

ความเป็นพิษของสารกำจัดวัชพืช 2,4-D-ไดเมทิลแอมโมเนียม ในปลานิล (*Oreochromis niloticus*)

Toxicity of 2,4-D-Dimethylammonium Based-Herbicide in Nile Tilapia (*Oreochromis niloticus*)

สาวิภา รัตนกร¹, บุญทิศา ชัดิขำนิ², พวงเพชร พิมพ์จันทร์³, ชยพล มีพร้อม⁴, กอบกุล นงนุช⁵,
พัชร มงคลวัย² และ วิชชุดา ประสาทแก้ว⁶

Sawipa Ruttanakorn¹, Boonthiwa Chartchumni², Paongpetch Phimchan³, Chayapol Meeprom⁴,
Khobkul Nongnutch⁵, Patcharee Mongkolvai² and Witchuda Prasatkaew⁶

¹สาขาวิชาเทคโนโลยีการประมง คณะเทคโนโลยีการเกษตร มหาวิทยาลัยกาฬสินธุ์ ประเทศไทย

²สาขาวิชาประมง คณะทรัพยากรธรรมชาติ มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลอีสาน วิทยาเขตสกลนคร ประเทศไทย

³สาขาวิชาพืชศาสตร์ คณะเกษตรศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลอีสาน วิทยาเขตสุรินทร์ ประเทศไทย

⁴สาขาวิชาสัตวศาสตร์ คณะเกษตรศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลอีสาน วิทยาเขตสุรินทร์ ประเทศไทย

⁵คณะอุตสาหกรรมและเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลอีสาน วิทยาเขตสกลนคร ประเทศไทย

⁶สาขาการจัดการสิ่งแวดล้อม คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยราชภัฏธนบุรี สมุทรปราการ ประเทศไทย

¹Department of Fisheries Technology, Faculty of Agricultural Technology, Kalasin University, Thailand

²Department of Fisheries, Faculty of Natural Resources,

Rajamangala University of Technology Isan Sakon Nakhon Campus, Thailand

³Department of Plant Science, Faculty of Agriculture and Technology,

Rajamangala University of Technology Isan, Surin Campus, Thailand

⁴Department of Animal Science, Faculty of Agriculture and Technology,

Rajamangala University of Technology Isan, Surin Campus, Thailand

⁵Faculty of Industry and Technology, Rajamangala University of Technology Isan Sakon Nakhon Campus, Thailand

⁶Department of Environmental Management, Faculty of Science and Technology,

Dhonburi Rajabhat University Samutprakarn, Thailand

Received: 9 March 2026, Received in revised form: 2 July 2026, Accepted: 6 July 2026

Available online: 1 September 2026

บทคัดย่อ

วัตถุประสงค์และที่มา: สารกำจัดวัชพืช 2,4-D-ไดเมทิลแอมโมเนียม (2,4-D-dimethylammonium) เป็นสารกำจัดวัชพืชที่ใช้แพร่หลายในการกำจัดวัชพืชใบกว้าง และพืชประเภทกกในแหล่งน้ำ นอกจากนี้ยังใช้ควบคุมการเจริญเติบโตในพืชใบเลี้ยงคู่เพื่อเพิ่มผลผลิต ในประเทศไทยสัดส่วนการนำเข้าสารกำจัดวัชพืช 2,4-D-ไดเมทิลแอมโมเนียมมีปริมาณสูงเป็นอันดับสามของสารเคมีอันตรายทางการเกษตร และพบรายงานการตกค้างในสิ่งแวดล้อมทั้งในดินและน้ำ ซึ่งอาจสะสมในสัตว์น้ำและส่งผลกระทบต่อระบบนิเวศ การศึกษาครั้งนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาความเป็นพิษของสารกำจัดวัชพืช 2,4-D-ไดเมทิล

แอมโมเนียมต่อปลานิล (*Oreochromis niloticus*) ซึ่งเป็นปลาน้ำจืดที่พบได้ในแหล่งน้ำทั่วประเทศ ทั้งในระดับความเป็นพิษแบบเฉียบพลันและในระดับที่ไม่ก่อการตาย เพื่อเพิ่มความเข้าใจเกี่ยวกับกลไกการเกิดพิษของ 2,4-D-ไดเมทิลแอมโมเนียมในปลานิล

วิธีดำเนินการวิจัย: การทดสอบผลของสารกำจัดวัชพืช 2,4-D-ไดเมทิลแอมโมเนียมทำการศึกษาในปลานิลโตเต็มวัย น้ำหนัก 150-200 กรัม ศึกษาอัตราการตายสะสมที่ 5 ระดับความเข้มข้น คือ 33.60, 42.00, 50.40, 58.80 และ 67.20 มิลลิกรัม/ลิตร เปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุมที่ไม่ได้รับสัมผัสสาร ที่เวลา 24, 48, 72 และ 96 ชั่วโมง และประเมินระดับความเข้มข้นที่ก่อการตาย 50% (Lethal concentration 50%; LC₅₀) ด้วยการวิเคราะห์โพรบิท นอกจากนี้ยังศึกษาผลของสาร 2,4-D-ไดเมทิลแอมโมเนียมในระดับที่ไม่ก่อให้เกิดการตายเพื่อเป็นแนวทางการประเมินสุขภาพของปลาที่เวลา 0, 7, 14, 21 และ 28 วัน ซึ่งประกอบด้วย ระดับฮีโมโกลบิน ค่าความเข้มข้นของเลือด ค่าเม็ดเลือดแดงและเม็ดเลือดขาว และการจำแนกชนิดของเม็ดเลือดขาว การศึกษาลักษณะสัณฐานวิทยา การศึกษาภาวะเครียดออกซิเดชัน โดยการวัดกิจกรรมของเอนไซม์ต้านอนุมูลอิสระ 3 ชนิด คือ ซูเปอร์ออกไซด์ ดิสมิวเตส (SOD), คาตาเลส (CAT) และกลูตาไธโอน เอส-ทรานส์เฟอเรส (GST) และศึกษาการเปลี่ยนแปลงของเนื้อเยื่อ กิจกรรมของเอนไซม์อะซิetylโคลีนเอสเตอเรส และรูปแบบของโปรตีนด้วยเทคนิค SDS-PAGE และ Western blot

ผลการวิจัย: การได้รับสารกำจัดวัชพืช 2,4-D-ไดเมทิลแอมโมเนียมส่งผลให้อัตราการตายสะสมของปลานิลสูงขึ้นตามความเข้มข้นและระยะเวลาที่ได้รับ โดยความเข้มข้น 67.20 มิลลิกรัม/ลิตร พบอัตราการตายสะสมสูงสุดในเวลา 96 ชั่วโมง (ร้อยละ 50) ส่วนการได้รับพิษในระดับที่ไม่ก่อให้เกิดการตายส่งผลเสียต่อสุขภาพของปลาทั้งลักษณะภายนอก ได้แก่ ลักษณะสัณฐานวิทยาที่พบความเสียหายในอวัยวะภายนอก เช่น เกล็ดร่อนตัวซีด เนื้อเยื่อโคนครีบบวม กร่อน มีจ้ำเลือด และแนวโน้มรุนแรงขึ้นตามเวลาที่รับสาร การทำงานของเอนไซม์ในภาวะเครียดออกซิเดชันพบว่ากิจกรรมของเอนไซม์ SOD, CAT, GST เพิ่มขึ้นตามระยะเวลาการสัมผัสสาร ในขณะที่ค่าโลหิตวิทยา คือ ค่าความเข้มข้นของเลือด และปริมาณเม็ดเลือดขาวชนิด Eosinophil ลดลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) การเปลี่ยนแปลงเนื้อเยื่อพบผลกระทบต่อสุขภาพของปลาทั้งในเชิงอก ตับ ลำไส้ และกระเพาะอาหาร ตั้งแต่วันที่ 7-14 หลังได้รับสาร เช่น การเพิ่มจำนวนของเซลล์เยื่อ และ การคั่งของเลือด บริเวณซีเหงือก การเกิดช่องว่างในไซโตพลาซึมของเซลล์ตับ การเกิดบาดแผลและรอยโรคของไมโครวิลไล และการบวมของไมโครวิลไลในลำไส้เล็ก ส่วนในกระเพาะอาหารพบการสีกร่อนของเยื่อบุผิว เป็นต้น การศึกษารูปแบบของโปรตีน และการแสดงออกของอะซิetylโคลีนเอสเตอเรสพบว่ากิจกรรมของเอนไซม์อะซิetylโคลีนเอสเตอเรส ปริมาณโปรตีนในกล้ามเนื้อและการแสดงออกของอะซิetylโคลีนเอสเตอเรสของปลาที่ได้รับสารมีแนวโน้มลดลงตามระยะเวลาที่สัมผัส

สรุปผลการวิจัย: การได้รับสารกำจัดวัชพืช 2,4-D-ไดเมทิลแอมโมเนียมส่งผลกระทบต่อสุขภาพของปลานิลในหลายระบบ ทั้งความเสียหายต่ออวัยวะภายนอก เนื้อเยื่อภายใน การลดลงของค่าโลหิตวิทยา การเพิ่มขึ้นของเอนไซม์ที่เกี่ยวข้องกับภาวะเครียดออกซิเดชัน และการลดลงของอะซิetylโคลีนเอสเตอเรส ซึ่งการศึกษาลักษณะของสารกำจัดวัชพืช 2,4-D-ไดเมทิลแอมโมเนียมที่มีต่อปลานิลจากการวิจัยนี้สามารถใช้เป็นแนวทางในการประเมินผลกระทบของสารกำจัดวัชพืชต่อสิ่งมีชีวิตในแหล่งน้ำ ตลอดจนเป็นแนวทางการจัดการความเสี่ยงของการปนเปื้อนสารเคมีในสิ่งแวดล้อม โดยควรมีการ

วางแผนการใช้สารเคมีอย่างเหมาะสมตลอดจนเฝ้าระวังการปนเปื้อนของสารกำจัดวัชพืชในแหล่งน้ำ และผลกระทบที่อาจเกิดขึ้นต่อสัตว์น้ำอย่างเป็นระบบต่อไป

คำสำคัญ: 2,4-D-ไดเมทิลแอมโมเนียม; สารกำจัดวัชพืช; ปลานิล; ระบบนิเวศทางน้ำ; ตัวชี้วัดทางชีวภาพ

Abstract

Background and Objectives: 2,4-D-dimethylammonium is a widely used herbicide for controlling broadleaf weeds and sedges in aquatic environments. It is also utilized as a plant growth regulator in dicotyledonous crops to enhance crop productivity. In Thailand, it is one of the most extensively imported herbicides, ranking third among agricultural chemicals in terms of import volume. Owing to its widespread application, residues of 2,4-D-dimethylammonium are frequently detected in the environment, particularly in soil and surface waters. This study aimed to evaluate the toxicity of 2,4-D-dimethylammonium in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*), a freshwater fish species widely distributed throughout Thailand. Specifically, the study investigated acute toxicity, cumulative mortality, morphological alterations, oxidative stress responses, hematological changes, histopathological lesions in major organs, alterations in protein profiles, and acetylcholinesterase (AChE) activity and protein expression, which are recognized biomarkers of exposure to 2,4-D-dimethylammonium. The findings provide new insights into the toxicological mechanisms underlying 2,4-D-dimethylammonium-induced toxicity in Nile tilapia.

Methodology: Adult Nile tilapia weighing 150–200 g were used in this study. Acute toxicity was evaluated by exposing fish to five concentrations of 2,4-D-dimethylammonium (33.60, 42.00, 50.40, 58.80, and 67.20 mg/L), together with an untreated control group. Cumulative mortality was recorded at 24, 48, 72, and 96 h after exposure. The median lethal concentration (LC_{50}) was estimated using probit analysis. To investigate sublethal toxicity, fish were exposed to a non-lethal concentration of 2,4-D-dimethylammonium for 28 days, and samples were collected on days 0, 7, 14, 21, and 28. Hematological parameters, including hemoglobin concentration, hematocrit, erythrocyte count, total leukocyte count, and differential leukocyte count, were determined to assess physiological and immunological responses. Morphological abnormalities were documented throughout the exposure period. Oxidative stress was evaluated by measuring the activities of the antioxidant enzymes: superoxide dismutase (SOD), catalase (CAT), and glutathione S-transferase (GST). Histopathological examinations of the gills, liver, intestine, and stomach were performed to assess tissue damage. In addition, protein profiles, acetylcholinesterase (AChE) activity, and AChE protein expression were analyzed using SDS-PAGE and Western blotting.

Main Results: The results demonstrated that cumulative mortality increased with increasing herbicide concentration and exposure duration. The highest exposure concentration (67.20 mg/L) resulted in 50% cumulative mortality after

96 h. Sublethal exposure induced progressive morphological abnormalities, including scale discoloration, fin base swelling, fin erosion, and hemorrhagic lesions, all of which became more severe with prolong exposure. Oxidative stress analysis revealed significant increases in SOD, CAT, and GST activities with increasing exposure times, demonstrating an elevated production of reactive oxygen species and activation of the antioxidant defense system. Hematological analysis showed significant reductions ($p < 0.05$) in hematocrit and eosinophil counts, suggesting physiological stress and impaired immune function. Histopathological alterations were evident from days 7–14 after exposure. Gill tissues exhibited epithelial hyperplasia and lamellar aneurism, whereas liver tissues showed hepatocellular vacuolation and degeneration. Intestinal tissues displayed microvillar lesions, epithelial damage, and villus swelling, while stomach tissues exhibited epithelial erosion. Protein profiling and biomarker analyses of muscle tissue further revealed progressive decreases in AChE activity, total protein levels, and AChE protein expression with prolonged exposure.

Conclusions: The findings demonstrate that exposure to 2,4-D-dimethylammonium adversely affects multiple physiological systems in Nile tilapia, including external morphology, hematological homeostasis, oxidative stress, tissue integrity, and cholinergic nervous system function. The observed hematological impairment, oxidative stress, histopathological damage, and suppression of AChE activity collectively demonstrate the systemic toxicity of this herbicide. This study highlights the ecological risks associated with 2,4-D-dimethylammonium contamination in aquatic environments and underscores the need for responsible herbicide management, continuous monitoring of water quality, and the development of sustainable strategies to prevent chemical pollution. Collectively, this study provides valuable evidence for environmental risk assessment and advances scientific understanding of herbicide-induced toxicity in freshwater fish.

Keywords: 2,4-D-dimethylammonium; herbicide; tilapia; aquatic ecosystem; biological indicator

*Corresponding author. E-mail: witchuda.p@dru.ac.th

Introduction

สารกำจัดวัชพืช (Herbicide) เป็นสารเคมีที่มีการใช้ทางการเกษตรมากที่สุดชนิดหนึ่งในประเทศไทย และมีปริมาณการนำเข้าสูงขึ้นอย่างต่อเนื่องตั้งแต่ปี พ.ศ. 2565 – 2567 จากข้อมูลการนำเข้าวัตถุอันตรายทางการเกษตรในปี พ.ศ. 2567 มีการนำเข้ารวมกว่า 100 ล้านกิโลกรัม คิดเป็นร้อยละ 64 ของการนำเข้าวัตถุอันตรายทางการเกษตรในประเทศ ซึ่ง 2,4-D-ไดเมทิลแอมโมเนียม (2,4-D-dimethylammonium) เป็นสารกำจัดวัชพืชที่มีการนำเข้าสูงสุดเป็นอันดับสามของวัตถุอันตรายทางการเกษตร โดยมีปริมาณนำเข้าประมาณเจ็ดล้านกิโลกรัม คิดเป็นมูลค่ามากกว่าพันล้านบาทในแต่ละปี แสดงให้เห็นว่า

ประเทศไทยมีการใช้สารเหล่านี้เป็นจำนวนมาก (Mongkhonwuttikun & Sueppandee, 2021) ซึ่งการใช้งานในปริมาณมากอย่างต่อเนื่องของสาร 2,4-D-ไดเมทิลแอมโมเนียม ทำให้อาจเกิดการตกค้างในสิ่งแวดล้อมได้มากเช่นกัน

สาร 2,4-D-ไดเมทิลแอมโมเนียม เป็นสารกำจัดวัชพืชกลุ่มคลอโรฟีนอกซี (Chlorophenoxy compounds) มีสารออกฤทธิ์หลักคือ 2,4-ไดคลอโรฟีนอกซีอะซิติกแอซิด (2,4-dichlorophenoxyacetic acid หรือ 2,4-D) เป็นสารกำจัดวัชพืชที่นำมาใช้ในการกำจัดวัชพืชใบกว้างในแปลงหญ้า สนามกอล์ฟ และใช้กำจัดวัชพืชประเภทกกในแหล่งน้ำ นอกจากนี้ยังใช้เป็นสารควบคุมการเจริญเติบโต (Growth regulator) ในพืชใบเลี้ยงคู่เพื่อเพิ่มผลผลิต สาร 2,4-D ย่อยสลายได้อย่างรวดเร็วในสิ่งแวดล้อม ในดินสามารถถูกย่อยสลายได้ทั้งแบบใช้ออกซิเจนและไม่ใช้ออกซิเจน โดยแบคทีเรียในดิน เช่น *Flavobacterium peregrinum*, *Pseudomonas fluorescens*, *Arthrobacter globiformis*, *Streptomyces* sp. ส่วนในน้ำจะมีการย่อยสลายโดยเกิดปฏิกิริยาไฮโดรไลซิส (Hydrolysis) โดยมีแสงเป็นตัวเร่งปฏิกิริยา นอกจากนี้ 2,4-D ยังเป็นสารกำจัดวัชพืชใบกว้าง ที่มีการใช้อย่างแพร่หลายในแปลงหญ้า เช่น ข้าวสาลี ข้าวบาร์เลย์ ข้าวโอ๊ต ทำให้มีโอกาสตกค้างในหญ้าได้ (Boonthawee *et al.*, 2021) อีกทั้งยังพบการปนเปื้อนในแหล่งน้ำธรรมชาติจากการชะล้างลงสู่แหล่งน้ำ ซึ่งปริมาณการใช้อย่างต่อเนื่องและแพร่หลายอาจทำให้เกิดการตกค้างในสิ่งแวดล้อม และส่งผลกระทบต่อสัตว์น้ำโดยเฉพาะปลาที่อาศัยในน้ำเสี่ยงต่อการได้รับสารนี้อย่างต่อเนื่อง และอาจส่งผลกระทบต่อมนุษย์ซึ่งเป็นผู้บริโภคลำดับสุดท้ายในห่วงโซ่อาหาร

การศึกษาผลกระทบของสาร 2,4-D-ไดเมทิลแอมโมเนียมต่อสิ่งมีชีวิตในน้ำพบว่าสามารถทำให้เกิดความผิดปกติในเนื้อเยื่อและกระบวนการทำงานของกระบวนการต่าง ๆ ในร่างกายของสิ่งมีชีวิต โดยมีรายงานว่าสารสัมผัสในระดับสูงอาจทำให้เกิดการเสียชีวิตและผลกระทบต่อระบบทางสรีรวิทยาของปลา เช่น การเปลี่ยนแปลงพฤติกรรม การทำงานของเอนไซม์และโครงสร้างเนื้อเยื่อ (Khanchanasal *et al.*, 2022) นอกจากนี้ยังมีงานวิจัยรายงานว่าสารสัมผัสกับสารกำจัดวัชพืช 2,4-D-ไดเมทิลแอมโมเนียมในระดับที่ไม่ก่อให้เกิดการตาย สามารถก่อให้เกิดการเปลี่ยนแปลงทางชีวภาพ เช่น การเปลี่ยนแปลงค่าโลหิตวิทยา การแสดงออกของเอนไซม์อะซิติลโคลีนเอสเตอเรส (Acetylcholinesterase: AChE) ซึ่งถือเป็นตัวชี้วัดทางชีวภาพ (Biomarker) สำหรับการรับสัมผัสสารพิษในปลา และพบว่าการแสดงออกของเอนไซม์นี้จะลดลงเมื่อเวลาการได้รับสัมผัสนานขึ้น (Khanchanasal *et al.*, 2022; Sinha *et al.*, 2022; Wongchan *et al.*, 2025) โดยเมื่อสิ่งมีชีวิตได้รับสารกำจัดศัตรูพืชจะทำให้เกิดการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์อะซิติลโคลีนเอสเตอเรส และเกิดการสะสมของอะซิติลโคลีนอะซิติลโคลีนเอสเตอเรสจึงถูกนำมาใช้เป็นตัวชี้วัดทางชีวภาพของการได้รับสัมผัสสารกำจัดศัตรูพืชในสิ่งมีชีวิตหลายชนิด (Fulton & Key, 2001; Menéndez-Helman *et al.*, 2012) รวมทั้งในปลานิล ซึ่งเป็นสัตว์น้ำเศรษฐกิจที่มีความสำคัญและมักถูกใช้เป็นสิ่งมีชีวิตในการประเมินผลกระทบของสารปนเปื้อนในระบบนิเวศน้ำจืด

ปลานิล (*Oreochromis niloticus*) เป็นปลาเศรษฐกิจที่มีบทบาทสำคัญทั้งในระบบการเพาะเลี้ยงและระบบนิเวศน้ำจืดของประเทศไทยและประเทศอื่น ๆ ในเอเชีย การศึกษาความเป็นพิษของสารกำจัดวัชพืชต่อปลานิลจึงเป็นแนวทางสำหรับการศึกษผลกระทบที่มีต่อสิ่งมีชีวิตได้อย่างแพร่หลายในพื้นที่ต่าง ๆ ทั้งด้านการจัดการคุณภาพน้ำและความปลอดภัยของสัตว์น้ำที่บริโภคโดยมนุษย์ โดยเมื่อปลาได้รับสารพิษในปริมาณที่ไม่ก่อให้เกิดการตายอาจก่อให้เกิดการเปลี่ยนแปลง

ภายในร่างกายหลายด้าน เช่น ลักษณะสัณฐานวิทยา การทำงานของเอนไซม์ในร่างกาย การเปลี่ยนแปลงของเม็ดเลือด การเปลี่ยนแปลงเนื้อเยื่อ และการตอบสนองของตัวชี้วัดชีวภาพคืออะซิทีลโคลีนเอสเทอเรส ซึ่งการศึกษาลักษณะของสาร 2,4-D-ไดเมทิลแอมโมเนียม ที่มีต่อการทำงานของระบบต่าง ๆ ของสิ่งมีชีวิตอาจนำมาเป็นแนวทางเพื่อใช้ประเมินการปนเปื้อนสารพิษกลุ่มนี้ในแหล่งน้ำธรรมชาติได้ อย่างไรก็ตาม การศึกษาลักษณะของสารกำจัดวัชพืช 2,4-D-ไดเมทิลแอมโมเนียม ต่อสัตว์น้ำในอดีตรวมน้ำใหญ่มุ่งเน้นการศึกษาการตอบสนองของตัวชี้วัดทางชีวภาพในระดับต่าง ๆ เช่น การเปลี่ยนแปลงกิจกรรมของเอนไซม์อะซิทีลโคลีนเอสเทอเรส การเปลี่ยนแปลงค่าทางโลหิตวิทยา และการเปลี่ยนแปลงของเนื้อเยื่อ แม้ว่าการศึกษาเหล่านี้จะให้ข้อมูลสำคัญเกี่ยวกับผลกระทบของสารต่อสิ่งมีชีวิตน้ำ แต่ยังขาดการบูรณาการข้อมูลระหว่างระดับการตอบสนองทางสรีรวิทยา ชีวเคมี และพยาธิวิทยา เพื่ออธิบายกลไกความเป็นพิษอย่างเป็นระบบ นอกจากนี้ ความรุนแรงของผลกระทบยังอาจแตกต่างกันตามชนิด ขนาด อายุ และสภาวะทางสรีรวิทยาของสัตว์น้ำ รวมถึงระดับความเข้มข้นและระยะเวลาการได้รับสัมผัสสาร

ดังนั้น การศึกษาครั้งนี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อประเมินความเป็นพิษของสารกำจัดวัชพืช 2,4-D-ไดเมทิลแอมโมเนียม ต่อปลานิล (*Oreochromis niloticus*) ภายใต้ระดับความเข้มข้นและระยะเวลาการได้รับสัมผัสที่แตกต่างกัน โดยครอบคลุมการศึกษาคือความเป็นพิษเฉียบพลันและอัตราการตายสะสมในปลาที่ได้รับสารในระดับที่ก่อให้เกิดการตาย และผลการได้รับสารในระดับที่ไม่ก่อให้เกิดการตาย โดยศึกษาเปลี่ยนแปลงลักษณะสัณฐานวิทยาภายนอก การตอบสนองของภาวะเครียดออกซิเดชัน การเปลี่ยนแปลงค่าทางโลหิตวิทยา การเปลี่ยนแปลงของเนื้อเยื่อ รูปแบบการแสดงออกของโปรตีน และกิจกรรมของเอนไซม์อะซิทีลโคลีนเอสเทอเรสซึ่งเป็นตัวชี้วัดทางชีวภาพของการได้รับสัมผัสสาร ผลการศึกษาที่ได้จะช่วยเพิ่มความเข้าใจเกี่ยวกับกลไกการเกิดพิษของ 2,4-D-ไดเมทิลแอมโมเนียมในปลานิลอย่างครอบคลุม และสามารถนำไปใช้เป็นข้อมูลพื้นฐานสำหรับการประเมินความเสี่ยงด้านสิ่งแวดล้อม ตลอดจนการกำหนดแนวทางการใช้และจัดการสารกำจัดวัชพืชในภาคการเกษตรและการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำอย่างเหมาะสมและยั่งยืน

Methodology

สารเคมี

การทดสอบผลของสารกำจัดวัชพืช 2,4-D-ไดเมทิลแอมโมเนียม (2,4-D-dimethylammonium 84% W/V) ในการวิจัยครั้งนี้ใช้สารกำจัดวัชพืช 2,4-D-ไดเมทิลแอมโมเนียมในรูปแบบที่จำหน่ายเชิงพาณิชย์ในประเทศไทย การศึกษาลักษณะของสาร 2,4-D-ไดเมทิลแอมโมเนียม ในระดับที่ไม่ก่อให้เกิดการตาย คือ ภาวะเครียดออกซิเดชัน การทำงานของเอนไซม์ การวิเคราะห์ค่าโลหิตวิทยา และการเปลี่ยนแปลงของเนื้อเยื่อ ใช้สารเคมีเกรดงานวิเคราะห์ (Analytical reagent grade) ที่มีความบริสุทธิ์มากกว่าร้อยละ 99 และสารเคมีที่ใช้ในการศึกษารูปแบบโปรตีนและกิจกรรมของเอนไซม์อะซิทีลโคลีนเอสเทอเรสเป็นผลิตภัณฑ์ของบริษัท Bio-Rad Laboratories และ Sigma-Aldrich

สัตว์ทดลอง

- การศึกษาผลของสาร 2,4-D-ไดเมทิลแอมโมเนียม ในระดับที่ก่อให้เกิดการตาย (Lethal concentrations)

นำปลานิลโตเต็มวัย น้ำหนัก 150-200 กรัม ความยาว 20-25 เซนติเมตร จำนวน 270 ตัว จากฟาร์มเพาะเลี้ยงในจังหวัดสุรินทร์ มาพักฟื้นและปรับสภาพการทดลองในบ่อซีเมนต์ขนาด 1,000 ลิตร เลี้ยงในระบบการเลี้ยงที่มีการเติมออกซิเจนตลอด 24 ชั่วโมง และให้อาหารวันละ 2 ครั้ง ปรับสภาพปลาในบ่อทดลองเป็นเวลา 7 วัน จากนั้นแยกปลานิลออกเป็น 6 ชุดการทดลอง คือ ชุดควบคุมที่ไม่ได้รับสัมผัสสาร และชุดทดลองที่เติมสารกำจัดวัชพืช 2,4-D-ไดเมทิลแอมโมเนียมแต่ละบ่อที่ระดับความเข้มข้นต่าง ๆ จำนวน 5 ระดับ (5 ชุดการทดลอง) ซึ่งในแต่ละชุดการทดลองจะใช้ปลานิลจำนวน 15 ตัว และทำการทดลองจำนวน 3 ซ้ำ

- การศึกษาผลของสาร 2,4-D-ไดเมทิลแอมโมเนียม ในระดับที่ไม่ก่อให้เกิดการตาย (Sublethal concentrations)

นำปลานิลโตเต็มวัย น้ำหนักระหว่าง 150-200 กรัม ความยาว 20-25 เซนติเมตร จำนวน 30 ตัว มาพักฟื้นและปรับสภาพการทดลองในถังไฟเบอร์ 500 ลิตร เป็นเวลา 7 วัน หลังการปรับสภาพแบ่งปลานิลออกเป็น 2 กลุ่ม คือ กลุ่มควบคุม (ก่อนได้รับสาร) จำนวน 6 ตัว และกลุ่มทดลอง จำนวน 24 ตัว โดยเป็นชุดการทดลองละ 6 ตัว ซึ่งปลากลุ่มทดลองได้รับสาร 2,4-D-ไดเมทิลแอมโมเนียม ในระดับความเข้มข้นที่ไม่ก่อให้เกิดการตาย คือ 1/10 ของค่า LC_{50} ที่ 96 ชั่วโมง (Ramesh *et al.*, 2018) ที่เวลาต่าง ๆ คือ เวลา 7, 14, 21 และ 28 วัน เพื่อการศึกษาลักษณะสัณฐานวิทยา และเมื่อครบเวลาเก็บตัวอย่างปลาชุดการทดลองละ 6 ตัว โดยแบ่งเป็น การเก็บเลือดเพื่อศึกษาค่าโลหิตวิทยา จำนวน 3 ตัว และเก็บเนื้อเยื่อเพื่อศึกษาวาระเครือข่ายออกซิเดชัน การเปลี่ยนแปลงของเนื้อเยื่อ การศึกษารูปแบบของโปรตีน และการแสดงออกของอะซิติลโคลีนเอสเตอเรส จำนวน 3 ตัว ซึ่งการดูแลสัตว์ทดลองตลอดการวิจัยดำเนินการตามจรรยาบรรณการใช้สัตว์เพื่องานทางวิทยาศาสตร์ โดยคณะกรรมการกำกับดูแลการดำเนินการต่อสัตว์เพื่องานทางวิทยาศาสตร์มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลธัญบุรี (รหัสโครงการ 03-68-009)

การศึกษ้อัตราการตายสะสม (%) และค่า LC_{50}

ศึกษ้อัตราการตายสะสมในปลานิลที่ได้รับสาร 2,4-D-ไดเมทิลแอมโมเนียมที่ 5 ระดับความเข้มข้น ตาม Log scale คือ 33.60, 42.00, 50.40, 58.80 และ 67.20 มิลลิกรัม/ลิตร ซึ่งเตรียมได้จากการเติมสาร 2,4-D-ไดเมทิลแอมโมเนียม (2,4-D-dimethylammonium 84% W/V) ลงในบ่อเลี้ยงปริมาณเท่ากับ 40, 50, 60, 70 และ 80 ไมโครลิตร/ลิตร (ตามลำดับ) เปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุมที่ไม่ได้รับสาร เพื่อศึกษาระดับความเป็นพิษที่เวลา 24, 48, 72 และ 96 ชั่วโมงตามลำดับ โดยบันทึกอัตราการตายสะสมและใช้การวิเคราะห์โพรบิต (Probit analysis) ประเมินระดับความเข้มข้นที่ก่อการตาย 50% (Lethal concentration 50%; LC_{50}) โดยใช้ Minitab® 17 software (entitlement i.d.: 2ec6-9637-1508-0264-2c55-c33) และให้ข้อมูลอ้างอิงจากแนวทางการทดสอบสารพิษในปลา (Fish Toxicity Testing Framework) ของ OECD (2019) โดยการระบุการตายของปลาจะสังเกตอาการจากปลาที่แผ่นเปิดปิดเหงือกไม่เคลื่อนไหว และไม่มีการตอบสนองเมื่อใช้วัสดุสัมผัส

การศึกษาลักษณะสัณฐานวิทยา

การศึกษาลักษณะสัณฐานวิทยาของปลานิลที่ได้รับสัมผัสสารกำจัดวัชพืช 2,4-D-ไดเมทิลแอมโมเนียม ทำการประเมินการเปลี่ยนแปลงลักษณะสัณฐานวิทยาภายนอกของปลานิลที่ได้รับสารในระดับความเข้มข้นที่ไม่ก่อให้เกิดการตาย คือ 1/10 ของค่า LC_{50} ที่เวลา 96 ชั่วโมง (Ramesh *et al.*, 2018) เปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม (ก่อนได้รับสาร) ที่เวลา 0, 7, 14, 21 และ 28 วัน โดยสังเกตการเปลี่ยนแปลงต่าง ๆ ที่เกิดขึ้น ได้แก่ การขีดของผิวหนัง การหลุดของเกล็ด การกร่อนของครีบก การเกิดบาดแผล การบวมของเนื้อเยื่อ และการเกิดจำเลือด

การวิเคราะห์ค่าโลหิตวิทยา

การวิเคราะห์ค่าทางโลหิตวิทยาเพื่อประเมินการตอบสนองต่อความเครียดทางสรีรวิทยาของปลานิล โดยเก็บเลือดจากปลาที่ไม่ได้รับสารหรือก่อนทดลองจำนวน 3 ตัว จากนั้นเก็บตัวอย่างเลือดจากปลาที่ได้รับสารกำจัดวัชพืช ในระดับที่ไม่ก่อให้เกิดการตาย (1/10 ของค่า LC_{50} ที่เวลา 96 ชั่วโมง) ที่เวลา 7, 14, 21 และ 28 วัน หลังได้รับสัมผัสสารกำจัดวัชพืช 2,4-D-ไดเมทิลแอมโมเนียม การเก็บตัวอย่างเลือดจากปลานิลโดยนำมาสลบโดยใช้น้ำมันกานพลู 120 มิลลิกรัม/ลิตร (Simões *et al.*, 2010) เก็บตัวอย่างเลือดจากหลอดเลือดดำบริเวณคอดหางปลาโดยใช้กระบอกฉีดยาและเข็มพลาสติกชนิดใช้ครั้งเดียวทิ้ง (Disposable needles) ขนาด 24Gx 1-1/4 นิ้ว (0.55 x 25 มิลลิเมตร) เติมน้ำป้องกันการแข็งตัวของเลือด ปริมาณ 0.1 มิลลิลิตร หลังจากเก็บเลือดแล้วทำการถอดเข็มออก หยดเลือดลงบนแผ่นสไลด์จำนวน 1 หยด ทำการสเมียร์เลือดบนแผ่นสไลด์ ส่วนเลือดที่เหลือใส่ลงในหลอดที่มีสารป้องกันการแข็งตัวของเลือด (1% EDTA) จำนวน 5 หยด ผสมเลือดและสารละลาย 1% EDTA ให้เข้ากัน เก็บเลือดที่ได้นำไปวิเคราะห์ค่าโลหิตวิทยาต่าง ๆ ซึ่งประกอบด้วย ระดับฮีโมโกลบิน ค่าความเข้มข้นของเลือด ค่าเม็ดเลือดแดงและเม็ดเลือดขาว และการตรวจจำแนกชนิดของเม็ดเลือดขาว ตามวิธีการของ Thanomsit *et al.* (2020)

การศึกษาภาวะเครียดออกซิเดชัน

การศึกษาภาวะเครียดออกซิเดชัน (Oxidative stress analysis) ในปลานิลที่ได้รับสัมผัสสารกำจัดวัชพืช 2,4-D-ไดเมทิลแอมโมเนียม โดยวัดกิจกรรมของเอนไซม์ต้านอนุมูลอิสระ 3 ชนิด ได้แก่ เอนไซม์ซูเปอร์ออกไซด์ ดิสมิวเตส (Superoxide dismutase; SOD), คีตาเลส (Catalase; CAT) และกลูตาไธโอน เอส-ทรานส์เฟอเรส (Glutathione S-transferase; GST) โดยการวัดกิจกรรมของเอนไซม์จากการสกัดเนื้อเยื่อเหงือกของปลาตามวิธีการของ Thanomsit *et al.* (2025)

การเปลี่ยนแปลงของเนื้อเยื่อ

การศึกษาการเปลี่ยนแปลงของเนื้อเยื่อในปลานิลแบ่งออกเป็นขั้นตอนการเก็บเนื้อเยื่อ และขั้นตอนการเตรียมเนื้อเยื่อ เพื่อศึกษา ซึ่งขั้นตอนการเก็บเนื้อเยื่อ ทำได้โดยเก็บตัวอย่างปลานิลกลุ่มละ 3 ตัว จากกลุ่มควบคุมก่อนได้รับสาร (0 ชั่วโมง) และกลุ่มทดลองที่ได้รับสัมผัสสารกำจัดวัชพืช 2,4-D-ไดเมทิลแอมโมเนียม ในระดับที่ไม่ก่อให้เกิดการตาย (1/10 ของค่า LC_{50} ที่เวลา 96 ชั่วโมง) เป็นเวลา 0, 24, 48, 72, และ 96 ชั่วโมง โดยทำการสลบปลาด้วยน้ำแข็ง ฆ่าปลาเพื่อเก็บตัวอย่างเนื้อเยื่อเหงือก ตับ ลำไส้ และกระเพาะอาหารของปลานิลบนถาดน้ำแข็ง นำชิ้นเนื้อเยื่อมาตัดแบ่งให้มีขนาดเหมาะสมและแช่ในสารละลาย 10% Phosphate buffer formalin เพื่อคงสภาพ เป็นเวลา 24 ชั่วโมง เก็บที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

ขั้นตอนการเตรียมเนื้อเยื่อ นำเนื้อเยื่อที่เก็บรักษาใน 10 % Phosphate buffer formalin ตัดให้มีขนาดประมาณ 3-4 มิลลิเมตร เพื่อสามารถบรรจุลงในตลับ (Cassette) จากนั้นนำเนื้อเยื่อไปผ่านกระบวนการดองน้ำออก (Dehydration) ด้วยแอลกอฮอล์ นำเนื้อเยื่อที่ผ่านกระบวนการแล้วมาฝังในบล็อกพาราฟินเหลว (Paraffin wax) และนำบล็อกแช่เย็นเพื่อให้พาราฟินแข็งตัว ใช้เครื่องตัดเนื้อเยื่อ (Microtome) ตัดบล็อกพาราฟินให้ได้แผ่นบางขนาด 4 ไมครอน และนำไปลอยบนน้ำอุ่นที่อุณหภูมิ 45-50 องศาเซลเซียส ก่อนแปะลงบนแผ่นสไลด์ แล้วนำไปอบที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส เพื่อให้ตัวอย่างยึดติดแผ่นสไลด์ได้ดี จากนั้นนำสไลด์ไปล้างพาราฟินออก (Deparaffinization) และย้อมสีเพื่อให้เห็นโครงสร้างต่าง ๆ ด้วยสีฮีมาทอกซิลิน (Hematoxylin) และอีโอซิน (Eosin)

การศึกษารูปแบบของโปรตีน และการแสดงออกของอะซิติลโคลีนเอสเตอเรส

การเก็บตัวอย่างเนื้อเยื่อเพื่อศึกษารูปแบบของโปรตีนและการแสดงออกของอะซิติลโคลีนเอสเตอเรส ดัดแปลงจากวิธีการของ Khanchanasal *et al.* (2022) โดยเก็บเนื้อเยื่อส่วนกล้ามเนื้อของปลานิลมาใส่ในฟอสเฟตบัฟเฟอร์ที่มี PMSF 0.1 มิลลิวรีเพื่อรักษาสภาพ ใช้ Homogenizer สกัดเนื้อเยื่อ แล้วนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 5,000 rpm เป็นเวลา 60 นาที ใช้หลอดไมโครทิวป์ที่เคลือบด้วย 10% PMSF เก็บสารส่วนใสด้านบนเพื่อใช้ในการศึกษาโปรตีนต่อไป โดยนำไปวัดปริมาณโปรตีนตามวิธีการของ Cantawon *et al.* (2024)

การศึกษารูปแบบของโปรตีนจากปลานิล ใช้เทคนิค SDS-PAGE และ Western blot โดยนำตัวอย่างที่ทราบปริมาณโปรตีนมาเจือจางให้มีความเข้มข้น 4-8 ไมโครกรัม/ไมโครลิตร ด้วย PBS (pH 7.2) ผสมกับสารละลายตัวอย่าง (2x Buffer) แล้วนำมาแยกโปรตีนโดยใช้กระแสไฟฟ้าด้วยเครื่อง miniPROTEIN® Tetra Cell กระแสไฟฟ้า 110 โวลต์ โดยใช้ Separating gel 10% และ Stacking gel 4% นำแผ่นเจลออกจากชุดกระจกเมื่อสังเกตว่าสีของ Bromophenol blue เคลื่อนที่ถึงส่วนล่างของเจล นำไปย้อมโปรตีน ด้วยสี 0.1% Coomassie brilliant blue R-250 และล้างออกด้วย Destaining solution บันทึกผลแถบโปรตีนที่พบเปรียบเทียบกับโปรตีนมาตรฐานที่ทราบขนาดโมเลกุล (Pre-Stained protein ladder, Cleaver Scientific, Thailand) ส่วนเจลที่ศึกษาการแสดงออกของอะซิติลโคลีนเอสเตอเรส ใช้เทคนิค Western blot โดยนำแผ่นเจลที่ผ่านการแยกโปรตีนด้วยเทคนิค SDS-PAGE และยังไม่ย้อมสี ย้ายโปรตีนจากแผ่นเจลลงกระดาษไนโตรเซลลูโลส ด้วยเทคนิค Semi-dry transfer นำแผ่นเมมเบรนแช่ในนมพว่องมันเนย 5% ใน PBS แล้วนำเมมเบรนออกแช่ในโพลีโคลนอลแอนติบอดีที่จำเพาะต่ออะซิติลโคลีนเอสเตอเรส (PAb-AChE) เจือจาง 1:200 เป็นเวลา 12 ชั่วโมง ล้างแอนติบอดีส่วนเกินด้วยสารละลาย 0.5% Blotto ปั่นในแอนติบอดีตัวที่สองคือ GAR-HRP เป็นเวลา 3 ชั่วโมง ล้างแอนติบอดีส่วนเกิน และนำออกแช่ในสารละลายซับสเตรทคือ 0.03% DAB, 0.006% H₂O₂, 0.05% CoCl₂ เป็นเวลา 3 นาที ล้างด้วยน้ำหลาย ๆ ครั้ง ตรวจสอบแถบโปรตีนที่ให้ผลบวกกับแอนติบอดี คำนวณหาความหนาแน่นโมเลกุลโดยเทียบกับโปรตีนมาตรฐาน

การวิเคราะห์ทางสถิติ

ผลการทดลองที่เป็นข้อมูลเชิงปริมาณ ได้แก่ อัตราการตายสะสม การศึกษาการเปลี่ยนแปลงของเม็ดเลือด การศึกษาการทำงานของเอนไซม์ CAT, SOD และ GST ปริมาณโปรตีนรวมในกล้ามเนื้อและกิจกรรมของเอนไซม์อะซิติลโคลีน

เอสเทอเรสใช้การวิเคราะห์ความแปรปรวนแบบ One-Way ANOVA ที่ระดับความเชื่อมั่น 95% และเปรียบเทียบความแตกต่างระหว่างกลุ่มด้วยวิธี Duncan's Multiple Range Test (DMRT) โดยใช้โปรแกรม SAS University edition

Results

การศึกษาอัตราการตายสะสม (%) และ Lethal concentration

การศึกษ้อัตราการตายสะสมของปลานิลที่ได้รับสัมผัสกับสารกำจัดวัชพืช 2,4-D-ไดเมทิลแอมโมเนียม พบว่าอัตราการตายสะสมเพิ่มขึ้นตามความเข้มข้นและระยะเวลาที่ปลาได้รับสาร โดยพบอัตราการตายสะสมที่ 24 ชั่วโมง ร้อยละ 10.00 ± 0.00 ถึง 36.67 ± 5.77 และพบอัตราการตายสะสมสูงสุดในเวลา 96 ชั่วโมง ที่ความเข้มข้น 67.20 มิลลิกรัม/ลิตร พบอัตราการตายสะสมเท่ากับร้อยละ 50.00 ± 0.00 ในขณะที่ชุดควบคุมที่ไม่ได้รับสารไม่พบการตายตลอดระยะเวลาที่ทำการทดลองคือ 96 ชั่วโมง (Figure 1) โดยค่า LC_{50} ที่เวลา 24, 48, 72 และ 96 ชั่วโมง เท่ากับ 105.54, 91.70, 80.25 และ 78.94 มิลลิกรัม/ลิตร ตามลำดับ

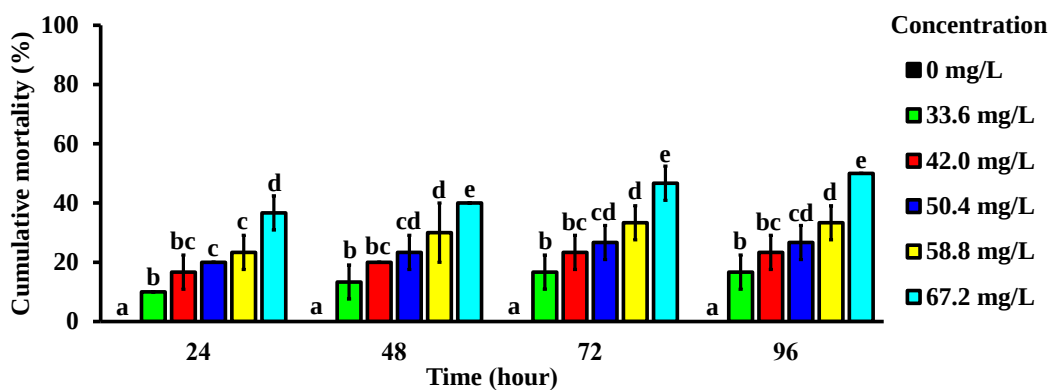


Figure 1 Cumulative mortality rate of Nile tilapia exposed to 2,4-D-dimethylammonium at 24, 48, 72, and 96 hours

การศึกษาลักษณะสัณฐานวิทยา

การศึกษการเปลี่ยนแปลงสัณฐานวิทยาของปลานิลเมื่อได้รับสัมผัสสารกำจัดวัชพืช 2,4-D-ไดเมทิลแอมโมเนียม ในระดับที่ไม่ก่อการตายคือ 7.89 มิลลิกรัม/ลิตร แสดงดัง Figure 2 โดยพบการเปลี่ยนแปลงลักษณะสัณฐานวิทยามากขึ้นตามระยะเวลาที่ได้รับสัมผัส โดยเมื่อได้รับสารเป็นเวลา 7 วัน ปลาจะเริ่มมีความผิดปกติเล็กน้อยที่บริเวณลำตัวมีสีซีดลง ซึ่งเป็นอาการเริ่มต้นของ การตายของเนื้อเยื่อ (Necrosis) และพบอาการครีบก้อนเล็กน้อย จากนั้นเมื่อเวลา 14 วัน พบความผิดปกติเพิ่มขึ้น คือ บริเวณเนื้อเยื่อครีบก้อนทำลายมากขึ้น ผิวหนังซีดบางจุด เนื้อเยื่อโคนครีบบวม และมีจำเลือดบริเวณครีบท้องและครีบกอก ส่วนที่เวลา 21 วันพบว่าเนื้อเยื่อครีบก้อนทำลายมากขึ้นในหลายส่วน ทั้งครีบท้อง ครีบกางและครีบท้อง การบวมของเนื้อเยื่อเพิ่มขึ้น เกิดหลุด และเนื้อเยื่อรอบครีบก้อนแสดงการขยายตัวมากขึ้น ส่วนที่เวลา 28 วัน พบการเสื่อมสภาพของเนื้อเยื่ออย่างรุนแรง ครีบท้องกรอบ เปื่อย ครีบท้องแห้ง เกิดรอบตัวซีด มีจำเลือดบริเวณลำตัว

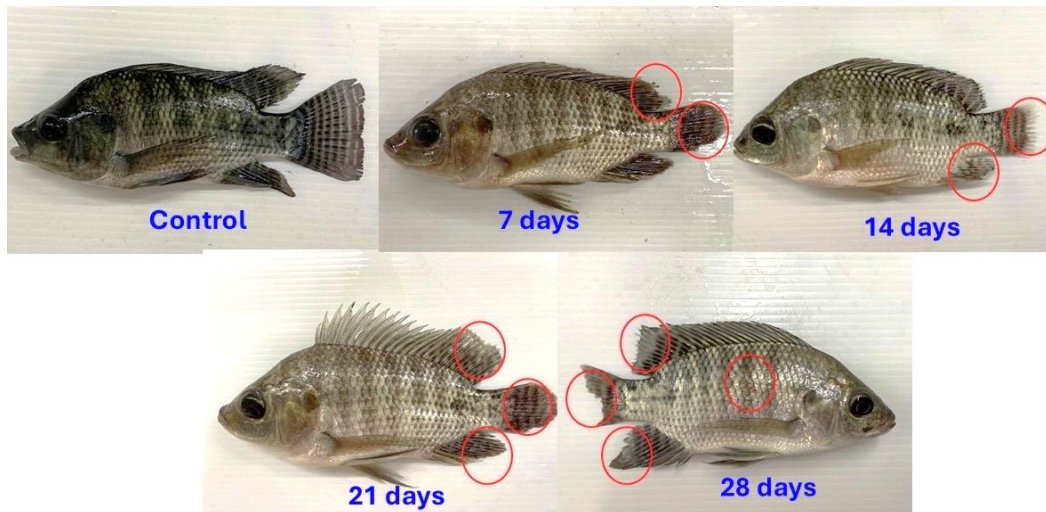


Figure 2 Morphology studied in Nile tilapia exposed to 2,4-D-dimethylammonium at 0, 7, 14, 21, and 28 days

การเปลี่ยนแปลงของเม็ดเลือด

การศึกษาการเปลี่ยนแปลงของเม็ดเลือดในปลานิลที่ได้รับสาร 2,4-D-ไดเมทิลแอมโมเนียม ในระดับที่ไม่ให้ก่อให้เกิดการตาย (7.89 มิลลิกรัม/ลิตร) พบว่าค่าความเข้มข้นของเลือด และปริมาณเม็ดเลือดขาวชนิด Eosinophil ในปลาที่ได้รับสารตั้งแต่เวลา 14, 21 และ 28 วัน แตกต่างจากชุดควบคุมอย่างมีนัยสำคัญ ($p < 0.05$) โดยมีแนวโน้มลดลงเมื่อได้รับสารเป็นเวลานานขึ้น ซึ่งค่าความเข้มข้นของเลือดในชุดควบคุมเท่ากับ $31.65 \pm 0.64\%$ ในปลาที่ได้รับสารตั้งแต่เวลา 14, 21 และ 28 วัน มีค่า $30.55 \pm 0.21\%$, $29.90 \pm 0.28\%$ และ $29.40 \pm 0.14\%$ ตามลำดับ และปริมาณเม็ดเลือดขาวชนิด Eosinophil ในชุดควบคุมมีค่าเท่ากับ 3.12 ± 0.01 เซลล์/100 เซลล์ ส่วนในปลาที่ได้รับสารตั้งแต่เวลา 14, 21 และ 28 วัน เท่ากับ 3.00 ± 0.02 , 2.88 ± 0.01 และ 2.72 ± 0.07 เซลล์/100 เซลล์ ตามลำดับ ส่วนค่าฮีโมโกลบิน ปริมาณเม็ดเลือดแดง และเม็ดเลือดขาวชนิดอื่น ๆ ไม่แตกต่างจากชุดควบคุมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (Table 1)

การทำงานของเอนไซม์ในภาวะเครียดออกซิเดชัน

การศึกษาการทำงานของเอนไซม์ CAT, SOD และ GST ในปลานิลที่ได้รับสาร 2,4-D-ไดเมทิลแอมโมเนียม ความเข้มข้น 7.89 มิลลิกรัม/ลิตร ที่เวลา 0, 7, 14, 21 และ 28 วัน พบว่ากิจกรรมของเอนไซม์ทั้ง 3 ชนิดเพิ่มขึ้นเมื่อได้รับสาร 2,4-D-ไดเมทิลแอมโมเนียม เป็นเวลานานขึ้น โดยกิจกรรมของเอนไซม์ CAT และ GST ที่ได้รับสารเป็นเวลา 7, 14, 21 และ 28 วัน แตกต่างจากชุดควบคุมก่อนได้รับสารอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) โดยมีค่าเฉลี่ยเท่ากับ 0.58, 0.69, 0.91 และ 1.19 ยูนิต/มิลลิกรัมโปรตีน และกิจกรรมของเอนไซม์ GST เท่ากับ 0.79, 1.06, 1.37 และ 1.60 ไมโครโมล/นาที่/กรัม ตามลำดับ ส่วนกิจกรรมของเอนไซม์ SOD พบความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) เมื่อเทียบกับชุดควบคุมในปลาที่ได้รับสารตั้งแต่เวลา 14, 21 และ 28 วัน โดยมีค่าเท่ากับ 0.83, 0.92 และ 1.13 ยูนิต/มิลลิกรัมโปรตีน ตามลำดับ (Figure 3)

Table 1 Abnormalities percentage of the blood cells in Nile tilapia exposed to 2,4-D-dimethylammonium at sublethal concentration at 0, 7, 14, 21, and 28 days

Times	Hematology				Differential (count /100 cells)			
	Hb ^{ns} (gm%)	PCV (%)	Rbc ^{ns} (10 ⁶ /mm)	Wbc ^{ns} (10 ³ /mm)	Neu ^{ns} (Seg)	Lymph ^{ns}	Mono. ^{ns}	Eos. ^{ns}
Control	13.05 ±0.35	31.65 ±0.64 ^a	2.61 ±0.04	47.89 ±0.93	13.99 ±0.60	76.95 ±1.03	13.22 ±0.01	3.12 ±0.01 ^a
7 days	12.80 ±0.42	31.15 ±0.07 ^{ab}	2.60 ±0.04	47.38 ±0.38	13.80 ±0.57	76.67 ±0.79	13.13 ±0.11	3.11 ±0.01 ^a
14 days	12.55 ±0.64	30.55 ±0.21 ^{bc}	1.58 ±0.04	47.16 ±0.06	13.64 ±0.33	76.35 ±0.45	13.00 ±0.02	3.00 ±0.02 ^b
21 days	12.40 ±0.42	29.90 ±0.28 ^{cd}	2.57 ±0.05	46.78 ±0.46	13.16 ±0.07	75.79 ±0.32	12.27 ±1.03	2.88 ±0.01 ^c
28 days	11.70 ±0.28	29.40 ±0.14 ^d	2.55 ±0.06	46.59 ±0.27	13.00 ±0.02	74.62 ±0.55	11.40 ±0.54	2.72 ±0.07 ^d
p-value	0.153	0.006	0.699	0.229	0.201	0.092	0.068	<0.001

Note: Different letters above bars indicate statistically significant differences between groups at each time point ($p < 0.05$)

^{ns} indicates no significant difference among treatments at the 95% confidence level ($p \geq 0.05$)

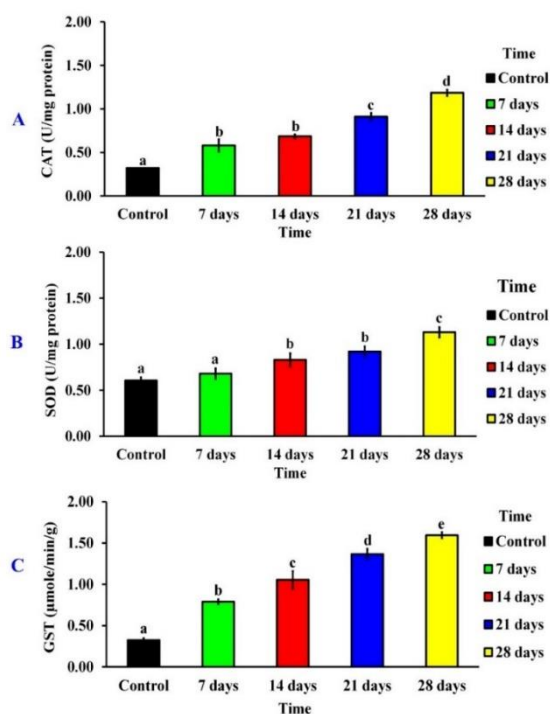


Figure 3 Oxidative stress analysis of CAT, SOD, and GST activity at 0, 7, 14, 21, and 28 days

Note: Different letters above bars indicate statistically significant differences between groups at each time point ($p < 0.05$)

การเปลี่ยนแปลงเนื้อเยื่อ

การเปลี่ยนแปลงเนื้อเยื่อของปลานิลเมื่อได้รับสัมผัสสารกำจัดวัชพืช 2,4-D-ไดเมทิลแอมโมเนียม ความเข้มข้น 7.89 มิลลิกรัม/ลิตร ตั้งแต่วันที่ 7, 14, 21 และ 28 เปรียบเทียบกับก่อนได้รับสาร (0 วัน) พบการเปลี่ยนแปลงของเนื้อเยื่อรุนแรงตามระยะเวลาที่ได้รับสาร ซึ่งพบการเปลี่ยนแปลงในเนื้อเยื่อเหงือกของปลาตั้งแต่วันที่ 7 ของการทดลอง โดยพบการเพิ่มจำนวนของเซลล์เยื่อ (Hyperplasia) และในวันที่ 14 เกิดการคั่งของเลือด (Blood congestion) บริเวณเหงือก ส่วนวันที่ 21 และ 28 พบการโป่งพองของหลอดเลือด (Lamellar aneurism) การเชื่อมประสานของแผ่นเหงือก (Fusion of lamellae) รวมถึงการเพิ่มจำนวนของเซลล์เยื่อแผ่นเหงือก (Lamellar epithelial hyperplasia) ในเนื้อเยื่อตับพบการเกิดช่องว่างในไซโตพลาซึมของเซลล์ตับ (Vacuolation) ต่อเนื่องตั้งแต่วันที่ 7-28 หลังได้รับสาร ส่วนในลำไส้พบการเปลี่ยนแปลงในวันที่ 14 โดยเกิดบาดแผลและรอยโรคของไมโครวิลไล (Wound and lesion of microvilli) และการบวมของไมโครวิลไล (Swelling of microvilli) ในขณะที่เนื้อเยื่อกระเพาะอาหารพบการตอบสนองตั้งแต่วันที่ 7 หลังได้รับสัมผัสสาร โดยเกิดการสึกกร่อนของเยื่อผิว (Epithelial erosion) และพัฒนาไปสู่บาดแผลและรอยโรคของเซลล์สร้างเมือก (Wound and lesion of mucous cells) ในวันที่ 14 และมีการเชื่อมประสานของเซลล์สร้างเมือก (Fusion of mucous-secreting cells) ในวันที่ 21 (Figure 4)

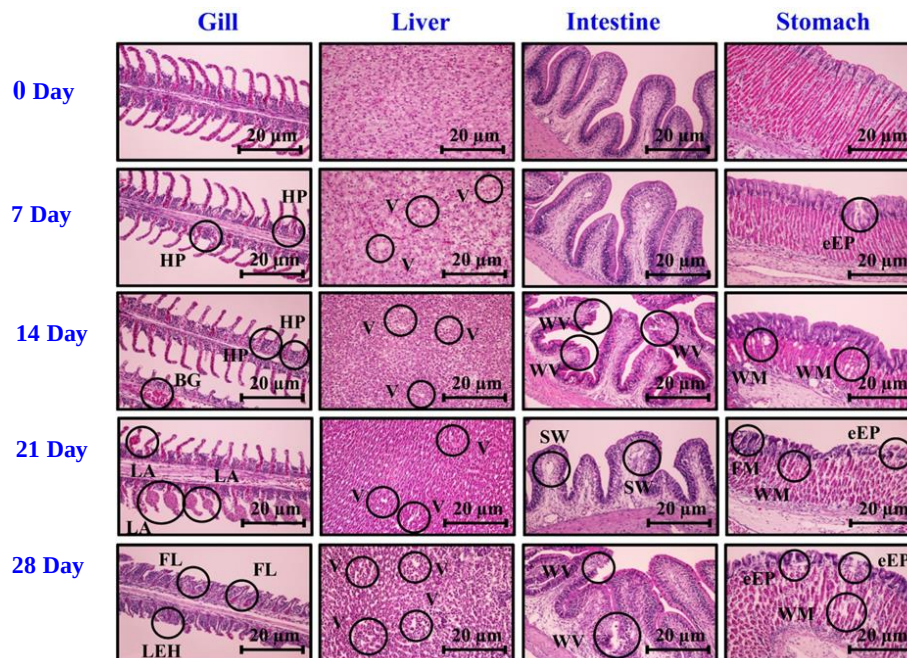


Figure 4 Histological alterations of the gill, liver, intestine, and stomach of Nile tilapia exposed to 2,4-D-dimethylammonium for 7, 14, 21, and 28 days.

Note: LA; Lamellar aneurism, V; vacuolation, FL; Fusion of lamellar, BG; Blood congestion, HP; Hyperplasia, LEH; Lamellar epithelial hyperplasia, WV; Wound and lesion of microvilli, SW; Swelling of microvilli, WM; Wound and lesion of mucous, FM; Fusion of mucous secreting, eEP; Epithelial erosion

การตอบสนองของโปรตีนและกิจกรรมของเอนไซม์อะซิติลโคลีนเอสเทอเรส

การศึกษาการตอบสนองของโปรตีนรวมในกล้ามเนื้อปลาหลังได้รับสาร 2,4-D-ไดเมทิลแอมโมเนียม ตั้งแต่วันที่ 7, 14, 21 และ 28 ที่ความเข้มข้น 7.89 มิลลิกรัม/ลิตร พบว่าปริมาณโปรตีนรวมและกิจกรรมของเอนไซม์อะซิติลโคลีนเอสเทอเรสในปลาที่ได้รับสาร 2,4-D-ไดเมทิลแอมโมเนียม มีแนวโน้มลดลง เมื่อเปรียบเทียบกับปลาชุดควบคุมพบความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) ในปลาที่ได้รับสารตั้งแต่วันที่ 14 โดยปลาชุดควบคุมก่อนได้รับสารมีโปรตีนรวมเท่ากับ 22.17 ± 0.40 มิลลิกรัม/มิลลิกรัม และกิจกรรมของเอนไซม์อะซิติลโคลีนเอสเทอเรสเท่ากับ 12.79 ± 0.32 นาโนโมล/มิลลิกรัม/นาที่ ส่วนในวันที่ 14 หลังได้รับสาร 2,4-D-ไดเมทิลแอมโมเนียม พบโปรตีนรวมเท่ากับ 20.90 ± 0.16 มิลลิกรัม/มิลลิกรัม และกิจกรรมของเอนไซม์อะซิติลโคลีนเอสเทอเรสเท่ากับ 11.17 ± 0.40 นาโนโมล/มิลลิกรัม/นาที่ (Figure 5) ซึ่งอะซิติลโคลีนเอสเทอเรสที่พบในกล้ามเนื้อของปลามีขนาดโปรตีนเท่ากับ 71 kDa (Figure 6)

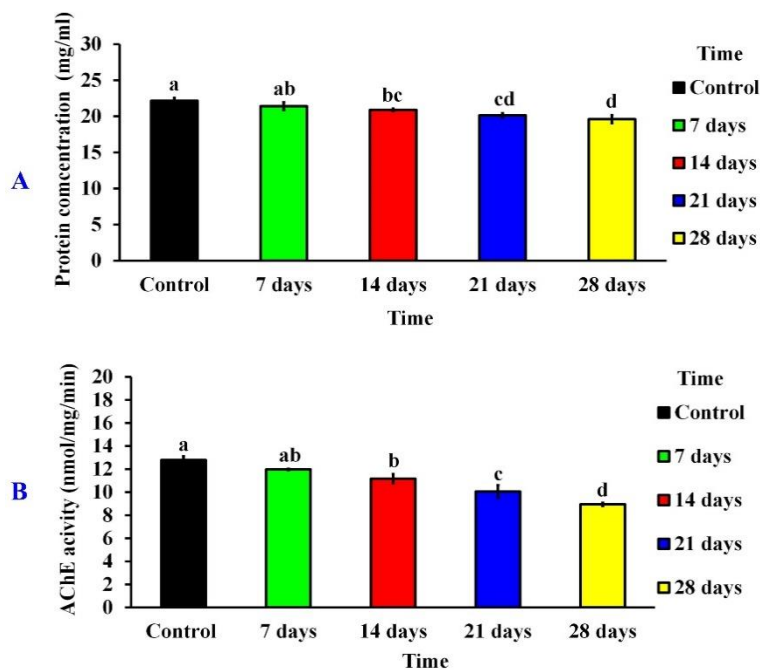


Figure 5 Total protein concentration and AChE activity of the Nile tilapia exposed to sublethal concentration of 2,4-D-dimethylammonium for 0, 7, 14, 21, and 28 days

Note: Different letters above bars indicate statistically significant differences between groups at each time point ($p < 0.05$)

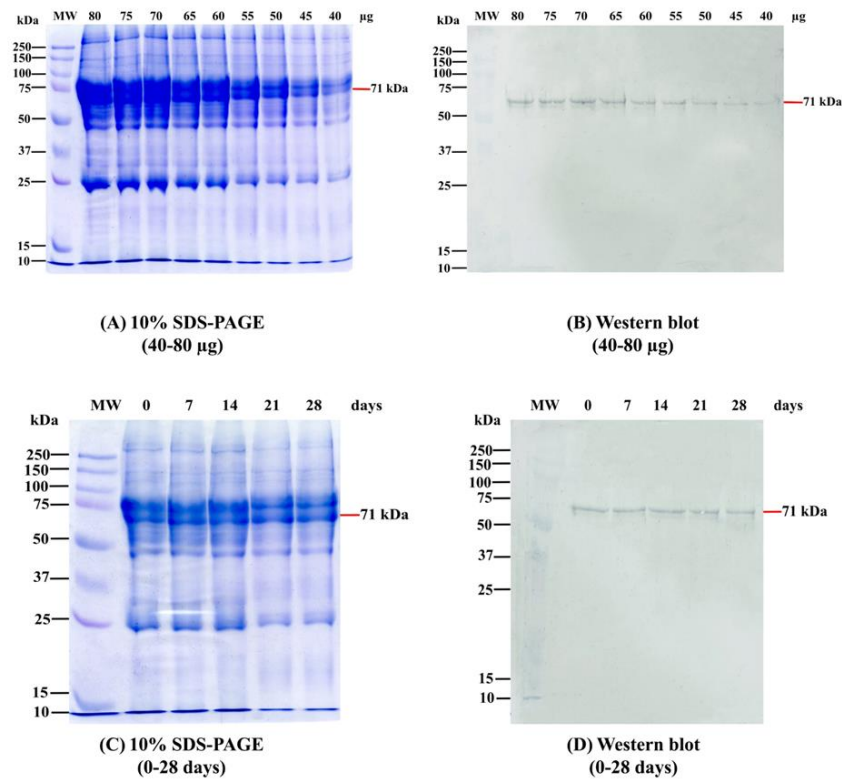


Figure 6 SDS-PAGE and Western blot analyses. (A) 10% SDS-PAGE analysis of protein extracts (40–80 µg). (B) Western blot analysis demonstrating the specificity of the PAb-AChE antibody (1:50 dilution). (C) 10% SDS-PAGE analysis of protein extracts from Nile tilapia exposed to a sublethal concentration of 2,4-D dimethylammonium for 0, 7, 14, 21, and 28 days. (D) Western blot analysis of AChE protein extracted from Nile tilapia exposed to a sublethal concentration of 2,4-D dimethylammonium for 0, 7, 14, 21, and 28 days.

Discussion

การตกค้างของสารเคมีในสิ่งแวดล้อมจากการเพิ่มปริมาณการใช้สารเคมีทางการเกษตรอย่างต่อเนื่อง ส่งผลกระทบต่อระบบนิเวศทางน้ำและสิ่งมีชีวิต ซึ่งอาจเกิดการสะสมสารพิษผ่านห่วงโซ่อาหารและนำไปสู่การสะสมสารพิษและก่ออันตรายแก่ผู้บริโภคตามลำดับขั้นห่วงโซ่อาหาร ปลาไนล์เป็นแหล่งโปรตีนสำคัญที่ประชาชนให้ความนิยมบริโภคและพบได้ในแหล่งน้ำจืดทั่วทุกภาคในประเทศไทย จึงเหมาะกับการนำมาใช้เป็นส่วนชีวิตที่เป็นตัวชี้วัดการปนเปื้อนของสารกำจัดศัตรูพืชในสิ่งแวดล้อมทางน้ำได้ดี

การศึกษาอัตราการตายสะสมของปลานิลที่ได้รับสัมผัสกับสารกำจัดวัชพืช 2,4-D-ไดเมทิลแอมโมเนียมที่ความเข้มข้นต่าง ๆ กัน เป็นเวลา 24-96 ชั่วโมง พบว่าอัตราการตายสะสมเพิ่มขึ้นตามระดับความเข้มข้นและระยะเวลาที่ได้รับสาร โดยการศึกษาครั้งนี้พบอัตราการตายสูงสุดในปลาที่ได้รับสารความเข้มข้น 67.20 มิลลิกรัม/ลิตร ซึ่งพบอัตราการตายสะสมเท่ากับร้อยละ 50.00 ในเวลา 96 ชั่วโมง ในขณะที่การศึกษาของ Khanchanasal *et al.* (2022) พบว่าอัตราการตายของปลานิลที่ได้รับสาร 2,4-D-ไดเมทิลแอมโมเนียมที่ระดับความเข้มข้น 50 ไมโครลิตร/ลิตร เป็นเวลา 96 ชั่วโมง มีอัตราการตายสะสมเท่ากับร้อยละ 76.67 ซึ่งมีอัตราการตายสูงกว่าการวิจัยในครั้งนี้ ส่วนในปลาตะเพียนที่ได้รับสาร 2,4-D-ไดเมทิลแอมโมเนียม ความเข้มข้น 67.20 มิลลิกรัม/ลิตร พบอัตราการตายร้อยละ 50.00 ที่เวลา 96 ชั่วโมง ในขณะที่การศึกษาในปลาอุก Hybrid catfish ที่ได้รับสาร 2,4-D-ไดเมทิลแอมโมเนียมความเข้มข้น 420 มิลลิกรัม/ลิตรเป็นเวลา 96 ชั่วโมง มีอัตราการตายร้อยละ 60.00 ส่วนปลาที่ได้รับสารความเข้มข้น 84 มิลลิกรัม/ลิตร พบอัตราการตายร้อยละ 20.00 แสดงให้เห็นว่าปลาแต่ละชนิดมีความทนต่อการได้รับสาร 2,4-D-ไดเมทิลแอมโมเนียมในระดับแตกต่างกัน (Kumla *et al.*, 2025; Thanomsit *et al.*, 2025) ซึ่งผลการศึกษานี้ชี้ให้เห็นว่าปลานิลมีความทนต่อสาร 2,4-D-ไดเมทิลแอมโมเนียมได้น้อยกว่าปลาอุก จึงสามารถนำมาใช้ประเมินเบื้องต้นถึงผลของการรับสัมผัสสาร 2,4-D-ไดเมทิลแอมโมเนียมในสัตว์น้ำได้

ผลการหาค่า LC_{50} ในปลานิลที่ได้รับสาร 2,4-D-ไดเมทิลแอมโมเนียมที่เวลา 24, 48, 72 และ 96 ชั่วโมง จากการศึกษานี้มีค่าเท่ากับ 105.54, 91.70, 80.25 และ 78.94 มิลลิกรัม/ลิตร ตามลำดับ ในขณะที่การศึกษาค่า LC_{50} ของ Khanchanasal *et al.* (2022) ที่ศึกษาในปลานิลที่ได้รับสาร 2,4-D-ไดเมทิลแอมโมเนียมที่เวลา 24, 48, 72 และ 96 ชั่วโมง LC_{50} มีค่าเท่ากับ 51.25, 45.23, 41.08 และ 37.42 ไมโครลิตร/ลิตร หรือคิดเป็น 43.05, 38.00, 34.51 และ 31.43 มิลลิกรัม/ลิตร ตามลำดับ ซึ่งความแตกต่างของค่า LC_{50} ในปลาชนิดเดียวกันอาจเกิดจากรูปแบบของสารที่ใช้ อายุ และชนิดของปลา (Khanchanasal *et al.*, 2022) ซึ่งค่า LC_{50} ในปลาแต่ละชนิดจะมีค่าแตกต่างกัน เช่น การศึกษาผลของสาร 2,4-D-ไดเมทิลแอมโมเนียม ในปลาอุก African Catfish (*Clarius gariepinus*) ที่ได้รับสาร 2,4-D-ไดเมทิลแอมโมเนียม เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ค่า LC_{50} เท่ากับ 360 มิลลิกรัม/ลิตร (Cheikyula *et al.*, 2019) ส่วนในปลาตะเพียนค่า LC_{50} ของ 2,4-D-ไดเมทิลแอมโมเนียม ที่เวลา 24, 48, 72, และ 96 ชั่วโมง เท่ากับ 140.76, 112.72, 81.87, และ 70.56 มิลลิกรัม/ลิตร (Thanomsit *et al.*, 2025)

การศึกษากการเปลี่ยนแปลงสัณฐานวิทยาของปลานิลเมื่อได้รับสัมผัสสารกำจัดวัชพืช 2,4-D-ไดเมทิลแอมโมเนียมในระดับที่ไม่ก่อการตาย (7.89 มิลลิกรัม/ลิตร) พบว่าปลาจะเริ่มมีความผิดปกติเล็กน้อย เมื่อได้รับสารเป็นเวลา 7 วัน โดยเริ่มจากที่ครีบทหางสีซีดลงซึ่งเป็นอาการเริ่มต้นของอาการเนื้อตายหรือ Necrosis เมื่อระยะเวลาผ่านไปจะพบอาการอื่น ๆ รุนแรงขึ้น เช่น เนื้อเยื่อครีบทถูกทำลาย ผิวหนังซีด มีจ้ำเลือด หางกร่อน เนื้อเยื่อโคนครีบทวม และเสียหายมากขึ้น เช่นเดียวกับการศึกษาของ Khanchanasal *et al.* (2022) ที่รายงานว่าลักษณะสัณฐานวิทยาของปลาที่ได้รับสัมผัสสารกำจัดวัชพืช 2,4-D-ไดเมทิลแอมโมเนียม ปริมาณ 5 ไมโครลิตร/ลิตร จะเปลี่ยนแปลงไปหลังสัมผัสสารเป็นเวลา 24 ชั่วโมง โดยพบการเกิดบาดแผลและจ้ำเลือด บริเวณแผ่นปิดเหงือก ซึ่งการเปลี่ยนแปลงจะเพิ่มขึ้นตามระดับความเข้มข้นและระยะเวลาที่ได้รับสัมผัส

การศึกษาค่าโลหิตวิทยาและการเปลี่ยนแปลงของเม็ดเลือดในปลานิลที่ได้รับสาร 2,4-D-ไดเมทิลแอมโมเนียมในระดับที่ไม่ให้ก่อให้เกิดการตายพบว่าค่าความเข้มข้นของเลือด และปริมาณเม็ดเลือดขาวชนิด Eosinophil ในปลาที่ได้รับสาร

ตั้งแต่วันที่ 14, 21 และ 28 วัน ลดลงอย่างมีนัยสำคัญ ในขณะที่การศึกษาในปลาดุก African Catfish ที่ได้รับสาร 2,4-D-ไดเมทิลแอมโมเนียม พบการเปลี่ยนแปลงในวันที่ 21 และ 28 หลังได้รับสัมผัสสาร โดยพบความแตกต่างของปริมาณเม็ดเลือดขาว เม็ดเลือดแดง ค่าฮีโมโกลบิน ค่าฮีมาโตคริต และความเข้มข้นของเลือด (Kumla *et al.*, 2025)

การศึกษาการเปลี่ยนแปลงเนื้อเยื่อของปลานิลเมื่อได้รับสัมผัสสารกำจัดวัชพืช 2,4-D-ไดเมทิลแอมโมเนียม พบว่าการเปลี่ยนแปลงของเนื้อเยื่อขึ้นอยู่กับระยะเวลาที่ได้รับสัมผัส โดยในเนื้อเยื่อเหงือกพบการเพิ่มจำนวนของเซลล์เยื่อ (Hyperplasia) การเกิดการคั่งของเลือด (Blood congestion) บริเวณซี่เหงือก และพบการโป่งพองของหลอดเลือด (Lamellar aneurism) การเชื่อมประสานของแผ่นเหงือก (Fusion of lamellae) และการเพิ่มจำนวนของเซลล์เยื่อแผ่นเหงือก (Lamellar epithelial hyperplasia) ซึ่งเป็นสัญญาณของการลดลงของพื้นที่ผิวสำหรับการแลกเปลี่ยนก๊าซของปลา ในขณะที่เนื้อเยื่อตับซึ่งเป็นอวัยวะสำคัญในการกำจัดสารพิษพบการเกิดช่องว่างในไซโตพลาซึมของเซลล์ตับ (Vacuolation) อย่างต่อเนื่อง ซึ่งแสดงถึงความผิดปกติของการทำงานและภาวะเครียดจากพิษของสารเคมี ส่วนในลำไส้พบเกิดบาดแผลและรอยโรคของไมโครวิลไล (Wound and lesion of microvilli) การบวมของไมโครวิลไล (Swelling of microvilli) ซึ่งส่งผลกระทบต่อความสามารถในการย่อยและดูดซึมสารอาหาร ในขณะที่การเปลี่ยนแปลงเนื้อเยื่อในกระเพาะอาหารพบการตอบสนองตั้งแต่ระยะต้น โดยเกิดการสึกกร่อนของเยื่อผิว (Epithelial erosion) และพัฒนาไปสู่บาดแผลและรอยโรคของมูกัส (Wound and lesion of mucous cells) การเชื่อมของเซลล์มูกัส (Fusion of mucous-secreting cells) ซึ่งแสดงถึงความเสียหายต่อการหลั่งเมือกที่มีบทบาทสำคัญในการป้องกันผนังกระเพาะอาหาร ซึ่งการเปลี่ยนแปลงในเนื้อเยื่อเหล่านี้ สอดคล้องกับการศึกษาในปลานิลและปลาชนิดอื่น ๆ เช่น การศึกษาของ Khanchanasal *et al.* (2022) พบการเปลี่ยนแปลงในเนื้อเยื่อเหงือกของปลานิลที่ได้รับสาร 2,4-D-ไดเมทิลแอมโมเนียมโดยพบเกิดอาการผิดปกติต่าง ๆ เช่น Hyperplasia, Epithelial lifting, Partial fusion of lamellae, Edema and lamellae, Disorganization และ Blood congestion ในเนื้อเยื่อเหงือก ซึ่งเป็นบริเวณที่ได้รับสัมผัสสารโดยตรง และเป็นบริเวณที่เกิดการแลกเปลี่ยนก๊าซเพื่อช่วยในการหายใจของปลานิล ส่วนการศึกษาในปลาดุก Hybrid catfish โดย Kumla *et al.* (2025) รายงานว่าการศึกษาการเปลี่ยนแปลงของเนื้อเยื่อสมองและเหงือกของปลาดุกพบการเสื่อมของเซลล์ประสาทและการเกิดช่องว่างในสมอง ในขณะที่เนื้อเยื่อเหงือกพบการหลอมรวมบางส่วนของแผ่นเหงือก การคั่งของเลือด การบวมน้ำ และการเพิ่มจำนวนเซลล์ ส่วนการศึกษาในปลาดุก African catfish พบการเปลี่ยนแปลงที่เกิดขึ้นในเนื้อเยื่อตับ ได้แก่ เนื้อเยื่อตาย การเกิดช่องว่าง การขยายตัวของเซลล์ตับ และภาวะเลือดคั่ง ส่วนในเหงือกพบการผิดปกติของ Gill filament มีเลือดคั่ง การสึกกร่อนของเซลล์เยื่อผิว การกร่อนและการหลุดตัวของแผ่นเหงือก ซึ่งการเปลี่ยนแปลงในเนื้อเยื่อที่พบเหล่านี้แสดงให้เห็นถึงระดับความเสียหายที่เพิ่มขึ้นตามความเข้มข้นของสาร 2,4-D-ไดเมทิลแอมโมเนียม (Cheikyula *et al.*, 2019)

การศึกษาการทำงานของเอนไซม์ CAT, SOD และ GST ซึ่งเป็นกลุ่มเอนไซม์ต้านอนุมูลอิสระทำหน้าที่ป้องกันเซลล์จากความเสียหายที่เกิดจากภาวะเครียดออกซิเดชัน พบการทำงานของเอนไซม์ทั้ง 3 ชนิดเพิ่มขึ้นเมื่อได้รับสาร 2,4-D-ไดเมทิลแอมโมเนียมเป็นเวลานานขึ้น ซึ่งการเพิ่มขึ้นตามระยะเวลาการได้รับสารเคมี ชี้ให้เห็นว่าสารเคมีที่ปลาได้รับก่อให้เกิดความเครียดออกซิเดชันสูงขึ้นตามเวลา ทั้งนี้อาจเนื่องมาจากการได้รับสารกำจัดวัชพืช 2,4-D-ไดเมทิลแอมโมเนียม กระตุ้นให้เกิดการสร้าง Reactive Oxygen Species (ROS) ภายในเซลล์ ปลาจึงตอบสนองต่อภาวะ Oxidative stress โดย SOD ซึ่ง

ทำหน้าที่เปลี่ยน Superoxide radicals ให้กลายเป็น ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ ส่วน CAT ทำหน้าที่สลายไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ที่เกิดจาก SOD ให้เปลี่ยนเป็นน้ำและออกซิเจนที่ไม่เป็นอันตรายต่อเซลล์ ในขณะที่ GST เป็นเอนไซม์ที่ทำหน้าที่ขจัดสารพิษโดยใช้ Glutathione เพื่อจับกับสารแปลกปลอมหรือผลิตภัณฑ์ที่เกิดจากความเครียดออกซิเดชัน ทำให้สารพิษละลายน้ำได้ดีขึ้นและถูกขับออกจากเซลล์ (Pan *et al.*, 2016) โดยการศึกษาภาวะเครียดออกซิเดชันในปลาตะเพียนที่ได้รับสาร 2,4-D-ไดเมทิลแอมโมเนียมพบการเพิ่มขึ้นของกิจกรรมของเอนไซม์ CAT, SOD และ GST เช่นเดียวกัน ซึ่งสารต้านอนุมูลอิสระเป็นตัวชี้วัดเบื้องต้นที่สำคัญในสิ่งมีชีวิต เนื่องจากแสดงถึงกลไกความเป็นพิษของสารพิษต่อสิ่งมีชีวิต สามารถใช้เป็นตัวชี้วัดทางชีวภาพในการเฝ้าระวังผลกระทบจากสารพิษในสัตว์น้ำได้ (Thanomsit *et al.*, 2025) อย่างไรก็ตามผลของภาวะเครียดออกซิเดชันอาจต่างกันไปในปลาแต่ละชนิด เช่น การศึกษาผลกระทบของ 2,4-D-ไดเมทิลแอมโมเนียมต่อปลาตุ๊กแกฟิกันพบว่าระดับความเข้มข้นของสารที่ก่อให้เกิดพิษเฉียบพลันส่งผลต่อการเปลี่ยนแปลงอย่างมีนัยสำคัญในกิจกรรมของเอนไซม์ในตับ โดยเฉพาะอย่างยิ่ง SOD และ CAT ที่ความเข้มข้น 1.36-1.60 มิลลิกรัม/ลิตร ในขณะที่ความเข้มข้นต่ำกว่าระดับที่ทำให้ปลาตายไม่แสดงการเปลี่ยนแปลงอย่างมีนัยสำคัญ (Hamisu *et al.*, 2024)

การศึกษาค้นคว้าของปริมาณโปรตีนในกล้ามเนื้อปลาหลังได้รับสาร 2,4-D-ไดเมทิลแอมโมเนียม ตั้งแต่ 7, 14, 21 และ 28 วัน พบว่าปริมาณโปรตีนรวมและกิจกรรมของเอนไซม์อะซีติลโคลีนเอสเทอเรสของปลาที่ได้รับสารต่ำกว่าปลาชุดควบคุมที่ไม่ได้รับสาร และกิจกรรมของเอนไซม์อะซีติลโคลีนเอสเทอเรสมีค่าลดลงตามระยะเวลาที่ได้รับสาร เช่นเดียวกับการแสดงออกของโปรตีนเมื่อตรวจสอบด้วยเทคนิค SDS-PAGE และ Western blot พบการแสดงออกของอะซีติลโคลีนเอสเทอเรสลดลงตามระยะเวลาที่ได้รับ เช่นเดียวกับการศึกษาของ Khanchanasal *et al.* (2022) ที่ศึกษาการแสดงออกของอะซีติลโคลีนเอสเทอเรสในปลานิลที่ได้รับสาร 2,4-D-ไดเมทิลแอมโมเนียมจากเนื้อเยื่อสมอง หัวใจ และกล้ามเนื้อ พบว่าแนวโน้มของอะซีติลโคลีนเอสเทอเรสจะลดลงในทุกเนื้อเยื่อที่ทำการศึกษาเมื่อได้รับสัมผัสสารเป็นเวลานานขึ้น ซึ่งมีรายงานว่าการยับยั้งกิจกรรมของเอนไซม์อะซีติลโคลีนเอสเทอเรสในเนื้อเยื่อสมองสามารถตรวจพบได้ในปลาที่ได้รับสัมผัสสารกำจัดศัตรูพืชกลุ่มออร์กาโนฟอสเฟตที่ระดับความเข้มข้นต่ำกว่าระดับที่ก่อให้เกิดการตาย ซึ่งให้ถึงความไวของระบบประสาทต่อการได้รับสารพิษ และสนับสนุนการใช้เอนไซม์อะซีติลโคลีนเอสเทอเรสเป็นตัวชี้วัดทางชีวภาพสำหรับการประเมินผลกระทบจากสารกำจัดศัตรูพืชในสัตว์น้ำตั้งแต่ระยะเริ่มต้นของการได้รับสัมผัสสาร (Fulton & Key, 2001) โดยอะซีติลโคลีนเอสเทอเรสที่พบในปลานิลมีน้ำหนักโมเลกุล 71 kDa ซึ่งใกล้เคียงกับสัตว์น้ำชนิดอื่น ๆ เช่น กุ้งก้ามกราม ปลาตะเพียน และปลาดุก (Kumla *et al.*, 2025; Thanomsit *et al.*, 2025; Wongchan *et al.*, 2025) ในขณะที่การศึกษานาตของอะซีติลโคลีนเอสเทอเรสจากสมองของปลาหมอเทศ (*Tilapia mossambica*) ด้วยเทคนิค Non-denaturing PAGE พบโปรตีนที่เป็นไอโซเมอร์ซึ่งมีขนาดต่างกัน คือโมโนเมอร์ขนาด 59 kDa และเดตรเมอร์ขนาด 244 kDa (Aswani & Trabucco, 2019)

ผลการศึกษาครั้งนี้แสดงให้เห็นว่าสารกำจัดวัชพืช 2,4-D-ไดเมทิลแอมโมเนียม ในระดับความเข้มข้นที่ไม่ก่อให้เกิดการตายสามารถเหนี่ยวนำให้เกิดความเป็นพิษต่อร่างกายของปลานิลได้อย่างต่อเนื่อง แม้ระดับความเข้มข้นที่ใช้ในการศึกษาจะสูงกว่าระดับที่พบในแหล่งน้ำธรรมชาติซึ่งมีรายงานในระดับไมโครกรัม/ลิตร (Marchesan *et al.*, 2010) แต่ผลการศึกษาสามารถนำไปใช้เป็นแนวทางในการอธิบายกลไกการเกิดผลกระทบต่อปลาที่ได้รับสัมผัสสารได้ โดยกลไกสำคัญที่เชื่อมโยง

ผลกระทบทั้งหมดคือภาวะเครียดออกซิเดชันซึ่งนำไปสู่การเปลี่ยนแปลงของเนื้อเยื่อและการลดลงของเอนไซม์อะซิติลโคลีน เอสเทอร์เอสตามระยะเวลา ซึ่งสอดคล้องกับลักษณะพื้นฐานวิทยาที่พบจากการสังเกตภายนอก คือ เมื่อได้รับสารเป็นเวลา 7 วัน พบการเพิ่มขึ้นของกิจกรรมเอนไซม์ CAT และ GST ร่วมกับการเปลี่ยนแปลงทางสัณฐานวิทยา ได้แก่ ลำตัวซีด ครีบก้อน และการเริ่มต้นของเนื้อตาย ขณะที่เนื้อเยื่อเหงือก กระเพาะอาหาร และตับเริ่มแสดงความเสียหาย สะท้อนถึงการตอบสนองของระบบต้านอนุมูลอิสระต่อการเพิ่มขึ้นของอนุมูลอิสระภายในเซลล์ สอดคล้องกับรายงานของ Oruç *et al.* (2004) ที่พบว่าการได้รับสาร 2,4-D ทำให้กิจกรรมของ CAT และ GST ในตับปลานิลเพิ่มขึ้นอย่างชัดเจน ซึ่งเป็นการตอบสนองต่อการสร้าง ROS ภายในเซลล์ และถือเป็นกลไกป้องกันขั้นแรกของร่างกาย ในขณะที่กิจกรรมของเอนไซม์อะซิติลโคลีนเอสเทอร์เอส และการแสดงออกของอะซิติลโคลีนเอสเทอร์เอสในรูปแบบโปรตีนยังไม่พบการเปลี่ยนแปลงอย่างมีนัยสำคัญ แสดงให้เห็นว่าระบบประสาทยังสามารถรักษาสสมดุลได้ แม้ปลาจะเริ่มเกิดภาวะเครียดออกซิเดชันแล้วก็ตาม เมื่อระยะเวลาการได้รับสารเพิ่มขึ้นเป็น 14 วัน กิจกรรมของเอนไซม์ SOD เพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญ แสดงถึงการสะสมของ ROS ในระดับที่สูงขึ้น ส่งผลให้เกิดการคั่งของเลือดในเหงือก ความเสียหายของไมโทคอนเดรียในลำไส้ และการเปลี่ยนแปลงของเซลล์สร้างเมือกในกระเพาะอาหาร พร้อมทั้งพบการลดลงของค่าอีมาโตคริต ปริมาณโปรตีนรวมในกล้ามเนื้อ และกิจกรรมของเอนไซม์อะซิติลโคลีนเอสเทอร์เอสอย่างมีนัยสำคัญ ต่อมาในวันที่ 21 ของการทดลอง ความเสียหายของเนื้อเยื่อมีความรุนแรงมากขึ้น โดยพบการโป่งพองของหลอดเลือดเหงือก การเชื่อมติดกันของแผ่นเหงือก และการเพิ่มจำนวนของเซลล์เยื่อเหงือก ซึ่งเป็นผลจากภาวะเครียดออกซิเดชันเรื้อรังที่ส่งผลต่อโครงสร้างและการทำงานของเหงือก ทำให้ประสิทธิภาพในการแลกเปลี่ยนก๊าซลดลงและหลังได้รับสารเป็นเวลา 28 วัน พบการเสื่อมสภาพของเนื้อเยื่ออย่างรุนแรงทั้งภายนอกและภายใน ได้แก่ ครีบก้อน เปื่อย เกล็ดหลุด และจำเลือดทั่วลำตัว รวมถึงความเสียหายของเหงือก ตับ ลำไส้ และกระเพาะอาหารอย่างเด่นชัด ในระยะนี้กิจกรรมของเอนไซม์ CAT, GST และ SOD มีค่าสูงสุด แสดงว่าระบบต้านอนุมูลอิสระถูกกระตุ้นอย่างต่อเนื่องแต่ไม่สามารถกำจัด ROS ได้เพียงพอ ส่งผลให้เกิดภาวะเครียดออกซิเดชันอย่างรุนแรง นอกจากนี้การศึกษาด้วยเทคนิค SDS-PAGE และ Western blot ยังพบว่าการแสดงออกของโปรตีนอะซิติลโคลีนเอสเทอร์เอส ลดลงอย่างต่อเนื่องตามระยะเวลาการได้รับสาร สะท้อนถึงผลกระทบต่อระบบประสาทของปลา

Conclusions

การศึกษาความเป็นพิษของสารกำจัดวัชพืช 2,4-D-ไดเมทิลแอมโมเนียมต่อปลานิลพบว่าความเข้มข้นและระยะเวลาที่ได้รับส่งผลให้อัตราการตายสะสมของปลาสูงขึ้น ขณะที่การได้รับพิษในระดับที่ไม่ก่อให้เกิดตายสามารถเกิดความเป็นพิษเรื้อรังต่อปลานิลได้ โดยมีกลไกสำคัญคือการเหนี่ยวนำให้เกิดภาวะเครียดออกซิเดชัน ส่งผลต่อการเปลี่ยนแปลงสัณฐานวิทยา เนื้อเยื่อ ระบบเลือด และระบบประสาท ซึ่งความรุนแรงของผลกระทบเพิ่มขึ้นตามระยะเวลาการได้รับสาร จึงสามารถใช้ภาวะเครียดออกซิเดชัน ค่าโลหิตวิทยา การเปลี่ยนแปลงของเนื้อเยื่อ และเอนไซม์อะซิติลโคลีนเอสเทอร์เอสเป็นตัวบ่งชี้ทางชีวภาพสำหรับการประเมินความเป็นพิษของสารกำจัดวัชพืช 2,4-D-ไดเมทิลแอมโมเนียมในระบบนิเวศทางน้ำได้อย่างมีประสิทธิภาพ ส่วนการประเมินลักษณะสัณฐานวิทยาภายนอก แม้จะไม่สามารถระบุชนิดของสารพิษหรือชี้เฉพาะกลไกความเป็นพิษได้

โดยตรง แต่การเปลี่ยนแปลงที่ปรากฏ เช่น การซีดของลำตัว การกร่อนของครีบ การหลุดของเกล็ด และการเกิดจำเลือด สามารถใช้เป็นดัชนีเบื้องต้นสำหรับการเฝ้าระวังและประเมินสุขภาพของสัตว์น้ำในพื้นที่เสี่ยงต่อการปนเปื้อนสารเคมีได้ เมื่อใช้ร่วมกับข้อมูลภาวะเครียดออกซิเดชัน การเปลี่ยนแปลงของเนื้อเยื่อ ค่าโลหิตวิทยา และเอนไซม์อะซิติลโคลีนเอสเทอเรส จะช่วยเพิ่มความแม่นยำในการวินิจฉัยและติดตามผลกระทบจากสารมลพิษในระบบนิเวศน้ำได้อย่างมีประสิทธิภาพมากยิ่งขึ้น

References

- Aswani, V., & Trabucco, D. (2019). Biochemical adaptation in brain Acetylcholinesterase during acclimation to sub-lethal temperatures in the eurythermal fish *Tilapia mossambica*. *Scientific Reports*, 9, 19762. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-56066-x>
- Boonthawee, B., Poomongkutchai, J., Noosang, S., Khongchamdee, S., & Kenthao, P. (2021). Development and validation of an analytical method for detecting 2,4-D and MCPA pesticide residues in cereals. In Department of agriculture. (Ed.), *Annual performance report fiscal year 2020: Agricultural Production Science Research and Development Division*, (pp. 450-463). Bangkok: Department of Agriculture. (in Thai)
- Cantawon, N., Kiatprasert, P., Prasatkaew, W., Mongkolvai, P., Nanthanawat, P., & Thanomsit, C. (2024). Effects of the herbicide 2, 4-D dimethylammonium on induction of vitellogenin synthesis in the plasma of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) and field study. *Agriculture & Technology RMUTI Journal*, 5(2), 83-98. (in Thai)
- Cheikyula, J.Q., Odo, J.I., & Ikiebe, V.I. (2019). Histological changes in juveniles of African catfish (*Clarias gariepinus*) exposed to amino force® (2,4 d-dimethylammonium salt). *Journal of Research in Forestry, Wildlife & Environment*, 11(4), 107-112.
- Fulton, M.H., & Key, P.B. (2001). Acetylcholinesterase inhibition in estuarine fish and invertebrates as an indicator of organophosphorus insecticide exposure and effects. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 20(1), 37-45. <https://doi.org/10.1002/etc.5620200104>
- Hamisu, Y., Auta, J., & Bawa, B. (2024). Toxicity of the herbicide 2,4-d dimethyl amine salt on behavioral, histological and oxidative stress biomarkers of African catfish *Clarias gariepinus* (Burchell, 1822) fingerlings. *FUDMA Journal of Sciences*, 8(6), 177-185. <https://doi.org/10.33003/fjs-2024-0806-2958>

- Khanchanasal, P., Nuankaew, C., Saowakoon, S., Nanuam, J., Nanthanawat, P., & Thanomsit, C. (2022). Toxicity Level of 2, 4-D Dimethylammonium in Nile tilapia and Acetylcholinesterase (AChE) Expression (Biomarker) to identify exposure in sub-lethal concentration. *Burapha Science Journal*, 27(2), 1278-1299. (in Thai) <https://li05.tci-thaijo.org/index.php/buuscij/article/view/1279>
- Kumla, S., Nanthanawat, P., Nanuam, J., Kiatprasert, P., Wattanakornsiri, A., & Thanomsit, C. (2025). 2,4-D dimethylammonium toxicity in hybrid catfish: Acetylcholinesterase gene, hematology and histology. *Environmental Toxicology and Pharmacology*, 120, 2025. <https://doi.org/10.1016/j.etap.2025.104867>
- Marchesan, E., Sartori, G.M.S., Avila, L.A., Machado, S.L.O., Zanella, R., Primel, E.G., Macedo, V.R.M., & Marchezan, M.G. (2010). Resíduos de agrotóxicos na água de rios da Depressão Central do Estado do Rio Grande do Sul, Brasil. *Ciência Rural*, 40(5), 1053–1059. <https://doi.org/10.1590/S0103-84782010005000078>
- Menéndez- Helman, R.J., Ferreyroa, G.V., dos Santos Afonso, M., & Salibián, A. (2012). Glyphosate as an acetylcholinesterase inhibitor in *Cnesterodon decemmaculatus*. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, 88, 6-9. <https://doi.org/10.1007/s00128-011-0423-8>
- Mongkhonwuttikun, P., & Sueppandee, I. (2021). Method validation for determination of the active ingredients of 2,4-D-dimethylammonium in pesticide products. In Department of agriculture. (Ed.), *Annual performance report fiscal year 2020: Agricultural production science research and development division*, (pp. 603-609). Bangkok: Department of Agriculture. (in Thai)
- OECD. (2019). Test No. 203: Fish, Acute Toxicity Test, OECD Guidelines for the Testing of Chemicals, Section 2, OECD Publishing, Paris, <https://doi.org/10.1787/9789264069961-en>
- Oruç, E. O., Sevgiler, Y., & Uner, N. (2004). Tissue-specific oxidative stress responses in fish exposed to 2,4-D and azinphosmethyl. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology*, 137(1), 43-51. <https://doi.org/10.1016/j.cca.2003.11.006>
- Pan, J., He, H., Su, Y., Zheng, G., Wu, J., Liu, S., & Rao, P. (2016). GST-TAT-SOD: Cell-permeable bifunctional antioxidant enzyme-A potential selective radioprotector. *Oxidative Medicine Cellular Longevity*, 2016, 5935080. <https://doi.org/10.1155/2016/5935080>

- Ramesh, M., Anitha, S., Poopal, R.K., & Shobana, C. (2018). Evaluation of acute and sublethal effects of chloroquine ($C_{18}H_{26}ClN_3$) on certain enzymological and histopathological biomarker responses of a freshwater fish *Cyprinus carpio*. *Toxicology Reports*, 5, 18-27.
<https://doi.org/10.1016/j.toxrep.2017.11.006>
- Simões, L.N., Paiva, G., & Gomes, L. de C. (2010). Clove oil as an anesthetic on Nile tilapia adults. *Pesquisa Agropecuaria Brasileira Journal*, 45(12), 1472–1477. <https://doi.org/10.1590/S0100-204X2010001200019>
- Sinha, D.K., Gour, J.K., Singh, M.K., & Nigam, A.K., (2022). Effect of pesticides on hematological parameters of fish: recent updates. *Journal of Scientific Research*, 66(01), 269-283.
<https://doi.org/10.37398/jsr.2022.660129>.
- Thanomsit, C., Sawakoon, S., Wattanakornsiri, A., Nanuam, J., Prasatkaew, W., Nanthanawate, P., Monkolvai, P., & Chalorchaoenyng, W. (2020). Glyphosate (Roundup): Fate in Aquatic Environment, Adverse Effect and Toxicity Assessment in Aquatic organisms. *Naresuan University Journal: Science and Technology*, 28(1), 65-81.
- Thanomsit, C., Kumla, S., Mongkolvai, P., Chartchumni, B., Wattanakornsiri, A., Nongnutch, K., Nanuam, J., Prasatkaew, W., & Nanthanawat, P. (2025). Toxicity testing, hematological alterations, and acetylcholinesterase expression on *Barbonymus gonionotus* (Bleeker, 1849) exposed to glyphosate-based herbicide. *AACL Bioflux*, 18(6), 2952-2965.
- Wongchan, B., Rakkaew, K., Jandee, N., Kiatprasert, P., Kumla, S., & Thanomsit, C. (2025). Toxicity of glufosinate-ammonium herbicide in giant freshwater prawn (*Macrobrachium rosenbergii*). *Burapha Science Journal*, 30(3), 795-816. (in Thai)
<https://li05.tci-thaijo.org/index.php/buuscij/article/view/746>