

Received: February 22, 2024; Revised: June 11, 2024; Accepted: July 3, 2024

ผลกระทบของสารกำจัดวัชพืช 2, 4-D ไดเมทิลแอมโมเนียมต่อการเหนี่ยวนำการสังเคราะห์
ไวเทลโลเจนินในพลาสมาของปลานิล (*Oreochromis niloticus*) และการศึกษาในภาคสนาม
Effects of the herbicide 2, 4-D dimethylammonium on induction of
vitellogenin synthesis in the plasma of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*)
and field study

น้ำทิพย์ จันถาวร¹ พงศ์ภัทร เกียรติประเสริฐ¹ วิชชุดา ประสาทแก้ว² พัชร มงคลวัย³พอจิต นันทนาวัฒน์⁴ และชุตินา ถนอมสิทธิ์^{1*}Namthip Cantawon¹, Pongpat Kiatprasert¹, Witchuda Prasatkaew²,
Patcharee Mongkolvai³, Phochit Nanthanawat⁴ and Chutima Thanomsit^{1*}¹คณะเกษตรศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลอีสาน วิทยาเขตสุรินทร์ จังหวัดสุรินทร์¹Faculty of Agriculture and Technology, Rajamangala University of Technology Isan Surin Campus, Surin Province²คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยราชภัฏธนบุรี จังหวัดกรุงเทพมหานคร²Faculty of Science and Technology, Dhonburi Rajabhat University, Bangkok³คณะทรัพยากรธรรมชาติ มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลอีสาน วิทยาเขตสกลนคร จังหวัดสกลนคร³Faculty of Natural Resources, Rajamangala University of Technology Isan Sakon Nakhon Campus, Sakon Nakhon Province⁴คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา จังหวัดชลบุรี⁴Faculty of Science, Burapha University, Chonburi Province

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

บทคัดย่อ

สารกำจัดวัชพืชที่ปนเปื้อนในแหล่งน้ำ สามารถรบกวนการทำงานของต่อมไร้ท่อ โดยชักนำให้ปลาเพศผู้หรือปลา
วัยอ่อนสังเคราะห์ไวเทลโลเจนิน งานวิจัยนี้จึงได้ทำการศึกษาการเหนี่ยวนำไวเทลโลเจนินในพลาสมาของปลานิล
(*Oreochromis niloticus*) โดยใช้สารกำจัดวัชพืช 2,4-D ไดเมทิลแอมโมเนียม โดยแบ่งออกเป็น 2 การทดลอง คือ
1) การศึกษาในห้องปฏิบัติการด้วยการเหนี่ยวนำไวเทลโลเจนินด้วยฮอร์โมนเอสโตรเจน (E_2) และสารกำจัดวัชพืช 2,4-D ระดับ
ความเข้มข้นที่ไม่ก่อให้เกิดการตาย (2.5 ไมโครลิตรต่อลิตร) โดยวิเคราะห์ปริมาณโปรตีนรวมในพลาสมา ศึกษารูปแบบ
ของโปรตีนด้วยเทคนิค SDS-PAGE และการแสดงออกของไวเทลโลเจนินด้วยเทคนิคทางแอนติบอดี คือ เวสเทิร์นบลอต
และดอทบลอต ร่วมกับการศึกษาภาคสนาม โดยเก็บตัวอย่างปลาจากแหล่งน้ำธรรมชาติ คือ อ่างเก็บน้ำห้วยเสนง จังหวัด
สุรินทร์ และฟาร์มปลาเอกชนที่ใช้น้ำจากอ่างเก็บน้ำห้วยเสนงในระบบเพาะเลี้ยง โดยนำมาศึกษาปริมาณโปรตีน การแสดงออก
ของโปรตีน และการแสดงออกของไวเทลโลเจนิน ร่วมกับการตรวจสอบการปนเปื้อนสารกำจัดศัตรูพืชในน้ำด้วยชุดทดสอบ

อย่างง่าย GT test kit ผลการศึกษาพบว่า ปลานิลที่ได้รับสัมผัสสารกำจัดวัชพืช 2,4-D สามารถเหนี่ยวนำให้มีการสังเคราะห์ไวเทลโลเจนินได้เช่นเดียวกับ E_2 โดยไวเทลโลเจนินที่พบมีขนาด 250 และ 220 กิโลดาลตัน ส่วนปลาธรรมชาติจากอ่างเก็บน้ำห้วยเสนง 4 ชนิด ที่ทำการศึกษาคือ ปลาช่อน ปลาดุกกร๊สเซีย ปลาบู่ และปลาดุกลูกผสม ไม่พบการแสดงออกของไวเทลโลเจนิน ส่วนปลานิลจากฟาร์มเอกชน พบการแสดงออกของไวเทลโลเจนินในทุกตัวอย่างที่ศึกษา สอดคล้องกับผลการตรวจสอบการปนเปื้อนของสารกำจัดวัชพืชในน้ำให้ผลบวกเช่นเดียวกัน ผลการศึกษาชี้ให้เห็นว่าสารกำจัดวัชพืช 2,4-D มีผลต่อการทำงานของต่อมไร้ท่อ โดยตรวจสอบได้จากการใช้ไวเทลโลเจนินเป็นตัวชี้วัดทางชีวภาพ ซึ่งการบริโภคปลาที่ได้รับสารเหล่านี้อาจส่งผลให้เกิดการสะสมสารกำจัดวัชพืชเพิ่มขึ้นตามลำดับห่วงโซ่อาหารและเป็นอันตรายกับมนุษย์ได้

คำสำคัญ: ไวเทลโลเจนิน สารกำจัดวัชพืช การปนเปื้อน 2,4-D ไคเมทิลแอมโมเนียม

Abstract

Herbicides contaminating water sources can disrupt endocrine functions by inducing vitellogenin in male or juvenile fish. This study investigates the induction of vitellogenin in the plasma of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) using the herbicide 2,4-D dimethylammonium. The experiment was divided into two parts as 1) Laboratory Study: This part involved inducing vitellogenin using estrogen (E_2) and 2,4-D at a non-lethal concentration of 2.5 $\mu\text{L/L}$. The plasma protein content and protein expression were analyzed using SDS-PAGE, while vitellogenin expression was detected using antibody techniques (Western blot and dot blot) 2) Field Study: Fishes samples were collected from Huai Senang reservoir in Surin province, and a fish farm using reservoir water in culture system. The plasma protein content, protein expression, and vitellogenin expression, together with pesticide contamination in the water using the GT test kit. The results showed that Nile tilapia exposed to 2,4-D herbicide synthesized vitellogenin similarly to those exposed to E_2 , with vitellogenin sizes of 250 and 220 kDa. In contrast, natural fishes from the Huai Senang reservoir (Snakehead fish, African catfish, Goby and Hybrid catfish) did not show vitellogenin expression. However, Nile tilapia from the private farm showed vitellogenin expression in all samples, correlating with positive pesticide contamination in the water. The study indicates that the herbicide 2,4-D affects endocrine function, with vitellogenin serving as a biomarker. Consuming fish exposed to such contaminants may lead to bioaccumulation of pesticides in the food chain, posing health risks to humans.

Keywords: Vitellogenin, Herbicides, Contamination, 2,4-D dimethylammonium

บทนำ

การขยายตัวของการส่งออกสินค้าเกษตรและการเพิ่มขึ้นของประชากรอย่างรวดเร็วส่งผลให้ระบบเกษตรกรรมของไทยถูกผลักดันเข้าสู่ระบบเกษตรกรรมกระแสหรือเกษตรกรรมเคมี เกษตรกรจึงนำเทคโนโลยีมาช่วยเพิ่มผลผลิตทางด้านอาหารให้เพียงพอความต้องการของผู้บริโภค โดยใช้สารเคมีกำจัดวัชพืชเพื่อเพิ่มผลผลิตทางการเกษตร การปรับปรุงพันธุ์พืช และการป้องกันกำจัดศัตรูพืช เห็นได้จากปริมาณการนำเข้าปุ๋ยเคมีและสารป้องกันกำจัดวัชพืชที่เพิ่มขึ้นต่อเนื่อง โดยในปี

พ.ศ. 2566 มีการนำเข้ารวม 0.141 ล้านตัน เพิ่มขึ้นร้อยละ 23.68 จากปี พ.ศ. 2565 โดยมีการนำเข้ารวม 0.114 ล้านตัน ซึ่งสารเคมีที่มีการนำเข้ามากที่สุด คือ สารกำจัดวัชพืช จำนวน 90,465 ตัน รองลงมา คือ สารป้องกันและกำจัดโรคพืช จำนวน 22,702 ตัน และสารกำจัดแมลง จำนวน 22,559 ตัน ซึ่งสารป้องกันและกำจัดวัชพืชที่มีการนำเข้ามากที่สุด ได้แก่ กลูโฟซิเนต-แอมโมเนียม, ไกลโฟเซต-ไอโซโพรพิลแอมโมเนียม และ 2,4-D-ไดเมทิลแอมโมเนียม ตามลำดับ (สำนักงานควบคุมพืชและวัสดุทางการเกษตร, 2567) ทั้งนี้สารกำจัดศัตรูพืชนับเป็นปัจจัยที่มีความจำเป็นอย่างหนึ่งในการเพิ่มผลผลิตทางการเกษตร โดยเฉพาะสารในกลุ่มกำจัดวัชพืชที่มีปริมาณการใช้มากขึ้น เนื่องจากการใช้สารเคมีกำจัดวัชพืชมีต้นทุนน้อยกว่าการกำจัดวัชพืชโดยใช้วิธีการทางกายภาพ ซึ่งการใช้สารเคมีทางการเกษตรโดยเฉพาะอย่างยิ่งสารกำจัดวัชพืชเป็นสาเหตุหนึ่งที่ทำให้เกิดปัญหาสิ่งแวดล้อม การใช้สารกำจัดวัชพืชที่ปราศจากการควบคุมอย่างถูกวิธีมีความเสี่ยงต่อการแพร่กระจายของสารกำจัดวัชพืชสู่สิ่งแวดล้อม นอกจากนี้ปัญหาการใช้สารเคมีทางการเกษตรที่มากเกินไปยังทำให้เกิดการตกค้างของสารเคมีในดิน อากาศ และแหล่งน้ำ (Thanomsit et al., 2020a) โดยการตรวจสอบการปนเปื้อนของสารกำจัดศัตรูพืชในแหล่งน้ำจากพื้นที่ฝั่งธนบุรีในเขตที่มีการทำเกษตรกรรม พบการปนเปื้อนสารกำจัดศัตรูพืช 7 ชนิด จาก 2 กลุ่ม คือ คาร์บาเมต และออร์แกโนฟอสเฟส ซึ่งปริมาณที่ตรวจพบมีค่าเฉลี่ยมากกว่ามาตรฐานของแหล่งน้ำในประเทศสหรัฐอเมริกา ซึ่งอาจมีผลแบบฉับพลันและเรื้อรังในสัตว์น้ำ (อุทุมพร, 2564) โดยการปนเปื้อนของสารดังกล่าวส่งผลกระทบต่อสัตว์น้ำและทำให้เกิดการสะสมสารพิษในสัตว์น้ำ แม้การปนเปื้อนของสารกำจัดศัตรูพืชอาจอยู่ในระดับที่ปลอดภัยต่อการบริโภคของมนุษย์ แต่ระดับการปนเปื้อนที่พบในแหล่งน้ำธรรมชาติอาจมีผลต่อสัตว์น้ำได้ (อุไรวรรณ, 2545; วิชาดา และรัตติยากร, 2548; Thanomsit et al., 2016a; Thanomsit et al., 2020a) โดยเฉพาะอย่างยิ่งหากเกิดการปนเปื้อนในสัตว์น้ำที่มนุษย์ใช้บริโภคก็จะส่งผลกระทบต่อสุขภาพของมนุษย์

2,4-D ไดเมทิลแอมโมเนียม (2,4-D dimethylammonium) เป็นสารกำจัดวัชพืชในกลุ่ม chlorophenoxyacetic acid ใช้สำหรับกำจัดวัชพืชใบกว้าง (Broad-leaf weed) สำหรับธัญพืช สวนสาธารณะ และสนามกอล์ฟ นอกจากนี้ยังใช้เป็นสารควบคุมการเจริญเติบโต (Growth regulator) ในพืชใบเลี้ยงคู่เพื่อให้ได้ผลผลิตเพิ่มขึ้น ซึ่งในทางการค้า 2,4-D ในรูปของกรดที่ใช้เป็นสารออกฤทธิ์แล้วยังมีอนุพันธ์ที่เป็นเกลือและเอสเทอร์จำนวนมาก ผลิตภัณฑ์ของ 2,4-D และอนุพันธ์นอกจากใช้เป็นสารออกฤทธิ์เพียงอย่างเดียวแล้วยังรวมกับสารกำจัดวัชพืชอื่น ๆ อีกหลายชนิด ซึ่งสาร 2,4-D นั้นเป็นสารที่ส่งผลกระทบต่อการทำงานของต่อมไทรอยด์ จึงสามารถชักนำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงของฮอร์โมนในสิ่งมีชีวิตได้ โดยสารกำจัดวัชพืช 2,4-D มีผลต่อสัตว์น้ำ โดยไปรบกวนการทำงานของต่อมไทรอยด์ ทำให้มีผลต่อฮอร์โมนและระบบการสืบพันธุ์ (Ackers et al., 2000) และยิ่งไปกว่านั้น Sarikaya and Yilmaza (2003) รายงานว่าเมื่อปลาไน (*Cyprinus carpio*) ได้รับสัมผัสสาร 2,4-D จะก่อให้เกิดความเป็นพิษในปลาสูงมาก และในปลาดุกด้าน (*Clarias batrachus*) หากได้รับสัมผัสกับสาร 2,4-D จะก่อให้เกิดการเปลี่ยนแปลงทางพันธุกรรมและการเปลี่ยนแปลงของเนื้อเยื่อ (Atecq et al., 2006)

ไวเทลโลเจนิน (Vitellogenin) เป็นโปรตีนที่พบในสิ่งมีชีวิตที่สืบพันธุ์ด้วยการวางไข่ ควบคุมโดยฮอร์โมน 17 β -เอสตราไดออล (17 β -estradiol; E₂) สังเคราะห์ขึ้นบริเวณตับของปลาเพศเมียที่โตเต็มวัยและหลั่งเข้าสู่กระแสเลือดเพื่อพัฒนาโอโอไซต์ (Oocyte) (Hock et al., 2001) ในสภาวะปกติปลาเพศผู้และปลาวัยอ่อนจะไม่มีสังเคราะห์ไวเทลโลเจนิน แต่สามารถสังเคราะห์ไวเทลโลเจนินเมื่อได้รับการกระตุ้นด้วยสารรบกวนที่มีลักษณะคล้ายเอสโตรเจนที่ปนเปื้อนอยู่ในสิ่งแวดล้อม ทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงกลไกของฮอร์โมนที่เกี่ยวข้องกับระบบสืบพันธุ์ (Marin and Matozzo, 2004) การเพิ่มขึ้นของไวเทลโลเจนินในปลาเพศผู้หรือปลาที่ยังไม่สมบูรณ์เพศ สามารถเกิดขึ้นได้โดยการเหนี่ยวนำของสารคล้ายฮอร์โมนเอสโตรเจนทั้งชนิดเดียวหรือหลายชนิดร่วมกัน ทั้งการสัมผัสสารที่มีความเข้มข้นต่ำเป็นระยะเวลานาน หรือสัมผัสสารความเข้มข้นสูงในเวลาสั้น (Hock et al., 2001) สารคล้ายเอสโตรเจนที่พบในชีวิตประจำวันเป็นได้ทั้งสารเคมีที่มีอยู่ในธรรมชาติหรือที่มนุษย์สังเคราะห์ขึ้นเพื่อใช้ในการแพทย์ การเกษตร และอื่น ๆ เช่น ฮอร์โมน ฮอร์โมนสังเคราะห์ โลหะหนัก และสารกำจัดวัชพืช (พอจิต, 2558) ซึ่งสารกำจัดศัตรูพืชที่ปนเปื้อนในแหล่งน้ำ สามารถรบกวนการทำงานของต่อมไทรอยด์โดยชักนำให้ปลาเพศผู้สังเคราะห์ไวเทลโลเจนินได้ โดยมีรายงานการสำรวจไวเทลโลเจนินในปลาจากแหล่งน้ำธรรมชาติ

เช่น ปลานิล ปลาช่อน ปลาตะเพียน และปลากะตัก พบการแสดงออกของไวเทิลโลเจนินในปลาเพศผู้จากแหล่งน้ำในพื้นที่อุตสาหกรรม และเกษตรกรรม ซึ่งให้เห็นว่าอุตสาหกรรมและเกษตรกรรมเป็นแหล่งที่มาของสารคล้ายเอสโตรเจนในสิ่งแวดล้อม (Okoumassoun et al., 2002; Prasatkaew et al., 2019) ซึ่งการสังเคราะห์ไวเทิลโลเจนินในปลาเพศผู้และปลาวัยอ่อนมีผลต่อสมดุลของประชากรในระบบนิเวศ อีกทั้งการบริโภคปลาที่ได้รับสารเหล่านี้อาจส่งผลให้เกิดพิษสะสมเพิ่มขึ้นตามลำดับห่วงโซ่อาหารและเป็นอันตรายกับมนุษย์ได้

ไวเทิลโลเจนินถูกนำมาใช้เป็นตัวชี้วัดทางชีวภาพของการรับสัมผัสสารคล้ายเอสโตรเจน การตรวจสอบไวเทิลโลเจนินด้วยเทคนิคทางแอนติบอดีถือเป็นทางเลือกที่น่าสนใจ เนื่องจากสามารถตรวจวัดได้อย่างครั้งละมาก ๆ ทรานสเฟอรัลได้รวดเร็ว ค่าใช้จ่ายน้อย และมีความแม่นยำ ซึ่งการศึกษาในครั้งนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาไวเทิลโลเจนินในปลานิล เนื่องจากเป็นปลาที่มีการแพร่กระจายในแหล่งน้ำทั่วประเทศ และเป็นปลาเศรษฐกิจที่มีการบริโภคในปริมาณมาก จึงเป็นทางเลือกที่น่าสนใจในการนำมาใช้เป็นตัวชี้วัดการได้รับสัมผัสสารดังกล่าวในแหล่งน้ำธรรมชาติ โดยทำการศึกษาก่อนการทดลองของไวเทิลโลเจนินเมื่อได้รับสัมผัสสารกำจัดวัชพืช 2,4-D ไคเมทิลแอมโมเนียม ซึ่งมีการใช้อย่างแพร่หลายในพื้นที่การเกษตร เปรียบเทียบกับกลุ่มที่ได้รับฮอร์โมน 17 β -เอสตราไดอล และกลุ่มควบคุมผลผลิตที่ไม่ได้รับสารใด โดยใช้เทคนิคทางแอนติบอดีตรวจสอบการแสดงออกของไวเทิลโลเจนินในห้องปฏิบัติการ ร่วมกับการศึกษาในภาคสนาม คือตรวจสอบไวเทิลโลเจนินจากปลาชนิดอื่น ๆ ในแหล่งน้ำธรรมชาติ และปลานิลจากฟาร์มเอกชนที่มีการนำน้ำจากแหล่งน้ำธรรมชาติมาใช้ในระบบการเพาะเลี้ยง เพื่อเป็นข้อมูลพื้นฐานในการเฝ้าระวังการปนเปื้อนของสารกำจัดวัชพืช 2,4-D และการวางแผนการใช้สารกำจัดวัชพืชให้เหมาะสม เพื่อป้องกันผลกระทบที่อาจเกิดขึ้นต่อระบบนิเวศและจำนวนประชากรปลาในแหล่งน้ำในอนาคต

วัสดุ อุปกรณ์ และวิธีการ

สัตว์ทดลอง และแผนการทดลอง

การวิจัยครั้งนี้ดำเนินการทดลองที่สาขาประมง คณะเกษตรศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลอีสาน วิทยาเขตสุรินทร์ ตามกฎหมายสวัสดิภาพของสัตว์ และได้รับการรับรองการอนุมัติให้ดำเนินการเลี้ยงและใช้สัตว์เพื่องานวิทยาศาสตร์จากมหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลอีสาน ใบอนุญาตใช้สัตว์ทดลองเลขที่ UL-03405-2559 โดยแบ่งการทดลองออกเป็น 2 ชุด คือ 1) การศึกษาในห้องปฏิบัติการด้วยการเหนี่ยวนำไวเทิลโลเจนินด้วย E₂ และ 2,4-D โดยนำมาศึกษาปริมาณโปรตีน การแสดงออกของโปรตีนด้วยเทคนิค SDS-PAGE และการแสดงออกของไวเทิลโลเจนินด้วยเทคนิคเวสเทิร์นบลอต และดอทบลอต 2) การศึกษาภาคสนาม โดยการเก็บตัวอย่างปลาจากแหล่งน้ำธรรมชาติ คือ อ่างเก็บน้ำห้วยเสนง และฟาร์มปลาเอกชนที่ใช้น้ำจากอ่างเก็บน้ำในระบบเพาะเลี้ยง นำมาศึกษาปริมาณโปรตีน การแสดงออกของโปรตีน และการแสดงออกของไวเทิลโลเจนิน ร่วมกับการตรวจสอบสารกำจัดศัตรูพืชในน้ำด้วยชุดทดสอบอย่างง่าย (GT test kit)

สารเคมีที่ใช้ในงานวิจัย

สารเคมีที่ใช้ทดสอบ คือ ฮอร์โมน 17 β -เอสตราไดอล (E₂) และสารกำจัดวัชพืช 2,4-D ไคเมทิลแอมโมเนียม (บริษัท แอกรอนอินดัสตรีส์ จำกัด ประเทศไทย หมายเลข CAS 2008-39-1) สารเคมีทั่วไปที่ใช้ในการวิจัยเป็นชนิดเกรดวิเคราะห์ และสารเคมีที่ใช้ในการศึกษารูปแบบโปรตีน และการศึกษาการเหนี่ยวนำการสร้างไวเทิลโลเจนิน (E₂) เป็นผลิตภัณฑ์ของบริษัท Merck (หมายเลข CAS 50-28-2)

สัตว์ทดลอง

ห้องปฏิบัติการ

นำปลานิลเพศผู้น้ำหนักเฉลี่ย 150-200 กรัม ยาว 20-25 เซนติเมตร มาปรับสภาพในบ่อคอนกรีตขนาด 100 ลิตร เป็นเวลา 7 วัน ซึ่งปลานิลจะได้รับอาหารวันละ 2 ครั้ง จากนั้นแบ่งตัวอย่างปลานิลออกเป็น 3 กลุ่ม คือ 1) กลุ่มควบคุมผลบดที่ไม่ได้รับสารใด 2) กลุ่มทดลองที่ทำการฉีดกระตุ้นให้ปลานิลสร้างไวเทลโลเจนินด้วยฮอร์โมน E_2 ปริมาณ 1.2 มิลลิกรัมต่อน้ำหนักปลา 1 กิโลกรัม จำนวน 4 ครั้ง เป็นระยะเวลา 12 วัน (ฉีดกระตุ้นวันที่ 0, 4, 8 และ 12 หลังการเก็บตัวอย่างเลือดปลานิล) การเก็บตัวอย่างเลือดปลานิลจะทำการเก็บทุก ๆ 3 วัน ก่อนการฉีดกระตุ้น โดยเริ่มเก็บตัวอย่างเลือดปลานิลตั้งแต่ก่อนฉีดครั้งแรก (วันที่ 0) จนถึงครั้งสุดท้าย และ 3) กลุ่มที่ได้รับสารกำจัดวัชพืช 2,4-D ไดเมทิลแอมโมเนียม ความเข้มข้น 2.5 ไมโครลิตรต่อลิตร เก็บตัวอย่างปลาเพื่อศึกษาระดับความเป็นพิษจำนวน 4 ครั้ง แต่ละครั้งห่างกัน 7 วัน ตั้งแต่ก่อนการแช่ครั้งแรก (วันที่ 0) จนถึงครั้งสุดท้ายเป็นเวลา 28 วัน การเก็บตัวอย่างปลาเพื่อศึกษาทำได้โดยนำปลานิลมาสลบ และเก็บเลือดปลาบริเวณเหนือเส้นข้างลำตัว โดยใช้เข็มฉีดยาขนาด 24G ที่เคลือบด้วยสารป้องกันการแข็งตัวของเลือด (EDTA) และใส่ในหลอดที่เคลือบเฮพารินและ 0.01% Phenylmethylsulfonyl fluoride (PMSF) (บริษัท Sigma) และจัดการส่วนที่เหลือของสัตว์น้ำโดยการนำใส่ถุงพลาสติกและส่งไปกำจัดพร้อมขยะติดเชื้อ

การสกัดโปรตีนจากพลาสมาของปลานิลเพื่อศึกษารูปแบบของโปรตีนและการวัดปริมาณโปรตีน

การสกัดโปรตีน

การเก็บตัวอย่างพลาสมาของปลานิลในแต่ละช่วงเวลาที่ทำการศึกษาโดยการเจาะเลือดปลานิลจากเส้นข้างลำตัว หลังจากนั้นเลือดที่ได้จากการเก็บตัวอย่างจะนำไปปั่นเหวี่ยงที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ความเร็ว 3,500 RPM เป็นเวลา 5 นาที เก็บส่วนใสเพื่อใช้ในการวิเคราะห์ปริมาณโปรตีนที่มีการเหนี่ยวนำการสร้างไวเทลโลเจนิน (พวจิต และคณะ, 2559)

การวัดปริมาณโปรตีน

นำโปรตีนมาตรฐาน BSA มาเจือจางให้มีปริมาณโปรตีน 0.03125, 0.0625, 0.25 และ 1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ปริมาณ 0.5 มิลลิลิตร (พวจิต และคณะ, 2559) หลังจากนั้นนำตัวอย่างพลาสมาของปลานิลที่ต้องการวัดปริมาณโปรตีนมาเจือจางตัวอย่างด้วยน้ำกลั่น 1:10 เท่า นำสารละลาย BSA และตัวอย่างพลาสมาตัวอย่างละ 10 ไมโครลิตร ใส่ลงในไมโครไตเตอร์เพลทหลุมที่ต้องการทดสอบโดยใส่ตัวอย่างละ 2 หลุม เติมน้ำสารละลาย Dry reagent เจือจางที่ปริมาตร 200 ไมโครลิตรทุกหลุม ผสมให้เข้ากัน ตั้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 5 นาที นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 595 นาโนเมตร บันทึกค่าการดูดกลืนแสงของสารละลาย BSA ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ นำมาสร้างกราฟมาตรฐานระหว่างปริมาณ BSA กับค่าการดูดกลืนแสง และนำค่าการดูดกลืนแสงของตัวอย่างมาเปรียบเทียบกับโปรตีนจากกราฟมาตรฐาน

การศึกษารูปแบบของโปรตีนที่พบในพลาสมาของปลานิลโดยใช้เทคนิคโซเดียมโดดีซิลซัลเฟต เจล อิเล็กโทรโฟรีซิส (SDS-PAGE) และการศึกษาการเหนี่ยวนำการสร้างไวเทลโลเจนินโดยใช้เทคนิคเวสเทิร์น บลอต (Western blot)

การศึกษารูปแบบโปรตีนจากปลานิล ดัดแปลงจาก Prasatkaew et al. (2019) โดยใช้เครื่อง mini PROTEIN® Tetra Cell ในการศึกษาใช้ Separating gel 10% โดยนำพลาสมาตัวอย่างที่ต้องการศึกษา และไวเทลโลเจนินบริสุทธิ์ มาเจือจางด้วย PBS (pH 7.2) ผสมกับสารละลายตัวอย่าง (2x buffer) แล้วนำมาแยกโปรตีนโดยใช้กระแสไฟฟ้าเป็น 120 โวลต์ จนกระทั่งสังเกตเห็นสีของ Bromophenol blue เคลื่อนที่ถึงส่วนล่างของเจลจึงค่อยหยุดกระแสไฟฟ้า จากนั้นนำไปย้อมโปรตีนด้วยสี 0.1% Coomassie brilliant blue R-250 ช้ำมคิน จากนั้นล้างสีออกด้วย Destaining solution จนกระทั่งเห็นแถบสีน้ำเงินของโปรตีนที่อยู่บนแผ่นเจลชัดเจน หลังจากนั้นล้างแผ่นเจลด้วยน้ำกลั่น เพื่อดูแถบโปรตีนและบันทึกผลแถบโปรตีนที่พบเปรียบเทียบกับโปรตีนมาตรฐานที่ทราบโมเลกุล สำหรับการศึกษาการเหนี่ยวนำการสร้างไวเทลโลเจนินจะใช้เทคนิคเวสเทิร์น บลอต ดัดแปลงจาก พวจิต และคณะ (2559) โดยแยกไวเทลโลเจนินใน 10% SDS-PAGE หลังจากนั้นทำการย้าย

โปรตีนจากแผ่นเจลที่ทำการศึกษาลงบนแผ่นไนโตรเซลลูโลสเมมเบรน ใช้กระแสไฟฟ้าที่ 15 โวลต์ เป็นเวลา 20 นาที นำแผ่นเมมเบรนแช่ในสารละลาย 5% Skim milk ใน PBS เป็นเวลา 1 ชั่วโมง ล้างแผ่นเมมเบรนด้วยสารละลาย 0.1% tween-20 ใน PBS เป็นเวลา 5 นาที จำนวน 3 ครั้ง นำแผ่นเมมเบรนแช่ในสารละลายแอนติบอดีที่จำเพาะต่อไวเทลโลเจนนิน (MAb-VTG 23 1:50) เป็นเวลา 12 ชั่วโมง ล้างออกด้วยสารละลาย 0.1% tween-20 ใน PBS เป็นเวลา 5 นาที จำนวน 3 ครั้ง นำแผ่นเมมเบรนไปแช่ในแอนติบอดีตัวที่สองที่ติดฉลากด้วยเอนไซม์ (GAM-HRP 1:1,000) เป็นเวลา 3 ชั่วโมง ล้างแผ่นเมมเบรนด้วยสารละลาย 0.1% tween-20 ใน PBS เป็นเวลา 5 นาที จำนวน 3 ครั้ง นำแผ่นเมมเบรนมาทำให้เกิดสีของปฏิกิริยาในสารละลายสับสเตรท (DAB 0.03%, H_2O_2 0.03%, $COCl_2$ 0.05% และ PBS 20 มิลลิลิตร) สังเกตผลของปฏิกิริยาคือการเกิดแถบสีน้ำตาลเทาบนแผ่นเมมเบรน คำนวณหาพื้นที่ของไวเทลโลเจนนินโดยเทียบกับโปรตีนมาตรฐาน (Pre-Stained protein ladder, Cleaver Scientific, Thailand)

การศึกษาการเหนี่ยวนำการสร้างไวเทลโลเจนนินในปลานิลโดยใช้เทคนิคดอตบล็อต (Dot blot)

การศึกษาการเหนี่ยวนำการสร้างไวเทลโลเจนนินในปลานิลโดยใช้เทคนิคดอตบล็อต ดัดแปลงจากวิชชุดา และพวจิต (2561) โดยเตรียมตัวอย่างให้มีความเข้มข้นของโปรตีนเท่ากับ 40, 20, 10, 5, 2.5, 1.25, 0.625, 0.312, 0.156 และ 0.078 ไมโครกรัมต่อไมโครลิตร จากนั้นนำตัวอย่างพลาสมาที่ต้องการศึกษามายดลงบนไนโตรเซลลูโลสเมมเบรน ทั้งไว้ให้แห้งที่อุณหภูมิห้อง จากนั้นแช่เมมเบรนในสารละลายนมพร่องมันเนย 5% ใน PBS เป็นเวลา 1 ชั่วโมง ล้างแผ่นเมมเบรนด้วยสารละลาย 0.1% tween-20 ใน PBS เป็นเวลา 5 นาที จำนวน 3 ครั้ง นำแผ่นเมมเบรนออกแช่ในสารละลายแอนติบอดีที่จำเพาะต่อไวเทลโลเจนนิน (MAb-VTG 23 1:50) นาน 12 ชั่วโมง จากนั้นล้างออกด้วยสารละลาย 0.1% tween-20 ใน PBS เป็นเวลา 5 นาที จำนวน 3 ครั้ง นำเมมเบรนไปแช่ใน GAM-HRP 1:1,000 ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 3 ชั่วโมง แล้วล้างออกด้วยสารละลาย 0.1% tween-20 ใน PBS เป็นเวลา 5 นาที จำนวน 3 ครั้ง นำเมมเบรนมาทำให้เกิดสีของปฏิกิริยาในสารละลายสับสเตรทเช่นเดียวกับเทคนิคเวสเทิร์น บลอต สังเกตและบันทึกผลการเกิดปฏิกิริยา ผลบวกของปฏิกิริยาคือเกิดจุดสีน้ำตาลเทาบนแผ่นเมมเบรน

การเก็บตัวอย่างภาคสนาม

ทำการเก็บตัวอย่างปลาเพศผู้จากแหล่งน้ำธรรมชาติบริเวณอ่างเก็บน้ำห้วยเสนง (Huai Saneng) ตำบลเจียง อำเภอมืองสุรินทร์ จังหวัดสุรินทร์ ภาคตะวันออกเฉียงเหนือของประเทศไทย ในช่วงเดือนสิงหาคม พ.ศ. 2566 จากแหล่งชุมชนที่มีท่าเรือชาวบ้านประกอบอาชีพเกษตรกรรมและทำการประมงพื้นบ้านเป็นอาชีพเสริม โดยตักปลาความยาว 30 เซนติเมตร ขนาดตา 1.3 เซนติเมตร ทำการแยกชนิด ชั่งน้ำหนัก และวัดความยาว ที่ห้องปฏิบัติการวิเคราะห์คุณภาพน้ำ สาขาประมง คณะเกษตรศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลอีสาน วิทยาเขตสุรินทร์ นอกจากนี้ยังได้ทำการเก็บตัวอย่างปลานิลเพศผู้จากฟาร์มปลาเอกชนบริเวณอ่างเก็บน้ำห้วยเสนงซึ่งใช้น้ำจากอ่างเก็บน้ำในระบบการเพาะเลี้ยง โดยการเก็บตัวอย่างจากแหล่งน้ำธรรมชาติและฟาร์มเอกชนจะทำเช่นเดียวกับการศึกษาในห้องปฏิบัติการ และทำการเก็บตัวอย่างน้ำจากอ่างเก็บน้ำและฟาร์มเอกชนมาตรวจสอบการปนเปื้อนของสารกำจัดวัชพืชโดยใช้ชุดทดสอบอย่างง่าย GT-Test Kit

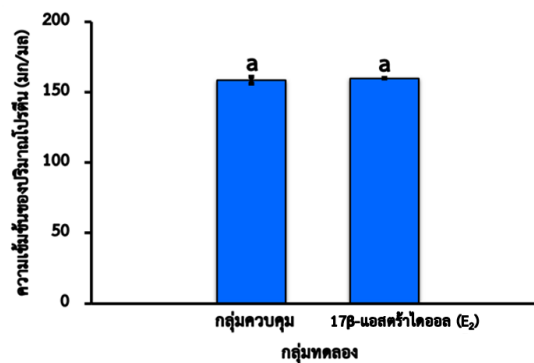
การวิเคราะห์ทางสถิติ

ผลการทดลองที่เป็นข้อมูลเชิงปริมาณคือปริมาณโปรตีนในพลาสมาของปลา ใช้การวิเคราะห์สถิติแบบ t-test ที่ระดับความเชื่อมั่น 95% เปรียบเทียบระหว่างกลุ่มควบคุมและกลุ่มทดลอง โดยใช้โปรแกรม SAS University edition (order number 1095069)

ผลการวิจัย

การศึกษาปริมาณโปรตีนรวมในพลาสมาของปลานิลที่มีการเหนี่ยวนำการสังเคราะห์ไวเทโลเจนนโดยการฉีดกระตุ้นด้วย 17β -estradiol (E_2)

เมื่อทำการศึกษารูปแบบของโปรตีนในพลาสมาของปลานิลในกลุ่มควบคุมและในปลานิลที่ฉีดกระตุ้นด้วย E_2 จำนวน 4 ครั้ง แต่ละครั้งห่างกัน 3 วัน พบว่า ปริมาณโปรตีนในพลาสมาของปลานิลกลุ่มควบคุม และปลานิลที่ได้รับการเหนี่ยวนำให้สร้างไวเทโลเจนนโดยการฉีดกระตุ้นด้วย E_2 ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ ($p>0.05$) โดยปริมาณโปรตีนในพลาสมาปลากลุ่มควบคุม และกลุ่มที่ฉีดกระตุ้นด้วย E_2 เท่ากับ 158.77 ± 2.42 และ 160.03 ± 0.21 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ (รูปที่ 1)

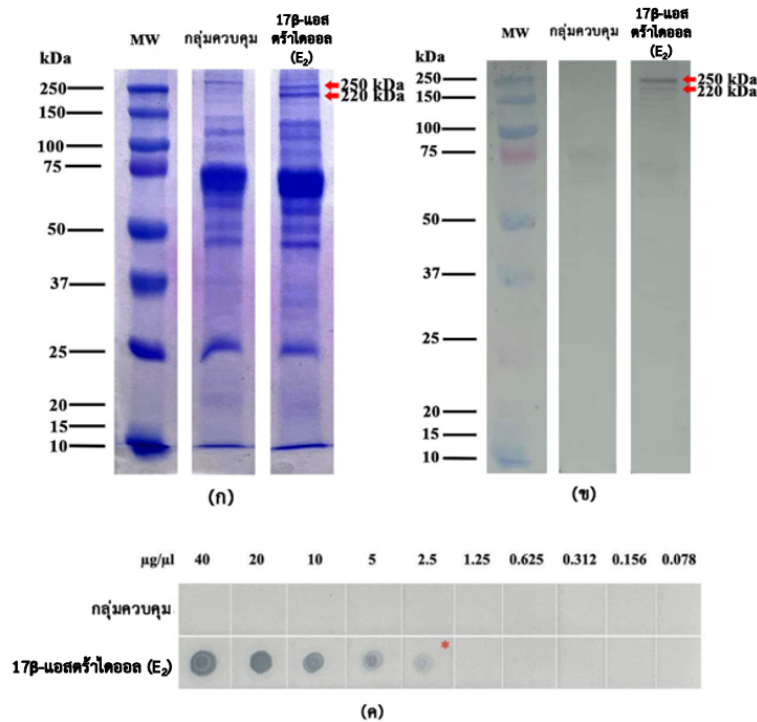


รูปที่ 1 ปริมาณโปรตีนรวมในพลาสมาของปลานิลในกลุ่มควบคุมและกลุ่มที่ได้รับการเหนี่ยวนำให้มีการสังเคราะห์ไวเทโลเจนนโดยการฉีดกระตุ้นด้วย E_2

หมายเหตุ: อักษรภาษาอังกฤษที่แตกต่างกัน แสดงให้เห็นถึงความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.05$)

การศึกษารูปแบบของโปรตีนและความจำเพาะของไวเทโลเจนนในพลาสมาโดยใช้เทคนิคเวสเทิร์นบลอตและดอทบลอต

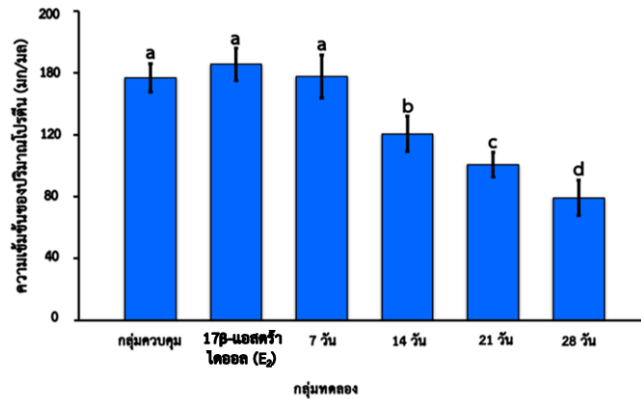
เมื่อทำการศึกษารูปแบบของโปรตีนในพลาสมาของปลานิลในกลุ่มควบคุม และปลานิลที่ได้รับการเหนี่ยวนำให้มีการสังเคราะห์ไวเทโลเจนนโดยการฉีดกระตุ้นด้วย E_2 จำนวน 4 ครั้ง โดยใช้เทคนิคเจลอิเล็กโทรโฟรีซิส พบว่า รูปแบบของโปรตีนที่พบในทั้ง 2 กลุ่ม มีลักษณะใกล้เคียงกัน โดยพบแถบโปรตีนขนาดใหญ่จำนวน 1 แถบ ที่มีน้ำหนักโมเลกุลประมาณ 70 kDa ในกลุ่มที่ฉีดด้วย E_2 พบว่า ไวเทโลเจนนมีขนาด 250 และ 220 kDa (รูปที่ 2ก) โดยไวเทโลเจนนที่ตรวจสอบได้สามารถยืนยันได้จากการศึกษาด้วยเทคนิคเวสเทิร์นบลอต (รูปที่ 2ข) โดยใช้แอนติบอดีที่มีความจำเพาะต่อไวเทโลเจนนที่ผลิตจากปลากะพงขาว ปริมาณโปรตีนที่ใช้ในการศึกษา คือ 4 ไมโครกรัมต่อไมโครลิตร ระดับการเจือจางของแอนติบอดีที่จำเพาะของไวเทโลเจนน คือ 1:50 และเมื่อทำการศึกษาความจำเพาะของไวเทโลเจนนที่เกิดจากการเหนี่ยวนำโดยการฉีด E_2 เปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุมโดยใช้เทคนิคดอทบลอต พบว่า ขีดจำกัดของการตรวจสอบคือ 2.5 ไมโครกรัมต่อไมโครลิตร (รูปที่ 2ค) แสดงให้เห็นถึงการศึกษารูปแบบของโปรตีนในพลาสมาของปลานิล การศึกษาความจำเพาะของไวเทโลเจนนที่เกิดจากการเหนี่ยวนำโดยการฉีดกระตุ้น E_2



รูปที่ 2 รูปแบบของโปรตีนในพลาสมาของปลานิลในกลุ่มควบคุมและในกลุ่มที่มีการเหนี่ยวนำให้มีการสังเคราะห์ไวเทโลเจนิน โดยการฉีดกระตุ้นด้วย E₂ (ก); การศึกษาความจำเพาะของไวเทโลเจนินโดยใช้เทคนิคเวสเทิร์นบลอต (ข); การศึกษาความจำเพาะของไวเทโลเจนินโดยใช้เทคนิคเวสเทิร์นบลอต (ค); การศึกษาความจำเพาะของไวเทโลเจนิน โดยใช้เทคนิคคอตทบลอต

การศึกษาการเหนี่ยวนำไวเทโลเจนินในปลานิลโดยใช้สารกำจัดวัชพืช 2,4-D ไดเมทิลแอมโมเนียม

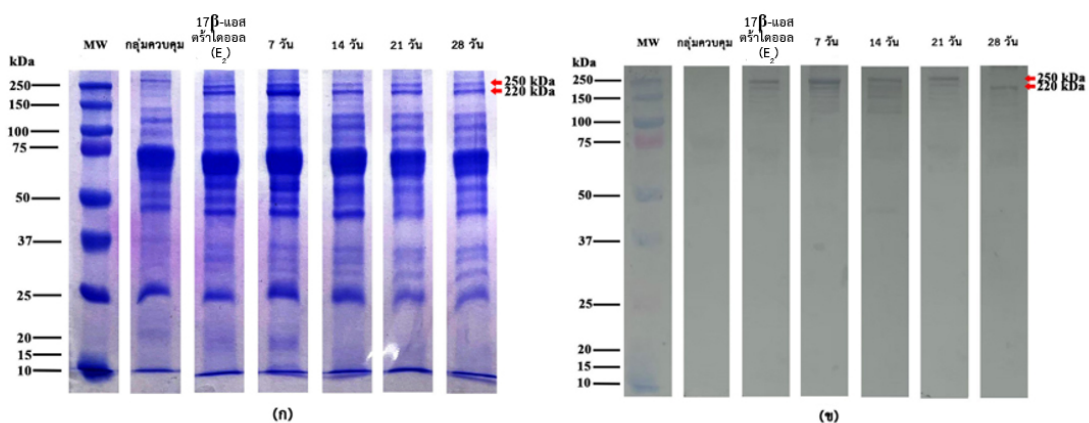
การเหนี่ยวนำไวเทโลเจนินในปลานิลโดยใช้สารกำจัดวัชพืช 2,4-D ไดเมทิลแอมโมเนียม พบว่า ปริมาณโปรตีนรวมในพลาสมาของกลุ่มควบคุมมีค่าเท่ากับ 159.60 ± 1.15 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร กลุ่มที่ฉีดกระตุ้นด้วย E₂ เพื่อให้มีการเหนี่ยวนำการสังเคราะห์ไวเทโลเจนินมีปริมาณโปรตีนรวมในพลาสมาเท่ากับ 160.70 ± 1.31 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร และในกลุ่มที่ได้รับสัมผัสสารกำจัดวัชพืช 2,4-D ไดเมทิลแอมโมเนียมเป็นเวลา 7, 14, 21 และ 28 วัน พบว่า ปริมาณโปรตีนรวมในพลาสมา มีค่าเท่ากับ 159.70 ± 1.73 , 155.07 ± 1.42 , 152.57 ± 1.00 และ 149.90 ± 1.41 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ โดยเมื่อทำการเปรียบเทียบปริมาณโปรตีนในพลาสมาในกลุ่มที่ทำการศึกษา พบว่า กลุ่มควบคุม กลุ่มที่ฉีดกระตุ้นด้วย E₂ และกลุ่มที่ได้รับสัมผัสสารกำจัดวัชพืช 2,4-D ไดเมทิลแอมโมเนียมเป็นเวลา 7 วัน ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ ($p > 0.05$) แต่ในกลุ่มที่ได้รับสัมผัสสารกำจัดวัชพืช 2,4-D ไดเมทิลแอมโมเนียมเป็นเวลา 14, 21 และ 28 วัน นั้นมีแนวโน้มลดลงตามระยะเวลาที่ได้รับสัมผัส และปริมาณโปรตีนในพลาสมาปลานิลทั้ง 3 กลุ่ม (14, 21 และ 28 วัน) มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) รูปที่ 3



รูปที่ 3 ปริมาณโปรตีนรวมในพลาสมาของปลานิลในกลุ่มควบคุม กลุ่มที่มีการเหนี่ยวนำให้มีการสังเคราะห์ไวเทโลเจนิน โดยการฉีดกระตุ้นด้วย E_2 และกลุ่มที่ได้รับสัมผัสสารกำจัดวัชพืช 2,4-D ไดเมทิลแอมโมเนียมเพื่อให้มีการสังเคราะห์ไวเทโลเจนินเป็นเวลา 7, 14, 21 และ 28 วัน

หมายเหตุ: อักษรภาษาอังกฤษที่ต่างกัน แสดงให้เห็นถึงความต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$)

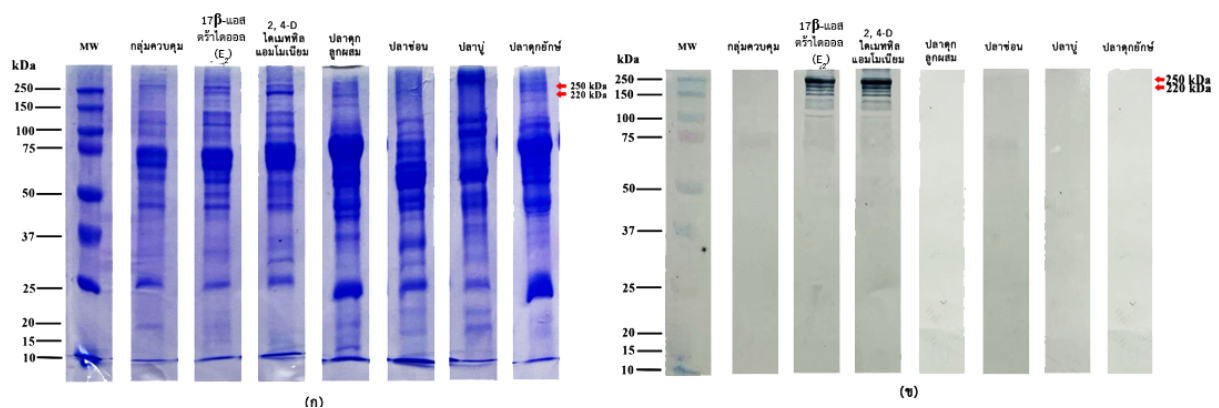
หลังจากที่ทำการศึกษาปริมาณโปรตีนรวมในพลาสมาของปลานิลแล้ว ได้มีการศึกษาถึงรูปแบบของโปรตีนที่พบในพลาสมาโดยใช้เทคนิค SDS-PAGE (รูปที่ 4ก) ซึ่งพบโปรตีนแถบใหญ่ที่มีน้ำหนักโมเลกุลประมาณ 70 kDa และพบโปรตีนที่มีน้ำหนักโมเลกุล 250 และ 220 kDa ในปลาทุกกลุ่ม ซึ่งมีแนวโน้มว่าอาจเป็นไวเทโลเจนิน เมื่อทำการศึกษาความจำเพาะของไวเทโลเจนินโดยใช้เทคนิคเวสเทิร์นบลอต (รูปที่ 4ข) พบว่า เมื่อเปรียบเทียบระหว่างกลุ่มควบคุม กลุ่มที่มีการเหนี่ยวนำให้มีการสังเคราะห์ไวเทโลเจนินโดยการฉีดกระตุ้นด้วย E_2 และกลุ่มที่ได้รับสัมผัสสารกำจัดวัชพืช 2,4-D ไดเมทิลแอมโมเนียมเพื่อเหนี่ยวนำให้มีการสังเคราะห์ไวเทโลเจนินเป็นเวลา 7, 14, 21 และ 28 วัน พบว่า กลุ่มที่ได้รับการฉีดกระตุ้นด้วย E_2 และกลุ่มที่ได้รับสัมผัสสารกำจัดวัชพืช 2,4-D ไดเมทิลแอมโมเนียมเป็นเวลา 7, 14 และ 21 วัน จะพบไวเทโลเจนิน 2 isoform ที่มีขนาด 250 และ 220 kDa ส่วนในปลานิลที่ได้รับสัมผัสสารกำจัดวัชพืช 2, 4-D ไดเมทิลแอมโมเนียมเป็นเวลา 28 วัน จะพบเพียงการแสดงออกของไวเทโลเจนินเพียง 1 isoform ขนาด 220 kDa (รูปที่ 4)



รูปที่ 4 (ก); รูปแบบโปรตีนในพลาสมาของปลานิล (ข); และการศึกษาความจำเพาะของไวเทโลเจนินในพลาสมาของปลานิลในกลุ่มควบคุม กลุ่มที่มีการเหนี่ยวนำให้มีการสังเคราะห์ไวเทโลเจนินโดยการฉีด E_2 และกลุ่มที่ได้รับสัมผัสสารกำจัดวัชพืช 2,4-D ไดเมทิลแอมโมเนียมเป็น เวลา 7, 14, 21 และ 28 วัน โดยใช้เทคนิคเวสเทิร์นบลอต

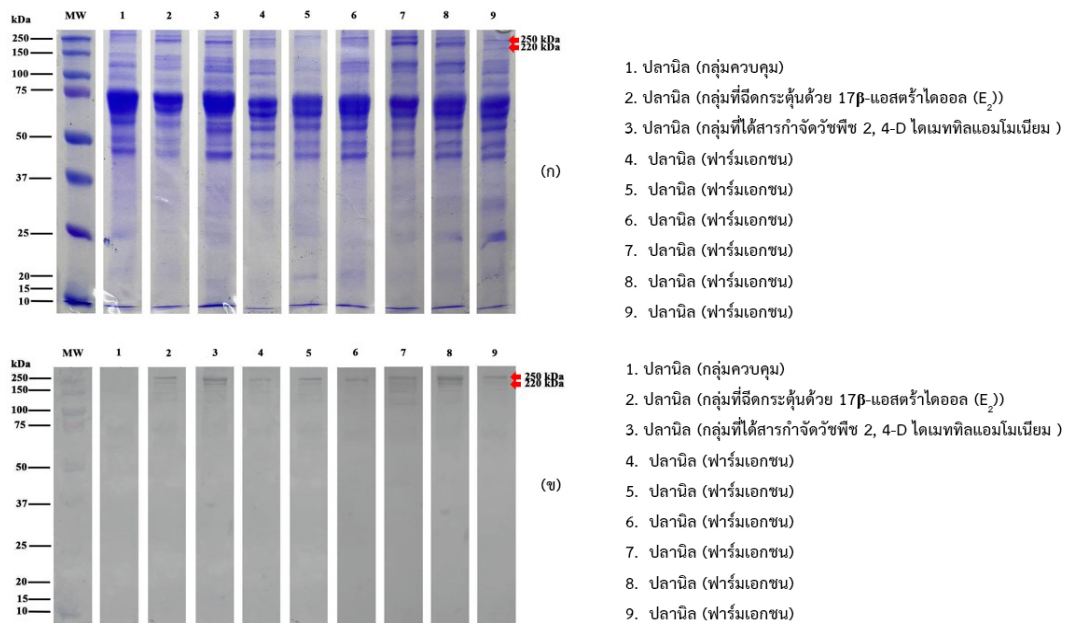
การเก็บตัวอย่างภาคสนาม

การเก็บตัวอย่างภาคสนามจากแหล่งน้ำธรรมชาติ บริเวณอ่างเก็บน้ำห้วยเสนง ตำบลเนินัง อำเภอเมืองสุรินทร์ จังหวัดสุรินทร์ ในช่วงเดือนสิงหาคม พ.ศ. 2566 ซึ่งเป็นช่วงฤดูของการทำนา โดยทำการเก็บตัวอย่างปลาทั้งหมด 4 ชนิด ชนิดละ 3 ตัวให้เป็นตัวแทนของปลาในแหล่งน้ำที่มีการทำการเกษตรโดยปลาที่นำมาใช้ในการศึกษา คือ ปลาช่อน ปลาดุกรัสเซีย ปลาน้ำ และปลาดุกกลุ่มผสม (รูปที่ 5 และตารางที่ 1) ซึ่งจากการศึกษา พบว่า ปลาทั้งหมดทุกชนิดที่ทำการศึกษามีพบการแสดงออกของไวเทิลโลเจนิน เมื่อเปรียบเทียบกับปลานิลในกลุ่มควบคุม และปลานิลที่ได้รับการเหนี่ยวนำให้มีการสังเคราะห์ไวเทิลโลเจนินโดยการฉีดกระตุ้นด้วย E_2 (รูปที่ 5ข) โดยรูปแบบของโปรตีนที่พบในปลาแต่ละชนิด พบว่า มีความแตกต่างกันเมื่อทำการศึกษาโดยใช้เทคนิคเจลอิเล็กโตรโฟรีซิส (รูปที่ 5ก)



รูปที่ 5 (ก) รูปแบบพลาสมาโปรตีนของปลานิลกลุ่มควบคุม ปลานิลที่ได้รับ E_2 และปลาช่อน ปลาดุกรัสเซีย ปลาน้ำ และปลาดุกกลุ่มผสม จากอ่างเก็บน้ำห้วยเสนง (ข) การศึกษาความจำเพาะของไวเทิลโลเจนินในปลาโดยใช้เทคนิคเวสเทิร์นบลอตเพื่อตรวจสอบการแสดงออกของไวเทิลโลเจนิน

การศึกษาการแสดงออกของไวเทิลโลเจนินในปลาจากฟาร์มเอกชนบริเวณอ่างเก็บน้ำห้วยเสนง พบรูปแบบของโปรตีนมีลักษณะแตกต่างกันเล็กน้อย (รูปที่ 6ก) โดยปลานิลในกลุ่มที่ได้รับการเหนี่ยวนำให้มีการแสดงออกของไวเทิลโลเจนินโดยการฉีด E_2 และปลานิลที่ได้รับสารกำจัดวัชพืช 2,4-D พบไวเทิลโลเจนินจำนวน 2 isoform ขนาด 250 และ 220 kDa เมื่อศึกษาโดยเทคนิคเจลอิเล็กโตรโฟรีซิสและเทคนิคเวสเทิร์นบลอต แต่ปลานิลที่จากฟาร์มปลาเอกชนทั้งหมด 6 ตัวอย่าง พบว่ามีเพียงตัวอย่างที่ 3 และ 4 เท่านั้นที่มีการแสดงออกของไวเทิลโลเจนิน 2 isoform ที่มีขนาด 250 และ 220 kDa ส่วนตัวอย่างที่ 1, 2, 5 และ 6 จะตรวจพบการแสดงออกของไวเทิลโลเจนิน 1 isoform ขนาด 250 kDa (รูปที่ 6 และตารางที่ 1)



รูปที่ 6 (ก) รูปแบบโปรตีนในพลาสมาของปลานิลกลุ่มควบคุม ปลานิลที่ได้รับ E₂ และปลานิลที่ได้มาจากฟาร์มเอกชน
(ข) การศึกษาความจำเพาะของไวเทโลเจนนินในปลาโดยใช้เทคนิคเวสเทิร์นบลอตเพื่อตรวจสอบการแสดงออกของไวเทโลเจนนิน (ปริมาณโปรตีน 4 ไมโครกรัมต่อไมโครลิตร และระดับการเจือจางของแอนติบอดี 1:50)

ตารางที่ 1 ผลการศึกษาไวเทโลเจนนินในปลาน้ำจืดจากอ่างเก็บน้ำห้วยเสนง ตำบลเนินัง อำเภอเมืองสุรินทร์ จังหวัดสุรินทร์ และจากฟาร์มปลาเอกชน และการตรวจสอบสารกำจัดวัชพืชในน้ำด้วย GT-Test kit

บริเวณที่ทำการศึกษา	ชนิดของปลา	น้ำหนักโมเลกุลของไวเทโลเจนนิน	ผลการตรวจสอบสารกำจัดวัชพืชในน้ำ
อ่างเก็บน้ำห้วยเสนง ตำบลเนินัง อำเภอเมืองสุรินทร์	ปลาช่อน (n=3)	-	ผลบวก
	ปลาดุกรัสเซีย (n=3)	-	
	ปลานุ้ (n=3)	-	
	ปลาดุกลูกผสม (n=3)	-	
ฟาร์มปลาเอกชน 1	ปลานิล (n=3)	250, 220 kDa	ผลบวก
ฟาร์มปลาเอกชน 2	ปลานิล (n=3)	250, 220 kDa	ผลบวก
ฟาร์มปลาเอกชน 3	ปลานิล (n=3)	250, 220 kDa	ผลบวก
ฟาร์มปลาเอกชน 4	ปลานิล (n=3)	250 kDa	ผลบวก
ฟาร์มปลาเอกชน 5	ปลานิล (n=3)	250 kDa	ผลบวก
ฟาร์มปลาเอกชน 6	ปลานิล (n=3)	250, 220 kDa	ผลบวก

การอภิปรายผล

สารกำจัดวัชพืช 2,4-D ไดเมทิลแอมโมเนียม เป็นสารกำจัดวัชพืชที่ถูกจัดอยู่ในกลุ่ม chlororphenoxycetic acid และยังเป็นกลุ่มสารที่ออกฤทธิ์คล้ายฮอร์โมนเอสโตรเจนหรือสารแปลกปลอมทางชีวภาพที่เปลี่ยนแปลงกลไกการออกฤทธิ์ของฮอร์โมนที่เรียกว่า ซีโนเอสโตรเจน (Xenoestrogen) และซีโนไบโอติค (Xenobiotic) ซึ่งเป็นกลุ่มสารเคมีที่มีผลต่อการทำงาน

ของต่อมไร้ท่อทำให้มีผลต่อการสังเคราะห์ไวเทโลเจนิน ซึ่งในทางการค้า 2,4-D จะอยู่ในรูปของกรดที่ใช้เป็นสารออกฤทธิ์และยังมือนุพัทธ์ที่เป็นเกลือและเอสเทอร์จำนวนมากที่นำมาใช้ในปัจจุบัน ผลกระทบของสาร 2,4-D ที่ตรวจพบในปลาจะมีผลต่อฮอร์โมนและระบบการสืบพันธุ์ โดยการเปลี่ยนแปลงโดยจะตรวจพบได้เมื่อปลาสัมผัสกับสารที่ระดับความเข้มข้น 10 ppb (Ackers et al., 2000) ซึ่งสาร 2,4-D เป็นสารที่ส่งผลต่อการทำงานของต่อมไร้ท่อ จึงสามารถชักนำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงของฮอร์โมนในสิ่งมีชีวิตได้ (Campbell et al., 2006) นอกจากนี้หากสารดังกล่าวมีการปนเปื้อนในสิ่งแวดล้อมทางน้ำและสะสมในสัตว์น้ำ เช่น ปลาน้ำจืดชนิดต่าง ๆ ก็จะทำให้เกิดผลกระทบต่อระบบนิเวศได้ การศึกษาครั้งนี้เริ่มจากการศึกษาการเหนี่ยวนำการสังเคราะห์ไวเทโลเจนินในปลาหมอของปลานิลเพศผู้ที่ได้รับสัมผัสสารกำจัดวัชพืชในระดับที่ไม่ก่อให้เกิดการตาย คือ ความเข้มข้น 2.5 ไมโครลิตรต่อลิตร ซึ่งพบว่าสามารถทำให้เกิดการสังเคราะห์ไวเทโลเจนินได้ โดยในสภาวะปกติยืนสำหรับสังเคราะห์ไวเทโลเจนินในปลาเพศผู้ และปลาวัยอ่อน จะไม่มีการทำงานแต่หากได้รับการกระตุ้นจากสารคล้ายเอสโตรเจนในสิ่งแวดล้อมจะสามารถกระตุ้นให้ปลาเหล่านี้ไวเทโลเจนินขึ้นมาได้ เช่นเดียวกับการทำงานของฮอร์โมนเอสโตรเจนที่สังเคราะห์ขึ้นจากภายในร่างกาย (พอจิต, 2558) โดยเมื่อเปรียบเทียบกับปลานิลที่ได้รับการฉีดกระตุ้นให้มีการเหนี่ยวนำการสังเคราะห์ไวเทโลเจนินโดยใช้ E_2 จำนวน 2 มิลลิกรัมต่อน้ำหนักปลา 1 กิโลกรัม เป็นกลุ่มควบคุมผลบวก และใช้ปลานิลที่ไม่ได้รับสารใดเป็นกลุ่มควบคุมผลลบ พบว่า รูปแบบของไวเทโลเจนินในปลาหมอปลานิลที่ได้รับ E_2 และ 2,4-D ไคเมทิลแอมโมเนียม ปริมาณ 2.5 ไมโครลิตรต่อลิตร เป็นเวลา 7–28 วัน มี 2 isoform (น้ำหนักโมเลกุล 250 และ 220 kDa) เช่นเดียวกัน แต่เมื่อพิจารณาถึงโปรตีนรวมที่พบในปลาหมอ พบว่า ปริมาณโปรตีนในปลาหมอที่ได้รับสัมผัสกับ 2,4-D ไคเมทิลแอมโมเนียมจะลดลงตามระยะเวลาและต่ำสุดในวันที่ 28 ซึ่งรูปแบบของไวเทโลเจนินในปลานิลที่ตรวจสอบได้ในครั้งนี้แตกต่างจากการศึกษาของ Garnayark et al. (2013) ที่ได้ศึกษารูปแบบของไวเทโลเจนินในปลา Asian catfish ที่มีขนาด 97 และ 67 kDa และการศึกษารูปแบบของไวเทโลเจนินในปลา Indian walking catfish (*Clarias batrachus* (L.)) พบไวเทโลเจนินขนาดโมเลกุล 97 และ 67 kDa (Mahapatra et al., 2017)

ในปัจจุบันการศึกษากาการเหนี่ยวนำการสังเคราะห์ไวเทโลเจนินโดยใช้สารกำจัดวัชพืชยังมีอยู่น้อยมากในประเทศไทย ส่วนในต่างประเทศได้มีรายงานไว้ เช่น การศึกษาของ Gupta and Verma (2020) ที่พบว่าสารกำจัดวัชพืชเพนไดเมทาลิน (Pendimethalin) สามารถเหนี่ยวนำให้มีการสังเคราะห์ไวเทโลเจนินในปลากระดุกเข็ง (*Clarias batrachus*) (Linnaeus) เพศผู้ โดยระยะเวลาที่สามารถเหนี่ยวนำให้มีการสังเคราะห์ไวเทโลเจนินได้คือ 30, 45 และ 60 วัน นอกจากนี้ Ishibashi et al. (2001) ได้ศึกษาผลของสาร bisphenol A ต่อปลาทอง (Goldfish, *Carassius auratus*) โดยพบว่า ปลาทองเพศผู้ที่ได้รับสาร bisphenol A ระยะเวลา 28 วัน สามารถสังเคราะห์ไวเทโลเจนินได้ และ Norberg and Haux (1988) พบว่า ปริมาณไวเทโลเจนินในเลือดลดปริมาณลง เมื่อได้รับยาฆ่าวัชพืช คือ เพนทาคลอโรฟีนอล (Pentachlorophenol) ซึ่งเป็นสารที่พบทั่วไปในแหล่งน้ำต่าง ๆ แสดงว่าสารเคมีในแหล่งน้ำมีผลต่อการสังเคราะห์ไวเทโลเจนินในปลา ยิ่งไปกว่านั้น สุรัสวดี และคณะ (2560) พบว่า โนนิลฟีนอล สามารถชักนำให้เกิดไวเทโลเจนินในปลากระพงขาววัยอ่อนได้เช่นเดียวกับปลาที่ได้รับฮอร์โมน 17 β -เอสตราไดออล โดยสามารถตรวจสอบไวเทโลเจนินได้ด้วยเทคนิคทางแอนติบอดีตั้งแต่วันที่ 3 หลังจากปลาได้รับสาร และการศึกษาของ Wang et al. (2015) พบการเหนี่ยวนำของไวเทโลเจนินในปลาทองเพศผู้ที่ได้รับสารกำจัดศัตรูพืชชนิดโมโนโครโตฟอส 0.01, 0.01 และ 1.00 มิลลิกรัมต่อลิตร ทั้งการตรวจสอบเชิงคุณภาพด้วยเทคนิค Western blot ที่พบโปรตีนขนาดขนาด 130, 106, และ 81 kDa และการตรวจสอบเชิงปริมาณด้วยเทคนิค ELISA แบบแซนด์วิช ที่พบปริมาณไวเทโลเจนินในปลาทองที่ได้รับโมโนโครโตฟอส ระหว่าง 7.8 ถึง 250 นาโนกรัมต่อมิลลิกรัม ซึ่งการศึกษาเหล่านี้ชี้ให้เห็นว่าไวเทโลเจนินเป็นเครื่องมือที่เหมาะสมสำหรับการศึกษาผลกระทบของสารคล้ายเอสโตรเจนต่อปลาหลายชนิดได้

ในจังหวัดสุรินทร์อ่างเก็บน้ำห้วยเสนงมีความสำคัญต่อวิถีการดำเนินชีวิตของประชาชนในท้องถิ่นและชุมชนใกล้เคียงเป็นอย่างมาก มีรายงานว่าในการทำประมงในอ่างเก็บน้ำห้วยเสนงสามารถทำได้ตลอดทั้งปี และยิ่งไปกว่านั้นเนื่องจากอ่างเก็บน้ำห้วยเสนงเป็นพื้นที่ที่มีความอุดมสมบูรณ์ มีปริมาณน้ำเพียงพอสำหรับใช้ในการเกษตรและประกอบกิจกรรมต่าง ๆ ดังนั้นการปนเปื้อนของสารกำจัดวัชพืชจึงมีโอกาที่จะตกค้างในสัตว์น้ำและเกิดการสะสมในสัตว์น้ำได้ สารกำจัดวัชพืชนั้นสามารถ

ก่อให้เกิดผลกระทบเชิงลบต่อสุขภาพของสัตว์น้ำและก่อให้เกิดการสะสมให้มีปริมาณสูงขึ้นตามลำดับชั้นของห่วงโซ่อาหาร ดังนั้นการศึกษาถึงผลกระทบที่เกิดขึ้นกับสิ่งมีชีวิตต่าง ๆ เช่น กุ้ง หอย ปู และปลา จึงมีความจำเป็นอย่างยิ่ง ทางเลือกหนึ่งที่น่าสนใจจะทำให้ทราบถึงผลกระทบโดยตรงคือการประยุกต์ใช้ตัวชี้วัดทางชีวภาพ โดยเฉพาะอย่างยิ่งไวเทิลโลเจนินซึ่งเป็นตัวชี้วัดที่มีความจำเพาะกับสารกำจัดแมลง และสารกำจัดวัชพืช เช่น โกลโฟเสต พาราควอต และ 2,4-D ดังนั้นจึงมีความเป็นไปได้ที่จะนำมาบ่งชี้ถึงการได้รับสัมผัสสาร และมีความเป็นไปได้ที่จะใช้สิ่งมีชีวิตในน้ำมาเป็นตัวบ่งบอกถึงการปนเปื้อนของสารดังกล่าวในแหล่งน้ำ

การสำรวจภาคสนามเพื่อศึกษาถึงการปนเปื้อนของสารกำจัดวัชพืชในพื้นที่บริเวณอ่างเก็บน้ำห้วยเสนง ตำบลเนินยาง อำเภอมืองสุรินทร์ จังหวัดสุรินทร์ ซึ่งเป็นการตรวจสอบเบื้องต้นเพื่อดูความเป็นไปได้ในการใช้ไวเทิลโลเจนินเป็นตัวชี้วัดการปนเปื้อนสารกำจัดวัชพืชในแหล่งน้ำ เนื่องจาก 2,4-D เป็นสารกำจัดวัชพืชที่ใช้ในการเกษตร จึงอาจมีการปนเปื้อนของสารปราบศัตรูพืชในแหล่งน้ำในพื้นที่ดังกล่าว นอกจากนี้ยังทำการสำรวจในปลาจากฟาร์มเอกชนที่นำน้ำจากอ่างเก็บน้ำมาใช้ในระบบเพาะเลี้ยง โดยผลการสำรวจในภาคสนามโดยการเก็บตัวอย่างปลาน้ำจืดชนิดต่าง ๆ จากพื้นที่อ่างเก็บน้ำห้วยเสนง มาศึกษา พบว่า ลักษณะสัณฐานวิทยาของปลาน้ำจืดชนิดต่าง ๆ ที่เก็บมาได้มีลักษณะปกติ ไม่พบบาดแผล ดังนั้นหากใช้ลักษณะสัณฐานวิทยาเป็นเกณฑ์อาจประเมินเบื้องต้นได้ว่าปลาอาจจะไม่ได้มีการสัมผัสสารกำจัดวัชพืช เนื่องจาก Thanomsit et al. (2020b) อธิบายว่าปลาที่ได้รับสัมผัสสารกำจัดวัชพืชจะมีลักษณะสัณฐานวิทยาที่เปลี่ยนแปลงไปทั้งในเรื่องของรูปร่างและสีผิว เช่น ลำตัวมีสีซีด แผ่นปิดเหงือกมีแผลและจำเริญ ลำตัวมีบาดแผล มีเลือดออก และเกล็ดหลุดร่อน (ไชยวัฒน์ และคณะ, 2564) โดยการสำรวจปลาน้ำจืดในพื้นที่บริเวณอ่างเก็บน้ำห้วยเสนง คือ ปลาช่อน ปลาดุกรัสเชีย ปลาบู และปลาดุกลูกผสม ซึ่งไม่พบการแสดงออกของไวเทิลโลเจนิน เมื่อเปรียบเทียบกับปลานิลที่ได้รับการเหนี่ยวนำให้มีการสังเคราะห์ไวเทิลโลเจนินโดยการฉีดกระตุ้นด้วย E_2 แต่ผลการวิเคราะห์การปนเปื้อนของสารกำจัดวัชพืชในน้ำโดยชุดทดสอบอย่างง่าย GT test kit ผลว่า ให้ผลบวก โดยอาจจะเนื่องมาจากปลาชนิดต่าง ๆ สามารถเคลื่อนที่ไปมาในบริเวณต่าง ๆ ของอ่างเก็บน้ำได้ หรืออาจได้รับสัมผัสสารกำจัดวัชพืชในปริมาณต่ำหรือระยะเวลาสั้น ๆ ทำให้ไม่สามารถเหนี่ยวนำการสังเคราะห์ไวเทิลโลเจนินได้ โดย Walker et al. (2006) และ Thanomsit et al. (2022) ได้รายงานว่าความเป็นพิษของสารที่ตรวจพบในปลานั้นมีหลายปัจจัยที่ควบคุมการแสดงออกของตัวชี้วัดทางชีวภาพ เช่น ฮอร์โมนหรือโปรตีนชนิดต่าง ๆ ในร่างกาย ซึ่งได้แก่ ระยะเวลาที่ได้รับสัมผัส ความเข้มข้นของสาร และเส้นทางการได้รับสัมผัส นอกจากนี้ยัง พบว่า การได้รับสารเคมีที่รบกวนการทำงานของต่อมไร้ท่อหลายชนิดร่วมกัน เช่น โนนิลฟีนอลร่วมกับเบนโซ (เอ) ไพรีน และแคดเมียมคลอไรด์ ทำให้พบปริมาณไวเทิลโลเจนินต่ำกว่าการได้รับสารชนิดเดียวอย่างมีนัยสำคัญ (Prasatkaew et al., 2019) ในขณะที่การตรวจสอบการปนเปื้อนของยาฆ่าแมลงกลุ่มออร์กาโนคลอรีนในปลานิลในธรรมชาติจากแม่น้ำ Ouémé ประเทศเบนินในแอฟริกาตะวันตก ซึ่งเป็นแม่น้ำที่อยู่ใกล้พื้นที่เกษตรกรรม โดยใช้ไวเทิลโลเจนินเป็นตัวชี้วัดทางชีวภาพ ร่วมกับการตรวจสอบสารกำจัดศัตรูพืชกลุ่มออร์กาโนคลอรีนในเนื้อเยื่อของปลานิล ผลการศึกษาพบปริมาณไวเทิลโลเจนินในปลาจากบริเวณที่มีการปนเปื้อนสารปราบศัตรูพืช โดยมีความสัมพันธ์กับระดับออร์กาโนคลอรีนในเนื้อเยื่อ ชี้ให้เห็นว่ามีสารกำจัดศัตรูพืชกลุ่มออร์กาโนคลอรีนปนเปื้อนในแหล่งน้ำ โดยสารเหล่านี้รบกวนการทำงานของต่อมไร้ท่อในปลานิลได้ นอกจากนี้การบริโภคปลาจากแม่น้ำที่มีการปนเปื้อน อาจส่งผลให้ยาฆ่าแมลงเหล่านี้สะสมเพิ่มขึ้นตามห่วงโซ่อาหารส่งผลให้เกิดผลกระทบด้านลบต่อสิ่งมีชีวิตและสิ่งแวดล้อมได้ (Okoumassoun et al., 2002) ส่วนการศึกษาไวเทิลโลเจนินในปลานิลจากฟาร์มปลาเอกชน พบว่า มีการแสดงออกของไวเทิลโลเจนินในทุกตัวอย่างที่ทำการศึกษา สอดคล้องกับการตรวจสอบการปนเปื้อนของสารกำจัดวัชพืชที่พบผลบวกเนื่องมาจากฟาร์มเอกชนที่ทำการเก็บตัวอย่างครั้งนี้มีการนำน้ำจากแหล่งน้ำธรรมชาติมาใช้ในการเพาะเลี้ยง ซึ่งหากเป็นช่วงฤดูทำนาอาจจะมีการใช้สารเคมีทางการเกษตรค่อนข้างสูง ทำให้เกิดการปนเปื้อนในน้ำและส่งผลกระทบต่อปลาที่เลี้ยงในฟาร์มได้ โดยการเลี้ยงในพื้นที่จำกัดทำให้ปลาไม่สามารถเคลื่อนย้ายที่และอาจสัมผัสกับสารกำจัดวัชพืชอยู่ตลอดเวลา ทำให้สามารถเหนี่ยวนำให้เกิดการสังเคราะห์ไวเทิลโลเจนินได้

ผลการศึกษาครั้งนี้แสดงให้เห็นว่าสารกำจัดวัชพืช 2,4-D สามารถเหนี่ยวนำให้เกิดการสังเคราะห์ไวเทโลเจนินในพลาสมาของปลานิลเพศผู้ได้ โดยสามารถใช้ปลานิลเป็นตัวชี้วัดการได้รับสัมผัสสารดังกล่าวทั้งในห้องปฏิบัติการ แหล่งน้ำธรรมชาติ และฟาร์มที่มีการเพาะเลี้ยง ซึ่งผลการทดลองชี้ให้เห็นการปนเปื้อนของสารกำจัดวัชพืชทั้งในแหล่งน้ำธรรมชาติ และฟาร์มที่มีการเพาะเลี้ยง ดังนั้นจึงควรมีการเฝ้าระวังการปนเปื้อนของสารกลุ่มดังกล่าว และวางแผนการใช้สารกำจัดวัชพืชให้เหมาะสมเพื่อป้องกันผลกระทบที่อาจเกิดขึ้นต่อสิ่งแวดล้อม และมนุษย์ซึ่งเป็นผู้บริโภคลำดับสูงสุดในห่วงโซ่อาหาร

บทสรุป

เมื่อศึกษาถึงการเหนี่ยวนำการสังเคราะห์ไวเทโลเจนินในพลาสมาของปลานิลโดยใช้สารกำจัดวัชพืช 2,4-D ไคเมทิลแอมโมเนียมที่ระดับความเข้มข้นที่ไม่ก่อให้เกิดการตาย คือ 2.5 μL พบว่าไวเทโลเจนินสามารถเหนี่ยวนำให้มีการสังเคราะห์ขึ้นได้เมื่อปลานิลได้รับสัมผัสสารกำจัดวัชพืช 2,4-D ตั้งแต่ 7-28 วัน การศึกษาโดยใช้เทคนิค SDS-PAGE และเทคนิคเวสเทิร์นบลอต พบว่า ไวเทโลเจนินที่ตรวจสอบได้มี 2 isoform ขนาด 250 และ 220 kDa เมื่อทำการศึกษากการแสดงออกของไวเทโลเจนินในปลาบริเวณอ่างเก็บน้ำห้วยเสนง อำเภอเมืองสุรินทร์ จังหวัดสุรินทร์ และในฟาร์มปลาเอกชน พบว่า ไม่มีการแสดงออกของไวเทโลเจนินในปลา 4 ชนิดที่ทำการศึกษาในบริเวณอ่างเก็บน้ำห้วยเสนง คือ ปลาช่อน ปลาดุกกรสีเขีย ปลาบู่ และปลาดุกลูกผสม แต่เมื่อทำการตรวจสอบการปนเปื้อนของสารกำจัดวัชพืชโดยใช้ชุดทดสอบอย่างง่ายพบว่า ให้ผลบวก ส่วนศึกษาการแสดงออกของไวเทโลเจนินในปลานิลจากฟาร์มเอกชน พบว่า มีการแสดงออกในทุกตัวอย่าง สอดคล้องกับผลการตรวจสอบการปนเปื้อนของสารกำจัดวัชพืชในน้ำที่ให้ผลบวกเช่นเดียวกัน จากข้อมูลงานวิจัยข้างต้นมีแนวโน้มว่าสารกำจัดวัชพืช 2,4-D ไคเมทิลแอมโมเนียมสามารถเหนี่ยวนำการสังเคราะห์ไวเทโลเจนินในปลาได้ ดังนั้นควรมีการวางแผนและเฝ้าระวังการปนเปื้อนของสารกำจัดวัชพืชดังกล่าวในแหล่งน้ำและในปลาน้ำจืดเพราะอาจจะส่งผลกระทบต่อจำนวนประชากรปลาและระบบนิเวศในแหล่งน้ำธรรมชาติได้

เอกสารอ้างอิง

- ไชยวัฒน์ นวลขาว, พชร มงคลวัย, สำเนา เสาวกุล, พงจิต นันทนาวัฒน์, จันทรพิมพ์ กังพานิช, อำนวย วัฒนกรสิริ และ ชุตินา ถนอมสิทธิ์. (2564). ผลกระทบของพาราควอตต่อการเปลี่ยนแปลงทางสรีรวิทยา การแสดงออกของอะซิติลโคลีนเอสเตอเรสและการเปลี่ยนแปลงเนื้อเยื่อวิทยาของปลานิล. ใน การประชุมวิชาการระดับชาติ “ราชชมงคลสุรินทร์ ครั้งที่ 12 วิจัยและนวัตกรรมเพื่อพัฒนาเศรษฐกิจวิถีใหม่” 16-17 กันยายน 2564. มหาวิทยาลัยเทคโนโลยี ราชชมงคลอีสาน วิทยาเขตสุรินทร์. สุรินทร์. F20 – F32.
- พงจิต นันทนาวัฒน์. (2558). ไวเทโลเจนิน : ตัวชี้วัดทางชีวภาพสำหรับการปนเปื้อนสารรบกวนการทำงานของต่อมไร้ท่อในแหล่งน้ำ. วารสารวิทยาศาสตร์บูรพา. 20(1): 201-208.
- พงจิต นันทนาวัฒน์, นันทิกา คงเจริญพร และศุภกิจ ศรีสวัสดิ์. (2559). การพัฒนาโมโคโนลแอนติบอดีจำเพาะต่อไวเทโลเจนินในปลากระพงขาว (*Lates calcarifer* Bloch). รายงานการวิจัยฉบับสมบูรณ์. คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา ชลบุรี.
- วิชาดา จงมีวาสนา และรัตติยากร ไชยพลงาม. (2548). การปนเปื้อนของสารเคมีกำจัดแมลงเอนซัลแฟนในน้ำประปา. วารสารกรมวิทยาศาสตร์การแพทย์. 47(3): 202-212.
- วิชชุดา ประสาทแก้ว และพงจิต นันทนาวัฒน์. (2561). การพัฒนาเทคนิคคอบลอตเพื่อตรวจสอบไวเทโลเจนินสำหรับใช้เป็นตัวชี้วัดทางชีวภาพของสารรบกวนการทำงานของต่อมไร้ท่อ. วารสารวิทยาศาสตร์บูรพา. 23(3): 1448-1457.

- สำนักควบคุมพืชและวัสดุการเกษตร. (2567). สรุปการนำเข้าวัตถุดิบอันตรายทางการเกษตร ปี 2566 10 อันดับ. กรมวิชาการเกษตร กระทรวงเกษตรและสหกรณ์. ค้นเมื่อ 4 มิถุนายน 2567. <https://www.doa.go.th/ard/wp-content/uploads/2024/04/5-รายงานสรุปการนำเข้าวัตถุดิบอันตรายทางการเกษตร-ปี-พ.ศ.-2566-ประเภท.pdf>.
- สุรัสวดี แพทย์รังษี, วิชชุดา ประสาทแก้ว และพอลจิต นันทนาวัฒน์. (2560). ผลของโนนินฟีนอลต่อการชักนำไวเทิลโลเจนินในปลากระพงขาววัยอ่อน. วารสารวิทยาศาสตร์บูรพา. 22(ฉบับพิเศษ): 195-202.
- อุไรวรรณ อินทร์ม่วง. (2545). มลพิษทางน้ำ. พิมพ์ครั้งที่ 1. สำนักพิมพ์มหาวิทยาลัยขอนแก่น: ขอนแก่น.
- อุทุมพร สมพงษ์. (2564). การศึกษาชนิดและปริมาณสารกำจัดศัตรูพืชตกค้างในน้ำบริเวณพื้นที่เกษตรกรรมของกรุงเทพมหานครฝั่งธนบุรี. วารสารวิชาการชาชนมฤ. 5(2): 17-30.
- Akers J.T., Johnston M.F. and Haasch M.L. (2000). Immunodetection of hepatic peroxisomal PMP70 as an indicator of peroxisomal proliferation in the ummichog, *Fundulus heteroclitus*. Marine Environmental Research. 50: 361-365.
- Ateq B., Farah M.A. and Ahmad W. (2006). Evidence of apoptic of 2,4-D and butachlor on walking catfish, *Clarias batrachus*, by transmission electron microscopy and DNA degradation studies. Lift Sciences. 78: 977-986.
- Campbell D.G., Borglin S.E., Green F.B., Grayson A., Wozel E. and Stringfellow W.T. (2006). Biologically directed environmental monitoring, fate, and transport of estrogenic endocrine disrupting compounds in water: A review. Chemosphere. 65(8): 1265-1280.
- Garnayak S.K., Mohanty J., Rao T.V., Sahoo S.K. and Sahoo P.K. (2013). Vitellogenin in Asian catfish, *Clarias batrachus*: Purification, partial characterization and quantification during the reproductive cycle by ELISA. Aquaculture. 392-395: 148-155.
- Gupta P. and Verma S.K. (2020). Impacts of herbicide pendimethalin on sex steroid level, plasma vitellogenin concentration and aromatase activity in teleost *Clarias batrachus* Linnaeus. Environmental Toxicology and Pharmacology. 75(3): 103324.
- Hock B., Marx A., Sherry J. and Hansen P.D. (2001). A new monoclonal antibody against vitellogenin from rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). Chemosphere. 44: 393-399.
- Ishibashi H., Tachibana K., Tsuchimoto M., Soyano K., Ishibashi Y., Tominaga N. and Arizono K. (2001). In vivo testing system for determining the estrogenic activity of endocrine-disrupting chemicals (EDCs) in goldfish (*Carassius auratus*). Journal of Health Science. 47(2): 213-218.
- Mahapatra S., Kabita S.K., Bhattacharya D., Sarkar S., Juin S.K., Maitra S. and Nath P. (2017). Purification and development of ELISAs for two forms of vitellogenin in Indian walking catfish, *Clarias batrachus* (L.). Fish Physiology and Biochemistry. 43: 477-491.
- Marin M.G.M. and Matozzo V. (2004). Vitellogenin induction as a biomarker of exposure estrogenic compounds in aquatic environmental. Marine Pollution Bulletin. 48: 835-839.
- Nicolas J.M. (1999). Vitellogenin in fish and the effects of PAH contaminants. Aquatic Toxicology. 45: 77-90.
- Norberg B. and Haux C. (1988). A homologous radioimmunoassay for rainbow trout (*Salmo trutta*) vitellogenin. Fish Physiology and Biochemistry. 5(2): 59-68.

- Okoumassoun L.E., Brochu C., Deblois C., Akponan S., Marion M., Averill-Bates D. and Denizeau F. (2002). Vitellogenin in tilapia male fishes exposed to organochlorine pesticides in Ouémé River in Republic of Benin. *Science of The Total Environment*. 299: 163-172.
- Prasatkaew W., Nanthanawat P. and Thanomsit C. (2019). Assessment of endocrine disrupting chemicals exposure in Sea Bass (*Lates calcarifer*) and wild fishes using vitellogenin as a biomarker. *Environment Asia*. 12(2): 69-78.
- Sarikaya R. and Yilmaz M. (2003). Investigation of acute toxicity and the effect of 2,4-D (2,4-D dichlorophenoxyacetic acid) herbicide on the behavior of the common carp (*Cyprinus carpio* L., 1758; Pisces, Cyprinidae). *Chemosphere*. 52: 195-201.
- Thanomsit C., Wattanakornsiiri A. and Nanthanawat P. (2016a). Effect of glyphosate on fish behavior and histological alteration of gills in Asian Sea bass (*Lates calcarifer*). *Burapha Science Journal*. 21(2): 204-215.
- Thanomsit C., Wattanakornsiiri A. and Nanthanawat P. (2016b). Toxicity evaluation of glyphosate on mortality rate and histological alteration in Black Rice crab. *Burapha Science Journal*. 21(3): 151-165.
- Thanomsit C., Saowakoon S., Wattanakornsiri A., Nanuam J., Prasatkaew W., Nanthanawat P., Monkolvai P. and Chalorchaoenyong W. (2020a). Glyphosate (Roundup) : fate, toxicity assessment and adverse effect on aquatic environment. *Naresuan University Journal: Science and Technology*. 28(1): 65-81.
- Thanomsit C., Nuankaew C., Prasatkaew W., Wattanakornsiri A., Nanuam J., Nanthanawat P., and Kiaprasert P. (2020b). Adverse effects of chlorpyrifos and cypermethrin mixture on physiological alterations and cholinesterase on Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). *Thai Journal of Agricultural Science*. 53(3): 134-148.
- Thanomsit C., Saetiew J. and Meemon P. (2022). Optical coherence tomography as an alternative tool for evaluating the effects of glyphosate on hybrid catfish (*Clarias gariepinus* × *Clarias macrocephalus*). *Toxicology Reports*. 9: 181-190.
- Walker C.H., Hopkin S.P. and Peakall D.B. (2006). *Principle of ecotoxicology*. Publisher: USA.
- Wang J., Bing X., Yu K., Tian H., Wang W. and Ru S. (2015). Preparation of a polyclonal antibody against goldfish (*Carassius auratus*) vitellogenin and its application to detect the estrogenic effects of monocrotophos pesticide. *Ecotoxicology and Environmental Safety*. 11: 109-116.