วารสารวิทยาศาสตร์บูรพา ปีที่ 27 (ฉบับที่ 2) พฤษภาคม – สิงหาคม พ.ศ. 2565
BURAPHA SCIENCE JOURNAL Volume 27 (No.2) May – August 2022 บทความวิจัย

ระดับความเป็นพิษของสารกำจัดวัชพืช 2,4-D ไดเมทิลแอมโมเนียมในปลานิล และการตรวจสอบการแสดงออกของอะซิทิลโคลีนเอสเทอเรส (ตัวชี้วัดทางชีวภาพ) เพื่อบ่งชี้การรับสัมผัสในระดับความเข้มข้นที่ไม่ก่อให้เกิดการตาย

Toxicity Level of 2, 4-D Dimethylammonium in Nile tilapia and Acetylcholinesterase (AChE) Expression (Biomarker) to Identify Exposure in Sub-lethal Concentration

ปราง กาญจนสาร[1], ไชยวัตน์ นวลขาว[1], สำเนาว์ เสาวกูล[2], จักรพันธ์ นานวม[3], พอจิต นันทนาวัฒน์[4] และ ชุติมา ถนอมสิทธิ์[2*]

Prang Khanchanasal[1], Chaiwat Nuankaew[1], Samnao Saowakoon[2], Jakkaphun Nanuam [3],
Phochit Nanthanawat[4] and Chutima Thanomsit[2*]

[1]หลักสูตรเทคโนโลยีการเกษตร คณะเกษตรศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลอีสาน วิทยาเขตสุรินทร์

[2]สาขาประมง คณะเกษตรศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลอีสาน วิทยาเขตสุรินทร์

[3]สาขาทรัพยากรธรรมชาติและสิ่งแวดล้อม คณะวิทยาศาสตร์และสังคมศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา วิทยาเขตสระแก้ว

[4]ภาควิชาเทคโนโลยีชีวภาพ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา

[1]Agricultural and Technology program, Faculty of Agriculture and Technology, Rajamangala University of Technology Isan Surin Campus

[2]Department of Fisheries, Faculty of Agriculture and Technology, Rajamangala University of Technology Isan Surin Campus

[3]Program of Natural resources and Environment, Faculty of Science and Social Sciences, Burapha University, Sakaeo campus

[4] Biotechnology program, Faculty of Science, Burapha University

Received : 15 July 2021
Revised : 1 October 2021
Accepted : 11 October 2021

บทคัดย่อ

งานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อประเมินความเป็นพิษของสารกำจัดวัชพืช 2, 4-D ไดเมทิลแอมโมเนียมในปลานิลและการตรวจสอบการแสดงออกของอะซิทิลโคลีนเอสเทอเรส (ตัวชี้วัดทางชีวภาพ) เพื่อบ่งชี้การรับสัมผัสในระดับความเข้มข้นที่ไม่ก่อให้เกิดการตายในระดับห้องปฏิบัติการเพื่อเป็นข้อมูลเบื้องต้นสำหรับการตรวจสอบการปนเปื้อนของ สารกำจัดวัชพืช 2, 4-D ไดเมทิลแอมโมเนียมในสิ่งแวดล้อมทางน้ำต่อไป สำหรับความเป็นพิษของสารดังกล่าวที่เกิดขึ้นในปลานิลจะประเมินจากค่าอัตราการตายสะสมของปลานิล ซึ่งพบว่าจะเพิ่มมากขึ้นตามระดับความเข้มข้นและระยะเวลาที่ได้รับสัมผัส หลังจากที่วิเคราะห์ค่าความเป็นพิษที่ก่อให้เกิดการตายแล้ว ในการศึกษาครั้งนี้ได้ศึกษาความเป็นพิษของสารในระดับ ที่ไม่ก่อให้เกิดการตายในปลานิลด้วยคือระดับความเข้มข้น 5 µl/L ปลานิลที่ได้รับสัมผัสสารในระดับที่ไม่ก่อให้เกิดการตายมีการเปลี่ยนแปลงทั้งพฤติกรรมและสัณฐานวิทยาต่างจากกลุ่มควบคุมโดยขึ้นอยู่กับระยะเวลาที่ได้รับสัมผัส อะซิทิลโคลีนเอสเทอเรสที่ตรวจสอบได้จากเนื้อเยื่อสมอง เหงือกและกล้ามเนื้อมีน้ำหนักโมเลกุลขนาด 71 กิโลดัลตัน (kDa) โดยการแสดงออกของอะซิทิลโคลีนเอสเทอเรสในเนื้อเยื่อทุกชนิดจะลดลงเมื่อได้รับสัมผัสสารเป็นเวลานานขึ้น เมื่อศึกษาการเปลี่ยนแปลงของเนื้อเยื่อเหงือกพบว่า

เกิดการเพิ่มจำนวนของเซลล์ (hyperplasia), การยกตัวของเยื่อบุผิว (epithelial lifting), การรวมตัวกันบางส่วนของเนื้อเยื่อเหงือก (partial fusion of lamellae), การบวมและการเรียงตัวกันแบบผิดปกติของเนื้อเยื่อเหงือก (edema and lamellae disorganization) และ การคั่งของเลือด (blood congestion) ในเนื้อเยื่อกล้ามเนื้อพบว่าจะเกิดอาการ การขยายตัวของเส้นใยกล้ามเนื้อ (dilation of muscle fiber), การแยกตัวของกล้ามเนื้อ (spiting of muscle) และ การคั่งของเลือด (blood congestion) โดยการเปลี่ยนแปลงจะเพิ่มมากขึ้นเมื่อปลานิลได้รับสัมผัสสารเป็นระยะเวลานาน จากข้อมูลทั้งหมดนี้จึงมีแนวโน้มที่จะประยุกต์ใช้ปลานิลตัวชี้วัด (bioindicator) การปนเปื้อนของสารกำจัดวัชพืช 2, 4-D ไดเมทิลแอมโมเนียมที่ปนเปื้อนในแหล่งน้ำได้ และยิ่งไปกว่านั้นอะซิทิลโคลีนเอสเทอเรสสามารถใช้เป็นตัวชี้วัดทางชีวภาพในการรับสัมผัสของสารได้

คำสำคัญ : สารกำจัดวัชพืช ; 2, 4-D ไดเมทิลแอมโมเนียม ; ตัวชี้วัดทางชีวภาพ ; อะซิทิลโคลีนเอสเทอเรส

Abstract

The objectives of this study were to assess toxicity of the herbicide 2, 4-D dimethyl ammonium in Nile tilapia and to examine acetylcholinesterase expression (bio-indicators) for indicating exposure in sub-lethal concentrations in laboratory condition. The results can be applied as fundamental knowledge for determining herbicide 2, 4-D dimethyl ammonium in the aquatic environment. The toxicity of this compound in Nile tilapia was estimated from the cumulative mortality which was found to increase with time and concentration of exposure. After studying the lethal toxicity, the toxicity in sub-lethal level was also evaluated which was at a concentration of 5 µl/L. Nile tilapia which exposed to herbicide in sub-lethal concentration had both behavioral and morphological changes differed from the control group depending on exposure time. Acetylcholinesterase found in tissues of brain, gill and muscle have a molecular weight of 71 kDa. The expression of acetylcholinesterase in all tissues was reduced with prolonged exposure. In changed gill tissues, we found hyperplasia, epithelial lifting, partial fusion of lamellae, edema and lamellae disorganization and blood congestion. In muscle tissue, it was found dilation of muscle fiber, spiting of muscle, and blood congestion. These tissue alterations increased with an increasing in exposure time. Based on all information we found, tilapia can be used as bio-indicator for herbicide 2, 4-D dimethyl ammonium contamination in water resources. Moreover, acetylcholinesterase expression can also be used as a biomarker of exposure.

Keywords : herbicide ; 2, 4-D dimethylammonium ; biomarker ; acetylcholinesterase

*Corresponding author. E-mail : chutima.tn@rmuti.acth

บทนำ

ในปัจจุบันมีการนำสารเคมีกำจัดศัตรูพืชจำนวนมากเข้ามาใช้ประโยชน์ในการเพาะปลูกเพื่อเพิ่มผลผลิตทางการเกษตร รวมทั้งการปรับปรุงพันธุ์พืช ซึ่งการใช้สารเคมีทางการเกษตรโดยเฉพาะอย่างยิ่ง สารกำจัดวัชพืช เช่น ไกลโฟเสท และราวอัพจัดว่าเป็นสาเหตุใหญ่ที่ทำให้เกิดปัญหาทางด้านสิ่งแวดล้อมตามมามากมาย เช่น ทำให้เกิดการตกค้างของสารเคมีในดิน อากาศ และแหล่งน้ำ (Thanomsit *et al*., 2020a) ซึ่งสาเหตุการปนเปื้อนของสารดังกล่าวจะส่งผลโดยตรงต่อสัตว์น้ำและเกิดการสะสมในสัตว์น้ำ โดยอาจจะส่งผลทั้งการเปลี่ยนแปลงทางพฤติกรรม สัณฐานวิทยา การเปลี่ยนแปลงในระดับชีวเคมี การเปลี่ยนแปลงเนื้อเยื่อ และอาจจะก่อให้เกิดการตายได้ในที่สุด (Thanomsit *et al*., 2016; Thanomsit *et al.,* 2020a)

สาร 2, 4-D เป็นสารกำจัดวัชพืชในกลุ่ม chlorophenoxyacetic acid ใช้สำหรับกำจัดวัชพืชใบกว้าง (broad-leaf weed) สำหรับธัญพืช สนามหญ้า สวนสาธารณะ และสนามกอล์ฟ นอกจากนี้ ยังใช้เป็นสารควบคุมการเจริญเติบโต (growth regulator) ในพืชใบเลี้ยงคู่เพื่อให้ได้ผลผลิตเพิ่มขึ้น ในทางการค้านอกจาก 2, 4-D ในรูปของกรด (acid) ที่ใช้เป็นสารออกฤทธิ์แล้วยังมีอนุพันธ์ที่เป็นเกลือ (salt) และเอสเตอร์ (ester) จำนวนมาก เช่น 2, 4-D diethylamine salt; 2, 4-D dimethlamine salt; 2, 4-D isopropylamine salt: 2, 4-D triisopropylamine salt; 2, 4-D sodium salt; 2, 4-D butyl ester; 2, 4-D butoxyethyl ester; 2, 4-D 2-ethylhexyl ester; 2, 4-D isopropyl ester และ 2, 4-D isobutyl ester ผลิตภัณฑ์ของ 2, 4-D และอนุพันธ์ นอกจากใช้เป็นสารออกฤทธิ์เพียงสารเดียวแล้วยังรวมกับสารกำจัดวัชพืชอื่นอีกหลายสาร U.S. EPA (2005) รายงานจำนวนผลิตภัณฑ์ที่ประกอบด้วย 2, 4-D หรืออนุพันธ์ที่ใช้ในทางการเกษตรและที่ใช้ในบ้านเรือนในประเทศสหรัฐอเมริกามีประมาณ 660 ผลิตภัณฑ์ และระหว่างปี พ.ศ. 2535 – 2543 มีปริมาณการใช้ประมาณ 46 ล้านปอนด์ โดยร้อยละ 66 หรือประมาณ 30 ล้านปอนด์ใช้ในทางการเกษตรกรรม และร้อยละ 34 ประมาณ 16 ล้านปอนด์ ใช้ในด้านอื่น ๆ สารกำจัดวัชพืช 2, 4-D และอนุพันธ์ ไม่มีการผลิตในประเทศไทย ในปี พ.ศ. 2548 – 2552 มีการนำเข้า 2, 4-D และอนุพันธ์ 4 ชนิด คือ 2, 4-D dimethylamine salt; 2, 4-D sodium salt; 2, 4-D butyl ester และ 2, 4-D isobutyl ester จาก 12 ประเทศ คือ จีน โปแลนด์ อินเดีย มาเลเซีย สิงคโปร์ อินโดนีเซีย เยอรมณี โคลัมเบีย นิวซีแลนด์ ออสเตรเลีย ออสเตรีย และอิสราเอล โดยปริมาณนำเข้าได้เพิ่มสูงขึ้นจาก 4,623 ตัน ในปี พ.ศ. 2548 เป็น 7,202 ตัน ในปี พ.ศ. 2551 และลดลงเหลือ 6,158 ตัน ในปี พ.ศ. 2552 (Pollution Control Department, 2010)

สารกำจัดวัชพืช 2, 4-D เป็นสารกำจัดวัชพืชที่มีการใช้อย่างแพร่หลาย สามารถตรวจพบได้ในสิ่งแวดล้อมทั้งอากาศ น้ำ ดิน ผักและผลไม้ Cessna *et al.* (2006) รายงานการตรวจวัดคุณภาพอากาศของจังหวัด Saskatchewan ประเทศแคนาดา โดยเก็บตัวอย่างระหว่างเดือนพฤษภาคม-เดือนสิงหาคม พ.ศ. 2532 พบ 2, 4-D ความเข้มข้นระหว่าง < 0.04 - 3.4 นาโนกรัม/ลูกบาศก์เมตร สำหรับประเทศไทยนั้นพบว่าการศึกษายังมีอยู่น้อยมาก ซึ่งต้องมีการศึกษาเพิ่มเติมต่อไป ยิ่งไปกว่านั้น Castro Marcato *et al.* (2006) รายงานว่าสารกำจัดวัชพืช 2, 4-D สามารถสะสมในห่วงโซ่อาหารและสามารถสะสมในสิ่งมีชีวิตในแหล่งน้ำได้ และที่สำคัญก่อให้เกิดการตายในสัตว์น้ำ 2, 4-D มีพิษเฉียบพลันที่ระดับต่าง ๆ ในสิ่งมีชีวิตในน้ำทั้งในกุ้ง หอย ปู ปลา แต่ระดับความเป็นพิษขึ้นอยู่กับชนิด ขนาด อายุ และระยะเวลาที่ได้รับสัมผัส ส่วนใหญ่มีพิษเฉียบพลันน้อย (LC_{50} ที่ 96 ชั่วโมง มีค่า 10 – 100 มิลลิกรัม/ลิตร) LC_{50} ที่ 96 ชั่วโมง ในปลา banded killifish ปลา white perch ปลา striped bass ปลา

guppy ปลา pumpkinseed sunfish และปลา carp มีค่าเท่ากับ 26.7, 40, 70.1, 70.7, 94.6 และ 96.5 มิลลิกรัม/ลิตร ตามลำดับ และไม่มีพิษเฉียบพลัน (LC_{50} ที่ 96 ชั่วโมง มีค่ามากกว่า 100 มิลลิกรัม/ลิตร) ในหอย bay mussel ปลา American eel และปลา rainbow trout มีค่า LC_{50} เท่ากับ 259, 300.6 และ 494 มิลลิกรัม/ลิตร ตามลำดับ (Pollution Control Department, 2010)

การเลี้ยงปลานิลในปัจจุบันมักพบปัญหาเกี่ยวกับการเกิดโรคและปัญหาการปนเปื้อนของสารพิษต่าง ๆ ยกตัวอย่าง เช่น สารกำจัดศัตรูพืชชนิดต่าง ๆ ทั้งสารกำจัดแมลงและสารกำจัดวัชพืช สำหรับในประเทศไทยสารกำจัดศัตรูพืชถูกนำมาใช้เกือบทุกพื้นที่ที่มีการเพาะปลูกดังนั้นจึงมีความเป็นไปได้ที่จะเกิดการสะสมของสารในกลุ่มดังกล่าว ไปยังสัตว์น้ำชนิดต่าง ๆ ทั้ง กุ้ง ปู หอยและปลา (Thanomsit *et al.*, 2016a, Thanomsit *et al.*, 2016b; Thanomsit *et al.*, 2018; Thanomsit *et al.*, 2020b) และยิ่งไปกว่านั้นสารกำจัดศัตรูพืชยังก่อให้เกิดการสะสมและเพิ่มจำนวนมากขึ้นเรื่อย ๆ ไปตามห่วงโซ่อาหาร มนุษย์ซึ่งเป็นผู้บริโภคในลำดับขั้นสูงที่สุดก็อาจจะได้รับผลกระทบเชิงลบต่อสุขภาพได้ (Thanomsit et al., *2020*) ดังนั้นในการศึกษาครั้งนี้มีวัตถุประสงค์คือการศึกษาผลของสารกำจัดวัชพืช 2, 4-D ไดเมทิลแอมโมเนียมในปลานิลที่ระดับความเข้มข้นระยะเวลาต่าง ๆ กันโดยเบื้องต้นจะทำการศึกษาถึงอัตราการตายสะสม ความเป็นพิษของ 2, 4-D ไดเมทิลแอมโมเนียม ศึกษาลักษณะสัณฐานวิทยาและพฤติกรรมของปลานิล การศึกษาการเปลี่ยนแปลงเนื้อเยื่อและตรวจสอบการแสดงออกของอะซิทิลโคลีนเอสเทอเรสซึ่งเป็นตัวชี้วัดทางชีวภาพของการได้รับสัมผัสของสารดังกล่าว

วิธีดำเนินการวิจัย

<u>สารเคมีที่ใช้ในงานวิจัย</u>

สารเคมีที่ใช้ทดสอบคือ สารกำจัดวัชพืช 2, 4-D ไดเมทิลแอมโมเนียม (รูปแบบเชิงการค้า) สารเคมีทั่วไปที่ใช้ในการศึกษาเป็นชนิดเกรดวิเคราะห์ และสารเคมีที่ใช้ในการศึกษารูปแบบโปรตีน และการศึกษาอะซิทิลโคลีนเอสเทอเรสเป็นผลิตภัณฑ์ของบริษัท Bio-Rad

<u>สัตว์ทดลอง</u>

ในการศึกษาครั้งนี้นำปลานิล ขนาดตัวโตเต็มวัย มาปรับสภาพในบ่อคอนกรีตขนาด 100 ลิตร เป็นเวลา 7 วัน หลังจากนั้นแบ่งตัวอย่างปลานิลออกเป็น 6 บ่อ ใส่ปลานิลบ่อละ 15 ตัวเติมสารกำจัดวัชพืช 2, 4-D ไดเมทิลแอมโมเนียมลงไปในบ่อ 5 ระดับความเข้มข้นเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม เก็บตัวอย่างปลาเพื่อศึกษาระดับความเป็นพิษที่เวลา 0, 24, 48, 72 และ 96 ชั่วโมงตามลำดับ

<u>การศึกษาอัตราการตายสะสม (%) และ lethal concentration (LC)</u>

ในการศึกษาครั้งนี้จะใช้การวิเคราะห์โพรบิทมาประเมินถึง lethal concentration โดยใช้ minitab software เบื้องต้นก่อนการคำนวณจะทำการศึกษาการตายสะสมของปลานิลที่ได้รับสัมผัสกับสารกำจัดวัชพืช 2, 4-D ไดเมทิลแอมโมเนียม โดยจะใช้ความเข้มข้นของสารกำจัดวัชพืช 2, 4-D ไดเมทิลแอมโมเนียมทั้งหมด 6 ความเข้มข้น เปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุมที่ไม่ได้รับสัมผัสและทำการประเมินเปอร์เซ็นต์การตายสะสมที่เวลา 24, 48, 72 และ 96 ชม. หลังจากนั้นศึกษาถึงระดับความ

เข้มข้นที่ไม่ก่อให้เกิดการตายเพื่อนำไปศึกษาถึงการศึกษาการเปลี่ยนแปลงพฤติกรรม การเปลี่ยนแปลงสรีรวิทยาของปลานิลที่ได้รับสัมผัสสารกำจัดวัชพืช 2, 4-D ไดเมทิลแอมโมเนียม และการแสดงออกของอะซิทิลโคลีนเอสเทอเรสต่อไป สำหรับการศึกษาอัตราการตายสะสมและหาค่า lethal concentration โดยใช้ Minitab® 17 software (entitlement i.d.: 2ec6-9637-1508-0264-2c55-c33) และใช้ข้อมูลอ้างอิงจาก OECD Fish Toxicity Testing Framework (2019)

การศึกษาการเปลี่ยนแปลงพฤติกรรมของปลานิลที่ได้รับสัมผัสสารกำจัดวัชพืช 2, 4-D ไดเมทิลแอมโมเนียม

ทำการประเมินการเปลี่ยนแปลงพฤติกรรมเมื่อปลานิลได้รับสัมผัสสารกำจัดวัชพืช 2, 4-D ไดเมทิลแอมโมเนียม เปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม โดยศึกษาที่เวลา 0, 1, 3, 6, 24, 48, 72, และ 96 ชั่วโมง ตามลำดับ

การศึกษาลักษณะสัณฐานวิทยาภายนอกของปลานิลได้รับสัมผัสสารกำจัดวัชพืช 2, 4-D ไดเมทิลแอมโมเนียม

ทำการประเมินการเปลี่ยนแปลงลักษณะสัณฐานวิทยาภายนอกเมื่อปลานิลได้รับสัมผัสสารกำจัดวัชพืช 2, 4-D ไดเมทิลแอมโมเนียม เปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม โดยศึกษาที่เวลา 0, 1, 3, 6, 24, 48, 72, และ 96 ชั่วโมง ตามลำดับ

การสกัดโปรตีนจากปลานิลเพื่อศึกษารูปแบบของโปรตีนและการวัดปริมาณโปรตีน

การสกัดโปรตีน

การสกัดโปรตีนจะดัดแปลงจาก Nuankaew *et al.* (2020c) นำปลานิลมาเลี้ยงในน้ำที่มีสารกำจัดวัชพืช 2, 4-D ไดเมทิลแอมโมเนียมความเข้มข้น 5 µl/L เป็นเวลา 24 – 96 ชั่วโมงเปรียบเทียบกับชุดควบคุมที่ไม่ได้รับสาร ทำการสลบปลาโดยใช้น้ำแข็ง หลังจากนั้นทำการผ่าตัดเอาสมอง เหงือกและกล้ามเนื้อของปลานิลที่เก็บมาได้ใส่ในบัฟเฟอร์ที่รักษาสภาพ (phosphate buffer (pH 7.2) ที่มี PMSF 0.1 M โดยอัตราส่วนของเนื้อเยื่อที่ใช้ในการสกัดคือ เนื้อเยื่อ 1 กรัมต่อบัฟเฟอร์ 2.0 ml หลังจากนั้นทำการสกัดเนื้อเยื่อโดยใช้ Homogenizer แล้วนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 5,000 rpm เป็นเวลา 60 นาที เก็บส่วนใสเพื่อใช้ในการตรวจวัดปริมาณอะซิทิลโคลีนเอสเทอเรส โดยใช้หลอดที่มีการเคลือบด้วย 10% PMSF

การวัดปริมาณโปรตีน

นำโปรตีนมาตรฐาน BSA มาเจือจางให้มีปริมาณโปรตีน 0.03125, 0.0625, 0.25, 0.5 และ 1 mg/ml ปริมาณ 0.5 ml หลังจากนั้นนำตัวอย่างโปรตีนที่สกัดได้จากสมอง กล้ามเนื้อ เหงือกและเลือดที่ต้องการวัดปริมาณโปรตีนมาเจือจางตัวอย่างด้วยน้ำกลั่น 1:10 เท่า นำสารละลาย BSA และตัวอย่างโปรตีนที่สกัดได้จาก สมอง เหงือก กล้ามเนื้อและเลือดของปลานิลตัวอย่างละ 10 ไมโครลิตร 2 ซ้ำ เติมสารละลาย Dye reagent เจือจาง ที่ ปริมาตร 200 ไมโครลิตร ทุกหลุม ผสมให้เข้ากัน ตั้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 5 นาที นำไปวัดค่าดารดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 595 นาโนเมตร บันทึกค่าการดูดกลืนแสงของสารละลาย BSA ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ นำมาสร้างกราฟมาตรฐานระหว่างปริมาณ BSA กับค่าการดูดกลืนแสง และนำค่าการดูดกลืนแสงของตัวอย่างมาเปรียบเทียบกับโปรตีนจากกราฟมาตรฐาน สำหรับการวิเคราะห์สถิติในการศึกษาปริมาณโปรตีนรวมในสมอง เหงือก และกล้ามเนื้อจะถูกนำมาวิเคราะห์สถิติแบบ t-test ใช้โปรแกรม SAS University edition (Order number 1095069) ในการวิเคราะห์โดยค่าที่ใช้คือค่าเฉลี่ยของชุดข้อมูลที่ระดับเชื่อมั่น 95%

การศึกษารูปแบบของโปรตีนที่พบในปลานิลโดยใช้เทคนิค SDS-PAGE และการศึกษาการแสดงออกของอะซิทิลโคลีนเอสเทอเรสโดยใช้เทคนิค Western blot

การศึกษารูปแบบของโปรตีนจากปลานิล ดัดแปลงจากการศึกษาของ Thanomsit *et al.* (2020c) โดยจะใช้เครื่อง miniPROTEIN® Tetra Cell ในการศึกษา ใช้ Separating gel 10 % และ Stacking gel 4% ปรับกระแสไฟฟ้าที่ต้องการแยกเป็น 110 โวลต์ หลังจากนั้นนำแผ่นเจลออกจากชุดกระจก นำแผ่นเจลส่วนไปย้อมสี 0.1% Coomassie blue เป็นเวลา 1 ชั่วโมง แล้วล้างสีส่วนที่ไม่ต้องการออกด้วยน้ำยาล้างสีย้อมโปรตีน 1 จนกระทั่งเห็นแถบสีน้ำเงินของโปรตีนที่อยู่บนแผ่นเจลชัดขึ้น และล้างด้วยน้ำยาล้างสีย้อมโปรตีน 2 เพื่อให้เห็นแถบสีน้ำเงินของโปรตีนชัดเจนและแผ่นเจลใส หลังจากนั้นล้างแผ่นเจลด้วยน้ำกลั่น เพื่อดูแถบโปรตีนและบันทึกผลแถบโปรตีนที่พบเปรียบเทียบกับโปรตีนมาตรฐานที่ทราบขนาดโมเลกุล (Pre-Stained protein ladder, Cleaver Sciencetific, Thailand) สำหรับการศึกษาความจำเพาะของอะซิทิลโคลีนเอสเทอเรสจะใช้เทคนิค Western blot โดยทำการแยกอะซิทิลโคลีนเอสเทอเรสใน 10 % SDS-PAGE จากนั้นนำเจลที่แยกโปรตีนแล้วถ่ายโปรตีนจากแผ่นเจลลงสู่กระดาษไนโตรเซลลูโลส นำไปแช่ในนมพร่องมันเนย 5% ใน PBS นำไปบ่มในโพลีโคลนอลแอนติบอดีที่จำเพาะต่ออะซิทิลโคลีนเอสเทอเรส (PAb-AChE: 1:200) เป็นเวลา 12 ชั่วโมง ล้างด้วย 0.5% blotto บ่มใน GAR-HRP 3 ชั่วโมง ล้างด้วย 0.5% นมพร่องมันเนยใน PBS และบ่มในสารละลาย 0.03% DAB, 0.006% H_2O_2, 0.05% $CoCl_2$ 3 นาที ล้างด้วยน้ำหลาย ๆ ครั้ง ตรวจดูแถบโปรตีนที่ให้ผลบวกกับแอนติบอดี คำนวณหาน้ำหนักโมเลกุลโดยเทียบกับโปรตีนมาตรฐาน(Pre-Stained protein ladder, Cleaver Sciencetific, Thailand) สำหรับอะซิทิลโคลีนเอสเทอเรสมีน้ำหนักโมเลกุล 71 kDa

การศึกษาแสดงออกของอะซิทิลโคลีนเอสเทอเรสโดยใช้เทคนิคดอทบลอท (dot blot)

การศึกษาแสดงออกของอะซิทิลโคลีนเอสเทอเรสโดยใช้เทคนิคดอทบลอท ดัดแปลงจากการศึกษาของ Nuankaew *et al.* (2020) โดยเตรียมตัวอย่างให้มีความเข้มข้นของโปรตีนเท่ากับ 40, 20, 10, 5, 2.5, 1.25, 0.625, 0.312, 0.156 และ 0.078 µg/µl หยดตัวอย่าง 1 µl ลงบนกระดาษไนโตรเซลลูโลส ทิ้งไว้ให้แห้งที่อุณหภูมิห้อง จากนั้นนำมาแช่ใน 5% นมพร่องมันเนยใน PBS เป็นเวลา 1 ชั่วโมง แล้วล้างออกด้วย PBS/0.5%Tween 20 ครั้งละ 5 นาที 3 ครั้ง จากนั้นบ่มในแอนติบอดีที่จำเพาะต่ออะซิทิลโคลีนเอสเทอเรส (PAb-AChE ระดับการเจือจาง 1:200) เป็นเวลา 12 ชั่วโมงล้างออกด้วย PBS/0.5%Tween 20 ครั้งละ 5 นาที 3 ครั้ง นำกระดาษไนโตรเซลลูโลสไปแช่ใน secondary antibody (GAR-HRP) ที่ระดับความเจือจาง 1:1,000 ข้ามคืนที่อุณหภูมิ 4 °C แล้วนำไปล้างโปรตีนส่วนเกินออกด้วยสารละลาย PBS/0.5%Tween 20 ครั้งละ 5 นาที 3 ครั้ง เป็นเวลา 5 นาที จำนวน 3 ครั้ง และนำกระดาษไนโตรเซลลูโลสมาทำให้เกิดสีปฏิกิริยาในสารละลายสับสเตรท (0.03% 3, 3'-diaminobenzidine tetrahydrochloride (DAB), 0.06% H_2O_2 และ 0.05% $CoCl_2$ ใน 0.15 M PBS, pH = 7.4) และบันทึกผลบวกของจุดโปรตีนสีน้ำตาลเทาที่เกิดขึ้นบนกระดาษไนโตรเซลลูโลส

การศึกษาการเปลี่ยนแปลงเนื้อเยื่อปลานิล

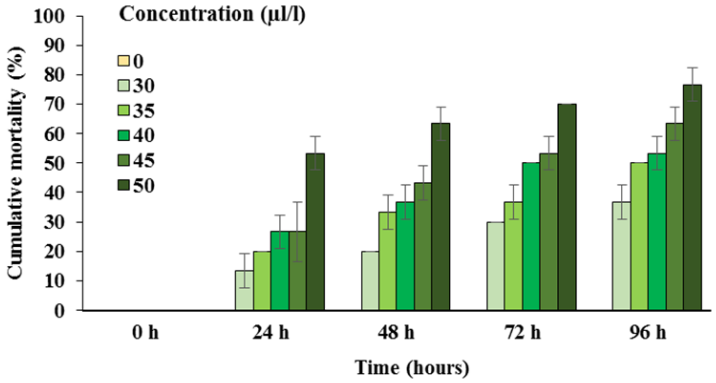
สุ่มเก็บตัวอย่างปลานิลจากกลุ่มควบคุมและกลุ่มทดลองที่ได้รับสัมผัสสารในระดับที่ไม่ก่อให้เกิดการตายหลังจากได้รับสารกำจัดวัชพืช 2, 4-D ไดเมทิลแอมโมเนียมตามระยะช่วงเวลาที่กำหนดที่ 24, 48, 72, และ96 ชั่วโมง โดยเก็บตัวอย่าง

กลุ่มล่ะ 3 ตัว จากนั้นสลบปลาด้วยน้ำแข็ง แล้วผ่าเก็บตัวอย่างเนื้อเยื่อกล้ามเนื้อปลานิลบนถาดน้ำแข็ง (on ice) ตลอดเวลา จากนั้นแบ่งเนื้อเยื่อเหงือก และกล้ามเนื้อปลานิลไปชั่งน้ำหนักวัดความยาวทั้งหมดแล้วนำเนื้อเยื่อเหงือกและเนื้อเยื่อกล้ามเนื้อไปรักษาสภาพด้วย 10 % phosphate buffer formalin เก็บรักษาตัวอย่าง 4 องศาเซลเซียส หลังจากนั้นตัดแต่งตัวอย่าง (trim) ให้มีขนาดเหมาะสม หลังจากนั้นนำตัวอย่างไปผ่านขั้นตอนการดึงน้ำออกจากตัวอย่างแล้วนำไปฝังด้วยพาราพลาสต์ จากนั้นนำบล็อค (block) ไปแช่ตู้เย็น ทำการตัดแต่งบล็อคตัวอย่างให้มีขนาดพอดีกับขนาดสไลด์ และแผ่นปิดสไลด์ จากนั้นนำไปตัดด้วยเครื่องไมโครโตม ให้มีความหนา 5 ไมครอน นำไปลอยในน้ำอุ่นที่อุณหภูมิ 45-50 องศาเซลเซียส ใช้แผ่นสไลด์ช้อนตัวอย่าง แล้วนำไปอบที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส เพื่อให้ตัวอย่างยึดติดแผ่นสไลด์ได้ดีหลังจากนั้นนำสไลด์ไปล้างพาราพลาสต์ออก แล้วย้อมด้วยสีฮีมาทอกซิลินและอีโอซิน

ผลการวิจัย

*ผลการศึกษาอัตราการตายสะสมและการศึกษาความเป็นพิษของสารกำจัดวัชพืช 2,4-D ไดเมทิลแอมโมเนีย*ม

เมื่อปลานิลได้รับสัมผัสกับสารกำจัดวัชพืช 2,4-D ไดเมทิลแอมโมเนียมที่ระดับความเข้มข้นต่าง ๆ กัน คือ 0, 30, 35, 40, 45 และ 50 µl/L เป็นเวลา 0-96 ชั่วโมงพบว่าอัตราการตายสะสมจะเพิ่มขึ้นตามระยะเวลาและระดับความเข้มข้นที่ได้รับสัมผัส อัตราการตายเกิดขึ้นครั้งแรกเมื่อปลานิลได้รับสัมผัสสารกำจัดวัชพืช 2,4-D ไดเมทิลแอมโมเนียมที่ระดับความเข้มข้น 30 µl/L โดยมีอัตราการตายสะสมที่ 13.33 ± 5.77% ส่วนอัตราการตายสูงสุดจะเกิดขึ้นเมื่อปลานิลได้รับสัมผัสสารกำจัดวัชพืช 2,4-D ไดเมทิลแอมโมเนียมที่ระดับความเข้มข้น 50 µl/L เป็นเวลา 96 ชั่วโมง อัตราการตายสะสมสูงสุดที่ตรวจสอบได้คิดเป็น 76.67 ± 5.77% (ภาพที่ 1)



ภาพที่ 1 อัตราการตายสะสมเมื่อปลานิลได้รับสารกำจัดวัชพืช 2,4-D ไดเมทิลแอมโมเนียม 0, 30, 35, 40, 45 และ 50 µl/L เป็นเวลา 0-96 ชั่วโมง

หลังจากทำการศึกษาและคำนวณอัตราการตายสะสมของปลานิลที่ได้รับสัมผัสสาร 2, 4-D ไดเมทิลแอมโมเนียมแล้ว อัตราการตายสะสมจะถูกแปลงเป็นค่าโพรบิท และนำไปคำนวณหาค่า LC_{10} , LC_{50}, และ LC_{90} ซึ่งจากการศึกษาพบว่า

ค่า LC_{10} ในปลานิลที่ได้รับสัมผัสกับ 2, 4-D ไดเมทิลแอมโมเนียมที่เวลา 24, 48, 72 และ 96 ชั่วโมง มีค่าเท่ากับ 28.32 (26.91-29.54), 22.61 (21.02-24.00), 18.69 (17.01-20.16) และ 15.66 (13.95-17.17) µl/L ค่า LC_{50} ที่เวลา 24, 48, 72 และ 96 ชั่วโมง มีค่าเท่ากับ 51.25 (50.19-52.49), 45.23 (44.51-46.02), 41.08 (4o.45-41.72) และ 37.42 (36.81-38.03) ul/L และค่า LC_{90} ที่เวลา 24,48,72 และ 96 ชั่วโมง มีค่าเท่ากับ 74.19 (71.40-77.50), 67.86 (66.78-70.07), 63.47 (62.76-66.50) และ 59.19 (57.81-60.73) µl/L ตามลำดับ (ตารางที่ 1)

ตารางที่ 1 ค่า LC_{10}, LC_{50} และ LC_{90} ของปลานิลที่ได้รับสัมผัสกับสารกำจัดวัชพืช 2, 4-D ไดเมทิลแอมโมเนียมที่เวลา 24, 48, 72 และ 96 ชั่วโมง

Time (hours)	LC_{10} (95% confidence) (µl/l)	LC_{50} (95% confidence) (µl/l)	LC_{90} (95% confidence) (µl/l)
24	28.32 (26.91-29.54)	51.25 (50.19-52.49)	74.19 (71.40-77.50)
48	22.61 (21.02-24.00)	45.23 (44.51-46.02)	67.86 (65.78-70.07)
72	18.69 (17.01-20.16)	41.08 (40.45-41.72)	63.47 (62.76-66.50)
96	15.66 (13.95-17.17)	37.42 (36.81-38.03)	59.19 (57.81-60.73)

ในการศึกษาครั้งนี้ทำการศึกษาถึงความเป็นพิษที่ก่อให้เกิดการตายแล้วจำนวน 5 ระดับความเข้มข้น คือ 30, 35, 40, 45 และ 50 µl/L เปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุมแล้ว การศึกษาครั้งนี้ยังศึกษาถึงความเป็นพิษที่ไม่ก่อให้เกิดการตายด้วย โดยทำการศึกษาความเป็นพิษของสาร 2, 4-D ไดเมทิลแอมโมเนียมในปลานิลในระดับความเข้มข้น 5 µl/L

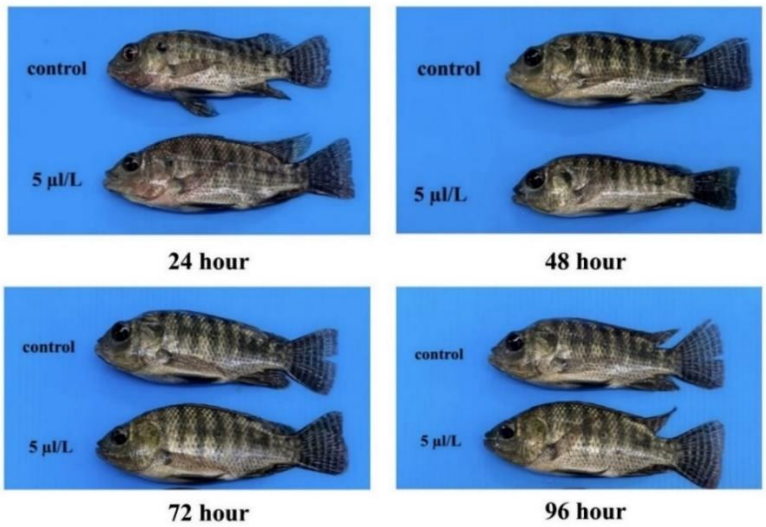
ผลการศึกษาการเปลี่ยนแปลงพฤติกรรมของปลานิลเมื่อได้รับสัมผัสสารกำจัดวัชพืช 2, 4-D ไดเมทิลแอมโมเนียม

พฤติกรรมของปลานิลที่มีการเปลี่ยนแปลงหลังจากสัมผัสกับสารกำจัดวัชพืช 2, 4-D ในระดับความเข้มข้นที่ไม่ก่อให้เกิดการตาย โดยในชั่วโมงที่ 1 ทุกระดับความเข้มข้นที่ทำการศึกษามีพฤติกรรมปกติ การเปลี่ยนแปลงพฤติกรรมเกิดขึ้นครั้งแรกในชั่วโมงที่ 3 โดยปลานิลจะลอยตัวบนผิวน้ำและฮุบอากาศบ่อยครั้งการเปลี่ยนแปลงพฤติกรรมจะเพิ่มมากขึ้นเมื่อปลานิลได้รับสารเป็นเวลานานและที่ระดับความเข้มข้นสูงขึ้นเรื่อยๆ โดยเมื่อเวลาผ่านไป 96 ชั่วโมง พฤติกรรมของปลานิลที่ตรวจสอบได้คือ รวมตัวกันอยู่ด้านล่างฮุบอากาศบ่อยครั้ง ขับถ่ายปริมาณมาก แผ่นปิดเหงือกจะเปิดและปิดเร็วมากกว่าปลาปกติ

*ผลการศึกษาการเปลี่ยนแปลงสัณฐานวิทยาของปลานิลเมื่อได้รับสัมผัสสารกำจัดวัชพืช 2, 4-D ไดเมทิลแอมโมเนี*ยม

หลังจากที่ทำการศึกษาถึงพฤติกรรมที่เปลี่ยนแปลงของปลานิลที่ได้รับสัมผัสสาร 2, 4-D ไดเมทิลแอมโมเนียม แล้วในการศึกษาครั้งนี้ก็ได้ทำการตรวจสอบถึงสัณฐานวิทยาที่เปลี่ยนแปลงไปด้วย โดยตรวจสอบในปลานิล 2 กลุ่ม คือ กลุ่มปลานิลที่

ได้รับสัมผัสกับสาร 2,4-D ไดเมทิลแอมโมเนียม แล้วไม่ทำให้ก่อให้เกิดการตาย (sub-lethal concentration) คือ 5 µl/L เปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุมซึ่งพบว่าปลานิลที่ได้รับสัมผัสกับสาร 2,4-D ไดเมทิลแอมโมเนียม ลักษณะสัณฐานวิทยาจะเปลี่ยนแปลงไปเมื่อปลานิลได้รับสัมผัสสารเป็นเวลา 24 ชั่วโมง ลักษณะสัณฐานวิทยาที่เปลี่ยนแปลงไป คือ มีแผลและจ้ำเลือดบริเวณแผ่นปิดเหงือก การเปลี่ยนแปลงสัณฐานวิทยาจะเพิ่มมากขึ้นตามระดับความเข้มข้นและระยะเวลาที่ได้รับสัมผัส โดยเมื่อปลานิลได้รับสัมผัสสารนานที่สุด คือเป็นเวลา 96 ชั่วโมง การเปลี่ยนแปลงทางสัณฐานวิทยาที่ตรวจสอบได้ คือ มีแผลและจ้ำเลือดบริเวณแผ่นปิดเหงือกและครีบอก (ภาพที่ 2)



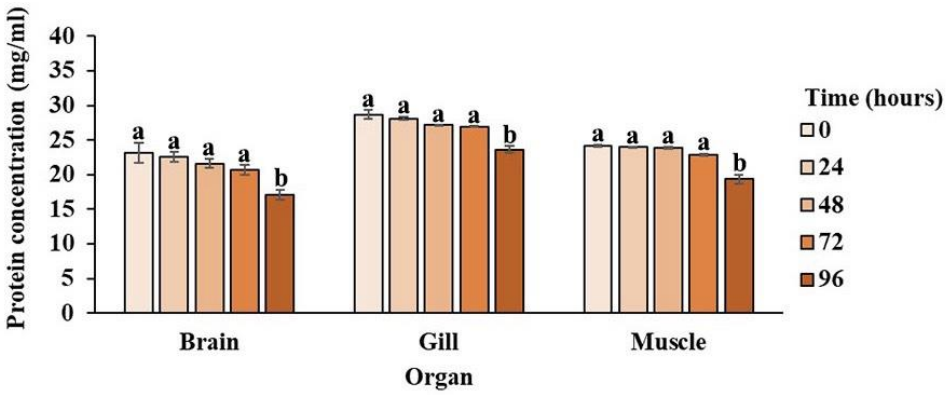
ภาพที่ 2 การเปลี่ยนแปลงสัณฐานวิทยาของปลานิลเมื่อได้รับสัมผัสสารกำจัดวัชพืช 2, 4-D ไดเมทิลแอมโมเนียมความเข้มข้น 5 µl/L เปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม (Control)

<u>การศึกษาปริมาณโปรตีนรวมที่พบในเนื้อเยื่อของปลานิลเมื่อได้รับสัมผัสสารกำจัดวัชพืช 2, 4-D ไดเมทิลแอมโมเนียม</u>

เมื่อทำการศึกษาปริมาณโปรตีนรวมในเนื้อเยื่อสมอง เหงือก และกล้ามเนื้อของปลานิลได้รับสัมผัสสารกำจัดวัชพืช 2, 4-D ไดเมทิลแอมโมเนียมพบว่า แนวโน้มของปริมาณโปรตีนจะลดลงเมื่อปลานิลได้รับสารนานขึ้น โดยในทุกเนื้อเยื่อที่ทำการศึกษาพบว่า เมื่อปลานิลได้รับสัมผัสสารเป็นเวลา 96 ชั่วโมงปริมาณโปรตีนที่ตรวจสอบได้จะแตกต่างจากกลุ่มควบคุมและกลุ่มที่ได้รับสัมผัสสารเป็นเวลา 24, 48 และ 72 ชั่วโมง อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมัน 95%

ในเนื้อเยื่อสมองปริมาณโปรตีนรวมที่ตรวจสอบได้ในกลุ่มควบคุมและกลุ่มที่ได้รับสัมผัสสารเป็นเวลา 24, 48, 72 และ 96 ชั่วโมง มีค่าเท่ากับ 23.14±1.38, 22.62±0.7, 21.61±0.7, 20.66±0.67 และ 17.07±0.68 mg/ml

ปริมาณโปรตีนรวมในเนื้อเยื่อเหงือกที่ตรวจสอบได้ในกลุ่มควบคุมและกลุ่มที่ได้รับสัมผัสสารเป็นเวลา 24, 48, 72 และ 96 ชั่วโมง มีค่าเท่ากับ 28.65±0.65, 28.12±0.15, 27.15±0.09, 26.93±0.08 และ 23.63±0.53 mg/ml และในเนื้อเยื่อกล้ามเนื้อปริมาณโปรตีนรวมในเนื้อเยื่อเหงือกที่ตรวจสอบได้ในกลุ่มควบคุมและกลุ่มที่ได้รับสัมผัสสารเป็นเวลา 24, 48, 72 และ 96 ชั่วโมง มีค่าเท่ากับ 24.16±0.09, 24.00±0.00, 23.89±0.12, 22.86±0.17 และ 19.34±0.61 mg/ml

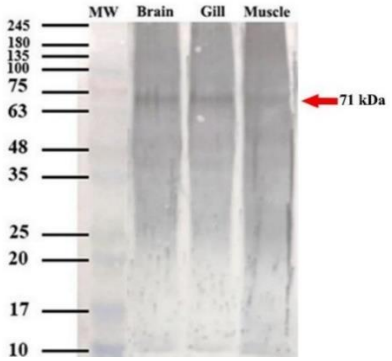


ภาพที่ 3 ปริมาณโปรตีนรวมในเนื้อเยื่อสมอง เหงือก และกล้าเนื้อของปลานิลเมื่อได้รับสัมผัสสารกำจัดวัชพืช 2, 4-D ไดเมทิลแอมโมเนียมในระดับความเข้มข้นที่ไม่ก่อให้เกิดการตาย (5 µl/L) เป็นเวลา 0, 24, 48, 72 และ 96 ชั่วโมง

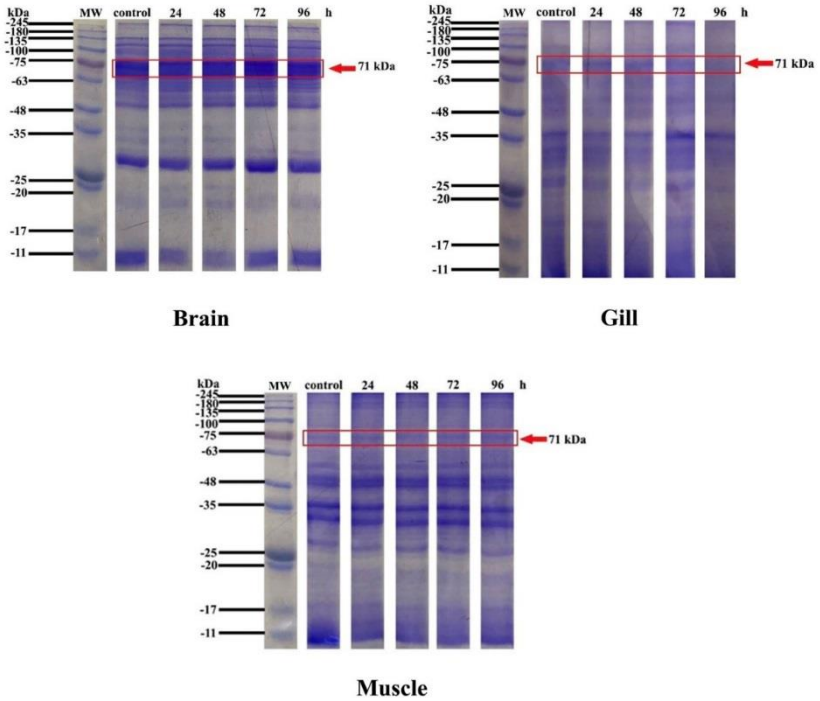
หมายเหตุ : อักษรภาษาอังกฤษที่ต่างกัน หมายถึง มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม ($p<0.05$)

<u>ผลการศึกษารูปแบบของโปรตีนในปลานิลเมื่อได้รับสัมผัสสารกำจัดวัชพืช 2, 4-D ไดเมทิลแอมโมเนียมและการศึกษาการแสดงออกของอะซิทิลโคลีนเอสเทอเรสโดยใช้เทคนิค Western blot</u>

หลังจากที่ทำการสกัดโปรตีนและวัดปริมาณโปรตีนในเนื้อเยื่อต่าง ๆ คือ สมอง เหงือก และกล้ามเนื้อแล้ว ตัวอย่างจากการสกัดจะถูกนำมาศึกษารูปแบบโปรตีนที่แยกได้และศึกษาถึงการแสดงออกของอะซิทิลโคลีนเอสเทอเรสโดยทดสอบด้วยเทคนิค Western blot ซึ่งจากการศึกษาพบอะซิทิลโคลีนเอสเทอเรสมีขนาด 71 kDa ในเนื้อเยื่อทั้งสามอวัยวะ (ภาพที่ 4) เทคนิคโซเดียมโดดีคริลซัลเฟต เจล อิเลคโตรโฟรีซีส Sodium Dodecyl Sulfate Polyacrylamide Gel Electrophoresis (SDS-PAGE) ถูกนำมาใช้ในการศึกษารูปแบบของโปรตีนในเนื้อเยื่อสมอง เนื้อเยื่อเหงือก และเนื้อเยื่อกล้ามเนื้อ (ภาพที่ 5) ของปลานิลเมื่อได้รับสัมผัสสารกำจัดวัชพืช 2, 4-D ไดเมทิลแอมโมเนียมในระดับความเข้มข้นที่ไม่ก่อให้เกิดการตาย (5 µl/L) ซึ่งจากการศึกษาพบว่าแนวโน้มของอะซิทิลโคลีนเอสเทอเรสจะลดลงในทุกเนื้อเยื่อที่ทำการศึกษาเมื่อได้รับสัมผัสสารเป็นเวลานานขึ้น โดยอะซิทิลโคลีนโคลีนเอสเทอเรสมีน้ำหนักโมเลกุล 71 kDa ภาพที่ 5 แสดงให้เห็นรูปแบบโปรตีนที่พบในเนื้อเยื่อชนิดต่าง ๆ



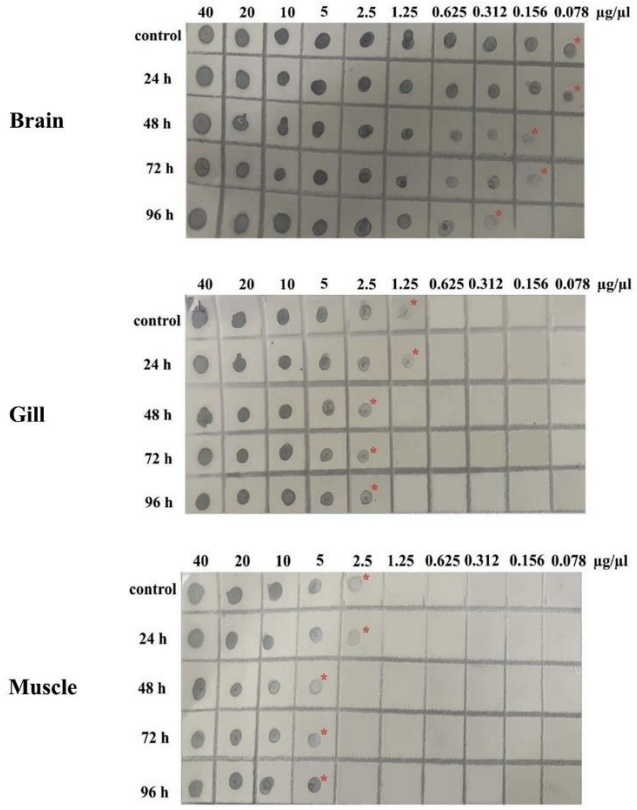
ภาพที่ 4 การศึกษาการแสดงออกของอะซิทิลโคลีนเอสเทอเรสที่แยกได้จากสมอง เหงือก และกล้ามเนื้อของปลานิลโดยใช้เทคนิค Western blot (PAb-AChE 1:200) ปริมาณโปรตีน 8 µg/µl



ภาพที่ 5 ผลการศึกษารูปแบบของโปรตีนโดยใช้เทคนิค 10% SDS-PAGE ในสมอง เหงือกและกล้ามเนื้อของปลานิลที่ได้รับสัมผัสกับสารกำจัดวัชพืช 2, 4-D ไดเมทิลแอมโมเนียมในระดับความเข้มข้นที่ไม่ก่อให้เกิดการตาย (5 µl/L) เป็นเวลา 0, 24, 48, 72 และ 96 ชั่วโมง ปริมาณโปรตีน 8 µg/µl

ผลการศึกษาการแสดงออกของอะซิทิลโคลีนเอสเทอเรสในปลานิลเมื่อได้รับสัมผัสสารกำจัดวัชพืช 2, 4-D ไดเมทิลแอมโมเนียม โดยใช้เทคนิค dot blot

ในสมองของปลานิลเมื่อได้รับสัมผัสกับสารกำจัดวัชพืช 2, 4-D ไดเมทิลแอมโมเนียมในระดับความเข้มข้นที่ไม่ก่อให้เกิดการตายคือ 5 ul/L พบว่า ในปลานิลกลุ่มควบคุมและกลุ่มที่ได้รับสัมผัสสารเป็นเวลา 24, 48, 72 และ 96 ชั่วโมงพบว่าการแสดงออกของอะซิทิลโคลีนเอสเทอเรสเมื่อศึกษาด้วยเทคนิค dot blot มีแนวโน้มจะลดลงเมื่อสัมผัสกับสารเป็นระยะเวลานานโดยขีดจำกัดการตรวจสอบคือ 0.078, 0.078, 0.156, 0.156 และ 0.312 µg/µl (ภาพที่ 6)



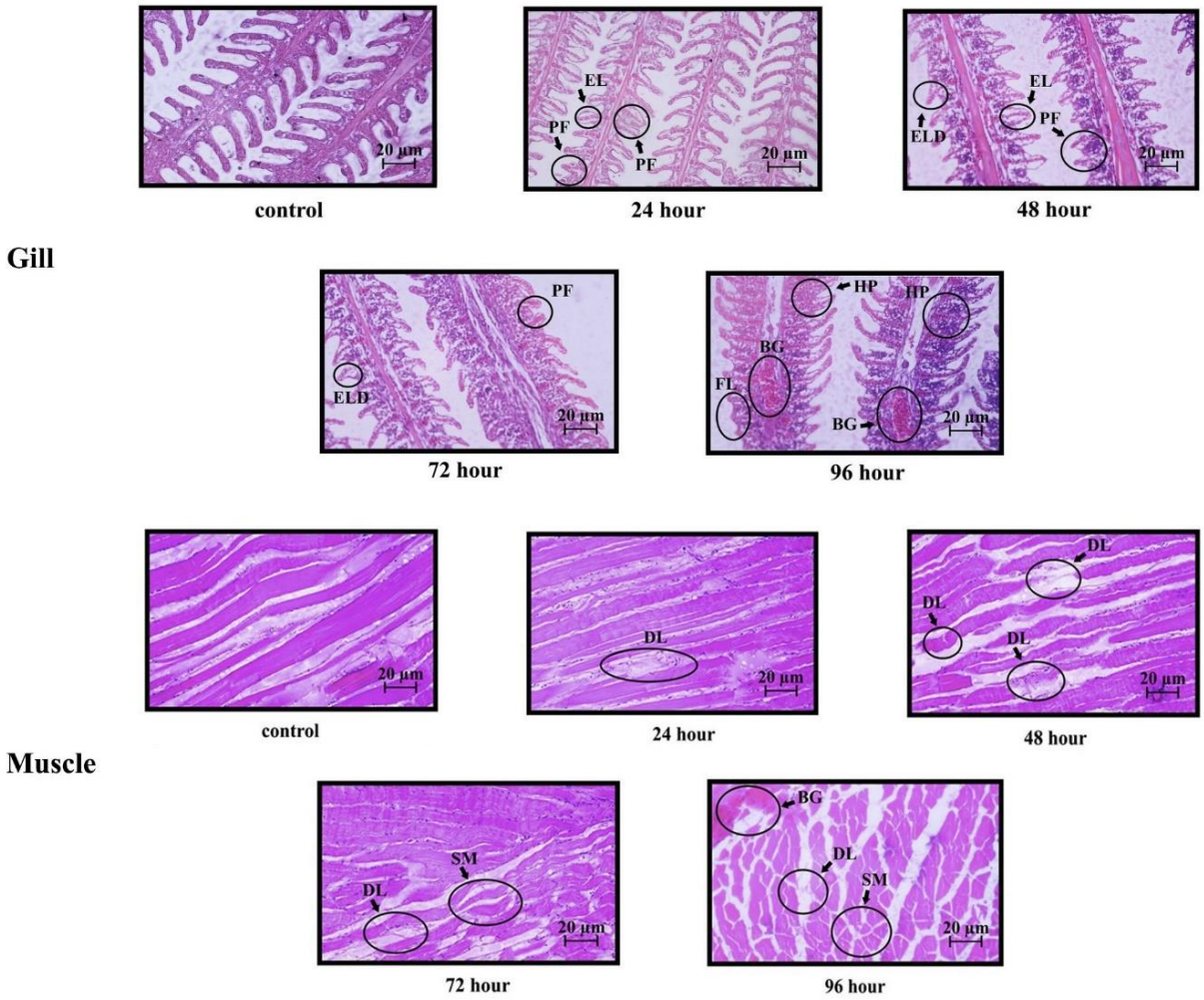
ภาพที่ 6 ผลการตรวจสอบอะซิทิลโคลีนเอสเทอเรสในสมอง เหงือก และกล้ามเนื้อของปลานิลเมื่อได้รับสัมผัส 2,4-D ไดเมทิลแอมโมเนียมในระดับที่ไม่ก่อให้เกิดการตาย ความเข้มข้น 5 µl/L

ผลการศึกษาการเปลี่ยนแปลงเนื้อเยื่อเมื่อปลานิลได้รับสัมผัสกับสารกำจัดวัชพืช 2, 4-D ไดเมทิลแอมโนเนียมในระดับที่ไม่ก่อให้เกิดการตาย

ในการศึกษาการเปลี่ยนแปลงเนื้อเยื่อของปลานิลที่ได้รับสัมผัสกับสารกำจัดวัชพืช 2, 4-D ไดเมทิลแอมโนเนียมในระดับที่ไม่ก่อให้เกิดการตายคือความเข้มข้น 5 µl/L โดยประเมินการเปลี่ยนแปลงจากเนื้อเยื่อเหงือกและกล้ามเนื้อพบว่าการ

เปลี่ยนแปลงของเนื้อเยื่อจะขึ้นอยู่กับระยะเวลาที่ได้รับสัมผัสซึ่งจากการศึกษาพบว่าในเนื้อเยื่อเหงือกการเปลี่ยนแปลงจะเกิดขึ้นเมื่อปลานิลได้รับสัมผัสกับสารเป็นเวลา 24 ชั่วโมงโดยการเปลี่ยนแปลงที่ตรวจสอบได้คือ การเกิด epithelial lifting และ partial fusion of lamellae เมื่อปลานิลได้รับสัมผัสสารนานขึ้นคือเป็นเวลา 48 ชั่วโมง การเปลี่ยนแปลงของเนื้อเยื่อที่ตรวจสอบได้คือ epithelial lifting, partial fusion of lamellae และเกิด edema และ lamellae disorganization และเมื่อปลานิลได้รับสัมผัสสารเป็นเวลา 72 ชั่วโมงการเปลี่ยนแปลงของเนื้อเยื่อเหงือกที่ตรวจสอบได้คือ partial fusion of lamellae และ edema and lamellae disorganization และที่ระยะเวลานานสูงสุดที่ทำการศึกษาคือ 96 ชั่วโมงการเปลี่ยนแปลงของเนื้อเยื่อปลานิลที่ตรวจสอบได้คือ hyperplasia และ blood congestion ในหลายบริเวณ (ภาพที่ 7)

เมื่อทำการศึกษาการเปลี่ยนแปลงของเนื้อเยื่อกล้ามเนื้อพบว่า เมื่อปลานิลได้รับสัมผัสกับสารกำจัดวัชพืช 2,4-D ไดเมทิลแอมโมเนียม เมื่อเวลาผ่านไป 24 ชั่วโมง การเปลี่ยนแปลงของเนื้อเยื่อที่เกิดขึ้นคือ เกิด dilation of muscle fibers และเมื่อปลานิลได้รับสัมผัสสารนานขึ้นคือเป็นเวลา 48 ชั่วโมง การเปลี่ยนแปลงของเนื้อเยื่อที่ตรวจสอบได้คือ จะเกิดอาการ dilation of muscle fibers หลายบริเวณ และยิ่งไปกว่านั้นเมื่อปลานิลได้รับสัมผัสสารเป็นเวลา 72 ชั่วโมงพบว่านอกเหนือจากการเกิดอาการ dilation of muscle fibers แล้วในเนื้อเยื่อกล้ามเนื้อยังตรวจพบอาการ spiting of muscle fibers ด้วย และท้ายที่สุดเมื่อปลานิลได้รับสัมผัสสารเป็นเวลานานที่สุดจะเกิดการเปลี่ยนแปลงมากที่สุด คือ เกิด dilation of muscle fibers, spiting of muscle fibers และเกิด blood congestion (ภาพที่ 7)



ภาพที่ 7 การศึกษาการเปลี่ยนแปลงเนื้อเยื่อของเหงือกและกล้ามเนื้อปลานิลเมื่อปลานิลได้รับสัมผัสกับสารกำจัดวัชพืช 2,4-D ไดเมทิลแอมโนเนียมในระดับที่ไม่ก่อให้เกิดการตาย (5 µl/L) เป็นเวลา 24, 48, 72 และ 96 ชั่วโมงเปรียบเทียบกับชุดควบคุมโดยที่ EL: epithelial lifting, PF: partial fusion of lamellae ELD: edema และ lamellae disorganization HP: hyperplasia, BG: blood congestion, DL: dilation of muscle fibers, SM: spiting of muscle fibers, BG: blood congestion

วิจารณ์ผลการวิจัย

สารกำจัดวัชพืช 2, 4-dichlorophenoxyacetic acid (2,4-D) เป็นสารกำจัดวัชพืชในกลุ่ม chlorophenoxyacetic acid ประโยชน์หลักคือใช้สำหรับกำจัดวัชพืชใบกว้าง (broad-leaf weed) สำหรับธัญพืช สนามหญ้า สวนสาธารณะ และสนาม

กอล์ฟ นอกจากนี้ ยังใช้เป็นสารควบคุมการเจริญเติบโต (growth regulator) ในพืชใบเลี้ยงคู่เพื่อให้ได้ผลผลิตเพิ่มขึ้น ในทางการค้านอกจาก 2, 4-D ในรูปของ acid ที่ใช้เป็นสารออกฤทธิ์แล้วยังมีอนุพันธ์ที่เป็นเกลือ (salt) และเอสเตอร์ (ester) จำนวนหลายสาร สารกำจัดวัชพืช 2, 4-D ที่ปนเปื้อนในสิ่งแวดล้อมถูกย่อยสลายได้อย่างรวดเร็ว ในอากาศทำปฏิกิริยาออกซิเดชันกับอนุมูลอิสระไฮดรอกซิล ในน้ำเกิดปฏิกิริยาการแตกสลายด้วยน้ำได้โดยมีแสงเป็นตัวเร่งปฏิกิริยา ในดินถูกย่อยสลายโดยชีวภาพ (Pollution Control Department, 2010)

Ackers *et al*. (2000) รายงานว่า นักวิจัยในมหาวิทยาลัยแมรีแลนด์ ได้ศึกษาถึงผลกระทบของสาร 2, 4-D ในปลา ซึ่งโครงสร้างของสารในกลุ่มนี้จะไปมีผลต่อฮอร์โมนและระบบการสืบพันธุ์โดยตรวจพบการเปลี่ยนแปลงในปลาเมื่อปลาสัมผัสกับสารดังกล่าวที่ระดับความเข้มข้น 10 ppb และยิ่งไปกว่านั้น Sarikaya & Yilmaz (2003) รายงานเพิ่มเติมว่าหากปลา (*Cyprinus carpio*) ได้รับสัมผัสกับสาร 2, 4-D จะก่อให้เกิดความเป็นพิษในปลาสูงมาก และในปลา *Clarias batrachus* หากรับสัมผัสกับสาร 2, 4-D จะก่อให้เกิดการเปลี่ยนแปลงทางพันธุกรรมและการเปลี่ยนแปลงเนื้อเยื่อ (Ateeq *et al*., 2006)

Castro Marcato *et al*. (2006) เสนอแนะว่าการใช้สารกำจัดวัชพืชชนิดต่างๆ ในการทำการเกษตรเป็นสาเหตุสำคัญที่ทำให้เกิดผลกระทบต่อสุขภาพ เนื่องจากสารกำจัดวัชพืชมีความคงตัวและสามารถสะสมในสิ่งมีชีวิตไปตามสายใยอาหาร ซึ่งสายใยอาหารจะเป็นเส้นทางหลักที่ทำให้มนุษย์ได้รับสัมผัสสารดังกล่าว เนื่องจากมนุษย์บริโภคปลาและหอยที่ได้รับ การปนเปื้อนและยิ่งไปกว่านั้นยังมีรายงานอีกว่าสารกำจัดวัชพืช 2, 4-D ส่งผลต่ออัตราการเมทาบอลิซึมในสัตว์น้ำและก่อให้เกิดการตายของเซลล์ในสัตว์น้ำชนิดต่างๆ ที่พบในสายใยอาหารด้วย จากความสำคัญดังกล่าวข้างต้นการศึกษาครั้งนี้จึงมีเป้าหมายเพื่อจะศึกษาความเป็นพิษของของสารกำจัดวัชพืช 2,4-D ไดเมทิลแอมโมเนียมในปลานิลและการตรวจสอบการแสดงออกของอะซิทิลโคลีนเอสเทอเรส (ตัวชี้วัดทางชีวภาพ) เพื่อบ่งชี้การรับสัมผัสในระดับความเข้มข้นที่ไม่ก่อให้เกิดการตาย พร้อมทั้งศึกษาการเปลี่ยนแปลงพฤติกรรม การเปลี่ยนแปลงสัณฐานวิทยา และการเปลี่ยนแปลงเนื้อเยื่อของปลานิลที่ได้รับสัมผัสสารดังกล่าวในระดับห้องปฏิบัติการเพื่อเป็นข้อมูลเบื้องต้นสำหรับการตรวจสอบการปนเปื้อนของสารกำจัดวัชพืช 2,4-D ไดเมทิลแอมโมเนียมในสิ่งแวดล้อมทางน้ำต่อไป

เมื่อปลานิลได้รับสัมผัสกับวัชพืช 2,4-D ไดเมทิลแอมโนเนียม เบื้องต้นจะทำการศึกษาถึงอัตราการตายสะสมของปลานิล ในระดับความเข้มข้น 0, 30, 35, 40, 45 และ 50 µl/L เป็นเวลา 0-96 ชั่วโมง ซึ่งจากการศึกษาพบว่าอัตราการตายสะสมจะเพิ่มขึ้นตามความเข้มข้นของสารและระยะเวลาที่ปลานิลได้รับสัมผัส โดยอัตราการตายสะสมจะเกิดขึ้นเมื่อเวลา 96 ชั่วโมง คล้ายคลึงกับการศึกษาของ Babieri (2009) ที่ทำการศึกษาถึงผลของสาร 2, 4-D ในปลา *Geophagus brasiliensis* โดยทดสอบที่ระดับความเข้มข้น 1,5,10,20,40 และ 80 mg/L เป็นเวลา 96 ชั่วโมง พบว่า ปลาเกิดการตาย และยิ่งไปกว่านั้นสารดังกล่าวส่งผลต่อการหายใจและปลาขับแอมโมเนีย (ของเสีย) ออกมามากกว่าปกติ โดยในปลาที่ได้รับสัมผัสกับสารเป็นเวลา 96 ชั่วโมง ที่ระดับความเข้มข้นสูงสุด คือ 80 mg/L จะก่อให้เกิดการตาย 100% และอัตราการหายใจจะสูงกว่ากลุ่มอื่น ๆ อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ

หลังจากที่ทำการศึกษาอัตราการตายสะสมของปลานิลที่ได้รับสัมผัสกับสารกำจัดวัชพืช 2,4-D ไดเมทิลแอมโนเนียมแล้ว ค่าอัตราการตายสะสมจะถูกนำไปประเมินถึงค่าความเป็นพิษของสารโดยการวิเคราะห์โพรบิท ซึ่งค่า LC_{10},

LC_{50} และ LC_{90} ในการศึกษาครั้งนี้จะแตกต่างกับการศึกษาก่อนหน้านี้ เช่น การศึกษาของ Sarikaya & Selvi (2005) ที่รายงานว่าค่า LC_{50} ที่พบในปลานิล(*Oreochromis niloticus*) ตัวเต็มวัย คือ 86.90 mg/L และแตกต่างจากการศึกษาของ Castro Marcato *et al*. (2017) ที่รายงานค่า LC_{50} ในปลาชนิดต่าง ๆ คือปลา fathead minnows (*Pimephales pro*melas), ปลา blue gills (*Lepomis macrochirus*) และปลา rainbow trout (*Salmo gairdneri*) ว่าเมื่อปลาได้รับสัมผัสกับสาร 2, 4-D ว่า ค่า LC_{50} ที่ตรวจพบอยู่ในช่วง 250-600 mg/L และยิ่งไปกว่านั้นยังแตกต่างกับการศึกษาของ Barbieri (2008) ที่รายงานว่าความเป็นพิษ (LC_{50}) ของ 2,4-D (2,4-di Chlorophenoxyacetic acid) ในปลา *Gophagus bra*siliensis ซึ่งพบว่าที่เวลา 24, 48, 72 และ 96 ชั่วโมง มีค่า LC_{50} เท่ากับ 45.95, 32.49, 28.28 และ 15.16 mg/L ซึ่งสาเหตุที่การศึกษาค่า LC_{50} ของปลานิลได้รับสัมผัสกับวัชพืช 2,4-D ไดเมทิลแอมโนเนียมแตกต่างจากการศึกษาอื่น ๆ ที่มีรายงานก่อนหน้านี้อาจจะเนื่องมาจากรูปแบบของสารที่ใช้ในการศึกษาและ ชนิดของปลา

เมื่อทำการศึกษาถึงความเป็นพิษที่ก่อให้เกิดการตายแล้ว ในการศึกษาครั้งนี้จะศึกษาถึงผลกระทบของ สารกำจัดวัชพืช 2,4-D ไดเมทิลแอมโนเนียมในระดับที่ไม่ก่อให้เกิดการตายในปลานิลด้วย โดยระดับความเข้มข้นของสารที่ใช้ทดสอบคือ 5 µl/L ซึ่งจากการศึกษาพบว่าสารกำจัดวัชพืช 2,4-D ไดเมทิลแอมโนเนียมส่งผลต่อพฤติกรรมและสัณฐานวิทยาของปลานิลโดยการเปลี่ยนแปลงทั้งพฤติกรรมและสัณฐานวิทยา แตกต่างจากกลุ่มควบคุมโดยขึ้นอยู่กับระยะเวลาที่ได้รับสัมผัส การเปลี่ยนแปลงที่เกิดขึ้นคือ การเปลี่ยนแปลงพฤติกรรมที่ตรวจสอบได้คือ ปลานิลจะลอยตัวบนผิวน้ำและฮุบอากาศบ่อยครั้ง มีการขับของเสียปริมาณมาก และแผ่นปิดเหงือกจะเปิดและปิดเร็วมากกว่าปลาปกติ ส่วนการเปลี่ยนแปลงสัณฐานวิทยาที่ตรวจสอบได้คือ เกิดแผลและจ้ำเลือดบริเวณแผ่นปิดเหงือกและครีบ ซึ่งสอดคล้อง Cattaneo *et al*. (2008) ที่รายงานเรื่องผลของสาร 2, 4-D ในปลา *Rhamdia quelen* จากประเมินการเปลี่ยนแปลงพฤติกรรม ซึ่งพบว่าปลาจะว่ายน้ำผิดปกติ และสอดคล้องกับการศึกษาของ Thanomsit *et al*. (2016a) ศึกษาถึงผลกระทบของสารกำจัดวัชพืช (ไกลโฟเสท) ในปลากะพงขาว ผลการศึกษาพบว่าสารกำจัดวัชพืช (ไกลโฟเสท) ส่งผลต่อการเปลี่ยนแปลงลักษณะพฤติกรรมและสัณฐานวิทยา โดยพฤติกรรมของปลากะพงขาวที่เปลี่ยนแปลงคือว่ายน้ำแบบควงสว่านและเสียการทรงตัว ส่วนลักษณะสัณฐานวิทยาที่เปลี่ยนแปลงไปจากกลุ่มที่ตรวจสอบได้ คือ ลำตัวมีสีซีดจาง เหงือกสีซีดจาง ท้องบวมและมีอาการตกเลือดตามส่วนต่าง ๆ ของร่างกาย

เป็นที่ทราบกันดีว่าสารกำจัดศัตรูพืชมีฤทธิ์ยับยั้งการทำงานของเอนไซม์โคลีนเอสเทอเรสในสิ่งมีชีวิตและมีรายงานสารกำจัดวัชพืช เช่น ไกลโฟเสทและพาราควอตก็ส่งผลต่อการแสดงออกของอะซิทิลโคลีนเอสเทอเรสเช่นเดียวกัน (Modezto & Martnez, 2010; Braz-Mota et al., 2016) ด้วยเหตุนี้จึงมีการตรวจประเมินการรับสัมผัสสารกำจัดศัตรูพืชด้วยการตรวจวัดการทำงานของเอนไซม์อะซิทิลโคลีนเอสเทอเรสจึงเป็นสิ่งสำคัญ เทคนิคที่ใช้สำหรับการวิเคราะห์อะซิทิลโคลีนเอสเทอเรสตามที่มีรายงานนั้นมีด้วยกันหลายวิธี เทคนิคทางแอนติบอดี เช่น เทคนิค dot blot และ Western blot เป็นต้น (Thanomsit *et al.*, 2020c; Thanomsit *et al*., 2021)

เทคนิค dot blot เป็นเทคนิคทางแอนติบอดีแบบหนึ่ง การตรวจวิเคราะห์ใช้หลักการของแอนติบอดีและแอนติเจนที่จำเพาะต่อกันทำปฏิกิริยาบนแผ่นเมมเบรน เมื่อเติมแอนติบอดีที่ติดฉลากด้วยเอนไซม์มาจับกับแอนติเจน หรือแอนติบอดีที่จำเพาะต่อแอนติเจนที่สนใจ ซึ่งเทคนิคนี้สามารถตรวจสอบตัวอย่างจำนวนมากได้ในเวลาอันรวดเร็ว มีความแม่นยำสูง

สามารถวิเคราะห์ได้ในระดับนาโนกรัม ค่าใช้จ่ายน้อย และขั้นตอนไม่ยุ่งยาก จึงมีการนำไปประยุกต์ใช้กับการตรวจสอบทั้งในเชิงสิ่งแวดล้อม การเกษตร หรือทางการแพทย์อย่างกว้างขวาง ดังนั้น เทคนิค dot blot จึงถือเป็นทางเลือกหนึ่งที่มีความน่าสนใจในการนำมาพัฒนาเพื่อตรวจสอบการปนเปื้อนสารรบกวนการทำงานของต่อมไร้ท่อในสิ่งแวดล้อม รวมทั้งการตรวจสอบการปนเปื้อนของสารกำจัดวัชพืชในสัตว์น้ำได้ (Peter *et al*., 2001; Rupprecht *et al*., 2010; Bastos *et al*., 2018; Thanomsit *et al*., 2020c) ในการศึกษาครั้งนี้ได้ทำการแยกอะซิทิลโคลีนเอสเทอเรสโดยใช้เทคนิค เจล อิเลคโตรโฟรีซีส (10% SDS-PAGE) และศึกษาความจำเพาะของอะซิทิลโคลีนเอสเทอเรสในเนื้อเยื่อสมอง เหงือก และกล้ามเนื้อของปลานิลที่ได้รับสัมผัสกับสารกำจัดวัชพืช 2, 4-D ไดเมทธิลแอมโนเนียมในระดับที่ไม่ก่อให้เกิดการตาย พบว่าอะซิทิลโคลีนเอสเทอเรสที่แยกได้มีขนาดน้ำหนักโมเลกุลเท่ากับ 71 kDa ซึ่งสอดคล้องกับการศึกษาก่อนหน้านี้ที่ Thanomsit *et al*. (2018) และ Thanomsit *et al*. (2020c) รายงานไว้ในปลาดุกลูกผสม ปลาช่อนและปลาหมอ และยิ่งไปกว่านั้นในการศึกษาครั้งนี้ได้ทำการศึกษาถึงการแสดงออกของอะซิทิลโคลีนเอสเทอเรสในเนื้อเยื่อสมอง เนื้อเยื่อเหงือก และเนื้อเยื่อกล้ามเนื้อของปลานิลซึ่งพบว่าเทคนิคดังกล่าวนำมาใช้ในการตรวจสอบได้และการแสดงออกของอะซิทิลโคลีนเอสเทอเรสมีแนวโน้มที่จะลดลงหากปลานิลสัมผัสสารเป็นเวลานาน สอดคล้องกับการศึกษาของ Nuankaew *et al*. (2020) รายงานว่าเทคนิค dot blot สามารถนำมาประยุกต์ใช้ในการตรวจสอบการแสดงออกของอะซิทิลโคลีนเอสเทอเรสในปลานิลที่ได้รับสัมผัสสารกำจัดวัชพืช (พาราควอต)ได้ โดยขีดจำกัดของการตรวจสอบจะลดลงหากปลานิลสัมผัสสารเป็นเวลานานเมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม และการศึกษาการแสดงออกของอะซิทิลโคลีนเอสเทอเรสในปลานิลเมื่อสัมผัสกับสารกำจัดวัชพืช 2,4-D ไดเมทธิลแอมโนเนียมยังสอดคล้องกับการศึกษาของ Atamaniuk *et al*. (2013) ที่ทำการประเมินถึงการแสดงออกของอะซิทิลโคลีนเอสเทอเรสในปลาทองที่ได้รับสัมผัสกับสาร 2, 4-D โดยจากการศึกษาพบว่า อะซิทิลโคลีนเอสเทอเรสในเนื้อเยื่อเหงือกจะลดต่ำลงกว่ากลุ่มควบคุม

หลังจากที่ทำการศึกษาเรื่องของการเปลี่ยนแปลงพฤติกรรม สัณฐานวิทยาและการแสดงออกของอะซิทิลโคลีนเอสเทอเรสซึ่งเป็นตัวชี้วัดทางชีวภาพที่ได้รับสัมผัสแล้ว เทคนิคสุดท้ายที่นำมาใช้ในการศึกษาถึงผลกระทบของสารกำจัดวัชพืช 2,4-D ไดเมทิลแอมโนเนียมในปลานิลคือการศึกษาการเปลี่ยนแปลงเนื้อเยื่อของปลานิลโดยในการศึกษาครั้งนี้ทำการตรวจสอบการเปลี่ยนแปลงของเนื้อเยื่อ 2 ชนิดคือเนื้อเยื่อเหงือก และเนื้อเยื่อกล้ามเนื้อ โดยเนื้อเยื่อเหงือกนั้นเป็นบริเวณที่ได้รับสัมผัสสารโดยตรงและเป็นบริเวณที่เกิดการแลกเปลี่ยนก๊าซเพื่อช่วยในการหายใจของปลานิลด้วย จากการศึกษาพบการเปลี่ยนแปลงสำคัญที่เกิดขึ้นในเนื้อเยื่อเหงือกคือ เกิด hyperplasia, epithelial lifting, partial fusion of lamellae, edema and lamellae disorganization และ blood congestion สอดคล้องกับการศึกษาของ Vigario & Saboia-Morais (2014) ที่พบว่าการเปลี่ยนแปลงบริเวณเนื้อเยื่อเหงือกที่ตรวจสอบได้ เมื่อ ปลา *Poecilia vivipara* ได้รับสัมผัสสารกำจัดวัชพืชคือ คือ เกิดการเปลี่ยนแปลงบริเวณเยื่อหุ้มเซลล์ที่ทำหน้าที่แลกเปลี่ยนก๊าซและเกิดการรวมตัวกันของซี่เหงือก และคล้ายคลึงกับการศึกษาของ Thanomsit *et al*. (2016a) ที่ได้รายงานว่าในเหงือกปลากะพงที่ได้รับสัมผัสกับสารกำจัดวัชพืช (ไกลโฟเสท) จะเกิดการเปลี่ยนแปลงเนื้อเยื่อเหงือก 3 ระยะ คือ ระยะที่ 1 คือ การบวม การรวมตัวกันและการเปลี่ยนแปลงของเนื้อเยื่อบริเวณที่เหงือกและเกิดการยกตัวของเนื้อเยื่ออิพิทีเลียม ส่วนการเปลี่ยนแปลงในระยะที่ 2 คือ การส่งของเลือด และระยะที่ 3 คือ เกิดการโป่งพอง และมีการตายของซี่เหงือกและยังสอดคล้องกับการศึกษาของ Samamta *et al*. (2018) รายงานผลการศึกษาความเป็น

พิษของสารกำจัดวัชพืช (Almix) จำนวน (66.67 mg/L) ในปลา *Heteropneustes fossilis* ซึ่งจากการศึกษาพบว่าสารกำจัดวัชพืชดังกล่าวส่งผลต่อการเปลี่ยนแปลงเนื้อเยื่อเหงือกคือ เกิด atrophy ใน secondary lamella เกิด hyperthropy ในบริเวณเนื้อเยื่ออิพิทิเลียม และ เกิด fusion of lamellae ส่วนในเนื้อเยื่อกล้ามเนื้อหลังจากปลานิลได้รับสัมผัสกับสารกำจัดวัชพืช 2,4-D ไดเมทิลแอมโนเนียม พบว่าจะเกิดอาการ dilation of muscle fiber, spiting of muscle และ blood congestion

สรุปผลการวิจัย

สารกำจัดวัชพืช 2,4-D ไดเมทิลแอมโนเนียมมีความเป็นพิษต่อปลานิลโดยก่อให้เกิดอัตราการตายสะสมซึ่งเพิ่มจำนวนขึ้นตามระดับความเข้มข้นและระยะเวลาที่ได้รับสัมผัส ในระดับที่ไม่ก่อให้เกิดการตาย สารกำจัดวัชพืช 2,4-D ไดเมทิลแอมโนเนียมส่งผลต่อพฤติกรรมและสัณฐานวิทยาของปลานิลโดยการเปลี่ยนแปลงที่ตรวจสอบได้คือ ปลานิลจะลอยตัวบนผิวน้ำและฮุบอากาศบ่อยครั้ง มีการขับของเสียปริมาณมาก และแผ่นปิดเหงือกเปิดและปิดเร็วมากกว่าปลาปกติ เกิดแผลและจ้ำเลือดบริเวณแผ่นปิดเหงือกและครีบ อะซิทิลโคลีนเอสเทอเรสถูกนำมาประยุกต์ใช้เป็นชี้วัดทางชีวภาพของการได้รับสัมผัสสารกำจัดวัชพืช 2,4-D ไดเมทิลแอมโนเนียมของปลานิล ซึ่งน้ำหนักโมลเลกุลของอะซิทิลโคลีนเอสเทอเรสในเนื้อเยื่อสมอง เนื้อเยื่อเหงือก และเนื้อเยื่อกล้ามเนื้อพบว่ามีน้ำหนักโมเลกุลขนาด 71 kDa การแสดงออกของอะซิทิลโคลีนเอสเทอเรสจะลดลงตามระยะเวลาที่ได้รับสัมผัส สารกำจัดวัชพืช 2,4-D ไดเมทิลแอมโนเนียมส่งผลต่อการเปลี่ยนแปลงเนื้อเยื่อทั้งในเนื้อเยื่อเหงือกและเนื้อเยื่อกล้ามเนื้อโดยการเปลี่ยนแปลงจะเพิ่มมากขึ้นเมื่อปลานิลได้รับสัมผัสสารเป็นระยะเวลานาน การเปลี่ยนแปลงที่ตรวจสอบได้ในเนื้อเยื่อเหงือกคือ เกิด hyperplasia, epithelial lifting, partial fusion of lamellae, edema and lamellae disorganization และ blood congestion ส่วนในเนื้อเยื่อกล้ามเนื้อพบว่าจะเกิดอาการ dilation of muscle fiber, spiting of muscle และ blood congestion จากข้อมูลในการศึกษาครั้งนี้จึงมีแนวโน้มที่จะประยุกต์ใช้ปลานิลตัวชี้วัด (bioindicator) การปนเปื้อนของสารกำจัดวัชพืช 2,4-D ไดเมทิลแอมโมเนียมที่ปนเปื้อนในแหล่งน้ำได้ และสามารถประยุกต์ใช้อะซิทิลโคลีนเอสเทอเรสเป็นตัวชี้วัดทางชีวภาพในการรับสัมผัสของสารดังกล่าวได้

กิตติกรรมประกาศ

งานวิจัยนี้ได้รับการสนับสนุนจากหลักสูตรเทคโนโลยีการเกษตรและสาขาประมง คณะเกษตรศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลอีสาน วิทยาเขตสุรินทร์

เอกสารอ้างอิง

Ackers, J. T., Johnston, M. F. & Haasch, M. L. (2000). Immunodetection of hepatic peroxisomal PMP70 as an indicator of peroxisomal proliferation in the mummichog, *Fundulus heteroclitus*. Marine Environmental Research, *50*, 361-365.

Ateeq, B., Farah, M. A. & Ahmad, W. (2006). Evidence of apoptotic effects of 2, 4-D and butachlor on walking catfish, *Clarias batrachus*, by transmission electron microscopy and DNA degradation studies. Lift Sciences, *78,* 977-986.

Barbieri, E. (2008). Effect of 2, 4-D herbicide (2, 4-dichloro phenoxyacetic acid) on oxygen consumption and ammonium excretion of juveniles of *Geophagus brailiensis* (Quoy & Gaimard, 1824) (Osteichthyes, Cichlidae). Ecotoxicology, 1-6.

Bastos, C. R., Mathias,L. A., Gomes-Jusi, M.M., Ferreira dos Santos, R., Pinheiro da Silva, G.C., André, M.R., Machado, R. Z. & Bürger, K.P. (2018). Evaluation of dot-blot test for serological diagnosis of bovine brucellosis. *Brazilian Journal of Microbiology*. (In press)

Braz-Mota, S., Sadaus=Henrique, H., Duarte, R. M., Val, A. L. & Almeida-Val, V. M. F. (2015). Roundup exposure promotes gills and liver impairments, DNA damage and inhibition of brain cholinergic activity in the Amazon teleost fish *Colossoma macroponum*. Chemosphere. *135*, 53-60.

Cessna, A. J., Donald, D.B., Bailey, J., Waiser. M., Headley, J. V. (2006). Persistence of the sulfonylurea herbicides thifensulfuron-methyl, ethametsulfuron-methyl and metsulfuron-methyl infarm dugouts. Journal of Environmental Quality, *35*, 2395–2401.

Castro Marcato, A.C., Pereira de souza, C. & Fontanetti, C.S. (2017). Herbicide 2, 4-D: A review of toxicity on Non-target organisms. Water Air Soil and Pollution, *228*(120), 1-12.

Cattaneo, R., Loro, V.L., Spanevello, R., Silverira, F. A., Luz, L. & Miron, D. S. (2008). Metabolic and histological parameters of silver catfish (*Rhamdia quelen*) exposed to commercial formulation 0f 2, 4-dichlorophenoxiacetic acid (2,4-D) herbicide. Pesticide Biochemistry and Physiology, *92,* 133-137.

Heggsteom, M. J. (2009). The sublethal effects of 2, 4-D dimethylamine on wood frog tadpoles in Saskatchewan. Thesis Master of Science. University of Saskatchewan. Canada.

Kayhan, F.E., Turan, G T., Kaymak, G., Akbulut, C., & Ertug, N. D. Y. (2017). The 2, 4-D herbicidal effect on defense enzyme activities and AChE levels in liver and gill tissues of *Xiphoprus hellerii* (Sworstail fish). Eltxir pollution, *110*, 48560-48563.

Modesto, K.A. & Martinez, C. B. R., (2010). Roundup causes oxidative stress in liver and inhibits acetylcholinesterase in muscle and brain of the fish *Prochilodus lineatus*. Chemosphere*, 78,* 294–299.

Mohamed, F.A.S. (2009). Histological studies on *Tilapia zillii* and *Solea vulgaris* from Lake Qurun, Egypt. World Journal of fish and Marine science, *1*(1), 29-39.

Nuankaew, C., Ngamsnae, P., Saowakoon, S., Nanthanawat, P. & Thanomsit, C. (2020). Toxicity of Paraquat on Physiology, Behavior and Acetylcholinesterase (AChE) Expression in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*), in: The 4th National Conference on Innovation for Learning and Invention 2020. pp. A16-A28.

OECD. Test Guidelines for the Chemicals - OECD. 2019. Test guideline No.203 Fish, acute toxicity testing. 1-23.

Peter, L.D., Doyottea, A., Mitchelmorea, C.L., McEvoy, J. & Livingstonea, D.R. (2001). Seasonal variation and estradiol-dependent elevation of Thames estuary eel *Anguilla anguilla* plasma vitellogenin levels and comparisons with other United Kingdom estuaries. The Science of the Total Environment, *279,* 137–150.

Pollution Control Department (2010). 2, 4-dichlorophenoxyacetic acid (2, 4-D). Chulaprint. Bangkok. 84 p.

Rupprecht, K.R., Nair, R.K., Harwick, L.C., Grote, J., Beligere, G.S., Rege, S.D., Chen, Y.Y., Lin, Z., & Fishpaugh, J.R. (2010). Development of a dot-blot assay for screening monoclonal antibodies to lowmolecular-mass drugs. Analytical Biochemistry, *407,* 160–164.

Samanta, P. Rituparna, D.A.S., Sandipan, P.A.L., Aloke kumar, M., Senapati, T., Kole, D & Ghosh, A.R. (2018). Toxicity assessment of agrochemical Almix in *Heteroneustes fossils* through histopathological alterations. Interdisciplinary Toxicology, *11*(2), 129-147.

Sarikaya, R. & Selvi, M. (2005). Investigation of acute toxicity of (2, 4-dichlorophenoxy) acetic acid (2, 4-D) herbicide on larvae and adult Nile tilapia (*Oreochromis nilotic*us L.). Environmental Toxicology and Pharmacology, *20,* 264-268.

Sarikaya, R., & Yilmaz, M. (2003). Investigation of acute toxicity and the effect of 2, 4-D (2,4 dichlorophenoxyacetic acid) herbicide on the behavior of the common carp (*Cyprinus carpio* L., 1758 ; Pisces, Cyprinidae). Chemosphere, *52,* 195-201.

Thanomsit, C., Maprajuab, A., Saowakoon, A., Prasartkaew, W., Ocharoen, Y., Wattanakornsiri, A., Nanuam, J., & Nanthanawat, P. (2018). Acetylcholinesterase (AChE): Potential Biomarker for evaluating Pesticide exposure on egg and tissue of golden apple snail (*Pomecea canliculata*) from Huai-Saneng Resevior, Surin Province, Thailand. Thai Journal of Agricultural science, *51*(3), 104-117.

Thanomsit, C., Saowakoon, S., Wattanakornsiri, A., Nanuam, J., Prasatkaew, W., Nanthanawate, P., Monkolvai, P. & Chalorcharoenying, W. (2020a). Glyphosate (Roundup): Fate, Toxicity Assessment and Adverse Effect on Aquatic Environment. Naresuan University Journal: Science and Technology, *28*(1), 65-81.

Thanomsit, C., Nuankaew, C., Prasatkaew, W., Wattanakornsiri, A., Nanuam, J., Nanthanawat, P. & Kiatprasert, P. (2020b). Adverse effects of chlorpyrifos and cypermethrin mixture on physiological alterations and cholinesterase on Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). Thai journal of Agricultural science, *53*(3), 134-148.

Thanomsit, C., Saowakoon, K., Wattanakornsiri, A., Khongchareonporn, N., Nanuam, J., Prasatkaew, W., & Nanthanawat, P. (2020c) Acetylcholinesterase (AChE) Polyclonal Antibody from Hybrid catfish (*C. macrocephalus* × *C. gariepinus*): Specification, Sensitivity and Cross Reactivity. Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology, 108837.

Thanomsit, C., Wattanakornsiiri, A. & Nanthanawat, P. (2016a). Effect of glyphosate on fish behavior and histological alteration of gills in Asian Sea bass (*Lates calcarifer*). Burapha Science Journal, *21* (2), 204-215.

Thanomsit, C., Wattanakornsiiri, A. & Nanthanawat, P. (2016b). Toxicity evaluation of glyphosate on mortality rate and histological alteration in Black Rice crab. Burapha Science Journal, *21*(3), 151-165.

U.S. EPA. (United states Environment Protection Agency). 2005. Reregistration Eligibility Decision for 2, 4-D. USA. 321 p.

Vigario, A, F. & Saboia-Morais, S.M.T. (2014). Effect of the 2, 4-D herbicide on gills epithelia and liver of the fish *Poecilia vivipara. Brazilian Journal of Veterinary Research*, *34*(6), 523-528.