อัตราการเพาะฟัก ลักษณะสัณฐานวิทยาและการเปลี่ยนแปลงของไข่หอยเชอรี่ (*Pomacea canailculata*) หลังสัมผัสกับสารเคมีทางการเกษตร

Hatching rate, morphological characteristic and alteration of golden apple snail's egg (*Pomacea canailculata*) after being exposed to agricultural chemicals

ชุติมา ถนอมสิทธิ์[1*] ลัดดาวรรณ บุญปก[1] ธนพงศ์ เปรียบเสนาดี[1] อำนวย วัฒนกรสิริ[2] หยาดเพชร โอเจริญ[3] จักรพันธุ์ นาน่วม[4] วิชชุดา ประสาทแก้ว[5] และ พอจิต นันทนาวัฒน์[6]

Chutima Thanomsit [1*], Laddawan Boonpok[1], Thanapong Preabsenadee[1], Amnuay Wattanakornsiri [2], Yhardpetch Ocharoen [3], Jakkaphun Nanuam[4], Witchuda Prasatkaew [5] and Phochit Nanthanawat [6]

[1]Department of Fisheries, Faculty of Agriculture and Technology, Rajamangala University of Technology Isan Surin Campus, Surin 32000 Thailand

[2]Program of Environmental Science, Faculty of Science and Technology, Surindra Rajabhat University, Surin 32000 Thailand

[3]Program of Environmental Science, Faculty of Science, Burapha University, Chonburi, 20131, Thailand

[4]Program of Natural resources and Environment, Faculty of Science and Social Sciences, Burapha University, Sakaeo 27160 Thailand

[5]Department of Environmental Science, Faculty of Science and Technology, Dhonburi Rajabhat University Samutprakan, Samutprakan 10540 Thailand

[6]Department of Biotechnology, Faculty of Science, Burapha University, Chonburi 20131 Thailand

*Corresponding author email address, chutima.tn@rmuti.ac.th

บทคัดย่อ

ทำการศึกษาการเพาะฟักไข่หอยเชอรี่ในสภาวะต่างๆ กัน โดยการทดลองจะแบ่งออกเป็น 5 ชุดคือ ไข่หอยเชอรี่ที่ได้รับสัมผัสกับน้ำ ไกลโฟเสทความเข้มข้น 1 ppm ไซเปอร์เมทรินความเข้มข้น 0.26 ppm และเมทัลดีไฮด์ความเข้มข้น 0.75 ppm โดยเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุมที่ไม่ได้รับสัมผัสสารเคมีทางการเกษตร ผลการศึกษาพบว่า ไข่หอยเชอรี่ทุกชุดการทดลองมีอัตราการเพาะฟักสูงกว่า 90% และไม่มีความแตกต่างกับชุดควบคุม ($p \geq 0.05$) โดยอัตราการเพาะฟักในกลุ่มควบคุมเฉลี่ยคือ 94±1.97% ส่วนไข่หอยที่ได้รับสัมผัสกับน้ำไกลโฟเสท ไซเปอร์เมทริน และเมทัลดีไฮด์เฉลี่ย 98.05±1.30 %, 92.88±3.16%, 94.32±3.46% และ 94.12±3.20% ตามลำดับ ลักษณะสัณฐานวิทยาของ ไข่หอยเชอรี่พบว่า การเปลี่ยนแปลงรูปร่างของไข่หอยเชอรี่จำแนกได้ 5 กลุ่ม คือ ลักษณะไข่ผิดปกติ เปลือกไข่ผิดปกติ ตัวอ่อนผิดปกติ เนื้อเยื่อเปื่อยยุ่ย และเกิดการเชื่อมกันของเซลล์เนื้อเยื่อ โดยพบว่าสารเคมีทางการเกษตรที่ก่อให้เกิดการเปลี่ยนแปลงสูงที่สุดคือ สารกำจัดแมลงไซเปอร์เมทริน หลังจากทำการสกัดโปรตีนจากไข่หอยเชอรี่ 2 ระยะ คือ ระยะแรกเริ่มของการวางไข่ (สีชมพูเข้ม) และระยะก่อนการฟักตัวของไข่ (สีชมพูอ่อน) พบว่ารูปแบบโปรตีนที่แยกมีลักษณะแตกต่างกัน พบว่า Perivitellin (PV) จำนวน 3 isoform ขนาดโมเลกุลของแถบโปรตีน 98, 67 และ 31 กิโลดาลตัน และ Ovorubin (Ov) ขนาด 28 กิโลดาลตัน ผลการทดลองครั้งนี้ชี้ให้เห็นว่าไข่หอยเชอรี่มีความทนทานต่อสารเคมีทางการเกษตรสูงมาก โดยไม่มีผลต่ออัตราการเพาะฟัก สามารถเป็นประโยชน์ในการประเมินประชากรหอยเชอรี่ในสิ่งแวดล้อม เพื่อแก้ไขปัญหาในเรื่องของการแพร่กระจายและการทำลายสัตว์ท้องถิ่นต่อไป

คำสำคัญ: อัตราการเพาะฟัก ยาฆ่าแมลง เพอริไวเทลลิน หอยเชอรี่

Abstract

This research aimed to examine on the hatching rate of golden apple snail. Five experimental conditions which based on what snail exposed; (a) water, (2) 1 ppm of glyphosate, (3) 0.26 ppm of cypermethrin, (4) 0.75 ppm of metaldehyde and (5) the control (without any exposure). The results shown that hatching rate of the snail was higher than 90% no statistical difference compared to the control ($p \geq 0.05$). The hatching rate in control group was 94±1.97% and the average rates found in exposure condition of water, glyphosate, cypermethrin and metaldehyde were 98.05±1.30%, 92.88±3.16%, 94.32±3.46% and 94.12±3.20%, respectively. For morphological study, the alterations could be classified into 5 groups; abnormal egg, egg shell deformed, fetus abnormal, decomposed tissue and the connection of tissue cells. The agrochemical causing highest alteration was cypermethrin. After the protein of snail egg in both stages; early spawning (dark pink) and early hatchery stage (light pink) were extracted, we found the difference in protein form were occurred. The important proteins found were 3 types comprising; Perivitellin 2 (Pv2) and Ovorubin (Ov). For Perivitellin 2 (Pv2) their molecular weight of protein were 98, 67 and 31 kDa while it was 28 kDa for Ovorubin. From our results, it indicated that golden apple snail highly tolerates to agrochemicals of high hatching rate. Therefore, this findings can be useful in assessing golden apple snail wild population that causing original habitat degradation.

Keywords: Hatching rate; Insecticide; Perivitellin; Ovorubin

บทนำ

ปัจจุบันประเทศไทยมีสิ่งมีชีวิตชนิดพันธุ์ต่างถิ่นอยู่มากกว่า 3,500 ชนิด และยังมีการนำเข้าอย่างต่อเนื่อง ด้วยหลายเหตุผลไม่ว่าจะด้วยความบังเอิญหรือจงใจก็ตาม แม้สิ่งมีชีวิตชนิดพันธุ์ต่างถิ่นบางชนิดจะมีประโยชน์ทั้งในด้านเศรษฐกิจ เกษตรกรรม และปศุสัตว์ เช่น พืชเศรษฐกิจ สมุนไพรรักษาโรค สัตว์เลี้ยง สัตว์เศรษฐกิจ รวมถึงการรวบรวมชนิดพันธุ์เพื่อการอนุรักษ์ ซึ่งจะมีประโยชน์ต่อการอ้างอิงและขยายพันธุ์ในอนาคต อย่างไรก็ตามเมื่อสัตว์ชนิดพันธุ์ต่างถิ่นเหล่านี้เมื่อนำเข้ามา และสามารถปรับตัวให้เข้ากับสภาพแวดล้อมและแพร่ขยายพันธุ์กลายเป็นชนิดพันธุ์ที่รุกรานได้ จะส่งผลต่อการเปลี่ยนแปลงของระบบนิเวศ หรือทำให้เกิดการครองพื้นที่โดยชนิดพันธุ์เดียว ทำให้สิ่งมีชีวิตพื้นเมืองสูญพันธุ์ และสร้างผลกระทบต่อความหลากหลายทางชีวภาพไปจนถึงการสาธารณสุข สิ่งแวดล้อม เศรษฐกิจและสังคมได้ในที่สุด (Chalermchutipapha, 2010)

หอยเชอรี่ (Golden Apple Snail) มีชื่อเรียกอีกอย่างหนึ่งว่า หอยโข่งอเมริกาใต้ หรือเป๋าฮื้อน้ำจืด จัดเป็นสัตว์ต่างถิ่นที่มีถิ่นกำเนิดในทวีปอเมริกาใต้ และเข้ามาในประเทศไทยผ่านเข้ามาจากประเทศญี่ปุ่นและประเทศฟิลิปปินส์ (Chankao, 2004) ในปี พ.ศ. 2553 มีรายงานว่าหอยเชอรี่ถูกจัดเป็นสัตว์ต่างถิ่นในลำดับที่ 11 ซึ่งสร้างความเสียหายให้กับสัตว์พื้นเมืองต่าง ๆ เนื่องจากหอยเชอรี่มีอัตราการขยายพันธุ์ที่รวดเร็ว เจริญเติบโตไว สามารถกินอาหารได้หลากหลายประเภท และมีความสามารถในการปรับตัวให้เข้ากับสิ่งแวดล้อมได้ดีมากทำให้พบหอยเชอรี่ได้ตามสิ่งแวดล้อมทั่วไป (Chalermchutipapha, 2010) หอยเชอรี่เพศ

เมียสามารถวางไข่ได้ตลอดทั้งปี โดยเฉพาะในฤดูฝนจะวางไข่ได้ 10-14 ครั้งต่อเดือน ลักษณะของไข่หอยเชอรี่คือไข่จะเป็นเม็ดเล็กๆ เกาะติดกันเป็นกลุ่มๆ ละประมาณ 300-3,000 ฟอง และไข่สามารถฟักเป็นตัวหอยได้ภายใน 7-12 วัน (Chooprateep, 2014) จึงทำให้หอยเชอรี่เพิ่มปริมาณได้อย่างรวดเร็วและสามารถแพร่กระจายไปสู่แหล่งน้ำและนาข้าวในพื้นที่ต่างๆ ได้ ดังนั้นหอยเชอรี่จึงกลายเป็นศัตรูพืชที่สำคัญในพื้นที่ทำการเกษตรและพื้นที่ที่ไม่ใช่พื้นที่การเกษตร ส่งผลกระทบต่อผลผลิตข้าว ผลผลิตทางการเกษตรอื่นๆ พืชน้ำ และสัตว์ชนิดอื่น รวมถึงยังส่งผลกระทบต่อความหลากหลายทางชีวภาพ โดยเฉพาะอย่างยิ่งปัญหาที่พบกับหอยโข่งพันธุ์พื้นเมือง เนื่องจากหอยโข่งพันธุ์พื้นเมือง *Pila ampullacea* Linnaeus, 1758 (Phosri and Laemkom, 2017) และหอยเชอรี่เป็นหอยในวงศ์เดียวกันมีความต้องการและมีบทบาทหน้าที่ในระบบนิเวศเหมือนกันจึงก่อให้เกิดภาวะการแข่งขันกันในระบบนิเวศ (Aroonsrimorakot *et al*., 2002)

การกำจัดหอยเชอรี่วิธีที่นิยมใช้ได้แก่ วิธีกล โดยการเก็บหอยทำลายด้วยการทำที่ดักหอยขณะปล่อยน้ำเข้านา รวมทั้งการใช้ใบไม้ เช่น ใบกล้วย และใบมะละกอเพื่อล่อให้หอยล่อให้หอยเข้ามากิน การกำจัดด้วยชีววิธีโดยการใช้ศัตรูธรรมชาติ เช่น เป็ด นกกระยาง นกปากห่าง นกอีลุ้ม การใช้ปลาคาร์พและปลาดุกแอฟริกันกินหอยเชอรี่ (Teo, 2006) อย่างไรก็ตามวิธีต่างๆ ก็มีข้อดีข้อเสียแตกต่างกันไป ที่สำคัญอาจไม่สามารถป้องกันได้ทันเวลา และยังต้องใช้แรงงานและเวลามาก ดังนั้นการใช้สารเคมีเพื่อกำจัดหอยเชอรี่จึงเป็นทางเลือกหนึ่ง โดยใช้สารเคมีที่กำจัดหอยทาก (Molluscicide) ที่นิยมใช้กันมากคือเมทัลดีไฮด์ (Metaldehyde) แต่มีข้อเสียคืออาจก่อให้เกิดพิษต่อสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม ยิ่งไปกว่านั้นในบางพื้นที่มีการใช้สารเคมีเพื่อกำจัดศัตรูพืชและใช้ผิดประเภทเพื่อควบคุมสัตว์ชนิดอื่นก็จะก่อให้เกิดการตกค้างของสารในกลุ่มดังกล่าวตามมา อย่างไรก็ตามหากใช้ความเข้มข้นไม่สูงพอก็อาจจะไม่ก่อให้เกิดการตาย แต่อาจจะเกี่ยวข้องกับพันธุกรรม ดีเอ็นเอ หรือโครงสร้างทางสัณฐานวิทยาทั้งภายและภายนอก ยิ่งไปกว่านั้นหากหอยเชอรี่มีความทนทานและเกิดการตายหลังจากได้รับสารเคมีในกลุ่มดังกล่าวก็จะทำให้เกิดการสะสม และถ่ายทอดไปตามห่วงโซ่อาหาร ซึ่งมนุษย์ที่เป็นผู้บริโภคลำดับสูงสุดก็จะได้รับผลกระทบต่อสุขภาพ (Thanomsit *et al.,* 2017)

การวิจัยในครั้งนี้จึงเป้าหมายเพื่อศึกษาการเพาะฟักและความทนทานของไข่หอยเชอรี่หลังจากได้รับสัมผัสสารเคมีทางการเกษตรชนิดต่าง ๆ ซึ่งยังไม่ได้มีรายงาน ส่วนใหญ่เกี่ยวข้องกับการใช้ประโยชน์จากหอยเชอรี่และการกำจัดหอยเชอรี่โดยใช้ชีววิธี การศึกษาถึงสภาวะการสัมผัสของสารเคมีทางการเกษตรแบบชั่วคราวจะทำให้ทราบถึงการเปลี่ยนแปลงที่เกิดขึ้นได้จริงในสภาพแวดล้อมทั่วไปเพราะในปัจจุบันการใช้สารเคมีทางการเกษตรพบได้ทั่วไปในทุกภาคของประเทศไทย สำหรับในการศึกษาครั้งนี้จะทำการตรวจสอบความทนทานของไข่หอยเชอรี่โดยประเมินจากอัตราการเพาะฟัก ลักษณะสัณฐานวิทยา และรูปแบบของโปรตีนที่พบในไข่หอย เพื่อจะเป็นประโยชน์ในการวางแผนการจัดการสิ่งแวดล้อมและการควบคุมประชากรหอยเชอรี่ต่อไป

วิธีการทดลอง

1. สารเคมีที่ใช้ในการวิจัย

สารเคมีทางการเกษตรที่นำมาใช้ในการศึกษาอยู่ในรูปแบบทางการค้าและอยู่ในรูปสารละลายคือ ไกลโฟเสท (ไอโซโพพริลแอมโมเนียม 48% w/v, SL) ไซเปอร์เมทริน (ความเข้มข้น 25% w/v) ส่วนเมทัลดีไฮด์ (เมทัลดีไฮด์ 5 % GB) นั้นจะเป็นผลึกขนาดใหญ่ต้องนำมาละลายน้ำ สารเคมีทั่วไปที่ใช้ในการศึกษาเป็นชนิดเกรดวิเคราะห์ และสารเคมีที่ใช้ในการทำเจลลิเลคโตรโฟรีซีสเป็นผลิตภัณฑ์ของบริษัท Bio-Rad

2. สัตว์ทดลอง

ในการศึกษาครั้งนี้ทำการสุ่มเก็บไข่หอยเชอรี่ จากบริเวณอ่างเก็บน้ำห้วยเสนง อำเภอเมือง จังหวัดสุรินทร์ โดยไข่หอยที่นำศึกษาจะมี 2 ระยะคือไข่หอยเชอรี่ระยะแรกเริ่มของการวางไข่ (ฝักไข่มีสีชมพูเข้ม) และไข่ระยะที่เตรียมตัวฟัก (ฝักไข่มีสีชมพูอ่อน) โดยขนาดของฝักไข่หอยเชอรี่มีความกว้างโดยเฉลี่ย 1.70±0.26 เซนติเมตร ความยาวโดยเฉลี่ย 3.98±0.48 เซนติเมตร และน้ำหนักเฉลี่ย 3.29±0.76 กรัม ตามลำดับ โดยนำไข่หอยเชอรี่มาทำการฉีดพ่นและแช่ในน้ำที่มีสารเคมีทางการเกษตรซึ่งเป็นการได้รับสัมผัสแบบชั่วคราว หลังจากนั้นปล่อยให้น้ำและสารเคมีที่ละลายอยู่ค่อยๆ ระเหยไป โดยในการทดลองจะใช้สารเคมีทางการเกษตร 3 ชนิด คือ ไกลโฟเสท ไซเปอร์เมทริน และเมทัลดีไฮด์ เปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุมและกลุ่มที่ได้รับสัมผัสกับน้ำ โดยระดับความเข้มข้นที่ใช้จะอ้างอิงจากค่ามาตรฐานระดับความเป็นพิษสำหรับการศึกษาผลกระทบที่มีต่อสัตว์น้ำ

3. การศึกษาเปอร์เซ็นต์อัตราการฟักของไข่หอยเชอรี่และ การศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาของไข่หอยเชอรี่

ในการศึกษาเปอร์เซ็นต์อัตราการฟักของหอยเชอรี่นำไข่หอยเชอรี่ระยะแรกเริ่มของการวางไข่ (ฝักไข่สีชมพูเข้ม) มาสัมผัสกับสารเคมีทางการเกษตร คือ ไกลโฟเสทความเข้มข้น 1 ppm ไซเปอร์เมทรินความเข้มข้น 0.26 ppm และเมทัลดีไฮด์ 0.75 ppm แบบชั่วคราวเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุมและกลุ่มที่ได้รับสัมผัสกับน้ำ โดยในการศึกษาถึงเปอร์เซ็นต์การเพาะฟักนี้ไข่ถูกนำมาวางบนจานแก้วเพาะเชื้อและเตรียมน้ำที่มีสารเคมีทางการเกษตรโดยปริมาตรน้ำที่มีสารเคมีทางการเกษตรละลายอยู่จะถูกนำมาเติมลงไปในจานแก้วเพาะเชื้อโดยปริมาตรของน้ำคือ 20 มิลลิลิตร ในการศึกษาจะทำทั้งหมด 3 ซ้ำ ตรวจสอบการฟักของไข่ทุกๆ 24 ชั่วโมง แล้วเปรียบเทียบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยอัตราเปอร์เซ็นต์การฟักไข่จากแต่ละชุดการทดลองด้วยการวิเคราะห์ความแปรปรวนแบบปัจจัยเดียว (One Way Analysis of Variance ; ANOVA) ที่ระดับความเชื่อมั่น 95% โดยใช้โปรแกรม Minitab 18

การศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาของไข่หอยเชอรี่นั้นทำการตรวจสอบภายใต้กล้องจุลทรรศน์กำลังขยาย 4 เท่า และทำการสุ่มไข่ที่มีการฟักครั้งละ 100 ฟอง จำนวน 3 ซ้ำ เพื่อประเมินลักษณะอาการต่าง ๆ ที่เปลี่ยนไปเมื่อได้รับสัมผัสสารเคมีแล้วคำนวณหาเปอร์เซ็นต์อัตราการเปลี่ยนแปลงทางสัณฐานวิทยาของไข่และตัวอ่อนที่พบ

4. การสกัดไข่หอยเชอรี่เพื่อศึกษารูปแบบของโปรตีนและการวัดปริมาณโปรตีน

นำไข่หอยเชอรี่ทั้งสองระยะคือ ไข่หอยเชอรี่ระยะแรกเริ่มของการวางไข่ (ฝักไข่มีสีชมพูเข้ม) และไข่ระยะที่เตรียมตัวฟัก (ฝักไข่มีสีชมพูอ่อน) มาบดให้ละเอียดในสารละลายทริสไฮโดรคลอไรด์บัฟเฟอร์ pH 7.2 ที่มีส่วนผสมของ PMSF (Phenylmethylsulfonyl fluoride) และ Triton X-100 ในอัตราส่วนไข่หอยเชอรี่ 1 กรัม ต่อสารละลายบัฟเฟอร์ 1 ml หลังจากนั้นนำตัวอย่างที่ได้ไปปั่นเหวี่ยงที่อุณหภูมิ 4 °C เป็นเวลา 60 นาที ที่ความเร็วรอบ 350 RCF นำส่วนใสที่ได้ไปวิเคราะห์ปริมาณโปรตีนเทียบกับสารมาตรฐาน BSA

5. การศึกษารูปแบบของโปรตีนโดยเทคนิคเจลอิเลคโทรโฟรีซีส

ศึกษารูปแบบของโปรตีนจากไข่หอยเชอรี่ด้วยเครื่อง mini PROTEIN® Tetra Cell โดยใช้ Separating gel 10 % และ Stacking gel 4% ปรับกระแสไฟฟ้าที่ต้องการแยกเป็น 110 โวลต์ ปล่อยให้แถบสีเคลื่อนที่ลงไปจนเกือบถึงปลายสุดของแผ่นเจล และแกะชุดกระจกออกมาหลังจากนั้นนำแผ่นเจลออกจากชุดกระจก ตัดส่วนของแผ่นเจลที่เป็น Stacking Gel ออก นำแผ่นเจลส่วนไปย้อมสี 0.1% Coomassie Brilliant blue R-250 เป็นเวลา 2 ชั่วโมง แล้วล้างสีส่วนที่ไม่ต้องการออกด้วยน้ำยาล้างสีย้อมโปรตีน หลังจากนั้นล้างแผ่นเจลด้วยน้ำกลั่น เพื่อดูแถบโปรตีนและบันทึกผลแถบโปรตีนที่พบเปรียบเทียบกับโปรตีนมาตรฐานที่ทราบขนาดโมเลกุล (Precision Plus Protein Standard Dual color, Bio-Rad) (ดัดแปลงจาก Thanomsit *et al.,* 2017)

ผลการวิจัย

1. อัตราการเพาะฟักของไข่หอยเชอรี่เมื่อได้รับสัมผัสสารเคมีทางการเกษตรชนิดต่าง ๆ

การศึกษาเปอร์เซ็นต์อัตราการเพาะฟักของหอยเชอรี่พบว่าหลังจากที่ไข่หอยเชอรี่ได้รับสัมผัสกับสารเคมีทางการเกษตรชนิดต่างๆ แบบชั่วคราว และได้รับสัมผัสกับน้ำซึ่งใช้เป็นใช้เป็นตัวทำละลายสารเคมีเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม พบว่าการฟักของไข่หอยจะเกิดขึ้นในวันที่ 4 ของการศึกษา โดยการฟักจะใช้เวลาทั้งสิ้น 9 วัน (Figure 1) อัตราการฟักของไข่หอยเชอรี่ในแต่ละกลุ่มที่ทำการศึกษาอยู่ในระดับสูง คือมากกว่า 90% โดยอัตราการเพาะฟักของไข่ในแต่ละกลุ่มมีค่าที่ไม่แตกต่างกันทางสถิติ ($p \geq 0.05$) โดยอัตราการเพาะฟักของไข่หอยในกลุ่มควบคุมเท่ากับ 94±1.97% ไข่หอยเชอรี่ที่ได้รับสัมผัสกับน้ำเท่ากับ 98.05±1.30% ไข่หอยเชอรี่ที่ได้รับสัมผัสกับไกลโฟเสทมีค่าเท่ากับ 92.88±3.16%

ส่วนไข่หอยเชอรี่ที่ได้รับสัมผัสกับไซเปอร์เมทรินมีค่าเท่ากับ 94.32±3.46% และไข่หอยเชอรี่ที่ได้รับสัมผัสกับเมทัลดีไฮด์จะมีค่าเฉลี่ยอัตราการเพาะฟักคิดเป็น 94.12±3.20% (Figure 2) เมื่อทำการศึกษาถึงระยะเวลารวมของการฟักของไข่หอยเชอรี่พบว่าหอยเชอรี่ในกลุ่มควบคุม (Figure 3) กลุ่มที่ได้รับสัมผัสกับน้ำ (Figure 4) และกลุ่มที่ได้รับสัมผัสกับไซเปอร์เมทรินที่ระดับความเข้มข้น 0.26 ppm (Figure 6) นั้นจะเริ่มการฟักก่อนกลุ่มที่ได้รับสัมผัสกับไกลโฟเสทและเมทัดดีไฮด์ โดยใช้เวลาตั้งแต่การฟักออกจากไข่จนถึงระยะที่มีการพัฒนาเป็นตัวอ่อนและเป็นลูกหอยขนาดเล็กทั้งหมดเป็นเวลา 9 วัน ส่วนกลุ่มที่ได้รับสัมผัสกับไกลโฟเสทระดับความเข้มข้น 1 ppm จะใช้เวลา 12 วัน (Figure 5) และกลุ่มที่ได้รับสัมผัสกับเมทัลดีไฮด์ที่ระดับความเข้มข้น 0.75 ppm จะใช้เวลาทั้งหมด 10 วัน (Figure 7)

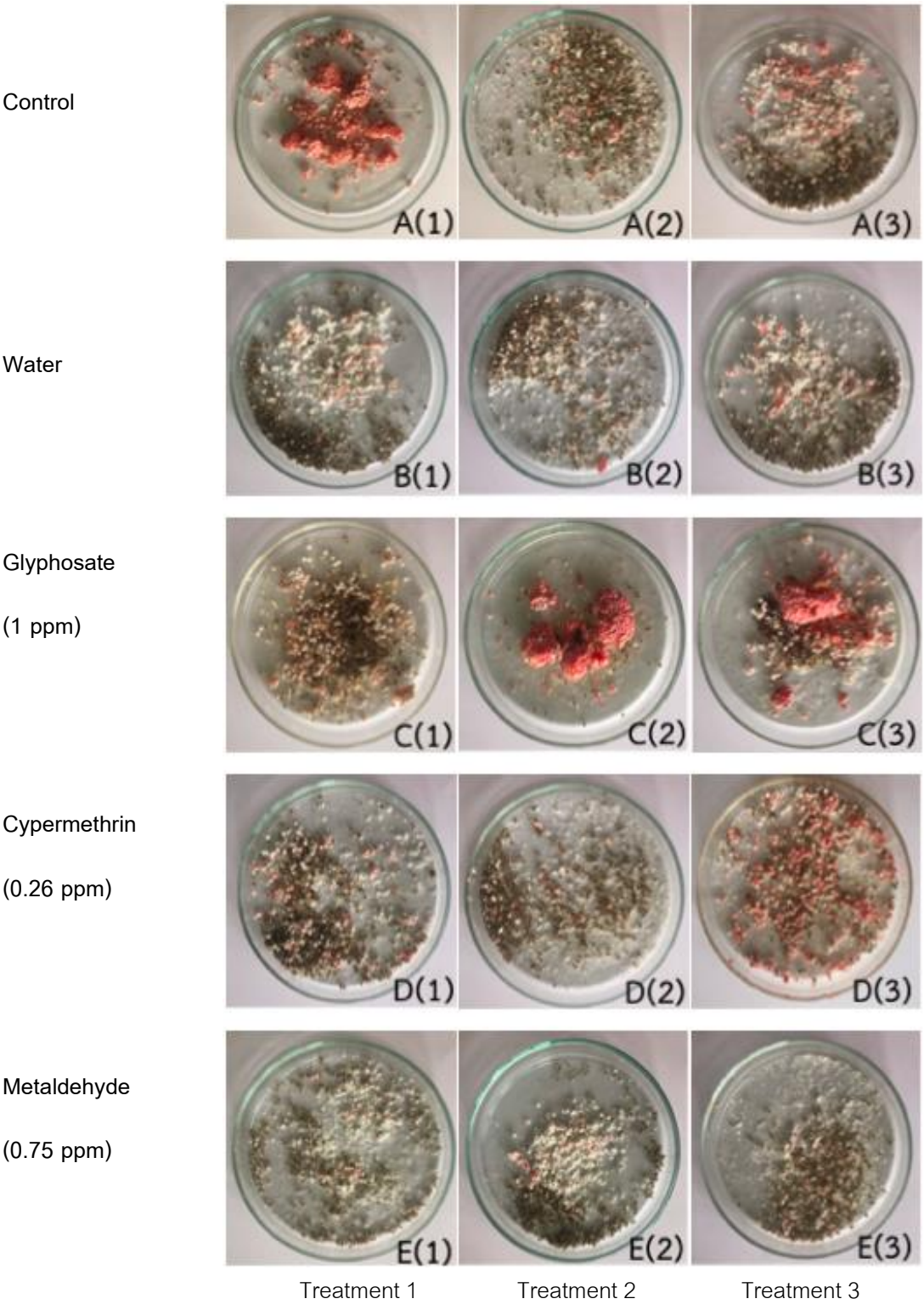

Figure 1 Hatching of apple snail egg after exposed to agro-chemicals (C, D and E) for 6 days comparing to the control group and water immersed group (6 days) (A and B)

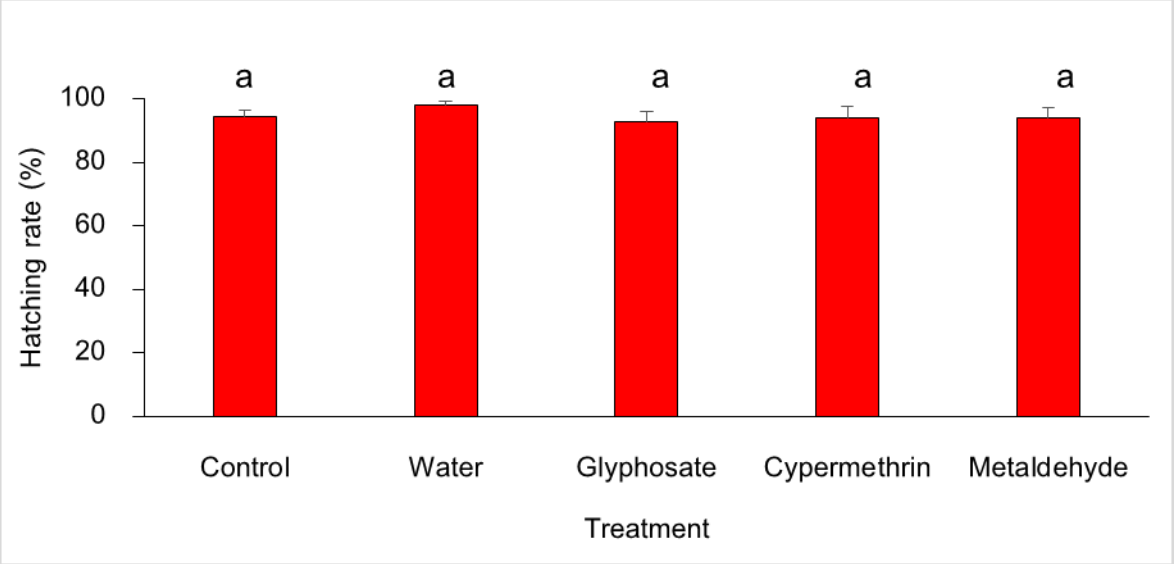

Figure 2 Hatching rate of golden apple snail after exposed to agro-chemicals comparing to the control group and water immersed group (p=0.05) (similar English letters means no statistically different calculated by using Minitab 18 software)

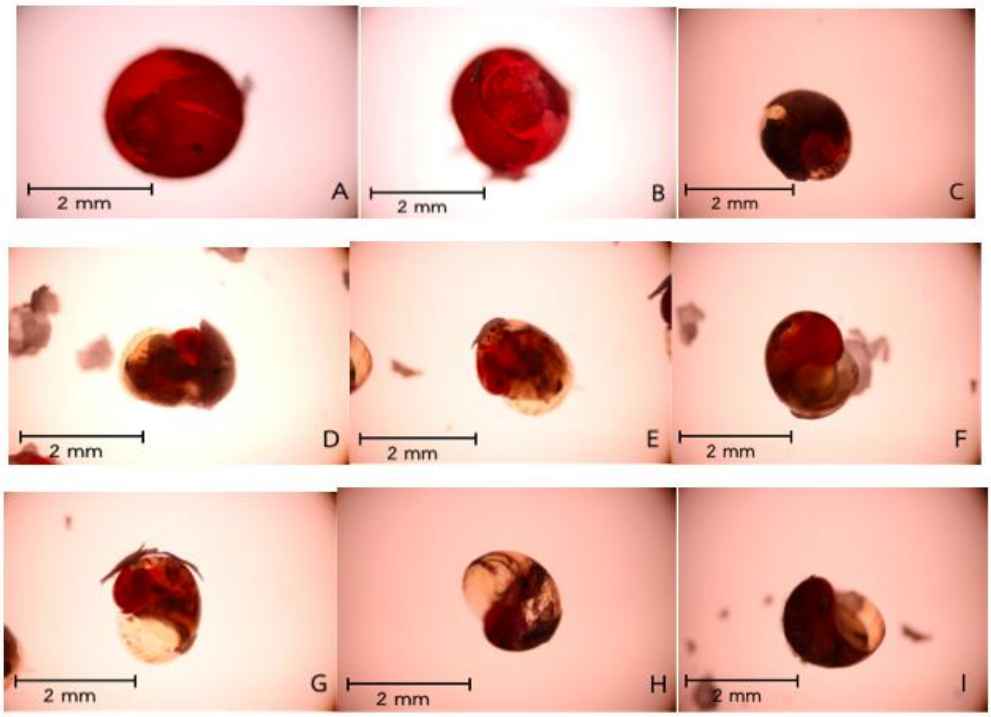

Figure 3 Morphological characteristics of golden apple snail egg in the control group until the hatching stage. It took 9 days for hatching and developing the embryo (4 x)

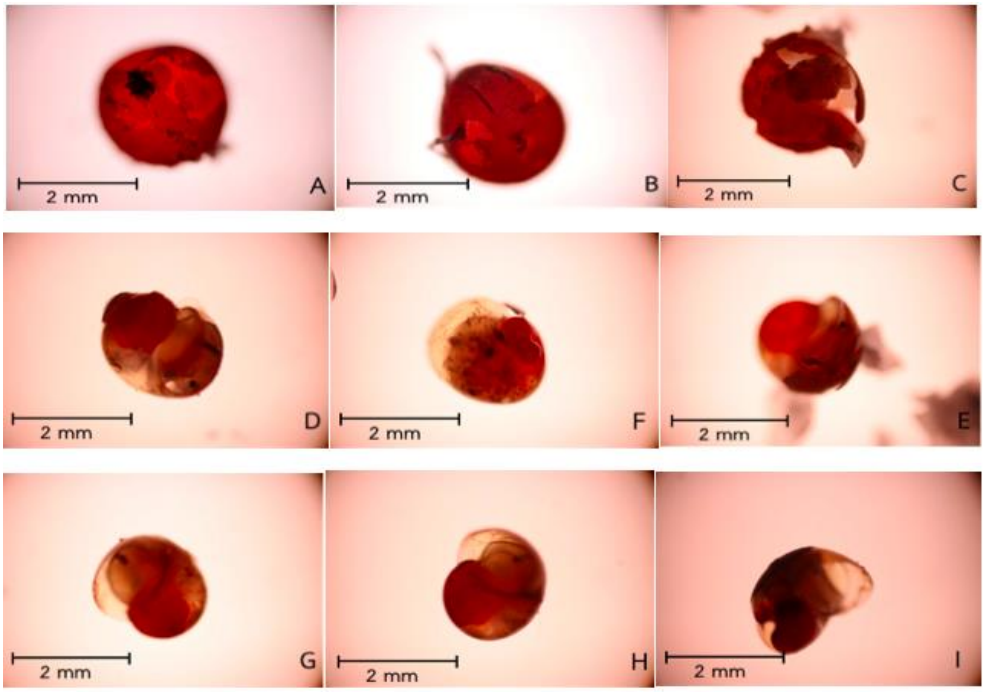

Figure 4 Morphological characteristics of golden apple snail egg in the water immersed group until the hatching stage. It took 9 days for hatching and developing the embryo (4 x)

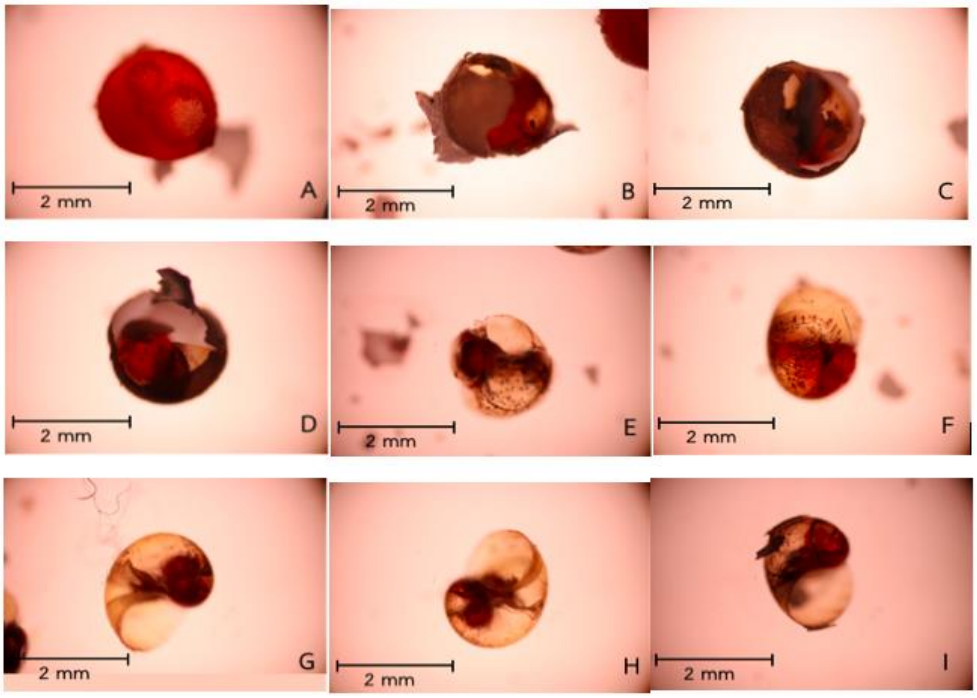

Figure 5 Morphological characteristics of golden apple snail egg in the glyphosate-exposed group until the hatching stage. It took 12 days for hatching and developing the embryo (4 x)

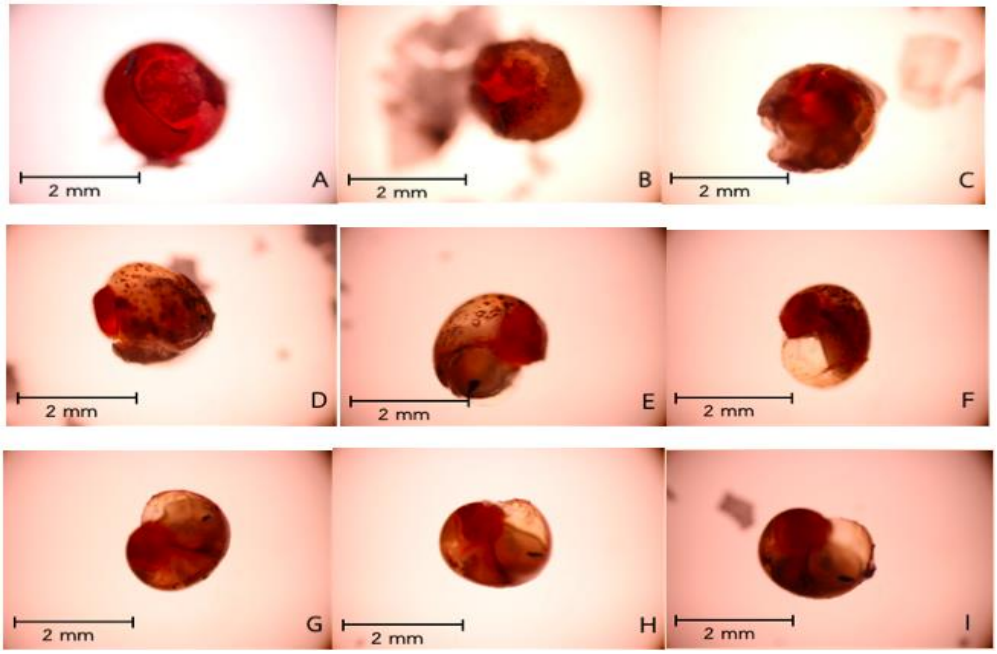

Figure 6 Morphological characteristics of golden apple snail egg in the cypermethrin-exposed group until the hatching stage. It took 9 days for hatching and developing the embryo (4 x)

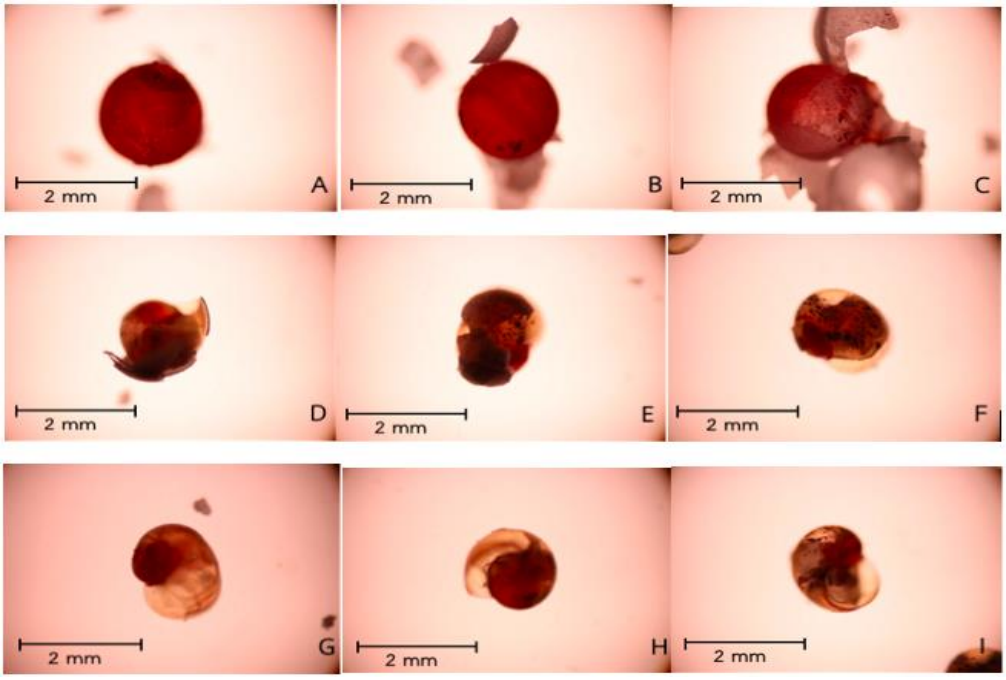

Figure 7 Morphological characteristics of golden apple snail egg in the metaldehyde exposed group until the hatching stage. It took 10 days for hatching and developing the embryo (4 x)

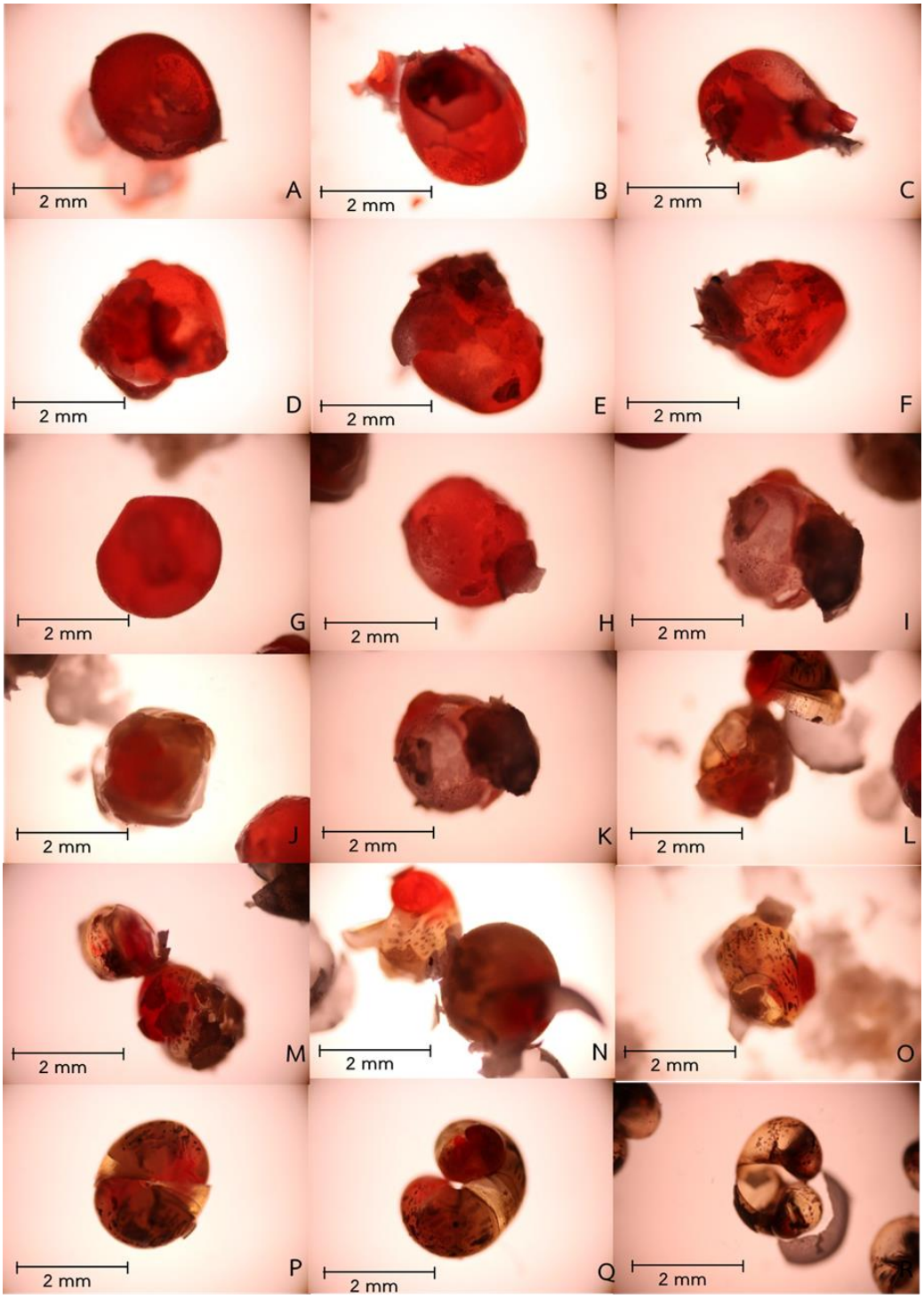

Figure 8 The symptoms noticed after exposure to agro-chemicals; abnormal eggs (I-K), abnormal eggshell (I-K), embryonic abnormalities (L-N), decayed tissue (O), and connected cellular (P-R) (4 x)

2. ผลการศึกษาสัณฐานวิทยาและพัฒนาการของไข่หอยเชอรี่

หลังจากที่นำไข่หอยเชอรี่มาเพาะฟักในสภาวะแวดล้อมต่างๆ โดยให้รับสัมผัสกับสารเคมีทางการเกษตรชนิดต่างๆ แบบชั่วคราว พบอาการผิดปกติที่ตรวจพบได้ในไข่หอยเชอรี่ตั้งแต่ฟัก พัฒนาเป็นตัวอ่อนจนกระทั่งกลายเป็นลูกหอยขนาดเล็ก (Figure 8) โดยพบว่าเมื่อได้รับสัมผัสสารในกลุ่มต่างๆ จะเกิดการเปลี่ยนแปลงได้ 5 ลักษณะ คือ เกิดการผิดปกติของไข่และเปลือกไข่มีอาการผิดปกติโดยการมีเปลือกที่บางมาก ตัวอ่อนผิดปกติ เนื้อเยื่อเปื่อยยุ่ย และเกิดการเชื่อมกันหรือรวมตัวกันของเซลล์ เมื่อเปรียบเทียบลักษณะอาการที่เกิดขึ้นพบว่าไข่หอยเชอรี่ที่ได้รับสัมผัสกับไซเปอร์เมทรินจะแสดงอาการที่ผิดปกสูงที่สุด คือ ไข่ผิดปกติ 7.33±0.58% เปลือกไข่ที่พบอาการปกติ 4.67± 0.58% ตัวอ่อนมีลักษณะผิดปกติคิดเป็น 2.67±0.58% เกิดอาการเนื้อเยื่อเปื่อยยุ่ยคิดเป็น 1.67±0.58% และเกิดการเชื่อมกันของเซลล์ตัวอ่อนและเปลือกหอยคิดเป็น 1.33±0.58% สำหรับการศึกษาสัณฐานวิทยาและพัฒนาการของไข่หอยเชอรี่ที่พบในกลุ่มควบคุมพบเพียงอาการผิดปกติของไข่คิดเป็น 1.33±0.58% (Figure 9)

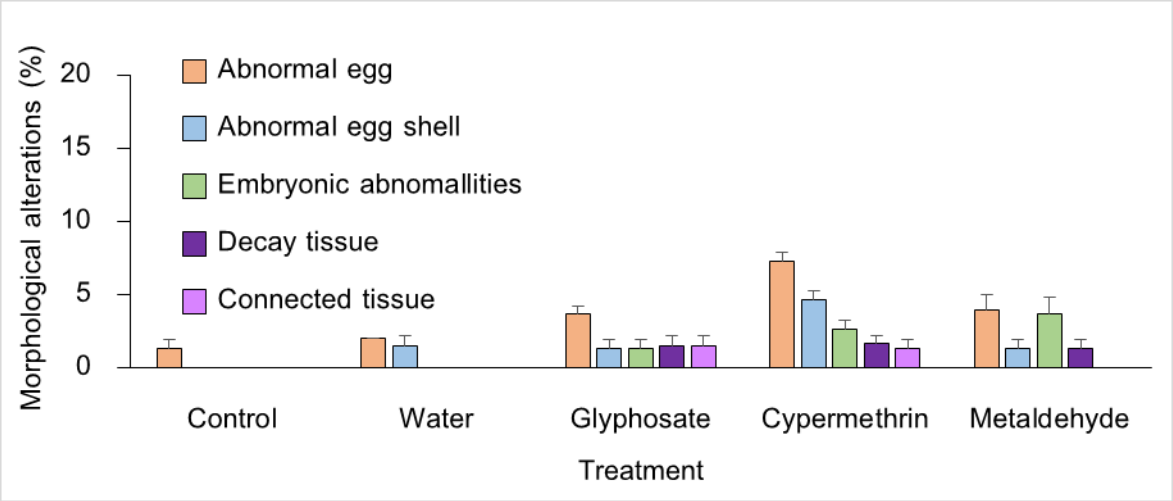

Figure 9 Morphological alterations of golden apple snail egg and its embryo after exposure to agricultural chemicals

3. ผลการศึกษารูปแบบของโปรตีนที่พบในไข่หอยเชอรี่

เมื่อทำการศึกษารูปแบบของโปรตีนที่พบในไข่หอยเชอรี่ทั้งสองระยะ คือไข่หอยเชอรี่ระยะแรกเริ่มการวางไข่ (ฝักไข่มีสีชมพูเข้ม : Figure 10 lane 2-4) และไข่ระยะที่เตรียมตัวฟัก (ฝักไข่มีสีชมพูอ่อน : Figure 10 lane 5-6) โดยเปรียบเทียบกับโปรตีนมาตรฐาน (Figure 10 lane 1) พบว่าไข่หอยระยะแรกซึ่งมีลักษณะเป็นสีชมพู เมื่อทำการสกัดพบว่าโปรตีนที่แยกได้จะมีหลายชนิดและมีปริมาณโปรตีนที่สูงกว่าไข่หอยเชอรี่ในระยะที่เตรียมจะฟักโดยโปรตีนหลักที่สำคัญที่พบในไข่หอยเชอรี่ในระยะแรกที่หอยวางไข่ได้แก่โปรตีน Perivitellin 2 ซึ่งมีทั้งหมด 3 form ซึ่งมีขนาดโมเลกุลประมาณ 98 kDa, 67 kDa และ 31 kDa ตามลำดับโดย Perivitellin 2 ที่เป็นโปรตีนหลักซึ่งมีขนาดโมเลกุล 67 kDa จะมีลักษณะเป็นแถบโปรตีนขนาดใหญ่และมีแถบหนากว่า

เมื่อเปรียบเทียบกับ Perivitellin 2 ที่มีโมเลกุลขนาด 98 และ 31 kDa ส่วนโปรตีนที่สำคัญที่พบเฉพาะในไข่หอยเชอรี่ระยะแรกที่หอยเชอรี่เริ่มวางไข่คือ Ovorubin ซึ่งมีขนาดแถบโปรตีนขนาดโมเลกุลประมาณ 28 kDa เมื่อเปรียบเทียบปริมาณโปรตีนและรูปแบบของโปรตีนที่พบในไข่ระยะแรกที่แม่หอยวางไข่กับไข่หอยระยะที่กำลังจะฟักนั้นพบว่าแถบโปรตีนและปริมาณโปรตีนที่พบในระยะที่ไข่กำลังจะฟักนั้นจะน้อยกว่า โดยไข่หอยที่กำลังจะฟักแถบโปรตีนหลักที่พบคือ Perivitellin 2 ที่มีขนาดโมเลกุล 67 kDa เท่านั้น และ Ovorubin ที่พบมีขนาดแถบโปรตีน 28 kDa ซึ่งลักษณะของแถบโปรตีนที่พบจะมีขนาดบางกว่าและมีสีซีดกว่า (Figure 10)

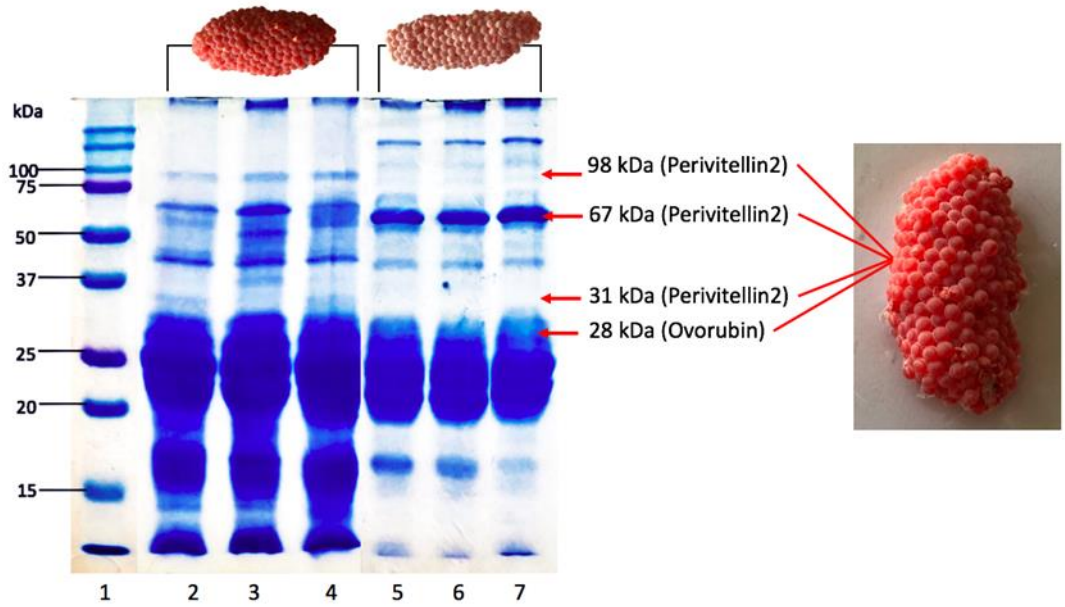

Figure 10 Form of protein extracted from golden apple snail egg which being examined by gel electrophoresis (10% SDS-PAGE); early egg lying (pink, lane 2-4) and Pre-hatching stage (light pink, lane 5-6) comparing to standard protein (lane 1). The important proteins found were Perivitellin (98 kDa, 67 kDa and 31 kDa) and Ovorubin (28 kDa)

อภิปรายผลการทดลอง

หอยเชอรี่ (Golden Apple Snail, *Pomacea canailculata*) เป็นหอยฝาเดียวชนิดหนึ่ง มีถิ่นกำเนิดในแอฟริกาจัดเป็นสิ่งมีชีวิตต่างถิ่นที่รุกรานชนิดพันธุ์พื้นเมืองของไทย (Alien species) (Jintasataporn *et al*., 2004) โดยทั่วไปแล้วหอยน้ำจืดถูกจัดว่าเป็นผู้บริโภคลำดับต้นในห่วงโซ่อาหารที่มีความเสี่ยงในการได้รับสัมผัสสารกำจัดศัตรูพืชในสิ่งแวดล้อมทางผ่านการกินอาหาร เช่น การกรองกินแพลงตอนหรือกัดกินพืชน้ำต่างๆ รวมทั้งต้นข้าวในนาที่มีการใช้สารปราบศัตรูพืชฉีดพ่น นอกจากนี้ยังอาจได้รับสัมผัสสารกำจัดศัตรูพืชที่ละลายอยู่ในแหล่งน้ำสะสมในดินโคลนหรือตะกอนในแหล่งน้ำที่อาศัยอยู่ ยิ่งไปกว่านั้นหอยเชอรี่หรือหอยฝาเดียวชนิดต่างๆ จะอาศัยอยู่ในบริเวณแหล่งน้ำนิ่ง ซึ่งทำให้มีการสะสมของสารพิษและได้รับสัมผัสเป็นเวลานาน จึงถือเป็นสัตว์น้ำที่มีโอกาสได้รับและสะสมสารพิษไว้ในร่างกายได้มาก ดังนั้น หอยฝาเดียว เช่น หอยเชอรี่และหอยขมจึงถูกนำมาใช้เป็นตัวชี้วัดของการรับสัมผัสสารเคมีหลายชนิด เช่น โลหะหนัก (Heavy metals) ไตรบิวทิลทิน

(Tributyltin) และยาฆ่าแมลง (Insecticide) เป็นต้น (Piyatiratitivorakul and Boonchamoi, 2008; Putkome *et al*., 2008; Martínez *et al*., 2017). ในขณะเดียวกันการบริโภคหอยฝาเดียวจากบริเวณที่มีการใช้สารปราบศัตรูพืชจึงมีโอกาสที่ได้รับสารกัดจัดศัตรูพืชผ่านทางห่วงโซ่อาหาร ซึ่งอาจสะสมเป็นอันตรายต่อมนุษย์ (Thanomsit *et al*., 2017) หอยเชอรี่มีการขยายพันธุ์และเพิ่มจำนวนได้อย่างรวดเร็วมากกว่าหอยน้ำจืดชนิดอื่นๆ โดยไข่หอยเชอรี่จะมีการฟักตัวอย่างรวดเร็วและมีไข่ในฝักไข่จำนวนมาก และที่สำคัญหอยเชอรี่มีการปรับตัวและแก่งแย่งพื้นที่ได้ดีกว่าหอยฝาเดียวพื้นเมืองบางชนิด เช่น หอยโข่ง จึงเป็นสาเหตุให้หอยในธรรมชาติบางชนิดลดลงเมื่อมีการเพิ่มจำนวนประชากรของหอยเชอรี่ (Phosri and Laemkom, 2017) สำหรับในประเทศเบื้องต้นยังไม่มีรายงานถึงการฟักของไข่หอยเชอรี่เมื่อสัมผัสกับสารเคมีทางการเกษตรต่างๆ ดังนั้นการศึกษาครั้งนี้จึงเป็นการจำลองสภาพธรรมชาติเพื่อให้ทราบถึงความทนทานและความสามารถในการเพาะฟักของหอยเชอรี่และปัจจัยที่ต้องศึกษาเพิ่มเติมต่อไปคือหากได้สัมผัสแต่ไม่ก่อให้เกิดการตายและเกิดการสะสมสารพิษไว้ในร่างกายก็อาจจะส่งผลต่อหอยและผู้บริโภค ซึ่งในปัจจุบันพบว่าประชากรในภาคอีสานมีการบริโภคหอยเชอรี่ด้วย ดังนั้นการศึกษาครั้งนี้จึงเป็นจุดเริ่มต้นของการศึกษาทั้งทางพิษวิทยาและสิ่งแวดล้อมรวมทั้งทรัพยากรประมงด้วยเพราะหอยเชอรี่คือสัตว์ต่างถิ่นที่นำเข้ามาในประเทศไทย ซึ่งหากประเมินถึงความหลากหลายทางชีวภาพก็มีผลกระทบในอนาคตอย่างแน่นอน

การศึกษาอัตราการเพาะฟักของหอยเชอรี่เพื่อประเมินความทนทาน และการเปลี่ยนแปลงลักษณะทางสัณฐานวิทยาเมื่อไข่หอยเชอรี่ได้รับสัมผัสสารเคมีทางการเกษตรในชนิดต่าง ๆ โดยรูปแบบการได้รับสัมผัสเป็นแบบชั่วคราวนั้นพบว่าการได้รับสัมผัสสารเคมีทางการเกษตรต่าง ๆ คือ ไกลโฟเสท ไซเปอร์เมทริน และเมทัลดีไฮด์ ไม่มีผลต่ออัตราการเพาะฟักไข่ แสดงให้เห็นว่าไข่หอยเชอรี่มีความทนทานต่อการได้รับสัมผัสสารพิษสูง โดยจำนวนไข่ที่ฟักได้จะอยู่ในช่วง 690-747 ฟอง ในขณะที่การเลี้ยงหอย *C. ramosus* ในประเทศไทยในช่วงเดือนสิงหาคมถึงเดือนเมษายน พบว่าความสามารถในการฟักไข่ใน ห้องปฏิบัติการอยู่ระหว่าง 116-353 ฟอง แตกต่างจากไข่หอยที่จากธรรมชาติที่จะมีการวางไข่ประมาณ 217-734 ฟอง (Nugranad, 1992) โดยปริมาณการฟักของไข่ที่ต่างกันของหอยเชอรี่และหอย *C. ramosus* ในห้องปฏิบัติการอาจเนื่องมาจากความแตกต่างระหว่างชนิด อย่างไรก็ตามขนาดของตัวอ่อนหอย *C. ramosus* ที่ฟักออกมาในวันที่ 15 จะมีขนาด 1.295 mm และ 1.375 mm เมื่อตัวอ่อนมีอายุประมาณ 20 วันซึ่งใกล้เคียงกับการศึกษาในหอยเชอรี่ครั้งนี้ที่พบว่าตัวอ่อนของหอยและลูกหอยจะมีขนาดประมาณ 1.73±0.29 mm

การศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาเมื่อไข่หอยเชอรี่และตัวอ่อนได้รับสัมผัสสารเคมีทางการเกษตร พบว่าการเปลี่ยนแปลงที่เกิดขึ้นคือ 1) ไข่มีลักษณะผิดปกติ 2) เปลือกไข่มีอาการผิดปกติ โดยการมีเปลือกที่บางมาก 3) การพัฒนาของตัวอ่อนผิดปกติโดยประเมินจากรูปร่าง 4) เนื้อเยื่อเปื่อยยุ่ย และ 5) เกิดการเชื่อมกันหรือรวมตัวกันของเซลล์นั้น ลักษณะการเปลี่ยนแปลงของแต่ละอาการที่ประเมินได้นั้นมีค่าไม่เกิน 10% ซึ่งทำให้เป็นที่น่าสังเกตว่าหอยเชอรี่มีการปกป้องกันตัวเองหรือมีความทนทานและการปรับตัวได้ดีมากแม้จะได้สัมผัสกับสารการเคมีทางการเกษตรชนิดต่าง ๆ โดยไข่หอยเชอรี่นั้นมีโปรตีนที่สำคัญคือ Lipoprotein เช่น Perivitellin 2 และ Ovorubin (Dreon *et al*., 2003) และเมื่อศึกษาถึงการวิเคราะห์เรื่องหน้าที่ของ Perivitellin

2 และ Ovorubin พบว่าเป็นโปรตีนหลักที่มีความคงตัวสูง ทนทานต่อการถูกย่อยสลาย และทนทานต่อการเปลี่ยนแปลงในช่วง pH ค่อนข้างกว้างคือ 4-10 (Cadierno *et al*., 2017)

ไข่หอยเชอรี่จะมีสารพิษป้องกันตัวเองโดยชั้นแรกคือ สารที่เคลือบผิวของไข่ซึ่งเป็นโปรตีนที่ชื่อว่า Perivitellin 2 (PV2) ซึ่งสารนี้มีผลต่อโปรตีนที่ส่งต่อระบบประสาท (Neurotoxin) (Dreon *et al*., 2013) ที่มีส่วนประกอบระหว่างแลคตินและ Pore-Forming chains โดยพบว่ามีฤทธิ์ทำลายไขสันหลังของหนูทดลอง ทำให้หนูอ่อนแรง และหากได้รับปริมาณที่สูงหนูอาจจะตายได้ อย่างไรก็ตาม Perivitellin 2 เป็นสารออกฤทธิ์ค่อนข้างช้าดังนั้นไข่หอยจึงต้องมีสิ่งป้องกันตัวเองจากธรรมชาติและผู้ล่าเพิ่มอีกชั้น (Cadierno *et al.,* 2017) ซึ่งกลไกการป้องกันตัวเองจากสิ่งแวดล้อมของไข่หอยเชอรี่ขั้นที่กล่าวถึงนั้นก็คือการที่ไข่หอยเชอรี่มีสีชมพูแดง โดยสีนี้มาจากโปรตีนที่ชื่อว่า Ovorubin ซึ่ง Garin *et al*. (1996) รายงานว่า Ovorubin นี้เป็นโปรตีนที่พบในไข่ในสัดส่วนสูงถึง 65% มีหน้าที่สำคัญคือเป็นแหล่งอาหารและช่วยในการป้องกันตัวอ่อนโดย Ovorubin เป็นโปรตีนที่มีขนาด 28 ถึง 35 kDa

Horn *et al.* (2008) รายงานว่าธรรมชาติของหอยเชอรี่นั้นหอยเพศเมียมีพฤติกรรมที่พยายามจะวางไข่บนที่แห้งเพื่อหลบหลีกจากศัตรูหรือผู้ล่า และยิ่งไปกว่านั้นหอยเชอรี่เพศเมียจำเป็นที่จะต้องวางไข่ในที่แห้งเพราะน้ำจะส่งผลต่อการเปลี่ยนแปลงความสามารถในการเลือกผ่านของผนังเซลล์ของไข่หอยและหากไข่หอยได้สัมผัสกับน้ำนั้นจะไปลดออกซิเจนที่สามารถนำไปใช้ได้โดยตรงจากอากาศ ยิ่งไปกว่านั้นอุณหภูมิส่งผลต่อการเพาะฟักหากมีการสัมผัสกับน้ำทั้งการแช่หรือลอยปริ่มน้ำก็จะทำให้อุณหภูมิในการบ่มฟักลดลงหากเปรียบเทียบเทียบกับอุณหภูมิมิของอากาศด้านบน แต่การศึกษาครั้งนี้พบว่าไข่สามารถฟักตัวได้ตามปกติหากสัมผัสกับน้ำเพียงระยะสั้น โดยพบว่าหลังจากแช่ในน้ำเป็นเวลา 4 วัน จะเริ่มเกิดการฟักตัว และน้ำจะค่อย ๆ ระเหยออกไปจากจานเพาะฟัก ทำให้น้ำซึมผ่านเข้าไปในเซลล์ไข่ได้น้อยลง ซึ่งแม้มีการฉีดพ่นน้ำลงไปในจานเพาะฟักไข่หอยเชอรี่ก็ไม่มีผลให้อัตราการเพาะฟักเปลี่ยนแปลง อย่างไรก็ตามพบว่า Ovorubin ไม่มีผลต่อการต่อต้านเชื้อแบคทีเรีย โดยที่ Ovurubin จะมีความทนทานและคงตัวเมื่ออยู่ในบริเวณที่มีอุณหภูมิสูง (Frassa *et al*. 2010)

ลักษณะดังกล่าวจึงเป็นสิ่งสำคัญที่ทำให้ไข่หอยเชอรี่ทนทานเมื่ออยู่ในสิ่งแวดล้อม โดย Dreon *et al*. (2003) รายงานว่า Ovorubin เป็นโปรตีนหลักอีกหนึ่งชนิดที่พบในไข่ของหอยเชอรี่โดยเมื่อทำการศึกษาด้วยเทคนิคเจลอิเลคโทรโฟรีซีสและ Immunoblot โดยใช้แอนติบอดีที่จำเพาะต่อ Ovurubin ระดับการเจือจาง 1:1,000 พบว่า Ovurubin มี 3 isoform ที่มีขนาดน้ำหนักโมกุลเป็น 35 kDa, 32 kDa และ 28 kDa ตามลำดับ (Dreon *et al.,* 2003) ซึ่งแตกต่างจากการศึกษาในครั้งนี้ที่พบเพียง 1 isoform ที่มีขนาดโมเลกุลประมาณ 28 kDa โดย Frassa *et al*. (2010) ทำการศึกษาถึงโครงสร้างและความคงตัวของสารพิษต่อระบบประสาทซึ่งพบในไข่ของหอยเชอรี่ (*Pomecea canaliculta*) ซึ่งเป็น lipoprotein คือ Perivitellin 2 พบว่า Perivitellin 2 ที่แยกได้มี 3 ขนาดคือ 98 kDa, 67 kDa และ 31 kDa โดยแถบโปรตีนหลักมีขนาด 67 kDa และ 31 kDa เมื่อใช้ Proteinase K เป็นตัวเปรียบเทียบ (Frassa *et al*. 2010) ซึ่งคล้ายกับการศึกษาในครั้งนี้ที่พบว่า Perivitellin 2 ที่แยกได้มี 3 ขนาดคือ 98 kDa, 67 kDa และ 31 KDa เช่นเดียวกับการศึกษาของ Dreon *et al*., (2013) ที่

พบว่า Perivitellin 2 ซึ่งเป็นโปรตีนที่ส่งผลความเป็นพิษต่อระบบประสาท (Neurotoxin) นั้นสามารถแยกได้จากไข่หอยเชอรี่ (*Pomeaca canaliculata*) โดยมีขนาดโมกุลประมาณ 67 kDa และ 31 kDa ตามลำดับ

สรุปผลการวิจัย

การได้รับสัมผัสกับสารเคมีทางการเกษตรคือไกลโฟเสท ไซเปอร์เมทริน และเมทัลดีไฮด์แบบชั่วคราวไม่มีผลต่ออัตราการเพาะฟักไข่ของหอยเชอรี่ แสดงให้เห็นว่าไข่และตัวอ่อนหอยเชอรี่มีความทนทานต่อสารดังกล่าวค่อนข้างสูง นอกจากนี้การเปลี่ยนแปลงทางสัณฐานวิทยาหลังจากได้รับสัมผัสสารมีค่าค่อนข้างต่ำ ทั้งนี้อาจจะเนื่องมาจากไข่ของหอยเชอรี่มีความสามารถในการป้องกันตัวเอง โดยมีการสร้างโปรตีน Perivitellin 2 และ Ovorubin เพื่อป้องกันตัวเองจากสิ่งแวดล้อมต่าง ๆ ซึ่งผลการศึกษาการฟักไข่ของหอยเชอรี่ในห้องปฏิบัติการพบว่าขนาดของไข่หอยเชอรี่มีขนาดเล็กทำให้ไข่หนึ่งฝักสามารถฟักเป็นตัวอ่อนได้จำนวนมาก จึงเป็นข้อมูลที่ทำให้สามารถประเมินประชากรของหอยเชอรี่ต่อไปในอนาคตได้ เพราะแม้ว่าหอยเชอรี่จะสามารถนำไปใช้ประโยชน์ได้กว้างขวาง แต่หากไม่มีการควบคุมก็จะทำให้สัตว์พื้นเมืองได้รับผลกระทบได้ รวมทั้งการที่ไข่หอยเชอรี่มีความทนทานต่อสารเคมีทางการเกษตร จึงควรมีการศึกษาเพิ่มเติมถึงความสามารถในการสะสมของสารต่าง ๆ ในหอยเชอรี่ เนื่องจากปัจจุบันมีการนำหอยเชอรี่มาบริโภคเป็นอาหารมากขึ้น ซึ่งผู้บริโภคอาจจะได้รับผลกระทบเชิงลบต่อสุขภาพได้

กิตติกรรมประกาศ

งานวิจัยนี้ได้รับการสนับสนุนจากสาขาวิชาประมง คณะเกษตรศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลอีสาน วิทยาเขตสุรินทร์

References

Aroonsrimorakot, S., Sangnate V. and Pattanaplung, T. 2002. The utilization of endosulfan to eliminate golden apple snail *(Pomacea canaliculata)* in paddy field. Research report. Faculty of Environment and Resource Studies. Mahidol University. [in Thai]

Chalermchutipapha, N. 2010. Alien species raids to destroy biodiversity. UPDATE. pp. 51-61. [in Thai]

Chankao, S. 2004. 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. Pp. 61 [in Thai]

Chooprateep, S. 2014. Duration against wetting-drying cycles of lateritic soil block using crushed golden apple snail shell and cement as a binder. School of Civil Engineering. Suranaree University. Pp 62. ([in Thai]

Cadierno, M. P., Dreon, M. S. and Heras, H. 2017. Apple snail perivitellin precursor properties help explain predators' feeding behavior. Physiological and Biochemical Zoology 90(4), 461-470.

Dreon, M., S., Heres, H., and Pollero, R., J. 2003. Metabolism of Ovorubin, the major Egg lipoprotein from the apple snail. Molecular and cellular Biochemistry 243, 9-14.

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

Frassa, M., V., Ceolin, M., Dreon , M., S., and Heras , H. 2010. Structure and stability of the neurotoxin PV2 from the eggs of the apple snail *Pomacea canaliculata*. Biochimica et Biophysica Atca 1804. 1492-1499.

Garin, C. F., Heras, H. and Pollern, R. J. 1996. Lipoprotein of the egg perivitellin flouid of *Pomacea canaliculata* snails (Mollusca: Gastropoda). Journal of Experimental Zoology 276, 307-314.

Horn, K. C., Johnson, D., Boles, K. M., Moore, A., Sienann, E., and Gabler, C. A. 2008. Factors affecting hatching success of golden apple snail eggs: effect of water immersion and cannibalism. The society of wetland Scientista 28(2), 544-549.

Jintasataporn, O., Tabthipwon, P. and Yenmark, S. 2004. *Macrobrachium rosenbergii*; *Pomacea canaliculata*; Fish meal; Feeds; Pepsin; Proteins; Digestibility; Growth; Feed conversion efficiency. Proceedings of 42 nd Kasetsart University Annual Conference: Fisheries, Agro-Industry. Bangkok. pp 181-189. [in Thai]

Martínez, M. L., Piol, M. N., Nudelman, N. S., and Guerrer, N. R. V. 2017. Tributyltin bioaccumulation and toxic effects in freshwater gastropods *Pomacea canaliculata* after a chronic exposure: field and laboratory studies. Ecotoxicology 26, 691-701.

Nugranad, J.1992. Experimental rearing of *Chicoreus ramosus* larvae at Prachuap KhiriKhan Hatchery. Phuket. Mar. Boil. Can. Spec. Publ. 19. 53-64.

Piyatiratitivorakul, P. and Boonchamoi, P. 2008. Comparative toxicity of mercury and cadmium to the juvenile freshwater snail, *Filopaludina martensi martensi*. ScienceAsia 34. 367-370.

Phosri, D. and Laemkom, T. 2017. Study on Reproductive Biology and Some Relating Factors on Sexual Maturation of Thai Native Apple Snail (*Pila ampullacea* Linnaeus, 1758) in the Rice Field Si Muang Mai, Ubon Ratchathani Province. Journal of Science and Technology, Ubon Ratchathani University 19(1), 123-137. [in Thai]

Putkome, S., Cheevaporna, V., and Helandera, H. F. 2008. Inhibition of Acetylcholinesterase Activity in the Golden Apple Snail (*Pomacea canaliculata Lamarck*) Exposed to Chlorpyrifos, Dichlorvos or Carbaryl Insecticides. Environment Asia 2, 15-20.

Teo, S. S. 2006. Evaluation of different species of fish for biological control of golden apple snail *Pomacea canaliculata* (Lamarck) in rice. Crop Protection 25. 1004-1012.

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