ผลของ Tetrodotoxin (TTX) ต่อการเจริญเติบโตและสุขภาพของกุ้งขาว (*Litopenaeus vannamei*)

Effects of Tetrodotoxin (TTX) on Growth Performance and Health Conditions in Pacific White Shrimp (*Litopenaeus vannamei*)

นุชรี สงสกุล

Nutcharee Songsakul

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญา
วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวาริชศาสตร์
มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์

A thesis Submitted in Partial Fulfillment of the Requirement for the Degree of Master of Science in Aquatic Science
Prince of Songkla University
2553

ลิขสิทธิ์ของมหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์

ชื่อวิทยานิพนธ์ ผลของ Tetrodotoxin ต่อการเจริญเติบโตและสุขภาพของกุ้งขาว (*Litopenaeus vannamei*)

ผู้เขียน นางสาวนุชรี สงสกุล

สาขาวิชา วาริชศาสตร์

อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก

…….....

(รองศาสตราจารย์ ดร.วุฒิพร พรหมขุนทอง)

อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม

……..……..

(ดร.อมรรัตน์ เสริมวัฒนากุล)

คณะกรรมการสอบ

…….....ประธานกรรมการ

(รองศาสตราจารย์ ดร.ประภาพร อุทารพันธุ์)

…….กรรมการ

(รองศาสตราจารย์ ดร.วุฒิพร พรหมขุนทอง)

…….กรรมการ

(ดร.อมรรัตน์ เสริมวัฒนากุล)

…….....กรรมการ

(ดร.สุภฎา คีรีรัฐนิคม)

บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ อนุมัติให้นับวิทยานิพนธ์ฉบับนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษา ตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาวาริชศาสตร์

…….

(รองศาสตราจารย์ ดร.อมรรัตน์ พงศ์ดารา)

คณบดีบัณฑิตวิทยาลัย

ชื่อวิทยานิพนธ์ ผลของ Tetrodotoxin (TTX) ต่อการเจริญเติบโตและสุขภาพของกุ้งขาว (*Litopeneaus vannamei*)

ผู้เขียน นางสาวนุชรี สงสกุล

สาขาวิชา วาริชศาสตร์

ปีการศึกษา 2553

บทคัดย่อ

การทดลองนี้มีจุดประสงค์เพื่อศึกษาผลของสารพิษ Tetrodotoxin (TTX) ต่อการเจริญเติบโต สุขภาพ และการฟื้นตัวหลังการได้รับสารพิษของกุ้งขาว โดยเลี้ยงกุ้งขาวด้วยอาหารที่ผสมสารพิษ TTX ที่ระดับ 0, 2.5 และ 5 ppm เป็นระยะเวลา 6 สัปดาห์ เมื่อสิ้นสุดสัปดาห์ที่ 6 ทำการวิเคราะห์การเจริญเติบโต องค์ประกอบเลือด acetylcholinesterase (AChE) และกิจกรรมของเอนไซม์ lactate dehydrogenase (LDH) และการเปลี่ยนแปลงของเนื้อเยื่อตับและตับอ่อน จากนั้นนำกุ้งที่เหลือจากแต่ละชุดการทดลองๆ ละ 20 ตัว เลี้ยงต่อด้วยอาหารชุดควบคุมเป็นเวลา 2 สัปดาห์ เมื่อสิ้นสุดระยะเวลาการเลี้ยงวิเคราะห์องค์ประกอบเลือด กิจกรรมของเอนไซม์ AChE และกิจกรรมของเอนไซม์ LDH และการเปลี่ยนแปลงของเนื้อเยื่อ ผลการทดลองพบว่า เมื่อสิ้นสุดการเลี้ยงที่ระยะเวลา 6 สัปดาห์ การเจริญเติบโตของกุ้งลดลงตามปริมาณความเข้มข้นของสารพิษที่ได้รับ ซึ่งกุ้งในชุดการทดลองที่ได้รับอาหารผสมสารพิษ TTX 5 ppm มีการเจริญเติบโตต่ำสุด ส่วนน้ำตาลในเลือด โปรตีนในซีรัม และกิจกรรมของเอนไซม์ AChE ลดลงตามระดับของสารพิษที่เพิ่มขึ้น ในขณะที่ปริมาณเม็ดเลือดรวมและกิจกรรมของเอนไซม์ LDH เพิ่มขึ้นตามระดับสารพิษที่เพิ่มขึ้น ส่วนการเปลี่ยนแปลงของเนื้อเยื่อพบว่ากุ้งที่ได้รับสารพิษมีเซลล์ที่ใช้ในการสะสมอาหารมีจำนวนลดลง เกิดการตายของเซลล์ตับและตับอ่อน มีเม็ดเลือดแทรกอยู่ระหว่างท่อตับ และระยะห่างระหว่างท่อตับเพิ่มขึ้น ซึ่งการเปลี่ยนแปลงที่เกิดขึ้นสอดคล้องกับการเจริญเติบโตและองค์ประกอบเลือด ผลการทดลองของกุ้งที่ได้รับการพักฟื้นโดยการให้อาหารชุดควบคุมเป็นระยะเวลา 2 สัปดาห์ พบว่าองค์ประกอบเลือดและกิจกรรมของเอนไซม์ต่างๆ ไม่มีความแตกต่างทางสถิติกับกุ้งในชุดควบคุม ($p<0.05$) ในส่วนของเนื้อเยื่อตับและตับอ่อน พบว่ามีเซลล์ตับและตับอ่อนบางส่วนลีบฝ่อ แต่ไม่พบเซลล์เม็ดเลือดแทรกระหว่างท่อตับและระยะห่างที่เพิ่มขึ้นของท่อตับ จากการทดลองครั้งนี้ชี้ให้เห็นว่า อาหารที่มีการผสมสารพิษ TTX ที่ระดับ 2.5 และ 5 ppm มีผลกระทบต่อการเจริญเติบโตและสุขภาพของกุ้ง และร่างกายของกุ้งขาวสามารถปรับตัวเข้าสู่สภาวะปกติได้เมื่อได้รับอาหารที่มีคุณภาพและไม่มีการปนเปื้อนของสารพิษที่ไปรบกวนการทำงานของอวัยวะหรือระบบต่างๆ ของร่างกาย

Thesis Title	Effect of Tetrodotoxin on growth performance and health conditions in Pacific white shrimp (*Litopenaeus vannamei*)
Author	Miss. Nutcharee Songsakul
Major Program	Aquatic Science
Academic	2010

Abstract

The purpose of this experiment was to investigate the effect of Tetrodotoxin on growth performance, health conditions and recovering of Pacific white shrimp (*Litopenaeus vannamei*) after receiving diet without TTX. Shrimp were fed with diets containing TTX at 0, 0.25 and 5 ppm for 6 weeks. At the end of sixth week, growth performance, blood parameters acetylcholinesterase activity (AChE) and lactate dehydrogenase activity (LDH) including histology damage of hepatopancreas were investigated. Consequently, the treated shrimp were fed with control diet for 2 week. At the end of experiment, blood parameter and histology damage were studied. The results showed that, at the end of the sixth week, growth performance decreased with an increasing TTX levels and it indicated that 5 ppm TTX fed shrimp gave the lowest growth. Besides, Blood glucose, serum protein, acetylcholinesterase activity decreased with increasing TTX levels. Histological damage was also observed in the hepatopancreas such as arthophy and necrotic cell and dilation of hepatopancreatic tubule. The degree of histological damage increased response directly to toxin levels and related with growth and blood parameters. Recovering of TTX fed shrimp after feeding with control diet for 2 weeks showed that blood parameter and enzyme activity were not significantly compared to control ($p<0.05$). Increasing of nutrient storage was found in the cell as well as tissue damage such as arthophy and necrotic cell and dilation of hepatopancreatic tubule was also observed. The results from this study indicated that supplementation of diet with TTX at 5 ppm had severe affected on growth performance and health conditions of Pacific white shrimp. However, recovering of shrimp can be found after feeding with non-TTX contaminated diet

กิตติกรรมประกาศ

ผู้เขียนขอขอบพระคุณ รองศาสตราจารย์ ดร.วุฒิพร พรหมขุนทอง ประธานกรรมการที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ และดร. อมรรัตน์ เสริมวัฒนากุล กรรมการที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ที่กรุณาให้คำปรึกษา ช่วยเหลือ และสนับสนุนในการค้นคว้าวิจัย รวมทั้งกรุณาแก้ไขข้อบกพร่องต่างๆ จนกระทั่งวิทยานิพนธ์ฉบับนี้สำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยดี

ขอขอบพระคุณ ดร.มะลิ บุณยรัตผลิน ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ชุติมา ตันติกิติ และ ดร.นเรศ ซ่วนยุก ผู้ซึ่งให้คำแนะนำแนวทางและแก้ไขข้อบกพร่องแก่ข้าพเจ้าตลอดมา

ขอขอบพระคุณ คุณไพบูลย์ บุญลิปตานนท์ และคุณพัชรี ซุ่นสั้น ศูนย์วิจัยและพัฒนาประมงชายฝั่งกระบี่ ที่ให้ความช่วยเหลือในระหว่างการทำการทดลอง และขอขอบพระคุณ กรมประมงที่สนับสนุนทุนวิจัยในครั้งนี้

ขอขอบพระคุณ รองศาสตราจารย์ ดร.กิจการ ศุภมาตย์ ในการให้คำแนะนำช่วยเหลือ และวางแผนการทดลอง และชี้แนะแนวทางในการศึกษาค้นคว้าข้อมูล และเป็นแรงผลักดันให้งานวิจัยนี้ประสบความสำเร็จ

ขอขอบพระคุณบัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัย สงขลานครินทร์ และคณะทรัพยากรธรรมชาติ ที่ได้อุดหนุนทุนวิจัย และขอบขอบคุณพี่ๆ เพื่อนๆ นักศึกษา ปริญญาเอก ปริญญาโททุกท่าน ที่ให้ความช่วยเหลือ และคำแนะนำในระหว่างการวิเคราะห์ผลการทดลอง โดยเฉพาะ คุณสุณีย์ หวันเหล็ม คุณจิรวัฒน์ ทัดแก้ว คุณบุญกอบ วิริยพงศ์สุธี ที่ให้คำแนะนำตลอดการทดลอง คุณสุพัตรา อรุณรัตน์ และคุณสุนันท์ ช่วยป้อง ที่ช่วยอำนวยความสะดวกในการทำงานทดลองตลอดมา

ขอขอบพระคุณคณาจารย์ ภาควิชาวาริศาสตร์ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ ทุกท่านที่ให้ความกรุณาสั่งสอนให้ความรู้แก่ข้าพเจ้า ตลอดระยะเวลาที่ข้าพเจ้าได้ศึกษา ณ ที่นี้ และขอขอบคุณเจ้าหน้าที่ห้องปฏิบัติการ และเจ้าหน้าที่สำนักงานภาควิชาวาริชศาสตร์ทุกท่านที่ให้ความกรุณาให้คำแนะนำที่เป็นประโยชน์และช่วยอำนวยความสะดวกในระหว่างการทดลอง

สุดท้ายขอขอบพระคุณครอบครัว โดยเฉพาะคุณพ่อ คุณแม่ พี่น้องของข้าพเจ้าที่คอยเป็นกำลังในการศึกษา ทำให้ข้าพเจ้ามุมานะพยายามจนประสบความสำเร็จในการศึกษาระดับวิทยาศาสตรมหาบัณฑิตในครั้งนี้

นุชรี สงสกุล

สารบัญ

	หน้า
สารบัญ	(6)
รายการตาราง	(9)
รายการภาพประกอบ	(11)
รายการตารางภาคผนวก	(12)
บทที่	
1 บทนำ	1
1. บทนำต้นเรื่อง	1
2. ตรวจเอกสาร	2
2.1 ชีววิทยาของของกุ้งขาว	2
2.2 การปนเปื้อนของสารพิษในอาหารสัตว์น้ำ	4
2.3 การเปลี่ยนแปลงของสารพิษในร่างกาย	7
2.4 ผลของสารพิษที่ปนเปื้อนในอาหารต่อสัตว์น้ำ	7
2.5 Tetrodotoxin (TTX) ในสัตว์น้ำ	8
2.6 สถานการณ์ปลาปักเป้าในประเทศไทย	16
2.7 ผลกระทบต่อผู้บริโภค	16
2.8 วิธีการตรวจหาสาร TTX ในสัตว์น้ำ	18
2.9 การดูแลรักษาผู้ป่วยได้รับสารTTX และ STX	18
2.10 แนวทางในการป้องกันและแก้ปัญหา	19
3. วัตถุประสงค์	20
2 วัสดุ อุปกรณ์ และวิธีการทดลอง	21
การทดลองที่ 1	21
1.1 การเตรียมสัตว์ทดลอง และสารเคมี	21
1.2 อุปกรณ์	21
1.3 วิธีการทดลอง	24
1.3.1 แผนการทดลอง	24
1.3.2 การเตรียมสัตว์ที่ใช้ในการทดลอง	25
1.3.3 การเตรียมน้ำสำหรับใช้ในการทดลอง	25
1.3.4 การเตรียมอาหารทดลอง	26

สารบัญ (ต่อ)

	หน้า
1.3.5 การเตรียมสารพิษ TTX	27
1.3.6 การเก็บรวบรวมข้อมูล	27
1.3.7 การวิเคราะห์ข้อมูล	29
การทดลองที่ 2	30
2.1 สารเคมี	30
2.2 อุปกรณ์	30
2.3 วิธีการทดลอง	30
2.3.1 แผนการทดลอง	30
2.3.2 การเตรียมอุปกรณ์การทดลอง	31
2.3.3 การเตรียมกุ้งทดลอง	31
2.3.4 ขั้นตอนในการเตรียมอาหารทดลอง	31
2.3.5 การเก็บรวบรวมข้อมูล	31
2.3.6 การวิเคราะห์ข้อมูล	33
3 ผลการทดลอง	34
การทดลองที่ 1	34
1.1 ระดับของสารพิษในอาหารทดลอง	34
1.2 พฤติกรรมและการผิดปกติของกุ้งขาว	34
1.3. ผลของสารพิษ TTX ต่อการเจริญเติบโต และ องค์ประกอบทางเคมีของตัวกุ้ง	35
1.4 ผลของสารพิษ TTX ต่อองค์ประกอบเลือดของกุ้งขาว	40
1.5 ผลของสารพิษ TTX ต่อเอ็นไซม์ acetylcholinesterase(AChE) และ lactic dehydrogenase (LDH)	44
1.6 การศึกษาเนื้อเยื่อของกุ้งขาวที่ได้รับสารพิษ TTX	45
1.7 การตกค้างของสารพิษในตัวกุ้ง	49
การทดลองที่ 2	50
2.1 ผลขององค์ประกอบเลือดเบื้องต้น	50
2.2 ระดับแร่ธาตุในน้ำเลือดของกุ้งขาวที่ฟื้นตัวจากการได้รับสารพิษ TTX	50

สารบัญ (ต่อ)

	หน้า
2.3 ค่ากิจกรรมของเอ็นไซม์ acetylcholinesterase (AChE) และ lactic dehydrogenase (LDH) ของกุ้งขาวที่ฟื้นตัวจากการได้รับสารพิษ TTX	52
2.4 การศึกษาทางด้านพยาธิสภาพของเนื้อเยื่อของกุ้งขาวที่ฟื้นตัวจากการได้รับสารพิษ TTX	52
4 วิจารณ์ผลการทดลอง	56
5 สรุปผลการทดลอง	66
ข้อเสนอแนะ	66
เอกสารอ้างอิง	68
ภาคผนวก	77
1. การวิเคราะห์คุณค่างทางโภชนาการของอาหารทดลอง	78
2. การคำนวณหาค่าอัตราการรอดตายและการเจริญเติบโต	82
3. วิธีการศึกษาองค์ประกอบเลือด	83
4. สารเคมีวิธีการเตรียมตัวอย่างและวิธีการศึกษาพยาธิสภาพเนื้อเยื่อ	86
5. การวิเคราะห์คุณภาพน้ำ	89
6. การวิเคราะห์กิจกรรมของเอนไซม์ AChE	92
7.การวิเคราะห์กิจกรรมของเอนไซม์ LDH	92
ประวัติผู้เขียน	95

รายการตาราง

ตารางที่		หน้า
1.	ความสามารถในการต้านทานพิษ Tetrodotoxin ในสัตว์น้ำที่มีการสะสมสารพิษและไม่มีการสะสมสารพิษ	14
2.	ระดับความเป็นพิษที่น้อยที่สุดที่ทำให้สัตว์ตาย ของ TTX ในสัตว์ชนิดต่างๆ	15
3.	คุณค่าทางโภชนาการและระดับของสารพิษในอาหารทดลอง	27
4.	ระดับสารพิษ TTX ที่ผสมในอาหาร	34
5.	องค์ประกอบทางเคมีของกุ้งขาวที่เลี้ยงด้วยอาหารที่ผสมสาร TTX ระดับต่างๆ เป็นระยะเวลา 6 สัปดาห์	35
6.	น้ำหนักเฉลี่ยของกุ้งขาวหลังจากได้รับอาหารผสมสารพิษ TTX เป็นระยะเวลา 6 สัปดาห์	36
7.	การเจริญเติบโตที่เพิ่มขึ้น, อัตราการเจริญเติบโตต่อวัน, อัตราการเจริญเติบโตจำเพาะ, ของกุ้งขาวหลังจากได้รับอาหารผสมสารพิษ TTX เป็นระยะเวลา 6 สัปดาห์	38
8.	ปริมาณอาหารที่กุ้งกินต่อตัวต่อวัน, อัตราการเปลี่ยนอาหารเป็นเนื้อ และ ประสิทธิภาพการใช้โปรตีนหลังจากได้รับอาหารผสมสารพิษ TTX เป็นระยะเวลา 6 สัปดาห์	39
9.	อัตราการรอดของกุ้งหลังจากได้รับอาหารผสมสารพิษ TTX เป็นระยะเวลา 6 สัปดาห์	40
10.	ปริมาณเม็ดเลือดรวม, ระดับกลูโคสในเลือด, อัตราส่วน oxyhemo cyanin/hemolym protein, ปริมาณโปรตีนในเลือดและกิจกรรมของเอนไซม์ฟีนอลออกซิเดสของกุ้งขาวที่ได้รับอาหารผสมสารพิษ TTX เป็นระยะเวลา 6 สัปดาห์	43
11.	ระดับไอออนในเลือดของกุ้งขาวหลังจากได้รับอาหารผสมสารพิษ TTX เป็นระยะเวลา 6 สัปดาห์	43
12.	ค่ากิจกรรมของเอ็มไซม์ AChE และ LDH เนื้อของกุ้งขาวหลังได้รับ	44
13.	ปริมาณสารพิษที่ตกค้างในตัวกุ้งขาวที่ได้รับอาหารผสมสารพิษ TTX เป็นระยะเวลา 6 สัปดาห์	49

รายการตาราง (ต่อ)

ตารางที่ หน้า

14. ปริมาณเม็ดเลือดรวม, ระดับกลูโคสในเลือด, อัตราส่วน oxyhemocyanin ต่อ hemolym protein, ปริมาณโปรตีนในเลือดและกิจกรรมของเอนไซม์ฟีนอลออกซิเดสของกุ้งขาวที่ฟื้นตัวจากการได้รับสารพิษ TTX 51
15. ระดับแร่ธาตุในน้ำเลือดของกุ้งขาวที่ฟื้นตัวจากการได้รับสารพิษ TTX 51
16. ค่ากิจกรรมของเอ็นไซม์ acetylcholinesterase (AChE) และ Lactate dehydrogenase (LDH) ของกุ้งขาวที่ฟื้นตัวจากการได้รับสารพิษ TTX 52

รายการภาพประกอบ

ภาพที่		หน้า
1.	กุ้งขาว (*Litopenaeus vannamei*)	2
2.	ระบบประสาทของกุ้งในกลุ่ม Penaeus	4
3.	การได้รับอาหารที่ปนเปื้อนสารพิษของสัตว์น้ำผ่านทางห่วงโซ่อาหาร	7
4.	ลักษณะการเกิดของสารประกอบสาร TTX	9
5.	โครงสร้างของสาร TTX	10
6.	การขัดขวางการทำงานของโซเดียมในระบบประสาท	11
7.	โครงสร้างตับและตับอ่อนที่ปกติของกุ้งขาว	45
8.	โครงสร้างตับและตับอ่อนที่ของกุ้งขาวที่ได้รับ TTX ระดับ 2.5 ppm เป็นระยะเวลา 6 สัปดาห์	46
9.	โครงสร้างตับและตับอ่อนของกุ้งขาวที่ได้รับอาหารที่ผสมสาร TTX ระดับ 2.5 ppm เป็นระยะเวลา 6 สัปดาห์	46
10.	โครงสร้างตับและตับอ่อนของกุ้งขาวที่ได้รับอาหารผสมสาร TTX ที่ระดับ 5 ppm เป็นระยะเวลา 6 สัปดาห์	47
11.	ตับและตับอ่อนของกุ้งขาวที่ได้รับอาหารผสมสาร TTX ที่ระดับ 5 ppm เป็นระยะเวลา 6 สัปดาห์	47
12.	โครงสร้างตับและตับอ่อนของกุ้งขาวที่ได้รับอาหารผสมสาร TTX ที่ระดับ 5 ppm เป็นระยะเวลา 6 สัปดาห์	48
13.	โครงสร้างตับและตับอ่อนของกุ้งขาวที่ได้รับอาหารผสมสาร TTX ที่ระดับ 5 ppm เป็นระยะเวลา 6 สัปดาห์	48
14.	โครงสร้างตับและตับอ่อนของกุ้งขาวที่ผิดปกติที่เลี้ยงด้วยอาหารผสมสาร TTX ที่ระดับ 5 ppm เป็นระยะเวลา 6 สัปดาห์	49
15.	โครงตับและตับอ่อนของกุ้งขาวปกติ	53
16.	โครงตับและตับอ่อนของกุ้งหลังจากหยุดให้อาหารที่ผสมสาร TTX 2.5 ppm	53
17.	โครงสร้างตับและตับอ่อนของกุ้งที่เคยได้รับสารพิษ TTX ระดับ 2.5 ppm	54
18.	โครงสร้างตับและตับอ่อนของกุ้งที่เคยได้รับสารพิษ TTX ระดับ 5 ppm	54
19.	โครงสร้างตับและตับอ่อนของกุ้งที่เคยได้รับสารพิษ TTX ระดับ 5 ppm	55

รายการตารางภาคผนวก

ตาราง	หน้า
องค์ประกอบทางโภชนาการของอาหารที่ใช้ในการทดลอง	94

บทที่ 1

บทนำ

1. บทนำต้นเรื่อง

การเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำในปัจจุบัน อาหารที่ใช้เลี้ยงมีความสำคัญต่อต้นทุนการผลิตและรายได้ที่ได้รับของเกษตรกรเป็นอย่างมาก จากรายงานพบว่า ค่าอาหารสัตว์น้ำคิดเป็น 60 % ของต้นทุนในการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำ (อมรรัตน์ เสริมวัฒนากุล และคณะ, 2548) ดังนั้น อาหารสัตว์น้ำโดยเฉพาะกุ้ง ที่มีความต้องการโปรตีนในระดับสูงเพื่อการเจริญเติบโต และแหล่งโปรตีนที่สำคัญมาจากปลาป่น เนื่องจากปลาป่นเป็นวัตถุดิบที่เป็นแหล่งโปรตีนที่มี กรดอะมิโนจำเป็นครบถ้วนเพียงพอต่อความต้องการและเป็นวัตถุดิบที่มีความสำคัญสำหรับการผลิตอาหารสัตว์น้ำเป็นอย่างมาก (พันทิพา พงษ์เพียจันทร์, 2538) เนื่องจากสภาวะปัจจุบันปลาป่นมีความต้องการสูงและมีราคาเพิ่มสูงขึ้น จึงทำให้มีการปลอมปนปลาป่นด้วยสารเคมีหรือวัตถุดิบอื่นๆ ซึ่งทำให้คุณภาพของปลาป่นไม่ได้มาตรฐานและส่งผลต่อสุขภาพของสัตว์น้ำและอาจส่งผลกระทบต่อสุขภาพของผู้บริโภคได้ หากมีการนำวัตถุดิบหรือสารปลอมปนเป็นส่วนประกอบในการผลิตอาหารสัตว์น้ำ ซึ่งในปัจจุบันปลาปักเป้ามีราคาถูกและเป็นปลาที่มีสารพิษอยู่ในตัว สารพิษดังกล่าวคือ Tetrodotoxin (TTX) สารพิษชนิดนี้ไม่สามารถทำลายด้วยความร้อน ดังนั้น หากมีการนำปลาปักเป้าป่นมาเป็นวัตถุดิบอาหารจึงอาจส่งผลกระทบต่อผลผลิตสัตว์น้ำในแง่ของการตกค้างของสารพิษในเนื้อ เนื่องจากพิษไม่สามารถทำลายโดยความร้อนที่ใช้ในการหุงต้ม รวมทั้งแง่ของการส่งออกสินค้าไปยังต่างประเทศ ดังนั้นการนำปลาปักเป้ามาปลอมปนจึงมีความเสี่ยงต่อการปนเปื้อนของสารพิษ TTX ในวัตถุดิบ การรายงานของ Miyazawa และ Noguchi (2001) ศึกษาข้อมูลวิเคราะห์ข้อมูลการสะสมพิษของสัตว์น้ำโดยพบว่า สัตว์น้ำสามารถสะสมสารพิษในตัวได้มาก และในกุ้งนั้นสารพิษอาจมีผลต่อการทำงานของตับและตับอ่อน ทำให้เจริญเติบโตช้า อัตราการรอดต่ำ และอาจมีการตกค้างของสารพิษ TTX ในตัวกุ้ง เนื้อเยื่อ และน้ำเลือด ซึ่งส่งผลต่อสุขภาพของผู้ที่บริโภคสัตว์เหล่านั้นด้วย อย่างไรก็ตามข้อมูลที่มีการศึกษาการเกิดพิษและการตกค้างของสารพิษ TTX ในสัตว์น้ำยังคงมีอยู่น้อยมาก ดังนั้น การศึกษาในครั้งนี้เพื่อให้ทราบถึงความเป็นพิษของสารพิษ TTX ต่อกุ้งขาว การสะสมของสารพิษนี้ในตัวกุ้งขาว และการฟื้นตัวของกุ้งขาวหลังจากได้รับการพักฟื้น โดยการให้กุ้งขาวกินอาหารที่ผสมสาร TTX บริสุทธิ์ในระดับต่างๆ และผลจากการศึกษาที่ได้สามารถนำไปเป็นแนวทางในการจัดการระดับมาตรฐานของคุณภาพอาหารสัตว์น้ำ และเป็นแนวทางในป้องกันการปนเปื้อนของ TTX ในวัตถุดิบที่ใช้ในการผลิตอาหารสัตว์น้ำและความปลอดภัยของผู้บริโภค

2. ตรวจเอกสาร

2.1 ชีววิทยาของ กุ้งขาว (*Litopenaeus vannamei*)

ภาพที่ 1 : กุ้งขาว (*Litopenaeus vannamei*)
ที่มา : www.fao.org/fi/glossary/aquaculture/spec-term...

กุ้งขาว เป็นสายพันธุ์กุ้งทะเลในกลุ่ม กุ้งขาวแปซิฟิ กุ้งขาว มีชื่อทางวิทยาศาสตร์ว่า *Litopenaeus vannamei* กุ้งขาวที่ทำการเพาะเลี้ยงกันอยู่ในปัจจุบันนี้แบ่งออกได้เป็น 2 กลุ่ม ตามสภาพภูมิศาสตร์ของโลกได้แก่ กุ้งขาวตะวันตก เช่น กุ้งขาว (*Litopenaeus vannamei*), กุ้งน้ำเงินตะวันตก (*Penaeus stylirostris*) ทางฝั่งตะวันออก ได้แก่ กุ้งแชบ๊วย (*P. merguiensis*), กุ้งขาวจีน (*P. chinensis*), กุ้งขาวอินเดีย (*P. indicus*) กุ้งขาวจะมีลำตัว 8 ปล้อง และมีสีขาว หน้าอกใหญ่ การเคลื่อนไหวเร็ว ส่วนหัวมี 1 ปล้อง มีกรียาวประมาณ 0.8 เท่าของความยาวเปลือก หัวสันกรีสูง ปลายกรีแคบ ส่วนของกรีมีลักษณะเป็นสามเหลี่ยมมีสีแดงอมน้ำตาล กรีด้านบนมี 8 ฟัน กรีด้านล่างมี 2 ฟัน ร่องบนกรีมองเห็นได้ชัด เปลือกหัวสีขาวอมชมพูถึงแดง ขาเดินมีสีขาวซึ่งเป็นลักษณะที่โดดเด่น หนวดยาวมีสีแดงมี 2 เส้น ตาแดงเข้ม ส่วนตัวมี 6 ปล้อง เปลือกตัวสีขาวอมชมพูถึงแดง เปลือกบาง ขาว่ายน้ำ 5 คู่ มีสีขาวข้างในที่ปลายมีสีแดง ส่วนหางมี 1 ปล้อง ปลายหางมีสีแดงเข้ม แพนหางมี 4 ใบและ 1 กรีหาง เป็นสัตว์ที่มีความแข็งแรงและทนทานจึงมีการขยายพันธุ์ตามธรรมชาติได้กว้าง เช่น ในแถบแนวชายฝั่งตะวันออกของมหาสมุทรแปซิฟิก ตั้งแต่เม็กซิโกถึงเปรู เนื่องจากภูมิภาคในแถบนี้ที่ระดับความลึกจากเส้นแนวชายฝั่งลงไปประมาณ 72 เมตร หรือ 235 ฟุต และพื้นท้องทะเลมีลักษณะเป็นเหมือนโคลนซึ่งเหมาะสมแก่การเจริญเติบโต และเป็นแหล่งอาหารที่อุดมสมบูรณ์ กุ้งขาวเป็นกุ้งที่เลี้ยงได้ทั้งระบบธรรมชาติ และระบบกึ่งหนาแน่น ลักษณะพิเศษของกุ้งสายพันธุ์นี้คือสามารถสร้างความคุ้นเคย หรือปรับตัวภายใต้ระบบการเพาะเลี้ยงได้ เช่น สามารถเพาะเลี้ยงได้ทั้งในน้ำที่มีระดับความเค็มในช่วงกว้างคือที่ 5-35 ส่วนในพันส่วน (ppt) และที่ระดับความเค็มที่สามารถเจริญเติบโตได้ดีคือ 10-22 ppt อุณหภูมิที่สามารถเจริญเติบได้ดีคือ 26-29 องศาเซลเซียส แต่สามารถทำการเพาะเลี้ยงได้ที่อุณหภูมิ 25-35 องศาเซลเซียส ปริมาณออกซิเจนที่ละลายในน้ำมีค่า 4-9 มิลลิกรัม/ลิตร และ pH ควรอยู่ระหว่าง 7.2-8.6 สามารถเลี้ยงได้ในน้ำที่มีความกระด้างรวม 120 มิลลิกรัม/ลิตร และมี alkalinity 80-150 มิลลิกรัม/ลิตร (ภิญโญ เกียรติปิญโญ, 2545)

2.1.1ระบบกล้ามเนื้อ

ผิวลำตัวชั้นนอกมีอีพิเดอร์มิส (epidermis) หุ้มด้วยชั้นของคิวติเคิล (cuticle) ใต้ชั้นอีพิเดอร์มิสเป็นเนื้อเยื่อเกี่ยวพัน และมีกล้ามเนื้อตามยาว ช่วยในการเคลื่อนไหว ซึ่งประกอบด้วย กล้ามเนื้อเฟลคเซอร์ (flexor muscle) มีอยู่ 2 คู่ เป็นมัดกล้ามเนื้อที่ช่วยในการดีดตัวของกุ้ง กล้ามเนื้อเอคเทนเซอร์ (extensor muscle) มีอยู่ 2 คู่ เป็นมัดกล้ามเนื้อช่วยให้กุ้งเหยียดตัว

2.1.2 ระบบย่อยอาหาร

มีรยางค์หลายคู่ช่วยในการจับเหยื่อให้เข้าสู่ปากผ่านคอหอยสั้นๆ เข้าไปยังกระเพาะอาหารส่วนแรก (cardiac stomach) และกระเพาะอาหารส่วนหลัง (pyloric stomach) บริเวณด้านข้างมีรูเปิดของท่อน้ำย่อยจากตับ (digestive gland) เข้ามาช่วยย่อยและมีการดูดซึมในบริเวณนี้ด้วย จากนั้นกากอาหารจะถูกส่งออกตามลำไส้ไปยังทวารที่อยู่ส่วนท้ายของร่างกาย

2.1.3 ระบบหมุนเวียนโลหิตและระบบแลกเปลี่ยนก๊าซ

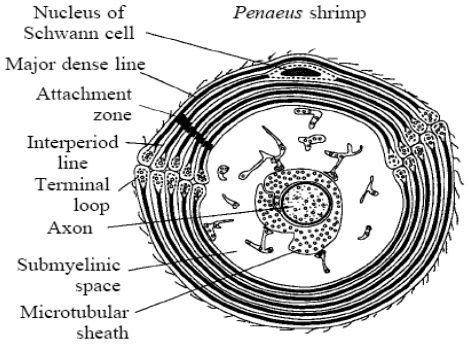
หัวใจอยู่บริเวณด้านเหนือกระเพาะอาหารและอวัยวะสืบพันธุ์ ในช่องรอบหัวใจ (pericardial cavity) มีช่องเล็กๆ ให้เลือดในช่องนี้ไหลเข้าไปในหัวใจได้ เส้นเลือดที่สำคัญมีหลายเส้น และส่งเลือดไปเลี้ยงทั่วร่างกาย ที่สำคัญได้แก่ เส้นเลือดจำนวนมาก หน้าที่การทำงาน opthalmic artery 1 เส้น ออกจากหัวใจด้านหน้าไปเลี้ยงส่วนหัวและกระเพาะอาหาร antennary artery 1 คู่ เป็นเส้นเลือดที่แตกแขนงออกจาก ophthalmic artery ไปเลี้ยงหนวด gastric artery 1 คู่ เป็นเส้นเลือดที่แยกแขนงออกจาก ophthalmic artery ไปเลี้ยงกระเพาะ hepatic artery 1 คู่ ออกจากหัวใจทางด้านล่างไปเลี้ยงตับ (digestive gland) dorsal abdominal artery 1 เส้น ออกจากหัวใจส่วนท้ายด้านล่าง แล้ววกขึ้นบนไปยังหาง stemal artery 1 เส้น แยกจาก darsal abdominal artery ลงสู่ด้านล่าง ventral artery 1 เส้น อยู่ทางด้านล่าง แล่นไปส่วนหัวเรียก ventral thoracic artery และแล่นไปส่วนท้องเรียก ventral abdominal artery เลือดของกุ้งมีสีฟ้าอ่อน เพราะมีองค์ประกอบของฮีโมไซยานิน เมื่อเลือดไหลออกจากหัวใจไปยังเส้นเลือด ต่าง ๆ แล้วไหลเข้ามารวมกันที่แอ่งพักเลือดด้านท้อง เลือดจะไหลเข้าสู่เส้นเลือดที่นำไปฟอกยังเหงือก ซึ่งมีอยู่ 8 คู่ ทางด้านข้างของส่วนอก โดยมีแผ่นเปลือกปิดไว้แต่ละอันมีใยเหงือกเล็กๆเป็นบริเวณที่มีการแลกเปลี่ยนก๊าซออกซิเจนและคาร์บอนไดออกไซด์ เมื่อเกิดการฟอกเลือดแล้วเลือดจะไหลออกเพื่อไหลเข้าสู่ช่องรอบหัวใจแล้วเข้าหัวใจทางรูออสเตีย (ostia)

2.1.4 ระบบขับถ่ายของเสีย

อวัยวะที่ใช้ในการขับถ่าย คือ ต่อมที่อยู่บริเวณโคนหนวดเรียกต่อมเขียว (green gland หรือ antennary gland) อยู่ภายในช่องที่มีของเหลวที่เป็นของเสียมารวมอยู่โดยการซึมแพร่เข้าไปในต่อมเขียว ซึ่งมีลักษณะเป็นถุงและส่งไปพักที่บริเวณกระเพาะพัก(bladder) แล้วเปิดออกนอกร่างกายที่บริเวณโคนหนวดคู่ที่ 2

2.1.5 ระบบประสาท

ประกอบด้วยสมอง เป็นปมประสาทขนาดใหญ่อยู่บริเวณส่วนหัว มีแขนงแยกไปเลี้ยงตา (optic nerve) และไปเลี้ยงหนวด (antennary nerve) จากปมประสาท สมองมีเส้นประสาทล้อมรอบหลอดอาหาร ลงมายังปมประสาทด้านล่าง รวมกันเป็นปมประสาททรวงอก (thoracic ganglion) ซึ่งมีปมประสาท 7 ปม จากนั้นจะทอดยาวเป็นปมประสาทส่วนท้อง(ventral nerve cord) และมีปมประสาทแยกออกไปยังกล้ามเนื้อและรยางค์ต่างๆ



ภาพที่ 2 : ระบบประสาทของกุ้งในกลุ่ม Penaeus
ที่มา : Xu และคณะ (1999)

2.2 การปนเปื้อนของสารพิษในอาหารสัตว์น้ำ

ตามที่รัฐบาลไทยได้รณรงค์ด้านอาหารปลอดภัย เพื่อให้อาหารที่ผลิตและบริโภคในประเทศมีความปลอดภัย ได้คุณภาพมาตรฐานทัดเทียมสากล นำไปสู่การเป็นครัวโลกนั้น เป้าหมายหลักที่สำคัญประการหนึ่ง คือ อาหารต้องสะอาด ปราศจากเชื้อโรคไม่มีสารปนเปื้อนอันตราย และสารตกค้างจากยาฆ่าแมลงต้องอยู่ในระดับที่ปลอดภัย ในปัจจุบันผู้บริโภคต้องเสี่ยงกับโรคอาหารเป็นพิษที่เกิดจากวัตถุดิบและอาหารที่มีกระบวนการผลิตการปรุง และการเก็บรักษาที่ไม่ถูกสุขลักษณะทำให้มีโอกาสการปนเปื้อนสิ่งที่เป็นอันตราย ในส่วนของ

ผู้บริโภคมักจะให้ความสำคัญกับปริมาณสารเคมีที่ตกค้างอยู่ในอาหารและอาหารสัตว์มากกว่าสารพิษจากธรรมชาติซึ่งสร้างขึ้น สารพิษจากธรรมชาติสามารถแบ่งได้เป็น 5 ชนิด ตามแหล่งกำเนิดได้แก่

1. สารพิษจากเชื้อรา (mycotoxin) ส่วนใหญ่เป็นสารที่มีโมเลกุลขนาดเล็ก และทนต่อความร้อน (heat stable) เช่น อะฟลาทอกซิน (aflatoxin) โอคราทอกซิน (ochratoxin) เป็นต้น

2. สารพิษจากแบคทีเรีย (bacterial toxin) ส่วนใหญ่เป็นโปรตีน จึงไม่ทนต่อความร้อน (heat labile) เช่น โบทูลิน (botulin) เอนเทอโรทอกซิน (enterotoxin) ที่ *Staphylococcus aureus* และ *Bacillus cereus* สร้างขึ้น

3. สารพิษจากสาหร่าย (phycotoxin) ส่วนใหญ่เป็นสารที่ทนต่อความร้อน ที่สร้างจากสาหร่ายในกลุ่ม dinoflagellate และ phytoplankton ผู้บริโภคได้รับสารพิษเนื่องจากรับประทานหอยที่กินสาหร่ายเหล่านี้เป็นอาหาร หรือดื่มน้ำที่มีสาหร่ายปนเปื้อนในปริมาณสูง

4.สารพิษจากพืช (phytotoxin) มักเป็นสารในกลุ่มอัลคาลอยด์ (alkaloid) พบในพืชที่ใช้เป็นอาหาร เช่น glycoalkaloid ในมันฝรั่ง ซึ่งพืชสร้างขึ้นเพื่อป้องกันการเข้าทำลายของแมลงและเชื้อรา เป็นต้น รวมทั้งพืชสมุนไพร เช่น pyrrolizidine alkaloid เป็นต้น

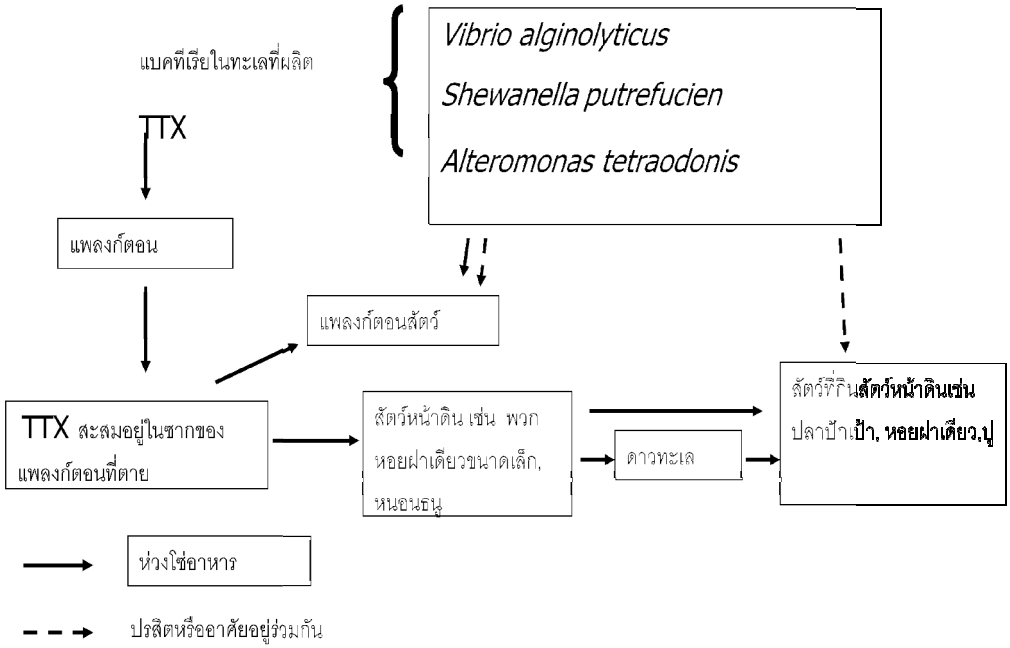
5. สารพิษจากสัตว์ (zootoxin) ได้แก่ พิษงู พิษแมงป่อง พิษคางคก ซึ่งสารพิษกลุ่มนี้ถือว่ามีการปนเปื้อนในอาหารน้อยมากยกเว้นพิษ TTX จากปลาปักเป้า (มณี ตันติรุ่งกิจ, 2548)

การปนเปื้อนของสารพิษในอาหารสัตว์น้ำนั้น ส่วนใหญ่มีสาเหตุมาจากขั้นตอนการผลิตและการเก็บรักษาวัตถุดิบอาหาร ซึ่งการเก็บรักษาอาหารสัตว์น้ำนั้นเป็นสิ่งที่สำคัญ หากมีการเก็บอาหารที่ไม่ถูกสุขลักษณะจะทำให้คุณภาพของอาหารลดลง หรือมีสารพิษที่เป็นอันตรายกับสัตว์น้ำเกิดขึ้น ซึ่งมีการตรวจพบการปนเปื้อนของ aflatoxin ที่ผลิตโดยเชื้อราในกลุ่ม *Aspergillus* sp. ในระหว่างกระบวนการผลิตหรือการเก็บรักษาวัตถุดิบ สำหรับในสัตว์น้ำพบว่า aflatoxin ทำให้มีการเจริญเติบโตไม่ดี สรีระไม่สมบูรณ์ และมีการเปลี่ยนแปลงของเนื้อเยื่อ ทำให้ผลผลิตลดลง นอกจาก *Aspergillus sp.* แล้วยังมี *Flusarium monoliform* ซึ่งสามารถสร้างสารพิษที่สำคัญหลายชนิดเช่น fumonosin B1, ochratoxin A (ชุติมา ตันติกิตติ, 2549) โดยสารเหล่านี้จะเข้าสู่ตัวสัตว์น้ำและก่อให้เกิดความเป็นพิษต่อร่างกายสัตว์น้ำ

นอกเหนือจากสารพิษที่กล่าวมาข้างต้น ในแหล่งน้ำธรรมชาตินั้น ตัวสัตว์น้ำเองได้รับพิษจากอาหารที่กินเข้าไป ซึ่งเป็นอาหารที่มีชีวิต โดยอาหารมีชีวิตบางชนิดสามารถผลิตสารพิษได้เช่น ไดโนแฟลกเจลเลตและสาหร่ายบางชนิดที่มีพิษ สารพิษที่ผลิตขึ้นโดยไดโนเฟลกเจลเลตส่วนหนึ่งจะถูกปล่อยออกมานอกเซลล์และเข้าสู่สิ่งมีชีวิตชนิดอื่นเช่น หอย กุ้ง ปลา และปู ด้วยวิธีการกรองหรือการกิน โดยสอดคล้องกับการรายงานของ Noguchi และคณะ (2006b) ดังที่แสดงในภาพที่ 3 นอกจากนี้ยังมี สารพิษซิกัวเทอรา (ciguatera) ซึ่งเป็นสารพิษที่ผลิตโดย

แพลงก์ตอน *Gambierdiscus toxicus* ซึ่งเป็นอาหารของสัตว์น้ำขนาดเล็กบางประเภท สัตว์น้ำได้รับพิษชนิดนี้ โดยปลาที่มีขนาดใหญ่จะกินสัตว์น้ำขนาดเล็กๆ เหล่านี้เป็นอาหารอีกต่อหนึ่ง พิษในปลาขนาดใหญ่จะมีความเข้มข้นมากกว่าในสัตว์น้ำขนาดเล็ก และมักสะสมในตับ สมอง หรือนัยน์ตามากกว่าในเนื้อ สารพิษนี้มีคุณสมบัติสามารถทนความร้อนได้และมักพบในปลาที่อาศัยบริเวณแนวปะการัง เช่น แถบทะเลแคริบเบียน และมหาสมุทรแปซิฟิก และมีพิษอีกชนิดหนึ่งที่สามารถพบได้ในสัตว์น้ำคือ พิษอัมพาตจากหอย (paralytic shellfish poisoning : PSP) เรียกย่อๆ ว่า สารพีเอสพี เป็นพิษที่ผลิตโดยแพลงก์ตอน *Gonyaulax catanella* และ *G. tamarensis* ซึ่งเป็นอาหารของหอย โดยหอยจะกรองเอาแพลงก์ตอนเหล่านี้เป็นอาหารทำให้เกิดการสะสมสารพิษในตัว LD_{50} ของพิษชนิดนี้ ในปลาเท่ากับ 400-755 ไมโครกรัม PSP/กิโลกรัม (White, 1981) และการได้รับอาหารที่ปนเปื้อนสารพิษ diarrhetic shellfish poison, (DSP) ในสัตว์จำพวกหอยเช่น หอยแมลงภู่ หอยแครง หรือหอยนางรม ซึ่งผลิตโดยแพลงก์ตอนพืชในกลุ่มไดโนแฟลกเจลเลต ในสกุล *Dinophysis* ได้แก่ *D. fortii*, *D. acut* และในสกุล *Prorocentrum* ซึ่งกรองเอาแพลงก์ตอนพืชเหล่านี้เป็นอาหาร ส่วนสารพิษ แอนาท็อกซิน-เอ (anatoxin-a) ผลิตโดยสาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงินในสกุล *Anabaena* sp. และ *Oscillatoria* sp. ซึ่งออกฤทธิ์ในการทำลายระบบประสาท นอกจากนี้ยังมี saxitoxin (STX) และ นีโอแซคซิท็อกซิน (neosaxitoxin) ซึ่งผลิตโดยสาหร่าย *Anabaena flos-aquae* สารพิษทั้ง 2 ชนิดนี้ ออกฤทธิ์ต่อระบบประสาท (Camacho *et al*., 2007) ซึ่งมีอาการคล้ายกับการได้รับพิษ TTX การที่ปลาปักเป้าและสัตว์น้ำอื่นมีพิษ TTX ในตัวนั้น เนื่องจากการกินอาหารที่มีการปนเปื้อนของสารพิษที่ผลิตขึ้นโดยแบคทีเรียที่อาศัยอยู่ในแพลงก์ตอน เมื่อแพลงก์ตอนตายแบคทีเรียส่วนหนึ่งจะกระจายออกสู่แหล่งน้ำ และสะสมในสัตว์น้ำชนิดอื่นต่อไป และแบคทีเรียอีกส่วนหนึ่งก็จะถูกทับถมรวมกับซากของแพลงก์ตอนที่ตายลง เมื่อสัตว์หน้าดินมากินซากเหล่านี้ สารพิษจะสะสมภายในตัวเซลล์ และสามารถทำให้สัตว์น้ำชนิดอื่นได้รับพิษเหล่านี้โดยผ่านทางห่วงโซ่อาหาร (ภาพที่ 3) ทั้งนี้ขึ้นอยู่กับชนิดของสัตว์น้ำ ปริมาณสารพิษที่สัตว์น้ำได้รับและชนิดของอาหารที่สัตว์น้ำเหล่านั้นกินเข้าไป ซึ่งชี้ให้เห็นว่าสารพิษส่วนใหญ่ที่สัตว์น้ำได้รับนั้น ผลิตมาจากแพลงก์ตอนและแบคทีเรียที่อาศัยอยู่ในทะเลและสะสมในตัวสัตว์น้ำโดยการกินสิ่งมีชีวิตเหล่านี้เป็นอาหาร

ปัจจุบันพบว่า สารพิษ TTX มีแนวโน้มที่จะเกิดการปนเปื้อนในอาหารสัตว์น้ำสูงขึ้น เป็นไปได้ว่า ในอนาคตปลาที่นำมาทำเป็นปลาป่นมีปริมาณลดน้อยลง ในขณะที่ความต้องการปลาป่นเพิ่มสูงขึ้น และอาจจะมีการนำปลาปักเป้ามาใช้ทำเป็นปลาป่นเพื่อใช้เป็นแหล่งโปรตีนในอาหารสัตว์ ซึ่งข้อมูลของ TTX ที่มีต่อสัตว์น้ำมีอยู่น้อยมาก หากสัตว์น้ำได้รับสารพิษชนิดนี้ในปริมาณน้อยๆ เป็นระยะเวลานานอาจทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงของเนื้อเยื่อ รวมถึงการตกค้างของสารพิษในอวัยวะส่วนต่างๆ แต่ข้อมูลในส่วนนี้ยังคงมีอยู่น้อยจึงต้องมีการศึกษาเพิ่มเติมต่อไป



ภาพที่ 3 : การได้รับอาหารที่ปนเปื้อนสารพิษของสัตว์น้ำผ่านทางห่วงโซ่อาหาร
ที่มา : Noguchi และคณะ (2006b)

2.3 การเปลี่ยนแปลงของสารพิษในร่างกาย

โดยทั่วไปแล้ว ภายในร่างกายมนุษย์หรือสัตว์มีขบวนการต่างๆ ที่จะเปลี่ยนแปลงสารใดๆ ก็ตามที่ได้รับเข้าเพื่อให้สารนั้นๆ มีฤทธิ์น้อยลง หรือเป็นอันตรายต่อร่างกายน้อยลง ตลอดจนสามารถเปลี่ยนไปในรูปที่สามารถขับถ่ายออกนอกร่างกายได้ (มาลินี, 2523)

2.4 ผลของสารพิษที่ปนเปื้อนในอาหารต่อสัตว์น้ำ

จากที่ได้กล่าวมาข้างต้น การได้รับสารพิษในสัตว์น้ำส่วนใหญ่มาจากการกินอาหารที่ปนเปื้อนสารพิษ โดยสารพิษที่ได้รับจะไปมีผลต่อระบบต่างๆ ของร่างกายและส่งผลต่อการเจริญเติบโต นอกจากนี้เมื่อสัตว์น้ำได้รับอาหารที่ปนเปื้อนสารพิษเป็นระยะเวลานานทำให้เกิดอาการเป็นพิษแบบเรื้อรัง จากการศึกษาของ อรอนงค์ บัณฑิต (2548) พบว่า กุ้งที่ได้รับสารพิษ ทีทู (aycotoxin T-2) ที่ระดับความเข้มข้น 2.0 ppm มีการฝ่อและการลีบของเซลล์ท่อตับ และเซลล์สะสมอาหารมีขนาดเล็กลงอีกทั้งเกิดการสลายตัวของเซลล์ท่อตับ และมีการจับตัวกันอย่างหลวมๆ ของเซลล์สร้างน้ำเหลือง นอกจากสารพิษทีทูแล้วยังมี aflatoxin B1 โดย

การศึกษาของ ปิยวัฒก์ วสยางกูร และคณะ (2540) พบว่า กุ้งที่ได้รับ aflatoxin B1ในขนาด 10 และ 20 ppb มีค่าเฉลี่ยของจำนวนเม็ดเลือดทั้งหมดและชนิดเม็ดเลือดกรานูโลไซต์ต่ำ เมื่อเปรียบเทียบกับกุ้งที่ได้รับอาหารที่ไม่ผสม aflatoxin B1 สำหรับอัตราการเจริญเติบโตของกุ้งที่ได้รับอาหารที่ผสม aflatoxin B1 ลดลง และมีอัตราการตายสูงกว่ากุ้งที่ได้รับอาหารที่ไม่ผสม aflatoxin B1 สอดคล้องกับการรายงานของ มะลิ บุณยรัตผลิน และคณะ (2543) พบว่า เมื่อกุ้งได้รับอาหารที่มี aflatoxin B1 เป็นระยะเวลานานทำให้มีปริมาณเม็ดเลือดและความว่องไวของเอนไซม์ฟีนอลออกซิเดสเพิ่มขึ้น และมีการเปลี่ยนแปลงของเนื้อเยื่อตับและตับอ่อนในกุ้งกุลาดำที่ได้รับอาหารปนเปื้อน aflatoxin B1 ที่ระดับความเข้มข้น 74, 126 และ 220 ppb ดังนี้ เซลล์ท่อตับลีบเล็ก (atrophy) มีการเพิ่มจำนวนของเซลล์ในเนื้อเยื่อระหว่างท่อตับ และมีการตายของเซลล์บุผิวท่อตับบางส่วน (cell necrosis) นอกจากนี้ยังพบว่าการเปลี่ยนแปลงของเนื้อเยื่อมีความสัมพันธ์กับความเข้มข้นของ aflatoxin ที่ได้รับ ในสัตว์น้ำหลังจากได้รับสารพิษ TTX เข้าสู่ร่างกาย จากการรายงานของ Haverinen และคณะ (2007) ในปลาเรนโบว์เทร้าท์ (Rainbow trout) โดยทำการ cloning เนื้อเยื่อหัวใจของปลาเรนโบว์เทร้าท์ พบว่า กล้ามเนื้อหัวใจของปลาเรนโบว์เทร้าท์ มีความไวต่อ TTX มากกว่าในสัตว์มีกระดูกสันหลังถึง 1,000 เท่า โดยทั่วไปแล้วภายในร่างกายมนุษย์หรือสัตว์มีกระบวนการต่างๆ ที่จะเปลี่ยนแปลงสารใดๆ ก็ตามที่มนุษย์หรือสัตว์ได้รับเข้าไป โดยเปลี่ยนไปเป็นสารที่ออกฤทธิ์น้อยลง หรือเป็นอันตรายต่อร่างกายน้อยลง ตลอดจนเปลี่ยนแปลงไปอยู่ในรูปที่ขับถ่ายออกจากร่างกายได้รวดเร็วขึ้น การเปลี่ยนแปลงของสารในร่างกายอาจได้สารตัวใหม่ซึ่งเป็นอันตรายต่อร่างกายมากขึ้น หากสารที่ถูกเปลี่ยนแปลงไปเป็นสารที่มีพิษน้อยลงหรือมีอันตรายต่อร่างกายน้อยลง เรียกกระบวนการนี้ว่า detoxify หากสารถูกเปลี่ยนแปลงไปเป็นสารที่มีพิษมากขึ้นหรือมีอันตรายต่อร่างกายมากขึ้นเรียกกระบวนการนี้ว่า lethal synthesis (มาลินี ลิ้มโภคา, 2523)

2.5 Tetrodotoxin (TTX) ในสัตว์น้ำ

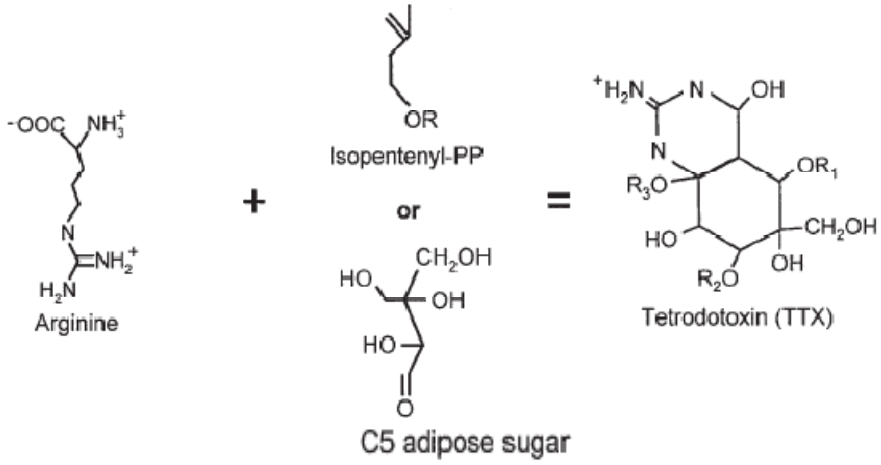
สารพิษ TTX สามารถพบได้ในปลาปักเป้าและสัตว์น้ำอื่นอีกหลายชนิด ซึ่งสารพิษ TTX ในธรรมชาตินั้นเกิดจากการสังเคราะห์ของแบคทีเรียกลุ่ม *Vibrio* sp. และ *Pseudomonas tetraodonis* และแบคทีเรียในกลุ่ม *Actinomycetes* โดยพบแบคทีเรียเหล่านี้ในลำไส้ของปลาปักเป้า (Soong and Venkatesh, 2006) สารพิษ TTX สามารถส่งผ่านจากสิ่งมีชีวิตชั้นต่ำไปยังสัตว์ชั้นสูงผ่านทางห่วงโซ่อาหาร (Noguchi *et al*., 2006b) ดังแสดงในภาพที่ 3 ปัจจุบันมีการศึกษาเพื่อพิสูจน์ข้อสมมุติฐานดังกล่าว ซึ่งให้ผลสรุปค่อนข้างชัดเจนว่า เชื้อแบคทีเรียที่อาศัยอยู่กับสิ่งมีชีวิตเป็นผู้สร้างสารพิษ TTX ส่วนใหญ่เป็นแบคทีเรียในกลุ่ม *Vibrio* sp. (อัธยา กังสุวรรณ และคณะ, 2530) ต่อมามีการศึกษาเพิ่มเติมถึงสายพันธุ์ *Vibrio* sp. ที่สามารถสร้าง TTX ได้ พบว่า แบคทีเรียที่อาศัยอยู่ในแมงดาทะเลไทย (*Carcinoscorpius*

rotundicauda) มี 1 ใน 15 สายพันธุ์เป็น *Vibrio* sp. โดยสายพันธุ์ที่พบคือ *Vibrio* LM-1 (อัธยา กังสุวรรณ และคณะ, 2541) ซึ่งสอดคล้องกับการรายงาน Saito และคณะ (1985) ที่พบว่าแบคทีเรียที่อยู่ในลำไส้ของสัตว์มีพิษสามารถสร้างสารพิษในเซลล์ได้ (Miyazawa and Noguchi, 2001)

Tsai และคณะ (2006a) พบสารพิษ TTX ในปู (*Demania cultripes*) ซึ่งในแต่ละตัวอย่างนั้นได้มีความเป็นพิษโดยเฉลี่ยอยู่ในช่วง 347±276 MU (Mouse Unit) นอกจากนี้ยังมีรายงานการพบสารพิษ TTX ใน gastropod 5 ชนิดคือ *Polinices didamy, Natica lineate, Oliva miniacea, O. mustelina, O. hirasei* (Hwang *et al*., 2007)

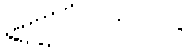
2.5.1 คุณสมบัติสาร TTX

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 เป็นสารอนุพันธ์ของ amino perhydroquinazoline ($CnH_{17}NsOe$) ซึ่งประกอบด้วย hydroxy group และ guanidinium group ลักษณะเป็น heterocyclic ขนาดเล็ก อาการของสารพิษชนิดนี้จัดอยู่ในกลุ่มของ neurotoxin เป็นพิษที่มีผลต่อระบบประสาทที่รุนแรงที่สุด (Soong and Venkatesh, 2006)



ภาพที่ 4 : ลักษณะการเกิดของสารประกอบสาร TTX

ที่มา : Zimmer และ Ferrer (2007)

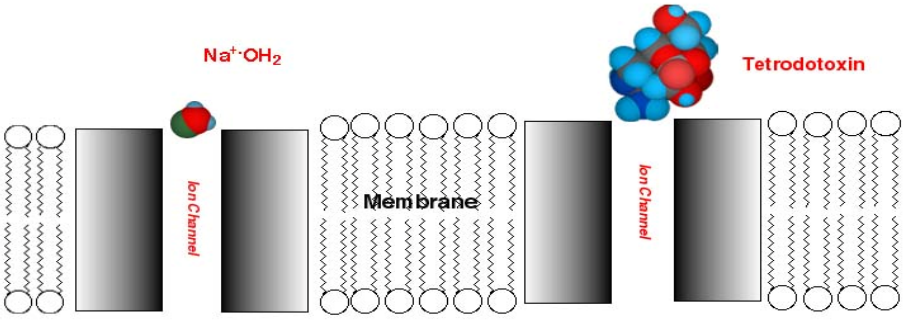


ภาพที่ 5 : โครงสร้างของสาร TTX
ที่มา : www.chm.bris.ac.uk

TTX มีสูตรทางเคมีคือ $C_{11}H_{17}O_8N_3$ และมีน้ำหนักโมเลกุลเท่ากับ 319.3 กรัมต่อโมล ซึ่งมีโครงสร้างดังภาพที่ 2 สาร TTX สามารถละลายได้ดีในกรด และละลายน้ำได้ สารพิษชนิดนี้มีความสามารถในการทนความร้อนได้สูงถึง 220 องศาเซลเซียส แต่มีการสลายตัวในสภาวะที่เป็นด่าง (วริต คุปต์กาญจนากุล และ วินัย วนานุกูล, 2550)

2.5.2 กลไกการออกฤทธิ์สาร TTX

TTX เป็นสารพิษที่ออกฤทธิ์อย่างรวดเร็วบริเวณ excitable membrance ทำให้เกิดการยับยั้งการทำงานของ sodium channel คล้ายพิษจาก saxitoxin (STX) โดยมีการจับเกาะในตำแหน่งเดียวกันที่บริเวณ external part of voltage-gate channel ทำให้ไม่เกิด action potential ของเซลล์ จึงมีผลให้กระบวนการส่งต่อสัญญาณไฟฟ้าของเซลล์ต่างๆ สูญเสียไป เซลล์ที่ได้รับผลกระทบจากสารพิษทั้ง 2 ชนิดมากคือ เซลล์กล้ามเนื้อและเซลล์ของระบบประสาท ทั้งประสาทสั่งการ (motor nerve) และประสาทรับความรู้สึก (sensory nerve) สารพิษชนิดนี้สามารถออกฤทธิ์ได้ทั้งระบบประสาทส่วนกลาง และประสาทส่วนปลาย โดยทำให้กล้ามเนื้ออ่อนแรงและมีฤทธิ์กระตุ้น chemo receptor trigger zone ที่ medulla oblongata ทำให้เกิดการหายใจติดขัดและกดก้านสมองที่เรียกว่า vasomotor center ซึ่งทำหน้าในการควบคุมการขยายตัวของหลอดเลือดและการหายใจ และเป็นสาเหตุหลักที่ทำให้เกิดการเสียชีวิตจากกล้ามเนื้อกระบังลมเป็นอัมพาตจนหยุดหายใจ (ภาพที่ 6)



ภาพที่ 6 : การขัดขวางการทำงานของ Na channel ในระบบประสาท
ที่มา : www.life.umd.edu

ความเป็นพิษของ TTX สามารถรายงานในหน่วยของ Mouse Unit (MU) ซึ่งเป็นระดับของสารพิษที่ทำให้หนูขาวหนัก 20 กรัม ตายภายใน 30 นาที และจากการรายงานของ Noguchi และคณะ (2006b) พบว่า ในหนูมี LD_{50} เท่ากับ 1 MU/20 g ในแมว มี LD_{50} น้อยกว่า 10 ไมโครกรัม/กิโลกรัม โดย 1 MU เท่ากับ 0.2 ไมโครกรัม และขนาดที่ทำให้มนุษย์เสียชีวิตโดยประมาณ 2 มิลลิกรัม และปริมาณของพิษที่น้อยที่สุดที่คนได้รับแล้วแสดงอาการอยู่ที่ 0.2 มิลลิกรัม (Yoshikawa-Ebesu *et al*., 2001) โดยสอดคล้องกับการรายงานของ วริต คุปต์กาญจนากุล และวินัย วนานุกูล (2550) และค่าเฉลี่ย Lethal dose (LD_{50}) 9 ไมโครกรัม/กิโลกรัม ในรูปการฉีดเข้าหลอดเลือด

จากที่กล่าวมาข้างต้น สาร TTX เป็นสารที่ออกฤทธิ์เหมือนกับสาร STX แต่มีโครงสร้างแตกต่างกัน และจากการศึกษาของ Linares และคณะ (2008) พบว่าเมื่อ ฉีดสารสกัด STX เข้าสู่กล้ามเนื้ออของกุ้งที่ระดับต่างๆ พบว่า สาร STX มีผลทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงของกล้ามเนื้อหัวใจและในเส้นประสาท โดยพบว่ากล้ามเนื้อหัวใจมีการเกาะยึดกันน้อยลง ทำให้เกิดช่องว่างในหัวใจ และเกิดการอักเสบบริเวณ neuropile ganglia

2.5.3 การแพร่กระจายของ TTX ในตัวปลาปักเป้า และสัตว์ชนิดอื่น

จากรายงานที่ผ่านมา พบว่า ปลาปักเป้าชนิด *Arothron meppa* และ *Lagocephalus inermis* มีการตรวจพบสารพิษ TTX นอกจากนี้ได้ทำการทดลองทางเคมีเพิ่มเติมเพื่อยืนยันชนิดของพิษดังกล่าว โดยพบพิษในส่วนของ ตับ และไข่ (อัธยา กังสุวรรณ และคณะ, 2533) ในการศึกษาของ Soong และ Venkatesh (2006) ในปลาปักเป้า สารพิษ TTX มีความเข้มข้นมากในตับและรังไข่ บริเวณเยื่อบุลำไส้และหนัง โดยบริเวณเนื้อเยื่อเกี่ยวพันของปลามี TTX มากกว่า 30 ไมโครโมล ทั้งนี้พบว่า ตัวปลาไม่ได้รับอันตรายจากสารพิษ TTX เนื่องจากในปลาปักเป้าใน Domain I ของ Na_v ที่ตำแหน่ง 401 นั้นมีกรดอะมิโนคือ

asparagines อยู่และรูปแบบกรดอะมิโนไม่มีการจับตัวกันเป็นแบบวงแหวน (nonaromatic amino acid) ทำให้ TTX ไม่สามารถเข้ามาจับได้ซึ่งต่างจากในสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนมและในปลาซึ่งที่ตำแหน่ง 401 เป็น aromatic amino acid ที่เป็นมีวิวัฒนาการของยีน สัตว์หลายชนิดมีวิวัฒนาการของยีนดังกล่าวได้แก่ *Taricha granulosa, Taricha rivularis, Taricha torosa,* หมึกยักษ์วงแหวนสีฟ้า (Blue-ringed octopus: *Hapalochlaena maculosa*) หนอนตัวแบน ปลานกแก้ว ดาวทะเล หนอนทะเล ปลาสินสมุทร ปูแซนทิด (*Panopeus herbstii*) แมงดาทะเล หนอนริบบิ้น (*Lineus* spp.) ที่เกาะอยู่กับหอยนางรม หอยทรัมเปตและพวกหอยฝาเดียว นอกจากนี้ยังพบในสัตว์ครึ่งบกครึ่งน้ำ เช่น คางคกแห่งอเมริกากลางในสกุล *Atelopus* กบฮาร์เลควิน (*Dendrobates histrionicus*) และกบในเขตร้อนบางชนิด เช่น กบศรพิษ (*Dendrobates leucomelas*) และที่ผ่านมาได้มีการรายงานว่า พบพิษ TTX ในปลาบู่ 3 ชนิดของไต้หวัน และแมงดาถ้วยนั้นพบว่าสามารถตรวจสอบการสะสมสารพิษ TTX ในตัวได้ในบางฤดูกาล โดยสันนิษฐานว่าอาจเป็นผลมาจากการที่สัตว์กินแพลงก์ตอนบางชนิดเช่น ไดโนแฟลกเจลเลต ที่สร้างสารพิษ TTX ทำให้เกิดการสะสมพิษในหอยหรือสัตว์หน้าดินขนาดเล็กแล้วถูกกินโดยแมงดาทะเลและสัตว์อื่น สารพิษจึงมีการสะสมอยู่ในเนื้อและไข่ของแมงดาถ้วย เมื่อคนบริโภคแมงดาถ้วยที่มีสารพิษสะสมอยู่จึงทำให้เกิดอาการเป็นพิษได้ จากการรายงานของ Brillantes และคณะ (2003) ในประเทศไทยพบปลาปักเป้าที่มีพิษกระจายอยู่มากในจังหวัด สมุทรสาคร และได้ทำการตรวจหาสาร TTX ได้โดยวิธี high-performance liquid chromatography (HPLC) และพบว่าในช่วงเดือนสิงหาคม พ.ศ. 2544 อวัยวะสืบพันธุ์ของปลาปักเป้ามีระดับความเป็นพิษของ TTX สูงถึง 847 MU/g ซึ่งมีค่ามากกว่าในช่วงเดือนอื่นๆ

2.5.4 ความต้านทานต่อสารพิษและการสะสมของสารพิษ TTX ในสัตว์น้ำ

การออกฤทธิ์ของสารพิษ TTX ในสัตว์น้ำนั้นมีกลไกการออกฤทธิ์เหมือนกับสารพิษในกลุ่มของ PSP จากที่กล่าวมาข้างต้นว่า ปลาปักเป้ามีการวิวัฒนาการของยีนที่สามารถต้านทานพิษของ TTX ได้ จากการรายงานของ Noguchi และคณะ (2004) ได้นำปลาปักเป้าที่ไม่มีพิษ 3 ชนิดคือ *L. wheeleri*, *L. gloveri* และ *L. cutaneus* มาเลี้ยงด้วยอาหารที่ผสมสารพิษ TTX โดยปลาปักเป้าจะแสดงอาการเกิดพิษภายใน 40 วัน เมื่อเลี้ยงด้วยอาหารที่ผสมสารพิษ TTX ที่ระดับ 4 MU/g/day และที่เลี้ยงด้วยอาหารที่ผสมสารพิษนี้ที่ระดับ 0.5 MU/g/day ปลาปักเป้าแสดงอาการเกิดพิษภายใน 100 วัน และมีความเป็นพิษเพิ่มขึ้นไปจนถึง 240 วัน และถึงแม้ว่าปลาปักเป้าที่เลี้ยงด้วยอาหารที่ผสมสารพิษ TTX ที่ระดับ 4 MU/g/day สามารถเลี้ยงได้นานถึง 139 วันก็ตาม แต่เป็นไปได้ว่าปลาปักเป้าทั้ง 3 ชนิดนี้อาจจะมีการกำจัดออกหรือทำให้พิษลดความรุนแรงลงได้ (detoxify) หรืออาจมีการสร้างภูมิต้านทานที่สามารถต้านทานสารพิษชนิดนี้ได้ จากการศึกษาดังกล่าวทำให้ทราบว่าปลาปักเป้าที่มาการจากเลี้ยงไม่

มีการสะสมของสารพิษ ซึ่งสอดคล้องกับการได้รับอาหารที่ปนเปื้อนสารพิษของสัตว์น้ำผ่านทางห่วงโซ่อาหารที่รายงานโดย Noguchi และคณะ (2006b) ดังที่แสดงไว้ในภาพที่ 3 นอกจากนี้ยัง Noguchi และคณะ (2006a) พบว่า การสะสมสารพิษ TTX ในปลาปักเป้าในตัวจะมีความสามารถในการต้านทานพิษในระดับที่สูง ซึ่งมากกว่าหนูถึง 300-750 เท่า ในขณะที่สัตว์น้ำอื่น ๆ เช่น ในปลากระดูกแข็ง (*Oplegnathus panctatus, O. fasciacus* และ *Girella puncatata*) สามารถต้านสารพิษ TTX ได้เพียง 0.3-1.8 MU เมื่อเปรียบเทียบกับหนูขาว (ตารางที่ 1) การศึกษาของ Haverinen และคณะ (2007) ทำการ cloning เนื้อเยื่อหัวใจของปลาเรนโบว์เทร้าท์ พบว่า Na current จากกล้ามเนื้อหัวใจของปลามีความไวต่อ TTX มากกว่าในสัตว์มีกระดูกสันหลัง 1,000 เท่า แต่อย่างไรก็ตามการศึกษาด้านกลไกการยับยั้งการเป็นพิษภายในตัวปลาหรือสัตว์น้ำอื่นๆ ที่มีการสะสมพิษชนิดนี้ภายในตัวนั้น ยังมีการศึกษาน้อยมาก ดังนั้นในกรณีนี้อาจต้องมีการศึกษาในระดับโมเลกุลเชิงลึกต่อไป เพื่อนำข้อมูลที่ได้มาเป็นแนวทางในการป้องกันและจัดการกับพิษที่เกิดขึ้นแก่สัตว์น้ำและผู้บริโภคให้เกิดความปลอดภัยมากขึ้น

ตารางที่ 1 ความสามารถในการต้านทานพิษ Tetrodotoxin ในสัตว์น้ำที่มีการสะสมสารพิษและไม่มีการสะสมสารพิษ

Species			MLD50 (MU/20g
TTX bearing organism			
Xanthid crap	*Artergalis*	*floridus*	1,000
Tropical gob	*Yongeichthys*	*criniger*	>300
Puffer fish Toxic	*Takifugu*	*niphobles*	700-750
	T.*pandalis*		500-550
	T.*rubripes*(culture)		300-500
Genaral non-toxic or rarely toxin			
	Lagocephalur	*wheeleri*	15-18
	L. *gloveri*		19-20
	Liosaccus	*cutaneus*	13-15
Non toxic	Ostradon		0.9-1.3
TTX free Vertebrate			
Teleosts	*Oplegnathus*	*panctatus*	0.8-0.9
	Girella	*puncatata*	0.8-1.8
	O.*fasciacus*		0.3-0.5
Lead mammal			
Mouse	*Mus*	*musculus*	1

ที่มา : Noguchi และคณะ (2006b)

ตารางที่ 2 ระดับความเป็นพิษที่น้อยที่สุดที่ทำให้สัตว์ตาย ของ TTX ในสัตว์ชนิดต่าง ๆ

Animal	Minimium lethal dose (μgTTX/kg body weight)
Plaice(Paralichthys olivaceus)	0.5
Dragonfly	1.3
Carp	2
Pigeon	2.7
Rat	2.7
Sparrow	4
Guinea-pig	4.5
Frog	5
Hen	6
Rabbit	8
Mouse	8
Dog	9
Cat	10
Turtle	46
Eel	80
Toad (Bufo)	200
Snake (non-poisonous, species not given)	450

ที่มา : Kao (1966)

จากตารางที่ 2 พบว่า สัตว์แต่ละชนิดมีความสามารถในการต้านทาน TTX ในระดับที่ต่างกัน ใน คางคก (Toad) สามารถทนพิษได้สูงถึง 200 ppb และในแมว 10 ppb ส่วนในสัตว์ปีกเช่น นกพิราบ (Pigeon) สามารถทนพิษได้ 2.7 ppb นกในกลุ่มนกกระจอก (Sparrow) 4 ppb และในสัตว์น้ำเช่น ปลาไน สามารถทนพิษได้ 2 ppb และปลาไหล 80 ppb

2.6 สภาพการณ์เกี่ยวกับปลาปักเป้าในประเทศไทย

ถึงแม้ว่าประเทศไทยจะออกข้อกำหนดให้ห้ามผลิต ห้ามนำเข้า หรือห้ามจำหน่าย และส่งออกปลาปักเป้าทุกชนิด และห้ามนำอาหารที่มีเนื้อปลาปักเป้าเป็นส่วนผสมนำมาจำหน่ายซึ่งมีผลบังคับใช้ตั้งแต่วันที่ 26 ธันวาคม 2545 เป็นต้นมานั้น แต่ยังคงพบปัญหาในกรณีที่เกิดจากการรับประทานปลาปักเป้าเป็นบางครั้ง ทั้งนี้อาจเป็นเพราะผู้บริโภครู้เท่าไม่ถึงการณ์หรือมีความรู้เกี่ยวกับปลาปักเป้าค่อนข้างน้อยและไม่สามารถจำแนกปลาปักเป้าที่มีพิษได้ นอกจากนั้นยังพบในกรณีที่พ่อค้าแม่ค้า และผู้ประกอบอาหารลักลอบนำปลาปักเป้ามาแล่จำหน่ายและประกอบอาหารให้แก่ผู้บริโภค โดยลักษณะของเนื้อปลาปักเป้าเมื่อผ่านการแล่แล้ว จะมีลักษณะคล้ายเนื้อออกไก่สด จึงเรียกอีกชื่อหนึ่งว่า “ปลาเนื้อไก่” พบมากตามร้านหมูกระทะ ร้านข้าวต้ม ร้านสุกี้ หรือนำไปผสมกับปลาชนิดอื่นเพื่อทำลูกชิ้นปลา โดยเส้นทางขนส่งส่วนใหญ่จะมาจากน่านน้ำทะเลฝั่ง เนื่องจากซื้อมาในราคาที่ถูก จากนั้นจะผ่านกระบวนการแปรรูปโดยการแล่เอาเฉพาะในของส่วนเนื้อ เพื่อส่งขายในราคาที่สูงขึ้น นอกจากรายได้จากการขายเนื้อปลา เศษของปลาปักเป้าที่เหลือจะจำหน่ายให้แก่โรงงานอาหารสัตว์หรือโรงงานปลาป่น ซึ่งส่งผลกระทบต่อผู้บริโภคที่รับประทานอาหารที่มีส่วนผสมของปลาปักเป้าดังกล่าว และการส่งเศษปลาปักเป้าที่ผ่านการแล่เอาเนื้อแล้วเข้าสู่โรงงานปลาป่น อาจก่อให้เกิดความเสียหายต่อธุรกิจการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำได้เนื่องจากคุณภาพของวัตถุดิบที่ไม่ได้มาตรฐานและมีการปนเปื้อนของสารพิษในวัตถุดิบอาหาร

2.7 ผลกระทบของ TTX ต่อผู้บริโภค

TTX จัดเป็นสารพิษที่ออกฤทธิ์ทางระบบประสาท (neurotoxin) ซึ่งมีฤทธิ์ไปขัดขวางหรือยับยั้งการทำงานของระบบประสาทและกล้ามเนื้อ ทำให้เกิดอาการชาที่ลิ้น นิ้วมือ คลื่นไส้ อาเจียน หายใจติดขัด อาจทำให้ระบบประสาทที่ทำหน้าในการควบคุมกล้ามเนื้อหยุดชะงัก (vasomotor blockage) ทำให้การเต้นของหัวใจผิดปกติ และเสียชีวิตได้ในเวลาอันรวดเร็ว ซึ่งอาการของพิษจะเกิดขึ้นหลังจากได้รับพิษนี้เข้าสู่ร่างกายประมาณ 10-45 นาที หรืออาจใช้เวลามากกว่านี้ ทั้งนี้ขึ้นอยู่กับปริมาณสารที่ได้รับเข้าไป สำหรับการได้รับสาร TTX ในคนซึ่งอาจเกิดจากการรู้เท่าไม่ถึงการณ์ทำให้ได้รับอันตราย ในประเทศญี่ปุ่นมีรายงานการตายของผู้ที่ได้รับพิษ TTX จากการรับประทานปลาปักเป้าโดยเฉลี่ย 50 คนต่อปี ทำให้มีการกำหนดให้มี TTX ปนเปื้อนในอาหารได้ไม่เกิน 10,000 MU หรือ 2.2 ไมโครกรัมต่อปลาปักเป้า 1 กิโลกรัม

ในประเทศไทยมีผู้ได้รับพิษจากการบริโภคปลาปักเป้า ทั้งชนิดน้ำจืดและน้ำเค็ม การวินิจฉัยโรคจากพิษสาร TTX และ STX ทำได้โดยอาศัยอาการและอาการทางคลินิก

เป็นหลักลักษณะของคลินิกที่สำคัญที่ทำให้คิดถึงโรคนี้คือ อาการชาและอ่อนแรง ซึ่งมีลักษณะเด่นคือ ชาปลายลิ้นและปาก ตามด้วยชาปลายมือปลายเท้า และมีการอ่อนแรงแบบ ascending paralysis หากได้ประวัติกินปลาปักเป้าหรือไข่แมงดาทะเลมาในช่วงไม่กี่ชั่วโมงก่อนมีอาการ จะช่วยในการวินิจฉัยได้ อย่างไรก็ตามผู้ป่วยหลายรายอาจได้ประวัติกินปลาเท่านั้น เนื่องจากปลาปักเป้าส่วนใหญ่มักถูกขายในท้องตลาดในชื่ออื่น เช่น ปลาไก่ หรือขายปลอมปนกับปลาชนิดอื่น (วินัย วนานุกูล, 2008) ซึ่งตรงกับการรายงายของกรมวิทยาศาสตร์การแพทย์โดยได้รายงานถึงอาการของผู้ที่ได้รับพิษ TTX ซึ่งจะแสดงอาการคือ ชาตามริมฝีปาก ลิ้น บริเวณใบหน้า ปลายนิ้วมือ คลื่นไส้ อาเจียน และมีอาการชาเพิ่มมากขึ้น รู้สึกอ่อนเพลีย แขนขาไม่มีแรง จนกระทั่งเดินหรือยืนไม่ได้ กล้ามเนื้อกระตุกคล้ายกับชัก มีอาการ ataxia พูดลำบากจนถึงพูดไม่ได้ ระยะนี้ผู้ป่วยยังรู้สึกตัว และเมื่อกล้ามเนื้อเป็นอัมพาต รู้สึกหายใจไม่สะดวก ต่อมาจะหมดสติ รูม่านตาขยาย ไม่มีปฏิกิริยาต่อแสง ความรุนแรงของการเกิดพิษ TTX นี้ขึ้นอยู่กับปริมาณของสารพิษที่ได้รับและระยะเวลาที่สารพาอยู่ในตัว ดังนั้น ถ้าไม่ได้รับการรักษาที่ถูกวิธี จะทำให้หัวใจหยุดเต้น และเสียชีวิตในที่สุด และในปัจจุบันยังไม่มียาแก้พิษ TTX ถ้าพิษได้รับการขับถ่ายทางไตจะทำให้ผู้ป่วยมีอาการดีในกรณีที่ได้รับพิษไม่มากนัก และที่ผ่านมามีชาวประมง 6 คนเสียชีวิตเนื่องจากกินปลาปักเป้าทะเลในเดือนมีนาคม 2544 นั้น ทางกรมวิทยาศาสตร์ทางการแพทย์ได้ส่งตัวอย่างชีววัตถุของชาวประมงทั้ง 6 คนมาทำการวิเคราะห์หาสาเหตุของการเสียชีวิตดังกล่าว ซึ่งเป็นการคาดการณ์เบื้องต้นว่ามีสาเหตุเนื่องมาจากพิษ TTX โดยตัวอย่างที่ส่งมาวิเคราะห์ประกอบด้วย ตับ ไต ปัสสาวะ และ เศษของเหลือในกระเพาะอาหาร ซึ่งได้ทำการสกัดพิษและทดสอบพิษในหนูทดลอง และยืนยันชนิดของพิษโดยใช้ HPLC ผลของการวิเคราะห์ด้วย HPLC ยืนยันได้ว่า พิษที่พบนั้นเป็นพิษ TTX ซึ่งพบสาร TTX ในตัวอย่างจากชาวประมง 5 คน จากทั้งหมด 6 คน ปริมาณของพิษที่ตรวจวัดได้จากตัวอย่างเศษอาหารที่เหลืออยู่ในกระเพาะอาหาร ซึ่งมีความเข้มข้นของพิษ 2.55 MU/g และพิษในไต 2.36 MU/g จากการตรวจหาสารพิษที่ตกค้างในผู้เสียชีวิตจากการรับประทานปลาปักเป้าโดยตรวจหาสาร TTX ในปัสสาวะและเลือดโดยใช้ C18 Sep-Pak cartridge column และ LC-MS พบว่า ในปัสสาวะและในน้ำเลือดมีสาร TTX อยู่โดยในน้ำปัสสาวะมีปริมาณ TTX สูงกว่าในน้ำเลือด (Tsai *et al*., 2006b)

เนื่องจากปลาปักเป้าเป็นปลาที่มีพิษอาจทำให้ผู้บริโภคได้รับอันตราย จนถึงขั้นเสียชีวิตได้ ดังนั้นจึงมีการควบคุมปัญหาที่เป็นอันตรายจากปลาปักเป้าในประเทศไทย โดยสำนักงานคณะกรรมการอาหารและยา (อย.) ได้ออกประกาศกระทรวงสาธารณสุข (ฉบับที่ 264) พ.ศ.2545 เรื่อง กำหนดอาหารที่ห้ามผลิต นำเข้า หรือจำหน่าย โดยกำหนดให้ปลาปักเป้าทุกชนิด และอาหารที่มีเนื้อปลาปักเป้าเป็นส่วนผสม เป็นอาหารห้ามผลิต นำเข้าหรือจำหน่าย (ณัฐคมพร ภานุรัตนะ, 2550) อย่างไรก็ตาม ปัจจุบันยังพบผู้เสียชีวิตจากการบริโภคเนื้อปลาปักเป้าและยังมีการลักลอบจำหน่ายเนื้อปลาปักเป้า

2.8 วิธีการตรวจหาสารพิษ TTX ในสัตว์น้ำ

สารชีวพิษมีความสำคัญต่อการดำรงชีวิตของมนุษย์ เมื่อได้รับสารเหล่านี้เข้าสู่ร่างกายจะมีผลต่อระบบต่างๆ เช่น สารในกลุ่ม paralytic shellfish poisons เช่น saxitoxin, neoxaxitoxin, gonyotoxin, tetrodotoxin ซึ่งเป็นพิษที่ออกฤทธิ์ต่อระบบประสาท ระบบกล้ามเนื้อ ระบบทางเดินหายใจ วิธีการในการตรวจหาสารเหล่านี้ ซึ่งมีหลายวิธีด้วยกันเช่น วิธี ELISA, HPLC, GC-MS และ LC-MS เป็นต้น Zhou และคณะ (2007) ได้ทำการตรวจสอบสารพิษโดยวิธี ELISA สามารถตรวจพบพิษที่ระดับต่ำสุดเท่ากับ 0.05 นาโนกรัม และขั้นตอนในวิเคราะห์ดังกล่าวใช้เวลา 1.8 ชั่วโมง ส่วน อัธยา กังสุวรรณ และคณะ (2533) ได้ใช้วิธี HPLC ในการตรวจหาสาร TTX จากอวัยวะของปลาปักเป้าพบว่า พบพิษ TTX ในตับและไข่ ของ *L. inermis* และในเนื้อของ *A. mappa* ซึ่งประกอบด้วย TTX และ อนุพันธ์คือ anhydro TTX นอกจากนี้ได้นำไข่ของแมงดาถ้วย ซึ่งมีพิษ TTX มาสกัดพิษและทำให้บริสุทธิ์จากนั้นนำไปวิเคราะห์ด้วย HPLC พบ TTX และพิษอัมพาต (PSP) บางชนิดด้วย (อัธยา กังสุวรรณ และคณะ, 2538) และ Lee และคณะ (2000) ได้รายงานการค้นพบแบคทีเรีย *Vibrio* LM-1 จากปลาปักเป้า ซึ่งเป็นแบคทีเรียที่สามารถสร้างสาร TTX ได้โดยใช้วิธี HPLC และวิธี gas chromatography-mass spectrometry (GC-MS) ในการตรวจหาสารพิษที่แบคทีเรียสร้างขึ้น ส่วน Noguchi และคณะ (2006a) ได้รายงานการวิเคราะห์สาร TTX ด้วยวิธี LC-MS ซึ่งสามารถตรวจหาสารพิษได้ 0.1 MU/g เช่นเดียวกับ Tsai และคณะ (2006b) ได้ทำการตรวจหาสารพิษ TTX ในปัสสาวะและเลือดของเหยื่อผู้เคราะห์ร้ายโดยใช้เครื่อง LC-MS และ GC-MS ในการตรวจหาสารพิษพบว่า LC-MS สามารถตรวจหาสารพิษชนิดนี้ได้แม้มีปริมาณต่ำมากแต่การวิเคราะห์ด้วย GC-MS ไม่สามารถใช้ตรวจหาสารพิษได้ทั้งเชิงคุณภาพและปริมาณ

วิธี LC-MS มีข้อดีในแง่ที่นำมาใช้กับสารที่มีขั้วสูง สารที่ไม่ระเหย และสารที่มีปริมาณต่ำได้ และให้ผลการวิเคราะห์ที่ถูกต้อง แม่นยำ สะดวก และรวดเร็ว จึงเป็นเทคนิคที่ได้รับการยอมรับอย่างกว้างขวางในแวดวงของงานวิเคราะห์และการตรวจสอบสารพิษ อย่างไรก็ตาม LC-MS ก็มีข้อจำกัดคือ ไม่สามารถให้ข้อมูลเกี่ยวกับระยะอะตอมในโมเลกุลได้ (ชุติมา ลิ้มมัทวาภิรัต์, 2548)

2.9 การดูแลรักษาผู้ป่วยที่ได้รับสารพิษ TTX และ STX (วินัย วนานุกูล, 2008)

ปัญหาที่สำคัญของผู้ป่วยโรคจากพิษสาร TTX และ STX คือทางเดินหายใจและการหายใจ เนื่องจากผู้ป่วยมีโอกาสสำลัก และการหายใจล้มเหลวได้ง่าย การดูแลรักษาแบบประคับประคองจึงเป็นสิ่งที่สำคัญมาก ขั้นตอนของการดูแลประกอบดังนี้

1. ประเมินทางเดินหายใจ (airway) ระยะแรกควรให้ผู้ป่วยงดการกินอาหารหรือน้ำทางปากก่อน หากผู้ป่วยมีอาการหนังตาตกมากขึ้น ภาพซ้อน กลืนลำบาก เสียงขึ้นจมูก หรือพูดไม่ชัดแสดงว่ามีโอกาสที่ผู้ป่วยเกิดการสำลักได้มาก ควรพิจารณาใส่ endotrachea tube แต่เนิ่นๆ

2. การหายใจ (breathing) ถ้าผู้ป่วยมีอาการหายใจลำบาก หายใจตื้น หายใจช้าหรือซึมลง ควรพิจารณาใส่เครื่องช่วยหายใจแก่ผู้ป่วยการใช้เครื่องตรวจวัด oxygen saturation ไม่ใช่การตรวจที่ไวพอในกรณีนี้

3. การลดการปนเปื้อนสารพิษ (decontamination) ถ้าผู้ป่วยมาถึงโรงพยาบาลภายใน 1 ชั่วโมงแรก อาจพิจารณาล้างท้อง และให้ผงถ่านกัมมันต์ (activated charcoal) 50 กรัม ทางสายกระเพาะอาหาร (nasogastric tube) แต่ถ้าเกินกว่านั้นควรพิจารณาให้ผงถ่านกัมมันต์เพียงอย่างเดียว

4. ผู้ป่วยที่มีความดันโลหิตต่ำควรให้สารน้ำ เช่น normal saline ถ้าประเมินภาวะสารน้ำในร่างกาย เช่นจาก central venous pressure (CVP) พบว่าเพียงพอ แต่ยังมีความดันโลหิตต่ำอยู่จึงพิจารณาให้ยากลุ่ม resopresser ยา norepinephrine อาจจะได้ผลดีกว่า dopamine ในกรณีนี้

5. โรคพิษจากสาร TTX และ STX ปัจจุบันนี้ยังไม่มียาที่ใช้ในการต้านพิษ แต่จะเป็นการรักษาแบบประคับประคองจนอาการของผู้ป่วยดีขึ้น

2.10 แนวทางในการป้องกันและการแก้ปัญหา

1. ความร้อนไม่สามารถทำลายสาร TTX และ STX ได้ การปรุงอาหารด้วยความร้อนจึงไม่ได้ลดความเสี่ยงในการเกิดโรค ไม่ควรกินอาหารจากสัตว์น้ำที่มีสารพิษชนิดนี้อยู่

2. ในประเทศญี่ปุ่นเนื้อปลาปักเป้าจัดเป็นอาหารที่คนนิยมกิน และมีความปลอดภัยระดับหนึ่งเนื่องจากการแล่เนื้อปลาปักเป้าจะทำได้โดยผู้ที่ได้รับใบอนุญาตเท่านั้น เพราะจะต้องผ่านการฝึกอบรมจนชำนาญที่จะไม่ทำให้พิษ TTX ซึ่งอยู่ในอวัยวะภายในและผิวหนังของปลาไปปนเปื้อนกับเนื้อปลา และที่สำคัญอีกประการหนึ่งคือ ผู้บริโภคปลารู้ว่าตัวเองกินปลาอะไร สามารถบอกญาติให้นำส่งโรงพยาบาลได้ทันทีเมื่อมีอาการมากขึ้น

3. ในประเทศไทยการแล่เนื้อปลาปักเป้าโดยคนงานที่ไม่ได้รับการฝึกอบรมให้ทราบถึงอันตราย และการขายไม่ได้แจ้งว่าเป็นปลาปักเป้า ส่วนไข่แมงดาถ้วยซึ่งอันตรายมักปะปนอยู่กับไข่แมงดาจานซึ่งกินได้ ผู้ป่วยจึงมักได้รับพิษโดยไม่รู้ตัวได้ (วินัย วนานุกูล, 2008)

4. ควรมีการศึกษาถึงชนิดสายพันธุ์ของปลาปักเป้าในประเทศไทย ความเป็นพิษของปลาปักเป้าแต่ละชนิด ขนาด ฤดูกาล และแหล่งที่ทำการประมงรวมทั้งศึกษาความเป็น

พิษของปลาปักเป้าที่ผ่านกระบวนการแปรรูป เพื่อลดความเสี่ยงที่จะนำปลาปักเป้ามาบริโภค และแนวทางการนำปลาปักเป้ามาใช้ประโยชน์อย่างปลอดภัย

5. พัฒนาเทคนิคในการตรวจวิเคราะห์สารพิษ ให้สะดวกรวดเร็วขึ้น เพื่อความสะดวกในการใช้งานสามารถช่วยเหลือผู้ได้รับพิษได้อย่างรวดเร็ว

6. ให้ความรู้กับชาวประมง เพื่อให้สามารถแยกแยะออกได้ว่าเป็นปลาปักเป้าสายพันธุ์ใด รับประทานได้หรือไม่ และบอกถึงอันตรายของสารพิษที่มีอยู่ในตัวปลาและหากนำไปแปรรูปจะมีอันตรายมากน้อยอย่างไร

3. วัตถุประสงค์

1. ทราบถึงระดับความเป็นพิษของสารพิษ TTX ต่อการเจริญเติบโต, สุขภาพ และการตกค้างของสารพิษ TTX ในกุ้งขาว

2. เพื่อเป็นแนวทางในการจัดการนำวัตถุดิบอาหารโดยเฉพาะปลาป่นมาใช้ในการผลิตอาหารสัตว์น้ำ ซึ่งเป็นการป้องกันการนำปลาปักเป้าป่นที่มีการปนเปื้อนสารพิษ TTX มาเป็นวัตถุดิบในการผลิตอาหารสัตว์น้ำ

บทที่ 2

วัสดุ อุปกรณ์ และวิธีการทดลอง

1 การทดลองที่ 1 การศึกษาผลของสารพิษ TTX ต่อการเจริญเติบโตและสุขภาพของกุ้งขาว

1.1 การเตรียมสัตว์ทดลอง และสารเคมี

1.1.1 การเตรียมกุ้งที่ใช้ในการทดลอง

ใช้กุ้งขาวสุขภาพแข็งแรง น้ำหนักเฉลี่ยเริ่มต้นประมาณ 1.5-3 กรัม จำนวน 600 ตัว จากสถานีวิจัยวาริชศาสตร์ คณะทรัพยากรธรรมชาติ อำเภอละงู จังหวัดสตูล

1.1.2 สารเคมี

1.1.2.1 สารเคมีสำหรับวิเคราะห์ส่วนประกอบทางโภชนาการของอาหารและสัตว์ทดลองแสดงในภาคผนวก

1.1.2.2 สารเคมีสำหรับการศึกษาด้านเนื้อเยื่อวิทยา (ภาคผนวก)

1.1.2.3 สารเคมีสำหรับการวิเคราะห์องค์ประกอบเลือด (ภาคผนวก)

1.1.2.4 สารพิษ Tetrodotoxin (sigma, 5651)

1.1.2.5 สารเคมีสำหรับวิเคราะห์คุณภาพน้ำ (ภาคผนวก)

1.1.3 อาหารสำหรับเลี้ยงกุ้งขาว

ใช้อาหารเม็ดสำเร็จรูปที่คำนวณได้จากสูตร โดยให้มีระดับคุณค่าทางโภชนาการเท่ากันทุกชุดการทดลอง

1.2 อุปกรณ์

1.2.1 อุปกรณ์ที่ใช้ในการเลี้ยงกุ้งสำหรับทดลอง

1.2.1.1 ถังไฟเบอร์กลาส ขนาดความจุ 3 ลูกบาศก์เมตร สำหรับหรับพักกุ้งไว้ก่อนเริ่มการทดลอง

1.2.1.2 ถังไฟเบอร์กลาส ขนาดความจุ 3 ลูกบาศก์เมตรและขนาดความจุ 1 ลูกบาศก์เมตรสำหรับพักน้ำทะเลและน้ำสำหรับใช้ในการทดลอง

1.2.1.3 อุปกรณ์ระบบให้อากาศ ประกอบด้วยเครื่องให้อากาศ ท่อลมสายยางใส และ หัวทราย

1.2.1.4 อุปกรณ์เปลี่ยนถ่ายน้ำ และทำความสะอาดถังเลี้ยงกุ้ง ได้แก่ สายยางใสสำหรับเปลี่ยนถ่ายน้ำ ฟองน้ำสำหรับล้างถังทดลอง

1.2.1.5 อุปกรณ์สำหรับเคลื่อนย้ายกุ้ง ได้แก่ สวิงช้อนกุ้ง และถังพลาสติก คลอรีน สำหรับฆ่าเชื้อปรสิตในน้ำทะเล

1.2.1.5 อุปกรณ์สำหรับวัดความเค็มน้ำทะเล ได้แก่ salinometer

1.2.2 อุปกรณ์เตรียมอาหารทดลอง

1.2.2.1 เครื่องมือผลิตอาหาร ยี่ห้อ Hobart mixer รุ่น A 200 T ที่ประกอบด้วยเครื่องผสมอาหารแบบมีใบพัด ชุดอัดเม็ดอาหาร

1.2.2.2 อุปกรณ์ชั่งตวงวัสดุอาหาร ได้แก่เครื่องชั่งไฟฟ้าทศนิยม 2 ตำแหน่ง ของ Satorius รุ่น Basic เครื่องชั่งไฟฟ้าทศนิยม 4 ตำแหน่ง ของ Satorius รุ่น Research กระบอกตวงน้ำ บีกเกอร์ขนาด 100 และ 500 ml ถาดใส่อาหาร และถุงพลาสติกบรรรจุวัตถุดิบยและอาหารทดลองที่เสร็จสิ้นกระบวนการผลิต

1.2.2.3 ตู้เย็นเพื่อเก็บอาหารทดลองในระหว่างการรอนำไปใช้

1.2.3 อุปกรณ์วิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมีของอาหารทดลองและสัตว์ทดลอง

1.2.3.1 อุปกรณ์วิเคราะห์ความชื้น ได้แก่ ตู้อบ (hot air oven) ของบริษัท Memmert โถดูดความชื้น (desiccator) เครื่องชั่งไฟฟ้า 3 ตำแหน่ง ถ้วยกระเบื้องเคลือบ (crucible)

1.2.3.2 อุปกรณ์วิเคราะห์โปรตีน ได้แก่ เครื่องย่อย (digestion apparatus) ของบริษัท Gerhardt รุ่น Kjeldatherm เครื่องกลั่น (distillation apparatus) ของ Gerhardt รุ่น Vapodest I หลอดย่อยโปรตีน (digestion tube) บีกเกอร์ กระบอกตวง ขวดรูปชมพู่ และบิวเรต กระดาษชั่งตัวอย่างปราศจากไนโตรเจน

1.2.3.3 อุปกรณ์วิเคราะห์ไขมัน ได้แก่ ชุดเครื่องมือวิเคราะห์ไขมัน รุ่น Soxtec System HT6 ไส้กรองสาร ถ้วยสกัดสาร ตู้อบ โถอบแห้ง เครื่องชั่งไฟฟ้า 3 ตำแหน่ง

1.2.3.4 อุปกรณ์วิเคราะห์เถ้า ได้แก่ ถ้วยกระเบื้องเคลือบ (crucible) เตาเผา (muffle furnace) ของ Gallenkamp โถดูดความชื้น (desiccator) เครื่องชั่งไฟฟ้า 3 ตำแหน่ง

1.2.4 อุปกรณ์สำสำหรับวิเคราะห์น้ำ

1.2.4.1 อุปกรณ์วัดค่าความเป็นกรดด่าง (pH) คือ เครื่อง pH meter

1.2.4.2 อุปกรณ์และเครื่องแก้วสำหรับวิเคราะห์ค่าความเป็นด่าง (alkalinity) ได้แก่ ขวดรูปชมพู่ บีกเกอร์ กระบอกตวง บิวเรต ปิเปต ลูกยาง และขวดเก็บตัวอย่างน้ำ

1.2.4.3 อุปกรณ์วัดอุณหภูมิน้ำ ได้แก่ เทอร์โมมิเตอร์

1.2.4.4 อุปกรณ์และเครื่องแก้วสำหรับวิเคราะห์ค่าออกซิเจนละลายน้ำ (OD) ได้แก่ ขวด BOD ขวดรูปชมพู่ กระบอกตวง ปิเปต ลูกยาง

1.2.5 อุปกรณ์วิเคราะห์องค์ประกอบเลือด

1.2.5.1 อุปกรณ์เก็บเลือดกุ้ง ได้แก่ เข็มขนาด 25G ยาว 1 นิ้ว และกระบอกฉีดยาพลาสติกขนาด 1 ml หลอดพลาสติก (microcentrifuge tube) ขนาด 1.5 ml

1.2.5.2 อุปกรณ์สำหรับวิเคราะห์ปริมาณโปรตีนในซีรัม (serum protein) ได้แก่ เครื่องหมุนเหวี่ยงที่ควบคุมอุณหภูมิได้ (Beckman, Avanti™ 30 centrifuge) สเปคโตรโฟโตมิเตอร์ (spectrophotometer) แท่งบดพลาสติก ไมโครปิเปต (eppandroft)

1.2.5.3 อุปกรณ์สำหรับนับเม็ดเลือด คือ กล้องจุลทรรศน์ ฮีมาไซโตมิเตอร์ (Haemacytometer) และเครื่องกดนับ (counter)

1.2.5.4 อุปกรณ์สำหรับวิเคราะห์ PO activity ได้แก่ 96 well plate ไมโครปิเปต ไมโครเซ็นตริฟิวซ์ (microcentrifuge tube) microplate reader

1.2.5.5 อุปกรณ์สำหรับวิเคราะห์เอมไซม์ Acetlycholinesterase ได้แก่ QuantiChrom™Acetylcholenesterase Assay Kit (BioAssay Symtem, DACE-100)

1.2.5.6 อุปกรณ์สำหรับวิเคราะห์เอ็มไซม์ Lactate dehydrogenase ได้แก่ ชุดทดสอบ เอนไซม์ D-Lactic dehydrogenase (Sigma, L-2011)

1.2.6 อุปกรณ์ที่ใช้ศึกษาการเปลี่ยนแปลงพยาธิสภาพของเนื้อเยื่อ

1.2.6.1 ชุดอุปกรณ์ผ่าตัด ได้แก่ มีดผ่าตัด กรรกไกร ที่คีบ

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

1.2.6.3 เครื่องตัดชิ้นเนื้อเยื่อคือ ไมโครโตม (microtome) (Jung AG Heidelberg) ใบมีดตัดเนื้อเยื่อ (Leica, Disposable Microtome Blades) อ่างน้ำอุ่น (warm bath) และสไลด์

1.2.6.4 อุปกรณ์สำหรับเตรียมสไลด์ถาวร คือ ตู้อบควบคุมอุณหภูมิ (Sunyo, Program Oven) ชุดสำหรับใส่สีย้อม และแผ่นปิดสไลด์

1.2.6.5 เครื่องเอ็มเบดดิ้ง (embedding center)

1.2.6.6 เตาร้อน (hot plate)

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

1.2.7 อุปกรณ์สำหรับตรวจสอบการเจริญเติบโตของกุ้งประกอบด้วย

1.2.7.1 เครื่องชั่งไฟฟ้าทศนิยม 2 ตำแหน่ง

1.2.7.2 ถังพลาสติกขนาด 5 ลิตร

1.2.7.3 กะละมังพลาสติก

1.2.7.4 สวิงช้อนกุ้ง

1.2.7.5 กล่องพลาสติก

1.2.7.6 ผ้าขนหนูซับตัวกุ้ง

1.3 วิธีการทดลอง

1.3.1 แผนการทดลอง

วางแผนการทดลองแบบสุ่มตลอด (Completely randomized design, CRD) เริ่มต้นการทดลองโดยชั่งน้ำหนักกุ้งขาว สุ่มกุ้งให้มีน้ำหนักในช่วง 3-4 กรัมต่อตัว โดยแบ่งการทดลองออกเป็น 3 ชุดการทดลอง (treatments) แต่ละชุดการทดลองมี 4 ซ้ำ (replication) ๆ ละ 20 ตัว ให้อาหารวันละ 4 มื้อ เวลา 8.00, 12.00, 15.00 และ 20.00 น. สังเกตปริมาณอาหารที่

กุ้งกิน เพื่อนำไปปรับปริมาณอาหารมื้อต่อไป ชั่งและบันทึกน้ำหนักอาหารที่ให้ทุกวัน ชั่งน้ำหนักทุก 2 สัปดาห์ สุ่มกุ้งชุดการทดลองละ 5 ตัวมาชั่งน้ำหนักด้วยเครื่องชั่งทศนิยม 2 ตำแหน่ง และเมื่อครบสัปดาห์ที่ 6 ทำการชั่งน้ำหนักกุ้งที่หมดเพื่อเปรียบเทียบการเจริญเติบโตในแต่ละชุดการทดลอง เลี้ยงกุ้งต่อไปอีก 3 วัน จากนั้นสุ่มเก็บตัวอย่างกุ้งทั้งหมดของแต่ละชุดการทดลอง ๆ ละ 8 ตัว เพื่อศึกษาองค์ประกอบเลือด การศึกษาปริมาณแร่ธาตุในเลือดจำนวน 4 ตัวต่อชุดการทดลอง สำหรับการศึกษาการเปลี่ยนแปลงทางเนื้อเยื่อกุ้งขาวใช้กุ้งขาวที่ได้จากการเก็บเลือดแล้วชุดการทดลองละ 4 ตัว ส่วนการศึกษาองค์ประกอบทางโภชนาการในตัวกุ้ง ใช้กุ้งที่ทำการเก็บเลือดแล้ว 4 ตัว ส่วนการศึกษากิจกรรมของเอนไซม์ acetylcholinesterase (AChE) และกิจกรรมของเอนไซม์ lactate dehydrogenase (LDH) ใช้กุ้งขาว 8 ตัวต่อชุดการทดลอง ส่วนการศึกษาการตกค้างของสารพิษใช้กุ้งขาวชุดการทดลองละ 12 ตัว ชุดการทดลองแต่ละชุดแบ่งตามระดับความเข้มข้นของสารพิษ TTX 2 ระดับ (2.5 และ 5 ppm) รวมชุดควบคุม (0 ppm) เมื่อสิ้นสุดการทดลองเปรียบอัตราการเจริญเติบโต การเปลี่ยนแปลงขององค์ประกอบเลือดและเนื้อเยื่อระหว่างชุดการทดลอง

1.3.2 การเตรียมสัตว์ที่ใช้ในการทดลอง

นำมาพักไว้ในถังไฟเบอร์ขนาด 3 ตัน เลี้ยงด้วยอาหารสำเร็จรูปเชิงการค้า 2 สัปดาห์ จากนั้นแล้วคัดขนาดให้มีน้ำหนักใกล้เคียงกันใส่ในถังทดลอง ถังละ 30 ตัว เลี้ยงต่อด้วยอาหารสำเร็จรูปเชิงการค้า 1 สัปดาห์ เพื่อให้กุ้งปรับตัวเข้ากับสภาพแวดล้อมที่ใช้ในการทดลอง ก่อนเริ่มการทดลองทำการตรวจสอบสุขภาพของกุ้งโดยการเช็คเชื้อแบทที่เรียภายนอกและภายใน แล้วทำการคัดกุ้งขาวที่มีสุขภาพแข็งแรงลงถังทดลอง โดยให้มีขนาดอยู่ระหว่าง 3-4 กรัม ใส่ในถังทดลอง จำนวน 20 ตัวต่อถัง จำนวน 12 ถัง

1.3.3 การเตรียมน้ำสำหรับใช้ในการทดลอง

ใช้ถังพลาสติกขนาดความจุน้ำ 200 ลิตร (หน่วยทดลอง) ระบบน้ำที่ใช้เลี้ยงเป็นแบบระบบเปิด มีการเปลี่ยนถ่ายน้ำทุกวัน ใช้น้ำทะเลความเค็ม 10-15 ppt อุณหภูมิ 28-29 องศาเซลเซียส ติดตั้งอุปกรณ์ให้อากาศ น้ำทะเลที่ใช้นำมาพักไว้ในถังไฟเบอร์ขนาด 3 ตัน กำจัดปรสิตที่ปนเปื้อนมากับน้ำโดยใช้คลอรีนความเข้มข้น 30 ppm พักไว้ 2-3 วัน จึงนำมาใช้ตรวจสอบคลอรีนในน้ำโดยใช้โพแทศเซียมไอโอไดด์ (KI) นำน้ำที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้วเติมในถังทดลองให้ได้ปริมาตร 150 ลิตร น้ำ ดูดตะกอนและอาหารที่เหลือทุกวันก่อนให้อาหาร เปลี่ยนถ่ายน้ำทุกวัน

1.3.4 การเตรียมอาหารทดลอง

การทดลองทั้ง 2 การทดลองใช้สูตรอาหารเดียวกัน โดยสูตรอาหารที่ใช้เลี้ยงกุ้งทดลองแตกต่างกันตามระดับความเข้มข้นของสารพิษ เริ่มโดยคำนวณสูตรอาหารให้มีระดับคุณค่าทางโภชนาการเท่ากันทุกชุดการทดลอง แต่ละสูตรมีระดับโปรตีน 35 เปอร์เซ็นต์ ไขมัน 8 เปอร์เซ็นต์ แต่มีระดับสารพิษแตกต่างกัน 2 ระดับคือ 2.5 และ 5 ppm ส่วนในชุดควบคุมไม่ใส่สารพิษ สารพิษ TTX ที่ใช้ในการทดลองเป็นสารพิษบริสุทธิ์ 99.98 เปอร์เซ็นต์ ของบริษัท Sigma (T5651) ซึ่งขั้นตอนในการเตรียมอาหารทดลองมีดังนี้

1 นำวัตถุดิบที่จะนำมาใช้ในการทดลองไปวิเคราะห์คุณค่าทางโภชนาการตามวิธีการของ AOAC (1990) จากนั้นจึงสร้างสูตรอาหาร โดยคำนวณอาหารทดลองทุกสูตรให้มีระดับของโปรตีน ไขมัน ที่เท่ากันและกำหนดให้มีระดับของสารพิษที่แตกต่างกันคือ 0, 2.5 และ 5 ppm ตามลำดับ (ภาคผนวก)

2 ชั่งวัตถุดิบอาหารที่ร่อนผ่านตะแกรง ขนาด 30 เมช (mesh) ชั่งวัตถุดิบทั้งหมดตามอัตราส่วนที่ต้องการ ส่วนน้ำมันปลา วิตตามิน และแร่ธาตุแยกใส่ถุงพลาสติกไว้ใช้ในแต่ละชุดการทดลอง ตามสูตรที่คำนวณไว้ ด้วยเครื่องชั่งไฟฟ้าที่มีความละเอียด 2 ตำแหน่ง

3 นำวิตามินผสม แร่ธาตุผสม แป้งสาลี ตามที่คำนวณไว้ในแต่ละสูตรอาหารผสมให้เข้ากันอย่างทั่วถึงในถุงพลาสติกใส

4 นำวัตถุดิบที่ได้ในข้อ 3.4.3 ลงผสมในปลาป่นผสมให้เข้ากันให้วัตถุดิบมีเป็นเนื้อเดียวกันมากที่สุด จากนั้นนำวัตถุดิบที่ได้เข้าเครื่องผสมอาหาร Hobart mixer รุ่น A 200 T ผสมให้เข้ากันประมาณ 10 นาที จากนั้นเติมน้ำมันปลาผสมเลซิตินลงไปผสมให้เข้ากัน

5 นาที การผสมสารพิษในอาหารทำโดยการนำวัตถุดิบที่คำนวณไว้ผสมให้เข้ากัน จากนั้นจึงนำสารพิษ TTX มาละลายกับน้ำที่ใช้ในการผสมอาหาร โดยละลายสารพิษให้เป็นเนื้อเดียวกันจากนั้นจึงค่อยๆ เทน้ำที่สารพิษอยู่ลงไปผสมในอาหาร เมื่อผสมจนเข้ากันดีแล้ว โดยน้ำที่ใช้เป็นน้ำที่มีสารพิษ tetrodotoxin ละลายอยู่ ผสมจนวัตถุดิบอาหารผสมเป็นเนื้อเดียวกัน

6 นำวัตถุดิบอาหารที่ผสมกันดีเข้าเครื่องอัดเม็ดอาหาร ผ่านหน้าแว่นที่มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 2 มิลลิเมตร โดยตัดเม็ดอาหารให้มีขนาดใกล้เคียงกัน โดยตัดให้มีขนาดที่เหมาะสมกับขนาดที่กุ้งกินตลอดการทดลอง

7 นำอาหารที่เตรียมเสร็จแล้วอบที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส จนแห้งพอดี บรรจุในถุงพลาสติกแล้วเก็บรักษาไว้ในตู้เย็นที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส (วุฒิพร พรหมขุนทอง และคณะ, 2540) นำอาหารทดลองไปตรวจสอบคุณค่าทางโภชนาการของสูตรอาหาร (โปรตีน ไขมัน ความชื้น และเถ้า) ด้วยการวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมีของอาหารที่เตรียมตามวิธีมาตรฐานของ AOAC (1996)

1.3.5 การเตรียมสารพิษ TTX

คำนวณปริมาณสารพิษ TTX ที่ใช้เพื่อให้ได้ระดับความเข้มข้นต่างกัน 2 ระดับ คือ 2.5 และ 5 ppm เริ่มโดยนำสารพิษบริสุทธิ์ 99.98 เปอร์เซ็นต์ ที่บรรจุอยู่ในขวดขนาด 1 mg (น้ำหนักสาร) สูตรที่มีความเข้มข้น 2.5 ppm ใช้สารพิษ 1.5 mg ส่วนสูตรที่เหลือใช้สารพิษ 3 mg คำนวณปริมาตรน้ำที่ใช้ในการทำอาหารทั้งหมดในแต่ละสูตร จากนั้นดึงน้ำที่คำนวณไว้แล้วมาเติมน้ำ 1 ml ลงไปในขวดเขย่าให้สารละลายจนหมดทำการล้างขวดสาร 5 ครั้ง โดยใช้น้ำเดิมเพื่อให้แน่ใจว่าไม่มีสารพิษตกค้างอยู่ในขวด

ตารางที่ 3 คุณค่าทางโภชนาการและระดับของสารพิษในอาหารทดลอง[1]

องค์ประกอบทางเคมี	ชุดควบคุม	ชุดการทดลองที่ 2	ชุดการทดลองที่ 3
โปรตีน (%)	35.06±0.32[a]	35.38±0.12[a]	35.32±0.61[a]
ไขมัน (%)	8.603±0.58[a]	8.712±0.58[a]	8.829±0.55[a]
เถ้า (%)	7.442±0.2[a]	7.210±0.47[a]	7.530±0.11[a]
TTX (mg/kg)	0	2.5	5

[1] ตัวเลขที่นำเสนอเป็นค่าเฉลี่ย±ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน (จากการวิเคราะห์ตัวอย่าง 3 ซ้ำ)
ค่าเฉลี่ยในสดมภ์ที่มีอักษรเหมือนกันกำกับ ไม่มีความแตกต่างทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์ ($p>0.05$)

1.3.6 การเก็บรวบรวมข้อมูล

1.3.6.1 การตรวจสอบพฤติกรรมและลักษณะที่แสดงออกภายนอกของกุ้งขาว

ตลอดระยะเวลาทดลอง สังเกตพฤติกรรมที่ผิดปกติและลักษณะภายนอกที่แสดงออก ได้แก่ พฤติกรรมการกินอาหาร สีของลำตัว ลักษณะลำตัว การลอกคราบ และระยางค์ต่างๆ ผิดปกติหรือไม่ รวมทั้งอวัยวะภายนอกอื่นๆ ของกุ้งทุกชุดการทดลอง

1.3.6.2 การตรวจสอบการเจริญเติบโตและอัตราการรอดตายของกุ้งขาว

ชั่งน้ำหนักกุ้งทุก 2 สัปดาห์ โดยชั่งน้ำหนักรวมของกุ้งแต่ละซ้ำด้วยเครื่องชั่งไฟฟ้าทศนิยม 2 ตำแหน่ง นับจำนวนกุ้งที่เหลืออยู่ จนสิ้นสุดการทดลอง สังเกตลักษณะ

อาการกุ้งตลอดการทดลอง พร้อมทั้งจดบันทึกข้อมูลไว้จนสิ้นสุดการทดลอง 6 สัปดาห์ นำข้อมูลที่ได้มาคำนวณ

- น้ำหนักเฉลี่ยต่อตัว (average weight) (ภาคผนวก)
- น้ำหนักที่เพิ่มขึ้น (% weight gain) ตามวิธีการของ Jantrarotai และคณะ (1994) (ภาคผนวก)
- อัตราการเจริญเติบโตจำเพาะ (% specific growth rate, SGR) ตามวิธีการของ Jantrarotai และคณะ (1994)
- อัตราการเปลี่ยนอาหารเป็นเนื้อ (feed conversion rate, FCR) ตามวิธีการของ Dupree และ Sneed (1966)
- ปริมาณอาหารที่กุ้งกิน (feed consumption) (ภาคผนวก)
- อัตราการรอดตาย (survival rate) ตามวิธีการของ Nankervis และคณะ (2000)

1.3.6.3 การศึกษาองค์ประกอบเลือด

เก็บตัวอย่างกุ้งในสัปดาห์ที่ 6 โดยสุ่มกุ้งจากทุกชุดการทดลองๆ ละ 8 ตัว เพื่อศึกษาองค์ประกอบเลือด ได้แก่

- ปริมาณเม็ดเลือดรวมทั้งหมด (Total hemocytes count) โดยใช้วิธีการของ กิจการ ศุภมาตย์ และสิทธิ บุณยรัตผลิน (2538)
- การวิเคราะห์กิจกรรมเอนไซม์ฟีนอลออกซิเดส(phenoloxidase activity) โดยวิธีดัดแปลงจาก Smith และ Soderhall (1983)
- ระดับกลูโคสในน้ำเลือด (กิจการ ศุภมาตย์ และคณะ (2543)
- ปริมาณโปรตีนในซีรัมวิธีดัดแปลงจาก Lowry และคณะ (1951) ที่ดัดแปลงโดย กิจการ ศุภมาตย์ และคณะ (2543)
- อัตราส่วนระหว่าง Oxyhemoxycanin/hemolymph protein (กิจการ ศุภมาตย์ และคณะ (2543)
- ระดับแร่ธาตุในน้ำเลือด ส่งตัวอย่างวิเคราะห์ที่ศูนย์เครื่องมือกลาง คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์

1.3.6.4 การศึกษาการเปลี่ยนแปลงทางเนื้อเยื่อวิทยา

เก็บตัวอย่างเนื้อเยื่อของกุ้งกุลาดำในสัปดาห์ที่ 6 จำนวน 4 ตัว จากแต่ละชุดการทดลอง เพื่อศึกษาการเปลี่ยนแปลงทางเนื้อเยื่อวิทยา ตามวิธีของ Bell และ Lightner

(1988) โดยฉีดน้ำยาเดวิดสันบริเวณหัวใจ ตับและตับอ่อน ส่วนหัว และกล้ามเนื้อลำตัวให้ทั่ว แล้วตัดส่วนหัวกุ้งออกเป็นสองซีก นำกล้ามเนื้อลำตัวดองในขวดที่บรรจุน้ำยาเดวิดสัน ให้น้ำยาท่วมตัวอย่างเป็นเวลา 72 ชั่วโมง เพื่อให้น้ำยาดองซึมเข้าสู่เนื้อเยื่อได้ทั่วถึง ตัวอย่างที่นำมาศึกษาการเปลี่ยนแปลงทางเนื้อเยื่อ คือ เนื้อเยื่อตับอ่อน (hepatopancreatic tissue) เนื้อเยื่อน้ำเหลือง (lymphoid cell) เหงือก (gill) เนื้อเยื่อสร้างเม็ดเลือด (hemopoietic tissue) และกล้ามเนื้อ (muscle) หลังจาก 72 ชั่วโมง เปลี่ยนเป็นแอลกอฮอล์ 50 เปอร์เซ็นต์ 24 ชั่วโมง หลังจากนั้นเปลี่ยนเป็นแอลกอฮอล์ 7 0 เปอร์เซ็นต์ นำไปผ่านขั้นตอนการเตรียมเนื้อเยื่อตามวิธีมาตรฐานของ Humason (1979) โดยใช้เครื่อง automatic tissue processor ซึ่งเป็นการผ่านแอลกอฮอล์ระดับความเข้มข้นต่าง ๆ จาก 70 ถึง 100 เปอร์เซ็นต์ เพื่อดึงน้ำออกจากเซลล์แล้วผ่านไอโซ โพรพิลและไซลีน หลังจากนั้นนำเนื้อเยื่อมาผ่านขึ้นตอนการฝังชิ้นเนื้อลงในพาราพลาส (embedding) แล้วตัดเนื้อเยื่อด้วยเครื่องไมโครโตม ให้มีความหนาประมาณ 3-5 ไมครอน ย้อมสีฮีมาทอกไซลินและอีโอซิน Hematoxylin & Eosin (H&E) (Bancroft, 1967) จากนั้นนำตัวอย่างมาตรวจสอบการเปลี่ยนแปลงของเนื้อเยื่อโดยกล้องจุลทรรศน์ธรรมดา (Olympus AX 70) และบันทึกภาพโดยกล้องถ่ายภาพดิจิตอล Olympus DP-10

1.3.6.5 การศึกษาการตกค้างของสารพิษในตัวกุ้งขาว

เก็บตัวอย่างกุ้งในสัปดาห์ที่ 6 จำนวน 12 ตัว จากแต่ละชุดการการทดลอง จากนั้นนำไปอบให้แห้งที่อุณหภูมิ 80 องศาเซลเซียล จนแห้งจากนั้นนำมาบดให้ละเอียดแล้วส่งวิเคราะห์หาสารตกค้างโดย LC-MS/MS ที่สำนักงานอาหารและความปลอดภัย กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ กระทรวงสาธารณสุข จังหวัดนนทบุรี

1.3.7 การวิเคราะห์ข้อมูล

วิเคราะห์ข้อมูลโดยใช้การวิเคราะห์ความแปรปรวน ANOVA แบบ CRD (Steel and Torrie, 1980) และเปรียบเทียบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยด้วยวิธี Duncan’s Multiple Range Test (Duncan, 1955)

2.การทดลองที่ 2 : การฟื้นตัวของกุ้งขาวหลังจากได้รับสารพิษ TTX

2.1 สารเคมี

1.2.1 สารเคมีสำหรับการศึกษาด้านเนื้อเยื่อวิทยา (ภาคผนวก)

1.2.2 สารเคมีสำหรับการวิเคราะห์องค์ประกอบเลือด (ภาคผนวก)

1.2.3 สารพิษ Tetrodotoxin (sigma, 5651)

1.2.4 สารเคมีสำหรับวิเคราะห์คุณภาพน้ำ (ภาคผนวก)

2.2 อุปกรณ์

2.2.1 อุปกรณ์ที่ใช้ในการเลี้ยงกุ้งสำหรับทดลอง

2.2.1.1 ถังไฟเบอร์กลาส ขนาดความจุ 3 ลูกบาศก์เมตรและขนาดความจุ 1 ลูกบาศก์เมตรสำหรับพักน้ำทะเลและน้ำสำหรับใช้ในการทดลอง

2.2.1.2 อุปกรณ์ระบบให้อากาศ ประกอบด้วยเครื่องให้อากาศ ท่อลม สายยางใส และ หัวทราย

2.2.1.3 อุปกรณ์เปลี่ยนถ่ายน้ำ และทำความสะอาดถังเลี้ยงกุ้ง ได้แก่ สายยางใสสำหรับเปลี่ยนถ่ายน้ำ ฟองน้ำสำหรับล้างถังทดลอง

2.2.1.4 อุปกรณ์สำหรับเคลื่อนย้ายกุ้ง ได้แก่ สวิงช้อนกุ้ง และถังพลาสติก คลอรีน สำหรับฆ่าเชื้อปรสิตในน้ำทะเล

2.2.1.5 อุปกรณ์สำหรับวัดความเค็มน้ำทะเล ได้แก่ salinometer

2.3 วิธีการทดลอง

2.3.1 แผนการทดลอง

วางแผนการทดลองแบบสุ่มตลอด (Completely randomized design, CRD) เพื่อดูการกำจัดสารพิษออกจากร่างกาย โดยนำกุ้งที่เหลือจากการทดลองที่ 1 มาชุดการทดลองละ 20 ตัว ให้อาหารวันละ 4 มื้อ เวลา 8.00, 12.00, 15.00 และ 20.00 น หลังจากครบ 2 สัปดาห์ สุ่มเก็บตัวอย่างกุ้งทั้งหมดของแต่ละชุดการทดลอง ๆ ละ 8 ตัว เพื่อศึกษาองค์ประกอบเลือด การศึกษาปริมาณแร่ธาตุในเลือดจำนวน 4 ตัวต่อชุดการทดลอง สำหรับการศึกษาการ

เปลี่ยนแปลงทางเนื้อเยื่อกุ้งขาวใช้กุ้งขาวที่ได้จากการเก็บเลือดแล้ว ชุดการทดลองละ 4 ตัว ส่วนการศึกษาองค์ประกอบทางโภชนาการในตัวกุ้ง ใช้กุ้งที่ทำการเก็บเลือดแล้ว 4 ตัว ส่วนการศึกษาเอนไซม์ AChE และ LDH ใช้กุ้งขาว 6 ตัวต่อชุดการทดลอง ส่วนการศึกษาการตกค้างของสารพิษใช้กุ้งขาวชุดการทดลองละ 6 ตัว

2.3.2 การเตรียมอุปกรณ์การทดลอง

ศึกษาความสามารถในการฟื้นตัวของกุ้งขาวหลังจากได้รับสารพิษ TTX โดยถังพลาสติกขนาดความจุน้ำ 200 ลิตร (หน่วยทดลอง) ระบบน้ำที่ใช้เลี้ยงเป็นแบบระบบเปิด มีการเปลี่ยนถ่ายน้ำทุกวัน ใช้น้ำทะเลความเค็ม 10-15 ppt อุณหภูมิ 28-29 องศาเซลเซียส ติดตั้งอุปกรณ์ให้อากาศ น้ำทะเลที่ใช้นำมาพักไว้ในถังไฟเบอร์ขนาด 3 ตัน กำจัดปรสิตที่ปนเปื้อนมากับน้ำโดยใช้คลอรีนความเข้มข้น 30 ppm พักไว้ 2-3 วัน จึงนำมาใช้ ตรวจสอบคลอรีนในน้ำโดยใช้โพแทศเซียมไอโอไดด์ (KI) นำน้ำที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้วเติมในถังทดลองให้ได้ปริมาตร 150 ลิตร ดูดตะกอนและอาหารที่เหลือทุกวันก่อนให้อาหาร เปลี่ยนถ่ายน้ำทุกวัน

2.3.3 การเตรียมกุ้งทดลอง

นำกุ้งที่เหลือจากการทดลองที่ 1 มาชุดการทดลองละ 20 ตัว มาเลี้ยงต่อด้วยอาหารชุดควบคุมเป็นเวลา 2 สัปดาห์

2.3.4 ขั้นตอนในการเตรียมอาหารทดลอง

นำวัตถุดิบที่จะนำมาใช้ในการทดลองไปวิเคราะห์คุณค่าทางโภชนาการตามวิธีการของ AOAC (1990) จากนั้นจึงสร้างสูตรอาหาร โดนคำนวณอาหารทดลองทุกสูตรให้มีระดับของโปรตีน ไขมัน ที่เท่ากัน โดยมีขั้นตอนและวิธีการเดียวกันกับการทดลองที่ 1

2.3.5 การเก็บรวบรวมข้อมูล

2.3.5.1 การศึกษาองค์ประกอบเลือด

เก็บตัวอย่างกุ้ง ในสัปดาห์ที่ 2 โดยสุ่มกุ้งจากทุกชุดการทดลอง ๆ ละ 8 ตัว เพื่อศึกษาองค์ประกอบเลือด ได้แก่

- ปริมาณเม็ดเลือดรวมทั้งหมด (Total hemocytes count) โดยใช้วิธีการของกิจการ ศุภมาตย์ และสิทธิ บุณยรัตผลิน (2538)

- การวิเคราะห์กิจกรรมเอนไซม์ฟีนอลออกซิเดส (phenoloxidase activity) โดยวิธีดัดแปลงจาก Smith และ Soderhall (1983)

- ระดับกลูโคสในน้ำเลือด (กิจการและคณะ (2543)

- ปริมาณโปรตีนในซีรัมวิธีดัดแปลงจาก Lowry และคณะ (1951) ที่ดัดแปลงโดยกิจการและคณะ (2543)

- อัตราส่วนระหว่าง Oxyhemoxycanin/hemolymph protein (กิจการและคณะ (2543)

- ระดับแร่ธาตุในน้ำเลือด ส่งตัวอย่างวิเคราะห์ที่ศูนย์เครื่องมือกลาง คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์

2.3.5.2 การศึกษาระดับของเอนไซม์ Acetylcholinesterase ในระบบประสาท

เก็บตัวอย่างเส้นประสาทของกุ้งตั้งแต่ส่วนหัวไปจนปล้องสุดท้ายของลำตัว โดยสุ่มกุ้งชุดการทดลองละ 6 ตัว โดยชุดทดสอบ QuatiChrom™Acetylcholenesterase Assay Kit

2.3.5.3 การศึกษาระดับของเอนไซม์ Lactate dehydrogenase

เก็บตัวอย่างกล้ามเนื้อของกุ้งบริเวณปล้องที่ 6 โดยชุดทดสอบ ได้แก่ ชุดทดสอบ เอนไซม์ D-Lactic dehydrogenase (Sigma, L-2011)

2.3.5.4 การศึกษาการเปลี่ยนแปลงทางเนื้อเยื่อวิทยา

เก็บตัวอย่างเนื้อเยื่อของกุ้งกุลาดำในสัปดาห์ที่ 2 จำนวน 4 ตัว จากแต่ละชุดการทดลอง เพื่อศึกษาการเปลี่ยนแปลงทางเนื้อเยื่อวิทยา ตามวิธีของ Bell และ Lightner (1988) โดยฉีดน้ำยาเดวิดสันบริเวณหัวใจ ตับ ส่วนหัว และกล้ามเนื้อให้ทั่วลำตัว แล้วตัดส่วนหัวกุ้งออกเป็นสองซีก นำกล้ามเนื้อลำตัวดองในขวดที่บรรจุน้ำยาเดวิดสัน ให้น้ำยาท่วมตัวอย่างเป็นเวลา 72 ชั่วโมง เพื่อให้น้ำยาดองซึมเข้าสู่เนื้อเยื่อได้ทั่วถึง ตัวอย่างที่นำมาศึกษาการเปลี่ยนแปลงทางเนื้อเยื่อ คือ เนื้อเยื่อตับอ่อน (hepatopancreatic tissue) เนื้อเยื่อน้ำเหลือง

(lymphoid cell) เหงือก (gill) เนื้อเยื่อสร้างเม็ดเลือด (hemopoietic tissue) และกล้ามเนื้อ (muscle) หลังจาก 72 ชั่วโมง เปลี่ยนเป็นแอลกอฮอล์ 50 เปอร์เซ็นต์ 24 ชั่วโมง หลังจากนั้นเปลี่ยนเป็นแอลกอฮอล์ 70 เปอร์เซ็นต์ นำไปผ่านขั้นตอนการเตรียมเนื้อเยื่อตามวิธีมาตรฐานของ Humason (1979) โดยใช้เครื่อง automatic tissue processor ซึ่งเป็นการผ่านแอลกอฮอล์ระดับความเข้มข้นต่าง ๆ จาก 70 ถึง 100 เปอร์เซ็นต์ เพื่อดึงน้ำออกจากเซลล์แล้วผ่านไอโซโพรพิลและไซลีน หลังจากนั้นนำเนื้อเยื่อมาผ่านขั้นตอนการฝังชิ้นเนื้อลงในพาราพลาส (embedding) แล้วตัดเนื้อเยื่อด้วยเครื่องไมโครโตม ให้มีความหนาประมาณ 3-5 ไมครอน ย้อมสีฮีมาทอกไซลินและอีโอซิน Hematoxylin & Eosin (H&E) (Bancroft, 1967) จากนั้นนำตัวอย่างมาตรวจสอบการเปลี่ยนแปลงของเนื้อเยื่อโดยกล้องจุลทรรศน์ธรรมดา (Olympus AX 70) และบันทึกภาพโดยกล้องถ่ายภาพดิจิตอล Olympus DP-10

2.3.5.5 การศึกษาสารตกค้างในตัวกุ้งขาว

เก็บตัวอย่างกุ้งในสัปดาห์ที่ 6 จำนวน 6 ตัว จากแต่ละชุดการทดลอง จากนั้นนำไปอบให้แห้งที่อุณหภูมิ 80 องศาเซลเซียล จนแห้งจากนั้นนำมาบดให้ละเอียดแล้วส่งวิเคราะห์หาสารตกค้างโดย LC-MS/MS ที่สำนักงานอาหารและความปลอดภัย กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ กระทรวงสาธารณะสุข จังหวัดนนทบุรี

2.3.6 การวิเคราะห์ข้อมูล

วิเคราะห์ข้อมูลโดยใช้การวิเคราะห์ความแปรปรวน ANOVA แบบ CRD (Steel and Torrie, 1980) และเปรียบเทียบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยด้วยวิธี Duncan' Multiple Range Test (Duncan, 1955)

บทที่ 3

ผลการทดลอง

1. การทดลองที่ 1 ผลของสารพิษ TTX ต่อการเจริญเติบโตและสุขภาพของกุ้งขาว

1.1 ระดับของสารพิษในอาหารทดลอง

จากการวิเคราะห์ปริมาณของสารพิษ TTX ที่มีอยู่ในอาหารพบว่าเมื่อนำไปหาปริมาณสารด้วยวิธี LC-MS/MS พบว่า ระดับของสารพิษ TTX ในอาหารมีปริมาณต่ำกว่าที่กำหนด ดังที่แสดงในตารางที่ 4

ตารางที่ 4 ระดับสารพิษ TTX ที่ผสมในอาหาร

ชุดการทดลอง	ระดับของสารพิษ TTX (mg/kg อาหาร)	
	ปริมาณที่ผสมลงในอาหาร (mg/kg)	ปริมาณที่วิเคราะห์ได้ในอาหาร (mg/kg)
T1 (TTX 0 ppm)	0	*
T2 (TTX 2.5 ppm)	2.5	2.14
T3 (TTX 5 ppm)	5	3.45

*ไม่พบสารพิษ TTX ในอาหารทดลอง

1.2. พฤติกรรมและความผิดปกติของกุ้งขาวหลังจากได้รับสาร TTX

หลังจากกุ้งขาวได้รับอาหารที่ผสมสาร TTX เป็นระยะเวลา 2 สัปดาห์ พบว่ากุ้งที่ได้รับอาหารผสม TTX 2.5 และ 5 ppm มีพฤติกรรมในการเข้ามากินอาหารช้าลงตลอดจนสิ้นสุดการทดลอง และในสัปดาห์ที่ 2 ของการทดลองพบว่า กุ้งที่ได้รับสารพิษ TTX ระดับ 5 ppm เริ่มมีการตายเกิดขึ้น ส่วนความผิดปกติของลักษณะภายนอกเช่น การกร่อนของรยางค์และแพนหาง ไม่พบในกุ้งขาวทั้ง 3 ชุดการทดลอง

ตารางที่ 5 องค์ประกอบทางเคมีของกุ้งขาวที่เลี้ยงด้วยอาหารที่ผสมสาร TTX ระดับต่าง ๆ เป็นระยะเวลา 6 สัปดาห์ (รายงานบนฐานของวัตถุแห้ง)

ชุดการทดลอง	ความชื้น (%)	โปรตีน (%)	ไขมัน (%)	เถ้า (%)
กุ้งเริ่มต้นการทดลอง	76.57±1.44	61.77±2.43	4.74±0.13	13.15±0.11
ชุดควบคุม	78.75±0.24[b]	70.61±0.36[a]	6.89±0.07[b]	14.45±0.41[b]
TTX 2.5 ppm	76.31±0.15[a]	69.02±1.56[a]	6.43±0.25[a]	13.53±0.60[b]
TTX 5 ppm	77.66±0.69[ab]	70.64±0.8[a]	6.27±0.23[a]	11.23±0.94[a]

[1] ตัวเลขที่นำเสนอเป็นค่าเฉลี่ย±ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน (จากการวิเคราะห์ตัวอย่าง 3 ซ้ำ)
ค่าเฉลี่ยในสดมภ์ที่มีอักษรเหมือนกันกำกับ ไม่มีความแตกต่างทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์ (p>0.05)

1.3. ผลของสารพิษ TTX ต่อการเจริญเติบโต และ องค์ประกอบทางเคมีของตัวกุ้ง

1.3.1 องค์ประกอบทางเคมีของตัวกุ้ง และน้ำหนักเฉลี่ยต่อตัว

องค์ประกอบทางเคมีของตัวกุ้งเมื่อเริ่มต้นการทดลอง และผลการวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมีของกุ้งเมื่อสิ้นสุดการทดลอง แสดงไว้ดังตารางที่ 4 โดยพบว่า กุ้งที่ได้รับอาหารผสมสารพิษ TTX ที่ระดับ 5 ppm ส่งผลให้ค่า ไขมัน และเถ้าในตัวกุ้งมีค่าต่ำกว่าชุดที่ไม่ได้รับสารพิษอย่างมีนัยสำคัญทางสถิต ($p<0.05$) (ตารางที่ 5)

จากการทดลองพบว่า ตลอดระยะเวลาในการทดลอง 6 สัปดาห์ กุ้งทั้ง 3 ชุดการทดลองมีน้ำหนักเฉลี่ยเพิ่มขึ้นตามระยะเวลาทดลอง น้ำหนักเริ่มต้นเฉลี่ยต่อตัวกุ้งขาวทั้ง 3 ชุดการทดลอง ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ ($p>0.05$) โดยมีน้ำหนักอยู่ในช่วง 3.37±0.01 ถึง 3.38±0.15 กรัม น้ำหนักเฉลี่ยต่อตัวกุ้งขาวเริ่มมีความแตกต่างกันเมื่อเลี้ยงได้ 6 สัปดาห์ โดยพบว่ากุ้งขาวที่ได้รับอาหารผสมสารพิษ TTX 0 ppm มีน้ำหนักเฉลี่ยต่อตัวสูงสุด คือ 6.62±0.10 กรัม และมีแตกต่างกับกุ้งขาวในชุดการทดลองที่ได้รับอาหารผสมสารพิษ TTX 2.5 และ 5 ppm ($p<0.05$) และกุ้งขาวทั้งที่ได้รับอาหารผสมสารพิษ TTX 2.5 และ 5 ppm มีน้ำหนักเฉลี่ยต่อตัวแตกต่างกันทางสถิติ กุ้งขาวทั้งที่ได้รับอาหารผสมสารพิษ TTX 5 ppm มีน้ำหนักเฉลี่ยต่อตัวต่ำสุดคือ 6.00±0.30 กรัม (ตางรางที่ 6)

ตารางที่ 6 น้ำหนักเฉลี่ยของกุ้งขาวหลังจากได้รับอาหารผสมสารพิษ TTX เป็นระยะเวลา 6 สัปดาห์ (หน่วยเป็นกรัม)

ชุดการทดลอง (ระดับสารพิษ)	ระยะเวลา (สัปดาห์)(กรัม)			
	0	2	4	6
T1 (TTX 0ppm)	3.38±0.15[a]	4.34±0.13[a]	5.94±0.43[a]	6.62±0.10[c]
T2 (TTX2.5 ppm)	3.38±0.03[a]	4.23±0.15[a]	5.62±0.17[a]	6.29±0.13[b]
T3 (TTX5 ppm)	3.37±0.01[a]	4.09±0.51[a]	5.93±0.17[a]	6.00±0.30[a]

[1] ตัวเลขที่นำเสนอเป็นค่าเฉลี่ย±ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน(จากการวิเคราะห์ตัวอย่าง 3 ซ้ำ)
ค่าเฉลี่ยในสดมภ์ที่มีอักษรเหมือนกันกำกับ ไม่มีความแตกต่างทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์ (p>0.05)

1.3.2 การเจริญเติบโตที่เพิ่มขึ้น (weight gain)

จากการทดลองให้กุ้งขาวกินอาหารผสมสารพิษ TTX ที่ระดับ 0 2.5 และ 5 ppm เป็นระยะเวลา 6 สัปดาห์ พบว่า กุ้งขาวทั้ง 3 ชุดการทดลอง มีการเจริญเติบโตที่เพิ่มขึ้นแตกต่างกันทางสถิติ ($p<0.05$) โดยกุ้งขาวที่ได้รับอาหารผสมสารพิษ TTX 0 ppm มีการเจริญเติบโตที่เพิ่มขึ้นดีที่สุดคือ อยู่ที่ 98.38±3.61 เปอร์เซ็นต์ กุ้งขาวชุดที่ได้รับอาหารผสมสารพิษ TTX 2.5 ppm มีการเจริญเติบโตที่เพิ่มขึ้นเท่ากับ 86.74±3.60 เปอร์เซ็นต์ และกุ้งขาวที่ได้รับอาหารผสมสารพิษ TTX 5 ppm มีการเจริญเติบโตที่เพิ่มขึ้นน้อยที่สุดเท่ากับ 77.81±9.49 เปอร์เซ็นต์ (ตารางที่ 7)

1.3.3 การเจริญเติบโตต่อวัน (average daily weight gain)

กุ้งขาวที่ได้รับอาหารผสมสารพิษ TTX 0 ppm มีการเจริญเติบโตต่อวันดีที่สุดเท่ากับ 0.088±0.003 กรัมต่อตัวต่อวัน ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติกับกุ้งขาวชุดที่ได้รับอาหารผสมสารพิษ TTX ที่ระดับ 2.5 ppm ($p>0.05$) ซึ่งมีการเจริญเติบโตที่เพิ่มขึ้นอยู่ที่ 0.076 ± 0.005 กรัมต่อตัวต่อวัน และกุ้งขาวชุดที่ ได้รับอาหารสารพิษ TTX 5 ppm มีการเจริญเติบโตต่อวันต่ำที่สุดคือ 0.154±0.154 กรัมต่อตัวต่อวัน แต่ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติกับกุ้งขาวชุดที่ได้รับอาหารสารพิษ TTX ที่ระดับ 2.5 ppm ($p>0.05$) แต่มีความแตกต่างกันทางสถิติกับกุ้งที่รับอาหารผสมสารพิษ TTX 0 ppm ($p<0.05$) (ตารางที่ 7)

1.3.4 อัตราการเจริญเติบโตจำเพาะ (specific growth rate)

อัตราการเจริญเติบโตจำเพาะพบว่า กุ้งขาวชุดที่ได้รับอาหารผสมสารพิษ TTX 0 ppm มีอัตราการเจริญเติบโตจำเพาะดีที่สุดเท่ากับ 1.803±0.047 เปอร์เซ็นต์ต่อวัน แต่ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติกับกุ้งขาวที่ได้รับอาหารผสมสาร TTX ที่ระดับ 2.5 ppm ซึ่งมีอัตราการเจริญเติบโตจำเพาะอยู่ในช่วง 1.620±0.954 เปอร์เซ็นต์ต่อวัน ($p>0.05$) และพบว่ากุ้งขาวที่ได้รับสารพิษ TTX 5 ppm มีอัตราการเจริญเติบโตต่อวันต่ำที่สุดคือ 1.513±0.142 เปอร์เซ็นต์ต่อวัน แต่ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติกับกุ้งขาว ที่ได้รับสารพิษ TTX ที่ระดับ 2.5 ppm ($p>0.05$) แต่มีความแตกต่างกันทางสถิติกับกุ้งที่ไม่ได้รับสารพิษ TTX ($p<0.05$) (ตารางที่ 7)

1.3.5 น้ำหนักอาหารกุ้งกินทั้งหมด, ปริมาณอาหารที่กุ้งกินต่อตัวต่อวัน, อัตราการเปลี่ยนอาหารเป็นเนื้อ และ ประสิทธิภาพการใช้โปรตีน

ปริมาณน้ำหนักอาหารที่กินทั้งหมดของกุ้งขาวทั้ง 3 ชุดการทดลองไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ ($p>0.05$) ประสิทธิภาพการใช้โปรตีนของกุ้งในชุดที่ได้รับอาหารผสมสารพิษ 5 ppm มีค่าต่ำที่สุด ในขณะที่กุ้งขาวชุดที่ได้รับสารพิษ TTX ที่ระดับ 5 ppm มีอัตราการเปลี่ยนอาหารเป็นเนื้อสูงที่สุด ($p<0.05$) (ตารางที่ 8)

ตารางที่ 7 การเจริญเติบโตที่เพิ่มขึ้น, อัตราการเจริญเติบโตต่อวัน, อัตราการเจริญเติบโตจำเพาะ, ของกุ้งขาวหลังจากได้รับอาหารผสมสารพิษ TTX เป็นระยะเวลา 6 สัปดาห์[1]

ชุดการทดลอง (ระดับสารพิษ)	การเจริญเติบโตที่เพิ่มขึ้น[2] (เปอร์เซ็นต์)	อัตราการเจริญเติบโตต่อวัน (กรัมต่อตัวต่อวัน)	อัตราการเจริญเติบโตจำเพาะ(เปอร์เซ็นต์ต่อวัน)
1 (0 ppm)	98.38±3.61[b]	0.088±0.003[b]	1.80±0.05[b]
2(2.5 ppm)	86.74±3.60[ab]	0.076±0.005[ab]	1.64±0.10[ab]
3 (5 ppm)	77.81± 9.49[a]	0.069±0.008[a]	1.51±0.14[a]

ค่าเฉลี่ยในสดมภ์ที่มีอักษรเหมือนกันกำกับ ไม่มีความแตกต่างทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์ ($p>0.05$)

1 ตัวเลขที่นำเสนอเป็นค่าเฉลี่ย±ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน(จากการวิเคราะห์ตัวอย่าง 3 ซ้ำ)

2 เปอร์เซ็นต์น้ำหนักที่เพิ่มขึ้น= (น้ำหนักสุดท้าย-น้ำหนักเริ่มต้น)/น้ำหนักเริ่มต้นx 100

ตารางที่ 8 ปริมาณอาหารที่กุ้งกินต่อตัวต่อวัน, อัตราการเปลี่ยนอาหารเป็นเนื้อ และ ประสิทธิภาพการใช้โปรตีนหลังจากได้รับอาหารผสมสารพิษ TTX เป็นระยะเวลา 6 สัปดาห์

ชุดการทดลอง (ระดับสารพิษ)	ปริมาณอาหารที่กุ้งกินต่อตัว (กรัมต่อตัว)	อัตราการเปลี่ยนอาหารเป็นเนื้อ	ประสิทธิภาพการใช้โปรตีน
1 (0 ppm)	5.09±0.61[a]	1.53±0.23[a]	1.89±0.29[b]
2(2.5 ppm)	4.89±0.14[a]	1.67±0.06[a]	1.69±0.07[ab]
3 (5 ppm)	5.47±0.17[a]	2.10±0.26[b]	1.36±0.16[a]

[1] ตัวเลขที่นำเสนอเป็นค่าเฉลี่ย±ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน(จากการวิเคราะห์ตัวอย่าง 3 ซ้ำ)

ค่าเฉลี่ยในสดมภ์ที่มีอักษรเหมือนกันกำกับ ไม่มีความแตกต่างทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์ ($p>0.05$)

1.3.6 อัตราการอดตาย

จากการทดลองให้กุ้งขาวกินอาหารผสมสารพิษ TTX เป็นระยะเวลา 6 สัปดาห์ พบว่า ในสัปดาห์ที่ 2 ของการทดลอง อัตราการรอดตายของกุ้งขาวชุดที่ได้รับอาหารผสมสารพิษ TTX 0 และ 2.5 ppm ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ ($p>0.05$) โดยมีอัตราการรอดตาย 100 เปอร์เซ็นต์ ส่วนกุ้งขาวชุดที่ได้รับอาหารผสมสารพิษ TTX 5 ppm มีอัตราการอดตายน้อยที่สุดแตกต่างกับทุกชุดการทดลอง ($p<0.05$) โดยมีอัตราการอดตาย 92.500±5.00 เปอร์เซ็นต์ (ตารางที่5) และเมื่อเลี้ยงต่อไปจนสิ้นสุดการทดลองพบว่า อัตราการรอดตายของกุ้งขาวทั้ง 3 ชุดการทดลอง ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ ($p>0.05$) (ตารางที่ 9)

ตารางที่ 9 อัตราการรอดของกุ้งหลังจากได้รับอาหารผสมสารพิษ TTX เป็นระยะเวลา 6 สัปดาห์

ชุดการทดลอง (ระดับสารพิษ)	อัตราการรอด/สัปดาห์			
	0 (%)	2 (%)	4 (%)	6 (%)
1 (0 ppm)	100±0.00[a]	100±0.00[b]	93.750±9.47[a]	95.00±8.66[a]
2 (2.5 ppm)	100±0.00[a]	100±0.00[b]	92.500±6.55[a]	93.33±2.89[a]
3 (5 ppm)	100±0.00[a]	92.500±5.00[a]	88.333±7.64[a]	85.00±5.00[a]

1 ตัวเลขที่นำเสนอเป็นค่าเฉลี่ย±ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน(จากการวิเคราะห์ตัวอย่าง 3 ซ้ำ)
ค่าเฉลี่ยในสดมภ์ที่มีอักษรเหมือนกันกำกับ ไม่มีความแตกต่างทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์ ($p>0.05$)

1.4 ผลของสารพิษ TTX ต่อองค์ประกอบเลือดของกุ้งขาว

1.4.1 ปริมาณเม็ดเลือดรวมทั้งหมด (total hemocyte count)

การวิเคราะห์องค์ประกอบเลือด ได้แก่ ปริมาณเม็ดเลือดรวมทั้งหมด (total hemocyte count) ของกุ้งขาวที่ได้รับอาหารผสมสารพิษ TTX ทั้ง 3 สูตร พบว่า กุ้งที่ได้รับอาหารที่ผสมสารพิษ TTX ระดับ 5 ppm มีปริมาณเม็ดเลือดรวมสูงสุดคือ $2.57\pm0.24\times10^{7}$ เซลล์ต่อml มีความแตกต่างกันทางสถิติ($p<0.05$) กับกุ้งขาวชุดที่ได้รับอาหารผสมสารพิษ TTX 0 ppm และ 2.5 ppm โดยปริมาณเม็ดเลือดรวมของกุ้งขาวชุดที่ได้รับอาหารผสมสารพิษ TTX 0 ppm และ 2.5 ppm อยู่ในช่วง $1.77\pm0.33\times10^{7}$ เซลล์ต่อml ถึง $2.12\pm0.28\times10^{7}$ เซลล์ต่อml โดยกุ้งขาวทั้ง 2 ชุด นี้ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ ($p>0.05$) (ตารางที่ 10)

1.4.2 ระดับกลูโคสในเลือด (blood glucose)

จากการวิเคราะห์ระดับกลูโคสในเลือดของกุ้งขาว พบว่า กุ้งขาวที่ได้รับอาหารที่ผสมสารพิษ TTX ระดับ 0 ppm มีระดับกลูโคสในเลือดเท่ากับ 42.585±2.573 mg% มีความแตกต่างกันทางสถิติกับกุ้งขาวในชุดที่ได้รับอาหารผสมสารพิษ TTX ที่ระดับ 2.5 ppm และ 5 ppm ระดับกลูโคสในเลือดของกุ้งขาวชุดที่ได้รับอาหารผสมสารพิษ TTX ที่ระดับ 2.5 ppm และ 5 ppm ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ($p>0.05$) โดยมีค่าอยู่ในช่วง 25.860±8.982 mg% ถึง 27.068±5.409 mg% ตามลำดับ (ตารางที่ 10)

1.4.3 oxyhemocyanin/hemolymph protein

จากการวิเคราะห์ Oxyhemocynin/Hemolymph protein ในกุ้งขาวหลังจากได้รับอาหารผสมสารพิษ TTX ที่ระดับ 0, 2.5 และ 5 ppm เป็นระยะเวลา 6 สัปดาห์ พบว่าอัตราสาวนของ oxyhemocynin/hemolymph protein ของกุ้งขาวทั้ง 3 ชุดการทดลองไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ ($p>0.05$) โดยมีอัตราส่วน Oxyhemocynin/hemolymph protein อยู่ในช่วง 55.430±2.573 ถึง 57.067±1.748 เปอร์เซ็นต์ (ตารางที่ 10)

1.4.4 ปริมาณโปรตีนในซีรัม (serum protein)

จากการวิเคราะห์ปริมาณโปรตีนในซีรัมของกุ้งขาวที่ได้รับสารพิษ TTX ที่ระดับ 0, 2.5 และ 5 ppm เป็นระยะเวลา 6 สัปดาห์ พบว่า ปริมาณโปรตีนในซีรัมของกุ้งทั้ง 3 ชุดการทดลองนี้มีความแตกต่างกันทางสถิติ ($p<0.05$) โดยปริมาณโปรตีนในซีรัมมีแนวโน้มลดลงเมื่อระดับของสารพิษเพิ่มสูงขึ้นและลดลงต่ำสุดในในกุ้งกลุ่มที่ได้รับสารพิษ TTX ระดับสูงสุด (5 ppm) โดยกุ้งขาวที่ได้รับอาหารที่ผสมสารพิษ TTX 0 ppm มีปริมาณโปรตีนในซีรัมสูงสุดคือ 109.57±7.82 mg/ml และมีปริมาณโปรตีนในซีรัมลดลงเมื่อระดับของสารพิษในอาหารเพิ่มสูงขึ้นเป็น 2.5 และ 5 ppm คือ 91.07±4.31 mg/ml และ 75.46±8.74 mg/ml ตามลำดับ ดังที่ได้แสดงในตารางที่ 10

1.4.5 ค่ากิจกรรมเอนไซม์ฟีนอลออกซิเดส (PO activity)

ค่ากิจกรรมเอนไซม์ฟีนอลออกซิเดสของกุ้งขาวที่ได้รับสารพิษ TTX เป็นระยะเวลา 6 สัปดาห์ พบว่ากุ้งขาวที่ได้รับสารพิษ TTX มีค่ากิจกรรมของเอนไซม์ฟีนอลออกซิ

เดส มีแนวโน้มลดลงเมื่อระดับสารพิษในอาหารเพิ่มขึ้นจาก 0, 2.5 และ 5 ppm อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.05$) โดยลดลงต่ำสุดในในกุ้งกลุ่มที่ได้รับสารพิษ TTX ระดับสูงสุด (5 ppm) โดยค่ากิจกรรมของเอนไซม์ฟีนอลออกซิเดสของกุ้งขาวที่ได้รับอาหารผสมสารพิษ TTX 0, 2.5 และ 5.0 ppm เท่ากับ 345.99±72.97 , 257.63±21.37 และ258.07±14.02 ยูนิต/นาที/มิลลิกรัมโปรตีน ตามลำดับ (ตารางที่ 10)

1.4.6 ระดับแร่ธาตุในน้ำเลือดของกุ้งขาว

จากการทดลองให้กุ้งขาวกินอาหารที่ผสมสารพิษ TTX เป็นระยะเวลา 6 สัปดาห์พบว่า กุ้งที่ได้รับอาหารผสมสารพิษ TTX ระดับ 2.5 และ 5 ppm มีปริมาณ Ca^{2+} ในเลือดปริมาณต่ำกว่าชุดควบคุมอย่างมีนัยสำคัญ ($p<0.05$) เท่ากับ 370.82±33.99 และ 390.68±27.43 mg/L ตามลำดับ และพบว่า ปริมาณ Na^{+} และ mg^{2+} ในเลือดของกุ้งที่ได้รับอาหารผสมสารพิษ TTX ระดับ 5 ppm ต่ำกว่าชุดควบคุมอย่างมีนัยสำคัญ ($p<0.05$) ในส่วนของ K^{+} พบว่า ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติทั้ง 3 ชุดการทดลอง ($p>0.05$) (ตารางที่ 11)

ตารางที่ 10 ปริมาณเม็ดเลือดรวม, ระดับกลูโคสในเลือด, อัตราส่วน oxyhemocyanin/hemolym protein, ปริมาณโปรตีนในเลือด และกิจกรรมของเอนไซม์ฟีนอลออกซิเดสของกุ้งขาวที่ได้รับอาหารผสมสารพิษ TTX เป็นระยะเวลา 6 สัปดาห์

ชุดการทดลอง (ระดับสารพิษ)	ปริมาณเม็ดเลือดรวม(x10^7 cell/ml)	ระดับกลูโคสในเลือด (mg%)	oxyhemocyanin/hemolym protein (%)	ปริมาณโปรตีนในเลือด (mg/ml)	PO activity (unit/min/mg.prot.)
1 (TTX 0 ppm)	1.77±0.33^{a}	42.585±6.695^{b}	55.430±2.573^{a}	109.57±7.82^{c}	345.99±72.97^{b}
2 (TTX 2.5 ppm)	2.12±0.28^{a}	25.860±8.982^{a}	56.770±1.237^{a}	91.07±4.31^{b}	257.63±21.37^{a}
3 (TTX 5 ppm)	2.57±0.24^{b}	27.068±5.409^{a}	57.067±1.748^{a}	75.46±8.74^{a}	258.07±14.02^{a}

[1] ตัวเลขที่นำเสนอเป็นค่าเฉลี่ย±ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน (จากการวิเคราะห์ตัวอย่าง 8 ซ้ำ)

ค่าเฉลี่ยในสดมภ์ที่มีอักษรเหมือนกันกำกับ ไม่มีความแตกต่างทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์ (p>0.05)

ตารางที่ 11 ระดับไอออนในเลือดของกุ้งขาวหลังจากได้รับอาหารผสมสารพิษ TTX เป็นระยะเวลา 6 สัปดาห์

ชุดการทดลอง (ระดับสารพิษ)	ไอออนในเลือด (mg/L)			
	Na^{+}	K^{+}	Ca^{2+}	Mg^{2+}
1(TTX0 ppm)	126.32±10.70^{b}	189.85±54.66^{a}	633.01±21.36^{b}	134.09±15.42^{b}
2(TTX2.5 pm)	111.96±12.55^{a}	191.20±54.29^{a}	370.82±33.99^{a}	173.22±62.97^{ab}
3(TTX 5 ppm)	109.71±2.06^{ab}	180.90±69.85^{a}	390.68±27.43^{a}	92.01±18.87^{a}

[1] ตัวเลขที่นำเสนอเป็นค่าเฉลี่ย±ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน (จากการวิเคราะห์ตัวอย่าง 4 ซ้ำ)

ค่าเฉลี่ยในสดมภ์ที่มีอักษรเหมือนกันกำกับ ไม่มีความแตกต่างทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์ (p>0.05)

1.5 ผลของสารพิษ TTX ต่อกิจกรรมของเอ็นไซม์ acetylcholinesterase (AChE) และ และกิจกรรมของเอนไซม์ lactic dehydrogenase (LDH)

1.5.1 ผลของสารพิษ TTX ต่อกิจกรรมของเอ็นไซม์ AChE

จากการทดลองให้กุ้งขาวกินอาหารผสมสารพิษ TTX ระดับ 0, 2.5 และ 5 ppm เป็นระยะเวลา 6 สัปดาห์ พบว่า ค่ากิจกรรมของเอ็นไซม์ AChE ของกุ้งขาวมีแนวโน้มลดลงตามระดับของสารพิษที่เพิ่มขึ้น ($p<0.05$) โดยค่ากิจกรรมของเอ็นไซม์ AChE ในกุ้งขาวชุดที่ได้รับอาหารผสมสารพิษ TTX 5 ppm ต่ำที่สุดเท่ากับ 31.25±8.51 ยูนิต/ลิตร รองลงมาคือกุ้งที่ได้รับอาหารผสมสารพิษ TTX ระดับ 2.5 ppm มีค่ากิจกรรมของเอ็นไซม์ AChE เท่ากับ 138.22±28.69 ยูนิต/ลิตร ในขณะกุ้งในชุดควบคุมมีค่ากิจกรรมของเอ็นไซม์ AChE 169.27±15.62 ยูนิต/ลิตร (ตารางที่ 12)

1.5.2 ผลของสารพิษ TTX ต่อกิจกรรมของเอ็นไซม์ LDH

จากการทดลองให้กุ้งขาวกินอาหารผสมสารพิษ TTX ระดับ 0, 2.5 และ 5 ppm เป็นระยะเวลา 6 สัปดาห์ พบว่า ค่ากิจกรรมของเอ็นไซม์ LDH เพิ่มสูงขึ้น ($p<0.05$) โดยกุ้งขาวชุดที่ได้รับอาหารผสมสารพิษ TTX 5 ppm มีค่ากิจกรรมของเอนไซม์ LDH ในกล้ามเนื้อสูงที่สุด คือ 39.61±7.84 ยูนิต/มิลลิกรัมโปรตีน รองลงมาคือกุ้งในชุดที่ได้รับสารพิษ TTX 2.5 ppm เท่ากับ 27.87±5.04 ยูนิต/มิลลิกรัมโปรตีน และในชุดควบคุมเท่ากับ 27.12±4.48 ยูนิต/มิลลิกรัมโปรตีน (ตารางที่ 12)

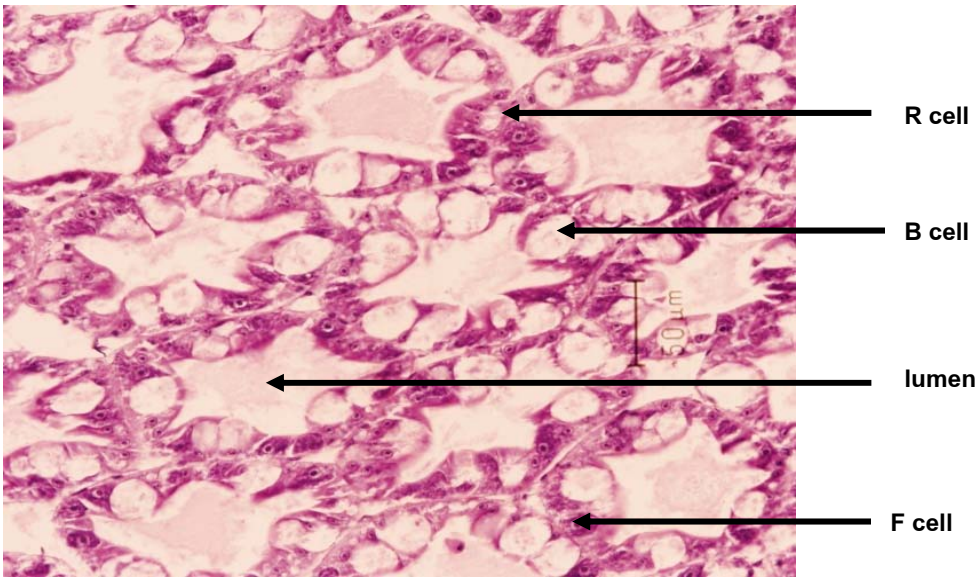
ตารางที่ 12 ค่ากิจกรรมของเอ็มไซม์ AChE และ LDH ของกุ้งขาวหลังได้รับอาหารผสมสารพิษ TTX เป็นระยะเวลา 6 สัปดาห์

ชุดการทดลอง (ระดับสารพิษ)	acetylcholenesterase (U/L)	lactic dehydrogenase Unit/mg protein
1 (0 ppm)	169.27±15.62[c]	27.12±4.48[a]
2 (2.5 ppm)	138.22±28.69[b]	27.87±5.04[b]
3 (5 ppm)	31.25±8.51[a]	39.61±7.84[c]

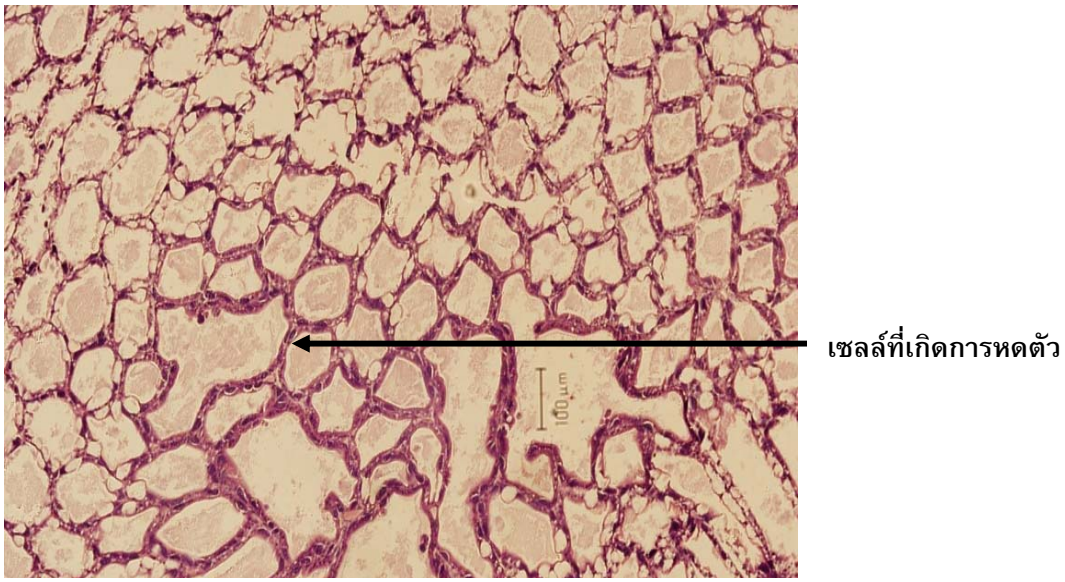
[1] ตัวเลขที่นำเสนอเป็นค่าเฉลี่ย±ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน (จากการวิเคราะห์ตัวอย่าง 3 ซ้ำ)
ค่าเฉลี่ยในสดมภ์ที่มีอักษรเหมือนกันกำกับ ไม่มีความแตกต่างทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์ ($p>0.05$)

1.6 การศึกษาเนื้อเยื่อของกุ้งขาวที่ได้รับสารพิษ TTX

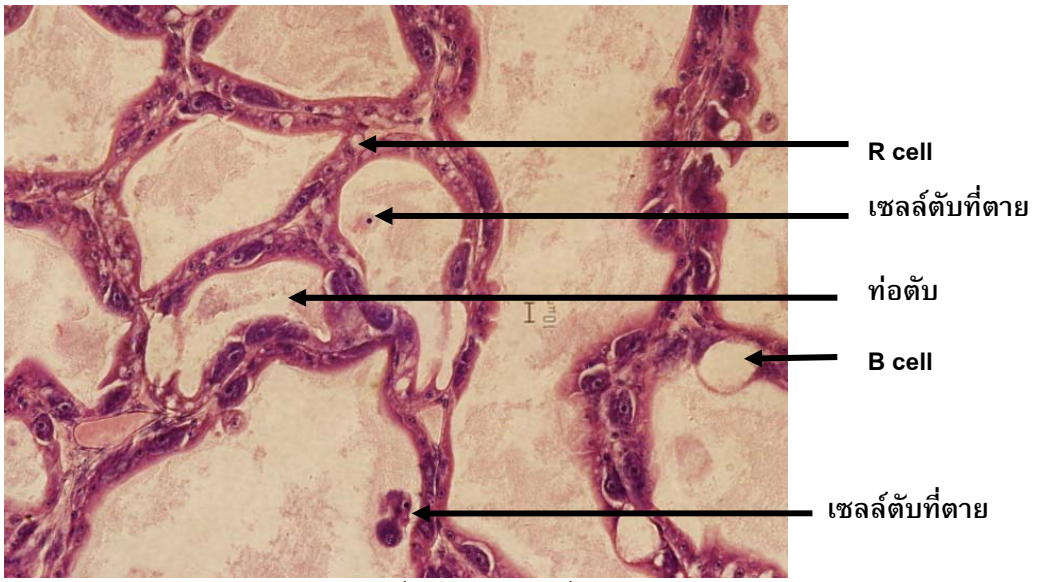
จากการศึกษาในครั้งนี้พบว่า กุ้งที่ได้รับสารพิษ TTX เกิดการเปลี่ยนแปลงของเนื้อเยื่อตับและตับอ่อน โดยกุ้งขาวที่ได้รับสารพิษ TTX ระดับ 0 ppm ไม่พบความผิดปกติของเนื้อเยื่อตับและตับอ่อน โดยเซลล์ตับมีการเรียงตัวเป็นระเบียบ โครงสร้างท่อตับปกติ (ภาพที่ 7) และจากการทดลองพบการเปลี่ยนแปลงของเนื้อเยื่อตับในกุ้งขาวที่ได้รับสารพิษ TTX อาการที่พบในกุ้งขาวที่ได้รับสารพิษระดับ 2.5 ppm ได้แก่ เซลล์ที่ใช้ในการสะสมอาหารมีจำนวนลดลงร่วมกับการหดตัวของเซลล์ (artrophy) (ภาพที่8) และพบมีการตายของเซลล์เกิดขึ้น (cell necrosis) (ภาพที่ 9) กุ้งที่ได้รับสารพิษ 5 ppm เซลล์ที่ใช้ในการสะสมอาหารมีจำนวนลดลงร่วมกับการหดตัวของเซลล์ (artrophy) เช่นเดียวกับกุ้งที่ได้รับได้รับสารพิษระดับ 2.5 ppm (ภาพที่ 10 และ 11), มีการแทรกตัวของของเหลวและเม็ดเลือดแทรกระหว่างท่อตับ เกิดการตายของเซลล์เยื่อบุผิวท่อตับ และเกิดระยะห่างระหว่างท่อภายในตับและตับอ่อนมากขึ้น (dilation of hepatopancreatic tissue) (ภาพที่ 12,13) ส่วนเนื้อเยื่ออวัยวะอื่นๆ เช่น antennal gland, hematopoietic tissue, nerve และเนื้อเยื่อหัวใจไม่พบความผิดปกติ



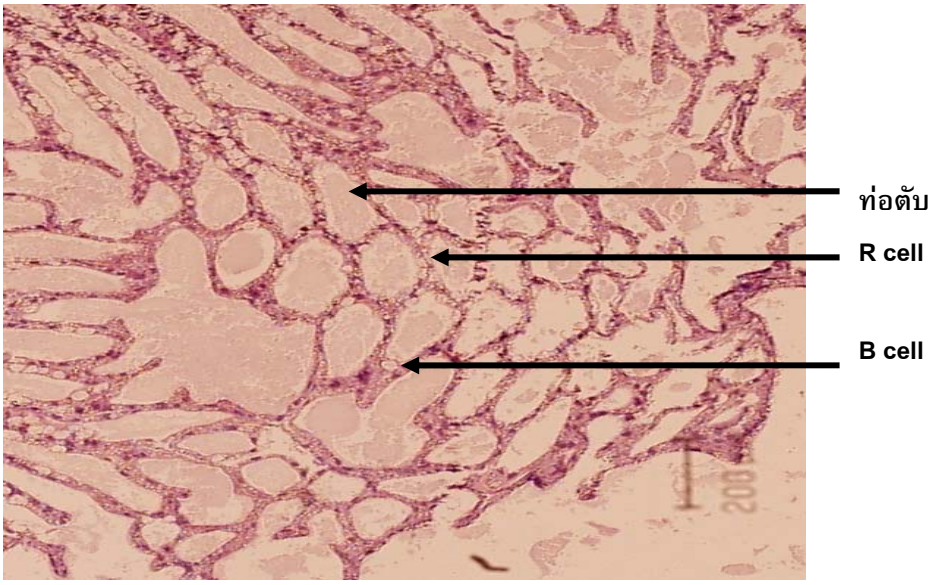
ภาพที่ 7 โครงสร้างตับและตับอ่อนที่ปกติของกุ้งขาว เซลล์ต่างๆ มีลักษณะสมบูรณ์ ท่อตับเป็นรูปดาว ไม่มีการแทรกตัวของเซลล์เม็ดเลือดระหว่างท่อตับ (H&E, Bar = 50 µm)



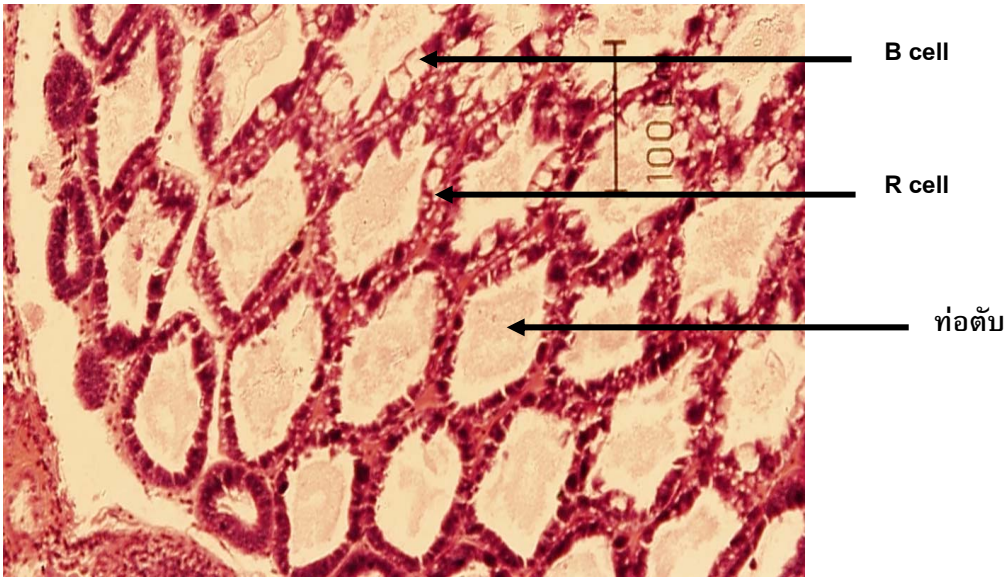
ภาพที่ 8 โครงสร้างตับและตับอ่อนที่ของกุ้งขาวที่ได้รับ TTX ระดับ 2.5 ppm เป็นระยะเวลา 6 สัปดาห์ เซลล์ที่ใช้ในการสะสมอาหาร (R cell) และเซลล์ที่หลั่งน้ำย่อย (B cell) มีจำนวนน้อยเมื่อเปรียบเทียบกับชุดควบคุม และพบการหดตัวของเซลล์ (Artrophy) (ศรชี้) (H&E, Bar = 100 µm)



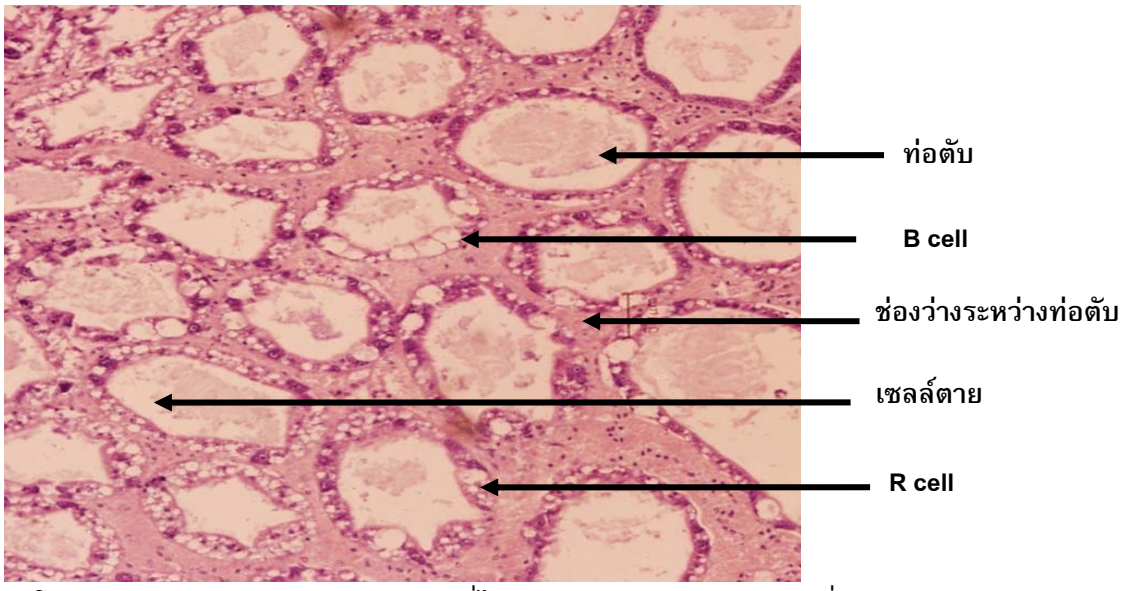
ภาพที่ 9 โครงสร้างตับและตับอ่อนของกุ้งขาวที่ได้รับอาหารที่ผสมสาร TTX ระดับ 2.5 ppm เป็นระยะเวลา 6 สัปดาห์ เซลล์ที่ใช้ในการสะสมอาหาร (R cell) และเซลล์ที่หลั่งน้ำย่อย (B cell) มีจำนวนน้อยเมื่อเปรียบเทียบกับชุดควบคุม พบการตายของเซลล์เกิดขึ้นขึ้น (ลูกศรชี้) (H&E, Bar = 10 µm)



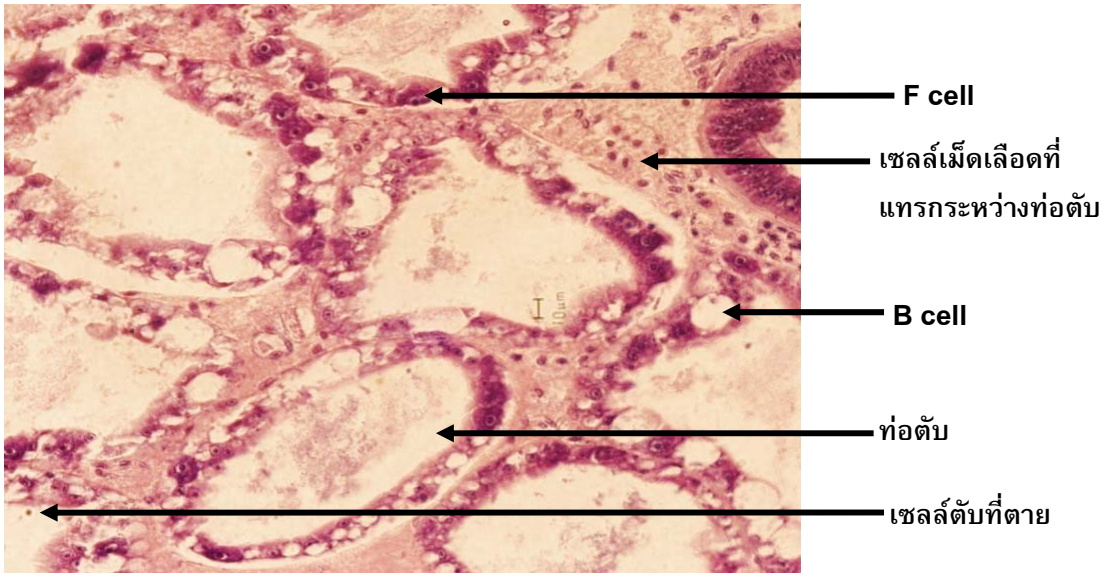
ภาพที่ 10 โครงสร้างตับและตับอ่อนของกุ้งขาวที่ได้รับอาหารผสมสาร TTX ที่ระดับ 5 ppm เป็นระยะเวลา 6 สัปดาห์ เซลล์ที่ใช้ในการสะสมอาหาร (R cell) และเซลล์ที่หลั่งน้ำย่อย (B cell) มีจำนวนน้อยเมื่อเปรียบเทียบกับชุดควบคุม (ลูกศรชี้) (H&E, Bar = 200 µm)



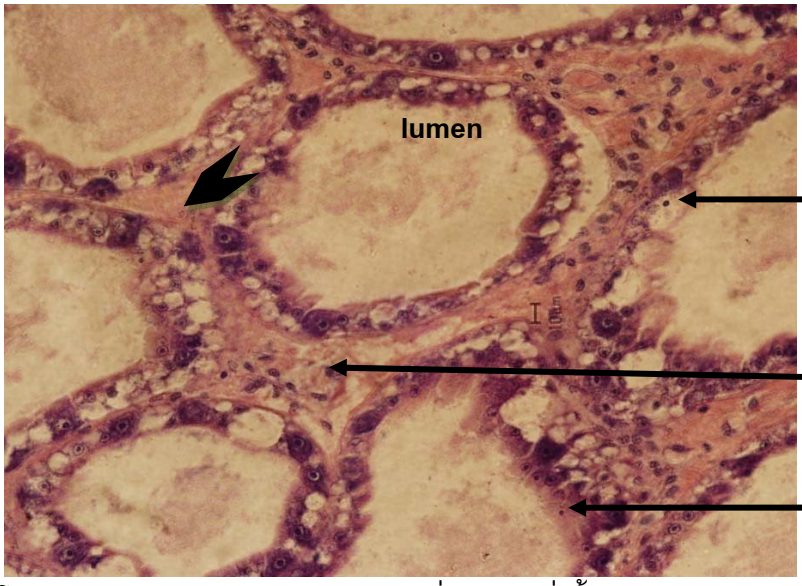
ภาพที่ 11 โครงสร้างตับและตับอ่อนของกุ้งขาวที่ได้รับอาหารผสมสาร TTX ที่ระดับ 5 ppm เป็นระยะเวลา 6 สัปดาห์ เซลล์ที่ใช้ในการสะสมอาหาร (R cell) และเซลล์ที่หลั่งน้ำย่อย (B cell) มีจำนวนน้อยเมื่อเปรียบเทียบกับชุดควบคุม (ลูกศรชี้) (H&E, Bar = 100 µm)



ภาพที่ 12 โครงสร้างตับและตับอ่อนของกุ้งขาวที่ได้รับอาหารผสมสาร TTX ที่ระดับ 5 ppm เป็นระยะเวลา 6 สัปดาห์ เซลล์ที่ใช้ในการสะสมอาหาร (R cell) และเซลล์ที่หลั่งน้ำย่อย (B cell) มีจำนวนน้อยเมื่อเปรียบเทียบกับชุดควบคุม เกิดการตายของเซลล์เยื่อบุผิวท่อตับ เกิดช่องว่างระหว่างท่อตับ (ลูกศรชี้) (H&E, Bar = 50 µm)



ภาพที่ 13 โครงสร้างตับและตับอ่อนของกุ้งขาวที่ได้รับอาหารผสมสาร TTX ที่ระดับ 5 ppm เป็นระยะเวลา 6 สัปดาห์ มีการตายของเซลล์ที่บริเวณเซลล์บุผิวท่อตับและตับอ่อนทำให้เกิดเกิดระยะห่างระหว่างท่อภายในตับและตับอ่อนมากขึ้น (dilation of hepatopancreatic tissue) และมีของเหลวและเม็ดเลือดแทรกอยู่ระหว่างท่อตับ (ลูกศรชี้) (H&E, Bar = 10 µm)



ภาพที่ 14 โครงสร้างตับและตับอ่อนของกุ้งขาวที่ผิดปกติที่เลี้ยงด้วยอาหารผสมสาร TTX ที่ระดับ 5 ppm เป็นระยะเวลา 6 สัปดาห์ เซลล์เม็ดเลือดที่แทรกระหว่างท่อตับและเซลล์ตับที่ตายจากการได้รับสารพิษ TTX (ลูกศรชี้) (H&E, Bar = 10 µm)

1.7 การตกค้างของสารพิษในตัวกุ้ง

จากการศึกษากาตกค้างของสารพิษ TTX ในตัวกุ้งที่ได้รับอาหารผสมสารพิษ TTXที่ระดับ 0, 2.5 และ 5 ppm เป็นระยะเวลา 6 สัปดาห์ โดยใช้วิธี LC-MS/MS ไม่พบสารพิษ TTX ในกุ้งทั้ง 3 ชุดการทดลอง (ตารางที่ 13)

ตารางที่ 13 ปริมาณสารพิษที่ตกค้างในตัวกุ้งขาวที่ได้รับอาหารผสมสารพิษ TTX เป็นระยะเวลา 6 สัปดาห์

ชุดการทดอลง (ระดับของสารพิษ)	ปริมาณของสารพิษที่ตรวจพบ (mg/kg)
T1(0 ppm)	ND
T2(2.5 ppm)	ND
T3(5 ppm)	ND

Limite of detection (LOD) = 0.003 mg/kg

ND = ไม่พบการตกค้าง

2.การทดลองที่ 2 ความสามารถในการฟื้นตัวของกุ้งขาวหลังจากได้รับสารพิษ TTX

2.1 ผลขององค์ประกอบเลือดเบื้องต้น

องค์ประกอบเลือดเบื้องต้นของกุ้งขาวทั้ง 3 ชุดการทดลองเมื่อได้รับอาหารที่ไม่ได้ผสมสาร TTX พบว่า ไม่มีความแตกต่างกันในทางสถิติโดยพบว่า ปริมาณเม็ดเลือดรวมอยู่ในช่วง 1.36±0.53 $\times 10^7$ ถึง 1.78±0.29 $\times 10^7$ เซลล์ต่อml กลูโคสในเลือดอยู่ในช่วง 41.67±17.99 ถึง 55.16±15.99 มิลลิกรัมเปอร์เซ็นต์ oxyhemocyanin/hemolymp protein 65.60±5.08 ถึง 66.25±6.97 เปอร์เซ็นต์ โปรตีนในเลือด 92.57±7.83 57 ถึง 97.94±7.86 มิลลิกรัมต่อml กิจกรรมเอนไซม์ฟีนอลออกซิเดส 297.10±37.44 ถึง 307.08±54.75 ยูนิตต่อนาทีต่อมิลลิกรัมโปรตีน (ตารางที่ 14)

2.2 ระดับแร่ธาตุในน้ำเลือดของกุ้งขาวที่ฟื้นตัวจากการได้รับสารพิษ TTX

จากการศึกษาในครั้งนี้พบว่า ระดับ Na^+ ในเลือดของกุ้งขาวที่ได้รับสารพิษที่ระดับ 5 ppm มีค่าต่ำที่สุดแตกต่างจากกุ้งขาวในชุดควบคุมและกุ้งที่ได้รับสารพิษ TTX ระดับ 2.5 ppm อย่างมีนัยสำคัญโดยมีค่าเท่ากับ 344.48±22.25 ppm ($p<0.05$) ในขณะที่ผลของ K^+ พบว่า กุ้งที่ได้รับสารพิษ TTX ที่ระดับ 5 ppm มีค่ากว่ากุ้งขาวในชุดควบคุมอย่างมีนัยสำคัญมีค่าเท่ากับ 233.10±10.26 ส่วนระดับ Ca^{2+} ของกุ้งขาวในชุดควบคุมไม่มีความแตกต่างทางสถิติทั้ง 3 ชุดการทดลอง ทางด้าน Mg พบว่า กุ้งที่ได้รับสารพิษ TTX ที่ระดับ 2.5 ppm มีระดับของ Mg^{2+} ในน้ำเลือดน้อยที่สุดซึ่งมีความแตกต่างกันทางสถิติกับกุ้งในชุดควบคุมและกุ้งที่ได้รับสารพิษ TTX ที่ระดับ 5 ppm (ตารางที่ 15)

ตารางที่ 14 ปริมาณเม็ดเลือดรวม, ระดับกลูโคสในเลือด, อัตราส่วน oxyhemocyanin/hemolym protein, ปริมาณโปรตีนในเลือดและกิจกรรมของเอนไซม์ฟีนอลออกซิเดสของกุ้งขาวที่ฟื้นตัวจากการได้รับสารพิษ TTX

ชุดการทดลอง (ระดับสารพิษ)	ปริมาณเม็ดเลือดรวม ($x10^6$ cell/ml)	ระดับกลูโคสในเลือด (mg%)	Oxyhemocyanin/ hemolymp protein (%)	ปริมาณโปรตีนในเลือด (mg/ml)	PO activity (unit/min/mg.prot.)
1 (TTX 0 ppm)	13.6±0.53[a]	50.80±10.01[a]	66.26±2.25[a]	97.94±7.86[a]	307.08±54.75[a]
2 (TTX 2.5 ppm)	17.8±0.16[a]	55.16±15.99[a]	65.60±5.08[a]	92.57±7.83[a]	297.10±37.44[a]
3 (TTX 5 ppm)	17.8±0.29[a]	41.67±17.99[a]	66.25±6.97[a]	93.43±3.51[a]	302.41±63.88[a]

[1] ตัวเลขที่นำเสนอเป็นค่าเฉลี่ย±ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน (จากการวิเคราะห์ตัวอย่าง 8 ซ้ำ)

ค่าเฉลี่ยในสดมภ์ที่มีอักษรเหมือนกันกำกับ ไม่มีความแตกต่างทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์ (p>0.05)

ตารางที่ 15 ระดับแร่ธาตุในน้ำเลือดของกุ้งขาวที่ฟื้นตัวจากการได้รับสารพิษ TTX

ชุดการทดลอง (ระดับสารพิษ)	ไอออนในเลือด (mg/L)			
	Na^+	K^+	Ca^{2+}	Mg^{2+}
1 (TTX 0 ppm)	460.98±26.82[b]	262.70±12.84[b]	324.49±1.69[a]	161.12±28.97[b]
2 (TTX 2.5 ppm)	439.01±23.24[b]	240.13±10.89[ab]	332.94±9.54[a]	100.34±3.57[a]
3 (TTX 5 ppm)	344.48±22.25[a]	233.10±10.26[a]	321.64±5.72[a]	168.78±4.86[b]

ตัวเลขที่นำเสนอเป็นค่าเฉลี่ย±ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน (จากการวิเคราะห์ตัวอย่าง 4 ซ้ำ)

ค่าเฉลี่ยในสดมภ์ที่มีอักษรเหมือนกันกำกับ ไม่มีความแตกต่างทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์ (p>0.05)

2.3 กิจกรรมของเอ็นไซม์ AChE และ LDH ของกุ้งขาวที่ฟื้นตัวจากการได้รับสารพิษ TTX

จากการศึกษาในครั้งนี้พบว่า เมื่อกุ้งขาวได้รับอาหารตามปกติโดยไม่มีสารพิษ TTX ระดับของเอนไซมม์ AChE ในระบบประสาทไม่มีความแตกต่างกันในทางสถิติกับกุ้งในชุดควบคุมโดยระดับของเอนไซม์อยู่ในช่วง 213.54±22.70 ถึง 322.92±72.92 U/L เช่นเดียวกับระดับของเอนไซม์ LDH ในกล้ามเนื้อซึ่งไม่มีความแตกต่างกันในทางสถิติ โดยระดับของเอนไซม์อยู่ในช่วง 27.05±8.97 ถึง 29.38±4.90 Unit/mg protein (ตารางที่ 16)

ตารางที่ 16 ค่ากิจกรรมของเอ็นไซม์ acetylcholinesterase (AChE) และ lactate dehydrogenase (LDH) ของกุ้งขาวที่ฟื้นตัวจากการได้รับสารพิษ TTX

ชุดการทดลอง (ระดับสารพิษ)	AChE* (U/L)	LDH** Unit/mg protein
1 (0 ppm)	322.92±72.92[a]	27.05±8.97[a]
2 (2.5 ppm)	305.55±78.87[a]	28.26±10.26[a]
3 (5 ppm)	213.54±22.70[a]	29.38±4.90[a]

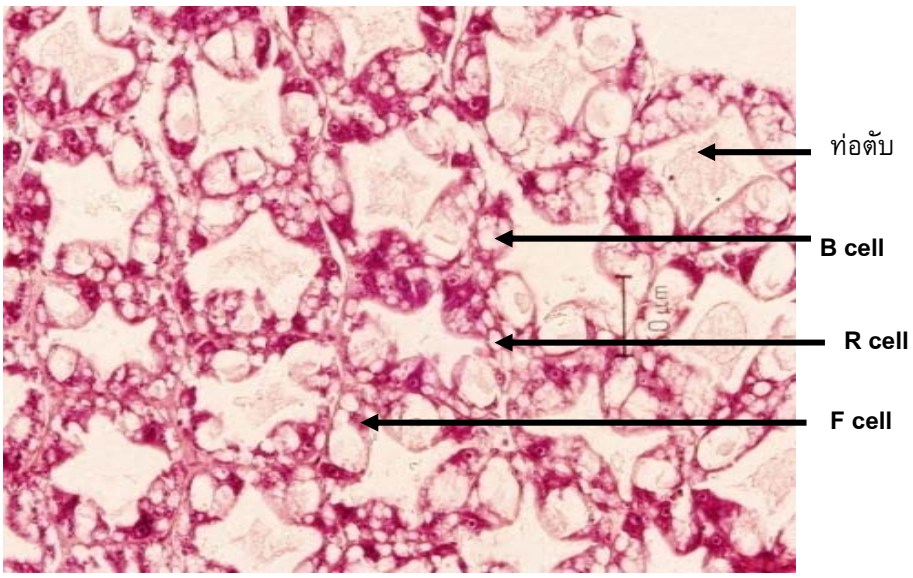
*ตัวเลขที่นำเสนอเป็นค่าเฉลี่ย±ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน (จากการวิเคราะห์ตัวอย่าง 4 ซ้ำ)

**ตัวเลขที่นำเสนอเป็นค่าเฉลี่ย±ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน (จากการวิเคราะห์ตัวอย่าง 5 ซ้ำ)

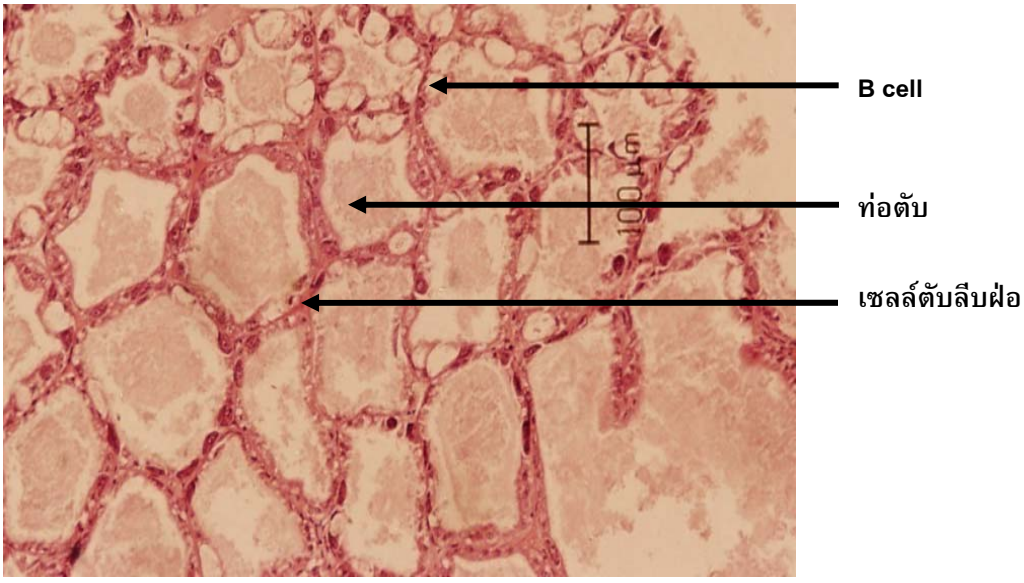
ค่าเฉลี่ยในสดมภ์ที่มีอักษรเหมือนกันกำกับ ไม่มีความแตกต่างทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์ (p>0.05)

2.4 การศึกษาทางด้านพยาธิสภาพของเนื้อเยื่อของกุ้งขาวที่ฟื้นตัวจากการได้รับสารพิษ TTX

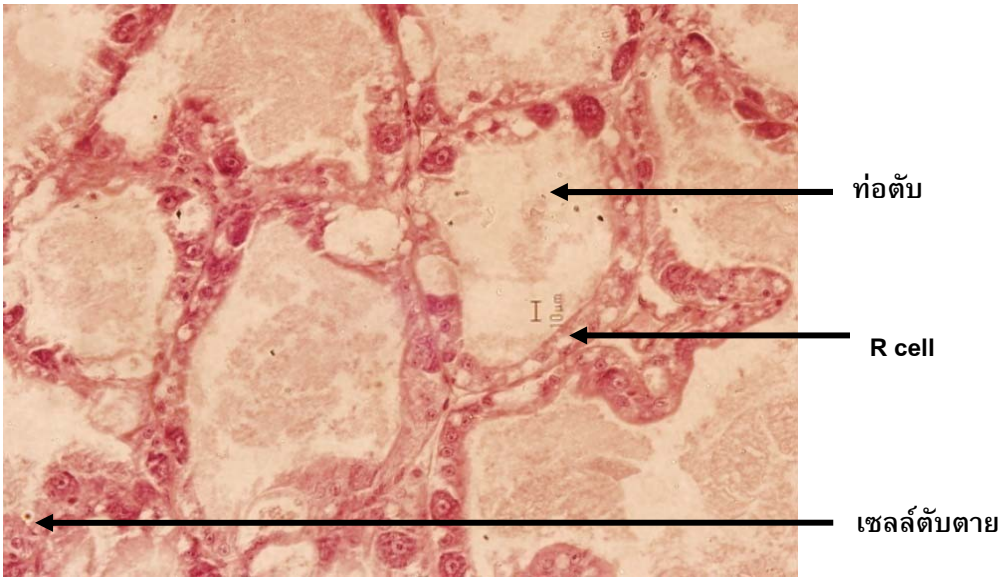
จากการศึกษาในครั้งนี้พบว่า เมื่อกุ้งขาวได้รับฟักฟื้นโดยให้กุ้งขาวกินอาหารที่ไม่มีการเปื้อนของสารพิษ TTX เป็นระยะเวลา 2 สัปดาห์ พบว่า เนื้อเยื่อตับและตับอ่อนของกุ้งสามารถกลับสู่ภาวะปกติได้ในระดับหนึ่ง โดยพบว่า เนื้อเยื่อตับและตับอ่อนของกุ้งขาวที่เคยได้รับสารพิษ TTX ที่ระดับ 2.5 ppm มาก่อน มีเซลล์ที่ใช้ในการสะสมอาหารเพิ่มมากขึ้น แต่มีเนื้อเยื่อบางส่วนที่ยังไม่สามารถกลับสู่ภาวะปกติได้โดยยังมีเซลล์ที่ใช้ในการสะสมอาหาร มีน้อยและมีการตายของเซลล์เกิดขึ้นอยู่อย่างเห็นได้ชัดเจน ส่วนเนื้อเยื่อตับและตับอ่อนของกุ้งขาวที่ได้รับสารพิษ ที่ระดับ 5 ppm มาก่อนพบว่ามีการฟื้นตัวได้เช่นแต่อยู่ในระดับที่น้อยกว่ากุ้งในชุดที่เคยได้รับสารพิษ TTX ที่ระดับ 2.5 ppm ซึ่งยังพบ มีการตายของเซลล์ ร่วมกับเกิดระยะห่างระหว่างท่อตับขึ้น ในขณะที่เนื้อเยื่อบางส่วนมีการฟื้นตัวเข้าสู่ภาวะปกติโดยเริ่มมีเซลล์ที่ใช้ในการสะสมอาหารมากขึ้นเล็กน้อย ในส่วนเนื้อเยื่ออื่นไม่พบอาการที่ผิดปกติ



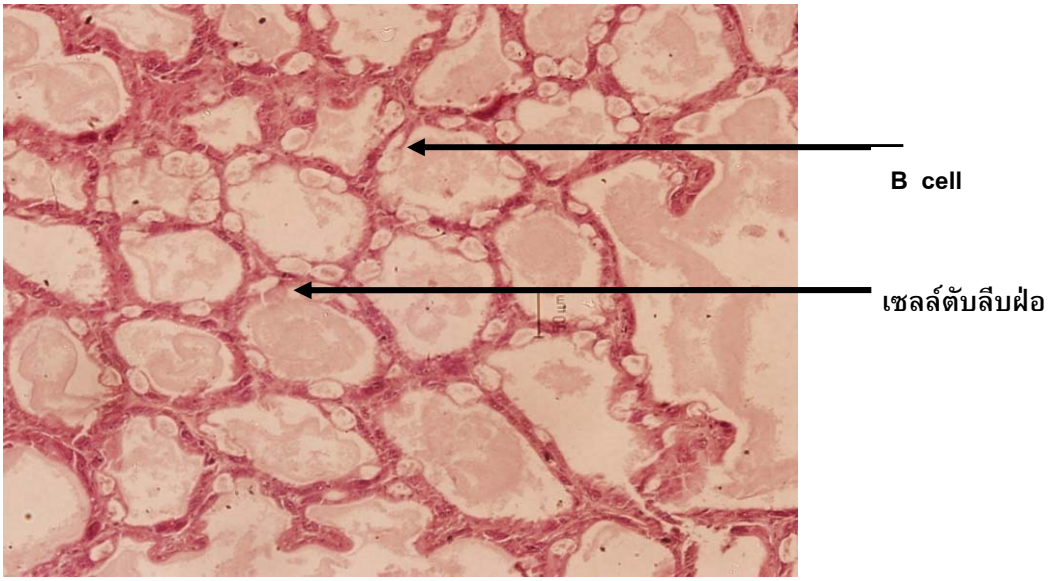
ภาพที่ 15 โครงตับและตับอ่อนปกติของกุ้งในชุดควบคุม พบว่าเนื้อเยื่อตับและตับอ่อนมีเซลล์ที่ใช้สำหรับการสะสมอาหารเพิ่มมากขึ้น (H&E, Bar = 50 µm)



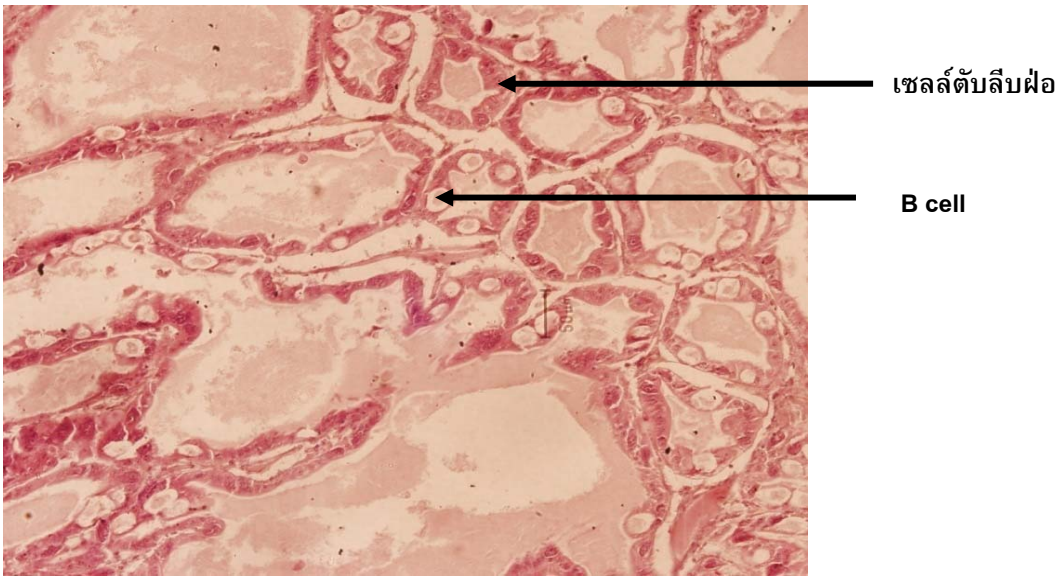
ภาพที่ 16 โครงตับและตับอ่อนของกุ้งหลังจากหยุดให้อาหารที่ผสมสาร TTX 2.5ppm ในระยะเวลา 2 สัปดาห์ พบว่า เซลล์ตับเกิดการลีบฝ่อ (H&E, Bar = 100 µm)



ภาพที่ 17 โครงสร้างตับและตับอ่อนของกุ้งที่เคยได้รับสารพิษ TTX ระดับ 2.5 ppm พบว่าเนื้อเยื่อตับและตับอ่อนมีเซลล์ที่ใช้สำหรับการสะสมอาหารเพิ่มมากขึ้น ในขณะที่บางส่วนยังไม่สามารถฟื้นตัวกลับสู่ภาวะปกติได้โดยยังคงเห็นจำนวนเซลล์ที่ใช้ในการสะสมอาหารมีจำนวนน้อย (H&E, Bar = 10 µm)



ภาพที่ 18 โครงสร้างตับและตับอ่อนของกุ้งที่เคยได้รับสารพิษ TTX ระดับ 5 ppm เซลล์ที่ใช้ในการสะสมอาหารยังมีจำนวนน้อยอยู่ และบางส่วนเริ่มมีเซลล์ที่ใช้ในการสะสมอาหารเพิ่มมากขึ้น (H&E, Bar = 50 µm)



ภาพที่ 19 โครงสร้างตับและตับอ่อนของกุ้งที่เคยได้รับสารพิษ TTX ระดับ 5 ppm และมีเซลล์ที่ใช้ในการสะสมอาหารเพิ่มขึ้น ประกอบกับมีการตายของเซลล์บุผิวท่อตับและตับอ่อน ทำให้เกิดระยะห่างระหว่างภายใน(50um) (H&E, Bar = 50 µm)

บทที่ 4

วิจารณ์ผลการทดลอง

1 การทดลองที่ 1 ผลของสาร TTX ต่อการเจริญเติบโตและสุขภาพของกุ้งขาว

1.1 ผลของสาร TTX ต่อการเจริญเติบโตของกุ้งขาว

การทดลองในครั้งนี้ เป็นจากการศึกษาผลของสาร TTX ที่ปนเปื้อนในอาหาร ระดับ 0, 2.5 และ 5 ppm จากนั้นนำไปให้กุ้งกินเป็นระยะเวลา 6 สัปดาห์ จากการศึกษาในครั้งนี้ พบว่า การเจริญเติบโต (เปอร์เซ็นต์น้ำหนักที่เพิ่มขึ้น อัตราการเจริญเติบโตต่อวัน และ อัตราการเจริญเติบโตจำเพาะ) มีแนวโน้มลดลง และต่ำที่สุดในกุ้งขาวที่ได้รับสารพิษ TTX ที่ระดับ 5 ppm นอกจากนี้ยังพบว่า กุ้งขาวในกลุ่มที่ได้รับสารพิษ TTX ที่ระดับ 5 ppm มีอัตราการเปลี่ยนอาหารเป็นเนื้อสูงที่สุด สอดคล้องกับค่า ประสิทธิภาพการใช้โปรตีนซึ่งต่ำกว่ากุ้งขาวชุดที่ไม่ได้รับสาร TTX ($p<0.05$) ไม่มีความแตกต่างกับกุ้งขาวชุดที่ได้รับสาร TTX ที่ระดับ 2.5 ppm ($p>0.05$) ชี้ให้เห็นว่า เมื่อระดับสาร TTX สูงขึ้นมีผลทำให้ประสิทธิภาพการนำอาหารไปใช้ประโยชน์ทางด้านการเจริญเติบโตได้น้อยลง เนื่องจากนำสารอาหารไปใช้ในส่วนอื่นที่มีความจำเป็นมากกว่า ซึ่งในกรณีนี้กุ้งขาวอาจนำสารอาหารที่ได้มาเปลี่ยนเป็นพลังงานเพื่อใช้ในกิจกรรมของเซลล์และกล้ามเนื้อหลังจากได้รับสารพิษ ซึ่งสอดคล้องกับการรายงายของ Kuriaki และคณะ (1959) เมื่อหนูได้รับสารพิษ TTX มีผลให้เกิดการนำกลูโคสเข้าสู่เซลล์เพิ่มขึ้น ซึ่งแสดงว่าร่างกายมีความต้องการใช้พลังงานมากขึ้นสอดคล้องกับการทดลองในครั้งนี้ เมื่อกุ้งได้รับสารพิษ TTX ทำให้กุ้งขาวที่ได้รับสารพิษนั้นมีการเจริญเติบโตของลดลงในขณะที่อัตราการเปลี่ยนอาหารเป็นเนื้อสูงเพิ่มสูงขึ้น เป็นเพราะร่างกายมีความต้องการนำพลังงานไปใช้มากขึ้นและเซลล์ของระบบทางเดินอาหารถูกทำลายทำให้ร่างกายใช้สารอาหารได้น้อย เช่นเดียวกับการรายงานของ Linares และคณะ (2009) ที่พบว่าเมื่อกุ้งขาวได้รับ *Gymnodinium catenatum* และ *Karenia brevis* เป็นระยะเวลา 60 วัน โดยการผสมลงไปในอาหารสำเร็จรูปที่ระดับความเข้มข้น 10^3 เซลล์ต่อลิตร พบว่า น้ำหนักที่เพิ่มขึ้นของกุ้งที่ได้รับ *G. catenatum* และ *K. brevis* ต่ำกว่าชุดควบคุมและเมื่อนำกุ้งไปตรวจหาสารพิษตกค้างในตัวพบ สาร PSP และ NSP ในกุ้งที่ได้รับ *G. catenatum* และ *K. brevis* ซึ่งสอดคล้องกับการได้รับสารพิษชนิดอื่นซึ่งมีผลต่อการเจริญเติบโตและอัตราการเปลี่ยนอาหารเป็นเนื้อเช่นเดียวกัน จากการรายงานของ Meissner และคณะ (1995) พบว่า กุ้งขาวที่ได้รับอาหารปนเปื้อนสาร aflatoxin ทำให้การเจริญเติบโตลดลง และอัตราการเปลี่ยนอาหารเป็นเนื้อสูงขึ้นเมื่อกุ้งได้รับสารพิษระดับ 500-1,000 ppb และ

เมื่อให้อาหารปนเปื้อนสาร aflatoxin ระดับ 15,000 ppb เป็นเวลา 2 สัปดาห์ กุ้งขาวจะตายหมด Myrna และคณะ (2006) พบว่า กุ้งกุลาดำที่ได้รับอาหารที่ปนเปื้อนสารพิษ aflatoxin จะมีอัตราการเจริญเติบโตลดลงร่วมกับการเกิดโรคเปลือก และจะเกิดการเปลี่ยนแปลงของเนื้อเยื่อทั้งตัวภายหลังได้รับอาหารที่มีการปนเปื้อนสารพิษ aflatoxin เป็นระยะเวลา 62 วัน

1.2 ผลของสาร TTX ต่อองค์ประกอบเลือดของกุ้งขาว

สิ่งมีชีวิตในกลุ่มครัสเตเชียที่อยู่ในน้ำล้อมรอบด้วยปัจจัยของสิ่งแวดล้อมที่สามารถเปลี่ยนแปลงได้ตลอดเวลา เม็ดเลือดและองค์ประกอบเลือดกุ้งสามารถเปลี่ยนแปลงได้ตามสภาพแวดล้อม เช่น การเปลี่ยนแปลงคุณภาพน้ำ วงจรการลอกคราบ และปัจจัยภายในตัวกุ้งเอง เช่น การอักเสบ เมแทโบลิซึม อายุ ระยะเจริญ วัย เพศ และสายพันธุ์ (Mulcahy, 1975) อีกทั้งคุณสมบัติของเม็ดเลือดมักมีการเปลี่ยนแปลงอย่างรวดเร็วเมื่อดูดออกจากแอ่งเลือดและยังขึ้นอยู่กับสุขภาพกุ้งเองด้วย เมื่อกุ้งขาวได้รับสารพิษหรือสิ่งแปลกปลอมเข้าสู่ร่างกาย ร่างกายจะมีการตอบสนองต่อสิ่งแปลกปลอมนั้นๆ โดยด่านแรกของระบบภูมิคุ้มกันในกุ้งคือ เปลือก และเมือก ระบบภูมิคุ้มกันในกุ้งเป็นแบบไม่จำเพาะเนื่องจากเซลล์เม็ดเลือดกุ้งไม่มีเซลล์ที่ทำหน้าที่ในการจดจำสิ่งแปลกปลอมที่เข้ามา แต่จะมีการตอบสนองในส่วนของเม็ดเลือดชนิด hyaline และ granulocyte โดยเม็ดเลือดชนิด hyaline มีหน้าที่หลักในการจับกินสิ่งแปลกปลอมแบบล้อมจับ (phagocytosis) cloting, agglutination ส่วนเซลล์เม็ดเลือดชนิด granulocyte มีหน้าที่หลักในส่วนของระบบ ProPO, precipitin, (กิจการ ศุภมาตย์ และคณะ, 2543) และจากการทดลองในครั้งนี้พบว่า ปริมาณเม็ดเลือดรวมของกุ้งมีแนวโน้มเพิ่มสูงขึ้น โดยในกุ้งขาวชุดที่ได้รับสาร TTX 5 ppm มีปริมาณเม็ดเลือดรวมสูงกว่าทุกชุดการทดลองอย่างมีนัยสำคัญ ในขณะที่กิจกรรมของเอนไซม์ฟีนอลออกซิเดสลดต่ำลงเช่นกัน สอดคล้องกับการรายงานของ Yeh และคณะ (2005) ที่พบว่า เมื่อกุ้งก้ามกรามได้รับสารจำพวก organophophorus ซึ่งเป็นสารกำจัดศัตรูพืชที่ส่งผลต่อการทำงานของระบบประสาทส่งผลต่อ องค์ประกอบเลือดบางประการเช่น ลดการทำงานของเอ็นไซม์ฟีนอลออกซิเดส และทำให้ปริมาณเม็ดเลือดรวมเพิ่มสูงขึ้น ซึ่งสอดคล้องกับค่าปริมาณเม็ดเลือดที่เพิ่มสูงขึ้นของ *Mytilus edulis* หลังจากได้รับสาร Domoic acid ซึ่งเป็นสารพิษที่ทำให้ความจำเสื่อม (Dizer *et al*.,2001) สอดคล้องกับการรายงานของ อรอนงค์ บัณฑิต (2548) รายงานว่า เมื่อกุ้งได้รับสาร T-2 toxin ร่างกายจะมีการสร้างเม็ดเลือดชนิด hyaline เพิ่มสูงขึ้นในขณะที่เซลล์เม็ดเลือดชนิด granulocyte มีปริมาณลดลง และค่ากิจกรรมของเอนไซม์ฟีนอลออกซิเดสลดลงเช่นกัน ซึ่งความว่องไวของกิจกรรมเอนไซม์ฟีนอลออกซิเดสนั้นขึ้นอยู่กับการทำงานของเซลล์เม็ดเลือดชนิดที่มี granule หากกุ้งได้รับสารพิษหรือสิ่งแปลกปลอมเข้าสู่ร่างกายจะส่งผลให้ granule ในเซลล์ลดลงทำให้ความว่องไวของเอนไซม์ฟีนอลออกซิเดสลดต่ำลงด้วย (Perazzolo, 1997) ซึ่งการทดลองในครั้งนี้เป็นไปได้ว่า ปริมาณเม็ด

เลือดรวมที่เพิ่มสูงขึ้นส่วนใหญ่เป็นชนิด hyaline มากกว่าที่จะเป็นการตอบสนองของเซลล์เม็ดเลือดชนิด granulocyte ซึ่งเป็นการทำงานระบบของ ProPO ซึ่งสอดคล้องกับกิจกรรมของเอนไซม์ฟีนอลออกซิเดสที่ลดต่ำลงเช่นกัน

ในส่วนของระดับกลูโคสในเลือดพบว่า กุ้งขาวชุดที่ได้รับอาหารผสมสารพิษ TTX 2.5 และ 5 ppm มีค่าต่ำกว่ากุ้งในชุดควบคุมอย่างมีนัยสำคัญ ($p<0.05$) อธิบายได้ว่า กลูโคสเป็นน้ำตาลโมเลกุลเดี่ยวที่ร่างกายนำไปใช้ชีวิตประจำวันและเป็นองค์ประกอบของเซลล์ ซึ่งระดับของกลูโคสมีความสัมพันธ์กับการที่ร่างกายได้รับสิ่งแปลกปลอม (Pascual *et al*., 2003) จากการทดลอง กุ้งขาวที่ได้รับสาร TTX เข้าสู่ร่างกาย ส่งผลให้กุ้งตกอยู่ภาวะเครียด เนื่องจากความเป็นพิษของสาร TTX และเนื่องจากมีการนำกลูโคสเข้าสู่เซลล์เพิ่มมากขึ้น (Kuriaki *et al*., 1959) เพื่อเป็นแหล่งพลังงานมีผลทำให้ระดับกลูโคสในเลือดลดลง นอกจากนี้หากเซลล์อยู่ในภาวะขาดออกซิเจน สามารถกระตุ้นการขนส่งกลูโคสเข้าสู่ได้เซลล์ได้เช่นเดียวกัน ในขณะที่ค่า oxyhemocyanin/hemolymph protein ไม่มีความแตกต่างกันในทางสถิติทุกชุดการทดลอง ($p>0.05$) การใช้พลังงานในกิจกรรมต่าง ๆในระดับที่สูงขึ้น มีความสัมพันธ์กับค่า oxyhemocyanin (Pascual *et al*., 2003) จากการศึกษาชี้ให้เห็นว่า กุ้งขาวในทุกชุดการทดลองมีความสามารถในการขนส่งออกซิเจนใกล้เคียงกัน เนื่องจากพื้นที่ผิวในการรับออกซิเจนมีขนาดใกล้เคียงกัน แต่ในขณะที่ชุดที่ได้รับสารพิษนั้นมีความต้องการออกซิเจนในปริมาณที่สูงขึ้น แต่ร่างกายสามารถรับได้ในปริมาณเท่าเดิม จึงส่งผลทำให้ออกซิเจนที่ได้รับไม่เพียงพอต่อการทำกิจกรรมของเซลล์ทำให้เซลล์ตกอยู่ในภาวะขาดออกซิเจน โดยภาวะขาดออกซิเจนของเซลล์นี้จะสอดคล้องกับค่าของเอนไซม์ LDH ในกล้ามเนื้อที่สูงขึ้น นอกจากนี้หากสภาพแวดล้อมของการเลี้ยงไม่ดี มีการปนเปื้อนของสารพิษหรือสารเคมีอื่นๆทั้งจากอาหารหรือน้ำที่ใช้เลี้ยงจะทำให้ระบบป้องกันตัวเองลดประสิทธิภาพลงได้ ทำให้กุ้งมีสุขภาพอ่อนแอลงได้เช่นกัน

1.3 ผลของสารพิษ TTX ต่อกิจกรรมของเอนไซม์ AChE และเอนไซม์ LDH

สารพิษ TTX ซึ่งมีคุณสมบัติในการขัดขวางการขนส่งของกระแสประสาท (Noguhi และคณะ, 2006) นอกจากนี้นักวิจัยได้ค้นพบว่า TTX ที่ระดับความเข้มข้น $1.3x10^{-5}$ mg/g สามารถยับยั้งการทำงานของ acetylcholine esterase และ cytochrome-c-oxydase ในขณะที่ cholineacetylase จะถูกยับยั้งในความเข้นที่ต่ำกว่าคือ $1x10^{-7}$ mg/g ในหนูได้ (Kuriaki and Nagano,1957) สอดคล้องกับการรายงานของ Galgani และ Bocquence (1990) รายงานว่า สารจำพวก organophophorus และ carbamate สามารถยับยั้งการทำงานของ choline esterase ส่วน Kaethner และคณะ (1994) พบว่า สาร TTX มีผลต่อ retina ของปลาม้าลายในระยะ embryo และ Linnares และคณะ (2008) รายงานว่า หลังกุ้งขาวได้รับสารพิษ

saxitoxin (STX) โดยการฉีดเข้ากล้ามเนื้อพบว่า กุ้งขาวเกิดอาการเป็นอัมพาตบริเวณหนวดและขาเดิน ว่ายน้ำผิดปกติ และไม่มีการเคลื่อนไหว นอกจากนี้พบว่าการได้รับสารพิษประเภท neurotoxin จะทำให้มีการผลิตสารสื่อประสาท (neurotransmitter) มากกว่าปกติ (ดิสวิน ภู่วุฒิกุล และ วินัย วนานุกูล, 2550) อะซีทิลโคลีน (acetylcholine) ซึ่งเป็นสารสื่อประสาทที่มีการผลิตออกมาในปริมาณมากกว่าปกติ เนื่องจากไม่มีกระแสประสาทไปกระตุ้นให้ Ca^{2+} เข้าไปในเซลล์เพื่อปล่อยสารสื่อประสาทออกจากเซลล์ ทำให้มีการสะสม acetylcholine มากขึ้น ส่งผลทำให้กิจกรรมของเอนไซม์ acetylcholinesterase ลดลงเนื่องไม่มี substrate เข้าไปจับ (กนกวรรณ ติลกสกุลชัย, 2547) ซึ่งสอดคล้องกับผลของกิจกรรมของเอนไซม์ acetylcholinesterase ในระบบประสาทที่มีปริมาณลดลงตามระดับของสารพิษที่เพิ่มสูงขึ้น ซึ่งมีลักษณะคล้ายกับการได้รับสารพิษชนิดอื่นที่ออกฤทธิ์ต่อระบบประสาท เช่น ยาฆ่าแมลงในกลุ่ม organophosphate สอดคล้องกับการรายงานของ สุพัตรา ศรีไชยรัตน์(2538) รายงานว่า กุ้งที่สัมผัสสาร methyl parathion มีระดับการทำงานของ cholinesterase (ChE activity) ในกล้ามเนื้อและปมประสาทลดลง และการลดลงของ ChE activity ขึ้นกับปริมาณของ methyl parathion ที่สัมผัส และการลดลงของ การตอบสนองทางระบบภูมิคุ้มกันเมื่อทดสอบ chemotactic และ phagocytic activity ของ haemocyte นอกจากนี้อาจพบการเปลี่ยนแปลงของ hepatopancreatic cell ในระดับ ultrastructure ส่วน Wongtavatchai และคณะ (2000) ได้รายงานผลการศึกษา ความเป็นพิษกึ่งเฉียบพลันของ methyl parathion ในกุ้งกุลาดำ (ขนาด 18-27 กรัม/ตัว) ที่สัมผัส methyl parathion ในระดับ 3 ppb เป็นเวลา 12-24 ชั่วโมง พบว่า กุ้งที่สัมผัสสาร methyl parathion ไม่แสดงความผิดปกติใดๆ ที่สังเกตได้จากภายนอก รวมทั้งความผิดปกติของของเนื้อเยื่อเหงือกที่มีการสัมผัสกับสาร แต่พบว่า cholinesterase activity ในกล้ามเนื้อมีปริมาณลดลง สอดคล้องกับการรายงานของ Dizer และคณะ (2001) พบว่า เมื่อ *M. edulis* เมื่อได้รับสาร Domoic acid มีผลทำให้กิจกรรมของเอนไซม์ choline esterase ลดลง เช่นเดียวกับการรายงานของ ปิยะรัตน์ จันทร์ศิริพรชัย และคณะ (2545) ที่ได้ทำการทดสอบพิษกึ่งเฉียบพลันของยาฆ่าแมลงในกลุ่ม pyrethroid ต่อกิจกรรมของเอนไซม์ cholinesterase ในกุ้งกุลาดำ การศึกษานี้แสดงให้เห็นว่า cypermethrin และ deltamethrin ในระดับต่ำเพียง 0.1 ppb ทำให้ cholinesterase activity ในกล้ามเนื้อกุ้งลดลงหลังจากการสัมผัสสารกลุ่ม pyrethroid ซึ่งเป็นสารที่ออกฤทธิ์ต่อระบบประสาท การศึกษาในครั้งให้ผลการทดลองที่สอดคล้องกับการรายงานของ Fujii และ Novales (1968) ที่พบว่าสาร TTX มีผลต่อสารสื่อประสาทที่เกี่ยวกับการกระตุ้นการสร้างเม็ดสีของปลา Killifish และสารพิษ TTX ตั้งแต่ 10^{-8} ถึง $5x10^{-6}$ กรัมต่อml มีผลกระตุ้นการทำงานของกล้ามเนื้อเรียบ กล้ามเนื้อหัวใจ และกล้ามเนื้อเนื้อลายของหนู (Kuriyama *et al*., 1966) หากกล้ามเนื้อถูกกระตุ้นให้ทำงานหนัก ทำให้เซลล์อยู่ในภาวะขาดออกซิเจน (anaerobic conduction) และจากการรายงานของ Shankar และ Quastel (1972) พบว่า เนื้อเยื่อประสาทของหนูที่ได้รับสารพิษ TTX เป็นอัมพาตเกิดภาวะมีออกซิเจนในเนื้อเยื่อต่ำกว่าปกติ มีผลทำให้

ปริมาณ lactate เพิ่มมากขึ้น เนื่องจากการหายใจแบบไม่ใช้ออกซิเจนของเซลล์ ซึ่งปฏิกิริยานี้จะเกิดขึ้นในเซลล์กล้ามเนื้อขณะที่มีการทำงานหนัก ทำให้เกิด lactic acid และ NAD^+ ขึ้นมา โดยมีเอนไซม์ lactate dehydrogenase (LDH) เป็นตัวเร่งปฏิกิริยา (เปลื้อง สุวรรณมณี, 2544) สอดคล้องกับการทดลองในครั้งนี้ ที่พบว่า เมื่อกุ้งได้รับสารพิษ TTX เซลล์อยู่ในภาวะถูกกระตุ้นตลอดเวลาทำให้เกิดภาวะการขาดออกซิเจน ส่งผลให้กิจกรรมของเอนไซม์ LDH ในกล้ามเนื้อเพิ่มสูงขึ้นตามมาด้วย และเมื่อเซลล์อยู่ในสภาวะขาดออกซิเจนจึงมีความจำเป็นที่ต้องใช้พลังงานในการทำกิจกรรมเพิ่มขึ้น ทำให้มีการขนส่งน้ำตาลเข้าสู่เซลล์เพื่อเป็นแหล่งพลังงานเพิ่มมากขึ้น ส่งผลให้สารอาหารที่ใช้สำหรับการเจริญเติบโตหรือการสะสมในตัวมีปริมาณน้อยลง ซึ่งสอดคล้องกับผลการทดลองในด้านการเจริญเติบโตครั้งนี้ด้วย

1.4 ผลของสารพิษ TTX ต่อปริมาณแร่ธาตุในน้ำเลือดของกุ้งขาว

จากการศึกษาในครั้งนี้พบว่า ปริมาณแร่ธาตุ Ca^{2+}, Mg^{2+}, Na^{+}ในน้ำเลือดของกุ้งขาวที่ได้รับอาหารผสมสารพิษ TTX มีแนวโน้มลดลง ส่วน K^+ ในน้ำเลือดไม่มีความแตกต่าง 3 ชุดการทดลอง ซึ่งสอดคล้องการรายงานของ Pullman และคณะ (1968) ที่พบว่า เมื่อสุนัขได้รับสารพิษ TTX โดยการฉีดเข้าเส้นเลือด ทำให้หลอดเลือดขยายตัวและเหนี่ยวนำให้มีการขับออกของ Na ในไตเพิ่มมากขึ้นในถัดมาคือ Ca^{2+}ในขณะที่ K^+ และ Mg^{2+}ในขณะที่มีการขับมีการขับออกเพียงเล็กน้อย จากที่กล่าวมา การเปลี่ยนแปลงของแร่ธาตุในตัวน้ำเลือดของกุ้งอาจเป็นมาจากปัจจัยที่กล่าวมาข้างต้น นอกจากนี้การเปลี่ยนแปลงของแร่ธาตุในน้ำเลือดของสิ่งมีชีวิตในกลุ่มครัสเตเชียยังขึ้นอยู่กับหลายปัจจัย และพบว่ากุ้งแต่ละชนิดมีสมดุลเกลือแร่แตกต่างกัน โดยกุ้งกุลาดำจะมีความเข้มข้นของเลือดเพิ่มขึ้นเมื่อน้ำมีความเค็มเพิ่มขึ้น เมื่อมีการเปลี่ยนแปลงของความเค็มทำให้ต้องใช้พลังงานมากด้วย กล่าวคือ ความสัมพันธ์ของความเค็มน้ำที่เปลี่ยนแปลงมีผลต่อระดับความเข้มข้นของแร่ธาตุของเลือด นอกจากนี้แร่ธาตุเป็นองค์ประกอบสำคัญในโครงสร้างเปลือกและเนื้อเยื่อ รวมทั้งเป็นองค์ประกอบปัจจัยอื่นร่วมหรือตัวกระตุ้นในน้ำย่อยหลายชนิดของกุ้ง (บุญรัตน์ ประทุมชาติ, 2008)

1.5 ผลของสารพิษ TTX ต่ออัตราการรอดของกุ้งขาว

พบว่าอัตราการรอดตายกุ้งขาวทุกชุดการทดลองไม่มีความแตกต่างกันในทางสถิติ ($p<0.05$) ซึ่งเป็นไปได้ว่าระดับของสารพิษที่กุ้งได้นั้นไม่รุนแรง หรืออยู่ในระดับที่ร่างกายกุ้งสามารถรับได้ โดยไม่ทำให้กุ้งตายแต่แสดงออกที่อวัยวะหรือระบบการทำงานของร่างกาย ความรุนแรงของสารพิษที่ได้รับขึ้นอยู่กับปริมาณของสารที่ได้รับ อายุหรือขนาดของสัตว์ จากการรายงานของ Hwang และคณะ (1990) รายงานว่า สัตว์ในกลุ่มครัสเตเชียได้แก่ กุ้ง และปู มี

ค่า minimum lethal dose 99 (MLD_{99}) 0.5-5 MU/20 กรัมน้ำหนักตัว โดยกุ้งกุลาดำ อยู่ที่ 0.5 MU /20 กรัมน้ำหนักตัว กุ้งแชบ๊วย 2-5 MU/20 กรัมน้ำหนักตัว โดยการฉีดสารพิษ TTX และ PSP เข้ากล้ามเนื้อ ซึ่งตรงนี้ชี้ให้เห็นว่าขนาดและชนิดของสัตว์มีผลต่อความรุนแรงของสารพิษที่ได้รับ

1.6 ผลของสาร TTX ต่อการเปลี่ยนแปลงของเนื้อเยื่อ

สารพิษเมื่อเข้าสู่ร่างกายคนหรือสัตว์ ถูกดูดซึมเข้าสู่กระแสโลหิตแล้ว จะมีการแพร่กระจายไปยังส่วนต่าง ๆของร่างกาย การแพร่กระจายของสารพิษนั้นขึ้นอยู่กับอัตราการไหลเวียนของเลือดไปยังบริเวณต่าง ๆ และความสามารถของสารพิษในผ่านเยื่อหุ้มเซลล์หรือการจับเกาะกับเนื้อเยื่อ สารพิษ ถ้าสารพิษสามารถกระจายเข้าสู่เนื้อเยื่อได้อย่างรวดเร็ว จะทำให้ความเข้มข้นของสารพิษในกระแสเลือดลดลง และหากสามารถละลายเข้าไปในเซลล์ของเนื้อเยื่อได้จะมีการแพร่กระจายไปทั่วร่างกาย (อนงค์ บิณฑวิหค, 2546) การออกฤทธิ์ของสารพิษต่อเซลล์หรือออร์แกเนลล์ของอวัยวะต่าง ๆทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงหน้าที่ โครงสร้างหรือการทำงานของระบบต่าง ๆในร่างกาย (Shimojo และ Iwaoka, 2000) เมื่อสัตว์ได้รับสารพิษ TTX มีผลทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงทางสัณฐานวิทยา และชีวเคมีของไมโตคอนเดียในเซลล์ของระบบประสาท (Yin *et al*., 2005) สอดคล้องกับการรายงานของ มะลิ บุณยรัตผลิน และคณะ (2543) รายงานว่ากุ้งกุลาดำที่ได้รับอาหารปนเปื้อน aflatoxin ระดับ 74-220 ppb เป็นเวลา 8 สัปดาห์ จะมีการเปลี่ยนแปลงของเนื้อเยื่อตับอ่อนอย่างชัดเจน โดยพบเซลล์ท่อตับฝ่อและลีบ มีการแทรกตัวของเม็ดเลือดในส่วนของช่องว่างระหว่างท่อตับ และตรวจพบเซลล์ตายการเปลี่ยนแปลงของเนื้อเยื่อรุนแรงที่สุดในกุ้งที่ได้รับ aflatoxin ระดับสูงสุด (220 ppb) และความรุนแรงจะลดลงในกุ้งที่ได้รับ aflatoxin น้อยลงเช่นเดียวกับการศึกษาของ Lavilla-Pitogo และคณะ (1994) รายงานว่ากุ้งกุลาดำที่ได้รับ aflatoxin ระดับ 50 ppb เป็นเวลา 60 วัน พบเซลล์ตับที่ทำหน้าที่เก็บสะสมอาหารลดขนาดลง เม็ดเลือดจำนวนมากแทรกระหว่างท่อตับและเกิด melanization บริเวณที่มีการตายของเซลล์ สอดคล้องกับการรายงานของ Freeman และ Fingerman (1969) รายงานว่า กุ้ง Palaemonetes ที่ได้รับ TTX ที่ระดับความเข้มข้น $3x10^{-7}$ M ทำให้เกิด hyperpolarization ของ chromatophore ส่วน Linares และคณะ (2008) พบว่าหลังจากกุ้งได้รับสาร STX โดยการฉีดเข้ากล้ามเนื้อที่ระดับความเข้มข้น 5 MU/กรัมน้ำหนักตัว พบว่ามีการเปลี่ยนแปลงของกล้ามเนื้อหัวใจและเนื้อเยื่อของระบบประสาทโดยพบว่า กล้ามเนื้อหัวใจมีการขยายตัวเพิ่มมากขึ้น เกิดช่องว่างภายในหัวใจ และในส่วนของเซลล์ประสาทบริเวณ ganglia พบว่าเซลล์ที่ยึดเกาะกันมีปริมาณลดลง ในปีถัดมา Linares และคณะ (2009) ได้ทำการทดลองในกุ้งขาว พบว่า หลังจากกุ้งที่ได้รับ *Gymnodinium catenatum* และ *Karenia brevis* ซึ่งมีสาร PSP และ NSP ปนเปื้อนอยู่ เป็นระยะเวลา 60 วัน พบว่า ทำให้เกิดความ

เสียหายแก่เนื้อเยื่อตับและตับอ่อน คือมีจำนวนเซลล์ที่ใช้ในการสะสมอาหารลดลง รวมทั้งเกิดการตายของเซลล์ ในส่วนของระบบประสาทพบว่าเนื้อเยื่อในส่วนของ ganglia cell มีการตายของเซลล์เกิดขึ้น ในส่วนของกล้ามเนื้อหัวใจพบว่าเกิดช่องว่างภายในหัวใจมากขึ้น (lysis) ชะลอ ลิ้มสุวรรณ และคณะ (2009) เมื่อศึกษาทางพยาธิสภาพของเนื้อเยื่อกุ้งที่ได้รับอาหารที่ปนเปื้อนสารเมลามีน พบว่า บริเวณส่วนหัวของกุ้งมีอาการบวมและมีจุดสีขาว อวัยวะส่วนที่มีการเปลี่ยนแปลงมากที่สุดคือ antennal gland หรือ green gland ซึ่งเป็นอวัยวะที่ใช้ในการขับถ่ายของเสีย เมื่ออวัยวะที่ทำหน้าที่ในการควบคุมปริมาณของเหลวและขับถ่ายของเสียได้รับผลกระทบทำให้การควบคุมปริมาณของเหลวไม่เป็นปกติ ทดลองในครั้งนี้ ซึ่งพบว่ากุ้งที่ได้รับสารพิษ TTX เกิดการเปลี่ยนแปลงของเนื้อตับและตับอ่อนโดยความรุนแรงจะเพิ่มขึ้นตามระดับของสารพิษที่เพิ่มขึ้น ซึ่งการเปลี่ยนที่สามารถพบได้ในกุ้งที่ได้รับสารพิษ 2.5 และ 5 ppm คือ เซลล์ที่ใช้ในการสะสมอาหารมีจำนวนลดลง เกิดการตายของเซลล์บุผิวท่อตับ ในขณะที่กุ้งขาวที่ได้รับสารพิษ TTX ในระดับสูงสุด (5 ppm) เกิดระยะห่างระหว่างท่อภายในตับอ่อนมากขึ้น และมีของเหลวแทรกอยู่ระหว่างท่อตับ แต่ไม่พบการเปลี่ยนแปลงของกล้ามเนื้อหัวใจและเนื้อเยื่อบริเวณปมประสาท ซึ่งจากการทดลองในครั้งนี้ไม่พบความผิดปกติดังกล่าว สอดคล้องกับ อนงค์ บิณฑวิหค (2546) สารพิษเมื่อเข้าสู่ร่างกายจะออกฤทธิ์ต่อการทำงานของเซลล์ต่างๆ เช่น ทำให้การลีบฝ่อ (artrophy) หรือทำให้เซลล์มีขนาดเล็กลง การแทรกตัวของของเหลวจนทำให้เกิดเซลล์ตาย โดยส่วนต่างๆ ของเซลล์จะถูกทำลาย (necrosis) นอกจากนี้ยังพบการตายของเยื่อหุ้มไลโซโซม ทำให้เกิดช่องว่างภายในเซลล์และย้อมติดสีชมพูมากขึ้น ซึ่งเป็นไปได้ว่า ระดับของสารพิษที่ไดรับไม่รุนแรงและประกอบระยะเวลที่ได้รับสารพิษในเวลาไม่นานพอที่จะทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงของเนื้อเยื่อส่วนอื่นได้ และเมื่อมีการเปลี่ยนแปลงของเซลล์ตับ เช่น การเสื่อมสลายและตายของเซลล์ตับ ทำให้การใช้ประโยชน์ของโภชนะในร่างกายสัตว์มีประสิทธิภาพลดลง และส่งผลกระทบต่อการเจริญเติบโตของสัตว์ตามมา (Ueno, 1983) เนื่องจากตับมีหน้าที่เก็บรวบรวมสารอาหารซึ่งดูดซึมจากทางเดินอาหารแล้วผ่านกระบวนการเมแทบอลิซึมเพื่อเปลี่ยนเป็นสารเก็บสะสมไว้ สร้างน้ำย่อย การสังเคราะห์โปรตีนสำหรับใช้เพื่อการเจริญเติบและเป็นแหล่งพลังงาน

1.7 การตกค้างสารพิษ TTX ภายในตัวของกุ้งขาว

จากการศึกษา ตรวจหาสารพิษ TTX ในกุ้งที่ได้รับอาหารที่ผสมสารพิษ TTX 2.5 และ 5 ppm เป็นระยะเวลา 6 สัปดาห์ โดยวิธี LC-MS/MS ปรากฏว่า ไม่พบสารตกค้างในตัวกุ้ง หรือมีสารสะสมอยู่ในปริมาณน้อยเกินกว่า 0.003 mg ซึ่งน้อยกว่าที่เครื่องสามารถตรวจหาได้ Linares และคณะ (2009) รายงานว่า เมื่อกุ้งขาวได้รับ *Gymnodinium catenatum* และ *Karenia brevis* เป็นระยะเวลา 60 วัน โดยการผสมลงไปในอาหารสำเร็จรูปในความเข้มข้น

10^3 เซลล์ต่อลิตรพบว่า กุ้งน้ำหนักที่เพิ่มขึ้นต่ำกว่าชุดควบคุมและเมื่อนำกุ้งไปหาสารพิษตกค้างในตัวพบสาร PSP และ NSP ในกุ้งที่ได้ *G. catenatum* และ *K. brevis* ในระดับ 40-75 ไมโครกรัม ต่อเนื้อเยื่อ 100 กรัม Hu และ Kao (1986) พบว่าที่ pH 7.8 ถึง 8.8 มีผลทำให้พันธะไฮโดรเจน ที่คาร์บอนตำแหน่งที่ 10 ของ TTX ไม่สามารถไปจับกับตัวรับบนผนังเซลล์ของเซลล์ประสาท ส่งผลให้ความรุนแรงของ TTX ลดลง และเนื่องจากสารพิษ TTX นั้นสามารถละลายน้ำได้อาจจะถูกขับออกมาพร้อมของเสียในร่างกาย พร้อมแร่ธาตุต่างๆ ทาง antennal grand ซึ่งเป็นเนื้อเยื่อเฉพาะสำหรับทำหน้าที่ในการขับถ่ายของเสีย ซึ่งการศึกษาในครั้งนี้ไม่พบการเปลี่ยนแปลง antennal grand แสดงให้เห็นว่าร่างกายของกุ้งสามารถที่ขับสารพิษ TTX ออกจากร่างกายได้ เมื่ออวัยวะที่ใช้ในการขับถ่ายยังอยู่ในสภาพสมบูรณ์ ซึ่งสอดคล้องกับการรายงานของ ชลอ ลิ้มสุวรรณ และคณะ (2009) ที่ได้ทำการศึกษาลักษณะภายนอกและการเปลี่ยนแปลงทางพยาธิสภาพของเนื้อเยื่อของกุ้งขาวที่ไดรับอาหารเม็ดสำเร็จรูปผลิตจากวัตถุดิบที่ปนเปื้อนสารเมลามีนและกรดไซยานูริคซึ่งพบว่า antennal grand ได้รับความเสียหายทำให้ประสิทธิภาพในการขับถ่ายของเสียออกจากร่างลดลง โดยไม่ถูกดูดซึมกลับ ซึ่งการดูดซึมกลับเข้าไปของสารอาหารหรือสารพิษนั้นขึ้นอยู่กับความสามารถในการละลายตัวในไขมันของสารพิษ แต่เนื่องด้วยสารพิษ TTX เป็นสารพิษที่ไม่ละลายในไขมัน (Narashi *et al*., 1966) จึงอาจทำให้ถูกขับออกและไม่มีการดูดซึมกลับเข้าสู่กระแสโลหิตทำให้ไม่มีการตกค้างสารพิษของในร่างกายหรือในเนื้อเยื่อ

2.การทดลองที่ 2 การฟื้นตัวของกุ้งขาวหลังจากได้รับสารพิษ TTX

หลังจากกุ้งได้รับสารพิษ TTX ติดต่อกันเป็นระยะเวลา 6 สัปดาห์นั้นทำให้ทราบว่า สารพิษดังกล่าวมีผลต่อการเจริญเติบโตและสุขภาพของกุ้ง ดังนั้นการทดลองในเรื่องนี้จึงมีวัตถุประสงค์ศึกษาการฟื้นตัวของกุ้งขาวหลังจากได้รับสารพิษ โดยนำกุ้งที่ได้รับอาหารที่ผสมสารพิษมาพักฟื้นด้วยการนำมาเลี้ยงด้วยอาหารปกติที่ไม่มีการปนเปื้อนของสารพิษ TTX เป็นระยะเวลา 2 สัปดาห์ ซึ่งจากการทดลองในครั้งนี้พบว่า ค่าขององค์ประกอบเลือดเบื้องต้นของกุ้งขาวปริมาณเอ็นไซม์ acetylcholenesterase และ lactate dehydrogenase หลังจากได้รับอาหารปกติแทนอาหารที่ผสมสารพิษ ไม่มีความแตกต่างกับค่าขององค์ประกอบเลือดของกุ้งในชุดควบคุม เป็นไปได้ว่ากุ้งขาวสามารถกำจัดสารพิษออกจากร่างได้ สอดคล้องกับการรายงานของ Hwang และคณะ (1990) รายงานว่า สัตว์ในกลุ่มครัสเตเชียได้แก่ กุ้ง และปู มีค่า MLD 50 น้อยกว่า 10 MU/20 กรัมน้ำหนักตัว ซึ่งมีความสามารถในการรับสารพิษ TTX ได้ที่ระดับน้อยกว่า และเมื่อนำกุ้งไปวิเคราะห์สารตกค้างไม่พบสาร TTX ในตัว (Dizer *et al*.,2001) พบว่า *M. edulis* ที่ได้รับสาร Domoic acid จะมีปริมาณเม็ดเลือดเพิ่มสูงขึ้น และจะลดลงภายใน 7 วัน และจากการรายงานของ Omondi และ Stark (2001) พบว่า สภาวะที่เหมาะในการทำงานของ

เอ็นไซม์ protease ในระบบย่อยอาหารของกุ้งจาก midgut gland พบว่า เอ็นไซม์ protease มีภาวะการทำงานที่เหมาะที่ pH ระหว่าง 7.7-9.2 จากการทดลองในครั้งนี้เป็นไปได้ว่า ความรุนแรงของสารพิษที่กุ้งได้รับยังอยู่ในสภาวะที่ร่างกายสามารถกำจัดออกได้ หรือเป็นเพราะความรุนแรงของสารพิษลดลงเนื่องจากละลายไปกับน้ำ หรือจากสภาวะของทางเดินอาหารที่มีค่า pH เป็นด่าง เพราะสารพิษ TTX มีคุณสมบัติเป็นกรด และจะสลายตัวเมื่ออยู่ในสภาวะที่เป็นด่าง ดั้งนั้นจึงมีความเป็นได้ว่า pH ในระบบทางเดินอาหารของกุ้งมีส่วนช่วยในการลดความรุนแรงของสารพิษลง Hu และ Kao (1986) พบว่า pH มีผลต่อการทำงานสารพิษ TTX ต่อการไปขัดขวางการเข้าและออกของ Na โดยพบว่าที่ pH 8.8 สารพิษ TTX มีความรุนแรงลดลงเนื่องจากคาร์บอนตำแหน่งที่ 10 เป็นตำแหน่งที่มีทั้งประจุลบและบวก เมื่อระดับ pH สูงขึ้นทำให้พันธะไฮโดรเจนที่ยึดเหนี่ยวกันอ่อนลดลง จึงทำให้สารพิษนั้นลดระดับความรุนแรงลดลง ทำให้ร่างกายสามารถรับและกำจัดสารพิษออกได้ซึ่งสอดคล้องกับลักษณะทางพยาธิสภาพของเนื้อเยื่อ antennal gland ซึ่งไม่พบความผิดปกติ และเมื่อเวลาผ่านไปร่างกายเริ่มมีการปรับตัวได้จึงทำให้มีอัตราการตายอยู่ระดับปกติ หรือบางครั้งหากไดรับสารพิษในความเข้มข้นต่ำติดต่อกันหลายครั้งก็จะทำให้การเกิดพิษลดลงหรือไม่เกิดพิษเลย ทั้งนี้ความรุนแรงของสารพิษ TTX ขึ้นอยู่กับปริมาณและระยะเวลาที่ได้รับ เพศ อายุ และชนิด ซึ่งสัตว์แต่ละชนิดมีความไวต่อการเกิดพิษแตกต่างกัน

เนื้อเยื่อตับและตับอ่อนของกุ้งขาวที่ได้รับสารพิษ TTX มีบางส่วนที่ได้รับความเสียหายจากการได้รับสารพิษเช่น จำนวนเซลล์ที่ใช้ในการสะสมอาหารลดลงและการตายของเซลล์บุผิวท่อตับตับและตับอ่อน มีของเหลวแทรกอยู่ระหว่างท่อตับ เกิดระยะห่างระหว่างท่อตับยังคงปรากฏให้เห็น แต่เมื่อได้รับการพักฟื้นพบว่า มีเนื้อเยื่อตับและตับอ่อนบางส่วนที่จำนวนเซลล์ที่ใช้ในการสะสมอาหารมีจำนวนเพิ่มมากขึ้น เมื่อร่างกายไดรับสารพิษอวัยวะต่างๆ ที่ได้รับความเสียหายอาจกลับคืนสู่สภาวะปรกติได้ แต่บางครั้งสารพิษนั้นก็ทำให้เนื้อเยื่อถูกทำลายหรือเปลี่ยนแปลงไป การที่เนื้อเยื่อจะกลับคืนสู่ภาวะปรกติได้หรือไม่นั้น ขึ้นอยู่กับเนื้อเยื่อนั้นมีเซลล์ตั้งต้นที่สามารถแบ่งตัวหรือเจริญเติบโตขึ้นมาทดแทนเซลล์เดิมที่ถูกทำลายโดยสารพิษ เช่น ตับมีเซลล์ตั้งต้นภายในเป็นจำนวนมาก เมื่อเซลล์ตับถูกทำลายจะมีเซลล์แบ่งตัวและเจริญเติบขึ้นมาแทนที่ได้ และหากความเข้มข้นของสารพิษไม่ได้ทำให้เซลล์ได้รับความเสียหายมากนักจะทำให้เซลล์กลับคืนสู่สภาวะปกติได้ (อนงค์, 2548) แต่เนื่องด้วยระยะเวลาเพียง 2 สัปดาห์ที่ใช้ในการทดลองนั้น อาจไม่เพียงพอสำหรับทำให้ร่างกายหรือเซลล์ต่างๆ กลับสู่สภาวะปกติได้อย่างสมบูรณ์จึง จากการทดลองครั้งนี้ชี้ให้เห็นว่า ร่างกายของกุ้งขาวสามารถปรับเข้าสู่สภาวะปกติเมื่อไม่มีสารพิษไปรบกวนการทำงานของอวัยวะหรือระบบต่างๆของร่างกาย

จากการศึกษาในครั้งนี้พบว่า เอ็นไซม์ acetylcholinesterase (AChE) ในระบบประสาทลดลง จากการที่กุ้งได้รับสารพิษ TTX และหากมีการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ AChE ซึ่งเป็นเอนไซม์ที่สำคัญในขบวนการสื่อสัญญาณประสาท ตรงบริเวณรอยต่อของเซลล์

ประสาทกล้ามเนื้อ (neuromuscular junction) มีผลให้กุ้งมีร่างกายอ่อนแรงลง เนื่องมาจากการหดตัวของกล้ามเนื้อ และถ้าอาการรุนแรงมาก ทำให้เกิดเป็นอัมพาต (paralysis) การได้รับสารพิษในระยะแรกทำให้เกิดการหดเกร็งของกล้ามเนื้อ ซึ่งส่งผลโดยตรงต่อเซลล์กล้ามเนื้อเมื่อมีการหดมากขึ้น ทำให้เซลล์อยู่ในภาวะขาดออกซิเจน ดังนั้นเซลล์จึงจำเป็นต้องใช้กระบวนการหายใจแบบไม่ใช้ออกซิเจนผลผลิตที่ได้คือมีปริมาณเอนไซม์ lactate dehydrogenase (LDH) เพิ่มมากขึ้น เมื่อร่างกายอยู่ในสภาวะที่ไม่ปกติจำเป็นต้องใช้ ATP เพื่อเป็นแหล่งพลังงานในการอยู่รอด ดังนั้นสารอาหารที่ได้มาส่วนใหญ่ต้องนำมาใช้เป็นแหล่งงานให้กับกระบวนการดังกล่าว ทำให้มีสารอาหารไม่เพียงพอที่จะนำไปสะสมหรือใช้ในการเจริญเติบโต ส่งผลให้กุ้งขาวมีการเจริญเติบโตลดลง ซึ่งยืนยันได้จากการที่ตับและตับอ่อนมีปริมาณเซลล์ที่ใช้ในการสะสมอาหารลดลงนั้นเอง แต่อย่างไรก็ตามกุ้งมีความสามารถในการกำจัดสารพิษออกจากร่างกายได้หรือมีการสะสมอยู่ในปริมาณน้อยเนื่องจากไม่สามารถตรวจพบสารพิษภายในตัวกุ้ง เมื่อกุ้งขาวได้รับอาหารที่ไม่มีสารพิษ TTX ปนเปื้อน พบว่า องค์ประกอบเลือดต่างๆ ระดับของเอ็นไซม์ AChE ในระบบประสาท และระดับของเอ็นไซม์ LDH ในกล้ามเนื้อไม่มีความแตกต่างกุ้งกุ้งในชุดควบคุม แสดงให้เห็นว่า ร่างกายของกุ้งมีการฟื้นตัวได้ในระดับหนึ่งหากไม่มีการได้รับสารพิษเพิ่มเติม และมีแนวโน้มที่กลับคืนสู่ภาวะปกติได้เมื่อเวลาผ่านไประยะหนึ่ง

บทที่ 5

สรุปผลการทดลอง

จากการศึกษาผลของสารพิษ TTX ต่อการเจริญเติบโตและองค์ประกอบเลือดของกุ้งขาวพบว่า กุ้งขาวที่ได้รับอาหารผสมสารพิษ TTX เป็นระยะเวลา 6 สัปดาห์ มีพฤติกรรมในการเข้ามากินอาหารช้าลง และเป็นไปอย่างต่อเนื่องจนสิ้นสุดการทดลอง และส่งผลต่อ การเจริญเติบโต (เปอร์เซ็นต์น้ำหนักที่เพิ่มขึ้น อัตราการเจริญเติบโตต่อวัน อัตราการเจริญเติบโตจำเพาะอัตราการเปลี่ยนอาหารเป็นเนื้อ) โดยทำให้กุ้งขาวมีการเจริญเติบโตช้ากว่ากุ้งขาวที่ไม่ได้รับสารพิษ TTX ในส่วนของ ระดับกลูโคสในเลือด ปริมาณโปรตีนในซีม กิจกรรมของเอนไซม์ฟีนอลออกซิเดสลดต่ำลง เมื่อระดับของสารพิษเพิ่มสูงขึ้นเป็น 0 2.5 และ 5 ppm ในขณะเดียวกัน กิจกรรมของเอ็นไซม์ acetylcholinesterase ในระบบประสาทและปริมาณแร่ธาตุต่างๆ ในน้ำเลือดของกุ้งขาวลดลงเช่นเดียวกับการเจริญเติบโตและองค์ประกอบเลือดบางประการ ตรงข้ามกับปริมาณเม็ดเลือดรวม และกิจกรรมของเอ็นไซม์ lactate dehydrogenase ในกล้ามเนื้อซึ่งมีปริมาณเพิ่มสูงขึ้นตามระดับของสารพิษที่เพิ่มขึ้น และมีผลต่อพยาธิภาพของเนื้อเยื่อตับและตับอ่อนของกุ้ง ทำให้เซลล์ที่ใช้ในการสะสมอาหารลดลง มีการตายเซลล์บุผิวท่อตับ และเกิดระยะห่างระหว่างท่อตับ แต่ไม่พบการตกค้างของสารพิษในตัวกุ้ง นอกจากนี้ยังพบว่า เมื่อเลี้ยงกุ้งที่ได้รับสารพิษด้วยอาหารในชุดควบคุมต่อเนื่องเป็นระยะเวลา 2 สัปดาห์ พบว่า องค์ประกอบเลือดต่างๆ และกิจกรรมของเอนไซม์ ไม่มีความแตกต่างกับกุ้งที่ไม่ได้รับสารพิษ ส่วนเนื้อเยื่อตับและตับอ่อนของกุ้งไม่สามารถกลับคืนสู่ภาวะปกติได้อย่างสมบูรณ์ ซึ่งต้องใช้ระยเวลาในการฟื้นตัวมากกว่านี้

จากการศึกษาครั้งนี้ชี้ให้เห็นว่า สารพิษ TTX มีผลต่อการเจริญเติบโตและการสะสมอาหาร รวมการทำงานของระบบประสาทและกล้ามเนื้อด้วยหากได้รับสารพิษติดต่อกันในช่วงระยะเวลาหนึ่ง และสารพิษที่ระดับ 2.5 ppm เริ่มส่งผลต่อการเจริญเติบและสุขภาพของกุ้ง

ข้อเสนอแนะ

ปลาปักเป้า เป็นปลาที่มีการสะสมสารพิษ TTX ในร่ายกาย หากมีการนำปลอมปนกับปลาชนิดอื่นๆ ในการทำปลาป่น อาจทำให้สารพิษ TTX ปนเปื้อนในปลาป่นซึ่งเป็นวัตถุดิบสำคัญในการผลิตอาหารสัตว์ได้ ดังนั้นในการผลิตปลาป่นควรมีการคัดเลือดชนิดของปลาที่จะนำมาเป็นปลา

ป่นเพื่อเป็นการป้องกันการปนเปื้อนของสารพิษ TTX ในวัตถุดิบอาหารและในอาหารสัตว์และเพื่อความปลอดภัยของผู้บริโภค

ภัยของสารพิษจากธรรมชาติในวงจรอาหารที่ มีผลต่อสุขภาพของมนุษย์และสัตว์ ทั้งแบบเฉียบพลันและเรื้อรัง ทำให้ต้องมีมาตรการควบคุมการปนเปื้อนของสารพิษจากธรรมชาติตั้งแต่การวิเคราะห์ การจัดการความเสี่ยง และการป้องกันอันตรายที่ จะเกิดจากสารพิษจากธรรมชาติเหล่านั้น รวมถึงการเจรจาต่อรองการค้าระหว่างประเทศ หลายประเทศให้ความสำคัญต่อการพัฒนากระบวนการวิเคราะห์ วัสดุอ้างอิง และการประกันคุณภาพการวิเคราะห์

เอกสารอ้างอิง

กนกวรรณ ติลกสกุลชัย. 2547. ประสาทสรีรวิทยาพื้นฐาน. *ใน* สรีรวิทยา 1 (วัฒนา วัฒนาภา, สุพัตรา โล่ห์สิริวัฒน์ และสุพรพิมพ์ เจียสกุล) หน้า 49-111.คณะแพทยศาสตรศิริราชพยาบาล. มหาวิทยาลัยมหิดล. 49-111.

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

กิจการ ศุภมาตย์, อุษณีย์ เอกปณิธานพงศ, Itami, T. และ จิราพร เกษรจันทร์. 2543. ระบบภูมิคุ้มกันโรคในกุ้งกุลาดำ: I. เทคนิคในการศึกษาระบบภูมิคุ้มกันโรคและองค์ประกอบเลือดในกุ้งกุลาดำ. ว. สงขลานครินทร์ วทท. 22(ฉบับพิเศษ): 567-580.

ชลอ ลิ้มสุวรรณ, นิติ ชูเชิด, สาธิต ประเสริฐศรี, สุธี วงศ์มณีประทีป, เกศินี หลายสุทธิสาร, ปัทมา วิริยพัฒนทรัพย์ และ แก้วตา ลิ้มเฮง. 2009. การศึกษาลักษณะภายนอกและการเปลี่ยนแปลงทางพยาธิสภาพของเนื้อเยื่อในกุ้งขาวแวนนาไมที่ได้รับอาหารเม็ดสำเร็จรูปผลิตจากวัตถุดิบที่ปนเปื้อนของเมลามีนและกรดไซยานูริค. การประชุมวิชาการของมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ครั้งที่ 47 สาขา ประมง กรุงเทพฯ. 17-20 มีนาคม 2552. 490-499.

ชุติมา ตันติกิตติ. 2549. เอกสารการสอนวิชา อาหารสัตว์น้ำขั้นสูง. คณะทรัพยากรธรรมชาติ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์. สงขลา. 169 น.

ชุติมา ลิ้มมัทวาภิรัต์. 2548. การประยุกต์ใช้ลิควิดโครมาโตกราฟี-แมสส์สเปกโทรเมตรี. ว.ไทยไภษัชยนิพนธ์ 3: 1-24.

ณัฐคมพร ภานุรัตนะ. 2550. ข่าวน่ารู้เรื่อง... ปลาปักเป้า. ว. สาระน่ารู้ด้านผลิตภัณฑ์สุขภาพในส่วนท้องถิ่น 3: 1-6.

ดิสวิน ภู่วุฒิกุล และ วินัย วนากูล. 2550. Scorpain envenomation (พิษจากแมงป่อง). จุลสารพิษวิทยา. คณะแพทยศาสตร์ โรงพยาบาลรามาธิบดี มหาวิทยาลัยมหิดล 42-45

นิคม ละอองศิริวงศ์ และ ยงยุทธ ปรีดาลัมพบุตร. 2546. วิธีวิเคราะห์น้ำเพื่อการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำชายฝั่ง. กลุ่มงานวิจัยระบบและการจัดการการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำชายฝั่ง สถาบันวิจัยการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำชายฝั่ง จังหวัดสงขลา สำนักวิจัยและพัฒนาประมงชายฝั่ง กรมประมง. 211 น.

บุญรัตน์ ประทุมชาติ. 2008. สมดุลเกลือแร่สำคัญอย่างไรกับการเลี้ยงกุ้ง. ว. อะความบิซ 3:20-23

ปิยวัฒก์ วสยางกูร, มนัส แตงอ่อน, อนาวิล ปิติวรรณ, อนงค์ บิณฑวิหค, วรา พานิชเกรียงไกร, จิรศักดิ์ ตั้งตรงไพโรจน์ และ อรัญญา พลพรพิสิฐ. 2540. ผลของอะฟลาท็อกซิน บี 1 ต่อเม็ดเลือดในกุ้งกุลาดำ. โครงการการเรียนการสอนเพื่อเสริมประสบการณ์ คณะสัตวแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย. 15 น.

ปิยะรัตน์ จันทร์ศิริพรชัย, วารินทร์ ธนาสมหวัง, มาลินี กิตกำจร และ เจนนุช ว่องธวัชชัย. 2545. เปรียบเทียบความเป็นพิษของไซเมอร์เมทรินและเดลต้าเมทรินในกุ้งกุลาดำและปลานิลโดยการวัดการทำงานของเอนไซม์โมลีนเอสเทอเรส. การประชุมวิชาการทางสัตวแพทย์และการเลี้ยงสัตว์ ครั้งที่ 28, 9-11 ตุลาคม 2545. 6 น.

ประจวบ หลำอุบล. 2532. ความรู้เรื่องการเลี้ยงกุ้ง. สำนักพิมพ์ ดวงกมลสมัย.กรุงเทพ ฯ. 14 น.

เปลื้อง สุวรรณมณี. 2544. เอกสารประกอบการสอนวิชาชีววิทยา 1. ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยทักษิณ. สงขลา. 143 น.

พันทิพา พงษ์เพียจันทร์. 2538. หลักการอาหารสัตว์ เล่ม 2 หลักโภชนศาสตร์และการประยุกต์. คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่. เชียงใหม่. 576 น.

ภิญโญ เกียรติภิญโญ. 2545. วิธีปฏิบัติสำหรับการเลี้ยงกุ้งขาว แอล.เวนาไม (Practical technology for *Litopeneaus vannamei* culture). เมืองเกษตรแมกกาซีน. กรุงเทพฯ. 120 น.

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

มณี ตันติรุ่งกิจ. 2548. สารพิษจากธรรมชาติ อันตรายและมาตรการควบคุมการปนเปื้อนในอาหาร. ว. ศูนย์ปฏิบัติการวิจัยและเรือนปลูกพืชทดลอง 19: 5-9

มาลินี ลิ้มโภคา. 2523. พิษวิทยาและการวินิจฉัยโรคทางสัตวแพทย์. คณะสัตวแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์. กรุงเทพฯ. 276 น.

วินัย วนานุกูล. 2008. โรคจากสารเตโตรโดทอกซิน (Tetrodotoxin poisoning). ว.พิษวิทยาไทย. 23: 25-26

วริต คุปต์กาญจนากุล และ วินัย วนานุกูล. 2550. พิษจากปลาปักเป้า (puffer fish). จุลสารพิษวิทยา คณะแพทยศาสตร์ โรงพยาบาลรามาธิบดี มหาวิทยาลัยมหิดล 15: 10-12.

วีรพงศ์ วุฒิพันธุ์ชัย. 2536. อาหารปลา. สำนักพิมพ์โอเดียนสโตร์ กรุงเทพฯ. 216 น.

เวียง เชื้อโพธิ์หัก. 2528. อาหารปลา. ภาควิชาเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำ คณะประมง มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์. กรุงเทพฯ. 111 น.

สุพัตรา ศรีไชยรัตน์. 2538. การวิเคราะห์หาสมรรถนะของเอนไซม์โคลีนเอสเทอเรสในกุ้งกุลาดำและปลากะพง.เวชสารสัตวแพทย์ 25: 195-207.

อรอุษา อุสันโน. 2546. ผลของอะฟลาทอกซินบี$_1$ ต่อปลานิลแดงแปลงเพศ. วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวาริชศาสตร์ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์.

อนงค์ บิณฑวิหค. 2546. สารพิษจากเชื้อราอะฟลาท๊อกซิน. ภาควิชาเภสัชวิทยา คณะสัตวแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย. 322 น.

อมรรัตน์ เสริมวัฒนากุล, พิสมัย สมสืบ, นุชนรี ทองศรี และ สาวิตรี วงศ์สุวรรณ. 2548. อาหารและการผลิตอาหารสัตว์น้ำ. กรมประมง กระทรวงเกษตรและสหกรณ์. กรุงเทพฯ. 69 น.

อรอนงค์ บัณฑิต. 2548. ผลของสารพิษจากเชื้อราทีทูและซาลาลีโนนต่อการเจริญเติบโต องค์ประกอบเลือด และเนื้อเยื่อในกุ้งกุลาดำและกุ้งขาว. วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาวาริชศาสตร์ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์.

อัธยา กังสุวรรณ. 2536. การสำรวจปลาปักเป้าที่มีพิษในทะเลอันดามัน. รายงานการสัมมนาวิชาการประจำปี 2536: กรมประมง ณ สถาบันวิจัยการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำจืด บางเขน 15-17 กันยายน 2536 หน้า 715 – 725.

อัธยา กังสุวรรณ, ทะมะโอะ โนะงุจิ และ คะเนะฮิซะ ฮะชิโมะโตะ. 2530. **แบคทีเรียที่สร้างเททโทรโดท๊อกซินในแมงดาทะเล**. รายงานการสัมมนาวิชาการประจำปี 2530: กรมประมง ณ สถาบันประมงน้ำจืดแห่งชาติ บางเขน 15-17 กันยายน 2530 หน้า 144 – 151.

อัธยา กังสุวรรณ, ทะมะโอะ โนะงุจิ และ คะเนะฮิซะ ฮะชิโมะโตะ. 2533. **พิษของปลาปักเป้า *Arothron meppa* และ *Lagocephalus inermis*.** รายงานการสัมมนาวิชาการประจำปี 2533: กรมประมง ณ สถาบันวิจัยประมงน้ำจืดแห่งชาติ บางเขน 17–19 กันยายน 2533 หน้า 90-93.

อัธยา กังสุวรรณ, พูลทรัพย์ วรุฬหกุล, มนูน พรมเดช และ โอซามุ อาระคะวา. 2541. การตรวจและติดตามความเป็นพิษในแมงดาทะเล. ว.การประมง 51: 241-248.

อัธยา กังสุวรรณ, สมชาย รุ่งจิรธนานนท์, มูลเดช พรมเดช และ โยชิโอะ โอโนอุเอะ. 2538. อาหารเป็นพิษเนื่องจากไข่แมงดาทะเล. รายงานการสัมมนาวิชาการประจำปี 2538: กรมประมง ณ ห้องประชุมใหญ่ กรมประมง และสถาบันวิจัยการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำจืด 18–20 กันยายน 2538 หน้า 395-400.

AOAC (Association of Official Analytical Chemists). 1990. Official Methods of Analysis.

15th ed. AOAC. Washington, D.C. 1263 p.

Bancroft, J.D. 1967. Histochemical Techniques. Butterworths. London . 348 p.

Berry, C.L. 1988. The pathology of mycotoxins. J. Pathol. 154 : 301-311.

Boonyaratpalin, M., Thongrod, S., Supamattaya, K., Britton, G. and Schlipalias, L.E. 2001. Effect of beta-carotene source, *Dunaliella salina*, and astaxanthin on pigmentation, growth, survival and health of *Penaeus monodon*. Aquaculture Res. 32: 182-190.

Brillantes, S., Samosorn, W., Faknoi, S. and Oshima, Y. 2003. Toxicity of puffers landed and marketed in Thailand. Fish. Sci. 69: 1224-1230.

Camacho, G.F., Rodriguez, G.J., Miron, S.A., Garcia, C.M.C., Belarbi, H.E., Chisti, Y. and Molina, G.M.E. 2007. Biotechnological significance of toxic marine dinoflagellates. Toxicon 25: 176-194.

Chemical Ecology. 2001. Tetrodotoxin: Mode of Action. (Online) Available: http://www.life.umd.edu/grad/mlfsc/zctsim/ionchannel.html (April 25, 2008)

Conkova, E., Laciakova, A., Pastorova, B. and Seidel, H. 2001. The effect of zearalenone on some enzymatic parameters in rabbits. Toxicol. Letters 121 : 145-149.

Duncan, D.B. 1955. Multiple-rage and multiple F tests. Biometrics 11 : 1– 42.

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 Wildlife. Tech. Pap. No. 9.

Fujii, R. and Noveales R.,R. (1968). Tetrodotoxin: effect on fish and frog melanophore. Science.160:1123-1124.

Freeman, A.R. and Fingerman, M. 1969. Action of terodotoxin and observation on the characteristic of the chromatophore membrane of prawn, Palaemonetes. Comp. Biochem. Physiol. 29:483-486.

Haverinen, J., Hassinen, M. and Vornanen, M. 2007. Fish cardiac sodium channel are tetrodotoxin sensitive. Acta Phys. 191: 197-204.

Hu, S.L. and Kao, C.Y. 1986. The pH dependence of the tetrodotoxin-blocked of the sodium chanel and implication for tetrodotoxin binding. Toxicon 24: 25-31.

Huang, N.H., Lin, J. and Lin, L.H. 2008. Identification and quantification of tetrodotoxin

in the marine gastropod *Nassarius* by LC-MS. Toxicon 51: 744-779.

Humason, G.L. 1972. Animal Tissue Techniques. 3rd ed. W.H. Freeman.San Francisco. 641 p.

Hwang, D.F. and Chue,C.C.H and Jeng, S.S. 1990. Susceptibility of fish, crustacean and mollusk to tetrodotoxin and paralytic shellfish poision. Nippon Suisan Gakkaishi 56: 337-343-

Hwang, P.A., Tsai, Y.H., Lin, H.P. and Hwang, D. F. 2007. Tetrodotoxin-binding protein isolated from five species of toxin gastropod. Food Chem. 103: 1153-1158.

Jen, C.H., Lin, J.S., Tsai, H.Y. and Chen, H.C. 2008. Tetrodotoxin poining evidenced by solid-phase extraction combining with liquid chromatography-tandem mass spectrometry. J. Chromatogr. B 871: 95-100.

Johnson, J. 2002. Tetrodotoxin. The Department of Molecular Biophysics&Biochemistry. The Florida State University. USA. (online) Available: http://www.chm. bris.ac.uk/motm/ttx/ ttxv.htm (April 25, 2008)

Kaethner, R.J. and Stuermer, C.A.C. 1994. Growth behavior of retinolectal axon in live zebrafish under TTX-induce neural impulse blocked. Neurobiology 25: 781-796.

Kao, C.Y. 1966. Tetrodotoxin, saxitoxin and their significance in the study of excitation phenomena. *Pharmacol. Rev.* **18**: 997-1049.

Kuriaki, K. and Nagano, H. 1957. Susceptibility of certain enzyme of the central neuvous system to tetrodotoxin. Phamarcol. 12: 393-396.

Kuriaki, K. and Wada, I. 1959. Effect of tetrodotoxin, epinephrine and nor-epinephrine on glucose uptake of the rat diapharagm

Kuriyama, H., Osa, T. andToida, N. 1966. Effect of tetrodotoxin on smoot muscle cells of the guinea-pig taenia coli. Pharmac. Chemother. 27: 366-376.

Lee, M.-J., Jeong, D.-Y., Kim, W.-S., Kim, H.-D., Kim, C.-H., Park, W.-W., Park, Y.-H.,

Kim, K.-S., Kim, H.-M. and Kim, D.-S. 2000. A tetrodotoxin-producing *Vibrio* strain, LM-1, from the puffer fish *Fugu vermicularis radiates*. Appl. Environ. Microbiol. 66: 1698-1701.

Linares, P. J., Ochoa, L. J. and Martınez G. A. 2008. Effect of PSP Toxins in White Leg Shrimp *Litopenaeus vannamei* Boone, 1931. Food Sci. 73 :69-73

Linares, P. J., Ochoa, L. J. and Martınez G. A. 2009. Retention and tissue damage of PSP and NSP toxins in shrimp: Is cultured shrimp a potential vector of toxins to human population. Toxicon 53: 185–195.

Lorezo, S., Edomi, P., Giolainini, G., Mettulio, R. and Ferrero, E,A. 2005. Role of biogenic and cHH in the crustacean hyperglycemic stress response. The j. Exp. Biol. 208: 3341-3347.

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

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

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 Migaki, G.), pp 1004. The University of Wisconsin Press.

Myrna, N B., Celia, R.L., Precilla, F.S. and Edna, T B. 2006. Aflatoxin B_1 contamination of shrimp feeds and its effect on growth and hepatopancreas of pre-adult *Penaeus monodon.*Science of Food and agriculture.Vol 62:5-11

Nankervis, L., Matthews, S.J. and Appleford, P. 2000. Effect of dietary non-protein energy source on growth nutrient and circulation insulin-like growth factor l and triodothyronine levels in juvenile barramundi, *Lates calcarifer*. Aquaculture 191 : 323-335.

Narahashi, T., Anderson, N.C. and Moore, J.W. 1966. Tetrodotoxin Does Not Block Excitation from Inside the Nerve Membrane. *Science*. Vol 153 :765 - 767

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 net cages. **J. Food Hyg. Soc. Japan** 45: 146-149.

Noguchi, T., Arakawa, O. and Takatani, T. 2006a. Toxicity of puffer fish *Takifugu rubripes* cultured in net cages at sea or aquaria on land. Biochem. 1: 153-157.

Noguchi, T., Arakawa, O. and Takatani, T. 2006b. TTX accumulation in pufferfish. Biochem. 1: 145-152.

Omondi, J.G. and Stark, J.R. 2001. Studies on digest protease from midgut gland of a shrimp *P. indicus* and lobster, *Nephrops norvegicus*: Part 1 Proteollytic activity. Appl. Biochem. Biotechnol. 90: 137-153

Pascual, C., Gaziola, G., and Rosas, C. 2003. Blood metabolism and hemocyanin of the white shrimp, *Litopenaeus vannamei*: The effect of culture conditions and comparision with other crustacean species. Mar. Biol 142: 735-745

Perazzolo, L.M. and Barracco, M.A. 1997. The prophenoloxidase activity system of the shrimp *Penaeus paulensis* and associated factors. Developmental & Comparative Immunol. 21 : 385-395.

Pullman, T.N., Lavender, A.R. and Aho, I. 1968. Effect of tetrodotoxin on the mammalian kidney. Physiology. 60: 822-829.

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.

Shankar, R. and Quastel. JH. 1972. Effects of Tetrodotoxin and Anaesthetics on Brain Metabolism and Transport During Anoxia. Biochem. 26:851-867.

Shimojo, R. Y. and Iwaoka, W. T. (2000). A rapid hemolysis assay for the detection of sodium channel-specific marine toxins. Toxico. 154 (1-3):1-7.

Soderhall, K. and Cerenius, L. 1992. Crustacean immunity. Annu. Rev. Of Fish Dis. 2 : 3-23.

Soong, W.T. and Venkatesh, B. 2006. Adaptive evolution of tetrodotoxin resistance in animal. Trends Genet. 22: 621-626.

Supamattaya, K., Kasorncharda, J. and Boonyaratpalin, S. 1994. Comparative study of simple method the black tiger shrimp (*Penaeus monodon*). Songklanakarin J. Sci. Technol. 16: 37-38

Thuesen, E.V., Kogure, K., Hashimoto, K. and Nemoto, T. 1988. Poison arrow worms: a tetrodotoxin venom in the marine phylum Chaetognatha. J. Exp. Mar. Biol. Ecol. 116: 249-256.

Tsai, Y.H., Ho, P.H., Hwang, C.C., Hwang, P.A., Cheng, C.A. and Hweng, D.F. 2006a. TTX in several species of xanthid crabs in southern Taiwan. Food Chem. 95: 205-212.

Tsai, Y.H., Hwang, D.F., Cheng, C.A., Hwang, C.C. and Deng, J.F. 2006b. Determination of TTX in human urine and blood using C18 cartridge column, ultra filtration and LC–MS. J. Chromatogr. B 832: 75-80.

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

Wang, J, X., Yu, C, R., Luo, X., Zhou, J, M. and Lin, T, X. 2008. Toxin-screening and identification of bacteria isolation from highly toxic marine gastropod *Nassarius semiplicatus*. Toxicon. 52: 55-61

Wakely, F, J., Fuhrman, J, G., Fuhrman, A, F., Fischer, G, H. and Mosher, S, H. 1996. The occurrence of tetrodotoxin (tarichatoxin) in amphibian and the distribution of the toxin in the organs newts (*Taricha*). Toxicon 3: 195-203

White, A.W. 1981. Sensitivity of marine fishes to toxins from the red-tide dinoflagellate *Gonyaulax excavate* and implications for fish kills. Mar. Biol. 65: 255-260.

Wongtavatchai, J., Suphachalat. P., Panichkriangkrai, W. and Tangtrongpiroj, J. 2000. Acetylcholinesterase activity as a biomarker for organophosphorus pedticides contamination in black tiger shrimp (Penaeus monodon). InProceedings the Regional Conference on Consumer Safety and Residues in Animal Products, Faculty Veterinary Medicine, Chiang Mai University, Thailand, July 26-28, 2000. p. 118-122.

Yin, L.H., Lin, S.H., Huang, C.C., Hwang, F.D., Liu, S.J. and Chen, H.W. 2005. Tetrodotoxication with Nassauris glans : a possibility of tetrodotoxin spreading in marine products near pratas island. Med. Hyg. 73(5): 985–990.

Yoshikawa-Ebesu, J.S.M., Hokama, Y. and Nogushi, T. 2001. Tetrodotoxin. *In*: Foodborne Disease Handbook. 2nd(eds Hui, Y.H., Kitts, D. and Stanfield, P.S.). Vol. 4, pp. 253-286. Marcel Dekker. New York.

Yu, A.L., Cheng R., Jun, L., Feng W. Y., T, Y. and Fiang, M.Z. 2007. A primary study on toxicity bioassay of snail (*Nassarius* sp.) samples using mysis shrimp(*Neomysis awatschensis*). Marine Environmental Science .

Zaki, Z.A., Mady, EA., Ahmed, S.M. and Youssef, N.M. 2001. Effect of tetrodotoxin (TTX) on some brain neurotransmitters in rats. Nat Toxins.10:307-16

Zhou, Y., Li, Y., Pan, F.G., Liu, Z.S. and Wang, Z. 2007. The development and optimization of ELISA for the determination of tetrodotoxin. J. Medical Colleges of PLA. 22: 347-351.

Zimer, K.R., and Ferrer, P.R. 2007. Neuroecology, chemical defense, and the keystone species concept. Biol. Bull. 213: 208-225

ภาคผนวก

ภาคผนวก ก

สารเคมีและวิธีการวิเคราะห์

1 การวิเคราะห์คุณค่างทางโภชนาการของอาหารทดลอง

1.1 การวิเคราะห์ความชื้น ตามวิธีมาตรฐานของ AOAC (1990)

1.1.1 นำขวดชั่งเข้าตู้อบอุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 40 นาที และทำให้เย็นในโถดูดความชื้น

1.1.2. ชั่ง และบันทึกน้ำหนักของขวดชั่งโดยละเอียด

1.1.3 ชั่งตัวอย่างใส่ขวดชั่งประมาณ 5 กรัม โดยบันทึกน้ำหนักอย่างละเอียด

1.1.4 นำตัวอย่างเข้าตู้อบ โดยใช้อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 8 ชั่วโมง

1.1.5 ตัวอย่างที่อบแล้วใส่โถดูดความชื้นทิ้งไว้ให้เย็น บันทึกน้ำหนักของตัวอย่าง

1.1.6 ทำซ้ำตามข้อ 1 ถึง 5 จนน้ำหนักที่ได้คงที่ โดยน้ำหนักที่หายไปคือน้ำหนักของความชื้น

คำนวณ % ความชื้นด้วยสมการ

$$\text{เปอร์เซ็นต์ ความชื้น} = \frac{(a - b)}{w} \times 100$$

เมื่อ a = น้ำหนักของอาหารก่อนอบแห้ง

b = น้ำหนักของอาหารหลังอบแห้ง

w = น้ำหนักของอาหารก่อนอบ

1.2 การวิเคราะห์ปริมาณเถ้า ตามวิธีมาตรฐานของ AOAC (1990)

1.2.1 ชั่งตัวอย่างอาหาร 2 กรัม ใส่ในถ้วยกระเบื้องเคลือบ

1.2.2 นำไปเผาในเตาเผาที่อุณหภูมิ 600 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 ชั่วโมง จนเถ้าเป็นสีขาว

1.2.3 นำเข้าโถอบแห้ง เพื่อให้ดูดความชื้น และเมื่อตัวอย่างอาหารเย็นดีแล้ว นำออกชั่งทันที

คำนวณ % เถ้าด้วยสมการ

$$\text{เปอร์เซ็นต์ เถ้า} = \frac{(b - a)}{w} \times 100$$

เมื่อ a = น้ำหนักของถ้วยกระเบื้องเคลือบ

b = น้ำหนักของถ้วยกระเบื้องเคลือบกับน้ำหนักของเถ้าภายหลังการเผา

w = น้ำหนักของอาหารก่อนเผา

1.3 การวิเคราะห์หาโปรตีน ตามวิธีมาตรฐานของ AOAC (1990)

1.3.1 สารเคมี

1. กรดซัลฟูริก (H_2SO_4) เข้มข้น 93 – 98 เปอร์เซ็นต์

2. สารเร่งรวม (catalyst mixture) ชั่งคอปเปอร์ซัลเฟต ($CuSO_4$) 7 กรัม กับโปแตสเซียมซัลเฟต (K_2SO_4) 100 กรัม ผสมให้เข้ากัน

3.โซเดียมไฮดรอกไซด์ 45 เปอร์เซ็นต์ (NaOH) ละลาย 450 กรัม ของโซเดียมไฮ ดรอกไซด์ ชนิดเกล็ดลงในน้ำกลั่นให้ได้ปริมาตร 1 ลิตร

4. สารละลายกรดเกลือ 0.1 นอร์มอล ละลายกรดเกลือ 9 ml ลงในน้ำกลั่น ปรับปริมาตรให้ได้ 1 ลิตร

5. กรดบอริค (H_3BO_3) 4 เปอร์เซ็นต์ ต้มน้ำกลั่น 50 ml ให้ร้อน แล้วใส่ผงกรดบอริคลงไป 4 กรัม ต้มจนละลายหมดทิ้งไว้จนสารละลายเย็นลง แล้วจึงเติมน้ำกลั่นให้ครบ 100 ml

6. อินดิเคเตอร์ผสมระหว่าง เมทธิลเรด และเมทธิลีนบลู ละลายเมทธิลเรด 0.2 กรัม ในแอลกอฮอล์ 95 เปอร์เซ็นต์ ปรับปริมาตรให้ได้ 100 ml และละลายเมทธิลีนบลู 0.2กรัม ในแอลกอฮอล์ 95 เปอร์เซ็นต์ ปรับปริมาตรให้ได้ 100 ml จากนั้นนำสารละลายเมทธิลเรด2 ส่วน ผสมกับสารละลายเมทธิลีนบลู 1 ส่วน เขย่าให้เข้ากัน

7. เมทิลออเรนจ์ อินดิเคเตอร์ (methyl orange indicator) ละลายเมทิลออเรนจ์ 0.1 กรัม ในน้ำกลั่น ปรับปริมาตรให้ได้ 100 ml

8. สารละลายโซเดียมคาร์บอเนต (Na_2CO_3) 0.1 นอร์มอล อบโซเดียมคาร์บอเนตที่อุณหภูมิ 260 – 270 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที ชั่งสารมา1.325 กรัม เติมน้ำกลั่น ปรับปริมาตรให้ได้ 250 ml

1.3.2 วิธีการ

ก ขั้นตอนการย่อย (digestion)

1. ชั่งตัวอย่างอาหารให้ได้น้ำหนักประมาณ 1 กรัม โดยชั่งด้วยกระดาษกรองที่ปราศจากสารไนโตรเจนแล้วใส่ในขวดแก้ววิเคราะห์โปรตีน

2. เติมสารเร่งรวม 10 กรัม เพื่อเป็นตัวช่วยเร่งปฏิกริยาการย่อย

3. เติมกรดซัลฟูริกเข้มข้น 25 ml

4. นำไปย่อยด้วยชุดเครื่องย่อยโปรตีน ที่อุณหภูมิ 375 องศาเซลเซียส กระทั่งสารละลายในขวดแก้ววิเคราะห์โปรตีนใส ทิ้งไว้ให้เย็น

ข ขั้นตอนการกลั่น (distillation)

1. เมื่อสารละลายเย็นดีแล้ว จึงเติมน้ำกลั่นลงไปให้ได้ปริมาตรประมาณ 300ml

2. ใส่ลูกแก้ว 2 ลูก เพื่อป้องกันการกระแทกของสารละลาย

3. ต่อขวดแก้ววิเคราะห์โปรตีนเข้ากับเครื่องกลั่นที่มีขวดปากแคบวัดปริมาตร ซึ่งมีกรดบอริค 40 mlอยู่โดยให้ปลายของหลอดแก้วที่ต่อจากกระบอกแก้วควบแน่นจุ่มอยู่ในกรด บอริคเติมโซเดียมไฮดรอกไซด์ลงในขวดแก้ววิเคราะห์ช้า ๆ จนกระทั่งสารละลายมีสีดำ

4. ใส่อินดิเคเตอร์ในกรดบอริค 2 – 3หยด

5. ทำการกลั่นจนไม่มีก๊าซแอมโมเนียออกมา แล้วทำการกลั่นต่อไปอีก 10 นาที แล้วล้างปลายเครื่องกลั่นด้วยน้ำกลั่น นำขวดปากแคบวัดปริมาตรออกจากเครื่องกลั่น

ค ขั้นตอนการไตเตรท (titration)

1. นำไปไตเตรทด้วยกรดเกลือมาตรฐานที่ทราบความเข้มข้น 0.1 นอร์มอล จนถึงจุดยุติ (end point) โดยใช้อินดิเคเตอร์รวม สารละลายจะเปลี่ยนเป็นสีน้ำเงินอ่อน

2. จดปริมาตรของกรดเกลือไว้เพื่อคำนวณต่อไป

การคำนวณ

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

เมื่อ V_1 = ปริมาตรของกรดมาตรฐานที่ใช้ไตเตรทตัวอย่าง

V_2 = ปริมาตรของกรดมาตรฐานที่ใช้ไตเตรทตัวอย่างที่ใช้ตรวจสอบ

N = เป็นความเข้มข้นของกรดเกลือเป็นนอร์มอล

W = น้ำหนักตัวอย่างอาหาร

การตรวจหาความเข้มข้นของสารละลายกรดเกลือมาตรฐาน

ดูดสารละลายโซเดียมคาร์บอเนต 40 ml ใส่ในขวดรูปชมพู่ ขนาด 250 ml เติมน้ำกลั่น 20 ml เติมเมทิลออเรนซ์ อินดิเคเตอร์ 2-3 หยด ทำการไตเตรทด้วยสารละลายกรดเกลือ 0.1 นอร์มอล คำนวณความเข้มข้นของสารละลายกรดเกลือโดยใช้สูตร

$N_1 V_1 = N_2 V_2$

1.4 การวิเคราะห์หาไขมัน (ใช้เครื่อง Soxtec System HT6) ตามวิธีมาตรฐานของ AOAC (1990)

1.4.1 สารเคมี

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

1.4.2 วิธีการ

1. อบถ้วยพร้อมลูกแก้วที่อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส 8 ชั่วโมง ทิ้งไว้ให้เย็นในโถดูดความชื้น
2. อบตัวอย่างที่จะวิเคราะห์ที่อุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 คืน ทิ้งให้เย็นในโถดูดความชื้น
3. ชั่งน้ำหนักถ้วยพร้อมลูกแก้ว (w_1)
4. ชั่งตัวอย่างที่ต้องการวิเคราะห์ใส่กระดาษกรองประมาณ 1-2 กรัม (w_2) ห่อให้มิดชิดใส่ลงในไส้กรอง (thimble) ที่เตรียมไว้ นำไปใส่เข้าเครื่อง Soxtec System HT6
5. นำถ้วยพร้อมลูกแก้วที่ชั่งน้ำหนักไว้แล้วมาเติม คลอโรฟอร์ม : เมทานอล ในอัตราส่วน 2:1 ปริมาตร 25 ml แล้วใส่เข้าเครื่องให้เรียบร้อย
6. เปิดเครื่อง ปรับอุณหภูมิไปที่ 160 องศาเซลเซียส เปิดน้ำเข้าเครื่อง เปิดวาล์ว เลื่อนปุ่มไปที่ boiling ต้มให้เดือด 30 นาที

7. เลื่อนปุ่มไปที่ rinsing เพื่อล้างตัวอย่าง 20 นาที

8. ปิดวาล์ว เปิดสวิทซ์อากาศเลื่อนปุ่มไปที่ evaporation เพื่อให้สารระเหยออกไป 5 นาที

9. ปิดเครื่อง อากาศและน้ำ แล้วเลื่อนปุ่ม evaporation กลับที่เดิม นำถ้วยออกจากเครื่องแล้วนำไปอบที่ 100 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 1 คืน

10. นำถ้วยออกมาใส่โถดูดความชื้น ทิ้งไว้ให้เย็น แล้วนำมาชั่งน้ำหนัก (w_3)

การคำนวณหาเปอร์เซ็นต์ไขมัน

$$\text{เปอร์เซ็นต์ ไขมัน} = \frac{w_3 - w_1}{w_2} \times 100$$

เมื่อ w_1 = น้ำหนักถ้วยพร้อมลูกแก้ว

w_2 = น้ำหนักตัวอย่าง

w_3 = น้ำหนักถ้วยพร้อมลูกแก้วและไขมันหลังอบ

2. การคำนวณหาค่าอัตราการรอดตายและการเจริญเติบโตตามวิธีการของ Jantrarotai และคณะ (1994)

2.1 การคำนวณหาอัตรารอดตาย (เปอร์เซ็นต์) โดยสมการ

$$\text{อัตรารอดตาย (เปอร์เซ็นต์)} = \frac{\text{จำนวนกุ้งเมื่อสิ้นสุดการทดลอง} \times 100}{\text{จำนวนกุ้งเมื่อเริ่มต้น}}$$

2.2 การคำนวณน้ำหนักกุ้งที่เพิ่มขึ้นเฉลี่ยต่อตัว (เปอร์เซ็นต์ weight gain)

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

2.3 การคำนวณอัตราการเจริญเติบโตจำเพาะ (specific growth rate, SGR)

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

2.4 ปริมาณอาหารที่กุ้งกิน (กรัมต่อตัวต่อวัน)

ปริมาณอาหารที่กุ้งกิน (กรัมต่อตัวต่อวัน)

$$= \frac{\text{น้ำหนักอาหารที่กุ้งกินทั้งหมด / จำนวนกุ้งเมื่อสิ้นสุดการทดลอง}}{\text{เวลา (วัน)}}$$

2.5 การคำนวณอัตราการเปลี่ยนอาหารเป็นเนื้อ (feed conversion rate)

คำนวณตามวิธีการของ Dupree และ Sneed (1966)

การคำนวณอัตราการเปลี่ยนอาหารเป็นเนื้อ = $\frac{\text{น้ำหนักอาหารที่กุ้งกินทั้งหมด}}{\text{น้ำหนักกุ้งที่เพิ่มขึ้น}}$

3. วิธีการศึกษาองค์ประกอบเลือด

ทำการดูดเลือดกุ้งบริเวณโคนขาเดินคู่ที่ 3 ประมาณ 0.4 mlดใส่หลอดไมโครเซนตริฟิวก์ เพื่อนำไปวิเคราะห์หาค่าองค์ประกอบเลือดต่างๆ

3.1 การนับปริมาณเลือดทั้งหมด (Total haemocyte count) ตามวิธีการของ กิจการ (2538)

3.1.1 สารเคมี

trypan blue 0.15 เปอร์เซ็นต์ : ละลาย trypan blue 0.15 กรัม ในสารละลาย NACl 2.5 เปอร์เซ็นต์ 100 ml คนให้ละลายโดยวางบน magnetic stirrer นาน 6-12 ชั่วโมง และกรองผ่านกระดาษกรองเบอร์ 1 แบ่งใส่หลอดพลาสติกหลอดละ 225 ไมโครลิตร

3.1.2 วิธีการ

ดูดเลือดที่ได้จากหลอดไมโครเซนตริฟิวก์มา 25 ไมโครลิตร ใส่ในหลอดไมโครเซนตริฟิวก์ที่มี trypan blue 225 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากัน ในหลอดไมโครเซนตริฟิวก์นับเซลล์เม็ดเลือดทั้งหมดโดยใช้ฮีมาไซโตมิเตอร์ (haemacytometer) ภายใต้กล้องจุลทรรศน์แล้วคำนวณเป็นเซลล์ต่อmlจากสูตร

ปริมาตรของฮีมาไซโตมิเตอร์ = กว้าง $\times$ยาว $\times$ สูง

= 1mm $\times$1 mm $\times$ 0.1 m

= 0.1 ลูกบาศก์มิลลิเมตร (mm^3)

จำนวนเซลล์เม็ดเลือด/ลูกบาศก์มิลลิเมตร = เซลล์เม็ดเลือดที่นับได้

จำนวนเซลล์เม็ดเลือด/ml = เซลล์เม็ดเลือดที่นับได้ $\times 10^4$

3.2 การวิเคราะห์กิจกรรมของเอนไซม์ฟีนอลออกซิเดส ดัดแปลงจาก Soderhall และคณะ (1988)

3.2.1 สารเคมี

1. cacodylate buffer (CAC buffer)

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

2. Trypsin

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

3. L-3,4-dihydroxyphenylalanine (L-DOPA) ละลาย L-DOPA 0.003 กรัม ใน CAC buffer 1 ml

3.2.2 วิธีการ

ดูดเลือดที่ได้ 200 ไมโครลิตรใสหลอดไมโตรเซนติฟิวก์ที่มี CAC buffer อยู่ 100 ไมโครลิตรผสมให้เข้ากันแช่ในไนโตรเจนเหลว จากนั้นเก็บใน -70 องศาเซลเซียล นำเลือดที่ได้มาบดให้ละเอียดแล้วนำไปปั้นตกตะกอน ที่ 13000 ×g อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส นาน 10 นาที ดูดส่วนใส 25 ไมโครลิตรใส่ 96 well เติม tripsin 25 ไมโครลิตรจับเวลา 2 นาที จากนั้นเติม CAC buffer 150 ไมโครลิตร แล้วเติม LDOPA 50 ไมโครลิตร เขย่าให้เข้ากันจับเวลา 2 นาที นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงด้วยเครื่องไมโครเพลตลีดเดอร์ค่ากิจกรรมของเอนไซม์ฟีนอลออกซิเดสคำนวณได้จากสูตร

กิจกรรมของเอนไซม์ฟีนอลออกซิเดส = ยูนิต/นาที (0.001) * โปรตีนในHLS 0.2 ml

= ยูนิต/นาที/มิลลิกรัมโปรตีน

* 0.001 เป็นค่าที่กำหนดเอง

ยูนิต (unit) หมายถึง ความสามารถของเอนไซม์ฟีนอลออกซิเดสในการเปลี่ยน L-DOPA ไปเป็นโดปามีน (dopamine) โดยวัดจากค่าการดูดกลืนแสงที่เปลี่ยนแปลงภายในเวลา 1 นาที

3.3 การวิเคราะห์ปริมาณโปรตีนในซีรัม ดัดแปลงจาก Lowry และคณะ (1951)

3.3.1 สารเคมี

1. สารละลาย BSA มาตรฐาน

ละลาย bovine serum albumin 1.0 มิลลิกรัม ในน้ำ deionized 10 ml และเจือจางสารละลายข้างต้นด้วยน้ำ deionized ในหลอดทดลองให้มีความเข้มข้น 10-100 ไมโครกรัมต่อml

3.3.2 วิธีการ

โดยนำเลือดได้ที่ใส่หลอดไมโครเซนตริฟิวซ์แล้วบดให้ละเอียดจากนั้นปั่นตกตะกอนที่ความเร็วรอบ 13000 รอบต่อนาที 4 องศาเซลเซียล เป็นเวลา 10 นาที ดูดส่วนใสที่ได้ 5 ไมโครลิตร ใส่หลอดไมโครเซนตริฟิวซ์ที่มีน้ำกลั่นอยู่ 995 ไมโครลิตรผสมให้เข้ากัน จากนั้น ดูดสารละลายตัวอย่างที่ได้มา 250 ไมโครลิตรใส่หลอดทดลองขนาด 5 ml ที่มีน้ำกลั่น 250 ไมโครลิตร จากนั้นเติม Alkaline copper solution 1 ml ผสมให้เข้ากันทิ้งไว้ 10 นาที จากนั้นเติม Folin's reagent 1.5 ml ผสมให้เข้ากันทิ้งไว้ 10 นาที จากนั้นนำไปวัดค่าการดูกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 640 นาโนเมตร

3.4 การวิเคราะห์ Oxyhemocyanin/hemolymph protein

โดยนำเลือดกุ้ง 10 ไมโครลิตร ใส่ลงในหลอดไมโครเซนตริฟิวซ์ที่มีน้ำกลั่นอยู่ 990 ไมโครลิตร นำไปวัดค่าดูดกลืนแสง 500 ไมโครลิตร ที่ความยาวคลื่น 335 ไมโครลิตร ส่วนที่เหลือนำไปหาปริมาณโปรตีน โดยดูดตัวอย่างมา 100 ไมโครลิตร ใส่ลงในหลอดทดลองขนาด 5 mlที่มีน้ำกลั่นอยู่ 400 ไมโครลิตร จากนั้นเติม Alkaline copper solution 1 ml ผสมให้เข้ากันทิ้งไว้ 10 นาที จากนั้นเติม Folin's reagent 1.5 ml ผสมให้เข้ากันทิ้งไว้ 10 นาที จากนั้นนำไปวัดค่าการดูกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 640 นาโนเมตร

3.5 การวิเคราะห์ปริมาณกลูโคสในเลือด (Blood glucose)

นำเลือดที่ได้ 50 ไมโครลิตร ใส่ในหลอดไมโครเซนตริฟิวซ์ที่มี 3% TCA 450 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากัน จากนั้นนำไปปั่นตกตะกอนที่ความเร็วรอบ 6500 rpm 2 นาที จากนั้นสูดส่วนใส่ที่ได้ 300 ไมโครลิตร ใส่ในหลอดทดลองที่มี color reagent 2.7 ml ผสมให้เข้ากันห่อด้วยกระดาษฟรอยด์แล้วนำไปต้มในน้ำเดือด เป็นเวลา 8 นาที เมื่อตามเวลาที่กำหนดนำไปแช่ในน้ำแข็งทันที ทิ้งไว้ให้เย็นนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 630 นาโนเมตร

การคำนวณ

$$\text{ปริมาณกลูโคส ในตัวอย่าง} = \frac{\text{OD 630 ตัวอย่าง}}{\text{OD 630 Standard}} \times \text{ความเข้มข้นของ Standard}$$

4.สารเคมีวิธีการเตรียมตัวอย่างและวิธีการศึกษาพยาธิสภาพเนื้อเยื่อ ตามวิธีของ Bancroft (1967) และ Humason (1972)

4.1 สารเคมี

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

95% ethyl alcohol	330	ml
100% formalin (formaldehyde 37–39%)	220	ml
glacial acetic acid	115	ml
tap water	335	ml

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	ml

ละลายอลัมลงในน้ำกลั่นเติมฮีมาทอกซิลินผสมจนกระทั่งละลายหมดจึงเติมโซเดียมไอโอเดทผสมให้เข้ากันจากนั้นเติมกรดซิตริกและคลอรัลไฮเดรทผสมจนกระทั่งเป็นเนื้อเดียวกันทิ้งไว้ 1 สัปดาห์ก่อนนำมาใช้งาน

3. สีย้อมอีโอซิน (eosin) เตรียมโดยใช้

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

ผสมเข้าด้วยกัน

4.2.การเตรียมตัวอย่าง

ฉีดน้ำยาดองเดวิดสันบริเวณหัวใจ ตับ ส่วนหัว กล้ามเนื้อลำตัวให้ทั่ว แล้วตัดตัดส่วนหัวกุ้งออกเป็นสองซีกนำกล้ามเนื้อลำตัวตัดตามขวางดองในขวดที่บรรจุน้ำยาดองเดวิดสันโดยให้น้ำยาท่วมตัวอย่างเป็นเวลา 72 ชั่วโมง เพื่อให้น้ำยาดองซึมเข้าสู่เนื้อเยื่อได้ทั่วถึง ตัวอย่างที่นำมาศึกษาการเปลี่ยนแปลงทางเนื้อเยื่อคือ เนื้อเยื่อตับอ่อน (hepatopancreatic tissue) ต่อมน้ำเหลือง(lymphoid cell) เหงือก (gill) และ กล้ามเนื้อ (muscle) หลังจาก 72 ชั่วโมง เปลี่ยนเป็นแอลกอฮอล์ 70 เปอร์เซ็นต์ หลังจากนั้นนำไปผ่านขั้นตอนการเตรียมเนื้อเยื่อตามวิธีของ Humason (1979)

ขั้นตอนการ dehydration และ embedding

1. ตบแต่งตัวอย่าง (trim) ที่ผ่านการดองแล้วให้มีขนาดพอเหมาะเพื่อสะดวกต่อการ embed และนำไปตัด section

2. นำตัวอย่างไปผ่านขั้นตอน 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.	ไอโซโพรพิล แอลกอฮอล์(isopropyl alcohol)	1

8.	ไอโซโพรพิล แอลกอฮอล์	1
9.	ไซลีน (xylene)	1
10.	ไซลีน	1
11.	พาราพลาสท์ (paraplast)	1
12.	พาราพลาสท์	1

3. นำตัวอย่างที่ผ่านขั้นตอนดึงน้ำออกไป embed ด้วยพาราพลาสท์ จากนั้นนำ block ไปแช่ตู้เย็นเพื่อง่ายต่อการนำไปตัด section ต่อไป

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

5. ใช้แผ่นสไสด์ช้อนตัวอย่าง แล้วนำไปอบที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 คืน

6. นำสไลด์ที่อบแล้วไปผ่านขบวนการย้อมสีฮีมาทอกซิลินและอีโอซินโดยมีขั้นตอนดังนี้

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) แล้วนำตัวอย่างไปศึกษาพยาธิสภาพด้วยกล้องจุลทรรศน์

5. การวิเคราะห์คุณภาพน้ำ ตามวิธีการของ Boyd และ Tucker (1992)

5.1 การวิเคราะห์ค่าความเป็นด่างของน้ำ

5.1.1 สารเคมี

1. ฟีนอล์ฟทาลีน อินดิเคเตอร์ (phenolphthalein indicator) : เตรียมสารละลาย ฟีนอล์ฟทาลีน (phenolphthalein) 0.5 กรัม ในเอทิลแอลกอฮอล์95 เปอร์เซ็นต์ จนได้ปริมาตร 100 ml

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

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

4. สารละลายมาตรฐานกรดซัลฟูริก 0.2 นอร์มอล : เตรียมโดยค่อย ๆ เทกรดซัลฟูริกเข้มข้น 6 ml ลงในน้ำกลั่น (ที่ต้มเดือดใหม่ ๆ แล้วปิดฝาทิ้งไว้ให้เย็น) ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นจนครบ 1 ลิตร

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

5.1.2 การตรวจหาความเข้มข้นของสารละลาย

1. สารละลายโซเดียมคาร์บอเนต 0.2 นอร์มอล ปริมาตร 25 ml ใส่ลงในขวดรูปชมพู่ขนาด 250 ml

2. หยดเมทิลเรด อินดิเคเตอร์ 5 หยด เขย่าให้เข้ากันจะได้สารละลายสีเหลือง

3. ไตเตรทด้วยสารละลายมาตรฐานกรดซัลฟูริกจนสารละลายเปลี่ยนเป็นสีชมพู

4.นำส่วนผสมทั้งหมดไปต้มจนเดือดเป็นเวลาประมาณ 5-3 นาที เพื่อไล่ก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ให้หมดสารละลายจะเปลี่ยนเป็นสีเหลืองอีกครั้ง

5.ไตเตรทด้วยสารละลายมาตรฐานกรดซัลฟูริกต่อไป จนกระทั่งสารละลายเปลี่ยนเป็นสีชมพูอีกครั้งหนึ่ง

6. บันทึกปริมาตรของสารละลายมาตรฐานกรดซัลฟูริกทั้งหมดที่ใช้ไป

การคำนวณความเข้มข้นของสารละลายมาตรฐานกรดซัลฟูริก (นอร์มอล)

$$\text{ความเข้มข้น(นอร์มอล)} = \frac{0.2 \times 25}{\text{ปริมาตร (ml) ของสารละลายมาตรฐานกรดซัลฟูริกที่ใช้}}$$

หลังจากนั้นทำการปรับความเข้มข้นของสารละลายมาตรฐานกรดซัลฟูริกให้มีความเข้มข้นเท่ากับ 0.02 นอร์มอล โดยใช้สูตร

$$N_1V_1 = N_2V_2$$

N_1 = ความเข้มข้นของสารละลายที่จะปรับค่า

N_2 = ความเข้มข้นของสารละลายที่ต้องการ

V_1 = ปริมาตรของสารละลายที่จะปรับค่า

V_2 = ปริมาตรของสารละลายที่ต้องการ

5.1.3 วิธีการ

1. นำตัวอย่างน้ำ 100 ml ใส่ลงในขวดรูปชมพู่ขนาด 250 ml

2. หยดฟีนอลฟ์ทาลีนอินดิเคเตอร์ 10 หยด เขย่าให้เข้ากันถ้าสารละลายใส ให้ทำข้อ 3 ต่อไป ถ้าสารละลายสีชมพูจะต้องไตเตรทด้วยสารละลายมาตรฐานกรดซัลฟูริกจนกระทั่งสารละลายสีชมพูนั้นหายไปบันทึกปริมาตรที่ใช้ไป(นำไปรวมกับปริมาตรของสารละลายมาตรฐานกรดซัลฟูริกที่ใช้ไปในข้อ 4) ทำต่อไปในข้อ.3

3. หยดเมทิลออเรนจ์ 3-2 หยด เขย่าให้เข้ากัน จะได้สารละลายสีเหลือง

4. ไตเตรทด้วยสารละลายมาตรฐานกรดซัลฟูริก 0.02 นอร์มอล จนกระทั่งสารละลายปลี่ยนเป็นสีส้ม จนปริมาตรของสารละลายกรดซัลฟูริกที่ใช้ไปทั้งหมด

การคำนวณค่าความเป็นด่างของน้ำ (มิลลิกรัมต่อลิตร)
ค่าความเป็นด่าง

$$= \frac{\text{ปริมาตรของกรดซัลฟูริกที่ใช้} \times \text{นอร์มอลิตี้ของกรดซัลฟูริก} \times 50 \times 1{,}000}{\text{ปริมาตรน้ำตัวอย่าง}}$$

5.2 การวิเคราะห์ออกซิเจนละลายน้ำ (นิคม ละอองศิริวงศ์ และยงยุทธ ปรีดาลัมพบุตร, 2546 ดัดแปลงจาก Winkler method)

5.2.1 ขั้นตอน

1.เก็บตัวอย่างน้ำ พยายามอย่าให่มีฟองอากาศเกิดขึ้น

2.การเตรียมสารเคมี

2.1 Manganese Sulfate Soliution (น้ำยาตัวที่ 1)

ชั่ง $MnSO_4.H_2O$ 364 กรัม ละลายในน้ำกลั่น 800 ml เมื่อ $MnSO_4.H_2O$ ละลายหมดนำมากรองด้วยกระดาษกรอง แล้วปริมาตรให้ครบ 1000 ml

2.2. Alkali-iodine-azide solution (น้ำยาตัวที่ 2)

2.2.1 ชั่งNaOH 500 g และ NaI 135 g ละลายในน้ำกลั่นปรับปริมาตรให้ครบ 1000 ml

2.2.2 ชั่ง Sodium Azide (NaN_3) 10 g ละลายในน้ำกลั่น 40 ml นำสารละลาย NaN_3 เติมลงในสารในข้อ 2.2.1

3. วิธีการ

3.1 เติมน้ำยาตัวที่ 1 ปริมาตร 1 ml (Manganese Sulfate Soliution)

3.2 เติมน้ำยาตัวที่ 1 ปริมาตร 1 ml (Alkali-iodine-azide solution)

3.3 ปิดฝาเขย่าให้เข้ากัน (ประมาณ 15 ครั้ง)

3.4 เก็บในที่มืดไม่ให้โดนแสง 15 นาที

3.5 เติม H2SO4 เข้มข้น 1 ml

3.6 ปิดฝาเขย่าให้เข้ากัน

ขั้นตอนในการไตเตรท

1 ตวงน้ำ 100 ml ใส่ขวกรูปชมพู่

2 ไตเตรทด้วย Sodium thiosulfate 0.025 N จนสารละลายเปลี่ยนจากสีเหลืองเข้มเป็นสีเหลืองอ่อน

3 หยดน้ำแป้งลงไป 2-3 หยดไตเตรทต่อจนสารละลายเปลี่ยนเป็นไม่มีสี

การคำนวณ

ปริมาณออกซิเจนละลายในน้ำ = (ปริมาตร Sodium thiosulfate ที่ไตเตรท)x2

6. การวิเคราะห์กิจกรรมของเอนไซม์ AChE

เก็บเส้นประสาทของกุ้งตั้งแต่ส่วนหัวจนถึงโคนหาง ใสในหลอดไมโครเซนตริฟิวส์ที่มี PBS 7.5 อยู่ 300 ไมโครลิตร จากนั้นนำตัวอย่างที่ได้บดให้ละเอียดนำไปปั่นด้วยเครื่อง centrifuge ที่ความเร็วรอบ 14000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียลเป็นเวลา 10 นาที ดูดส่วนใสที่ได้มา 10 ไมโครลิตร เจือจางด้วย PBS 190 ไมโครลิตร (20 เท่า) จากนั้นดูตัวอย่างที่ได้มา 5 ไมโครลิตร ใส่ใน 96 well-plate จากนั้นเติม working reagent 95 ไมโครลิตร นำไปค่าดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 412 นาโนเมตร ที่เวลา 2 นาที (OD_2) และ 10 นาที (OD_{10}) calibate โดยดูดน้ำกลั่น 200 ไมโครลิตร ใส่ใน 96 well plate และดูด calibrator 200 ไมโคลิตร ลงไปตามด้วยตัวอย่าง 10 ไมโครลิตร นำไปวัด OD 412 บันทึกค่าที่ได้

วิธีการคำนวณ

$$AChE = \frac{OD_{10}-OD_2}{OD_{cal}-OD_{H2O}} \times n \times 200 \ (U/L)$$

OD2 = ค่าของตัวอย่างที่เว โนเมตร

OD10 = ค่าของตัวอย่างที่เวลา 10 นาที OD 412 นาโนเมตร

n = dilution ที่ใช้ในการทำปฏิกิริยา

200 = ค่าคงที่ในการทำปฏิกิริยา

ODcal = ค่าที่ได้จากการ calibate

7. การวิเคราะห์กิจกรรมของเอนไซม์ LDH

ดูด PBS 300 ไมโครลิตร ใส่ในหลอดไมโครเซนตริฟิวส์จากเก็บตัวอย่างกล้ามเนื้อของกุ้งขาวประมาณ 1 กรัม ใส่ลงใน PBS ที่เตรียมไว้ นำไปบดจนละเอียดจากนั้น

นำไปปั่นตกตะกอนด้วยเครื่อง centrifuge ที่ความเร็วรอบ 14000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียลเป็นเวลา 10 นาที ดูดส่วนใสที่ได้มา 10 ไมโครลิตร เจือจางด้วย PBS 190 ไมโครลิตร (20 เท่า) มา 5 ไมโครลิตร ใส่ใน 96 well-plate เติม จากนั้นนำไปวิเคราะห์หาค่ากิจกรรมของเอนไซม์ LDH

ตารางองค์ประกอบทางโภชนาการของอาหารที่ใช้ในการทดลอง

วัตถุดิบ	ชุดการทดลองที่ 1 (กรัม/100 กรัม)	ชุดการทดลองที่ 2 (กรัม/100 กรัม)	ชุดการทดลองที่ 3 (กรัม/100 กรัม)
Fish meal	24	24	24
Soybean meal	15	15	15
Poultry meal	5	5	5
Wheat flour	18	18	18
Rice flour	22.849	22.849	22.849
fish oil	3	3	3
squid meal	3	3	3
Lecithin	2	2	2
Cholesterol	0.15	0.15	0.15
Vitamin + Mineral premix	2.5	2.5	2.5
Choline Chloride	0.3	0.3	0.3
Vitamin E	0.08	0.08	0.08
Vitamin C	0.1	0.1	0.1
Se	0.001	0.001	0.001
Wheat gluten	4	4	4
BHT	0.02	0.02	0.02
รวม	100	100	100
TTX (mg)	0	0.25	0.5
protein	35.664	35.664	35.664
Fat	8.085	8.085	8.085
Ash	7.678	7.678	7.678

[1]วิตามินผสม(มิลลิกรัม/อาหาร1 กิโลกรัม)ประกอบด้วย Thiamine (B_1) 10 มิลลิกรัม: Riboflavin (B_2) 20 มิลลิกรัม: Pyridoxine (B_6) 10 มิลลิกรัม: Cobalamine (B_{12}) 2 มิลลิกรัม: Retinol (A) 4,000 IU: Cholecalciferol (D_3) 2,000 IU: Menadione sodium bisulfite (K_3) 80 มิลลิกรัม : Folic 5 มิลลิกรัม: Calcium pantothenate 40 มิลลิกรัม: Inositol 400 มิลลิกรัม : Niacin 150 มิลลิกรัม: Tocopherol (E) 50 มิลลิกรัม: Biotin 1 มิลลิกรัม: Ascorbic acid (C) 500 มิลลิกรัม

[2]แร่ธาตุรวม (ปริมาณ/แร่ธาตุผสม1กิโลกรัม) ประกอบด้วย Na 3.278 กรัม: Mg 25.25 กรัม: K 76.612 กรัม: Ca 49.096 กรัม: Fe 4.821 กรัม: Zn 0.667 กรัม: Mn 0.433 กรัม, Cu 0.069 กรัม และ I 0.015 กรัม

[3]ใช้น้ำเป็นตัวพา (Carier)

หมายเหตุ : สูตรอาหารดังกล่าวอาจมีการปรับเปลี่ยนเมื่อมีการวิเคราะห์คุณภาพของวัตถุดิบอาหาร

ประวัติผู้เขียน

ชื่อ สกุล นางสาวนุชรี สงสกุล

รหัสนักศึกษา 5010620014

วุฒิการศึกษา 2553

วุฒิ	ชื่อสถาบัน	ปีที่สำเร็จการศึกษา
วิทยาศาสตรบัณฑิต (วิทยาศาสตร์การเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำ)	มหาวิทยาลัยทักษิณ	2549