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

ผลกระทบของอะบาเม็กตินต่อการเปลี่ยนแปลงพฤติกรรม สรีรวิทยา และการแสดงออกของอะซิทิลโคลีนเอสเทอเรสในปลาดุกลูกผสม

Effect of Abamectin on Alteration of Behavior, Physiology and Acetylcholinesterase Expression in Hybrid Catfish

ชัยประสาร คำโสภา[1], ไชยวัตน์ นวลขาว[2], ปราง กาญจนสาร[2], เถลิงเกียรติ สมนึก[1], พวงเพชร พิมพ์จันทร์[3], พัชรี มงคลวัย[4] และ ชุติมา ถนอมสิทธิ์[1]*

Chaiprasarn Khumsopha[1], Chaiwat Nuankaew[2], Prang Khanchanasal[2], Talerngkiat Somneuk[1], Phuangphet Pimchun[3], Patcharee Mongkolvai[4] and Chutima Thanomsit[1*]

[1] สาขาประมง คณะเกษตรศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลอีสาน วิทยาเขตสุรินทร์

[2]หลักสูตรเทคโนโลยีการเกษตร คณะเกษตรศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลอีสาน วิทยาเขตสุรินทร์

[3] สาขาพืชศาสตร์ สิ่งทอ และการออกแบบ คณะเกษตรศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลอีสาน วิทยาเขตสุรินทร์

[4] สาขาประมง คณะทรัพยากรธรรมชาติ มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลอีสาน วิทยาเขตสกลนคร

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

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

[3]Department of Plant science, Textile and Design, Faculty of Agriculture and Technology, Rajamangala University of Technology Isan Surin Campus,

[4]Department of Fisheries, Faculty of Natural resources, Rajamangala University of Technology Isan Sakonnakorn Campus

Received : 17 June 2021
Revised : 13 September 2021
Accepted : 16 September 2021

บทคัดย่อ

การศึกษาครั้งนี้มีเป้าหมายเพื่อศึกษาผลของสารกำจัดแมลงศัตรูพืชอะบาเม็กตินที่ส่งผลต่อปลาดุกลูกผสมโดยประเมินผลกระทบจากการตายสะสม การเปลี่ยนแปลงพฤติกรรม การเปลี่ยนแปลงสัณฐานวิทยา และศึกษาการแสดงออกของอะซิทิลโคลีนเอสเทอเรสในระดับความเข้มข้นที่ไม่ก่อให้เกิดการตายในปลาดุกลูกผสม จากการศึกษาพบว่า อัตราการตายสะสมของปลาดุกลูกผสมจะเพิ่มขึ้นตามระยะเวลาและความเข้มข้นที่ได้รับสัมผัส ค่า LC_{50} (95% confidence) ที่เวลา 24, 48, 72 และ 96 ชั่วโมงมีค่าเท่ากับ 45.76 (44.61-47.01), 39.16 (38.00-40.40), 29.44 (28.42-30.46) และ 20.84 (19.61-21.98) ppm และค่า EC_{50} (95% confidence) ที่ประเมินได้ที่เวลา 24, 48, 72 และ 96 ชั่วโมงมีค่าเท่ากับ 4.79 (4.63-4.96), 3.72 (3.60-3.86), 2.77 (2.65-2.88) และ 1.94 (1.80-2.06) ppm ตามลำดับ ในการศึกษาครั้งนี้เลือกตัวอย่างปลาดุกลูกผสมที่ได้รับสัมผัสกับอะบาเม็กติน 1 ppm ซึ่งเป็นระดับที่ไม่ก่อให้เกิดการตายมาศึกษาต่อเพื่อเป็นตัวแทนการได้รับสัมผัสสาร การเปลี่ยนแปลงพฤติกรรมที่ตรวจสอบได้จะเริ่มขึ้นเมื่อปลาดุกลูกผสมได้รับอะบาเม็กตินเป็นเวลา 6 ชั่วโมง โดยอาการที่ตรวจสอบได้ คือ ว่ายน้ำผิดปกติ เสียการทรงตัวและว่ายน้ำเป็นแนวตั้งฉากกับผิวน้ำ ส่วนสัณฐานวิทยาจะเริ่มเปลี่ยนแปลงไปเมื่อได้รับสัมผัสสารเป็นเวลา 3 ชั่วโมง คือ มีการขับเมือกมากกว่าปกติ อะซิทิลโคลีนเอสเทอเรสที่แยกได้จากเนื้อเยื่อสมอง เหงือก และกล้ามเนื้อมีขนาดน้ำหนักโมเลกุล 71 kDa เมื่อทำการศึกษาโดยใช้เทคนิค Western blot การแสงออกของอะซิทิลโคลีนเอสเทอเรสในเนื้อเยื่อสมอง เหงือก และกล้ามเนื้อ มีแนวโน้มที่จะลดลงตามระยะเวลาที่ได้รับสัมผัส ดังนั้นจากการศึกษาครั้งนี้แสดงให้เห็นว่าปลาดุกลูกผสมมีแนวโน้มที่จะให้เป็นตัวชี้วัดการได้รับสัมผัสของอะบาเม็กตินที่ปนเปื้อนในน้ำได้

คำสำคัญ : อะบาเม็กติน ; อะซิทิลโคลีนเอสเทอเรส ; ปลาดุกลูกผสม ; สารกำจัดแมลง

Abstract

The aim of this study was to investigate the effects of abamectin insecticides in hybrid catfish by assessing cumulative mortality, alteration of behavior and physiology and acetylcholinesterase expression after exposing in sublethal concentration. The results indicated that cumulative mortality increased with an increasing in concentration and exposure time. The LC_{50} (95% confidence) at 24, 48, 72 and 96 h were 45.76 (44.61-47.01), 39.16 (38.00-40.40, 29.44 (28.42-30.46), and 20.84 (19.61-21.98) ppm. The EC_{50} (95% confidence) measured at 24, 48, 72 and 96 h were 4.79 (4.63-4.96), 3.72 (3.60-3.86), 2.77 (2.65-2.88), and 1.94 (1.80-2.06) ppm, respectively. Thus, we selected the hybrid catfish being exposed to abamectin in concentration of 1 ppm (sublethal concentration) for further study. The detectable change in behavior was initially found after exposing to abamectin for 6 h. We found abnormal swimming, losing balance and swimming perpendicular to the water surface. The physiological change was found after 3 h of exposure. It was found more mucus excretion. The molecular weight of acetylcholinesterase which extracted from tissues of brain, gill and muscle was studied by using Western blot technique and found that it was 71 kDa. The expression of acetylcholinesterase in these tissues tended to decrease with an increasing in exposure time. Thus, the hybrid catfish can be applied as an indicator for abamectin contamination in water.

Keywords : acetylcholinesterase ; abamectin ; hybrid catfish ; insecticide

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

บทนำ

ประเทศไทยมีประชากรเพิ่มขึ้นเรื่อย ๆ อย่างรวดเร็ว ส่งผลให้มีการขยายตัวทางด้านเศรษฐกิจ รวมทั้งความต้องการอาหารเพิ่มมากขึ้นด้วย ดังนั้นจึงได้มีการนำเทคโนโลยีใหม่ ๆ เข้ามาช่วยในการเพิ่มผลผลิตด้านอาหารเพื่อให้เพียงพอกับความต้องการของผู้บริโภค เช่น การนำสารเคมีกำจัดศัตรูพืชเข้ามาใช้ประโยชน์ในการเพาะปลูกเพื่อเพิ่มผลผลิตทางการเกษตร รวมทั้งการปรับปรุงพันธุ์พืช โดยเฉพาะอย่างยิ่งการใช้สารกำจัดแมลงศัตรูพืชซึ่งเป็นสาเหตุสำคัญที่ก่อให้เกิดปัญหาทางด้านสิ่งแวดล้อม เช่น ปัญหาการใช้สารเคมีทางการเกษตรในปริมาณที่มากเกินความจำเป็นทำให้เกิดการตกค้างของสารเคมีในสิ่งแวดล้อมคือทั้งใน ดิน อากาศ และแหล่งน้ำ ซึ่งสาเหตุการปนเปื้อนของสารดังกล่าวจะส่งผลโดยตรงต่อสัตว์น้ำ เพราะแหล่งน้ำเป็นแหล่งรองรับของเสียที่ใหญ่ที่สุด (Thanomsit *et al*., 2020a)

อะบาเม็กติน (abamectin) หรือที่รู้จักกันทั่วไปในชื่อการค้า เอ.จี.บา ไดเมทิน แอ็กโกรติน อบามา และแจคเก็ต เป็นสารกำจัดแมลง (Insecticide) ที่เกิดจากกระบวนการหมักแบคทีเรียที่อาศัยอยู่ในดินชื่อ (*Streptimyces avermitilis)* สารที่สกัดได้คือ อะเวอร์เม็กติน บีหนึ่งเอ (avermectin B1a) และ อะเวอร์เม็กติน บีหนึ่งบี (Avermectin B1b) ที่มีคุณสมบัติทางกายภาพและความเป็นพิษคล้ายคลึงกัน (Thanomsit, Ocharoen & Nanthanawat, 2016) แต่สิ่งที่แสดงถึงประสิทธิภาพในการกำจัดแมลงก็คือสารอะเวอร์เม็กติน บีหนึ่งเอ ต้องมีมากกว่า 80 เปอร์เซ็นต์ของสารออกฤทธิ์ ดังนั้นสารกำจัดแมลงศัตรูพืชส่วนใหญ่ที่ผลิตในรูปสารออกฤทธิ์ 1.8 เปอร์เซ็นต์ (น้ำหนักต่อปริมาตร; W/V EC) นั้นต้องมีอะเวอร์เม็กติน บีหนึ่งเอ อยู่มากกว่า 1.44 เปอร์เซ็นต์ อะบาเม็กตินถูกนำมาใช้กันอย่างแพร่หลายเพราะถือเป็นสารกำจัดแมลงประสิทธิภาพสูง อัตราส่วนในการใช้น้อย ออกฤทธิ์กำจัดแมลงแบบสัมผัสและก่อให้เกิดการตาย และยังสามารถดูดซึมเข้าสู่ใบพืชได้จึงสามารถกำจัดแมลง เช่น เพลี้ยไฟ หนอนชอนใบและหนอนม้วนใบข้าวได้ดี อะบาเม็กตินมีโอกาสปนเปื้อนลงสู่แหล่งน้ำได้ มีหลายงานวิจัยที่ชี้ให้เห็นถึงผลกระทบเชิงลบที่เกิดขึ้นจากการได้รับสัมผัสของอะบาเม็กตินในสัตว์น้ำโดยเฉพาะอย่างยิ่งในปลาน้ำจืด จากเหตุผลดังกล่าวข้างต้นการศึกษาถึงระดับความเป็นพิษรวมไปถึงการตรวจสอบผลกระทบของอะบาเม็กตินจึงเป็นเรื่องที่น่าสนใจในสภาวการณ์ในปัจจุบันซึ่งประชากรมีจำนวนเพิ่มมากขึ้นทำให้มีความต้องการในการบริโภคอาหารเพิ่มขึ้นไปด้วย ดังนั้นเกษตรกรส่วนใหญ่มักใช้สารเคมีกำจัดแมลงเป็นตัวช่วยทำให้ผลผลิตไม่ถูกทำลายเพื่อให้ได้ผลผลิตที่ดีและได้ผลผลิตมากขึ้น คุณสมบัติอีกประการของอะบาเม็กตินคือละลายนำได้ดีและยึดเกาะกับอนุภาคของดิน นอกจากนี้ยังสลายตัวเร็วเมื่ออยู่ในสภาพแวดล้อม มีรายงานว่าเมื่อผิวดินกระทบแสงแดด อะบาเม็กตินจะสลายตัวภายใน 8-12 ชั่วโมง หรือภายใน 1 วัน สำหรับในพืชนั้นอะบาเม็กตินจะลดปริมาณลงเหลือครึ่งหนึ่งทุก 4-6 ชั่วโมงจึงนับเป็นสารที่ปลอดภัยสูงสำหรับผู้ใช้และสิ่งแวดล้อมในด้านประสิทธิภาพการป้องกันกำจัดแมลงศัตรูพืชนั้น ทางสัตววิทยา กรมวิชาการเกษตรได้แนะนำให้ใช้อะบาเม็กตินในการป้องกันการกำจัดแมลงศัตรูพืชที่มีผลต่อสัตว์น้ำ (Thanomsit, Ocharoen & Nanthanawat, 2016; Thanomsit & Ocharoen, 2016)

การเลี้ยงปลาดุกบิ๊กอุยหรือปลาดุกลูกผสมในปัจจุบันมักพบปัญหาเกี่ยวกับการเกิดโรคและปัญหาการปนเปื้อนของสารพิษต่าง ๆ ยกตัวอย่าง เช่น ยากำจัดแมลงศัตรูพืชชนิดต่าง ๆ และโลหะหนัก เช่น แคดเมียม และปรอท เป็นต้น ในประเทศไทยสารกำจัดแมลงศัตรูพืช ถูกนำมาใช้เกือบทุกพื้นที่ที่มีการเพาะปลูกดังนั้นจึงมีความเป็นไปได้ที่จะเกิดการสะสมของสารในกลุ่มดังกล่าวไปยังสัตว์น้ำชนิดต่าง ๆ ทั้งกุ้ง ปู หอย และปลา (Thanomsit, Saowakoon, & Nanthanawat, 2016;

Thanomsit *et al*., 2017; Thanomsit *et al*., 2018) และยิ่งไปกว่านั้นสารกำจัดสูตรพืชยังก่อให้เกิดการสะสมและเพิ่มจำนวนมากขึ้นเรื่อย ๆ ไปตามห่วงโซ่อาหาร มนุษย์ซึ่งเป็นผู้บริโภคในลำดับขั้นสูงที่สุดก็อาจจะได้รับผลกระทบเชิงลบต่อสุขภาพได้ ในปัจจุบันสารกำจัดศัตรูพืชมีหลายชนิด อะบาเม็กตินจัดเป็นสารกำจัดแมลงที่นิยมกันมากเป็นอันดับต้น ๆ ของประเทศไทย ที่ถูกนำมาใช้ในการเกษตร โดยอะบาเม็กตินจัดเป็นสารกำจัดแมลงในกลุ่ม microbial derived insecticides (Cranshaw, 2005) อะบาเม็กตินออกฤทธิ์ที่ระบบประสาทและกล้ามเนื้อก่อให้เกิดอันตรายต่อปลาน้ำจืด โดยสารจะซึมเข้าผิวหนังของปลาทำให้ปลามีการเปลี่ยนแปลงในเรื่องพฤติกรรมและสัณฐานวิทยา หากได้รับปริมาณที่สูงทำให้ปลาเกิดการตายในที่สุด (Thanomsit, Ocharoen & Nanthanawat, 2016; Thanomsit & Ocharoen, 2016; Kushwaha, Anerao, Rajput, Bhagriya & Roy, 2020)

ในปัจจุบันอะซิทิลโคลีนเอสเทอเรสมีความสำคัญมากในการตรวจสอบทางพิษวิทยา เพราะสามารถบอกผลกระทบเชิงลบที่เกิดขึ้นต่อสิ่งมีชีวิตได้โดยตรงโดยเฉพาะอย่างยิ่งการนำมาใช้เป็นต่อชี้วัดทางชีวภาพในสิ่งมีชีวิตในแหล่งน้ำ เพื่อประเมินถึงคุณภาพของสิ่งแวดล้อมทางน้ำ และใช้เป็นแนวทางในการจัดการคุณภาพน้ำต่อไปได้ กลไกการออกฤทธิ์ของสารกำจัดแมลงและสารกำจัดวัชพืชจะส่งผลต่อมนุษย์และสัตว์น้ำโดยสารในกลุ่มดังกล่าวจะไปรวมตัวกับเอนไซม์โคลีนเอสเทอเรส ทำให้เอนไซม์ไม่สามารถย่อยสารอะซิทิลโคลีนซึ่งเป็นตัวส่งกระแสความรู้สึกจากปลายประสาทไปยังกล้ามเนื้อเกิดการสะสมหรือการคั่งของอะเซทิลโคลีน ทำให้การส่งต่อความรู้สึกดำเนินตลอดอยู่เวลาเกิดอาการกระตุกของกล้ามเนื้อเป็นอัมพาตและตายในที่สุด (Thanomsit *et al*., 2020b) Gruber & Munn (1998) ได้เสนอแนะว่าการแสดงออกของระดับอะซิทิลโคลีนเอสเทอเรส สามารถใช้เป็นตัวติดตามทางชีวภาพได้ในพื้นที่เสี่ยงที่มีการใช้สารเคมีทางการเกษตรมากได้ และอะซิทิลโคลีนเอสเทอเรสจัดเป็นตัวชี้วัดทางชีวภาพที่จำเพาะ (Walker, Hopkin, Sibly & Peakall, 2006)

Thanomsit *et al.* (2018) ได้ทำการศึกษาการแสดงออกของอะซิทิลโคลีนเอสเทอเรสจากหอยขมและหอยเชอรี่ที่ได้จากตลาดสด อำเภอเมือง จังหวัดสุรินทร์ ในช่วงฤดูฝนที่มีการทำนาเพื่อประเมินถึงการได้รับสัมผัสกับยากำจัดศัตรูพืชซึ่งจะใช้เป็นข้อมูลเบื้องต้นในการลดความเสี่ยงของผู้บริโภค จากการศึกษาพบว่าหอยขมและหอยเชอรี่ทุกขนาด คือ ขนาดเล็ก ขนาดกลาง ขนาดใหญ่ มีการแสดงออกของอะซิทิลโคลีนเอสเทอเรสสูงกว่าชุดควบคุมทั้งสองครั้งที่ทำการศึกษาและเมื่อศึกษาถึงลักษณะภายนอกและภายในทั้งสองขนาดมีลักษณะที่ปกติ เนื้อเยื่อไม่มีการเปลี่ยนแปลง และสีของเนื้อหอยมีสีเข้มแบบปกติจากข้อมูลดังกล่าวอาจจะบ่งชี้ได้ว่าหอยทั้งชนิดอาจจะมีการรับสัมผัสกับสารกำจัดศัตรูพืช ในปริมาณไม่มากเพราะเนื้อเยื่อไม่มีการเปลี่ยนแปลงมีเพียงการแสดงออกของอะซิทิลโคลีนเอสเทอเรส

จากความสำคัญดังกล่าวข้างต้นในการศึกษาครั้งนี้มีวัตถุประสงค์คือการศึกษาผลของอะบาเม็กตินในปลาดุกลูกผสมที่ระดับความเข้มข้นระยะเวลาต่าง ๆ กันโดยเบื้องต้นจะทำการศึกษาถึงความเป็นพิษของ อะบาเม็กตินโดยประเมินจากอัตราการตายสะสม ศึกษาลักษณะสัณฐานวิทยาของปลาดุกลูกผสม พฤติกรรม และตรวจสอบการเปลี่ยนแปลงของอะซิทิลโคลีนเอสเทอเรสซึ่งเป็นตัวชี้วัดทางชีวภาพของการได้รับสัมผัสสารกำจัดแมลงศัตรูพืชอะบาเม็กติน

วิธีดำเนินการวิจัย

สารเคมีที่ใช้ในงานวิจัยและสัตว์ทดลอง

สารเคมีทางการเกษตรที่นำมาใช้ในการศึกษาจะเป็นสารเคมีที่อยู่ในรูปแบบทางการค้าและอยู่ในรูปสารละลายคือ อะบาเม็กติน (1.8% W/V EC) สารเคมีชนิดอื่นๆ เป็นชนิดเกรดวิเคราะห์ และสารเคมีที่ใช้ในการศึกษาปริมาณโปรตีนและการศึกษาอะซิทิลโคลีนเอสเทอเรสจากบริษัท Bio-Rad ประเทศไทย

ในการศึกษาครั้งนี้นำปลาดุกลูกผสมที่มีความยาวเฉลี่ย 16.75±1.6 เซนติเมตร และน้ำหนักเฉลี่ย 21.79±3.1 กรัม มาปรับสภาพในบ่อคอนกรีตขนาด 100 ลิตร แบ่งออกเป็น 6 บ่อใส่ปลาดุกลูกผสมบ่อละ 10 ตัว (3 ซ้ำ) เก็บตัวอย่างเป็นเวลา 0, 24, 48, 72 และ 96 ชั่วโมง

การศึกษาระดับความเป็นพิษ median lethal concentration (LC_{50})

การศึกษาระดับความเป็นพิษของสารกำจัดแมลงอะบาเม็กติน อ้างอิงและพัฒนาจากการศึกษาของ Cantawon *et al*. (2021) และใช้ข้อมูลอ้างอิงจาก OECD Fish Toxicity Testing Framework (2019) โดยการทดสอบความเป็นพิษใช้ปลาดุกลูกผสมจำนวน 10 ตัวมาเลี้ยงในถังพลาสติกขนาด 200 ลิตร (จำนวน 3 ซ้ำ) เตรียมความเข้มข้นของสารอะบาเม็กติน 6 ระดับความเข้มข้น 0 (กลุ่มควบคุม), 10, 20, 30, 40, และ 50 ppm หลังจากนั้นตรวจสอบการตายสะสมที่เวลา 24, 48, 72 และ 96 ชั่วโมง คำนวณเปอร์เซ็นต์อัตราการตายสะสมจากจำนวนตัวอย่างทั้งหมด 3 ซ้ำในแต่ละชุดการทดลอง (Mean±SD) และหาระดับความเป็นพิษที่ก่อให้เกิดการตายของปลาดุกลูกผสมจำนวน 50% (LC_{50}) ที่เวลา 96 ชั่วโมง โดยใช้การวิเคราะห์แบบ โพรบิท (probit analysis) ที่ระดับความเชื่อมั่น 95% และใช้โปรแกรม minitab® 17 software (entitlement i.d.: 2ec6-9b37-1508-0264-2c55-c33)

การศึกษาพฤติกรรมของปลาดุกที่ได้รับสัมผัสสารอะบาเม็กติน

ทำการศึกษาถึงพฤติกรรมของปลาดุกลูกผสมเมื่อได้รับสัมผัสกับสารปลาดุกลูกผสมโดยทำการประเมินการเปลี่ยนแปลงการแสดงและกิริยาท่าทางซึ่งสิ่งมีชีวิต ระบบหรืออัตลักษณ์ประดิษฐ์ที่เกิดร่วมกันระหว่างสัตว์น้ำกับสิ่งแวดล้อม อ้างอิงจาก OECD Fish Toxicity Testing Framework (2019) โดยศึกษาการเปลี่ยนแปลงพฤติกรรมที่ถูกนำมาใช้ในการประเมินคือ การสูญเสียความสมดุลในการเคลื่อนตัวและพฤติกรรมการว่ายน้ำผิดปกติ เมื่อปลาดุกลูกผสมได้รับสัมผัสสารอะบาเม็กตินที่เวลา 0, 1, 3, 6, 24, 48, 72, และ 96 ชั่วโมง ตามลำดับ และทำการศึกษาระดับความเป็นพิษของสารอะบาเม็กตินที่ส่งผลต่อการเปลี่ยนแปลงพฤติกรรม โดยการทดสอบการเปลี่ยนแปลงพฤติกรรมใช้ปลาดุกลูกผสมจำนวน 10 ตัวมาเลี้ยงในถังพลาสติกขนาด 200 ลิตร เตรียมความเข้มข้นของสารอะบาเม็กติน 6 ระดับความเข้มข้น 0 (กลุ่มควบคุม), 1, 2, 3, 4, และ 5 ppm หลังจากนั้นตรวจสอบการเปลี่ยนแปลงสะสมที่เวลา 24, 48, 72 และ 96 ชั่วโมง คำนวณเปอร์เซ็นต์อัตราการเปลี่ยนแปลงสะสมจากจำนวนตัวอย่างทั้งหมด 3 ซ้ำในแต่ละชุดการทดลอง (Mean±SD) และหาระดับความเป็นพิษที่ก่อให้เกิดการเปลี่ยนแปลงพฤติกรรมของปลาดุกลูกผสมจำนวน 50% (median effective concentration; EC_{50}) ที่เวลา 96 ชั่วโมง โดยใช้การวิเคราะห์แบบ โพรบิท (probit analysis) ที่ระดับความเชื่อมั่น 95% และใช้โปรแกรม minitab® 17 software (entitlement i.d.: 2ec6-9b37-1508-0264-2c55-c33)

การศึกษาลักษณะสัณฐานวิทยาภายนอกและภายในของปลาดุกลูกผสม

ทำการศึกษาถึงสัณฐานของปลาดุกลูกผสมเมื่อได้รับสัมผัสกับสารปลาดุกลูกผสมโดยทำการประเมินการเปลี่ยนแปลงลักษณะทางกายภาพทั้งภายนอกและภายใน การศึกษารูปพรรณสัณฐานภายนอกและคุณสมบัติเฉพาะของโครงสร้างของสิ่งมีชีวิต เช่น สี โครงสร้าง ขนาด รูปร่าง และรูปแบบการเปลี่ยนแปลงของโครงสร้างของปลา โดยเปรียบเทียบกับชุดควบคุมทุกระดับความเข้มข้นที่ศึกษาที่เวลา 0, 1, 3, 6, 24, 48, 72 และ 96 ชั่วโมง

การสกัดโปรตีนจากอวัยวะของปลาดุกลูกผสมเพื่อศึกษารูปแบบของโปรตีนและการหาปริมาณโปรตีน (protein determination)

การสกัดโปรตีนจากอวัยวะของปลาดุกลูกผสมเพื่อศึกษารูปแบบของโปรตีนดัดแปลงจาก Thanomsit *et al*. (2020b) โดยทำการเก็บตัวอย่างจะทำทั้งหมด 3 อวัยวะคือ สมอง กล้ามเนื้อ และเหงือก ของปลาดุกลูกผสมในกลุ่มที่ได้รับสัมผัสสารอะบาเม็กตินในระดับความเข้มข้นที่ไม่ก่อให้เกิดการตายที่เวลา 24, 48, 72 และ 96 ชั่วโมงและกลุ่มควบคุมมาใช้ในการศึกษา หลังจากทำการหาปริมาณโปรตีนในตัวอย่างเพื่อนำค่าความเข้มข้นโปรตีนมาคำนวณก่อนนำไปใช้การทดสอบรูปแบบโปรตีน โดยนำตัวอย่างที่เก็บไว้มาทำให้ละลายที่อุณหภูมิห้อง จากนั้นเจือจางตัวอย่างด้วยน้ำกลั่นในอัตราส่วน 1:100 นำตัวอย่างใส่ใน microplate หลุมละ 10 µl จำนวน 2 หลุม เพื่อเป็น replicate นำสารละลายโปรตีนมาตรฐาน BSA ความเข้มข้น 1.4 mg/ml ของบริษัท Bio-Rad มาเจือจางเช่นเดียวกับสารตัวอย่างให้มีความเข้มข้น 0.7, 0.35, 0.175 และ 0.0875 mg/ml เติม dye reagent 200 µl ในทุกหลุม ทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องนาน 5 นาที นำ microplate มาอ่านค่าการดูดกลืนแสงด้วยเครื่อง microplate reader ที่ความยาวคลื่น 595 nm นำค่าการดูดกลืนแสงที่เครื่องอ่านได้มาสร้างกราฟมาตรฐานจากการคำนวณค่าการดูดกลืนแสงกับค่าความเข้มข้นต่าง ๆ ของโปรตีนมาตรฐาน BSA โดยให้แกน x คือความเข้มข้นของโปรตีน (mg/ml) และแกน y คือค่าการดูดกลืนแสง จากนั้นนำค่าการดูดกลืนแสงของตัวอย่างมาแทนค่า y ในสมการ linear regression (y = ax + b) จะทราบค่าความเข้มข้นของโปรตีนในตัวอย่าง ซึ่งนำไปใช้ในการคำนวณปริมาณโปรตีนที่จะใช้สำหรับเติมตัวอย่างลงบน 10% SDS-PAGE

การศึกษารูปแบบของโปรตีนที่พบในปลาดุกลูกผสมที่สัมผัสอะบาเม็กตินโดยใช้เทคนิค โซเดียมโดดีคริลซัลเฟต เจล อิเล็คโตรโฟรีซีส Sodium Dodecyl Sulfate Polyacrylamide Gel Electrophoresis (SDS-PAGE)

การศึกษารูปแบบของโปรตีนที่พบในปลาดุกลูกผสมที่สัมผัสอะบาเม็กตินอ้างอิงจาก Thanomsit *et al*. (2018) คือ เตรียมส่วนผสมของสารละลายอะคริลาไมด์ ให้ separating gel มีความเข้มข้น 10% (H_20 4.85 ml, 30% acrylamide mixture 3.35 ml, 1.5 M Tris (pH 8.8) 1.65 ml, 10% SDS 100 µl, 10% APS 50 µl, TEMED 3.5 µl) เทสารละลายอะคริลาไมด์ลงในช่องว่างระหว่างแผ่นกระจกของชุดอิเล็คโตรโฟรีซีส ให้เหลือส่วนของ stacking gel ไว้ประมาณ 1 เซนติเมตร เติมน้ำกลั่นบนเจลเพื่อป้องกันการเกิดปฏิกิริยาโพลีเมอไรเซชั่น แล้วทิ้งไว้ให้เจลแข็งตัวประมาณ 30 นาที

หลังจากนั้นเตรียมส่วนผสม stacking gel 4% (H_20 3.05 ml, 30% acrylamide mixture 670 µl, 1.5 M Tris (pH 6.8) 1.25 ml, 10%SDS 50 µl, 10% APS 60 µl, TEMED 5 µl) วางซี่หวีลงในช่องกระจก เพื่อให้เกิดเป็นช่องเติมตัวอย่าง เทส่วนผสมของ stacking gel ลงบน separating gel ทิ้งไว้ให้เจลแข็งตัวประมาณ 15 นาที แล้วประกอบเจลลงในชุดอิเล็คโตร

โฟรีซีส เติมสารละลายอิเล็คโทรดบัฟเฟอร์ ให้ท่วมช่องเติมตัวอย่าง เติมตัวอย่างที่ผสมกับ 2x sample buffer และต้มในน้ำเดือด 5 นาทีแล้ว มาใส่ในช่องเติมตัวอย่างแต่ละช่อง ปริมาณ 10 µl (ปริมาณโปรตีนเท่ากับ 80 µg) ต่ออุปกรณ์จ่ายไฟตั้งกระแสไฟฟ้าที่ 110 โวลต์ จนกระทั่งสังเกตว่าสีของ bromophenol blue เคลื่อนที่ถึงส่วนล่างของเจล จึงหยุดกระแสไฟค่อย ๆ นำเจลออกจากแผ่นกระจกแล้วนำมาย้อมด้วยสี Coomassie Brilliant Blue R 250 เป็นเวลา 1 ชั่วโมง จากนั้นล้างสีออกด้วย destaining solution I และ destaining solution II จนกระทั่งเห็นแถบสีของโปรตีนชัดเจนแต่เนื้อเจลค่อนข้างใส

การศึกษาความจำเพาะของอะซิทิลโคลีนเอสเทอเรสด้วยเทคนิค Western blot

การศึกษาความจำเพาะของอะซิทิลโคลีนเอสเทอเรสด้วยเทคนิค Western blot ดัดแปลงจาก Thanomsit *et al*. (2020a) เริ่มจากทำการย้ายโปรตีนจากแผ่นเจลลงในกระดาษไนโตรเซลลูโลสโดยใช้ Simi dye-Transblot apparatus แล้วนำไปแช่ ใน 0.5% blotto เป็นเวลา 1 ชั่วโมง ล้างตัวประทำส่วนเกินออกด้วย PBS จำนวน 3 ครั้ง ๆ ละ 5 นาที นำไนโตรเซลลูโลสเมมเบรนมาบ่มในแอนติบอดี (PAb-AChE จาก Bio-Rad ประเทศไทย code 0200-0042) ที่ระดับการเจือจาง 1 : 200 เป็นเวลา 12 ชั่วโมงที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส หลังจากนั้นล้างตัวกระทำส่วนเกินออกด้วย 0.5% blotto จำนวน 3 ครั้งๆ ละ 5 นาที หลังจากนั้นนำไปบ่มใน goat-anti rabbit -HRP (GAR-HRP จากบริษัท Bio-Rad ประเทศไทย code 170-6515) ที่ระดับการเจือจาง 1: 1000 เป็นเวลา 3 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิห้อง ล้างด้วย 0.5 % blotto จำนวน 3 ครั้ง ๆ ละ 10 นาที แช่ในสารละลายสับสเตรท (0.03% diaminobenzidine (DAB), 0.006% H_2O_2 และ 0.05% $CoCl_2$ ใน PBS) เป็นเวลา 5 นาที สังเกตแถบโปรตีนสีน้ำตาลดำที่มีขนาด 71 kDa

การศึกษาการแสดงออกของอะซิทิลโคลีนเอสเทอเรสด้วยเทคนิค dot blot

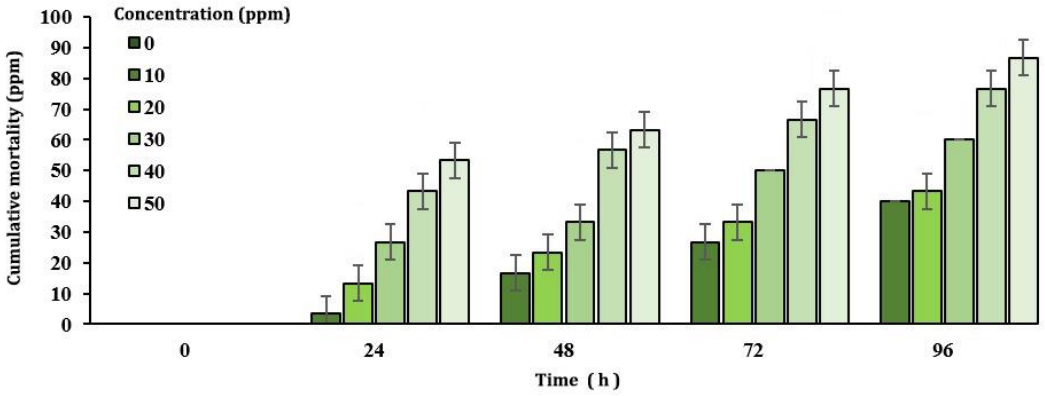
เตรียมตัวอย่างให้มีความเข้มข้นของโปรตีนที่สกัดจากสมอง เหงือก และกล้ามเนื้อของปลาดุกลูกผสมที่ได้รับสัมผัสกับอะบาเม็กตินในระดับความเข้มข้นที่ไม่ก่อให้เกิดการตายคือ 1 ppm ให้มีความเข้มข้นเท่ากับ 40, 20, 10, 5, 2.5, 1.25, 0.625, 0.312, 0.156 และ 0.078 µg/µl หยดตัวอย่าง 1.2 µl ลงบนกระดาษไนโตรเซลลูโลส ทิ้งไว้ให้แห้งที่อุณหภูมิห้อง จากนั้นนำมาแช่ใน 5% นมพร่องมันเนยใน PBS เป็นเวลา 1 ชั่วโมง แล้วล้างออกด้วย PBS/0.5%Tween 20 ครั้งละ 5 นาที 3 ครั้ง จากนั้นบ่มในแอนติบอดีที่จำเพาะต่ออะซิทิลโคลีนเอสเทอเรส (PAb-AChE ระดับการเจือจาง 1:200) นาน 12 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส หลังจากนั้นล้างตัวกระทำส่วนเกินออกด้วย PBS/0.5%Tween 20 ครั้งละ 5 นาที 3 ครั้ง นำกระดาษไนโตรเซลลูโลสไปแช่ใน Secondary antibody ระดับการเจือจาง 1: 1000 (GAR-HRP จากบริษัท Bio-Rad ประเทศไทย code 170-6515) ที่ระดับความเจือจาง 1:1,000 ทิ้งไว้ข้ามคืนที่อุณหภูมิ 4 ^{o}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).และบันทึกผลของจุดโปรตีนสีน้ำตาลเทาที่เกิดขึ้นบนกระดาษไนโตรเซลลูโลส

ผลการวิจัย

ผลการศึกษาอัตราการตายสะสมและระดับความเป็นพิษของปลาดุกลูกผสมเมื่อได้รับสัมผัสอะบาเม็กติน

เมื่อทำการศึกษาถึงอัตราการตายสะสมพบว่าอัตราการตายจะเพิ่มขึ้นตามระยะเวลาและความเข้มข้นที่ได้รับสัมผัส โดยอัตราการตายครั้งแรกจะเกิดขึ้นเมื่อปลาดุกลูกผสมได้รับสัมผัสกับอะบาเม็กตินเป็นเวลา 24 ชั่วโมง ที่ระดับความเข้มข้น 10, 20, 30, 40 และ 50 ppm อัตราการตายคิดเป็น 3.33, 13.33, 26.67, 43.33 และ 53.33% ตามลำดับ เมื่อปลาดุกลูกผสมรับสัมผัสกับอะบาเม็กตินเป็นเวลา 48 ชั่วโมง อัตราการตายสะสมที่ตรวจสอบได้ที่ระดับความเข้มข้น 10, 20, 30, 40 และ 50 ppm คิดเป็น 16.67, 26.67, 33.33 56.67 และ 63.33% ตามลำดับ

ยิ่งไปกว่านั้นเมื่อทำการศึกษาอัตราการตายสะสมของปลาดุกลูกผสมที่ได้รับสัมผัสอะบาเม็กตินที่เวลา 72 ชั่วโมง พบว่าอัตราการตายสะสมเพิ่มขึ้นตามระดับความเข้มข้นดังที่ทำการศึกษามาก่อนนี้คือ ระดับความเข้มข้น 10, 20, 30, 40 และ 50 ppm อัตราการตายสะสมคิดเป็น 26.67, 33.33, 50.00, 66.67 และ 76.67% ตามลำดับ และการศึกษาทำการศึกษาอัตราการตายสะสมของปลาดุกลูกผสมที่ได้รับสัมผัสอะบาเม็กตินที่เวลาสูงสุดคือ 96 ชั่วโมง พบว่าอัตราการตายสะสมจะสูงที่สุด โดยที่ระดับความเข้มข้น 10, 20, 30, 40 และ 50 ppm อัตราการตายคิดเป็น 40.00, 43.33, 60.00, 76.67 และ 86.67% ตามลำดับ (ภาพที่ 1)

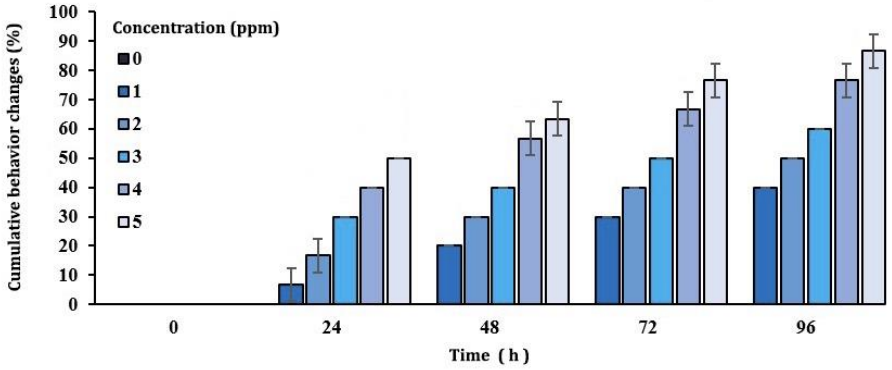


ภาพที่ 1 แสดงอัตราการตายสะสมของปลาดุกลูกผสมที่ได้รับสัมผัสสารอะบาเม็กติน (Mean±SD) ที่ระดับความเข้มข้น 0, 10, 20, 30, 40 และ 50 ppm เป็นเวลา 0, 24, 48, 72 และ 96 ชั่วโมง

เมื่อทำการศึกษาอัตราการตายสะสมของปลาดุกลูกผสมเมื่อสัมผัสกับอะบาเม็กตินแล้วทำการวิเคราะห์ค่า LC_{50} โดยการวิเคราะห์โพรบิทและใช้โปรแกรม minitab พบว่าค่า LC_{50} (95% confidence) ที่เวลา 24, 48, 72 และ 96 ชั่วโมงมีค่าเท่ากับ 45.76 (44.61-47.01), 39.16 (38.00-40.40, 29.44 (28.42-30.46) และ 20.84 (19.61-21.98) ppm

ผลการศึกษาพฤติกรรมของปลาดุกลูกผสมเมื่อได้รับสัมผัสกับอะบาเม็กติน

การเปลี่ยนแปลงพฤติกรรมที่ตรวจสอบได้จะเริ่มขึ้นเมื่อปลาดุกลูกผสมได้รับอะบาเม็กตินเป็นเวลา 6 ชั่วโมง โดยอาการที่ตรวจสอบได้ คือ ว่ายน้ำผิดปกติ เสียการทรงตัวและว่ายน้ำเป็นแนวตั้งฉากกับผิวน้ำ ปลาดุกลูกผสมที่ได้รับสัมผัสกับอะบาเม็กตินจะถูกนำมาประเมินค่าอัตราการเปลี่ยนแปลงพฤติกรรมสะสมของปลาดุกลุกผสมที่ระยะเวลา 0, 24, 48, 72 และ 96 ชั่วโมงโดยประเมินผลจากการสูญเสียสมดุลในการเคลื่อนที่และพฤติกรรมการว่ายน้ำ ซึ่งจากการศึกษาพบว่า การเปลี่ยนแปลงพฤติกรรมของปลาดุกลูกผสมที่ได้สัมผัสกับอะบาเม็กตินจะเพิ่มขึ้นตามระดับความเข้มข้นและระยะเวลาที่ได้รับสัมผัส เมื่อปลาดุกลูกผสมสัมผัสกับสารเป็นเวลา 24 ชั่วโมง พบว่าที่ระดับความเข้มข้น 1, 2, 3, 4 และ 5 ppm มีระดับการเปลี่ยนแปลงพฤติกรรมคิดเป็น 6.67, 16.67, 30.00, 40.00, และ 50.00% เมื่อปลาดุกสัมผัสสารอะบาเม็กตินเป็นเวลา 48 ชั่วโมง อัตราการเปลี่ยนแปลงพฤติกรรมสะสมคิดเป็น 20.00, 30.00, 40.00, 56.67 และ 63.33% ที่เวลา 48 ชั่วโมง อัตราการเปลี่ยนแปลงพฤติกรรมสะสมคิดเป็น 30.00, 40.00, 50.00, 66.67 และ 76.67% และท้ายที่สุดที่เวลา 96 ชั่วโมง อัตราการเปลี่ยนแปลงพฤติกรรมสะสมคิดเป็น 40.00, 50.00, 60.00, 76.67 และ 87.67% (ภาพที่ 2)



ภาพที่ 2 แสดงอัตราการเปลี่ยนแปลงพฤติกรรมสะสมของปลาดุกลูกผสมที่ได้รับสัมผัสสารอะบาเม็กติน (Mean±SD) ที่ระดับความเข้มข้น 0, 1, 2, 3, 4 และ 5 ppm เป็นเวลา 0, 24, 48, 72 และ 96 ชั่วโมง

เมื่อทำการศึกษาอัตราการตายสะสมจะทำการศึกษา median effective concentration (EC_{50}) โดยใช้การวิเคราะห์แบบโพรบิท และ ใช้โปรแกรม minitab ซึ่งจากการศึกษาพบว่าค่า EC_{50} (95% confidence) ที่ประเมินได้ที่เวลา 24, 48, 72 และ 96 ชั่วโมงมีค่าเท่ากับ 4.79 (4.63-4.96), 3.72 (3.60-3.86), 2.77 (2.65-2.88) และ 1.94 (1.80-2.06) ppm

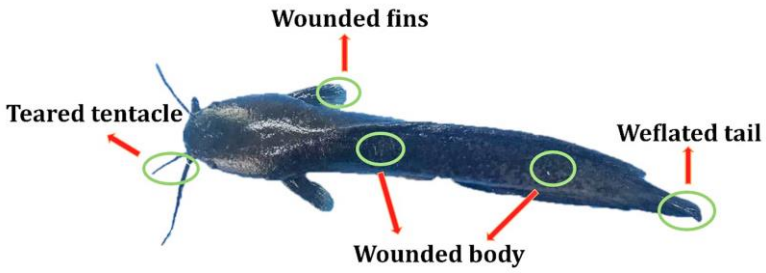
ผลการศึกษาสัณฐานวิทยาที่เปลี่ยนแปลงไปตามระยะเวลาการทดลองที่ต่างกัน

เมื่อทำการศึกษาถึงสัณฐานวิทยาของปลาปลาดุกลูกผสมที่ได้รับสัมผัสสารอะบาเม็กตินในระดับความเข้มข้นที่ไม่ก่อให้เกิดการตายที่ความเข้มข้น 1 ppm พบว่าปลาดุกลูกผสมมีลักษณะภายนอกที่เปลี่ยนแปลงไปตามระยะเวลาที่ได้รับ

สัมผัส มีสีจางลง มีรอยแผลตามลำตัว ขับเมือกมากกว่าปกติ หางกิ่ว หนวดขาดกุด ปลาดุกลูกผสมมีซีดขาว และหนังปลาหลุดลอก ซึ่งแตกต่างจากกลุ่มควบคุมอย่างชัดเจน แสดงดังตาราง 1 และภาพที่ 3

ตารางที่ 1 แสดงให้เห็นสัณฐานวิทยาของปลาดุกลูกผสมเมื่อได้รับสัมผัสกับอะบาเม็กตินระดับความเข้มข้นที่ไม่ก่อให้เกิดการตาย (1 ppm) ที่เปลี่ยนแปลงไปที่เวลาต่าง ๆ

เวลา (ชั่วโมง)	สัณฐานวิทยาของปลาดุกลูกผสมที่ได้รับสัมผัสกับอะบาเม็กติน
0	ปกติ
1	ปกติ
3	เริ่มมีการขับเมือกออกมา
6	ขับเมือกมาก มีแผลตามลำตัวเล็กน้อย
24	มีแผลตามลำตัว มองเห็นชัดเจน หางกิ่วเล็กน้อย และขับเมือกออกมาก
48	มีแผลตามลำตัว มีเมือกปกคลุมลำตัวและบริเวณแผลสีเริ่มซีดจาง หางกิ่วมากขึ้น
72	มีแผลตามครีบและลำตัว หนวดขาดกุด หางกิ่ว มีเมือกคลุมทั้งตัว สีซีดจาง
96	มีแผลขนาดใหญ่ตามลำตัว ผิวหนังลอก หนวดขาดกุด หางกิ่ว มีเมือกคลุมทั้งตัว สีซีดจาง

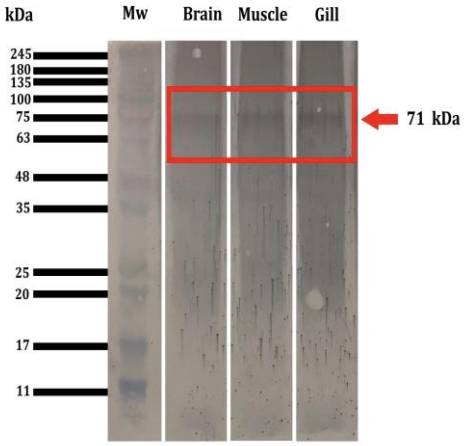


ภาพที่ 3 แสดงตัวอย่างลักษณะภายนอกของปลาดุกลูกผสมที่ได้รับสัมผัสสารอะบาเม็กตินพบว่ามีลักษณะที่เปลี่ยนแปลงไป เช่น มีสีจางลง มีรอยแผลตามลำตัว ขับเมือกมากกว่าปกติ หางกิ่ว หนวดขาดกุด

เมื่อทำการศึกษาลักษณะภายในของปลาดุกลูกผสมที่ได้รับสัมผัสกับสารอะบาเม็กตินทั้ง 3 อวัยวะ คือ สมอง เหงือก และกล้ามเนื้อ พบว่าสมอง มีอาการบวมและมีเลือดออก บริเวณเหงือกพบว่า เหงือกมีซีดจางมากกว่าปกติและบางส่วนของซี่เหงือกฉีกขาด และในกล้ามเนื้อพบว่า มีสีซีดและมีเลือดออกเป็นจุด ๆ ทุกอวัยวะที่ได้รับสัมผัสสารอะบาเม็กตินมีความแตกต่างกับกลุ่มควบคุม

ผลการศึกษาความจำเพาะของอะซิทิลโคลีนเอสเทอเรสในปลาดุกลูกผสมที่ได้รับสัมผัสอะบาเม็กตินด้วยเทคนิค Western blot

เมื่อทำการศึกษารูปแบบของโปรตีนของปลาดุกลูกผสมที่ได้รับสัมผัสสารอะบาเม็กตินโดยมีโปรตีนมาตรฐานเป็นตัวเปรียบเทียบในเนื้อเยื่อในสมอง กล้ามเนื้อ และเหงือก และนำเทคนิค Western blot มาใช้ประเมินถึงความจำเพาะของอะซิทิลโคลีนเอสเทอเรสที่แยกได้กับแอนติบอดีที่ใช้ทดสอบที่มีความจำเพาะกับอะซิทิลโคลีนเอสเทอเรส (PAb-AChE ระดับการเจือจาง 1:200) พบว่าแสดงผลบวกบริเวณแถบโปรตีนที่มีขนาดน้ำหนักโมเลกุล 71 kDa ในทุกเนื้อเยื่อที่ทำการศึกษา (ภาพที่ 4)



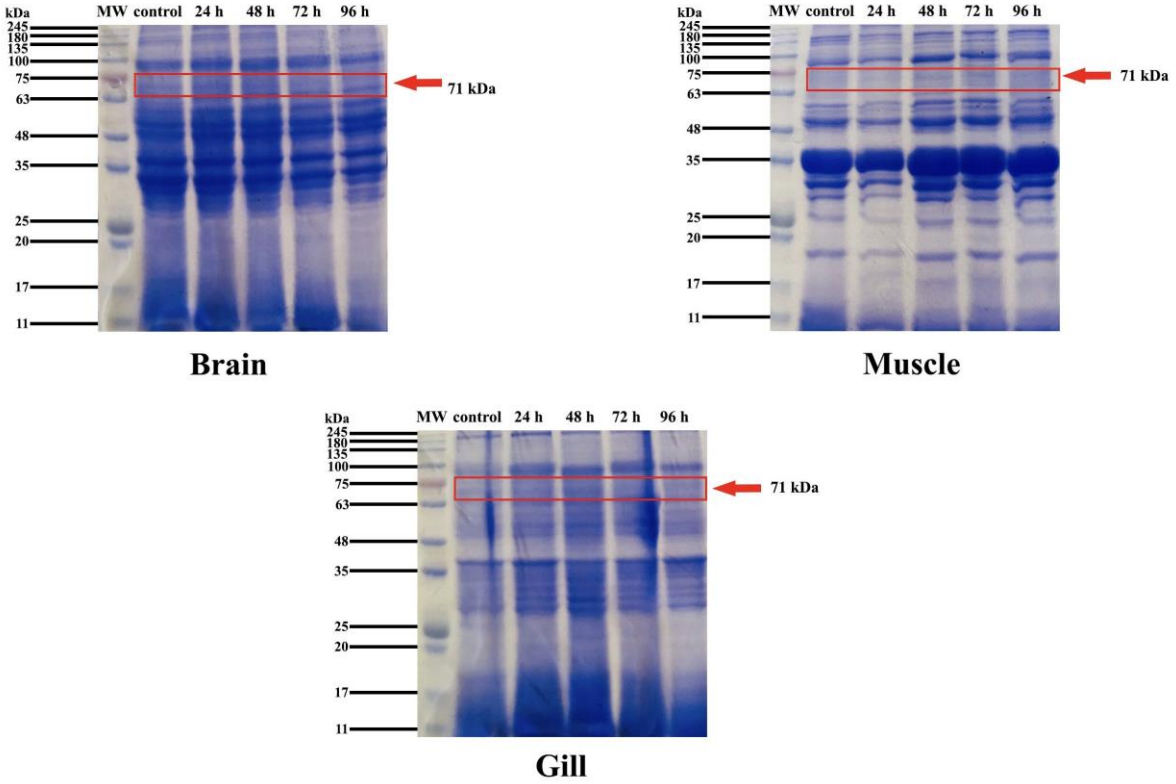
ภาพที่ 4 การศึกษาความจำเพาะของอะซิทิลโคลีนเอสเทอเรสในสมอง กล้ามเนื้อ และเหงือกของปลาดุกลูกผสมที่ได้รับสัมผัสอะบาเม็กตินความเข้มข้น 1 ppm ด้วยเทคนิค Western blot

ผลการศึกษารูปแบบโปรตีนในปลาดุกลูกผสมที่ได้รับสัมผัสสารอะบาเม็กตินในระดับที่ไม่ก่อให้เกิดอัตราการตาย

10% SDS-PAGE ถูกนำมาใช้ในการศึกษาถึงรูปแบบของโปรตีนที่พบในสมอง กล้ามเนื้อ และเหงือก ของปลาดุกลูกผสมที่ได้รับสัมผัสกับอะบาเม็กตินที่ระดับความเข้มข้นและเวลาต่าง ๆ โดยรูปแบบของโปรตีนที่พบจะเปลี่ยนไปตามระยะเวลาที่ทำการศึกษา ในสมองที่ระดับความเข้มข้นที่ศึกษาที่เวลา 24 ชั่วโมง อะซิทิลโคลีนเอสเทอเรสจะสามารถตรวจสอบได้โดยมีขนาด 71 kDa แต่เมื่อเวลาผ่านไปเป็น 48 ชั่วโมง การแสดงออกจะลดลงและที่เวลา 96 ชั่วโมง จะไม่พบการแสดงออกของอะซิทิลโคลีนเอสเทอเรส

กล้ามเนื้อเป็นอีกหนึ่งเนื้อเยื่อที่ถูกนำมาใช้ในการศึกษาโดยจะใช้บริเวณเหนือเส้นข้างลำตัว รูปแบบโปรตีนที่พบจะคล้ายคลึงกันกับในสมอง อะซิทิลโคลีนเอสเทอเรสมีขนาดโมเลกุล 71 kDa เมื่อปลานิลได้รับสัมผัสสารเป็นเวลานานมากขึ้นก็มีการแสดงออกของอะซิทิลโคลีนเอสเทอเรสน้อยลง คือ พบแถบโปรตีนขนาด 71 kDa บางลง แต่โปรตีนขนาดโมเลกุลเล็กในช่วง 25-37 kDa พบว่า ยังคงปรากฏอยู่ในทุกช่วงเวลาที่ทำการศึกษา

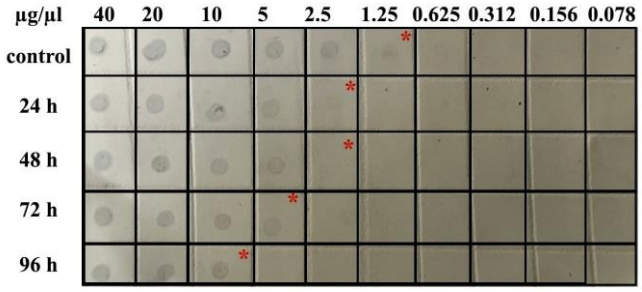
อะซิทิลโคลีนเอสเทอเรสในเหงือกมีขนาดโมเลกุล 71 kDa เช่นเดียวกับที่พบในสมองและในกล้ามเนื้อ ในทุกระดับความเข้มข้นและทุกระยะเวลาที่ศึกษาพบว่าอะซิทิลโคลีนเอสเทอเรส มีการแสดงออกอย่างชัดเจน แต่แนวโน้มที่พบคือลดลงตามระยะเวลาที่ได้รับสัมผัส (ภาพ 5)



ภาพที่ 5 เทคนิค SDS-PAGE ศึกษารูปแบบโปรตีนจากสมอง เหงือก และกล้ามเนื้อปลาดุกลูกผสม ที่ได้รับสัมผัสสารอะบาเม็กติน ความเข้มข้น 1 ppm ที่เวลา 24, 48, 72 และ 96 ชั่วโมง

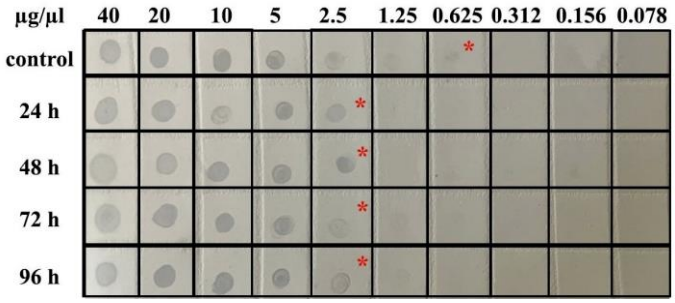
ผลการศึกษาการแสดงออกของอะซิทิลโคลีนเอสเทอเรสโดยใช้เทคนิค dot blot ในปลาดุกลูกผสมที่ได้รับสัมผัสอะบาเม็กติน

ในสมองของปลาดุกลูกผสมเมื่อได้รับสัมผัสกับอะบาเม็กตินในระดับความเข้มข้นที่ไม่ก่อให้เกิดการตายคือ 1 ppm พบว่า ในปลาดุกลูกผสมกลุ่มควบคุมและกลุ่มที่ได้รับสัมผัสสารเป็นเวลา 24, 48, 72 และ 96 ชั่วโมงพบว่า การแสดงออกของอะซิทิลโคลีนเอสเทอเรสเมื่อศึกษาด้วยเทคนิค dot blot มีแนวโน้มจะลดลงเมื่อสัมผัสกับสารเป็นระยะเวลานานโดยขีดจำกัดการตรวจสอบคือ 1.25, 2.5, 2.5, 5 และ 10 µg/µl (ภาพที่ 6)



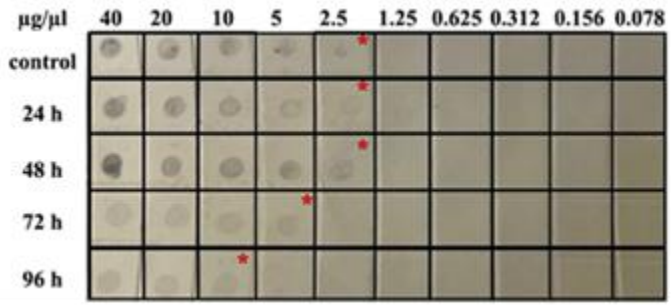
ภาพที่ 6 การตรวจสอบอะซิทิลโคลีนเอสเทอเรสด้วยเทคนิค dot blot ในสมองของปลาดุกลูกผสมชุดควบคุม และในปลาดุกลูกผสมที่ได้รับสัมผัสสารอะบาเม็กตินความเข้มข้น 1 ppm ที่เวลา 24, 48, 72 และ 96 ชั่วโมง

ในกล้ามเนื้อของปลาดุกลูกผสมเมื่อได้รับสัมผัสกับอะบาเม็กตินในระดับความเข้มข้นที่ไม่ก่อให้เกิดการตายคือ 1 ppm พบว่า ในปลาดุกลูกผสมกลุ่มควบคุมและกลุ่มที่ได้รับสัมผัสสารเป็นเวลา 24, 48, 72 และ 96 ชั่วโมงพบว่า การแสดงออกของอะซิทิลโคลีนเอสเทอเรสเมื่อศึกษาด้วยเทคนิค dot blot มีแนวโน้มจะลดลงเมื่อสัมผัสกับสารเป็นระยะเวลานาน โดยขีดจำกัดการตรวจสอบคือ 0.625, 2.5, 2.5, 2.5, และ 2.5 µg/µl (ภาพที่ 7)



ภาพที่ 7 การตรวจสอบอะซิทิลโคลีนเอสเทอเรสด้วยเทคนิค dot blot ในกล้ามเนื้อของปลาดุกลูกผสมชุดควบคุม และในปลาดุกลูกผสมที่ได้รับสัมผัสสารอะบาเม็กติน ความเข้มข้น 1 ppm ที่เวลา 24, 48, 72 และ 96 ชั่วโมง

ในเหงือกของปลาดุกลูกผสมเมื่อได้รับสัมผัสกับอะบาเม็กตินในระดับความเข้มข้นที่ไม่ก่อให้เกิดการตายคือ 1 ppm พบว่า ในปลาดุกลูกผสมกลุ่มควบคุมและกลุ่มที่ได้รับสัมผัสสารเป็นเวลา 24, 48, 72 และ 96 ชั่วโมงพบว่า การแสดงออกของอะซิทิลโคลีนเอสเทอเรสเมื่อศึกษาด้วยเทคนิค dot blot มีแนวโน้มจะลดลงเมื่อสัมผัสกับสารเป็นระยะเวลานานโดยขีดจำกัดการตรวจสอบคือ 2.5, 2.5, 2.5, 5, และ 10 µg/µl (ภาพที่ 8)



ภาพที่ 8 การตรวจสอบอะซิทิลโคลีนเอสเทอเรสด้วยเทคนิค dot blot ในเหงือกของปลาดุกลูกผสมชุดควบคุม และในปลาดุกลูกผสมที่ได้รับสัมผัสสารอะบาเม็กติน ความเข้มข้น 1 ppm ที่เวลา 24, 48, 72 และ 96 ชั่วโมง

วิจารณ์ผลการวิจัย

ปัจจุบันสารเคมีกำจัดศัตรูพืชมีความสำคัญต่อการเกษตรกรรมของประเทศไทย มีรายงานว่ามีการนำเข้าจากต่างประเทศและมีการนำมาใช้ในการปราบศัตรูพืชสูงที่สุด ซึ่งการใช้สารกำจัดศัตรูพืชดังกล่าวนั้นก็อาจจะก่อให้เกิดการปนเปื้อนสู่สิ่งแวดล้อมทั้งในดิน อากาศและน้ำได้ หากเกิดการปนเปื้อนในแหล่งน้ำจะก่อให้เกิดการสะสมในสิ่งมีชีวิตชนิดต่าง ๆ ตามห่วงโซ่อาหาร และยิ่งกว่านั้นการปนเปื้อนของสารกำจัดศัตรูพืชในสิ่งมีชีวิตก็อาจจะก่อให้เกิดการเปลี่ยนแปลงทางพฤติกรรมและสรีรวิทยา หรือหากมีการปนเปื้อนในระดับสูงก็อาจจะก่อให้เกิดการตายของสัตว์น้ำได้ในที่สุด จากความสำคัญดังกล่าวข้างต้นจึงจำเป็นอย่างยิ่งที่จะต้องมีการศึกษาถึงแนวทางการป้องกันและการจัดการปัญหาดังกล่าวเพื่อลดการปนเปื้อนของสารดังกล่าวในสิ่งแวดล้อม (Thanomsit *et al*., 2020a)

อะบาเม็กติน เป็นผลึกผงสีเหลืองอ่อน สามารถติดไฟเมื่อได้รับความร้อนหรือเปลวไฟ และระเบิดได้เมื่อมีสาร oxidizer อยู่ด้วย เป็นสารที่ไม่ละลายน้ำ แต่ละลายได้ดีในสารตัวทำละลาย เช่น acetone, methanol, isopropanol หรือ toluene ในผลิตภัณฑ์ อะบาเม็กตินจึงต้องมีตัวทำละลายอยู่ด้วยเสมอ โดยมีลักษณะเป็นน้ำสีเหลืองน้ำตาลอ่อน หรือน้ำตาลเข้ม มีรายงานว่าผลกระทบของอะบาเม็กตินที่พบในปัจจุบันคือ เกิดปัญหาการตกค้างของสารเคมีในสิ่งแวดล้อมซึ่งสาเหตุส่วนใหญ่เกิดจากการแพร่กระจายของสารเคมีในระหว่างการฉีดพ่น เนื่องจากสารเคมีส่วนใหญ่จะกระจายจากบริเวณของพืชที่ต้องการฉีดพ่นลงสู่พื้นดินและบางส่วนระเหยอยู่ในอากาศทำให้มีการสะสมอยู่ในพื้นดินและน้ำ ซึ่งเป็นที่อยู่อาศัยของสัตว์น้ำ และในที่สุดจะส่งผลให้เกิดการสะสมของสารเคมีในห่วงโซ่อาหารและทำให้สิ่งมีชีวิตในระบบห่วงโซ่อาหารทุกระดับได้รับผลกระทบ (Thanomsit, Ocharoen & Nanthanawat, 2016; Thanomsit & Ocharoen, 2016; Thanomsit *et al.*, 2020a) ซึ่งอาจจะส่งผลต่อทรัพยากรสัตว์น้ำในอนาคต นอกจากนี้ยังส่งผลต่อคุณภาพของน้ำคือทำให้เกิดมีการเปลี่ยนแปลงและเสื่อมโทรมลงทำให้การใช้ประโยชน์จากน้ำนั้นลดลงหรืออาจใช้ประโยชน์ไม่ได้ จากความสำคัญดังกล่าวข้างต้นการศึกษาครั้งนี้

มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาผลของสารกำจัดแมลงศัตรูพืชอะบาเม็กตินในปลาดุกลูกผสมโดยประเมินผลกระทบจากการตายสะสม การเปลี่ยนแปลงพฤติกรรมการเปลี่ยนแปลงสัณฐานวิทยา และศึกษาการแสดงออกของอะซิทิลโคลีนเอสเทอเรสในปลาดุกลูกผสม

ระดับความเป็นพิษและการตายสะสมของปลาดุกลูกผสมที่ได้รับสัมผัสกับอะบาเม็กติน

ในการศึกษาวิจัยครั้งนี้พบว่าอัตราการตายของปลาดุกลูกผสมจะขึ้นอยู่กับความเข้มข้นและระยะเวลาที่ได้รับสัมผัสกับอะบาเม็กตินปลาดุกลูกผสมในชุดควบคุมจะไม่เกิดการตาย การตายจะเกิดขึ้นครั้งแรกเมื่อปลาดุกลูกผสมได้รับสัมผัสสารทุกระดับความเข้มข้นเมื่อเวลาผ่านไป 24 ชั่วโมง และระดับการตายที่พบสูงสุด คือ ที่เวลา 96 ชั่วโมง สำหรับการศึกษาระดับความเป็นพิษของอะบาเม็กตินที่มีต่ออัตราการสะสมของปลาดุกลูกผสมในครั้งนี้แตกต่างกับการศึกษาในปลาม้าลายที่พบว่าความเข้มข้นที่ก่อให้เกิดการตาย คือ 33 µg/L ที่เวลา 48 ชั่วโมง ซึ่งระดับความเข้มข้นที่แตกต่างกันและส่งผลต่อการตายในปลานี้อาจจะเนื่องจากชนิดของปลาแตกต่างกัน ซึ่ง Walker *et al*. (2006) รายงานไว้ว่าชนิดของสัตว์น้ำ ขนาดของสัตว์น้ำ และเส้นทางการได้รับสัมผัสสารส่งผลต่ออัตราการตายของสัตว์น้ำที่แตกต่างกัน ยิ่งไปกว่านั้นการศึกษาครั้งนี้ยังแตกต่างกับการศึกษาของ Novellia, Vieiraa, Cordeirob, Cappelinib, Vieirab & Espíndola (2011) ที่ศึกษาผลของอะบาเม็กตินในสัตว์น้ำจืด คือ ไรแดง (*Daphnia similis*) และปลา *Danio rerio* จากการศึกษาพบว่า ค่า EC_{50} ที่เวลา 48 ชั่วโมง ในไรแดงมีค่าเท่ากับ 5.1 mg/L ส่วนค่า LC_{50} ที่เวลา 48 ชั่วโมง ในปลา *Danio rerio* มีค่าเท่ากับ 33 mg/L

Tisler & Erizen (2006) ทำการศึกษาถึงความเป็นพิษของอะบาเม็กตินใน *Daphnia magna* ซึ่งจากการศึกษาพบว่าอะบาเม็กตินก่อให้เกิดการตายใน *Daphnia magna* และอะบาเม็กตินส่งผลต่อสรีรวิทยาและพฤติกรรมด้วย ค่า EC_{10}, EC_{50} และEC_{90} ที่เวลา 24 ชั่วโมง มีค่าเท่ากับ 0.11, 0.33 (0.21-0.43) และ 0.97 mg/L

พฤติกรรมของปลาดุกลูกผสมที่ได้รับสัมผัสกับอะบาเม็กติน

สำหรับพฤติกรรมนั้น โดยทั่วไปจะหมายถึง การแสดงและกิริยาท่าทางซึ่งสิ่งมีชีวิต ระบบหรืออัตลักษณ์ประดิษฐ์ที่เกิด ร่วมกันกับสิ่งแวดล้อม ซึ่งรวมระบบอื่นหรือสิ่งมีชีวิตโดยรวม เช่นเดียวกับสิ่งแวดล้อมทางกายภาพ พฤติกรรมเป็นการตอบสนองของระบบหรือสิ่งมีชีวิตต่อสิ่งเร้าหรือการรับเข้าทั้งหลาย ไม่ว่าจะเป็น ภายในหรือภายนอกหลังจากสิ่งมีชีวิตชนิดต่าง ๆ ได้รับสัมผัสกับสารเคมีที่เป็นพิษจะก่อให้เกิดผลกระทบต่อพฤติกรรมต่าง ๆ โดยเฉพาะอย่างยิ่งพฤติกรรมการว่ายน้ำหรือการเคลื่อนที่มักจะนำมาใช้ในการศึกษาถึงการได้รับสัมผัสสารเคมีที่เป็นพิษในปลา และยิ่งไปกว่านั้นพฤติกรรมจะถูกนำมาใช้ในการศึกษาร่วมกันกับการเปลี่ยนแปลงทางด้านสรีรวิทยา (Thanomsit, Ocharoen & Nanthanawat, 2016; Isaac, Joshua & Jehu, 2017) การศึกษาครั้งนี้พบว่าปลาดุกลูกผสมจะมีพฤติกรรมที่เปลี่ยนไปจากปลาในกลุ่มควบคุมอย่างชัดเจนคือว่ายน้ำหัวตั้งฉากกับผิวน้ำ และเคลื่อนตัวมารวมกลุ่มบริเวณด้านล่างของโหลแก้วหลังจากที่ได้รับสัมผัสกับอะบาเม็กตินก่อนที่จะตาย ซึ่งคล้ายคลึงกับการศึกษาของพฤติกรรมที่เปลี่ยนแปลงไปของปลาดุกแอฟริกา (*Clarias gariepinus*) ที่ว่ายน้ำผิดปกติจากผิวน้ำลงพื้นน้ำอย่างรวดเร็ว กระโดด (Ladipo, Doherty & Oyebadejo, 2011) และคล้ายคลึงกับพฤติกรรมของลูกปลานิล (*Oreochromis niloticus*) ว่ายน้ำผิดปกติ และเสียการทรงตัวเมื่อได้รับสัมผัสกับสารกำจัดแมลง (Akinsorotan, Morgan & Izah, 2019) และยิ่งไปกว่านั้นในการศึกษาครั้งนี้ก็ยังมีความคล้ายคลึงกับการศึกษาของ Kushwaha *et al*. (2020)

ที่ศึกษาการเปลี่ยนแปลงพฤติกรรมของปลา *Oreochromis mossambicus* เมื่อได้รับสัมผัสกับสารอะบาเม็กติน ซึ่งจากการศึกษาพบว่า อะบาเม็กตินส่งผลต่อพฤติกรรมการว่ายน้ำและและการเปลี่ยนแปลงของ operculum ของปลาชนิดดังกล่าวเมื่อได้รับสัมผัสกับสารเป็นเวลา 36 ชั่วโมงที่ระดับความเข้มข้น 45 และ 55 ppb

ลักษณะสัณฐานวิทยาของปลาดุกลูกผสมที่ได้รับสัมผัสกับอะบาเม็กติน

สัณฐานวิทยาเป็นการศึกษา โครงสร้างของสัตว์และวิธีวิวัฒนาการในการศึกษาครั้งนี้ได้นำวิธีการประเมินถึงสัณฐานวิทยาที่เปลี่ยนแปลงไปของปลาดุกลูกผสมที่ได้รับสัมผัสกับอะบาเม็กตินมาประยุกต์ใช้ในการตรวจสอบเพื่อให้ทราบถึงผลกระทบที่เกิดอย่างแท้จริงโดยประเมินทั้ง ลักษณะภายนอกและภายในโดยเมื่อทำการศึกษาพบว่าลักษณะภายนอกของปลาดุกลูกผสมที่ตรวจสอบได้เมื่อได้รับสัมผัสกับอะบาเม็กตินพบว่าปลาดุกลูกผสมมีลักษณะภายนอกที่เปลี่ยนแปลงไปตามระยะเวลาที่ได้รับสัมผัส มีสีจางลง มีรอยแผลตามลำตัว ขับเมือกมากกว่าปกติ หางกิ่ว หนวดขาดกุด สีปลาปลาดุกลูกผสมซีดขาว และหนังปลาหลุดลอก และยิ่งไปกว่า นั้นเมื่อทำการศึกษาลักษณะภายในโดยตรวจสอบ อวัยวะทั้งหมด 3 อวัยวะคือ เหงือก กล้ามเนื้อและสมองพบว่าทุกอวัยวะมีการ เปลี่ยนแปลงที่แตกต่างจากกลุ่มควบคุมทั้งหมด ซึ่งในการศึกษาครั้งสอดคล้องกับการศึกษาของ Isaac *et al*. (2017) ที่รายงานว่า เมื่อใน African catfish (*Clarias gariepinus*) เมื่อสัมผัสกับสารกำจัดศัตรูพืชจะเกิดการเปลี่ยนแปลงในเรื่องของการเปลี่ยนแปลงสัณฐานวิทยา คือ มีการเปลี่ยนแปลงของสีผิว และมีเลือดออกบริเวณผิวหนัง

การศึกษารูปแบบโปรตีนและการแสดงออกอะซิทิลโคลีนเอสเทอเรสของปลาดุกลูกผสมที่ได้รับสัมผัสกับอะบาเม็กตินโดยใช้เทคนิค โซเดียมโดดีคริลซัลเฟต เจล อิเล็คโตรโฟรีซีสและ Western blot

เป็นที่ทราบกันดีว่าอะซิทิลโคลีนเอสเทอเรสเป็นเอนไซม์ที่ทำหน้าที่เปลี่ยนอะซิทิลโคลีน (สารสื่อประสาท) ไปเป็นโคลีนและอะซีเตทเมื่อเอนไซม์อะซิทิลโคลีนเอสเทอเรสไม่สามารถทำหน้าที่ได้จะทำให้ เกิดการคั่งของอะซิทิลโคลีน ซึ่งการคั่งของสารดังกล่าว นี้จะมีผลต่อระบบประสาทส่วนกลางและส่วนปลายทำให้เกิดการกระตุกของกล้ามเนื้อ ด้วยเหตุนี้จึงมีการตรวจประเมินการรับสัมผัสสารกำจัดศัตรูพืชด้วยการตรวจวัดการทำงานของเอนไซม์อะซิทิลโคลีนเอสเตอเรสโดยตรงการตรวจวัดการทำงานของเอนไซม์อะซิทิลโคลีนเอสเทอเรสนี้สามารถนำมาใช้เป็นตัวชี้วัด ทางชีวภาพของการสัมผัส (biomarker of exposure) จากการรับสัมผัสสารกำจัดศัตรูพืชได้หากได้รับสัมผัสสารดังกล่าวเป็นเวลานานและมีปริมาณ มากจะพบว่าอะซิทิลโคลีนเอสเทอเรสจะถูกทำลายและที่สำคัญเนื้อเยื่อก็จะเกิดการเปลี่ยนแปลงด้วย ในการศึกษาครั้งนี้พบว่าอะซิทิลโคลีนเอสเทอเรสในปลาดุกลูกผสมที่แยกได้จากสมอง กล้ามเนื้อและเหงือกมีขนาด 71 kDa เมื่อทำการศึกษาโดยใช้เทคนิค Western blot โดยนำแอนติบอดีที่จำเพาะต่ออะซิทิลโคลีนเอสเทอเรสมาใช้ในการตรวจสอบ และเมื่อทำการศึกษารูปแบบโปรตีนโดยใช้เทคนิคเจล อิเล็คโตรโฟรีซีส ในสมองของปลาดุกลูกผสมที่ได้รับสัมผัสอะบาเม็กตินที่เวลา 24 ชั่วโมง พบว่าอะซิทิลโคลีนเอสเทอเรสจะสามารถตรวจสอบได้โดยมีขนาด 71 kDa แต่เมื่อเวลาผ่านไปเป็น 48 ชั่วโมงจะมีปริมาณลดลงและที่เวลา 96 ชั่วโมง จะไม่พบการแสดงออกของอะซิทิลโคลีนเอสเทอเรสโดยรูปแบบของโปรตีนที่พบจะเปลี่ยนไปตามระดับระยะเวลาที่ทำการศึกษา สอดคล้องกับการศึกษาของ Thanomsit *et al*. (2020b) ที่พบว่าการแสดงออกของอะซิทิลโคลีนเอสเทอเรสจะลดลงเมื่อปลาดุกลูกผสมได้รับสัมผัสสารกำจัดศัตรูพืช (ไกลโฟเสท)เป็นระยะเวลานานโดยอะซิทิลโคลีนเอสเทอเรสมี

ขนาด 71 kDa ยิ่งในกว่านั้นในการศึกษาครั้งนี้ยังสอดคล้องกับการศึกษาของ Thanomsit *et al.* (2021) ที่พบว่าอะซิทิลโคลีนเทอเรอสมีขนาด 71 kDa เมื่อทำการศึกษาในปลานิลและปลาหมอ

งานวิจัยจำนวนมากชี้ให้เห็นว่าอะซิทิลโคลีนเอสเทอเรสถูกนำมาประยุกต์ใช้เป็นตัวชี้วัดคุณภาพทางด้านสิ่งแวดล้อมทางน้ำและการตรวจสอบทางด้านพิษวิทยา แต่การตรวจสอบถึงปริมาณชองอะซิทิลโคลีนเอสเทอเรสโดยตรวจสอบการทำงานโดยตรงของเอนไซม์ เช่น วิธีการของ Ellman, Courtney, Andres & Featherstone (1961) และวิธีของ Alves Costa *et al*. (2007) นั้น มีขีดจำกัดในเรื่องของเวลาและการตรวจสอบควรกระทำอย่างรวดเร็ว เพื่อป้องกันการเสียสภาพของเอนไซม์อะซิทิลโคลีนเอสเทอเรส และเมื่อทำการศึกษาในภาคสนามการเก็บตัวอย่างและตรวจวิเคราะห์ทำได้ยากมากกว่าในห้องปฏิบัติการ การตรวจสอบทางอณุชีววิทยาในห้องปฏิบัติการก็สามารถนำมาประยุกต์ใช้ในการตรวจสอบอะซิทิลโคลีนเอสเทอเรสได้เช่นกัน แต่ก็มีขีดจำกัดในเรื่องเครื่องมือที่ใช้มีราคาสูงมาก เกิดการปนเปื้อนและมีการเสียสภาพของดีเอ็นเอในระหว่างการตรวจสอบได้ง่าย รวมทั้งผู้วิจัยต้องมีความชำนาญสูง การตรวจปริมาณโดยตรงโดยใช้สเปกโตรโฟเตอร์มิเตอร์หรือการนำเทคนิคทางภูมิคุ้มกันโดยอาศัยหลักการทำงานของแอนติเจนและแอนติบอดีมาตรวจสอบก็เป็นอีกหนึ่งทางเลือกที่สำคัญเพราะเป็นเทคนิคที่ไม่ซับซ้อน มีความแม่นยำสูง และใช้ค่าใช้จ่ายน้อยที่สำคัญคือสามารถตรวจสอบตัวอย่างได้ครั้งละมาก ๆ ดังนั้นการประยุกต์ใช้เทคนิคทางแอนติบอดีซึ่งเป็นเทคนิคที่มีความไวและความจำเพาะสูงจึงกลายเป็นอีกทางเลือกหนึ่งที่สำคัญ (You *et al*., 2016; Thanomsit *et al*., 2017)

เทคนิค dot blot เป็นเทคนิคทางแอนติบอดีแบบหนึ่ง สำหรับการตรวจวิเคราะห์นั้นจะใช้หลักการของแอนติบอดีและแอนติเจนที่จำเพาะต่อกันทำปฏิกิริยาบนแผ่นเมมเบรน โดยเมื่อเติมแอนติบอดีที่ติดฉลากด้วยเอนไซม์มาจับกับแอนติเจน หรือแอนติบอดี ที่จำเพาะต่อแอนติเจนที่สนใจ แล้วนำมาเติมสับสเตรทที่จำเพาะกับเอนไซม์นั้นก็จะสามารถตรวจสอบผลเชิงคุณภาพได้ด้วยการสังเกตจุดสีน้ำตาลเทาบนแผ่นเมมเบรน โดยอาจเปรียบเทียบกับตัวควบคุมผลบวกและลบเพื่อเพิ่มความแม่นยำ ซึ่งเทคนิคนี้สามารถตรวจสอบตัวอย่างจำนวนมากได้ในเวลาอันรวดเร็ว มีความแม่นยำสูง สามารถวิเคราะห์ได้ในระดับนาโนกรัม ค่าใช้จ่ายน้อย และขั้นตอนไม่ยุ่งยาก จึงมีการนำไปประยุกต์ใช้กับการตรวจสอบทั้งในเชิงสิ่งแวดล้อม การเกษตร หรือทางการแพทย์อย่างกว้างขวาง ดังนั้น เทคนิค dot blot จึงถือเป็นทางเลือกหนึ่งที่มีความน่าสนใจในการนำมาพัฒนาเพื่อตรวจสอบการปนเปื้อนสารรบกวนการทำงานของต่อมไร้ท่อในสิ่งแวดล้อม (Peter *et al*., 2001; Rupprecht *et al*., 2010; Bastos *et al*., 2018)

การตรวจสอบอะซิทิลโคลีนเอสเทอเรสด้วยเทคนิค dot blot เพื่อประเมินถึงความไวและความจำเพาะของอะซิทิลโคลีนเอสเทอเรสกับโพลีโคลนอลแอนติบอดีพบว่าขีดจำกัดของการตรวจสอบอะซิทิลโคลีนเอสเทอเรสที่สมองในปลาดุกลูกผสมชุดคุมควบคุมเปรียบเทียบกับกลุ่มที่ได้รับสัมผัสอะบาเม็กตินเป็นเวลา 24, 48, 72 และ 96 ชั่วโมง มีขีดจำกัดในการตรวจสอบคือ 1.25, 2.5, 2.5, 5 และ 10 µg/µl ในกล้ามเนื้อคือที่ 0.625, 2.5, 2.5, 2.5, และ 2.5 µg/µl และท้ายที่สุดในเหงือกคือประมาณ 2.5, 2.5, 2.5, 5, และ10 µg/µl โดยขีดจำกัดของการตรวจสอบครั้งนี้ แตกต่างกับการศึกษาของ Nuankaew, Ngamsnae, Saowakoon, Nanthanawat, & Thanomsit (2020) ที่พบว่าเมื่อใช้เทคนิค dot blot ประเมินถึงการแสดงออกของอะซิทิลโคลีนเอสเทอเรสในปลานิลที่ได้รับสัมผัสกับพาราควอตพบว่าการแสดงออกของของอะซิทิลโคลีนเอสเทอเรสใน

กล้ามเนื้อของปลานิลที่ได้รับสัมผัสพาราควอตเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุมพบว่าขีดจำกัดของการแสดงออกที่ตรวจสอบได้คือ 0.156, 1.25, 2.5, 5 และ 10 µg/µl เมื่อได้ศึกษาในกลุ่มควบคุมเปรียบเทียบกับปลานิลที่ได้รับสัมผัสพาราควอตเป็นเวลา 24, 48, 72 และ 96 ชั่วโมงตามลำดับ ซึ่งสาเหตุที่ขีดจำกัดในการตรวจสอบต่างกันนี้อาจจะเนื่องจากชนิดของปลาและสารที่ใช้ทดสอบต่างชนิดกัน ซึ่ง Walker *et al*. (2006) ได้เสนอรายงานไว้ และยิ่งไปกว่านั้น Thanomsit *et al*. (2020a) ได้เสนอแนะว่าหากปลาดุกลูกผสมได้รับสารกำจัดศัตรูพืชเป็นเวลานานมีแนวโน้มจะส่งส่งผลต่อการแสดงออกของอะซิทิลโคลีนเอสเทอเรสโดยอาจจะมีการแสดงออกที่ลดลงจากกลุ่มควบคุมทั้งนี้อาจจะเนื่องมาจากสารกำจัดศัตรูพืชส่วนใหญ่มีความเป็นพิษสูงอาจจะไปทำลายเซลล์ต่าง ๆ ส่งผลให้การแสดงออกของอะซิทิลโคลีนเอสเทอเรสลดลง

สรุปผลการวิจัย

อะบาเม็กตินเป็นสารกำจัดแมลงศัตรูพืชเมื่อปลาดุกลูกผสมได้รับสัมผัสจะก่อให้เกิดผลกระทบทั้งในเรื่องการตายสะสม การเปลี่ยนแปลงพฤติกรรม การเปลี่ยนแปลงสัณฐานวิทยา และการแสดงออกของอะซิทิลโคลีนเอสเทอเรสในระดับความเข้มข้นที่ไม่ก่อให้เกิดการตายในปลาดุกลูกผสมคือ 1 ppm พบว่าสามารถใช้อะซิทิลโคลีนเอสเทอเรสเป็นตัวชี้วัดการได้รับสัมผัสได้ ซึ่งการเปลี่ยนแปลงที่ตรวจสอบได้จะขึ้นอยู่กับระยะเวลาที่ได้รับสัมผัสโดยมีแนวโน้มที่จะลดลงหากมีการสัมผัสเป็นระยะเวลานาน อะซิทิลโคลีนเอสเทอเรสที่แยกได้จากเนื้อเยื่อสมอง กล้ามเนื้อ และเหงือกมีขนาดน้ำหนักโมเลกุลเท่ากับ 71 kDa ดังนั้นปลาดุกลูกผสมจึงมีแนวโน้มที่จะนำมาใช้เป็นตัวชี้วัดการได้รับสัมผัสสารอะบาเม็กตินได้ หากมีการปนเปื้อนในแหล่งน้ำได้

กิตติกรรมประกาศ

งานวิจัยนี้ได้รับการสนับสนุนจากสาขาประมง คณะเกษตรศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลอีสาน วิทยาเขตสุรินทร์

เอกสารอ้างอิง

Alves Costa, J. R. M., Mela, M., Silva de Assis, H.C. da, Pelletier, É., Randi, M. A. F. & Oliveira Ribeiro, C.A. de, (2007). Enzymatic inhibition and morphological changes in *Hoplias malabaricus* from dietary exposure to lead (II) or methylmercury. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, *67*, 82–88.

Akinsorotan, O. A., Morgan, P. I. & Izah, S. C. (2019). Behavioral response and acute toxicity of fingerlings of African Cat Fish, *Clarias Gariepinus* exposed to paraquat dichloride. *Journal of plant and animal ecology*, *1*(3), 1-13.

Cranshaw, W. (2005). Classes of pesticides used in landscape/nursery pest management (Tactics and tools for IPM). Colorado State University. USA. Pp. 42-43.

Ellman, G.L., Courtney, K.D., Andres, V. & Featherstone, R. M., (1961). A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. *Biochemical Pharmacology*, *7*, 88–95.

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)

Cantawon, N., Nuankaew, C., Khanchanasal, P., Saleethong, P., Kangpanich, C., Nanthanawat, P. & Thanomsit, c. (2021). Adverse Effect of $CdCl_2$ on Hatching Rate of Egg's Golden Apple Snail (*Pomacea canaliculata*) and Application Acetylcholinesterase (AChE) as Biomarker of Exposure. *Burapha Science Journal*, *26*(1), 488-509.

Gruber, S. J. & Munn, M. D. (1998). Organophosphate and carbamate insecticides in agricultural waters and cholinesterase (ChE) in hibition in common carp (*Cyprinus carpio*). *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, *35* (3), 391-396.

Isaac, A .O., Joshua, O. S. & Jehu, A. (2017). Behavioural and some physiological assessment of glyphosate and paraquat toxicity to juveniles of African catfish, *Clarias gariepinus*, *Pakistan Journal of Zoology*, *49* (1), 183-190.

Kushwaha, S., Anerao, I., Rajput, S., Bhagriya, P. & Roy, H. (2020). Evaluation of abamectin induced hepatotoxicity in *Oreochromis mossambicus*. *Cogent Biology*, *6*(1), 1-14.

Ladipo M. K., Doherty V. F. & Oyebadejo S. A. (2011). Acute Toxicity, Behavioural changes and histopathological effect of paraquat dichloride on tissues of catfish (*Clarias Gariep*inus), *International Journal of Biology*, *3*(2), 67-74.

Novellia, A., Vieiraa, B. H., Cordeirob, D., Cappelinib, L.T.D., Vieirab, E. M. & Espíndola, E. L.G. (2011). Lethal effects of abamectin on the aquatic organisms *Daphnia similis*, *Chironomus xanthus* and *Danio rerio*, Chemosphere, *86*(1), 36-40.

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.

Nwani, C. D., Ifo, C.T., Nwamba, H. O., Ejere, V. C., Onyishi, G.C., Oluah, S. N., Ikwuagwu, O. E. & Odo, G. E. (2015). Oxidative stress and biochemical responses in the tissues of African catfish *Clarias gariepinus* juvenile following exposure to primextra herbicide. *Drug and chemical toxico*logy, *38*(3), 278–285.

OECD. Test Guidelines for the Chemicals - OECD. (2019). Test guideline No.203 Fish, acute toxicity testing, pp. 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.

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.

Thanomsit, C. & Ocharoen, Y. (2016). Fate and Toxicity of Abamectin in exposed fish. *RMUTI Journal*, *9* (3), 215-226.

Thanomsit, C., Saowakoon, K. & Nanthanawat, P. (2016). Mortality rate and histological alterations of prawn (*Macrobrachium rosenbergii*) exposed to abamectin. *Journal of Fisheries Technology Research*, *10* (2), 23-37. (in Thai)

Thanomsit, C., Ocharoen, Y. & Nanthanawat, P. (2016). Behavior, Survival rate, behavior and histological alterations in Nile tilapia (*Orechromis niloticus-mo*ssambicus) after exposed to abamectin. *Naresuan University Journal: Science and Technology*, *24*(3), 65-74.

Thanomsit, C., Maprajuab, A., Prasartkaew, W., Ocharoen, Y., Wattakornsiri, A., Nanuam, J. & Nanthanawat, P. (2017). Application of Acetylcholinesterase as biomarker for pesticide exposure to reduce health risk in consuming Pond snail and Golden apple snail, in: Innovation and Technology Conference 2017. pp. 221–227.

Thanomsit, C., Maprajub, A., Saowakoon, S., Prasatkaew, W., Ocharore, Y. Wattanakornsiri, A., Nanuam, J. & Nanthanawat, P. (2018). Acetylcholinesterase (AChE): Potential Biomarker for Evaluating Pesticide Exposure on Egg and Tissue of Golden Apple Snail (*Pomacea Canaliculata*) from Huai-Saneng Reservoir, Surin Province, Thailand. *Thai Journal of Agricultural Science*, *51* (3), 104-117.

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

Thanomsit, C., Kiatprasert, P., Prasatkaew, W., Khongchareonporn, N. & Nanthanawat, P. (2021). Acetylcholinesterase (AChE) monoclonal antibody generation and validation for use as a biomarker of glyphosate-based herbicide exposure in commercial freshwater fish. *Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology*, 108956.

Tisler, T. (2006). Abamectin in the aquatic environment. *Journal of Ecotoxcology*, *15*, 495 – 502.

Walker, C. H., Hopkin, S.P., Sibly, R. M., & Peakall, D. B. (2006). *Principle of Ecotoxicolo*gy. Taylor & Francis: USA.

You, H., Gobert, G.N., Du, X., Pali, G., Cai, P., Jones, M. K. & McManus, D.P. (2016). Functional characterisation of *Schistosoma japonicum* acetylcholinesterase. *Parasit. Vectors*, *9* (328), 1615-1621.