



ISSN 1686-4522

KOCH CHA SARN JOURNAL OF SCIENCE
Vol. 44 (1); January-June (2022), pp. 22-22
<https://science.srru.ac.th/kochasarn>

Research Article

Effect of chlorpyrifos mixture with cypermethrin (pesticide) on morphological changes and Acetylcholinesterase expression in Golden apple snail (*Pomacea canaliculata*)

ผลกระทบของคลอร์ไพริฟอสผสมไซเปอร์เมทริน (สารกำจัดแมลง) ต่อการเปลี่ยนแปลงสัณฐานวิทยาและการแสดงออกของอะซิติลโคลีนเอสเตอเรสในหอยเชอรี่ (*Pomacea canaliculata*)

ประจักษ์ บัวเขียว¹, อภิสิทธิ์ เดชฤทธิ์¹, เถลิงเกียรติ สมนึก¹, วิชชุดา ประสาทแก้ว², พวงเพชร พิมพ์จันทร์³, สุทธิติล ปิยะเดชสุนทร⁴, ชุตินา ฅนอมสิทธิ์^{1*}

¹ สาขาประมง คณะเกษตรศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลอีสาน วิทยาเขตสุรินทร์ 145 หมู่ 15 ถ.สุรินทร์-ปราสาท ต.นอกเมือง อ.เมือง จ.สุรินทร์ 32000

² สาขาการจัดการสิ่งแวดล้อม คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยราชภัฏธนบุรี สมุทรปราการ 59/1 หมู่ที่ 14 ซ.เทศบาลบางปู 119 ถ.สุขุมวิท ต.บางปลา อ.บางพลี จ.สมุทรปราการ 10540

³ สาขาพืชศาสตร์ สิ่งทอ และการออกแบบ คณะเกษตรศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลอีสาน วิทยาเขตสุรินทร์ 145 หมู่ 15 ถ.สุรินทร์-ปราสาท ต.นอกเมือง อ.เมือง จ.สุรินทร์ 32000

⁴ สาขาสัตวศาสตร์ คณะเกษตรศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลอีสาน วิทยาเขตสุรินทร์ 145 หมู่ 15 ถ.สุรินทร์-ปราสาท ต.นอกเมือง อ.เมือง จ.สุรินทร์ 32000

*ชุตินา ฅนอมสิทธิ์ สาขาประมง คณะเกษตรศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลอีสาน วิทยาเขตสุรินทร์ 145 หมู่ 15 ถ.สุรินทร์-ปราสาท ต.นอกเมือง อ.เมือง จ.สุรินทร์ 32000

Article Info

Received 06 March 2022

Revised 05 May 2022

Accepted 10 August 2022

Abstract

This study aimed to evaluate the effects of the chlorpyrifos mixture with cypermethrin insecticide on golden apple snails by assessing the cumulative mortality, behavior alteration, internal and external morphological appearance and expression of acetylcholinesterase in golden apple snail (*Pomacea canaliculata*). We found that the snail exposed to chlorpyrifos mixture with cypermethrin at concentrations 0, 5, 10, 15, 20, and 25 µg/L for 24, 48, 72 and 96 hrs showed an increase in cumulative mortality with exposure time while we did not find mortality in the control group (without exposure). The mortality firstly detected at 72 hrs. after exposure in all concentrations. The detectable behavior change occurred after exposure for 1 hr at a concentration of 10 µg/L. The behavior change detected was excretion and a little movement on the experimental tank. The external morphology was not changed in the color and shell appearance. The internal morphological changes firstly occurred in the exposure of 25 µg/L for 24 hrs. We found their tissue being decayed and acetylcholinesterase expression being decreased with an increase in exposure time and concentration after being evaluated by using the dot blot technique. Therefore, golden apple snails could be bio-indicator for chlorpyrifos mixture with cypermethrin insecticide in an aquatic environment.

Keywords Chlorpyrifos mixture with cypermethrin, Golden apple snail, Morphology, Acetylcholinesterase

บทคัดย่อ

งานวิจัยนี้มีเป้าหมายเพื่อศึกษาผลกระทบของสารกำจัดแมลงศัตรูพืชคลอร์ไพริฟอสผสมกับไซเปอร์เมทรินที่ส่งผลต่อหอยเชอรี่ (*Pomacea canaliculata*) โดยประเมินผลกระทบจากการตายสะสม การเปลี่ยนแปลงพฤติกรรม สันฐานวิทยาภายนอกและภายในและศึกษาการแสดงออกของอะซิทิลโคลีนเอสเตอเรสในหอยเชอรี่ จากการศึกษาพบว่าหอยเชอรี่เมื่อได้รับสัมผัสสารคลอร์ไพริฟอสผสมกับไซเปอร์เมทรินที่ระดับความเข้มข้น 0, 5, 10, 15, 20 และ 25 ไมโครลิตร/ลิตร เป็นเวลา 24, 48, 72 และ 96 ชั่วโมงพบว่า อัตราการตายสะสมเพิ่มตามระดับความเข้มข้นที่ได้รับสัมผัสโดยตลอดช่วงเวลาที่ศึกษาคือ 24, 48, 72 และ 96 ชั่วโมง หอยเชอรี่ในชุดควบคุมจะไม่เกิดการตาย แต่การตายเกิดขึ้นครั้งแรกเมื่อหอยเชอรี่ได้รับสัมผัสสารทุกระดับความเข้มข้นเมื่อเวลาเข้าสู่ 72 ชั่วโมง ส่วนพฤติกรรมที่สามารถตรวจสอบได้จะเริ่มขึ้นเมื่อหอยเชอรี่ได้รับสัมผัสสารคลอร์ไพริฟอสผสมกับไซเปอร์เมทรินที่เวลา 1 ชั่วโมง ที่ระดับความเข้มข้น 10 ไมโครลิตร/ลิตร การเปลี่ยนแปลงที่ตรวจสอบได้คือ หอยเชอรี่มีการขับถ่าย เคลื่อนตัวเล็กน้อย เกาะตามหลอดทดลอง และการศึกษาลักษณะสันฐานวิทยาภายนอกพบว่าไม่เกิดการเปลี่ยนแปลง โดยที่หอยเชอรี่มีสีและเปลือกที่ปกติ ส่วนการเปลี่ยนแปลงลักษณะสันฐานวิทยาในหอยเชอรี่มีการเปลี่ยนแปลงเกิดขึ้นครั้งแรกที่ความเข้มข้น 25 ไมโครลิตร/ลิตร ที่เวลา 24 ชั่วโมง โดยมีเนื้อเยื่อเปื่อยยุ่ย และการแสดงออกของอะซิทิลโคลีนเอสเตอเรสในเนื้อเยื่อหอยเชอรี่มีแนวโน้มที่จะลดลงตามระยะเวลาและความเข้มข้นที่ได้รับสัมผัสสารเมื่อทดสอบโดยใช้เทคนิค dot blotting ดังนั้นหอยเชอรี่จึงมีแนวโน้มที่จะให้เป็นตัวชี้วัดการได้รับสัมผัสสารกำจัดแมลงศัตรูพืชคลอร์ไพริฟอสผสมกับไซเปอร์เมทรินที่ปนเปื้อนในแหล่งน้ำได้

คำสำคัญ: คลอร์ไพริฟอสผสมไซเปอร์เมทริน หอยเชอรี่ สันฐานวิทยา อะซิทิลโคลีนเอสเตอเรส

1. บทนำ

หอยเชอรี่ (Golden apple snail; *Pomacea canaliculata*) มีชื่อเรียกอีกอย่างหนึ่งว่า หอยโข่งอเมริกาใต้ หรือเปาฮื้อน้ำจืด เป็นสัตว์ต่างถิ่นที่มีถิ่นกำเนิดในทวีปอเมริกาใต้และเข้ามาในประเทศไทยผ่านเข้ามาจากประเทศญี่ปุ่นและประเทศฟิลิปปินส์ [1] ในปี พ.ศ. 2553 หอยเชอรี่ถูกจัดเป็นสัตว์ต่างถิ่นในลำดับที่ 11 ซึ่งสร้างความเสียหายให้กับสัตว์พื้นเมืองต่าง ๆ เนื่องจากมีอัตราการขยายพันธุ์รวดเร็ว เจริญเติบโต กินอาหารได้หลากหลายและมีความสามารถในการปรับตัวให้เข้ากับสิ่งแวดล้อมได้ดีมาก ทำให้พบหอยเชอรี่ได้ตามสิ่งแวดล้อมทั่วไป [2] ปัจจุบันมีการนำหอยเชอรี่มาบริโภคเป็นอาหารหรือใช้เป็นอาหารสัตว์มากขึ้น เนื่องจากเนื้อหอยเชอรี่มีโปรตีนสูงถึง 54-65 เปอร์เซ็นต์ [3] จึงถือเป็นแหล่งโปรตีนที่น่าสนใจ อย่างไรก็ตามในการนำมาบริโภค ควรมีการศึกษาความเสี่ยงจากการได้รับสัมผัสสารกำจัดศัตรูพืช เนื่องจากหอยเชอรี่มีโอกาสได้รับสัมผัสสารกำจัดศัตรูพืชทั้งผ่านการกินอาหาร เช่น การกรอกกินแพลงก์ตอน หรือกัดกินพืชต่าง ๆ รวมทั้งต้นข้าวในนาที่มีการใช้สารปราบศัตรูพืชฉีดพ่น และยังอาจได้รับสารกำจัดศัตรูพืชที่ละลายอยู่ในน้ำ หรือตะกอนพื้นท้องน้ำ ซึ่งหอยเชอรี่อาศัยอยู่บริเวณแหล่งน้ำนั้น ทำให้มีความเสี่ยงที่จะสัมผัสกับสารกำจัดศัตรูพืชเป็นเวลานานและเกิดการสะสมในร่างกาย จึงถือเป็นสัตว์น้ำที่มีโอกาสได้รับและสะสมสารพิษไว้ในร่างกายได้มาก [4]

ปัจจุบันมักพบปัญหาเกี่ยวกับการเกิดโรคและปัญหาการปนเปื้อนของสารพิษต่าง ๆ ในสิ่งแวดล้อม เช่น สารกำจัดแมลงศัตรูพืชชนิดต่าง ๆ และโลหะหนัก เช่น แคดเมียม และปรอท เป็นต้น ในประเทศไทยสารกำจัดแมลงศัตรูพืชถูกนำมาใช้เกือบทุกพื้นที่ที่มีการเพาะปลูก ดังนั้นจึงมีความเป็นไปได้ที่จะเกิดการสะสมของสารในกลุ่มดังกล่าวไปยังสัตว์น้ำชนิดต่าง ๆ ทั้งกุ้ง ปู และปลา [5, 6] ยิ่งไปกว่านั้นสารกำจัดศัตรูพืชยังก่อให้เกิดการสะสมและเพิ่มจำนวนมากขึ้นตามลำดับห่วงโซ่อาหาร มนุษย์ซึ่งเป็นผู้บริโภคในลำดับขั้นสูงสุดก็อาจจะได้รับ

ผลกระทบเชิงลบต่อสุขภาพได้ โดยอาจมีผลต่อพฤติกรรมซึ่งเป็นการตอบสนองของระบบหรือสิ่งมีชีวิตต่อสิ่งเร้าหรือการรับเข้าทั้งหลาย ไม่ว่าจะเป็นภายในหรือภายนอก หลังจากสิ่งมีชีวิตชนิดต่าง ๆ ได้รับสัมผัสกับสารเคมีที่เป็นพิษจะก่อให้เกิดผลกระทบต่อพฤติกรรมต่าง ๆ ซึ่งสามารถใช้ศึกษาถึงผลกระทบที่มีต่อสิ่งมีชีวิตในระดับที่ยังไม่ก่อให้เกิดการตายได้

คลอร์ไพริฟอสจัดเป็นสารกำจัดแมลงที่นิยมกันมากเป็นอันดับต้น ๆ ของประเทศไทยที่ถูกนำมาใช้ในการเกษตร เป็นสารปราบศัตรูพืชในกลุ่มออร์แกโนฟอสเฟต มีความเป็นพิษระดับปานกลาง แต่ยังคงมีความเป็นพิษค่อนข้างสูงเมื่อเทียบกับไซเปอร์เมทริน โดยไซเปอร์เมทรินเป็นสารปราบศัตรูพืชในกลุ่มไพรีทรอยด์ ซึ่งสารเคมีทั้งสองชนิดจัดอยู่ในกลุ่มสารเคมีที่มีกลไกออกฤทธิ์ที่ระบบประสาทและระบบกล้ามเนื้อของแมลงในทางสัมผัสและกลืน โดยการศึกษาในหอยทากน้ำจืด (*Melanoides tuberculatus*) พบว่าค่า LC₅₀ ของไซเปอร์เมทรินที่ 96 ชั่วโมง เท่ากับ 3.81 มิลลิกรัมต่อลิตร [7] และการศึกษาในหอยหวาน (*Marcia Opima*) เท่ากับ 2.75 มิลลิกรัมต่อลิตร [8] อย่างไรก็ตามมีรายงานว่าสารเคมีกำจัดศัตรูพืชที่ผสมกันสองกลุ่มจะทำให้เกิดความเป็นพิษต่อหอยเชอรี่มากกว่าสารเคมีกำจัดศัตรูพืชที่มีสารเคมีเพียงกลุ่มเดียว [9] ซึ่งปัจจุบันมีการนำคลอร์ไพริฟอสกับไซเปอร์เมทรินมาผสมกันและจำหน่ายในทางการค้าเพื่อประสิทธิภาพในการกำจัดแมลงและไรศัตรูพืชได้อย่างกว้างขวาง ซึ่งหากเกษตรกรมีการใช้สารเคมีเหล่านี้ในปริมาณมากเกินไปจะส่งผลให้เกษตรกรและประชากรทั่วไปมีโอกาสสัมผัสกับสารกำจัดศัตรูพืชที่ปนเปื้อนในอาหารและแหล่งน้ำ เนื่องจากมีการตกค้างของสารเหล่านี้ในสิ่งแวดล้อม ก่อให้เกิดการสะสมในสิ่งมีชีวิตต่าง ๆ ตามห่วงโซ่อาหารและอาจส่งผลกระทบต่อสิ่งมีชีวิตในระบบนิเวศได้

อะซิทิลโคลีนเอสเตอเรส (Acetylcholinesterase) เป็นเอนไซม์ที่ทำหน้าที่เปลี่ยนอะซิทิลโคลีน ซึ่งเป็นสารสื่อประสาทไปเป็นโคลีน

และอะซีเตทจะถูกยับยั้ง และทำให้เกิดการคั่งของอะซีทิลโคลีน ซึ่งการคั่งของสารดังกล่าวจะมีผลต่อระบบประสาทส่วนกลางและส่วนปลายที่มีผลต่อการทำงานของกล้ามเนื้อ [6] จากการศึกษาของซุติมา ถนอมสิทธิ์ และคณะ ได้มีการใช้ระดับของเอนไซม์อะซีทิลโคลีนเอสเตอเรสมาใช้เป็นตัวชี้วัดทางชีวภาพจากการรับสัมผัสสารกำจัดศัตรูพืชเพื่อลดความเสี่ยงในการบริโภคหอยขมและหอยเชอรี่ ในช่วงฤดูฝนที่มีการทำนาเพื่อประเมินถึงการได้รับสัมผัสกับสารกำจัดศัตรูพืชซึ่งสามารถใช้เป็นข้อมูลเบื้องต้นในการลดความเสี่ยงของผู้บริโภค [6]

อย่างไรก็ตามยังไม่มีการศึกษาถึงผลของสารกำจัดศัตรูพืชที่มีภูมิการใช้ร่วมกันในการเกษตรต่อการเปลี่ยนแปลงสัณฐานวิทยาและการแสดงออกของอะซีทิลโคลีนเอสเตอเรสในหอยเชอรี่ ซึ่งปัจจุบันมีการนำคลอรีโฟสเฟสมกับไซเพอร์เมทรินเพื่อประสิทธิภาพในการกำจัดแมลงและไรศัตรูพืช ดังนั้น การศึกษาครั้งนี้จึงมีเป้าหมายเพื่อทำการศึกษาระดับความเป็นพิษของคลอรีโฟสเฟสมกับไซเพอร์เมทรินที่ส่งผลต่ออัตราการตายสะสมของหอยเชอรี่ ผลของคลอรีโฟสเฟสมกับไซเพอร์เมทรินต่อการเปลี่ยนแปลงพฤติกรรมและลักษณะสัณฐานวิทยา และตรวจสอบการเปลี่ยนแปลงของอะซีทิลโคลีนเอสเตอเรสซึ่งเป็นตัวชี้วัดทางชีวภาพของการได้รับสัมผัสสารกำจัดศัตรูพืชในแหล่งน้ำธรรมชาติ จากเนื้อเยื่อของหอยเชอรี่ที่ได้รับสัมผัสกับสารคลอรีโฟสเฟสมกับไซเพอร์เมทริน เพื่อใช้บ่งชี้การได้รับสัมผัสสารกำจัดแมลงศัตรูพืชและเป็นข้อมูลเบื้องต้นสำหรับการประยุกต์ใช้กับสัตว์น้ำชนิดอื่น ๆ ต่อไป

2.วิธีดำเนินการวิจัย

การวางแผนการทดลอง

การวางแผนการทดลองแบบสุ่มสมบูรณ์ CRD โดยทำการทดลองทั้งหมด 3 ซ้ำ ใช้โหลแก้วทดลอง ขนาด 10 ลิตร จำนวน 18 โหล แบ่งออกเป็น 5 ชุดการทดลอง และชุดควบคุม 1 ชุดการทดลอง ใส่หอยเชอรี่โหลละ 10 ตัว เติมสารคลอรีโฟสเฟสมกับไซเพอร์เมทรินลงในแต่ละโหล ซึ่งระดับความเข้มข้นที่ใช้ในการทดลองได้จากการศึกษาเบื้องต้นของคณะผู้วิจัยโดยเทียบกับอัตราส่วนสารคลอรีโฟสเฟสมกับไซเพอร์เมทรินที่แนะนำให้ใช้ในการกำจัดศัตรูพืช (ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัม/ลิตร) ซึ่งกำหนดความเข้มข้นให้อยู่ในระดับการได้รับสารพิษแบบกึ่งเฉียบพลันคือ 5, 10, 15, 20 และ 25 ไมโครกรัม/ลิตร เก็บตัวอย่างที่เวลา 24, 48, 72 และ 96 ชั่วโมง

สารเคมีที่ใช้ในงานวิจัย

สารเคมีทางการเกษตร (สารกำจัดศัตรูพืช) ที่นำมาใช้ในการศึกษาจะเป็นสารเคมีที่อยู่ในรูปแบบทางการค้าและอยู่ในรูปสารละลายคือ คลอรีโฟสเฟสมกับไซเพอร์เมทริน (50%+5% W/V, EC) โดยอัตราการใช้สารที่ระบุคือ 2.5 มิลลิกรัมต่อน้ำ 1 ลิตร และระดับความเข้มข้นใช้ในการศึกษาคือ 0, 5, 10, 15, 20 และ 25 ไมโครกรัม/ลิตร

สัตว์ทดลอง

ในการศึกษานี้ใช้น้ำหอยเชอรี่ (*P. Canaliculata*) ขนาดโตเต็มวัยที่มีความยาวเฉลี่ย 4.6 ± 0.5 เซนติเมตร และน้ำหนักเฉลี่ย 24.11 ± 0.23 กรัม มาปรับสภาพในโหลแก้วทดลอง ขนาด 10 ลิตร เติมสาร

คลอรีโฟสเฟสมกับไซเพอร์เมทรินลงในโหลระดับความเข้มข้นใช้ในการศึกษาคือ 5, 10, 15, 20 และ 25 ไมโครกรัม/ลิตร เปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม ทำการเก็บตัวอย่างเป็นเวลา 24, 48, 72 และ 96 ชั่วโมง

การศึกษาพฤติกรรมของหอยเชอรี่ที่ได้รับสัมผัสสารคลอรีโฟสเฟสมกับไซเพอร์เมทริน

ทำการศึกษาถึงพฤติกรรมของหอยเชอรี่เมื่อได้รับสัมผัสกับสารเคมี โดยดูจากการแสดงออกของพฤติกรรมต่าง ๆ ในหอยเชอรี่ชุดควบคุมเปรียบเทียบกับหอยเชอรี่ที่สัมผัสสารคลอรีโฟสเฟสมกับไซเพอร์เมทรินที่ระดับความเข้มข้น 5, 10, 15, 20 และ 25 ไมโครกรัม/ลิตร ที่เวลา 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 24, 48, 72 และ 96 ชั่วโมง ส่วนสัณฐานวิทยาภายนอกของหอยเชอรี่เมื่อได้รับสัมผัสกับสารทำการศึกษาคือสีและเปลือก และสัณฐานวิทยาภายในทำการศึกษาคือเนื้อเยื่อของหอยเชอรี่เมื่อได้รับสัมผัสกับสารคลอรีโฟสเฟสมกับไซเพอร์เมทรินที่ระดับความเข้มข้นที่ 0 (ชุดควบคุม), 5, 10, 15, 20 และ 25 ไมโครกรัม/ลิตร ในเวลา 24, 48, 72 และ 96 ชั่วโมง

การสกัดโปรตีนจากหอยเชอรี่

นำหอยเชอรี่ที่ได้รับสัมผัสกับสารคลอรีโฟสเฟสมกับไซเพอร์เมทริน และชุดควบคุม มาสกัดโปรตีนโดยดัดแปลงจากจากวิธีการของ Thanomsit et al. [6] โดยนำหอยเชอรี่มาล้างให้สะอาด หลังจากนั้นทำการแกะเปลือก และนำเฉพาะบริเวณส่วนเท้ามาบดให้ละเอียดและเติมน้ำสารละลายทริสไฮโดรคลอไรด์บัฟเฟอร์ที่มีความเข้มข้น 0.02 โมลาร์ pH 7.2 ซึ่งมีสารละลาย Phenylmethylsulfonyl fluoride (PMSF) เป็นส่วนประกอบ โดยอัตราส่วนที่ใช้คือเนื้อเยื่อ 1 กรัมต่อฟอสเฟตบัฟเฟอร์ 2.5 มิลลิกรัม หลังจากนั้นนำไปปั่นเหวี่ยงที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ความเร็ว 3,500 RPM เป็นเวลา 1 ชั่วโมง นำส่วนใสมาใช้ในการวิเคราะห์ปริมาณโปรตีนเปรียบเทียบกับ Bovine serum albumin (BSA)

การวัดปริมาณโปรตีนจากหอยเชอรี่

นำโปรตีนมาตรฐาน BSA มาเจือจางแบบ Serial dilution ให้มีปริมาณโปรตีน 1, 0.5, 0.25, 0.0625 และ 0.03125 มิลลิกรัม ในปริมาณ 0.5 มิลลิกรัม จากนั้นนำตัวอย่างโปรตีนที่สกัดได้จากหอยเชอรี่มาเจือจางด้วยน้ำกลั่นในอัตราส่วน 1:10 นำสารละลาย BSA และตัวอย่างโปรตีนจากหอยเชอรี่ตัวอย่างละ 10 ไมโครกรัม จำนวน 2 ซ้ำ เติมน้ำสารละลาย Dye reagent เจือจางที่ปริมาตร 200 ไมโครกรัม ทุกหลุม ผสมให้เข้ากัน ตั้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 5 นาที นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 595 นาโนเมตร บันทึกค่าการดูดกลืนแสงของสารละลาย BSA ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ นำมาสร้างกราฟมาตรฐานระหว่างปริมาณ BSA กับค่าการดูดกลืนแสง และนำค่าการดูดกลืนแสงของตัวอย่างมาเปรียบเทียบกับโปรตีนจากกราฟมาตรฐาน ตามวิธีการของ Thanomsit et al. [10] นำปริมาณโปรตีนที่ได้มาใช้ในการคำนวณความเข้มข้นของโปรตีนเพื่อศึกษารูปแบบของโปรตีนที่พบในหอยเชอรี่โดยใช้เทคนิคโซเดียมโดดีซิลซัลเฟต เจลอิเล็กโทรโฟรีซิสหรือเทคนิคคอตทอลล์ต่อไป

การศึกษาารูปแบบของโปรตีนที่พบในหอยเชอร์โดยใช้เทคนิค โยเดียมไดโอดีคริลซัลเฟต เจลอิเล็กโทรโฟรีซิส

เตรียมส่วนผสมของสารละลายอะคริลามิด (Acrylamide) ให้ Separating gel มีความเข้มข้น 12.5% และเตรียมส่วนผสม Stacking gel 4% ตามวิธีการของ Thanomsit et al. [10] จากนั้นประกอบเจลลงในชุดอิเล็กโทรโฟรีซิส เติมสารละลาย 2x buffer ให้ท่วมช่องเติมตัวอย่าง ตั้งหรือออกแล้วเติมตัวอย่างที่ผสมกับ 2x buffer และต้มในน้ำเดือด 5 นาทีแล้ว มาใส่ในช่องเติมตัวอย่างแต่ละช่องในปริมาณ 10 ไมโครลิตร (ปริมาณโปรตีนเท่ากับ 80 ไมโครกรัม) ต่ออุปกรณ์จ่ายไฟตั้งกระแสไฟฟ้าที่ 120 โวลต์ จนกระทั่งสังเกตเห็นสีของ Bromophenol blue เคลื่อนที่ลงจนเกือบถึงปลายสุดของแผ่นเจล จึงหยุดกระแสไฟฟ้า จากนั้นนำแผ่นเจลออกจากชุดกระแสจก ตัดส่วนที่เป็น Stacking gel ออก แล้วนำไปย้อมสี 0.1 % Coomassie brilliant blue R-250 เป็นเวลา 2 ชั่วโมง แล้วล้างสีส่วนที่ไม่ต้องการออกด้วยสารละลาย Destaining solution I และ Destaining solution II จนกระทั่งเห็นแถบสีของโปรตีนชัดเจน

การศึกษาแสดงออกของอะซิติลโคลีนเอสเตอเรสด้วยเทคนิค ดอทบลอต

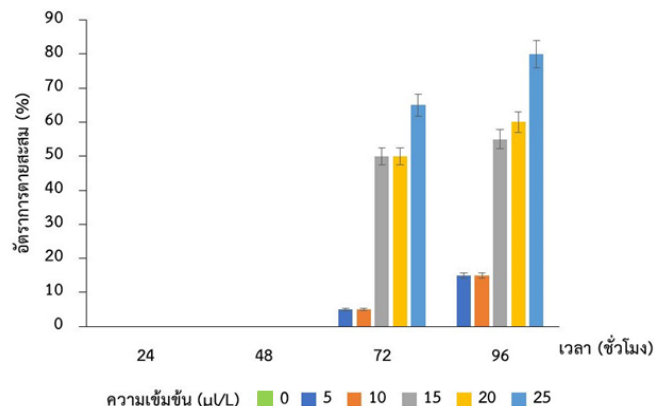
เตรียมตัวอย่างให้มีความเข้มข้นของโปรตีนเท่ากับ 40, 20, 10, 5, 2.5, 1.25, 0.625, 0.312, 0.156 และ 0.078 ไมโครกรัม/ไมโครลิตร หยดตัวอย่าง 1 ไมโครลิตร ลงบนกระดาษไนโตรเซลลูโลส ที่ไว้ให้แห้งที่อุณหภูมิห้อง จากนั้นนำมาแช่ใน 5% นมพร่องมันเนยใน PBS (Phosphate buffer saline) เป็นเวลา 1 ชั่วโมง แล้วล้างออกด้วย PBS/0.59% Tween 20 ครั้งละ 5 นาที 3 ครั้ง จากนั้นบ่มในแอนติบอดีที่จำเพาะต่ออะซิติลโคลีนเอสเตอเรส (PAb-AChE ระดับการเจือจาง 1:200) นาน 12 ชั่วโมง แล้วล้างออกด้วย PBS/0.59% Tween 20 ครั้งละ 5 นาที 3 ครั้ง นำกระดาษไนโตรเซลลูโลสไปแช่ใน Secondary antibody (GAR-HRP) ที่ระดับการเจือจาง 1:1,000 เป็นเวลา 3 ชั่วโมง แล้วนำไปล้างโปรตีนส่วนเกินออกด้วยสารละลาย PBS/0.596Tween 20 ครั้งละ 5 นาที 3 ครั้ง และนำกระดาษไนโตรเซลลูโลสมาทำให้เกิดปฏิกิริยาในสารละลายสับสเตรท (0.03% 3, 3'-Diaminobenzidine tetrahydrochloride (DAB), 0.06% H₂O₂ และ 0.05% COCl₂ ใน 0.15 M PBS, pH = 7.4) และ บันทึกผลของจุดโปรตีนสีน้ำตาลเทาที่เกิดขึ้นบนกระดาษไนโตรเซลลูโลส [11]

3. ผลการทดลอง

ผลการศึกษาระดับความเป็นพิษของหอยเชอร์ที่ได้รับสัมผัสกับสาร คลอร์ไพริฟอสผสมกับไซเพอร์เมทริน

เมื่อทำการศึกษาถึงอัตราการตายสะสมในหอยเชอร์ที่ได้รับสัมผัสกับสารคลอร์ไพริฟอสผสมกับไซเพอร์เมทรินที่ระดับความเข้มข้น 0 (ชุดควบคุม), 5, 10, 15, 20 และ 25 ไมโครลิตร/ลิตร เป็นเวลา 24, 48, 72 และ 96 ชั่วโมง โดยหอยเชอร์ที่ตายสังเกตได้จากแผ่นฝาเปลือกที่เปิดและหอยเชอร์จะลอยตัวขึ้นสู่ผิวน้ำ พบว่าอัตราการตายสะสมของหอยเชอร์ที่ได้รับสัมผัสกับสารคลอร์ไพริฟอสผสมกับไซเพอร์เมทรินเพิ่มขึ้นตามระดับความเข้มข้นที่ได้รับสัมผัส โดยตลอดช่วงเวลาการศึกษาคือ 24, 48, 72 และ 96 ชั่วโมง หอยเชอร์ในชุดควบคุมไม่เกิดการตาย แต่พบการตายครั้งแรกเมื่อหอยเชอร์ได้รับสัมผัสสารเมื่อเวลาเข้าสู่ 72 ชั่วโมง ที่ระดับความเข้มข้น 5, 10, 15, 20 และ 25

ไมโครลิตร/ลิตร มีอัตราการตายสะสมเท่ากับ 5±0.70%, 5±0.70%, 50±0.0%, 50±2.28%, และ 70±0.70% และที่เวลา 96 ชั่วโมงที่ระดับความเข้มข้น 5, 10, 15, 20 และ 25 ไมโครลิตร/ลิตร อัตราการตายสะสมเท่ากับ 15±0.70%, 15±0.70%, 55±0.70%, 60±1.41%, และ 80±1.41% ตามลำดับ (ภาพที่ 1)



ภาพที่ 1 แสดงอัตราการตายสะสมของหอยเชอร์ที่ได้รับสัมผัสสาร คลอร์ไพริฟอสผสมกับไซเพอร์เมทริน ที่ระดับความเข้มข้น 5, 10, 15, 20 และ 25 ไมโครลิตร/ลิตร เป็นเวลา 24, 48, 72 และ 96 ชั่วโมง

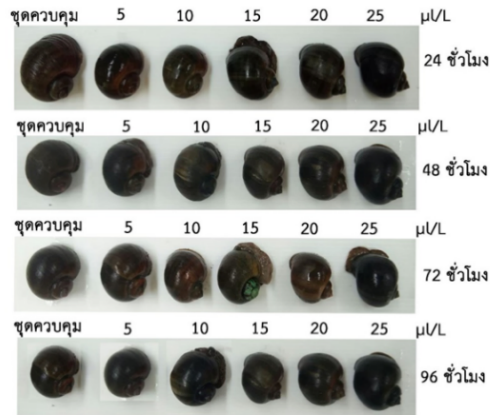
ผลศึกษาพฤติกรรมของหอยเชอร์เมื่อได้รับสัมผัสสารคลอร์ไพริฟอส ผสมกับไซเพอร์เมทริน

การศึกษาพฤติกรรมของหอยเชอร์เมื่อได้รับสัมผัสสารคลอร์ไพริฟอส ผสมกับไซเพอร์เมทรินจะประเมินจากหอยเชอร์ที่ได้รับสัมผัสสารเป็น เวลา 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 24, 48, 72 และ 96 ชั่วโมง ที่ระดับความเข้มข้น 5, 10, 15, 20 และ 25 ไมโครลิตร/ลิตร เปรียบเทียบกับกลุ่ม ควบคุม โดยพฤติกรรมที่เปลี่ยนแปลงไปของหอยเชอร์จะเพิ่มมากขึ้น เมื่อได้รับสัมผัสกับสารเป็นเวลานานมากขึ้นและระดับความเข้มข้นของ สารที่เพิ่มขึ้น ซึ่งการเปลี่ยนแปลงพฤติกรรมจะเกิดขึ้นครั้งแรกเมื่อหอย เชอร์ได้รับสัมผัสสารเป็นเวลา 1 ชั่วโมงที่ระดับความเข้มข้น 10 ไมโครลิตร/ลิตร ซึ่งการเปลี่ยนแปลงที่สังเกตพบคือ หอยเชอร์มีการ ขับถ่าย และปล่อยสารเมือกมากกว่าในชุดควบคุม สังเกตได้จากความ ขุ่น เป็นฟองของน้ำและสิ่งขับถ่ายที่อยู่ในน้ำที่เลี้ยง และหอยเชอร์มี การเคลื่อนไหวตัวเล็กน้อยโดยเกาะตามไหลทดสอบ ส่วนการเปลี่ยนแปลง สูงสุดจะเกิดขึ้นเมื่อหอยเชอร์ได้รับสัมผัสกับสารที่ระดับความเข้มข้น 25 ไมโครลิตร/ลิตร เป็นเวลา 96 ชั่วโมง

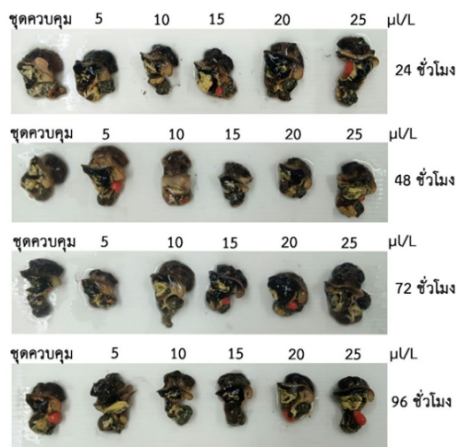
ผลศึกษาลักษณะสัณฐานวิทยาภายนอกและภายในของหอยเชอร์

เมื่อทำการศึกษาถึงลักษณะสัณฐานวิทยาภายนอกของหอยเชอร์ที่ ได้รับสัมผัสสารคลอร์ไพริฟอสผสมกับไซเพอร์เมทรินที่เวลา 24, 48, 72 และ 96 ชั่วโมง และความเข้มข้นที่ศึกษาคือ 0, 5, 10, 15, 20, และ 25 ไมโครลิตร/ลิตร พบว่าหอยเชอร์ไม่มีการเปลี่ยนแปลงลักษณะ สัณฐานวิทยาภายนอกโดยมีสีและเปลือกเป็นปกติคือสีน้ำตาลดำ ภาพ ที่ 2 แสดงให้เห็นถึงลักษณะสัณฐานวิทยาภายนอกของหอยเชอร์เมื่อ ได้รับสัมผัสสารคลอร์ไพริฟอสผสมกับไซเพอร์เมทรินและเมื่อ ทำการศึกษาถึงลักษณะสัณฐานวิทยาภายในของหอยเชอร์ที่ได้รับ สัมผัสสารคลอร์ไพริฟอสผสมกับไซเพอร์เมทรินที่เวลา 24, 48, 72 และ 96 ชั่วโมง และความเข้มข้นที่ศึกษาคือ 0, 5, 10, 15, 20, และ

25 ไมโครลิตร/ลิตร พบว่าหอยเชอรี่มีการเปลี่ยนแปลงลักษณะสัณฐานวิทยาภายในเกิดขึ้นครั้งแรกที่ความเข้มข้น 25 ไมโครลิตร/ลิตร ที่เวลา 24 ชั่วโมง โดยมีเนื้อเยื่อเปื่อยยุ่ย ดังภาพที่ 3 แสดงให้เห็นถึงลักษณะสัณฐานวิทยาภายในของหอยเชอรี่ของหอยเชอรี่เมื่อได้รับสัมผัสสารคลอรีไพรีฟอสผสมกับไซเพอร์เมทริน



ภาพที่ 2 ลักษณะสัณฐานวิทยาภายนอกของหอยเชอรี่ที่ได้รับสัมผัสสารคลอรีไพรีฟอสผสมกับไซเพอร์เมทรินความเข้มข้นที่ศึกษา คือ 0 (ชุดควบคุม), 5, 10, 15, 20 และ 25 ไมโครลิตร/ลิตร ที่เวลา 24, 48, 72 และ 96 ชั่วโมง

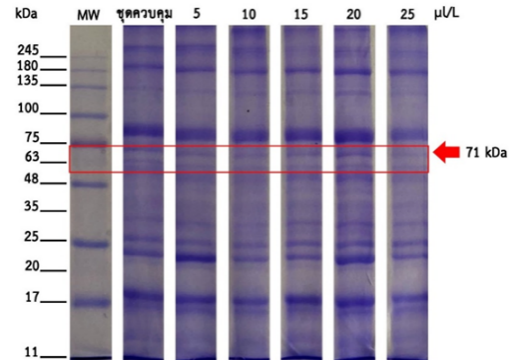


ภาพที่ 3 ลักษณะสัณฐานวิทยาภายในของหอยเชอรี่ที่ได้รับสัมผัสสารคลอรีไพรีฟอสผสมกับไซเพอร์เมทรินที่ระดับความเข้มข้นที่ศึกษา คือ 0 (ชุดควบคุม), 5, 10, 15, 20 และ 25 ไมโครลิตร/ลิตร ที่เวลา 24, 48, 72 และ 96 ชั่วโมง

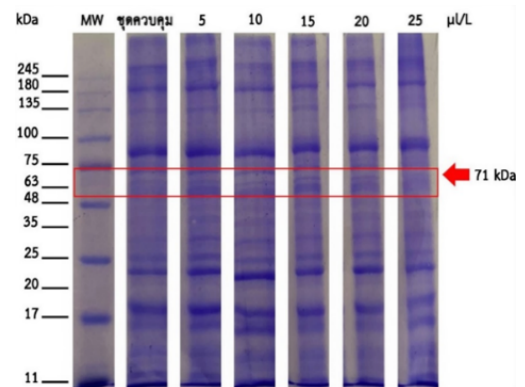
ผลการศึกษารูปแบบของโปรตีนที่พบในหอยเชอรี่โดยใช้เทคนิค โยเดียมไดดีคริลซัลเฟต เจลอิเล็กโทรโฟรีซิส

10% SDS-PAGE ถูกนำมาใช้ในการศึกษาถึงรูปแบบของโปรตีนที่พบในเนื้อเยื่อของหอยเชอรี่ที่ได้รับสัมผัสกับสารคลอรีไพรีฟอสผสมกับไซเพอร์เมทรินที่ระดับความเข้มข้นและเวลาต่าง ๆ โดยรูปแบบของโปรตีนที่พบจะเปลี่ยนไปตามระดับความเข้มข้น และเวลาที่ทำการศึกษาในเนื้อเยื่อหอยเชอรี่ ที่ระดับความเข้มข้นที่ศึกษา คือ 0, 5, 10, 15, 20 และ 25 ไมโครลิตร/ลิตร เป็นเวลา 24 ชั่วโมง อะซีทิลโคลีนเอสเตอเรสจะสามารถตรวจสอบได้โดยมีขนาดโมเลกุล 71 kDa

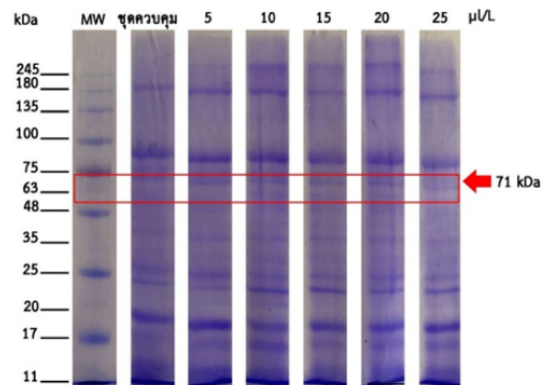
แต่เมื่อเวลาผ่านไปเป็น 48 ชั่วโมง จะมีแนวโน้มลดลง สุดท้ายที่เวลา 96 ชั่วโมง จะไม่พบการแสดงออกของอะซีทิลโคลีนเอสเตอเรส (แสดงดังภาพที่ 4, 5, 6 และ 7)



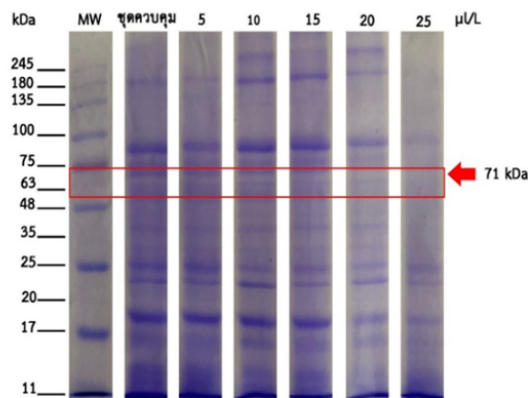
ภาพที่ 4 การใช้เทคนิค 10% SDS-PAGE ศึกษาถึงรูปแบบของโปรตีนจากเนื้อเยื่อหอยเชอรี่ที่ได้รับสัมผัสกับสารคลอรีไพรีฟอสผสมกับไซเพอร์เมทรินที่ระดับความเข้มข้น 0 (ชุดควบคุม), 5, 10, 15, 20 และ 25 ไมโครลิตร/ลิตร ที่เวลา 24 ชั่วโมง



ภาพที่ 5 การใช้เทคนิค 10% SDS-PAGE ศึกษาถึงรูปแบบของโปรตีนจากเนื้อเยื่อหอยเชอรี่ที่ได้รับ สัมผัสกับสารคลอรีไพรีฟอสผสมกับไซเพอร์เมทรินที่ระดับความเข้มข้น 0 (ชุดควบคุม), 5, 10, 15, 20 และ 25 ไมโครลิตร/ลิตร ที่เวลา 48 ชั่วโมง



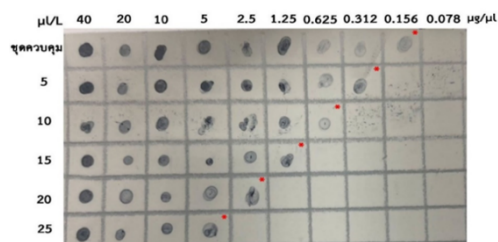
ภาพที่ 6 การใช้เทคนิค 10% SDS-PAGE ศึกษาถึงรูปแบบของโปรตีนจากเนื้อเยื่อหอยเชอรี่ที่ได้รับสัมผัสกับสารคลอรีไพรีฟอสผสมกับไซเพอร์เมทรินที่ระดับความเข้มข้น 0, 5, 10, 15, 20 และ 25 ไมโครลิตร/ลิตร ที่เวลา 72 ชั่วโมง



ภาพที่ 7 การใช้เทคนิค 10% SDS-PAGE ศึกษาถึงรูปแบบของโปรตีนจากเนื้อเยื่อหอยเชอร์รี่ที่ได้รับสัมผัสกับสารคลอร์ไพริฟอสผสมกับไซเพอร์เมทรินที่ระดับความเข้มข้น คือ 0 (ขูดควมคุม), 5, 10, 15, 20 และ 25 ไมโครลิตร/ลิตร ที่เวลา 96 ชั่วโมง

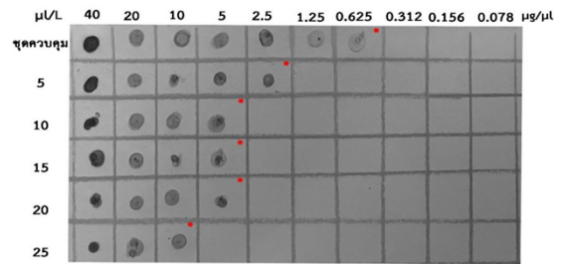
ผลการศึกษาการแสดงออกของอะซิติลโคลีนเอสเทอเรสด้วยเทคนิคคอตบล็อต

ในเนื้อเยื่อของหอยเชอร์รี่ที่ได้รับสัมผัสกับสารคลอร์ไพริฟอสผสมกับไซเพอร์เมทรินที่ระดับความเข้มข้น คือ 0 (ขูดควมคุม), 5, 10, 15, 20 และ 25 ไมโครลิตร/ลิตร ที่เวลา 24 ชั่วโมง เมื่อศึกษาการแสดงออกของอะซิติลโคลีนเอสเทอเรสด้วยเทคนิคคอตบล็อตหมีขีดจำกัดการตรวจสอบคือ 0.156, 0.312, 0.625, 0.125, 2.5 และ 5 ไมโครลิตร/ลิตร (ดังภาพที่ 8)



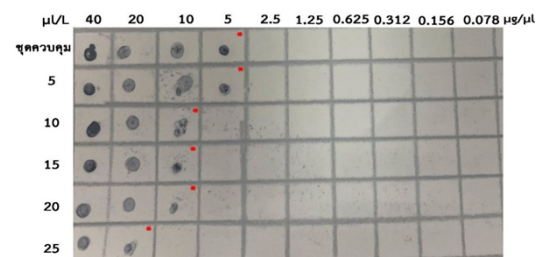
ภาพที่ 8 การตรวจสอบค่าของอะซิติลโคลีนเอสเทอเรสด้วยเทคนิคคอตบล็อตในเนื้อเยื่อหอยเชอร์รี่ที่ได้รับสัมผัสสารความเข้มข้น 0 (ขูดควมคุม), 5, 10, 15, 20 และ 25 ไมโครลิตร/ลิตร ที่เวลา 24 ชั่วโมง

ในเนื้อเยื่อของหอยเชอร์รี่ที่ได้รับสัมผัสกับสารคลอร์ไพริฟอสผสมกับไซเพอร์เมทรินที่ระดับความเข้มข้น คือ 0, 5, 10, 15, 20 และ 25 ไมโครลิตร/ลิตร ที่เวลา 48 ชั่วโมง เมื่อศึกษาการแสดงออกของอะซิติลโคลีนเอสเทอเรสด้วยเทคนิคคอตบล็อตหมีขีดจำกัดการตรวจสอบคือ 0.625, 2.5, 5, 5, 5 และ 10 ไมโครกรัม/ไมโครลิตร (ดังภาพที่ 9)

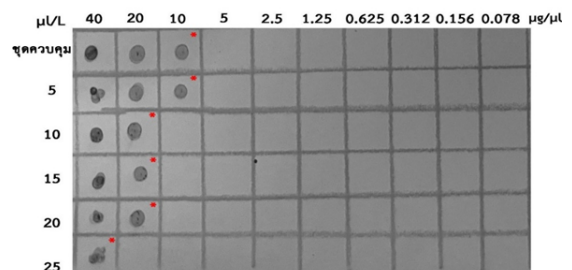


ภาพที่ 9 การตรวจสอบค่าของอะซิติลโคลีนเอสเทอเรสด้วยเทคนิคคอตบล็อตในเนื้อเยื่อหอยเชอร์รี่ที่ได้รับสัมผัสสารความเข้มข้น 0 (ขูดควมคุม), 5, 10, 15, 20 และ 25 ไมโครลิตร/ลิตร ที่เวลา 48 ชั่วโมง

ในเนื้อเยื่อของหอยเชอร์รี่ที่ได้รับสัมผัสกับสารคลอร์ไพริฟอสผสมกับไซเพอร์เมทรินที่ระดับความเข้มข้น คือ 0 (ขูดควมคุม), 5, 10, 15, 20 และ 25 ไมโครลิตร/ลิตร ที่เวลา 72 ชั่วโมง เมื่อศึกษาการแสดงออกของอะซิติลโคลีนเอสเทอเรสด้วยเทคนิคคอตบล็อตหมีขีดจำกัดการตรวจสอบคือ 5, 5, 10, 10, 10 และ 20 ไมโครกรัม/ไมโครลิตร (ดังภาพที่ 10)



ภาพที่ 10 การตรวจสอบค่าของอะซิติลโคลีนเอสเทอเรสด้วยเทคนิคคอตบล็อต ในเนื้อเยื่อหอยเชอร์รี่ที่ได้รับสัมผัสสารความเข้มข้น 0 (ขูดควมคุม), 5, 10, 15, 20 และ 25 ไมโครลิตร/ลิตร ที่เวลา 72 ชั่วโมง ในเนื้อเยื่อของหอยเชอร์รี่ที่ได้รับสัมผัสกับสารคลอร์ไพริฟอสผสมกับไซเพอร์เมทรินที่ระดับความเข้มข้น คือ 0 (ขูดควมคุม), 5, 10, 15, 20 และ 25 ไมโครลิตร/ลิตร ที่เวลา 96 ชั่วโมง เมื่อศึกษาการแสดงออกของอะซิติลโคลีนเอสเทอเรสด้วยเทคนิคคอตบล็อตหมีขีดจำกัดการตรวจสอบคือ 10, 10, 20, 20, 20 และ 40 ไมโครกรัม/ไมโครลิตร (ดังภาพที่ 11)



ภาพที่ 11 การตรวจสอบค่าของอะซิติลโคลีนเอสเทอเรสด้วยเทคนิคคอตบล็อต ในเนื้อเยื่อหอยเชอร์รี่ที่ได้รับสัมผัสสารความเข้มข้น 0 (ขูดควมคุม), 5, 10, 15, 20 และ 25 ไมโครลิตร/ลิตร ที่เวลา 96 ชั่วโมง

4. อภิปรายผลการทดลอง

จากผลการศึกษาดังกล่าวผลกระทบของคลอรีนฟอสฟอสมกับไซเปอร์เมทริน (สารกำจัดแมลง) ต่อการเปลี่ยนแปลงสัณฐานวิทยาและการแสดงออกของอะซิติลโคลีนเอสเตอเรสในหอยเชอรี่ พบว่าอัตราการตายสะสมในหอยเชอรี่ที่ได้รับสัมผัสกับสารคลอรีนฟอสฟอสมกับไซเปอร์เมทรินเพิ่มขึ้นตามระยะเวลาและระดับความเข้มข้นที่ได้รับสัมผัส ซึ่งอัตราการตายพบครั้งแรกเมื่อเวลาเข้าสู่ 72 ชั่วโมง โดยที่ระดับความเข้มข้นสูงสุดคือ 25 ไมโครลิตร/ลิตร มีอัตราการตายเท่ากับ $70 \pm 0.70\%$ และที่เวลา 96 ชั่วโมง ที่ระดับความเข้มข้น 25 ไมโครลิตร/ลิตร มีอัตราการตายสะสมเท่ากับ $80 \pm 1.41\%$ ตามลำดับ ซึ่งความเป็นพิษและอัตราการตายสะสมของหอยเชอรี่จากการทดลองนี้ที่เพิ่มขึ้นตามระยะเวลาและระดับความเข้มข้นนี้ให้ผลเช่นเดียวกับการศึกษาความเป็นพิษของแคดเมียมคลอไรด์ (CdCl_2) ต่อการตายของหอยเชอรี่ พบว่าความเป็นพิษและอัตราการตายของหอยเชอรี่จะเพิ่มตามระดับความเข้มข้นที่ได้รับสัมผัส [12] โดย Caguan และ Joshi [9] ได้รายงานว่าสารเคมีกำจัดศัตรูพืชที่เป็นส่วนผสมของคลอรีนฟอสฟอสมกับไซเปอร์เมทรินจะทำให้เกิดความเป็นพิษต่อหอยเชอรี่มากกว่าสารเคมีกำจัดศัตรูพืชที่มีสารเคมีเพียงกลุ่มเดียว และจากการศึกษาของคณะผู้วิจัยก่อนหน้านี้ซึ่งอยู่ในระหว่างตีพิมพ์พบว่าค่า LC_{50} ของคลอรีนฟอสฟอสมในหอยเชอรี่ ที่เวลา 96 ชั่วโมง เท่ากับ 4.22 มิลลิตรต่อลิตร ส่วนค่า LC_{50} ของไซเปอร์เมทริน ที่ 96 ชั่วโมง เท่ากับ 8.99 มิลลิตรต่อลิตร ซึ่ง Walker et al. [13] อธิบายไว้ว่าปัจจัยที่ควบคุมระดับความเป็นพิษของสิ่งมีชีวิตคือ ระยะเวลา เส้นทางการได้รับสัมผัส และระดับความเข้มข้นของสาร และจากการศึกษาของ Thanomsit et al. [14] ที่ได้ทำการศึกษาถึงความเป็นพิษและอัตราการตายสะสมของปลาไนเมื่อได้รับสัมผัสสารคลอรีนฟอสฟอสมกับไซเปอร์เมทริน ซึ่งจากการศึกษาพบว่า การตายครั้งแรกเกิดขึ้นเมื่อปลาไนได้รับสัมผัสสารทุกระดับความเข้มข้นเมื่อเวลาผ่านไป 24 ชั่วโมง และอัตราการตายสะสมจะเพิ่มขึ้นตามระยะเวลาและระดับความเข้มข้นที่เพิ่มขึ้น ซึ่งแตกต่างจากการศึกษาในหอยทากน้ำจืด (*Melanoides tuberculatus*) ซึ่งค่า LC_{50} ที่ 96 ชั่วโมงของการสัมผัสกับไซเปอร์เมทรินเท่ากับ 3.81 มิลลิตรต่อลิตร และในหอยหวาน (*Marcia Opima*) ซึ่งพบว่าค่า LC_{50} ของไซเปอร์เมทรินเท่ากับ 2.75 ppm [7,8] โดยอาจมาจากความแตกต่างของหอยแต่ละชนิด และรูปแบบต่าง ๆ ของไซเปอร์เมทรินที่ใช้

จากการศึกษาพฤติกรรมของหอยเชอรี่พบว่าหอยเชอรี่ในกลุ่มที่ได้รับสัมผัสสารคลอรีไพรีฟอสผสมกับไซเพอร์เมทรินมีพฤติกรรมที่เปลี่ยนแปลงไปจากกลุ่มควบคุมอย่างชัดเจน การเปลี่ยนแปลงที่ตรวจสอบได้คือ หอยเชอรี่มีการขับถ่ายของเสีย ปล่อยสารเมือก คั่ว ตัวหยาบตัวยุบกันไหลทลลงและเคลื่อนตัวเล็กน้อย ซึ่งการศึกษาในครั้งนี้คล้ายคลึงกับการศึกษาของกอบกุล [15] ที่รายงานว่าพิษเฉียบพลันของสารสกัดจากใบสาบเสือผกากรองต่อหอยเชอรี่จะส่งผลให้การแสดงพฤติกรรมคล้าย ๆ กัน คือ ในช่วงแรกหอยจะปิดฝาเปลือกและปล่อยตัวให้ลอยสู่ผิวน้ำจากนั้นจะค่อย ๆ เปิดฝาเปลือกแล้วยื่นส่วนเท้าออกมาและเคลื่อนที่ เมื่อเวลาผ่านไปจะเริ่มคลานขึ้นสู่ผิวน้ำเพื่อหนีจากน้ำ จากนั้นเมื่อครบบระยะเวลา 24 ชั่วโมงและ 48 ชั่วโมง หอยเชอรี่บางตัวจะปิดฝาเปลือกแน่นสนิทลอยอยู่บนผิวน้ำ ในขณะที่บางตัวจะปิดฝาเปลือกแน่นสนิทแล้วจมอยู่ก้นภาชนะพร้อมทั้งปล่อยสารเมือกออกมาและตายในที่สุด

สันฐานวิทยาเป็นการศึกษาโครงสร้างของสัตว์และวิวิฒนาการ
 ในการศึกษาครั้งนี้ได้นำวิธีการประเมินถึงสันฐานวิทยาที่เปลี่ยนแปลง
 ไปของหอยเชอร์รี่ที่ได้รับสัมผัสสารคลอรีไพรีฟอสผสมกับไซเพอร์
 เมทรินมาประยุกต์ใช้ในการตรวจสอบเพื่อให้ทราบถึงผลกระทบที่เกิด
 อย่างแท้จริงโดยประเมินทั้งลักษณะภายนอกและภายในโดยเมื่อ
 ทำการศึกษาพบว่าลักษณะภายนอกของหอยเชอร์รี่ที่ตรวจสอบเมื่อ
 ได้รับสัมผัสสารคลอรีไพรีฟอสผสมกับไซเพอร์เมทรินพบว่าหอยเชอร์รี่มี
 ลักษณะสันฐานวิทยาภายนอกที่ไม่เปลี่ยนแปลง คือ มีสีและเปลือกที่
 ปกติ ซึ่งการศึกษารุ่นนี้แตกต่างกับการศึกษาของชุดิมา และคณะ
 [16] ที่รายงานว่าไซหอยเชอร์รี่หลังสัมผัสกับสารเคมีทางการเกษตร
 พบว่าการเปลี่ยนแปลงรูปร่างของไซหอยเชอร์รี่จำแนกได้ 5 กลุ่ม คือ
 ลักษณะไข่มดปกติ เปลือกไข่มดปกติและตัวอ่อนผิดปกติ และยัง
 แตกต่างกับการศึกษาของน้ำทิพย์ และคณะ [12] ที่ทำการศึกษา
 สันฐานวิทยาของไซหอยเชอร์รี่หลังจากสัมผัสกับแคดเมียมคลอไรด์
 พบว่าการเปลี่ยนแปลงรูปร่างของไซและลักษณะของไซที่ปกติ
 จะเพิ่มขึ้นตามระดับความเข้มข้นของแคดเมียมคลอไรด์ที่ไซได้รับการ
 สัมผัส

เมื่อทำการศึกษาลักษณะสัณฐานวิทยาภายในของหอยเชอรี โดยตรวจสอบจากเนื้อเยื่อ พบว่าเนื้อเยื่อของหอยเชอรีได้รับสัมผัสสาร มีการเปลี่ยนแปลงไปจากกลุ่มควบคุมโดย พบว่า เนื้อเยื่อของหอยเชอรีได้รับสัมผัสสารมีลักษณะเนื้อเปื่อยยุ่ย ซึ่งในการศึกษครั้งนี้เป็นไปในแนวเดียวกันกับการศึกษาของ ชูติมา และคณะ [16] ที่รายงานว่า ลักษณะสัณฐานวิทยาภายในของไขหอยเชอรีหลังสัมผัสกับสารเคมีทางการเกษตรคือ โกลโฟเสท ไฮเปอร์เมทริน และเมทิลดีไฮด์ พบว่าเนื้อเยื่อของหอยเชอรีเปื่อยยุ่ย และเกิดการเชื่อมกันของเซลล์เนื้อเยื่อ และการศึกษากันนี้เป็นไปในแนวเดียวกันกับการศึกษาสัตว์น้ำชนิดอื่นที่พบว่าสารกำจัดแมลงศัตรูพืชส่งผลต่อการเปลี่ยนแปลงสัณฐานวิทยาภายใน ยกตัวอย่างเช่น ในการศึกษาของ ชูติมา และคณะ [17] ที่ทำการศึกษาผลกระทบของสารกำจัดแมลงศัตรูพืชคลอร์ไพริฟอสในปูนา พบว่า ลักษณะสัณฐานวิทยาของปูนาเมื่อได้รับสัมผัสกับคลอร์ไพริฟอสซึ่งระดับความเข้มข้นและระยะเวลามีผลต่อการเปลี่ยนแปลงเมียบเปรียบเทียบับชุดควบคุม โดยการเปลี่ยนแปลงที่ตรวจสอบคือเนื้อเยื่อบริเวณเหงือกเปลี่ยนแปลงเป็นสีขาว เนื้อเยื่อถูกทำลายไปเหงือกขาด และ Hepatopancreas จะมีสีเข้มขึ้น แต่เมื่อได้รับสัมผัสที่ความเข้มข้นสูงสุด คือ 10 ppm Hepatopancreas จะเปื่อยยุ่ย ซึ่งสาเหตุของการศึกษาในครั้งนี้แตกต่างกันอาจเนื่องมาจากชนิดของสัตว์ทดลอง และชนิดของสารที่นำมาทดลองแตกต่าง

การศึกษาารูปแบบของโปรตีนที่พบในหอยเชอร์รี่ด้วยเทคนิคโซเดียมโดดีลซัลเฟต เจลอิเล็กโทรโฟริซิส โดยพิจารณาการแสดงออกของอะซิติลโคลีนเอสเทอเรส ซึ่งเป็นเอนไซม์ที่ทำหน้าที่เปลี่ยนอะซิติลโคลีน (สารสื่อประสาท) ไปเป็นโคลีนและอะซีเตท เมื่อเอนไซม์อะซิติลโคลีนเอสเทอเรสไม่สามารถทำหน้าที่ได้ จะทำให้เกิดการคั่งของอะซิติลโคลีน ซึ่งการคั่งของสารดังกล่าวจะมีผลต่อระบบประสาทส่วนกลางและส่วนปลายทำให้เกิดการกระตุกของกล้ามเนื้อ [6,10,13] ด้วยเหตุนี้จึงมีการตรวจประเมินการรับสัมผัสสารกำจัดศัตรูพืชด้วยการตรวจวัดการทำงานของเอนไซม์อะซิติลโคลีนเอสเทอเรสโดยตรง ซึ่งสามารถนำมาใช้เป็นตัวชี้วัดทางชีวภาพของการรับสัมผัส (Biomarker of exposure) จากการสัมผัสสารกำจัดศัตรูพืชได้ โดยหากได้รับ สารดังกล่าวเป็นเวลานานและมีปริมาณมากจะพบว่า

อะซีทิลโคลีนเอสเทอร์จะถูกทำลายและที่สำคัญเนื้อเยื่อจะเกิดการเปลี่ยนแปลงด้วย ในการศึกษาครั้งนี้พบว่าอะซีทิลโคลีนเอสเทอร์ในหอยเชอร์รี่จากเนื้อเยื่อทุกระดับความเข้มข้นที่ศึกษา ตั้งแต่เวลา 24 ชั่วโมง สามารถตรวจสอบอะซีทิลโคลีนเอสเทอร์ได้ โดยมีขนาดโมเลกุล 71 kDa แต่เมื่อเวลาผ่านไปเป็น 48 ชั่วโมง จะมีแนวโน้มลดลงสุดท้ายที่เวลา 96 ชั่วโมง จะไม่พบการแสดงออกของอะซีทิลโคลีนเอสเทอร์ ซึ่งเป็นไปในแนวเดียวกันกับการศึกษาของ ชูติมา และคณะ [6] ศึกษาถึงอะซีทิลโคลีนเอสเทอร์ในหอยขมและหอยเชอร์รี่ทุกขนาดคือขนาดเล็ก ขนาดกลาง และขนาดใหญ่ พบว่าการแสดงออกของอะซีทิลโคลีนเอสเทอร์สูงกว่าชุดควบคุม โดยอะซีทิลโคลีนเอสเทอร์มีน้ำหนักโมเลกุลเท่ากับ 71 kDa และยังสามารถศึกษาของ ชูติมา และคณะ [15] ที่ศึกษาการแสดงออกของอะซีทิลโคลีนเอสเทอร์ในไขหอยเชอร์รี่และหอยเชอร์รี่ (*Pomacea canaliculata*) พบว่าไขเป็นสีชมพูนั้นจะปรากฏแถบโปรตีน 2 isoform ที่มีขนาด 67 kDa และ 71 kDa ส่วนของหัวที่นำมาสกัดพบว่าอะซีทิลโคลีนเอสเทอร์มีขนาด 71 kDa และยังเป็นไปในแนวเดียวกันกับการศึกษาของ น้ำทิพย์ และคณะ [16] ที่รายงานไว้ว่า รูปแบบของโปรตีนที่พบในหอยเชอร์รี่ที่ได้รับสัมผัสแคดเมียมคลอไรด์ มีขนาดเท่ากับ 71 kDa และเมื่อหอยเชอร์รี่ได้รับสัมผัสสารนํ้าขึ้นการแสดงออกของอะซีทิลโคลีนเอสเทอร์มีแนวโน้มที่จะลดลง โดยการศึกษาผลของคลอรีนฟอสเฟตต่ออะซีทิลโคลีนเอสเทอร์ในปลาไนพบว่า การทำงานของเอนไซม์อะซีทิลโคลีนเอสเทอร์จะลดลงมากขึ้น เมื่อได้รับสัมผัสสารคลอรีนฟอสเฟตในระดับความเข้มข้นที่สูงขึ้น โดยเมื่อได้รับสารกำจัดศัตรูพืชในระดับความเข้มข้นต่ำมาก สิ่งมีชีวิตจะสามารถปรับตัวและสร้างเอนไซม์อะซีทิลโคลีนเอสเทอร์ขึ้นมาทดแทนเพื่อให้ระดับการทำงานของเอนไซม์อะซีทิลโคลีนเอสเทอร์ที่ลดลงให้กลับเข้าสู่ระดับที่สามารถดำรงชีวิตอยู่ได้ [17]

เทคนิคคอตบลดทเป็นเทคนิคทางแอนติบอดีแบบหนึ่ง โดยใช้หลักการของแอนติบอดีและแอนติเจนที่จำเพาะต่อกันทำปฏิกิริยาบนแผ่นเมมเบรน เมื่อเติมแอนติบอดีที่ติดฉลากด้วยเอนไซม์มาจับกับแอนติเจน หรือแอนติบอดี ที่จำเพาะต่อแอนติเจนที่สนใจ แล้วนำมาเติมสับสเตรทที่จำเพาะกับเอนไซม์นั้นก็จะสามารถตรวจสอบผลเชิงคุณภาพได้ด้วยการสังเกตจุดสีน้ำตาลเทาบนเมมเบรน โดยอาจเปรียบเทียบกับตัวควบคุมผลบวกและลบเพื่อเพิ่มความแม่นยำ ซึ่งเทคนิคนี้สามารถตรวจสอบตัวอย่างจำนวนมากได้ในเวลาอันรวดเร็ว มีความแม่นยำสูง สามารถวิเคราะห์ได้ในระดับนาโนกรัม ค่าใช้จ่ายน้อย และขั้นตอนไม่ยุ่งยาก จึงมีการนำไปประยุกต์ใช้กับการตรวจสอบทั้งในเชิงสิ่งแวดล้อม การเกษตร หรือทางการแพทย์อย่างกว้างขวาง ดังนั้นเทคนิคคอตบลดทจึงถือเป็นทางเลือกหนึ่งที่มีความน่าสนใจในการนำมาพัฒนาเพื่อตรวจสอบการปนเปื้อนสารรบกวนการทำงานของต่อมไร้ท่อในสิ่งแวดลอม Thanomsit et al. [18] เสนอแนะว่าเทคนิคคอตบลดทเป็นเทคนิคที่นำมาใช้ในการประเมินถึงการแสดงออกของอะซีทิลโคลีนเอสเทอร์ในสัตว์น้ำได้ เช่น ในปลาอุกผสม และปลาช่อน ซึ่งการแสดงออกของอะซีทิลโคลีนเอสเทอร์จะขึ้นอยู่กับปริมาณสารและระยะเวลาที่ได้รับสัมผัส [14]

ในการศึกษาครั้งนี้พบว่าหอยเชอร์รี่เมื่อสัมผัสกับสารคลอรีนฟอสเฟตกับไซเพอร์เมทรินพบว่าการแสดงออกของอะซีทิลโคลีนเอสเทอร์จะลดลงเมื่อหอยเชอร์รี่ได้รับสัมผัสสารเป็นเวลานานและที่ระดับความเข้มข้นสูงเมื่อทำการประเมินโดยใช้เทคนิคคอตบลดท การศึกษาในครั้งนี้เป็นไปในแนวเดียวกันกับการศึกษาของ น้ำทิพย์ และคณะ [16]

ที่รายงานไว้ว่าเมื่อทำการศึกษาการแสดงออกของอะซีทิลโคลีนเอสเทอร์ด้วยเทคนิคคอตบลดทในหอยเชอร์รี่ที่ได้รับสัมผัสกับแคดเมียมคลอไรด์ พบว่าการแสดงออกของอะซีทิลโคลีนเอสเทอร์จะลดลงและมีขีดจำกัดของการตรวจสอบใกล้เคียงกัน

ในการศึกษาครั้งนี้สอดคล้องกับการศึกษาของ ชูติมา และคณะ [19] ที่รายงานว่าการแสดงออกของอะซีทิลโคลีนเอสเทอร์ในเหงือกและ Hepatopancreas ของปูนาที่ได้รับสัมผัสกับคลอรีนฟอสเฟตพบขึ้นอยู่กับระดับความเข้มข้นของคลอรีนฟอสเฟตที่ได้รับสัมผัสเมื่อทำการทดสอบโดยใช้เทคนิคคอตบลดท โดยถ้ายังได้รับสัมผัสคลอรีนฟอสเฟตปริมาณสูงขีดจำกัดของการตรวจสอบก็จะต่ำมาก ยิ่งไปกว่านั้น Narra [20] รายงานว่าการแสดงออกของอะซีทิลโคลีนเอสเทอร์สามารถทำได้โดยใช้การตรวจประเมินกิจกรรมของเอนไซม์ในปู (*Barytelphusa guerini*) ที่ได้รับสัมผัสกับคลอรีนฟอสเฟต ซึ่งเทคนิคที่ใช้มีความแตกต่างกันในการศึกษาครั้งนี้ทำให้การศึกษาต่างกัน

5. สรุปผลการทดลอง

หอยเชอร์รี่เมื่อได้รับสัมผัสกับสารคลอรีนฟอสเฟตกับไซเพอร์เมทรินซึ่งเป็นสารกำจัดแมลงศัตรูพืชจะก่อให้เกิดผลกระทบทั้งในเรื่องของการตายสะสม โดยเมื่อได้รับสารผสมกันจะทำให้เกิดความเป็นพิษต่อหอยเชอร์รี่มากกว่าสารเคมีกำจัดศัตรูพืชที่มีสารเคมีเพียงกลุ่มเดียวนอกจากนี้ยังมีผลต่อการเปลี่ยนแปลงพฤติกรรม การเปลี่ยนแปลงสัณฐานวิทยา และการแสดงออกของอะซีทิลโคลีนเอสเทอร์โดยการเปลี่ยนแปลงที่ตรวจสอบได้จะขึ้นอยู่กับระยะเวลาที่ได้รับสัมผัส อย่างไรก็ตามพบว่าการแสดงออกของอะซีทิลโคลีนเอสเทอร์จะลดลงเมื่อหอยเชอร์รี่ได้รับสัมผัสสารเป็นเวลานาน โดยอะซีทิลโคลีนเอสเทอร์ในหอยเชอร์รี่มีขนาด 71 kDa ดังนั้นหอยเชอร์รี่จึงมีแนวโน้มที่จะนำมาใช้เป็นตัวชี้วัดการได้รับสัมผัสสารกำจัดศัตรูพืชได้หากมีการปนเปื้อนในแหล่งน้ำ และสามารถใช้เป็นตัวชี้วัดทางชีวภาพของการสัมผัสสารเคมีกำจัดศัตรูพืชในแหล่งน้ำตามธรรมชาติได้ อย่างไรก็ตามควรมีการศึกษาเพิ่มเติมเกี่ยวกับสัตว์น้ำอื่น ๆ ที่ได้รับสัมผัสสารคลอรีนฟอสเฟตกับไซเพอร์เมทริน และการศึกษาในสารเคมีทางการเกษตรชนิดอื่น ๆ เพิ่มเติม

6. กิตติกรรมประกาศ

งานวิจัยนี้ได้รับการสนับสนุนจากสาขาวิชาประมง คณะเกษตรศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลธัญบุรี วิทยาเขตสุรินทร์

เอกสารอ้างอิง

1. Chankao S. Study of biodiversity of golden apple snail in central part of Thailand by polymerase chain reaction. Master of Education degree. Chemistry. Faculty of Science. Srinakharinwirot University. Bangkok. 2004. 61 p.
2. Chalermchutipapha N. Alien species raids to destroy biodiversity. UPDATE. 2010. p. 51-61.
3. อรพินท์ จินตสถาพร, ประทักษ์ ตาบทิพย์วรรณ, สุนารี เย็นมาก. การใช้หอยเชอร์รี่ทดแทนปลาป่นในอาหารกุ้งก้ามกราม.

- การประชุมทางวิชาการของมหาวิทยาลัย เกษตรศาสตร์ ครั้งที่ 42. กรุงเทพฯ: มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์; 2547. p.181-189.
4. Thanomsit C, Wattanakornsiri A, Nanthanawat P. Adverse Effects of Abamectin on Hematological Profile and Histological Alterations of Hybrid catfish (*Clarias microcephalus* x *C. gariepinus*). Burapha Science Journal. 2017; 22(2): 169-182.
5. Thanomsit C, Saowakoon K, Wattanakornsiri A, Nanuam J, Prasatkaew W, Nanthanawat P. Induction and purification of Acetylcholinesterase (AChE) from hybrid catfish after exposed to glyphosate for applying as antigen in antibody production. The 1st Rajamangala Sakon Nakhon Conference: RSKC 2018.
6. ชูติมา ฅนอมสธิ์, อรุณี มาประจวบ, วิชชุดา ประสาทแก้ว, หยาต เพชร โอเจริญ, อำนวย วัฒนกรสิริ, จักรพันธ์ นาน่วม, พอลิต นันทนาววัฒน์. การประยุกต์ใช้อะซิติลโคลีนเอสเทอเรส เป็นตัวชี้วัดทางชีวภาพการได้รับสัมผัสสารกำจัดศัตรูพืชเพื่อลดความเสี่ยงในการบริโภคหอยขมและหอยเชอรี่. การประชุมวิชาการระดับชาติ นวัตกรรมและเทคโนโลยีวิชาการ 2017 “วิจัย องค์ความรู้ สู่การพัฒนา อย่างยั่งยืน” มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลธัญบุรี, สุรินทร์. 2560. น.117-119.
7. Fakeye OD, Olatunji EO. A study of the acute toxicity of some selected heavy metal and pesticides on a fresh water snail (*Melanoides tuberculatus*). ChemTech Journal. 2016; 11: 28-43.
8. Mukadam M, Kulkarni A. Acute Toxicity of Synthetic Pyrethroid Cypermethrin on Protein Content in Estuarine Clam, Marcia Opima (Gmelin, 1791). Journal of Environmental & Analytical Toxicology. 2014; 4(2): 1-4. doi: 10.4172/2161-0525.1000209
9. Cagauan AG, Joshi RC. Golden apple snail *Pomacea* spp. in the Philippines. Review on levels of infestation, control methods, utilization and future research directions. Journal of Agriculture and Life Sciences. 2003; 37(2): 7-32.
10. Thanomsit C, Maprajub A, Saowakoon S, Prasatkaew W, Ocharore Y, Wattanakornsiri A, Nanthanawat P. Acetylcholinesterase (AChE): Potential Biomarker for Evaluating Pesticide Exposure on Egg and Tissue of Golden Apple Snail (*Pomacea canaliculata*) from Huai-Saneng Reservoir, Surin Province, Thailand. Thai Journal of Agricultural Science. 2018; 51(3): 104-117.
11. วิชชุดา ประสาทแก้ว, พอลิต นันทนาววัฒน์. การพัฒนาเทคนิค ดอทบลอตเพื่อตรวจสอบไวเทิลโลเจนินสำหรับใช้เป็นตัวชี้วัดทางชีวภาพของสารบรรกวนการทำงานของต่อมไร้ท่อ. วารสารวิทยาศาสตร์บูรพา. 2561; 23(3): 1448-1457.
12. น้ำทิพย์ จันถาวร, ไชยวัฒน์ นวลขาว, ปราง ภาณุจนสาร, ปวีณา สาสีทอง, จันทรพิมพ์ กังพานิช, พอลิต นันทนาววัฒน์, ชูติมา ฅนอมสธิ์. ผลกระทบของแคดเมียมคลอไรด์ ($CdCl_2$) ที่มีต่อการเพาะฟักของไข่หอยเชอรี่. วารสารวิทยาศาสตร์บูรพา. 2564; 26(1): 488-509.
13. Walker CH, Hopkin SP, Sibly RM, Peakall DB. Principle of Ecotoxicology. 2006; Taylor & Francis: USA.
- 1 4. Thanomsit C, Nualkaw C, Prasatkaew W, Wattanakornsiri A, Nanuam J, Nanthanawat P, Kiatprasert P. Adverse effects of chlorpyrifos and cypermethrin mixture on physiological alterations and cholinesterase expression on Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). Thai Journal of Agriculture Science. 2020; 53(3): 134-148.
15. กอบกุล นงนุช. พิษเฉียบพลันของสารสกัดสาบเสือและต้น ผกากรองต่อหอยเชอรี่. การประชุมวิชาการระดับชาติ นวัตกรรมและเทคโนโลยีวิชาการ 2017 “วิจัย องค์ความรู้ สู่การพัฒนา อย่างยั่งยืน” มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลธัญบุรี, สุรินทร์. 2560. น. 814-816.
16. ชูติมา ฅนอมสธิ์, ถัดดาวรรณ บุญปก, ธนพงศ์ เปรียบเสนาดี, อำนวย วัฒนกรสิริ, หยาตเพชร โอเจริญ, จักรพันธ์ นาน่วม, วิชชุดา ประสาทแก้ว, พอลิต นันทนาววัฒน์. อัตราการเพาะฟัก ลักษณะสัณฐานวิทยาและการเปลี่ยนแปลงของไข่หอยเชอรี่ (*Pomacea canaliculata*) หลังสัมผัสกับสารเคมีทางการเกษตร. วารสารวิจัยเทคโนโลยีการประมง. 2562; 13(1): 24-40.
17. พิทยา นิตยาชิต, ศักดิ์สิทธิ์ จันทรไทย, รักพงษ์ เพชรคำ. ผลของ สารคลอรีฟรีฟอสต่อการทำงานของเอนไซม์อะเซติลโคลีนเอสเทอเรสในสมอง พลาสมา และเม็ดเลือดแดงของปลานิล. วารสารวิจัย มช. 2552; 14(1): 55-67.
- 1 8. Thanomsit C, Saowakoon K, Wattanakornsiri A, Khongchareonporn N, Nanuam J, Prasatkaew W, Nanthanawat P. Acetylcholinesterase (AChE) Polyclonal Antibody from Hybrid catfish (*C. macrocephalus* x *C. gariepinus*): Specification, Sensitivity and Cross Reactivity. Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology, 2020; 108837.
19. ชูติมา ฅนอมสธิ์, น้ำทิพย์ จันถาวร, ไชยวัฒน์ นวลขาว, จักรพันธ์ นาน่วม, หยาตเพชร โอเจริญ, อำนวย วัฒนกรสิริ, พอลิต นันทนาววัฒน์. ผลกระทบของสารกำจัดแมลงศัตรูพืช (คลอรีฟรีฟอส) ในปูนา (*Sayarmia* sp.). การประชุมวิชาการระดับชาติ ราชมงคลสุรินทร์ ครั้งที่ 11 “วิจัยและนวัตกรรมวิถี

ใหม่”. มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลอีสาน วิทยาเขต
สุรินทร์, สุรินทร์. 2563.

20. Narra MR. Effects of chlorpyrifos insecticide, on
cholinesterase activity and its depuration in the crab
Barytelphusa guerini. International Journal of
Environmental Technology and Management. 2015;
18(1): 1-8.