ผลของสารพิษ Tetrodotoxin จากปลาปักเป้าป่นต่อการเจริญเติบโต และสุขภาพของกุ้งขาว (*Litopenaeus vannamei*)

Effect of Tetrodotoxin from Puffer Fish Meal on Growth Performance and Health Condition in White Shrimp (*Litopenaeus vannamei*)

มัณฑนา ใจเย็น

Manthana Jaiyen

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต

สาขาวิชาวาริชศาสตร์

มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์

A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements for the Degree of

Master of Science in Aquatic Science

Prince of Songkla University

2553

ลิขสิทธิ์ของมหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์

ชื่อวิทยานิพนธ์ ผลของสารพิษ Tetrodotoxin จากปลาปักเป้าปันต่อการเจริญเติบโต และสุขภาพของกุ้งขาว (*Litopenaeus vannamei*)

ผู้เขียน นางสาวมัณฑนา ใจเย็น

สาขาวิชา วาริชศาสตร์

อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก

.....

(รองศาสตราจารย์ ดร.วุฒิพร พรหมขุนทอง)

อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม

.....

(ดร.อมรรัตน์ เสริมวัฒนากุล)

คณะกรรมการสอบ

.....ประธานกรรมการ

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ชุติมา ตันติกิตติ)

.....กรรมการ

(รองศาสตราจารย์ ดร.วุฒิพร พรหมขุนทอง)

.....กรรมการ

(ดร.อมรรัตน์ เสริมวัฒนากุล)

.....กรรมการ

(ดร.สุภฎา คีรีรัฐนิคม)

บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ อนุมัติให้นับวิทยานิพนธ์ฉบับนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษา ตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาวาริชศาสตร์

.....

(รองศาสตราจารย์ ดร.เกริกชัย ทองหนู)

คณบดีบัณฑิตวิทยาลัย

ชื่อวิทยานิพนธ์ ผลของสารพิษ Tetrodotoxin จากปลาปักเป้าป่นต่อการเจริญเติบโต และสุขภาพของกุ้งขาว (*Litopenaeus vannamei*)

ผู้เขียน นางสาวมัณฑนา ใจเย็น

สาขาวิชา วาริชศาสตร์

ปีการศึกษา 2552

บทคัดย่อ

การศึกษาผลของสารพิษ Tetrodotoxin จากปลาปักเป้าป่นต่อการเจริญเติบโตและสุขภาพของกุ้งขาว (*Litopenaeus vannamei*) โดยแบ่งเป็น 6 ชุดการทดลอง ๆ ละ 4 ซ้ำ จำนวน 20 ตัวต่อซ้ำ วางแผนการทดลองแบบสุ่มตลอด โดยมีระดับสารพิษ Tetrodotoxin แตกต่างกัน 6 ระดับคือ 0 (ชุดควบคุม), 1.31, 1.81, 1.97, 2.18 และ 2.64 พีพีเอ็ม นำไปทดลองในกุ้งขาวน้ำหนักเฉลี่ยเริ่มต้น 1.5 กรัมต่อตัว เป็นเวลา 8 สัปดาห์ โดยกุ้งที่ได้รับสารพิษ 2.64 พีพีเอ็ม ที่ 8 สัปดาห์ มีน้ำหนักเฉลี่ยต่อตัว เปอร์เซ็นต์น้ำหนักที่เพิ่มขึ้น อัตราการเจริญเติบโตจำเพาะ และอัตราการรอดตายต่ำกว่ากุ้งกลุ่มอื่น ๆ (0 (ชุดควบคุม), 1.31, 1.81, 1.97 และ 2.18 พีพีเอ็ม) และไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติทุกชุดการทดลอง (p›0.05) ขณะที่กุ้งที่ได้รับสารพิษ Tetrodotoxin ระดับสูงสุด (2.64 พีพีเอ็ม) มีอัตราการเปลี่ยนอาหารเป็นเนื้อสูงกว่ากุ้งกลุ่มอื่น ๆ (0 (ชุดควบคุม), 1.31, 1.81, 1.97 และ 2.18 พีพีเอ็ม) (p›0.05) ซึ่งไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติกับกุ้งที่ได้รับสารพิษ Tetrodotoxin ที่ระดับ 1.81, 2.18 และ 2.64 พีพีเอ็ม แต่มีความแตกต่างกันทางสถิติกับกุ้งที่ได้รับสารพิษ Tetrodotoxin ที่ระดับ 1.31 และ 1.97 (พีพีเอ็ม

ค่าองค์ประกอบเลือดของกุ้งที่ได้รับสารพิษ Tetrodotoxin มีปริมาณเม็ดเลือดรวมทั้งหมด ปริมาณโปรตีนในน้ำเลือด ปริมาณกลูโคสในเลือด และกิจกรรมเอนไซม์ฟีนอลออกซิเดสของกุ้งขาวมีแนวโน้มลดลงในกุ้งที่ได้รับสารพิษ ในระดับสูง แต่ไม่พบการตกค้างของสารพิษ Tetrodotoxin ในตัวกุ้งขาว

จากการศึกษาทางเนื้อเยื่อของกุ้งขาวทดลอง พบการเปลี่ยนแปลงทางพยาธิสภาพของเซลล์ตับในกุ้งทดลองที่ได้รับสารพิษ Tetrodotoxin 1.81, 1.97, 2.18 และ 2.64 พีพีเอ็ม โดยพบการฝ่อและลีบของเซลล์ท่อตับ เซลล์สะสมอาหารลดขนาดลง (atrophy of R-cell) อีกทั้งเกิดการสลายตัวของเซลล์ท่อตับ (degeneration of tubule) และเซลล์ตาย (cell necrosis) การเปลี่ยนแปลงของเนื้อเยื่อตับมีความรุนแรงที่สัมพันธ์กับระดับความเข้มข้นของสารพิษแปรผันตรงต่อระยะเวลาที่กุ้งได้รับ แต่ไม่พบความผิดปกติของ อวัยวะสร้างเม็ดเลือด เนื้อเยื่อเหงือกและกล้ามเนื้อลำตัวตลอดการทดลอง

Thesis Title	Effect of Tetrodotoxin from Puffer Fish Meal on Growth Performance and Health Condition in White Shrimp (*Litopenaeus vannamei*)
Author	Miss Manthana Jaiyen
Major Program	Aquatic Science
Academic Year	2009

Abstract

The effects of tetrodotoxin (TTX) from puffer fish meal on growth performance and health condition was conducted in white shrimp (*Litopenaeus vannamei*). This trial comprised 6 treatments with 4 replications each. 20 shrimp were released in each aquarium and the water volume was maintained at 180 litre. Completely randomized design was employed in the study in which the TTX levels were adjusted by the inclusion of puffer fish meal in the normal fish meal. The TTX concentrations were 0, 1.31, 1.81, 1.97, 2.18 and 2.64 ppm for treatments 1 to 6, respectively. A control diet was prepared using normal fishmeal without the inclusion of puffer meal.

The results obtained from this study suggested that the inclusion of TTX at the level of 2.64 ppm provided the lowest weight gain as well as the worst feed efficiency. Furthermore, shrimp fed diets with TTX supplementation 2.64 ppm caused the reduction in total blood cell counts, protein in haemolymph and phenoloxidase activity. At the termination period, TTX was not detected in whole body shrimp.

Histological changes were observed as for pathological condition of liver in specimens given 1.81, 1.97, 2.18 and 2.64 ppm tetrodotoxin. Artrophy of hepatic tubules and R-cell which followed by degeneration of kidney tubules and necrosis Blood forming cells. However more severe changes occurred in hepatic tissue with severity correlated with levels of toxins and time of exposure. No histological changes were observed for hemopoietic tissue, gill tissues and body musculature during the study.

กิตติกรรมประกาศ

ผู้เขียนขอขอบพระคุณ รองศาสตราจารย์ ดร.วุฒิพร พรหมขุนทอง ประธานกรรมการที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ ที่กรุณาให้คำปรึกษา ช่วยเหลือ และสนับสนุนในการค้นคว้าวิจัย รวมทั้งกรุณาแก้ไขข้อบกพร่องต่างๆ จนกระทั่งวิทยานิพนธ์ฉบับนี้สำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยดี ขอขอบพระคุณรองศาสตราจารย์ ดร.กิจการ ศุภมาตย์ ผู้ให้คำแนะนำ ปรึกษา ตลอดจนวางแผนการทดลองเมื่อเริ่มต้น อันเป็นประโยชน์อย่างยิ่งในการดำเนินการวิจัย และขออุทิศคุณความดีของงานวิจัยนี้แด่ท่านที่ได้ล่วงลับไปแล้ว

ขอขอบพระคุณ ผู้เชี่ยวชาญ ดร. อมรรัตน์ เสริมวัฒนากุล กรรมการที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ที่กรุณาตรวจแก้ไขวิทยานิพนธ์ ตลอดจนแนวทางปฏิบัติในการทำวิจัย รวมทั้งความอนุเคราะห์ในอีกหลายๆ เรื่อง จนกระทั่งวิทยานิพนธ์ฉบับนี้สำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยดี

ขอขอบพระคุณ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ชุติมา ตันติกิตติ ประธานกรรมการสอบวิทยานิพนธ์ และ ดร. สุภฎา คีรีรัฐนิคม กรรมการการสอบวิทยานิพนธ์ ที่กรุณาให้คำแนะนำเพิ่มเติม ตลอดจนแก้ไขข้อบกพร่องต่างๆ แก่วิทยานิพนธ์ฉบับนี้ให้มีความสมบูรณ์ยิ่งขึ้น ขอขอบคุณ บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ และคณะทรัพยากรธรรมชาติ ที่ให้ทุนอุดหนุนในการทำวิจัย

ขอขอบพระคุณดร. มะลิ บุณยรัตผลิน ที่ปรึกษากรมประมง คุณไพบูลย์ บุญลิปตานนท์ คุณสุภาพ ไพรพนาพงศ์ คุณพัชรี ซุ่นสั้น เจ้าหน้าที่ศูนย์วิจัยและพัฒนาประมงชายฝั่ง กระบี่ ที่ให้คำแนะนำและให้ความอนุเคราะห์ในด้านต่าง ๆสำหรับการทำงานวิจัยในครั้งนี้

ขอขอบพระคุณรองศาสตราจารย์ ดร.พิมพ์ใจ ใจเย็น ที่ให้คำแนะนำในการเขียนวิทยานิพนธ์ ทำให้งานนี้มีความสมบูรณ์ยิ่งขึ้น

ขอขอบพระคุณ คุณลัดดาวัลย์ โรจนพรรณทิพย์ คุณพนาวัลย์ กลึงกลางดอน เจ้าหน้าที่สำนักคุณภาพและความปลอดภัยอาหาร กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ กระทรวงสาธารณสุข และคุณจิราภา เสฐจินตนิน เจ้าหน้าที่ศูนย์วิทยาศาสตร์การแพทย์ จังหวัดสมุทรสงคราม ที่ให้คำแนะนำและวิธีการวิเคราะห์สารพิษ Tetrodotoxin และให้ความช่วยเหลือในการจัดหาปลาปักเป้าที่มีความเข้มข้นของสารพิษสูง

ขอขอบพระคุณ ดร. นเรศ ซ่วนยุก คุณสุณีย์ หวันเหล็ม คุณกิตติชนม์ อุเทนะพันธุ์ คุณบุญกอบ วิริยะพงศ์สุธี คุณจิรวัฒน์ ทัดแก้ว คุณสุพัตรา อรุณรัตน์ คุณบุศรินทร์ วินิจ คุณนุชรี สงสกุล คุณสุชัญญา มรรคาเขต และคุณสุเชษฐ์ หมู่สิกะเภรี สำหรับคำแนะนำและความช่วยเหลือในด้านต่างๆ ตลอดการทำวิจัย รวมทั้งเพื่อนนักศึกษาปริญญาโททุกท่าน

ขอขอบคุณเจ้าหน้าที่ศูนย์วิจัยสุขภาพสัตว์น้ำ เจ้าหน้าที่ภาควิชาวาริชศาสตร์ คณะทรัพยากรธรรมชาติ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ วิทยาเขตหาดใหญ่

สุดท้ายนี้ขอกราบขอบพระคุณบิดา มารดา รวมทั้งขอบคุณน้องๆ ของข้าพเจ้า ที่คอยเป็นแรงใจและสนับสนุนทุนตลอดระยะเวลาที่ทำการศึกษา จนทำให้ผู้เขียนประสบความสำเร็จในการศึกษาในครั้งนี้ ตลอดจนขอขอบคุณทุกๆ ท่านที่ไม่ได้เอ่ยนามในครั้งนี้ ที่ทำให้วิทยานิพนธ์ฉบับนี้สำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยดี

สารบัญ

	หน้า
สารบัญ	(7)
รายการตาราง	(10)
รายการภาพประกอบ	(11)
รายการตารางภาคผนวก	(13)
บทที่	
1. บทนำ	1
บทนำต้นเรื่อง	1
ตรวจเอกสาร	3
1. กุ้งขาว	3
1.1 ถิ่นที่อยู่อาศัยและการแพร่กระจาย	3
1.2 ลักษณะของกุ้งขาววานาไม	4
1.3 ลักษณะอุปนิสัย	5
1.4 วงจรชีวิตและการสืบพันธุ์	5
1.5 การเจริญเติบโตและการลอกคราบ	6
1.6 อุปนิสัยการกินอาหาร	6
1.7 ประเมินสถานการณ์ด้านการตลาดและการผลิตกุ้ง	7
ประเมินสถานการณ์การผลิตกุ้ง	7
อุตสาหกรรมกุ้งไทย	7
2.ปลาปักเป้า	8
2.1 วิธีสังเกตเนื้อปลาปักเป้า กับเนื้อปลากะพง	9
2.2 Tetrodotoxin	11
2.3 คุณสมบัติของ Tetrodotoxin	11
2.4 คุณสมบัติความเป็นพิษของ Tetrodotoxin	11
2.5 ผลจากสารพิษ	13
2.6 กลไกการสร้างและการสะสมสารพิษในสัตว์น้ำ	15
2.7 การแพร่กระจายของ Tetrodotoxin ในธรรมชาติ	19

สารบัญ (ต่อ)

	หน้า
2.8 ความเป็นพิษและความต้านทานต่อสารพิษ Tetrodotoxin ในสัตว์น้ำ	22
2.9 การปนเปื้อนสารพิษ Tetrodotoxin ในปลาปัก	23
วัตถุประสงค์ของการวิจัย	25
2. วัสดุ อุปกรณ์และวิธีการทดลอง	26
1. วัสดุ	26
2. อุปกรณ์	26
3. สารเคมี	28
4. วิธีการทดลอง	28
4.1 การเตรียมอุปกรณ์การทดลอง	28
4.2 การเตรียมสัตว์ทดลอง	28
4.3 การเตรียมอาหารทดลอง	28
4.4 แผนการทดลองและการเก็บรวบรวมข้อมูล	31
4.5 การเก็บรวบรวมข้อมูล	32
4.5.1 ศึกษาผลของสารพิษ Tetrodotoxin จากปลาปักเป้าปนต่อเจริญเติบโตของกุ้งขาว	32
4.5.2 การตรวจสอบสุขภาพของกุ้งขาว	32
4.5.2.1 การศึกษาองค์ประกอบเลือด	32
4.5.2.2 การศึกษาการเปลี่ยนแปลงเนื้อเยื่อของกุ้งขาว	33
4.5.3 การวิเคราะห์สารพิษตกค้างในกุ้งขาว	33
4.6 การวิเคราะห์ข้อมูล	33
3. ผลการทดลอง	34
3.1 ผลของสารพิษ Tetrodotoxin จากปลาปักเป้าปนต่อการเจริญเติบโตของกุ้งขาว	34
3.1.1 องค์ประกอบทางเคมีของอาหารทดลอง	34
3.1.2 การเจริญเติบโตและอัตราการรอดตายของกุ้งขาว	34
3.1.3 องค์ประกอบทางโภชนาการของกุ้งขาวทั้งตัว	40
3.2 ผลของสารพิษ Tetrodotoxin จากปลาปักเป้าปนต่อสุขภาพของกุ้งขาว	41
3.2.1 ผลการศึกษาองค์ประกอบเลือดของกุ้งขาว	41

สารบัญ (ต่อ)

	หน้า
3.2.2 ผลของสารพิษ Tetrodotoxin จากปลาปักเป้าปนต่อการเปลี่ยนแปลงทางพยาธิสภาพของเนื้อเยื่อกุ้งขาว	45
3.3 ผลการวิเคราะห์สารพิษ Tetrodotoxin ที่ตกค้างในตัวกุ้งหลังจากได้รับสารพิษ Tetrodotoxin ที่ระดับต่างๆ เป็นระยะเวลา 8 สัปดาห์	54
4. วิจารณ์ผลการทดลอง	55
5. สรุปและข้อเสนอแนะ	59
เอกสารอ้างอิง	61
ภาคผนวก ก	67
ภาคผนวก ข	81
ภาคผนวก ค	82
ประวัติผู้เขียน	96

สารบัญตาราง

ตารางที่	หน้า
1. ความแตกต่างระหว่างลูกกุ้งขาวและลูกกุ้งแชบ๊วยระยะโพสลาวา 10 ขึ้นไป	4
2. ความแตกต่างระหว่างกุ้งขาวและกุ้งแชบ๊วยระยะวัยรุ่น	4
3. แบคทีเรียชนิดต่างๆ ที่ตรวจพบสารพิษ Tetrodotoxin โดยวิธี HPLC และ GC-MS	16
4. การแพร่กระจายของสารพิษ Tetrodotoxin ในสัตว์นอกเหนือจากปลาปักเป้า	21
5. ความสามารถในการต้านทานพิษ Tetrodotoxin ในสัตว์น้ำชนิดต่าง	22
6. ส่วนประกอบและปริมาณวัตถุดิบในอาหารแต่ละสูตรของการทดลองสารพิษ Tetrodotoxin	31
7.องค์ประกอบทางเคมีของอาหารทดลอง บนฐานน้ำหนักแห้ง	34
8. การเจริญเติบโตของกุ้งขาวที่ได้รับอาหารปนเปื้อนสารพิษ Tetrodotoxin ที่ระดับต่างๆ เป็น ระยะเวลา 8 สัปดาห์ (หน่วยเป็นกรัม)	35
9. เปอร์เซ็นต์น้ำหนักที่เพิ่มขึ้น อัตราการเจริญเติบโตจำเพาะ อัตราการเปลี่ยนอาหารเป็นเนื้อ ปริมาณอาหารที่กุ้งกิน และอัตราการรอดตายของกุ้งขาวที่ได้รับ อาหารปนเปื้อนสารพิษ Tetrodotoxin ที่ระดับต่างๆ เป็นระยะเวลา 8 สัปดาห์	37
10. องค์ประกอบทางโภชนาการของกุ้งขาวทั้งตัวหลังให้อาหารทดลองเป็นเวลา 8 สัปดาห์ [1] (% บนน้ำหนักแห้ง)	41
11. ค่าองค์ประกอบเลือดของกุ้งขาวที่ได้รับอาหารปนเปื้อนสารพิษ Tetrodotoxin ในอาหารที่ระดับต่างๆ เป็นระยะเวลา 8 สัปดาห์	43
12. ลักษณะความผิดปกติของกุ้งขาวหลังจากได้รับสารพิษ Tetrodotoxin ที่ระดับต่างๆ เป็นระยะเวลา 4 สัปดาห์	47
13. ลักษณะความผิดปกติของกุ้งขาวหลังจากได้รับสารพิษ Tetrodotoxin ที่ระดับต่างๆ เป็นระยะเวลา 8 สัปดาห์	48
14. แสดงผลการวิเคราะห์สารพิษ Tetrodotoxin ที่ตกค้างในตัวกุ้งหลังจากได้รับสารพิษ Tetrodotoxin ที่ระดับต่างๆ เป็นระยะเวลา 8 สัปดาห์	54

รายการภาพประกอบ

ภาพประกอบที่ **หน้า**

1. การเปรียบเทียบเนื้อปลาปักเป้าที่แล่ด้านข้างลำตัวและด้านในของลำตัว 9
2. การเปรียบเทียบเนื้อปลากะพงและเนื้อปลาปักเป้า 10
3. การเปรียบเทียบเนื้อปลากะพงและเนื้อปลาปักเป้า 10
4. โครงสร้างของสาร Tetrodotoxin 11
5. การขัดขวางการทำงานของโซเดียม 12
6. กลไกการสะสมของสารพิษ Tetrodotoxin ในสัตว์น้ำในทะเล 16
7. เปอร์เซ็นต์น้ำหนักที่เพิ่มขึ้นของกุ้งขาวหลังจากได้รับอาหารปนเปื้อนสารพิษ Tetrodotoxin ที่ระดับต่างๆ เป็นเวลา 8 สัปดาห์ 38
8. อัตราการเจริญเติบโตจำเพาะ (เปอร์เซ็นต์ต่อวัน) ของกุ้งขาวหลังจากได้รับอาหารปนเปื้อนสารพิษ Tetrodotoxin ที่ระดับต่างๆ เป็นเวลา 8 สัปดาห์ 38
9. อัตราการเปลี่ยนอาหารเป็นเนื้อของกุ้งขาวหลังจากได้รับอาหารปนเปื้อนสารพิษ Tetrodotoxin ที่ระดับต่างๆ เป็นเวลา 8 สัปดาห์ 39
10. อัตราการรอดตายของกุ้งขาวหลังจากได้รับอาหารปนเปื้อนสารพิษ Tetrodotoxin ที่ระดับต่างๆ เป็นเวลา 8 สัปดาห์ 39
11. ปริมาณเม็ดเลือดทั้งหมดของกุ้งขาวหลังจากได้รับอาหารปนเปื้อนสารพิษ Tetrodotoxin ที่ระดับต่างๆ เป็นเวลา 8 สัปดาห์ 43
12. ปริมาณโปรตีนในน้ำเลือดของกุ้งขาวหลังจากได้รับอาหารปนเปื้อนสารพิษ Tetrodotoxin ที่ระดับต่างๆ เป็นเวลา 8 สัปดาห์ 44
13. ปริมาณกลูโคสในเลือดของกุ้งขาวหลังจากได้รับอาหารปนเปื้อนสารพิษ Tetrodotoxin ที่ระดับต่างๆ เป็นเวลา 8 สัปดาห์ 44
14. กิจกรรมของเอนไซม์ฟีนอลออกซิเดสในเลือดของกุ้งขาวหลังจากได้รับอาหารปนเปื้อนสารพิษ Tetrodotoxin ที่ระดับต่างๆ เป็นเวลา 8 สัปดาห์ 45
15. เนื้อเยื่อตับกุ้งขาวปกติ (ชุดควบคุม) โครงสร้างตับปกติ เซลล์เรียงตัวเป็นระเบียบ (Lum = Lumen; H&E, Bar = 100 μm) 49
16. เนื้อเยื่อตับกุ้งขาวที่ได้รับสารพิษ Tetrodotoxin 2.18 พีพีเอ็ม เป็นระยะเวลา 4 สัปดาห์ พบเซลล์ตับเกิดการฝ่อและลีบ (artrophy) เริ่มมีเม็ดเลือดแทรกอยู่ระหว่างท่อตับ (infiltration of hemocyte) (H&E, Bar = 50 μm) 49

รายการภาพประกอบ (ต่อ)

ภาพประกอบที่ **หน้า**

17. เนื้อเยื่อตับกุ้งขาวที่ได้รับสารพิษ Tetrodotoxin 2.18 พีพีเอ็ม เป็นระยะเวลา 4 สัปดาห์ พบเซลล์ตับเกิดการฝ่อและลีบ (artrophy) ไม่พบ R-cell และ B-cell การสะสม อาหารและการสร้างน้ำย่อยลดลง (H&E, Bar = 50 μm) 50
18. เนื้อเยื่อตับกุ้งขาวที่ได้รับสารพิษ Tetrodotoxin 2.64 พีพีเอ็ม เป็นระยะเวลา 4 สัปดาห์ พบเซลล์ตับเกิดการฝ่อและลีบ (artrophy) เริ่มมีเม็ดเลือดแทรกอยู่ระหว่างท่อตับ (infiltration of hemocyte) (H&E, Bar = 50 μm) 50
19. เนื้อเยื่อตับกุ้งขาวที่ได้รับสารพิษ Tetrodotoxin 1.81 พีพีเอ็ม เป็นระยะเวลา 8 สัปดาห์ พบการแทรกตัวของเม็ดเลือดระหว่างท่อตับ (infiltration of haemocyte) (H&E, Bar = 10 μm) 51
20. เนื้อเยื่อตับกุ้งขาวที่ได้รับสารพิษ Tetrodotoxin 1.97 พีพีเอ็ม เป็นระยะเวลา 8 สัปดาห์ พบว่าเกิดการเสื่อมสลายของเซลล์ท่อตับ (degeneration) การแทรกตัวของเม็ดเลือดระหว่างท่อตับ (infiltration of haemocyte) (H&E, Bar = 10 μm) 51
21. เนื้อเยื่อตับกุ้งขาวที่ได้รับสารพิษ Tetrodotoxin 2.18 พีพีเอ็ม เป็นระยะเวลา 8 สัปดาห์ พบว่าเซลล์ตับมีขนาดเล็กลง (atrophy) พบ R-cell จำนวนน้อย การสะสมอาหารลดลง (ศรชี้) (H&E, Bar = 50 μm) 52
22. เนื้อเยื่อตับกุ้งขาวที่ได้รับสารพิษ Tetrodotoxin 2.18 พีพีเอ็ม เป็นระยะเวลา 8 สัปดาห์ พบเกิดการฝ่อและลีบของเซลล์ท่อตับ (atrophy) R-cell และ B-cell จำนวนน้อยการสะสมอาหารและการสร้างน้ำย่อยลดลง (H&E, Bar = 50 μm) 52
23. เนื้อเยื่อตับกุ้งขาวที่ได้รับสารพิษ Tetrodotoxin 2.64 พีพีเอ็ม เป็นระยะเวลา 8 สัปดาห์ พบเกิดการการแทรกตัวของเม็ดเลือดระหว่างท่อตับ (infiltration of haemocyte) (H&E, Bar = 50 μm) 53
24. เนื้อเยื่อตับกุ้งขาวที่ได้รับสารพิษ Tetrodotoxin 2.64 พีพีเอ็ม เป็นระยะเวลา 8 สัปดาห์ พบว่าเกิดการเสื่อมสลายของเซลล์ท่อตับ (degeneration) การแทรกตัวของเม็ดเลือดระหว่างท่อตับ (infiltration of haemocyte) (H&E, Bar = 50 μm) 53

รายการตารางภาคผนวก

ตารางภาคผนวกที่	**หน้า**
ก. สารเคมีและวิธีวิเคราะห์	65
ข. 1 คุณภาพน้ำตลอดการทดลองในการเลี้ยงกุ้งขาวในตู้ทดลอง เป็นระยะเวลา 8 สัปดาห์ (4/05/52-22/06/52)	78
ค. 1 ผลการวิเคราะห์ความแปรปรวนทางสถิติของการเจริญเติบโตของกุ้งขาว	79

บทที่ 1
บทนำ

บทนำต้นเรื่อง

ประเทศไทยมีการทำการประมงเป็นอันดับต้นๆ ของโลก มีการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำและจับสัตว์น้ำส่งออกเป็นจำนวนมาก แต่ก็ยังพบปัญหาเกี่ยวกับโรคสัตว์น้ำซึ่งสามารถเกิดจากเชื้อต่างๆ เช่น ไวรัส แบคทีเรีย รา และปรสิต แต่ในปัจจุบันมีอีกปัญหาหนึ่งที่มีความสำคัญคือ สารพิษที่ปนเปื้อนมากับตัวสัตว์น้ำ ซึ่งส่งผลกระทบต่อตัวสัตว์น้ำเองรวมทั้งผู้บริโภค เนื่องจากการนำวัตถุดิบสัตว์น้ำมาใช้ทำเป็นปลาป่นซึ่งเป็นแหล่งโปรตีนที่สำคัญของสัตว์น้ำในปัจจุบัน มีอัตราการเสี่ยงที่จะเกิดการปนเปื้อนของสารพิษจากสัตว์น้ำที่ใช้เป็นวัตถุดิบ ปลาป่นคุณภาพดีต้องใช้วัตถุดิบเป็นปลาที่มีคุณภาพดี ในอดีตมีปลาในทะเลจำนวนมากจึงทำให้สามารถคัดเลือกปลาก่อนเข้าโรงงานปลาป่นได้ ปลาที่นำมาทำเป็นปลาป่นคือ ปลาแป้น ปลาวัว ปลาข้างเหลือง ปลาทูเล็ก ปลาหลังเขียว และปลาทูแขก (วีระ, 2551) แต่ก็พบว่าในปัจจุบันปลาในทะเลได้ลดจำนวนลงจึงไม่สามารถที่จะคัดเลือกปลาก่อนนำเข้าโรงงานปลาป่นได้ มีการนำปลาทุกชนิดที่ได้มาทำเป็นปลาป่น เพราะความต้องการปลาป่นในอุตสาหกรรมสัตว์น้ำสูง จึงทำให้ปลาปักเป้าเป็นปลาอีกชนิดที่นำมาทำเป็นปลาป่นในโรงงานอุตสาหกรรม ซึ่งในโรงงานอุตสาหกรรมนั้นไม่สามารถที่จะแยกชนิดปลาได้เพราะมีปริมาณปลาเป็นจำนวนมากและจะเสียเวลา จึงทำให้ปลาปักเป้าสามารถผสมอยู่รวมกับปลาชนิดอื่นได้ ดังนั้นปลาปักเป้าที่จับได้มีโอกาสเสี่ยงที่จะมีการปนเปื้อนสารพิษ Tetrodotoxin ในปริมาณค่อนข้างสูง คุณสมบัติของสารพิษชนิดนี้เป็นสารพิษที่ออกฤทธิ์ทำลายระบบประสาทและกล้ามเนื้อเคลื่อนไหวชนิดรุนแรง ผู้ที่ได้รับพิษอาจแสดงอาการภายในระยะเวลาอันสั้นและอาจเสียชีวิตได้ในเวลาไม่กี่ชั่วโมง การรักษาในปัจจุบันนี้ไม่มียารักษาใดๆ ที่สามารถนำมาใช้รักษาพิษนี้ได้ พิษของปลาปักเป้านี้มีโครงสร้างที่ทนความร้อนได้สูงมาก (จักรพันธ์, 2542)ซึ่งความร้อนที่ใช้ในการผลิตปลาป่นในโรงงานอุตสากรรมรวมทั้งกระบวนการผลิตอาหารสัตว์นั้นไม่สามารถที่จะทำลายสารพิษชนิดนี้ให้หมดไปได้หากมีการปนเปื้อนของสารพิษนี้ในปลาป่น และที่สำคัญมีรายงานการวิจัยที่ชี้ให้เห็นว่าการสะสมและการถ่ายทอดสารพิษชนิดนี้ผ่านระบบห่วงโซ่อาหารได้ ดังนั้นหากปลาที่ทำการเพาะเลี้ยงโดยใช้อาหารที่มีการปนเปื้อนสารพิษ Tetrodotoxin ย่อมส่งผลอันตรายต่อผู้บริโภคสัตว์น้ำอย่างหลีกเลี่ยงไม่ได้เนื่องจากสัตว์น้ำเป็นที่นิยมและต้องการบริโภคค่อนข้างสูง การศึกษาผลของสารพิษ Tetrodotoxin สามารถนำมาเป็นแนวทางในการลดอัตราการสูญเสียทางเศรษฐกิจและเพิ่มคุณภาพผลผลิตด้านการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำได้อย่างดียิ่ง

การศึกษาครั้งนี้มีวัตถุประสงค์ศึกษาผลของสารพิษ Tetrodotoxin ที่ปนเปื้อนในอาหารต่อการเจริญเติบโต การรอดตาย องค์ประกอบเลือด และเนื้อเยื่อวิทยาของกุ้ง ซึ่งในปัจจุบันยังไม่พบรายงานการวิจัย ดังนั้นรายละเอียดเหล่านี้สามารถนำไปเป็นข้อมูลพื้นฐานสำหรับเป็นแนวทางในการศึกษาด้านโรคที่เกิดจากสารพิษ Tetrodotoxin ในสัตว์น้ำได้ครอบคลุมยิ่งขึ้น และสามารถป้องกันโรคที่เกิดขึ้นต่อสุขภาพคนและสัตว์น้ำ รวมทั้งลดการสูญเสียทางเศรษฐกิจได้ทันเหตุการณ์เพื่อพัฒนาอุตสาหกรรมอาหารสัตว์และการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำที่ยั่งยืนต่อไปในอนาคต

ตรวจเอกสาร

1. กุ้งขาว (Pacific white shrimp)

อนุกรมวิธานของกุ้งขาวจัดจำแนกโดย Brock และ Main (1994)

Phylum Arthropoda

Class Crustacea

Subclass Malacostraca

Order Decapoda

Suborder Dendrobrachiata

Superfamily Penaeoidea

Family Penaeidae

Genus *Penaeues*

Subgenus *Litopenaeus*

Species *vannamei*

กุ้งขาววานาไม (*Litopenaeus vannamei*) เป็นกุ้งสายพันธุ์หลักของทวีปอเมริกา ค้นพบโดย Boone ในปี ค.ศ. 1931 มีชื่อเรียกหลายภาษาเช่นภาษาสเปนเรียก Camaron Patiblance ภาษาอังกฤษเรียก Whiteleg Shrimp ภาษาฝรั่งเศสเรียก Crevette Pattes Blanches นอกจากนี้ยังมีชื่อทางการค้าที่เรียกตามแหล่งที่พบหรือลักษณะรูปร่างที่ปรากฏ เช่น ในประเทศสหรัฐอเมริกาเรียก West Coast White Shrimp หรือ Whiteleg Shrimp ในประเทศโคลัมเบียเรียก Camaron Caf หรือ Camaron Blanco ในประเทศเม็กซิโกเรียก Camaron Blance ในประเทศอินโดนีเซียเรียก Vannamei สำหรับชื่อภาษาอังกฤษโดยทั่วไปจะเรียก Whiteleg, Pacific White, Mexican White, Ecuadoran White เป็นต้น ในธรรมชาติจะพบกุ้งขาววานาไมได้ตั้งแต่ชายฝั่งทะเลของประเทศเม็กซิโกจนถึงชายฝั่งทะเลของประเทศเปรู ซึ่งเป็นเขตที่มีอุณหภูมิของน้ำประมาณ 26-28 องศาเซลเซียส (อุณหภูมิเฉลี่ยทั้งปีสูงกว่า 20 องศาเซลเซียส) และมีความเค็มประมาณ 35 พีพีที (ปิยะบุตร, 2545)

1.1 ถิ่นที่อยู่อาศัยและการแพร่กระจาย

กุ้งขาววานาไมเป็นกุ้งพื้นเมืองที่กระจายอยู่ในทะเลของประเทศกลุ่มแปซิฟิกจากนอกชายฝั่งทางเอเชียตะวันออกเฉียงใต้ถึงชายฝั่งแปซิฟิกของทวีปอเมริกาเหนือถึงทวีปอเมริกาใต้ โดยปกติแล้วจะพบมากในแถบประเทศปานามาและพบการกระจายทั่วไปตามชายฝั่งตะวันออกของ

มหาสมุทรแปซิฟิกจากเม็กซิโกไปถึงตอนเหนือของประเทศเปรู มีรายงานว่าพ่อแม่พันธุ์ที่นำมาเพาะเลี้ยงพบได้ตั้งแต่ไหล่ทวีปจนถึงความลึก 72 เมตร (ปิยะบุตร, 2545)

1.2 ลักษณะของกุ้งขาววานาไม

ลักษณะโครงสร้างโดยทั่วไปของกุ้งขาววานาไมจะคล้ายกับกุ้งกุลาดำซึ่งอยู่ในตระกูล Penaeidae เหมือนกัน โดยกุ้งขาวจะมีลำตัว 6 ปล้อง ส่วนหัว 1 ปล้อง ส่วนหาง 1 ปล้อง หน้าอกใหญ่ลักษณะลำตัวขาวใส ขาสีขาว หางมีสีแดง โดยเฉพาะบริเวณปลายหางจะมีสีแดงเข้ม กรีจะมีแนวตรงปลายงุ้มลงเล็กน้อย เมื่อโตขึ้นฟันกรีด้านบนจะมี 8 ซี่ และด้านล่าง 2 ซี่ ความยาวของกรีจะยาวกว่าลูกตาไม่มาก มีเมือกมาก ซึ่งไม่เหมือนกับกุ้งขาวบางชนิด ที่สามารถสังเกตเห็นได้ว่ามีเมือกน้อย ลำตัวค่อนข้างแห้งเร็วเมื่อนำขึ้นมาจากน้ำและที่สังเกตได้เด่นชัดที่สุดคือลำไส้ของกุ้งชนิดนี้จะโตเห็นได้ชัดกว่ากุ้งชนิดอื่น (ภิญโญ, 2545) กุ้งขาวขนาดตัวที่โตสมบูรณ์เต็มที่จะมีขนาดเล็กกว่ากุ้งกุลาดำ โดยความยาวจากปลายกรีหัวจนถึงแพนหางประมาณ 230 มิลลิเมตร น้ำหนักตัวเฉลี่ยประมาณ 120 กรัม กินอาหารได้หลายชนิดที่มีอยู่ในธรรมชาติในทุกระดับความลึก ชอบว่ายน้ำและไม่หมกตัว ความแตกต่างระหว่างลูกกุ้งขาวและลูกกุ้งแชบ๊วยตามตารางที่ 1 และตารางที่ 2 ดังนี้

ตารางที่ 1 ความแตกต่างระหว่างลูกกุ้งขาวและลูกกุ้งแชบ๊วยระยะโพสลาวา 10 ขึ้นไป

ลักษณะ	กุ้งขาววานาไม	กุ้งแชบ๊วย
ลักษณะลำตัว	สั้นป้อม	ยาวเพรียว
ระยะระหว่างตา	ห่าง , กางออก	ค่อนข้างชิดกัน
ฟันกรีด้านบน	7-8 ซี่	8-10 ซี่
ฟันกรีด้านล่าง	2-3 ซี่	2-3 ซี่
ความยาวกรีของกุ้งอายุ พี 5	กรีสั้นกว่าดวงตา	กรียาวเลยดวงตา

ที่มา : ปิยะบุตร (2545)

ตารางที่ 2 ความแตกต่างระหว่างกุ้งขาวและกุ้งแชบ๊วยระยะวัยรุ่น

ลักษณะ	กุ้งขาววานาไม	กุ้งแชบ๊วย
สีของหนวด	สีแดงตลอดเส้น	เป็นปล้องขาวสลับแดง
ฟันกรีด้านบน	7-8 ซี่	8-10 ซี่
ฟันกรีด้านล่าง	2-3 ซี่	2-3 ซี่
ความยาวกรี	กรีสั้นกว่า exopodite ของหนวด ปลายกรียาวตรง	กรียาวเลย exopodite ของหนวด กรีงอนเชิดขึ้น

สีของขาว่ายน้ำ	ขาวใส	สีน้ำตาลแดง
ระดับความเค็มที่เหมาะสม	0-35 พีพีที	7-25 พีพีที

ที่มา : ปิยะบุตร (2545)

ข้อดีของกุ้งขาววานาไมที่แตกต่างจากกุ้งกุลาดำ มีหลายประการคือ

1. ทนต่อความเค็มได้ในช่วงกว้างตั้งแต่ 0-50 พีพีที (Pillay, 1990) โดยจะมีการเจริญเติบโตได้ดีในช่วง 10-30 พีพีที

2. เจริญเติบโตได้ดีในช่วงอุณหภูมิกว้างคือ 22-32 องศาเซลเซียส (Pillay, 1990) แต่จะเจริญเติบโตได้ดีที่สุดในช่วง 25-35 องศาเซลเซียส (Ponce-Palafox *et al*., 1997)

3. ทนต่อสภาพออกซิเจนต่ำได้ดี พบว่าแม้ออกซิเจนต่ำถึง 0.8 พีพีเอ็ม เป็นเวลาหลายชั่วโมง ก็ยังไม่ตาย แต่การเจริญเติบโตจะดีถ้าออกซิเจนมีค่าตั้งแต่ 4 พีพีเอ็มขึ้นไป (ธวัชชัย, 2546)

4. พีเอชที่เหมาะสมคือ 7.0-8.5 ถ้าแม้ว่าบางครั้งพีเอชขึ้นสูงถึง 10 ก็สามารถที่จะอยู่รอดได้ (Pillay, 1990)

5. สามารถใช้อาหารที่มีโปรตีนต่ำในการเลี้ยง ทำให้ต้นทุนการผลิตถูกลง นอกจากนั้นยังสามารถใช้อาหารธรรมชาติจากบ่อได้อย่างมีประสิทธิภาพ อัตราการแลกเนื้อต่ำ

6. ให้เปอร์เซ็นต์เนื้อสูงถึง 66-68 เปอร์เซ็นต์ (กุ้งกุลาดำให้เพียง 62 เปอร์เซ็นต์) (ธวัชชัย, 2545)

7. ตลาดมีความต้องการสูง และมีตลาดทั่วโลก โดยเฉพาะตลาดยุโรป และอเมริกา (ชลอ, 2545)

1.3 ลักษณะอุปนิสัย

กุ้งขาวเป็นกุ้งที่มีการปรับตัวต่อสิ่งแวดล้อมได้ดีโดยเฉพาะสามารถปรับตัวในช่วงความเค็มกว้างตั้งแต่ 0-45 พีพีที ความเค็มที่เหมาะสมคือ 10-30 พีพีที ปรับตัวอยู่ในอุณหภูมิตั้งแต่ 24-32 องศาเซลเซียส แต่จะเหมาะสมที่สุดที่ 28-30 องศาเซลเซียส มีการเจริญเติบโตดี ลอกคราบบ่อย จึงต้องการแร่ธาตุสูง โดยเฉพาะแมกนีเซียมและแคลเซียม กุ้งขาวเคลื่อนตัวได้เร็ว ว่ายน้ำอยู่ตลอดเวลา จึงต้องการออกซิเจนค่อนข้างสูง และทำร้ายกุ้งตัวอื่น กินอาหารได้หลายชนิดที่มีอยู่ในธรรมชาติในทุกระดับความลึก ชอบว่ายน้ำและไม่หมกตัว (ภิญโญ, 2545)

1.4 วงจรชีวิตและการสืบพันธุ์

ในธรรมชาติกุ้งขาวจะมีอายุประมาณเกือบ 36 เดือน โดยจะวางไข่ที่ระดับน้ำลึกประมาณ 30-60 เมตรใกล้พื้นทราย เริ่มตั้งแต่ตัวผู้และตัวเมียมีอายุ 9 เดือนขึ้นไป และควรมีน้ำหนักตัว

เริ่มต้นของตัวผู้ 35 กรัม ตัวเมีย 40 กรัมขึ้นไป (ภิญโญ, 2545) ปกติแล้วแม่กุ้งขนาด 60-120 กรัม จะวางไข่ประมาณ 150,000-250,000 ฟอง (ปิยะบุตร, 2545) ส่วนแม่กุ้งขนาด 35-45 กรัมจะวางไข่ประมาณ 100,000-200,000 ฟอง (ภิญโญ, 2545) โดยจะวางไข่ในตอนกลางคืนบนพื้น แม่กุ้งจะว่ายน้ำอย่างรวดเร็วอยู่ประมาณ 45-60 วินาที แล้วจึงเริ่มวางไข่ขณะที่ลดความเร็วลงอย่างช้า ๆ เนื่องจากลักษณะอวัยวะสืบพันธุ์เพศเมียของกุ้งขาว นี้จะมีลักษณะเป็นแบบเปิด (opened thelycum) ซึ่งแตกต่างจากลักษณะอวัยวะสืบพันธุ์เพศเมียของกุ้งกุลาดำและกุ้งแชบ๊วย ซึ่งมีลักษณะเป็นแบบปิด (closed thelycum) ดังนั้นรูปแบบของการสืบพันธุ์และพฤติกรรมในการผสมพันธุ์จึงแตกต่างกับกุ้งกุลาดำและกุ้งแชบ๊วย เมื่อผสมพันธุ์ตัวผู้จะสลัดถุงน้ำเชื้อเข้าไปเก็บไว้ในอวัยวะเพศของตัวเมีย ถุงน้ำเชื้อจะมีปีกบาง ๆ และมีสารเหนียว ๆ ติดมาด้วย จะปิดอวัยวะเพศของเพศเมีย โดยสารเหนียวที่ปีกบาง ๆ เป็นตัวทำให้เกาะติด การผสมพันธุ์ของกุ้งขาวนี้สามารถผสมพันธุ์โดยไม่ต้องรอให้ตัวเมียลอกคราบ (ปิยะบุตร, 2545; ภิญโญ, 2545)

1.5 การเจริญเติบโตและการลอกคราบ

อัตราการเจริญเติบโตของกุ้งขึ้นอยู่กับปัจจัย 2 ปัจจัยคือ ความถี่ในการลอกคราบและขนาดที่เพิ่มขึ้น เพราะตัวกุ้งจะถูกห่อหุ้มด้วยเปลือกที่มีโครงสร้างแข็งแรง ดังนั้นจึงต้องลอกคราบเก่าออกและสร้างคราบใหม่ที่ใหญ่ขึ้นเพื่อรองรับการขยายขนาดที่เพิ่มขึ้น ในช่วงก่อนการลอกคราบ กุ้งจะสร้างคราบใหม่ที่ยังนิ่มอยู่ไว้ภายในชั้น cuticle และ intercalary sclerite เมื่อถึงเวลาลอกคราบ กุ้งจะสลัดตัวหลุดออกจากคราบเก่าโดยใช้หาง คราบใหม่ที่ยังนิ่มอยู่ในช่วงแรกก็จะแข็งขึ้นเรื่อย ๆ พร้อมกับขนาดของกุ้งที่มีขนาดใหญ่ขึ้น การลอกคราบยังขึ้นอยู่กับอายุของกุ้งขาว อุณหภูมิของน้ำ ความอุดมสมบูรณ์ของอาหาร (ประจวบ, 2527)

1.6 อุปนิสัยการกินอาหาร

โดยปกติแล้วกุ้งตระกูล Penaeidae หากินตอนกลางคืนและกินซากพืชซากสัตว์เป็นอาหาร แต่ตามธรรมชาติแล้วกุ้งเป็นสัตว์กินเนื้อซึ่งกินสัตว์ในกลุ่มครัสตาเชียขนาดเล็กแอมพิพอดและโพลีชีดเป็นอาหาร กุ้งจะกินอาหารได้ดีตั้งแต่เวลา 08.00 ถึง 20.00 น. โดยเฉพาะในช่วงบ่ายแก่ ๆ กุ้งจะกินสาหร่าย ผักบุ้งเมื่ออาหารไม่เพียงพอ (ภิญโญ, 2545) แต่ในระบบการเลี้ยงแบบพัฒนาแล้วอาหารในธรรมชาติที่มีในบ่อไม่เพียงพอต่อปริมาณกุ้งที่หนาแน่นดังนั้นจึงต้องมีการให้อาหารเพิ่ม ซึ่งกุ้งขาววานาไมต้องการอาหารที่มีโปรตีนประมาณ 35 เปอร์เซ็นต์ น้อยกว่ากุ้งชนิดอื่น เช่น กุ้งกุลาดำและกุ้งกุลาลาย (ปิยะบุตร, 2545)

1.7 สถานการณ์การผลิตและการตลาดกุ้งทะเล

1.7.1 ประเมินสถานการณ์การผลิตกุ้ง

ประเทศไทย จากข้อมูลทางสำนักงานเศรษฐกิจเกษตร คาดว่ากุ้งเลี้ยงจะแทนที่กุ้งที่จับจากทะเล เพราะต้นทุนในการเลี้ยงถูกในขณะที่ต้นทุนในการจับสูงขึ้นจากราคาน้ำมันที่เพิ่มขึ้น แต่ในระยะยาวออกไปเมื่อประชากรหนาแน่นต้องการพื้นที่เพื่ออยู่อาศัยการเลี้ยงกุ้งจะมีต้นทุนสูงขึ้นจากราคาที่ดิน จนกลับมาแพงเท่าหรือแพงกว่ากุ้งจับจากธรรมชาติ การผลิตกุ้งจะมีประเทศผู้ผลิตเพิ่มขึ้น จากปัจจุบันที่ไทยเป็นรายใหญ่ที่สุดมีคู่แข่งในทวีปเอเชีย คือ เวียดนาม อินเดีย จีน และทวีปอเมริกาคือ เอกวาดอร์ และบราซิลเป็นต้น แหล่งผลิตใหม่ที่มีศักยภาพ คือทวีปอาฟริกาจะเป็นแหล่งผลิตกุ้งส่งออกไปยังตลาดสหภาพยุโรปโดยเฉพาะ ประเทศไทยมีปัญหาในเรื่องอัตราภาษีและกฎกติกาที่ทางสหภาพยุโรปกำหนดขึ้น (สมาคมอาหารแช่เยือกแข็งไทย, 2548) นอกจากนี้ควรหันมาเพิ่มการเลี้ยงกุ้งทะเลขนาดใหญ่เพื่อจับขายระดับบน และต้องปรับผลผลิตให้ดีขึ้นทั้งปริมาณ คุณภาพ ต้นทุนการเลี้ยงที่ไม่สูง เน้นการแปรรูปให้มีความหลากหลายสนองความต้องการของลูกค้า และรักษามาตรฐานในการผลิต โดยเฉพาะมาตรฐานทางด้านสุขอนามัยทั้งนี้เพื่อศักยภาพในการแข่งขัน (สำนักบริการการส่งออก, 2547)

1.7.2 อุตสาหกรรมกุ้งไทย

อุตสาหกรรมกุ้งไทยจัดเป็นอุตสาหกรรมการผลิตเพื่อการส่งออกเป็นหลัก โดยมีสัดส่วนสูงถึงร้อยละ 87 ของการผลิตทั้งหมด ส่วนที่เหลือร้อยละ 13 จะถูกวางจำหน่ายภายในประเทศ ปัจจุบัน โรงงานแปรรูปกุ้งเพื่อการส่งออกมีประมาณ 957 ราย สถานประกอบการแปรรูปเบื้องต้น 458 ราย สถานประกอบการห้องเย็น (รับฝาก) 92 ราย แพปลา พ่อค้าคนกลางผู้รวบรวมสัตว์น้ำ 2,016 ราย และจำนวนเกษตรกรที่เพาะเลี้ยงกุ้ง 13,537 ราย โดยมีคนงานรวมกันทั้งสิ้นประมาณ 700,000 คน ทั้งนี้ มีผู้ประกอบการรายใหญ่ที่มีการผลิตครบวงจร 3 ราย ได้แก่ บริษัท เจริญโภคภัณฑ์อาหาร จำกัด(มหาชน) หรือ ซีพีเอฟ บริษัท เอเชี่ยน ซีฟู้ด จำกัด(มหาชน) และบริษัท ไทยยูเนี่ยนโฟรเซ่นโปรดักส์ จำกัด (มหาชน) โดยโรงงาน แปรรูปของผู้ประกอบการในอุตสาหกรรมส่วนใหญ่จะตั้งในจังหวัดสมุทรสาคร สมุทรสงครามและกรุงเทพมหานคร ซึ่งมีสัดส่วนสูงถึง 75 เปอร์เซ็นต์ ของพื้นที่ตั้งโรงงานแปรรูปทั้งหมด เนื่องจากพื้นที่ดังกล่าวมีความสะดวกในการขนส่งทางทะเลเพื่อการส่งออกไปยังตลาดต่างประเทศ รวมทั้งจังหวัดสมุทรสาครและสมุทรสงครามยังเคยเป็นแหล่งวัตถุดิบที่สำคัญมาก่อน (สำนักบริการการส่งออก, 2547)

2. ปลาปักเป้า

อนุกรมวิธานของปลาปักเป้าจัดจำแนกโดย Gordon และคณะ (1996)

Kingdom Animalia

Phylum Chordata

Subphylum Vertebrata

Class Osteicthyes

Order Tetraodontiformes

Family Tetraodontidae

Genus *Lagocephalus*

Family Diodontidae

Genus *Allomycterus*

Genus *Chilomycterus*

Family Triodontidae

Genus *Triodon*

ปลาปักเป้าพบทั้งในน้ำจืดและน้ำทะเล มีประมาณ 100 ชนิด แต่ที่ทำให้เกิดพิษมีประมาณ 50 ชนิด และพบในประเทศไทยประมาณ 20 ชนิด เนื้อของปลาปักเป้าไม่มีสารพิษ หรือมีสารพิษน้อย พิษมีมากที่ไข่ ตับ กระเพาะ ลำไส้ ผิวหนัง และสารพิษของปลาจะเพิ่มมากขึ้นในฤดูปลาวางไข่ ปลาปักเป้าตามทฤษฎีจะเริ่มสะสมสารพิษจากสาหร่ายอื่น ๆ ตัวมันไม่ได้ผลิตเอง เพราะฉะนั้นจึงมีรายงานว่าบางชนิดมีพิษ บางชนิดไม่มีพิษ แต่บางทฤษฎีบอกว่าตอนปลามีไข่อ่อนจะผลิตได้บ้าง ตัวปลาปักเป้าไม่มี Receptor ที่ Sodium channel จึงไม่ Sensitive กับสารพิษ โดยมากมีลำตัวกลม ครีบและหางเล็ก จึงว่ายน้ำได้เชื่องช้า หัวโต ฟันแหลมคมใช้สำหรับขบกัดสัตว์น้ำมีเปลือกต่างๆ เป็นอาหาร คนที่ลงเล่นน้ำจึงมักถูกกัดทำร้ายเป็นแผลบ่อยๆ เมื่อตกใจหรือข่มขู่สามารถสูดน้ำหรือลมเข้าช่องท้องให้ตัวพองออกได้คล้ายลูกโป่ง ปลาบางชนิดมีหนาม ปลาปักเป้าเป็นปลาที่มีพิษในตัว โดยเฉพาะอวัยวะภายในและรังไข่ แม้บริโภคเพียงเล็กน้อยก็อาจถึงแก่ความตายได้ แต่บางชนิดในบางแหล่งน้ำหรือบางภูมิภาคก็มีผู้จับมาบริโภค โดยต้องรู้วิธีชำแหละเป็นพิเศษ เช่น ประเทศญี่ปุ่นนิยมบริโภคปลาปักเป้าโดยทำเป็นปลาดิบ (Sashimi) จนเป็นอาหารประจำชาติญี่ปุ่นที่ขึ้นชื่อเป็นที่รู้จัก วงศ์ปลาปักเป้ามีอยู่ด้วยกันทั้งหมด 3 วงศ์ (Family) คือ Diodontidae ปลาในวงศ์นี้มีฟัน 2 ซี่ Tetraodontidae ปลาในวงศ์นี้มีฟัน 4 ซี่ และ Triodontidae ปลาในวงศ์นี้ลักษณะลำตัวแบนข้าง สำหรับในเมืองไทยพบปลาทั้ง 3 วงศ์นี้ ทั้งหมด 28 ชนิด เป็น

ชนิดที่อาศัยอยู่ในน้ำจืด 12 ชนิด ในประเทศไทยมีการนำปลาปักเป้ามาจำหน่ายในท้องตลาดในชื่อปลาเนื้อไก่ ซึ่งผู้บริโภคอาจได้รับพิษ อันตรายถึงขั้นเสียชีวิตในเวลาอันรวดเร็วได้ เนื่องจากสารพิษชื่อว่า เตโตรโดท็อกซิน (Tetrodotoxin)ในหนังปลา ไข่ปลา เนื้อปลา ตับ และลำไส้ มีความทนต่อความร้อนสูง ความร้อนในการปรุงอาหาร การหุงต้ม และการแปรรูปไม่สามารถทำลายสารพิษดังกล่าว ปักเป้าที่พบเห็นในตลาดมีอยู่ 3 ชนิดด้วยกันคือ

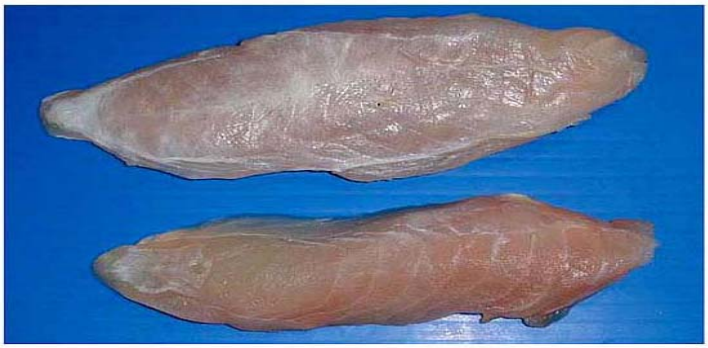
- *Lagocephalus inermis* ปลาชนิดนี้เป็นปลาขนาดใหญ่ ไม่มีตุ่มหนามตามตัว ผิวเรียบทั้งตัว

- *Lagocephalus spediceus* ปลาชนิดนี้เป็นปลาที่มีตุ่มหนามตั้งแต่หัวไปถึงครึ่งตัว

- *Lagocephalus lunaris* ปลาชนิดนี้มีลักษณะลำตัวคล้ายกับ *Lagocephalus spediceus* แต่มีตุ่มหนามตั้งแต่หัวไปจนถึงครีบหลัง มีการตรวจพบสารพิษในปลาชนิดนี้ด้วย (อัธยา และคณะ, 2539)

2.1 วิธีสังเกตเนื้อปลาปักเป้า กับเนื้อปลากะพง

การบริโภคเนื้อปลาปักเป้าบางชนิดมีความเสี่ยง เนื่องจากมีพิษและเป็นอันตรายต่อชีวิตผู้บริโภค เนื้อปลาปักเป้าเมื่อแล่แล้วจะมีลักษณะเป็นชิ้นหนา สีออกขาวอมชมพู มัดกล้ามเนื้อมีขนาดใหญ่สังเกตเห็นชัดเจน ด้านข้างลำตัวเมื่อลอกหนังออกจะมีพังผืดอยู่ (ดังภาพที่ 1) ซึ่งมีลักษณะคล้ายเนื้อไก่ ทำให้คนส่วนใหญ่เรียกว่า ปลาเนื้อไก่



ภาพที่ 1 การเปรียบเทียบเนื้อปลาปักเป้าที่แล่ด้านข้างลำตัวและแล่ด้านในของลำตัว
บน คือเนื้อปลาปักเป้าแล่ด้านข้างลำตัว ซึ่งยังเห็นมีพังผืดอยู่
ล่าง คือเนื้อปลาปักเป้าแล่ด้านใน จะเห็นมัดกล้ามเนื้อขนาดใหญ่
ที่มา: กลุ่มวิจัยเทคโนโลยีชีวภาพ กรมประมง (2550)

เมื่อเปรียบเทียบเนื้อปลาปักเป้ากับเนื้อปลากะพง พบว่าเนื้อปลากะพงจะมีลักษณะเป็นชิ้นบางกว่า มัดกล้ามเนื้อมีขนาดเล็กกว่า ทำให้มองเห็นเป็นริ้วถี่ๆ ดังภาพที่ 2 และด้านข้างลำตัวเมื่อลอกหนังออกจะเห็นกล้ามเนื้อได้อย่างชัดเจน (ไม่มีพังผืด) ดังภาพที่ 3 ซึ่งเป็นความแตกต่างระหว่างเนื้อปลาปักเป้ากับเนื้อปลาชนิดอื่น

ภาพที่ 2 การเปรียบเทียบเนื้อปลากะพงและเนื้อปลาปักเป้า
บน คือเนื้อปลากะพงแล่ด้านใน มีมัดกล้ามเนื้อขนาดเล็ก มองเห็นเป็นริ้วถี่ๆ
ล่าง คือเนื้อปลาปักเป้าแล่ด้านใน มีมัดกล้ามเนื้อขนาดใหญ่กว่า
ที่มา: กลุ่มวิจัยเทคโนโลยีชีวภาพ กรมประมง (2550)

ภาพที่ 3 การเปรียบเทียบเนื้อปลากะพงและเนื้อปลาปักเป้า
บน คือเนื้อปลากะพงแล่ด้านข้างลำตัว จะเห็นกล้ามเนื้อได้อย่างชัดเจน
ล่าง คือเนื้อปลาปักเป้าแล่ด้านข้างลำตัว ซึ่งจะเห็นมีพังผืดสีขาวติดอยู่
ที่มา: กลุ่มวิจัยเทคโนโลยีชีวภาพ กรมประมง (2550)

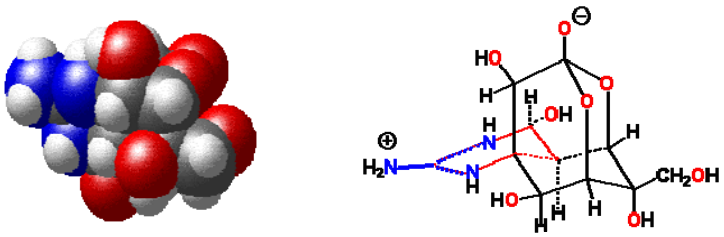
2.2 Tetrodotoxin

Tetrodotoxin มีชื่อเต็มทางเคมีคือ Octahydro-12-(hydroxymethyl)-2-imino-5,9:7,10a-dimethano-10aH-[1,3]dioxocino[6,5-d]pyrimidine-4,7,10,11,12-pentol มีชื่อสามัญคือ spheroidine, tarichatoxin, tetrodotoxin และ Fugu poison ซึ่งเป็นพิษที่มีผลต่อระบบประสาทที่รุนแรงที่สุด มีชื่อว่า Tetraodontiformes หรือที่รู้จักกันในชื่อของ tetraodon pufferfish ซึ่งเป็นแหล่งของสารพิษและยังพบสารพิษชนิดนี้ในสัตว์ทะเลชนิดอื่นเช่น ดาวทะเล ปลาผีเสื้อ หมึก bluering ซึ่งสะสมพิษไว้ที่ต่อมน้ำลาย สำหรับไว้ป้องกันตัวเองเมื่อถูกคุกคาม (Mosher, 1986)

2.3 คุณสมบัติของ Tetrodotoxin

พิษ Tetrodotoxin ในปลาปักเป้านั้นเกิดจากการสังเคราะห์ของแบคทีเรีย Tetrodotoxin (TTX) มีสูตรทางเคมีคือ $C_{11}H_{17}O_8N_3$ และมีน้ำหนักโมแลกุลเท่ากับ 319.28 กรัมต่อโมล ซึ่งมีโครงสร้างดังภาพที่ 4 สาร Tetrodotoxin มีฤทธิ์เป็นด่าง และละลายได้ดีในกรดอะซิติกเจือจางและละลายได้บางส่วนในน้ำ แอลกอฮอล์ และอีเทอร์ แต่ไม่ละลายในตัวทำละลายอินทรีย์ชนิดอื่น แต่จะถูกทำลายในกรดแก่และด่าง (Evan, 1972)

สารพิษชนิดนี้มีความสามารถในการทนความร้อนได้สูงถึง 220 องศาเซลเซียส จึงทำให้ความร้อนที่เกิดขึ้นในกรรมวิธีผลิตอาหารนั้นไม่สามารถที่จะทำลายสารพิษ Tetrodotoxin ได้ สารพิษ Tetrodotoxin พบว่าในหนูพิษชนิดมี LD_{50} เท่ากับ10 μ/kg (Narita *et al.,* 1987)



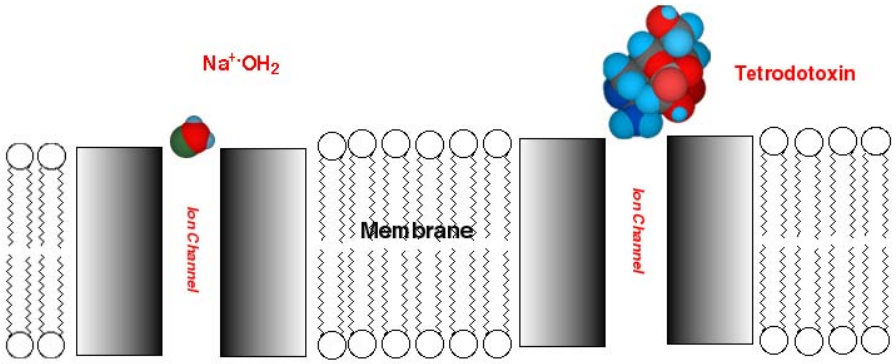
ภาพที่ 4 โครงสร้างของสาร Tetrodotoxin

ที่มา : Fujita (2008)

2.4 คุณสมบัติความเป็นพิษของ Tetrodotoxin

Tetrodotoxin เป็นสารพิษที่มีผลต่อการทำงานของระบบประสาท การทำงานของ Tetrodotoxin คือไปขัดขวางหรือยับยั้งการทำงานของระบบประสาทและกล้ามเนื้อ การเคลื่อนที่

ของกระแสประสาทในระบบประสาท เป็นไปตามกฎ all and none rule จากการศึกษาพบว่าใยประสาทที่มีขนาดใหญ่ และมี node of ranuilar ห่างกันมากๆ จะสามารถนำกระแสประสาทได้อย่างรวดเร็วโดยการกระโดด (saltatory conduction) เซลล์ประสาทก่อนได้รับการกระตุ้น จะเรียกภาวะนี้ว่า "ภาวะปกติ" (Polarization) โดยในขณะนั้น เยื่อด้านนอกจะเป็นประจุบวก เยื่อด้านในจะเป็นประจุลบและโซเดียมอิออน (Na^+) จะถูกขับออกภายนอกเซลล์ตลอดเวลาในขณะเดียวกันก็จะดึงโปตัสเซียมอิออน (K^+) ให้มาสะสมอยู่ในเซลล์ ซึ่งการขับออกและดูดกลับนี้จะเกิดสภาพความต่างศักดิ์ในธรรมชาติเรียกว่าความต่างศักย์ปกติ (resting potential) มีค่าประมาณ -60 mV เซลล์ประสาทหลังการกระตุ้น (Depolarization) จะมีการกลับขั้วไฟฟ้าบริเวณที่ถูกกระตุ้นเรียกว่าอยู่ในระยะการเปลี่ยนขั้ว เยื่อด้านนอกจะมีประจุลบส่วนเยื่อด้านในจะมีประจุบวกเพราะเยื่อหุ้มเซลล์ประสาทจะเปลี่ยนคุณสมบัติไปจากเดิมชั่วคราว คือจะยอมให้ Na^+ ซึมผ่านเข้าไปจนปริมาณ Na^+ ด้านในมากกว่าด้านนอกส่วน K^+ จะซึมผ่านออกมาด้านนอกจะทำให้เกิดความต่างศักย์ ซึ่งเรียกว่า Action potential มีค่าประมาณ +40 mV ถึง +60 mV (Action potential ก็คือกระแสประสาทนั้นเอง) เมื่อกระแสประสาทผ่านไปแล้ว บริเวณที่ถูกกระตุ้นครั้งแรกจะเปลี่ยนกลับสู่ระยะปกติ เรียกว่า Repolarization โดยเซลล์จะขับโซเดียมอิออน(Na^+)ออกไปแล้วดึงโปแตสเซียมอิออน (K^+) กลับเข้ามาในเซลล์เรียกกระบวนการนี้ว่า Na^+- K^+ pump ต้องใช้พลังงานจากการสลาย ATP ที่อยู่ภายในเซลล์ประสาท ซึ่งก็คือ กระบวนการแอกทีฟทรานสปอร์ต ถ้าเซลล์ประสาทใดไม่มี Na^+- K^+ pump คือการนำ Na^+ และ K^+ กลับที่เดิมเซลล์ประสาทนั้นจะไม่สามารถนำกระแสประสาทได้อีกเมื่อสัตว์ได้รับสาร TTX สารนี้จะไปขัดขวางการทำงานของโซเดียมบริเวณเยื่อบุเส้นประสาท ทำให้ไม่สามารถขนส่งกระแสประสาทได้ (Hashimoto *et al.,* 1990)



ภาพที่ 5 การขัดขวางการทำงานของโซเดียม

ที่มา : Chemical Ecology (2008)

ความเป็นพิษของ Tetrodotoxin รายงานในหน่วยของ Mouse unit (MU/g) ซึ่งเป็นระดับของสารพิษที่ทำให้หนูขาวที่มีน้ำหนัก 20 กรัม ตายภายในเวลา 30 นาที (กลุ่มงานพิษวิทยาและสิ่งแวดล้อม กระทรวงสาธารณสุข กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์) สารพิษ Tetrodotoxin จัดเป็นสารพิษที่ออกฤทธิ์ทางระบบประสาท (neurotoxin) ซึ่งมีฤทธิ์ไปขัดขวางหรือยับยั้งการทำงานของระบบประสาทและกล้ามเนื้อ ทำให้เกิดอาการชาที่ลิ้น นิ้วมือ คลื่นไส้ อาเจียน หายใจติดขัด อาจทำให้ระบบประสาทที่ควบคุมกล้ามเนื้อหยุดชะงัก (vasomotor blockage) การเต้นของหัวใจผิดปกติ และอาจทำให้เสียชีวิตได้ในเวลาอันรวดเร็ว ซึ่งอาการของพิษมักจะเกิดขึ้นหลังจากได้รับพิษนี้เข้าสู่ร่างกายประมาณ 10-45 นาที หรืออาจใช้เวลานานกว่านี้ก็ได้ขึ้นอยู่กับปริมาณสารที่ได้รับเข้าไป การได้รับสาร Tetrodotoxin ในคนอาจเกิดจากการรู้เท่าไม่ถึงการณ์ ซึ่งในประเทศญี่ปุ่นมีรายงานการตายเกิดขึ้นประมาณ 50 คนต่อปี เกิดจากการกินอาหารที่มีปลาปักเป้า (puffer fish dishes) เป็นส่วนประกอบซึ่งเกิดจากการที่นำปลาปักเป้าที่มีการสะสมของสารพิษ Tetrodotoxin ในตัวมาประกอบอาหาร หรือผู้ที่ทำการปรุงอาหารไม่มีความชำนาญ (จักรพันธ์, 2542)

2.5 ผลจากสารพิษ

สารที่แยกได้จากปลาปักเป้ามีสองชนิดคือ Tetrodotoxin และ Tetrodonic acid ซึ่งเมื่อผ่านกรรมวิธีต่างๆ แล้วได้สาร Tetrodotoxin อาการพิษจากสาร Tetrodotoxin จะเกิดขึ้นหลังรับประทานปลาปักเป้าประมาณ 30 นาที ถึงหลายชั่วโมง แล้วแต่ปริมาณที่รับประทาน อาการที่เกิดขึ้นแบ่งเป็นสี่ขั้น คือ

ขั้นแรก ชาที่ริมฝีปาก ลิ้น ปลายนิ้วมือ คลื่นไส้ วิงเวียน อาเจียน กระสับกระส่าย

ขั้นที่สอง ชามากขึ้น อาเจียนมาก อ่อนเพลีย แขนขาไม่มีแรง ยืนและเดินไม่ได้

ขั้นที่สาม เคลื่อนไหวแขนขาไม่ได้ พูดลำบากถึงพูดไม่ได้ เนื่องจากสายกล่องเสียงเป็นอัมพาต แต่ผู้ป่วยยังรู้สึกตัว

ขั้นที่สี่ กล้ามเนื้อเป็นอัมพาตทั่วไป หายใจลำบาก ลำตัวเขียวคล้ำ หมดสติ รูม่านตาโตเต็มที่ไม่มีปฏิกิริยาต่อแสง ถ้าไม่ได้รับการรักษาที่ถูกต้องผู้ป่วยจะเสียชีวิตในเวลาอันรวดเร็ว อาการอาจแรงขึ้นจากขั้นแรกถึงขั้นที่สี่ใช้เวลาเพียง 10-15 นาที (Hwang *et al.,* 1990)

อัธยา และคณะ (2539) ศึกษาพิษของปลาปักเป้าน้ำจืด *Tetraodon leiurus* และ *T. suvatii* ที่จับมาจากอ่างเก็บน้ำจังหวัดอุดรธานี และจังหวัดยโสธร ระหว่างเดือนพฤษภาคม 2538 ถึงเดือนมีนาคม 2539 ทำการทดสอบพิษ โดยใช้หนูทดลองและรวบรวมเนื้อเยื่อที่เป็นพิษมาสกัด และทำให้บริสุทธิ์เป็นบางส่วนโดยใช้ ultrafiltration แล้วนำไปวิเคราะห์ด้วยเครื่อง HPLC (Shimadzu)

โดยใช้ column LiChroCART RP - 18(e) ขนาด 0.4 x 25 ซม. (Merck) ผลจากการทดสอบพิษพบว่า ปลาปักเป้าทั้ง 2 ชนิด มีความเป็นพิษในทุกส่วนของเนื้อเยื่อ โดยพบพิษในตับสูงสุด (880 MU/g) ผลทาง HPLC แสดงให้เห็นว่าองค์ประกอบพิษของปลาปักเป้าน้ำจืดทั้ง 2 ชนิดเป็นพิษอัมพาต (Paralytic shellfish poison : PSP) คือ saxitoxin, neosaxitoxin และ decarmaboyl saxitoxin ซึ่งผิดจากปลาปักเป้าน้ำเค็มที่เป็น tetrodotoxin ครั้งนี้เป็นรายงานครั้งแรกของการพบ PSP ในปลาปักเป้าน้ำจืดของไทย

เมื่อวันที่ 22 สิงหาคม 2550 คณะแพทย์ศาสตร์โรงพยาบาลจุฬาลงกรณ์ จัดอภิปรายเรื่องพิษปลาปักเป้า มหันตภัยใกล้ตัวในอาหาร รศ.นพ.นรินทร์ หิรัญสุทธิกุล หัวหน้าภาควิชาเวชศาสตร์ป้องกันและสังคม คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัยกล่าวว่าตั้งแต่ปี 2547-2550 มีผู้ป่วยโรคพิษปลาปักเป้าทะเล 95 ราย ปักเป้าน้ำจืด 13 ราย ไม่ทราบแหล่งของสารพิษ 7 ราย รวม 115 ราย ซึ่งในจำนวนนี้มีผู้เสียชีวิต 15 คน จังหวัดที่มีผู้ได้รับสารพิษจากปลาปักเป้ามากที่สุด คือ ชลบุรี 46 ราย เสียชีวิต 4 รายรองลงมาได้แก่ กรุงเทพมหานคร 35 ราย สตูล 10 ราย ขอนแก่น 9 ราย สมุทรปราการ 7 ราย สมุทรสงคราม 4 ราย ชัยภูมิ 2 ราย เชียงใหม่ 2 ราย และไม่ทราบจังหวัด 7 ราย ส่วนอาหารที่นิยมนำปลาปักเป้ามาประกอบได้แก่ ไข่ปลา ต้มปลา ทอด ปิ้ง ย่าง ต้มยำปลา ก๋วยเตี๋ยวปลา ต้มยำไข่ปลา ปลาผัดขึ้นฉ่าย นอกจากนี้จากการตรวจสอบพบว่า มีร้านค้าบางแห่งใช้สีผสมอาหารย้อมเนื้อปลาปักเป้าไปย้อมให้มีสีส้มคล้ายเนื้อของปลาแซลมอล ซึ่งพบมากในร้านอาหารหมูกระทะและจิ้มจุ่ม

จิราวรรณ (2550) เปิดเผยว่า แม้การจำหน่ายเนื้อปลาปักเป้าจะผิดกฎหมายตามประกาศกระทรวงสาธารณสุข แต่ปัจจุบันยังมีผู้ลักลอบจำหน่ายเนื้อปลาปักเป้า ซึ่งพิษปลาปักเป้าอาจเป็นอันตรายต่อผู้บริโภค ถ้ารับการรักษาไม่ทันอาจถึงขั้นเสียชีวิต ซึ่งเรื่องนี้กรมประมงได้ประกาศเตือนประชาชนอยู่เสมอให้งดเว้นการบริโภคปลาปักเป้า ส่วนกรณีที่สมาคมประมงสมุทรสงครามทำหนังสือร้องเรียนให้รัฐบาลทบทวนประกาศกระทรวงสาธารณสุข โดยขอให้กำหนดมาตรการและหลักเกณฑ์ต่างๆ เพื่อควบคุมการจำหน่ายเนื้อปลาปักเป้าให้ถูกกฎหมายเหมือนต่างประเทศเบื้องต้นสำนักงานอาหารและยา ได้ตั้งคณะทำงานจัดทำมาตรการดังกล่าวแล้ว โดยกรมประมงได้รับมอบหมายให้วิจัย 3 ประเด็น คือ

1.วิจัยการทำประมงปลาปักเป้า เช่น ชนิดและปริมาณของปลาปักเป้าในเมืองไทย แหล่งประมงที่ปลาปักเป้าติดเครื่องมือประมงขึ้นมา

2. ศึกษาพิษปลาปักเป้า เช่น ฤดูกาลที่เกิดพิษ ชนิด และปริมาณของพิษ

3. การเก็บรักษา แล้วให้นำข้อมูลที่ได้ไปวิเคราะห์ร่วมกับหน่วยงานที่เกี่ยวข้องเพื่อหาข้อยุติที่ชัดเจนเรื่องการนำปลาปักเป้ามาใช้ประโยชน์ การบริโภคเนื้อปลาปักเป้าให้ปลอดภัยเป็นเรื่อง

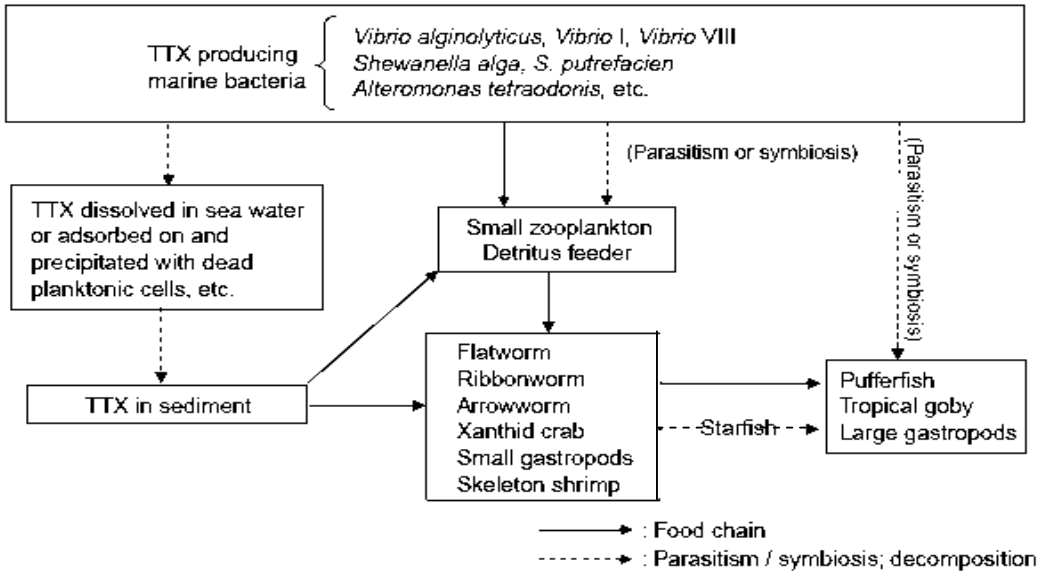
ละเอียดอ่อนที่ต้องศึกษาวิจัยและฝึกอบรม อีกทั้งต้องคำนึงถึงปัจจัยหลายด้านที่เกี่ยวข้อง เช่น เกาหลีและญี่ปุ่นที่สามารถจำหน่ายเนื้อปลาปักเป้าให้แก่ผู้บริโภคได้นั้น ผู้ประกอบอาหารจากปลาปักเป้าต้องมีความรู้เกี่ยวกับปลาปักเป้าและต้องได้รับการฝึกอบรมอย่างดี มีใบรับรองอย่างเป็นทางการ นอกจากนี้ยังกำหนดสายพันธุ์ของปลาปักเป้าที่จะนำมาปรุงอาหาร และปลาปักเป้าที่นำเข้าประเทศต้องมีใบรับรอง รวมทั้งกำหนดปริมาณพิษปลาปักเป้าต้องไม่เกิน 4 MU/g จึงเป็นเรื่องที่ต้องศึกษาอย่างรอบคอบเพื่อลดความเสี่ยงที่อาจเกิดขึ้น

2.6 กลไกการสร้างและการสะสมสารพิษในสัตว์น้ำ

ที่ผ่านมาได้มีสมมุติฐานที่เกี่ยวกับกลไกการสร้างและสะสมสารพิษ Tetrodotoxin ในปลาปักเป้านั้นอาจมีสาเหตุจากการที่ปลาได้รับสารพิษจากการกินอาหารผ่านห่วงโซ่อาหารที่มีความซับซ้อนเป็นหลัก ซึ่งเริ่มต้นจากแบคทีเรียซึ่งจัดสิ่งมีชีวิตที่เป็นต้นกำเนิดเริ่มแรกในการสร้างสารพิษ Tetrodotoxin ในห่วงโซ่อาหารต่างๆ โดยมีการทดลองต่างๆ เกิดขึ้นเพื่อพิสูจน์สมมุติฐานดังกล่าว (Saito *et al.*, 1985; Noguchi *et al*., 2006a) และพบว่าแบคทีเรียที่อาศัยในลำไส้ของสัตว์ที่มีสารพิษอยู่สามารถสร้างสารพิษในเซลล์ได้ (Hashimoto *et al*., 1990; Miyazawa and Noguchi, 2001) ซึ่งทำให้สัตว์ได้รับพิษเหล่านั้นมากขึ้นในระดับที่เป็นอันตรายในที่สุด

จากรายงานการศึกษาที่ผ่านมาพบว่าสารพิษ Tetrodotoxin สามารถส่งผ่านจากสิ่งมีชีวิตชั้นต่ำไปยังสิ่งมีชีวิตชั้นสูงได้ ประกอบกับการเกิดสารพิษชนิดนี้ในสิ่งมีชีวิตชนิดต่าง ๆ ที่เกี่ยวข้องไม่มีความสัมพันธ์ทางด้านกำเนิดและการเจริญพันธุ์เหมือนกับสิ่งมีชีวิตโดยทั่วไปที่มีการถ่ายทอดผ่านรุ่นต่อรุ่นได้ ดังนั้นอาจเป็นไปได้ว่าสิ่งมีชีวิตขนาดเล็กบางชนิดอาจเป็นผู้สร้างสารพิษ Tetrodotoxin ที่แท้จริงในห่วงโซ่อาหารได้ และในปัจจุบันมีการศึกษาเพื่อพิสูจน์ข้อสมมุติฐานดังกล่าว ซึ่งให้ผลสรุปที่ค่อนข้างชัดเจนว่าแบคทีเรียที่อาศัยอยู่กับสิ่งมีชีวิตที่พบสารพิษ เช่น การแยกแบคทีเรียในลำไส้ของปลาดาว *(Astropecten polycanthus*), xanthid crab *(Atergatis floridus*) และปลาปักเป้า *(Takifugu snyderi*) มาศึกษาการผลิตสารพิษ Tetrodotoxin โดยใช้เทคนิค HPLC และ GC/MS แบคทีเรียที่แยกได้จากลำไส้ของสิ่งมีชีวิตที่ตรวจพบสารพิษชนิดนี้มีหลายชนิด ได้แก่ *Vibrio alginolyticus* จากปลาดาว, *Vibrio* VIII จากปู และ *Vibrio* I จากปลาปักเป้า โดยมีการวัดปริมาณของสารพิษที่เกิดจากการสร้างสารพิษของแบคทีเรียทั้งสามชนิดได้ค่าเท่ากับ 213, 30 และ 3 MU/อาหารเลี้ยงเชื้อ 500 มิลลิลิตร ตามลำดับ และเมื่อทำการแยก fragment จากแบคทีเรียทั้งสามพบว่าทุกตัวจะมีปฏิกิริยาจำเพาะกับ Trimethylsilylated C_9-base ที่ได้มาจากสาร Authentic TTX (Noguchi *et al*., 1986; Narita *et al.,* 1987; Hashimoto *et al*. 1990) ทำให้สรุปได้ว่าแบคทีเรียที่แยกได้จากลำไส้ของสัตว์จำพวกนี้สามารถสร้างสารพิษได้เอง

นอกจากนี้ยังมีแบคทีเรียอีกหลายชนิดที่สามารถสร้างสารพิษนี้ได้เช่นกัน เช่น *Shewanella alga* และ *Alteromonas tetraodonis* ที่แยกได้จากสาหร่ายสีแดง (*Jania* sp.) (Yasumoto *et al.,* 1986), *Shewanella putrefaciens* แยกได้จากปลาปักเป้า *(T. niphobles*) (Matsui *et al*., 1990) และแบคทีเรียอื่นๆ ที่อาศัยในทะเลอีกหลายชนิด (ตารางที่ 3) อย่างไรก็ตามเมื่อเปรียบเทียบการสร้างพิษของแบคทีเรียที่แยกได้จากลำไส้กับปริมาณของสารพิษที่มีการสะสมพิษไว้ในปลาปักเป้าจะมีปริมาณเพียงเล็กน้อยก็ตามแต่แบคทีเรียดังกล่าวก็จัดเป็นผู้สร้างสารพิษเริ่มต้น (TTX producer) ดังแสดงกลไกการสะสมสารพิษและการถ่ายทอดสารพิษจากสัตว์ชั้นต่ำไปยังสัตว์ชั้นสูงได้ในภาพที่ 6



ภาพที่ 6 กลไกการสะสมของสารพิษ Tetrodotoxin ในสัตว์น้ำในทะเล

ที่มา: Noguchi และคณะ (2006a)

ตารางที่ 3 แบคทีเรียชนิดต่างๆ ที่ตรวจพบสารพิษ Tetrodotoxin โดยวิธี HPLC และ GC-MS

Bacterial strain	Toxin detected by[a]		
	HPLC technique		GC-MS technique
	TTX	Anh-TTX	
Vibrio alginolyticus ATCC 17749	-	+	+
V. alginolyticus NCMB 1903	-	+	+
V. anguillarum NCMB 829	-	+	+

V. anguillarum NCMB 1291	-	+	+
V. costicola (V. costicolus) NCMB 701	-	+	+
V. fischeri NCMB 1281	-	±	-
Photobacterium fischeri NCMB 1381	-	±	±
V. harveyi (Aeromonas harveyi) NCMB 2	-	±	+
V. marinus Ps 207	-	+	±
V. parahaemolyticus NCMB 1902	-	+	+
V. parahaemolyticus ATCC 17802	-	+	+
Photobacterium phosphoreum NCMB 844	±	+	+
Aeromonas hydrophila NCMB 89	-	+	-
A. hydrophila NCMB 89[b]	-	±	-
A. salmonicida ATCC 14174	±	±	+
A. salmonicida ATCC 14174[b]	±	±	+
Pleisomanas shigelloides ATCC 14029	±	+	+
Escherichia coli IAM 1268	-	-	-
E. coli IAM 1268[b]	-	±	±
Alteromonas communis IAM 12914	-	±	±
A. nigrifaciens IAM 13010	±	±	±
A. vaga IAM 12923	±	-	±

[a] HPLC, High-performance liquid chromatography; GC-MS, gas chromatography-mass spectrometry. TTX, Tetrodotoxin; Anh-TTX, anhydrotetrodotoxin, + Clearly detected; ± difficult to detect; - not detected.

[b] Cultivated in a freshwater medium.

ที่มา : Simidu และคณะ (1987)

นอกจากนี้ Ikeda และคณะ (2006) ได้ศึกษาการสะสมสารพิษ Tetrodotoxin ในโคพีพอด *(Pseudocaligus fugu*) โดยใช้เทคนิค Immunoenzymatic technique ซึ่งโคพีพอดชนิดนี้จัดเป็นปรสิตภายนอกชนิดหนึ่งที่อาศัยบนผิวหนังของปลาปักเป้า (*T. niphobles*) และพบว่ามีการสะสมพิษ Tetrodotoxin ในตัวของโคพีพอด คาดว่าการสะสมพิษในโคพีพอดอาจเกิดเนื่องมาจากการกินอาหารของโคพีพอดที่กินเมือกบนผิวลำตัว เนื้อเยื่อ และเลือดของปลาปักเป้าทำให้ตัวโคพีพอดได้รับพิษไปด้วย และสอดคล้องกับการรายงานของ Ito และคณะ (2006) ได้ทำการจำแนกโคพี

พอด 2 ชนิด ที่เป็นปรสิตภายนอกของปลาปักเป้า ได้แก่ *P. fugu* และ *Taeniacanthus* sp. ได้มาจากบริเวณผิวลำตัวและเหงือกของปลาปักเป้าตามลำดับ โดยใช้เทคนิค High performance liquid chromatography (HPLC) และ Gas chromatography-mass spectrometry (GC-MS) ในการศึกษาปริมาณและจำแนกพิษ Tetrodotoxin ในโคพีพอดที่แยกได้จากผิวลำตัวและเหงือกปลา พบว่าโคพีพอดแต่ละชนิดมีสารพิษ Tetrodotoxin และอนุพันธ์ของสารพิษสะสมอยู่ในตัวแตกต่างกัน รวมทั้งองค์ประกอบของสารพิษในตัวโคพีพอดที่แยกได้จากเมือกและเหงือกแตกต่างกันเมื่อทำการวิเคราะห์โดยใช้เทคนิค HPLC ทั้งนี้เป็นไปได้ว่าโคพีพอดที่นำมาศึกษาได้จากเนื้อเยื่อปลาที่แตกต่างกัน ปริมาณสารพิษที่ได้รับอาจแตกต่างกันด้วย และเมื่อสารพิษเข้าสู่ภายในตัวของโคพีพอดอาจมีการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างของสารเคมีแตกต่างไปจากโครงสร้างเดิมโดยกระบวนการเมแทบอลิซึมในร่างกาย

ในแง่ของการตรวจพบสารพิษ Tetrodotoxin ในปลาปักเป้าแต่ละชนิดนั้น พบว่าปลาปักเป้าที่อยู่ในตระกูล Diodontidae และ Ostracidae จัดอยู่ในกลุ่มของ non-toxic species หรือไม่มีพิษ ปลาปักเป้าชนิดที่มีการตรวจพบสารพิษ Tetrodotoxin นั้นส่วนใหญ่อาศัยอยู่ในทะเลและในน้ำกร่อยเท่านั้น ปลาปักเป้าที่พบในน้ำกร่อย ได้แก่ *Tetraodon nigroviridis* และ *T. Steindachneri* ทั้งสองชนิดนี้สามารถพบได้ในแหล่งน้ำกร่อยของไทย แต่ในส่วนของปลาปักเป้าที่อาศัยในน้ำจืดนั้นได้แก่ *T. fangi, T. leiurus* และ *T. suwantii* โดยพบว่าตรวจพบสารพิษได้เช่นเดียวกันแต่เป็นสารพิษชนิด Saxitoxins (STXs) ซึ่งสารพิษทั้งสองชนิดนี้มีกลไกการออกฤทธิ์ที่คล้ายคลึงกันโดยจัดอยู่ในกลุ่มของ Paralytic Shellfish Poison (PSP) family และสามารถทำอันตรายต่อสิ่งมีชีวิตถึงแก่ชีวิตได้เช่นกัน (อัธยา และคณะ 2539)

เมื่อทำการศึกษาและเปรียบเทียบสารพิษ Tetrodotoxin ที่มีการสะสมในตัวของปลาปักเป้านั้นพบว่าตับและรังไข่ของปลาปักเป้านั้นมีความเป็นพิษสูงสุด รองลงมาคือลำไส้และผิวหนัง และพบว่ากล้ามเนื้อและ Testis จะมีความเป็นพิษที่รุนแรงน้อยมากหรือไม่มีความเป็นพิษอยู่เลย ยกเว้นในปลาปักเป้าชนิด *Lagocephalus lunaris* ที่พบสารพิษในส่วนของกล้ามเนื้อที่มีพิษรุนแรง ในส่วนที่มีการสะสมพิษบริเวณผิวหนังของปลาปักเป้า grass puffer (*Takifugu niphobles*) มีการสะสมพิษอยู่ที่บริเวณผิวลำตัวโดยเมือกที่ขับออกมาเคลือบลำตัว ยกเว้นในส่วนของอวัยวะภายใน (internal organs) เนื่องจากพิษที่ปลาปักเป้าขับออกมาเพื่อป้องกันตัวเองจากศัตรูหรือจากสภาพแวดล้อมที่ไม่เหมาะสมเป็นต้น ทำให้ปลาสร้างสารพิษเหล่านี้ออกมาเคลือบบริเวณผิวภายนอกลำตัว Saito และคณะ (1985) ได้ทดลองการสร้างสารพิษ Tetrodotoxin ของปลาปักเป้าบริเวณผิวลำตัวโดยการเช็ดเมือกออกไปจากลำตัวโดยใช้ผ้าก็อซ พบว่าปลามีการสร้างเมือกจำนวนมากมาปกคลุมและเมือกที่สร้างขึ้นมีปริมาณของสารพิษ Tetrodotoxin ในปริมาณมาก สาร

เมือกหรือของเหลวที่สัตว์น้ำสร้างขึ้นประกอบไปด้วยโมเลกุลของสารชนิดต่างๆ มากมาย และจัดเป็นการตอบสนองของระบบภูมิคุ้มกันด่านแรกในการป้องกันตัวเองจากสิ่งแวดล้อมหรือศัตรูอื่นๆ (Alexander and Ingram, 1992) นอกจากนี้ยังมีรายงานการศึกษาของ Matsumura (1995) ที่พบว่าสารพิษ Tetrodotoxin อาจมีบทบาทในการเป็นฮอร์โมนเพศ (sex pheromone) ได้เช่นกัน นอกเหนือจากการมีคุณสมบัติเป็น defense agent และสามารถเป็นสารที่ช่วยเพิ่มระบบภูมิคุ้มกันของปลาดีขึ้น (Arakawa, 2001) อย่างไรก็ตามบทบาทของสารพิษ Tetrodotoxin ที่สร้างและสะสมในปลาปักเป้านั้นยังไม่ชัดเจนนักเนื่องจากมีรายงานการศึกษาค่อนข้างน้อย

2.7 การแพร่กระจายของ Tetrodotoxin ในธรรมชาติ

พบในสัตว์น้ำได้หลายชนิดเช่น แมงดาถ้วย มีลักษณะตัวเล็กและหางกลมเรียว พบตามพื้นทะเลที่เป็นดินโคลนและตามลำคลองในป่าชายเลน การที่แมงดาถ้วยเป็นพิษนั้นจะเกิดเฉพาะช่วงเดือนกุมภาพันธ์ ถึง กันยายน เหตุที่แมงดาถ้วยมีพิษเป็นบางช่วง สันนิษฐานว่าเวลาดังกล่าวอาจมีการเจริญแพร่พันธุ์อย่างรวดเร็วของแพลงก์ตอนบางชนิด เช่น ไดโนแฟลกเจลเลต ที่สร้างสารพิษ แล้วแพลงก์ตอนชนิดดังกล่าวถูกกินโดยหอยหรือหนอนซึ่งเป็นสัตว์หน้าดิน เมื่อพิษเข้ามาสะสมในหอยหรือหนอนแล้วถูกกินโดยแมงดาถ้วย พิษจึงมาสะสมอยู่ในเนื้อและไข่ของแมงดาถ้วยเมื่อคนบริโภคแมงดาถ้วยตัวที่มีสารพิษสะสมอยู่ จึงทำให้เกิดอาการพิษได้ แม้ว่าจะได้ปรุงไข่หรือเนื้อที่บริโภคให้สุกแล้วก็ตามเมื่อเราบริโภคแมงดาถ้วยที่มีสารพิษเข้าไป จะทำให้เกิดอาการมึนงง ปวดศีรษะ คลื่นไส้ อาเจียน หัวใจเต้นเร็ว ปากชา แขนขาอ่อนเปลี้ย กล้ามเนื้อไม่ทำงาน หมดความรู้สึกและอาจเสียชีวิตได้ ขึ้นอยู่กับปริมาณที่บริโภคเข้าไปมากหรือน้อย การรักษาให้ล้างท้อง โดยทำให้อาเจียน และรีบนำส่งโรงพยาบาลอย่างเร็วที่สุด อัธยา และคณะ (2530) รายงานว่าการสร้าง Tetrodotoxin ของแบคทีเรียในแมงดาทะเลไทย (*Carcinoscorpius rotundicauda*) ซึ่งเป็นสัตว์ชนิดหนึ่งที่พบว่ามีความเป็นพิษ เนื่องจากเททโทรโดท๊อกซิน การศึกษาทำโดยแยกแบคทีเรียจากลำไส้ และไข่ของแมงดาทะเลที่ยังมีชีวิตอยู่ สายพันธุ์ของแบคทีเรียที่พบมากถูกเลี้ยงใน 2 x ORI medium ที่ 20 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชม. นำเซลล์แบคทีเรียที่ได้มาทำให้เซลล์แตก โดยใช้ ultrasonication แล้วกรองโดย ultrafiltration นำสารที่กรองได้บางส่วนมาทำให้บริสุทธิ์ โดยผ่าน Bio-Gel P-2 คอลัมน์ จากการวิเคราะห์โดยใช้ HPLC, ultraviolet spectrophotometry (UV) และ GC-MS พบว่า 15 ใน 16 ชนิดของแบคทีเรียที่นำมาวิเคราะห์สามารถสร้าง Tetrodotoxin หรือ anhydrotetrodotoxin ได้ นอกจากนี้จากการวิเคราะห์โดยใช้พื้นฐานทางชีวเคมีและลักษณะอื่น ๆ แสดงให้เห็นว่า 1 ใน 15 ชนิด เป็น *Vibrio* sp.

อัธยา และคณะ (2533) รายงานว่า พบพิษในปลาปักเป้า *Arothron meppa* และ *Lagocephalus inermis* ด้วย ซึ่งยังไม่เคยมีรายงานมาก่อน ดังนั้น จึงได้ทำการทดลองทางเคมีเพิ่มเติม เพื่อยืนยันชนิดของพิษดังกล่าว โดยได้นำส่วนที่พบพิษ คือ ตับ และไข่ของ *L. inermis* และเนื้อของ *A. mappa* มาทำการสกัด เพื่อรวบรวมพิษโดยใช้เมทธิลแอลกอฮอล์ที่มีกรดน้ำส้มผสมอยู่ 1% และสกัดไขมันออกโดยใช้คลอโรฟอร์ม พิษที่สกัดได้ถูกนำมาทำให้บริสุทธิ์เป็นบางส่วน โดยใช้วิธี คอลัมน์โครมาโตกราฟี ใช้ Bio-Gel P-2 คอลัมน์ และสกัดโดยใช้กรดน้ำส้ม 0.1 N เก็บรวบรวมส่วนที่เป็นพิษมาวิเคราะห์ โดยวิธี HPLC ผลที่ได้แสดงว่าพิษในตับ ไข่ ของ *L. inermis* และในเนื้อของ *A. mappa* ประกอบด้วย tertrodotoxin และ อนุพันธ์ anhydrotetrodotoxin

อัธยา (2536) รายงานว่า ปลาปักเป้าในวงศ์ Tetraodontidae เป็นชนิดที่นิยมเอามาบริโภค โดยทำการสำรวจปลาปักเป้าในทะเลอันดามัน พบปลาปักเป้า *Lagocephalus spadiceus, L. lunaris, L. inermis, L. sceleratus, Arothron immaculatus, A. stellatus, Diodon hystrix, Chelonodon patoca*, และปลาปักเป้าสีทอง *Xenopterus naritus* ทำการวิเคราะห์พิษในเนื้อเยื่อส่วนต่าง ๆ ของแต่ละตัวอย่าง โดยใช้วิธี mouse bioassay และคำนวณปริมาณพิษ โดยพบว่า *L. spadiceus*, *D. hystrix* และ *A. stellatus* เป็นชนิดที่ปลอดภัย โดยไม่พบพิษในทุกส่วนของเนื้อเยื่อที่ตรวจสอบ ส่วนอีก 5 ชนิด มีพิษในเนื้อเยื่อต่าง ๆ ในระดับต่าง ๆ กันทั้งนี้ พบความเป็นพิษสูงสุดในเนื้อของ *Chelonodon patoca* ทุกตัวอย่าง ในปริมาณ 156 MU/g รองลงมา ได้แก่ *Lagocephalus lunaris* ซึ่งพบพิษในเนื้อสูงสุด 20 MU/g ส่วน *Xenopterus naritus* หรือปลาปักเป้าสีทองนั้น พบว่ามีพิษในเนื้อเยื่อทุกส่วนที่นำมาวิเคราะห์ของทุกตัวอย่าง โดยปริมาณที่พบในเนื้อสูงสุด 18 MU/g ทั้งนี้เป็นการรายงานเกี่ยวกับพิษของปลาปักเป้าเหลืองทองเป็นครั้งแรกในประเทศไทย

อัธยา (2539) รายงานว่า ไข่แมงดาถ้วยมีพิษแต่ไม่พบพิษในไข่แมงดาจาน ทั้งนี้จากการที่ได้นำเอาไข่ที่มีพิษมาสกัดพิษและทำให้บริสุทธิ์เป็นบางส่วนแล้ว นำไปวิเคราะห์ด้วย HPLC นั้น พบว่า tetrodotoxin และพิษอัมพาต (Paralytic Shellfish Poison, PSP) บางชนิดด้วย นอกจากนี้ยังมีการแพร่กระจายของสารพิษ Tetrodotoxin ในสัตว์ชนิดอื่นนอกเหนือจากปลาปักเป้า ดังตารางที่ 4

ตารางที่ 4 การแพร่กระจายของสารพิษ Tetrodotoxin ในสัตว์นอกเหนือจากปลาปักเป้า

Animals		Toxic parts	Maximal toxicity**	References
Platyhelminthes				
Turbellaria				
Flatworms	*Planocara* spp.	Whole body	Strongly	Miyazawa *et al* (1986)
Nemertinea				
Ribbonworms	*Lineus fuscoviridis*	Whole body	Strongly	Miyazawa *et al.* (1988)
	Tubulanus punctatus	Whole body	Moderate	Miyazawa *et al.* (1988)
	Cephalothrix linearis	Whole body	Strongly	Ali et al. (1990)
Mollusca				
Gastropoda	*Tutufa lissostoma*	Digestive gland	Moderate	Noguchi *et al.* (1984)
	Niotha clathrata	Whole body	Strong	Jeon *et al.* (1984)
	Natica lineate	Whole body	Moderate	Hwang *et al*. (1990)
	Cymatium echo	Digestive gland	Weak	Narita (1991)
	Pugilina ternotoma	Digestive gland	Weak	Narita (1991)
Annelida				
Polychaeta	*Pseudopolamilla*	Whole body	Weak	Yasumoto *et al.* (1989)
Arthropoda	*occelata*			
Xanthidae crabs		Whole body	Weak	Yasumura *et al.* (1986)
Horseshore crab	*Zosimus aeneus*	Egg	Weak	Kungsuwan *et al.* (1987)
	Carcinoscorpius			
Chaetognatha	*rotundicauda*			Thuesen *et al.* (1988)
Arrowworms		Head	Not detected	Thuesen *et al.* (1988)
	Parasagitta spp.	Head	Not detected	
Echinodermata	*Flaccisagitta* spp.			Maruyama *et al.* (1984)
Starfish		Whole body	Moderate	
Vertebrata	*Astropecte*n spp.			Yotsu *et al.* (1990)
Amphibia		Skin, egg, ovary	Moderate	Yasumoto *et al.* (1988)
Newts	*Notophthalmus* spp.	Skin, egg, ovary, muscle, blood	Weak	Yotsu *et al*. (1990)
	Cynopsis spp.	Skin, egg, ovary, muscle, blood	Not detected	Daly *et al*. (1994)
	Triturus spp.	Skin	Moderate	Tanu *et al*. (2001)
Frogs	*Colostethu*s sp.	Skin	Moderate	
	Polypedates sp.			

** Weak: 10-100 MU/g tissue (weakly toxic), Moderate: 100-1000 MU/g tissue (Moderately toxic), Strong: >1000 MU/g tissue (strongly toxic), โดยที่ 1 MU (mouse unit) เป็นปริมาณสารพิษที่ฆ่าหนูตัวผู้ (ddY strain) ที่มีน้ำหนัก 20 g ตายภายใน 30 นาที หลังจากฉีดเข้าช่องท้อง

ที่มา : Miyazawa และ Noguchi (2001)

2.8 ความเป็นพิษและความต้านทานต่อสารพิษ Tetrodotoxin ในสัตว์น้ำ

ในสัตว์น้ำนั้นความเป็นพิษของสารพิษ TTX มีกลไกการออกฤทธิ์เหมือนกับสารพิษในกลุ่มของ Paralytic Shellfish Poison (PSP) ที่จะไปยับยั้งการทำงานของ Na^+ channel ซึ่งสามารถทำให้ปลาหรือสัตว์น้ำวัยอ่อนตายได้ และเมื่อนำปลาปักเป้าที่ไม่มีพิษมาเลี้ยงโดยให้กินอาหารที่ผสมสารพิษ TTX 4 MU/g/ต่อวัน พบว่าจะแสดงอาการเป็นพิษภายใน 40 วัน และถ้าให้ในระดับ 0.5 MU/g/day ปลาปักเป้าจะแสดงอาการเป็นพิษได้ใน 100 วัน และความเป็นพิษจะเพิ่มขึ้นไปจนถึง 240 วัน แต่จากการทดลองนี้พบว่าปลาปักเป้าที่ไม่มีพิษแต่ได้รับอาหารที่มีการปนเปื้อนสารพิษ 4 MU/g/d พบว่าสามารถอยู่ได้แม้ว่าเลี้ยงนานถึง 139 วันก็ตามเป็นไปได้ว่าปลาทั้งสามชนิดนี้อาจมีการกำจัดหรือทำให้พิษลดความรุนแรงลงได้ (Detoxify) หรือมีการสร้างภูมิต้านทานต่อพิษชนิดนี้ได้ ดังนั้นจึงมีการศึกษาการยับยั้งหรือต้านทานต่อความเป็นพิษของ TTX ในสัตว์น้ำเพื่อทดสอบหาค่าความเข้มข้นต่ำสุดของสารพิษ TTX ที่ทำให้สัตว์น้ำตายได้โดยการฉีดสารละลายที่มีส่วนผสมของสารพิษเข้าช่องท้องของปลาแต่ละชนิด (Saito *et al.,* 1985) ดังแสดงในตารางที่ 5 พบว่าสัตว์น้ำแต่ละชนิดมีความทนทานต่อพิษได้ในระดับที่แตกต่างกัน

ตารางที่ 5 ความสามารถในการต้านทานพิษ Tetrodotoxin ในสัตว์น้ำชนิดต่าง

	Species	MLD** (MU/20g)	References
TTX bearing organisms			
Xanthid crab	*Atergatis floridus*	1000	Koyama *et al*. (1983)
Tropical goby	*Yongeichthys criniger*	>300	Noguchi and Hashimoto (1973)
Japanese newt	*Cynops pyrrhogaster*	>2000	Arakawa (2001)
Puffer fish			Saito *et al*. (1985)
Toxic	*Takifugu niphobles*	700-750	
	T. pardalis	500-550	
	T. rubripes (culture)	300-500	
Generally non-toxic or rarely toxic	*Lagocephalus wheeleri*	15-18	
	L. gloveri	19-20	
	Liosaccus cutaneous	13-15	
Non-toxic	*Ostracion immaculatum*	0.9-1.3	
TTX free vertebrates			Saito *et al.* (1985)
Teleosts	*Oplegnathus punctatus*	0.8-0.9	
	O. fasciatus	0.8-1.8	
	Girella punctata	0.3-0.5	
Land mammal			
Mouse	*Mus musculus*	1	

** Minimum lethal dose of TTX (MU/20g body mass)

ที่มา : Noguchi และคณะ (2006b)

จากตารางที่ 5 แสดงให้เห็นว่าสัตว์น้ำที่มีการสะสมสารพิษ TTX ไว้ในตัวจะมีความสามารถในการต้านทานพิษชนิดนี้ได้ในระดับสูงเช่น ปลาปักเป้าสามารถต้านทานต่อพิษได้มากกว่าหนูถึง 300-750 เท่า ในขณะที่ปลาหรือสัตว์น้ำอื่นๆ ที่ไม่มีพิษนี้สะสมในตัวจะมีความต้านทานได้ต่ำมาก เช่น ปลากระดูกแข็ง *(Oplegnathus punctatus, O. fasciatus และ Girella punctata)* ที่สามารถต้านทานพิษ TTX ได้เพียง 0.3 -1.8 เท่า เมื่อเปรียบเทียบกับหนูขาว ซึ่งสอดคล้องกับการรายงานของ Hwang และคณะ. (1990) ที่ได้ศึกษาผลของสารพิษ TTX ในหอยทาก 2 กลุ่ม ได้แก่กลุ่มของหอยทากที่มีพิษอยู่ในตัวมี 8 ชนิด ดังนี้ *Polinices didyma, Natica lineate, N. vitellus, Zeuxis sufflatus, Niotha clathrata, Oliva miniacea, O. mustelina* and *O. hirasei* และกลุ่มของหอยทากที่ไม่มีพิษมี 2 ชนิด ดังนี้ *Pomacea canaliculatus* และ *Satsuma bairdi* นั้นพบว่าหอยทากที่มีพิษมีค่า minimum lethal dose ของสารพิษ TTX ประมาณ >44.5 μg TTX/20 g ของน้ำหนักตัว ในขณะที่หอยทากที่ไม่มีพิษนั้นมีค่า MLD เท่ากับ <3.6 μg TTX/20 g ของน้ำหนักตัว ซึ่งผลการทดลองที่ได้เป็นไปในทิศทางเดียวกันและพอจะสรุปได้ว่าปลาหรือสัตว์น้ำอื่นๆ ที่มีการสะสมสารพิษ TTX ในตัวจะมีความสามารถต้านทานพิษของ TTX ได้มากกว่าสัตว์น้ำที่ไม่มีการสะสม TTX ปัจจุบันยังไม่มีข้อมูลเพียงพอที่จะอธิบายได้ว่าทำไมสัตว์น้ำที่มีการสะสมสารพิษเหล่านี้ไว้ในตัวจึงไม่ได้รับอันตรายจากพิษที่สะสมไว้ (Noguchi *et al.,* 2006b)

2.9 การปนเปื้อนสารพิษ Tetrodotoxin ในปลาปัก

จากการสัมภาษณ์ฉัตรชัย (2551) พนักงานโรงงานปลาปักภาคใต้ ตำบลบ้านพรุ จังหวัดสงขลา พบว่าโรงงานผลิตปลาปักของไทยส่วนใหญ่รับซื้อวัตถุดิบจากเรือประมงทั่วไป และบางแห่งมีเรือประมงเป็นของตนเอง รวมทั้งรับซื้อปลานอกน่านน้ำไทย เพื่อให้ได้วัตถุดิบเพียงพอกับความต้องการของตลาดปลาปัก วัตถุดิบที่ใช้ในการผลิตปลาปักส่วนใหญ่ (ร้อยละ 60-70) เป็นเศษปลาที่คนไม่นิยมบริโภคหรือที่เรียกว่าปลาเป็ดที่จับได้จากเรือประมง นอกจากนี้ยังใช้ชิ้นส่วนของปลา กุ้ง ที่เหลือจากโรงงานแปรรูปต่าง ๆ เช่น โรงงานแช่เย็นแช่แข็ง โรงงานปลาทูน่ากระป๋อง โรงงานซูริมิ โรงงานแปรรูปกุ้งส่งออก และจากการนำปลาเป็ดจากบริเวณสะพานปลาภายในประเทศไทยนั้น ในปัจจุบันมีปลาที่เป็นตัวเลือกน้อยลงในการนำเข้าโรงงานปลาปัก จึงทำให้มีปลาปักเป้าผสมไปกับปลาเป็ดชนิดอื่นประมาณร้อยละ 4-7 แต่ในเดือนมีนาคม ถึง เดือน

กันยายน จะมีปลาปักเป้าผสมกับปลาเป็ดชนิดอื่นประมาณร้อยละ 10-20 จึงทำให้ปลาปั่นที่ผลิตออกมามีโอกาสที่จะปนเปื้อนสารพิษ terodotoxin สูง และอาจจะส่งผลต่อผู้บริโภคได้

วัตถุประสงค์ของการวิจัย

1. เพื่อศึกษาระดับความเป็นพิษของสารพิษ Tetrodotoxin ต่อการเจริญเติบโตของกุ้งขาว
2. เพื่อศึกษาผลของสารพิษ Tetrodotoxin ที่ปนเปื้อนปลาปักเป้าต่อสุขภาพของกุ้งขาว
3. เพื่อศึกษาผลของการตกค้างของสารพิษ Tetrodotoxin ในกุ้งขาว

บทที่ 2
วัสดุ อุปกรณ์และวิธีการทดลอง

1. วัสดุ

1.1 กุ้งขาว

กุ้งขาวในการทดลองใช้กุ้งขาว 1-2 กรัม/ตัว คัดขนาดกุ้งขาวที่มีขนาดใกล้เคียงกันใส่ตู้ทดลองที่สะอาด

1.2 อาหารทดลอง

2. อุปกรณ์

2.1 อุปกรณ์เลี้ยงกุ้งทดลอง

2.1.1 อุปกรณ์ในการเลี้ยงกุ้งทดลอง ได้แก่ ตู้ทดลองขนาด 20 x 48 x 20 นิ้ว ความจุน้ำ 300 ลิตร จำนวน 24 ตู้

2.1.2 อุปกรณ์ระบบให้อากาศ ประกอบด้วย เครื่องให้อากาศ ท่อลม สายยาง และหัวทราย

2.1.3 อุปกรณ์เปลี่ยนถ่ายน้ำ ได้แก่ สายยางดูดตะกอน

2.1.4 อุปกรณ์ขนย้ายกุ้งทดลอง ได้แก่ ถังพลาสติก และสวิง

2.2 อุปกรณ์เตรียมอาหารทดลอง

2.2.1 เครื่องเตรียมอาหารทดลองของ Hobart Model A 200 ประกอบด้วยชุดผสมอาหารแบบมีใบพัดและชุดเครื่องอัดเม็ดอาหาร

2.2.2 อุปกรณ์ชั่งตวงวัตถุดิบอาหาร ได้แก่ เครื่องชั่งไฟฟ้าทศนิยม 2 ตำแหน่งของ Sartorius รุ่น Basic และเครื่องชั่งไฟฟ้า 4 ตำแหน่ง ของ Sartorius รุ่น Research กระบอกตวง บีกเกอร์และมีดตัดอาหาร

2.2.3 ถาดเตรียมอาหารและตู้อบอาหาร

2.2.4 ตู้แช่แข็งใช้สำหรับเก็บอาหารทดลอง

2.3 อุปกรณ์วิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมีของอาหารทดลอง

2.3.1 อุปกรณ์วิเคราะห์ความชื้น ได้แก่ ขวดชั่ง (weighing bottle) ตู้อบ (hot air oven) ของ Memmert โถดูดความชื้น (desiccators) เครื่องชั่งไฟฟ้า 4 ตำแหน่ง

2.3.2 อุปกรณ์วิเคราะห์โปรตีน ได้แก่ เครื่องย่อย (digestion apparatus) ของ Gerhard รุ่น Kjeldatherm เครื่องกลั่น (distillation apparatus) ของ Gerhardt รุ่น Vapodest I หลอดย่อยโปรตีน (digestion tube) กระบอกตวง บีกเกอร์ บิวเรตและขวดรูปชมพู่

2.3.3 อุปกรณ์วิเคราะห์ไขมัน ได้แก่ ชุดเครื่องมือวิเคราะห์ไขมัน รุ่น Soxtec System HT6 ไส้กรองสาร ถ้วยสกัดสาร ตู้อบ โถอบแห้ง โถดูดความชื้นและเครื่องชั่งไฟฟ้าทศนิยม 4 ตำแหน่ง

2.3.4 อุปกรณ์วิเคราะห์เถ้า ได้แก่ ถ้วยกระเบื้องเคลือบ (crucible) เตาเผา (muffle furnace) ของ Gallenkamp โถดูดความชื้น (desiccators) และเครื่องชั่งไฟฟ้าทศนิยม 4 ตำแหน่ง

2.4 อุปกรณ์วิเคราะห์องค์ประกอบเลือด

2.4.1 อุปกรณ์เก็บเลือด ได้แก่ เข็มขนาด 25G ยาว 1 นิ้ว กระบอกฉีดยาพลาสติกขนาด 1 มิลลิลิตรและหลอดพลาสติก (micro tube) ขนาด 1.5 มิลลิลิตร

2.4.2 เครื่องสำหรับแยกซีรัม ได้แก่ เครื่องหมุนเหวี่ยงที่ควบคุมอุณหภูมิได้ (Beckman, Avanti^{TM} 30 centrifuge) และเครื่องสเปคโตรโฟโตมิเตอร์ (spectrophotometer)

2.4.3 อุปกรณ์สำหรับนับเม็ดเลือด คือ ฮีมาไซโตมิเตอร์ (heamacytometer) กล้องจุลทรรศน์

2.4.4 อุปกรณ์สำหรับเจือจางเลือด ได้แก่ หลอดพลาสติกขนาด 1 มิลลิลิตร ไมโครปิเปตทิปและเครื่องเขย่าผสม (Vertex meter)

2.5 อุปกรณ์ศึกษาพยาธิสภาพของเนื้อเยื่อ

2.5.1 ชุดอุปกรณ์ผ่าตัด

2.5.2 เครื่องเตรียมเนื้อเยื่ออัตโนมัติ (automatic tissue processor) ของ Technicon Corporation รุ่น Autotechnicon Mono MOD. 2A

2.5.3 เครื่องตัดชิ้นเนื้อเยื่อ คือ ไมโครโตม (microtome) (Jung AG Heidelberg) ใบมีดตัดเนื้อเยื่อ (Leica, Disposible Microtome Blades) อ่างน้ำอุ่น (water bath) และสไลด์

2.5.4 อุปกรณ์เตรียมสไลด์ถาวร คือ ตู้อบควบคุมอุณหภูมิ (Sunyo, Program Oven) ชุดสำหรับใส่สีย้อมและแผ่นปิดสไลด์

2.5.5 เครื่องเอ็มเบดดิ้ง (embedding center)

2.5.6 เตาร้อน (hot plate)

2.5.7 กล้องถ่ายภาพของ Olympus รุ่น AX 70 และกล้องจุลทรรศน์แบบเลนส์ประกอบของ Olympus รุ่น C-35 AD

3. สารเคมี

3.1 สารเคมีสำหรับวิเคราะห์ส่วนประกอบทางโภชนาการของอาหารทดลอง (ภาคผนวก ก)

3.2 สารเคมีสำหรับวิเคราะห์องค์ประกอบเลือดของกุ้งขาว (ภาคผนวก ก)

3.3 สารเคมีสำหรับการศึกษาทางด้านเนื้อเยื่อวิทยาของกุ้งขาว (ภาคผนวก ก)

สารเคมีสำหรับวิเคราะห์ปริมาณ Tetrodotoxin ในอาหารกุ้งขาว และตัวกุ้งขาว (ภาคผนวก ก)

4. วิธีการทดลอง

4.1 การเตรียมอุปกรณ์การทดลอง

ใช้ตู้กระจกขนาด 90 x 45 x 45 เซนติเมตร ความจุน้ำ 180 ลิตร (ต่อหน่วยทดลอง) ทำความสะอาด และติดตั้งอุปกรณ์ให้อากาศให้พร้อมสมบูรณ์ แล้วเติมน้ำทะเลจนถึงปริมาตรที่ต้องการ น้ำทะเลที่ได้มาจากบ่อพักน้ำที่สูบจากทะเล ระบบน้ำที่ใช้เป็นระบบใช้แล้วทิ้ง โดยเปลี่ยนถ่ายน้ำวันละ 60 เปอร์เซ็นต์ ตรวจวัดคุณภาพน้ำทุกสัปดาห์ตลอดระยะเวลาการทดลอง

4.2 การเตรียมสัตว์ทดลอง

กุ้งขาวระยะโพสลาวาร์ 15 จำนวน 20,000 ตัว จากฟาร์มเพาะเลี้ยงกุ้งเอกชน นำมาอนุบาลในบ่อซีเมนต์ขนาดความจุน้ำ 5 ตัน โดยในช่วงสัปดาห์แรกให้อาร์ทีเมีย หลังจากนั้นให้กินอาหารเม็ดสำเร็จรูป วันละ 3-4 ครั้ง และเปลี่ยนถ่ายน้ำทุกวัน อนุบาลจนได้ขนาดกุ้งประมาณ 1.5 กรัม และสุ่มกุ้งไปเลี้ยงในตู้ทดลอง จำนวน 20 ตัว/ตู้ และเลี้ยงกุ้งด้วยอาหารทดลองชุดควบคุม เป็นเวลา 3 วัน เพื่อปรับพฤติกรรมกุ้งให้เคยชินกับอาหารทดลองและตู้ทดลอง

4.3 การเตรียมอาหารทดลอง

วิเคราะห์วัตถุดิบอาหาร และคำนวณสูตรอาหารให้มีระดับคุณค่าทางโภชนาการเท่ากันทุกชุดการทดลอง แต่ละสูตรมีระดับโปรตีนระหว่าง 33 – 35 เปอร์เซ็นต์ ไขมันระหว่าง 7 – 8 เปอร์เซ็นต์ เถ้าระหว่าง 8 – 9 เปอร์เซ็นต์ และความชื้นระหว่าง 3 -4 เปอร์เซ็นต์ แต่ให้มีระดับ Tetrodotoxin ที่ต่างกัน 6 ระดับ คือ 0, 1, 1.5, 2, 2.5 และ 3 พีพีเอ็ม ดังตารางภาคผนวกที่ ข 2 เริ่มโดยการนำปลาปักเป้าพ่นที่มีสารพิษ Tetrodotoxin ผสมกับรวมกับวัตถุดิบอาหารอื่นๆ ในเครื่องผสมอาหารจนวัตถุดิบเข้ากันดี จึงนำมาอัดเม็ดอาหาร หลังจากนั้นอบที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียสจนแห้งดี บรรจุลงถุงพลาสติกเก็บรักษาในตู้เย็นที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

เตรียมอาหารทดลอง โดยการเตรียมตัวอย่างปลาปักเป้า 3 ชนิดคือ *Lagocephalus lunaris*, *L. inermis* และ *L. spediceus* โดยรวบรวมปลาปักเป้าจากสะพานปลาที่มหาชัย จังหวัดสมุทรสาคร และเตรียมตัวอย่างไข่ปลาปักเป้าป่น โดยนำไข่ปลาปักเป้าสดจากศูนย์วิทยาศาสตร์การแพทย์จังหวัดสมุทรสงคราม นำวัตถุดิบทั้งสองอย่างมานึ่ง และอบแห้งที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 48 ชั่วโมง บดให้ละเอียดและนำปลาปักเป้าป่นและไข่ปลาปักเป้าป่นไปวิเคราะห์หาปริมาณสารพิษ Tetrodotoxin ที่มีอยู่ เพื่อเตรียมเป็นวัตถุดิบแทนปลาป่นปกติ จากนั้นนำตัวอย่างปลาป่นที่มีปริมาณสารพิษที่เพียงพอแล้วมาเตรียมอาหารทดลองสำหรับกุ้งขาว

การเตรียมปลาปักเป้าป่น

นำปลาปักเป้าป่นที่มีปริมาณของสารพิษ Tetrodotoxin 2.25 พีพีเอ็ม 3 กิโลกรัม รวมกับไข่ปลาปักเป้าป่น มีปริมาณสารพิษ Tetrodotoxin 216.83 พีพีเอ็ม 75 กรัม

วิธีการคำนวณ

1. ปริมาณสารพิษ TTX จากปลาปักเป้าป่น

ในเนื้อปลาปักเป้าป่นมี Tetrodotoxin 0.75 มิลลิกรัม/กิโลกรัม เท่ากับ เนื้อปลา 1 กิโลกรัม มี Tetrtodotoxin 0.75 มิลลิกรัม

ถ้ามีเนื้อปลาปักเป้าป่น 3 กิโลกรัม เท่ากับมี Tetrodotoxin 0.75 X 3 = 2.25 มิลลิกรัม

2. ปริมาณสารพิษ TTX จากไข่ปลาปักเป้า

ในไข่ปลาปักเป้าป่นมี Tetrodotoxin เริ่มต้น 216.83 มิลลิกรัม/กิโลกรัม มีไข่ปลาปักเป้าอยู่ 416.23 g

แสดงว่าในไข่ปลาปักเป้ามีปริมาณสารพิษ (216.83 X 416.23) / 1,000 = 90.251 มิลลิกรัม หลังจากอบแล้วไข่ปลาปักเป้าป่นมีน้ำหนัก 134.25 กรัม แต่ปริมาณ Tetrodotoxin มีเท่าเดิม เพราะสารพิษชนิดนี้ไม่สามารถระเหย และหายไปโดยความร้อน

3. นำปลาปักเป้าป่นที่ร่อนได้ 3 กิโลกรัม ผสมกับไข่ปลาที่ผ่านการอบแห้งแล้ว 75 กรัม

- เนื้อปลาปักเป้าป่น 3 กิโลกรัม มีปริมาณ Tetrodotoxin เท่ากับ 0.75 X 3 = 2.25 มิลลิกรัม ต่อ 3 กิโลกรัม

- ไข่ปลา 75 กรัม มีปริมาณ Tetrodotoxin เท่ากับ (75 X 90.251)/134.25 = 50.419553 มิลลิกรัม ต่อ 3

เมื่อนำมารวมกันจะมีปริมาณ Tetrodotoxin เท่ากับ 2.25 + 50.419553 = 52.669553 มิลลิกรัม ดังนั้นหลังการผสมแล้วปลาปักเป้าป่นก็จะมีปริมาณ Tetrodotoxin เท่ากับ 52.669553 มิลลิกรัม

ในปลาปักเป้าป่นเทียบต่อ 100 กรัม ก็จะได้ (52.6699553 / 3,075) X 100 = 1.71 มิลลิกรัม จากนั้นก็นำมาคำนวณอาหาร ดังนี้

สูตรที่ 1 ในปลาป่น 30 กรัม จะใช้ปลาป่นปกติ 30 กรัม ไม่ใช้ปลาปักเป้าป่น จึงไม่มีสารพิษ Tetrodotoxin

สูตรที่ 2 ในปลาป่น 30 กรัม จะใช้ปลาป่นปกติ 24 กรัม ใช้ปลาปักเป้าป่น 6 กรัม คำนวณโดย (6 X 1.71) / 100 = 0.102 เมื่อคำนวณเป็น พีพีเอ็ม จะได้ 0.102 X 10 = 1.02 พีพีเอ็ม

สูตรที่ 3 ในปลาป่น 30 กรัม จะใช้ปลาป่นปกติ 21 กรัม ใช้ปลาปักเป้าป่น 9 กรัม คำนวณโดย (9 X 1.71) / 100 = 0.153 เมื่อคำนวณเป็น พีพีเอ็ม จะได้ 0.154 X 10 = 1.53 พีพีเอ็ม

สูตรที่ 4 ในปลาป่น 30 กรัม จะใช้ปลาป่นปกติ 18 กรัม ใช้ปลาปักเป้าป่น 12 กรัม คำนวณโดย (12 X 1.71) / 100 = 0.205 เมื่อคำนวณเป็น พีพีเอ็ม จะได้ 0.205 X 10 = 2.05 พีพีเอ็ม

สูตรที่ 5 ในปลาป่น 30 กรัม จะใช้ปลาป่นปกติ 15 กรัม ใช้ปลาปักเป้าป่น 15 กรัม คำนวณโดย (15 X 1.71) / 100 = 0.256 เมื่อคำนวณเป็น พีพีเอ็ม จะได้ 0.256 X 10 = 2.56 พีพีเอ็ม

สูตรที่ 6 ในปลาป่น 30 กรัม จะใช้ปลาป่นปกติ 12 กรัม ใช้ปลาปักเป้าป่น 18 กรัม คำนวณโดย (18 X 1.71) / 100 = 0.307 เมื่อคำนวณเป็น พีพีเอ็ม จะได้ 0.307 X 10 = 3.07 พีพีเอ็ม

วิธีการเตรียมอาหารทดลอง

4.3.1 นำวัตถุดิบที่ใช้ในการทดลองไปวิเคราะห์คุณค่าทางโภชนาการ ได้แก่ โปรตีน, ไขมัน ,ความชื้น, เถ้า, เยื่อใย และคาร์โบไฮเดรต และร่อนผ่านตะแกรงขนาด 30 เมช (mesh) แล้วชั่งน้ำหนักของวัตถุดิบแต่ละชนิด ดังตารางที่ 7

4.3.2 นำส่วนผสมทั้งหมด ยกเว้นน้ำมันปลาและน้ำกลั่น ผสมเข้าด้วยกันด้วยเครื่องผสมอาหาร(Hobart) เป็นเวลา 15 นาที แล้วเติมน้ำมันปลาลงไป ประมาณ 10 นาที เมื่อส่วนผสมเข้ากันดีแล้วเติมน้ำกลั่นประมาณ 40 เปอร์เซ็นต์ของน้ำหนักอาหาร

4.3.3 นำวัตถุดิบอาหารที่ผสมเข้ากันดีแล้วเข้าเครื่องอัดเม็ดอาหารผ่านแว่นขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 3 มิลลิเมตร โดยตัดเม็ดอาหารให้มีขนาดใกล้เคียงกัน

4.3.4 นำเม็ดอาหารที่ได้อบที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส นาน 24 ชั่วโมง ผึ่งให้เย็นบรรจุใส่ถุงพลาสติก เก็บรักษาไว้ในตู้เย็นที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

4.3.5 นำอาหารทดลองไปวิเคราะห์คุณค่าทางโภชนาการ ได้แก่ โปรตีน, ไขมัน, ความชื้น, เยื่อใย และเถ้าตามวิธีมาตรฐานของ AOAC (1990)

ตารางที่ 6 ส่วนประกอบและปริมาณวัตถุดิบในอาหารแต่ละสูตรของการทดลองสารพิษ Tetrodotoxin

ส่วนประกอบ (ก./อาหาร 100 กรัม	T1	T2(4:1)	T3(7:3)	T4(3:2)	T5(1:1)	T6(2:3)
ปลาป่น	30	24	21	18	15	12
ปลาป๊กเป้าป่น	0	6	9	12	15	18
กากถั่วเหลือง	15	16	16	16	17	17
Poultry meal	5	5	5	5	5	5
แป้งสาลี	20	20	20	20	20	20
แป้งข้าวจ้าว	18.349	17.349	17.349	17.349	16.349	16.349
น้ำมันปลา	2	2	2	2	2	2
เลซิติน	1.5	1.5	1.5	1.5	1.5	1.5
โคเลสเตอรอล	0.15	0.15	0.15	0.15	0.15	0.15
วิตามิน + แร่ธาตุรวม	2.5	2.5	2.5	2.5	2.5	2.5
โคลีนคลอไรด์	0.3	0.3	0.3	0.3	0.3	0.3
วิตามิน อี	0.08	0.08	0.08	0.08	0.08	0.08
วิตามิน ซี	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1
ซีลีเนียม	0.001	0.001	0.001	0.001	0.001	0.001
วีทกลูเตน	5	5	5	5	5	5
BHT	0.02	0.02	0.02	0.02	0.02	0.02
รวม (กรัม)	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00

4.4 แผนการทดลองและการเก็บรวบรวมข้อมูล

วางแผนการทดลองแบบสุ่มตลอด (Completely Randomized Design : CRD) ระยะเวลาในการเลี้ยง 8 สัปดาห์ โดยมีชุดการทดลอง 6 ชุดการทดลอง (treatment) ชุดการทดลองละ 4 ซ้ำ (replicate) ดำเนินการทดลองโดยเติมน้ำลงตู้ทดลองที่เตรียมไว้ 180 ลิตรต่อตู้ เมื่อเริ่มต้นทดลองสุ่มกุ้งที่อนุบาลไว้ลงในตู้ทดลองตู้ละ 20 ตัว จำนวน 24 ตู้ทดลอง ให้อาหารวันละ 5 ครั้ง คือ เวลา 7.00 น., 11.00 น., 15.00 น., 19.00 น. และ 22.00 น. โดยให้อาหารจนกุ้งอิ่ม บันทึกน้ำหนักอาหารที่ให้ทุกวันตลอดการทดลอง ทำการชั่งน้ำหนักกุ้งทดลองทุกๆ 2 สัปดาห์เพื่อศึกษาอัตราการเจริญเติบโต

ก่อนให้อาหารช่วงเช้าดูดตะกอนทำความสะอาดตู้ทดลองโดยวิธีกาลักน้ำแล้วเติมน้ำจากบ่อพักน้ำให้เท่าเดิมทุกครั้งเพื่อควบคุมคุณภาพน้ำให้เหมาะสมตลอดการทดลอง เมื่อสัปดาห์ที่ 4 ทำการสุ่มเก็บตัวอย่างกุ้งขาวของแต่ละกลุ่มการทดลอง ชุดการทดลองละ 8 ตัว จากตู้ที่เลี้ยงไว้เพื่อศึกษาทางเนื้อเยื่อวิทยา

เมื่อสิ้นสุดสัปดาห์ที่ 8 ทำการสุ่มเก็บตัวอย่างกุ้งขาวเพื่อศึกษา การเจริญเติบโต องค์ประกอบเลือด เนื้อเยื่อวิทยา และวิเคราะห์หาปริมาณ Tetrodotoxin ที่ตกค้างในตัวกุ้งขาว

4.5 การเก็บรวบรวมข้อมูล

4.5.1 ศึกษาผลของสารพิษ Tetrodotoxin จากปลาปักเป้าป่นต่อเจริญเติบโตของกุ้งขาว

ชั่งน้ำหนักกุ้งขาวทุก 2 สัปดาห์ โดยสุ่มชั่งน้ำหนักกุ้ง 5 ตัวต่อตู้เพื่อลดความเครียดของกุ้งขณะทดลองและนับจำนวนกุ้งในตู้ เพื่อทราบน้ำหนักที่เพิ่มขึ้นด้วยเครื่องชั่งไฟฟ้าทศนิยม 2 ตำแหน่ง พร้อมทั้งจดบันทึกไว้จนสิ้นสุดการทดลอง 8 สัปดาห์ นับจำนวนกุ้งที่เหลือและชั่งน้ำหนักของกุ้งในแต่ละซ้ำเพื่อนำข้อมูลที่ได้มาคำนวณหาค่าอัตราการเจริญเติบโต

- น้ำหนักกุ้งที่เพิ่มขึ้นเฉลี่ยต่อวัน (เปอร์เซ็นต์ weight gain) ตามวิธีการที่รายงานจาก Tipia-Salazar และคณะ (2004)

- อัตราการเปลี่ยนอาหารเป็นเนื้อ (feed conversion ratio; FCR) ตามวิธีการที่รายงานจาก Dupree และ Sneed (1966)

- อัตราการเจริญเติบโตจำเพาะ (specific growth rate; SGR) ตามวิธีการของ Ziaei-Nejad และคณะ (2006)

- ปริมาณอาหารที่กุ้งกิน (feed consumption)

- อัตราการรอดตาย (survival rate) ตามวิธีที่รายงานจาก Jantrarotai และคณะ (1994)

4.5.2 การตรวจสอบสุขภาพของกุ้งขาว

เก็บตัวอย่างกุ้งในสัปดาห์ที่ 8 หลังจากสิ้นสุดการทดลอง โดยสุ่มกุ้งขาวจากทุกชุดการทดลองๆ ละ 20 ตัว สำหรับกุ้งที่เหลือทำการศึกษาการเปลี่ยนแปลงทางเนื้อเยื่อวิทยาและการตกค้างของสารพิษ Tetrodotoxin ในตัวกุ้งขาว

4.5.2.1 การศึกษาองค์ประกอบเลือด

- ปริมาณเม็ดเลือดรวมทั้งหมด (Total haemocyte count) ตามวิธีการของ กิจการและสิทธิ (2538)

- ปริมาณโปรตีนในน้ำเลือด (protein in haemolymph) ตามวิธีการของ Lowry และคณะ (1951)

- ปริมาณน้ำตาลในเลือด (blood glucose) ตามวิธีการของ Hyvarinen และ Nikkila (1962)

- การวิเคราะห์กิจกรรมของเอนไซม์ฟีนอลออกซิเดส (phenoloxidase activity) โดยดัดแปลงจากวิธีการจาก Smith และ Soderhall (1983)

4.5.2.2 การศึกษาการเปลี่ยนแปลงเนื้อเยื่อของกุ้งขาว

สุ่มเก็บตัวอย่างเนื้อเยื่อกุ้งขาว สุ่มตัวอย่างกุ้งชุดการทดลองละ 10 ตัว ในสัปดาห์ที่ 4 และ 8 ของการทดลอง สุ่มตัวอย่างกุ้งแต่ละชุดการทดลองๆ ละ 10 และ 10 ตัว ตามลำดับ เพื่อศึกษาการเปลี่ยนแปลงทางเนื้อเยื่อวิทยาตามวิธีของ Bell และ Lightner (1988) โดยฉีดน้ำยาเดวิดสันบริเวณหัวใจ ตับ ส่วนหัว และกล้ามเนื้อลำตัวให้ทั่ว แล้วตัดส่วนหัวกุ้งออกเป็นสองซีก นำกล้ามเนื้อลำตัวดองในขวดที่บรรจุน้ำยาเดวิดสัน เพื่อรักษาสภาพของเนื้อเยื่อ ให้น้ำยาท่วมตัวเป็นเวลา 72 ชั่วโมง เพื่อให้น้ำยาดองซึมเข้าสู่เนื้อเยื่อได้ทั่วถึง ตัวอย่างที่นำมาศึกษาการเปลี่ยนแปลงทางเนื้อเยื่อคือ เนื้อเยื่อตับอ่อน (hepatopancreatic tissue) เนื้อเยื่อน้ำเหลือง (lymphoid cell) เหงือก (gill) เนื้อเยื่อสร้างเม็ดเลือด (hemopoietic tissue) หลังจากนั้นนำเนื้อเยื่อของอวัยวะทั้งหมดผ่านขั้นตอนการเตรียมเนื้อเยื่อโดยเครื่อง Automatic Tissue Processor นำเนื้อเยื่อมาฝังในพาราฟิน แล้วนำมาตัดด้วยเครื่องไมโครโตม (sliding microtome) หนา 3 ไมครอน ตามวิธีมาตรฐานของ Humason (1979) และย้อมด้วยสี Hematoxylin และ Eosin ตามวิธีของ Bancroft (1967) เพื่อนำไปทำสไลด์ถาวร และนำไปตรวจสอบการเปลี่ยนแปลงของเนื้อเยื่อโดยกล้องจุลทรรศน์

4.5.3 การวิเคราะห์สารพิษตกค้างในกุ้งขาว

เก็บตัวอย่างกุ้งขาวหลังจากทำการทดลองครบ 8 สัปดาห์ นำมาชุดการทดลองละ 10 ตัว เพื่อส่งวิเคราะห์หาสารพิษที่ตกค้างในเนื้อเยื่อโดยใช้เทคนิค Liquid Chromatography-Mass Spectrometry (LC-MS/MS) ณ กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ กระทรวงสาธารณสุข

4.6 การวิเคราะห์ข้อมูล

วิเคราะห์ข้อมูล โดยการใช้การวิเคราะห์ค่าความแปรปรวน ANOVA ด้วย CRD และเปรียบเทียบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยด้วยวิธี Duncan’s Multiple Range Test ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์ (Steel and Torrie, 1980)

บทที่ 3
ผลการทดลอง

3.1 ผลของสารพิษ Tetrodotoxin จากปลาปักเป้าป่นต่อการเจริญเติบโตของกุ้งขาว

3.1.1 องค์ประกอบทางเคมีของอาหารทดลอง

องค์ประกอบทางเคมีของอาหารในแต่ละชุดการทดลอง ดังแสดงในตารางที่ 7 พบว่ามีความชื้น 3.46±0.53 - 4.27±0.28 เปอร์เซ็นต์ โปรตีน 33.92±0.65 - 35.44±0.92 เปอร์เซ็นต์ ไขมัน 7.52±0.14 - 8.499±0.41 เปอร์เซ็นต์ เถ้า 8.69±0.47 - 9.41±0.43 เปอร์เซ็นต์

ตารางที่ 7 องค์ประกอบทางเคมีของอาหารทดลอง บนฐานน้ำหนักแห้ง[1] **(%)**

อาหารทดลอง	ระดับ TTX (พีพีเอ็ม)	ความชื้น	โปรตีน	ไขมัน	เถ้า
1	0	4.00±0.24	35.44±0.53	7.68±0.51	8.77±0.19
2	1.31	4.01±0.73	35.43±0.45	7.52±0.14	9.03±0.26
3	1.81	4.13±0.66	35.08±0.25	7.77±0.88	8.69±0.47
4	1.97	4.27±0.28	34.93±0.28	7.96±0.39	8.83±0.59
5	2.18	3.46±0.53	34.26±0.46	8.33±0.73	9.41±0.43
6	2.64	4.09±0.44	33.93±0.37	8.50±0.41	9.30±0.29

[1] ตัวเลขที่นำเสนอเป็นค่าเฉลี่ย ± ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน จากข้อมูล 3 ซ้ำ

3.1.2 การเจริญเติบโตและอัตราการรอดตายของกุ้งขาว

3.1.2.1 น้ำหนักเฉลี่ยต่อตัว

การเจริญเติบโตของกุ้งโดยน้ำหนักตัว (กรัม/ตัว) ที่ให้อาหารที่มี Tetrodotoxin 0 – 2.64 พีพีเอ็ม ไม่แตกต่างกันทางสถิติ เมื่อเลี้ยงนาน 4 สัปดาห์ และพบว่าระดับ Tetrodotoxin ในอาหารเริ่มมีผลต่อการเจริญเติบโต เมื่อเลี้ยงนาน 6 สัปดาห์ คือกุ้งที่กินอาหารที่มี Tetrodotoxin ระดับ 1.31 พีพีเอ็ม จะโตช้ากว่ากุ้งที่ให้อาหารไม่มี Tetrodotoxin อย่างไม่มีนัยสำคัญทางสถิติ (p›0.05) แต่กุ้งที่กินอาหารที่มี Tetrodotoxin ระดับ 1.81 – 2.64 พีพีเอ็ม นาน 6 สัปดาห์จะมีน้ำหนักตัวต่ำกว่ากุ้งที่ให้อาหารไม่มี Tetrodotoxin อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (p›0.05) จากน้ำหนักตัวในสัปดาห์ที่ 8 พบว่า

เมื่อกุ้งโตขึ้นจะมีความทนทานต่อพิษ Tetrodotoxin มากขึ้น คือระดับ Tetrodotoxin ที่ทำให้กุ้งโตช้ากว่าชุดควบคุมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (p›0.05) อยู่ที่ 2.18 – 2.64 พีพีเอ็ม

ตารางที่ 8 การเจริญเติบโตของกุ้งขาวที่ได้รับอาหารปนเปื้อนสารพิษ Tetrodotoxin ที่ระดับต่างๆ เป็นระยะเวลา 8 สัปดาห์ [1] (หน่วยเป็นกรัม)

อาหารทดลอง	ระดับ TTX	ระยะเวลา (สัปดาห์)				
	(พีพีเอ็ม)	0	2	4	6	8
1	0	1.87±0.02 ^{a}	3.51±0.19 ^{a}	5.78±0.95 ^{ab}	7.57±0.77 ^{b}	9.83±0.99 ^{c}
2	1.31	1.88±0.01 ^{a}	3.50±0.16 ^{a}	4.79±0.36 ^{a}	7.07±0.66 ^{ab}	9.90±1.37 ^{c}
3	1.81	1.88±0.00 ^{a}	3.56±0.36 ^{a}	5.15±0.15 ^{ab}	6.89±0.31 ^{a}	9.22±0.46 ^{abc}
4	1.97	1.87±0.00 ^{a}	3.54±0.18 ^{a}	4.88±0.52 ^{a}	6.74±0.24 ^{a}	8.92±0.91 ^{ab}
5	2.18	1.87±0.01 ^{a}	3.36±0.19 ^{a}	5.22±0.14 ^{ab}	6.75±0.23 ^{a}	8.30±0.55 ^{a}
6	2.64	1.88±0.01 ^{a}	3.56±0.14 ^{a}	6.63±0.44 ^{a}	6.63±0.12 ^{a}	8.74±1.00 ^{ab}

[1]ตัวเลขที่นำเสนอเป็นค่าเฉลี่ย±ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน จากข้อมูล 4 ซ้ำ ค่าเฉลี่ยในสดมภ์ที่มีตัวอักษรเหมือนกันกำกับ ไม่มีความแตกต่างทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์ (0.05)

3.1.2.2 น้ำหนักที่เพิ่มขึ้น อัตราการเจริญเติบโตจำเพาะ อัตราการเปลี่ยนอาหารเป็นเนื้อ ปริมาณอาหารที่กุ้งกิน และอัตราการรอดตาย

เปอร์เซ็นต์น้ำหนักที่เพิ่มขึ้น (weight gan) อัตราการเจริญเติบโตจำเพาะ (specific growth rate) อัตราการเปลี่ยนอาหารเป็นเนื้อ (FCR) ปริมาณอาหารที่กุ้งกิน (feed consumption) และอัตราการรอดตาย (survival rate) ของกุ้งขาวที่ได้รับอาหารปนเปื้อนสารพิษ Tetrodotoxin ที่ระดับ 0 (ชุดควบคุม), 1.31, 1.81, 1.97, 2.18 และ 2.64 พีพีเอ็ม เป็นระยะเวลา 8 สัปดาห์ แสดงไว้ในตารางที่ 9

น้ำหนักที่เพิ่มขึ้นและอัตราการเจริญเติบโตจำเพาะของกุ้งขาวที่ได้รับอาหารปนเปื้อนสารพิษ Tetrodotoxin ที่ระดับ 0 (ชุดควบคุม), 1.31, 1.81, 1.97, 2.18 และ 2.64 พีพีเอ็ม เป็นระยะเวลา 8 สัปดาห์ มีน้ำหนักที่เพิ่มขึ้นและอัตราการเจริญเติบโตจำเพาะของกุ้งขาวกลุ่มที่ได้รับสารพิษมีแนวโน้มลดต่ำลง แต่ไม่มีความแตกต่างกับอาหารชุดควบคุมที่ไม่มี Tetrodotoxin อย่างไม่มีนัยสำคัญทางสถิติ (p›0.05) มีค่าอยู่ในช่วง 83.03±17.99 – 115.86±30.56 เปอร์เซ็นต์ และ 0.11±0.01 – 0.14±0.17 เปอร์เซ็นต์ต่อวัน (ตารางที่ 9)

อัตราการเปลี่ยนอาหารเป็นเนื้อของอาหารที่มี Tetrodotoxin 1.31 พีพีเอ็ม ไม่มีความแตกต่างกับอาหารชุดควบคุมที่ไม่มี Tetrodotoxin อย่างไม่มีนัยสำคัญทางสถิติ (p›0.05) แต่อาหารที่

มี Tetrodotoxin 1.81 – 2.64 พีพีเอ็ม มีผลให้อัตราการเปลี่ยนอาหารเป็นเนื้อสูงขึ้นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (p›0.05) คุณสมบัติข้อนี้จะมีผลให้ต้นทุนการผลิตกุ้งด้านค่าอาหารของเกษตรกรสูงขึ้นและมีมลภาวะจากอาหารต่อสิ่งแวดล้อมมากขึ้น หากอาหารมี Tetrodotoxin สูงกว่า 1.31 พีพีเอ็ม (ตารางที่ 9)

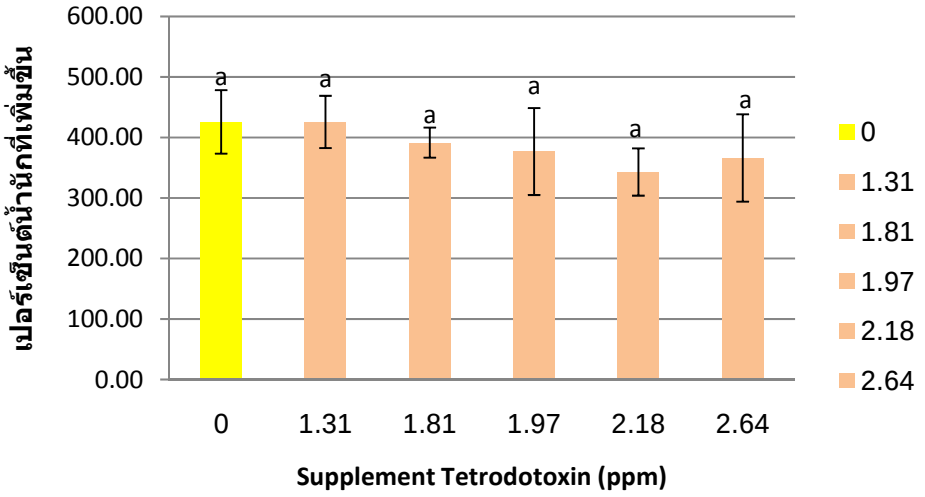
ปริมาณอาหารที่กุ้งกินต่อตัวต่อวันของกุ้งขาวที่ได้รับอาหารปนเปื้อนสารพิษ Tetrodotoxin ที่ระดับ 0 (ชุดควบคุม), 1.31, 1.81, 1.97, 2.18 และ 2.64 พีพีเอ็ม เป็นระยะเวลา 8 สัปดาห์ พบว่าไม่มีผลต่อการกินอาหาร ที่ระดับความเชื่อมั่น 95% (p›0.05) โดยมีค่าอยู่ในช่วง 0.23±0.02 - 0.26±0.01 กรัมต่อตัวต่อวัน (ตารางที่ 9)

อัตราการรอดตายของกุ้งขาวที่ได้รับอาหารปนเปื้อนสารพิษ Tetrodotoxin ที่ระดับ 0 (ชุดควบคุม), 1.31, 1.81, 1.97, 2.18 และ 2.64 พีพีเอ็ม เป็นระยะเวลา 8 สัปดาห์ พบว่า ไม่มีผลต่ออัตราการรอดตายของกุ้งขาวที่ได้รับอาหารปนเปื้อนสารพิษ Tetrodotoxin ที่ระดับต่างๆ ที่ระดับความเชื่อมั่น 95% (p›0.05) โดยมีค่าอยู่ในช่วง 68.75±19.73 – 75.00±10.80 เปอร์เซ็นต์ (ตารางที่ 9)

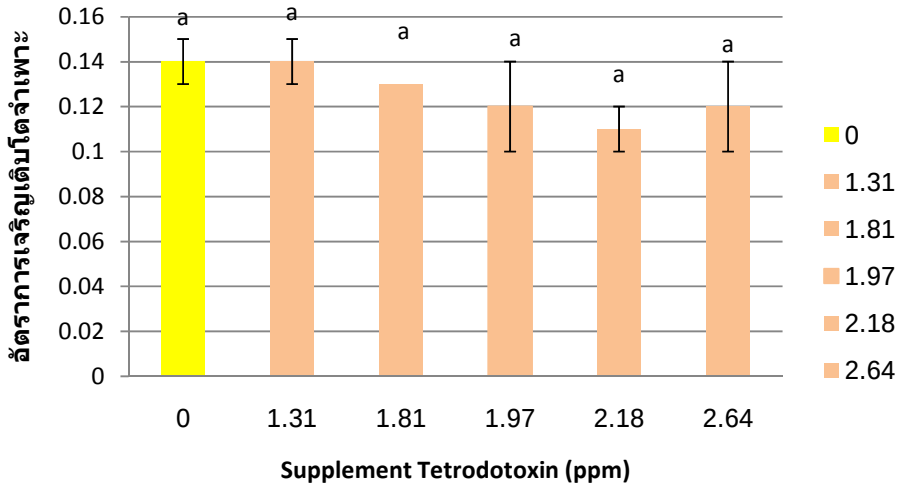
ตารางที่ 9 เปอร์เซ็นต์น้ำหนักที่เพิ่มขึ้น อัตราการเจริญเติบโตจำเพาะ อัตราการเปลี่ยนอาหารเป็นเนื้อ ปริมาณอาหารที่กุ้งกิน และอัตราการรอดตายของกุ้งขาวที่ได้รับ อาหารปนเปื้อนสารพิษ Tetrodotoxin ที่ระดับต่างๆ เป็นระยะเวลา 8 สัปดาห์[1]

อาหารทดลอง	ระดับ TTX (พีพีเอ็ม)	น้ำหนักเริ่มต้น (กรัม/ตัว)	น้ำหนักสุดท้าย (กรัม/ตัว)	เปอร์เซ็นต์ น้ำหนักที่เพิ่มขึ้น	อัตราการเจริญเติบโต จำเพาะ (เปอร์เซ็นต์/วัน)	อัตราการ เปลี่ยนอาหาร เป็นเนื้อ	ปริมาณอาหาร ที่กุ้งกิน (กรัม/ตัว/วัน)	อัตราการรอดตาย (เปอร์เซ็นต์)
1	0	1.87±0.22 ^{a}	10.65±0.28 ^{c}	425.37±52.40 ^{a}	0.14±0.01 ^{a}	1.52±0.12 ^{a}	0.23±0.02 ^{a}	75.00±10.80 ^{a}
2	1.31	1.88±0.15 ^{a}	9.95±1.01 ^{bc}	425.55±42.98 ^{a}	0.14±0.01 ^{a}	1.57±0.33 ^{a}	0.25±0.07 ^{a}	73.75±24.95 ^{a}
3	1.81	1.87±0.05 ^{a}	9.37±0.43 ^{ab}	391.23±24.93 ^{a}	0.13±0.00 ^{a}	1.99±0.41 ^{bc}	0.25±0.02 ^{a}	73.75±7.50 ^{a}
4	1.97	1.87±0.08 ^{a}	9.39±0.10 ^{ab}	376.83±71.74 ^{a}	0.12±0.02 ^{a}	1.80±0.18 ^{ab}	0.24±0.02 ^{a}	68.75±19.73 ^{a}
5	2.18	1.87±0.12 ^{a}	8.43±1.30 ^{a}	342.72±38.94 ^{a}	0.11±0.01 ^{a}	2.09±0.05 ^{bc}	0.25±0.04 ^{a}	73.75±12.50 ^{a}
6	2.64	1.87±0.12 ^{a}	8.27±0.95 ^{a}	386.17±72.03 ^{a}	0.12±0.02 ^{a}	2.20±0.05 ^{c}	0.26±0.01 ^{a}	70.00±4.08 ^{a}

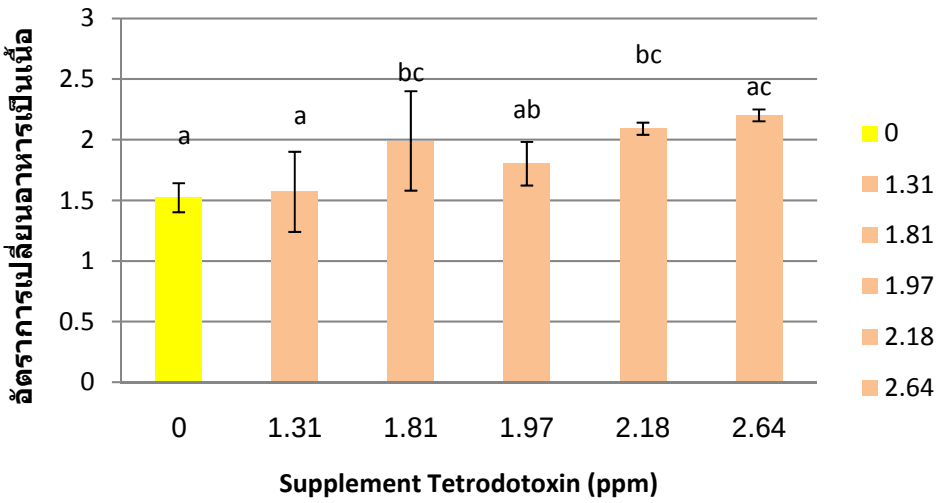
[1]ตัวเลขที่นำเสนอเป็นค่าเฉลี่ย±ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน จากข้อมูล 4 ซ้ำ ค่าเฉลี่ยในสดมภ์ที่มีตัวอักษรเหมือนกันกำกับ ไม่มีความแตกต่างทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์ (p›0.05)



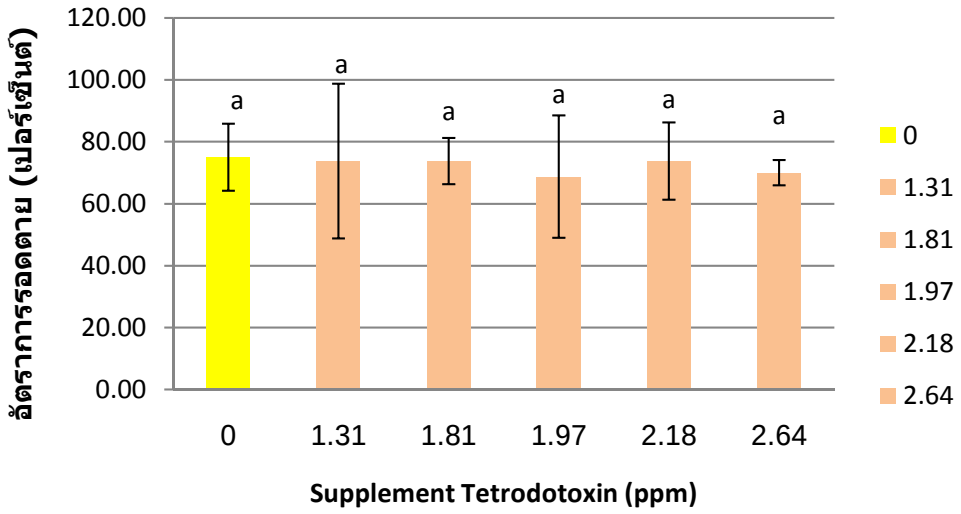
ภาพที่ 7 เปอร์เซ็นต์น้ำหนักที่เพิ่มขึ้นของกุ้งขาวหลังจากได้รับอาหารปนเปื้อนสารพิษ Tetrodotoxin ที่ระดับต่างๆ เป็นเวลา 8 สัปดาห์



ภาพที่ 8 อัตราการเจริญเติบโตจำเพาะ (เปอร์เซ็นต์ต่อวัน) ของกุ้งขาวหลังจากได้รับอาหารปนเปื้อนสารพิษ Tetrodotoxin ที่ระดับต่างๆ เป็นเวลา 8 สัปดาห์



ภาพที่ 9 อัตราการเปลี่ยนอาหารเป็นเนื้อของกุ้งขาวหลังจากได้รับอาหารปนเปื้อนสารพิษ Tetrodotoxin ที่ระดับต่างๆ เป็นเวลา 8 สัปดาห์



ภาพที่ 10 อัตราการรอดตายของกุ้งขาวหลังจากได้รับอาหารปนเปื้อนสารพิษ Tetrodotoxin ที่ระดับต่างๆ เป็นเวลา 8 สัปดาห์

3.1.3 องค์ประกอบทางโภชนาการของกุ้งขาวทั้งตัว

องค์ประกอบทางโภชนาการของกุ้งขาวก่อนการทดลองและกุ้งขาวหลังการทดลองให้อาหารที่ปนเปื้อนสารพิษ Tetrodotoxin ที่ระดับ 0 (ชุดควบคุม), 1.31, 1.81, 1.97, 2.18 และ 2.64 พีพีเอ็ม เป็นเวลา 8 สัปดาห์ โดยพบว่าเปอร์เซ็นต์ความชื้นในตัวกุ้งขาวที่ได้รับอาหารปนเปื้อนสารพิษ Tetrodotoxin ที่ระดับต่างๆ เปรียบเทียบกับกุ้งขาวที่ได้รับอาหารชุดควบคุม ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ (p›0.05) ในแต่ละชุดการทดลอง โดยมีค่าอยู่ในช่วง 76.31 ± 0.31 – 77.25 ± 0.39 เปอร์เซ็นต์ ดังตารางที่ 10

ปริมาณโปรตีนในตัวของกุ้งขาวที่ได้รับอาหารที่มีการปนเปื้อนสารพิษ Tetrodotoxin จากปลาปักเป้าปนที่ระดับ 0 (ชุดควบคุม), 1.31, 1.81, 1.97, 2.18 และ 2.64 พีพีเอ็ม เป็นระยะเวลา 8 สัปดาห์ พบว่ากุ้งขาวที่ได้รับอาหารชุดควบคุมที่ระดับ 0 พีพีเอ็ม มีปริมาณโปรตีนในตัวกุ้งสูงสุดเท่ากับ 65.85 ± 0.48 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ (p›0.05) กับกุ้งขาวที่ได้รับอาหารปนเปื้อนสารพิษ Tetrodotoxin ที่ระดับ 1.31 พีพีเอ็ม ที่ระดับ 64.44 ± 1.41 เปอร์เซ็นต์ แต่มีความแตกต่างกันทางสถิติ (p›0.05) กับกุ้งขาวที่ได้รับอาหารปนเปื้อนสารพิษ Tetrodotoxin ที่ระดับ 1.81, 1.97, 2.18และ 2.64 พีพีเอ็ม (63.98 ± 0.69, 63.99 ± 0.75, 62.68 ±0.39 และ 61.25 ± 1.10 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ) ดังตารางที่ 10

ปริมาณไขมันในตัวของกุ้งขาวที่ได้รับอาหารที่มีการปนเปื้อนสารพิษ Tetrodotoxin จากปลาปักเป้าปนที่ระดับ 0 (ชุดควบคุม), 1.31, 1.81, 1.97, 2.18 และ 2.64 พีพีเอ็ม เป็นระยะเวลา 8 สัปดาห์ พบว่าไขมันในตัวกุ้งขาวที่ได้รับอาหารปนเปื้อนสารพิษ Tetrodotoxin ที่ระดับต่างๆ เปรียบเทียบกับกุ้งขาวที่ได้รับอาหารชุดควบคุม ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ (p›0.05) ในแต่ละชุดการทดลอง โดยมีค่าอยู่ในช่วง 6.59 ± 0.36 – 8.87 ± 0.36 เปอร์เซ็นต์

ปริมาณเถ้าในตัวของกุ้งขาวที่ได้รับอาหารที่มีการปนเปื้อนสารพิษ Tetrodotoxin จากปลาปักเป้าปนที่ระดับ 0 (ชุดควบคุม), 1.31, 1.81, 1.97, 2.18 และ 2.64 พีพีเอ็ม เป็นระยะเวลา 8 สัปดาห์ พบว่าเถ้าในตัวกุ้งขาวที่ได้รับอาหารปนเปื้อนสารพิษ Tetrodotoxin ที่ระดับ 2.18 มีปริมาณเถ้าในตัวกุ้งสูงสุด คือ 9.27 ± 0.24 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ (p›0.05) กับกุ้งขาวที่ได้รับอาหารปนเปื้อนสารพิษ Tetrodotoxin ที่ระดับ 0, 1.31 และ 2.64 พีพีเอ็ม (9.07 ± 0.34, 8.66 ±0.26 และ 9.19 ± 0.41 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ) แต่มีความแตกต่างกันทางสถิติ (p›0.05) กับกุ้งขาวที่ได้รับอาหารปนเปื้อนสารพิษที่ระดับ 18.1 และ 1.97 พีพีเอ็ม (8.26 ± 0.21 และ 8.33 ± 0.44 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ) ดังตารางที่ 10

ตารางที่ 10 องค์ประกอบทางโภชนาการของกุ้งขาวทั้งตัวหลังให้อาหารทดลองเป็นเวลา 8 สัปดาห์ [1] (% บนน้ำหนักแห้ง)

สูตรที่	ส่วนประกอบ (เปอร์เซ็นต์)			
	ความชื้น	โปรตีน	ไขมัน	เถ้า
กุ้งก่อนทดลอง	78.37±0.57	34.18±0.61	4.03±0.31	5.58±0.32
1	76.98±1.02 [a]	65.85±0.48 [d]	8.87±0.36 [a]	9.07±0.34 [b]
2	76.31±0.31 [a]	64.44±1.41 [cd]	8.35±0.43 [a]	8.66±0.26 [ab]
3	76.90±1.01 [a]	63.98±0.69 [abc]	8.61±0.35 [a]	8.26±0.21 [a]
4	77.25±0.39 [a]	63.99±0.75 [bc]	8.25±3.53 [a]	8.33±0.44 [a]
5	76.94±0.28 [a]	62.68±0.39 [ab]	6.69±0.36 [a]	9.27±0.24 [b]
6	77.10±1.12 [a]	61.25±1.10 [a]	7.50±0.85 [a]	9.19±0.41 [b]

[1]ตัวเลขที่นำเสนอเป็นค่าเฉลี่ย±ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน จากข้อมูล 3 ซ้ำ ค่าเฉลี่ยในสดมภ์ที่มีตัวอักษรเหมือนกันกำกับ ไม่มีความแตกต่างทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์ (p›0.05)

3.2 ผลของสารพิษ Tetrodotoxin จากปลาปักเป้าพ่นต่อสุขภาพของกุ้งขาว

3.2.1 ผลการศึกษาองค์ประกอบเลือดของกุ้งขาว

ผลการวิเคราะห์องค์ประกอบเลือดของกุ้งขาว ได้แก่ ปริมาณเม็ดเลือดรวมทั้งหมด โปรตีนในน้ำเลือด ปริมาณกลูโคสในเลือด และกิจกรรมเอนไซม์ฟีนอลออกซิเดส ของกุ้งขาวที่ได้รับอาหารที่มีการปนเปื้อนสารพิษ Tetrodotoxin จากปลาปักเป้าพ่นที่ระดับ 0 (ชุดควบคุม), 1.31, 1.81, 1.97, 2.18 และ 2.64 พีพีเอ็ม เป็นระยะเวลา 8 สัปดาห์ พบว่าปริมาณเม็ดเลือดรวมทั้งหมดของกุ้งขาวที่ได้รับอาหารชุดควบคุม ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ (p›0.05) ในแต่ละชุดการทดลอง โดยมีค่าอยู่ในช่วง 15.76 ± 4.44 x 10^6 - 23.78 ± 6.45 x 10^6 เซลล์ต่อมิลลิลิตร ดังตารางที่ 11 และภาพที่ 11

ปริมาณโปรตีนในน้ำเลือดของกุ้งขาวที่ได้รับอาหารที่มีการปนเปื้อนสารพิษ Tetrodotoxin จากปลาปักเป้าพ่นที่ระดับ 0 (ชุดควบคุม), 1.31, 1.81, 1.97, 2.18 และ 2.64 พีพีเอ็ม เป็นระยะเวลา 8 สัปดาห์ พบว่ากุ้งขาวที่ได้รับอาหารชุดควบคุมที่ระดับ 0 พีพีเอ็ม มีปริมาณโปรตีนในน้ำเลือดสูงสุดเท่ากับ 116.65 ± 10.08 มิลลิกรัมต่อลิตร ซึ่งไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ (p›0.05) กับกุ้งขาวที่ได้รับอาหารปนเปื้อนสารพิษ Tetrodotoxin ที่ระดับ 1.31, 1.81 และ 1.97 พีพีเอ็ม (113.85 ± 15.82, 106.73 ± 10.55 และ 113.34 ± 7.02 มิลลิกรัมต่อลิตร ตามลำดับ) แต่มีความแตกต่างกันทางสถิติ

(p›0.05) กับกุ้งขาวที่ได้รับอาหารปนเปื้อนสารพิษ Tetrodotoxin ที่ระดับ 2.18 และ 2.64 พีพีเอ็ม (98.50 ± 8.65 และ 93.84 ± 4.539ตามลำดับ) ดังตารางที่ 11 และภาพที่ 12

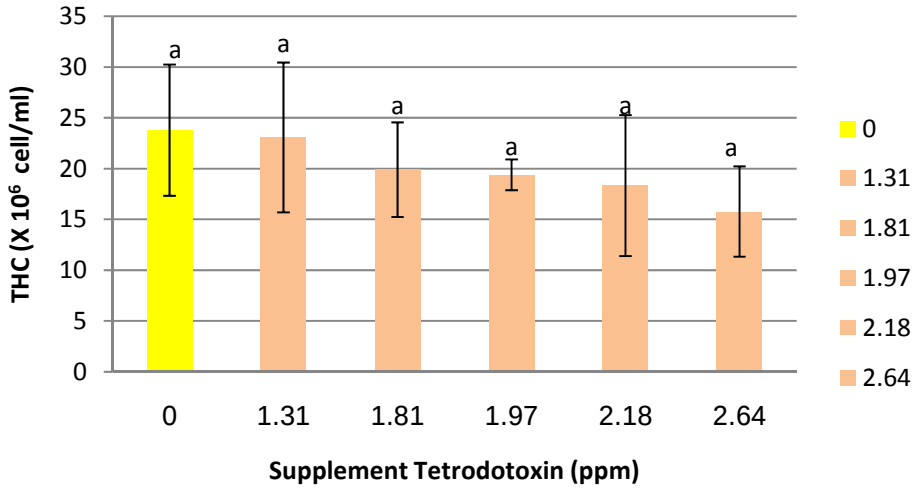
ปริมาณกลูโคสในเลือดของกุ้งขาวที่ได้รับอาหารที่มีการปนเปื้อนสารพิษ Tetrodotoxin จากปลาปักเป้าปนที่ระดับ 0 (ชุดควบคุม), 1.31, 1.81, 1.97, 2.18 และ 2.64 พีพีเอ็ม เป็นระยะเวลา 8 สัปดาห์ พบว่าปริมาณกลูโคสในเลือดของกุ้งขาวที่ได้รับอาหารชุดควบคุม ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ (p›0.05) ในแต่ละชุดการทดลอง โดยมีค่าอยู่ในช่วง 13.15 ± 3.16 – 17.19 ± 4.77 มิลลิกรัมเปอร์เซ็นต์ ดังตารางที่ 11 และภาพที่ 13

การศึกษากิจกรรมเอนไซม์ฟีนอลออกซิเดสในเลือดของกุ้งขาวที่ได้ได้รับอาหารที่มีการปนเปื้อนสารพิษ Tetrodotoxin จากปลาปักเป้าปนที่ระดับ 0 (ชุดควบคุม), 1.31, 1.81, 1.97, 2.18 และ 2.64 พีพีเอ็ม เป็นระยะเวลา 8 สัปดาห์ พบว่ากิจกรรมเอนไซม์ฟีนอลออกซิเดสในเลือดกุ้งขาวที่ได้รับสารพิษ Tetrodotoxin ที่ระดับ 1.31 พีพีเอ็ม มีปริมาณกิจกรรมเอนไซม์ฟีนอลออกซิเดสสูงที่สุดเท่ากับ 358.08 ± 85.04 หน่วย/นาที/มิลลิกรัมโปรตีน ซึ่งไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ (p›0.05) กับกุ้งขาวที่ได้รับอาหารปนเปื้อนสารพิษ Tetrodotoxin ที่ระดับ 0 และ 1.81 พีพีเอ็ม (358.08 ± 85.04 และ 264.59 ± 86.70 หน่วย/นาที/มิลลิกรัมโปรตีน) แต่มีความแตกต่างกันทางสถิติ (p›0.05) กับกุ้งขาวที่ได้รับสารพิษ Tetrodotoxin ที่ระดับ 1.97, 2.18 และ 2.64 พีพีเอ็ม (243.19 ± 76.12, 212.96 ± 105.00 และ 156.08 ± 57.10 หน่วย/นาที/มิลลิกรัมโปรตีน ตามลำดับ) ดังตารางที่ 11 และภาพที่ 14

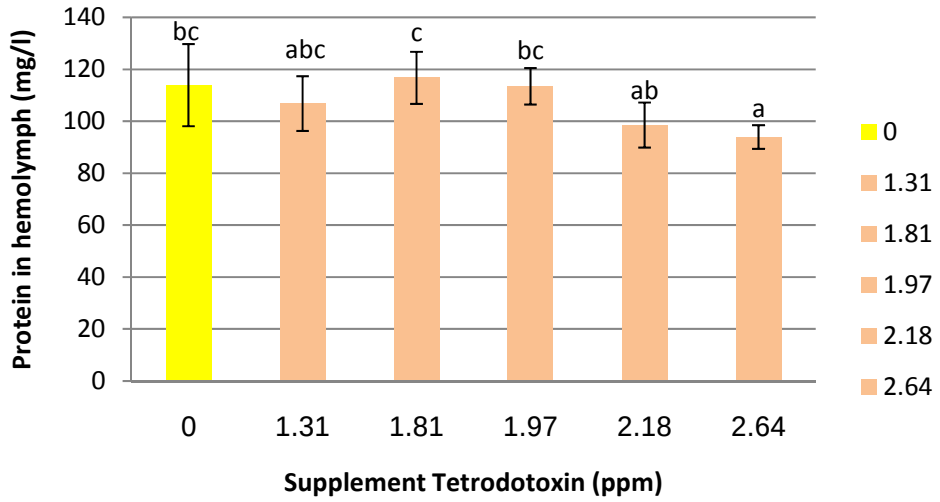
ตารางที่ 10 ค่าองค์ประกอบเลือดของกุ้งขาวที่ได้รับอาหารปนเปื้อนสารพิษ Tetrodotoxin ในอาหารที่ระดับต่างๆ เป็นระยะเวลา 8 สัปดาห์[1]

ชุดการทดลอง	ปริมาณเม็ดเลือดทั้งหมด ($x10^6$ เซลล์ต่อมิลลิลิตร)	โปรตีนในน้ำเลือด (มิลลิกรัมต่อลิตร)	กลูโคสในเลือด (มิลลิกรัมเปอร์เซ็นต์)	PO activity (unit/min/mg.prot.)
1	23.78 ± 6.45^{a}	113.85 ± 15.82^{bc}	17.19 ± 4.77^{a}	358.08 ± 85.04^{b}
2	23.06 ± 7.37^{a}	106.73 ± 10.55^{abc}	16.79 ± 4.11^{a}	371.83 ± 78.45^{b}
3	19.88 ± 4.65^{a}	116.65 ± 10.08^{c}	16.47 ± 3.42^{a}	264.59 ± 86.70^{ab}
4	19.38 ± 1.52^{a}	113.34 ± 7.02^{bc}	16.11 ± 5.30^{a}	243.19 ± 76.12^{a}
5	18.32 ± 6.93^{a}	98.50 ± 8.65^{ab}	13.15 ± 3.16^{a}	212.96 ± 105.00^{a}
6	15.76 ± 4.44^{a}	93.84 ± 4.53^{a}	13.35 ± 2.76^{a}	156.08 ± 57.10^{a}

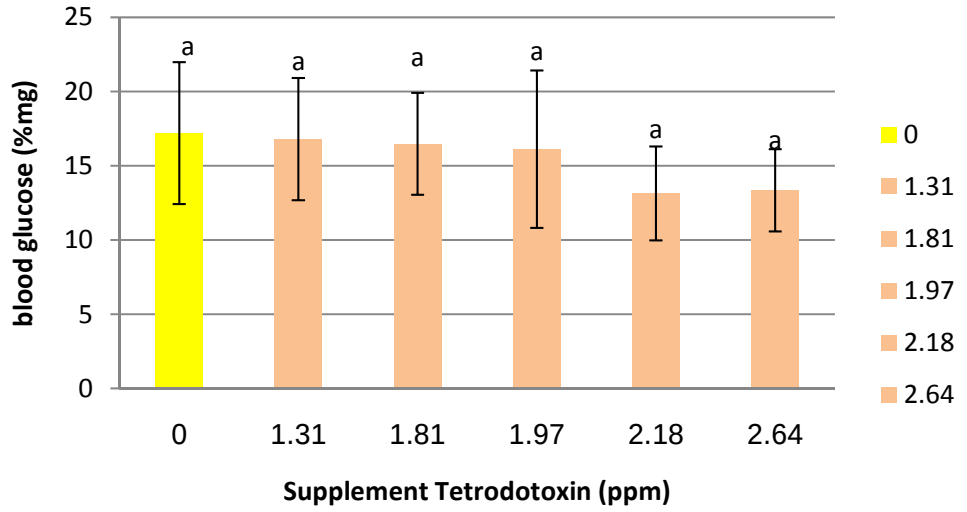
[1] ตัวเลขนำเสนอเป็นค่าเฉลี่ย ± ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน จากข้อมูล 20 ซ้ำ
ค่าเฉลี่ยในสดมภ์ที่มีตัวอักษรเหมือนกันกำกับ ไม่มีความแตกต่างทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์ (p › 0.05)



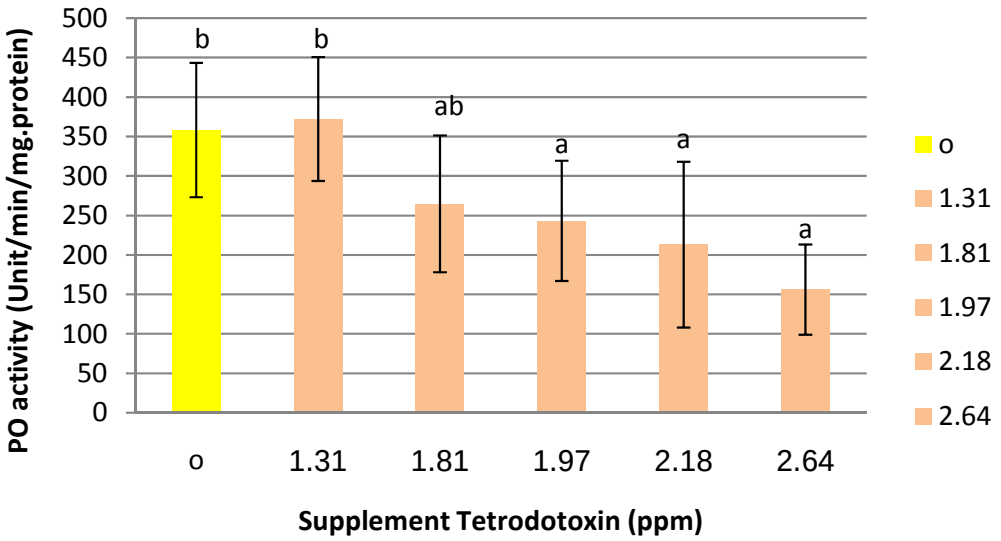
ภาพที่ 11 ปริมาณเม็ดเลือดทั้งหมดของกุ้งขาวหลังจากได้รับอาหารปนเปื้อนสารพิษ Tetrodotoxin ที่ระดับต่างๆ เป็นเวลา 8 สัปดาห์



ภาพที่ 12 ปริมาณโปรตีนในน้ำเลือดของกุ้งขาวหลังจากได้รับอาหารปนเปื้อนสารพิษ Tetrodotoxin ที่ระดับต่างๆ เป็นเวลา 8 สัปดาห์



ภาพที่ 13 ปริมาณกลูโคสในเลือดของกุ้งขาวหลังจากได้รับอาหารปนเปื้อนสารพิษ Tetrodotoxin ที่ระดับต่างๆ เป็นเวลา 8 สัปดาห์



ภาพที่ 14 กิจกรรมของเอนไซม์ฟีนอลออกซิเดสในเลือดของกุ้งขาวหลังจากได้รับอาหารปนเปื้อนสารพิษ Tetrodotoxin ที่ระดับต่างๆ เป็นเวลา 8 สัปดาห์

3.2.2 ผลของสารพิษ Tetrodotoxin จากปลาปักเป่าต่อการเปลี่ยนแปลงทางพยาธิสภาพของเนื้อเยื่อกุ้งขาว

ผลการศึกษาการเปลี่ยนแปลงของเนื้อเยื่อ ได้แก่ เนื้อเยื่อตับอ่อน (hepatopancreas) ต่อมน้ำเหลือง (lymphoid organ) อวัยวะสร้างเม็ดเลือด (hemopoietic tissue) เหงือก (gills) และกล้ามเนื้อลำตัว (muscle) ที่ได้รับอาหารปนเปื้อนสารพิษ Tetrodotoxin ที่ระดับ 0 (ชุดควบคุม), 1.31, 1.81, 1.97, 2.18 และ 2.64 พีพีเอ็ม เป็นระยะเวลา 4 สัปดาห์ และ 8 สัปดาห์ แสดงเป็นเปอร์เซ็นต์ความผิดปกติ ดังตารางที่ 12 และ 13

ตับอ่อน

ไม่พบการเปลี่ยนแปลงของเนื้อเยื่อตับอ่อนกุ้งขาวที่ได้รับอาหารอาหารปนเปื้อนสารพิษ Tetrodotoxin ที่ระดับ 0 (ชุดควบคุม), 1.31, 1.81 และ 1.97 พีพีเอ็ม เป็นระยะเวลา 4 สัปดาห์ ขณะที่พบความผิดปกติในเซลล์ตับกุ้งขาวที่ได้รับสารพิษ Tetrodotoxin ที่ระดับ 2.18 และ 2.64 พีพีเอ็ม พบว่าเซลล์ตับมีลักษณะฝ่อและลีบ เซลล์ที่สะสมอาหารลดขนาดลง (ภาพที่ 16-18) การสะสมอาหารและการสร้างน้ำย่อยลดลง แต่โครงสร้างต่างๆ ของเซลล์ยังปกติ และมีการเปลี่ยนแปลงของเนื้อเยื่อตับอย่างรุนแรง ได้แก่ มีการสลายของเซลล์ท่อตับ มีเม็ดเลือดแทรกตัวค่อนข้างมากระหว่างท่อตับ (ภาพที่ 16-18) เพื่อทำลาย

ไม่พบการเปลี่ยนแปลงของเนื้อเยื่อตับอ่อนกุ้งขาวที่ได้รับอาหารอาหารปนเปื้อนสารพิษ Tetrodotoxin ที่ระดับ 0 (ชุดควบคุม) และ 1.31 พีพีเอ็ม เป็นระยะเวลา 8 สัปดาห์ ขณะที่พบความผิดปกติในเซลล์ตับกุ้งขาวที่ได้รับสารพิษ Tetrodotoxin ที่ระดับ 1.81, 1.97, 2.18 และ 2.64 พีพีเอ็ม พบว่าเซลล์ตับมีลักษณะฝ่อและลีบ เซลล์ที่สะสมอาหารลดขนาดลง การสะสมอาหารและการสร้างน้ำย่อยลดลง แต่โครงสร้างต่างๆ ของเซลล์ยังปกติ และมีการเปลี่ยนแปลงของเนื้อเยื่อตับอย่างรุนแรง ได้แก่ มีการสลายของเซลล์ท่อตับ มีเม็ดเลือดแทรกตัวค่อนข้างมากระหว่างท่อตับ (ภาพที่ 19-24) เพื่อทำลายเซลล์ท่อตับ

เนื้อเยื่อต่อมน้ำเหลือง

ไม่พบความผิดปกติของต่อมน้ำเหลือง ในกุ้งขาวที่ได้รับอาหารอาหารปนเปื้อนสารพิษ Tetrodotoxin ที่ระดับ 0 (ชุดควบคุม), 1.31, 1.81, 1.97, 2.18 และ 2.64 พีพีเอ็ม เป็นระยะเวลา 4 สัปดาห์ โดยพบว่าท่อน้ำเหลืองมีลักษณะปกติที่มีการเรียงตัวของเซลล์น้ำเหลืองเป็น eosinophilic รอบๆ ท่อเลือดที่เรียกว่า lumen

ไม่พบความผิดปกติของต่อมน้ำเหลือง ในกุ้งขาวที่ได้รับอาหารอาหารปนเปื้อนสารพิษ Tetrodotoxin ที่ระดับ 0 (ชุดควบคุม), 1.31, 1.81, 1.97, 2.18 และ 2.64 พีพีเอ็ม เป็นระยะเวลา 8

สัปดาห์ โดยพบว่าท่อน้ำเหลืองมีลักษณะปกติที่มีการเรียงตัวของเซลล์น้ำเหลืองเป็น eosinophilic รอบๆ ท่อเลือดที่เรียกว่า lumen

อวัยวะสร้างเม็ดเลือด

ไม่พบความผิดปกติของเซลล์สร้างเม็ดเลือดในกุ้งขาวที่ได้รับอาหารอาหารปนเปื้อนสารพิษ Tetrodotoxin ที่ระดับ 0 (ชุดควบคุม), 1.31, 1.81, 1.97, 2.18 และ 2.64 พีพีเอ็ม เป็นระยะเวลา 4 สัปดาห์ โดยพบว่าเซลล์เรียงตัวเป็นระเบียบ ขนาดและรูปร่างของเซลล์ปกติเช่นเดียวกับชุดควบคุม

ไม่พบความผิดปกติของเซลล์สร้างเม็ดเลือดในกุ้งขาวที่ได้รับอาหารอาหารปนเปื้อนสารพิษ Tetrodotoxin ที่ระดับ 0 (ชุดควบคุม), 1.31, 1.81, 1.97, 2.18 และ 2.64 พีพีเอ็ม เป็นระยะเวลา 8 สัปดาห์ โดยพบว่าเซลล์เรียงตัวเป็นระเบียบ ขนาดและรูปร่างของเซลล์ปกติเช่นเดียวกับชุดควบคุม

เหงือก

ไม่พบการเปลี่ยนแปลงของเนื้อเยื่อเหงือกในกุ้งขาวที่ได้รับอาหารอาหารปนเปื้อนสารพิษ Tetrodotoxin ที่ระดับ 0 (ชุดควบคุม), 1.31, 1.81, 1.97, 2.18 และ 2.64 พีพีเอ็ม เป็นระยะเวลา 4 สัปดาห์

ไม่พบการเปลี่ยนแปลงของเนื้อเยื่อเหงือกในกุ้งขาวที่ได้รับอาหารอาหารปนเปื้อนสารพิษ Tetrodotoxin ที่ระดับ 0 (ชุดควบคุม), 1.31, 1.81, 1.97, 2.18 และ 2.64 พีพีเอ็ม เป็นระยะเวลา 8 สัปดาห์

ลำตัว

ไม่พบการเปลี่ยนแปลงของเนื้อเยื่อกล้ามเนื้อในกุ้งขาวที่ได้รับอาหารอาหารปนเปื้อนสารพิษ Tetrodotoxin ที่ระดับ 0 (ชุดควบคุม), 1.31, 1.81, 1.97, 2.18 และ 2.64 พีพีเอ็ม เป็นระยะเวลา 4 สัปดาห์

ไม่พบการเปลี่ยนแปลงของเนื้อเยื่อกล้ามเนื้อในกุ้งขาวที่ได้รับอาหารอาหารปนเปื้อนสารพิษ Tetrodotoxin ที่ระดับ 0 (ชุดควบคุม), 1.31, 1.81, 1.97, 2.18 และ 2.64 พีพีเอ็ม เป็นระยะเวลา 8 สัปดาห์

ตารางที่ 12 ลักษณะความผิดปกติของกุ้งขาวหลังจากได้รับสารพิษ Tetrodotoxin ที่ระดับต่างๆ เป็นระยะเวลา 4 สัปดาห์[1]

ชุดการทดลอง	ตับอ่อน	ต่อมน้ำเหลือง	อวัยวะสร้างเม็ดเลือด	เหงือก	ลำตัว
1	N	N	N	N	N
2	N	N	N	N	N
3	N	N	N	N	N
4	N	N	N	N	N
5	P(35%)	N	N	N	N
6	P(40%)	N	N	N	N

N : Normal

P : Pathological change; artrophy of hepatopancreatic tubiles and hemocytes infiltration in intersticial

[1]% ความผิดปกติ = (จำนวนกุ้งผิดปกติ/จำนวนกุ้งทั้งหมด) x 100

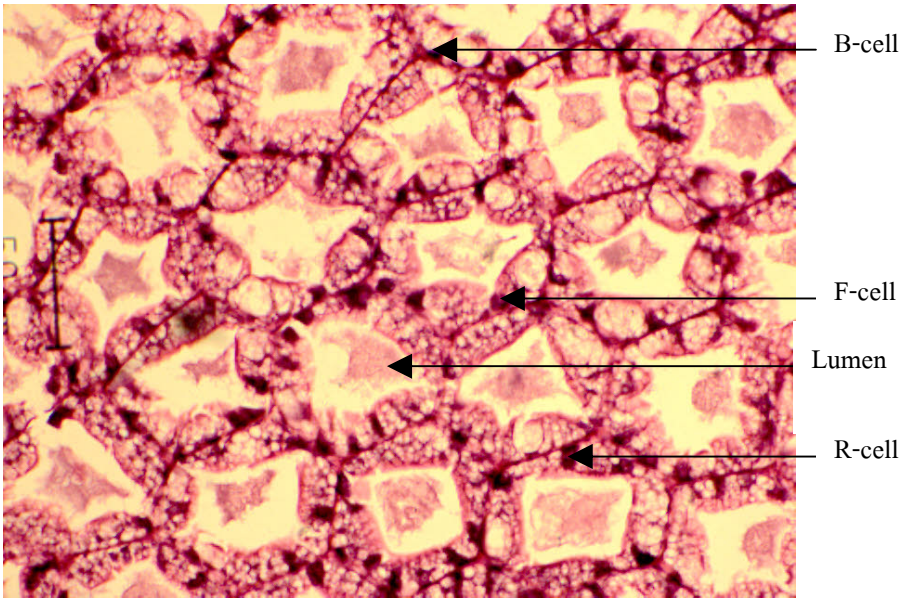
ตารางที่ 13 ลักษณะความผิดปกติของกุ้งขาวหลังจากได้รับสารพิษ Tetrodotoxin ที่ระดับต่างๆ เป็นระยะเวลา 8 สัปดาห์[1]

ชุดการทดลอง	ตับอ่อน	ต่อมน้ำเหลือง	อวัยวะสร้างเม็ดเลือด	เหงือก	ลำตัว
1	N	N	N	N	N
2	N	N	N	N	N
3	P(30%)	N	N	N	N
4	P(50%)	N	N	N	N
5	P(60%)	N	N	N	N
6	P(70%)	N	N	N	N

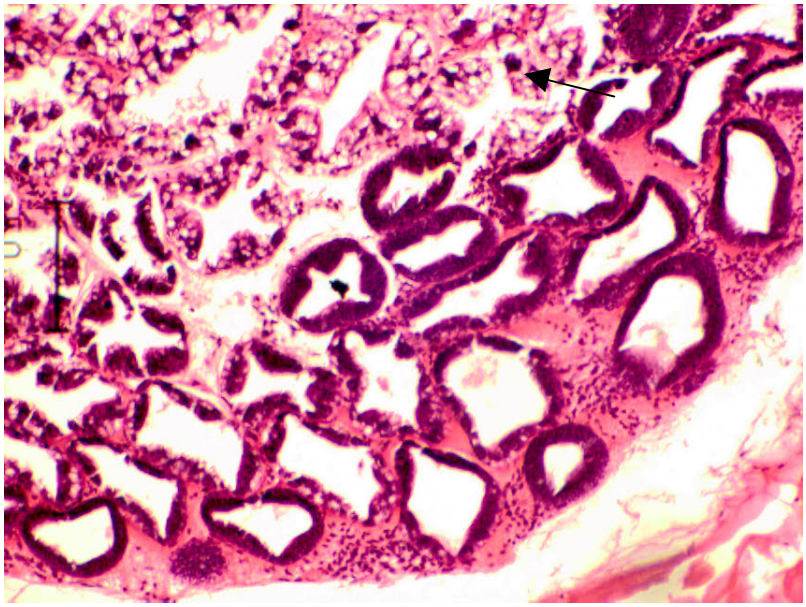
N : Normal

P : Pathological change; artrophy of hepatopancreatic tubiles and hemocytes infiltration in intersticial

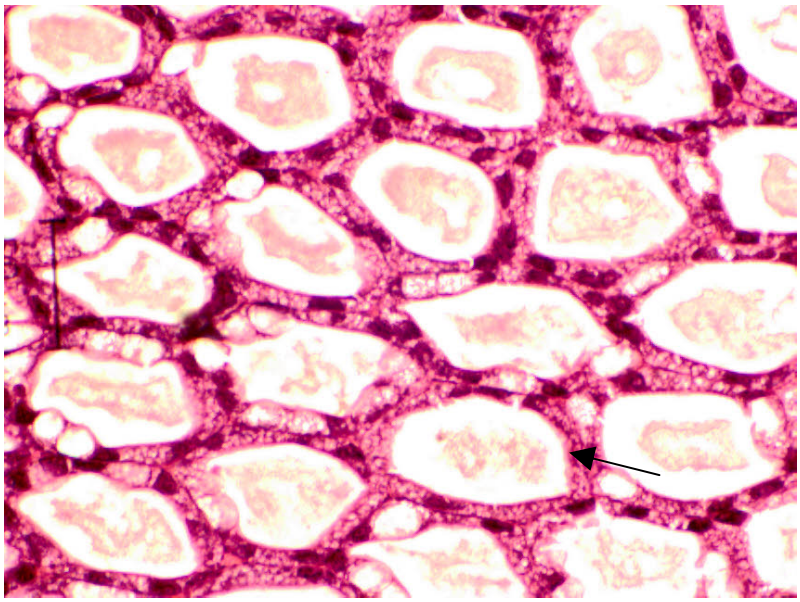
[1]% ความผิดปกติ = (จำนวนกุ้งผิดปกติ/จำนวนกุ้งทั้งหมด) x 100



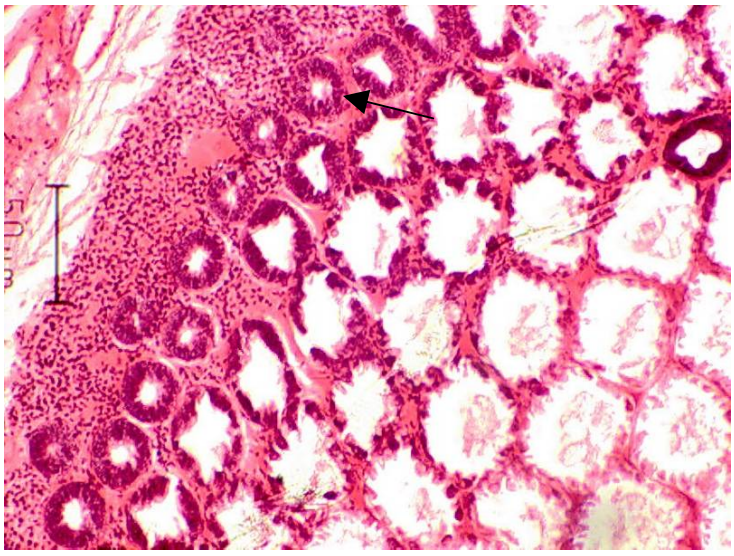
ภาพที่ 15 เนื้อเยื่อตับกุ้งขาวปกติ (ชุดควบคุม) โครงสร้างตับปกติ เซลล์เรียงตัวเป็นระเบียบ (Lum = Lumen; H&E, Bar = 100 µm)



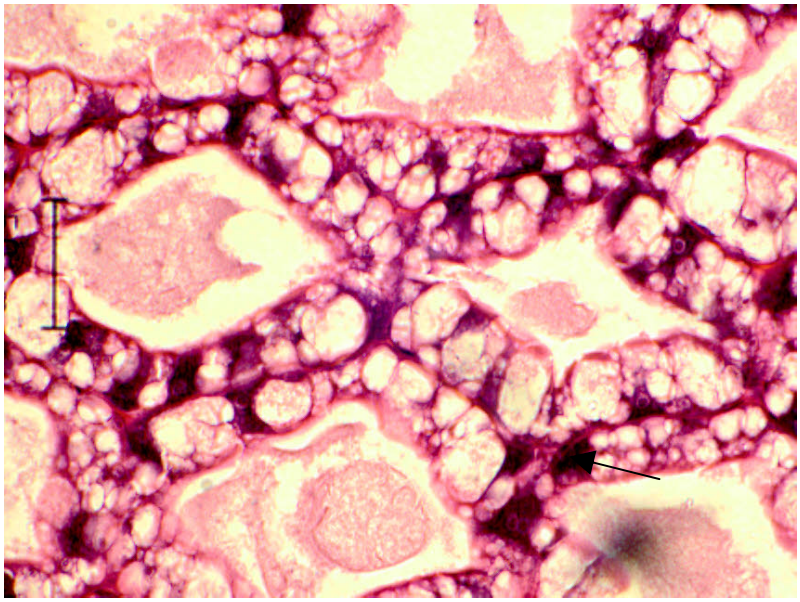
ภาพที่ 16 เนื้อเยื่อตับกุ้งขาวที่ได้รับสารพิษ Tetrodotoxin 2.18 พีพีเอ็ม เป็นระยะเวลา 4 สัปดาห์ พบเซลล์ตับเกิดการฝ่อและลีบ (artrophy) เริ่มมีเม็ดเลือดแทรกอยู่ระหว่างท่อตับ (ศรชี้) (infiltration of hemocyte) (H&E, Bar = 50 µm)



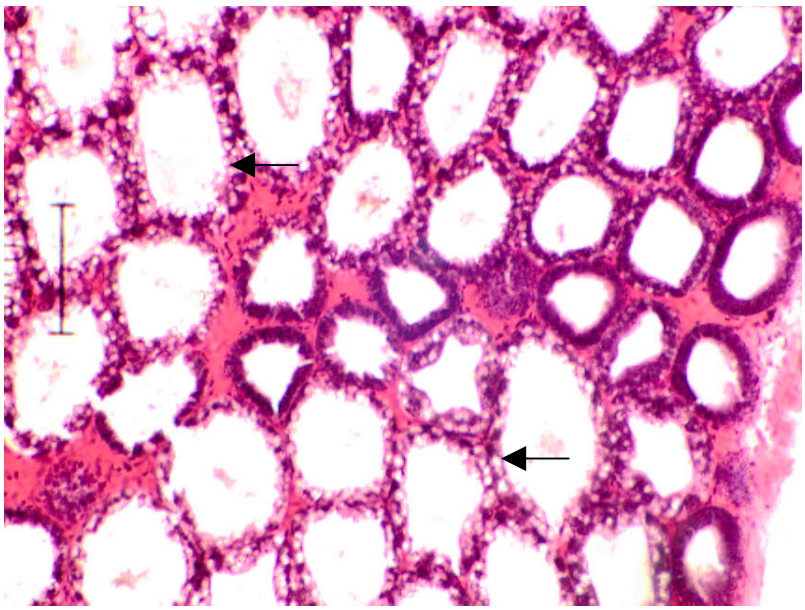
ภาพที่ 17 เนื้อเยื่อตับกุ้งขาวที่ได้รับสารพิษ Tetrodotoxin 2.18 พีพีเอ็ม เป็นระยะเวลา 4 สัปดาห์ พบเซลล์ตับเกิดการฝ่อและลีบ (artrophy) (ศรชี้) ไม่พบ R-cell และ B-cell ทำให้การสะสมอาหารและการสร้างน้ำย่อยลดลง (H&E, Bar = 50 µm)



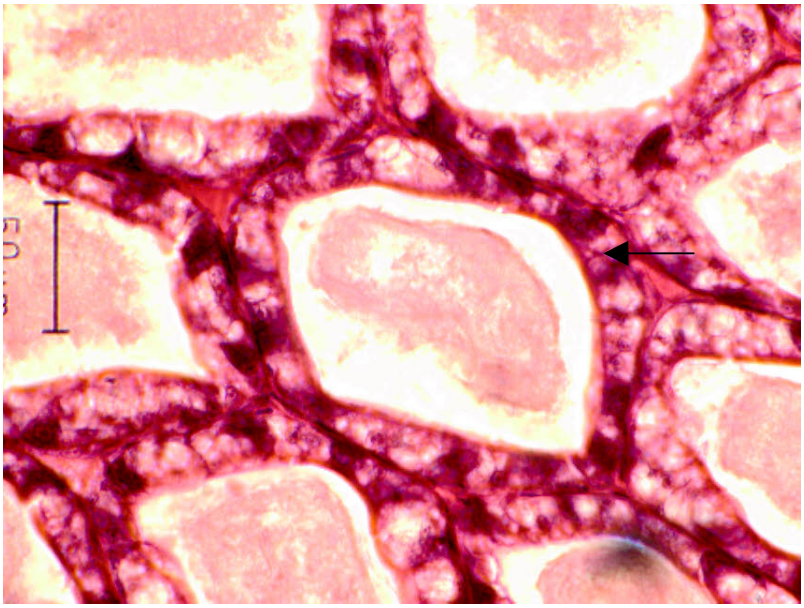
ภาพที่ 18 เนื้อเยื่อตับกุ้งขาวที่ได้รับสารพิษ Tetrodotoxin 2.64 พีพีเอ็ม เป็นระยะเวลา 4 สัปดาห์ พบเซลล์ตับเกิดการฝ่อและลีบ (artrophy) (ศรชี้) เริ่มมีเม็ดเลือดแทรกอยู่ระหว่างท่อตับ (infiltration of hemocyte) (ศรชี้) (H&E, Bar = 50 µm)



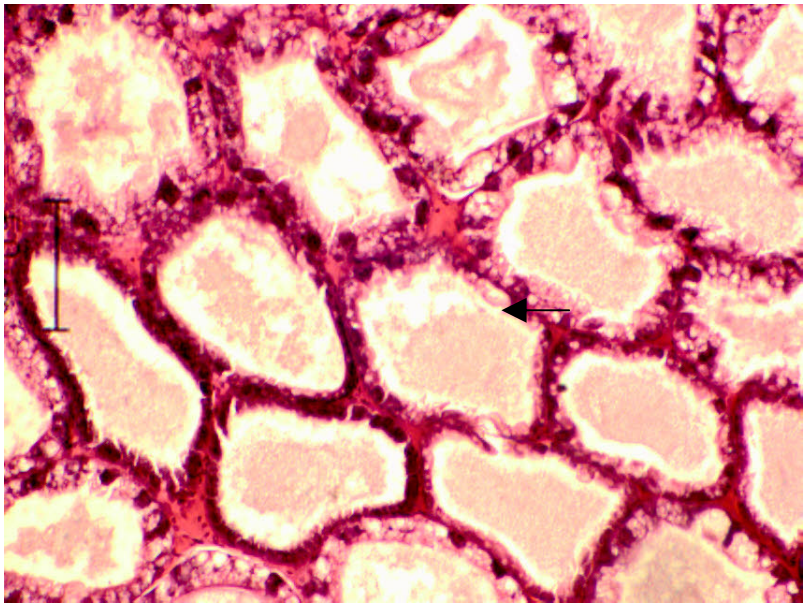
ภาพที่ 19 เนื้อเยื่อตับกุ้งขาวที่ได้รับสารพิษ Tetrodotoxin 1.81 พีพีเอ็ม เป็นระยะเวลา 8 สัปดาห์ พบการแทรกตัวของเม็ดเลือดระหว่างท่อตับ (ศรชี้) (infiltration of haemocyte) (H&E, Bar = 10 µm)



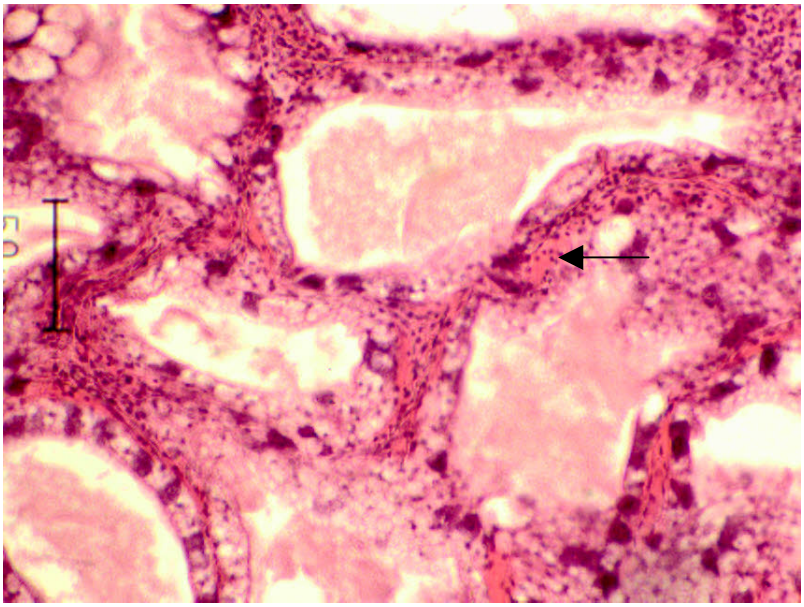
ภาพที่ 20 เนื้อเยื่อตับกุ้งขาวที่ได้รับสารพิษ Tetrodotoxin 1.97 พีพีเอ็ม เป็นระยะเวลา 8 สัปดาห์ พบว่าเกิดการเสื่อมสลายของเซลล์ท่อตับ (degeneration) (ศรชี้) การแทรกตัวของเม็ดเลือดระหว่างท่อตับ (ศรชี้) (infiltration of haemocyte) (H&E, Bar = 10 µm)



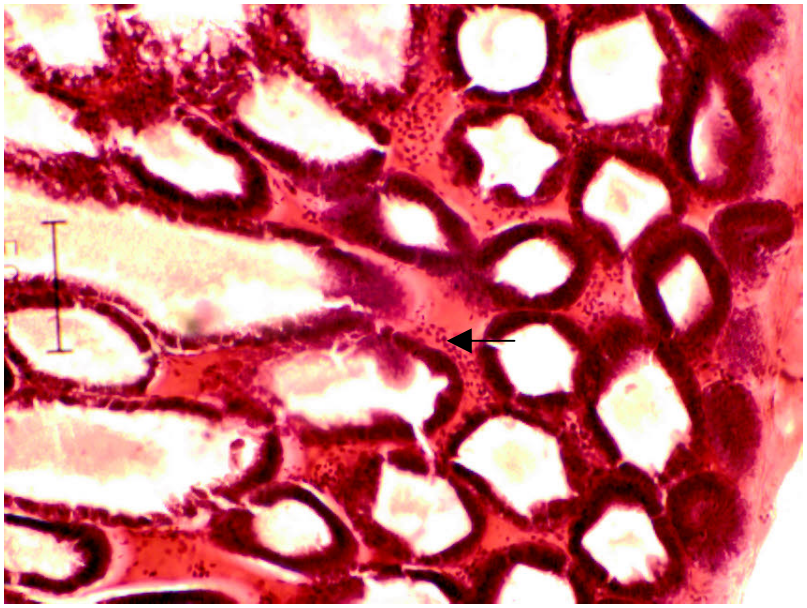
ภาพที่ 21 เนื้อเยื่อตับกุ้งขาวที่ได้รับสารพิษ Tetrodotoxin 2.18 พีพีเอ็ม เป็นระยะเวลา 8 สัปดาห์ พบว่าเซลล์ตับมีขนาดเล็กลง (atrophy) พบ R-cell จำนวนน้อย ทำให้การสะสมอาหารลดลง (ศรชี้) (H&E, Bar = 50 µm)



ภาพที่ 22 เนื้อเยื่อตับกุ้งขาวที่ได้รับสารพิษ Tetrodotoxin 2.18 พีพีเอ็ม เป็นระยะเวลา 8 สัปดาห์ พบเกิดการฝ่อและลีบของเซลล์ท่อตับ (atrophy) (ศรชี้) R-cell และ B-cell จำนวนน้อยการสะสมอาหารและการสร้างน้ำย่อยลดลง (H&E, Bar = 50 µm)



ภาพที่ 23 เนื้อเยื่อตับกุ้งขาวที่ได้รับสารพิษ Tetrodotoxin 2.64 พีพีเอ็ม เป็นระยะเวลา 8 สัปดาห์ พบเกิดการการแทรกตัวของเม็ดเลือดระหว่างท่อตับ (infiltration of haemocyte) (ศรชี้) (H&E, Bar = 50 µm)



ภาพที่ 24 เนื้อเยื่อตับกุ้งขาวที่ได้รับสารพิษ Tetrodotoxin 2.64 พีพีเอ็ม เป็นระยะเวลา 8 สัปดาห์ พบว่าเกิดการเสื่อมสลายของเซลล์ท่อตับ (degeneration) การแทรกตัวของเม็ดเลือดระหว่างท่อตับ (ศรชี้) (infiltration of haemocyte) (H&E, Bar = 50 µm)

3.3 ผลการวิเคราะห์สารพิษ Tetrodotoxin ที่ตกค้างในตัวกุ้งหลังจากได้รับสารพิษ Tetrodotoxin ที่ระดับต่างๆ เป็นระยะเวลา 8 สัปดาห์

ตารางที่ 14 ผลการวิเคราะห์สารพิษ Tetrodotoxin ที่ตกค้างในตัวกุ้งหลังจากได้รับสารพิษ Tetrodotoxin ที่ระดับต่างๆ เป็นระยะเวลา 8 สัปดาห์

ชุดการทดลอง	ปริมาณ Tetrodotoxinในอาหาร (พีพีเอ็ม)	Tetrodotoxin ที่ตกค้างในตัวกุ้ง (พีพีเอ็ม)
1	0	0
2	1.31	0
3	1.81	0
4	1.97	0
5	2.18	0
6	2.64	0

บทที่ 4
วิจารณ์ผลการทดลอง

4.1 ผลของสารพิษ Tetrodotoxin ต่อการเจริญเติบโต

จากการศึกษาครั้งนี้ พบว่า การเจริญเติบโตของกุ้งขาวที่ได้รับอาหารปนเปื้อนสารพิษ Tetrodotoxin ที่ปนเปื้อนในอาหารระดับ 0 – 2.64 พีพีเอ็ม เป็นเวลา 8 สัปดาห์ มีน้ำหนักเฉลี่ยต่อตัว น้ำหนักที่เพิ่มขึ้น และอัตราการเจริญเติบโตจำเพาะ มีแนวโน้มลดลงตามระดับสารพิษที่สูงขึ้น อัตราการเปลี่ยนอาหารเป็นเนื้อสูงขึ้น ตามระดับสารพิษที่สูงขึ้น ทั้งนี้การเจริญเติบโตขึ้นอยู่กับหลายปัจจัย ได้แก่ สิ่งรบกวนระหว่างการเลี้ยงและสิ่งแวดล้อมระหว่างการทดลองรวมทั้งปัจจัยหลักอาจเนื่องมาจากกุ้งขาวได้รับสารพิษ Tetrodotoxin ในระดับความเข้มข้นสูงทำให้อัตราการรอดตายต่ำตามระดับความเข้มข้นของสารพิษไปด้วย ซึ่งการทดลองให้อาหารปนเปื้อนสารพิษ Tetrodotoxin กับกุ้งขาวให้ผลด้านการเจริญเติบโตที่คล้ายคลึงและสอดคลองกับผลการทดลองของ Smith (1996) ในกุ้งกุลาดำและกุ้ง *P. japonicus* ที่ทดลองเลี้ยงด้วยน้ำที่มีการบลูมของแพลงก์ตอนพืชชนิด Oscillatoriales ในฟาร์ม และมีการให้อาหารปกติ พบว่าอัตราการเจริญเติบโตและอัตราการรอดตายของกุ้งทดลองต่ำลงเนื่องมาจากน้ำที่ใช้ทดลองเลี้ยงกุ้งมีแพลงก์ตอนพืชชนิด Oscillatoriales ผสมอยู่ในน้ำ หลังจากที่นำแพลงก์ตอนพืชชนิด Oscillatoriales ไปตรวจดูพบว่า แพลงก์ตอนพืชชนิด Oscillatoriales เป็นตัวสร้างแบคทีเรียชนิด Vibiosis จำนวนมาก ซึ่งแบคทีเรียชนิดนี้สามารถสร้างสารพิษ PSP และสารพิษชนิดนี้มีกลไกการออกฤทธิ์ต่อสิ่งมีชีวิตเหมือนกับสารพิษ Tetrodotoxin ซึ่งสอดคลองกับ Linares และคณะ (2008) ที่ศึกษาผลของสารพิษ PSP ในกุ้งขาว โดยแบ่งกุ้งขาวที่ใช้ในการทดลองออกเป็น 2 รุ่น คือกุ้งขาววัยอ่อน (3.8 ± 0.3 กรัม) และกุ้งตัวเต็มวัย (41.7 ± 4.4 กรัม) ทำการทดลองเลี้ยงในถังพลาสติกขนาด 40 ลิตร น้ำที่ใช้เลี้ยงมีความเค็ม 35 ส่วนในพันส่วน ให้อาหารที่มีโปรตีน 40 เปอร์เซ็นต์ โดยอาหารของกุ้งขาววัยอ่อนมีการปนเปื้อนสารพิษที่ระดับ 0.5, 1 และ 5 MU อาหารทดลองกุ้งขาวตัวเต็มวัย 5 และ 20 MU พบว่ากุ้งขาววัยอ่อนสามารถทนต่อสารพิษได้น้อยกว่าเมื่อเทียบกับน้ำหนักตัว และกุ้งมีอัตรารอดตายที่ต่ำมาก แต่ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ

4.2 ผลของสารพิษ Tetrodotoxin ต่อสุขภาพของกุ้ง

เมื่อพิจารณาองค์ประกอบเลือดของกุ้งขาวที่ได้รับอาหารปนเปื้อนสารพิษ Tetrodotoxin ที่ระดับต่างๆ เป็นเวลา 8 สัปดาห์ ไม่มีผลต่อปริมาณเม็ดเลือดรวมกุ้ง ส่วนกุ้งที่ได้รับสารพิษ

Tetrodotoxin ระดับสูงสุด (2.64 พีพีเอ็ม) มีปริมาณเม็ดเลือดต่ำที่สุด ทั้งนี้เม็ดเลือดและองค์ประกอบเลือดกุ้งสามารถเปลี่ยนแปลงได้ตามสภาพแวดล้อม เช่น การเปลี่ยนแปลงคุณภาพน้ำ วงจรการลอกคราบ และปัจจัยภายในตัวกุ้งเอง เช่น การอักเสบ เมแทบอลิซึม อายุ ระยะเจริญ วัย เพศ และสายพันธุ์ (Mulcahy, 1975) อีกทั้งคุณสมบัติของเม็ดเลือดมักมีการเปลี่ยนแปลงอย่างรวดเร็วเมื่อดูดออกจากแอ่งเลือดและยังขึ้นอยู่กับสุขภาพกุ้งเองด้วยนอกจากนี้การเปลี่ยนแปลงที่สอดคล้องกับปริมาณเม็ดเลือด ได้แก่ ปริมาณโปรตีนในน้ำเลือด ปริมาณกลูโคสในเลือด และความว่องไวของกิจกรรมเอนไซม์ฟีนอลออกซิเดส มีค่าต่ำที่สุดในกุ้งที่ได้รับสารพิษสูงที่สุด (2.64 พีพีเอ็ม) สอดคล้องกับ Perazzolo (1997) รายงานว่าความว่องไวของเอนไซม์ฟีนอลออกซิเดส ขึ้นอยู่กับการทำงานของเม็ดเลือดชนิดที่มีกรานูลและเอนไซม์บางส่วนในซีรัม เมื่อกุ้งได้รับสารพิษหรือสิ่งแปลกปลอมชนิดหนึ่งเข้าไปส่งผลให้กรานูลในเม็ดเลือดลดลงจึงทำให้ความว่องไวของเอนไซม์ฟีนอลออกซิเดสลดลง ปริมาณเอนไซม์ alkaline phosphatase (ALP), alanine aminotransferase (ALT) และ aspartate aminotransferase (AST) ที่ทำหน้าที่เกี่ยวกับการสลายกรดอะมิโนเพื่อสร้างพลังงานในตับ (Stryer, 1988) มีแนวโน้มเพิ่มสูงขึ้นในกุ้งที่ได้รับสารพิษ ซึ่งเป็นตัวบ่งชี้ถึงการรับตัวตอบสนองต่อสารพิษมากขึ้น เอนไซม์ ALP เป็นเอนไซมี่อยู่ในตับมีหน้าที่กำจัดสารพิษ ดังนั้นเมื่อสัตว์ได้รับสารพิษเข้าสู่ร่างกายจึงทำให้ปริมาณเอนไซม์สูงขึ้น แต่ในบางสภาวะพบว่าความเครียดมีผลทำให้น้ำตาลในเลือดลดต่ำลงได้ Santos และ Nery (1987) ศึกษาพบว่าความเครียดมีผลทำให้ปริมาณกลูโคสในเลือดปู *C. granulata* ต่ำลงอย่างรวดเร็วเมื่อถูกย้ายจากน้ำทะเลความเค็ม 30 พีพีที มาเลี้ยงในน้ำจืด และในส่วนของปริมาณโปรตีนในน้ำเลือดของกุ้งขาวมีแนวโน้มลดต่ำลงตามสภาวะของความเครียดในตัวกุ้งขาวเช่นเดียวกัน เนื่องจากเมื่อร่างกายของกุ้งขาวมีความเครียดร่างกายจะเปลี่ยนโปรตีนไปเป็นกรดอะมิโนอิสระ เพื่อช่วยในการรักษาสภาพเซลล์ให้คงที่อยู่ได้ (Lima และคณะ, 1997) ซึ่งสอดคลองกับ Vargas – Albors และคณะ (1889) ซึ่งพบว่ากุ้ง *P. califoriiensis* ที่อาศัยอยู่ในสภาพของอุณหภูมิและความเค็มของน้ำที่สูงและต่ำกว่าปกติจะมีผลทำให้ปริมาณโปรตีนลดต่ำลงได้ เช่นเดียวกับ Rodriguez (1981) ศึกษาพบว่าความเค็มของน้ำที่เพิ่มสูงขึ้นจะทำให้กุ้งเกิดความเครียด จนทำให้ปริมาณโปรตีนในน้ำเลือดของกุ้งขาว *L. vannamei* และกุ้งน้ำเงิน *P. stylirostris* ลดต่ำลงตามสภาวะความเครียดที่เพิ่มขึ้น

ผลของสารพิษ Tetrodotoxin ระดับต่างๆ ต่อการเปลี่ยนแปลงเนื้อเยื่อกุ้งขาวที่ได้รับสารพิษระดับต่างๆ เป็นเวลา 4 สัปดาห์ พบการเปลี่ยนแปลงของเนื้อเยื่อในกุ้งที่ได้รับสารพิษ Tetrodotoxin ระดับ 2.18และ 2.64 พีพีเอ็ม โดยการเปลี่ยนแปลงของเนื้อเยื่อในกุ้งที่พบ ได้แก่ การฝ่อและลีบของเนื้อเยื่อตับ เซลล์ที่ละสมอาหารลดลง การสลายตัวของเซลล์ท่อตับ และเกิดการตายของเซลล์บุผิวท่อตับบางส่วน โดยนิวเคลียสของเซลล์ตับหดตัวตามที่ได้รายงานว่า ตับที่ได้รับสารพิษมักพบเซลล์

ตาย ในส่วนของไซโตพลาซึมติดสีย้อมอีโอซินเพิ่มขึ้น เนื่องจากการสูญเสีย basophilic RNA ไมโตคอนเดรียไม่เป็นระเบียบ การเพิ่มของ acidophilic group เนื่องจากการแตกหักของโครงสร้างโปรตีน เมื่อเปรียบเทียบกับเซลล์ปกติ เซลล์ตายจะมีนิวเคลียสเล็กกว่าและติดสีแน่นทึบของฮีมาทอกไซลิน (Hibriya, 1982; Wheater *et al.,* 1985 อ้างโดย อรอุษา, 2546) การเปลี่ยนแปลงของการทดลองในครั้งนี้สอดคล้องกับการศึกษาในกุ้งขาวโดย Linares และคณะ (2009) ได้รายงานว่ากุ้งขาวที่ได้รับอาหารปนเปื้อนสารพิษ PSP และ NSP โดยผสม dinoflgellates (10^3, 10^4 และ 10^6 เซลล์/ลิตร) เป็นระยะเวลา 45 วัน เซลล์ตับที่สะสมอาหารมีขนาดเล็กลงมีเนื้อเยื่อเกี่ยวพันและเม็ดเลือดจำนวนมากแทรกตัวในเนื้อเยื่อบริเวณท่อตับ และเกิด melanization ในบริเวณที่มีการตายเซลล์ และจากการศึกษาของ Poli และคณะ (1990), Cattet และ Geraci (1993), Andrinolo และคณะ (1999) และ Lehane, 2000 เนื้อเยื่อของกุ้งที่ได้รับสารพิษ Tetrodotoxin จะทำให้เกิดการตายและมีการเสื่อมสลายของเซลล์ตับ มีความเสื่อมสลายในเซลล์ของระบบประสาท ไปจนถึงช่องว่างของเซลล์ตับ เมื่อมีการเปลี่ยนแปลงของเซลล์ตับ เช่น การเสื่อมสลายและตายของเซลล์ตับ ทำให้ประโยชน์ของโภชนะในร่างกายสัตว์มีประสิทธิภาพลดลง และส่งผลกระทบต่อการเจริญเติบโตของสัตว์ตามมา (Ueno, 1983)

ผลของสารพิษ Tetrodotoxin ต่อการเปลี่ยนแปลงของเนื้อเยื่อ พบว่ามีความสัมพันธ์กับปริมาณสารที่ได้รับ โดยชุดการทดลองที่ได้รับสารพิษในปริมาณสูงมีการเปลี่ยนแปลงของเนื้อเยื่อที่ชัดเจนและรุนแรงกว่าในกลุ่มที่ได้รับสารพิษน้อยกว่า นอกจากปัจจัยทางด้านระดับของสารพิษแล้วยังขึ้นอยู่กับระยะเวลาที่สัตว์ได้รับสารพิษด้วย การได้รับสารพิษในปริมาณน้อยๆ แต่เป็นประจำเก็บสะสมที่อวัยวะต่างๆ ของร่างกาย จนเมื่อระดับการสะสมเพิ่มสูงขึ้นก็จะแสดงอาการพิษออกมา (แก้ว, 2546) ดังนั้นเมื่อกุ้งได้รับสารพิษเป็นระยะเวลาที่นานขึ้นทำให้พบเปอร์เซ็นต์ความผิดปกติและอาการผิดปกติที่รุนแรงกว่า การเปลี่ยนแปลงของเนื้อเยื่อที่ได้รับสารพิษ Tetrodotoxin จะแสดงออกในส่วนของตับชัดเจน เนื่องจากตับมีหน้าที่เก็บรวบรวมสารอาหารซึ่งดูดซึมจากทางเดินอาหารแล้วผ่านกระบวนการเมแทบอลิซึมเพื่อเปลี่ยนเป็นสารเก็บสะสมไว้ การสังเคราะห์โปรตีนสร้างน้ำย่อย และทำหน้าที่ทำลายพิษ (detoxification) ของสารพิษที่เข้าสู่ร่างกาย (กนกธร, 2546)ซึ่งการเปลี่ยนแปลงทางพยาธิสภาพของเนื้อเยื่อตับซึ่งจะส่งผลต่อการสร้างน้ำย่อยและตับสามารถสะสมอาหารได้น้อยลง ซึ่งจะพบว่าในเซลล์ตับของกุ้งนั้นพบ R-cell และ B-cell ลดลงซึ่งส่งผลต่อการเจริญเติบโตที่ลดลงและอัตราการเปลี่ยนอาหารเป็นเนื้อที่เพิ่มขึ้น และเซลล์สร้างน้ำย่อยเสียไปมากทำให้ตับสร้างน้ำย่อยได้น้อย ตับจึงใช้สารอาหารได้น้อยลง แต่ในตัวกุ้งกลไกการกำจัดสารพิษยังไม่ทราบแน่ชัด แต่น่าจะผ่านการทำงานของตับเช่นกัน (มะลิ และคณะ, 2543)

จากการทดลองครั้งนี้และข้อมูลต่าง ๆ ข้างต้นแสดงให้เห็นว่าเมื่อกุ้งขาวที่ได้รับสารพิษ Tetrodotoxin ในปริมาณต่าง ๆ พบว่าก่อให้เกิดการเปลี่ยนแปลงด้านการเจริญเติบโตและองค์ประกอบเลือดซึ่งมีแนวโน้มไปในทิศทางเดียวกัน เมื่อศึกษาการเปลี่ยนแปลงทางพยาธิสภาพของเนื้อเยื่อตับ เริ่มพบความผิดปกติตั้งแต่ 4 สัปดาห์แรก ตั้งแต่ระดับ 2.18 พีพีเอ็ม ขณะที่เวลา 8 สัปดาห์ พบความผิดปกติ ตั้งแต่ 1.81 พีพีเอ็ม โดยความรุนแรงของการเปลี่ยนแปลงทางเนื้อเยื่อที่ตรวจพบจะสัมพันธ์กับความเข้มข้นของสารพิษและระยะเวลาที่กุ้งได้รับ ดังเช่นกุ้งขาวที่ได้รับสารพิษ Tetrodotoxin ในระดับต่าง ๆ ในสัปดาห์ที่ 8 มีอาการรุนแรงและพบจำนวนตัวผิดปกติสูงกว่ากุ้งที่ได้รับสารพิษในสัปดาห์ที่ 4 อย่างชัดเจน เนื่องจากข้อมูลความเป็นพิษของ Tetrodotoxin ในสิ่งมีชีวิตชนิดต่าง ๆ มีค่อนข้างจำกัด และยังไม่มีการศึกษากันอย่างกว้างขวางนักในสัตว์น้ำ

บทที่ 5
สรุปผลการทดลอง

จากผลการศึกษาผลของสารพิษ Tetrodotoxin จากปลาปักเป้าปนต่อการเจริญเติบโตและสุขภาพของกุ้งขาว สามารถสรุปได้ดังนี้

1. กุ้งขาวที่ได้รับอาหารปนเปื้อนสารพิษ Tetrodotoxin ที่ระดับต่างๆ เป็นเวลา 8 สัปดาห์ ทำให้การเจริญเติบโตมีแนวโน้มลดลง แต่ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ (p›0.05) อัตราการเปลี่ยนอาหารเป็นเนื้อสูงสุดที่ระดับ 0 พีพีเอ็ม ซึ่งไม่แตกต่างกันทางสถิติ (p›0.05) กับกุ้งขาวที่ได้รับอาหารที่ปนเปื้อนสารพิษที่ระดับ 1.31 และ 1.97 พีพีเอ็ม แต่มีความแตกต่างกัน กับกุ้งขาวที่ได้รับอาหารปนเปื้อนสารสารพิษที่ระดับ 1.81, 2.18 และ 2.64 พีพีเอ็ม อย่างมีนัยสำคัญ (p›0.05) อัตราการเจริญเติบโตจำเพาะ ปริมาณอาหารที่กุ้งกิน และอัตราการรอดตายในกุ้งขาวที่ได้รับอาหารปนเปื้อนสารพิษ Tetrodotoxin ที่ระดับต่างๆ พบว่าไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ (p›0.05) เมื่อเปรียบเทียบกับกุ้งขาวที่ได้รับอาหารชุดควบคุม

2. กุ้งขาวที่ได้รับอาหารปนเปื้อนสารพิษ Tetrodotoxin ที่ระดับต่างๆ เป็นเวลา 8 สัปดาห์ พบว่าระดับ Tetrodotoxin ในอาหารที่ระดับ 1.31 – 2.64 ppm มีผลให้ปริมาณเม็ดเลือดทั้งหมด และระดับกลูโคสในเลือดกุ้งขาวลดลง เมื่อระดับ Tetrodotoxin ในอาหารเพิ่มขึ้น แต่ลดลงอย่างไม่มีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95% ระดับ Tetrodotoxin ในอาหารที่ระดับ 2.64 ppm มีผลให้โปรตีนในน้ำเลือดกุ้งลดลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (p›0.05) และระดับ Tetrodotoxin ในอาหารที่ระดับ 1.97, 2.18 และ 2.64 มีผลให้ PO activity ในเลือดกุ้งลดลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (p›0.05)

3. กุ้งขาวที่ได้รับอาหารปนเปื้อนสารพิษ Tetrodotoxin ที่ระดับต่างๆ เป็นเวลา 4 สัปดาห์ พบความผิดปกติของเนื้อเยื่อตับ ในกุ้งที่ได้รับสารพิษ Tetrodotoxin ที่ระดับ 1.81 พีพีเอ็ม 1.97 พีพีเอ็ม 2.18 พีพีเอ็ม และ 2.64 พีพีเอ็ม โดยมีอาการรุนแรงและเปอร์เซ็นต์ตัวที่ผิดปกติเพิ่มมากขึ้นตามระยะเวลาที่กุ้งได้รับสารพิษ ไม่พบความผิดปกติของต่อมน้ำเหลือง อวัยวะสร้างเม็ดเลือด กล้ามเนื้อเหงือกและกล้ามเนื้อลำตัว

กุ้งขาวที่ได้รับอาหารปนเปื้อนสารพิษ Tetrodotoxin ที่ระดับต่างๆ เป็นเวลา 8 สัปดาห์ พบความผิดปกติของเนื้อเยื่อตับ ในกุ้งที่ได้รับสารพิษ Tetrodotoxin ที่ระดับ 2.18 พีพีเอ็ม และ 2.64 พีพีเอ็ม โดยมีอาการรุนแรงและเปอร์เซ็นต์ตัวที่ผิดปกติเพิ่มมากขึ้นตามระยะเวลาที่กุ้งได้รับสารพิษ ไม่พบความผิดปกติของต่อมน้ำเหลือง อวัยวะสร้างเม็ดเลือด กล้ามเนื้อเหงือกและกล้ามเนื้อลำตัว

4. กุ้งขาวที่ได้รับสารพิษ Tetrodotoxin ในระดับ 0-2.64 พีพีเอ็ม เป็นเวลา 8 สัปดาห์ ไม่พบการสะสมสารพิษในตัวกุ้งขาว

ข้อเสนอแนะ

1. ผลการเจริญเติบโตและผลการตกค้างของสารพิษในกุ้งขาวที่ได้รับสารพิษ Tetrodotoxin เป็นเวลา 8 สัปดาห์ ไม่มีความแตกต่างกันมาก และในตัวกุ้งขาวก็ไม่พบการตกค้างของสารพิษ ดังนั้นควรมีการศึกษาโดยเพิ่มระดับความเข้มข้นของสารพิษและระยะเวลาให้ยาวนานขึ้น

2. การผลิตปลาปั่นควรมีการป้องกันไม่ให้มีปลาปักเป้าปนกับปลาชนิดอื่น เพื่อความปลอดภัยต่อสัตว์เลี้ยง และผู้บริโภค

เอกสารอ้างอิง

กนกธร ปิยธำรงรัตน์. 2546. ระบบทางเดินอาหาร. ใน เนื้อเยื่อวิทยา. หน้า 205-251. กรุงเทพฯ : โอ. เอส. พริ้นติ้ง เฮ้าส์.

กิจการ ศุภมาตย์ และ สิทธิ บุณยรัตผลิน. 2538. การศึกษาภูมิคุ้มกันโรคและแนวทางการใช้วัคซีนป้องกันโรคติดเชื้อแบคทีเรียและไวรัสในกุ้งกุลาดำ (*Penaeus monodon*). รายงานการวิจัย สำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ. 1-17.

แก้ว กังสดาลอำไพ. 2546. สารพิษในอาหาร ตอนที่ 2 ปัญหาสารพิษจากเชื้อราในอาหาร. ว. รามาธิบดี. 14 : 25-30.

กลุ่มวิจัยเทคโนโลยีชีวภาพ, กรมประมง. 2550. วิธีการสังเกตเนื้อปลาปักเป้า.[ออนไลน์] เข้าถึงได้ http://www.arunsawat.com. วันที่สืบค้น 12/09/2551.

จักรพันธ์ ปัญจะสุวรรณ. 2542. พิษภัยในอาหาร. กรุงเทพฯ: โอเดียนสโตร์. 10-11.

จิราวรรณ แย้มประยูร. 2550. กรมประมงชี้แจงพิษปลาปักเป้า. ข่าวประชาสัมพันธ์กรมประมง. กรุงเทพฯ.

ฉัตรชัย ชาตะกาญน์. 2551. พนักงานโรงงานปลาป่นภาคใต้. 22 พฤศจิกายน. ติดต่อสัมภาษณ์ด้วยวาจา.

ชลอ ลิ้มสุวรรณ. 2545. คิดอย่างด็อกเตอร์ชลอ: เลี้ยงกุ้งขาวต้องระวังโรคดวงขาวด้วย. ว.สัตว์น้ำเศรษฐกิจ 6: 31-34.

ธวัชชัย สันติกุล. 2545. มารู้จักกุ้งขาว *Penaeus vannamei*. มติชนบทเทคโนโลยีชาวบ้าน 278: 102-103.

ธวัชชัย สันติกุล. 2546. ตรวจสอบความพร้อมก่อนเลี้ยงกุ้งขาว"แวนนาไม". มติชนบทเทคโนโลยีชาวบ้าน 304: 100-101.

นรินทร์ หิรัญสุทธิกุล. 2550. พิษปลาปักเป้า. [ออนไลน์] เข้าถึงได้ http://www.si.mahidol.ac.th/pufferfish.html. วันที่สืบค้น 12/09/2551.

ประจวบ หลำอุบล. 2527. กุ้ง.กรุงเทพฯ: ภาควิชาวิทยาศาสตร์ทางทะเล คณะประมง มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์. 331 น.

ปิยะบุตร วานิชพงษ์พันธุ์. 2545. ศาสตร์ของกุ้งขาวลิโทพีเนียสแวนนาไม (ตอนที่ 2). ว. สัตว์น้ำ 159: 113-116.

ภิญโญ เกียรติภิญโญ. 2545. วิธีปฏิบัติสำหรับการเลี้ยงกุ้งขาว แอล.วานาไม (Practical Technology for *Litopenaeus vannamei* Culture). สมุทรปราการ: สำนักพิมพ์เมืองเกษตรแม็กกาซีน. 4-15.

มะลิ บุณยรัตผลิน, กิจการ ศุภมาตย์, ดวงจันทร์ สุประเสริฐ และชูศักดิ์ บริสุทธิ์. 2543. ระบบภูมิคุ้มกันโรคในกุ้งกุลาดำ : IX. การศึกษาผลของ Aflatoxin B1 ต่อการเจริญเติบโต องค์ประกอบเลือด ระบบภูมิคุ้มกัน และเนื้อเยื่อในกุ้งกุลาดำ. ว. สงขลานครินทร์ วทท. 22 (ฉบับพิเศษ) : 641-652.

วีระ อิ้งสอาด. 2551. การศึกษาสภาพโรงงานผลิตปลาป่นในประเทศไทย. [ออนไลน์] เข้าถึงได้ http://www.dld.go.th/person/information/wor10/109.doc วันที่สืบค้น 12 /09/2551.

สมาคมแช่เยือกแข็งไทย. 2548. ประเมิณแนวโน้มธุรกิจกุ้งโลก. [ออนไลน์] เข้าถึงได้ http://www.thai-frozen.or.th/th/index.asp วันที่สืบค้น 5/01/2553.

สิริ เอกมหาราช. 2548. การเพาะเลี้ยงกุ้งขาว (*Penaeus vannamei*) ในกลุ่มประเทศเอเชียตะวันออกเฉียงใต้และประเทศจีน. ว. การประมง 58: 107-111.

สำนักบริการการส่งออก. 2547. [ออนไลน์] เข้าถึงได้ www.depthai.go.th/tabid/391/Default.aspx?... วันที่สืบค้น 5/01/2553.

อัธยา กังสุวรรณ. 2536. สำรวจปลาปักเป้าที่มีพิษในทะเลอันดามัน. รายงานวิชาการประจำปี 2536. กรุงเทพฯ: กรมประมง. 715-725.

อัธยา กังสุวรรณ, ทะมะโอะ โนะงุจิ และคะเนฮิชะ ฮะชิโมะโตะ. 2530. แบคทีเรียที่สร้างเททโทรโดทอกซิน. รายงานสัมมนาวิชาการประจำปี 2530. กรุงเทพฯ: กรมประมง. 144-151.

อัธยา กังสุวรรณ, ทะมะโอะ โนะงุจิ และคะเนะฮิชะ ฮะชิโมะโตะ. 2533. พิษของปลาปักเป้า *Arothron meppa* และ *Lagocephalus inermis*. รายงานสัมมนาวิชาการประจำปี 2533. กรุงเทพฯ: กรมประมง. 90-93.

อัธยา กังสุวรรณ, มนูน พรมเดช, โอซามุ อาระคาวา และโยชิโอะ โอโนอุเอะ. 2539. พิษของปลาปักเป้าน้ำจืด. เอกสารวิชาการเลขที่ 11/2539. กรุงเทพฯ: กรมประมง.

อรอุษา อุสันโนน. 2546. ผลของอะฟาทอกซินบี1 ต่อปลานิลแปลงเพศ. วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์.

Alexander, J.B. and Ingram, G.A. 1992. Noncellular nonspecific defense mechanisms of fish. Ann. Rev. Fish. Dis. 2: 249-279.

Andrinolo, D., Micheab, L.F., Lagos, N., 1999. Toxic effects, pharmacokinetics and clearance of saxitoxin, a component of paralytic shellfish poison (PSP), in cats. Toxicon 37 :447-464.

AOAC. (Association of Official Analytical Chemists). 1990. Official Methods of Analysis. Washington, DC: AOAC.

Arakawa, K. 2001. Resistibility against TTX and PSP. Studies on the Toxicity of a Japanese Newt *Cynops pyrrhogaster*, Nagasaki: Doctoral thesis, Nagasaki University: 50-53.

Bancroft, J.D. 1967. Histochemical Techniques. London : Butterworths.

Bell, T.A. and Lightner, D.V. 1988. A Handbook of Normal Penaeid Shrimp Histology. World Aquaculture Society. Arizona: Allen Press. 32-36.

Brock, J.A. and Main, K. 1994. A Guide to the Common Problems and Disease of Cultureed *Penaeus vannamei*. Honolulu: Makapuu. 234-236.

Boyd, C.E. and Tucker, C.S. 1992. Water Quality and Pond Soil Analysis for Aquaculture. Albama: Auburn University.

Cattet, M., Geraci, J.R., 1993. Distribution and elimination of ingested brevetoxin (PbTx-3) in rats. Toxicon 31 (11), 1483-1486.

Chemical Ecology. 2008. Tetrodotoxin: Mode of Action. [online]. Available http://www.life.umd.edu/grad/MLfsc/zctsim/ionchannel.html. accessed on 12/09/2008.

Dupree, H.K. and Sneed, K.P. 1966. Response of channel catfish fingerling to different levels of major nutrients in purified diets. U.S. Bureau of Sports Fish and Wildlifte Tech. Pap. No. 9.

Fujita, P. 2008. What's In a Name: Poison Monks and Fugu Evolution. [online]. Available http://images.google.co.th/imgres?imgurl. Accessed on 12/09/2008.

Gordon, M.S., Plaut, I. and Kim, D. 1996. How puffers (teleostie:Tetraodontidae) swim. Fish Biol. 49: 319-328.

Hashimoto, K., Noguchi, T. and Watabe, S. 1990. New aspect of tetrodotoxin. *In:* Microbial Toxins in Foods and Feeds. (Eds. Pohland, A.E. and Smith, J.E.). New York: Plenum Press. 159-172.

Hibiya, T. 1982. An Atlas of fish Histology Normal and pathology (eds. Hidy, P.H., Baldwin, R.S., Greasham, R.L., Keith, C.L. and McMullen, J.R.) Vol.22, pp. 143-156. New York : Academic Press.

Humason, G.L. 1979. Animal Tissue Technique (4th Edition). San Francisco: W.H. Freeman and Company. 661 p.

Hwang, D.F., Chueh, C.H. and Jeng, S.S. 1990. Occurrence of tetrodotoxin in the gastropod mollusk *Natica lineata* (lined moon shell). Toxicon 28: 21– 27.

Ikeda, K., Venmathi , B.A., Honda, S., Ohtsuka, S., Arakawa, O., Asakawa, M. and Boxshall, G.A. 2006. Accumulation of tetrodotoxin (TTX) in *Pseudocligus fugu*, a parasite copepod from panther puffer *Takifugu pardalis*, but without vertical transmission-using an immunoenzymatic technique. Toxicon 48: 116-122.

Ito, K., Okabe, S., Asakawa, M., Bessho, K., Taniyama, S., Shida, Y. and Ohtsuka, S. 2006. Detection of tetrodotoxin (TTX) from two copepods infecting the grass puffer *Takifugu niphobles*: TTX attracting the parasites. Toxicon 48: 620-626.

Jantrarotai, W., Sitasit, P. and Rajchapakdee, S. 1994. The optimum carbohydrate to lipid ratio in hybrid Clarias catfish (*Clarias macrocephalus x C. Gariepinus*) diets containing raw broken rice. Aquaculture 27: 43-54.

Linares, J., Ochoa, J.L. and Martinez, A. 2008.Effect of PSP Toxin in White Leg Shrimp *Litopenaeus vannamei* Boone, 1931. J. OF Food SCIENCE. 73: 69-73.

Lowry, O.H., Rosebrrough, N.J., Farr, A.L. and Randell, R.J. 1951. Protein measurement with the folin phenol reagent. J. Biol. Chem. 193: 265 – 275.

Matsui, T., Taketsugu, S., Sato, H., Yamamori, K., Kodama, K., Ishi, A., Hirose, H. and Shimizu, C. 1990. Toxification of cultured puffer fish by the administration of tetrodotoxin producing bacteria. Nippon Suisan Gakkaishi 56: 705 -709.

Matsumura, K. 1995. Tetrodotoxin as a pheromone. Nature 378: 563-564.

Miyazawa, K. and Noguchi, T. 2001. Distribution and origin of tetrodotoxin. J. Toxicol. Toxin Rev. 20: 11 –33.

Mosher, H.S. 1986. Tetrodotoxin, Saxitoxin and the Molecular Biology of the Sodium Channel. Sci. 479: 1-448.gaki, G.), pp 1004. The University of Wisconsin Press.

Mulcahy, M.F. 1975. Fish Blood Changes Associated with Disease: A Hematological Study of Pike Lymphoma and Salmon Ulcerative Dermal Necrosis. In The Pathology of Fishes. (eds. Ribelin, W.E. and Mi

Narita, H., Matsubara, S., Miwa, N., Akahane, S., Murakami, M., Goto, T., Nara, M., Noguchi, T., Saito, T., Shida, Y. and Hashimoto, K. 1987. *Vibrio alginolyticus*, a TTX-producing bacterium isolated from the starfish *Astropecten polyacanthus*. Nippon Suisan Gakkaishi 47: 935–941.

Noguchi, T., Arakawa, O. and Takatani, T. 2006a. TTX accumulation in pufferfish. Comp. Biochem. Physiol. 1(D): 145-152.

Noguchi, T., Arakawa, O. and Takatani, T. 2006b. Toxicity of pufferfish *Takifugu rubripes* cultured in netcages at sea or aquaria on land. Comp. Biochem. Physiol. 1(D): 153-157.

Noguchi, T., Jeon, J.K., Arakawa, O., Sugita, H., Deguchi, Y., Shida, Y. and Hashimoto, K. 1986. Occurrence of tetrodotoxin in *Vibrio* sp. isolated from intestines of xanthid crab *Atergatis floridus*. J. Biochem. 99: 311 –314.

Noguchi, T., Takatani, T. and Arakawa, O. 2004. Toxicity of puffer fish cultured in netcages. J. Food Hyg. Soc. Jpn. 45: 146-149.

Pillay, T.V.R. 1990. Aquaculture principles and practies. *In:* Aquaculture Development and Coordination Programme Food and Agriculture Organization of the United Nation. Rome: Agricultural Department . 111-115.

Poli, M.A., Templeton, C.B., Thompson, W.L., Hewetson, J.F., 1990. Distribution and elimination of brevetoxin PbTx-3 in rats. Toxicon 28 (8), 903-910.

Ponce-Palafox, J., Martinez-Palacios, C.A. and Ross, L.G. 1997. The effects of salinity and temperature on the growth and survival rates of juvenile white shrimp, *Penaeus vannamei*, Boone, 1931. Aquaculture 157: 107-115.

Saito, T., Noguchi, T., Harada, T., Murata, O., Abe, T. and Hashimoto, K. 1985. Resistibility of toxic and nontoxic pufferfish against tetrodotoxin. Bull. Jpn. Soc. Sci. Fish. 51: 1371.

Simidu, U., Noguchi, T., Hwang, D.F., Shida, Y. and Hashimoto, K. 1987. Marine bacteria which produce tetrodotoxin. Appl. Environ. Microbiol. 53: 1714– 1715.

Smith, T. 1996. Toxic effects of blooms of marine species of Osciilatoriales on farmed prawns (*Penaeus monodon, Penaeus japonicus*) and brine shrimp (*Artemia salina*). Toxicon. 34: 857-869.

Smith, V.J. and Soderhall, K. 1983. β-1,3-glucan activation of crustacean hemocytes *in vitro* and *in vivo*. Biol. Bull. 164: 299-314.

Steel, R.G.D. and Torrie, J.H. 1980. Principle and Procedures of Statistics. 2 nd Edition. New York: Mc Graw Hill. 401-437.

Tapia-Salazar, M., Cruz-Suarez, L.E., Ricque-Marie, D., Pike, I.H., Smith, T.K., Harris, A., Nygard, E. and Opstvedt, J. 2004. Effect of fishmeal made from stale versus fresh herring and of added crystalline biogenic amines on growth and survival of blue shrimp *Litopenaeus stylirostris* fed practical diets. Aquaculture 242: 437-453.

Ueno, Y. 1983. Effect of trichothecene Mycotoxins on Farm Animals. In Development in Food Science 4 (ed. Ueno, Y.) pp. 177-193. Tokyo: Elsevier.

Wheater, P.R., Burkitt, H.G., Stevens, A. and Lowe, J.S. 1985. Basic Histopatology. New York : Churchill Livingstone. pp. 217.

Yasumoto, T., Yasumura, D., Yotsu, M., Michishita, T., Endo, A. and Kotaki, Y. 1986. Bacterial production of tetrodotoxin and anhydrotetrodotoxin. Agric. Biol. Chem. 50: 793–795.

Ziaei-Nejad, S., Rezaei, M.H., Takami, G.A., Lovett, D.L., Mirvaghefi1, A.R. and Shakouri, M. 2006. The effect of *Bacillus* spp. Bacteria used as probiotics on digestive enzyme activity, survival and growth in the Indian white shrimp *Fenneropenaeus indicus*. Aquaculture 252: 516-524.

ภาคผนวก ก

สารเคมีและวิธีการวิเคราะห์

1.การวิเคราะห์คุณค่าทางโภชนาการของอาหารทดลอง

1.1 การวิเคราะห์ความชื้น (ตามวิธีการของ AOAC, 1990)

1. นำขวดชั่งเข้าตู้อบอุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 40 นาที และทำให้เย็นในโถดูดความชื้น

2. ชั่งและบันทึกน้ำหนักของขวดชั่งโดยละเอียด

3. ชั่งตัวอย่างใส่ขวดชั่งประมาณ 5 กรัม โดยบันทึกน้ำหนักอย่างละเอียด

4. นำตัวอย่างเข้าตู้อบ โดยใช้อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 8 ชั่วโมง

5. นำตัวอย่างที่อบแล้วใส่โถดูดความชื้นทิ้งไว้ให้เย็น บันทึกน้ำหนักของตัวอย่าง

6. ทำซ้ำตามข้อ 1-5 จนกระทั่งน้ำหนักที่ได้คงที่ โดยน้ำหนักที่หายไปคือน้ำหนักของความชื้น

การคำนวณ

$$\text{ปริมาณความชื้น (เปอร์เซ็นต์)} = \frac{\text{ผลต่างของน้ำหนักตัวอย่างก่อนอบและหลังอบ}}{\text{น้ำหนักตัวอย่างเริ่มต้น}} \times 100$$

1.2 การวิเคราะห์ปริมาณเถ้า (ตามวิธีกาของ AOAC, 1990)

1. เผาถ้วยกระเบื้องเคลือบในเตาเผาที่อุณหภูมิ 600 องศาเซลเซียส เป็นเวลาประมาณ 3 ชั่วโมง ปิดสวิตซ์เตาเผารอประมาณ 30-45 นาที เพื่อให้อุณหภูมิเตลดลงก่อน แล้วนำออกจากเตาเผาใส่โถดูดความชื้น ปล่อยให้เย็นจนถึงอุณหภูมิห้องแล้วชั่งน้ำหนัก

2. เผาซ้ำอีก ครั้งละประมาณ 30 นาที และกระทำเช่นข้อ 1 จนได้ผลต่างของน้ำหนักทั้งสองครั้งติดต่อกันไม่เกิน 1-3 มิลลิกรัม

3. ชั่งน้ำหนักให้ได้แน่นอน (ประมาณ 3 กรัม) ใส่ในถ้วยกระเบื้องซึ่งทราบน้ำหนักที่แน่นอนแล้ว นำไปเผาในตู้ดูดควันจนหมดควันแล้วจึงเข้าเตาเผาอุณหภูมิ 600 องศาเซลเซียส และกระทำเช่นเดียวกับข้อ 1-2

การคำนวณ

ปริมาณเถ้า (เปอร์เซ็นต์) = $\frac{\text{น้ำหนักตัวอย่างหลังเผา}}{\text{น้ำหนักตัวอย่างเริ่มต้น}} \times 100$

1.3 การวิเคราะห์หาโปรตีน (ตามวิธีการของ AOAC, 1990)

สารเคมี

1. กรดซัลฟิวริกเข้มข้น (sulfuric acid, H_2SO_4) 93-98 เปอร์เซ็นต์

2. สารเร่งรวม (catalyst mixture) เตรียมโดยชั่งคอปเปอร์ซัลเฟต (copper sulfate, $CuSO_4$) 7 กรัม กับโปแทสเซียมซัลเฟต (potassium sulfate, K_2SO_4) 100 กรัม ผสมให้เข้ากัน

3. สารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ (sodium hydroxide, NaOH) 45 เปอร์เซ็นต์ เตรียมโดยสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ 450 กรัม ในน้ำกลั่น ปรับปริมาตรให้ได้ 1 ลิตร

4. สารละลายกรดเกลือ (hydrochloric acid, HCl) 0.1 นอร์มอล เตรียมโดยสารละลายกรดเกลือ 9 มิลลิลิตรในน้ำกลั่น แล้วปรับปริมาตรจนครบ 1 ลิตร

5. สารละลายกรดบอริค (boric acid, H_3BO_3) 4 เปอร์เซ็นต์ เตรียมโดยละลายกรดบอริคในน้ำกลั่น ต้มจนกระทั่งละลายหมดปรับปริมาตรให้ได้ 100 มิลลิลิตร

6. อินดิเคเตอร์รวม (mixed indicator) เตรียมโดยละลายเมทิลเรด 0.2 กรัมในแอลกอฮอร์

7. สารละลายโซเดียมคาร์บอเนต (sodium carbonate, Na_2CO_3) 0.1 นอร์มอล เตรียมโดยอบโซเดียมคาร์บอเนตที่อุณหภูมิ 260-270 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที ชั่งสารดังกล่าวมา 1.325 กรัม ละลายในน้ำกลั่นจนมีปริมาตร 250 มิลลิลิตร

8. เมทิลออเรนซ์ อินดิเคเตอร์ (methyl orange indicator) เตรียมโดยสารละลายเมทิลออเรนซ์ 0.1 กรัมในน้ำกลั่น และปรับปริมาตรจนครบ 100 มิลลิลิตร

การหาความเข้มข้นของสารละลายกรดเกลือมาตรฐาน

ดูดสารละลายโซเดียมคาร์บอเนต 40 มิลลิลิตร ลงในขวดรูปชมพู่ขนาด 250 มิลลิลิตร เติมน้ำกลั่น 20 มิลลิลิตร เติมเมทิลออเรนซ์ อินดิเคเตอร์ 2-3 หยด ทำการไตเตรทด้วยสารละลายกรดเกลือ 0.1 นอร์มอล คำนวณความความเข้มข้นของสารละลายกรดเกลือโดยใช้สูตร $N_1V_1=N_2V_2$

หรือนอร์มอลลิตี้ของกรดเกลือ = $\frac{\text{น้ำหนัก (กรัม) ของโซเดียมคาร์บอเนต x 100}}{\text{สารละลายกรดเกลือ (มิลลิลิตร) x 52.994}}$

วิธีการ

ก. ขั้นตอนการย่อย

1. ชั่งตัวอย่างด้วยกระดาษชั่งสารที่ปราศจากไนโตรเจน ให้ได้น้ำหนักประมาณ 0.5-1 กรัม (ตัวอย่างของเหลวใช้ปริมาตร 10-15 มิลลิลิตร) ใส่ในหลอดย่อยโปรตีนและทำแบลงค์ด้วย บันทึกน้ำหนักโดยละเอียด

2. เติมสารเร่งรวม 3 กรัม

3. เติมกรดกำมะถันความเข้มข้น 10 มิลลิลิตร

4. นำไปให้ความร้อนด้วยชุดเครื่องย่อยโปรตีน วางหลอดย่อยในเตาเผาย่อย แล้วประกอบสายยางระหว่างฝาครอบเข้ากับเครื่องจับไอกรดและเปิดเครื่องจับไอกรด (โซเดียมไฮดรอกไซด์ 15 เปอร์เซ็นต์เป็นตัวจับไอกรด)

5. ย่อยที่อุณหภูมิ 375 องศาเซลเซียส เวลา 90-120 นาที (สามารถเพิ่มเวลาในการย่อยได้จนได้สารละลายใส) เมื่อย่อยจนใสหรือได้สารละลายสีฟ้าหรือสีเขียวอมฟ้า ตั้งทิ้งไว้ให้เย็นในตู้ดูดควัน

6. นำไปกลั่น

ข. ขั้นตอนการกลั่น

1. เติมน้ำกลั่นปริมาตร 50 มิลลิลิตร ลงในขวดวิเคราะห์

2. ต่อขวดแก้ววิเคราะห์โปรตีนเข้ากับชุดเครื่องกลั่นที่มีขวดรูปชมพู่บรรจุกรดบอริค 40 มิลลิลิตร โดยให้ปลายของท่อยางที่ต่อจากกระบอกแก้วควบแน่นจุ่มอยู่ในกรดบอริคเติมโซเดียมไฮดรอกไซด์ลงในขวดวิเคราะห์ตัวอย่างๆ จนกระทั่งสารละลายมีสีดำ

3. เติมอินดิเคเตอร์ลงในกรดบอริค 2-3 หยด

4. ทำการกลั่นจนกระทั่งไม่มีก๊าซแอมโมเนียออกมา เมื่อกรดบอริคเปลี่ยนเป็นสีเขียวแล้วจึงทำการกลั่นต่อไปอีก 10 นาที จากนั้นจึงนำขวดรูปชมพู่ออกจากเครื่องกลั่น

ค. ขั้นตอนการไตเตรท (titration)

1. นำไปไตเตรทด้วยสารละลายกรดเกลือมาตรฐานที่ทราบความเข้มข้นที่แน่นอนจนกระทั่งกระบอริคเปลี่ยนเป็นสีน้ำเงินอ่อน

2. บันทึกปริมาตรของกรดเกลือมาตรฐานที่ใช้เพื่อการคำนวณต่อไป

การคำนวณ

โปรตีน (เปอร์เซ็นต์) = $\frac{1.4\ (V_1-V_2)\ N \times 6.25}{W}$

โดยที่ V_1 คือ ปริมาตรของกรดเกลือที่ใช้ในการไตเตรทกับตัวอย่าง

V_2 คือ ปริมาตรของกรดเกลือที่ใช้ในการไตเตรทกับ blank

N คือ ความเข้มข้นของกรดเกลือ (นอร์มอล)

W คือ น้ำหนักตัวอย่าง

1.4 การวิเคราะห์ไขมัน (ตามวิธีการของ AOAC, 1990)

สารเคมี

1. สารละลายคลอโรฟอร์ม (chloroform)
2. เมทธานอล (methanol)

วิธีการ

1. อบถ้วยสกัดไขมัน (cup) ที่มีลูกแก้ว 2-3 เม็ด และตัวอย่างวิเคราะห์ในตู้อบที่อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส อบจนแห้งแล้วตั้งทิ้งไว้ให้เย็นในโถดูดความชื้น
2. ชั่งน้ำหนักถ้วยสกัดพร้อมลูกแก้วให้ได้น้ำหนักคงที่ (W_1)
3. ชั่งน้ำหนักตัวอย่างที่ต้องการวิเคราะห์ใส่กระดาษกรองประมาณ 1-2 กรัม (W_2) ห่อให้มิดชิดใส่ลงในไส้กรอง (thimble) ที่เตรียมไว้ นำไปใส่เข้าเครื่องสกัดไขมัน
4. นำถ้วยสกัดไขมันพร้อมลูกแก้วที่ชั่งไว้แล้วเติมสารละลายคลอโรฟอร์ม : เมทธานอล 25 มิลลิลิตร แล้วใส่เข้าเครื่องสกัดไขมันให้เรียบร้อย
5. เปิดเครื่องสกัดไขมัน ปรับอุณหภูมิไปที่ 160 องศาเซลเซียส เปิดน้ำเข้าเครื่อง เลื่อนปุ่มไปที่ boiling ต้มให้เดือด 30 นาที
6. เลื่อนปุ่มไปที่ rinsing เพื่อล้างตัวอย่าง 20 นาที
7. เปิดวาล์ว เปิดสวิตซ์อากาศเลื่อนปุ่มไปที่ evaporation เพื่อให้สารระเหยออกไป 5 นาที
8. ปิดเครื่อง เปิดสวิตซ์อากาศเลื่อนไปที่ปุ่ม evaporation กลับที่เดิม นำถ้วยสกัดไขมันออกจากเครื่อง วางทิ้งไว้ให้เย็นแล้วนำไปอบที่อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส จนแห้ง
9. นำถ้วยสกัดไขมันออกมาใส่ในโถดูดความชื้นทิ้งไว้ให้เย็น นำมาชั่งน้ำหนัก (W_3)

การคำนวณ

ไขมัน (เปอร์เซ็นต์) = $\frac{(W_3 - W_1)}{W2} \times 100$

โดยที่ W_1 คือ น้ำหนักถ้วยสกัดไขมันพร้อมลูกแก้ว

W_2 คือ น้ำหนักตัวอย่าง

W_3 คือ น้ำหนักถ้วยสกัดไขมันพร้อมลูกแก้วและตัวอย่างหลังการอบ

2. การคำนวณหาค่าอัตราการรอดตายและการเจริญเติบโต

2.1 น้ำหนักกุ้งที่เพิ่มขึ้นเฉลี่ยต่อตัว (% weight gain) ตามวิธีการรายงานจาก Tapia-Salazar และคณะ (2004)

$$= \frac{(\text{น้ำหนักกุ้งสุดท้าย} - \text{น้ำหนักกุ้งเริ่มต้น})}{\text{น้ำหนักกุ้งเริ่มต้น (กรัม)}} \times 100$$

2.2 อัตราการเปลี่ยนอาหารเป็นเนื้อ (feed conversion ratio; FCR) ตามวิธีการที่รายงานจาก Dupree และ Sneed (1966)

$$= \frac{\text{น้ำหนักอาหารที่กุ้งกินทั้งหมด (กรัม)}}{\text{น้ำหนักกุ้งที่เพิ่มขึ้น (กรัม)}}$$

2.3 อัตราการเจริญเติบโตจำเพาะ (specific growth rate; SGR) ตามวิธีการที่รายงานจาก Jantrarotai และคณะ (1994)

$$= \frac{(\ln \text{น้ำหนักกุ้งสุดท้าย} - \ln \text{น้ำหนักกุ้งเริ่มต้น})}{\text{เวลา (วัน)}} \times 100$$

2.4 ปริมาณอาหารที่กุ้งกิน (กรัม/ตัว/วัน)

= น้ำหนักอาหารที่กุ้งกินทั้งหมด (กรัม) / จำนวนกุ้งเมื่อสิ้นสุดการทดลอง (ตัว)
เวลา (วัน)

2.5 อัตราการรอดตาย (เปอร์เซ็นต์) ตามวิธีการที่รายงานจาก Jantrarotai และคณะ (1994)

= จำนวนกุ้งเมื่อสิ้นสุดการทดลอง (ตัว) x 100
จำนวนกุ้งที่เริ่มทำการทดลอง

3. การศึกษาองค์ประกอบเลือด

3.1 การนับปริมาณเม็ดเลือดทั้งหมด (total haemocyte count)

สารเคมี

1. trypan blue 0.15 เปอร์เซ็นต์ : ละลาย trypan blue 0.15 กรัม ในสารละลาย NaCl 2.5 เปอร์เซ็นต์ 100 มิลลิลิตร คนให้ละลายโดยวางบน magnetic stirrer นาน 6-12 ชั่วโมง และกรองผ่านกระดาษกรองเบอร์ 1 แบ่งใส่หลอดพลาสติกหลอดละ 0.45 มิลลิลิตร

วิธีการ

ใช้กระบอกฉีดยาขนาด 1 มิลลิลิตร และเข็มฉีดยาขนาด 24G ความยาว 12 มิลลิเมตร เจาะเลือดกุ้งบริเวณโคนขาเดินคู่ที่ 3 ปริมาณ 0.2 มิลลิลิตร ใช้ปิเปตอัตโนมัติดูดเลือด 50 ไมโครลิตร ผสมกับสารละลาย trypan blue 0.45 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันในหลอดพลาสติก นับเซลล์เม็ดเลือดทั้งหมดโดยใช้ฮีมาไซโตมิเตอร์ (haemacytometer) ภายใต้กล้องจุลทรรศน์แล้วคำนวณเป็นเซลล์ต่อมิลลิลิตรจากสูตร

ปริมาตรของฮีมาไซโตมิเตอร์ = กว้าง x ยาว x สูง
= lmm x 1 mm x 0.1 mm
= 0.1 ลูกบาศก์มิลลิเมตร (mm^3)

จำนวนเซลล์เม็ดเลือด/ลูกบาศก์มิลลิเมตร = เซลล์เม็ดเลือดที่นับได้

จำนวนเม็ดเลือด/มิลลิลิตร = เซลล์เม็ดเลือดที่นับได้ x 10^4

3.2 การวิเคราะห์ปริมาณโปรตีนในน้ำเลือด ดัดแปลงจาก Lowry และคณะ (1951)

สารเคมี

1. สารละลาย BSA มาตรฐาน

ละลาย bovine serum albumin 1.0 มิลลิกรัม ในน้ำกลั่นปราศจากอิออน (deionized water) 10 มิลลิลิตร และเจือจางสารละลายข้างต้นด้วยน้ำกลั่นปราศจากอิออน ในหลอดทดลองให้มีความเข้มข้น 10 – 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

2. 1 N Folin-Phenol reagent (dilute 1:10)

3. Working alkaline copper reagent

2 เปอร์เซ็นต์ Na_2CO3 ใน 0.1 N NaOH (เตรียมโดยต้มน้ำให้เดือดก่อนเติม) และต้องให้เย็นสนิทก่อน ส่วน NaOH 0.4 กรัมต่อ 100 มิลลิลิตร ร่วมกับ $NaCO_3$ 2 กรัม ต่อ 100 มิลลิลิตร คนให้เข้ากัน ปรับปริมาตรโดย Volumetric flask และเก็นในขวดพลาสติก

0.5 เปอร์เซ็นต์ $CuSO_4.5H_2O$ ใน 1 เปอร์เซ็นต์ Na หรือ K-tartrate โดยให้ละลายสารแต่ละตัวก่อน จากนั้นนำ $CuSO_4.H_2O$

วิธีการ

เติมสารละลายส่วนใส (hemocyte lysate: HLS) ที่ได้จากการทำให้เซลล์เม็ดเลือดแตก ปริมาตร 40 ไมโครลิตร ลงในหลอดทดลองขนาด 10 มิลลิลิตร ลงในหลอดทดลองขนาด 10 มิลลิลิตร เติม alkaline copper solution 1 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันตั้งให้เกิดปฏิกิริยานาน 10 นาที แล้วเติมสารละลาย folin reagent 0.1 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน ตั้งให้เกิดปฏิกิริยานาน 30 นาที นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่มีความยาวคลื่น 750 นาโนเมตร ตัวเทียบใช้น้ำที่ปราศจากไอออน (deionized) 0.4 มิลลิลิตร แทนตัวอย่าง แล้วคำนวณปริมาณโปรตีนโดยเทียบกับกราฟมาตรฐานโบวีนซีรัมอัลบูมิน (Bovine serum albumin; BSA) สำหรับซีรัมเตรียมโดยใช้กระบอกฉีดยาขนาด 1 มิลลิลิตร และเข็มฉีดยาขนาด 24G ความยาว 12 มิลลิเมตร ที่ไม่บรรจุสารป้องกันเลือดแข็งตัวเจาะเลือดกุ้งที่บริเวณโคนขาเดินคู่ที่ 3 ให้ได้ประมาณ 0.2-0.3 มิลลิลิตร ตั้งไว้ที่อุณหภูมิห้องนาน 2 ชั่วโมง บดเลือดที่แข็งตัวด้วยแท่งบดพลาสติก นำไปหมุนเหวี่ยงที่ 10,000 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส นาน 2 นาที ทำการแยกส่วนใสเพื่อนำไปวิเคราะห์โปรตีน จำนวน 5 ไมโครลิตร ลงในน้ำกลั่นที่ปราศจากไอออน ปริมาตร 995 ไมโครลิตร จากนั้นนำไปทำปฏิกิริยากับสารละลาย alkaline copper ปริมาตร 2 มิลลิลิตร ทิ้งไว้ 10 นาที แล้วเติม folin reagent 3 มิลลิลิตร ตั้งทิ้งไว้อีก 10 นาที

แล้วนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 640 นาโนเมตร และคำนวณปริมาณโปรตีนโดยเทียบกับกราฟมาตรฐาน BSA

การวิเคราะห์ปริมาณกลูโคสในเลือด ดัดแปลงจาก Hyvarinen และ Nikkila, (1962)

สารเคมี

1. 3 เปอร์เซ็นต์ Trichloroacetic acid

ชั่ง 3 กรัม Trichloroacetic acid ละลายในน้ำกลั่น และปรับปริมาตรจนครบ 100 มิลลิลิตร

2. Color reagent

ชั่ง 1.5 กรัม Thiourea ละลายใน 940 มิลลิลิตร Glacial acetic acid แล้วเติม 60 มิลลิลิตร O-toluidine เก็บไว้ในตู้เย็น ระวังอย่าให้ถูกแสง

3. Benzoic acid solution

ชั่ง 0.2 กรัม Benzoic ละลายในน้ำกลั่น ปรับปริมาตรจนครบ 1,000 มิลลิลิตร

4. Standard glucose ละลายใน 100 มิลลิลิตร Benzoic acid solution เก็บไว้ในตู้เย็น

วิธีการ

ใช้กระบอกฉีดยาขนาด 1 มิลลิลิตร และเข็มฉีดยาขนาด 24G ความยาว 12 มิลลิเมตร ที่ไม่บรรจุสารป้องกันเลือดแข็งตัว เจาะเลือดที่โคนขาเดินคู่ที่ 3 ให้ได้ปริมาตร 0.2 มิลลิลิตร ถ่ายในหลอดพลาสติกและทำการวิเคราะห์ทันที โดยเติมเลือด 0.1 มิลลิลิตร ในหลอดพลาสติกที่มีสารละลาย trichloro acid (TCA) 3 เปอร์เซ็นต์ 1 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันทันทีนำไปหมุนเหวี่ยงที่ 3,590xg อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส นาน 2 นาที แยกส่วนใส 0.5 มิลลิลิตร เติมในหลอดทดลองขนาด 10 มิลลิลิตร ที่มี color reagent 4.5 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันนำไปแช่ในน้ำเดือด 8 นาที ตั้งทิ้งไว้ให้เย็นและวัดค่าดูดกลืนแสงที่มีความยาวคลื่น 630 นาโนเมตร ตัวเทียบใช้สารละลาย trichloro acetic acid (TCA) 3 เปอร์เซ็นต์ 0.5 มิลลิลิตร แทนสารละลายตัวอย่างแล้วคำนวณปริมาณกลูโคสในเลือดโดยเทียบกับกราฟมาตรฐานกลูโคส

การวิเคราะห์กิจกรรมของเอนไซม์ฟีนอลออกซิเดส ดัดแปลงจาก Smith และ Soderhall (1983)

สารเคมี

1. cacodylate buffer (CAC buffer)

ละลาย $C_2H_6A_sNaO_2.3H_2O$ (Cacodylic acid sodium salt trihydrate) 1.07 กรัม ในน้ำกลั่นปราศจากอิออน (deionized water) 500 มิลลิลิตร เติม CaCl (calcium chloride) 0.37 กรัม ปั่นให้ละลายแล้วจึงเติม MgCl (magnesium chloride) 5.08 กรัม ปรับ pH ให้ได้ 7.0 ปรับปริมาตรให้ครบ 1,000 มิลลิลิตร ใส่ขวดเก็บไว้ที่ 4 องศาเซลเซียส

2. trypsin

ละลาย trypsin (1:250) 0.001 กรัม ใน CAC buffer 1 มิลลิลิตร

3. L-3,4-dihydroxyphenylalanine (L-DOPA)

ละลาย L-DOPA 0.003 กรัม ใน CAC buffer 1 มิลลิลิตร

วิธีการ

การวิเคราะห์กิจกรรมของเอนไซม์ฟีนอลออกซิเดส (phenoloxidase activity) ดัดแปลงจาก Smith และ Soderhall (1983) ใช้กระบอกฉีดยาขนาด 1 มิลลิลิตร และเข็มฉีดยาขนาด 24G ความยาว 12 มิลลิเมตร เจาะเลือดกุ้งบริเวณโคนขาเดินคู่ที่ 3 ปริมาณ 0.5 มิลลิลิตร โดยดูดเลือด (hemolymph) มา 100 ไมโครลิตร แล้วเติมสารละลาย cacodylate buffer (CAC buffer) 100 ไมโครลิตร (สัดส่วน 1:1) ผสมให้เข้ากันดีแล้วเก็บรักษาไว้ในไนโรเจนเหลวเพื่อใช้งานต่อไป

นำเม็ดเลือดที่ได้มาทำให้เซลล์แตกโดยใช้เครื่องอัลตร้าโซนิกส์ฮอโมจิไนเซอร์ ที่แอมพลิจูด (amplitude) ระดับ 30 เป็นเวลา 20 นาที และนำไปหมุนเหวี่ยงที่ความเร็ว 6,500 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส นาน 2 นาที นำส่วนใส (heamocyte lysate; HLS) มาวิเคราะห์ทันที โดยใช้ปิเปตอัตโนมัติดูดสารละลายส่วนใส HSL มา 25 ไมโครลิตร ใส่ลงในเพลต (96-well plate) และเติมสารละลาย trypsin 25 ไมโครลิตร จากนั้นเติมสานละลาย L-3,4-dihydroxyphenylalanine (L-DOPA) 50 ไมโครลิตร และเติมสารละลาย CAC buffer 200 ไมโครลิตร ตามลำดับ และนำเพลตที่ใส่ตัวอย่างเข้าเครื่อง Microplate reader โดนวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 490 นาโนเมตร อ่านค่าทุก 2 นาที เป็นเวลา 20 นาที

ค่ากิจกรรมของเอนไซม์ฟีนอลออกซิเดส = ยูนิต/นาที (0.001)*โปรตีนใน HLS 0.2 มิลลิลิตร

= ยูนิต/นาที/มิลลิกรัมโปรตีน

*0.001 เป็นค่าที่กำหนดโดย Smith และ Soderhall (1983)

ยูนิต (unit) หมายถึง ความสามารถของเอนไซม์ฟีนอลออกซิเดสในการเปลี่ยน L-DOPA ไปเป็นโดปามีน (dopamine) โดยวัดจากค่าการดูดกลืนแสงที่เปลี่ยนแปลงภายในเวลา 2 นาที

4. สารเคมีวิธีการเตรียมตัวอย่างและวิธีการศึกษาพยาธิสภาพเนื้อเยื่อตามวิธีการของ Bancraft (1967) และ Humason (1979)

สารเคมี

1. น้ำยาดองเดวิดสัน (Davidson's fixative) Bell และ Lightner (1988)

95% ethyl alcohol	330	มิลลิลิตร
100% formalin (formaldehyde 37-39%)	220	มิลลิลิตร
Gracial acetic acid	115	มิลลิลิตร
Tap water	335	มิลลิลิตร

เก็บที่อุณหภูมิห้อง

2. สีย้อมฮีมาทอกซิลิน (haematoxylin) เตรียมโดยใช้

ฮีมาทอกซิลิน (haematoxylin crystal)	4	กรัม
โซเดียมไอโอเดท (sodium iodate)	0.8	กรัม
อลัม (potassium aluminium sulfate, alum)	100	กรัม
กรดซิตริก (citric acid)	4	กรัม
คลอรัลไฮเดรท (chloral hydrate)	200	กรัม
น้ำกลั่น	2,000	มิลลิลิตร

ละลายอลัมลงในน้ำกลันเติมฮีมาทอกซิลินผสมจนกระทั่งละลายหมดจึกเติมดียวกันโซเดียมไดโอเดทผสมให้เข้ากันจากนั้นเติมกรดซิตริกและคลอรัลไฮเดรทผสมจนกระทั่งเป็นเนื้อเดียวกันทิ้งไว้ 1 สัปดาห์ก่อนนำมาใช้งาน

3. สีย้อมอีโอซิน (eosin) เตรียมโดยใช้

อีโอซิน (eosin Y.Cl 45380)	1	กรัม
เอทธิลแอลกอฮอล์ 70 เปอร์เซ็นต์	1,000	มิลลิลิตร
กรดอะซิติกเข้มข้น	5	มิลลิลิตร

ผสมเข้าด้วยกัน

การเตรียมตัวอย่าง

ฉีดน้ำยาดองเดวิดสันบริเวณหัวใจ ตับ ส่วนหัว กล้ามเนื้อลำตัวให้ทั่ว แล้วตัดส่วนหัวกุ้งออกเป็นสองซีกนำกล้ามเนื้อลำตัวตัดตามขวางดองในขวดที่บรรจุน้ำยาดองเดวิดสันโดยให้น้ำยาท่วมตัวอย่างเป็นเวลา 72 ชั่วโมง เพื่อให้น้ำยาดองซึมเข้าสู่เนื้อเยื่อให้ทั่วถึง ตัวอย่างที่นำมาศึกษาการเปลี่ยนแปลงทางเนื้อเยื่อคือ เนื้อเยื่อตับอ่อน (hepatopancreatic tissue) อวัยวะสร้างเม็ดเลือด (hematopoietic tissue) ต่อมน้ำเหลือง (lymphoid cell) เหงือก (gill) และกล้ามเนื้อ (muscle) หลังจาก 72 ชั่วโมง เปลี่ยนเป็นแอลกอฮอล์ 70 เปอร์เซ็นต์ หลังจากนั้นนำไปผ่านขั้นตอนการเตรียมเนื้อเยื่อตามวิธีการของ Humason (1979)

ขั้นตอนการ dehydrate และ embedding

1. ตบแต่งตัวอย่าง (trim) ที่ผ่านการดองแล้วให้มีขนาดพอเหมาะเพื่อสะดวกต่อการ embed และนำไปตัด section

2. นำตัวอย่างไปผ่านขั้น dehydration ด้วยเครื่องเตรียมเนื้อเยื่ออัตโนมัติ (automatic tissue processor) ซึ่งมีขั้นตอนดังนี้

ขั้นตอนที่	สารละลาย	เวลา (ชั่วโมง)
1	แอลกอฮอล์ 50 เปอร์เซ็นต์	1
2	แอลกอฮอล์ 70 เปอร์เซ็นต์	1
3	แอลกอฮอล์ 70 เปอร์เซ็นต์	1
4	แอลกอฮอล์ 95 เปอร์เซ็นต์	1
5	แอลกอฮอล์ 95 เปอร์เซ็นต์	1
6	แอบโซลูท แอลกอฮอล์ (absolute alcohol)	1
7	ไอโซโพลพิล แอลกอฮอล์	1
8	ไอโซโพลพิล แอลกอฮอล์	1
9	ไซลีน (xylene)	1
10	ไซลีน	1
11	พาราพลาสท์ (paraplast)	1
12	พาราพลาสท์	1

3. นำตัวอย่างที่ผ่านขั้นตอนการดึงน้ำออกไป embed ด้วยพาราพลาสท์ จากนั้นนำ block ไปแช่ในตู้เย็นเพื่อง่ายต่อการนำไปตัด section ต่อไป

4. ตบแต่งตัวอย่างที่อยู่ใน block ให้มีขนาดพอดีกับขนาดสไลด์ และ cover glass ปิดได้สนิท จากนั้นนำไปตัดด้วยเครื่องตัดเนื้อเยื่อไมโครโตม (microtome) ให้มีความหนาประมาณ 3-5 ไมครอน นำไปลอยในน้ำอุ่นที่อุณหภูมิ 45-50 องศาเซลเซียส

5. ใช้แผ่นสไลด์ช้อนตัวอย่าง แล้วนำไปอบที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 คืน

6. นำสไลด์ที่อบแล้วไปผ่านขบวนการย้อมสีฮีมาทอกซิลินและอีโอซิน โดยมีขั้นตอนดังนี้

ขั้นตอนที่	สารละลาย	เวลา (นาที)
1	ไซลีน	2
2	ไซลีน	2
3	ไซลีน	2
4	ไอโซโพรพิล แอลกอฮอล์	1
5	ไอโซโพรพิล แอลกอฮอล์	1
6	แอลกอฮอล์ 95 เปอร์เซ็นต์	1
7	แอลกอฮอล์ 70 เปอร์เซ็นต์	1
8	แอลกอฮอล์ 50 เปอร์เซ็นต์	1
9	น้ำกลั่น	1
10	ฮีมาทอกซิลิน	20
11	น้ำประปา	1
12	น้ำกลั่น	1
13	แอลกอฮอล์ 50 เปอร์เซ็นต์	2
14	อีโอซิน	4
15	แอลกอฮอล์ 70 เปอร์เซ็นต์	2
16	แอลกอฮอล์ 95 เปอร์เซ็นต์	2
17	แอบโซลูท แอลกอฮอล์	2
18	ไอโซโพรพิล แอลกอฮอล์	2
19	ไอโซโพรพิล แอลกอฮอล์	2
20	ไซลีน	2
21	ไซลีน	2

22 ไซลีน 2

7. mount slide ด้วยน้ำยาเปอร์เมาท์ (permount) แล้วนำตัวอย่างไปศึกษาทางพยาธิสภาพด้วยกล้องจุลทรรศน์

5. การวิเคราะห์คุณภาพน้ำตามวิธีการของ Boyd และ Tucker (1992)

การวิเคราะห์ค่าความเป็นด่างของน้ำ

สารเคมี

1. ฟีนอล์ทาลีน อินดิเคเตอร์ (phenolphalein indicator) : เตรียมสารละลายฟีนอล์ฟทาลีน (phenolphalein) 0.5 กรัม ในเอทิลแอลกอฮอล์ 95% จนได้ปริมาตร 100 มิลลิลิตร

2. เมทิลออเรนจ์ อินดิเคเตอร์ : เตรียมโดยสารละลายเมทิลออเรนจ์ 0.5 กรัม ในน้ำกลั่นที่ปราศจากอิออน ปรับปริมาตรให้ได้ 100 มิลลิลิตร

3. เมทิลเรด อินดิเคเตอร์ : เตรียมโดยสารละลายเมทิลเรด 0.5 กรัม ในน้ำกลั่นที่ปราศจากอิออน ปรับปริมาตรให้ได้ 100 มิลลิลิตร

4. สารละลายมาตรฐานกรดซัลฟูริก 0.2 นอร์มอล : เตรียมโดยค่อยๆ เทกรดซัลฟูริกเข้มข้น 6 มิลลิลิตร ลงในน้ำกลั่น) ที่ต้มเดือดใหม่ๆ แล้วปิดฝาทิ้งไว้ให้เย็น ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นจนครบ 1 ลิตร

5. สารละลายมาตรฐานโซเดียมคาร์บอเนต 0.2 นอร์มอล : เตรียมโดยชั่งโซเดียมคาร์บอเนตซึ่งอบแห้งจำนวน 10.6 กรัม โดยอบที่อุณหภูมิ 130 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 90 นาที แล้วทำให้เย็นในโถอบแห้ง จากนั้นละลายในน้ำกลั่นที่ต้มเดือดใหม่ๆ วางไว้ให้เย็น ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นจนครบ 1 ลิตร

การตรวจหาความเข้มข้นของสารละลาย

1. สารละลายโซเดียมคาร์บอเนต 0.2 นอร์มอล ปริมาตร 25 มิลลิลิตร ใส่ลงในขวดรูปชมพู่ขนาด 250 มิลลิลิตร

2. หยดเมทิลเรด อินดิเคเตอร์ 5 หยด เขย่าให้เข้ากันจะได้สารละลายสีเหลือง

3. ไตเตรทด้วยสารละลายมาตรฐานกรดซัลฟูริกจนสารละลายเปลี่ยนเป็นสีชมพู

4. นำส่วนผสมทั้งหมดไปต้มจนเดือดเป็นเวลาประมาณ 3-5 นาที เพื่อไล่ก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ให้หมดสารละลายจะเปลี่ยนเป็นสีเหลืองอีกครั้ง

5. ไตเตรทด้วยสารละลายมาตรฐานกรดซัลฟูริกต่อไปจนกระทั่งสารละลายเปลี่ยนเป็นสีชมพูอีกครั้งหนึ่ง

6. บันทึกปริมาตรของสาละลายมาตรฐานกรดซัลฟูริกที่ใช้ไปทั้งหมด

การคำนวณความเข้มข้นของสารละลายมาตรฐานกรดซัลฟูริก (นอร์มอล)

$$\text{ความเข้มข้น (นอร์มอล)} = \frac{0.2 \times 25}{\text{ปริมาตร (มิลลิลิตร) ของสารละลายมาตรฐานกรดซัลฟูริคที่ใช้}}$$

หลังจากนั้นทำการปรับความเข้มข้นของสารละลายมาตรฐานกรดซัลฟูริกให้มีความเข้มข้นเท่ากับ 0.02 นอร์มอล โดยใช้สูตร

$$N_1V_1 = N_2V_2$$

N_1 = ความเข้มข้นของสารละลายทีจะปรับค่า

N_2 = ความเข้มข้นของสารละลายที่ต้องการ

V_1 = ปริมาตรของสารละลายที่จะปรับค่า

V_2 = ปริมาตรของสารละลายที่ต้องการ

วิธีการ

1. นำตัวอย่างน้ำ 100 มิลลิลิตร ใส่ลงในขวดรูปชมพู่ขนาด 250 มิลลิลิตร

2. หยดฟีนอล์ฟทาลีนอินดิเคเตอร์ 10 หยด เขย่าให้เข้ากัน

ถ้าสาละลายใส ให้ทำข้อ 3 ต่อไป

ถ้าสารละลายสีชมพูต้องไตเตรทด้วยสารละลายมาตรฐานกรดซัลฟูริกจนกระทั่งสารละลายสีชมพูนั้นหายไปบันทึกปริมาตรที่ใช้ไป (นำไปรวมกับปริมาตรของสารละลายมาตรฐานกรดซัลฟูริกที่ใช้ไปในข้อ 4) ทำต่อไปในข้อ 3.

3. หยดเมทิลออเรนจ์ 2-3 หยด เขย่าให้เข้ากัน จะได้สารละลายสีเหลือง

4. ไตเตรทด้วยสารละลายมาตรฐานกรดซัลฟูริก 0.02 นอร์มอล จนกระทั่งสารละลายเปลี่ยนเป็นสีส้ม จนปริมาตรของสารละลายกรดซัลฟูริกที่ใช้ไปทั้งหมด

การคำนวณค่าความเป็นด่างของน้ำ (มิลลิกรัมต่อลิตร)

$$\text{ค่าความเป็นด่าง} = \frac{\text{ปริมาตรของกรดซัลฟูริกที่ใช้ x นอร์มอลลิตี้ของกรดซัลฟูริก x 50 x 1,000}}{\text{ปริมาตรน้ำตัวอย่าง}}$$

ภาคผนวก ข

ตารางภาคผนวกที่ ข 1 คุณภาพน้ำตลอดการทดลองในการเลี้ยงกุ้งขาวในตู้ทดลองเป็นระยะเวลา 8 สัปดาห์ (4/05/52-22/06/52)[1]

วันที่	พีเอช	ความเค็ม (พีพีที)	อัลคาไลท์นิตี้ (มก./ล.)	แอมโมเนียรวม (มก./ล.)	ไนไตรท์ (มก./ล.)	ชนิดและปริมาณแพลงก์ตอน (เซลล์/มล.)[2]	แบคทีเรียในน้ำ (โคโลนี/มล.)			
							เรืองแสง	เขียว	เหลือง	รวม[3]
20/04/52	8.91	6	72	0.13	0.01	*Microcystis* sp. +	0	320	1,020	1,740
27/04/52	8.58	5	60	0.05	0.01	*Microcystis* sp. +, *Oscillatoria* sp. +	0	0	0	960
4/05/52	8.41	5	48	0.1042	0.0037	*Chaetoceros* sp. ++, *Microcystis* sp. +	0	0	10	230
25/05/52	8.78	5	58	0.04	0	*Microcystis* sp. +	0	0	0	60
1/06/52	8.22	5	87	0	0.01	*Microcystis* sp. +, *Gyrodinium* sp. +	0	0	200	1,860
8/06/52	8.12	3	62	0.06	0	*Microcystis* sp. +	0	0	0	20
15/06/52	7.91	4	68	1.17	0.07	*Microcystis* sp. +	0	0	0	1,150
23/06/52	8.76	5	74	0.55	0.01	*Microcystis* sp. +	0	0	0	180

หมายเหตุ : [1]ส่งตัวอย่างน้ำวิเคราะห์ที่ศูนย์วิจัยและพัฒนาประมงชายฝั่งสตูล; สัปดาห์ละ 1 ครั้ง (ทุกวันจันทร์)

[2]ปริมาณแพลงก์ตอน = + : พบน้อย; ++ : พบปานกลาง, +++ : พบมาก

[3]แบคทีเรียรวม

ภาคผนวก ค

การวิเคราะห์ทางสถิติของผลการทดลอง

ตารางภาคผนวกที่ ค 1 ผลการวิเคราะห์ความแปรปรวนทางสถิติของการเจริญเติบโตของกุ้งขาว

1.1 ความแปรปรวนของน้ำหนักสุดท้ายของกุ้งขาวหลังจากได้รับอาหารปนเปื้อนสารพิษ Tetrodotoxin ที่ระดับต่างๆ เป็นระยะเวลา 8 สัปดาห์

Source	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	16.964	5	3.393	3.881	.015
Within Groups	15.734	18	.874		
Total	32.697	23			

Treatment	N	Subset for alpha = .05		
		1	2	3
5	4	8.1575		
6	4	8.5900	8.5900	
3	4	9.2225	9.2225	9.2225
4	4		9.8500	9.8500
1	4			10.1700
2	4			10.5025
Sig.		.144	.087	.091

1.2 ความแปรปรวนของน้ำหนักที่เพิ่มขึ้นของกุ้งขาวที่ได้รับอาหารปนเปื้อนสารพิษ Tetrodotoxin ที่ระดับต่างๆ เป็นระยะเวลา 8 สัปดาห์

Source	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	3919.429	5	783.886	1.008	.441
Within Groups	13994.760	18	777.487		
Total	17914.189	23			

Treatment	N	Subset for alpha = .05
		1
6	4	83.0300
5	4	83.8750
4	4	95.4175
3	4	98.0700
2	4	113.2025
1	4	115.8550
Sig.		.155

1.3 ความแปรปรวนของอัตราการเปลี่ยนอาหารเป็นเนื้อของกุ้งขาวที่ได้รับอาหารปนเปื้อนสารพิษ Tetrodotoxin ที่ระดับต่างๆ เป็นระยะเวลา 8 สัปดาห์

Source	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	1.022	5	.204	7.868	.003
Within Groups	.260	10	.026		
Total	1.282	15			

Treatment	N	Subset for alpha = .05	
		1	2
1	4	1.5250	
2	4	1.5700	
4	4		1.9150
3	4		1.9933
5	4		2.0933
6	4		2.2033
Sig.		.758	.088

1.4 ความแปรปรวนของอัตราการเจริญเติบโตจำเพาะของกุ้งขาวที่ได้รับอาหารปนเปื้อนสารพิษ Tetrodotoxin ที่ระดับต่างๆ เป็นระยะเวลา 8 สัปดาห์

Source	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	.003	5	.001	1.429	.262
Within Groups	.006	18	.000		
Total	.009	23			

Treatment	N	Subset for alpha = .05
		1
5	4	.1150
6	4	.1225
4	4	.1250
3	4	.1325
1	4	.1425
2	4	.1425
Sig.		.080

1.5 ความแปรปรวนของอัตราการกินอาหารต่อวันของกุ้งขาวที่ได้รับอาหารปนเปื้อนสารพิษ Tetrodotoxin ที่ระดับต่างๆ เป็นระยะเวลา 8 สัปดาห์

Source	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	21.465	5	4.293	.777	.579
Within Groups	99.506	18	5.528		
Total	120.970	23			

Treatment	N	Subset for alpha = .05
		1
3	4	57.6225
6	4	57.6325
4	4	57.9075
5	4	58.3650
2	4	58.3950
1	4	60.3825
Sig.		.156

1.6 ความแปรปรวนของอัตราการรอดตายของกุ้งขาวที่ได้รับอาหารปนเปื้อนสารพิษ Tetrodotoxin ที่ระดับต่างๆ เป็นระยะเวลา 8 สัปดาห์

Source	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	125.000	5	25.000	.110	.989
Within Groups	4075.000	18	226.389		
Total	4200.000	23			

Treatment	N	Subset for alpha = .05
		1
4	4	68.7500
6	4	70.0000
2	4	73.7500
3	4	73.7500
5	4	73.7500
1	4	75.0000
Sig.		.607

1.7 ความแปรปรวนขององค์ประกอบทางโภชนาการ (ความชื้น) ของกุ้งขาวหลังการทดลองของกุ้งขาวที่ได้รับอาหารปนเปื้อนสารพิษ Tetrodotoxin ที่ระดับต่างๆ เป็นระยะเวลา 8 สัปดาห์

Source	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	1.554	5	.311	.505	.767
Within Groups	7.386	12	.615		
Total	8.940	17			

Treatmant	N	Subset for alpha = .05
		1
2	3	76.3133
3	3	76.8987
5	3	76.9437
1	3	76.9753
6	3	77.1027
4	3	77.2557
Sig.		.207

1.8 ความแปรปรวนขององค์ประกอบทางโภชนาการ (โปรตีน) ของกุ้งขาวหลังการทดลอง ของกุ้งขาวที่ได้รับอาหารปนเปื้อนสารพิษ Tetrodotoxin ที่ระดับต่างๆ เป็นระยะเวลา 8 สัปดาห์

Source	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	37.112	5	7.422	9.661	.001
Within Groups	9.219	12	.768		
Total	46.331	17			

Treatmant	N	Subset for alpha = .05			
		1	2	3	4
6	3	61.2467			
5	3	62.6800	62.6800		
3	3		63.9767	63.9767	
4	3		63.9900	63.9900	
2	3			64.4367	64.4367
1	3				65.8467
Sig.		.068	.106	.553	.072

1.9 ความแปรปรวนขององค์ประกอบทางโภชนาการ (ไขมัน) ของกุ้งขาวหลังการทดลองของกุ้งขาวที่ได้รับอาหารปนเปื้อนสารพิษ Tetrodotoxin ที่ระดับต่างๆ เป็นระยะเวลา 8 สัปดาห์

Source	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	10.634	5	2.127	.955	.482
Within Groups	26.718	12	2.227		
Total	37.352	17			

Treatment	N	Subset for alpha = .05
		1
5	3	6.5900
6	3	7.4967
4	3	8.2533
2	3	8.3467
3	3	8.6100
1	3	8.8667
Sig.		.117

1.10 ความแปรปรวนขององค์ประกอบทางโภชนาการ (เถ้า) ของกุ้งขาวหลังการทดลอง ของกุ้งขาวที่ได้รับอาหารปนเปื้อนสารพิษ Tetrodotoxin ที่ระดับต่างๆ เป็นระยะเวลา 8 สัปดาห์

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	2.952	5	.590	5.511	.007
Within Groups	1.285	12	.107		
Total	4.237	17			

Treatmant	N	Subset for alpha = .05	
		1	2
3	3	8.2573	
4	3	8.3283	
2	3	8.6610	8.6610
1	3		9.0697
6	3		9.1873
5	3		9.2743
Sig.		.176	.054

ตารางภาคผนวกที่ ค 2 ผลการวิเคราะห์ความแปรปรวนทางสถิติของระบบภูมิคุ้มกันในกุ้งขาว

2.1 ความแปรปรวนของปริมาณเม็ดเลือดรวมทั้งหมดของกุ้งขาวหลังจากได้รับอาหารปนเปื้อนสารพิษ Tetrodotoxin ที่ระดับต่างๆ เป็นระยะเวลา 8 สัปดาห์

Source	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	179.265	5	35.853	1.146	.373
Within Groups	562.919	18	31.273		
Total	742.184	23			

Treatment	N	Subset for alpha = .05
		1
6	4	15.76050
5	4	18.31750
4	4	19.37750
3	4	19.87750
2	4	23.06000
1	4	23.77500
Sig.		.087

2.2 ความแปรปรวนของปริมาณโปรตีนในน้ำเลือดของกุ้งขาวหลังจากได้รับอาหารปนเปื้อนสารพิษ Tetrodotoxin ที่ระดับต่างๆ เป็นระยะเวลา 8 สัปดาห์

Source	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	1702.348	5	340.470	3.359	.026
Within Groups	1824.555	18	101.364		
Total	3526.902	23			

Treatment	N	Subset for alpha = .05		
		1	2	3
6	4	93.8375		
5	4	98.5000	98.5000	
2	4	106.7250	106.7250	106.7250
4	4		113.3400	113.3400
1	4		113.8500	113.8500
3	4			116.6450
Sig.		.103	.062	.217

2.3 ความแปรปรวนของปริมาณกลูโคสในเลือดของกุ้งขาวหลังจากได้รับอาหารปนเปื้อนสารพิษ Tetrodotoxin ที่ระดับต่างๆ เป็นระยะเวลา 8 สัปดาห์

Source	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	63.990	5	12.798	.791	.570
Within Groups	291.109	18	16.173		
Total	355.099	23			

Treatment	N	Subset for alpha = .05
		1
5	4	13.1475
6	4	13.3490
4	4	16.1129
3	4	16.4693
2	4	16.7861
1	4	17.1935
Sig.		.221

2.4 ความแปรปรวนของกิจกรรมของเอนไซม์ฟีนอลออกซิเดสในเลือดของกุ้งขาวหลังจากได้รับอาหารปนเปื้อนสารพิษ Tetrodotoxin ที่ระดับต่างๆ เป็นระยะเวลา 8 สัปดาห์

Source	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	2.451	5	.490	4.256	.007
Within Groups	2.763	24	.115		
Total	5.214	29			

Treatment	N	Subset for alpha = .05	
		1	2
6	5	3.8660	
5	5	3.9400	
4	5	4.0700	
3	5	4.2740	4.2740
1	5		4.5680
2	5		4.5940
Sig.		.093	.171

ประวัติผู้เขียน

ชื่อ สกุล นางสาวมัณฑนา ใจเย็น

รหัสประจำตัวนักศึกษา 5010620023

วุฒิการศึกษา

วุฒิ	ชื่อสถาบัน	ปีที่สำเร็จการศึกษา
วิทยาศาสตรบัณฑิต (เพาะเลี้ยงสัตว์น้ำ)	มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลศรีวิชัย วิทยาเขตตรัง	2549