

**Thesis Title** Bioaccumulation and DNA Damage Induced by Copper and Lead in Asian Clams (*Corbicula* sp.) from Bung Boraphet, Nakhon Sawan Province, Thailand

**Author** Mr. Tinnapan Netpae

**Degree** Doctor of Philosophy (Environmental Science)

**Thesis Advisory Committee**

Asst. Prof. Dr. Chitchol Phalaraksh Chairperson

Assoc. Prof. Dr. Yuwadee Peerapornpisal Member

Asst. Prof. Dr. Weerah Wongkham Member

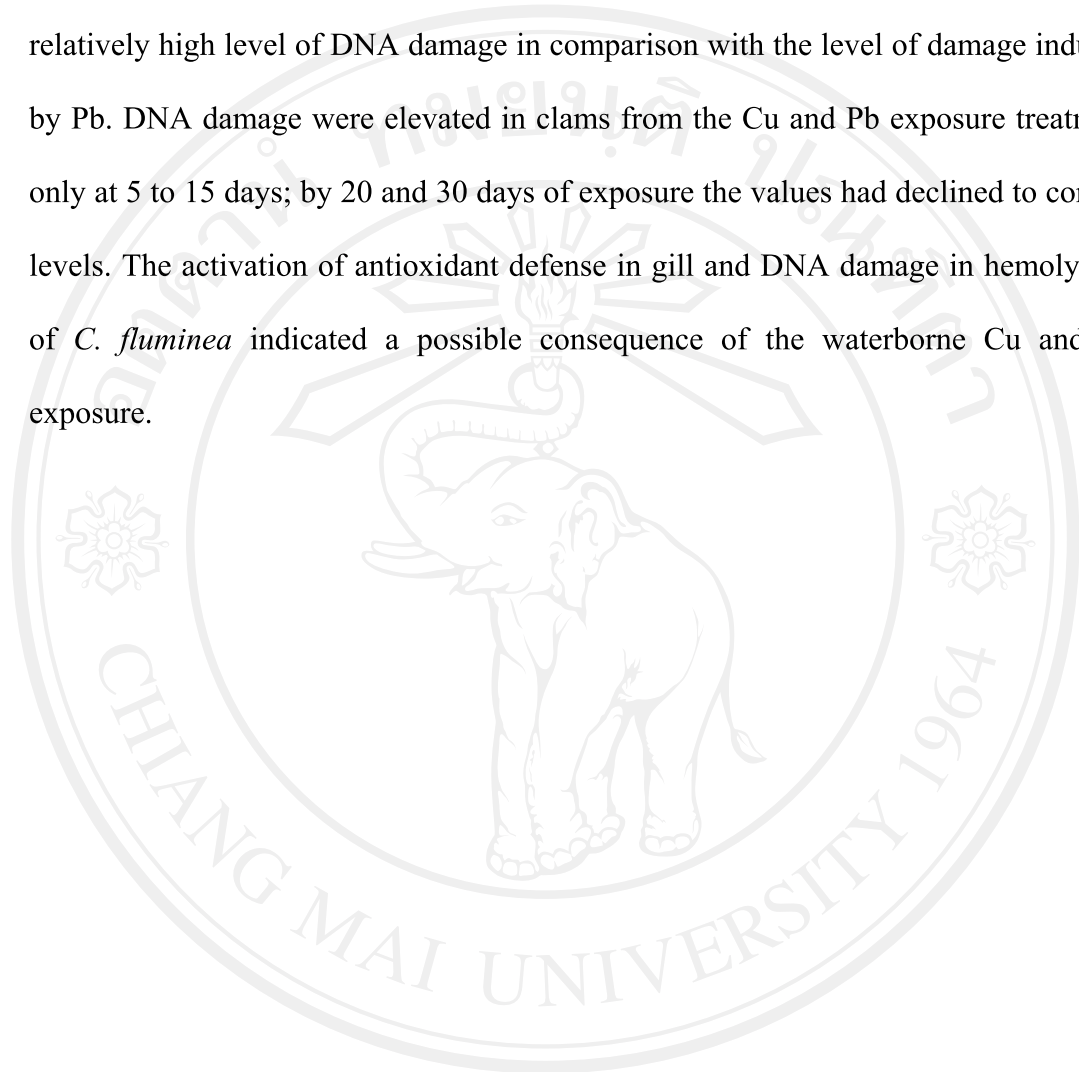
**ABSTRACT**

The objective of the research was to investigate the concentration of copper (Cu) and lead (Pb) found in water, sediments, and tissue of Asian clams (*Corbicula* sp.) in Beung Boraphet. Samples were collected from 12 study sites within Bung Boraphet between February to December 2008. The physico - chemical parameters of water including temperature, pH, turbidity,  $\text{NO}_3^-$ -N,  $\text{NH}_3$ -N,  $\text{PO}_4^{3-}$ ,  $\text{BOD}_5$ , DO, Cu, and Pb were measured. In comparison with the water quality standard of Thailand, water in Bung Boraphet was medium clean. Cu and Pb in water were detected at low levels while their levels were high in the sediment and tissues of *Corbicula* sp..

Accumulation rate of Cu and Pb in tissues of *Corbicula fluminea* was determined under laboratory condition. Clams were treated by Cu (0 to 4 mg l<sup>-1</sup>) and Pb (0 to 10 mg l<sup>-1</sup>) in aquariums for 0 to 168 hours. The Cu and Pb concentrations in aqueous solution decreased throughout the treatment period while concentrations of Cu and Pb in tissues of *C. fluminea* increased. Pb was found accumulate in tissue more than Cu. The high Pb concentration accumulation in tissues was 142.35 ± 8.14 mg kg<sup>-1</sup> dry wt. at 48 hrs whereas that of Cu was 26.83 ± 0.47 mg kg<sup>-1</sup> dry wt. at 128 hrs. The results show the suitable condition for using *C. fluminea* as Cu and Pb contamination monitoring in water.

Biomarker responses of antioxidative enzyme activity and DNA damage in the *C. fluminea* were exposed in different concentrations of Cu and Pb for 30 days in a controlled laboratory experiment. Cu concentrations were commonly between 0 to 0.5 mg l<sup>-1</sup>. While the Pb concentrations varied greatly from 0 to 5 mg l<sup>-1</sup>. The antioxidative enzyme activities such as glutathione reductase, superoxide dismutase, and catalase were qualified by the use of a Oxford Biomedical Research kit. DNA damage was measured by single cell gel electrophoresis (Comet Assay). Antioxidative enzyme activities in clam gills from Cu were higher than control after 30 days and suggested an increase in superoxide dismutase and catalase activities. While glutathione reductase was increased in gill of clams at 0.1 to 0.5 mg Cu l<sup>-1</sup>, but Cu concentrations at 0 and 0.05 mg l<sup>-1</sup> were decreased. Antioxidative enzyme activities for every concentration of Pb were decreased, especially catalase. The minimum activity of catalase was found in gill cell suspension of clams at 5 mg Pb l<sup>-1</sup> after 20 days. DNA of hemolymph which had not been exposed to Cu and Pb showed low background damage which made it easy to evaluate the response of the DNA to heavy

metals. When the hemolymph of *C. fluminea* were exposed to the Cu and Pb, the tail length of DNA was increased significantly. The results indicated that Cu induced a relatively high level of DNA damage in comparison with the level of damage induced by Pb. DNA damage were elevated in clams from the Cu and Pb exposure treatment only at 5 to 15 days; by 20 and 30 days of exposure the values had declined to control levels. The activation of antioxidant defense in gill and DNA damage in hemolymph of *C. fluminea* indicated a possible consequence of the waterborne Cu and Pb exposure.



ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่  
Copyright© by Chiang Mai University  
All rights reserved

**ชื่อเรื่องวิทยานิพนธ์** การสะสมทางชีวภาพ และการทำลายดีเอ็นเอที่ถูกเหนี่ยวนำโดย ทองแดง และตะกั่ว ใน หอยทวาย (*Corbicula* sp.) จากบึงบอระเพ็ด จังหวัด นครสวรรค์ ประเทศไทย

**ผู้เขียน** นาย ทินพันธุ์ เนตรแพ

**ปริญญา** วิทยาศาสตรดุษฎีบัณฑิต (วิทยาศาสตรสิ่งแวดล้อม)

**คณะกรรมการที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์**

ผศ. ดร. ชิตชล ผลารักษ์ ประธาน กรรมการ

รศ. ดร. युวดี พิรพรพิศาล กรรมการ

ผศ. ดร. วีระ วงศ์คำ กรรมการ

**บทคัดย่อ**

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่

Copyright © by Chiang Mai University  
A All Rights Reserved

วัตถุประสงค์ของงานวิจัยนี้ เพื่อทำการวัดความเข้มข้นของทองแดง (Cu) และตะกั่ว (Pb)

ที่พบในน้ำ ตะกอนดิน และเนื้อเยื่อของ หอยทวาย (*Corbicula* sp.) ในบึงบอระเพ็ด โดยเก็บ ตัวอย่างจาก 12 จุดศึกษาภายในบึงบอระเพ็ด ระหว่างเดือน กุมภาพันธ์ ถึงเดือน ธันวาคม พ.ศ. 2551

โดยศึกษาปัจจัยทางกายภาพ และเคมีของน้ำทั้งทางภาคสนาม และในห้องปฏิบัติการ ได้แก่

อุณหภูมิ พีเอช ความขุ่น ไนเตรต แอมโมเนีย ฟอสเฟต ปริมาณออกซิเจนที่จุลินทรีย์ใช้ในการ

ย่อยสลายสารอินทรีย์ ปริมาณออกซิเจนที่ละลายในน้ำ ทองแดง และตะกั่ว ผลที่ได้เมื่อเปรียบเทียบกับค่ามาตรฐานคุณภาพน้ำผิวดินของประเทศไทยพบว่า น้ำในบึงบอระเพ็ดมีคุณภาพอยู่ในเกณฑ์สะอาด ปานกลาง ทองแดงและตะกั่วที่พบในน้ำมีระดับต่ำ แต่พบว่าการสะสมในระดับสูงในตะกอนดิน และเนื้อเยื่อของหอย *Corbicula* sp.

ทำการวัดอัตราการสะสมของทองแดง และตะกั่ว ในเนื้อเยื่อของหอย *C. fluminea* ทำการวัดในห้องปฏิบัติการ โดยทำการเลี้ยงหอยในตู้ที่มีสารละลายทองแดง (ความเข้มข้น 0 ถึง 4 มิลลิกรัมต่อลิตร) และตะกั่ว (ความเข้มข้น 0 ถึง 10 มิลลิกรัมต่อลิตร) เป็นเวลา 0 ถึง 168 ชั่วโมง ซึ่งผลที่ได้พบว่าความเข้มข้นของ ทองแดง และตะกั่ว ในสารละลายจะลดลงตลอดระยะเวลาการทดลอง ขณะที่ความเข้มข้นของ ทองแดง และตะกั่ว ในเนื้อเยื่อ *C. fluminea* จะเพิ่มขึ้น โดยตะกั่ว จะมีการสะสมในเนื้อเยื่อหอยมากกว่าทองแดง ซึ่งค่าสูงสุดของตะกั่วที่สะสมในเนื้อเยื่อมีความเข้มข้น 142.35 ไมโครกรัมต่อกรัมของน้ำหนักแห้ง ที่ 48 ชั่วโมง ขณะที่การสะสมของทองแดง มีความเข้มข้นสูงสุดที่ 26.83 ไมโครกรัมต่อกรัมของน้ำหนักแห้ง ที่ 120 ชั่วโมง ซึ่งผลที่ได้แสดงให้เห็นถึงสถานะที่เหมาะสมสำหรับใช้ *C. fluminea* ในการเฝ้าระวังทองแดง และตะกั่วในน้ำ

การตอบสนองของตัวบ่งชี้ทางชีวภาพได้แก่ ปฏิกริยาเอนไซม์ป้องกันอนุมูลอิสระและการ

ทำลายดีเอ็นเอของ *C. fluminea* แสดงออกมาที่ความเข้มข้นของทองแดง และตะกั่ว ที่แตกต่างกัน ในระยะเวลา 30 วัน ของการทดลองภายใต้สภาวะควบคุมในห้องปฏิบัติการ โดยทองแดงมีความเข้มข้นระหว่าง 0 ถึง 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร ขณะที่ตะกั่วมีความเข้มข้นระหว่าง 0 ถึง 5 มิลลิกรัมต่อลิตร โดยปฏิบัติการของเอนไซม์ป้องกันอนุมูลอิสระที่ศึกษา ได้แก่ กลูตาไทโอนรีดักเทส ซูเปอร์ออกไซด์ดิสมิวเทส และแคตทาเลส ซึ่งทำการตรวจสอบโดยใช้ชุดตรวจสอบของ Oxford Biomedical Research ส่วนการทำลายดีเอ็นเอวัดโดยวิธี single cell gel electrophoresis

(Comet Assay) ผลที่ได้พบว่าปฏิกิริยาของเอนไซม์ป้องกันอนุมูลอิสระในเหงือกหอยที่ได้รับทองแดงมีค่ามากกว่ากลุ่มที่ไม่ได้รับทองแดงหลังจาก 30 วัน โดยปฏิกิริยาของซูเปอร์ออกไซด์ดิสมิวเทส และ แคตตาลีสในเหงือกหอยเพิ่มขึ้น ขณะที่กลูตาไทโอนรีดักเทสเพิ่มขึ้นที่ความเข้มข้นของทองแดงระหว่าง 0.1 ถึง 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร แต่ที่ความเข้มข้นที่ 0 ถึง 0.05 มิลลิกรัมต่อลิตร มีค่าลดลง ปฏิกิริยาของเอนไซม์ป้องกันอนุมูลอิสระลดลงในตะกั่วทุกความเข้มข้น โดยเฉพาะอย่างยิ่งแคตตาลีส โดยปฏิกิริยาต่ำสุดพบที่ตะกั่วความเข้มข้น 5 มิลลิกรัมต่อลิตร หลังจาก 20 วัน ผลของการทำลายดีเอ็นเอพบว่า มีการทำลายดีเอ็นเอของฮีโมลิมปีต่ำในกลุ่มควบคุมซึ่งทำให้ง่ายต่อการประเมินการตอบสนองของดีเอ็นเอต่อโลหะหนัก ซึ่งเมื่อฮีโมลิมปีของ *C. fluminea* ได้รับทองแดง และตะกั่ว ความยาวของหางดีเอ็นเอจะเพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญ ผลที่ได้พบว่าทองแดงมีความสัมพันธ์ต่อการชักนำให้เกิดการทำลายดีเอ็นเอสูงเมื่อเทียบกับตะกั่ว การทำลายดีเอ็นเอจะเพิ่มสูงขึ้นจากการที่หอยได้รับทองแดง และตะกั่วเฉพาะวันที่ 5 ถึง 15 วันของการทดลอง โดยวันที่ 20 และ 30 ของการทดลอง ดีเอ็นเอที่ถูกทำลายจะลดลงใกล้เคียงกับกลุ่มควบคุม ผลของปฏิกิริยาของเอนไซม์ป้องกันอนุมูลอิสระในเหงือก และการทำลายดีเอ็นเอในฮีโมลิมปี ของ *C. fluminea* แสดงให้เห็นถึงผลที่แสดงออก จากการสัมผัสทองแดง และตะกั่วในแหล่งน้ำ