อีกด้วย โดยโปรตีนประเภทที่พบบ่อยในเซลล์ของสิ่งมีชีวิตจำพวกยูแคริโอต (eukaryote) ได้แก่ เมทัลโลไธออนิน (metallothionein) และไฟโตคีเลติน (phytochelatin)



ภาพประกอบ 6 ภาพกระบวนการขนส่ง การรักษาสมดุล และการลดพิษของธาตุทองแดงภายในเซลล์พืช

ที่มาจาก: <http://www.etm.sc.mahidol.ac.th/a18.shtml>

เมทัลโลไธออนีนจัดอยู่ในกลุ่มของโปรตีนขนาดเล็กที่มีองค์ประกอบของกรดอะมิโนซิสเทอีน (cysteine) ปริมาณสูง และสามารถจับกับโลหะหนักได้หลายประเภท เมทัลโลไธออนีนแบ่งออกเป็น 3 กลุ่ม โดยกลุ่มที่ 3 (class III) อาจเรียกได้อีกชื่อหนึ่งว่าไฟโทคีเลติน ซึ่งแตกต่างจากกลุ่มที่ 1 และ 2 (class I and II) ตรงที่ไฟโทคีเลตินถูกสังเคราะห์จากกลูตาไธโอน (glutathione) ด้วยเอนไซม์ไฟโทคีเลตินซินเทส (phytochelatin synthase) และไฟโทคีเลตินมีโครงสร้างทั่วไปเป็น (Glu-Cys)₂-11-Gly ต่างจากโปรตีนที่ได้จากการสังเคราะห์โดยไรโบโซม (ribosome) จากการศึกษาถึงปัจจุบันพบไฟโทคีเลตินในสิ่งมีชีวิตบางกลุ่มเท่านั้น ได้แก่ พืชส่วนใหญ่ สัตว์ชั้นต่ำและยีสต์บางชนิด ขณะที่เมทัลโลไธออนีนนั้น พบได้ทั่วไปทั้งในสิ่งมีชีวิตกลุ่มยูแคริโอตและในแบคทีเรียบางสายพันธุ์ เมทัลโลไธออนีนและไฟโทคีเลตินมีหน้าที่สำคัญในการลดพิษจากโลหะหนัก หลักฐานจากการศึกษาในพืช *Arabidopsis thaliana* และยีสต์ *Schizosaccharomyces pombe* กลายพันธุ์ที่สูญเสียความสามารถในการสังเคราะห์ไฟโทคีเลติน แสดงให้เห็นว่า ไฟโทคีเลตินมีบทบาทสำคัญในการลดพิษจากแคดเมียม ในขณะที่หนูซึ่งขาดยีนสร้างเมทัลโลไธออนีนกลุ่มที่ 1 และยีสต์ *Saccharomyces cerevisiae* ซึ่งขาดเมทัลโลไธออนีนกลุ่มที่ 2 จะสูญเสียความสามารถในการต้านทานพิษจากแคดเมียมและทองแดงตามลำดับ

การทดลองเหล่านี้แสดงให้เห็นถึงความสำคัญของยีนที่ช่วยในการลดพิษจากโลหะ นอกจากนี้ความเข้าใจถึงกระบวนการสะสมและการลดพิษจากโลหะยังสามารถนำมาประยุกต์ใช้รักษาผู้ป่วยที่มีความผิดปกติทางพันธุกรรมซึ่งอาจได้รับอันตรายจากโลหะแม้เข้าสู่ร่างกายในปริมาณเพียงเล็กน้อยได้ เช่น ในการรักษาผู้ป่วยโรควิลสัน (Wilson's disease) ซึ่งไวต่อการรับพิษจากทองแดง ผู้ป่วยต้องรับประทานธาตุสังกะสีเสริมในปริมาณที่สามารถเพิ่มการแสดงออกของยีนเมทัลโลไธออนีน เพื่อที่โปรตีนเมทัลโลไธออนีนจะช่วยลดพิษจากการดูดซึมธาตุทองแดงในเซลล์ร่างกายของผู้ป่วย ในอนาคตเราอาจใช้องค์ความรู้เหล่านี้ ผสมกับเทคโนโลยีชีวภาพเพื่อปรับปรุงสายพันธุ์ให้พืชหรือสัตว์ลดอัตราการสะสมของโลหะที่เป็นพิษได้ ซึ่งจะนำไปสู่การพัฒนาให้อาหารมีความปลอดภัยสำหรับผู้บริโภคสูงขึ้น (เมธา มีแต้ม, 2554) นอกจากนี้โปรตีน MT ยังช่วยปกป้องเซลล์จากพิษของแคดเมียม โดยเมื่อแคดเมียมถูกดูดซึมเข้าสู่ร่างกายแล้วจะกระจายตัวไปยังเนื้อเยื่อต่างๆของร่างกายผ่านทางกระแสเลือด แคดเมียมในร่างกายที่อยู่ในรูปของไอออน (Cd^{2+}) สามารถจับกับกรดอะมิโนซิสเทอีน (cysteine) ในโมเลกุลของโปรตีน MT และเกิดเป็นสารประกอบเชิงซ้อน (Cd-MT) (Klaassen, Liu, & Choudhuri, 1999) ทำให้ลดความเป็นพิษของแคดเมียมต่อเซลล์และอวัยวะต่างๆของร่างกายได้ (Kondo, Woo, Michalska, Choo, & Lazo, 1995)

งานวิจัยที่เกี่ยวข้องกับยีน MT

ดุจฤดีและสุภาวดี (2556) ได้ศึกษาคุณลักษณะของยีน MT ชนิดหนึ่งจาก เนื้อเยื่อตับของปลาดุกอุย โดยใช้เทคนิค RACE พบว่า ลำดับนิวคลีโอไทด์ที่สมบูรณ์ของ cDNA ของปลาดุกอุยมีความยาวทั้งหมดเท่ากับ 509 คู่เบส ซึ่งเป็นส่วน Open reading frame 183 คู่เบส สามารถแปลรหัสเป็นกรดอะมิโนได้ 60 หน่วย ประกอบด้วยกรดอะมิโนซิสเตอีน จำนวน 20 ตำแหน่ง ทำให้มีโครงสร้างทุติยภูมิประกอบด้วย 2 โดเมนที่สำคัญ (β และ α) เพื่อทำหน้าที่จับกับโลหะหนักต่างๆ เช่น แคดเมียม ปรอท และทองแดง เป็นต้น ยีน MT มีการแสดงออกในทุกเนื้อเยื่อ โดยเฉพาะเนื้อเยื่อตับที่มีการแสดงออกสูงที่สุด การศึกษาจีโนมิกดีเอ็นเอที่สมบูรณ์ของยีน MT พบว่าประกอบด้วย 3 เอ็กซอน และ 2 อินทรอน โดยศึกษาจากไพรเมอร์ที่ออกแบบบริเวณรหัสพันธุกรรมเริ่มต้น และรหัสหยุดการสังเคราะห์โปรตีน การศึกษาการแสดงออกของยีน MT ในเนื้อเยื่อตับและเหงือกของปลาดุกอุยเมื่อสัมผัสแคดเมียมที่ความเข้มข้นต่างๆ (0, 1, 10 และ 100 $\mu\text{g/L}$) เป็นเวลา 14 วัน โดยวิธี Real-time PCR พบว่า การแสดงออกของยีน MT ในเนื้อเยื่อตับจะขึ้นอยู่กับเวลาที่สัมผัสแต่ไม่ยั่งยืน โดยเพิ่มสูงขึ้นในทุกความเข้มข้นของแคดเมียมในวันที่ 3 และ 7 ของการสัมผัส แล้วหลังจากนั้นจะค่อยๆ ลดลง จนถึงวันที่ 14 โดยสูงที่สุดที่ความเข้มข้น 10 $\mu\text{g/L}$ ในวันที่ 3 ของการสัมผัส ในขณะที่เนื้อเยื่อเหงือกจะมีระดับการแสดงออกของยีน MT สูงที่สุดในวันแรกของการสัมผัส ดังนั้นการแสดงออกของยีน MT ในเนื้อเยื่อตับและเหงือกสามารถใช้เป็นดัชนีชีวภาพการสัมผัสแคดเมียมในน้ำได้ การศึกษาการเปลี่ยนแปลงทางพยาธิสภาพในเนื้อเยื่อตับและเหงือกของปลาที่สัมผัสแคดเมียมที่ความเข้มข้น 100 $\mu\text{g/L}$ พบว่า เนื้อเยื่อเหงือกมีอาการบวม น้ำ เซลล์เยื่อเหงือกยกตัวขึ้น กิ่งเหงือกเชื่อมติดกัน และเนื้อเยื่อตับพบอาการเลือดคั่ง เป็นต้น (ดุจฤดี ปานพรหมมินทร์ & สุภาวดี พุ่มพวง, 2556)

ดวงใจและธนากร (2560) ได้ศึกษาสารตกค้างโลหะหนักในแหล่งน้ำ ซึ่ง Metallothionein (MT) เป็นโปรตีนที่สามารถจับกับโลหะหนักได้หลายชนิด โดยได้ทำการเปรียบเทียบผลของแคดเมียมและคอปเปอร์ที่ความเข้มข้นและระยะเวลาแตกต่างกันต่อการแสดงออกของ ยีน MT ในปลานิล โดยแช่ปลาในน้ำผสมแคดเมียม (0.25 และ 2.50 $\mu\text{g/L}$) และคอปเปอร์ (25 และ 250 $\mu\text{g/L}$) นาน 1, 2, 4 และ 8 ชั่วโมง เก็บเนื้อเยื่อตับ สกัด Total RNA แล้วสังเคราะห์ First strand cDNA เพื่อศึกษาการแสดงออกของยีนด้วยเทคนิค RT-PCR พบว่า แคดเมียม 0.25 $\mu\text{g/L}$ สามารถกระตุ้นให้เกิดการแสดงออก ของยีนภายใน 1 ชั่วโมง ขณะที่คอปเปอร์ 25 $\mu\text{g/L}$ จะมีการแสดงออกของยีนเมื่อได้รับนาน 2 ชั่วโมง ผลการทดลองแสดงให้เห็นว่ายีน MT สามารถใช้เป็นตัวบ่งชี้ทางชีววิทยาเพื่อประเมินการปนเปื้อนของแคดเมียมและคอปเปอร์ใน

แหล่งน้ำได้ โดยการแสดงออกของยีน MT มีความไวต่อแคดเมียมมากกว่าคอปเปอร์ (ดวงใจ พิสุทธิธรรมาชัย & ธนากร เหมะสถล, 2560)

วาทิพย์และคณะ (2557) ได้ศึกษาแคดเมียมปริมาณต่ำกระตุ้นการแสดงออกของ ยีนเมทัลโลไธโอนีน (MT) และฮีโมออกซีจีน-1 (HO-1) ในเซลล์เพาะเลี้ยงเซลล์รกชนิดเจอี-3 ของ มนุษย์ โดยทดสอบด้วยสารแคดเมียม (CdCl_2) ที่ความเข้มข้นต่างๆ เป็นเวลา 24 ชั่วโมง วิเคราะห์ การแสดงออกของยีน MT และ HO-1 ด้วยวิธี reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR) พบว่า เมื่อเซลล์ได้รับแคดเมียมในปริมาณต่ำจะเกิดการกระตุ้นให้มีการแสดงออกของ ยีน MT และ HO-1 เพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) (วาทิพย์ บุณยวิจิต et al., 2557)

ไวเทลโลเจนิน (Vitellogenin)

ไวเทลโลเจนิน (Vitellogenin) เป็นพลาสมาโปรตีน (plasma protein) ที่สังเคราะห์ โดยตับ (Mommsen & Walsh, 1988) ภายใต้การควบคุมของฮอร์โมนและเป็นสารตั้งต้นที่สำคัญ ของโปรตีนโยลค์ (yolk protein) ของสัตว์มีกระดูกสันหลัง (Korsgaard & Petersen, 1979) เช่น ปลาชนิดต่างๆ สัตว์ครึ่งบกครึ่งน้ำ (amphibian) สัตว์เลื้อยคลาน (reptile) และสัตว์ปีก (avian) นั้น มีการขนส่งไวเทลโลเจนินผ่านกระแสเลือดไปยังรังไข่ เมื่อไวเทลโลเจนินถูกรับเข้าสู่โอโอไซท์จะถูก ย่อยเปลี่ยนเป็นโปรตีนโยลค์ (Wallace, 1965) กระบวนการไวเทลโลเจนินซิสเกี่ยวข้องกับการผลิต โปรตีนไข่แดงและกระบวนการพัฒนาเซลล์ไข่ ซึ่งเป็นกระบวนการสำคัญในขั้นตอนการสืบพันธุ์ ของสัตว์ที่ออกลูกเป็นไข่ (oviparous animals) (Tseng et al., 2001) โปรตีนตั้งต้นที่ทำหน้าที่ใน การผลิตโปรตีนไวเทลลินหรือโปรตีนไข่แดง เรียกว่า โปรตีนไวเทลโลเจนิน (Vitellogenin) และ ภายหลังสิ้นสุดกระบวนการไวเทลโลเจนินซิสจะได้โปรตีนไวเทลลิน (vitellin) หรือโปรตีนไข่แดง ซึ่ง เป็นโปรตีนที่จำเป็นต่อการพัฒนาเซลล์ไข่และตัวอ่อน (Tiu et al., 2008) นอกจากการมีบทบาทใน แ่งโภชนาการสำหรับการสืบพันธุ์และการพัฒนาเอมบริโอแล้ว โปรตีนไวเทลโลเจนิน ยังมีส่วน เกี่ยวข้องในการนำแร่ธาตุ ไซมัน และสารอื่นๆ เข้าไปในเซลล์ไข่ที่กำลังมีการพัฒนาอีกด้วย (Wilder et al., 2010) จากการศึกษาแบบการแสดงออกของยีนที่เกี่ยวข้องกับการผลิตโปรตีนไวเทลโล เจนินในอวัยวะที่แตกต่างกัน ในเฮพาโตแพนแครียสและรังไข่ของกิ้งก่าฟิเนียส และกิ้งก่าดำ อวัยวะ หลักที่เป็นแหล่งผลิตโปรตีนไวเทลโลเจนินในกิ้ง คือทั้งเฮพาโตแพนแครียสและรังไข่ ซึ่งมีความ แตกต่างจากครึ่งเตเชียนชนิดอื่น เช่น ปลาและกิ้งมังกง ที่บริเวณที่มีการผลิตโปรตีนไวเทลโลเจนินจะ จำกัดอยู่ที่เฮพาโตแพนแครียสเพียงอวัยวะเดียว (รณนิมุข หิรัญสัจจาเลิศ, 2556)

งานวิจัยที่เกี่ยวข้องกับยีน VTG

Novillo และคณะ (2005) ได้ศึกษาการเปลี่ยนแปลงตัวรับนิวเคลียสและการแสดงออกของยีน Vitellogenin ในการตอบสนองต่อสเตียรอยด์และโลหะหนักใน *Caenorhabditis elegans* พบว่า ที่ความเข้มข้นของแคดเมียม (CdCl_2) 100 μM ทำให้เกิดการยับยั้งการแสดงออกของยีน Vitellogenin ใน *Caenorhabditis elegans* ส่งผลให้ไม่เกิดโปรตีนโวลต์ทั้งสามชนิด (YP170s YP115 และ YP88) (Novillo, Won, Li, & Callard, 2005)

Park และ Kwak (2012) ได้ประเมินศักยภาพการแสดงออกของยีน Metallothionein (MT) และ Vitellogenin (VTG) ในตัวอ่อนของ *Chironomus riparius* เมื่อสัมผัสสาร endocrinedisrupting chemicals (EDCs) ได้แก่ bisphenol A (BPA), 4-nonylphenol (NP), di-(2-ethylhexyl) phthalate (DEHP) โลหะหนัก ได้แก่ Cd, Cu, Pb สารกำจัดศัตรูพืช ได้แก่ 2,4-Dichlorophenoxyacetic acid (2,4-D) และยาปฏิชีวนะในสัตว์ (Fenbendazole) พบว่า การแสดงออกของยีน MT เพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญ โดยตอบสนองต่อ Cd, Cu, Pb, DEHP, 2,4-D, NP, BPA, และ fenbendazole ตามลำดับ นอกจากนี้การแสดงออกของยีน VTG เพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญ โดยตอบสนองต่อ BPA, NP, DEHP, Cd, 2,4-D, fenbendazole, Pb, และ Cu ตามลำดับ ผลการศึกษานี้ชี้ให้เห็นว่า VTG สามารถใช้เป็น biomarker ของสารกำจัดศัตรูพืช Cd และ EDCs ในขณะที่ MT เป็น biomarker ที่มีศักยภาพของโลหะหนัก เช่น Cd, Cu และ Pb ในสิ่งแวดล้อมทางน้ำ (Park & Kwak, 2012)

Moncaleano-Niño และคณะ (2017) ได้ศึกษาการเปลี่ยนแปลงของ Metallothionein และ Vitellogenin ของเนื้อเยื่อ *Saccostrea* spp. ที่ความเข้มข้นของแคดเมียมในระยะเวลา 96 ชั่วโมง พบว่า Vitellogenin ในเนื้อเยื่อของหอยนางรม เมื่อได้รับแคดเมียมที่ความเข้มข้น 1,000 $\mu\text{g/L}$ เป็นเวลา 96 ชั่วโมง มีค่าการตอบสนองลดลงอย่างมีนัยสำคัญ โดยมีค่าการตอบสนองเท่ากับ 0.04 mg P/g gonad เมื่อเทียบกับหอยนางรมควบคุม (0.68 mg P/g gonad) ซึ่งบ่งบอกถึงฤทธิ์ในการต่อต้าน estrogenic ของ Cd ที่ความเข้มข้นสูง (Moncaleano-Niño et al., 2017)

โลหะหนัก (Heavy Metal)

โลหะหนัก หมายถึง โลหะหนักที่มีความหนาแน่นเกินกว่า 5 กรัม ตัวอย่างเช่น ปปรอท ตะกั่ว สารหนู แคดเมียม โคบอลต์ เป็นต้น ความเป็นพิษของโลหะหนัก เกิดจากร่างกายได้รับสารโลหะหนัก ซึ่งสารโลหะหนักนั้นจะไปรบกวนการทำงานของเอ็นไซม์ของเซลล์และยึดกับเยื่อหุ้ม

เซลล์ทำให้การควบคุมการลำเลียงของสารต่างๆ ของเยื่อหุ้มเซลล์ผิดปกติไป ความเป็นพิษของโลหะหนักขึ้นอยู่กับรูปแบบทางเคมีของสารประกอบของโลหะหนักแต่ละชนิด และเส้นทางที่ร่างกายได้รับเข้าไป เช่น ทางระบบหายใจ ระบบทางเดินอาหาร ผิวหนัง เป็นต้น ซึ่งสารพิษเหล่านี้เมื่อสะสมอยู่ในร่างกายจนถึงระดับหนึ่ง ก็จะแสดงอาการออกมาให้เห็น ซึ่งผลของความเป็นพิษของโลหะหนักต่อกลไกระดับเซลล์มี 5 แบบคือ

1. ทำให้เซลล์ตาย
2. เปลี่ยนแปลงโครงสร้างและการทำงานของเซลล์
3. เป็นตัวการทำให้เกิดมะเร็ง
4. เป็นตัวการทำให้เกิดความผิดปกติทางพันธุกรรม
5. ทำความเสียหายต่อโครโมโซม ซึ่งเป็นปัจจัยทางพันธุกรรม

ในการศึกษาครั้งนี้ ผู้วิจัยสนใจศึกษาโลหะหนัก 4 ชนิด ได้แก่ แคดเมียม พรอท สารหนู และทองแดง (ชนิษฐ พานชูวงศ์, 2550)

แคดเมียม (Cadmium)

แคดเมียมเป็นธาตุโลหะหนักที่มีสีเงินแกมเขียว มีคุณสมบัติเบา อ่อน ดัดโค้งได้ง่าย และทนต่อการกัดกร่อน มีความถ่วงจำเพาะ (specific gravity) 8.65 จุดหลอมเหลว (m.p.) 302.9 °C จุดเดือด (b.p.) 767 °C มีความดันไอ (vapor pressure) 1.4 mmHg ที่ 400 °C และ 16 mmHg ที่ 500 °C ดังนั้นเมื่อมีการใช้ความร้อนสูง เช่น การอบแร่ การบัดกรี การหลอมเหล็ก และการเผาของเสีย จะทำให้มีไอของแคดเมียมออกมาได้ในระหว่างกระบวนการที่มีการให้ความร้อน และไอของแคดเมียมในอากาศจะถูกออกซิไดส์อย่างรวดเร็วไปเป็นแคดเมียมออกไซด์ (CdO) นอกจากนี้แคดเมียมยังเป็นธาตุที่ไม่ละลายน้ำ แต่ละลายได้ดีในกรดไนตริก (HNO₃) และกรดไฮโดรคลอริก (HCl) เจือจาง ซึ่งจะทำให้เป็นอันตรายต่อคนแบบเฉียบพลันเมื่อกินเข้าไป

ประโยชน์ของแคดเมียม

แคดเมียมถูกนำไปใช้ประโยชน์ในอุตสาหกรรมต่างๆ และสินค้าอุปโภคบริโภค โดยใช้ผสมกับโลหะอื่นเป็นโลหะผสมอัลลอยด์ (alloy) เพื่อเพิ่มความเหนียวและความทนทานต่อการกัดกร่อน ใช้ผสมในสารฆ่าเชื้อราที่ใช้ในกิจการเกษตร ใช้ในการชุบโลหะ โดยใช้แคดเมียมเคลือบบนแผ่นเหล็ก ทองแดง อะลูมิเนียม โดยการชุบด้วยไฟฟ้า โลหะที่ได้จากการชุบนำไปใช้เป็นส่วนประกอบของเครื่องบิน รถยนต์ อุปกรณ์ไฟฟ้า อุปกรณ์อิเล็กทรอนิกส์ วิทยุ เป็นต้น

ความเป็นพิษของแคดเมียม

จากการที่แคดเมียมถูกนำไปใช้ประโยชน์ในอุตสาหกรรมและสินค้าอุปโภค ทำให้โลหะแคดเมียมเกิดการปนเปื้อนอยู่ในสิ่งแวดล้อม บรรยากาศและในอาหาร ทำให้เราได้รับแคดเมียมเข้าสู่ร่างกายได้หลายทางโดยไม่รู้ตัว คนทั่วไปจะได้รับแคดเมียมเข้าสู่ร่างกายจากอาหารที่บริโภคเข้าไปเป็นหลัก โดยอาจติดปะปนมากับพืช ผัก ผลไม้ หรือผลิตภัณฑ์จากสัตว์ที่นำมาปรุงเป็นอาหาร แคดเมียมอาจละลายอยู่ในน้ำที่เราดื่มและได้รับจากอากาศโดยการหายใจเอาอากาศที่มีฝุ่นแคดเมียมฟุ้งกระจายอยู่ โดยเฉพาะในแหล่งอุตสาหกรรมที่มีการใช้แคดเมียมเป็นวัตถุดิบ เช่น โรงงานทำแบตเตอรี่ หรือบริเวณที่เป็นเหมืองแร่ สังกะสี ตะกั่ว ทองแดง ที่มักมีแคดเมียมปนอยู่ด้วย การสัมผัสกับสิ่งของที่มีแคดเมียมเป็นส่วนประกอบและการอยู่ในแหล่งที่มีการปนเปื้อนของแคดเมียมในอากาศนานๆ จะทำให้แคดเมียมซึมผ่านผิวหนังเข้าสู่ร่างกายเราได้อีกด้วย (เชมชิต ธนาภิชาญเจริญ, นงนาถ เมฆรังสิมันต์, & สุรัชย์ ศิลาภรณ์โชติ, 2551)

ปรอท (Mercury)

ปรอท (Hg) เป็นสารชนิดหนึ่งที่พบอยู่ตามธรรมชาติในรูปของแร่อิสระหรือในรูปของ HgS ปะปนอยู่ในเนื้อหินประเภทต่างๆ เช่น หินปูนหรือหินทราย เป็นต้น ในสภาวะอุณหภูมิปกติ ปรอทที่มีความบริสุทธิ์จะมีสถานะเป็นของเหลว มีสีขาวคล้ายเงิน จึงมีชื่อเรียกว่า “Liquid Silver” หรือ “Quick Silver” นับเป็นโลหะชนิดเดียวที่มีสภาพเป็นของเหลว ณ อุณหภูมิปกติ แต่ก็สามารถแปรสภาพเป็นของแข็งได้ แต่จะมีความเปราะและจะระเหยเป็นไอได้

ประโยชน์

ปรอทสามารถนำมาใช้ประโยชน์ได้อย่างกว้างขวางทั้งทางการแพทย์ วิทยาศาสตร์ การเกษตร การทหาร และอุตสาหกรรมสาขาต่างๆ ซึ่งสามารถสรุปได้ดังต่อไปนี้

1. ใช้ประโยชน์ในการทำเครื่องมือวิทยาศาสตร์ต่างๆ เช่น เทอร์โมมิเตอร์ บารอมิเตอร์ เป็นต้น นอกจากนี้ยังใช้เป็นตัวเร่ง (catalyst) ในกระบวนการทางเคมีต่างๆอีกด้วย
2. ใช้ประโยชน์ในทางการแพทย์ คือ เป็นส่วนผสมของยารักษาโรคหลายชนิด ใช้ในการอุดฟัน และเป็นองค์ประกอบในเครื่องมือแพทย์ เช่น เครื่องมือที่ใช้วัดความดันโลหิต เป็นต้น
3. ใช้ประโยชน์ทางการเกษตร คือ เป็นองค์ประกอบของสารเคมีกำจัดแมลง และสารเคมีกำจัดเชื้อราในพืช ทำให้สามารถป้องกัน กำจัดแมลงและเชื้อราที่เป็นศัตรูพืชได้
4. ใช้ประโยชน์ทางด้านอุตสาหกรรม ได้แก่ อุตสาหกรรมผลิตเครื่องมือและอุปกรณ์ไฟฟ้า อุตสาหกรรมทอผ้า อุตสาหกรรมชุบโลหะ อุตสาหกรรมผลิตสีทาบ้าน อุตสาหกรรมผลิตน้ำยาซักแห้ง อุตสาหกรรมผลิตคลอรีนและโซดาไฟ และอุตสาหกรรมทำขนเฟอร์ เป็นต้น

5. ใช้ประโยชน์ทางการทหาร คือ เป็นองค์ประกอบอย่างหนึ่งในการทำระเบิด

นอกจากนี้ยังมีปรอทซึ่งถูกนำเข้ามาในรูปที่เป็นองค์ประกอบของสารเคมีกำจัดศัตรูพืชอีกเป็นจำนวนมาก ดังนั้นหากมีการนำปรอทที่ผลิตเป็นเครื่องมือเครื่องใช้หรือสารเคมีกำจัดศัตรูพืชไปใช้ประโยชน์อย่างไม่ถูกต้องแล้ว โอกาสที่สารดังกล่าวจะสะสมและแพร่กระจายอยู่ในสิ่งแวดล้อมก็ย่อมจะเป็นไปได้สูง และก่อให้เกิดอันตรายต่อมนุษย์และสิ่งแวดล้อมได้ในที่สุด (กองจัดการสารอันตรายและกากของเสีย กรมควบคุมมลพิษ, 2541)

ความเป็นพิษของปรอท

การเกิดพิษจากสารปรอทมีทั้งชนิดเฉียบพลันและเรื้อรัง ปรอทเมื่อเข้าสู่ร่างกายจะไปทำอันตรายต่อระบบประสาทส่วนกลาง ซึ่งได้แก่ สมอง และไขสันหลัง ทำให้เสียการควบคุมเกี่ยวกับการเคลื่อนไหวของแขน ขา การพูด และยังทำให้ระบบประสาทรับรู้เสียไป เช่น การได้ยิน การมองเห็น พิษชนิดเฉียบพลันมักเกิดจากอุบัติเหตุโดยการกลืนกินสารปรอทเข้าสู่ร่างกาย ซึ่งปริมาณปกติที่ได้รับเข้าสู่ร่างกายและทำให้คนตายได้ โดยเฉลี่ยประมาณ 0.02 กรัม อาการที่เกิดจากการกลืนกินปรอท คือ อาเจียน ปากพอง แดงไหม้ อักเสบและเนื้อเยื่ออาจหลุดออกมาเป็นชิ้นๆ เลือดออก ปวดท้องอย่างแรง อุจจาระเป็นเลือด เป็นลม สลบ เมื่อเข้าสู่ระบบหมุนเวียนโลหิต ปรอทจะไปทำลายไต ทำให้ปัสสาวะไม่ออกหรือปัสสาวะเป็นเลือด และตายในที่สุด (จิราภรณ์ อ่ำพันธ์, 2543)

สารหนู (Arsenic)

สารหนูเป็นธาตุกึ่งโลหะ เป็นสารที่มีลักษณะเป็นผงโลหะสีเทา มีมากเป็นอันดับที่ 20 ของธาตุที่พบมากบนโลก สารหนูพบในสิ่งมีชีวิตทั้งพืชและสัตว์ ตลอดจนพบในธรรมชาติ ได้แก่ ในพื้นดิน ทะเล มหาสมุทร และแหล่งน้ำต่างๆ สารหนูในธรรมชาติเหล่านี้มาจากการระเบิดของภูเขาไฟ, การเผาถ่านหิน, การถลุงแร่ การใช้สารกำจัดศัตรูพืช และสารหนูซึ่งเป็นองค์ประกอบของดิน หิน ตามธรรมชาติ นอกจากนี้สารหนูยังออกมาสู่บรรยากาศโลกจากอุตสาหกรรมบางประเภทที่มีการใช้สารชนิดนี้ เช่น การอบไม้ การผลิตสี และการผลิตสารกำจัดศัตรูพืช (ศูนย์วิจัยและประเมินความเสี่ยงด้านอาหารปลอดภัย)

ประโยชน์

สามารถพบสารหนูจากกิจกรรมการทำเหมืองแร่ การถลุงโลหะ การใช้ปุ๋ยและยาฆ่าแมลงในการเกษตร สารหนูยังถูกนำมาใช้เป็นวัตถุพิษในการผลิตยากำจัดศัตรูพืช ยาฆ่าแมลง ยาฆ่าวัชพืช น้ำยาถนอมเนื้อไม้ บางครั้งมีการนำมาผสมในอาหารสัตว์ ในยาคนและยาสัตว์

อันตรายของสารหนู

พิษของสารหนูนี้มีทั้งแบบเฉียบพลัน (Acute Toxicity) และเรื้อรัง (Chronic Toxicity) แบบเฉียบพลัน (จากการกิน) ทำให้เกิดการระคายเคืองต่อกระเพาะอาหาร ลำไส้ คลื่นไส้ อาเจียน และท้องร่วง ในคนไข้ที่มีอาการรุนแรง อาจจะมีเลือดปน คนไข้จะอ่อนเพลีย อาเจียน และตายได้ แบบเรื้อรัง (จากการกินหรือหายใจ) จะมีอาการอ่อนเพลีย เบื่ออาหาร คลื่นไส้ ระบบทางเดินอาหารผิดปกติ ตับอาจถูกทำลาย นอกจากนี้ อาจมีอาการทางผิวหนัง ทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงสีของผิวหนัง ทำให้หนังดำน อาการบวมแข็ง อาจจะเป็นสาเหตุของมะเร็งที่ผิวหนังได้ นอกจากนี้ ยังทำให้เกิดความผิดปกติของระบบขับเหงื่อ และทำให้เกิดเนื้อตายบริเวณนิ้ว (สารานุกรมไทยสำหรับเยาวชนฯ เล่มที่ 22)

ทองแดง (Copper)

เป็นโลหะที่ใช้มากที่สุดโลหะหนึ่งในรูปของโลหะอิสระ เพราะมีสมบัติหลายประการ เช่น สมบัติการนำไฟฟ้าและความร้อนดีเยี่ยม ทนต่อการผุกร่อน แข็งแรง ดึงเป็นเส้น และตีเป็นแผ่นบางๆ ได้ (โครงการพัฒนาเนื้อหาความรู้สำหรับเครือข่ายคอมพิวเตอร์เพื่อโรงเรียนไทย มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์) มีน้ำหนักอะตอม 63.55 ความหนาแน่น (ที่ 20 °C) 8.96 g.cm⁻³ จุดหลอมเหลว 1,805 °C จุดเดือด 2,562 °C

การใช้ประโยชน์ของโลหะทองแดง

โลหะทองแดงมีคุณสมบัติเด่นมากมายโดยเฉพาะการนำไฟฟ้าและการนำความร้อนที่สูง มีความต้านทานการกัดกร่อน สามารถแปรรูปด้วยวิธีต่างๆ ได้ง่าย นอกจากนี้ยังมีความแข็งแรง และมีความต้านทานสูง ดังนั้นโลหะทองแดงจึงมีการนำไปใช้ประโยชน์อย่างกว้างขวาง ทองแดงเป็นตัวนำไฟฟ้าที่ดี การใช้งานส่วนใหญ่จึงเกี่ยวข้องกับอุตสาหกรรมไฟฟ้า เช่น ใช้ทำสายไฟ เคเบิล มอเตอร์ เครื่องกำเนิดไฟฟ้า ไดนาโม พัดลม ระบบควบคุมในโรงงาน อุปกรณ์ไฟฟ้า ระบบจ่ายกำลัง เครื่องปรับอากาศ และอุปกรณ์อิเล็กทรอนิกส์ต่างๆ ด้วยคุณสมบัติด้านการกัดกร่อนทองแดงจึงนำมาใช้ในการก่อสร้างหลายอย่าง เช่น ทำหลังคา ท่อน้ำและข้อต่อต่างๆ ระบบให้ความร้อน และระบบปรับอากาศ ใช้ทำเครื่องจักรกล เครื่องใช้ในบ้าน เนื่องจากขึ้นรูปง่าย มีความสามารถต้านทานการกัดกร่อนของน้ำทะเล และมีการถ่ายเทความร้อนสูง จึงใช้ทำท่อ วาล์ว ข้อต่อในโรงงานน้ำจากน้ำทะเล อุปกรณ์แลกเปลี่ยนความร้อน และเครื่องมือกลอื่นๆ (สุภาวดี หุ่นสวัสดิ์, 2539)

พิษของทองแดงต่อร่างกาย

การเกิดพิษขึ้นอยู่กับปริมาณที่ได้รับเข้าไป ช่องทางที่ได้รับและสภาพร่างกายของแต่ละบุคคล ทองแดงถูกดูดซึมได้ดีในกระเพาะอาหารและลำไส้ส่วนบน โดยซึมผ่านเข้าผนังลำไส้ไปที่ตับ จากนั้นจะรวมตัวกับน้ำดี แล้วถูกหลั่งออกมาบริเวณลำไส้ ชั้บออกไปกับอุจจาระ หรืออาจถูกดูดกลับเข้าสู่ร่างกายได้ 30% โดยไปสะสมที่กระดูก กล้ามเนื้อ ตับ สมอง การสะสมจะมากที่ตับ และสมอง เมื่อได้รับทองแดงในปริมาณมากจะทำให้เกิดความเป็นพิษต่อร่างกาย คือ คลื่นเหียน อาเจียน เกิดการอักเสบในช่องท้องและกล้ามเนื้อ ท้องเสีย การทำงานของหัวใจผิดปกติ กดระบบภูมิคุ้มกันของร่างกายและอาจส่งผลให้เกิดความผิดปกติทางจิต ส่วนอาการเรื้อรังจากการได้รับติดต่อกันเป็นเวลานาน และตับทำหน้าที่ขับกพร่อง ไม่สามารถขับทองแดงออกจากร่างกายได้ตามปกติ จึงทำให้มีการสะสมอยู่ในร่างกายเป็นปริมาณมาก ส่งผลให้เกิดความผิดปกติของร่างกาย หรือกลุ่มอาการ Wilson' Diseases คือ ร่างกายสันเทาอยู่ตลอดเวลา กล้ามเนื้อแข็งเกร็ง มีน้ำมูกน้ำลายไหล ควบคุมการพูดลำบาก (ศูนย์ข้อมูลพิษวิทยา)

ตามพระราชบัญญัติส่งเสริมและรักษาคุณภาพสิ่งแวดล้อมแห่งชาติ พ.ศ. 2535 กฎประกาศ และระเบียบที่เกี่ยวข้องด้านการควบคุมมลพิษ เรื่อง กำหนดมาตรฐานคุณภาพน้ำในแหล่งน้ำผิวดิน ได้กำหนดมาตรฐานคุณภาพน้ำของโลหะหนักทั้ง 4 ชนิด ในแหล่งน้ำประเภท 2, 3, 4 โดย

แคดเมียม (Cd) ในน้ำที่มีความกระด้างในรูปของ CaCO_3 ไม่เกินกว่า 100 mg/L มีค่าไม่เกินกว่า 0.005 mg/L และในน้ำที่มีความกระด้างในรูปของ CaCO_3 เกินกว่า 100 mg/L มีค่าไม่เกินกว่า 0.05 mg/L

ปรอททั้งหมด (Total Hg) มีค่าไม่เกินกว่า 0.002 mg/L

สารหนู (As) มีค่าไม่เกินกว่า 0.01 mg/L

ทองแดง (Cu) มีค่าไม่เกินกว่า 0.1 mg/L (ประกาศคณะกรรมการสิ่งแวดล้อมแห่งชาติ ฉบับที่ 8, 2537)

แหล่งน้ำ

ความหมายของแหล่งน้ำ

น้ำฝนเป็นต้นกำเนิดของน้ำที่ปรากฏบนผิวโลก เมื่อฝนตกลงมาบนพื้นดิน จะมีน้ำบางส่วนขังอยู่บนผิวดิน และบางส่วนซึมลงไปสะสมอยู่ในดิน ทำให้เกิดเป็นแหล่งน้ำตามธรรมชาติ ในดินที่อำนวยการประโยชน์ให้กับพืชได้โดยตรง เมื่อมีฝนตกมาก น้ำไม่สามารถจะขังอยู่ได้บนผิวดิน

และซึมลงไปในดินได้ทั้งหมด ก็จะเกิดเป็นน้ำไหลนองไปบนผิวดิน จากนั้นจะไหลลงสู่ที่ลุ่ม ที่ต่ำ ลำน้ำ ลำธาร แม่น้ำ แล้วจึงไหลลงสู่ทะเลและมหาสมุทรต่อไป น้ำในดินและน้ำที่ซังอยู่บนผิวดินที่ได้มาจากฝนโดยตรงนั้น จะมีอย่างเพียงพอและสม่ำเสมอได้ก็ต้องอาศัยจากฝนที่ตกลงมาอย่างสม่ำเสมอด้วยเช่นกัน หากฝนไม่ตก ก็จำเป็นต้องมีน้ำจากแหล่งน้ำอื่นมาเพิ่มเติมให้โดยธรรมชาติ หรือโดยวิธีการชลประทาน พืชจึงจะมีน้ำใช้อย่างเพียงพอต่อความต้องการ แหล่งน้ำที่จะนำมาใช้ประโยชน์ในการชลประทาน ได้แก่ แหล่งน้ำผิวดินและแหล่งน้ำใต้ผิวดิน

แหล่งน้ำผิวดิน ได้แก่ แม่น้ำ ลำธาร ห้วย หนอง คลอง และบึง ฯลฯ เป็นแหล่งรวบรวมน้ำตามธรรมชาติ ซึ่งส่วนใหญ่จะได้จากน้ำที่ไหลมาบนผิวดิน และบางส่วนซึมออกมาจากดิน เป็นแหล่งน้ำขนาดเล็กและขนาดใหญ่ ที่จะอำนวยให้ทำการชลประทานขนาดต่างๆได้เป็นอย่างดี ปริมาณน้ำที่จะมีในแหล่งน้ำธรรมชาติ เช่น แม่น้ำ ลำธารนั้น ย่อมแตกต่างกันไปตามฤดูกาล ทั้งนี้ขึ้นอยู่กับว่า มีฝนตกในเขตของกลุ่มน้ำนั้นหรือไม่ หรือว่าตกจำนวนมากน้อยเพียงไร บางวันอาจมีน้ำไหลมาในลำธารมาก เพราะเกิดฝนตกหนักและอาจมีระดับสูงไหลล้นเข้าไปท่วมเป็นประโยชน์ต่อพื้นที่เพาะปลูกได้เองตามธรรมชาติ ส่วนในระยะฤดูแล้ง ไม่มีฝนตกเลย น้ำในแหล่งน้ำประเภทบ่อ หนอง และบึง ซึ่งได้เก็บในช่วงฤดูฝนไว้นั้นอาจมีน้ำให้ใช้พอบรรเทาความเดือดร้อนได้บ้าง แต่น้ำในแม่น้ำ ลำธาร และห้วยบางแห่ง อาจมีน้ำไหลลดน้อยลงไปหรือไม่มีเลยก็ได้

แหล่งน้ำธรรมชาติอีกประเภทหนึ่ง ซึ่งให้น้ำสำหรับทำการชลประทานได้ คือ แหล่งน้ำใต้ผิวดิน น้ำที่มีอยู่ใต้ผิวดิน ได้มาจากน้ำฝนที่ตกแล้วซึมผ่านลงไปสะสมอยู่ในช่องว่างของชั้นดินทราย และกรวด ตลอดจนรอยแตก และโพรงของหินที่อยู่ใต้ผิวดินนั้น เมื่อซูดบ่งลงไปจนถึงชั้นที่มีน้ำสะสมอยู่ เช่น ชั้นทรายและกรวด ซึ่งน้ำไหลผ่านได้ดี เวลาใดที่น้ำขึ้นไปใช้ทำให้ระดับน้ำในบ่อลดลง ก็จะมีน้ำไหลเข้ามาแทนที่อยู่เสมอ บ่อน้ำที่ใช้สำหรับการชลประทาน จะมีขนาดที่เหมาะสมอย่างไรวินั้น ขึ้นอยู่กับลักษณะของชั้นทราย หรือชั้นกรวดที่เป็นแหล่งสะสมน้ำ และปริมาณน้ำที่ต้องการใช้งานเป็นหลัก แต่โดยทั่วไปแล้วบ่อน้ำใต้ดินแห่งหนึ่งๆจะช่วยพื้นที่เพาะปลูกได้ไม่มากนัก (สารานุกรมไทยสำหรับเยาวชน เล่มที่ 7)

ประเภทแหล่งน้ำผิวดิน

คณะกรรมการสิ่งแวดล้อมแห่งชาติ ได้ออกประกาศคณะกรรมการสิ่งแวดล้อมแห่งชาติ ฉบับที่ 8 (พ.ศ. 2537) ออกตามความในพระราชบัญญัติส่งเสริมและรักษาคุณภาพสิ่งแวดล้อมแห่งชาติ พ.ศ. 2535 เรื่อง กำหนดมาตรฐานคุณภาพน้ำในแหล่งน้ำผิวดิน ตีพิมพ์ในราชกิจจานุเบกษา เล่ม 111 ตอนที่ 16 ลงวันที่ 24 กุมภาพันธ์ 2537 โดยกำหนดประเภทแหล่งน้ำ

ผิวดินแบ่งออกเป็น 5 ประเภท คือ แหล่งน้ำประเภทที่ 1 แหล่งน้ำประเภทที่ 2 แหล่งน้ำประเภทที่ 3 แหล่งน้ำประเภทที่ 4 และแหล่งน้ำประเภทที่ 5

แหล่งน้ำประเภทที่ 1 ได้แก่ แหล่งน้ำที่คุณภาพน้ำมีสภาพตามธรรมชาติ โดยปราศจากน้ำทิ้ง จากกิจกรรมทุกประเภทและสามารถเป็นประโยชน์เพื่อ

1. การอุปโภคและบริโภค โดยต้องผ่านการฆ่าเชื้อโรคตามปกติก่อน
2. การขยายพันธุ์ตามธรรมชาติของสิ่งมีชีวิตระดับพื้นฐาน
3. การอนุรักษ์ระบบนิเวศน์ของแหล่งน้ำ

แหล่งน้ำประเภทที่ 2 ได้แก่ แหล่งน้ำที่ได้รับน้ำทิ้งจากกิจกรรมบางประเภท และสามารถเป็นประโยชน์เพื่อ

1. การอุปโภคและบริโภค โดยต้องผ่านการฆ่าเชื้อโรคตามปกติก่อน และผ่านกระบวนการปรับปรุงคุณภาพน้ำทั่วไปก่อน

2. การอนุรักษ์สัตว์น้ำ
3. การประมง
4. การว่ายน้ำและกีฬาทางน้ำ

แหล่งน้ำประเภทที่ 3 ได้แก่ แหล่งน้ำที่ได้รับน้ำทิ้งจากกิจกรรมบางประเภท และสามารถเป็นประโยชน์เพื่อ

1. การอุปโภคและบริโภค โดยต้องผ่านการฆ่าเชื้อโรคตามปกติ และผ่านกระบวนการปรับปรุงคุณภาพน้ำทั่วไปก่อน

2. การเกษตร

แหล่งน้ำประเภทที่ 4 ได้แก่ แหล่งน้ำที่ได้รับน้ำทิ้งจากกิจกรรมบางประเภท และสามารถเป็นประโยชน์เพื่อ

1. การอุปโภคและบริโภค โดยต้องผ่านการฆ่าเชื้อโรคตามปกติ และผ่านกระบวนการปรับปรุงคุณภาพน้ำเป็นพิเศษก่อน

2. การอุตสาหกรรม

แหล่งน้ำประเภทที่ 5 ได้แก่ แหล่งน้ำที่ได้รับน้ำทิ้งจากกิจกรรมบางประเภท และสามารถเป็นประโยชน์เพื่อการคมนาคม (ประกาศคณะกรรมการสิ่งแวดล้อมแห่งชาติ ฉบับที่ 8, 2537)

ข้อมูลพื้นฐานของพื้นที่ศึกษา

สภาพทั่วไปของจังหวัดนครนายก

จังหวัดนครนายกมีเนื้อที่ประมาณ 2,122 ตารางกิโลเมตร หรือประมาณ 1,326,250 ไร่ ตั้งอยู่ทางทิศตะวันออกของประเทศไทย ระหว่างเส้นรุ้งที่ 14 องศาเหนือ และเส้นแวงที่ 101 องศาตะวันออก มีระยะทางจากกรุงเทพมหานครตามถนนทางหลวงแผ่นดินหมายเลข 305 (รังสิต-นครนายก) เลียบคลองรังสิตผ่านอำเภองครักษ์ ถึงจังหวัดนครนายก ระยะทาง 105 กิโลเมตร ห่างจากท่าอากาศยานสุวรรณภูมิประมาณ 105 กิโลเมตร ท่าอากาศยานดอนเมือง 82 กิโลเมตร ท่าเทียบเรือคลองเตย 120 กิโลเมตร ท่าเทียบเรือแหลมฉบัง 163 กิโลเมตร

ลักษณะภูมิประเทศ สภาพโดยทั่วไปเป็นที่ราบ ทางตอนเหนือและตะวันออกเป็นภูเขาสูงชันในเขตอำเภอบ้านนา อำเภอเมืองนครนายก และอำเภอปากพลี ส่วนหนึ่งอยู่ในเขตอุทยานแห่งชาติเขาใหญ่ซึ่งเป็นเขตรอยต่อกับอีก 3 จังหวัด ได้แก่ สระบุรี นครราชสีมา และปราจีนบุรี ซึ่งมีเทือกเขาติดต่อกับเทือกเขาดงพญาเย็น มียอดเขาสูงที่สุดของจังหวัดคือ ยอดเขาเขียว มีความสูงจากระดับน้ำทะเล 1,351 เมตร ส่วนทางตอนกลางและตอนใต้ เป็นที่ราบอันกว้างใหญ่เป็นส่วนหนึ่งของที่ราบสามเหลี่ยมลุ่มแม่น้ำเจ้าพระยาที่เรียกว่า “ที่ราบกรุงเทพ” ลักษณะดินเป็นดินปนทรายและดินเหนียวเหมาะแก่การทำนา ทำสวนผลไม้ และการอยู่อาศัย ซึ่งติดกับจังหวัดฉะเชิงเทราและปทุมธานี

สภาพภูมิอากาศ จังหวัดนครนายกมีอุณหภูมิเฉลี่ยประมาณ 21.70-37.30 องศาเซลเซียส ปริมาณน้ำฝนวัดได้เฉลี่ยประมาณ 188.30 มม.

จังหวัดนครนายกมีอาณาเขตติดต่อกับจังหวัดใกล้เคียง โดยทิศเหนือติดต่อกับจังหวัดสระบุรีและจังหวัดนครราชสีมา ทิศตะวันออกติดต่อกับจังหวัดนครราชสีมาและจังหวัดปราจีนบุรี ทิศใต้ติดต่อกับจังหวัดฉะเชิงเทราและจังหวัดปราจีนบุรี และทิศตะวันตกติดต่อกับจังหวัดปทุมธานี

จังหวัดนครนายก แบ่งเขตการปกครองออกเป็น 4 อำเภอ 41 ตำบล 408 หมู่บ้าน 1 องค์การบริหารส่วนจังหวัด 1 เทศบาลเมือง (เทศบาลเมืองนครนายก) 5 เทศบาลตำบล (เทศบาลตำบลท่าช้าง เทศบาลตำบลบ้านนา เทศบาลตำบลองครักษ์ เทศบาลตำบลเกาะหวาย เทศบาลตำบลพิบูลออก) และ 39 องค์การบริหารส่วนตำบล โดยอำเภองครักษ์ มีจำนวน 11 ตำบล ประกอบด้วย ตำบลองครักษ์ ตำบลพระอาจารย์ ตำบลบึงศาล ตำบลศรีษะกระบือ ตำบลโพธิ์แทน ตำบลบางสมบุญ ตำบลทรายมูล ตำบลบางปลากด ตำบลบางลูกเสือ ตำบลชุมพล ตำบลคลองใหญ่ (กลุ่มงานยุทธศาสตร์การพัฒนาจังหวัด สำนักงานจังหวัดนครนายก, 2557)

ด้านการเกษตร

ประชากรจังหวัดนครนายกเป็นครัวเรือนเกษตรกรรม มีจำนวน 21,829 ครัวเรือน หรือเท่ากับ ร้อยละ 23.55 ของครัวเรือนทั้งหมด (92,701 ครัวเรือน) ซึ่งมีแนวโน้มลดลงจากปี พ.ศ. 2558 เล็กน้อย ซึ่งจากเดิมมีครัวเรือนทำการเกษตรร้อยละ 23.75 โดยส่วนใหญ่มีอาชีพหลัก ได้แก่ การเกษตรกรรม การปศุสัตว์ และการประมง ซึ่งมีพื้นที่เกษตรกรรมประมาณ 708,983 ไร่ คิดเป็น ร้อยละ 53.48 ของพื้นที่จังหวัด โดยมีอาชีพทางการเกษตรกรรม ดังนี้

1. การปลูกข้าว มีพื้นที่ทำนาทั้งหมด 526,464 ไร่ คิดเป็นร้อยละ 74.26 ของพื้นที่เกษตรกรรมของจังหวัด แบ่งการเพาะปลูกเป็นข้าวนาปี และข้าวนาปรัง โดยมีพื้นที่ปลูกข้าวนาปี ประมาณ 367,857 ไร่ ผลผลิตข้าวนาปี 205,133 ตัน ผลผลิตข้าวนาปี เฉลี่ย 560 กก./ไร่ และมีพื้นที่ปลูกข้าวนาปรัง ประมาณ 176,246 ไร่ ผลผลิตข้าวนาปรัง 108,167 ตัน ผลผลิตข้าวนาปรัง เฉลี่ย 614 กก./ไร่ (ที่ความชื้น 15%) โดยพื้นที่ปลูกข้าวบางส่วนในทุกอำเภอเป็นพื้นที่ลุ่ม เกษตรกรใช้พันธุ์ข้าวในกลุ่มพันธุ์พื้นเมือง พันธุ์ข้าวน้ำลึก หรือพันธุ์ข้าวขึ้นน้ำ ซึ่งกลุ่มข้าวพันธุ์ดังกล่าวให้ผลผลิตในปริมาณที่ไม่สูงนัก และนอกจากนั้นในพื้นที่ปลูกข้าวของจังหวัดส่วนใหญ่ประสบปัญหาดินเปรี้ยวทำให้ได้ผลผลิตไม่สูง

2. การทำสวน ไม้ผล ไม้ยืนต้น มีพื้นที่ทำสวน ไม้ผล ไม้ยืนต้นประมาณ 49,637 ไร่ ที่นิยมปลูกกันมาก ได้แก่ มะยงชิด มะปรางหวาน กระท้อน กล้วย ขนุน ทุเรียน เงาะ มังคุด ลองกอง ไม้เลื้อย และมะนาว โดยเฉพาะอย่างยิ่งมะยงชิด มะปรางหวานที่นับว่าเป็นผลไม้ที่มีชื่อเสียงของจังหวัดนครนายก และเนื่องจากการทำสวนไม้ผลในจังหวัดส่วนใหญ่เป็นแบบสวนผสมผสาน ทำให้มีผลผลิตจากผลไม้ชนิดต่างๆ ผลัดเปลี่ยนกันออกตลอดทั้งปี ทำรายได้ให้แก่เกษตรกรเป็นอย่างดี

3. การปลูกไม้ดอกไม้ประดับ มีการเพาะปลูกทั้งในลักษณะของไม้ชำถุง ชำกิ่ง ไม้กระถาง ไม้ตัดใบ รวมถึงไม้ประดับชุดล้อม ส่วนมากอยู่ในเขตอำเภองครักษ์ ซึ่งมีการเพาะกล้าไม้จำหน่ายทั้งขนาดเล็ก และขนาดใหญ่ จำนวนกว่าพันชนิด จังหวัดนครนายกมีพื้นที่ปลูกไม้ดอกไม้ประดับประมาณ 6,408 ไร่ ถือได้ว่าเป็นแหล่งเพาะปลูกไม้ดอกไม้ประดับที่ใหญ่ที่สุดในประเทศไทย

4. การปลูกพืชผักและสมุนไพร มีการเพาะปลูกพืชผักและสมุนไพรประมาณ 3,602 ไร่ เพื่อใช้บริโภคในครัวเรือน หรือนำออกจำหน่ายภายในจังหวัดและพื้นที่จังหวัดข้างเคียง เช่น ตลาดปราจีนบุรี ตลาดไท และตลาดสี่มุมเมือง โดยปลูกกันมากในพื้นที่อำเภอบ้านนา อำเภอเมืองนครนายก อำเภองครักษ์ และอำเภอปากพลี ตามลำดับ

จังหวัดนครนายกมีการใช้ประโยชน์ที่ดิน จากพื้นที่ทั้งหมด 1,326,250 ไร่ ส่วนใหญ่ เป็นพื้นที่เกษตรกรรม 708,983 ไร่ คิดเป็นร้อยละ 53.48 รองลงมาเป็นพื้นที่ป่าไม้ 401,251 ไร่ ร้อยละ 30.26 และพื้นที่ชุมชนและสิ่งปลูกสร้าง 153.44 ตร.กม. คิดเป็นร้อยละ 8.62 จังหวัดนครนายก ได้มีการวางผังเมืองรวมจังหวัดเพื่อเป็นแนวทางในการพัฒนาในภาพรวมครอบคลุมพื้นที่ทั้ง จังหวัดตามความเหมาะสมและศักยภาพของพื้นที่ไว้แล้ว (กลุ่มงานยุทธศาสตร์การพัฒนาจังหวัด สำนักงานจังหวัดนครนายก, 2557)

แหล่งน้ำสำคัญในเขตจังหวัดนครนายก มีเขตลุ่มน้ำสำคัญอยู่ 3 แห่งคือ

1. ลุ่มน้ำนครนายก ต้นกำเนิดจากห้วยต่าง ๆ เช่น คลองท่าด่าน ห้วยนางรอง ห้วยสม พุง คลองมะเดื่อ ห้วยสาริกา ห้วยน้ำริน ห้วยแม่ป่าน เป็นต้น ซึ่งต้นน้ำอยู่ในเขตอุทยานแห่งชาติเขาใหญ่ ลำน้ำช่วงบนถึงน้ำตกเหวนรกเรียกว่า คลองสมอปูน ลงมาถึงบริเวณบ้านท่าด่านเรียกว่า คลองท่าด่าน แล้วไหลผ่านอำเภอเมือง นครนายก อำเภอปากพลีตอนบน และอำเภอองครักษ์ เรียกว่า แม่น้ำนครนายก แล้วไหลไปบรรจบแม่น้ำบางปะกง ที่ตำบลบางแตน อำเภอบ้านสร้าง จังหวัดปราจีนบุรี เรียกว่า ปากน้ำโยทะกา มีความยาวประมาณ 130 กิโลเมตร ไหลจากทิศ ตะวันออกไปทิศตะวันตก

2. ลุ่มน้ำคลองบ้านนา ต้นน้ำเกิดจากเทือกเขาในเขตอุทยานแห่งชาติเขาใหญ่ ในเขต อำเภอแก่งคอย และอำเภอมวกเหล็ก จังหวัดสระบุรี มีลำน้ำสาขาไหลมารวมกันคือ ห้วยเจ็ดคด ห้วยใหญ่ ห้วยน้ำเค็ม และห้วยข่าย ลำน้ำไหลจากทิศเหนือไปบรรจบกับคลองส่งน้ำฝั่งขวาของ โครงการส่งน้ำฯ นครนายก (คลอง 29) และแม่น้ำนครนายกในตำบลทองหลาง และตำบลบางอ้อ อำเภอบ้านนา ความยาวของลำน้ำจากต้นน้ำถึงจุดที่ไหลลงแม่น้ำนครนายก ประมาณ 57 กิโลเมตร ซึ่งมีน้ำไหลตลอดปี แต่มีน้ำน้อยมากในฤดูแล้ง

3. ลุ่มน้ำคลองยาง ต้นน้ำมาจากเทือกเขาสมอปูน ซึ่งเป็นลำน้ำช่วงบนอยู่ในเขต อุทยานฯ เขาใหญ่ เรียกว่า คลองวังบอน ไหลมาทางใต้ถึงตำบลปากพลี เรียกว่า คลองยาง เมื่อเข้า เขตตำบลปากพลีเรียกว่า คลองปากพลี จากสุดเขตตำบลปากพลีไปบรรจบแม่น้ำปราจีนบุรี เรียกว่า คลองสารภี มีความยาวรวมตลอดลำน้ำประมาณ 36 กิโลเมตร เป็นเส้นแบ่งเขตอำเภอ ปากพลี จังหวัดนครนายก กับอำเภอเมืองปราจีนบุรี จังหวัดปราจีนบุรี (กลุ่มงานยุทธศาสตร์การ พัฒนาจังหวัด สำนักงานจังหวัดนครนายก, 2557)

พฤติกรรมของชาวนาในการเพาะปลูก

กฤษฎา และคณะ (2557) ได้ศึกษาพฤติกรรมการใช้สารเคมีในการกำจัดศัตรูพืชของ ชาวนาในพื้นที่ อ.องครักษ์ จ.นครนายก โดยเป็นการศึกษาเชิงปรากฏการณ์ ใช้วิธีการเชิงคุณภาพ

โดยการสัมภาษณ์เกษตรกร จำนวน 100 ราย ดำเนินการศึกษาโดยประเมินสภาวะชนบทแบบเร่งด่วน โดยใช้แนวทางสัมภาษณ์กึ่งดำเนินการวิเคราะห์เนื้อหา พบว่าอำเภอองค์กรักษ์ มีลักษณะเป็นพื้นที่ราบลุ่ม และมีร้านค้าเคมีเกษตรจำนวน 19 ร้าน ระยะเวลาในการใช้สารเคมีอยู่ระหว่าง 5 - 25 ปี วัตถุประสงค์ในการผลิตของเกษตรกร เพื่อสามารถนำมาขายได้ในจำนวนที่มากที่สุดนำมาสู่การมีรายได้ที่สูง รูปแบบการใช้สารเคมี มี 2 ประเภท คือ

1. การใช้สารเคมีเพื่อควบคุมและกำจัดวัชพืช
2. การใช้สารเคมีกำจัดแมลงศัตรูพืช ยาฆ่าแมลงที่เกษตรกรใช้ในพื้นที่ด้วยกัน 17 ชนิด และอีก 14 กลุ่มสารออกฤทธิ์ ใช้จำนวน 6-7 ครั้ง/รอบการผลิต

พฤติกรรมของเกษตรกรในการใช้สารเคมี

1. ความคาดหวังของเกษตรกรที่ทำการผลิตข้าวคือเกษตรกรมุ่งหวังที่จะให้ได้ผลผลิตในปริมาณที่เพื่อให้ได้รายได้สูง
2. การรับรู้ตามกระบวนการรับรู้ (Perception)
3. ได้รับการส่งเสริม สาเหตุที่เกษตรกรต้องใช้สารเคมียา เนื่องจากวัชพืช และแมลงศัตรูพืชรบกวน เกษตรกรมีความมีความกังวล และความกลัวที่ต้องใช้สารเคมี (กฤติญา แสงภักดี et al., 2557)

จากการศึกษาเอกสาร แนวคิด ทฤษฎี และผลงานวิจัยต่างๆ ทั้งในและต่างประเทศดังกล่าวมาแล้วทั้งหมด ทำให้ผู้วิจัยสนใจที่จะศึกษาการแสดงออกของยีน Metallothionein และ Vitellogenin ในตั๊กแตนตำข้าว (*Cherax quadricarinatus*) ต่อปริมาณโลหะหนัก (แคดเมียม ปรอท สารหนู และทองแดง) โดยเก็บตัวอย่างน้ำจากแหล่งน้ำธรรมชาติ พื้นที่ ต.องค์กรักษ์ อ.องค์กรักษ์ จ.นครนายก วิเคราะห์โดยใช้เทคนิค real-time PCR

บทที่ 3

วิธีการดำเนินการวิจัย

สารเคมี

1.1 สารละลายมาตรฐานแคดเมียม ปรอท สารหนู และทองแดง 1,000 µg/ml สำหรับเครื่อง AA ยี่ห้อ Agilent สำหรับเตรียมสารเพื่อทดลองเลี้ยงกุ้ง

1.2 แคดเมียม (Cadmium, Cd) ความเข้มข้น 1,000 µg/L ใน 2% Nitric acid

1.3 ปรอท (Mercury, Hg) ความเข้มข้น 1,000 µg/L ใน 2% Nitric acid

1.4 สารหนู (Arsenic, As) ความเข้มข้น 1,000 µg/L ใน 2% Nitric acid

1.5 ทองแดง (Copper, Cu) ความเข้มข้น 1,000 µg/L ใน 2% Nitric acid

1.6 DI water

1.7 RNeasyTM RNA Stabilization Reagent

1.8 RNeasy[®] Mini Kit ยี่ห้อ QIAGEN (Germany)

1.9 Buffer RLT

1.10 Ethanol 70%

1.11 DNase I

1.12 RNase-free water

1.13 Buffer RDD

1.14 Buffer RW1

1.15 Buffer RPE

1.16 50 µM Oligo(dT)20 ยี่ห้อ Life technologies

1.17 10 mM dNTP Mix

1.18 DEPC-treated water

1.19 10X RT buffer

1.20 25 mM MgCl₂

1.21 0.1 M DTT

1.22 RNaseOUTTM (40 U/µl)

1.23 SuperScript[®] III RT

1.24 RNase H

1.25 Agarose gel 1%

1.26 1X TBE

1.27 Ethidium bromide 0.5 µg/L

1.28 Green Supermix ยี่ห้อ SsoAdvanced universal SYBR® Green supermix

1.29 Forward and reverse primer ของ MT, VTG, Elf1

1.30 Nuclease free H₂O

1.31 ชุดสกัดตัวอย่างสำเร็จรูป Q-sep Quenchers จากบริษัท RESTEK ประเทศสหรัฐอเมริกา

เครื่องมือ

2.1 เครื่อง HQd Portable Meter ยี่ห้อ HACH รุ่น HQ40d Model

2.2 เครื่อง AAS

2.3 เครื่อง GC-MS ยี่ห้อ Shimadzu ประเทศญี่ปุ่น

2.4 เครื่อง ICP-MS ยี่ห้อ PerkinElmer รุ่น NexION 300X ประเทศสหรัฐอเมริกา

2.5 เครื่อง Centrifuge

2.6 เครื่อง PCR Thermal cycle machine

2.7 เครื่อง Shaking Incubator

2.8 เครื่อง Electrophoresis apparatus และอุปกรณ์

2.9 เครื่อง Gel documentation ยี่ห้อ Major Science

2.10 เครื่อง PCR Bio-Rad® CFX 96™ ประเทศสหรัฐอเมริกา

2.11 เครื่อง PCR Thermal cycler machine

สัตว์ที่ใช้ในการทดลอง

กิ้งก่าแมงที่ใช้ในการทดลอง เป็นเพศผู้ มีขนาดความยาวเฉลี่ย 4.5-6.0 เซนติเมตร จากฟาร์มชมรมกิ้งก่าแมง มีนบุรี หนองจอก ลาดกระบัง บางน้ำเปรี้ยว ของครูสมพร จ. กรุงเทพมหานคร

ลำดับดีเอ็นเอของ primer

นำลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน Elf1, VTG และ MT ของกิ้งก่าแมง จาก Genbank (www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank) โดยตรงกับ accession number DQ847534 AF306784

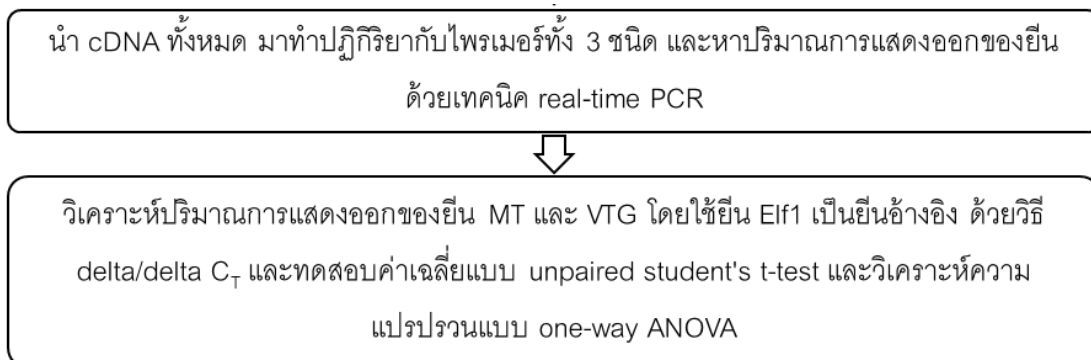
และ DQ847612 ตามลำดับ มาออกแบบไพรเมอร์ด้วยโปรแกรม Primer-BLAST (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast>) ให้มีความยาวประมาณ 18-30 คู่เบส ให้มีจำนวน 100-150 มีปริมาณ CG มากกว่า 50% และมีจุดหลอมเหลวไม่เกิน 60 องศาเซลเซียส

วิธีดำเนินการวิจัย

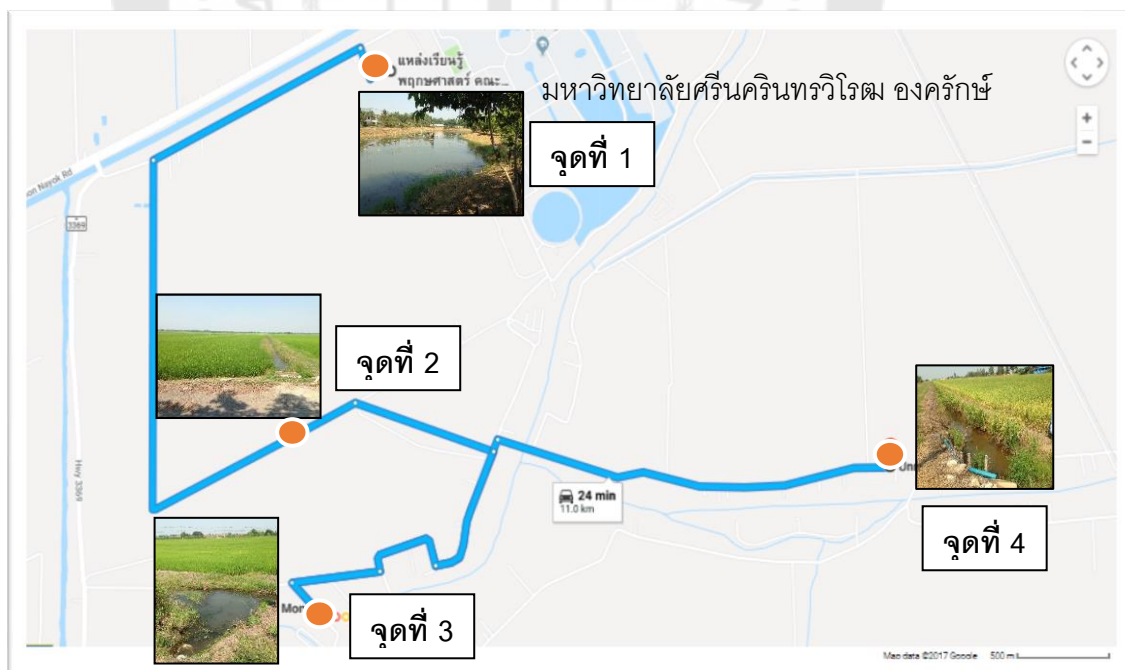
วิธีดำเนินการโดยภาพรวม



วิธีดำเนินการโดยภาพรวม (ต่อ)



เก็บตัวอย่างน้ำจากแหล่งน้ำธรรมชาติ ในพื้นที่ ต.องครักษ์ อ.องครักษ์ จ.นครนายก จำนวน 4 จุด โดยผู้วิจัยได้สุ่มเก็บตัวอย่างน้ำจากแหล่งน้ำธรรมชาติ ในพื้นที่ ต.องครักษ์ อ.องครักษ์ จ.นครนายก นำมาวิเคราะห์ข้อมูลคุณภาพทางกายภาพและเคมี เพื่อใช้เป็นข้อมูลในการออกแบบการทดลองเลี้ยงกุ้งก้ามแดง สกุล *Cherax quadricarinatus*



ภาพประกอบ 7 จุดเก็บตัวอย่างน้ำจากแหล่งน้ำธรรมชาติในพื้นที่ ต.องครักษ์ อ.องครักษ์ จ.นครนายก (ปรับปรุงและดัดแปลงมาจาก google map)

นำตัวอย่างทั้ง 4 จุด มาวิเคราะห์คุณภาพน้ำ

การวิเคราะห์คุณภาพน้ำทางกายภาพ

นำตัวอย่างน้ำมาวิเคราะห์ข้อมูลคุณภาพทางกายภาพ ได้แก่ อุณหภูมิ ความขุ่น ค่าการนำไฟฟ้า ค่าความเป็นกรด-ด่าง และค่าออกซิเจนละลายในน้ำ

วิธีการวิเคราะห์

นำตัวอย่างน้ำใส่ลงในปิเก็ตเจอร์ขนาด 100 มิลลิลิตร วัดอุณหภูมิด้วยเทอร์โมมิเตอร์ บันทึกรายผล และนำตัวอย่างน้ำใส่ลงในภาชนะที่มากับเครื่อง HQd Portable Meter ยี่ห้อ HACH รุ่น HQ40d Model (USA) และใช้ probe วัดค่าความขุ่น ค่าการนำไฟฟ้า ค่าความเป็นกรด-ด่าง และค่าออกซิเจนละลายในน้ำ บันทึกรายผลที่ได้

การวิเคราะห์คุณภาพน้ำทางเคมี

หาปริมาณโลหะหนัก

หาปริมาณโลหะหนัก ได้แก่ แคดเมียม ปรอท สารหนู และทองแดง ด้วยเทคนิคอินดักทีฟลี คัปเปิ้ล พลาสมา แมสสเปกโตรเมทรี (ไอซีพี-เอ็มเอส) ยี่ห้อ PerkinElmer รุ่น NexION 300X (USA) เพื่อหาปริมาณที่มีอยู่จริงในแหล่งน้ำธรรมชาติ นำข้อมูลที่ได้มาใช้ออกแบบการทดลองเลี้ยงกุ้ง ซึ่งจะใช้ปริมาณที่ตรวจพบมาเป็นเกณฑ์ในการกำหนดปริมาณโลหะหนักที่ใช้ทดลองเลี้ยงกุ้งก้ามแดง

เตรียมสารละลายมาตรฐานของ แคดเมียม ปรอท สารหนู และทองแดง โดยเตรียมที่ความเข้มข้นต่างๆ ดังนี้ 0.01, 0.05, 0.1, 0.5, 1, 2.5, 5, 10, 20, 25 $\mu\text{g/L}$ นำไปสร้างกราฟมาตรฐาน โดยกำหนดให้แกน x เป็นค่าความเข้มข้น (Conc.) ของสารละลายมาตรฐาน และแกน y เป็นค่า Ratio ที่วัดได้ คำนวณค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ (correlation coefficient, r) เกณฑ์ที่ยอมรับได้ ≥ 0.995

จากนั้นนำตัวอย่างน้ำที่เก็บจากแหล่งน้ำธรรมชาติ ในพื้นที่ ต.องครักษ์ อ.องครักษ์ จ.นครนายก ทั้ง 4 จุด มาวัดสัญญาณเป็นอัตราส่วน (ratio) ของสารที่ต้องการทดสอบกับสารมาตรฐานภายในหน่วย Count per Second (CPS) ด้วยเครื่อง ICP-MS ยี่ห้อ PerkinElmer รุ่น NexION 300X (USA) โดยใช้สภาวะของเครื่องดังนี้

ตาราง 2 แสดงสภาวะของการวิเคราะห์โลหะหนัก โดยใช้เครื่อง ICP-MS

พารามิเตอร์	ค่าที่ตั้ง
RF power	1,500 W
RF Matching	1.7 V
Nebulizer	Cross-flow
Nebulizer Pump	0.1 rps
S/C	2 degC
Sampling depth	8 mm.
Carrier Gas Flow	0.9 L/min
Makeup Gas Flow	0.3 L/min
Detector mode	Dual
Auto lens	On
Monitored ions	Cadmium 111 m/z, Mercury 202 m/z, Arsenic 75 m/z, Copper 63 m/z
Carrier Gas	Argon (Ar)

หาปริมาณสารกำจัดศัตรูพืช (Pesticides)

นำตัวอย่างน้ำจากธรรมชาติทั้ง 4 จุด เพื่อวิเคราะห์หาปริมาณสารกำจัดศัตรูพืช โดยมีขั้นตอนดังนี้

1. การสกัดตัวอย่างเพื่อวิเคราะห์ด้วยเครื่อง GC-MS

1.1 นำตัวอย่างน้ำที่เก็บจากธรรมชาติที่มีปริมาตร 500 มิลลิลิตร โดยนำไปประเหยจนเหลือ 25 มิลลิลิตร ใส่ลงในหลอด Centrifuge พลาสติก ขนาด 50 มิลลิลิตร พร้อมทั้งเติมสารละลาย Acetonitrile 10 มิลลิลิตร เขย่าด้วยเครื่องเขย่าสารเป็นเวลา 1 นาที

1.2 จากนั้นใส่สารสกัดตัวอย่าง Q-sep® QuEChERS dSPE ยี่ห้อ RESTEK (USA) ลงไป ทำการปั่นเหวี่ยงที่ 5,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 นาที เพื่อทำให้เกิดการแยกชั้นระหว่างส่วนที่เป็นของเหลวใสและของแข็ง

1.3 นำของเหลวใสที่อยู่ส่วนบนมาทำความสะอาดด้วยหลอด Cleansing เขย่าด้วยเครื่องเขย่าสาร 1 นาที จากนั้นทำการปั่นเหวี่ยงที่ 6,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 1 นาที

1.4 นำตัวอย่างที่ได้มากรองด้วยชุดทำความสะอาด Supelclean™ LC-Si ยี่ห้อ SUPELCO (Germany) จากนั้นนำสารที่ได้ใส่ใน Vial เพื่อทำการวิเคราะห์ด้วยเครื่อง GC-MS ต่อไป

1.5 เตรียม blank (น้ำ DI) และ สารมาตรฐานสารกำจัดศัตรูพืช (2,4-D, Ametryn, Dicamba, Bromophos-methyl และ Pendimethalin) โดยทำเช่นเดียวกับการเตรียมตัวอย่าง

2. การวิเคราะห์ปริมาณสารกำจัดศัตรูพืช (Pesticides) วิเคราะห์ด้วยเครื่อง GC-MS รุ่น QP2020 ยี่ห้อ Shimadzu ประเทศญี่ปุ่น โดยใช้สภาวะดังนี้

ตาราง 3 แสดงสภาวะของการวิเคราะห์ pesticides โดยใช้เครื่อง GC-MS

พารามิเตอร์	ค่าที่ตั้ง
HS	
Headspace sampler	AOC-20i
Mode	Loop (1 mL capacity)
Oven temperature	80°C
Vial warming time	30 minutes
GC	
Gas Chromatograph-mass spectrometer	GC-MS-QP2020
Column	DB-5 (30 m x 0.25 mm, Diameter 0.25 mm)
Injection mode	split
Split ratio	5
Control mode	Constant linear velocity (40 cm/sec)
Carrier Gas	Helium (He), Air
Oven temperature	80°C (2 min)->(180°C (3 min)->280°C (10 min)

ตาราง 3 (ต่อ)

พารามิเตอร์	ค่าที่ตั้ง
MS	
Ion source temp.	200°C
Interface temp.	250°C
Measurement mode	SIM mode
Event time	2 sec

จากนั้นนำผลการวิเคราะห์ที่ได้มา Integrate และเทียบกับฐานข้อมูลของ NIST/EPA/NIH Mass Spectral Library (NIST14) เพื่อสแกนหา Pesticides

เตรียมสารละลาย Cd, Hg, As, Cu และสารละลายผสมของโลหะทั้ง 4 ชนิด (mix Cd+Hg+As+Cu) โดยให้ความเข้มข้นใกล้เคียงกับตัวอย่างน้ำธรรมชาติทั้ง 4 จุด

จากการหาปริมาณ Cd, Hg, As, Cu จากตัวอย่างน้ำในธรรมชาติ นำมากำหนดความเข้มข้นของสารละลายโลหะหนักแต่ละชนิด โดยใช้สารละลายมาตรฐาน Cd, Hg, As, Cu AA Standard 1000 µg/L ใน 5% HNO₃ (Agilent Technologies) เตรียมสารละลายโลหะหนักทั้ง 4 ชนิด ให้ความเข้มข้นดังนี้ แคดเมียม 0.1 µg/L พรอท 0.1 µg/L สารหนู 1.0 µg/L และทองแดง 0.1 µg/L

จากนั้นนำสารละลายที่เตรียมไปตรวจสอบความเข้มข้นของโลหะหนักทั้ง 4 ชนิด ด้วยเครื่อง ICP-MS ซึ่งโลหะแต่ละชนิดมีความเข้มข้น ดังนี้ แคดเมียม 0.1 µg/L พรอท 4.5 µg/L สารหนู 1.1 µg/L และทองแดง 0.1 µg/L

นำตัวอย่างน้ำจากแหล่งน้ำธรรมชาติและสารละลายโลหะหนักทั้ง 4 ชนิดที่เตรียมไว้ มาเลี้ยงกุ้งก้ามแดงเป็นเวลา 6 ชั่วโมง แต่ละตัวอย่างทำ 3 ซ้ำ

กุ้งก้ามแดงที่ใช้ในการทดลองมีขนาดความยาวเฉลี่ย 4.5-6.0 เซนติเมตร นำมาเลี้ยงในภาชนะที่มีปริมาตร 200 มิลลิลิตร จำนวน 30 ถ้วย แต่ละถ้วยบรรจุตัวอย่างจำนวน 50 มิลลิลิตร โดยในแต่ละถ้วยบรรจุน้ำกลั่น, สารละลายแคดเมียมที่ระดับความเข้มข้น 0.1 µg/L, สารละลายพรอทที่ระดับความเข้มข้น 4.5 µg/L, สารละลายสารหนูที่ระดับความเข้มข้น 1.1 µg/L, สารละลายทองแดงที่ระดับความเข้มข้น 0.1 µg/L, สารละลายผสมระหว่างแคดเมียมที่ระดับความ

เข้มข้น 0.1 µg/L สารละลายปรอทที่ระดับความเข้มข้น 4.5 µg/L สารละลายสารหนูที่ระดับความเข้มข้น 1.1 µg/L และสารละลายทองแดงที่ระดับความเข้มข้น 0.1 µg/L, น้ำตัวอย่างจุดที่ 1, น้ำตัวอย่างจุดที่ 2, น้ำตัวอย่างจุดที่ 3 และน้ำตัวอย่างจุดที่ 4 ตามลำดับ โดยทำตัวอย่างละ 3 ซ้ำ จากนั้นใส่กึ่งก้ามแดงลงในแต่ละถ้วยอย่างละ 1 ตัว เลี้ยงกึ่งก้ามแดงเป็นเวลา 6 ชั่วโมง พร้อมให้อาการอย่างเพียงพอ จากนั้นน็อคกึ่งก้ามแดงด้วยน้ำเย็น บันทึกน้ำหนักและความยาวของกึ่งแต่ละตัว นำเนื้อเยื่อตับกึ่งมาสกัด Total RNA

ตาราง 4 แสดงชนิดของตัวอย่างน้ำ โดยแต่ละตัวอย่างทำ 3 ซ้ำ

ตัวอย่าง	รายละเอียด
1	น้ำกลั่น
2	สารละลาย Cd 0.1 µg/L
3	สารละลาย Hg 4.5 µg/L
4	สารละลาย As 1.1 µg/L
5	สารละลาย Cu 0.1 µg/L
6	สารละลายผสมระหว่าง Cd 0.1 µg/L + Hg 4.5 µg/L + As 1.1 µg/L + Cu 0.1 µg/L
7	น้ำตัวอย่างจุดที่ 1
8	น้ำตัวอย่างจุดที่ 2
9	น้ำตัวอย่างจุดที่ 3
10	น้ำตัวอย่างจุดที่ 4

การสกัด Total RNA จาก hepatopancreas ของกึ่งก้ามแดง

เก็บเนื้อเยื่อตับกึ่งก้ามแดงที่แช่ในน้ำตัวอย่างเป็นเวลา 6 ชั่วโมง มาประมาณ 30 มิลลิกรัม ใส่ลงในหลอด Microcentrifuge tube ขนาด 1.5 มิลลิลิตร ที่มี RNAlater™ RNA Stabilization Reagent อยู่ 500 ไมโครลิตร เก็บที่อุณหภูมิ -20 ถึง 0 องศาเซลเซียส

สกัด Total RNA ด้วย RNeasy® Mini Kit ยี่ห้อ QIAGEN (Germany) โดยมีรายละเอียดดังนี้ ปิเปต Buffer RLT มา 600 ไมโครลิตร ต่อ 1 ตัวอย่าง ใส่ลงใน Microcentrifuge

tube จากนั้นนำเนื้อเยื่อตัดขนาดประมาณ 30 มิลลิกรัม ที่เตรียมไว้นั้น บดให้เซลล์แตกเป็นเนื้อเดียวกับสาร Buffer RLT นำไปปั่นด้วยเครื่อง Centrifuge ที่ความเร็วสูงสุดประมาณ 3 นาที แล้วเติม 70% ethanol จำนวน 600 ไมโครลิตร ลงในหลอด ใช้ไมโครปิเปตดูดสารละลายตัวอย่างทั้งหมดขึ้นลง 3-5 นาที เพื่อให้สารละลายผสมเข้ากัน จากนั้นดูดสารละลายตัวอย่าง (มีสีเหลืองอ่อนๆ) มา 700 ไมโครลิตร ใส่ลงใน collection tube ขนาด 2 มิลลิลิตร จากนั้นปิดฝา นำไปปั่นที่ความเร็ว 10,000 รอบ 1 นาที นำส่วนล่างที่เป็นสารละลายทิ้งไป จากนั้นทำการย่อยในคอลัมน์ด้วย DNase เตรียม stock สารละลาย DNase I สำหรับตัวอย่างทั้งหมด จำนวน 30 ตัวอย่าง (โดยปิเปต RNase-Free water จำนวน 550 ไมโครลิตร ลงในหลอด DNase I นำไปปั่นที่ความเร็วมากกว่า 10,000 รอบ เป็นเวลา 15 วินาที และเติม Buffer RDD จำนวน 3,850 ไมโครลิตร ลงใน stock DNase I ทำการผสมสารให้เข้ากันโดยดูดสารละลายขึ้นลงด้วยไมโครปิเปต) จากนั้นปิเปต stock DNase I ที่เตรียมไว้มา 80 ไมโครลิตร ลงในหลอด column membrane ที่มีตะกอนตัวอย่างอยู่ด้านบน โดยใส่ Microcentrifuge tube ด้านล่างอันใหม่ ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 15 นาที นำส่วนล่างที่เป็นสารละลายทิ้งไป นำหลอดส่วนบนใส่ลงใน Microcentrifuge tube ใหม่เติม Buffer RW1 จำนวน 500 ไมโครลิตร ลงในหลอดแล้วปิดฝา นำไปปั่นที่ความเร็ว 10,000 รอบ 1 นาที นำส่วนล่างที่เป็นสารละลายทิ้งไป นำหลอดส่วนบนใส่ลงใน Microcentrifuge tube ใหม่เติม Buffer RPE จำนวน 500 ไมโครลิตร ใส่ลงในหลอดแล้วปิดฝา นำไปปั่นที่ความเร็ว 10,000 รอบ 3 นาที จากนั้นนำสารละลายที่อยู่ในหลอดส่วนล่าง มาใส่ Microcentrifuge tube ขนาด 1.5 มิลลิลิตร อันใหม่ จากนั้นเติม RNase-free water จำนวน 30-50 ไมโครลิตร ลงไปในหลอด ปิดฝา แล้วนำไปปั่นที่ความเร็ว 10,000 รอบ 1 นาที เก็บส่วนที่เป็นสารละลาย RNA ไว้ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส

การสังเคราะห์ first strand cDNA

การสังเคราะห์ first strand cDNA ใช้ชุดสำเร็จรูป (Life technologies) โดยมีขั้นตอนดังนี้ เตรียม stock สารที่ใช้โดย ปิเปต 50 μ M oligo(dT)₂₀ จำนวน 0.5 ไมโครลิตร เติม 10 mM dNTP mix จำนวน 1.5 μ l และ DEPC-treated water จำนวน 7 ไมโครลิตร จากนั้นเติมตัวอย่าง Total RNA มา 1 ไมโครลิตร (100 ng) ใส่สารละลายทั้งหมดลงในหลอด PCR ผสมสารละลายให้เข้ากันโดยดูดสารละลายขึ้นลงด้วยไมโครปิเปต นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที แล้วแช่ในน้ำแข็ง 1 นาที จากนั้นสังเคราะห์ cDNA โดยเติม 10x RT buffer จำนวน 3 ไมโครลิตร 25 mM MgCl₂ จำนวน 5 ไมโครลิตร 0.1 M DTT จำนวน 1 ไมโครลิตร RNaseOUT™ (40 U/ μ l) จำนวน 0.5 ไมโครลิตร และ SuperScript® III RT (200 U/ μ l) จำนวน 0.5 ไมโครลิตร

ผสมสารละลายให้เข้ากันโดยดูดสารละลายขึ้นลงด้วยไมโครปิเปต นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 50 นาที จากนั้นเพิ่มอุณหภูมิในการบ่มเป็น 85 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที แล้วนำมาแช่ในน้ำแข็ง เติม RNase H จำนวน 1 ไมโครลิตร แล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 นาที นำ cDNA ที่ได้เก็บไว้ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส

การตรวจสอบคุณภาพ cDNA ที่ได้ด้วยยีน 3 ชนิด คือ Elf1, VTG, MT ด้วยวิธี PCR

นำ First strand cDNA ที่ได้ใช้เป็นดีเอ็นเอต้นแบบ และไพรเมอร์ที่จำเพาะต่อดับกึ่งกำหนดไพรเมอร์ที่ใช้ในการทดสอบประกอบไปด้วย Elf1, VTG และ MT นำมาทำปฏิกิริยา PCR ด้วยเครื่อง Thermal cycler machine โดยมีปฏิกิริยาดังนี้ First strand cDNA 1 µl, Primer forward 0.25 µl, Primer reverse 0.25 µl, GoTaq®green master mix ยี่ห้อ Promega (USA) 2 µl, Nuclease-free H₂O 6.5 µl ทำปฏิกิริยาในปริมาตรทั้งหมด 10 µl นำไปเข้าเครื่อง PCR โดยใช้สภาวะดังต่อไปนี้ Initial Denaturation ที่อุณหภูมิ 95 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที ขั้นตอน Denaturation ที่อุณหภูมิ 94 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 30 วินาที ขั้นตอน annealing ที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 30 วินาที และขั้นตอน extension ที่อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 นาที 30 วินาที ทำปฏิกิริยาจำนวน 35 รอบ ตามด้วยขั้นตอน final extension ที่อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส 5 นาที

การตรวจยืนยันแถบผลิตภัณฑ์ที่เกิดขึ้นด้วยวิธี Agarose gel electrophoresis

ตรวจยืนยันแถบผลิตภัณฑ์ด้วยวิธี Agarose gel electrophoresis โดยนำ PCR product ไปหยดลงบน Agarose gel ความเข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์ ในบัฟเฟอร์ 1X TBE ใช้ความต่างศักย์ไฟฟ้า 100 โวลต์ และใช้ 100 bp DNA ladder marker ผสมกับ DNA Loading Dye 6X ยี่ห้อ biotech rabbit (Germany) เพื่อใช้เป็นแถบ DNA มาตรฐาน แล้วนำไปหยดลงบนเจล จากนั้นจึงตรวจสอบแถบผลิตภัณฑ์ด้วยการย้อมใน Ethidium bromide ที่ความเข้มข้น 0.5 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร และถ่ายภาพภายใต้แสงอัลตราไวโอเล็ต ด้วยเครื่องวิเคราะห์เจล (Gel documentation)

การหาปริมาณการแสดงออกของยีนด้วยเครื่อง real-time PCR

ศึกษาการแสดงออกของยีนด้วยเทคนิค real-time PCR โดยใช้ SsoAdvanced universal SYBR® Green supermix มีขั้นตอนดังนี้ ปิเปต Green supermix จำนวน 5 ไมโครลิตร Forward and reverse primers แต่ละชนิด (MT และ VTG และ เป็นยีนอ้างอิง Elf1) อย่างละ 0.25 ไมโครลิตร Nuclease-free H₂O จำนวน 5 ไมโครลิตร เติมห่วง first strand cDNA มา 0.5 ไมโครลิตร ลงในหลอด PCR ทำปฏิกิริยาในปริมาตรทั้งหมด 11 µl ผสมสารให้เข้ากันโดยการดูดสารละลายขึ้นลงด้วยไมโครปิเปต จากนั้นนำหลอดตัวอย่างทั้งหมด เข้าเครื่อง PCR Bio-

Rad[®]CFX96™ โดยกำหนดให้สภาวะการทำงานดังนี้ ช่วงแรก (polymerase Activation and DNA Denaturation) ใช้อุณหภูมิ 95 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 นาที ช่วงที่สอง (Denaturation) ใช้อุณหภูมิ 95 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 วินาที และช่วงที่สาม (Annealing/Extension + Plate Read) ใช้อุณหภูมิ 57 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 25 วินาที โดยทำซ้ำทั้งสามช่วงจำนวน 40 รอบ การตรวจสอบผลิตภัณฑ์ PCR ที่เกิดขึ้น วิเคราะห์ด้วยวิธี melting curve analysis โดยจะทำการเพิ่มอุณหภูมิจาก 65 °C จนถึง 95 °C ซึ่งจะเพิ่มขึ้น 0.5 °C ทุก 2 วินาที

การวิเคราะห์ปริมาณการแสดงออกของยีน MT และ VTG โดยใช้ยีน E1f1 เป็นยีนอ้างอิง

ปริมาณการแสดงออกของยีน MT และ VTG ได้จากการเทียบกับปริมาณของ E1f1 (ยีนอ้างอิง) คำนวณได้จากวิธี $\Delta/\Delta C_T$ (Livak & Schmittgen, 2001) และการวิเคราะห์ข้อมูลสถิติจะใช้วิธีการทดสอบค่าเฉลี่ย แบบ unpaired student's t-test และการวิเคราะห์ความแปรปรวนแบบ one-way ANOVA (Turkey's test) เพื่อหาค่าความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญในการแสดงออกของยีนด้วยโปรแกรม SPSS version12

บทที่ 4

ผลการทดลอง

การวิเคราะห์คุณภาพน้ำจากแหล่งน้ำธรรมชาติ ในพื้นที่ ต.องค์กรักษ์ อ.องค์กรักษ์ จ.นครนายก
จำนวน 4 จุด

การวิเคราะห์คุณภาพน้ำทางกายภาพและเคมี

จากการสุ่มเก็บตัวอย่างน้ำจากแหล่งน้ำธรรมชาติ ในพื้นที่ ต.องค์กรักษ์ อ.องค์กรักษ์ จ.
นครนายก จำนวน 4 จุด นำมาวิเคราะห์คุณภาพน้ำทางกายภาพและเคมี ซึ่งมีผลการวิเคราะห์ดังนี้

ตาราง 5 คุณภาพน้ำทางกายภาพและเคมี

ตัวอย่าง น้ำ	อุณหภูมิ (องศา เซลเซียส)	ค่าการ นำไฟฟ้า ($\mu\text{S}/\text{cm}$)	ความขุ่น (mg/L)	pH	DO (mg/L)	แคดเมียม ($\mu\text{g}/\text{L}$)	ปรอท ($\mu\text{g}/\text{L}$)	สารหนู ($\mu\text{g}/\text{L}$)	ทองแดง ($\mu\text{g}/\text{L}$)
1. จุดที่ 1	28.5	278	131.9	7.43	6.44	ND	0.87	ND	ND
2. จุดที่ 2	28.0	320	158.2	6.82	6.79	ND	0.90	ND	ND
3. จุดที่ 3	27.0	104.1	51.8	6.81	7.58	ND	2.02	ND	ND
4. จุดที่ 4	29.0	343	169.5	5.89	7.1	0.034	2.54	ND	ND

จากตารางเป็นผลการวิเคราะห์หาปริมาณโลหะหนักเบื้องต้นด้วยเทคนิค AAS พบ
ปริมาณโลหะปรอท ในตัวอย่างน้ำธรรมชาติทั้ง 4 จุด และพบปริมาณโลหะแคดเมียม ใน
ตัวอย่างน้ำจุดที่ 4 จึงทำการวิเคราะห์หาปริมาณเฉพาะ Cu ในน้ำตัวอย่างธรรมชาติแต่ละจุดซ้ำ
ด้วยเทคนิค ICP-MS เนื่องจากเป็นเทคนิคที่สามารถวิเคราะห์ตัวอย่างที่มีความเข้มข้นน้อยมากๆ
ระดับ $\mu\text{g}/\text{L}$ และ Cu เป็นโลหะหนักที่สามารถพบได้ทั่วไปตามแหล่งน้ำธรรมชาติและเป็น
องค์ประกอบในสิ่งมีชีวิต ผลการวิเคราะห์มีค่าดังนี้

น้ำตัวอย่างธรรมชาติจุดที่ 1 มีปริมาณ Cu เท่ากับ $0.9 \mu\text{g}/\text{L}$

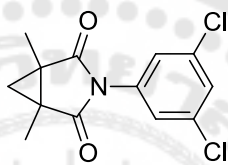
น้ำตัวอย่างธรรมชาติจุดที่ 2 มีปริมาณ Cu เท่ากับ $0.8 \mu\text{g}/\text{L}$

น้ำตัวอย่างธรรมชาติจุดที่ 3 มีปริมาณ Cu เท่ากับ $0.8 \mu\text{g}/\text{L}$

น้ำตัวอย่างธรรมชาติจุดที่ 4 มีปริมาณ Cu เท่ากับ $0.6 \mu\text{g}/\text{L}$

การวิเคราะห์ปริมาณสารกำจัดศัตรูพืช (Pesticides)

จากการสุ่มเก็บตัวอย่างน้ำจากแหล่งน้ำธรรมชาติ ในพื้นที่ ต.องค์กรักษ์ อ.องค์กรักษ์ จ. นครนายก จำนวน 4 จุด นำมาวิเคราะห์หาปริมาณสารกำจัดศัตรูพืชด้วยเครื่อง GC-MS โดยเทียบกับสารกำจัดศัตรูพืชมาตรฐาน ซึ่งเป็นสารผสมระหว่าง 2,4-D, Ametryn, Dicamba, Bromophos-methyl และ Pendimethalin และจากผลการสแกนหา Pesticides โดยเทียบกับฐานข้อมูล NIST/EPA/NIH Mass Spectral Library (NIST14) พบ Procymidone ในตัวอย่างน้ำจากแหล่งน้ำธรรมชาติจุดที่ 1 ที่สกัดได้ในชั้นน้ำ DI ซึ่งเมื่อเทียบกับ NIST Standard Reference Database 1A ของ NIST14 มีความเหมือนอยู่ที่ 52 เปอร์เซ็นต์

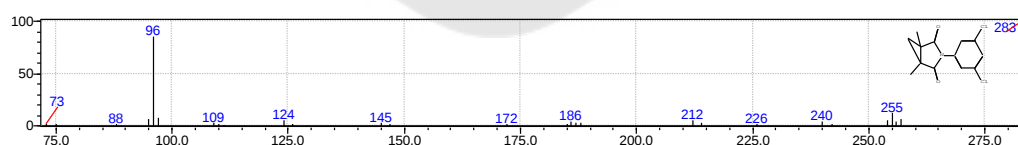


ภาพประกอบ 8 โครงสร้างของ Procymidone ที่ได้จากการวิเคราะห์ด้วยเครื่อง GC-MS

Target



Procymidone



ภาพประกอบ 9 Mass Spectrum ของ Procymidone เมื่อเทียบกับ NIST Standard Reference Database (NIST14)

การทดลองเลี้ยงกุ้งก้ามแดง

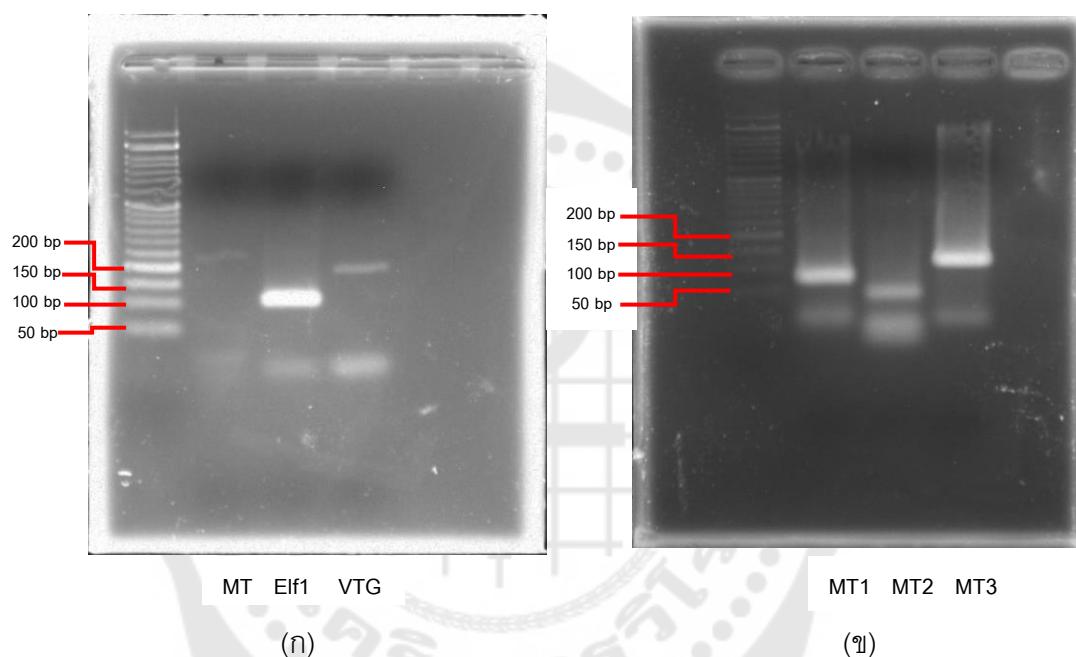
นำปริมาณความเข้มข้นที่ตรวจพบมาออกแบบการทดลอง เพื่อทำการศึกษาการตอบสนองของยีน MT และ VTG ต่อโลหะหนักแต่ละชนิด โดยเตรียมสารละลายแคดเมียมเข้มข้น 0.1 µg/L สารละลายปรอทเข้มข้น 4.5 µg/L สารละลายสารหนูเข้มข้น 1.1 µg/L และสารละลายทองแดงเข้มข้น 0.1 µg/L ให้ใกล้เคียงกับปริมาณที่ตรวจพบ ซึ่งปริมาณความเข้มข้นของโลหะแต่ละชนิดที่เตรียมขึ้นนั้น ได้มาจากการนำไปตรวจสอบค่าที่แน่นอนด้วยเทคนิค ICP-MS จากนั้นทดลองเลี้ยงกุ้งก้ามแดงในน้ำตัวอย่างทั้งหมด 10 ตัวอย่าง โดยแต่ละตัวอย่างทำ 3 ซ้ำ เลี้ยงกุ้งเป็นเวลา 6 ชั่วโมง พร้อมให้อาการอย่างพอเพียง จากนั้นทำการน็อคกุ้งด้วยน้ำเย็น บันทึกน้ำหนักและความยาวของกุ้งแต่ละตัว

ตาราง 6 ขนาดและน้ำหนักของกุ้งก้ามแดงในแต่ละตัวอย่าง

กุ้งก้ามแดง	ความยาวเฉลี่ย (เซนติเมตร) (±SD)	น้ำหนักเฉลี่ย (กรัม) (±SD)
1. น้ำกลั่น	5.50 ±0.00	3.57 ±0.38
2. สารละลายแคดเมียม 0.1 µg/L	5.23 ±0.25	3.70 ±0.89
3. สารละลายปรอท 4.5 µg/L	5.67 ±0.31	3.97 ±0.25
4. สารละลายสารหนู 1.1 µg/L	5.77 ±0.06	4.03 ±0.21
5. สารละลายทองแดง 0.1 µg/L	5.33 ±0.31	4.65 ±0.87
6. สารละลายผสมระหว่าง Cd 0.1 µg/L + Hg 4.5 µg/L + As 1.1 µg/L + Cu 0.1 µg/L	5.37 ±0.32	3.60 ±1.06
7. น้ำตัวอย่างจุดที่ 1	5.43 ±0.51	3.40 ±1.18
8. น้ำตัวอย่างจุดที่ 2	4.97 ±0.45	2.93 ±0.64
9. น้ำตัวอย่างจุดที่ 3	5.17 ±0.15	3.20 ±0.25
10. น้ำตัวอย่างจุดที่ 4	5.50 ±0.20	4.07 ±0.67

การออกแบบไพรเมอร์เพื่อการยืนยันขนาดผลิตภัณฑ์

จากการทดลองเลี้ยงกุ้งก้ามแดงในน้ำด้วยวิธีต่าง ๆ เป็นเวลา 6 ชั่วโมง แล้วทำการสกัด Total RNA จากนั้นสังเคราะห์ First strand cDNA นำมาสู่มตรวจสอบด้วยไพรเมอร์ที่จำเพาะต่อยีน MT ในการเพิ่มปริมาณ DNA เป้าหมายด้วยเครื่อง Thermal cycler machine พบว่า มีการแสดงออกของยีน MT ในเนื้อเยื่อตับ ซึ่งเป็นไปตามการทดลองของ Yudkovski และคณะ (2007) โดยแถบผลิตภัณฑ์ของยีน MT มีขนาดประมาณ 120 bp



ภาพประกอบ 10 ภาพแถบผลิตภัณฑ์ของยีน MT, Elf1, VTG (ก) และภาพแถบผลิตภัณฑ์ยีน MT (ข)

จากการตรวจสอบยืนยันขนาดผลิตภัณฑ์ของไพรเมอร์ เลือกใช้ยีน VTG และยีน Elf1 จากภาพประกอบ 10 (ก) และมีการออกแบบไพรเมอร์ยีน MT ใหม่ โดยออกแบบยีน MT อีก 3 ตัว ได้แก่ ยีน MT1 ยีน MT2 และยีน MT3 ซึ่งงานวิจัยนี้ได้เลือกใช้ยีน MT3 จากภาพประกอบ 10 (ข) เนื่องจากยีน MT3 มีขนาดตรงกับ product และมีแถบเข้มที่สุด

ตาราง 7 ชนิดและลำดับเบสของ primer ที่ใช้ในการทดลองจากบริษัท Bio Basic Inc.

Primer	Primer sequence (5'-3')	ผลผลิต PCR (bp)	อ้างอิง (Accession Number)
1. MT3	CCC AgC AAg AAg ACC TgC TCA Tg CTA CTT CAT ggg ACA Cgg TgC AC	117	DQ847612 (Yudkovski, 2007)
2. VTG	CTg gCC TTg gTT CAT gAC CgC C CgA ggT gCA Cgg AgT AgA gCT CCA TC	176	AF306784 (Abdu, 2002)
3. Elf1	ggg AgA CTg TTg ggg CAg AAT CAA CAg gCC ATC Agg CAT Agg CAT Agg CAT ggC CTT C	97	DQ847534 (Yudkovski, 2007)

จากตารางใช้ยีน Elf1 เป็นยีนอ้างอิง ซึ่งยีนนี้เป็น initiation factor ในการสังเคราะห์โพลีเพปไทด์ของไรโบโซมในสิ่งมีชีวิตพวกรูบัสโคไลต์ ในงานวิจัยนี้จะใช้ปริมาณของยีน Elf1 เป็นตัวหารของยีน MT และ VTG เพื่อลดปัจจัยต่างๆที่จะส่งผลต่อการวิเคราะห์ปริมาณการแสดงออกของยีน

การศึกษาการแสดงออกของยีน MT และ VTG ต่อปริมาณโลหะหนัก (แคดเมียม ปรอท สารหนู และทองแดง) ในเนื้อเยื่อตับกุ่มก้ามแดงด้วยเทคนิค real-time PCR

เมื่อได้ไพรเมอร์ที่เหมาะสมดังข้างต้นแล้ว จากนั้นทำการเพิ่มปริมาณ DNA เป้าหมายด้วยเทคนิค real-time PCR โดยใช้ไพรเมอร์ 3 ชนิด คือ Elf1, MT และ VTG

การแสดงออกของยีน MT ต่อปริมาณโลหะหนัก (แคดเมียม ปรอท สารหนู และทองแดง)

จากการศึกษาปริมาณของยีน MT โดยใช้ยีน Elf1 เป็นยีนอ้างอิง พบว่า ผลของแคดเมียมที่ระดับความเข้มข้น 0.1 µg/L ปรอทที่ระดับความเข้มข้น 4.5 µg/L สารหนูที่ระดับความเข้มข้น 1.1 µg/L และทองแดงที่ระดับความเข้มข้น 0.1 µg/L ต่อการแสดงออกของยีน MT ในเนื้อเยื่อตับกุ่มก้ามแดงที่ทดลองเลี้ยงเป็นเวลา 6 ชั่วโมง จำนวน 3 ซ้ำ โดยมีผลการวิจัยเป็นดังนี้

ตาราง 8 การแสดงออกของยีน MT ในเนื้อเยื่อตับกึ่งกำแดงต่อโลหะหนักแต่ละชนิดด้วยเทคนิค real time-PCR (* $P<0.05$)

Sample	Expression ($\pm$ SD)
MT-di	1.00 $\pm$ 0.01
MT-Cd (Cd 0.1 μ g/L)	3.08 $\pm$ 0.06*
MT-Hg (Hg 4.5 μ g/L)	0.92 $\pm$ 0.02
MT-As (As 1.1 μ g/L)	0.91 $\pm$ 0.00
MT-Cu (Cu 0.1 μ g/L)	0.69 $\pm$ 0.01*
MT-mix (Cd 0.1 μ g/L+ Hg 4.5 μ g/L+ As 1.1 μ g/L+ Cu 0.1 μ g/L)	10.25 $\pm$ 0.37*

จากตารางที่ 8 จะเห็นได้ว่า ยีน MT มีการแสดงออกต่อโลหะแคดเมียมมากที่สุด โดยมีค่าการแสดงออกที่ระดับ 3.08 รองลงมาคือ ปรอท มีค่าการแสดงออกที่ระดับ 0.92 และสารหนู มีค่าการแสดงออกที่ระดับ 0.91 และทองแดง มีค่าการแสดงออกน้อยที่สุดอยู่ที่ระดับ 0.69 ตามลำดับ และมีระดับการตอบสนองต่อโลหะผสมทั้ง 4 ชนิด อยู่ที่ 10.25 ซึ่งมีค่าสูงกว่าโลหะทั้ง 4 ชนิด

ตาราง 9 การแสดงออกของยีน MT ในเนื้อเยื่อตับกึ่งกำแดงในแหล่งน้ำธรรมชาติทั้ง 4 จุด ด้วยเทคนิค real time-PCR (* $P<0.05$)

Sample	Expression ($\pm$ SD)
MT- ตัวอย่างน้ำธรรมชาติจุดที่ 1	0.77 $\pm$ 0.00
MT- ตัวอย่างน้ำธรรมชาติจุดที่ 2	1.18 $\pm$ 0.02
MT- ตัวอย่างน้ำธรรมชาติจุดที่ 3	0.63 $\pm$ 0.01*
MT- ตัวอย่างน้ำธรรมชาติจุดที่ 4	0.86 $\pm$ 0.01

จากตารางที่ 9 ผลการแสดงผลของยีน MT ในแหล่งน้ำธรรมชาติ พื้นที่ ต.องค์กรักษ์ อ. องค์กรักษ์ จ.นครนายก พบการแสดงผลของยีน MT ในจุดที่ 2 มากที่สุด โดยมีค่าการแสดงผลออกที่ระดับ 1.18 รองลงมาคือ จุดที่ 4 มีค่าการแสดงผลออกที่ระดับ 0.86 จุดที่ 1 มีค่าการแสดงผลออกที่ระดับ 0.77 และจุดที่ 3 มีค่าการแสดงผลออกที่ระดับ 0.63 ตามลำดับ

การแสดงผลของยีน VTG ต่อปริมาณโลหะหนัก (แคดเมียม ปปรอท สารหนู และ ทองแดง)

จากการศึกษาปริมาณของยีน VTG โดยใช้ยีน Elf1 เป็นยีนอ้างอิง พบว่า ผลของแคดเมียมที่ระดับความเข้มข้น 0.1 µg/L ปปรอทที่ระดับความเข้มข้น 4.5 µg/L สารหนูที่ระดับความเข้มข้น 1.1 µg/L และทองแดงที่ระดับความเข้มข้น 0.1 µg/L ต่อการแสดงผลของยีน VTG ในเนื้อเยื่อตับกึ่งก้ามแดงที่ทดลองเลี้ยงเป็นเวลา 6 ชั่วโมง จำนวน 3 ซ้ำ โดยมีผลการวิจัยเป็นดังนี้

ตาราง 10 การแสดงผลของยีน VTG ในเนื้อเยื่อตับกึ่งก้ามแดงต่อโลหะหนักแต่ละชนิดด้วยเทคนิค real time-PCR ($P < 0.05$)

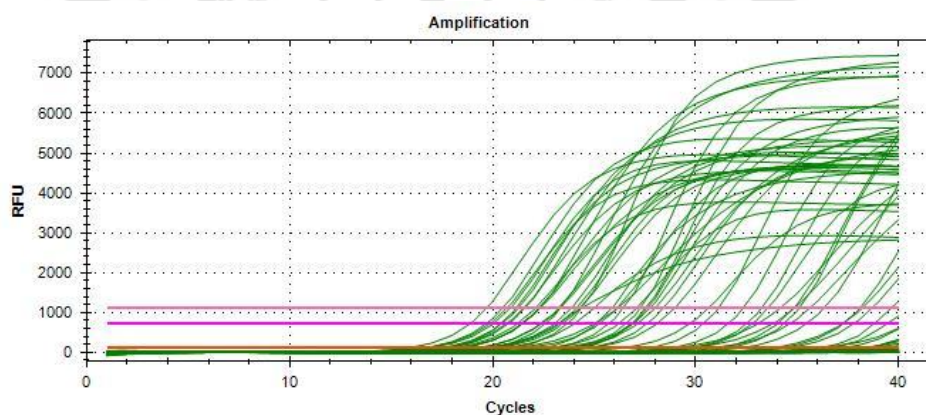
Sample	Expression (±SD)
VTG-di	1.00 ±0.01
VTG-Cd (Cd 0.1 µg/L)	36.20 ±0.50*
VTG-Hg (Hg 4.5 µg/L)	1,176.33 ±47.26
VTG-As (As 1.1 µg/L)	8.16 ±0.19
VTG-Cu (Cu 0.1 µg/L)	1.02 ±0.02*
VTG-mix (Cd 0.1 µg/L+ Hg 4.5 µg/L+ As 1.1 µg/L+ Cu 0.1 µg/L)	0.79 ±0.00

จากตารางที่ 10 จะเห็นได้ว่า ยีน VTG มีการแสดงออกต่อโลหะปรอทมากที่สุด โดยมีค่าการแสดงผลออกที่ระดับ 1,176.33 รองลงมาคือ แคดเมียม มีค่าการแสดงผลออกที่ระดับ 36.20 และสารหนู มีค่าการแสดงผลออกที่ระดับ 8.16 และทองแดง มีค่าการแสดงผลออกน้อยที่สุดอยู่ที่ระดับ 1.02 ตามลำดับ และมีระดับการตอบสนองต่อโลหะผสมทั้ง 4 ชนิด อยู่ที่ 0.79 ซึ่งมีค่าต่ำกว่าโลหะทั้ง 4 ชนิด

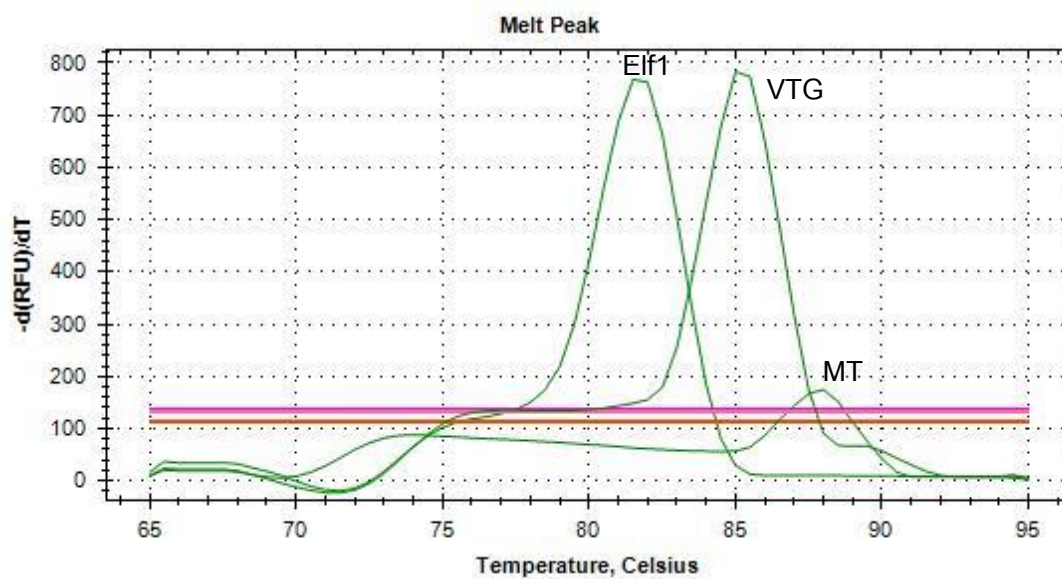
ตาราง 11 การแสดงออกของยีน VTG ในเนื้อเยื่อตับกึ่งกำแดงในแหล่งน้ำธรรมชาติทั้ง 4 จุดด้วยเทคนิค real time-PCR (* $P<0.05$)

Sample	Expression ($\pm$ SD)
VTG- ตัวอย่างน้ำธรรมชาติจุดที่ 1	0.80 $\pm$ 0.01*
VTG- ตัวอย่างน้ำธรรมชาติจุดที่ 2	5.25 $\pm$ 0.28
VTG- ตัวอย่างน้ำธรรมชาติจุดที่ 3	0.28 $\pm$ 0.01*
VTG- ตัวอย่างน้ำธรรมชาติจุดที่ 4	0.02 $\pm$ 0.00

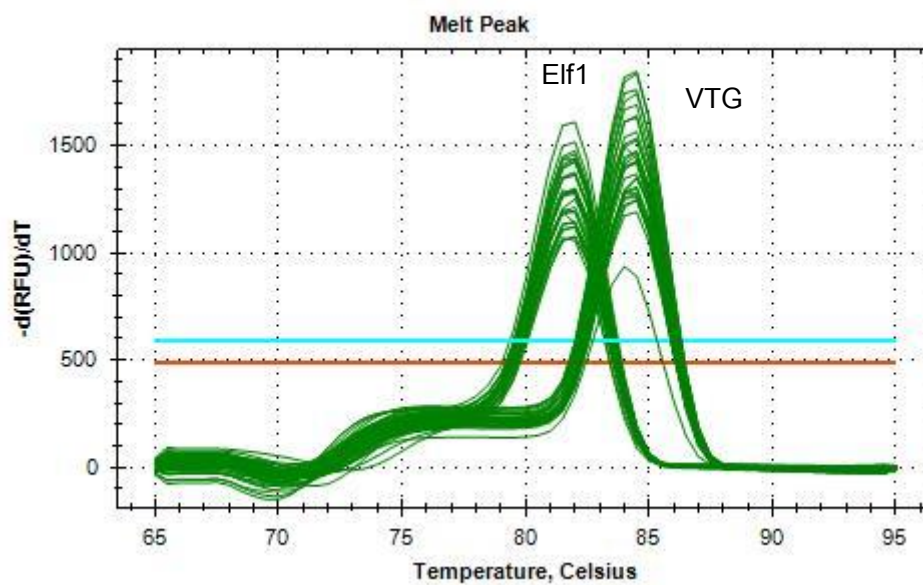
จากตารางที่ 11 ผลการแสดงออกของยีน VTG ในแหล่งน้ำธรรมชาติ พื้นที่ ต.องครักษ์ อ.องครักษ์ จ.นครนายก พบการแสดงออกของยีน VTG ในจุดที่ 2 มากที่สุด โดยมีค่าการแสดงออกที่ระดับ 5.25 รองลงมาคือ จุดที่ 1 มีค่าการแสดงออกที่ระดับ 0.80 จุดที่ 3 มีค่าการแสดงออกที่ระดับ 0.28 และจุดที่ 4 มีค่าการแสดงออกที่ระดับ 0.02 ตามลำดับ



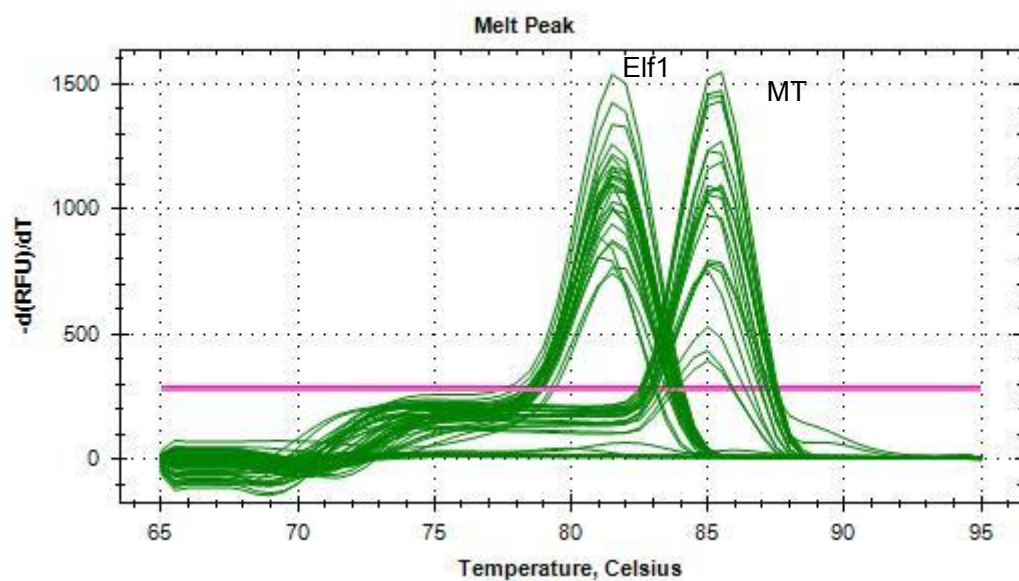
ภาพประกอบ 11 กราฟการแสดงออกของยีน MT ในตับกึ่งกำแดงในตัวอย่างน้ำทั้งหมด 10 ตัวอย่าง
ทำ 3 ซ้ำ



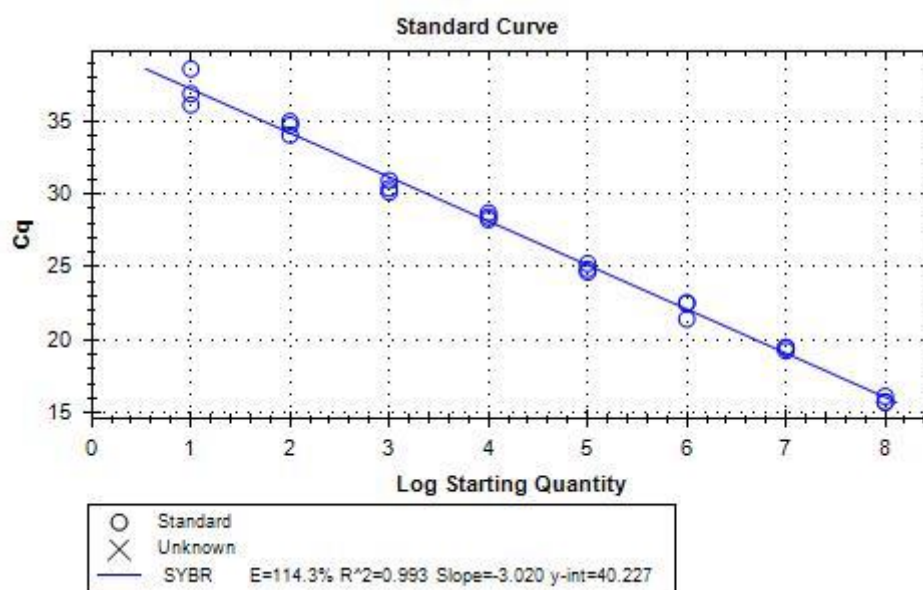
ภาพประกอบ 12 กราฟแสดง melting curve ของยีน Elf1 VTG และ MT



ภาพประกอบ 13 กราฟแสดง melting curve ระหว่างยีน Elf1 และ VTG



ภาพประกอบ 14 กราฟแสดง melting curve ระหว่างยีน Elf1 และ MT



ภาพประกอบ 15 กราฟมาตรฐานของยีน Elf1 ที่ความเข้มข้นต่างๆ

บทที่ 5

สรุปผล อภิปรายผล และข้อเสนอแนะ

สรุปผลการวิจัย

ผลการวิจัย สรุปได้ดังนี้

1. จากผลการวิเคราะห์คุณภาพน้ำทั้งทางกายภาพและเคมีของตัวอย่างน้ำจากแหล่งน้ำธรรมชาติ ในพื้นที่ ต.องครักษ์ อ.องครักษ์ จ.นครนายก คุณภาพน้ำทั้ง 4 จุด ผ่านเกณฑ์มาตรฐานคุณภาพน้ำในแหล่งน้ำผิวดิน ประเภทที่ 3 โดยค่า pH อยู่ในช่วง 5-9 ค่าออกซิเจนละลายน้ำ (DO) ต่ำกว่า 4.0 mg/L ปริมาณแคลเซียม มีค่าต่ำกว่า 0.005 mg/L (น้ำที่มีความกระด้างในรูปของ CaCO_3 ไม่เกินกว่า 100 mg/L) หรือมีค่าต่ำกว่า 0.05 mg/L (น้ำที่มีความกระด้างในรูปของ CaCO_3 เกินกว่า 100 mg/L) ปริมาณปรอท มีค่าต่ำกว่า 0.002 mg/L ปริมาณสารหนู มีค่าต่ำกว่า 0.01 mg/L และปริมาณทองแดง มีค่าต่ำกว่า 0.1 mg/L

2. จากผลการวิเคราะห์หา Pesticides ในตัวอย่างน้ำจากแหล่งน้ำธรรมชาติทั้ง 4 จุด ด้วยเทคนิค GC-MS พบเฉพาะสาร Procymidone ในตัวอย่างน้ำจุดที่ 1 ซึ่งเมื่อเทียบกับมาตรฐานของ NIST/EPA/NIH Mass Spectral Library (NIST14) มีความเหมือนอยู่ที่ 52 เปอร์เซ็นต์ โดยสารนี้เป็นสารกำจัดเชื้อรา dicarboximide ประเภทดูดซึมและออกฤทธิ์ในทางสัมผัส ใช้ในทางป้องกันและบำบัดโรคพืช

3. จากการศึกษาการแสดงออกของยีน MT และ VTG โดยทำการเลี้ยงกุ้งก้ามแดงในน้ำตัวอย่างทั้ง 10 ตัวอย่าง จำนวน 3 ซ้ำ เป็นเวลา 6 ชั่วโมง จากนั้นนำเอาตับกุ้งก้ามแดงมาสกัด Total RNA และสังเคราะห์ first-strand cDNA นำมาขยาย DNA เป้าหมายด้วยไพรเมอร์ 3 ชนิด คือ Elf1, MT และ VTG แล้ววิเคราะห์ปริมาณการแสดงออกของยีนด้วยเทคนิค real-time PCR โดยใช้ยีน Elf1 เป็นยีนอ้างอิง พบว่า ยีน MT ตอบสนองต่อโลหะแคดเมียม รองลงมาคือ ปรอท สารหนู และทองแดง ตามลำดับ โดยมีระดับการตอบสนองที่ 3.08, 0.92, 0.91, และ 0.69 และยีน VTG ตอบสนองต่อโลหะปรอท รองลงมาคือ แคดเมียม สารหนู และทองแดง ตามลำดับ โดยมีระดับการตอบสนองที่ 1,176.33, 36.20, 8.16, และ 1.02 และการตอบสนองของยีน MT และ VTG ต่อตัวอย่างน้ำจากแหล่งน้ำธรรมชาติทั้ง 4 จุด พบระดับการแสดงออกของยีนมากที่สุดในจุดที่ 2 โดยมีระดับการแสดงออกของยีน MT และ VTG อยู่ที่ 1.18 และ 5.25 ตามลำดับ การศึกษาการตอบสนองของยีน MT และ VTG ต่อโลหะแคดเมียม ปรอท สารหนู และทองแดงในตับกุ้งก้ามแดงสกุล *Cherax quadricarinatus* เป็นองค์ความรู้ใหม่ที่ใช้เป็นตัวบ่งชี้ในระดับอนุพันธุศาสตร์ ซึ่ง

จากผลการวิจัยชี้ให้เห็นว่ายีน MT สามารถใช้เป็น biomarker ของแคดเมียม (Cd 0.1 µg/L) และ ยีน VTG เป็น biomarker ของปรอท (Hg 4.5 µg/L) และเป็นข้อมูลพื้นฐานที่จะเป็นประโยชน์ต่อการศึกษากการตอบสนองของยีนในตับกึ่งก้ามแดงต่อโลหะชนิดอื่นๆต่อไป

อภิปรายผล

จากผลการวิเคราะห์การแสดงออกของยีน MT และ VTG ในตับกึ่งก้ามแดงต่อความเข้มข้นของโลหะหนักแคดเมียม ปรอท สารหนู และทองแดง ในน้ำตัวอย่างจากธรรมชาติ พื้นที่ ต. องค์กรักษ์ อ.องค์กรักษ์ จ.นครนายก พบระดับการแสดงออกของยีนมากที่สุดในจุดที่ 2 โดยมีระดับการแสดงออกของยีน MT และ VTG อยู่ที่ 1.18 และ 5.25 ตามลำดับ ซึ่งจากผลการวิเคราะห์หาปริมาณโลหะหนัก (Cd, Hg, As, Cu) ในน้ำตัวอย่างจากธรรมชาติทั้ง 4 จุด พบว่าในจุดที่ 4 มีปริมาณสารปรอทมากกว่าจุดที่ 2 ซึ่งสันนิษฐานว่ามีความเป็นไปได้ที่ในจุดที่ 2 มีโลหะชนิดอื่น โดยมิกลไกการสร้างสารประกอบระหว่างโลหะหนักกับเปปไทด์ที่มีกรดอะมิโนซิสเทอีนจำนวนมาก เกิดขึ้นจากการสร้างพันธะที่ตำแหน่งของซัลเฟอร์ของกรดอะมิโนซิสเทอีน (R-SH) กับโลหะหนัก (Peroza, Schmucki, Güntert, Freisinger, & Zerbe, 2009) เช่น Zn ที่กระตุ้นการแสดงออกของยีน MT (Krizkova et al., 2012) และสารผสมของโลหะหนักที่ส่งผลต่อความเป็นพิษและความเครียดในสิ่งมีชีวิต (Oxidative stress) (Muthusamy, Peng, & Ng, 2016; Saad et al., 2018) โดยแคดเมียมจะเพิ่มการดูดซึมของโลหะหนัก เช่น เหล็ก สังกะสี และทองแดง (Sampels, Kroupova, & Linhartova, 2017; Urani, Melchiorretto, Canevali, & Crosta, 2005) และอาจมีสารกำจัดศัตรูพืชกลุ่ม Endocrine Disrupted Compounds (EDCs) เป็นสารเคมีที่มีความสามารถคล้ายกับฮอร์โมนและสามารถรบกวนการสังเคราะห์ การขนส่ง การทำงาน และการสลายตัวของฮอร์โมนตามธรรมชาติในระบบต่อมไร้ท่อ (Yamamoto, Garcia, Kupsco, & Oliveira Ribeiro, 2017) ทำให้กระตุ้นการแสดงออกของยีน VTG

จากการศึกษากการตอบสนองของยีน MT และ VTG ต่อโลหะ 4 ชนิด พบว่า ยีน MT ตอบสนองต่อโลหะแคดเมียมได้ดีที่สุด และตอบสนองต่อโลหะทองแดงน้อยที่สุด ซึ่งสอดคล้องกับการศึกษาผลของแคดเมียมและคอปเปอร์ต่อการแสดงออกของยีน Metallothionein ในปลานิล (ดวงใจ พิสุทธิธรราชชัย & ธนากร เหมะสถล, 2560) และการศึกษาแคดเมียมปริมาณต่ำกระตุ้นการแสดงออกของยีนเมทัลโลไธโอนีนและฮีโมโกลบิน-1 (วาจาทิพย์ บุณยวิจิต et al., 2557) ในเซลล์เพาะเลี้ยงเซลล์รกชนิดเจอีจี-3 ของมนุษย์ และการแสดงออกของยีนและการวิเคราะห์ทางเดินของเซลล์มะเร็งเซลล์ตับของมนุษย์ที่รับแคดเมียม (Cartularo et al., 2015) ที่พบการ

ปนเปื้อนและส่งผลต่อการแสดงออกของยีน MT ต่อแคดเมียม และยีน VTG ตอบสนองต่อโลหะปรอทได้ดีที่สุด และตอบสนองต่อโลหะทองแดงน้อยที่สุด ซึ่งต่างจากการศึกษาการสะสมทางชีวภาพและการวัดค่า biomarker โดยศึกษา ยีน MT และยีน VTG ของปูทะเลเพศเมีย *Carcinus maenas* ต่อโลหะหนัก (Cd, Cu, Zn และสารละลายผสมของโลหะหนัก) ซึ่งพบปริมาณยีน MT (Total protein) ในสารละลายผสมของ Cd+Zn ทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพ โดยวัดยีน VTG ในเลือด โดยใช้เวลาน้อยที่สุดเมื่อสัมผัส Cd (Martín-Díaz, Villena-Lincoln, Bamber, Blasco, & DelValls, 2005) และการศึกษาของ Park และ Kwak (2012) ซึ่งทำการประเมินศักยภาพการแสดงออกของยีน Metallothionein (MT) และ Vitellogenin (VTG) ในตัวอ่อนของ *Chironomus riparius* เมื่อสัมผัสสาร endocrinedisrupting chemicals (EDCs) โดยการแสดงออกของยีน Vitellogenin จะเพิ่มขึ้นต่อปริมาณแคดเมียม และเป็น biomarker ของสารกำจัดศัตรูพืช (Park & Kwak, 2012) จากงานวิจัยสันนิษฐานว่ามีความเป็นไปได้ที่พบการแสดงออกของยีน VTG ต่อปรอท เนื่องจากปรอทเป็นส่วนผสมของยาฆ่าแมลงและสารกำจัดเชื้อรา (กองจัดการสารอันตรายและกากของเสีย กรมควบคุมมลพิษ, 2541) และเมื่อปรอทเข้าสู่สิ่งมีชีวิตอยู่ในรูปของสารประกอบอินทรีย์เป็น methyl mercury ทำให้เกิดพิษ ทำลายระบบประสาทส่วนกลาง (Weil et al., 2005) เกิดความผิดปกติของการทำงานของฮอร์โมน ทำให้กระตุ้นการแสดงออกของยีน VTG ได้

และจากการศึกษาหา Pesticides ในน้ำตัวอย่างจากแหล่งน้ำธรรมชาติทั้ง 4 จุด ด้วยเทคนิค GC-MS พบสาร Procymidone ในตัวอย่างน้ำจุดที่ 1 ซึ่งจากผลการแสดงออกของยีน MT และ VTG มีการแสดงออกในตัวอย่างน้ำจากแหล่งน้ำธรรมชาติ จุดที่ 2 มากที่สุด อาจเกิดจากสารกำจัดศัตรูพืชส่วนใหญ่สลายตัวง่าย ไม่คงตัว และในตัวอย่างมีปริมาณของ Pesticides น้อยมาก ๆ มีค่าต่ำกว่า LOD/LOQ ของเครื่องมือทำให้ตรวจวัดไม่พบ ในการศึกษาที่ผ่านยังมีงานวิจัยที่ศึกษาเกี่ยวกับยีน MT และ VTG ในกุ้งก้ามแดงไม่มากนัก อย่างไรก็ตามการศึกษการตอบสนองของยีน MT และ VTG ต่อโลหะชนิดอื่นๆ และการศึกษาปัจจัยที่ส่งผลต่อการแสดงออกของยีนที่ระยะเวลาและความเข้มข้นต่างๆของโลหะหนักแต่ละชนิด ควรมีการศึกษาและพัฒนาต่อไป

ข้อเสนอแนะ

ผลการศึกษาวิจัยครั้งนี้ มีข้อเสนอแนะดังนี้

1. ควรมีการกำหนดเพศและช่วงอายุของกุ้งก้ามแดงที่ใช้ในการศึกษาการแสดงออกของยีน Vitellogenin เนื่องจากการวิจัยในครั้งนี้ มีการใช้กุ้งก้ามแดง เพศผู้ ขนาด 4.5-6 เซนติเมตร

ซึ่งเป็นกุ้งที่มีขนาดเล็ก ยังไม่สามารถแยกเพศได้ชัดเจน อาจมีเพศเมียปะปนมาด้วย ส่งผลให้การศึกษากการแสดงออกของยีน Vitellogenin แตกต่างจากงานวิจัยอื่นๆที่เกี่ยวข้องได้

2. ควรเตรียมสารละลายมาตรฐานและสารละลายตัวอย่างโลหะหนักให้อยู่ในช่วงความเข้มข้น LOQ ของเครื่องมือที่ใช้วิเคราะห์ เพื่อให้ได้ผลการวิเคราะห์ที่มีความถูกต้อง

3. จากงานวิจัยนี้ได้ทำการตรวจสอบหา Pesticides ซึ่งเป็นการสแกนแบบคุณภาพด้วยเทคนิค GC-MS ซึ่งควรมีการศึกษาเพิ่มเติม โดยการนำสารมาตรฐานที่คาดว่าจะพบมาวิเคราะห์เทียบผลอีกทีเพื่อยืนยันความถูกต้อง และเนื่องจาก Pesticides มีการสลายตัวได้ง่าย ไม่คงตัว ควรมีการตรวจวิเคราะห์ตัวอย่างโดยทันทีหรือทำการสกัดเปลี่ยนรูปสารให้มีความคงตัวมากยิ่งขึ้น

4. ควรศึกษาความเข้มข้นของโลหะหนัก (Cd, Hg, As, Cu) เพื่อหาความเข้มข้นต่ำสุดที่มีผลต่อยีน และความเข้มข้นสูงสุดที่มีผลต่อการตายของกุ้ง และระยะเวลาในการสัมผัสกับโลหะหนักแต่ละชนิดต่อการแสดงออกของยีน

5. พื้นที่เก็บตัวอย่างน้ำ โดยเฉพาะบริเวณที่ลำนํามีช่วงคดเคี้ยว เพราะโอกาสเจอโลหะหนักจะสูงกว่าลำนํที่ไหลเป็นทางตรง

บรรณานุกรม

- Bruno, G., Volpe, M. G., De Luise, G., & Paolucci, M. (2006). DETECTION OF HEAVY METALS IN FARMED CHERAX DESTRUCTOR. *Bull. Fr. Pêche Piscic.*(380-381), 1341-1349.
- Cartularo, L., Laulicht, F., Sun, H., Kluz, T., Freedman, J. H., & Costa, M. (2015). Gene expression and pathway analysis of human hepatocellular carcinoma cells treated with cadmium. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 288(3), 399-408. doi:<https://doi.org/10.1016/j.taap.2015.08.011>
- Jiang, H., Qian, Z., Lu, W., Ding, H., Yu, H., Wang, H., & Li, J. (2015). Identification and Characterization of Reference Genes for Normalizing Expression Data from Red Swamp Crawfish *Procambarus clarkii*. *International Journal of Molecular Sciences*, 16(9), 21591-21605. doi:<https://doi.org/10.3390/ijms160921591>
- Klaassen, C. D., Liu, J., & Choudhuri, S. (1999). METALLOTHIONEIN: An Intracellular Protein to Protect Against Cadmium Toxicity. *Annual Review of Pharmacology and Toxicology*, 39(1), 267-294. doi:<https://doi.org/10.1146/annurev.pharmtox.39.1.267>
- Kondo, Y., Woo, E. S., Michalska, A. E., Choo, K. H., & Lazo, J. S. (1995). Metallothionein null cells have increased sensitivity to anticancer drugs. *Cancer research*, 55(10), 2021-2023.
- Korsgaard, B., & Petersen, I. (1979). Vitellogenin, lipid and carbohydrate metabolism during vitellogenesis and pregnancy, and after hormonal induction in the blenny *Zoarces viviparus* (L.). *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Comparative Biochemistry*, 63(2), 245-251. doi:[https://doi.org/10.1016/0305-0491\(79\)90036-1](https://doi.org/10.1016/0305-0491(79)90036-1)
- Krizkova, S., Ryvolova, M., Hrabeta, J., Adam, V., Stiborova, M., Eckschlager, T., & Kizek, R. (2012). Metallothioneins and zinc in cancer diagnosis and therapy. *Drug Metab Rev*, 44(4), 287-301. doi:10.3109/03602532.2012.725414
- Livak, K. J., & Schmittgen, T. D. (2001). Analysis of Relative Gene Expression Data Using Real-Time Quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta CT}$ Method. *Methods*, 25(4), 402-408. doi:<https://doi.org/10.1006/meth.2001.1262>

- Martín-Díaz, M. L., Villena-Lincoln, A., Bamber, S., Blasco, J., & DelValls, T. Á. (2005). An integrated approach using bioaccumulation and biomarker measurements in female shore crab, *Carcinus maenas*. *Chemosphere*, 58 (5) , 615 - 626 .
doi:<https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2004.08.072>
- Mommsen, T. P., & Walsh, P. J. (1988). 5 Vitellogenesis and Oocyte Assembly. In W. S. Hoar & D. J. Randall (Eds.), *Fish Physiology* (Vol. 11, pp. 347-406): Academic Press.
- Moncaleano-Niño, A. M., Barrios-Latorre, S. A., Poloche-Hernández, J. F., Becquet, V., Huet, V., Villamil, L., . . . Luna-Acosta, A. (2017). Alterations of tissue metallothionein and vitellogenin concentrations in tropical cup oysters (*Saccostrea* sp.) following short-term (96 h) exposure to cadmium. *Aquatic Toxicology*, 185 , 160 - 170 .
doi:<https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2017.02.011>
- Muthusamy, S., Peng, C., & Ng, J. C. (2016). Effects of binary mixtures of benzo[a]pyrene, arsenic, cadmium, and lead on oxidative stress and toxicity in HepG2 cells. *Chemosphere*, 165, 41-51. doi:<https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2016.08.137>
- Novillo, A., Won, S.-J., Li, C., & Callard, I. P. (2005). Changes in Nuclear Receptor and Vitellogenin Gene Expression in Response to Steroids and Heavy Metal in *Caenorhabditis elegans*. *Integrative and Comparative Biology*, 45(1), 61-71.
doi:<https://doi.org/10.1093/icb/45.1.61>
- Park, K., & Kwak, I.-S. (2012). Assessment of potential biomarkers, metallothionein and vitellogenin mRNA expressions in various chemically exposed benthic *Chironomus riparius* larvae. *Ocean Science Journal*, 47 (4) , 435 - 444 .
doi:<http://dx.doi.org/10.1007/s12601-012-0039-x>
- Peroza, E. A., Schmucki, R., Güntert, P., Freisinger, E., & Zerbe, O. (2009). The β E-Domain of Wheat Ec-1 Metallothionein: A Metal-Binding Domain with a Distinctive Structure. *Journal of Molecular Biology*, 387 (1) , 207 - 218 .
doi:<https://doi.org/10.1016/j.jmb.2009.01.035>
- Saad, R. B., Hsouna, A. B., Saibi, W., Hamed, K. B., Brini, F., & Ghneim-Herrera, T. (2018). A stress-associated protein, LmSAP, from the halophyte *Lobularia maritima* provides tolerance to heavy metals in tobacco through increased ROS scavenging and metal

- detoxification processes. *Journal of Plant Physiology*. doi:<https://doi.org/10.1016/j.jplph.2018.09.019>
- Sampels, S., Kroupova, H. K., & Linhartova, P. (2017). Effect of cadmium on uptake of iron, zinc and copper and mRNA expression of metallothioneins in HepG2 cells in vitro. *Toxicology in Vitro*, 44, 372-376. doi:<https://doi.org/10.1016/j.tiv.2017.08.003>
- Tiu, S. H. K., Benzie, J., & Chan, S.-M. (2008). From Hepatopancreas to Ovary: Molecular Characterization of a Shrimp Vitellogenin Receptor Involved in the Processing of Vitellogenin 1. *Biology of Reproduction*, 79 (1) , 66 - 74 . doi:<https://doi.org/10.1095/biolreprod.107.066258>
- Tseng, D.-Y., Chen, Y.-N., Kou, G.-H., Lo, C.-F., & Kuo, C.-M. (2001). Hepatopancreas is the extraovarian site of vitellogenin synthesis in black tiger shrimp, *Penaeus monodon*. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology*, 129(4), 909-917. doi:[https://doi.org/10.1016/S1095-6433\(01\)00355-5](https://doi.org/10.1016/S1095-6433(01)00355-5)
- Urani, C., Melchiorretto, P., Canevali, C., & Crosta, G. F. (2005). Cytotoxicity and induction of protective mechanisms in HepG2 cells exposed to cadmium. *Toxicology in Vitro*, 19(7), 887-892. doi:<https://doi.org/10.1016/j.tiv.2005.06.011>
- Wallace, R. A. (1965). Resolution and isolation of avian and amphibian yolk-granule proteins using TEAE-cellulose. *Analytical Biochemistry*, 11 (2) , 297 - 311 . doi:[https://doi.org/10.1016/0003-2697\(65\)90018-7](https://doi.org/10.1016/0003-2697(65)90018-7)
- Weil, M., Bressler, J., Parsons, P., Bolla, K., Glass, T., & Schwartz, B. (2005). Blood mercury levels and neurobehavioral function. *Jama*, 293 (15) , 1875 - 1882 . doi:<https://doi.org/10.1186/1476-069X-4-20>
- Wilder, M., Okumura, T., & Tsutsui, N. (2010). Reproductive Mechanisms in Crustacea Focusing on Selected Prawn Species: Vitellogenin Structure, Processing and Synthetic Control. *Aqua-BioScience Monographs*, 3 (3) , 73 - 110 . doi:<http://dx.doi.org/10.5047/absm.2010.00303.0073>
- Yamamoto, F. Y., Garcia, J. R. E., Kupsco, A., & Oliveira Ribeiro, C. A. (2017). Vitellogenin levels and others biomarkers show evidences of endocrine disruption in fish species

- from Iguaçu River - Southern Brazil. *Chemosphere*, 186, 88-99. doi:<https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2017.07.111>
- Yudkovski, Y., Shechter, A., Chalifa-Caspi, V., Auslander, M., Ophir, R., Dauphin-Villemant, C., . . . Tom, M. (2007). Hepatopancreatic multi-transcript expression patterns in the crayfish *Cherax quadricarinatus* during the moult cycle. *Insect Molecular Biology*, 16(6), 661-674. doi:<https://doi.org/10.1111/j.1365-2583.2007.00762.x>
- เชมชิต ฌนาภิกษาญเจริญ, นงนาถ เมฆรังสิมันต์, & สุรัชย์ ศิลาภณีโชติ. (2551). ประโยชน์และความ เป็นพิษของโลหะหนักแคดเมียม. Retrieved from http://www.dss.go.th/images/st- article/cp_4_2551_Cadmium.pdf
- เมธา มีแต้ม. (2554). กลไกระดับเซลล์ในการลดพิษจากโลหะ. Retrieved from <http://www.etm.sc.mahidol.ac.th/a18.shtml>
- โครงการพัฒนาเนื้อหาความรู้สำหรับเครือข่ายคอมพิวเตอร์เพื่อโรงเรียนไทย มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์. ตารางธาตุ. ทองแดง (*Copper*). Retrieved from <https://web.ku.ac.th/schoolnet/f-snet5.htm>
- กรมประมง กระทรวงเกษตรและสหกรณ์. (2558). กำหนดให้ผู้ประกอบกิจการการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำ ควบคุม (กึ่งก้ามแดงหรือกึ่งเครย์ฟิช *Procambarus clarkii* หรือ *Cherax spp.*) ต้องปฏิบัติ พระราชกำหนดการประมง พ.ศ. 2558: คู่มือประกอบการดำเนินงานตามประกาศกรม ประมง (ภาคผนวก).
- กฤติญา แสงภักดี, ภัฏญณ์ ศิลปะสิทธิ, ดวงรัตน์ แพงไทย, วสินี ไข้วพันธุ์, ศิริณา ศิริยันต์, & ภัทรพงษ์ เกริกสกุล. (2557). การศึกษาพฤติกรรมการใช้สารเคมีในการกำจัดศัตรูพืชของชาวนา อำเภอองครักษ์ จังหวัดนครนายก. *แก่นเกษตร*, 42(3), 375-384.
- กลุ่มงานยุทธศาสตร์การพัฒนาจังหวัด สำนักงานจังหวัดนครนายก. (2557). แผนพัฒนาจังหวัด นครนายก 4 ปี (พ.ศ. 2558 - 2561). Retrieved from <http://nakhonnayok.go.th/strategic/Strategic%20Plan.html>
- กองจัดการสารอันตรายและกากของเสีย กรมควบคุมมลพิษ. (2541).ปรอท (Mercury). Retrieved from http://infofile.pcd.go.th/haz/4_Mercury.pdf?CFID=112208&CFTOKEN=19877842

- กองนโยบายและยุทธศาสตร์พัฒนาประมง (กนป.). (2560). สถานการณ์กุ้งก้ามแดงหรือกุ้งเครย์ฟิช
2 5 6 0 . Retrieved from
<https://www.fisheries.go.th/strategy/?name=news&file=readnews&id=300>
- ขนิษฐ พานชูวงศ์. (2550). พรอท ตะกั่ว สารหนู โลหะหนักภัยใกล้ตัว หมอชาวบ้าน (Vol. ปีที่ 28 ฉบับที่ 334 pp. 48-50).
- จารุจินต์ นฤตะภัก. (2548). วิทยาศาสตร์สำหรับเยาวชน ชุดชีวิตกับสิ่งแวดล้อม (1). ปทุมธานี: สถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทย (วว.).
- จิราภรณ์ อ่ำพันธ์. (2543). อันตรายจากปรอท. Retrieved from
http://webdb.dmsc.moph.go.th/ifc_toxic/atx_1_001c.asp?info_id=79
- ณัฐธิดา คลังกลาง, & เวที วิจารณ์นท์. (2554). การใช้สัตว์ไม่มีกระดูกสันหลังหน้าดิน เพื่อเป็นดัชนีชี้วัดคุณภาพน้ำทางชีวภาพโดยการประยุกต์ใช้ *Belgian Biotic Index (BBI)* กรณีศึกษา ลำน้ำใกล้โรงงานผลิตน้ำมันปาล์มใน อำเภอหนองใหญ่ จังหวัดชลบุรี. Paper presented at the วารสารการประชุมวิชาการเสนอผลงานวิจัยระดับบัณฑิตศึกษา ครั้งที่ 12. มหาวิทยาลัยขอนแก่น.
- ดวงใจ พิสุทธิธาราชย์, & ธนากร เหมะสถล. (2560). ผลของแคดเมียมและคอปเปอร์ต่อการแสดงออกของยีน *Metallothionein* ในปลานิล. วารสารมหาวิทยาลัยทักษิณ, 20(พิเศษ), 34-42.
- ดวงกมล คำสอน, & ชมพูนุท ไชยรักษ์. (2556). การดึงดูดโลหะหนักของทานตะวันปลูกในดินปนเปื้อน สังกะสี ตะกั่ว และทองแดง. วารสารวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น, 41(2), 468-475.
- ดุจดดี ปานพรหมมินทร์, & สุภาวดี พุ่มพวง. (2556). การศึกษาคุณลักษณะและการแสดงออกของยีน *Metallothionein* ในปลาดุกอุยเพื่อใช้เป็นดัชนีชีวภาพตรวจการสัมผัสโลหะหนัก. สำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย.
- ธนภัทร ปลื้มพวง, ธงชัย มาลา, & อรุณศิริ กำลัง. (2557). ปริมาณแคดเมียมในข้าวที่ปลูกในดินปนเปื้อนแคดเมียมในพื้นที่ ลุ่มน้ำแม่ตาบ จังหวัดตาก ประเทศไทย. วารสารวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี, 3(2), 26-38.
- บัณฑิต ไทยผลิตเจริญ. (2553). มาตรการทางกฎหมายของไทยในการควบคุมชนิดพันธุ์สัตว์น้ำต่างถิ่นที่กระทบต่อสิ่งแวดล้อม : ศึกษากรณีหอยเชอรี่. (วิทยานิพนธ์ (นิติศาสตรมหาบัณฑิต)),

- มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์, กรุงเทพฯ. Retrieved from <http://digi.library.tu.ac.th/thesis/la/1563/03CHAPTER2.pdf>
- ประกาศคณะกรรมการสิ่งแวดล้อมแห่งชาติ ฉบับที่ 8. (2537). กำหนดมาตรฐานคุณภาพน้ำในแหล่งน้ำผิวดิน. Retrieved from http://infofile.pcd.go.th/law/3_14_water.pdf?CFID=1928487&CFTOKEN=21597277
- พีรพงษ์ พึ่งแย้ม. (2545). การวิเคราะห์สมบัติของไวเทลโลจีนินและการตรวจหาตัวรับไวเทลโลจีนินจากปลากระบอกดำ. Retrieved from <http://kb.psu.ac.th/psukb/handle/2553/2877>
- รชนีมุข หิรัญสัจจาเลิศ. (2556). ไวเทลโลเจเนซิส: กระบวนการสร้างไข่แดงของกุ้งกุลาดำ (*Penaeus monodon*). วารสารวิทยาศาสตร์ มข., เม.ย.-มิ.ย. 2556(ปีที่ 41 ฉบับที่ 2), 281-297.
- วาจาทิพย์ บุรณวิชิต, ธนกร เกิดอินทร์, ธีรพงศ์ ชัยมี, & ธาวัชทิพย์ บุญส่ง. (2557). *Low-level cadmium exposure induces metallothionein and heme oxygenase-1 gene expression in human choriocarcinoma cell line JEG-3* / แคดเมียมปริมาณต่ำกระตุ้นการแสดงออกของยีนเมทัลโลไธโอเนนและฮีโมออกซีจีเนส-1 ในเซลล์เพาะเลี้ยงเซลล์รกชนิดเจอีจี-3 ของมนุษย์. Paper presented at the Naresuan University Journal: Science and Technology (NUJST). <http://www.journal.nu.ac.th/NUJST/article/view/584>
- ศูนย์ข้อมูลพิษวิทยา. ความเป็นพิษของทองแดง. Retrieved from http://webdb.dmsc.moph.go.th/ifc_toxic/atx_1_001c.asp?info_id=296
- ศูนย์วิจัยและประเมินความเสี่ยงด้านอาหารปลอดภัย. สารหนู (Arsenic). Retrieved from <http://fic.nfi.or.th/foodsafety/damageCate.php?cid=6&id=4>
- สมทิพย์ ด้านธีรวิชัย, สุวัฒน์ ธนานุภาพไพศาล, วัสสา คงนคร, เจิดจรรย ศิริวงศ์, & อัญชลี ฤกษ์ดี. (2556). โครงการวิจัยเรื่องการประเมินผลกระทบประเด็นปัญหาโลหะหนักในระบบนิเวศของบริเวณพื้นที่อำเภอบ้านดอน จังหวัดสุราษฎร์ธานี และการใช้หอยนางรมเป็นตัวบ่งชี้. มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์. Retrieved from <http://kb.psu.ac.th/psukb/handle/2010/9915>
- สารานุกรมไทยสำหรับเยาวชนฯ เล่มที่ 7. เรื่องที่ ๗ การชลประทาน แหล่งน้ำ. Retrieved from <http://kanchanapisek.or.th/kp6/sub/book/book.php?book=7&chap=7&page=t7-7-infodetail05.html>
- สารานุกรมไทยสำหรับเยาวชนฯ เล่มที่ 22. เรื่องที่ ๖ อาชีวอนามัย : สารหนู (Arsenic). Retrieved from

<http://kanchanapisek.or.th/kp6/sub/book/book.php?book=22&chap=6&page=t22-6-infodetail06.html>

สุภาวดี หุ่นสวัสดิ์. (2539). ปริมาณสังกะสีและทองแดงในอาหารสำหรับผู้ป่วยในโรงพยาบาลภูมิพลอดุลยเดช พอ. (วิทยานิพนธ์ (ภ.ม.)), บัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.

Retrieved from <http://cuir.car.chula.ac.th/handle/123456789/10256>





ภาคผนวก ก

การเตรียมสารละลายมาตรฐานและกราฟมาตรฐานของ แคดเมียม ปรอท สารหนู และ ทองแดง สำหรับวิเคราะห์ด้วยเครื่อง ICP-MS

การเตรียมสารละลายมาตรฐานแคดเมียม ปรอท สารหนู และทองแดง

1. สารมาตรฐาน

- 1.1 แคดเมียม (Cadmium, Cd) ความเข้มข้น 1,000 µg/L ใน 2% Nitric acid
- 1.2 ปรอท (Mercury, Hg) ความเข้มข้น 1,000 µg/L ใน 2% Nitric acid
- 1.3 สารหนู (Arsenic, As) ความเข้มข้น 1,000 µg/L ใน 2% Nitric acid
- 1.4 ทองแดง (Copper, Cu) ความเข้มข้น 1,000 µg/L ใน 2% Nitric acid

2. การเจือจางสารละลายมาตรฐาน

- 2.1 standard solution ความเข้มข้น 100 µg/L

ปิเปตสารละลายมาตรฐาน (แคดเมียม ปรอท สารหนู และทองแดง) ความเข้มข้น 1,000 µg/L ใน 2% Nitric acid ปริมาตร 10 มิลลิลิตร ต่างไปกัน จากนั้นเติม Conc. Nitric acid จำนวน 2 มิลลิลิตร แล้วปรับปริมาตรด้วยน้ำ DI เขย่าให้เข้ากัน

- 2.2 standard solution ความเข้มข้น 1 µg/L

ปิเปตสารละลายมาตรฐาน (แคดเมียม ปรอท สารหนู และทองแดง) ความเข้มข้น 100 µg/L ใน 2% Nitric acid ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ต่างไปกัน จากนั้นเติม Conc. Nitric acid จำนวน 2 มิลลิลิตร แล้วปรับปริมาตรด้วยน้ำ DI เขย่าให้เข้ากัน

- 2.3 standard solution ความเข้มข้น 1 µg/L

เตรียมสารละลายมาตรฐานของ แคดเมียม ปรอท สารหนู และทองแดง โดยเตรียมที่ความเข้มข้นต่างๆ ดังนี้ 0.01, 0.05, 0.1, 0.5, 1, 2.5, 5, 10, 20, 25 µg/L นำไปสร้างกราฟมาตรฐาน โดยกำหนดให้แกน x เป็นค่าความเข้มข้น (Conc.) ของสารละลายมาตรฐาน และแกน y เป็นค่า Ratio ที่วัดได้ คำนวณค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ (correlation coefficient, r) เกณฑ์ที่ยอมรับได้ ≥ 0.995 จากนั้นทำการทดสอบตามวิธีทดสอบ Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater, APHA, AWWA, WEF (2017), 3030E by ICP-MS

กราฟมาตรฐานของ แคดเมียม ปรอท สารหนู และทองแดง

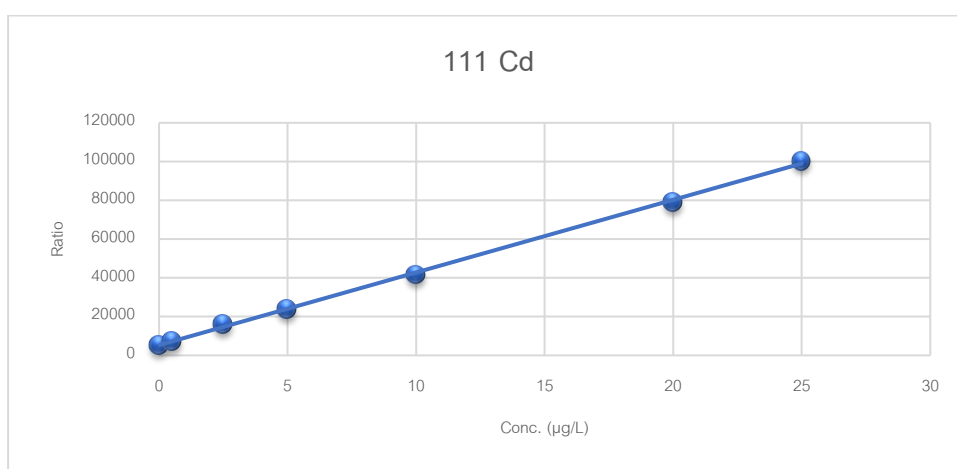
1. Calibration Curve of Cadmium

^{111}Cd

$$y = 8.029\text{E}+002 \cdot x + 1.155\text{E}+002$$

$$r = 0.9998$$

$$\text{BEC} = 1.439\text{E}-01 \mu\text{g/L}$$



ภาพประกอบ 16 Calibration Curve of Cadmium

2. Calibration Curve of Mercury

202 Hg

$$y = 1.347\text{E}+003 \cdot x + 1.494\text{E}+002$$

$$r = 0.9998$$

$$\text{BEC} = 1.110\text{E}-01 \mu\text{g/L}$$



ภาพประกอบ 17 Calibration Curve of Mercury

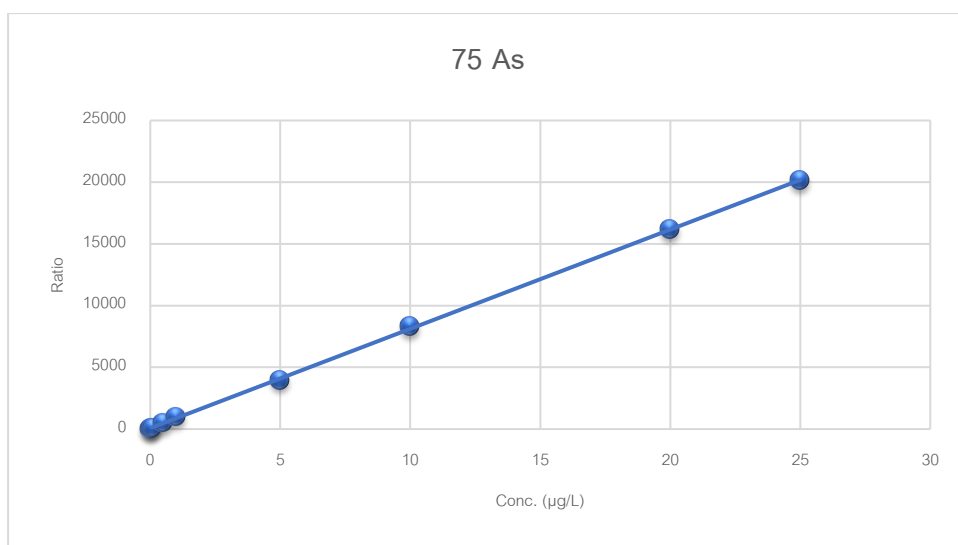
3. Calibration Curve of Arsenic

75 As

$$y = 6.864E+002 \cdot x + 1.146E+002$$

$$r = 0.9998$$

$$\text{BEC} = 1.670E-01 \mu\text{g/L}$$



ภาพประกอบ 18 Calibration Curve of Arsenic

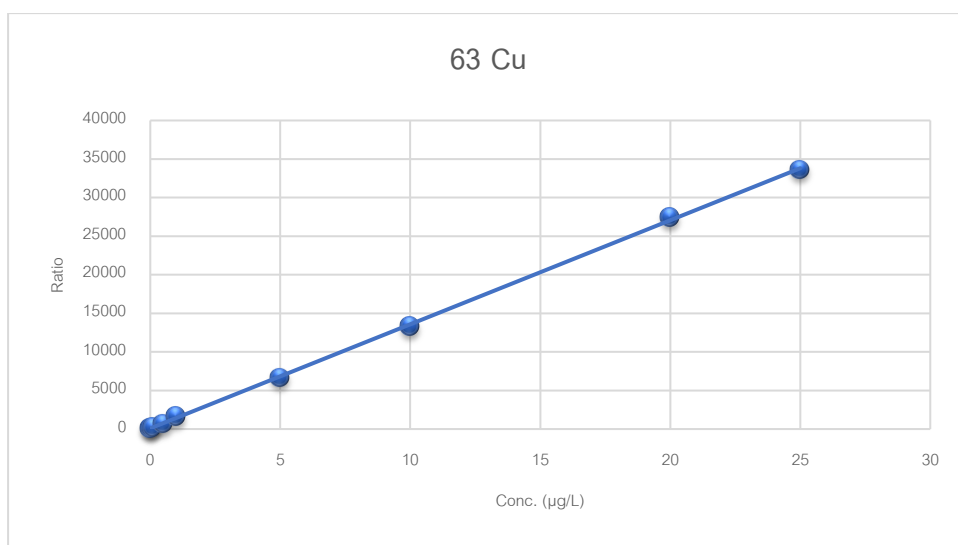
4. Calibration Curve of Copper

^{63}Cu

$$y = 3.685\text{E}+003 \cdot x + 6.471\text{E}+003$$

$$r = 0.9991$$

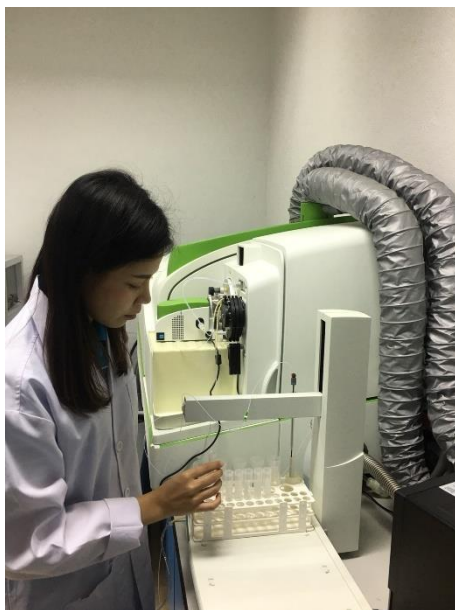
$$\text{BEC} = 1.756 \mu\text{g/L}$$



ภาพประกอบ 19 Calibration Curve of Copper

ภาคผนวก ค
ภาพประกอบแสดงขั้นตอนการดำเนินงานวิจัย

ขั้นตอนการวิเคราะห์หาปริมาณโลหะหนักด้วยเทคนิค ICP-MS

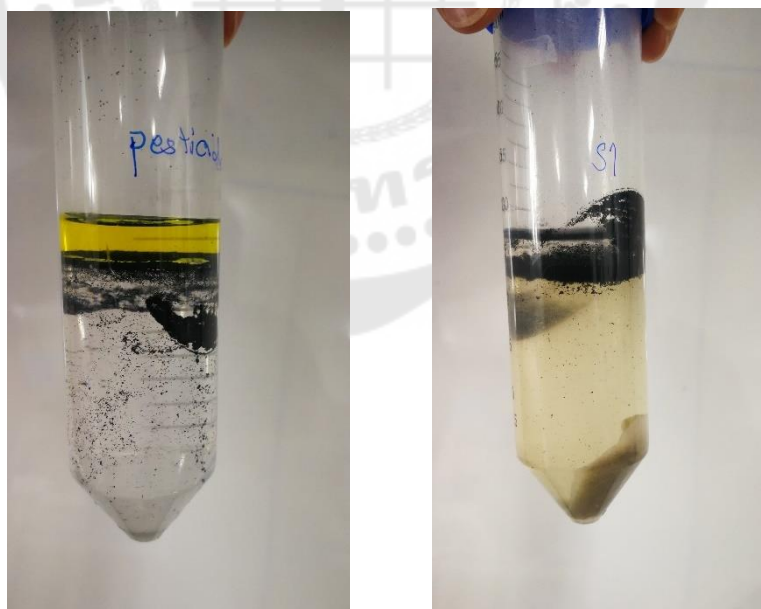


ภาพประกอบ 21 การวิเคราะห์หาปริมาณโลหะหนัก (แคดเมียม ปรอท สารหนู และทองแดง) ด้วย
เทคนิค ICP-MS รุ่น NexION 300X ยี่ห้อ PerkinElmer

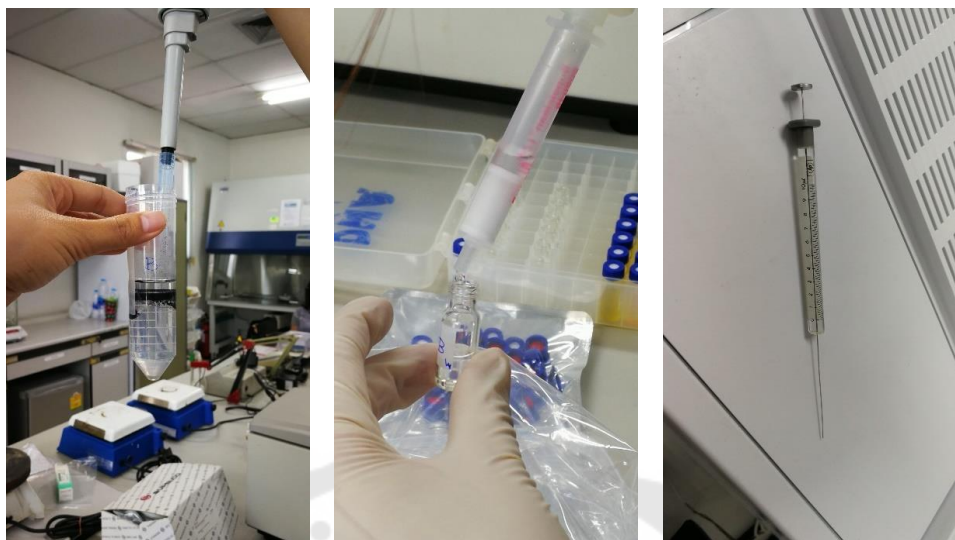
ขั้นตอนการวิเคราะห์หาปริมาณ Pesticides ด้วยเทคนิค GC-MS



ภาพประกอบ 22 สารมาตรฐาน Pesticides (2,4-D, Ametryn, Dicamba, Bromophos-methyl และ Pendimethalin)



ภาพประกอบ 23 การแยกชั้นของสารมาตรฐาน Pesticides (ซ้าย) การแยกชั้นของน้ำตัวอย่างจากแหล่งน้ำธรรมชาติ จุดที่ 1 (ขวา) เมื่อสกัดด้วย ACN



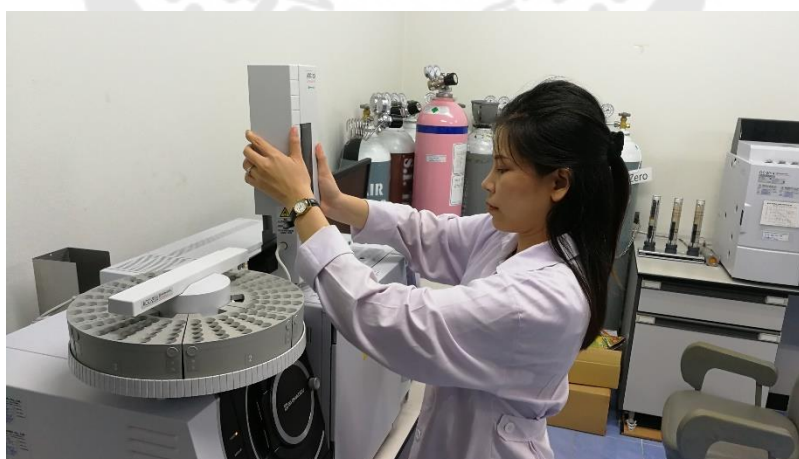
(a)

(b)

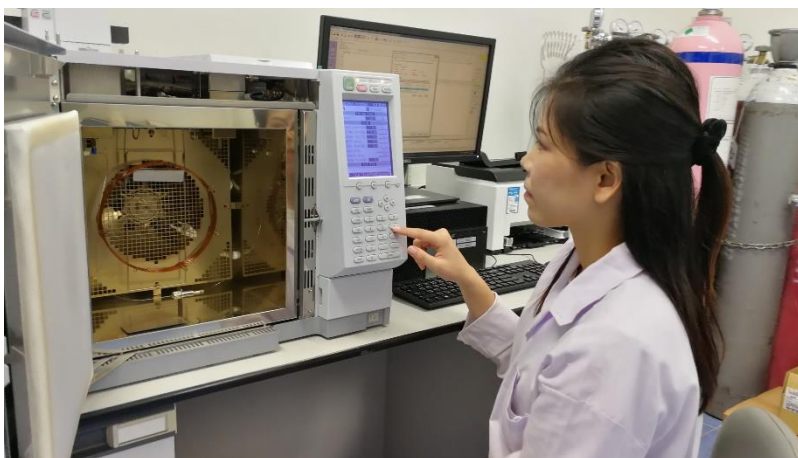
(c)

ภาพประกอบ 24 ขั้นตอนการสกัดตัวอย่าง เพื่อหา Pesticides และอุปกรณ์ที่ใช้กับเครื่อง GC-MS

- (a) คัดสารละลายในแต่ละชั้น เพื่อนำไปวิเคราะห์
- (b) กรองด้วยชุดทำความสะอาด Supelclean™ LC-Si ยี่ห้อ SUPELCO นำสารที่ได้ใส่ใน Vial เพื่อทำการวิเคราะห์ด้วยเครื่อง GC-MS ต่อไป
- (c) เข็มที่ใช้ฉีดตัวอย่าง



ภาพประกอบ 25 ขั้นตอนการประกอบ Auto Injector รุ่น AOC-20i ยี่ห้อ Shimadzu



ภาพประกอบ 26 แสดงลักษณะภายในและคอลัมน์ของเครื่อง GC-MS ยี่ห้อ Shimadzu

ขั้นตอนการทดลองเลี้ยงกิ้งก่าแมง



ภาพประกอบ 27 การเลี้ยงกิ้งก่าแมงในน้ำตัวอย่าง 10 ชนิด โดยนำตัวอย่างแต่ละชนิดทำ 3 ซ้ำ



ภาพประกอบ 28 เลี้ยงกุ้งในน้ำตัวอย่างเป็นเวลา 6 ชั่วโมง จากนั้นคัดกุ้งด้วยน้ำเย็น



ภาพประกอบ 29 ภาพขณะทำการชั่งน้ำหนักกุ้งแต่ละตัว และบันทึกน้ำหนักที่ได้



ภาพประกอบ 30 ภาพขณะทำการวัดความยาวของกุ้งแต่ละตัว และบันทึกค่าที่ได้



ภาพประกอบ 31 แสดงลักษณะของตับกุ้งก้ามแดง มีลักษณะเป็นพูขนาดใหญ่ 2 พู อยู่ในช่องว่างของ
ส่วนหัวบริเวณด้านหลังของกระเพาะอาหาร



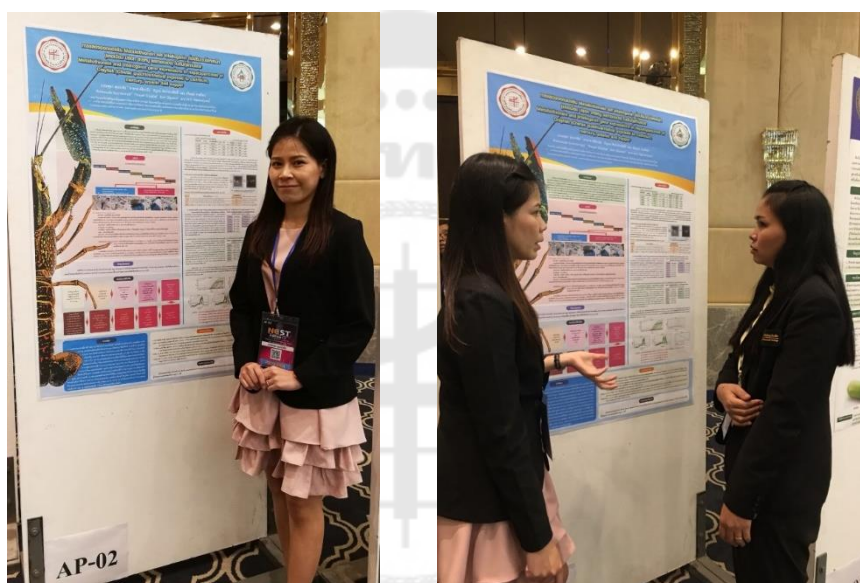
ภาพประกอบ 32 ขั้นตอนการนำเนื้อเยื่อขนาดประมาณ 30 มิลลิกรัม ใส่ในสารคงสภาพ RNAlater™
RNA Stabilization Reagent 500 ไมโครลิตร เก็บที่อุณหภูมิ -20 ถึง 0 องศาเซลเซียส

ภาคผนวก ง

การนำเสนอผลงานและเผยแพร่งานวิจัย

การนำเสนอผลงานและเผยแพร่งานวิจัย

ได้เข้าร่วมและนำเสนองานวิจัยในงานประชุมวิชาการระดับชาติด้านวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี “วิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีสู่การพัฒนาชุมชนและท้องถิ่น” ครั้งที่ 1 มหาวิทยาลัยราชภัฏบ้านสมเด็จเจ้าพระยา ระหว่างวันที่ 19-20 กรกฎาคม 2561 ณ โรงแรมเอสดี เอเวนิว กรุงเทพมหานคร



ภาพประกอบ 33 ภาพบรรยายภาาษณะนำเสนอผลงานวิจัย



ภาพประกอบ 34 ถ่ายภาพร่วมกับผู้ทรงคุณวุฒิที่มาตรวจประเมิน

ประวัติผู้เขียน

ชื่อ-สกุล	เปรมสุดา สุนทรพิธ
วัน เดือน ปี เกิด	3 ธันวาคม 2530
สถานที่เกิด	อำเภอเมือง จังหวัดตาก
วุฒิการศึกษา	พ.ศ. 2552 วิทยาศาสตรบัณฑิต (วท.บ.เคมี) เกียรตินิยมอันดับ 1 คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหาสารคาม พ.ศ. 2561 วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต (วท.ม.) สาขาวิชาเทคโนโลยีสิ่งแวดล้อมและการจัดการทรัพยากร คณะพัฒนธรรมสิ่งแวดล้อมและการท่องเที่ยวเชิงนิเวศ มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ
ที่อยู่ปัจจุบัน	197 ม.1 ตำบลท่าขนอย อำเภอกันทรวิชัย จังหวัดมหาสารคาม 44150