บทที่ 5
อภิปรายและสรุปผลการทดลอง

โลหะหนักโดยเฉพาะอย่างยิ่งแคดเมียมนั้นเป็นสารที่มีการปนเปื้อนอยู่ในสิ่งแวดล้อมค่อนข้างมาก โดยส่วนใหญ่พบว่าแคดเมียมจะอยู่รวมกับสังกะสี ตะกั่วและคอปเปอร์ซัลไฟต์ แคดเมียมจะพบมากในวัสดุที่มีสารอินทรีย์เป็นองค์ประกอบอยู่สูง เช่น น้ำมันดิบ และถ่านหิน (สุวัจน์ ธัญรส, 2549) นอกจากนี้ก็ยังพบได้ในกิจกรรมอื่น ๆ เช่น อุตสาหกรรมการทำเหมือง การหลอมและการถลุงตะกั่ว และสังกะสี จากลักษณะที่กล่าวมาจึงทำให้มีแคดเมียมเข้าไปปนเปื้อนในแหล่งน้ำต่าง ๆ มากมายโดยเฉพาะอย่างยิ่งในน้ำทะเล เพราะทะเลเป็นแหล่งสะสมของเสียแหล่งสุดท้ายของมนุษย์ ทำให้สัตว์น้ำต่าง ๆ ได้รับแคดเมียมและเก็บสะสมแคดเมียมไว้ในตัวเป็นจำนวนมาก เมื่อนำสัตว์น้ำมารับประทานจึงมีโอกาสได้รับแคดเมียมเข้าสู่ร่างกายที่อาจทำให้เกิดอันตรายต่อสุขภาพในมนุษย์ได้ การตรวจวัดโลหะหนักบริเวณแนวชายฝั่งทะเลเพื่อทำให้ทราบถึงสถานการณ์การปนเปื้อนของโลหะหนัก เพื่อเป็นแนวทางในการเฝ้าระวังและจัดการการปนเปื้อนของโลหะหนักแนวชายฝั่งทะเลจึงกลายเป็นสิ่งที่น่าสนใจ แต่การตรวจสอบการปนเปื้อนโดยการวัดปริมาณโลหะหนักทุกชนิดในสิ่งแวดล้อมหรือสิ่งมีชีวิตโดยตรงนั้นทำให้สิ้นเปลืองและที่สำคัญคือต้องใช้เครื่องมือที่มีราคาแพง ดังนั้นการใช้ตัวชี้วัดทางชีวภาพ (Biomarker) เช่น Metal-Binding Protein จึงเป็นอีกทางเลือกหนึ่งที่ควรใช้เพื่อตรวจสอบเบื้องต้นการรับสัมผัสของสิ่งมีชีวิตต่อโลหะหนัก ทั้งนี้เนื่องจาก Metal-Binding Protein เป็นโปรตีนขนาดเล็กที่มี cystein สูง และสามารถเลือกจับกับโลหะได้อย่างจำเพาะ ระดับความเข้มข้นของ Metal- Binding Protein จะเพิ่มขึ้นเมื่อสิ่งมีชีวิตได้รับโลหะ เพราะ Metal-Binding Protein มีบทบาทสำคัญในการเมตาโบไลต์และปรับสมดุลของร่างกายให้เป็นปรกติ จากลักษณะดังกล่าว Metal-Binding Protein จึงถูกเสนอให้ใช้เป็นดัชนีชี้บ่งถึงการปนเปื้อนของโลหะหนักในสิ่งแวดล้อมได้ ดังนั้นในการวิจัยครั้งนี้จึงได้มีการศึกษาถึงการผลิตโพลีโคลนอลแอนติบอดีที่จำเพาะกับ Cd- Binding Protein ในปลากะพงขาวซึ่งเป็นปลาน้ำกร่อยที่มีความสำคัญทางเศรษฐกิจ อาศัยในน้ำได้ทุกความเค็ม และมีการประยุกต์ใช้โพลีโคลนอลแอนติบอดีที่ผลิตขึ้นได้ในห้องปฏิบัติการไปใช้ในการตรวจสอบถึงการรับสัมผัสของปลาทะเลต่อโลหะหนักในปี 2550-2551 บริเวณนิคมอุตสาหกรรมมาบตาพุดและนิคมอุตสาหกรรมแหลมฉบังด้วย โดย Cd-Binding Protein ที่นำมาใช้ในการผลิตโพลีโคลนอลแอนติบอดีในครั้งนี้จะได้มาจากการฉีดกระตุ้นด้วย $CdNO_3.4H_2O$ แล้วนำมาทำให้บริสุทธิ์โดยใช้วิธี Immobilized metal ion affinity chromatography โดยจากการศึกษาพบว่า

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

5.1 การกระตุ้นให้ปลากะพงมีการสังเคราะห์ Cd- Binding Protein การสกัดโปรตีน Cd-Binding Protein และการทำให้บริสุทธิ์ด้วยวิธี Immobilized metal ion affinity chromatography

5.1.1 การกระตุ้นให้มีการสังเคราะห์ Cd-Binding Protein ในปลากะพงขาว

การฉีดกระตุ้นปลากะพงขาวด้วย $CdNO_3.H_2O$ ปริมาณ 4 มิลลิกรัมต่อน้ำหนักปลา 1 กิโลกรัม เป็นเวลา 48 ชั่วโมง พบว่าสามารถกระตุ้นให้ปลากะพงขาวมีการสังเคราะห์โปรตีนเพิ่มมากขึ้น โดยปริมาณโปรตีนรวมที่สามารถตรวจสอบได้ในปลากะพงขาวกลุ่มที่มีการฉีดกระตุ้นด้วย $CdNO_3.H_2O$ จะมีปริมาณสูงกว่าปลากระพงขาวในกลุ่มควบคุม 1-2 เท่า สามารถชักนำให้ปลากะพงขาวสร้าง Cd-Binding Protein และเมื่อศึกษารูปแบบของโปรตีนด้วยเทคนิค SDS-PAGE พบว่าโปรตีนที่แยกได้จากตับปลากระพงขาวมีหลายขนาด แต่แถบโปรตีนหลักซึ่งคาดว่าเป็น Cd-Binding Protein นั้นมีขนาดประมาณ 10 kDa ซึ่งสอดคล้องกับการทดลองของ Honda et al. (2005) ที่ศึกษาในปลาอะเมซอน (*Colossoma macroponum*) ที่มีการฉีดกระตุ้นด้วย $CdNO_3.H_2O$ ปริมาณ 3 มิลลิกรัมต่อน้ำหนักปลา 1 กิโลกรัมเป็นเวลา 48 ชั่วโมง ซึ่งพบว่าหลังจากการฉีดกระตุ้นปริมาณโปรตีนที่ตรวจสอบได้มีค่าสูงกว่าปลาในกลุ่มควบคุมและโปรตีนที่แยกได้มีขนาดประมาณ 10 kDa และสอดคล้องกับการศึกษาของ Mullin et al. (1999) ที่ได้ทำการศึกษาในปลาเรนโบว์เทร้าท์ โดยทำการฉีดกระตุ้นให้ปลาสร้าง Cd-Binding Protein ด้วย $CdCl_2$ ปริมาณ 3.5 มิลลิกรัมต่อน้ำหนักปลา 1 กิโลกรัม เป็นเวลา 3 สัปดาห์ สัปดาห์ละ 2 ครั้ง ซึ่งจากการศึกษาพบว่า Cd-Binging protein ที่ตรวจสอบได้จะมีปริมาณมากกว่าปลาที่ไม่ได้รับ $CdCl_2$ และโปรตีนที่แยกได้มีขนาด 14 kDa

5.1.2 การสกัดและการทำโปรตีนให้บริสุทธิ์ด้วยวิธี Immobilized metal ion affinity chromatography

ในการสกัดและทำบริสุทธิ์ Cd-Binding Protein สามารถทำได้หลายวิธี เช่น การตกตะกอน Gel Filtration Chromatography, Ion Exchange Chromatography และ High Performance Liquid Chromatography (HPLC) เป็นต้น แต่ถึงอย่างไรก็ตามการแยกและการทำบริสุทธิ์นั้นก็จะขึ้นอยู่กับวัตถุประสงค์ของการศึกษา ดังนั้นจึงมีการพัฒนาเทคนิคต่าง ๆ มากมาย เช่น Olafson and Thompson (1974) ทำการแยก Cd- Binding Protein จากตับของ Atlantic Grey Seal (*Halichoerus grypus*), Pacific Fur Seal (*Callorhinus ursinus*) และ Copper Rock (*Sebastodes caurinus*) โดยใช้เทคนิค Ultracentrifugation และ Gel Filtration Chromatography และการศึกษาของ Park et al. (2002) ที่ทำการแยก Cd-Binding Protein จากหอย Asian Periwinkle *(Littorina brevicula)* โดยใช้เทคนิค GeI- Filtration Chromatography และHigh Performance Liquid Chromatography (HPLC) แต่ถึงอย่างไรก็ตามวิธีการเหล่านี้ก็อาจจะทำให้สูญเสียโปรตีนจำนวนมากและใช้เวลานานในการแยกและทำบริสุทธิ์ ดังนั้นในการศึกษาครั้งนี้จึงใช้วิธี Immobilized

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

Metal Ion Affinity Chromatography โดยจะให้โปรตีนที่ต้องการแยกจับกับโลหะในคอลัมน์แล้วชะโปรตีนออกมาโดยอาศัยหลักการ Metalbiospecific Interaction ซึ่งวิธีนี้มีข้อดีหลายอย่างเมื่อเทียบกับวิธีข้างต้น กล่าวคือ วิธีนี้เป็นวิธีที่ง่าย สามารถกำจัดโปรตีนบางส่วนที่ไม่ต้องการออกได้ ไม่ทำให้สูญเสียโปรตีนมาก และใช้เวลาน้อย (Honda et al., 2005)

การใช้วิธี Immobilized Metal lion Affinity Chromotagraphy โดยใช้เทคนิคของ Honda et al. (2005) เพื่อให้ได้ Cd-Binding Protein ที่บริสุทธิ์ เป็นวิธีที่อาศัยความจำเพาะระหว่าง Coordinate Covalent binding ของ Amino Acids ที่จะทำให้โปรตีนสามารถจับกับโลหะที่เคลือบอยู่บนสารเรซินที่บรรจุอยู่ในคอลัมน์ ในการศึกษานี้ใช้ Hitrap FF Crude Column ขนาด 5 มิลลิลิตร ที่มีโลหะนิกเกิลเคลือบอยู่บนเรซิน โดยเมื่อโปรตีนผ่านคอลัมน์ จะจับกับ Ni^{2+} เมื่อชะ ด้วย 5, 50, 100, 250 และ 500 mM imidazol จะได้ Cd-Binding Protein ที่ออกมา โปรตีนที่พบมีน้ำหนักโมเลกุลขนาด 10 kDa ซึ่งสอดคล้องกับผลการทดลองของ Honda et al. (2005) โดยจะพบ Cd-Binding Protein ในแฟรกชั่นที่ 2 เป็นต้นไป ผลการทดลองชี้ให้เห็นว่าเทคนิค Immobilized Metal Ion Affinity Chromatography เป็นวิธีที่เหมาะสมอย่างยิ่งในการนำมาใช้ในการแยก Cd-Binding Protein และพบมีน้ำหนักมวลโมเลกุล 10 kDa

5.2 การทดสอบประสิทธิภาพของโพลีโคลนอลแอนติบอดีที่จำเพาะต่อ Cd-Binding Protein โดยเทคนิค Western Blot

ในการศึกษาครั้งนี้หลังจากมีการฉีดกระตุ้นภูมิคุ้มกันให้กับหนูขาวโดยแอนติเจน Cd-Binding Protein ที่ได้จากการสกัดและทำบริสุทธิ์โดยใช้วิธี Immobilized Metal lon Affinity Chromatography ผลการทดสอบประสิทธิภาพของโพลีโคลนอลแอนติบอดี (PAb) ต่อ Cd-Binding Protein โดยใช้เทคนิค Western Blot ที่ระดับความเข้มข้นของแอนติบอดีต่าง ๆ กัน 5 ระดับ คือ 1:1,000, 1:2,500, 1:5,000, 1:7,500 และ 1:10,000 พบว่าเมื่อนำแอนติบอดีที่ผลิตได้มาทดสอบกับแอนติเจนที่มีความเข้มข้น 10 µg ระดับความเข้มข้นของแอนติบอดีเหมาะสมคือ 1:2,500 โดยมีการจับกันของแอนติบอดีกับโปรตีนที่ไม่จำเพาะอื่นค่อนข้างน้อย และพบแถบโปรตีน Cd-Binding Protein (~10 kDa) ค่อนข้างชัดเจน ดังนั้นจึงเลือกใช้ค่าการเจือจางแอนติบอดีที่ 1:2,500 เพื่อใช้ในการทดสอบด้วยเทคนิค Western blot ในปลาทะเลชนิดอื่น ๆ ที่จับจากชายฝั่งทะเลบริเวณเขตพื้นที่อุตสาหกรรมต่อไป คุณสมบัติของโพลีโคลนอลแอนติบอดีที่ผลิตขึ้นมีความจำเพาะต่อ Cd-Binding Protein อย่างสูง แต่อาจสามารถจับกับ Metal-Binding Protein ที่ถูกกระตุ้นให้เกิดการสร้างขึ้นจากโลหะหนักตัวอื่นๆ ได้ เช่น Zn , Cu , Hg , Co, Ni, Bi และ Ag (Houggett et al.,1992) ซึ่งคล้ายคลึงกับการทดลองของ Mullin et al. (1999) ที่ได้ประยุกต์ใช้โมโนโคลนอลแอนติบอดีที่จำเพาะกับ

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

Cd-Binding Protein ในการตรวจสอบถึงการปนเปื้อนของโลหะหนักในแหล่งน้ำโดยจากการศึกษาพบว่าแอนติบอดีที่ผลิตได้จะจับกับโปรตีนที่มีขนาด 14 kDa อย่างจำเพาะ

นอกจากการใช้เทคนิค Western Blot สำหรับการตรวจสอบหรือประเมินผลกระทบทางสิ่งแวดล้อมแล้ว ในปัจจุบันเทคนิคที่สามารถนำมาประยุกต์ใช้ในการตรวจสอบถึงปริมาณ Cd-Binding Protein เพื่อใช้ประเมินถึงการปนเปื้อนของโลหะหนักในแหล่งน้ำก็ยังสามารถทำได้หลายวิธี เช่น Yudkovski et al. (2008) ตรวจสอบปริมาณ Metal-Binding Protein ในปลา Striped Sea Bream (*Lithognathus mormyrus*)ในทะเลเมดิเตอร์เรเนียน ประเทศอิสราเอล จากแหล่งน้ำ 2 แหล่ง คือ บริเวณที่มีสารมลพิษ และไม่มีสารมลพิษ โดยใช้โมโนโคลนอลแอนติบอดี ด้วยเทคนิค ELISA จากการศึกษาพบว่า ในปลาบริเวณที่มีสารมลพิษ จะตรวจพบปริมาณ Metal-Binding Protein สูงกว่าปลาที่อยู่ในบริเวณไม่มีมลพิษถึง 10 เท่า ซึ่งข้อจำกัดของการใช้แอนติบอดีจับจำเพาะกับแอนติเจน คือ ปัญหาความไม่จำเพาะหรือความไวของปฏิกิริยา โดยเฉพาะเมื่อใช้โพลีโคลนอลแอนติบอดีในการตรวจสอบ ดังนั้นการพัฒนาโมโนโคลนอลแอนติเพื่อนำมาใช้ในการตรวจสอบ Cd-Binding Protein จึงควรมีการศึกษาต่อไป

5.3 การสำรวจการแสดงออกของ Cd-Binding Protein ของปลาทะเลบางชนิดจากชายฝั่งทะเลบริเวณนิคมอุตสาหกรรมแหลมฉบัง จังหวัดชลบุรีและนิคมอุตสาหกรรมมาบตาพุด จังหวัดระยอง ด้วยวิธี Western Blot

ชายฝั่งทะเลตะวันออกเป็นพื้นที่ที่มีการพัฒนาให้เป็นแหล่งอุตสาหกรรม และแหล่งท่องเที่ยวที่สำคัญของประเทศ ซึ่งมีผลให้เกิดการขยายตัวของชุมชนบริเวณชายฝั่งทะเลตามมา ทำให้แหล่งน้ำทะเลบริเวณชายฝั่งทะเลตะวันออก เป็นแหล่งรองรับมลพิษที่สำคัญ และเกิดผลกระทบต่อคุณภาพน้ำชายฝั่ง เนื่องจากการระบายมลพิษจากกิจกรรมต่างๆ บริเวณชายฝั่ง โดยเฉพาะแหล่งชุมชนหนาแน่น แหล่งท่องเที่ยวบริเวณชายฝั่ง และแหล่งอุตสาหกรรมบริเวณนิคมอุตสาหกรรมมาบตาพุต จังหวัดระยอง บริเวณนิคมอุตสาหกรรมแหลมฉบัง จังหวัดชลบุรี โดยนิคมอุตสาหกรรมมาบตาพุตเป็นแหล่งอุตสาหกรรมหนักที่สำคัญ เช่น โรงแยกก๊าซธรรมชาติ อุตสาหกรรมปิโตรเคมี อุตสาหกรรมเหล็กผลิตภัณฑ์จากเหล็กและอุตสาหกรรมปุ๋ยเคมี ส่วนบริเวณนิคมอุตสาหกรรมแหลมฉบัง ส่วนใหญ่เป็นที่ตั้งของท่าเรือพาณิชย์สำหรับการขนถ่ายสินค้าประเภทบรรจุตู้ (คอนเทนเนอร์) มีเขตอุตสาหกรรมเพื่อการส่งออกประเภทไฟฟ้าและอิเล็กทรอนิกส์ อุตสาหกรรมยางรถยนต์ โทรทัศน์และวีดีทัศน์ (Chongprasith & Wilairatanadilok, 1999) รวมทั้งการขยายตัวของแหล่งชุมชน อาจจะทำให้สารมลพิษ เช่น โลหะหนักปนเปื้อนลงสู่แหล่งน้ำเพิ่มขึ้น และเมื่อสัตว์น้ำรับเอาโลหะหนักเข้าสู่ร่างกายอาจส่งผลกระทบทางสุขภาพและ

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

การสะสมของสารพิษในทรัพยากรสิ่งมีชีวิตที่อาศัยตามชายฝั่งทะเล หากมนุษย์นำสัตว์น้ำมาบริโภคจะส่งผลกระทบต่อสุขภาพได้เช่นกัน ทั้งนี้ปลาทะเลมีความสำคัญต่อการเป็นอาหารโปรตีนเพื่อการดำรงชีพของผู้อาศัยตามชายฝั่ง จึงควรคำนึงถึงความปลอดภัยในการรับประทานปลาทะเลที่อาจปนเปื้อนโลหะหนัก การศึกษาครั้งจึงใช้โพลีโคลนอลแอนติบอดี (PAb) ต่อ Cd-Binding Protein จากปลากะพงขาว ที่ผลิตได้ เป็นเครื่องมือสำรวจการแสดงออกของ Cd-Binding Protein ของปลาทะเลบางชนิดจากชายฝั่งทะเลบริเวณนิคมอุตสาหกรรมแหลมฉบังและนิคมอุตสาหกรรมมาบตาพุดทดสอบด้วยเทคนิค Western blot เพื่อให้ทราบถึงสถานการณ์การปนเปื้อนของโลหะหนักในบริเวณดังกล่าว

จากการสำรวจบริเวณนิคมอุตสาหกรรมมาบตาพุด ได้เก็บตัวอย่างปลาทะเล 29 ชนิด จำนวน 148 ตัวอย่าง พบการแสดงออกของ Cd-Binding Protein ให้ผลบวก 72 ตัวอย่าง คิดเป็น 48.6% (n=148) ส่วนบริเวณนิคมอุตสาหกรรมแหลมฉบัง ปลาทะเล 32 ชนิด จำนวน 158 ตัวอย่าง พบการแสดงออกของ Cd-Binding Protein ให้ผลบวก 46 ตัวอย่าง คิดเป็น 29.1% (n=158) จะเห็นว่าการแสดงออกของ Cd-Binding Protein ในปลาทะเลบริเวณนิคมอุตสาหกรรมมาบตาพุดสูงกว่าบริเวณนิคมอุตสาหกรรมแหลมฉบัง ทั้งนี้อาจเนื่องจากบริเวณนิคมอุตสาหกรรมมาบตาพุด เป็นแหล่งอุตสาหกรรมหนักที่ขบวนการผลิตอาจมีโลหะหนักหลายชนิดปนอยู่และคุณสมบัติของโพลีโคลนอลแอนติบอดีอาจจะจับกับโลหะหนักตัวอื่น ๆ ได้ แต่มีความจำเพาะกับแคดเมียมอย่างสูง ดังนั้นเมื่อแคดเมียมปนเปื้อนในสิ่งแวดล้อมที่มีการปล่อยน้ำทิ้งจากอุตสาหกรรมเหล็ก โรงงานถลุงโลหะและโรงงานถลุงเหล็ก กระบวนการผลิตสังกะสีที่ไม่เป็นสนิม โดยมีการเคลือบโลหะที่มีแคดเมียมเป็นองค์ประกอบอยู่ประมาณ 0.2% อุตสาหกรรมผลิตปุ๋ยฟอสเฟต หินฟอสเฟตที่ใช้เป็นวัตถุดิบจะมีแคดเมียมเป็นองค์ประกอบอยู่ประมาณ 100 ppm (เปี่ยมศักดิ์ เมนะเศวต, 2543) อีกทั้งยังมีคลองสาธารณะในพื้นที่นิคมอุตสาหกรรมมาบตาพุด จำนวน 9 คลอง ได้แก่ คลองพยูน คลองบางกะพรุน คลองบางเบิด คลองซากหมาก คลองตากวน คลองน้ำหู คลองห้วยใหญ่ คลองน้ำชา และคลองหลอด ที่พบว่าคุณภาพน้ำยังมีความเสื่อมโทรมทั้งทางกายภาพและทางเคมี กล่าวคือ คลองส่วนใหญ่มีปริมาณน้ำน้อยถึงปานกลาง สีคล้ำ และมีกลิ่นเหม็นตั้งแต่บริเวณต้นคลองถึงปากคลอง (กรมควบคุมมลพิษ, 2550) อาจทำให้สารมลพิษถูกชะลงสู่ชายฝั่งทะเลบริเวณมาบตาพุดเพิ่มมากขึ้น ซึ่งสอดคล้องกับการศึกษาของ ศรัณย์ เพ็ชร์พิรุณ และณรงค์ฤทธิ์ เลิศเกษตรวิทยา (2548) ทำการศึกษาปริมาณการสะสมตัวและการแพร่กระจายของทองแดง แคดเมียม และตะกั่ว ตามแนวดิ่งในดินตะกอน บริวณอ่าวไทยตอนบน 9 สถานี ได้แก่ บริเวณปากแม่น้ำแม่กลอง ปากแม่น้ำเจ้าพระยา ปากแม่น้ำบางปะกง แหลมฉบัง มาบตาพุต หัวหิน

แหลมผักเบี้ย และกลางอ่าวไทยตอนบน 2 สถานี พบว่ามาบตาพุดเป็นบริเวณที่พบปริมาณแคดเมียมสูงสุด มีค่าเฉลี่ย 1.52 ppm แต่ยังไม่เกินค่ามาตรฐานคุณภาพน้ำทะเลที่ควรพบแคดเมียม น้อยกว่า 5 µg/l

นอกจากนี้ฤดูกาลยังมีอิทธิพลต่อการแสดงออกของ Cd-Binding Protein โดยเมื่อเปรียบเทียบระหว่างช่วงเวลาที่ทำการสำรวจทั้ง 2 ครั้ง พบว่าการแสดงออกของ Cd-Binding Protein ในช่วงฤดูแล้ง (มีนาคม 2551) มีแนวโน้มสูงกว่า ฤดูฝน(สิงหาคม- กันยายน 2550) โดยแต่ละช่วงการเก็บตัวอย่างพบเปอร์เซ็นต์การแสดงออกของ Cd-Binding Protein เท่ากับ 51.3% (n=158) และ 25.0% (n=148) ตามลำดับ โดยโลหะหนักที่ปนเปื้อนลงสู่ทะเล บางส่วนจะละลายอยู่ในน้ำทะเล บางส่วนจะสะสมอยู่กับตะกอนดิน (Fabris et al., 2006) สัตว์ทะเลสะสมโลหะหนักไว้ในเนื้อเยื่อจากการรับโดยตรงจากน้ำทะเลผ่านเนื้อเยื่อเหงือก (Sadik, 1992) และกระบวนการดูดซึมทางผิวหนังและรับโดยอ้อมผ่านทางอาหารหรือตะกอนดินที่กินเข้าไป โลหะหนักบางชนิด เช่น แคดเมียม และ ปรอท ยังถ่ายทอดผ่านทางห่วงโซ่อาหารโดยจะมีการสะสมที่เพิ่มขึ้นในสิ่งมีชีวิต ที่มีลำดับขั้นการบริโภค ที่สูงขึ้นไปในห่วงโซ่อาหาร (Chi et al., 2007) ซึ่งการสะสมของแคดเมียมในเนื้อเยื่อของสิ่งมีชีวิตมีความสัมพันธ์กับความเข้มข้นของแคดเมียมในน้ำทะเล (Sadik, 1992)

โดยในช่วงฤดูแล้ง แคดเมียมในน้ำทะเลจะเพิ่มขึ้นตามความเค็มที่สูงขึ้น เนื่องจากแคดเมียมที่ยึดติดอยู่กับผิวหน้าของตะกอนที่พัดพามากับแม่น้ำ หรือจากตะกอนพื้นท้องน้ำถูกคายออกมาจากการแลกเปลี่ยนอิออนบนผิวหน้าตะกอน ทำให้แคดเมียมถูกดึงมาสร้างพันธะใหม่กับคลอไรด์หรือประจุลบอื่น ที่มีปริมาณสูงในน้ำทะเลในช่วงฤดูแล้ง มีผลให้แคดเมียมละลายน้ำได้มากขึ้น (ศรัณย์ เพ็ชร์พิรุณ และณรงค์ฤทธิ์ เลิศเกษตรวิทยา, 2548) โอกาสการรับสัมผัสของปลาทะเลต่อแคดเมียมจึงเพิ่มมากขึ้นด้วย สอดคล้องกับการศึกษาของ ฉลวย มุสิกะ (2544) พบว่าพฤติกรรมของแคดเมียม บริเวณแม่น้ำบาง ปะกง ในฤดูแล้ง (มีนาคม 2543) น้ำมีการเปลี่ยนแปลงความเค็มตั้งแต่ 8 psu บริเวณต้นน้ำจนถึง 32.5 psu พบแคดเมียมเฉลี่ย 0.036 ไมโครกรัมต่อลิตร โดยบริเวณปากแม่น้ำแคดเมียมและทองแดงในส่วนของสารละลายเพิ่มขึ้นสัมพันธ์กับความเค็ม ในขณะที่ฤดูฝน น้ำมีความเค็มตั้งแต่ 0 psu บริเวณต้นน้ำ ถึง 0.5 psu บริเวณปากแม่น้ำ พบแคดเมียมเฉลี่ย 0.026 ไมโครกรัมต่อลิตร เช่นเดียวกับการศึกษาของอภิรดี เมืองเดช (2545) ที่พบว่าปริมาณโลหะตะกั่ว แคดเมียม ในหอยแครง (*Anadara granosa*) บริเวณปากแม่น้ำบางปะกง และบริเวณชายฝั่งทะเลชลบุรี มีค่าเฉลี่ยสูงสุดในเดือนธันวาคม 2542 และมกราคม 2543 โดยมีค่าเท่ากับ 0.435และ 0.835 ไมโครกรัมต่อกรัมของน้ำหนักเปียก ตามลำดับ ส่วนในฤดูฝนปริมาณฝนที่มากอาจทำให้แคดเมียมที่ละลายในน้ำเจือจางลง ส่งผลให้การรับสัมผัสของปลาทะเลลดลงตามไปด้วย

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

จากการวิจัยครั้งนี้จะเห็นได้ว่าโพลีโคลนอลแอนติบอดีที่จำเพาะกับ Cd- Binding Protein ในปลากะพงขาวที่ผลิตขึ้น สามารถนำมาประยุกต์ใช้ในการตรวจสอบถึงการปนเปื้อนของโลหะหนักโดยเฉพาะอย่างยิ่งแคดเมียมในบริเวณนิคมอุตสาหกรรมมาบตาพุดและนิคมอุตสาหกรรมแหลมฉบังได้

สรุปผลการทดลอง

1. สาร$CdNO_3.4H_2O$ ความเข้มข้น 4 มิลลิกรัมต่อน้ำหนักปลา 1 กิโลกรัม สามารถชักนำให้เกิด Cd-Binding Protein มีขนาดประมาณ 10 kDa ในปลากะพงขาว ซึ่งทำให้มีปริมาณโปรตีนรวมสูงกว่าปลากะพงขาวกลุ่มควบคุมที่ฉีดบัฟเฟอร์

2. การใช้วิธี Immobilized Metal Ion Affinity Chromatography ด้วย HiTrap FF Crude Column สามารถกำจัดโปรตีนบางส่วนที่ไม่ต้องการออกไปได้ เพื่อให้ได้ Cd-Binding Protein ที่บริสุทธิ์

3. โพลีโคลนอลแอนติบอดี(PAb) จำเพาะต่อ Cd-Binding Protein ในปริมาณเจือจางที่เหมาะสมคือ 1:2,500 สามารถตรวจ Cd-Binding Protein จากปลากะพงขาวทดลองฉีด $CdNO_3$และจากปลาทะเลในแหล่งเสี่ยงต่อการปนเปื้อนของโลหะหนักได้ด้วยเทคนิค Western Blot ให้ขนาดโมเลกุลประมาณ 10 kDa

4. ปลาทะเลบริเวณนิคมอุตสาหกรรมแหลมฉบัง จังหวัดชลบุรี และนิคมอุตสาหกรรมมาบตาพุด จังหวัดระยอง มีความเสี่ยงต่อการปนเปื้อนของโลหะหนัก เนื่องจากการตรวจพบ Cd-Binding Protein ในปลาทะเล

4.1 ปลาทะเลบริเวณนิคมอุตสาหกรรมมาบตาพุด จังหวัดระยอง มีการชักนำให้สร้าง Cd-Binding Protein จำนวน 48.6% (n=148) ส่วนบริเวณนิคมอุตสาหกรรมแหลมฉบัง จำนวน 29.1% (n=158)

4.2 เปอร์เซ็นต์การแสดงออกของ Cd-Binding Protein ในช่วงฤดูแล้ง (มีนาคม 2551) เท่ากับ 51.3% (n=158) และ 25.0% (n=148) ตามลำดับ

ข้อเสนอแนะ

1. การผลิตโพลีโคลนอลแอนติบอดีจำเป็นต้องใช้แอนติเจนที่มีความบริสุทธิ์สูง เพราะอาจจะมีผลต่อความจำเพาะของแอนติบอดีที่ผลิตได้ ดังนั้นการใช้โพลีโคลนอลแอนติบอดีในการตรวจสอบ Cd-Binding Protein ยังคงมีข้อจำกัดบางประการ เช่น ความไม่จำเพาะของ

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

แอนติบอดี หรือความไวของปฏิกิริยา ดังนั้นควรมีการศึกษาการพัฒนาโมโนโคลนอลแอนติเพื่อนำมาใช้ในการตรวจสอบต่อไป

2. ควรมีการทดสอบปฏิกิริยาข้ามของโพลีโคลนอลแอนติบอดีที่จำเพาะต่อ Cd-Binding Protein กับปลากะพงขาวที่ได้รับโลหะหนักชนิดอื่นๆ เช่น สังกะสี และทองแดง เนื่องจากเป็นโลหะที่พบและจำเป็นต่อร่างกาย หากแต่เมื่อมีความเข้มข้นสูงก็สามารถเป็นพิษต่อร่างกายได้

3. ในการกำหนดสถานีเก็บตัวอย่าง ควรมีสถานีอ้างอิง ที่ไกลจากแหล่งสารมลพิษ เพื่อจะได้ทราบถึงความแตกต่างของการปนเปื้อนสารมลพิษได้อย่างชัดเจน

4. ควรศึกษาถึงสภาพแวดล้อมบางประการ เช่น ความเค็ม อุณหภูมิ ความเป็นกรดเป็นด่างในน้ำ ในสถานีที่เก็บตัวอย่าง เป็นต้น เพราะปัจจัยเหล่านี้มีส่วนสัมพันธ์ต่อการสะสมของโลหะหนักในสัตว์ทะเล

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University