ใบรับรองวิทยานิพนธ์

บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต (เพาะเลี้ยงสัตว์น้ำ)

ปริญญา

เพาะเลี้ยงสัตว์น้ำ
สาขา

เพาะเลี้ยงสัตว์น้ำ
ภาควิชา

เรื่อง ประสิทธิภาพของสารยูจีนอลสังเคราะห์ในการใช้เป็นยาสลบเพื่อการขนส่งปลา

Efficacy of Synthetic Eugenol as Anesthetic for Fish Transportation

นามผู้วิจัย นายอุทร เจริญเดช

ได้พิจารณาเห็นชอบโดย

อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก .....

(รองศาสตราจารย์นนทวิทย์ อารีย์ชน, Ph.D.)

อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม .....

(อาจารย์ประพันธ์ศักดิ์ ศิรษะภูมิ, Ph.D.)

อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม .....

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์เรืองวิชญ์ ยุ้นพันธ์, D.Tech.Sc.)

หัวหน้าภาควิชา .....

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์พงศ์เชฏฐ์ พิชิตกุล, Ph.D. Candidate)

บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์รับรองแล้ว

.....

(รองศาสตราจารย์กัญจนา ธีระกุล, D.Agr.)

คณบดีบัณฑิตวิทยาลัย

วันที่ ..... **เดือน** ..... **พ.ศ.** .....

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

วิทยานิพนธ์

เรื่อง

ประสิทธิภาพของสารยูจีนอลสังเคราะห์ในการใช้เป็นยาสลบเพื่อการขนส่งปลา

Efficacy of Synthetic Eugenol as Anesthetic for Fish Transportation

โดย

นายอุทร เจริญเดช

เสนอ

บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์
เพื่อความสมบูรณ์แห่งปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต (เพาะเลี้ยงสัตว์น้ำ)
พ.ศ. 2555

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

อุทร เจริญเดช 2555: ประสิทธิภาพของสารยูจีนอลสังเคราะห์ในการใช้เป็นยาสลบเพื่อการขนส่งปลา ปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต (เพาะเลี้ยงสัตว์น้ำ) สาขาเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำ ภาควิชาเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำ อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก: รองศาสตราจารย์ นนทวิทย์ อารีย์ชน, Ph.D. 206 หน้า

การศึกษาประสิทธิภาพของสารยูจีนอลสังเคราะห์ในการสลบปลาที่ใช้เป็นอาหารคือลูกปลานิลขนาด 0.30±0.01 กรัม และปลานิลขนาด 70.85±1.03 กรัม (ขนาดลงกระชัง) รวมทั้งปลาสวยงามคือปลาหางไหม้ขนาด 3.01±0.48 กรัม โดยเปรียบเทียบกับยาสลบชนิดน้ำมันกานพลู และ MS-222 เพื่อประยุกต์ใช้ในการขนส่งและกิจกรรมอื่น ๆ ที่ทำให้ปลาเกิดความเครียดและส่งผลต่อสุขภาพของปลา เพื่อให้การใช้ยาสลบมีความปลอดภัยจึงทำการศึกษาความเป็นพิษเฉียบพลันในลูกปลานิลขนาด 0.3 กรัม พบว่าสารยูจีนอลสังเคราะห์มีความเป็นพิษใกล้เคียงกับน้ำมันกานพลู ส่วนMS-222 มีความเป็นพิษต่ำกว่า โดยมีค่า LC_{50} ที่ 24 ชั่วโมงเท่ากับ 16.98, 16.95 และ 72.50 มิลลิกรัม ต่อลิตร ตามลำดับ การศึกษาประสิทธิภาพในการสลบ พบว่าสารยูจีนอลสังเคราะห์ที่ 5 มิลลิกรัมต่อลิตรทำให้ลูกปลานิลและปลาหางไหม้สลบระยะที่ 1 (sedation stage) และ 10 มิลลิกรัมต่อลิตร สำหรับปลานิลขนาดลงกระชัง ส่วนความเข้มข้นที่ทำให้ปลาสลบระยะที่ 4 คือ 20 มิลลิกรัมต่อลิตรสำหรับลูกปลานิลและปลาหางไหม้ และ 30 มิลลิกรัมต่อลิตรสำหรับปลานิลขนาดลงกระชัง การศึกษาประสิทธิภาพของสารยูจีนอลสังเคราะห์ในการลดผลกระทบของความเครียดในปลานิลขนาดลงกระชัง พบว่าสารยูจีนอลสังเคราะห์ช่วยลดผลกระทบของความเครียดได้ดี เมื่อประเมินจากค่าบ่งชี้ความเครียดในเลือด คือระดับของ cortisol และ glucose รวมถึงการตอบสนองของระบบภูมิคุ้มกันแบบไม่จำเพาะจากค่า spontaneous superoxide anion และค่า percent phagocytosis แต่การใช้สารยูจีนอลสังเคราะห์สลบปลานิลก่อนให้วัคซีนของเชื้อ *Streptococcus agalactiae* ไม่มีผลต่อการตอบสนองต่อการให้วัคซีน 2 ครั้งเมื่อประเมินจากปริมาณ antibody ในซีรั่ม การทดลองใช้สารยูจีนอลสังเคราะห์ที่ 5 มิลลิกรัมต่อลิตรในการขนส่งลูกปลานิลและปลาหางไหม้ พบว่ามีประสิทธิภาพที่ดีในการลดกิจกรรรมของปลาทดลอง ทำให้คุณภาพน้ำไม่เปลี่ยนแปลงมาก มีอัตรารอดสูงทั้งระหว่างและหลังการขนส่ง โดยความหนาแน่นที่เหมาะสมในการขนส่งลูกปลานิลอยู่ที่ 1,000 ตัวต่อน้ำ 3 ลิตร ด้วยเวลาในการขนส่ง 6 ชั่วโมง ส่วนการขนส่งปลาหางไหม้สามารถใช้ความหนาแน่น 75 ตัวต่อน้ำ 3 ลิตร ด้วยเวลาในการขนส่ง 24 ชั่วโมงและใช้สารยูจีนอลสังเคราะห์ที่ 5 มิลลิกรัมต่อลิตร

_____ _____ __ / __ / __

ลายมือชื่อนิสิต ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

Uton Charoendat 2012: Efficacy of Synthetic Eugenol as Anesthetic for Fish Transportation. Master of Science (Aquaculture), Major Field: Aquaculture, Department of Aquaculture. Thesis Advisor: Associate Professor Nontawith Areechon, Ph.D. 206 pages.

Efficacy of synthetic eugenol as fish anesthetic was investigated in tilapia fry, tilapia juvenile (*Oreochromis niloticus* Linn.) and silver shark (*Balantiocheilos melanopterus*) with average weight of 0.30±0.01 g, 70.85±1.03 g and 3.01±0.48 g, respectively and compared with clove oil and MS-222. The study emphasized on the application of synthetic eugenol for transportation and other activities that caused stress and harmful effect on fish health. For safe application, acute toxicity test of three anesthetics was conducted with 0.3 g tilapia fry. The results of 24 hr LC_{50} values were 16.98, 16.95 and 72.59 mg/l for synthetic eugenol, clove oil and MS-222, respectively. Study on efficacy as anesthetic revealed that 5 mg/l of synthetic eugenol induced stage 1 anesthesia (sedation stage) in tilapia fry and silver shark and 10 mg/l for tilapia juvenile. For stage 4 anesthesia, 20 mg/l synthetic eugenol was required for tilapia fry and silver shark and 30 mg/l for tilapia juvenile. Study on the effect of synthetic eugneol on stress response in tilapia juvenile indicated that this anesthetic could effectively reduce the negative response to stress determined by stress indicators including serum cortisol and glucose. Similar result was found with non-specific immunity including spontaneous superoxide anion and percent phagocytosis. However, application of synthetic eugenol to anesthesize tilapia before vaccination of formalin-killed *Streptococcus agalactiae* by intraperitoneal injection did not show any significant difference on specific immune response determined by serum antibody. Benefits of synthetic eugenol during transportation of tilapia fry were detected. Induction of sedation stage by 5 mg/l synthetic eugenol could significantly reduce the water quality deterioration and improve the survival of tilapia fry during and after transportation. The results from this study clearly demonstrated the positive effect of synthetic eugenol as an effective anesthetic for fish which can be used for transportation and also to reduce the response to stressful condition in aquaculture. Tilapia fry can be safely transported with density of 1,000 fry per 3 liters of water for 6 hr transportation and 75 silver shark per 3 liters of water for 24 hr transportation with additional of 5 mg/l synthetic eugenol in the water.

_____ _____ __ / __ / __

Student's signature Thesis Advisor's signature

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

กิตติกรรมประกาศ

ผู้วิจัยขอกราบขอบพระคุณ รองศาสตราจารย์ ดร. นนทวิทย์ อารีย์ชน อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก อาจารย์ ดร. ประพันธ์ศักดิ์ ศิรษะภูมิ และผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. เรืองวิชญ์ ยุ้นพันธ์ อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม ที่กรุณาให้คำปรึกษาที่ดีเสมอมา ทั้งในด้านการเรียนการค้นคว้าวิจัยตลอดจนการแก้ไขตรวจทานวิทยานิพนธ์ฉบับนี้ จนกระทั่งเสร็จสมบูรณ์

ขอขอบคุณ รองศาสตราจารย์ ดวงดาว ฉันทศาสตร์ ภาควิชาเภสัชกรรม คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล ซึ่งได้ให้การสนับสนุนในส่วนของสารเคมีที่นำมาใช้เพื่อการศึกษาครั้งนี้

ขอขอบคุณ รองศาสตราจารย์ ดร.วราห์ เทพาหุดี และรองศาสตราจารย์ สพ.ญ.ดร. เจนนุช ว่องธวัชชัย ที่ได้กรุณาเป็นประธานการสอบและผู้ทรงคุณวุฒิในการสอบปากเปล่าขั้นสุดท้ายของข้าพเจ้า

ขอขอบคุณสถาบันวิจัยและพัฒนาแห่งมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์และสำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัยที่ได้สนับสนุนทุนในการศึกษาวิจัยครั้งนี้

ขอขอบคุณพี่ ๆ น้อง ๆ ทุกคนในห้องปฏิบัติการจัดการสุขภาพสัตว์น้ำ ภาควิชาเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำทุกท่าน ที่คอยช่วยเหลือ ให้คำแนะนำ และเป็นกำลังใจในการทำวิทยานิพนธ์ให้แก่ข้าพเจ้าเสมอมา

ขอขอบคุณบริษัท ไบโอมิน (ประเทศไทย) จำกัด ที่รับข้าพเจ้าเข้าทำงาน ทำให้ข้าพเจ้าสามารถหาเงินเพื่อเลี้ยงชีพและส่งตัวเองเรียนจนสำเร็จการศึกษาได้

สุดท้ายนี้ขอกราบขอบพระคุณคุณพ่ออุทัย เจริญเดช คุณแม่ประดับ เจริญเดช และทุกคนในครอบครัวที่ให้ความรัก ให้กำลังใจ และให้การสนับสนุนในการศึกษาแก่ข้าพเจ้าจนสำเร็จลุล่วงด้วยดีตลอดมา

อุทร เจริญเดช

มีนาคม 2555

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

สารบัญ

หน้า

สารบัญ	(1)
สารบัญตาราง	(2)
สารบัญภาพ	(6)
คำนำ	1
วัตถุประสงค์	3
การตรวจเอกสาร	4
อุปกรณ์และวิธีการ	64
อุปกรณ์	64
วิธีการ	69
ผลและวิจารณ์	88
ผล	88
วิจารณ์	149
สรุป	172
เอกสารและสิ่งอ้างอิง	174
ภาคผนวก	201
ประวัติการศึกษาและการทำงาน	206

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

สารบัญตาราง

ตารางที่		หน้า
1	เปอร์เซ็นต์ของแอมโมเนียในรูป unionized ammonia ที่ระดับของอุณหภูมิ (°F) และ pH ต่าง ๆ	31
2	จำนวนปลาที่สามารถบรรจุได้ในถุงพลาสติกขนาด 18x22 นิ้ว ที่มีปริมาตรน้ำ 2 แกลลอน (7.58 ลิตร) โดยที่น้ำมีความกระด้างที่ 80-100 ppm และมีช่วงอุณหภูมิที่ 12.7-15.55 องศาเซลเซียส	34
3	ชนิดและขนาดของถุงที่ใช้ในการขนส่งปลา	37
4	การแบ่งระยะสลบของปลาตามลักษณะการเปลี่ยนแปลงพฤติกรรมของปลา แบ่งโดย McFarland (1960)	41
5	ระยะสลบของปลาแบ่งโดย Stoskopf (1993)	43
6	ระยะสลบของปลาแบ่งโดย Summerfelt and Smith (1990)	44
7	ระยะที่ปลาฟื้นจากการสลบแบ่งโดย Hikasa *et al.* (1986)	46
8	ระยะที่ปลาฟื้นจากการสลบแบ่งโดย Iwama and Ackerman (1994)	47
9	ระดับความเข้มข้นของยาสลบแต่ละชนิดที่ใช้เพื่อการหาความเข้มข้นที่เหมาะสมในการสลบปลา	70
10	ค่า LC_{50} ที่ 24 ชั่วโมงของยาสลบแต่ละชนิดเมื่อทดสอบกับลูกปลานิล	88
11	เวลาเฉลี่ยที่เหนี่ยวนำให้ลูกปลานิลขนาด 0.30±0.01 กรัม สลบและฟื้นจากการสลบ เมื่อสัมผัสกับสารยูจีนอลสังเคราะห์ที่ระดับความเข้มข้นต่าง ๆ เป็นเวลา 20 นาที	91
12	เวลาเฉลี่ยที่เหนี่ยวนำให้ลูกปลานิลขนาด 0.30±0.01 กรัม สลบและฟื้นจากการสลบ เมื่อสัมผัสกับน้ำมันกานพลูที่ระดับความเข้มข้นต่าง ๆ เป็นเวลา 20 นาที	92
13	เวลาเฉลี่ยที่เหนี่ยวนำให้ลูกปลานิลขนาด 0.30±0.01 กรัม สลบและฟื้นจากการสลบ เมื่อสัมผัสกับสาร MS-222 ที่ระดับความเข้มข้นต่าง ๆ เป็นเวลา 20 นาที	93

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

สารบัญตาราง (ต่อ)

ตารางที่		หน้า
14	เวลาเฉลี่ยที่เหนี่ยวนำให้ปลานิลวัยรุ่นขนาดลงกระชัง น้ำหนักเฉลี่ย 70.85±1.03 กรัม สลบและฟื้นจากการสลบ เมื่อสัมผัสกับสารยูจีนอลสังเคราะห์ที่ระดับความเข้มข้นต่าง ๆ เป็นเวลา 20 นาที	96
15	เวลาเฉลี่ยที่เหนี่ยวนำให้ปลานิลวัยรุ่นขนาดลงกระชัง น้ำหนักเฉลี่ย 70.85±1.03 กรัม สลบและฟื้นจากการสลบ เมื่อสัมผัสกับน้ำมันกานพลูที่ระดับความเข้มข้นต่าง ๆ เป็นเวลา 20 นาที	97
16	เวลาเฉลี่ยที่เหนี่ยวนำให้ปลานิลวัยรุ่นขนาดลงกระชัง น้ำหนักเฉลี่ย 70.85±1.03 กรัม สลบและฟื้นจากการสลบ เมื่อสัมผัสกับสาร MS-222 ที่ระดับความเข้มข้นต่าง ๆ เป็นเวลา 20 นาที	98
17	เวลาเฉลี่ยที่เหนี่ยวนำให้ปลาหางไหม้ ขนาด 3.01±0.48 กรัม สลบและฟื้นจากการสลบ เมื่อสัมผัสกับสารยูจีนอลสังเคราะห์ที่ระดับความเข้มข้นต่าง ๆ เป็นเวลา 20 นาที	101
18	เวลาเฉลี่ยที่เหนี่ยวนำให้ปลาหางไหม้ ขนาด 3.01±0.48 กรัม สลบและฟื้นจากการสลบ เมื่อสัมผัสกับน้ำมันกานพลูที่ระดับความเข้มข้น ต่าง ๆ เป็นเวลา 20 นาที	102
19	เวลาเฉลี่ยที่เหนี่ยวนำให้ปลาหางไหม้ ขนาด 3.01±0.48 กรัม สลบและฟื้นจากการสลบ เมื่อสัมผัสกับสาร MS-222 ที่ระดับความเข้มข้นต่าง ๆ เป็นเวลา 20 นาที	103
20	ความเข้มข้นเฉลี่ยของ cortisol ในซีรั่มของปลานิล (ug/dl) ก่อนและหลังการเหนี่ยวนำให้เกิดความเครียด ณ ช่วงเวลาที่กำหนด	105
21	ความเข้มข้นเฉลี่ยของ glucose ในซีรั่มของปลานิล (mg/dl) ก่อนและหลังการเหนี่ยวนำให้เกิดความเครียด ณ ช่วงเวลาที่กำหนด	108
22	% phagocytosis ของปลานิล ก่อนและหลังการเหนี่ยวนำให้เกิดความเครียด ณ ช่วงเวลาที่กำหนด	111

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

สารบัญตาราง (ต่อ)

ตารางที่		หน้า
23	ค่า spontaneous O_2^- production ของปลานิล ก่อนและหลังการเหนี่ยวนำให้เกิดความเครียด ณ ช่วงเวลาที่กำหนด	114
24	ค่า antibody titer หลังจากการฉีดวัคซีนโดยใช้สารยูจีนอลสังเคราะห์เป็นยาสลบและไม่ใช้ยาสลบในแต่ละสัปดาห์	117
25	ผลการวิเคราะห์เกี่ยวกับปฏิสัมพันธ์ระหว่างระยะเวลาขนส่งและการใช้ยาสลบแต่ละชนิดที่มีต่อคุณภาพน้ำและอัตรารอดของลูกปลานิลหลังจากการขนส่งด้วยความหนาแน่น 1,000 ตัวต่อน้ำ 3 ลิตร	124
26	ผลการวิเคราะห์เกี่ยวกับอิทธิพลหลักของการใช้ยาสลบแต่ละชนิดที่มีต่อคุณภาพน้ำและอัตรารอดของลูกปลานิลหลังจากการขนส่งด้วยความหนาแน่น 1,000 ตัวต่อน้ำ 3 ลิตร	125
27	ผลการวิเคราะห์เกี่ยวกับอิทธิพลหลักของระยะเวลาขนส่งปลาที่มีต่อคุณภาพน้ำและอัตรารอดของลูกปลานิลหลังจากการขนส่งด้วยความหนาแน่น 1,000 ตัวต่อน้ำ 3 ลิตร	126
28	ผลการวิเคราะห์เกี่ยวกับปฏิสัมพันธ์ระหว่างระยะเวลาขนส่งและการใช้ยาสลบแต่ละชนิดที่มีต่อคุณภาพน้ำและอัตรารอดของลูกปลานิลหลังจากการขนส่งด้วยความหนาแน่น 1,200 ตัวต่อน้ำ 3 ลิตร	133
29	ผลการวิเคราะห์เกี่ยวกับอิทธิพลหลักของการใช้ยาสลบแต่ละชนิดที่มีต่อคุณภาพน้ำและอัตรารอดของลูกปลานิลหลังจากการขนส่งด้วยความหนาแน่น 1,200 ตัวต่อน้ำ 3 ลิตร	134
30	ผลการวิเคราะห์เกี่ยวกับอิทธิพลหลักของระยะเวลาขนส่งปลาที่มีต่อคุณภาพน้ำและอัตรารอดของลูกปลานิลหลังจากการขนส่งด้วยความหนาแน่น 1,200 ตัวต่อน้ำ 3 ลิตร	135
31	ผลการวิเคราะห์เกี่ยวกับปฏิสัมพันธ์ระหว่างความหนาแน่น และการใช้ยาสลบแต่ละชนิดที่มีต่อคุณภาพน้ำและอัตรารอดของปลาหางไหม้หลังจากการขนส่งด้วยเวลา 24 ชั่วโมง	142

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

สารบัญตาราง (ต่อ)

ตารางที่		หน้า
32	ผลการวิเคราะห์เกี่ยวกับอิทธิพลหลักของความหนาแน่นในการขนส่งปลาที่มีต่อคุณภาพน้ำและอัตรารอดของปลาหางไหม้หลังจากการขนส่งด้วยเวลา 24 ชั่วโมง	144
33	ผลการวิเคราะห์เกี่ยวกับอิทธิพลหลักของการใช้ยาสลบแต่ละชนิดที่มีต่อคุณภาพน้ำและอัตรารอดของปลาหางไหม้หลังจากการขนส่งด้วยเวลา 24 ชั่วโมง	145

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

สารบัญภาพ

ภาพที่		หน้า
1	องค์ประกอบทางเคมีที่ได้จากดอกกานพลู	54
2	องค์ประกอบทางเคมีที่ได้จากใบกานพลู	55
3	ความเข้มข้นของ cortisol ในซีรั่มของปลานิล (ug/dl) ก่อนและหลังการเหนี่ยวนำให้เกิดความเครียด ณ ช่วงเวลาที่กำหนด	106
4	ความเข้มข้นของ glucose ในซีรั่มของปลานิล (mg/dl) ก่อนและหลังการเหนี่ยวนำให้เกิดความเครียด ณ ช่วงเวลาที่กำหนด	109
5	ค่า % phagocytosis ของปลานิล ก่อนและหลังการเหนี่ยวนำให้เกิดความเครียด ณ ช่วงเวลาที่กำหนด	112
6	ค่า spontaneous O_2^- production ของปลานิล ก่อนและหลังการเหนี่ยวนำให้เกิดความเครียด ณ ช่วงเวลาที่กำหนด	115
7	ค่า antibody titer เฉลี่ยในแต่ละสัปดาห์ของปลานิลที่ได้รับวัคซีนของเชื้อ *Streptococcus agalactiae* โดยการใช้และไม่ใช้สารยูจีนอลสังเคราะห์ในการสลบปลาก่อนการฉีดวัคซีน	118
8	Profile Plots ที่แสดงถึงปฏิสัมพันธ์ระหว่าง 2 ปัจจัย คือการใช้ยาสลบแต่ละชนิดและระยะเวลาขนส่ง ซึ่งมีอิทธิพลต่ออุณหภูมิของน้ำหลังจากการขนส่งลูกปลานิลด้วยความหนาแน่น 1,000 ตัวต่อน้ำ 3 ลิตร	127
9	Profile Plots ที่แสดงถึงปฏิสัมพันธ์ระหว่าง 2 ปัจจัย คือการใช้ยาสลบแต่ละชนิดและระยะเวลาขนส่ง ซึ่งมีอิทธิพลต่อค่าไนไตรต์ของน้ำหลังจากการขนส่งลูกปลานิลด้วยความหนาแน่น 1,000 ตัวต่อน้ำ 3 ลิตร	128
10	Profile Plots ที่แสดงถึงปฏิสัมพันธ์ระหว่าง 2 ปัจจัย คือการใช้ยาสลบแต่ละชนิดและระยะเวลาขนส่ง ซึ่งมีอิทธิพลต่อค่าไนไตรต์ของน้ำหลังจากการขนส่งลูกปลานิลด้วยความหนาแน่น 1,200 ตัวต่อน้ำ 3 ลิตร	136
11	Profile Plots ที่แสดงถึงปฏิสัมพันธ์ระหว่าง 2 ปัจจัย คือการใช้ยาสลบแต่ละชนิดและระยะเวลาขนส่ง ซึ่งมีอิทธิพลต่ออัตรารอดของลูกปลานิลหลังจากผ่านการขนส่งด้วยความหนาแน่น 1,200 ตัวต่อน้ำ 3 ลิตร เป็นระยะเวลา 7 วัน	137

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

สารบัญภาพ (ต่อ)

ภาพที่ **หน้า**

12 Profile Plots ที่แสดงถึงปฏิสัมพันธ์ระหว่าง 2 ปัจจัย คือการใช้ยาสลบแต่ละชนิด และความหนาแน่นที่ใช้ในการขนส่งซึ่งมีอิทธิพลต่ออุณหภูมิของน้ำหลังจากการขนส่งปลาหางไหม้ด้วยเวลา 24 ชั่วโมง 146

13 Profile Plots ที่แสดงถึงปฏิสัมพันธ์ระหว่าง 2 ปัจจัย คือการใช้ยาสลบแต่ละชนิด และความหนาแน่นที่ใช้ขนส่งซึ่งมีอิทธิพลต่อค่าไนไตรท์ของน้ำหลังจากการขนส่งปลาหางไหม้ด้วยเวลา 24 ชั่วโมง 147

14 Profile Plots ที่แสดงถึงปฏิสัมพันธ์ระหว่าง 2 ปัจจัย คือการใช้ยาสลบแต่ละชนิด และความหนาแน่นที่ใช้ในการขนส่ง ซึ่งมีอิทธิพลต่ออัตรารอดของปลาหางไหม้หลังจากการขนส่งด้วยเวลา 24 ชั่วโมง 148

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ประสิทธิภาพของสารยูจีนอลสังเคราะห์ในการใช้เป็นยาสลบเพื่อการขนส่งปลา

Efficacy of Synthetic Eugenol as Anesthetic for Fish Transportation

คำนำ

กิจกรรมเกี่ยวกับการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำในประเทศไทยได้มีการพัฒนาก้าวหน้าขึ้นอย่างต่อเนื่อง จากการศึกษาวิจัยจากหน่วยงานต่าง ๆ ที่เกี่ยวข้อง ทั้งนี้เพื่อลดการทำประมงทะเลที่มีผลกระทบต่อทรัพยากรธรรมชาติ และเพื่อให้เกิดความยั่งยืนทางด้านอาหารประเภทสัตว์น้ำซึ่งเป็นโปรตีนที่มีคุณภาพ มีราคาถูก และเป็นการสร้างอาชีพให้แก่ประชากรของประเทศ การได้มาซึ่งสัตว์น้ำทั้งเพื่อบริโภคหรือเป็นสัตว์เลี้ยงสวยงามนั้นส่วนใหญ่เกิดจากกิจกรรมต่าง ๆ ที่เกี่ยวข้องกัน ทั้งในส่วนของโรงเพาะและอนุบาล บ่อเลี้ยง โรงงานผลิตอาหารสัตว์น้ำและอื่น ๆ ที่เกี่ยวข้อง เช่น การขนส่งสัตว์น้ำซึ่งเป็นกิจกรรมที่เกิดขึ้นเสมอตั้งแต่ขั้นตอนแรกจนขั้นตอนสุดท้ายของการผลิตสัตว์น้ำ ทั้งนี้การขนส่งสัตว์น้ำมีชีวิตให้ไปถึงที่หมายได้โดยมีการสูญเสียน้อยที่สุดและมีค่าขนส่งน้อยที่สุดนั้นเป็นสิ่งที่ต้องการของผู้ประกอบการ ดังนั้นจึงได้มีการพัฒนาวิธีการต่าง ๆ เพื่อการขนส่งสัตว์น้ำมีชีวิตให้มีประสิทธิภาพมากขึ้น เช่น การพัฒนาวิธีเตรียมสัตว์น้ำก่อนการขนส่ง การพัฒนาภาชนะบรรจุและวิธีการบรรจุสัตว์น้ำ รวมทั้งการใช้วิธีการทางกายภาพ และทางเคมีบางอย่างเพื่อลดกิจกรรมและปรับสมดุลทางสรีรวิทยาของสัตว์น้ำให้เป็นปกติระหว่างขนส่ง สำหรับการขนส่งสัตว์น้ำในประเทศไทยนั้นส่วนใหญ่จะทำในสัตว์น้ำวัยอ่อน ปลาพ่อแม่พันธุ์ ปลาสวยงาม และมีบางส่วนที่เป็นการขนส่งสัตว์น้ำมีชีวิตไปยังตลาดหรือภัตาคารต่าง ๆ ซึ่งในปัจจุบันมีการให้ความสำคัญเกี่ยวกับการลดกิจกรรมของสัตว์น้ำระหว่างขนส่ง โดยการใช้วิธีการทางกายภาพและทางเคมี ได้แก่ การลดอุณหภูมิของน้ำ และการใช้สารเคมีบางชนิดที่มีฤทธิ์ในการสลบสัตว์น้ำเพื่อลดอัตราเมทาโบลิซึมของร่างกาย ซึ่งผลที่เกิดขึ้นนี้เอื้อประโยชน์โดยตรงต่อการขนส่งสัตว์น้ำ เนื่องจากเมื่ออัตราเมทาโบลิซึมต่ำลงจะส่งผลต่อการลดลงของอัตราการหายใจและการขับของเสียออกมา ทำให้คุณภาพน้ำในภาชนะขนส่งไม่เสื่อมเร็วเกินไป สัตว์น้ำไม่เครียด มีผลต่อการเพิ่มอัตรารอดและลดอัตราการเกิดโรคเนื่องจากสภาพที่อ่อนแอของสัตว์น้ำภายหลังการขนส่งได้ ทั้งนี้ยังสามารถเพิ่มจำนวนของสัตว์น้ำในการขนส่งได้มากขึ้น ปัจจุบันมีการใช้ยาสลบกับสัตว์น้ำในหลายกิจกรรมด้วยกัน แต่ยังมีข้อพิจารณาที่ยังไม่อนุญาตให้มีการใช้อย่างแพร่หลายเนื่องจากสารบางชนิดที่ใช้เป็นยาสลบมีผลข้างเคียงต่อทั้งสัตว์น้ำ ผู้ใช้ และสิ่งแวดล้อม เช่น การตกค้างของยาในเนื้อเยื่อของสัตว์น้ำ และสารบางชนิดอาจเป็นสารก่อมะเร็งที่มีผลทั้งทางตรง และทางอ้อมต่อผู้ใช้ ดั้งนั้น

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

การใช้ยาสลบกับสัตว์น้ำที่นำมาบริโภคต้องได้รับอนุญาตจากหน่วยงานภาครัฐที่เกี่ยวข้อง และได้รับการรับรองถึงประสิทธิภาพและความปลอดภัยของตัวยา ซึ่งยาสลบที่ได้รับอนุญาตจากองค์การอาหารและยาของสหรัฐอเมริกา (USFDA) ให้ใช้ได้โดยทั่วไปกับสัตว์น้ำในปัจจุบันมีอยู่ชนิดเดียว ได้แก่ สาร MS-222 (Tricaine methanesulfonate) แต่เนื่องจากสารนี้ยังด้อยประสิทธิภาพในการควบคุมการเกิดความเครียดซึ่งสามารถวัดได้จากระดับฮอร์โมน cortisol ในกระแสเลือดที่เพิ่มขึ้น ประกอบกับสารนี้มีราคาแพงและใช้ในปริมาณที่เข้มข้นมากกว่าสารอื่น ดังนั้นจึงได้มีการศึกษาหายาสลบทดแทนที่มีคุณสมบัติในการเป็นยาสลบที่ดีและมีความปลอดภัยในการใช้งานทั้งต่อสัตว์น้ำและผู้ใช้ และในขณะนี้มีสารที่น่าสนใจชนิดใหม่ที่มีคุณสมบัติทางด้านการสลบที่ดีและได้รับการรับรองจากองค์การอาหารและยาของสหรัฐอเมริกา ว่าสามารถนำมาใช้ได้อย่างปลอดภัยกับสัตว์น้ำ (Generally Considered Safe; GRAS) ได้แก่ สารยูจีนอล (Eugenol; 4-allyl-2-methoxyphenol) ซึ่งเป็นสารออกฤทธิ์ที่ได้จากน้ำมันกานพลู (Clove oil) สารนี้มีข้อได้เปรียบหลายประการเมื่อเทียบกับสารอื่นคือ ราคาถูก สามารถหาได้ง่าย และใช้ได้ผลในความเข้มข้นต่ำ ดังนั้นสารยูจีนอลจึงเป็นสารที่ควรพิจารณาถึงประสิทธิภาพในการสลบสัตว์น้ำ เพื่อสามารถนำไปประยุกต์ใช้ได้อย่างกว้างขวางในกิจกรรมเกี่ยวกับการทดลอง การเพาะเลี้ยงและการขนส่งสัตว์น้ำต่อไป

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

วัตถุประสงค์

1. เพื่อศึกษาประสิทธิภาพของสารยูจีนอลสังเคราะห์ในการสลบปลาได้แก่ ปลานิลซึ่งเป็นตัวแทนของปลาที่เป็นอาหาร และปลาหางไหม้ซึ่งเป็นตัวแทนของปลาสวยงาม

2. เพื่อศึกษาผลของการใช้สารยูจีนอลสังเคราะห์ที่มีต่อการเปลี่ยนแปลงทางสรีรวิทยาของปลานิลในส่วนของการเปลี่ยนแปลงดัชนีชี้วัดผลของการตอบสนองต่อความเครียด

3. เพื่อศึกษาผลของการใช้สารยูจีนอลสังเคราะห์ที่มีต่อกิจกรรมในการตอบสนองของระบบภูมิคุ้มกันแบบจำเพาะและไม่จำเพาะของปลานิล

4. เพื่อศึกษาความเป็นไปได้ในการใช้สารยูจีนอลสังเคราะห์ในการลดกิจกรรมของปลาระหว่างการขนส่ง

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

การตรวจเอกสาร

1. ปลานิล

1.1 ลักษณะทางอนุกรมวิธานและชีววิทยา

อันดับทางอนุกรมวิธานของปลานิล (Nelson, 1994)

Kingdom Animalia
Phylum Chordata
Subphylum Vertebrara
Superclass Gnathostomata
Class Actinopterygii
Order Perciformes
Suborder Labroidei
Family Cichidae
Genus *Oreochromis*
Species *Oreochromis niloticus*

ปลานิล (Nile tilapia) เป็นปลาน้ำจืดชนิดหนึ่ง มีชื่อวิทยาศาสตร์ว่า *Oreochromis niloticus* (Linn.) จัดอยู่ในตระกูล Cichlidae มีรูปร่างลักษณะคล้ายปลาหมอเทศ มีลักษณะพิเศษคือ ริมฝีปากบนและล่างเสมอกัน มีเกล็ด 4 แถวตรงบริเวณแก้ม และจะมีลายพาดขวางลำตัวประมาณ 9 -10 แถบ ครีบหลัง ครีบก้นและครีบหางมีจุดขาวและเส้นสีดำตัดขวาง ครีบหลังมีอันเดียว ประกอบด้วยก้านครีบแข็ง 15-18 อัน และก้านครีบอ่อน 12-14 อัน ครีบก้นมีก้านครีบแข็ง 3 อันและก้านครีบอ่อน 9-10 อัน มีเกล็ด 33 เกล็ดที่แถบบนเส้นข้างลำตัว มีเกล็ดตามแนวเฉียงด้านข้างจากตอนต้นของครีบหลังลงมาจนถึงเส้นข้างลำตัว 5 เกล็ด และจากเส้นข้างลำตัวลงมาถึงครีบก้น 13 เกล็ด และมีจุดเข้ม 1 จุดที่กระดูกแก้ม มีซี่กรอง 15-17 อัน ฟันบริเวณขากรรไกรและคอหอยมีหลายขนาด ตั้งแต่หยาบถึงละเอียด (Nelson, 1994) ปลานิลมีนิสัยชอบรวมกลุ่มเป็นฝูงตามแหล่งน้ำต่าง ๆ กินทั้งพืชและสัตว์เป็นอาหาร แพร่พันธุ์ได้อย่างรวดเร็วตามธรรมชาติ และสามารถทนต่อการ

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

เปลี่ยนแปลงความเค็ม อุณหภูมิและความเป็นกรดเป็นด่างได้ในช่วงกว้าง จึงสามารถปรับตัวได้กับทุกสภาพแวดล้อม (Suresh and Lin, 1992)

ปลานิลมีถิ่นกำเนิดเดิมอยู่ในทวีปแอฟริกา พบทั่วไปตามหนอง บึง และทะเลสาบ ในประเทศซูดาน อูแกนดา และ แทนแกนยิกา และแพร่กระจายไปอย่างกว้างขวางทั่วโลก (วรวุฒิ, 2547) ปลานิลถูกนำเข้ามาเลี้ยงในประเทศไทยครั้งแรกเมื่อวันที่ 25 มีนาคม 2508 โดยพระจักรพรรดิอากิฮิโต เมื่อครั้งดำรงพระอิสริยยศมกุฎราชกุมารแห่งประเทศญี่ปุ่นทรงจัดส่งปลานิลจำนวน 50 ตัว ความยาวเฉลี่ยประมาณตัวละ 9 เซนติเมตร น้ำหนักประมาณ 14 กรัม มาทูลเกล้าฯ ถวายแด่พระบาทสมเด็จพระเจ้าอยู่หัวฯ ด้วยข้อดีของปลาชนิดนี้หลายประการเช่น เลี้ยงง่าย มีรสชาติดี ออกลูกดกและโตเร็ว พระบาทสมเด็จพระเจ้าอยู่หัวฯ จึงถวายพระราชทานชื่อปลาชนิดนี้ว่า “ปลานิล” และได้พระราชทานปลานิลขนาดยาว 3-5 เซนติเมต จำนวน 10,000 ตัว ให้แก่กรมประมงเมื่อวันที่ 17 มีนาคม 2509 เพื่อดำเนินการเพาะเลี้ยงขยายพันธุ์และส่งเสริมให้แก่เกษตรกรนำไปเพาะเลี้ยงและปล่อยสู่แหล่งน้ำธรรมชาติ ด้วยเหตุนี้ทำให้มีการแพร่กระจายของประชากรปลานิลทั่วทุกภูมิภาคของประเทศไทย (ทัศนีย์, 2524; มานพ และคณะ, 2536)

1.2 การเพาะเลี้ยงปลานิลและผลผลิตของปลานิล

ปลานิลเป็นปลาเศรษฐกิจของไทยที่ได้มีการเพาะเลี้ยงกันอย่างแพร่หลายในขณะนี้ เนื่องจาก ปลานิลเป็นปลาโตเร็ว เลี้ยงง่ายกินอาหารได้หลากหลาย ทนต่อการเปลี่ยนแปลงสภาพแวดล้อมได้ค่อนข้างดี จึงเป็นสายพันธุ์ที่นิยมเลี้ยงกันทั่วไปทั้งการเลี้ยงเพื่อบริโภคภายในครัวเรือนและเพื่อการค้า ทั้งนี้ความนิยมในการบริโภคปลานิลภายในประเทศเริ่มมากขึ้น ประกอบกับปลานิลเป็นปลาเนื้อขาวที่ตลาดต่างประเทศต้องการโดยการแปรรูปในลักษณะของ Fillet จึงทำให้การเพาะเลี้ยงปลานิลและธุรกิจที่เกี่ยวข้องมีการขยายตัวเพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็ว ส่งผลต่อการเปลี่ยนแปลงระบบการเลี้ยงปลานิลจากการเลี้ยงแบบดั้งเดิม (Extensive system) เพื่อไว้บริโภคภายในครัวเรือนเป็นระบบการเลี้ยงแบบหนาแน่นเชิงพาณิชย์ (Intensive system) เพื่อผลิตปลานิลให้เพียงพอกับความต้องการบริโภคทั้งในประเทศและเพื่อการส่งออก สำหรับปัจจุบันนี้ระบบการเลี้ยงปลานิลได้มีการแบ่งออกเป็น 3 ประเภท คือ

1.2.1 การเลี้ยงแบบดั้งเดิม (Extensive system) เป็นการเลี้ยงในบ่อดินที่อาศัยอาหารธรรมชาติเป็นหลัก เช่น แพลงค์ตอน สัตว์หน้าดิน และเศษซากอินทรีย์ ที่มีอยู่ในบ่อเลี้ยง ความ

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

หนาแน่นของปลาที่ปล่อยเลี้ยงค่อนข้างเบาบาง โดยปล่อยในอัตรา 1-2 ตัวต่อตารางเมตร ซึ่งจะได้ผลผลิตจากการเลี้ยงรูปแบบนี้ประมาณ 200-400 กิโลกรัมต่อไร่ต่อปี

1.2.2 การเลี้ยงแบบกึ่งหนาแน่น (Semi-intensive system) เป็นรูปแบบการเลี้ยงที่ทำกันอย่างแพร่หลายในปัจจุบัน โดยนิยมสำหรับการขุนลูกปลาให้เป็นปลาวัยรุ่นเพื่อนำไปเลี้ยงต่อเป็นปลาขนาดตลาด การเลี้ยงจะดำเนินการ โดยใช้บ่อดินที่มีขนาดมากกว่า 200 ตารางเมตร และความลึก 1 เมตรขึ้นไป อัตราการปล่อยปลาอยู่ที่ 3-10 ตัวต่อตารางเมตร อาหารที่ใช้เลี้ยงจะเป็นอาหารสมทบและอาหารที่มีอยู่ในบ่อตามธรรมชาติ หลังจากการเลี้ยงเป็นระยะเวลา 8 เดือนจะได้ผลผลิตประมาณ 1,000-1,500 กิโลกรัมต่อไร่

1.2.3 การเลี้ยงแบบหนาแน่นเชิงพาณิชย์ (Intensive system) เป็นการเลี้ยงที่อาศัยการให้อาหารและมีอัตราการปล่อยปลาที่ความหนาแน่นสูงประมาณ 30-100 ตัวต่อตารางเมตร การเลี้ยงแบบนี้ใช้ต้นทุนสูงส่วนใหญ่นิยมสำหรับการขุนปลาเพื่อให้ได้ขนาดตลาดโดยการเลี้ยงในบ่อดินหรือกระชัง สำหรับการเลี้ยงปลาระบบนี้ในปัจจุบันถือว่าการเลี้ยงในกระชังนั้นเป็นที่นิยมมาก เนื่องจากได้ปลาที่มีคุณภาพ ไม่มีกลิ่นโคลน (Off-flavor) และ ได้ผลผลิตสูงโดยพบว่าภายในระยะเวลาการเลี้ยง 4-5 เดือนจะได้ผลผลิตในอัตรา 20-30 กิโลกรัมต่อตารางเมตร ทั้งนี้การเลี้ยงในกระชังมีข้อจำกัดคือต้องใช้ต้นทุนในการเลี้ยงเริ่มต้นสูง เสี่ยงกับโรคระบาดที่มากับน้ำ และสามารถทำได้ในบางพื้นที่เท่านั้น เนื่องจากการเลี้ยงแบบนี้ต้องอาศัยน้ำมีการไหลเวียนและมีคุณภาพดี พื้นที่ที่เหมาะสมควรอยู่ตามแม่น้ำหรือลำคลองที่มีการไหลเวียนของน้ำตลอดเวลา และไม่อยู่ใกล้กับแหล่งโรงงานอุตสาหกรรม (มานพ และคณะ, 2536; อุดม, 2549)

การเปลี่ยนแปลงระบบการเลี้ยงปลานิลให้เป็นแบบหนาแน่นในปัจจุบันนั้นถึงแม้ว่าจะมีผลดีกับความเจริญก้าวหน้าในธุรกิจการเพาะเลี้ยงปลานิล แต่ผลเสียที่เกิดขึ้นจากการเลี้ยงแบบนี้ก็สามารถสร้างความเสียหายให้กับผู้ประกอบการได้ เนื่องจากการเลี้ยงปลานิลแบบหนาแน่นมีผลต่อการสะสมของสารอินทรีย์ในพื้นที่เลี้ยงสูง ทำให้เอื้อต่อการเจริญขึ้นของเชื้อโรคและทำให้คุณภาพน้ำเสื่อมลง นอกจากนี้ปลาเกิดความเครียดเนื่องจากสภาพแวดล้อมที่อยู่กันอย่างหนาแน่นและคุณภาพน้ำที่เปลี่ยนแปลงไป ผลจากการเปลี่ยนแปลงของสภาพแวดล้อมและสรีระของปลาเช่นนี้มีผลต่อการเกิดปัญหาเรื่องโรคตามมา โดยทั่วไปโรคที่เกิดกับปลานิลมาจากปรสิตและแบคทีเรียเป็นหลัก โดยปรสิตที่ก่อโรคในปลาได้แก่ *Ichthyophtirias multifilis*, Monogene (*Gyrodactylus* sp. และ *Dactylogyrus* sp.), *Argulus* sp. และ *Lernaea* sp. ส่วนเชื้อแบคทีเรียซึ่งเป็น

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ตัวการสำคัญที่ทำให้เกิดโรคระบาดในปลานิลได้แก่ *Aeromonas hydrophila*, *Streptococcus agalactiae* และ *Flexibacter columnaris* (ชาญณรงค์, 2550; Areechon *et al.*, 2005) ทั้งนี้เพื่อป้องกันปัญหาเกี่ยวกับการระบาดของโรคเหล่านี้ควรเริ่มจากการจัดการบ่อให้อยู่ในสภาพที่เหมาะสม ไม่ให้เกิดการเปลี่ยนแปลงของสภาพแวดล้อมที่ปลาอยู่มากเกินไป และไม่ให้ปลาเกิดความเครียดซึ่งเป็นสาเหตุหลักที่ทำให้สุขภาพของปลาเสื่อมลง

1.3 การขนส่งปลานิล

ระบบการขนส่งลูกปลาวัยอ่อนในปัจจุบันก็มีหลายวิธีขึ้นอยู่กับขนาดของลูกปลา จำนวนลูกปลา ระยะทาง เวลาที่ใช้ในการเดินทางและค่าใช้จ่ายในการขนส่ง นอกจากนี้ช่วงเวลาที่ต้องการปล่อยลูกปลาและความสะดวกของฟาร์มก็เป็นอีกปัจจัยที่ใช้ในการพิจารณาเพื่อการขนส่งปลานิล ในปัจจุบันปลานิลที่นิยมในการขนส่งมักเป็นลูกปลานิลขนาดเล็กน้ำหนักไม่เกิน 0.3 กรัม ความยาวประมาณ 2.5 เซนติเมตร และนิยมขนส่งด้วยถุงพลาสติกบรรจุออกซิเจนเพราะสะดวก อยู่ได้หลายชั่วโมง เช็คจำนวนได้ง่าย และสามารถปรับเปลี่ยนรูปแบบของการขนส่งได้ โดยขนาดของการบรรจุปลาอยู่ที่ 1,000 ตัวต่อถุงที่มีปริมาตรน้ำ 3 ลิตรและอัดก๊าซออกซิเจนให้ได้ปริมาตร 75% ของปริมาตรถุงบรรจุ การขนส่งลูกปลานิลในประเทศไทยนิยมใช้รถปิคอัพหลังคาสูงตอนเดียวซึ่งสามารถขนส่งได้ถึง 250,000-300,000 ตัว การขนส่งทางรถยนต์ในประเทศจะมีค่าใช้จ่ายประมาณ 3-5 สตางค์ต่อตัว นอกจากนี้ยังสามารถการขนส่งลูกปลาทางอากาศได้โดยนำถุงปลาใส่กล่องโฟมแล้วส่งต่อด้วยเครื่องบิน วิธีการนี้จะขนส่งปลาได้เร็วและในระยะทางที่ไกลกว่าแต่มีค่าใช้จ่ายค่อนข้างสูง ไม่เหมาะกับการขนส่งปลาที่มีขนาดใหญ่และจำนวนมาก (ภูมิไทยฟาร์ม, 2551)

การขนส่งปลานิลแบบถังจ่ายออกซิเจนเป็นอีกรูปแบบหนึ่งที่มีข้อดีกว่าการขนส่งแบบบรรจุถุง คือสามารถบรรจุลูกปลาที่ขนส่งได้มากกว่าถึง 2 เท่า การขนส่งลักษณะนี้จะใช้ถังไฟเบอร์ขนาด 1.2 ตัน ขนลูกปลาได้ประมาณ 500,000 ตัว ใช้พื้นที่การขนส่งน้อย และควบคุมอุณหภูมิได้ง่าย มีระยะเวลาการขนส่งได้นาน 30-35 ชั่วโมง ใช้เวลาในการปล่อยปลาน้อยและปรับอุณหภูมิก่อนปล่อยลูกปลาลงบ่อได้ง่ายและเร็ว แต่มีข้อเสียในเรื่องของจำนวนปลาที่ไม่แน่นอน และอาจเกิดการตายของปลาและการได้รับบาดเจ็บระหว่างขนส่ง (ภูมิไทยฟาร์ม, 2551)

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

2. ปลาหางไหม้

2.1 ลักษณะทางอนุกรมวิธานและชีววิทยาของปลาหางไหม้

อันดับทางอนุกรมวิธานของปลาหางไหม้ (Ng and Kottelat, 2007)

Kingdom Animalia
Phylum Chordata
Subphylum Vertebrara
Superclass Gnathostomata
Class Actinopterygii
Order Cripriniformes
Family Cyprinidae
Genus *Balantiocheilos*
Species *Balantiocheilos melanopterus*

ปลาหางไหม้ (Bala Shark, Silver Shark) มีชื่อทางวิทยาศาสตร์ว่า *Balantiocheilos melanopterus* อยู่ในวงศ์ปลาตะเพียน (Cyprinidae) วงศ์ย่อย Cyprininae - Systomini มีรูปร่างเพรียวยาว ตาโต ใต้คางมีแผ่นหนังเป็นถุงเปิดออกด้านท้าย ลำตัวแบนข้างเล็กน้อย เกล็ดมีขนาดเล็ก ครีบหางเว้าเป็นแฉกลึก สีของลำตัวเป็นสีเงินแวววาว ครีบมีสีเหลืองอ่อน ขอบครีบทุกครีบมีสีดำยกเว้นครีบอก ปากเป็นแบบยืดหดได้มีขนาดเล็ก ริมฝีปากบนยื่นยาวกว่าริมฝีปากล่าง ปลาชนิดนี้มีอุปนิสัยที่รักสงบ ชอบว่ายน้ำอยู่รวมกันเป็นฝูง ตื่นตกใจง่าย มีขนาดโตเต็มที่ไม่เกิน 35 เซนติเมตร แม่ปลาขนาด 155 กรัม เมื่อผสมพันธุ์แล้วจะวางไข่ครั้งละประมาณ 6,000-7,000 ฟอง ลูกปลาฟักออกเป็นตัวใช้เวลาประมาณ 12 ชั่วโมง การแยกเพศพิจารณาจากลักษณะลำตัว ซึ่งปลาตัวเมียลำตัวจะกว้างกว่าตัวผู้ และในช่วงวางไข่ท้องจะอูมกว่า อาหารของปลาชนิดนี้ได้แก่ ลูกน้ำ หนอนแดง ตัวอ่อนแมลง และอาหารเม็ดสำเร็จรูป สภาพน้ำที่เหมาะสมควรมีค่า pH 6-8 และอุณหภูมิ 22-28 องศาเซลเซียส (สุรศักดิ์, 2542; Rainboth, 1996; Kottelat, 2001)

ปลาชนิดนี้นิยมว่ายน้ำรวมกันเป็นฝูง หากินตามใต้พื้นน้ำ ในอดีตพบชุกชุมในเขตที่ราบลุ่มแม่น้ำเจ้าพระยา ในประเทศไทย ในต่างประเทศพบได้ที่เกาะบอร์เนียว ประเทศอินโดนีเซีย

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

(ปลาที่พบในอินโดนีเซียสีของครีบหางจะออกเหลืองสดกว่า) แต่ในปัจจุบันได้สูญพันธุ์ไปแล้วจากธรรมชาติของประเทศไทย ซึ่งในอินโดนีเซียก็ใกล้จะสูญพันธุ์เช่นกัน (Kottelat, 2001)

การจัดอนุกรมวิธานปลาหางไหม้ได้แยกเป็น 2 ชนิด สำหรับปลาในอินโดนีเซีย ให้ใช้ชื่อวิทยาศาสตร์ว่า *Balantiocheilos melanopterus* ซึ่งเป็นชื่อเดิมที่เคยใช้ร่วมกับปลาหางไหม้ไทยชนิด *B. ambusticauda* โดยข้อแตกต่างระหว่างปลาสองชนิดคือ ปลาหางไหม้ชนิด *B. melanopterus* จะมีปลายปากแหลมยาวกว่า สีของครีบหางและครีบก้นจะออกเหลืองอมขาว ต่างกับปลาหางไหม้ไทยชนิด *B. ambusticauda* ที่มีครีบสีส้มแดง และขอบแถบดำก็มีขนาดใหญ่กว่า ซึ่งปลาหางไหม้ชนิดนี้เป็นชนิดที่นิยมเลี้ยงกันเป็นปลาตู้สวยงามทั่วไป (Ng and Kottelat, 2007)

2.2 การเพาะเลี้ยงและผลผลิตปลาหางไหม้

ปลาหางไหม้จัดเป็นปลาในกลุ่มเดียวกับปลาตะเพียนที่นิยมนำมาเลี้ยงเป็นปลาตู้ เนื่องจากมีเกล็ดสีเงินแววววาวเมื่อกระทบแสง การเลี้ยงปลาชนิดนี้มักเลี้ยงเป็นฝูงตั้งแต่ 10 ตัวขึ้นไป เนื่องจากปลามีนิสัยชอบว่ายรวมกันน้ำเป็นฝูง ในสมัยก่อนปลาหางไหม้ที่นำมาจำหน่ายเป็นปลาตู้มักได้มาจากการรวบรวมจากแหล่งน้ำธรรมชาติ แต่ปัจจุบันปลาในธรรมชาติลดลงจนบางพื้นที่สูญพันธุ์ไปแล้ว เกษตรผู้เพาะเลี้ยงปลาสวยงามจึงได้เพาะพันธุ์ปลาชนิดนี้โดยการผสมเทียมเหมือนกับการเพาะปลาตะเพียน ทำให้สามารถเพาะปลาชนิดนี้ได้ตลอดทั้งปีและส่งขายยังตลาดปลาสวยงามได้อย่างต่อเนื่อง ซึ่งปัจจุบันปลาที่พบขายอยู่ในตลาดปลาสวยงามล้วนแล้วแต่เป็นปลาที่ได้จากการเพาะเลี้ยงทั้งสิ้น (ทวีศักดิ์, 2551)

ปลาหางไหม้ติดอันดับ 1 ใน 5 ของปลาสวยงามส่งออกโดยมีตลาดส่งออกหลักอยู่ในโซนทวีปอเมริกา และตลาดปลาสวยงามในประเทศสิงคโปร์ โดยราคาขายส่งปลาหางไหม้ไปยังตลาดต่างประเทศเฉลี่ยตัวละ 5 บาท ปลาที่จำหน่ายจะมีขนาดลำตัว 2.5-3 นิ้วหรือเลี้ยงมาประมาณ 5-6 เดือน (ทวีศักดิ์, 2551)

2.3 การขนส่งปลาหางไหม้

ปลาหางไหม้เป็นปลาสวยงามที่มีมูลค่าต่ำและเป็นที่ต้องการของตลาดทั้งในและต่างประเทศ โดยการขนส่งปลาชนิดนี้มีปัจจัยที่ควรพิจารณาเพื่อเลือกวิธีการขนส่งเช่นเดียวกับปลา

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

นิลแต่ต่างกันที่การขนส่งปลาสวยงามมักเป็นการส่งออกต่างประเทศซึ่งต้องใช้ระยะเวลาในการขนส่งที่นานกว่า การบรรจุปลาลงภาชนะก็ควรพิจารณาให้มีความเหมาะสมโดยให้ปลาที่ไปถึงปลายทางอยู่ในสภาพดีและมีอัตรารอดมากที่สุดโดยอัตราการตายของปลาหลังขนส่งไม่ควรเกิน 5% (Lim *et al*., 2003) แต่สำหรับปลาสวยงามมูลค่าต่ำอย่างปลาหางไหม้นี้มักมีปัญหาเรื่องค่าขนส่งเนื่องจากมูลค่าของการขนส่งมากกว่ามูลค่าของปลา ดังนั้นเพื่อเป็นการแก้ปัญหานี้ผู้ประกอบการจึงได้บรรจุปลาลงในภาชนะบรรจุอย่างหนาแน่นเพื่อลดค่าใช้จ่ายในส่วนของการขนส่งลง แต่มักมีปัญหาเกี่ยวกับการตายของปลาระหว่างขนส่งและการเสื่อมลงของสุขภาพปลาหลังขนส่งทำให้มีปัญหาการเกิดเชื้อโรคตามมา ผู้ประกอบการจึงนิยมใส่ยาปฏิชีวนะ และสารเคมีบางอย่างลงในน้ำที่ใช้ขนส่งเพื่อควบคุมการเปลี่ยนแปลงของคุณภาพน้ำ รักษาสมดุลและลดกิจกรรมของปลาระหว่างขนส่ง ปกติแล้วปลาชนิดนี้มีการบรรจุลงถุงโดยใช้ความหนาแน่นประมาณ 50 ตัว ต่อปริมาตรน้ำ 3 ลิตร ระยะเวลาที่ใช้ในการขนส่งอยู่ที่ 24-48 ชั่วโมง โดยปลาที่ใช้มีขนาดประมาณ 2.5 นิ้ว แต่ถ้าปลามีขนาดใหญ่กว่านี้จำนวนที่บรรจุก็จะลดลงตามความเหมาะสม (ทวีศักดิ์, 2551)

3. **การเกิดความเครียดในสัตว์น้ำ** (Stress in aquatic animal)

3.1 ความเครียด (stress)

ความเครียดเป็นการตอบสนองทางสรีรวิทยาที่สัตว์พยายามรักษาสมดุลการทำงานของร่างกายให้เป็นปกติมากที่สุดเมื่อเผชิญกับปัจจัยต่าง ๆ ที่กระตุ้นให้เกิดความเครียดทั้งปัจจัยทางกายภาพและเคมี โดยปัจจัยที่ก่อให้เกิดความเครียด (stressor) นั้นหมายถึงสิ่งที่กระตุ้นให้เกิดการตอบสนองทางสรีรวิทยาในรูปแบบของการทดแทนสิ่งที่สูญเสียไปเพื่อให้เกิดภาวะสมดุล (Wedemeyer *et al*., 1990; Pickering, 1981) โดยการเกิดความเครียดนี้สามารถแยกตามสภาวะได้เป็น 3 ระดับ คือ

3.1.1 ระยะตกใจกลัวหรือระยะสัญญาณอันตราย (alarm stage)

เมื่อสัตว์ได้รับปัจจัย ที่ก่อให้เกิดความเครียด ระยะแรกสัตว์จะตื่นตกใจก่อน ซึ่งจะกระตุ้นให้ adrenal gland หลั่งฮอร์โมน epinephrine สู่กระแสโลหิต และเพิ่มกิจกรรมแบบ sympathetic ในระบบประสาทอัตโนมัติ (autonomic nervous system) ผลร่วมกันของฮอร์โมนและ

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ระบบประสาทจะก่อให้เกิดการเปลี่ยนแปลงทางสรีรวิทยาและปฏิกริยาชีวเคมี เช่น ทำให้ระดับน้ำตาลกลูโคสในเลือดสูงขึ้น เพิ่มการขยายในม่านตา หัวใจบีบตัวแรงและถี่ เป็นต้น ผลการตอบสนองเช่นนี้ จะส่งผลให้สัตว์มีการเตรียมพร้อมที่จะป้องกันอันตรายจากสิ่งที่เข้ามาทำร้าย (Wedemeyer, 1996)

3.1.2 ระยะขัดขืนหรือระยะต้านทาน (resistance stage)

เป็นระยะที่สัตว์อยู่ในสภาพ general adaptation syndrome เกิดขึ้นหลังจากผ่านระยะแรกมา และยังคงมีปัจจัยที่ก่อให้เกิดความเครียดอยู่ การตอบสนองของระยะนี้พบว่าในขณะที่กิจกรรมของระบบประสาทอัตโนมัติและการหลั่งฮอร์โมน epinephrine จากส่วน adrenal medulla กำลังลดลงอยู่นั้นเซลล์ของ adrenal cortex จะหลั่ง corticosteroids สู่กระแสโลหิตเป็นจำนวนมาก เหตุที่เป็นเช่นนี้ เพราะปัจจัยที่ก่อให้เกิดความเครียด ไปมีผลกระตุ้นประสาทส่วน hypothalamus ให้หลั่ง corticotrophic releasing hormone ไปกระตุ้นต่อมใต้สมองส่วน adrenohypophysis ให้หลั่ง adrenocorticotrophic hormone (ACTH) ซึ่งจะไปกระตุ้น cortical cell ของ adrenal gland ให้หลั่งฮอร์โมน corticosteroids อีกทีหนึ่ง ฮอร์โมน corticosteroids มีส่วนช่วยในการบวนการเมทาบอลิซึมของคาร์โบไฮเดรต ไขมัน และ โปรตีน และทำให้เกิดการสลายตัวของ glycogen ที่ตับ ส่งผลต่อการเพิ่มขึ้นของระดับน้ำตาลในเลือด (hyperglycemia) ทำให้ปฏิกิริยาที่เกี่ยวข้องกับการอักเสบ (inflammatory reaction) และการแข็งตัวของเลือดลดลง ถ้ามีปริมาณฮอร์โมน corticosteroids สูงมากก็อาจทำให้สัตว์ติดเชื้อโรคได้ง่าย เพราะฮอร์โมนมีนี้ผลต่อการลดลงของจำนวนเม็ดเลือดขาวชนิด lymphocyte ในเลือดทำให้มีการสร้าง antibody ลดลง สัตว์จึงมีภูมิคุ้มกันต่ำ และถ้าสัตว์มีแผลอยู่แล้วแผลจะหายช้าเนื่องจากฮอร์โมนมีผลต่อการห้ามเม็ดเลือดขาวไม่ให้ไปสู่บริเวณเนื้อเยื่อที่เกิดแผล นอกจากนี้ปฏิกริยาที่เกิดขึ้นอาจมีผลต่อการตกเลือดที่ไทมัส และการบวมที่เซลล์ไตได้ (Wedemeyer, 1996)

3.1.3 ระยะหมดแรง หรือระยะทรุดโทรม (exhaustion stage)

ระยะนี้เกิดขึ้นภายหลังจากการได้รับปัจจัยที่ก่อให้เกิดความเครียดเป็นเวลานาน ระยะนี้เซลล์และโครงสร้างของ adrenal cortex และ cortical cell จะเสื่อมลงและหยุดการสร้างฮอร์โมน corticosteroids ถ้าเกิดถึงสภาวะนี้ การตายของสัตว์จะตามมาอย่างรวดเร็ว (Wedemeyer, 1996)

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

3.2 ความเครียดในปลา (stress in fish)

การเกิดความเครียดในปลาเป็นกลไกที่ปลาพยายามปรับตัวเพื่อรักษาภาวะสมดุลของร่างกาย (homeostasis) เมื่อได้รับการกระตุ้นจากปัจจัยที่เหนี่ยวนำให้เกิดความเครียด ซึ่งการแทรกแซงภาวะสมดุลที่เกิดขึ้นนั้นปลาสามารถปรับตัวได้โดยอาศัยการตอบสนองต่าง ๆ ที่ประกอบกันเพื่อให้เกิดภาวะปกติภายในร่างกาย (Chrousos, 1998) ทั้งนี้หากปลาได้รับความเครียดที่รุนแรงและยาวนานอาจส่งผลต่อกลไกการตอบสนองทางด้านสรีรวิทยาที่มากเกินไปจนเป็นอันตรายต่อสุขภาพของปลา ซึ่งนำไปสู่การเกิดโรคและการตายในภายหลัง (Seyle, 1973, 1974; Barton and Iwama, 1991) สำหรับการตอบสนองต่อความเครียดในปลาสามารถจัดเป็นกลุ่มกว้าง ๆ ได้ 3 ขั้นตอน (Barton, 2002) ดังนี้

3.2.1 การตอบสนองขั้นต้น (primary response) เป็นการตอบสนองเริ่มต้นที่เกี่ยวข้องกับ neuroendocrine รวมทั้งการหลั่ง catecholamines จาก chromaffin tissue (Randall and Perry, 1992; Reid *et al.*, 1998) และการกระตุ้นของ hypothalamic-pituitary-interrenal (HPI) axis ให้มีการหลั่ง corticosteroid hormone เข้าสู่ระบบเลือด (Donaldson, 1981; Wendelaar Bonga, 1997; Mommsen *et al.*, 1999) ทั้งนี้ในส่วนของ catecholamines นั้นเป็นสารสื่อประสาทที่มีอยู่ 3 ชนิด หลักๆ คือ dopamine ซึ่งทำให้อัตราการเต้นของหัวใจและความดันเลือดเพิ่มขึ้น ต่อมาคือ epinephrine ซึ่งทำให้อัตราการเต้นของหัวใจเพิ่มขึ้น และมีการเปิดของท่อเลือดส่งผลให้ความดันของเลือดลดลง และสุดท้ายคือ norepinephrine ทำให้ท่อเลือดปิดซึ่งส่งผลต่อความดันของเลือดเพิ่มสูงขึ้น (Glaser *et al*., 1992)

3.2.2 การตอบสนองขั้นที่สอง (secondary response) ประกอบด้วยการเปลี่ยนแปลงของไอออนในน้ำเลือดและเนื้อเยื่อ การเปลี่ยนแปลงระดับของ metabolism ลักษณะโครงสร้างของเม็ดเลือด และ heatshock proteins (HSPs) ซึ่งทั้งหมดนี้เกี่ยวของกับกลไกการปรับตัวทางสรีรวิทยา ได้แก่ กระบวนการเผาผลาญภายในร่างกาย (metabolism) การหายใจ สภาพความเป็นกรดเป็นด่าง สมดุลแร่ธาตุในเลือด การทำงานของระบบภูมิคุ้มกัน และการทำงานของเซลล์ต่างๆ (Pickering, 1981; Iwama *et al.*, 1987, 1998; Mommsen *et al.*, 1999)

3.2.3 การตอบสนองขั้นที่สาม (tertiary response) ซึ่งแสดงออกมาในรูปแบบของการเปลี่ยนแปลงสภาพร่างกายของปลา เช่น การเจริญเติบโตลดลง ความต้านทานโรคลดลง กลไกการ

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ทำงานของร่างกายเพื่อรับมือกับสภาวะต่าง ๆ ด้อยประสิทธิภาพลง ปลาจึงมีพฤติกรรมที่เปลี่ยนไป และความพยายามที่จะปรับตัวขั้นสุดท้ายเพื่อการอยู่รอด ถ้าไม่สามารถปรับตัวได้ก็จะเกิดการตายในที่สุด (Wedemeyer and McLeay, 1981; Wedemeyer *et al.*, 1990) ทั้งนี้ความเครียดที่เกิดขึ้นจะมีผลกระทบต่อปลามากหรือน้อยขึ้นอยู่กับระดับและระยะเวลาที่ได้รับความเครียด ผลกระทบที่เกิดขึ้นกับปลานั้นอาจเกี่ยวข้องกับกลไกการทำงานต่าง ๆ ที่เกี่ยวข้องทางด้านชีวเคมีและชีวโมเลกุล (Adams, 1990)

3.3 การเกิดความเครียดในการเพาะเลี้ยงและการขนส่งสัตว์น้ำ

โดยปกติแล้วการเกิดความเครียดกับสัตว์น้ำในกระบวนการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำนั้นสามารถเกิดขึ้นได้ตลอดเวลา เนื่องจากกระบวนการในการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำ เช่น การจับ การคัดแยกปลา การชั่งวัด การเคลื่อนย้ายปลา การรักษาโรค รวมทั้งการขนส่งปลา กิจกรรมเหล่านี้ล้วนแต่สามารถกระตุ้นให้เกิดความเครียดในปลาได้ทั้งสิ้น นอกจากนี้ความเครียดยังสามารถเกิดได้เมื่อปลาอยู่ในสภาพแวดล้อมที่ไม่เหมาะสม เช่น การเสื่อมของคุณภาพน้ำ และความหนาแน่นเกินไปของปลาในพื้นที่เลี้ยง รวมทั้งการที่ปลาติดเชื้อโรค เช่น ปรสิต แบคทีเรีย และไวรัส ก็เป็นที่มาของการเกิดความเครียดได้เช่นกัน แต่ทั้งนี้การติดเชื้อโรคดังกล่าวมักเกิดขึ้นหลังจากการที่ปลาได้รับความเครียดจากการกระทำต่าง ๆ และจากสภาพแวดล้อมที่ไม่เหมาะสม ทำให้ร่างกายของปลาอ่อนแอ เชื้อโรคต่าง ๆ จึงสามารถเข้าสู่ร่างกายของปลาได้ง่ายขึ้น (Harmon, 2009; Wedemeyer, 1996)

ในระบบการเลี้ยงแบบหนาแน่นนั้นจะมีผลทำให้ปลาเกิดความเครียดมากขึ้นเรื่อยๆ เนื่องจากการเลี้ยงในลักษณะนี้จะทำให้คุณภาพน้ำเสื่อมลงเร็ว ประกอบกับสภาพที่หนาแน่นในระบบเลี้ยงจึงทำให้ปลามีความเครียดเกิดขึ้นมากกว่าการเลี้ยงในแบบอื่น ซึ่งความเครียดที่เกิดขึ้นนั้นสามารถเกิดได้ทั้งแบบเฉียบพลันและเรื้อรัง (Wedemeyer, 1997)

สำหรับความเครียดที่เกิดจากการขนส่งนั้นมักเกิดจากการกระตุ้นโดยขั้นตอนของการจับและบรรจุปลาลงในภาชนะขนส่ง ทั้งนี้ในระหว่างการขนส่งความเครียดที่เกิดขึ้นมาจากการเสื่อมลงของคุณภาพเนื่องจากปลามีการหายใจและปล่อยของเสียออกมาทำให้ปริมาณก๊าซออกซิเจนในน้ำลดลง และแอมโมเนียซึ่งมีความเป็นพิษต่อปลาเพิ่มขึ้น จึงเป็นผลให้ปลาเกิดความเครียดได้ในระหว่างการขนส่ง (Harmon, 2009)

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

4. ระบบภูมิคุ้มกันในปลา (Fish immune system)

ตามลำดับวิวัฒนาการของสัตว์ ปลาเป็นสัตว์มีกระดูกสันหลังที่ต่ำที่สุดที่มีวิวัฒนาการของระบบภูมิคุ้มกันคล้ายกับสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนมโดยเฉพาะปลากระดูกแข็งจัดได้ว่าเป็นสัตว์ที่มีการพัฒนาของระบบภูมิคุ้มกันที่ดีกว่าปลากลุ่มอื่น ซึ่งระบบภูมิคุ้มกันในปลาสามารถแบ่งออกเป็น 2 ประเภท คือ (Zarkadis *et al*., 2001)

4.1 ระบบภูมิคุ้มกันที่มาแต่กำเนิด (Innate immunity)

การตอบสนองทางภูมิคุ้มกันแบบที่ได้มาแต่กำเนิดเป็นการตอบสนองที่ไม่จำเพาะเจาะจงต่อเชื้อโรคและไม่มีการจดจำ ซึ่งระบบภูมิคุ้มกันแบบนี้ถือได้ว่ามีความสำคัญอย่างมากต่อการมีชีวิตรอดของปลา เนื่องจากปลาเป็นเป็นสัตว์ที่อาศัยอยู่ในน้ำซึ่งเป็นแหล่งอาศัยและแพร่กระจายของเชื้อโรคต่าง ๆ สำหรับการตอบสนองทางภูมิคุ้มกันแบบนี้ องค์ประกอบทางกายภาพ เช่น ผิวหนังและเกล็ดถือได้ว่ามีหน้าที่เป็น ด่านแรกในการตอบสนองทางภูมิคุ้มกัน ทั้งนี้ยังมีการทำงานของกลุ่มเซลล์และสารน้ำบางชนิดที่มีส่วนช่วยในการตอบสนองทางภูมิคุ้มกันแบบนี้ด้วย (Bols *et al*., 2001; Jones, 2001) ซึ่งกลไกที่ทำหน้าที่ในการป้องกันเชื้อโรคหรือสิ่งแปลกปลอมเข้าสู่ร่างกาย ได้แก่

4.1.1 กลไกการป้องกันตัวโดยอาศัยโครงสร้างทางกายภาพ (Physical defenses)

กลไกการทำงานในส่วนนี้เป็นการป้องกันและกำจัดสิ่งแปลกปลอมออกจากร่างกายโดยวิธีการง่าย ๆ ซึ่งเกิดขึ้นเมื่อร่างกายได้รับสิ่งแปลกปลอม ซึ่งการทำงานของกลไกดังกล่าวนี้จะอาศัยอวัยวะต่างๆของร่างกาย ได้แก่

ก. ผิวหนัง (Skin) เป็นด่านแรกที่ใช้ป้องกันเชื้อโรคหรือสิ่งแปลกปลอมไม่ให้เข้าสู่ร่างกาย โดยทั่วไปผิวหนังแบ่งออกเป็น 4 ชั้น ได้แก่ Cuticle, Epidermis, Dermis และ Hypodermis โดยชั้น Cuticle จะอยู่นอกสุดมีลักษณะเป็นชั้นบาง ๆ มีเมือก (Mucus) ที่ถูกขับออกมาจากเซลล์ชนิด Mucus หรือ Goblet cell เป็นองค์ประกอบส่วนใหญ่ สำหรับปลาในกลุ่ม Catfish จะมีเซลล์ชนิดพิเศษที่เรียกว่า Alarm substance cell ในชั้น Epidermis ที่ทำหน้าที่สร้างสารเตือนภัย

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

(Alarm substance) ออกมาเมื่อมีศัตรูเข้ามาทำร้าย ในปลาบางชนิดจะมีผิวหนังที่ค่อนข้างหนา และแข็งแรงจึงยากต่อการเข้าทำลายของเชื้อโรค (Ellis, 2001)

ข. เมือก (Mucus) เป็นองค์ประกอบที่อยู่ชั้นนอกสุดของผิวหนังและสัมผัสกับสภาพแวดล้อมโดยตรง ด้วยคุณสมบัติที่ลื่นและเหนียวหนืดของเมือกจึงสามารถดักจับเชื้อโรคหรือสิ่งแปลกปลอมได้ดี ประกอบกับการขับเมือกออกมาตลอดเวลาของปลาทำให้เชื้อโรคที่ติดอยู่กับเมือกเหล่านี้หลุดออกมาด้วย เชื้อโรคจึงไม่สามารถเข้าสู่ตัวปลาได้ ทั้งนี้ในเมือกยังมีโปรตีนและเม็ดเลือดขาวที่สำคัญต่อการตอบสนองทางภูมิคุ้มกันบางชนิดเคลื่อนตัวไปมาระหว่างชั้นผิวหนังของปลาซึ่งเป็นการส่งเสริมการป้องกัน เชื้อโรคเข้าสู่ร่างกายได้ดีขึ้น (Ellis, 2001; Magnadottir, 2006)

ค. เกล็ด (Scales) เป็นสิ่งห่อหุ้มและปกคลุมร่างกายของปลา มีต้นกำเนิดอยู่ที่ผิวหนังชั้นใน (Dermis) เกล็ดจึงถือเป็นโครงสร้างพิเศษของปลาที่มีลักษณะแข็งใช้เพื่อป้องกันอันตรายต่าง ๆ ทั้งจากปัจจัยทางกายภาพและป้องกันการบุกรุกของเชื้อโรคหรือสิ่งแปลกปลอมชนิดต่าง ๆเข้าสู่ร่างกาย (Magnadottir, 2006)

4.1.2 กลการป้องกันตัวของเซลล์ (Cellular defenses)

กลไกการป้องกันตัวเองในระบบภูมิคุ้มกันแบบนี้เป็นส่วนสำคัญในการตอบสนองต่อเชื้อโรคหรือสิ่งแปลกปลอมที่ผ่านกลไกทางกายภาพเข้ามาได้ โดยอาศัยการทำงานของเซลล์ที่เรียกว่า Phagocytes ได้แก่ Macrophage, Dendritic cell และ Polymorphonuclei (PMN) ที่มีโครงสร้างคล้ายกับ Neutrophil cell ในสัตว์ชั้นสูง (Ellis, 2001) เซลล์เหล่านี้ทำหน้าที่ในการทำลายเชื้อโรคและสิ่งแปลกปลอม อย่างไม่จำเพาะเจาะจง โดยอาศัยกระบวนการ Phagocytosis ซึ่งเป็นขบวนการที่ทำให้เกิดการย่อยสลายของสิ่งแปลกปลอมกลายเป็นหน่วยย่อยเล็ก ๆ โดยอาศัยกลไกต่าง ๆ ภายในเซลล์ที่ทำงานร่วมกัน หลังจากเกิดการย่อยสลายแล้วเซลล์จะปล่อยส่วนที่ถูกทำลายของสิ่งแปลกปลอมออกมานอกเซลล์ ทั้งนี้ในสัตว์ชั้นสูงได้มีการศึกษาพบว่า เซลล์เหล่านี้มีการจดจำในการตอบสนองต่อสิ่งแปลกปลอม และทำหน้าที่ในการเตรียมแอนติเจนสำหรับเซลล์เม็ดเลือดขาวบางกลุ่มเพื่อสานต่อการทำงานในกระบวนการตอบสนองต่อสิ่งแปลกปลอมอย่างจำเพาะเจาะจง โดยเซลล์ในกลุ่มนี้มีชื่อว่า Antigen presenting cell

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

4.1.3 กลไกการป้องกันตัวผ่านสารน้ำ (Humoral defenses)

ปลากระดูกแข็งโดยทั่วไปมีการหลั่งสารโปรตีนที่สำคัญออกมาในระบบหมุนเวียนเลือด เช่นเดียวกับสัตว์ชั้นสูง เพื่อทำหน้าที่สำคัญในการทำลายเชื้อโรค หรือสิ่งแปลกปลอม โดยมีฤทธิ์ทำให้เกิดการแตกสลาย (Lysis) ของเชื้อโรคอย่างไม่จำเพาะเจาะจง สารโปรตีนดังกล่าวสามารถแบ่งได้เป็นกลุ่มใหญ่ ได้แก่ กลุ่มที่ทำให้เกิดปฏิกิริยา Agglutination และ Precipitation เช่น Lectin like, C-type lectin และ Pentraxines (C-reative protein; CRP) กลุ่มที่มีความสามารถในการย่อยผนังเซลล์ของแบคทีเรีย (Lytic enzymes) เช่น Lysozymes, Chitinases และ Cathepsins กลุ่มที่ทำหน้าที่ในกระบวนการยับยั้งการเจริญเติบโตของแบคทีเรีย หรือไวรัส (Growth inhibitors) เช่น Transferrin (Iron binding protein), Interferon (IFN) และ Mx protein เป็นต้น และกลุ่มที่เป็น Protease inhibitors ได้แก่ α-2 Macroglobulin ซึ่งมีหน้าที่ในการทำงานครอบคลุมอย่างกว้าง ๆ โดยรวมถึง Encapsulation ใน Protease ด้วย (Whyte, 2007) สำหรับโปรตีนอีกชนิดที่สำคัญได้แก่ Complements ซึ่งเป็นโปรตีนที่มีอยู่ในร่างกาย สามารถกำจัดสิ่งแปลกปลอมได้ อย่างไม่จำเพาะเจาะจงโดยการทำให้เกิดการสลายตัวของเซลล์ได้ และช่วยส่งเสริมกระบวนการ Phagocytosis รวมทั้งยังเกี่ยวข้องกับการอักเสบ (Inflammatory) ของร่างกาย (Zarkadis *et al*., 2001) Lysozymes ซึ่งเป็น Lytic enzymes ที่สำคัญชนิดหนึ่งในการตอบสนองทางภูมิคุ้มกันของสัตว์ทุกชนิด โปรตีนชนิดนี้สามารถย่อยสลายผนังเซลล์ของแบคทีเรียได้และสามารถกระตุ้น Complement system และPhagocytosis ได้ (Magnadottir, 2006) สำหรับ Agglutinin และ Precipitins นั้นเป็นเอนไซม์ที่ทำหน้าที่คล้ายกับ Lectin และ Pentraxins ซึ่งสามารถเกิดปฏิกริยาได้กับ คาร์โบไฮเดรตในการกระตุ้นการเกิด Opsonization, Phagocytosis และ Complement system (Arason, 1996) นอกจากนี้ยังมีสารอีกชนิดหนึ่งที่มีความสำคัญอย่างมากที่ถูกสร้างขึ้นในการกระตุ้นภูมิคุ้มกัน คือ Cytokines และ Chemokines ถือได้ว่าเป็นตัวที่ควบคุม และเป็นสัญญาณโมเลกุล (Signaling molecules) ในการทำงานร่วมกันระหว่างระบบภูมิคุ้มกันทั้งแบบ Innate immunity และ Acquired หรือ Adaptive immunity (Secombes *et al*., 1999)

4.2 ระบบภูมิคุ้มกันที่เกิดขึ้นภายหลังจากที่ได้รับการกระตุ้น (Acquired or Adaptive immunity)

การตอบสนองทางภูมิคุ้มกันประเภทนี้ถือเป็นการระบบที่มีการพัฒนาที่ดีที่สุด สามารถพบได้ตั้งแต่ปลากระดูกอ่อนจนถึงมนุษย์ แต่ยังไม่ปรากฏในสัตว์ที่ไม่มีกระดูกสันหลัง

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

(Invertebrate) (Du Pasquier, 2001) ระบบการตอบสนองแบบนี้เกิดขึ้นก็ต่อเมื่อมีการกระตุ้นด้วยสิ่งแปลกปลอม (Antigen) และการตอบสนองจะมีความรุนแรงและรวดเร็วกว่าการตอบสนองในครั้งแรกเมื่อเซลล์ของระบบภูมิคุ้มกันพบกับ Antigen ชนิดเดิมอีกครั้ง เนื่องจากเป็นระบบการตอบสนองต่อสิ่งแปลกปลอมที่มีความสามารถในการจดจำและมีความจำเพาะสูง การตอบสนองในระบบนี้อาศัยการทำงานร่วมกันของกลุ่มเซลล์เม็ดเลือดขาว และอาศัยโปรตีนที่ผิวเซลล์เป็นสื่อกลางในการสื่อสารเพื่อจดจำเชื้อโรคหรือสิ่งแปลกปลอมที่บุกรุกเข้ามาในร่างกาย (Miller and Clem, 1984; Abbas *et al*., 2000) ระบบการตอบสนองแบบนี้สามารถแบ่งเป็น 2 ส่วนได้แก่

4.2.1 การตอบสนองโดยผ่านสารน้ำ (Humoral immune response)

การตอบสนองทางภูมิคุ้มกันแบบนี้มีเซลล์เม็ดเลือดขาว (Leukocytes) หลายชนิดเข้ามาร่วมกันทำงานอย่างเป็นระบบ ซึ่งผลของการตอบสนองจะมีการสร้างโปรตีนที่สามารถทำหน้าที่ในการจดจำเชื้อโรคหรือสิ่งแปลกปลอมได้อย่างจำเพาะเจาะจงเรียกว่า Antibody หรือ Immunoglobulin (Ig) ซึ่งเป็น glycoprotein ที่มีโครงสร้างพื้นฐานประกอบด้วยสายโปรตีน 2 สาย ได้แก่ สายหนัก (heavy chain) ประกอบด้วยกรดอะมิโนประมาณ 440 ตัว และสายเบา (light chain) ซึ่งประกอบด้วยกรดอะมิโนประมาณ 220 ตัว โปรตีนสายหนัก 1 สายและสายเบา 2 สายจะยึดกันด้วยพันธะไดซัลไฟด์ระหว่างสาย (inter-chain disulfide bond) และพันธะไดซัลไฟด์ระหว่างสาย (intra-chain disulfide bond) ทำให้เกิดเป็นโครงสร้างลักษณะคล้ายตัวอักษร Y ซึ่งเป็นหน่วยพื้นฐานของ immunoglobulin ที่แขนทั้งสองข้าง ใช้สำหรับจับกับสิ่งแปลกปลอม หรือ antigen จึงเรียกว่า antigen biding site และส่วนของ antigen ที่จับกับ antibody เรียกว่า antigenic determinant หรือ epitope (ไพศาล, 2548) ในสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนมจะมี Ig อยู่ 5 ชนิด ได้แก่ IgM, IgD, IgG, IgA และ IgE แต่ในปลากระดูกแข็งมีการสร้าง Ig เพียงสองชนิดคือ IgM และ IgD (Warr, 1995) นอกจากนี้ในปัจจุบันยังมีรายงาน Ig ชนิดใหม่ที่พบในปลากระดูกแข็ง คือ IgT พบในปลา Rainbow trout (Hansen *et al*., 2005) และ IgZ ที่ได้จาก Zebra fish (Danilova *et al*., 2000)

ในการทำงานของระบบภูมิคุ้มกันโดยสารน้ำ (Humoral immune response) ต้องอาศัยการทำงานของกลุ่มเซลล์เม็ดเลือดขาวบางชนิด ได้แก่

ก. Antigen presenting cell (APC) ได้แก่ Monocytes (Macrophages กรณีอยู่ในเนื้อเยื่อ) และ Dendritic cells ซึ่งกลุ่มเซลล์เหล่านี้จะทำหน้าที่ในการดักจับเชื้อโรคหรือสิ่ง

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

แปลกปลอมที่เข้ามาสู่ร่างกายด้วยวิธี Phagocytosis (Secombes *et al*., 1999) และทำการย่อยสลายพร้อมทั้งตกแต่งโครงสร้างของ Antigen โดยจะเลือกเอาเฉพาะส่วนที่มีคุณสมบัติที่ดีต่อการกระตุ้นการทำงานของระบบภูมิคุ้มกันที่เรียกว่า Epitope หรือ Antigenic determinant โดยจะถูกนำไปแสดงไว้ที่ผิวเซลล์ และอาศัยโปรตีนที่ผิวเซลล์ (Surface protein) ซึ่งเรียกว่า Major histocompatibility complex (MHC) เพื่อเป็นสื่อกลางให้ T helper cells มาตรวจสอบและจดจำ Epitope ของสิ่งแปลกปลอม จากนั้น T helper cells จะหลั่งสารบางชนิดที่เรียกว่า cytokines ออกมาเพื่อกระตุ้นให้กลุ่มของ Antigen presenting cells ให้มีการแบ่งตัวอย่างรวดเร็วเพื่อการตอบสนองต่อสิ่งแปลกปลอมอย่างมีประสิทธิภาพ (Dixon and Stet, 2001)

ข. Lymphocyte ซึ่งในสัตว์มีกระดูกสันหลังชั้นสูงสามารถแยกออกเป็น 2 กลุ่มใหญ่ ๆ ที่มีการทำงานร่วมกันในการตอบสนองทางภูมิคุ้มกัน คือ B และ T lymphocyte (B or T cells) ในส่วนของ B lymphocytes (B cells) นั้นมีบทบาทสำคัญในการสร้างสารที่ทำหน้าที่ในการจดจำและทำลายสิ่งแปลกปลอมซึ่งเรียกว่า Antibody ซึ่ง B-cell 1 ชนิดจะสามารถสร้าง Antibody ที่จำเพาะต่อ Antigen หรือ Epitope เพียงชนิดเดียวเท่านั้น นอกจากนี้ B cell ยังมีหน้าที่เป็น antigen presenting cell เมื่อ B cell พบกับ Antigen ที่จำเพาะเจาะจงเป็นครั้งแรกจะมีพื้นที่ที่สามารถจับกับ Antigen อย่างจำเพาะบนผิว B cell ซึ่งก็คือ Antibody ชนิด IgM ที่อยู่ในรูปของ Membrane bound form มีหน้าที่เป็นตัวพา Antigen เข้าสู่เซลล์โดยอาศัยกระบวนการ Endocytosis (Abbas *et al*., 2000) หลังจากนั้น B cell จะมีการย่อยสลาย Antigen เพื่อให้อยู่ในรูป Epitope ที่พร้อมจะกระตุ้นภูมิคุ้มกัน โดยจะมี MHC class II เป็นตัวพา Epitope เหล่านี้ไปไว้ที่ผิวเซลล์ เมื่อ T helper cell ที่มีความจำเพาะต่อ Epitope มาจับและตรวจพบก็จะหลั่งสารสำคัญหลายชนิดออกมา เช่น Interleukin-2 เพื่อทำให้ B cell มีการแบ่งเซลล์เพื่อเพิ่มจำนวนอย่างรวดเร็ว (Proliferation) และมีการจำแนกตัวเอง (Differentiation) เพื่อกำหนดหน้าที่ในการสร้างชนิดของ Ig ที่จำเพาะและพัฒนาตัวเองไปเป็น Plasma B cell ที่สามารถสร้าง Antibody ที่อยู่ในรูป Secreted form ออกไปสู่ระบบหมุนเวียนเลือดเพื่อตอบสนองและจดจำต่อ Antigen ชนิดนั้น ๆ ในกระแสเลือดหรืออวัยวะอื่นที่มี Antigen ชนิดนั้นอยู่ (Kaiser *et al*., 2004) นอกจากนี้ยังพบว่ายังมี B cell บางส่วนที่มีการพัฒนาตัวเองไปเป็น Memory B cell เพื่อการจำและตอบสนองต่อ Antigen ตัวเดิมในครั้งต่อไป ซึ่งการตอบสนองทางภูมิคุ้มกันต่อ Antigen ในครั้งแรกเรียกว่า Primary immune response ผลของการตอบสนองจะมีการสร้าง Ig ออกมาในระดับที่ไม่มากนักและการตอบสนองที่เกิดขึ้นค่อนข้างช้าแต่พบว่ามีการสร้างเซลล์ที่มีความจำเพื่อรองรับการเข้ามาอีกครั้งของ Antigen ชนิดเดิม (Secondary immune response) สำหรับ T lymphocytes (T cells) นั้นได้ถูกแบ่งออกเป็น 3 ชนิด ได้แก่ Helper T cell, Cytotoxic T

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

cell และ Suppressor T cell แต่ชนิดที่เกี่ยวข้องกับการสร้าง Ig คือ Helper T cell เท่านั้น โดยจะทำหน้าที่ในการจดจำ Epitope ของ Antigen ที่แสดงโดย MHC class II บนผิวของ B cell และ Antigen presenting cells หลังจากตรวจพบ Epitope ที่จำเพาะแล้ว Helper T cells จะหลั่งสารจำพวก Cytokines ออกมา ซึ่งจะมีผลทำให้ B cell รวมทั้ง Antigen presenting cells ชนิดอื่นมีการพัฒนาและมีการแบ่งตัวอย่างรวดเร็ว เพื่อต้านการบุกรุกของเชื้อโรคและสิ่งแปลกปลอมดังกล่าว นอกจากนี้เซลล์เหล่านี้ยังมีการพัฒนาตัวไปเป็นเซลล์ที่มีความสามารถในการจดจำเชื้อโรคหรือสิ่งแปลกปลอมชนิดเดิม ทำให้การตอบสนองของระบบภูมิคุ้มกันในครั้งต่อไปเกิดขึ้นอย่างรวดเร็วและมีประสิทธิภาพอย่างจำเพาะเจาะจง นอกจากนั้นยังทำให้ Antigen presenting cells มีการหลั่งสารจำพวก Interleukin-1 ออกมา ซึ่งมีความสำคัญต่อการพัฒนาตัวการอยู่รอดของทั้ง B cell และ T cell (Klein and Horejsi, 1997)

4.2.2 การตอบสนองโดยผ่านเซลล์ (Cell-mediated immune response)

การตอบสนองประเภทนี้มีความสำคัญอย่างมากในกรณีที่มีการติดเชื้อภายในเซลล์โดยเฉพาะอย่างยิ่งการติดเชื้อที่มีสาเหตุมาจากไวรัส รวมทั้งการเกิดเซลล์เนื้องอกหรือเซลล์มะเร็ง โดยมี Cytotoxic T cell (T killer cell) เป็นเซลล์ที่ทำหน้าที่ในกระบวนการนี้อย่างจำเพาะเจาะจงและอาศัยโปรตีนบนผิวเซลล์ชนิด MHC class I ซึ่งสามารถพบได้ในเซลล์ที่มีนิวเคลียสทุกชนิด เป็นตัวช่วยหรือสื่อกลางในการจดจำ โดยทั่วไปเมื่อเซลล์ถูกบุกรุกด้วยไวรัส (Viral infection) แล้ว ภายใน Cytoplasm ของเซลล์จะมีการตัดและตกแต่งอนุภาคของไวรัส (Viral perticals) ให้อยู่ในรูปที่เป็น Epitope ที่เหมาะสมแล้วจะมี MHC class I มาจับอย่างจำเพาะเจาะจงเป็นรูป Complex แล้วจะนำ Epitope เหล่านี้ไปวางบนผิวเซลล์ เพื่อรอให้ Cytotoxic T cell ที่มี T cell receptor (TCR) ที่จำเพาะมาตรวจสอบ เมื่อได้รับการจดจำด้วย Cytotoxic T cell อย่างจำเพาะเจาะจงแล้ว Cytotoxic T cell จะหลั่งสารพิษออกมาเพื่อทำลายหรือฆ่าเซลล์ที่มี Epitope ของสิ่งแปลกปลอมหรือไวรัสนั้นอย่างจำเพาะเจาะจง ทำให้เซลล์ที่มีการบุกรุกของไวรัสนั้นตายและมีผลต่อเนื่องให้ไวรัสที่อาศัยอยู่ภายในเซลล์หรือสิ่งแปลกปลอมอื่น ๆ ไม่ว่าจะเป็นเซลล์เนื้องอกหรือเซลล์มะเร็งตายและไม่สามารถแพร่กระจายไปยังส่วนอื่น ๆ ของร่างกายได้ (Klein and Horejsi, 1997)

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

5. ผลของความเครียดต่อระบบต่อมไร้ท่อและระบบภูมิคุ้มกันในปลา

ความเครียดนั้นถือได้ว่าเป็นตัวการสำคัญที่ทำให้เกิดโรคและเกิดการตายของปลา เนื่องจากเมื่อปลาได้รับความเครียดจากปัจจัยที่กระตุ้นให้เกิดความเครียดต่าง ๆ แล้ว ปลาจะมีการปรับตัวเพื่อรักษาสภาพร่างกายให้เป็นปกติมากที่สุดโดยอาศัยการเปลี่ยนแปลงของกลไกต่าง ๆ ทางสรีรวิทยาเพื่อให้เกิดสมดุลร่างกายแต่ถ้าความเครียดนั้นรุนแรงเกินกว่าที่ปลาสามารถรับได้ก็อาจก่อให้เกิดการเสื่อมลงของสุขภาพเนื่องจากการเปลี่ยนแปลงทางสรีรวิทยามากเกินจุดสมดุลและการทำงานของระบบภูมิคุ้มกันที่เสื่อมลง ทั้งนี้ผลที่เกิดขึ้นอาจเกิดขึ้นอย่างเฉียบพลัน (Acute) ในลักษณะของการตายทันทีจากอาการช๊อค และมีการติดเชื้อโรคจากสภาพร่างกายที่อ่อนแอลงอย่างรวดเร็วแล้วตายในที่สุด หรืออาจเกิดขึ้นในลักษณะของอาการเรื้อรัง (Chronic) ซึ่งถ้าปลาปรับตัวได้ก็จะกลับมาเป็นปกติ (Barton, 2002) สำหรับการเปลี่ยนแปลงทางสรีรวิทยาของร่างกายที่สืบเนื่องมาจากการเกิดความเครียดที่สำคัญ ได้แก่

5.1 การตอบสนองต่อความเครียดของระบบต่อมไร้ท่อในปลา

การตอบสนองในส่วนนี้เกิดขึ้นเมื่อปลาสัมผัสกับปัจจัยที่ก่อให้เกิดความเครียด กลไกทางสรีรวิทยาที่เกี่ยวข้องกับการตอบสนองต่อความเครียดได้ถูกกระตุ้นโดยการส่งสัญญาณไปยังระบบประสาทส่วนกลาง (central nervous system: CNS) ซึ่งเส้นใยประสาทของระบบประสาทแบบ sympathetic ที่ปกคลุมในส่วนของ Chromaffin cells ได้กระตุ้นให้เกิดการหลั่ง catecholamine ผ่าน cholinergic receptors ทั้งนี้ Chromaffin tissues (adrenal medulla homologue) จะพบได้ทั่วไปในไตส่วนหน้าของปลากระดูกแข็ง (Reid *et al.*, 1998) สำหรับ catecholamine และ epinephrine ในปลากระดูกแข็งนั้นถูกเก็บไว้ใน chromaffin cells และจะหลั่งออกมาอย่างรวดเร็วเมื่อเกิดความเครียด (Mazeaud *et al.*, 1977; Randall and Perry, 1992; Reid *et al.*, 1998)

การหลั่งฮอร์โมน cortisol ของปลากระดูกแข็งจะสัมพันธ์กับการหลั่งของ catecholamine โดยเส้นทางของการหลั่ง cortisol เริ่มที่ hypothalamic pituitary interrenal axis (HPI axis) ด้วยการหลั่ง corticotropin-releasing hormone (CRH) จากสมองส่วน hypothalamus เพื่อกระตุ้น corticotropic cells ของ anterior pituitary ให้หลั่ง adrenocorticotrophin (ACTH) ออกมา ซึ่งสารนี้จะไหลเวียนไปกระตุ้น interrenal cells (adrenal cortex homologue) ที่อยู่ในไตเพื่อสังเคราะห์และหลั่ง corticosteroids สู่ระบบหมุนเวียนเลือดเพื่อไปยังเนื้อเยื่อเป้าหมายต่างๆ สำหรับ

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

interrenal tissue นี้จะอยู่ที่ไตส่วนหน้าของปลากระดูกแข็ง และมีลักษณะที่แตกต่างกันตามวิวัฒนาการของสัตว์ (Nandi, 1962) ในปลากระดูกอ่อน (elasmobranches) มี 1 α-hydroxycorticosterone เป็นฮอร์โมน coticosteroids ที่มีหน้าที่ในการตอบสนองต่อความเครียด (Idler and Truscott, 1967)

ทั้งนี้ในกระบวนการสังเคราะห์ฮอร์โมน cortisol (corticosteroids) นั้น เกิดขึ้นจากการทำงานของเอนไซม์ 17-α-hydroxylase ที่ไปเปลี่ยน progesterone และ pregnenolone ซึ่งมี cholesteral เป็นสารตั้งต้น ให้ไปอยู่ในรูปของ 17-α-hydroprogesterone จากนั้นจะถูกเปลี่ยนไปเป็นรูปของ deoxycortisol โดยอาศัยเอนไซม์ C-21 hydroxylase และ deoxycortisol จะเปลี่ยนไปเป็น cortisol โดยการทำงานของเอนไซม์ 11-β-hydroxylase (Lindzey and Korach, 1997) ซึ่งจากข้อมูลดังกล่าว Pardue and Thaxton (1984) ได้รายงานว่า วิตามินซี มีความสามารถในการยับยั้งกระบวนการสังเคราะห์และการหลั่ง cortisol hormone เข้าสู่กระแสเลือดได้ โดยวิตามินซี จะไปยับยั้งการการทำงานของเอนไซม์ 2 ชนิดในกระบวนการสังเคราะห์ฮอร์โมน cortisol ได้แก่ C-21 hydroxylase และ 11-β-hydroxylase (Hayono *et al*., 1956; Cooper and Rosenthal, 1962; Kitabchi, 1967)

จะเห็นได้ว่าฮอร์โมนที่เกี่ยวข้องกับการเกิดความเครียดที่สำคัญ ได้แก่ corticosteroids แต่จากการศึกษาพบว่ายังมีฮอร์โมนอื่น ๆ อีกที่มีการเพิ่มระดับขึ้นในกระแสเลือดเมื่อเกิดความเครียด ได้แก่ thyroxine (Brown *et al*., 1978), prolactin (Avella *et al*., 1991; Pottinger *et al*., 1992) และ somatolactin (Rand-Weaver *et al*., 1993; Kakizawa *et al*., 1995) นอกจากนี้ความเครียดยังสามารถกดการสร้างและหลั่งของฮอร์โมนอื่น ๆ ในกระแสเลือด เช่น reproductive hormones (Pickering *et al*., 1987; Pankhurst and Dedual, 1994; Haddy and Pankhurst, 1999) สำหรับการศึกษาที่เกี่ยวข้องกับการตอบสนองต่อความเครียดนั้น ฮอร์โมน cortisol ถือได้ว่าเป็นปัจจัยที่วัดการตอบสนองต่อความเครียดได้ดีในระดับหนึ่ง นอกจากนี้ catecholanine และ indoleamines สามารถใช้เป็นตัวชี้วัดที่บ่งบอกถึงการตอบสนองของ central brain monoamines เมื่อถูกกระตุ้นด้วยความเครียด (Winberg and Nilsson, 1993) และสามารถใช้ seratonin เป็นดัชนีบ่งบอกถึงการควบคุมการทำงานของ epinephrine และ cortisol ในระหว่างที่ปลาเกิดความเครียดได้ (Fritsche *et al*., 1993; Winberg and Nilsson, 1993; Winberg *et al*., 1997)

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

5.2 ผลของความเครียดต่อการตอบสนองทางภูมิคุ้มกันในปลา

เมื่อปลาเกิดความเครียดจากการกระตุ้นด้วยปัจจัยต่าง ๆ ปลาจะมีการเปลี่ยนแปลงทางสรีรวิทยาโดยการสร้างและหลั่งฮอร์โมน cortisol สู่กระแสเลือด ซึ่งระดับฮอร์โมน cortisol ในเลือดที่สูงขึ้นนี้จะมีผลกระทบต่อการทำงานของการตอบสนองทางภูมิคุ้มกัน เนื่องจากฮอร์โมน cortisol มีผลทำให้จำนวนเม็ดเลือดขาวชนิด Lympocyte ลดลง ลดกิจกรรมของ NK cell และกดการทำงานของ Neutrophil (Farrell *et al*., 1983) ฮอร์โมน cortisol ที่เพิ่มขึ้นนั้นสามารถยับยั้งการทำงานของ IgA แล IgM ในน้ำเลือด แต่ไม่สามารถยับยั้งการทำงานของ IgE ในคนได้ (Posey *et al*., 1978) และจะไปขัดขวางการเพิ่มจำนวนของ T cell โดยไปขัดขวางการหลั่ง Interleukin I และ Interleukin II ซึ่งเป็น T cell growth factor ทำให้ T cell ไม่สามารถเพิ่มจำนวนและคงอยู่ได้ (Palacios and Sugawara, 1982) การเกิดภาวะต่าง ๆ เหล่านี้ส่งผลให้การทำงานในระบบภูมิคุ้มกันของปลาด้อยประสิทธิภาพลง ปลาจึงมีสุขภาพที่อ่อนแอทำให้สามารถรับเชื้อโรคต่างๆ เข้าสู่ร่างกายได้ง่ายขึ้น

ทั้งนี้ Fast *et al*. (2008) ได้รายงานว่าความเครียดที่เกิดขึ้นกับปลาจะมีผลต่อการทำงานของเซลล์ในระบบภูมิคุ้มกันคือ Macrophage ซึ่งจะสร้าง IL-1β มากขึ้น รวมทั้งการทำงานเม็ดเลือดขาวและอัตรารอดของเม็ดเลือดขาวจะลดลงเมื่อถูกกระตุ้นด้วย extracellular antigen และ Perez-Casanova *et al*., (2008) ได้รายงานว่าเมื่อมีความเครียดเกิดขึ้น จะมีการตอบสนองโดยการแสดงออกของยีนทางภูมิคุ้มกันที่เม็ดเลือดขาวมากขึ้น ซึ่งยีนเหล่านั้น ได้แก่ Interleukin-1β, β_2-microglobulin , MHC class I และ IgM-Light chain

ความเครียดที่เกิดขึ้นในปลานั้นนอกจากจะมีผลต่อระบบต่อมไร้ท่อและระบบภูมิทางภูมิคุ้มกันแล้วยังมีผลต่อการเปลี่ยนแปลงทางสรีรวิทยาด้านอื่น เช่น การสูญเสียพลังงานซึ่งเก็บไว้ที่กล้ามเนื้อ และตับ (phosphocreatine, ATP และ glycogen) ทำให้มีการสูญเสียไอออนที่อยู่ในน้ำเลือด (Killen *et al*., 2003) และทำให้น้ำตาลในเลือดสูงขึ้นเนื่องจากฮอร์โมน cortisol ที่เพิ่มขึ้นจากการเกิดความเครียดจะต้านการทำงานของ Insulin มีส่วนให้เกิดภาวะ hyperglycemia โดยการกระตุ้นให้เกิดการสลายตัวของ glycogen ที่ตับ (glyconeogenesis) และยับยั้งการใช้ glucose ที่มีอยู่ในกระแสเลือด โดยลดการโยกย้ายตัวขนส่ง glucose เช่น Glucose transporter type 4 (GLUT4) ซึ่งทำหน้าที่ส่ง glucose ไปยัง cell membrane แต่ทั้งนี้ cortisol ยังสามารถทำให้เกิดการสังเคราะห์ glycogen ที่ตับได้ในกรณีของปฏิกิริยาผันกลับ (King, 2005; Piroli *et al*., 2007; Baynes and Dominiczak, 2009)

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

5.3 การศึกษาการตอบสนองต่อความเครียดในปลา

การศึกษาเกี่ยวกับการตอบสนองต่อความเครียดในปลาที่ผ่านมาได้นำปัจจัยต่าง ๆ ทั้งทางด้านสรีรวิทยาและการตอบสนองทางภูมิคุ้มกันมาเป็นตัวชี้วัดการเกิดความเครียดซึ่งปัจจัยต่างๆเหล่านี้จะแสดงผลของการตอบสนองออกมาไม่เหมือนกัน ทั้งนี้ขึ้นอยู่กับกลไกการทำงานและลำดับในการตอบสนองต่อความเครียดของปัจจัยแต่ละอย่าง สำหรับการศึกษาผลของการตอบสนองต่อความเครียดในปัจจุบันนี้ จะเน้นเกี่ยวกับความเครียดที่เกิดจากสิ่งแวดล้อม และการรบกวนทางกายภาพ ซึ่งผู้ทำการศึกษาได้นำปัจจัยชี้วัดต่าง ๆ มาประกอบกันเพื่ออธิบายถึงลักษณะของความเครียดที่เกิดขึ้น ได้แก่

การศึกษาผลของความเครียดต่ออัตรารอด อัตราการใช้ออกซิเจน ระดับของ plasma cortisol และ plasma glucose ในเลือด รวมทั้ง การแสดงออกของยีน heat-shock protein 70 (hsp70) ที่เหงือกของปลา Atlantic cod (*Gadus morhua*) ขนาด 10 และ 50 กรัม โดยการกระตุ้นให้ปลาเกิดความเครียดจากการเพิ่มอุณหภูมิให้สูงขึ้น 2 องศาเซลเซียส ทุก ๆ ชั่วโมง จนถึงอุณหภูมิสูงสุดที่ 22 องศาเซลเซียส ซึ่งปกติแล้วปลาชนิดนี้จะอยู่ได้ที่อุณหภูมิสูงสุด 16 องศาเซลเซียส จากการศึกษาพบว่าการเพิ่มอุณหภูมิอย่างเฉียบพลันนั้นดัชนีชี้วัดการตอบสนองต่อความเครียดที่เกิดขึ้นในปลาได้ดีที่สุดคือ อัตราการใช้ออกซิเจน และ ระดับของ plasma cortisol ในเลือด ส่วนระดับของ plasma glucose และการแสดงออกของยีน hsp 70 จะเป็นตัวชี้วัดที่มีความไวต่ำกว่า (Perez-Casanova *et al*., 2008)

การตอบสนองต่อความเครียดของปลาต่างชนิดกันแม้ว่าจะอยู่ในสิ่งแวดล้อมเดียวกันจะมีความแตกต่างกันของการตอบสนองต่อความเครียด เช่นในการทดลองผลการตอบสนองต่อความเครียดของปลา coral trout 2 ชนิดคือ (*Plectropomus leopardus* และ *Plectropomus maculatus*) พบว่าเมื่อนำมาทดลองโดยกระตุ้นให้เกิดความเครียดด้วยการจับ การแกว่งน้ำ และการลดความเค็ม แล้วนำมาตรวจวัดปัจจัยต่างๆที่เป็นผลมาจากการเกิดความเครียด เช่น ฮอร์โมน cortisol, glucose, lactate, hemoglobin และ hematocrit พบว่าข้อมูลที่ได้จากปลาทั้งสองชนิดมีความแตกต่างกันโดยสิ้นเชิง (Frisch and Anderson, 2005) ทั้งนี้การได้รับความเครียดซ้ำ ๆ กันอาจทำให้เกิดความเครียดสะสม (Carmichael *et al*., 1983; Flos *et al*., 1988; Maule *et al*., 1988) ซึ่ง Barton *et al*. (1986) ได้พบว่าเมื่อลูกปลา chinook salmom ได้รับความเครียดจากการจับ หลาย ๆ ครั้ง ระดับของฮอร์โมน cortisol จะสะสมเพิ่มขึ้นในขั้นตอนสุดท้ายของการกระตุ้นให้เกิดความเครียด

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

นอกจากการเพิ่มขึ้นของ cortisol แล้วระดับของ plasma glucose ยังเพิ่มขึ้นด้วย ซึ่งช่วงเวลาที่ปลาได้รับการรบกวนจากปัจจัยที่กระตุ้นให้เกิดความเครียด และความรุนแรงของการกระตุ้นให้เกิดความเครียดนั้นจะมีผลต่อลักษณะในการตอบสนองต่อความเครียดของปลา ถ้าการกระตุ้นให้เกิดความเครียดนั้นไม่รุนแรงมาก ปลาก็สามารถปรับเปลี่ยนกลไกทางสรีรวิทยาให้เกิดการทดแทนสิ่งที่เสียไปเพื่อให้ร่างกายกลับสู่สภาพสมดุล แต่ถ้าหากปลาได้รับความเครียดอย่างรุนแรงจนร่างกายไม่สามารถปรับตัวให้เป็นปกติได้ทำให้ร่างกายได้รับผลกระทบด้านลบต่าง ๆ จนอาจทำให้ปลาตายได้ (Schreck, 2000)

เมื่อจำลองให้ปลา gilthead seabream (*Sparus aurara* L.) อยู่ในสภาพที่หนาแน่นระยะสั้น เพื่อศึกษาผลของความความเครียดที่เกิดขึ้นต่อการตอบสนองทางภูมิคุ้มกัน พบว่าผลของความเครียดจะไปกดการทำงานของ complement activity และ phagocytic activity แต่การทำงานของระบบดังกล่าวจะเป็นปกติภายหลังการทดลองประมาณ 3 วัน และจากผลของความเครียดที่ทำให้การทำงานของ phagocytic activity ลดลงนั้นอาจเกิดจากการที่ active cell ที่อยู่ในเนื้อเยื่อย้ายไปอยู่ในส่วนของกระแสเลือดแทน ทำให้ค่าของ phagocytic activity ของเซลล์เม็ดเลือดขาวที่ไตส่วนหน้ามีค่าต่ำลง (Ortuno *et al*., 2001)

Ortuno *et al*. (2002a) ได้ศึกษาผลของความเครียดต่อการตอบสนองทางภูมิคุ้มกันของปลา Seabream (*Sparus aurata* L.) ที่ได้รับความเครียดจากการกระตุ้นโดยการรบกวนทางกายภาพ การให้ปลาอยู่ในสภาพที่หนาแน่น การใช้ 2-phenoxyethanol เป็นยาสลบ และการนำปลาขึ้นจากน้ำเป็นเวลา 0, 1, 2, 3 และ 4 วัน แล้วตรวจวัดการตอบสนองต่อความเครียดจากระดับ glucose และฮอร์โมน cortisol ในเลือด จากนั้นวัดการตอบสนองทางภูมิคุ้มกันแบบไม่จำเพาะของปลาจาก complement activity และ respiratory brust จากการทดลองพบว่าการกระตุ้นให้เกิดความเครียดโดยการรบกวนทางกายภาพ การให้อยู่ในสภาพที่หนาแน่น และการใช้ยาสลบ ทำให้ระดับ glucose และฮอร์โมน cortisol สูงขึ้นเป็นบางครั้ง ทั้งนี้การที่ปลาอยู่ในสภาพหนาแน่น และสลบจะมีผลต่อการลดบทบาทลงของ complement activity ขณะที่การให้ปลาขาดอากาศโดยการผึ่งแห้งจะทำให้การทำงานของ respiratory burst ลดลง และเมื่อกระตุ้นปลาให้เกิดความเครียดด้วยวิธีการต่าง ๆ ร่วมกันจะทำให้การทำงานของระบบภูมิคุ้มกันทั้งในส่วนของ humoral และ cellular immunity ลดลง แต่ระดับของฮอร์โมน cortisol และ glucose ในเลือดยังคงสูงขึ้น ทั้งนี้จากการทดลองผลของการใช้ยาสลบที่มีต่อการทำงานของระบบภูมิคุ้มกันในปลาชนิดเดียวกันนี้ โดยใช้ยาสลบ 4 ชนิด ได้แก่ สาร MS-222 (0.19 mM), benzocaine (0.21 mM), 2 phenoxyethanol (1.6 mM) และquinaldine

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

sulphate (0.083 mM) พบว่า benzocaine และ 2 phenoxyethanol จะกดการทำงานของ complement activity และ phagocytosis ขณะที่ MS-222 และ quinaldine sulphate ไม่มีผลต่อการทำงานของระบบภูมิคุ้มกันดังกล่าว (Ortuno *et al*., 2002b) และจากการใช้สาร 2 phenoxyethanol เป็นยาสลบเพื่อศึกษาผลที่มีต่อการทำงานของระบบบภูมิคุ้มกันแบบ innate immunity พบว่าด้วยคุณสมบัติการเป็นยาสลบของสารนี้จึงสามารถทำให้ปลาสลบได้ดี แต่ด้วยคุณสมบัติของตัวสารเองที่ทำให้เกิดความเครียดในปลาได้โดยตรงจึงไม่สามารถควบคุมการเกิดความเครียดได้เมื่อใช้กับปลาที่อยู่ในสภาพที่หนาแน่น (Ortuno *et al*., 2002c)

6. การขนส่งสัตว์น้ำ

การขนส่งสัตว์น้ำในปัจจุบันนับว่าเป็นกิจกรรมที่สำคัญในการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำ โดยการขนส่งที่เกิดขึ้นโดยเฉพาะการขนส่งสัตว์น้ำที่มีชีวิตได้แก่การขนส่งในรูปของไข่ปลา ลูกพันธุ์ปลา ปลาพ่อแม่พันธุ์และปลาสวยงาม ทั้งนี้อาจขนส่งในลักษณะของฟาร์มต่อฟาร์มหรือการส่งออกไปยังต่างประเทศซึ่งมักมีข้อจำกัดในเรื่องของปริมาณปลาที่ขนส่งและค่าขนส่งเนื่องจากเป็นการขนส่งผ่านทางเครื่องบิน

สำหรับระบบในการขนส่งปลานั้นได้มีการแบ่งออกเป็น 2 ระบบ ได้แก่ระบบปิดและระบบเปิด โดยที่ระบบปิดจะทำการขนส่งโดยใช้ถุงพลาสติกที่มีการเติมน้ำและก๊าซออกซิเจนบริสุทธิ์ลงไปในถุงที่บรรจุปลา ทั้งนี้อาจมีการเติมสารอื่นที่มีคุณสมบัติในการควบคุมการเปลี่ยนแปลงของคุณภาพน้ำและรักษาสมดุลของปลาระหว่างการขนส่งลงไป การขนส่งลักษณะนี้เหมาะกับการขนส่งสัตว์น้ำที่มีขนาดเล็ก เช่นลูกพันธุ์ปลาและ ปลาสวยงามที่ต้องการส่งออกต่างประเทศ ส่วนการขนส่งในระบบเปิดเป็นการขนส่งที่ใช้ถังขนาดใหญ่เป็นภาชนะในการบรรจุปลาและมีการให้อากาศผ่านเครื่องปั๊มอากาศ การขนส่งลักษณะนี้จะมีการเชื่อมต่อกันระหว่างสิ่งแวดล้อมภายในภาชนะขนส่งและสิ่งแวดล้อมภายนอก ซึ่งการขนส่งสามารถทำได้กับทั้งปลาขนาดเล็กและปลาขนาดใหญ่ แต่เหมาะกับการขนปลาขนาดใหญ่มากกว่า เช่นการขนปลาวัยรุ่นเพื่อไปเลี้ยงเป็นปลาขนาดกระชังในลักษณะของฟาร์มต่อฟาร์ม (Berka, 1986)

การขนส่งสัตว์น้ำมีชีวิตส่วนใหญ่นิยมขนส่งด้วยระบบปิดคือการบรรจุสัตว์น้ำลงในถุงพลาสติกที่มีปริมาตรน้ำน้อยและมีการอัดก๊าซออกซิเจนบริสุทธิ์ เนื่องจากวิธีนี้เป็นวิธีที่ง่ายและสะดวกในการขนส่งโดยเฉพาะสัตว์น้ำที่มีชีวิตขนาดเล็กเนื่องจากสัตว์น้ำขนาดเล็กจะเสี่ยงต่อการ

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ได้รับบาดเจ็บและตายมากกว่าเมื่อขนส่งในระบบเปิดที่ใช้ถังขนาดใหญ่ ปกติแล้วการขนส่งระบบปิดนั้นปลาจะถูกบรรจุลงในถุงพลาสติกที่มีปริมาตรน้ำประมาณ 3 ลิตร แล้วบรรจุลงในกล่องโฟมที่มีฉนวนกันความร้อนอีกทีในกรณีที่เป็นการส่งออกต่างประเทศ แต่ในกรณีการขนส่งภายในประเทศระยะใกล้ ๆ ไม่จำเป็นต้องบรรจุลงกล่องโฟม การขนส่งในลักษณะนี้ต้องคำนึงถึงคุณภาพน้ำในภาชนะบรรจุเป็นสำคัญ เพราะจะมีการเปลี่ยนแปลงของคุณภาพน้ำอยู่ตลอดเวลา เนื่องจากการปล่อยของเสียจากปลาที่บรรจุ ทั้งนี้จะมากหรือน้อยนั้นขึ้นอยู่กับขนาดและจำนวนปลาที่บรรจุ รวมทั้งระยะทางในการขนส่ง (Crosby *et al*, 2007; Cole *et al*., 1999)

การขนส่งสัตว์น้ำ เช่นลูกพันธุ์ปลาและปลาสวยงามที่มีคุณภาพไปยังตลาดเป้าหมายนับเป็นปัจจัยสำคัญของความสำเร็จในการประกอบธุรกิจเกี่ยวกับสัตว์น้ำ แต่ในการขนส่งนั้นคุณภาพน้ำและสภาพแวดล้อมเป็นสิ่งสำคัญที่ควรพิจารณาเนื่องจากอาจเกิดการเปลี่ยนแปลงอย่างมากระหว่างจุดส่งสินค้ากับจุดหมายปลายทาง ประกอบกับระยะเวลาที่ใช้ในการขนส่งที่อาจใช้ระยะเวลา 48-72 ชั่วโมง กรณีส่งออกต่างประเทศ ซึ่งสิ่งเหล่านี้มีผลกระทบต่อคุณภาพของปลาเมื่อถึงจุดหมายได้ ถึงแม้ว่าในระหว่างการลำเลียงขนส่ง ปลาจะถูกบรรจุลงในถุงพลาสติกพร้อมกับการบรรจุออกซิเจนบริสุทธิ์ลงไป อย่างไรก็ตามใน ระหว่างการขนส่งคุณสมบัติน้ำในถุงก็จะมีการเปลี่ยนแปลงอยู่ตลอดเวลา เนื่องจากการลดลงของค่าความเป็นกรดเป็นด่าง (pH) การเพิ่มขึ้นของแอมโมเนีย ซึ่งปริมาณแอมโมเนียที่เพิ่มนี้จะเป็นอันตรายต่อปลา หากมีปริมาณมากเกินไปอาจทำให้ปลาตายได้ ส่วนการบรรจุปลาลงในถุงที่ระดับความหนาแน่นมากเกินไป แม้ว่าจะช่วยลดต้นทุนในการขนส่งลงได้ แต่อาจเพิ่มความเสี่ยงต่อผลเสียที่อาจเกิดตามมาได้ดังนั้นจึงควรที่จะหาแนวทางในการปรับสภาวะที่ก่อให้เกิดความสมดุลในการขนส่งให้ได้ประโยชน์สูงสุดภายใต้เงื่อนไขที่ว่า มีความคุ้มทุนมากที่สุด และมีอันตรายกับปลาน้อยที่สุด (Crosby *et al*, 2007; Cole *et al*., 1999)

6.1 คุณภาพน้ำระหว่างการขนส่งสัตว์น้ำ

น้ำเป็นสิ่งสำคัญสำหรับการขนส่งปลามีชีวิต สำหรับการขนส่งที่มีการลดปริมาตรน้ำลงและมีจำนวนปลามากขึ้นมักเป็นผลให้เกิดการเสื่อมลงของคุณภาพน้ำอย่างรวดเร็ว และมีอัตราการตายของปลาสูงเนื่องจากมีการขับถ่ายของเสียออกมามากภายในระบบของการขนส่ง การเปลี่ยนแปลงของคุณภาพน้ำที่มีผลต่อการขนส่งสัตว์น้ำที่สำคัญ ได้แก่ การลดลงของออกซิเจนที่ละลายน้ำและการเพิ่มขึ้นของคาร์บอนไดออกไซด์ เนื่องจากการหายใจของปลา การลดต่ำลงของ pH เนื่องจากการสะสมของคาร์บอนไดออกไซด์ในน้ำเพิ่มขึ้น และการเพิ่มขึ้นของแอมโมเนีย

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

เนื่องจากการขับถ่ายของปลา (Paterson *et al*., 2003) คุณภาพน้ำระหว่างการขนส่งจึงเป็นสิ่งแรกที่ควรพิจารณาในการขนส่งสัตว์น้ำมีชีวิตเนื่องจากคุณภาพของน้ำที่อยู่ในภาชนะขนส่งมีผลโดยตรงต่ออัตรารอดของปลาหลังขนส่ง โดยคุณภาพน้ำที่ควรพิจารณา ได้แก่

6.1.1 อุณหภูมิ

อุณหภูมิของน้ำมีความสำคัญต่อปลามากเนื่องจากปลาเป็นสัตว์เลือดเย็นซึ่งมีการเปลี่ยนแปลงอัตราเมทาบอลิซึมของร่างกายตามการเปลี่ยนแปลงของ อุณหภูมิและสภาพแวดล้อม ซึ่งอัตราเมทาบอลิซึมของปลาจะสูงขึ้นเป็นสองเท่าเมื่ออุณหภูมิสูงขึ้นจากเดิม 18 องศาฟาเรนไฮต์ และลดต่ำลงครึ่งหนึ่งเมื่ออุณหภูมิลดลงจากเดิม 18 องศาฟาเรนไฮต์ การลดลงของอัตราเมทาบอลิซึมนั้นจะมีผลต่อการใช้ออกซิเจนและการขับถ่ายของเสีย เช่น คาร์บอนไดออกไซด์และแอมโมเนียที่ลดลง (Swann, 1993) ซึ่งลักษณะเช่นนี้เป็นประโยชน์ต่อการนำมาประยุกต์ใช้ในการขนส่งที่ต้องการให้ปลาใช้ออกซิเจนและขับถ่ายของเสียออกมาน้อย ทำให้ผลกระทบที่เกิดขึ้นกับปลาระหว่างการขนส่งลดลง (Jensen, 1990)

สำหรับการใช้อุณหภูมิในการขนส่งปลานั้นขึ้นอยู่กับชนิดของปลาว่าเป็นปลาที่อยู่ในเขตร้อนหรือเขตอบอุ่น สำหรับปลาที่อยู่ในเขตร้อน เช่น ปลานิล และปลา red drum อุณหภูมิที่แนะนำอยู่ที่ 55-60 องศาฟาเรนไฮต์ และสำหรับปลาที่อยู่ในเขตอบอุ่น เช่น ปลา trout และ ปลา salmon อุณหภูมิที่แนะนำอยู่ในช่วง 45-50 องศาฟาเรนไฮต์ (Swann, 1993) สำหรับการขนส่งโดยการลดอุณหภูมิของน้ำลงนั้นปกติแล้วการขนส่งมักจะใช้เวลาประมาณ 2 วัน ซึ่งการลดอุณหภูมิของน้ำทำได้โดยใช้น้ำแข็งหรือ คูลแพ็ค (cool packs) ค่อย ๆ ใส่ลงในถุงที่มีปลาอยู่จนได้อุณหภูมิของน้ำที่ต้องการโดยไม่ทำให้ปลาเครียด ซึ่งน้ำแข็งและคูลแพ็คนี้นิยมใช้ในการลดอุณหภูมิของน้ำเพื่อการขนส่งโดยเฉพาะการขนส่งระยะใกล โดยน้ำแข็ง 1.5 ปอนด์สามารถลดอุณหภูมิของน้ำ 1 แกลลอนได้ 10 องศาฟาเรนไฮต์ ซึ่งการขนส่งโดยใช้น้ำแข็งเพื่อลดอุณหภูมินี้อาจบรรจุถุงปลาลงในกล่องโฟมที่มีฉนวนหุ้มอีกทีเพื่อป้องกันการเปลี่ยนแปลงอุณหภูมิจากภายนอก (Swann, 1993)

Froese (1998) ให้ข้อมูลว่าปลาในมีเขตร้อนอุณหภูมิที่เหมาะสมสำหรับการขนส่งสัตว์น้ำอยู่ที่ 22-30 องศาเซลเซียส ถ้าต่ำกว่า 15-18 องศาเซลเซียส จะมีผลทำให้ปลาตายได้ ซึ่งสำหรับการใช้กล่องโฟมสี่เหลี่ยมที่มีฉนวนหุ้มสามารถป้องการการเปลี่ยนแปลงอุณหภูมิที่เกิดจากความแตกต่างของอุณหภูมิภายนอกและภายในภาชนะขนส่งได้

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

Pavlidis *et al*. (2003) รายงานว่าการเปลี่ยนแปลงอุณหภูมิของน้ำนั้นทำให้เกิดการสลายตัวของไกลโคเจนที่ตับและส่งผลต่ออัตรารอดของปลา ทั้งนี้อุณหภูมิของน้ำที่ใช้ในการขนส่งและน้ำที่ใช้เปลี่ยนถ่ายระหว่างการขนส่งควรมีอุณหภูมิที่ไม่แตกต่างกัน ทั้งนี้การเปลี่ยนแปลงอุณหภูมิอย่างเฉียบพลันอาจเป็นผลให้เกิดความเครียดที่มีผลต่อการกดการทำงานของระบบภูมิคุ้มกัน และ ทำให้เกิดการตายในที่สุด (Wedemeyer, 1996)

6.1.2 ออกซิเจนที่ละลายน้ำ

ออกซิเจนเป็นสิ่งสำคัญสำหรับการขนส่งปลาเนื่องจากในระหว่างการขนส่งถ้าปลาขาดออกซิเจนอาจทำให้ปลาเกิดความเครียดอย่างรุนแรงและทำให้ปลาตายภายหลังการขนส่ง ทั้งนี้ความสามารถในการละลายน้ำของออกซิเจนนั้นจะแตกต่างกันไปตามอุณหภูมิ โดยที่อุณหภูมิต่ำออกซิเจนจะสามารถละลายน้ำได้ดีกว่าที่อุณหภูมิสูง แต่เนื่องจากการขนส่งโดยใช้ถุงพลาสติกนั้นมีการบรรจุอากาศในกระบวนการขนส่งก็ทำให้ออกซิเจนละลายน้ำอยู่ตลอดเวลาเนื่องจากการแกว่งของถุง ปัญหาที่เกี่ยวกับการขาดออกซิเจนจึงไม่ค่อยเกิดขึ้น ที่เกิดขึ้นอาจเนื่องมาจากถุงรั่วทั้งจากการบรรจุที่ไม่ได้มาตรฐาน หรือเงี่ยงของปลาขนาดใหญ่แทงทะลุถุงออกมา สำหรับการบรรจุออกซิเจนในถุงนั้นปกติแล้วจะให้ออกซิเจนอยู่ในถุงประมาณ 75% หรือ 3ใน 4 ของปริมาตรถุงบรรจุเพื่อให้แน่ใจว่ามีปริมาณออกซิเจนที่จะละลายน้ำเพียงพอสำหรับปลาตลอดการขนส่ง (Swann, 1993)

โดยปกติแล้วปริมาณการใช้ออกซิเจนของปลาระหว่างการขนส่งขึ้นอยู่กับปัจจัยหลายอย่าง ได้แก่ จำนวนปลา ชนิด ขนาดของปลา และระยะเวลาในการขนส่ง ความเครียดที่เกิดขึ้นของปลาระหว่างขนส่ง อุณหภูมิของน้ำ ค่า pH และ ระดับของคาร์บอนไดออกไซด์ในน้ำ รวมทั้งปริมาณของเสียในน้ำที่ปลาปล่อยออกมา (Crosby *et al*, 2007) ถ้าปลาอยู่ในภาวะที่ขาดออกซิเจน (anoxia) จะทำให้เกิดกลไกการทำงานของร่างกายแบบไม่ใช้ออกซิเจน (anaerobic metabolism) ส่งผลต่อการเพิ่มขึ้นของระดับกรดแลกติกในกระแสเลือด และอาจมีผลทำปลาตายได้ ถ้าอยู่ในสภาพนี้นานจนร่างกายไม่สามารถต้านทานกับการเปลี่ยนแปลงที่เกิดขึ้นได้ (Berka, 1986) และจากการรายงานของ Froese (1988) ได้กล่าวว่าการใช้ออกซิเจนจะเพิ่มขึ้นเป็นสามเท่าของสภาวะปกติเมื่อปลาอยู่ในสภาพของการขนส่งในระบบปิดโดยการใช้ถุงพลาสติก ทั้งนี้เมื่อปลามีการกินอาหารและย่อยอาหารมากขึ้นจะส่งผลให้ร่างกายเกิดการเผาผลาญโดยใช้ออกซิเจนเพื่อให้ได้

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

พลังงานออกมา ดังนั้นในการขนส่งปลาควรงดอาหารก่อนประมาณ 24-48 ชั่วโมงเพื่อลดการใช้ออกซิเจนระหว่างการขนส่ง (Wedemeyer, 1996)

การละลายของออกซิเจนขึ้นอยู่กับอุณหภูมิ ความเค็ม และความดัน แต่ในกรณีที่การละลายน้ำของออกซิเจนมากเกินไป (Supersaturation) จะทำให้ปลาตายได้เนื่องจากเกิดฟองอากาศขึ้นในกระแสเลือดและเนื้อเยื่อบริเวณเหงือก อาการที่เกิดขึ้นนี้เรียกว่า Gas bubble disease (Boyd, 1990) แต่สำหรับการใช้ออกซิเจนในการขนส่งปลานั้นไม่ค่อยมีปัญหาดังกล่าว เนื่องจากปลาที่ขนส่งมีปริมาณมากและการใช้ออกซิเจนก็เกิดขึ้นตลอดเวลาในภาชนะขนส่งแบบระบบปิด ปัญหาเกี่ยวกับการมีออกซิเจนมากเกินไปจึงไม่เกิดขึ้น

6.1.3 ความเป็นกรดเป็นด่าง (pH)

ความเป็นกรดเป็นด่าง (pH) คือ ค่าที่สามารถบอกความเข้มข้นของไฮโดรเจนไอออน (H^+) ในสารละลายได้ ซึ่งจะบ่งบอกว่าน้ำนั้นมีสภาพเป็นกรดหรือเป็นด่าง โดยค่า pH จะอยู่ในช่วง 1-14 ซึ่ง ที่ pH 7 นั้นจะเป็นค่ากลางของ pH ถ้า pH ต่ำกว่า 7 ถือว่าเป็นกรด และถ้าสูงกว่า 7 ถือว่าเป็นด่าง สำหรับค่า pH ที่เหมาะสำหรับการเจริญเติบโตของปลาจะอยู่ในช่วง 6.5-9 ซึ่งการเปลี่ยนแปลงของค่า pH นี้มีผลเกี่ยวเนื่องกับค่าความเป็นด่าง (alkalinity) ที่แสดงถึงความสามารถในการเป็นบัฟเฟอร์ในน้ำ และปริมาณของคาร์บอนไดออกไซด์อิสระในน้ำ ซึ่ง pH จะมีค่าลดลงเมื่อมีระดับของคาร์บอนไดออกไซด์ในน้ำสูงขึ้น ทั้งนี้ค่า pH จะมีความเกี่ยวข้องกับความเป็นพิษของแอมโมเนียในน้ำขนส่ง เนื่องจากน้ำที่มีค่า pH สูงหรือเป็นด่างจะมีผลต่อการเปลี่ยนรูปของแอมโมเนียไปเป็นแบบไม่มีไอออนซึ่งมีความเป็นพิษต่อปลาสูงกว่า (Cole *et al*., 1999) สำหรับการควบคุมระดับของ pH ในน้ำขนส่งนั้นได้มีการใช้ Tris buffer (tris hydroxymethylaminomethane) ซึ่งสารนี้มีประสิทธิภาพในการรักษาระดับของ pH ในน้ำให้คงที่ เช่น ในการทดลองขนส่งปลาหางนกยูงในถุงพลาสติกโดยใช้ tris buffer ความเข้มข้น 0.02 M ที่ pH 8 พบว่าสามารถควบคุมการเปลี่ยนแปลงของ pH ในน้ำระหว่างขนส่งได้ (Teo *et al*., 1989; Paterson *et al*., 2003)

จากรายงานของ Paterson *et al*. (2003) พบว่าปลากะพงขาว (*Lates calcarifer*) ที่ผ่านการขนส่งจะมีระดับของ pH ในเลือดลดลง และมีผลกระทบต่อการลำเลียงออกซิเจน ซึ่งลักษณะเช่นนี้มักจะเกิดขึ้นในการขนส่งสัตว์น้ำที่มีการลดลงของ pH ในน้ำเนื่องจากปริมาณ

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

คาร์บอนไดออกไซด์และแอมโมเนียในน้ำเพิ่มขึ้น ปลาจึงมีการปรับตัวโดยการขยายตัวของเม็ดเลือดเพื่อเพิ่มความสามารถในการลำเลียงออกซิเจนให้มากขึ้น

6.1.4 คาร์บอนไดออกไซด์

คาร์บอนไดออกไซด์เป็นผลผลิตที่ได้จากการหายใจของปลา เมื่อละลายน้ำจะมีคุณสมบัติทำให้น้ำมีสภาพเป็นกรดอ่อนๆ ที่เรียกว่ากรดคาร์บอนิก (H_2CO_3) ซึ่งมีผลต่อการลดลงของ pH ในน้ำ (Wedemeyer, 1996) ในกรณีที่มีปริมาณคาร์บอนไดออกไซด์ละลายน้ำมากเกิน 20 ppm จะมีผลต่อการขัดขวางการนำออกซิเจนของเม็ดเลือดแดง ทั้งนี้ในน้ำบางแหล่งอาจมีปริมาณคาร์บอนไดออกไซด์อยู่มาก เพื่อเป็นการลดปริมาณของคาร์บอนไดออกไซด์ลงอาจใช้วิธีการให้อากาศในน้ำก่อนนำมาใช้ หรือการหมุนเวียนน้ำผ่านคอลัมน์ที่มีคุณสมบัติในการสลายก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ออกไป (Swann, 1993)

6.1.5 แอมโมเนีย

แอมโมเนียที่เกิดขึ้นระหว่างการขนส่งมักเกิดจากกระบวนการเมทาบอลิซึมของโปรตีนที่ปลาขับออกมา และมีบางส่วนที่เกิดจากการย่อยสลายของเสียโดยแบคทีเรียในน้ำ แอมโมเนียจะมีอยู่สองรูปแบบ คือ ionized ammonia (NH_4^+) และ unionized ammonia (NH_3) ซึ่งเป็นแอมโมเนียในรูปที่มีความเป็นพิษสูงกว่า (Boyd, 1979) ทั้งนี้การเปลี่ยนรูปของแอมโมเนียขึ้นอยู่กับการเปลี่ยนแปลงของ pH และอุณหภูมิ ระหว่างการขนส่งปลาแอมโมเนียอาจมีค่าสูงขึ้นถึง 14 ppm ซึ่งจากตารางที่ 1 จะเห็นว่า ที่ pH 6.5 และ 55 ^{0}F จะมีแอมโมเนียในรูป unionized ammonia อยู่ประมาณ 0.07% ดังนั้นความเข้มข้นของแอมโมเนียที่ 14 ppm จะเท่ากับ 14x0.0007 = 0.0098 ppm (Cole *et al*., 1999) ซึ่งถ้าแอมโมเนียในรูป unionized ammonia มากกว่า 0.05 ppm ต้องระวังเป็นพิเศษสำหรับการเคลื่อนย้ายปลาเนื่องจากความเข้มข้นดังกล่าวเป็นพิษต่อปลามาก ทำให้ปลาเครียด สมดุลร่างกายและกลไกทางสรีระวิทยาเปลี่ยนแปลงไป และอาจส่งผลต่อการตายของปลาอย่างรวดเร็วคือประมาณ 30 นาทีหรือน้อยกว่า (Post, 1987) วิธีการที่ง่ายที่สุดในการในการควบคุมปริมาณแอมโมเนียในน้ำ ได้แก่ การลดอุณหภูมิของน้ำเพื่อลดกิจกรรมของปลาที่มีผลต่อการขับถ่ายแอมโมเนียออกมา และการให้ปลาอดอาหารก่อนการขนส่ง โดยทั่วไปแล้วปลาขนาดประมาณ 8 นิ้ว ควรงดอาหารประมาณ 48 ชั่วโมงถ้าปลาที่มีขนาดโตกว่านี้จะงดอาหารประมาณ 72 ชั่วโมงก่อนการบรรจุเพื่อการขนส่ง (Cole *et al*., 1999) นอกจากนี้ Amend *et al.* (1982)ได้แนะนำว่าการใช้

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

Clinoptiolite ซึ่งมีคุณสมบัติในการเปลี่ยนรูปของ acid ion ในน้ำ สามารถควบคุมระดับของแอมโมเนียไม่ให้สูงขึ้นระหว่างการขนส่งได้

ตารางที่ 1 เปอร์เซ็นต์ของแอมโมเนียในรูป unionized ammonia ที่ระดับของอุณหภูมิ (°F) และ pH ต่าง ๆ

	อุณหภูมิ (°F)				
pH	50	55	60	65	70
6.0	0.02	0.02	0.03	0.03	0.04
6.5	0.06	0.07	0.09	0.11	0.17
7.0	0.19	0.24	0.29	0.34	0.43
7.5	0.59	0.74	0.93	1.07	1.33
8.0	1.83	2.30	2.87	3.31	4.10
8.5	5.56	6.92	8.54	9.78	11.90
9.0	15.70	19.00	22.80	25.50	29.90

ที่มา: Swann (1993)

6.2 สารเคมีที่ใช้ในการขนส่งสัตว์น้ำ

สารเคมีที่ใช้ในการขนส่งสัตว์น้ำโดยทั่วไปมีคุณสมบัติในการควบคุมคุณภาพน้ำและรักษาสมดุลของปลาระหว่างขนส่ง ทั้งนี้การใช้การเคมีแต่ละชนิดนั้นต้องคำนึงถึงความปลอดภัยเป็นหลัก ทั้งในส่วนของผู้ใช้ สัตว์น้ำ และสิ่งแวดล้อม สารเคมีที่ใช้นั้นต้องเป็นที่ยอมรับขององค์การอาหารและยา และปริมาณที่ใช้ต้องเหมาะสมโดยไม่มีผลกระทบด้านลบต่อสัตว์น้ำ สำหรับสารที่มีการใช้กันทั่วไปในการขนส่งสัตว์น้ำแบ่งออกเป็น 3 กลุ่ม ได้แก่

6.2.1 กลุ่มยากล่อมประสาท (sedatives)

สารกลุ่มยากล่อมประสาทเป็นที่นิยมใช้กันอย่างแพร่หลายเพื่อลดความเครียดที่อาจเกิดขึ้นระหว่างการขนส่ง สารกลุ่มนี้มีคุณสมบัติในการลดการทำงานของขบวนการเผาผลาญ

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ภายในร่างกายของปลา และช่วยป้องกันการบาดเจ็บของปลาที่เกิดจากการกระโดดหรือการเสียดสีกันระหว่างการขนส่ง แต่สารที่ใช้ต้องมีความปลอดภัยและได้รับอนุญาตจากองค์การอาหารและยาว่าสามารถใช้กับสัตว์น้ำได้ โดยสารที่มีคุณสมบัติเป็นยาสลบที่ได้รับอนุญาตให้ใช้ได้กับสัตว์น้ำในปัจจุบันได้แก่ สาร MS-222 (tricane methanesulfonate) ซึ่งใช้ที่ความเข้มข้นประมาณ 60-70 ppm (Cole *et al*., 1999)

6.2.2 สารที่ใช้ในการควบคุมคุณภาพน้ำ (water quality stabilizer)

สารที่ใช้ในการควบคุมคุณภาพน้ำให้คงที่ประกอบด้วย zeolite และ activated carbon ซึ่งใช้เพื่อกำจัดแอมโมเนีย โดยปริมาณที่ใช้อยู่ที่ 20 กรัมต่อน้ำ 1ลิตร น้ำแข็ง heat pack และ cool pack ใช้เพื่อรักษาระดับอุณหภูมิของน้ำให้เกิดเปลี่ยนแปลงน้อยที่สุดระหว่างขนส่ง (Cole *et al*., 1999) เกลือแกง (NaCl) ใช้เพื่อทำให้น้ำมีสภาวะเป็นไอโซโทนิค (isotonic) และเกิดความสมดุลระหว่างน้ำภายนอกและภายในร่างกายของปลา โดยใช้ที่ความเข้มข้น 0.5% ของน้ำที่ใช้ขนส่ง (Jensen, 1990; Swann, 1993) นอกจากนี้ยังมีการใช้สารจำพวก chelating agents , buffer และสารที่ใช้กำจัดแอมโมเนียหรือคลอรีนในน้ำเช่น sodium thiosulphate (Cole *et al*., 1999) ซึ่ง sodium thiosulfate 7.4 ppm สามารถกำจัดคลอรีนได้ 1 ppm นอกจากนี้การให้อากาศอย่างรุนแรงก็สามารถกำจัดคลอรีนในน้ำได้เช่นกัน (Boyd, 1990) ทั้งนี้ยังมีสารประกอบของ Chlorine ได้แก่ Chloramine ซึ่งเป็นการรวมตัวกันของแอมโมเนียและคลอรีน สารนี้ไม่สามารถกำจัดได้ด้วยการให้อากาศจึงจำเป็นต้องใช้สารเคมีที่มีการขึ้นทะเบียนทางการค้าในการกำจัด (Crosby *et al*., 2007)

สำหรับกรณีที่คุณภาพน้ำมีค่าความเป็นด่าง (Alkalinity) ต่ำกว่า 100 mg/L as $CaCO_3$ ควรมีการเติมสารที่มีคุณสมบัติเป็นบัฟเฟอร์ซึ่งสามารถกำจัดคาร์บอนไดออกไซด์อิสระที่เป็นสาเหตุของการลดต่ำลงของ pH ซึ่งสารที่นิยมใช้ได้แก่ sodium bicarbonate (Na_2CO_3) โดยใช้ในปริมาณ 1 กรัมต่อน้ำ 1 แกลลอน (3.8 ลิตร) (Swann, 1993)

นอกจากนี้ยังมีการทดลองของ Singh *et al*. (2004) ที่ได้ขนส่งปลาในกลุ่ม Indian major carp ได้แก่ ปลา *Catla catla* (Hamilton), ปลา *Labeo rohita* (Hamilton) and ปลา *Cirrhinus mrigala* (Hamilton) โดยใช้ Tris buffer ที่ความเข้มข้น 0.01 M และ zeolite ที่ความเข้มข้น 7 กรัมต่อลิตร เพื่อลดปริมาณแอมโมเนียในน้ำระหว่างขนส่ง และการทดลองของ Zhang and Perschbacher (2003) ซึ่งได้เปรียบเทียบประสิทธิภาพของการใช้ Zeolite Sodium Chabazite

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

และ Activated Charcoal เพื่อเป็นตัวกำจัดแอมโมเนียในน้ำที่ใช้ในการขนส่งแบบระบบปิด โดยพบว่า Zeolite Sodium Chabazite มีความสามารถในการลดปริมาณ แอมโมเนียไนโตรเจนทั้งหมด (total ammonia nitrogen) และควบคุม pH ในน้ำที่อยู่ในภาชนะขนส่งให้คงที่ได้ดีกว่า Activated Charcoal ซึ่งชี้ให้เห็นว่า Zeolite Sodium Chabazite เหมาะที่จะนำมาใช้ในการควมคุมแอมโมเนียและการเปลี่ยนแปลง pH ของน้ำระหว่างการขนส่งได้ดี

6.2.3 สารกลุ่ม antiseptic และ antibiotic

การใช้ยาปฏิชีวนะเป็นวิธีที่ต้องควบคุมตามกฎหมาย ซึ่งการใช้ควรจะพิจารณาเป็นพิเศษเพื่อเป็นการป้องกันการดื้อยา ยาปฏิชีวนะชนิดที่นิยมใช้กันอย่างแพร่หลายในการขนส่งปลาและการรักษาโรคติดเชื้อแบคทีเรีย ได้แก่ Oxytetracycline โดยใช้ที่ความเข้มข้น 5-20 ppm และ acriflavine (ยาเหลือง) ใช้ที่ความเข้มข้น 3-10 ppm ทั้งนี้การใช้ยากับสัตว์น้ำนั้นควรมีการเปลี่ยนชนิดของยาโดยไม่ใช้ยาชนิดเดิมซ้ำๆกัน และยาที่ใช้ต้องได้รับการอนุญาตจากองค์การอาหารและยา เพื่อป้องกันการดื้อยาของเชื้อโรคและการตกค้างของยาในสัตว์น้ำ (Cole *et al*., 1999)

6.3 การเตรียมปลาก่อนการขนส่ง

การขนส่งปลานั้นต้องมีการเตรียมปลาก่อนการขนส่งเพื่อป้องกันโรคที่อาจจะติดต่อเข้ามาในฟาร์มได้ โดยในทางปฏิบัติต้องมีบ่อหรือตู้แยกเลี้ยงปลาส่วนนี้ไว้ก่อนเพื่อเฝ้าดู อาการผิดปกติที่อาจจะเกิดในช่วงระยะเวลา 1 สัปดาห์แรก โดยเฝ้าดูอาการผิดปกติของปลาหากไม่มีความผิดปกติก็สามารถดำเนินการขนส่งได้หากมีอาการผิดปกติเช่นการเกิดโรคต้องทำการรักษาและเฝ้าระวังโรคจนกว่าปลาจะเข้าสู่ภาวะปกติจึงดำเนินการขนส่งต่อไป (Lim *et al*., 2003) ทั้งนี้ปลาที่ต้องการขนส่งนั้นควรเลือกเฉพาะปลาที่มีสภาพแข็งแรงที่สุดเนื่องจากในกระบวนการขนส่งอาจเกิดความล่าช้าทำให้ปลาอยู่ในภาชนะขนส่งนานขึ้น และอาจทำให้ปลาตายได้ถ้าปลาที่ขนส่งไม่แข็งแรง (Berka, 1986; Subasinghe, 1997)

การเตรียมปลาก่อนการขนส่งนั้นควรฝึกให้ปลาอยู่ในสภาพที่หนาแน่นก่อนดำเนินการขนส่ง และสำหรับปลาเขตร้อนควรมีการลดอุณหภูมิลงโดยอุณหภูมิที่เหมาะสมในการลำเลียงอยู่ที่ 15-18 องศาเซลเซียส เพื่อให้ปลาคุ้นเคยกับสภาพของการลำเลียง และควรงดการให้อาหารอย่างน้อย 2 วัน แต่ไม่ควรเกิน 5 วัน ทั้งนี้ขึ้นอยู่กับชนิดของปลา เช่น ปลาที่ออกลูกเป็นตัว

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ได้แก่ ปลาหางนกยูง ปลาสอด และปลาแพลทตี้ ควรใช้เวลาอย่างน้อย 2 วัน ในขณะที่ปลาทองควรงดอาหารอย่างน้อย 4 วัน และควรจะดูดสิ่งขับถ่ายของปลาออกจากถังพักวันละ 1-2 ครั้ง เพื่อป้องกันไม่ให้ปลากินสิ่งขับถ่ายที่ตกค้าง การที่ไม่มีสิ่งขับถ่ายอยู่ในถังพักเป็นสิ่งที่แสดงให้เห็นถึงความพร้อมของปลาที่จะนำไปทำการขนส่งได้ (Cole *et al*., 1999)

6.4 ความหนาแน่นในการบรรจุปลา

ในการบรรจุปลาลงถุงเพื่อการขนส่งนั้นต้องให้ความสำคัญเป็นพิเศษเพื่อให้การขนส่งเป็นไปอย่างสมบูรณ์ที่สุดโดยสิ่งที่ต้องพิจารณาคือระยะทางที่ขนส่ง อุณหภูมิของน้ำ ชนิดและขนาดของปลา ถ้าคุณภาพน้ำต่าง ๆ ในภาชนะขนส่งคงที่ โดยทั่วไปปลาที่มีขนาดเล็กสามารถบรรจุได้ในปริมาณที่หนาแน่นกว่าเมื่อเปรียบเทียบกับปลาที่มีขนาดใหญ่ (Cole *et al*., 1999; Harmon, 2009) ซึ่งจำนวนปลาที่สามารถบรรจุเพื่อการขนส่งโดยทั่วไปได้ระบุรายละเอียดไว้ในตารางที่ 2

ตารางที่ 2 จำนวนปลาที่สามารถบรรจุได้ในถุงพลาสติกขนาด 18x22 นิ้ว ที่มีปริมาตรน้ำ 2 แกลลอน (7.58 ลิตร) โดยที่น้ำมีความกระด้างที่ 80-100 ppm และมีช่วงอุณหภูมิที่ 12.7-15.55 องศาเซลเซียส

Stage or Total Length in Inches	Carrying Capacities (lbs.) for Transport Period in Hours			
	1	12	24	40
Eggs	1.0-3.0	1.0-2.0	1.0- 1.5	0.5- 1.0
Fry				
Yolk-sac	2.0-4.0	1,4-3.0	0.8-2.0	0.2-1.5
Swim-up	1.0-4.0	0.9-3.0	0.8-2.0	0.4- 1.4
Fingerlings				
1/2	1.8-5.0	1.5-4.0	1.2-3.0	0.6- 1.5

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ตารางที่ 2 (ต่อ)

Stage or Total Length in Inches	Carrying Capacities (lbs.) for Transport Period in Hours			
	1	12	24	40
1 Fingerlings	2.0-5.0	1.7-4.0	1.3-4.0	0.7-2.0
2	2.0-7.0	1.8-6.0	1.5-4.0	0.7-2.0
3	2.0-7.0	1.8-6.0	1.7-4.0	0.7-2.0
Large fish	4.0-9.0	3.0-6.5	2.0-5.0	1.0-2.5

ที่มา: Dupree and Huner (1984)

ความหนาแน่นในการบรรจุปลาแต่ละชนิด และขนาดจะมีความแตกต่างกัน เช่น ลูกปลา *Salminus brasiliensis* จะมีการขนส่งที่ 15 กรัมต่อน้ำ 1 ลิตร ที่เวลา 12 ชั่วโมง (Adamante *et al*., 2008) ลูกปลา silver catfish (*Rhamdia quelen*) ขนส่งที่ความหนาแน่น 168 กรัมต่อน้ำ 1 ลิตร ที่เวลา 24 ชั่วโมง โดยอุณหภูมิที่ขนส่งอยู่คือ 15 องศาเซลเซียส และสามารถขนส่งได้ด้วยความหนาแน่นดังกล่าวที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส แต่ไม่เกิน 6 ชั่วโมง (Golombieski *et al*., 2003)

ทั้งนี้ Froese (1988) ได้รายงานถึงความสัมพันธ์ระหว่างน้ำหนักตัวและความหนาแน่นของปลาในการขนส่งแบบถุงพลาสติกว่า ปลาที่ขนส่งในลักษณะนี้จะมีอัตราเมทาบอลิซึมสูงกว่าสภาพปกติประมาณ 3 เท่า และ ปลาขนาดเล็กจะมีความเครียดระหว่างการขนส่งมากกว่าปลาขนาดใหญ่ สำหรับปลาขนาดใหญ่จะมีการขับของเสียออกมามากในการขนส่งจึงควรงดอาหารให้นานกว่าปกติเพื่อป้องกันการขับของเสียที่ทำให้คุณภาพน้ำระหว่างการขนส่งเสื่อมลง

จำนวนปลาที่บรรจุในถุงนั้นขึ้นอยู่กับระยะเวลาในการขนส่งซึ่งอาจใช้เวลานานตั้งแต่ 48-72 ชั่วโมง ในบางครั้งอาจมีการบรรจุปลาเกินจำนวน โดยปลาที่วางไข่จะบรรจุเกินจำนวนประมาณ 5% ขณะที่ปลาจำพวกออกลูกเป็นตัวจะบรรจุเกินจำนวนประมาณ 10% ส่วนปลาที่มีราคาแพง เช่น ตระกูลปลาหมอสี จะไม่มีการบรรจุเกินจำนวน ปลาที่มีขนาดใหญ่ ซึ่งมีหนามหรือเกล็ดที่แหลมคม ควรจะบรรจุไว้ในถุง 2 ชั้นเพื่อลดความเสี่ยงที่ครีบจะแทงถุงทำให้เกิดการรั่วได้ การ

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

บรรจุปลาจำนวนมากเกินไปเป็นการเพิ่มความเสี่ยงที่อาจเกิดได้กับปลา (Cole *et al*., 1999) ทั้งนี้ในการขนส่งปลาบางชนิดที่ไม่มีรายละเอียดเกี่ยวกับการขนส่งมาก่อน ต้องมีการทดสอบหาความหนาแน่นที่เหมาะสมก่อนการขนส่งจริง เพื่อให้เกิดประสิทธิภาพสูงสุดในการขนส่ง

6.5 วิธีการขนส่ง

ในการขนส่งนั้นผู้ประกอบการต้องมีการวางแผนการขนส่งไว้ล่วงหน้าทั้งในส่วนของเวลาที่ใช้ในการบรรจุ เวลาที่เริ่มขนส่งและเวลาที่สัตว์น้ำไปถึงผู้รับ รวมทั้งค่าขนส่ง ทั้งนี้ผู้ประกอบการต้องติดต่อกับผู้รับไว้ก่อนเพื่อสอบถามข้อมูลที่ใช้ในการพิจารณาถึงวิธีการขนส่งที่เหมาะสมและป้องกันการล้าช้าในการขนส่งที่อาจมีผลต่อการสูญเสียหลังขนส่งได้ (Cole *et al*., 1999)

การขนส่งสัตว์น้ำในปัจจุบันโดยเฉพาะการขนส่งปลาสวยงามนั้น นิยมบรรจุปลาลงในถุงพลาสติกซึ่งเติมออกซิเจนบริสุทธิ์และรัดด้วยหนังยางหรือใช้เครื่องจักรที่มีอุปกรณ์หนีบเพื่อปิดปากถุงและอาจบรรจุถุงลงในกล่องโฟม (ขนาด 42 x 60 x 30 เซนติเมตร และขนาด 38 x 49 x 38 เซนติเมตร) ที่มีคุณสมบัติเป็นฉนวนเพื่อป้องกันการเปลี่ยนแปลงของอุณหภูมิที่อาจเกิดขึ้นระหว่างขนส่ง สำหรับการขนส่งโดยเครื่องบินจะบรรจุถุงในลักษณะที่หลวมๆ เพื่อป้องกันการขยายตัวของอากาศในกรณีที่มีการเปลี่ยนแปลงของความดันอากาศเมื่ออยู่บนเครื่อง สำหรับถุงที่ใช้กันอย่างแพร่หลายในการขนส่งแบบระบบปิดนั้น ได้แก่ ถุงที่มีกันถุงเป็นรูปสี่เหลี่ยม ซึ่งข้อดีของถุงลักษณะนี้คือสามารถใช้ประโยชน์จากพื้นที่ผิวได้อย่างมีประสิทธิภาพ และอีกชนิดคือถุงแบบมีรอยจีบซึ่งสามารถช่วยให้ปริมาณออกซิเจนที่สัมผัสกับผิวหน้าน้ำละลายน้ำได้มากขึ้นและยังช่วยลดผลกระทบที่เกิดจากความแออัดของการใช้พื้นที่เวลาบรรจุลงกล่องโฟม ทั้งนี้การวางถุงในกล่องอย่างเหมาะสมก็จะช่วยลดความแออัดของปลาในบริเวณมุมถุงได้ ในกรณีของการบรรจุอากาศลงในถุงนั้นมีทั้งแบบเต็มถุง แบบครึ่งถุง และแบบหนึ่งส่วนสี่ของถุง ซึ่งปริมาณอากาศที่บรรจุนี้จะขึ้นอยู่กับระยะทางและวิธีการขนส่ง สำหรับในบางพื้นที่เช่นประเทศในแถบเอเชียจะใช้ถุงที่ผลิตมาจากพลาสติกและใช้ความร้อนปิดผนึกที่ปลายอีกด้านหนึ่งของถุง ทำให้ลักษณะถุงเป็นแบบมีตะเข็บด้านเดียว จึงเรียกถุงแบบนี้ว่า pillow bags เมื่อผู้ใช้เติมลมเข้าไปในถุง จะได้ถุงที่มีลักษณะเป็นทรงกลม ข้อดีของถุงแบบนี้คือช่วยเพิ่มพื้นที่ผิวของน้ำให้มากขึ้นในขณะขนส่ง สำหรับขนาดของถุงที่ใช้นั้นอาจแตกต่างกันทั้งนี้ขึ้นอยู่กับ จำนวน ชนิดและขนาดของปลา เช่น ถุงขนาด 7.5 x 17.5 เซนติเมตร นิยมใช้ในการบรรจุปลาแบบตัวเดียวต่อหนึ่งถุง ถุงขนาด 35 x 65 เซนติเมตรใช้

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

บรรจุปลาขนาดเล็กที่มีจำนวนมาก และถุงขนาดใหญ่ที่สามารถบรรจุน้ำได้ปริมาตร 5-7 ลิตร จะสามารถบรรจุปลาได้ 200-500 ตัวต่อถุง โดยมีอัตราส่วนของปริมาตรน้ำ : ปริมาตรอากาศ เท่ากับ 35 : 65 หรือ 20 : 80 ทั้งนี้น้ำหนักรวมต่อถุงในการบรรจุนั้นไม่ควรเกิน 20 กิโลกรัม (Cole *et al*., 1999) สำหรับชนิดและขนาดของถุงที่ใช้ในการขนส่งปลานั้นได้แสดงไว้ในตารางที่ 3

ตารางที่ 3 ชนิดและขนาดของถุงที่ใช้ในการขนส่งปลา

Flat Bags (pillow bags) (Length cm x width cm)	Pleated Bags (square bottom) (length cm x width cm x depth cm)
35 x 65 (full bag)	37.5 x 37.5 x 55 (full bag)
27.5 x 60	20 x 40 x 55 (half bag)
25 x 57.5	20 x 20 x 50 (quarter bag)
22.5 x 57.5 (half bag)	10 x 15 x 45 (eighth bag)
22.5 x 42.5	10 x 10 x 40 (sixteenth bag)
20 x 37.5	-
17.5 x 22.5	-
12.5 x 25 (quarter bag)	-
10 x 20 (eighth bag)	-
7.5 x 17.5 (individual bag)	-

ที่มา: Cole *et al*. (1999)

6.6 การปล่อยปลาหลังการขนส่ง

เมื่อปลาไปถึงจุดหมายปลายทางแล้ว ก่อนจะปล่อยปลาออกจากถุง ควรระมัดระวังความแตกต่างของอุณหภูมิและค่าความเป็นกรดเป็นด่างของน้ำที่ใช้ ในการขนส่งกับน้ำใหม่ เนื่องจากในขณะที่ปลาอยู่ในถุงปลาจะใช้ออกซิเจนและขับถ่ายคาร์บอนได้ออกไซด์ออกมา ทำให้เกิดการสะสมของคาร์บอนไดออกไซด์ เมื่อมีปริมาณเพิ่มมากขึ้นจะมีผลทำให้ค่าความเป็นกรดและเป็นด่างในถุงลดลง ในขณะเดียวกันปลามีการขับถ่ายของเสียออกมาในรูปของแอมโมเนียซึ่งเป็น

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

อันตรายกับปลาในถุง ดังนั้นในการที่บรรจุปลาเป็นจำนวนมากเพื่อลดต้นทุนการขนส่งอาจจะเป็นผลเสียหายได้ถ้าปลาตายระหว่างการขนส่ง (Cole *et al*., 1999)

วิธีที่แนะนำสำหรับการปรับสภาพของปลาให้เข้ากับสภาพน้ำใหม่ คือการลอยถุงพลาสติกที่ปิดสนิทในถังหรือตู้ที่ใช้สำหรับรับปลา ใช้เวลาประมาณ 5-15 นาที และรอจนกระทั่งอุณหภูมิของน้ำในถุงกับน้ำใหม่มีค่าเท่ากัน ถ้าเป็นไปได้ควรจะทำการตรวจสอบความแตกต่างระหว่างค่าของอุณหภูมิและค่าความ เป็นกรดเป็นด่างของน้ำในถุงและน้ำใหม่ ข้อควรระวังอย่างหนึ่งคือถ้าน้ำใหม่มีค่าอุณหภูมิสูงและค่าความเป็นกรดเป็นด่างสูงต้องเพิ่มความระมัดระวังเป็นพิเศษ เนื่องจากลักษณะเช่นนี้ทำให้แอมโมเนียที่อยู่ในถุงเพิ่มขึ้นได้อย่างรวดเร็ว ทั้งนี้เมื่อเปิดถุงปลาออกแล้วควรค่อย ๆปล่อยปลาลงในน้ำใหม่และอาจเติมเกลือแกงลงไปในน้ำเพื่อลดความเครียดให้กับปลา จากนั้นควรตรวจสอบหาปรสิตภายนอกหรือโรคที่อาจติดมากับปลา รวมทั้งกำจัดถุงที่ผ่านการใช้ขนส่งปลาแล้ว เพื่อเป็นการป้องกันโรคและปรสิตเข้าสู่ระบบการเลี้ยง (Cole *et al*., 1999)

ในกรณีที่ถุงปลาถูกเปิดอย่างรวดเร็วก่อนการปรับสภาพนั้นจะมีผลทำให้คาร์บอนไดออกไซด์ในน้ำที่ใช้ขนส่งแพร่กระจายสู่บรรยากาศ ส่งผลให้ค่าความเป็นกรดเป็นด่างน้ำที่ใช้ขนส่งเพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็ว ควบคู่ไปกับปริมาณแอมโมเนียที่เป็นพิษ ซึ่งสามารถทำให้ปลาเกิดความเครียด และร้ายแรงจนอาจทำให้ปลาตายได้ การเติมน้ำลงไปในถุงที่เปิดจะเป็นการเพิ่มความเครียดแก่ปลา หากน้ำที่เติมลงไปใหม่มีค่า pH และอุณหภูมิที่สูง (Cole *et al*., 1999)

6.7 การขนส่งปลาโดยการใช้ยาสลบ

วัตถุประสงค์ของการใช้ยาสลบในการขนส่งปลาคือต้องการให้ปลาลดกิจกรรมลงระหว่างการขนส่ง ซึ่งปลาอาจถูกกระตุ้นด้วยปัจจัยต่าง ๆ ที่ทำให้เกิดความเครียด เช่น การคัดปลา การกระแทกของมวลน้ำกับภาชนะขนส่ง และความเครียดที่เกิดจากการกระทำของปลาที่อยู่ในภาชนะขนส่งด้วยกัน การใช้ยาสลบยังสามารถลดการทำงานของระบบการเผาผลาญภายในร่างกายซึ่งส่งมีผลต่อการใช้ออกซิเจนที่น้อยลงและการขับแอมโมเนียและคาร์บอนไดออกไซด์ที่มีความเป็นพิษกับสัตว์น้ำออกมาน้อยลงเช่นกัน สำหรับความเข้มข้นของการใช้ยาสลบนั้นต้องเป็นระดับความเข้มข้นที่ทำให้ปลาเข้าสู่ระยะ sedation ของการสลบ เนื่องจากระยะสลบระยะนี้ปลาจะมีอาการที่สงบลง หายใจช้า และขับของเสียออกมาน้อย แต่ไม่มีการสูญเสียสมดุลของร่างกาย การใช้

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ยาสลบที่ระดับความเข้มข้นที่ทำให้ปลาสงบลงนี้จะมีผลดีต่อการลดความเครียดของปลาที่อาจเกิดขึ้นจากปัจจัยต่าง ๆ ระหว่างขนส่ง (Marking and Meyer, 1985, Summerfelt and Smith, 1990) สำหรับการใช้ยาสลบที่ความเข้มข้นสูงกว่าระดับ sedation จะมีผลทำให้ปลาเกิดการเสียสมดุลและอยู่ในภาวะสลบที่ทำให้ปลาจมตัวลงสู่ภาชนะขนส่งและอาจทำให้ปลาทับถมกันจนขาดอากาศหายใจและตายได้ (Piper *et al*. 1982)

ในอดีตได้มีการทดลองการใช้ยาสลบกับการขนส่งสัตว์น้ำ เช่น ในการทดลองของ Teo *et al*. (1989) ซึ่งได้ขนส่งปลาหางนกยูง (*Poecilia reticulata*) ในถุงพลาสติกโดยใช้สาร 2-phenoxyethanol เป็นยาสลบ พบว่าที่ความเข้ม 0.11 และ 0.22 กรัมต่อลิตร มีอัตราการตายของปลาเป็นศูนย์หลังการขนส่ง จากนั้น Guo *et al*. (1995) ได้ศึกษาประสิทธิภาพของยาสลบ 4 ชนิดที่ใช้ในการขนส่งปลา platyfish (*Xiphophorus maculates*) ในถุงพลาสติก ได้แก่ สาร 2-phenoxyethanol, quinaldine sulphate, metomidate และ MS-222 พบว่าสาร 2-phenoxyethanol มีประสิทธิภาพดีที่สุดในการใช้เพื่อขนส่งปลาโดยใช้ระบบปิดโดยมีประสิทธิภาพในการลดการขับถ่ายของเสียและการหายใจของปลาระหว่างการขนส่งลงได้ และจากการศึกษาของ Sandodden *et al*. (2001) พบว่าการใช้ etomidate ในการขนส่งปลาสามารถลดความเครียดของปลาระหว่างการขนส่งได้ แต่สำหรับในปัจจุบันนี้การใช้ยาสลบกับสัตว์น้ำนั้นต้องได้รับอนุญาตจากองค์การอาหารและยาซึ่งสารที่ได้รับการอนุญาตให้ใช้ได้กับสัตว์น้ำในปัจจุบันนี้มีอยู่ชนิดเดียวได้แก่ สาร MS-222 แต่เนื่องจากสารนี้มีข้อด้อยในการควบคุมการเกิดความเครียดของสัตว์น้ำระหว่างการขนส่งและมีราคาแพงจึงต้องหาสารอื่นสำหรับเป็นทางเลือกในการใช้กับสัตว์น้ำโดยสารนั้นต้องมีประสิทธิภาพของการเป็นยาสลบที่ดี ปลอดภัยต่อสัตว์น้ำ ตัวผู้ใช้ และสิ่งแวดล้อม (Treves-Brown, 2000)

7. **การสลบปลา** (Fish anesthesia)

7.1 การสลบ (Anesthesia)

การสลบ (anesthesia) มาจากภาษากรีก ที่มีความหมายว่า ไม่มีความรู้สึกซึ่งมักเกี่ยวข้องกับการผ่อนคลายจากความความเจ็บปวด (Stoskopf, 1993) มีหลายคำจำกัดความที่อธิบายเกี่ยวกับการสลบและลักษณะที่เกี่ยวข้อง การสลบเป็นลักษณะทางด้านชีวภาพที่ถูกกระตุ้นจากภายนอก ซึ่งเป็นผลให้เกิดการสูญเสียความรู้สึกบางส่วนหรือทั้งหมด และสูญเสียการควบคุมการ

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ทำงานของระบบประสาทที่อยู่ในอำนาจจิตใจนอกจากนี้การสลบนั้นอาจเกิดสภาพผันกลับได้ (Summerfelt and Smith, 1990)

การสลบอาจทำได้โดยการใช้สารเคมีและการใช้วิธีทางกายภาพอื่น ๆ เช่น การใช้ไฟฟ้า(electroanaesthesia) และการลดอุณหภูมิของน้ำ (hypothermia) ซึ่งทำให้เกิดการสลบโดยการป้องกันการส่งสารสื่อประสาททำให้ปลาสงบขึ้นหรือลดการเคลื่อนที่ สูญเสียการรับรู้ทั้งแบบมีสติและไม่มีสติ(Summerfelt and Smith, 1990) โดยทั่วไปยาสลบมีผลต่อร่างกายทุกส่วน โดยแสดงให้เห็นตั้งแต่ระยะที่สัตว์สงบลง (sedation) จนถึงระยะที่สัตว์สูญเสียความสมดุลของร่างกาย และปฏิกริยาการตอบสนอง โดยทั่วไปการสลบที่นำมาประยุกต์ใช้ในปลามักเกี่ยวข้องกับการทำให้ปลาอยู่กับที่ ไม่ว่ายน้ำ (immobilization) ทั้งที่มีและไม่มีสติ การไม่มีสติของปลาเปรียบได้กับการสูญเสียการตอบสนองเมื่อถูกกระตุ้น ซึ่งการสลบโดยทั่วไปของปลามักใช้ยาสลบที่มีฤทธิ์ไปกดระบบประสาทส่วนกลาง (central nervous system) ทำให้ปลาสูญเสียการตอบสนองดังกล่าว

การสูญเสียการตอบสนองเฉพาะที่หรืออาการชาเกิดขึ้นเมื่อเกิดการสูญเสียความรู้สึกเกี่ยวกับอาการเจ็บปวดโดยการควบคุมที่ส่วนปลายของระบบประสาททำให้อวัยวะบางส่วนไม่สามารถรับความรู้สึกได้ ในสภาพนี้สัตว์จะมีอาการชา การใช้ยาสลบเฉพาะที่อาจทำให้เกิดการยับยั้งระบบประสาทในส่วนของ olfactory nerve ชั่วคราวทำให้การว่ายน้ำที่ช้าลง การสลบเฉพาะที่หรือการชาสามารถทำให้เกิดขึ้นได้โดยยับยั้งการทำงานระบบประสาทที่ควบคุมอวัยวะส่วนนั้นๆ (Summerfelt and Smith, 1990)

การทำให้สงบหรือการกล่อมประสาท สามารถทำได้โดยการใช้ยา ซึ่งจากรายงานของ Stoskopf (1993) พบว่าการกล่อมประสาทสามารถลดผลกระทบต่อการเปลี่ยนแปลงของสิ่งแวดล้อมได้ ซึ่งเป็นผลดีต่อการควบคุมไม่ให้สัตว์เกิดความเครียดที่จะมีผลต่อการบาดเจ็บ เกิดโรค และตายตามมาในภายหลัง

ในการวิจัยทางการประมงและการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำการใช้ยาสลบจำเป็นต่อการลดความเครียดและลดการบาดเจ็บของปลาระหว่างที่ทำกิจกรรมต่าง เช่น การชั่งวัด การติดฉลาก การสุ่มตัวอย่าง นอกเหนือจากการที่ยาสลบสามารถป้องกันการบาดเจ็บได้แล้ว ยังสามารถลดความเครียดได้ด้วยการยับยั้งการทำงานของ hypothalamo-pituitary-interrenal (HPI) axis ซึ่งเกี่ยวข้องกับการเกิดความเครียดในปลา (Small, 2003)โดยที่คุณสมบัติที่ต้องการของยาสลบจะผัน

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

แปรตามวัตถุประสงค์ของการวิจัยหรือการใช้งาน การตอบสนองต่อยาสลบถือว่ามีความสำคัญเช่นกัน โดยทั่วไปจะพิจารณาที่ระยะที่เหนี่ยวนำให้เกิดการสลบและการฟื้นจากการสลบ นอกจากพิจารณถึงการตอบสนองของยาสลบทั้งทางสรีรวิทยาและพฤติกรรมแล้ว ยาสลบที่ใช้นั้นต้องปลอดภัย หาง่าย และไม่ทำให้อัตราการตายของปลาเพิ่มขึ้น (Stoskopf, 1993)

7.2 ระยะของการสลบ (Stage of anesthesia)

เมื่อมีการเหนี่ยวนำให้เกิดการสลบอย่างช้า ๆ จะทำให้สามารถสังเกตระยะต่าง ๆ ของการสลบได้ โดยที่ McFarland (1960) เป็นคนครั้งแรกที่ได้แบ่งระยะของการสลบตามลักษณะของการสลบไว้ ซึ่งมีรายละเอียดระบุไว้ดังตารางที่ 4

ตารางที่ 4 การแบ่งระยะสลบของปลาตามลักษณะการเปลี่ยนแปลงพฤติกรรมของปลาแบ่งโดย McFarland (1960)

Definable levels of anesthesia			Behavioral response of fish
Stage	Plane	Word equivalents	
0	-	Normal	Reactive to external stimuli, equilibrium and muscle tone normal.
I	1	Light sedation	Slight loss reactivity to external stimuli (visual and tactile) and ventilation decreased.
I	2	Deep sedation	Total loss reactivity to external stimuli except strong pressure and slight decrease opercular rate.
II	1	Partial loss equilibrium Light anesthesia	Partial loss muscle, react only to very strong tactile and vibrational stimuli, rheotaxis present but swimming capabilities seriously disrupted and increase opercular rate.

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ตารางที่ 4 (ต่อ)

Definable levels of anesthesia			Behavioral response of fish
Stage	Plane	Word equivalents	
II	2	Total loss equilibrium Deep anesthesia	Total loss muscle tone, react only to deep pressure stimuli and decrease opercular below normal or ventilation almost absent.
III	-	Loss of reflex reactivity Surgical anesthesia	Total loss of reaction to even massive stimulation, respiratory rate very slow and heart rate slow.
IV	-	Medullary collapse	Respiratory movements cease, followed several minutes later by cardiac arrest, eventual death and overdose.

ที่มา: McFarland (1960)

ระยะของการสลบที่แสดงออกของปลาคล้ายกับที่เกิดขึ้นในสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม (Brown, 1993) ระยะที่ปลาถูกกระตุ้นอย่างรุนแรงจะเกิดขึ้นระหว่างการเหนี่ยวนำโดยจะแสดงอาการออกมาในรูปแบบของการว่ายน้ำที่ไร้ทิศทาง หายใจเร็วขึ้น และมีอาการเสียสมดุล ส่วนในระยะที่ปลาสงบลงเป็นระยะที่ปลาแสดงอาการน้อยคือ ปลาจะว่ายน้ำและหายใจช้าลง และระยะที่ปลาสลบอย่างสมบูรณ์นั้นปลาจะสูญเสียความสมดุลของร่างการทั้งหมด ไม่สามารถเคลื่อนที่ได้ มีการหายใจอย่างแผ่วเบาและไม่ตอบสนองต่อสิ่งกระตุ้นต่าง ๆ ในระยะสุดท้ายของการสลบนั้นปลาจะสูญเสียสมดุลของร่างกายทุกอย่าง หยุดการหายใจสังเกตจากการที่ operculum หยุดนิ่ง ซึ่งลักษณะนี้สามารถเหนี่ยวนำให้การเต้นของหัวใจหยุดลงและทำให้เกิดการตายในที่สุด

ในปี 1993 นั้น Stoskopf ได้แบ่งระยะสลบออกเป็น 4 ระยะ 2 ระดับ และ 8 หมวดของระยะสลบในปลา ดังแสดงไว้ในตารางที่ 5

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ตารางที่ 5 ระยะสลบของปลาแบ่งโดย Stoskopf (1993)

Stage	Plane	Category	Behavior Response of Fishes
0	-	Normal	• Swimming actively • Reactive to external stimuli • Equilibrium normal • Muscle tone normal
I	1	Light sedation	• Voluntary swimming continues • Slight loss of reactivity to visual and tactile stimuli • Respiratory rate normal • Equilibrium normal • Muscle tone normal
I	2	Deep sedation	• Voluntary swimming stopped • Total loss of reactivity to visual and tactile stimuli • Slight decrease in respiratory rate • Equilibrium normal • Muscle tone slightly decreased • Still responds to positional changes
II	1	Light narcosis	• Excitement phase may precede increase in respiratory rate • Loss of equilibrium • Efforts to right itself • Muscle tone decreased • Still responds to positional changes weakly
II	2	Deep narcosis	• Ceases to respond to positional changes • Decrease in respiratory rate to approximately normal • Total loss of equilibrium • No efforts to right itself

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ตารางที่ 5 (ต่อ)

Stage	Plane	Category	Behavior Response of Fishes
III	1	Light anesthesia	• Total loss of muscle tone • Responds to deep pressure • Further decrease in respiratory rate • Suitable for minor surgical procedures
III	2	Surgical anesthesia	• Total loss of reactivity • Respiratory rate very low • Heart rate slow
IV	-	Medullary collapse	• Total loss of gill movement followed in several minutes by cardiac arrest

ที่มา: Stoskopf (1993)

อย่างไรก็ตาม Summerfelt and Smith (1990) ได้แบ่งระยะของการสลบใหม่เป็น 6 ระยะ โดยตัดส่วนของระดับที่เคยแบ่งไว้ก่อนหน้าทิ้งไป ซึ่งระยะที่แบ่งไว้แสดงรายละเอียดดังตารางที่ 6

ตารางที่ 6 ระยะสลบของปลาแบ่งโดย Summerfelt and Smith (1990)

Stage of Anesthesia	Descriptor	Behavior exhibited
0	Normal	Reactive to external stimuli ; opercular rate and muscle tone normal
1	Light sedation	Slight loss of reactivity to external visual and tactile stimuli ; opercular rate slightly decreased ; equilibrium normal
2	Deep sedation	Total loss of reactivity to external stimuli except strong pressure ; slight decrease in opercular rate ; equilibrium normal

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ตารางที่ 6 (ต่อ)

Stage of Anesthesia	Descriptor	Behavior exhibited
3	Partial loss of equilibrium	Partial loss of muscle tone ; swimming erratic ; increased opercular rate ; reactive only to strong tactile and stimuli
4	Total loss of equilibrium	Total loss of muscle tone and equilibrium ; slow but regular opercular rate ; loss of spinal reflexes
5	Loss of reflex reactivity	Total loss of reactivity ; opercular movements slow and irregular ; heart rate very slow ; loss of all reflexes
6	Medullary collapse	Opercular movements cease ; cardiac arrest usually follow quickly

ที่มา: Summerfelt and Smith (1990)

จากตารางที่ 6 การสลบเริ่มจากการที่ปลาสูญเสียการตอบสนองและการเคลื่อนที่เล็กน้อย (stage 1-light sedation) และการสูญเสียการตอบสนองจะเกิดอย่างสมบูรณ์ขึ้นเรื่อยๆ (stage 2-deep sedation) จากนั้นยาสลบจะมีผลมากขึ้นต่อเส้นประสาทที่กระดูกสันหลัง การผ่อนคลายกล้ามเนื้อ และการควบคุมภายใต้อำนาจของจิตใจสูญเสียไป (stages 3 and 4-partial and total loss equilibrium) ในที่สุดจะสูญเสียการตอบสนองทั้งหมด (stage 5)

สมองที่ควบคุมเกี่ยวกับการหายใจจะได้รับผลเนื่องจากการสลบเริ่มแรก (stages 1-2) โดยอัตราการหายใจจะลดลงเล็กน้อย เนื่องจากการที่ปลาลดกิจกรรมต่าง ๆ ของร่างกายลง แต่การหายใจจะเพิ่มสูงขึ้นเมื่อปลาเริ่มเสียความสมดุลของร่างกาย (stage 3) เมื่อการสลบเพิ่มมากขึ้น (stages 4-5) การหายใจของปลาก็จะลดลง แผ่วเบา และไม่เป็นปกติ ถ้าขยายเวลาการสลบไปมากขึ้นจะทำให้ปลาเกิดการขาดออกซิเจนอย่างรุนแรงจนทำให้ปลาเข้าสู่ระยะที่ 6 ของการสลบ ซึ่งสมองจะหยุดสั่งการ ทำให้การหายใจผ่านเหงือกหยุดลงปลาจึงไม่สามารถรับออกซิเจนได้อีกจนกว่าจะย้ายปลาไปยังน้ำปกติเพื่อให้ปลาฟื้นคืนมา ระยะที่ 5 และ 6 ของการสลบอาจทำให้ผิวหนังของปลามีสีจางลง ดังนั้นในการสลบปลาเพื่อไม่ให้เสี่ยงต่อการสลบที่นานเกินไป จึงควรย้ายปลาไปยังน้ำปกติทันทีที่ operculum ของปลาหยุดลง ระหว่างการเหนี่ยวนำให้เกิดการสลบ ปลาจะถูกแช่อยู่ใน

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

น้ำที่มียาสลบจนกว่าปลาจะเข้าสู่ระยะสลบที่ต้องการ โดยเวลาที่เหนี่ยวนำให้เกิดการสลบนั้นคิดเป็นนาทีที่ปลาสลบเข้าสู่ระยะสลบที่ต้องการ (Summerfelt and Smith, 1990)

7.3 ระยะฟื้นจากการสลบ (Stage of recovery)

หลักการพิจารณาถึงระยะของการฟื้นจากการสลบนั้นมีความผันแปรมาก (Munday and Wilson, 1997) โดยระยะฟื้นที่ช้ามักเป็นที่ต้องการในการนำมาใช้กับปลาที่ต้องรวบรวมมาจากธรรมชาติ หรือปลาที่ต้องเคลื่อนย้ายจากที่ที่มีระยะทางไกล ส่วนสภาพการอื่นๆนั้นการฟื้นจากการสลบของปลาโดยเร็วถือว่าเป็นสิ่งที่ดีที่สุด (Marking and Meyer, 1985; Stoskopf, 1993) ซึ่งระยะของการฟื้นจากการสลบนั้นมีนักวิทยาศาสตร์หลายคนได้แบ่งเอาไว้ตามลักษณะของการฟื้น ได้แก่ Hikasa *et al*. (1986) ซึ่งอธิบายไว้ในตารางที่ 7 และ Iwama and Ackerman (1994) ได้อธิบายไว้ในตารางที่ 8

ตารางที่ 7 ระยะที่ปลาฟื้นจากการสลบแบ่งโดย Hikasa *et al.* (1986)

Stage of recovery	Behavior exhibited
1	Reappearance of opercular movement
2	Partial recovery of equilibrium with partial recovery of swimming motion
3	Total recovery of equilibrium
4	Reappearance of avoidance swimming motion and reaction in response to external stimuli, but still behavioral response is stolid
5	Total behavioral recovery ; normal swimming

ที่มา: Hikasa *et al.* (1986)

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ตารางที่ 8 ระยะที่ปลาฟื้นจากการสลบแบ่งโดย Iwama and Ackerman (1994)

Stages of recovery	Description
I	Body immobilized but opercular movements just starting
II	Regular opercular movements and gross body movements beginning
III	Equilibrium regained and preanesthetic appearance

ที่มา: Iwama and Ackerman (1994)

จากคำอธิบายของ Summerfelt and Smith (1990) เวลาที่ทำให้ปลาฟื้น (recovery time) คือเวลาที่ปลาได้ฟื้นจากการสลบอย่างสมบูรณ์เมื่อปลาถูกนำมาไว้ในน้ำปกติหลังจากการสลบ ถ้าลักษณะทางสรีรวิทยามีการเปลี่ยนแปลงไปมากจากการสลบ เวลาที่จะทำให้ปลาฟื้นเป็นปกตินั้นก็จะเพิ่มมากขึ้น

7.4 วิธีการสลบปลา (Methods of fish anesthesia)

การสลบปลาสามารถทำได้โดยใช้วิธีการทางเคมีและวิธีการทางกายภาพ (Brown, 1993) วิธีการทางกายภาพได้แก่การลดอุณหภูมิของน้ำโดยการใช้น้ำแข็ง การช็อคด้วยไฟฟ้าและการเป่าอากาศผ่านหัว แต่วิธีการที่นิยมใช้ในการสลบปลามากที่สุดคือการใช้กลุ่มของสารเคมีที่มีฤทธิ์เป็นยาสลบ ซึ่งการใช้ยาสลบโดยทั่วไปจะใช้วิธีการแช่ในน้ำที่มียาสลบละลายอยู่เพื่อให้ตัวยาแพร่ผ่านเหงือกได้ นอกจากนี้วิธีการฉีดเข้าเข้ากล้ามเนื้อ เข้าช่องท้อง และการผสมอาหารก็เป็นอีกวิธีการที่สามารถสลบปลาได้ (Summerfelt and Smith, 1990; Brown, 1993; Ross and Ross, 1999)

การสลบปลาส่วนใหญ่ใช้วิธีการแช่ลงในน้ำที่มียาสลบละลายอยู่ (Stoskopf, 1993) และสิ่งที่ควรพิจารณานอกเหนือจากนี้คือขั้นตอนในการสลบต้องไม่ทำให้ปลาเกิดความเครียดเพิ่มขึ้น สำหรับการแช่นั้น ต้องเตรียมถังที่ใช้สำหรับแช่ปลาและถังสำหรับให้ปลาฟื้นพร้อมๆกัน และน้ำที่ใช้ต้องมีคุณภาพดี (Summerfelt and Smith, 1990; Ross and Ross, 1999) การสลบด้วยวิธีการแช่ปลาลงในน้ำที่มียาสลบละลายอยู่นั้น ยาสลบจะซึมผ่านเหงือกและแพร่เข้าสู่เส้นเลือดแดงซึ่งเป็นเส้นทางที่สั้นมากที่จะเข้าสู่สมองหรือระบบประสาทส่วนกลาง (central nervous system) เมื่อนำปลาที่ผ่านการสลบมาแช่ในน้ำปกติระบบในร่างกายของปลาจะขับยาสลบออกมาผ่านเหงือก

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

และผ่านผิวหนังเล็กน้อย สารบางตัวอาจสามารถขับออกมาทางไตได้ ทั้งในรูปแบบที่คงเดิมหรือรูปแบบที่ผ่านการเปลี่ยนแปลงมาแล้วในกระบวนการเมทาบอลิซึมของร่างกาย การเคลื่อนไหวของ operculum เป็นดัชนีชี้วัดที่ดีสำหรับการบอกระยะของการสลบ (Brown, 1993; Ross and Ross, 1999)

วิธีการสลบปลาโดยการฉีดสามารถทำได้เฉพาะกับปลาที่มีขนาดใหญ่หรือสำหรับปลาที่ต้องการใช้ในการผ่าตัด แต่วิธีการนี้ไม่มีการรายงานที่ชัดเจนทั้งการรักษาสภาพการสลบและการฟื้นจากการสลบ (Varner, 2000) การฉีดยาสลบปลาสามารถทำได้ทั้งการฉีดเข้าช่องท้องและกล้ามเนื้อแต่ทั้งนี้ต้องขึ้นอยู่กับขนาดของปลา (Ross and Ross, 1999) นอกจากนี้การฉีดยาสลบปลาสามารถทำได้โดยฉีดเข้าสู่เส้นทางอื่นเช่น orbital sinus, dorsal sinuses, peritoneum, red muscle และ caudal artery and vein (Brown, 1993; Ross and Ross, 1999) อย่างไรก็ตามการฉีดเข้าสู่กล้ามเนื้อไม่ใช่เส้นทางที่ดีที่สุด เนื่องจากกล้ามเนื้อจะมีแรงต้านทำให้ บางครั้งตัวยาที่ฉีดไปไม่สามารถเข้าไปออกฤทธิ์ในตัวปลาได้

ยาสลบสามารถนำไปใช้กับปลาโดยการผสมอาหารได้ทั้งในรูปของการบรรจุเป็นแคปซูล หรือการผสมกับอาหารโดยตรง (Brown, 1993) แต่ Ross and Ross (1999) ได้อธิบายว่าการให้ยาสลบผสมอาหารจะเหนี่ยวนำให้เกิดการสลบนั้นช้า เนื่องจากตัวยาออกฤทธิ์ก็ต่อเมื่อผ่านการดูดซับที่ลำไส้ และการให้ยาสลบวิธีนี้เป็นการยากที่จะประเมินความเข้มข้นที่ปลาจะได้รับไปในแต่ละตัวเนื่องจากปลาแต่ละตัวจะได้รับยาในปริมาณที่ต่างกันจากการกินอาหาร

8. ยาสลบ (Anesthetic)

8.1 ข้อมูลทางด้านเภสัชวิทยาของยาสลบ (Pharmacology of Anesthetic)

ข้อมูลทางด้านเภสัชวิทยาของยาสลบประกอบด้วย (Treves-Brown, 2000)

8.1.1 ผลของยาสลบต่อระบบประสาทส่วนกลาง

ยาสลบสามารถกดการทำงานในส่วนต่าง ๆ ของระบบประสาทส่วนกลาง เมื่อมีความเข้มข้นของยาเข้าสู่ร่างกายทำให้มีผลต่อการกดการทำงานของระบบประสาทส่วนที่มีความ

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ไวมากก่อนที่จะไปมีผลต่อส่วนอื่น ๆ ของร่างกาย ซึ่งผลของยาสลบที่เกิดขึ้นได้แก่ ผลต่อ cerebral cortex ทำให้เกิดอาการมึนชา ผลต่อ basal ganglia ทำให้เกิดอาการคลุ้มคลั่งและเกิดอาการตื่นเต้นเกินปกติ ผลต่อ spinal cord ทำให้เกิดการสลบอย่างสมบูรณ์ และผลต่อ medulla ทำให้เป็นอัมพาตและตายในที่สุด (Treves-Brown, 2000)

8.1.2 ผลของยาสลบต่อเคมีของเลือด

นอกจากก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์แล้ว ยาสลบยังเป็นสารตัวหนึ่งที่ทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงเคมีของเลือดปลา ระยะที่ทำให้ปลาสลบโดยสมบูรณ์ (ระยะ 5 ของการสลบ) สามารถทำให้ออกซิเจนในเลือดเปลี่ยนแปลงอย่างรวดเร็วซึ่งสอดคล้องต่อการเพิ่มขึ้นของก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ในเลือด แต่ระหว่างที่ปลาฟื้นตัวจากยาสลบ ออกซิเจนในเลือดจะเพิ่มสูงขึ้น ค่า pH ของเลือดจะต่ำลงและเพิ่มสูงขึ้นเมื่อปลาฟื้นจากการสลบ ระดับของ adrenalin เพิ่มสูงขึ้นเรื่อย ๆ เมื่อเวลาในการสลบขยายเพิ่มมากขึ้น และจะลดลงเมื่อปลาฟื้น การเปลี่ยนแปลงที่เกิดขึ้นทั้งหมดนี้มีผลต่อการขาดออกซิเจนเนื่องจากปลามีการเปิดปิดแผ่นปิดเหงือกลดลง ทำให้การไหลผ่านของน้ำผ่านเหงือกลดลง ปลาที่ได้เตรียมไว้เพื่อทำการผ่าตัดต้องพยายามรักษาสภาพการหายใจของปลา หากต้องนำปลาขึ้นจากน้ำมากกว่า 10 นาที โดยการสเปรย์น้ำหรือยาสลบที่เหงือกปลาหรือการแช่ส่วนของหัวปลาลงในน้ำที่มียาสลบ (Treves-Brown, 2000)

8.1.3 ผลของยาสลบต่อการตอบสนองของความเครียด

ระดับฮอร์โมน cortisol ในเลือดซึ่งเป็นผลมาจากความเครียดจะเปลี่ยนแปลงอย่างช้าๆตอนที่ปลาอยู่ในสภาพของการสลบและการฟื้น ทั้งนี้จากการทดลองของ Thomas and Robertson (1991) ได้ศึกษาการตอบสนองต่อความเครียดและผลของการใช้ยาสลบในลูกปลา red drum โดยการให้ปลาเกิดความเครียดด้วยการสัมผัสกับอากาศ และวัดการเพิ่มขึ้นของระดับ plasma cortisol และ glucose ซึ่งเป็นตัวชี้วัดการตอบสนองต่อความเครียด จากการทดลองได้ข้อสรุปว่าการสลบปลาในช่วงเวลาที่สั้นจะช่วยลดความเครียดในปลาได้ดีแต่สำหรับการใช้ยาสลบกับปลาในเวลาที่นานนั้นจะทำให้เกิดความเครียดมากด้วยผลจากยาสลบเอง

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

8.2 การพิจารณาเลือกใช้ยาสลบปลา

ในการเลือกยาสลบเพื่อมาใช้กับสัตว์น้ำนั้นต้องพิจารณาจากความเป็นพิษของตัวยา ความปลอดภัยต่อตัวสัตว์น้ำและผู้ใช้ ประสิทธิภาพในการสลบ ราคา และการควบคุมหรือข้อบังคับในการใช้สารดังกล่าว (Summerfelt and Smith, 1990) นอกจากนั้นตัวยาต้องสามารถหามาใช้ได้ง่าย (Cho and Heath, 2000)

ในช่วงเวลาต้นปี ค.ศ. 1970 ได้มีข้อแนะนำสำหรับการเลือกใช้ยาสลบปลาที่เหมาะสม คือ (Treves-Brown, 2000)

1. ยาสลบนั้นต้องเหนี่ยวนำให้ปลาเข้าสู่ระยะที่ 4 ของการสลบภายในเวลา 3 นาที
2. ปลอดภัยกับปลาเมื่อใช้เป็นเวลา 30 นาที
3. ปลาฟื้นเป็นปกติหลังจากการสลบภายในเวลา 20 นาที

จากนั้น Marking and Meyer (1985) ได้อธิบายลักษณะของยาสลบที่ดี คือ

1. เวลาที่เหนี่ยวนำให้เกิดการสลบต้องน้อยกว่า 15 นาที และที่ดีที่สุดควรน้อยกว่า 3 นาที
2. เวลาที่ปลาฟื้นจากการสลบต้องสั้นที่สุด คือประมาณ 5 นาที หรือน้อยกว่า
3. ไม่เป็นพิษกับปลา และมีความปลอดภัยสูง large safety factor
4. ใช้ได้สะดวกโดยไม่มีอันตรายต่อคนระหว่างการใช้
5. ไม่มีผลต่อการเปลี่ยนแปลงสรีรวิทยาของปลา
6. สามารถขับออกมาจากตัวปลาได้เร็ว ไม่มีการตกค้าง และไม่มีช่วงเวลาหยุดการใช้ยา (withdrawal time)
7. ไม่เป็นอันตรายในกรณีที่มีการใช้ซ้ำ
8. มีราคาไม่แพง

กิจกรรมในการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำส่วนใหญ่เกี่ยวเนื่องกับการจับปลา ทั้งการฉีดวัคซีน การชั่งวัด การคัดพ่อแม่พันธุ์ และการทำเครื่องหมาย ซึ่งวัตถุประสงค์ของการใช้ยาสลบในกิจกรรมเหล่านี้คือการทำให้ปลาไม่ดิ้น สามารถจับได้ง่าย ซึ่งเวลาที่เหมาะสมในการใช้ยาสลบควรอยู่ที่ 3

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

นาที สำหรับความเข้มข้นที่ใช้นั้นขึ้นอยู่กับชนิดและขนาดของปลาเนื่องจากปลาแต่ละชนิดและขนาดจะมีผลต่อการเหนี่ยวนำให้เกิดการสลบที่แตกต่างกัน โดยการเหนี่ยวนำให้เกิดการสลบนั้นตั้งอาศัยการไหลของน้ำที่มียาสลบผ่านเหงือกด้วยการเปิดปิดแผ่นปิดเหงือก ถ้าปลาที่ต้องการออกซิเจนมากการเปิดปิดแผ่นปิดเหงือกจะถี่กว่าปลาที่ต้องการออกซิเจนน้อยซึ่งลักษณะเช่นนี้มีผลทำให้ปลาที่ต้องการออกซิเจนสูงสลบได้เร็วกว่า (Gilderhus and Marking, 1987)

Gilderhus and Marking (1987) ได้หาช่วงของความเข้มข้นที่เหมาะสมในการใช้ยาสลบโดยพิจารณาจากหลักการใช้ยาสลบที่เหมาะสม โดยยาสลบที่ดีต้องทำให้ปลาสลบภายในเวลา 3 นาที และแช่ปลาเป็นเวลา 15 นาที เพื่อใช้ในวัตถุประสงค์ของการทดลอง สำหรับการศึกษาความผิดปกติของจากการใช้ยาสลบจะใช้เวลา 30 นาที ในการแช่ และปลาที่ผ่านการแช่ยาสลบที่ 15 นาทีนั้น ต้องฟื้นภายในเวลา 10 นาที

ระยะที่ 4 ของการสลบเป็นระยะที่เพียงพอสำหรับการใช้ในการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำ เมื่อนำปลาไปแช่ในน้ำที่มียาสลบละลายอยู่ ปลาจะตอบสนองโดยเริ่มจากการไวต่อสิ่งเร้า หลังจากนั้นปลาจะเริ่มว่ายน้ำไร้ทิศทาง และในที่สุดปลาจะไม่มีอาการตอบสนองต่อสิ่งเร้าต่าง ๆ และจมลงสู่ก้นภาชนะ ส่วนระยะที่ 1-2 ของการสลบ (sedation stage) เป็นระยะที่ทำให้ปลาลดกิจกรรมลงซึ่งสามารถนำไปใช้ในการลดความเครียดของปลาลงระหว่างการขนส่ง และทำให้เพิ่มเวลาในการขนส่งได้นานขึ้น (Gilderhus and Marking, 1987)

นอกจากนี้ Brown (1993) ให้ข้อมูลเพิ่มเติมว่าสารเคมีที่มีคุณสมบัติเป็นยาสลบที่ดีนั้นควรเหนี่ยวนำให้เกิดการสลบและการฟื้นอย่างไม่มีปัญหา โดยความเข้มข้นที่ใช้ควรน้อยกว่าความเข้มขันที่ทำให้เกิดความเป็นพิษทั้งต่อปลาและตัวผู้ใช้ และตัวยาต้องสามารถละลายน้ำได้ดี ในส่วนของผลทางด้านสรีรวิทยา ยาสลบที่ดีต้องไม่ทำให้ปลาเกิดการบาดเจ็บ โดยทำให้ปลาไม่เคลื่อนที่และทำให้กล้ามเนื้อคลายตัวอย่างเป็นปกติ นอกจากนี้สารเคมีที่ใช้เป็นยาสลบนั้นควรรักษาสภาพการออกฤทธิ์ได้นาน และมีการสลายตัวอย่างรวดเร็วเมื่ออยู่ในสิ่งแวดล้อม (Stoskopf, 1993)

ชนิดของตัวยาหรือสารเคมีที่สามารถนำมาใช้ในการสลบสัตว์น้ำ ได้แก่ MS-222(tricaine methanesulfonate), benzocaine, lidocaine, metomidate, etomidate, 2-phenoxyethanol, quinaldine sulfate, chlorobutanol, clove oil และ eugenol (Summerfelt and Smith, 1990; Iwama and Ackerman, 1994; Ross and Ross, 1999; Coyle *et al.*, 2004; Palic *et al.*, 2006)

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ยาสลบที่เหมาะสมสำหรับใช้ในปลาควรมีความปลอดภัยต่อปลาและมนุษย์ เป็นมิตรต่อสิ่งแวดล้อม มีประสิทธิภาพสูง หาซื้อได้ง่าย มีความสะดวกและประหยัดในการใช้งาน แต่ยาสลบปลาในปัจจุบันที่ใช้มักเป็นสารเคมี ซึ่งก่อให้เกิดปัญหาการตกค้างของสารเคมีต่อสัตว์น้ำและผู้บริโภค จึงไม่ปลอดภัยต่อการนำมาใช้กับปลาที่เลี้ยงเพื่อเป็นอาหาร ยกเว้น สาร MS-222 แต่การใช้สารชนิดนี้ต้องมีระยะหยุดการใช้ยา (withdrawal period) เป็นเวลาไม่น้อยกว่า 21 วัน ก่อนนำปลาไปปล่อยลงสู่แหล่งน้ำธรรมชาติหรือนำไปบริโภค (Taylor and Roberts, 1999)

สำหรับยาสลบที่สามารถใช้ได้กับสัตว์น้ำในปัจจุบันนั้นต้องได้รับการอนุญาตจากองค์การอาหารและยา (Food and Drug Administration; FDA) และได้รับการรับรองถึงประสิทธิภาพและความปลอดภัยของตัวยา ซึ่งยาสลบที่ได้รับการอนุญาตให้ใช้ได้โดยทั่วไปกับสัตว์น้ำในปัจจุบันมีเพียงชนิดเดียว ได้แก่ สาร MS-222 (Tricaine methanesulfonate) (Coyle *et al.* 2004) แต่เนื่องจากสารนี้มีข้อด้อยในการควบคุมการเกิดความเครียดในปลาและมีราคาค่อนข้างสูงจึงได้มีการหายาสลบซึ่งมีคุณสมบัติที่ดีกว่ามาทดแทน และขณะนี้ได้มีการศึกษาวิจัยเกี่ยวกับคุณสมบัติในการเป็นยาสลบของสาร Eugenol ซึ่งเป็นสารออกฤทธิ์ที่อยู่ในน้ำมันกานพลูเนื่องจากสารนี้มีคุณสมบัติเป็นยาสลบสัตว์น้ำที่ดี ราคาถูก และได้รับการรับรองจากองค์การอาหารและยาของสหรัฐอเมริกา (USFDA) ว่าสามารถนำมาใช้ได้อย่างปลอดภัยกับสัตว์น้ำ Generally Considered Safe (GRAS) จึงเป็นสารที่น่าสนใจที่จะนำใช้ในกิจกรรมต่างๆของการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำต่อไป

9. สาร Eugenol

9.1 ลักษณะและความสำคัญของสาร Eugenol

สาร Eugenol เป็นสารออกฤทธิ์ในน้ำมันกานพลูที่สกัดมาจากต้นกานพลู (*Syzygium aromaticum* Linn.) ซึ่งเป็นพืชสมุนไพรที่มีกลิ่นหอมเฉพาะ ต้นกานพลูนั้นจัดอยู่ใน Family Myrtaceae (Pruthi, 1980) เป็นไม้ยืนต้นขนาดกลางความสูง 10-20 เมตร มีถิ่นกำเนิดในประเทศอินโดนีเซีย และมีการนำไปปลูกยังประเทศต่าง ๆ ได้แก่ ศรีลังกา มาดากัสการ์ แทนซาเนีย และบราซิล ในประเทศไทยมีการปลูกทางภาคตะวันออก และภาคใต้ของประเทศ (Farrell, 1990; Weiss, 1997; Evans, 2002)

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

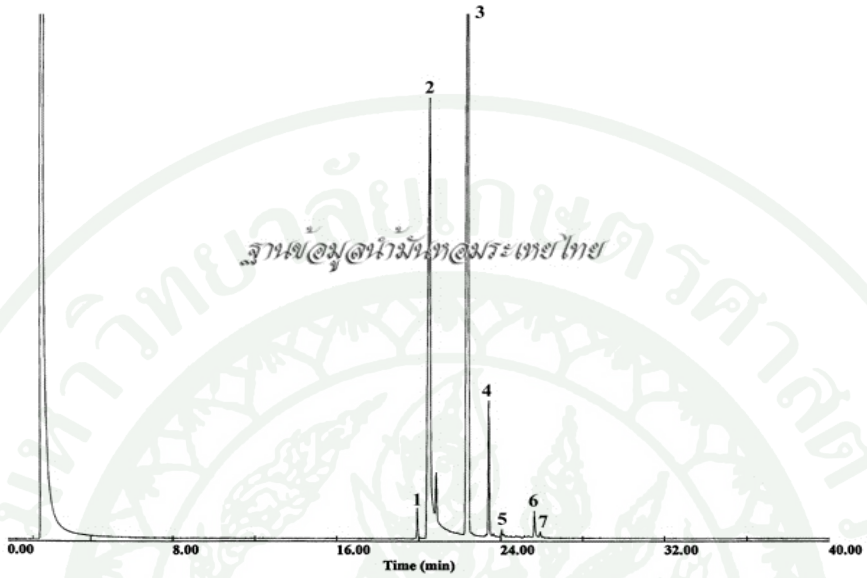
สาร Eugenol มีชื่อตาม IUPAC ว่า 4-Allyl-2-methoxyphenol และมีชื่ออื่นๆ ได้แก่ 2-Methoxy-4-(2-propenyl) phenol, Eugenic acid, Caryophyllic acid, 1-Allyl-3-methoxy-4-hydroxybenzene, Allylguaiacol, 2-Methoxy-4-allylphenol, 4-Allylcatechol-2-methyl ether และ 2-methoxy-4- (2-propen-1-yl) phenol สาร Eugenol มีสูตรโมเลกุลคือ $C_{10}H_{12}O_2$ มีมวลโมเลกุล 164.20 g/mol ความหนาแน่น 1.06 g/cm^3 มีจุดหลอมเหลวอยู่ที่ - 9 °C (264 K, 16 °F) และมีจุดเดือดอยู่ที่ 256 °C (529 K, 493 °F) (Wikipedia, nd.)

น้ำมันกานพลูเป็นน้ำมันหอมระเหยที่ได้จากดอกกานพลูแห้งโดยกระบวนการต้มกลั่นด้วยไอน้ำ (steam distillation) ประกอบด้วยสารออกฤทธิ์ที่สำคัญ 3 ชนิดคือ eugenol 85-95%, iso-eugenol และ methyleugenol 5-15% ส่วนน้ำมันการพลูที่ได้จากลำต้น ใบและดอกกานพลูมีสารประกอบและคุณสมบัติที่แตกต่างกันไปบ้างเล็กน้อย เช่น เมื่อนำดอกกานพลูแห้ง และใบกานพลูมาสกัดน้ำมันหอมระเหยโดยการต้มกลั่น (hydrodistillation) จะได้น้ำมันหอมระเหยร้อยละ 6.0 ซึ่งองค์ประกอบทางเคมีของน้ำมันที่วิเคราะห์โดย GC และ GC-MS ได้แสดงไว้ดังภาพที่ 1 และ 2 (สถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทย [วว.], 2549)

นอกจากนี้ยังพบว่าที่ตุ่มดอกของกานพลูมีสาร β-caryophyllene (Walter, 1972) ซึ่งมีฤทธิ์เป็นยาสลบโดยเฉพาะการใช้เป็นยาสลบเฉพาะที่ หรือยาชา (Ghelardini *et al*., 2001)

การใช้ประโยชน์จากน้ำมันกานพลูมีทั้งในทวีปเอเชีย ยุโรป และ อเมริกา ในตำรับยาไทยมีการนำทุกส่วนของกานพลูมาใช้เป็นยา เช่นเปลือกของลำต้นใบและดอกตูม ดอกกานพลูนั้นมีฤทธิ์ขับลม แก้อาการท้องอืด ท้องเฟ้อ เน่น จุกเสียด (Nagababu and Lakshmaiah, 1992; Evans, 2002) ใช้ในการยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย เช่น *Escherichia coli*, *Aeromonas hydrophila*, *Pseudomonas fluorescens*, *Clostridium* sp. and *Bacillus subtilis* (Nakatani , 1994) และใช้เป็น preservative เพื่อฆ่าเชื้อแบคทีเรียในอาหารกระป๋อง ในทางทันตกรรมใช้เป็นยาชาเฉพาะที่ และเป็นยาระงับกลิ่นปาก (Ghelardini *et al*., 2001) นอกจากนี้ยังมีฤทธิ์ในการคลายกล้ามเนื้อ (Soto and Burhanuddin, 1995) ยับยั้งเชื้อรา (Lee and Shibamoto, 2001) ยีสต์ (Conner and Beuchat, 1984) และใช้เป็นสารแต่งกลิ่นอาหาร (Duke and Beckstrom-Sternberg, 1994)

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์



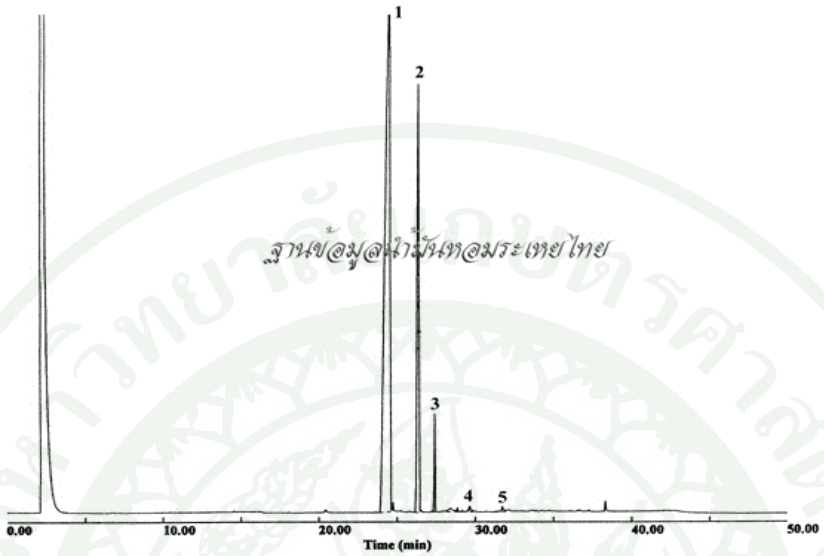
ฐานข้อมูลน้ำมันหอมระเหยไทย

ภาพที่ 1 องค์ประกอบทางเคมีที่ได้จากดอกกานพลู

หมายเหตุ 1 = α-cubebene (1.05), 2 = eugenol (36.75), 3 = *trans*-caryophyllene (51.47),
4 = α-humulene (4.93), 5 = epi-bicyclosesquiphellandrene (0.31),
6 = δ-cadinene (1.09), 7 = eugenol acetate (0.20)

ที่มา: วว. (2549)

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์



ฐานข้อมูลน้ำมันหอมระเหยไทย

ภาพที่ 2 องค์ประกอบทางเคมีที่ได้จากใบกานพลู

หมายเหตุ 1 = eugenol (72.87), 2 = *trans*-caryophyllene (22.55), 3 = α-humulene (2.59), 4 = iso-eugenol (0.30), 5 = caryophyllene oxide (0.26)

ที่มา: วว. (2549)

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

นอกจากนี้องค์การอาหารและยาของสหรัฐอเมริการ (USFDA) ได้รับรองให้น้ำมันกานพลูเป็นสารปรุงแต่งอาหาร (food additive) ที่มีความปลอดภัย แต่อย่างไรก็ตามหากได้รับกานพลูในรูปน้ำมันที่ไม่ละลาย (undiluted oil form) ในปริมาณมากหรือใช้กานพลูในบุหรี่ (clove cigarettes) อาจก่อให้เกิดอาการข้างเคียงต่อผู้ใช้ เช่น อาเจียน เจ็บคอ หายใจลำบาก และมีของเหลวในปอดเป็นต้น การสัมผัสกับกานพลูในรูปแบบที่ไม่ละลายบ่อยๆ อาจก่อให้เกิดอาการผิวหนังอักเสบหรือผิวหนังไหม้ได้ (มาวิน และคณะ, 2549)

น้ำมันกานพลูและอนุพันธ์ของน้ำมันกานพลู ได้นำมาใช้เป็นยาสลบกับปลาและได้รับความนิยมอย่างแพร่หลาย เนื่องจากมีราคาถูก ปลอดภัยทั้งกับปลาและมนุษย์ ประเทศที่นิยมใช้สารนี้ได้แก่ ออสเตรเลีย นิวซีแลนด์ และประเทศอื่นในแถบเกาะทางใต้และทางตะวันตกของมหาสมุทรเปซิฟิก (Oceania countries)ได้รับรองการใช้น้ำมันกานพลูและอนุพันธ์ของน้ำมันกานพลูในรูปแบบการค้าเพื่อใช้เป็นยาสลบปลาว่ามีความปลอดภัยต่อปลาที่จะปล่อยสู่ธรรมชาติและปลาที่เลี้ยงเพื่อการบริโภคของมนุษย์ โดยไม่ต้องมีระยะหยุดการใช้ยา (No withdrawal period) ก่อนนำปลาไปบริโภคหรือปล่อยสู่แหล่งน้ำธรรมชาติ (มาวิน และคณะ, 2549)

สาร Eugenol อาจมีความเป็นพิษต่อตับได้และกรณีที่ได้รับสารนี้มากเกินไปอาจทำให้เกิดอาการต่าง ๆ ที่ส่งผลเสียต่อสุขภาพเช่น อาการเกร็ง ชักกระตุก (convulsions), อาการท้องเสีย (diarrhea), อาการคลื่นไส้ (nausea), อาการไม่รู้สึกตัว (unconsciousness), เวียนศรีษะ (dizziness) และ หัวใจเต้นเร็วกว่าปกติ และอาการเหล่านี้จะแสดงอาการอย่างรุนแรงสำหรับผู้ที่แพ้สารชนิดนี้ (Wikipedia, nd.)

9.2 ประสิทธิภาพของการใช้สาร Eugenol และสาร Eugenol ในน้ำมันกานพลูเป็นยาสลบปลา

สาร eugenol ที่มีการใช้กันอยู่ในปัจจุบันอยู่ในรูปของน้ำมันกานพลูที่สกัดจากตุ่มดอกและใบของต้นกานพลู ซึ่งสารออกฤทธิ์ที่ได้จากน้ำมันการพลูนั้นนอกจากสาร eugenol แล้วยังมีสารอื่น ๆ ที่รวมอยู่ด้วยโดยเฉพาะสาร β-caryophyllene (Walter, 1972; Ghelardini *et al*., 2001) ซึ่งเป็นตัวเสริมฤทธิ์ในการสลบและอาจเป็นผลให้เกิดการตกค้างสู่สัตว์น้ำและส่งต่อมายังผู้บริโภคแต่ยังพิสูจน์ได้ไม่แน่ชัด สิ่งนี้เป็นสาเหตุทำให้น้ำมันกานพลูยังไม่ได้ขึ้นทะเบียนให้ใช้ได้ในสัตว์น้ำโดยทั่วไปเหมือนกับสาร MS-222 ถึงแม้สารนี้จะมีประสิทธิภาพที่ดีในการสลบปลาก็ตาม หลายปีที่

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ผ่านมาได้มีการศึกษาเกี่ยวกับประสิทธิภาพของน้ำมันกานพลูเพื่อใช้สำหรับการสลบปลาในกิจกรรมต่างๆของการเพาะเลี้ยงและการขนส่งสัตว์น้ำมากมาย แต่สำหรับการศึกษาเกี่ยวกับสาร eugenol ในรูปของการสังเคราะห์และอนุพันธ์ของสาร eugenol ยังมีข้อมูลส่วนนี้น้อยมากเมื่อเปรียบเทียบกับสาร eugenol ในรูปของน้ำมันกานพลู การศึกษาถึงประสิทธิภาพของสาร eugenol ส่วนใหญ่เกี่ยวข้องกับการประเมินความเข้มข้นที่เหมาะสมเพื่อใช้ในการสลบปลาแต่ละชนิดโดยพิจารณาจากความเข้มข้นและเวลาต่ำสุดที่เหนี่ยวนำให้เกิดการสลบ ส่วนเวลาที่ทำให้ปลาฟื้นจะพิจารณาจากวัตถุประสงค์ของการใช้งาน นอกจากนี้การเปลี่ยนแปลงทางด้านสรีรวิทยาของปลาโดยเฉพาะปัจจัยที่เกี่ยวข้องกับความเครียด การเสื่อมลงของระบบภูมิคุ้มกัน และการเปลี่ยนแปลงทางด้างชีวเคมีของตัวปลายังเป็นปัจจัยบ่งชี้ที่สามารถบอกถึงประสิทธิภาพของยาสลบแต่ละชนิดได้ โดยมีรายงานการศึกษาประสิทธิภาพของสาร eugenol ในการสลบปลา ดังนี้

ณัฐพงศ์ และคณะ (2547) ได้ศึกษาผลของการใช้น้ำมันกานพลูในการเหนี่ยวนำให้ปลาหางนกยูง (*Poecilia reticulate*) สลบที่ระดับ 2 ขั้น 1 (Stoskopf, 1993) นาน 48 ชั่วโมง โดยพบว่าความเข้มข้นของน้ำมันกานพลูที่ใช้ในการสลบปลาหางนกยูงอยู่ที่ 0.15 มิลลิกรัมต่อลิตร แต่การควบคุมการสลบปลาหางนกยูงด้วยน้ำมันกานพลู พบว่าปลาในกลุ่มทดลองตายทุกตัวภายในเวลาน้อยกว่า 8 ชั่วโมง ในขณะที่ปลากลุ่มควบคุมรอดทุกตัว เมื่อทำการศึกษาเพิ่มเติมโดยการเจือจางขนาดของยาสลบลงในอัตราส่วน 1:5 และ 1:10 ก็ยังให้ผลเช่นเดิม จากผลการศึกษาอาจกล่าวได้ว่าน้ำมันกานพลูไม่เหมาะสมที่จะใช้เป็นยาสลบในปลาหางนกยูงโดยเฉพาะในการขนส่งปลาเป็นระยะเวลานาน

มาวิน และคณะ (2549) ได้ศึกษาการสลบปลาที่สำคัญทางเศรษฐกิจชนิดต่าง ๆ ด้วยน้ำมันกานพลูพบว่าสามารถสลบลูกปลายี่สกขนาดความยาว 3-5 เซนติเมตร โดยการใช้น้ำมันกานพลูที่ความเข้มข้น 40 ppm และสามารถใช้ความเข้มข้น 10-15 ppm เพื่อลดกิจกรรมของปลาระหว่างการขนส่ง สำหรับการสลบปลานิลขนาดความยาวเฉลี่ย 22.04 เซนติเมตร ปลากดเหลืองขนาดความยาวเฉลี่ย 24.79 เซนติเมตร และปลานวลจันทร์ขนาดความยาวเฉลี่ย 44.58 เซนติเมตร พบว่าความเข้มข้นที่เหมาะสมในการสลบปลาอยู่ที่ 80 ppm ปลาตะเพียนขาวขนาดความยาวเฉลี่ย 23.94 เซนติเมตร และปลาเทพาขนาดความยาวเฉลี่ย 34.83 เซนติเมตร สามารถสลบได้โดยใช้ความเข้มข้น 100 ppm ส่วนปลาไนขนาดความยาวเฉลี่ย 27.51 เซนติเมตร และปลาบึกขนาดความยาวเฉลี่ย 35.50 เซนติเมตร สามารถสลบโดยใช้น้ำมันกานพลูที่ความเข้มข้น 120 และ 220 ppm ตามลำดับ

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ฎิลก และคณะ (2550) ได้ศึกษาเวลาการสลบและการฟื้นของน้ำมันกานพลูในปลาทอง (*Carassius auratus* Linn.) สามสายพันธุ์ ได้แก่ ปลาทองพันธุ์หัวสิงห์ ออรันดา และโคเมท พบว่าการใช้น้ำมันกานพลูที่ความเข้มข้น 100 ppm ทำให้การสลบเข้าสู่ขั้นที่ 3 ระดับที่ 2 (Stoskopf, 1993) เร็วกว่าการใช้ยาสลบที่ความเข้มเข้น 50 และ 25 ppm อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.05$) ในทางตรงกันข้ามการใช้น้ำมันกานพลูที่ความเข้มข้น 100 ppm ทำให้การฟื้นของปลาเกิดขึ้นได้ช้ากว่าที่ 50 และ 25 ppm ตามลำดับ ซึ่งในชนิดของปลาทองที่ศึกษาพบว่าไม่มีความแตกต่างทางสถิติ

อัญชนา และคณะ (2550) ได้ศึกษาระยะเวลาในการเหนี่ยวนำให้เกิดการสลบ พฤติกรรมการสลบ และการฟื้นสลบในปลาบึก (*Pangasianodon gigas*) ที่ใช้น้ำมันกานพลู และสาร MS-222 โดยแบ่งชุดการทดลองออกเป็น 6 กลุ่มๆ ละ 10 ตัว กลุ่มที่ 1, 2 และ 3 ใช้น้ำมันกานพลูความเข้มข้น 25, 50 และ 100 มิลลิกรัมต่อลิตร ตามลำดับ ส่วนกลุ่มที่ 4, 5 และ 6 ใช้ MS-222 ความเข้มข้น 25, 50 และ 100 มิลลิกรัมต่อลิตร ตามลำดับ ผลการศึกษาพบว่าระยะเวลาในการเหนี่ยวนำให้เกิดการสลบที่ระดับ 3 เพลน 2 ของกลุ่มที่ 1 คือ 8.02 $\pm$1.76 นาที กลุ่มที่ 2 คือ 3.03$\pm$0.715 นาที และกลุ่มที่ 3 คือ 1.49$\pm$0.134 นาที ซึ่งจะใช้เวลาน้อยลงเมื่อความเข้มข้นของน้ำมันกานพลูสูงขึ้นอย่างมีนัยสำคัญ ($P<0.05$) ในกลุ่ม MS-222 พบว่ากลุ่มที่ 6 เป็นกลุ่มเดียวที่เหนี่ยวนำให้เกิดการสลบสลบถึงระดับ 3 เพลน 2 (ตรวจสอบโดยการหนีบโคนครีบอกด้วยปากคีบ ปลามีอัตราการหายใจลดลง และนอนนิ่งอยู่ก้นบ่อ) ภายในเวลา 16.72$\pm$2.51 นาที ส่วนระยะเวลาที่ใช้ในการฟื้นสลบของกลุ่มที่ 1 คือ 4.28$\pm$0.84 นาที กลุ่มที่ 2 คือ 6.52$\pm$3.519 นาที และกลุ่มที่ 3 คือ 11.63$\pm$1.66 นาที ซึ่งจะใช้เวลามากขึ้นเมื่อความเข้มข้นของน้ำมันกานพลูสูงขึ้นอย่างมีนัยสำคัญ ($P<0.05$) และพฤติกรรมในการสลบของกลุ่มน้ำมันกานพลูพบว่าปลาบึกทดลองจะแสดงอาการกระวนกระวายมากกว่ากลุ่ม MS-222

Munday and Wilson (1997) ได้เปรียบเทียบประสิทธิภาพของน้ำมันกานพลูกับยาสลบชนิดอื่นเพื่อใช้เป็นยาสลบปลาในแนวปะการัง ได้แก่ปลา *Pomacentrus amboinensis* พบว่าน้ำมันกานพลูมีประสิทธิภาพดีที่สุดเมื่อเปรียบเทียบกับยาสลบชนิดอื่น และสิ่งที่เป็นข้อดีอีกอย่างสำหรับการใช้น้ำมันกานพลูกับปลาในแนวปะการังคือสารนี้ทำให้การฟื้นของปลาเกิดขึ้นได้ช้าซึ่งเหมาะกับการใช้ในภาคสนามที่ต้องการให้ปลาอยู่ในสภาพของการสลบเป็นเวลานาน

Keene *et al.* (1998) ได้ศึกษาประสิทธิภาพของน้ำมันกานพลูเพื่อใช้เป็นยาสลบปลา rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*, Walbaum) จากความเป็นพิษเฉียบพลันซึ่งพิจารณาจาก ค่า

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

LC_{50} ที่ 96 ชั่วโมง รวมทั้งพิจารณาเวลาที่เหนี่ยวนำให้เกิดการสลบและการฟื้นจากการสลบที่ความเข้มข้นต่างๆ โดยเปรียบเทียบประสิทธิภาพกับสาร MS-222 ซึ่งจากการทดลองพบว่าค่า LC_{50} ที่ 96 ชั่วโมง ของน้ำมันกานพลูกับปลา rainbow trout อยู่ที่ 9 มิลลิกรัมต่อลิตร และความเข้มข้นที่เหมาะสมสำหรับใช้สลบปลา rainbow trout ขนาดประมาณ 20 กรัมอยู่ที่ 40-60 มิลลิกรัมต่อลิตร ซึ่งเมื่อเปรียบเทียบกับสาร MS-222 พบว่าสารนี้มีประสิทธิภาพดีกว่าเนื่องจากสามารถทำให้ปลาสลบได้เร็วด้วยความเข้มข้นของสารที่น้อยกว่า

Wagner *et al.* (2002) ได้ศึกษาประสิทธิภาพการสลบปลาต่อการตอบสนองเกี่ยวกับความเครียดและอัตรารอดของไข่และอสุจิในปลา rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*, Walbaum) พ่อแม่พันธุ์ โดยการใช้ AQUI-S® (ประกอบด้วย isoeugenol ซึ่งเป็นอนุพันธุ์ของ eugenol 50% และสารอื่นอีก 50%) สาร MS-222 และ ก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ ในการสลบปลา จากการทดลองพบว่าปลาที่ใช้สาร AQUI-S® เป็นยาสลบจะมีผลในการควบคุมระดับของ plasma cortisol ให้ต่ำกว่าการทดลองอื่น และเมื่อพิจารณาภาพรวมของการสลบพบว่าทุกวิธีที่ใช้ในการสลบปลาพ่อแม่พันธุ์สามารถลดความเครียดในการจับเพื่อดำเนินการผสมพันธุ์ปลาได้แต่ไม่สามารถควบคุมความเครียดที่เกิดจากการปล่อยเซลล์สืบพันธุ์ของปลาได้ สังเกตจากอัตราการตายที่ไม่แตกต่างกันของทั้งไข่และอสุจิในชุดการทดลองที่ศึกษา แต่ถ้าพิจารณาถึงการใช้ให้เกิดประสิทธิภาพสูงสุดในการสลบปลา AQUI-S® น่าจะเป็นทางเลือกที่ดีที่สุดเนื่องจากมีประสิทธิภาพในการสลบที่ดีและราคาถูก

Walsh and Pease (2002) ได้ศึกษาการใช้น้ำมันกานพลูเป็นยาสลบปลา longfinned eel (*Anguilla reinhardtii*, Steindachner) พบว่าน้ำมันกานพลูสามารถใช้ในการสลบปลาชนิดนี้ได้ดีในช่วงอุหภูมิ 17-25 องศาเซลเซียสและความเค็มในช่วง 0-32 ppt และมีประสิทธิภาพดีกว่าเมื่อเปรียบเทียบกับสาร benzocaine ซึ่งเป็นสารที่มีความเสี่ยงต่อสุขภาพของมนุษย์

Hangono (2003) ได้ศึกษาการใช้น้ำมันกานพลูกับลูกปลากะพงขาว (*Lates calcarifer* Bloch) โดยพบว่าค่าความเป็นพิษเฉียบพลัน (LC_{50} ที่ 24 ชั่วโมง) ของน้ำมันกานพลูที่มีต่อลูกปลากะพงขาวอยู่ที่ 30 ppm ความเข้มข้นที่เหมาะสมของน้ำมันกานพลูในการสลบลูกปลาอยู่ที่ 20 ppm และความเข้มข้นที่ใช้เพื่อลดกิจกรรมลูกปลาระหว่างการขนส่งอยู่ที่ 5 ppm

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

Iversen *et al.* (2003) ศึกษาการใช้ยาสลบชนิดต่าง ๆ กับปลา Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) ได้แก่ น้ำมันกานพลู, Aqui-S™ (iso-eugenol), Benzok® และ Methomidate และศึกษาความสามารถของยาสลบแต่ละชนิดในการลดความเครียดของปลา จากการทดลองพบว่าสารทั้ง 4 ชนิดมีประสิทธิภาพในการสลบลูกปลา Atlantic salmon ที่ความเข้มข้น $\geq$ 2 มิลลิกรัมต่อลิตร สำหรับสาร methomidate และ $\geq$ 20 มิลลิกรัมต่อลิตร สำหรับ น้ำมันกานพลู, Aqui-S™ (iso-eugenol) และ Benzok® และเมื่อพิจารณาจากการควบคุมระดับ plasma cortisol พบว่าสารทั้งหมดยกเว้น Benzok® สามารถควบคุมระดับของ plasma cortisol ให้เป็นปกติได้ แต่เมื่อพิจารณา plasma lactate และ plasma glucose พบว่ายาสลบทุกชนิดมีผลต่อการเพิ่มขึ้นของ plasma lactate ที่ใกล้เคียงกันแต่ไม่มีผลต่อการเปลี่ยนแปลงของ plasma glucose ถ้าเปรียบเทียบถึงประสิทธิภาพของยาสลบพบว่ายาสลบที่ประกอบด้วยสาร eugenol และ อนุพันธ์ของสารนี้ ได้แก่ สาร Aqui-S™ (iso-eugenol) และน้ำมันกานพลูมีแนวโน้มที่จะนำมาใช้ได้อย่างมีประสิทธิภาพมากที่สุดเนื่องจากคุณสมบัติที่ดีในการลดความเครียดและสามารถใช้ได้ในระดับความเข้มข้นต่ำ ราคาถูก และเป็นมิตรต่อสิ่งแวดล้อมและผู้ใช้

Pirhonen and Schreck (2003) ได้ศึกษาผลของการสลบปลา steelhead trout (*Oncorhynchus mykiss*) โดยการใช้ สาร MS-222 น้ำมันกานพลู และคาร์บอนไดออกไซด์ โดยศึกษาการเปลี่ยนแปลงของระดับ plasma cortisol และการกินอาหาร หลังการสลบที่เวลา 4, 24 และ 48 ชั่วโมง จากการทดลองพบว่าการกินอาหารของปลาทั้งในชุดทดลองและชุดควบคุมไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ แต่ปลาในชุดควบคุมจะมีการกินอาหารที่ดีกว่าปลาในชุดทดลองที่ผ่านการสลบ และในกรณีของการตรวจวัดระดับ plasma cortisol หลังการสลบพบว่าระดับ plasma cortisol จะเพิ่มขึ้นสูงสุดที่เวลา 48 ชั่วโมงหลังการสลบ แต่เมื่อพิจารณาภายในชุดการทดลองพบว่าปลาที่สลบด้วยน้ำมันกานพลูจะมีระดับของ plasma cortisol ต่ำสุดเมื่อเทียบกับการสลบด้วยวิธีอื่น

Small (2003) ได้เปรียบเทียบประสิทธิภาพของสาร methomidate เพื่อใช้เป็นยาสลบปลา channel catfish (*Ictalurus punctatus*) โดยเปรียบเทียบประสิทธิภาพในการควบคุมการระดับ plasma cortisol กับยาสลบชนิดอื่นได้แก่ สาร MS-222, quinaldine และ น้ำมันกานพลู พบว่าการสลบปลาด้วยสาร methomidate และน้ำมันกานพลูสามารถควบคุมการเกิดความเครียดในปลาได้สังเกตจากระดับ plasma cortisol ที่ไม่สูงขึ้นมากนักเมื่อเปรียบเทียบกับการสลบโดยใช้สาร MS-222 และ สาร quinaldine ดังนั้น methomidate และน้ำมันกานพลูจึงมีประสิทธิภาพในการเป็นยาสลบสัตว์น้ำที่ดีกว่า

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

Cooke *et al.* (2004) ได้ประเมินความเข้มข้นของน้ำมันกานพลูที่จะนำมาใช้ในการจับและขนส่งปลา Largemouth bass (*Micropterus salmoidas*) พบว่าความเข้มข้นของน้ำมันกานพลูในช่วง 5-9 ppm สามารถใช้ในการลดกิจกรรมของปลาระหว่างการจับและขนส่งได้โดยไม่มีผลกระทบทางด้านลบต่อการเปลี่ยนแปลงทางสรีรวิทยาของปลามากนักโดยเฉพาะการเปลี่ยนแปลงที่เป็นผลเนื่องมาจากความเครียด

Grush *et al.* (2004) ได้ศึกษาประสิทธิภาพในการใช้น้ำมันกานพลูเพื่อเป็นยาสลบปลาม้าลายโดยพิจารณาจากค่า LC_{50} ที่ 96 ชั่วโมง และเวลาที่เหนี่ยวนำให้ปลาสลบและฟื้นจากการสลบโดยเปรียบเทียบประสิทธิภาพกับสาร MS-222 ภายใต้สภาพของการทดลองเดียวกัน จากการทดลองนี้พบว่าน้ำมันกานพลูมีค่า LC_{50} อยู่ที่ 21 ppm และความเข้มข้นที่ 60-100 ppm ของน้ำมันกานพลูเหมาะที่จะใช้ในการสลบปลาเนื่องจากสามารถทำให้ปลาสลบและฟื้นได้เร็ว และมีประสิทธิภาพดีกว่าเมื่อเปรียบเทียบกับการสลบปลาด้วยสาร MS-222

Kildea *et al.* (2004) ได้ศึกษาการสะสมของสาร eugenol จากน้ำมันกานพลูและ iso-eugenol จาก Aqui-S® ในเนื้อเยื่อของปลา perch (*Bidyanus bidyanus*) พบว่าหลังจากสลบปลาด้วยน้ำมันกานพลูเพื่อให้ง่ายต่อการจับ แล้วพักปลาไว้ 48 ชั่วโมง ปริมาณของสาร eugenol ที่ตรวจวัดจะน้อยกว่าระดับที่สามารถวัดได้ แต่เมื่อใช้น้ำมันกานพลูอีกครั้งในการขนส่งและพักปลาหลังการขนส่งไว้ 1 สัปดาห์ แล้วนำมาตรวจวัดสาร eugenol ในเนื้อเยื่ออีกครั้ง พบว่าสามารถตรวจวัดระดับของสารสะสมที่เพิ่มขึ้นในเนื้อเยื่อ 0.32 มิลลิกรัม/กิโลกรัม ซึ่งแสดงให้เห็นว่าการใช้สารนี้ซ้ำ ๆ กันมีผลต่อความสามารถในการขับสารออกจากร่างกายของปลาลดลง และนอกจากนี้อุณหภูมิยังมีผลต่อการขับสารออกจากร่างกายปลาด้วย โดยที่อุณหภูมิสูงปลา perch จะสามารถขับสารทั้ง eugenol และ iso-eugenol ออกจากร่างกายได้ดีกว่าที่อุณหภูมิต่ำ

Mylonas *et al.* (2005) ได้เปรียบเทียบประสิทธิภาพของน้ำมันกานพลู และสาร 2-phenoxyethanol ในการสลบปลา European sea bass (*Dicentrarchus labrax*) และปลา gilthead sea bream (*Sparus aurata*) ที่อุณหภูมิต่างกัน โดยพบว่าที่อุณหภูมิต่ำการสลบและการฟื้นของปลาจะใช้เวลานานกว่าที่อุณหภูมิสูง และเมื่อพิจารณาจากความเข้มข้นของสารที่ใช้ในการสลบพบว่าน้ำมันกานพลูสามารถใช้ในการสลบปลาได้อย่างมีประสิทธิภาพที่ความเข้มข้น 30 มิลลิกรัมต่อลิตร สำหรับใช้กับปลา European sea bass และ 55 มิลลิกรัมต่อลิตร สำหรับปลา gilthead sea bream ส่วนสาร 2-phenoxyethanol สามารถใช้ได้ที่ความเข้มข้น 300 มิลลิกรัมต่อลิตร เพื่อสลบปลา

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

European sea bass และ 450 มิลลิกรัมต่อลิตร เพื่อสลบปลา gilthead sea bream จากความเข้มข้นที่ใช้ในการสลบปลานี้ทำให้น้ำมันกานพลูมีประสิทธิภาพในการสลบที่ดีกว่าเนื่องจากสามารถใช้ในการสลบปลาได้ในระดับความเข้มข้นที่ต่ำกว่าสาร 2-phenoxyethanol ถึงสิบเท่า

Velisek *et al.* (2005) ได้ศึกษาประสิทธิภาพของน้ำมันกานพลูเพื่อใช้เป็นยาสลบปลา rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) (ขนาดความยาวเฉลี่ย 150±20 มิลลิเมตร และน้ำหนักเฉลี่ย 40±10 กรัม) รวมทั้งการประเมินความเป็นพิษเฉียบพลันและการเปลี่ยนแปลงทางด้านสรีรวิทยา โลหิตวิทยา และชีวเคมีที่เป็นผลจากการใช้ยาสลบ ซึ่งจากการทดลองนี้พบว่าความเป็นพิษเฉียบพลันที่ประเมินจากการหาค่า LC_{50} ที่ 96 ชั่วโมง อยู่ที่ 14.1 ppm ในส่วนของการเปลี่ยนแปลงทางโลหิตวิทยาพบว่าสารนี้มีผลต่อการเพิ่มขึ้นของกลูโคสและแอมโมเนียในเลือด แต่ไม่มีผลทำให้กิจกรรมของเอนไซม์ aspartate aminotransferase (AST) ลดลง การใช้น้ำมันกานพลูเป็นยาสลบไม่มีผลต่อการเปลี่ยนแปลงทางด้านพยาธิวิทยาของอวัยะต่าง ๆ ในปลาเช่นที่ ตับ ม้าม ไต ยกเว้นที่ gill lamellae มีการเปลี่ยนแปลงเล็กน้อยแต่พบเพียง 20% ของปลาที่ทำการทดลอง ส่วนในกรณีของการศึกษาทางด้านชีวเคมีไม่พบการเปลี่ยนแปลง ซึ่งจากการทดลองนี้ความเข้มข้นของน้ำมันกานพลูที่แนะนำให้ใช้กับปลา rainbow trout อยู่ที่ 30 มิลลิกรัมต่อลิตร

Hajek *et al.* (2006) ได้ศึกษาผลของการใช้น้ำมันกานพลูกับปลาคาร์พ พบว่าความเข้มข้นของยาสลบที่เหมาะสมกับการใช้ในการสลบปลาอยู่ในช่วง 30-50 มิลลิกรัมต่อลิตร เพื่อให้ปลาสลบเป็นเวลามากกว่า 5 นาที ในการทำกิจกรรมสำหรับการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำ

Palic *et al.* (2006) ได้ศึกษาประสิทธิภาพของยาสลบในการควบคุมการเกิดความเครียดในปลาโดยตรวจวัดจากระดับ plasma cortisol และการทำงานของเซลล์เม็ดเลือดขาวชนิด neutrophil ในส่วนของการเกิด oxidative burst และการแตกของแกลนูลในเซลล์ (degranulation) โดยศึกษาจากการใช้ยาสลบ 3 ชนิดกับปลา fathead minnow ได้แก่ สาร tricaine methanesulfonate (MS-222), metomidate hydrochloride (MTMD) และสาร eugenol โดยใช้ความเข้มของของยาสลบ 75 มิลลิกรัมต่อลิตร, 4 มิลลิกรัมต่อลิตร และ 30 มิลลิกรัมต่อลิตร ตามลำดับ และเหนี่ยวนำให้ปลาเกิดความเครียดโดยการจัดสภาพให้ปลาอยู่กันอย่างหนาแน่น จากการทดลองพบว่าการใช้สาร eugenol และสาร metomidate เป็นยาสลบนั้นมีประสิทธิภาพดีกว่าสาร MS-222 เนื่องจากสามารถช่วยรักษาระดับของ plasma cortisol ให้คงที่และ ช่วยป้องกันความเครียดที่มีผลต่อการลดบทบาทในการทำงานของ neutrophil ลงได้

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

Guénette *et al.* (2007) ได้ศึกษาข้อมูลทางเภสัชจลศาสตร์ของสาร eugenol ในปลา rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) โดยแช่ปลาในน้ำที่มีสาร eugenol ละลายอยู่ 75 ppm เป็นเวลา 15 นาที จากนั้นนำปลาไปพักฟื้นในน้ำปกติและเก็บตัวอย่างเลือดปลาที่เวลา 0.25, 0.5, 1, 2, 4, 6, 8, 24 และ 48 ชั่วโมงเพื่อนำไปวิเคราะห์หาผลทางด้านเภสัชจลศาสตร์ จากการทดลองนี้พบว่า Cmax ของสาร eugenol อยู่ที่ 10.53 μg/mL, AUC_{0-t} อยู่ที่ 16.55 μg h/mL, AUC_{0-inf} อยู่ที่ 17.04 μg h/mL และค่าครึ่งชีวิต (half life) อยู่ที่ 12.14 ชั่วโมง ซึ่งจากผลการทดลองนี้ชี้ให้เห็นว่าสาร eugenol สามารถถูกดูดซับและขับออกจากตัวปลาได้ดีในน้ำที่มีอุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส และจากการที่สารนี้มีค่าของครึ่งชีวิตที่นานจึงอาจเป็นผลให้มีการสะสมในเนื้อปลาได้หากมีการใช้สารนี้ซ้ำ ๆ กัน

Park *et al.* (2008) ได้ศึกษาประสิทธิภาพของน้ำมันกานพลูในการสลบปลา kelp grouper (*Epinephelus bruneus*) โดยพิจารณาประสิทธิภาพในการสลบจากเวลาที่เหนี่ยวนำให้ปลาสลบภายใน 3 นาที เวลาที่ทำให้ปลาฟื้นภายใน 10 นาที และการตอบสนองทางสรีรวิทยา ได้แก่ ระดับ plasma cortisol และ plasma glucose การทดลองได้ดำเนินการที่อุณหภูมิซึ่งแตกต่างกัน 3 ระดับได้แก่ 18, 22 และ 26 องศาเซลเซียส จากการศึกษานี้พบว่าที่อุณหภูมิต่ำ การเหนี่ยวนำให้ปลาสลบและการฟื้นจะเกิดขึ้นโดยใช้เวลานานกว่าเมื่อเปรียบเทียบกับการสลบที่อุณหภูมิสูง และความเข้มข้นที่เหมาะสมของน้ำมันกานพลูที่ใช้สลบปลาที่อุณหภูมิ 18 องศาเซลเซียส อยู่ที่ 250-300 มิลลิกรัมต่อลิตร ส่วนที่ 22 และ 26 องศาเซลเซียส อยู่ที่ 150-200 มิลลิกรัมต่อลิตร และ 50-100 มิลลิกรัมต่อลิตร ตามลำดับ และจากการใช้น้ำมันกานพลูที่ความเข้มข้น 150 มิลลิกรัมต่อลิตร เป็นยาสลบปลาที่อุณหภูมิ 22 องศาเซลเซียส พบว่าระดับของ plasma cortisol จะเพิ่มขึ้นสูงสุด (4.24±1.57 ug/dL) เมื่อเวลาผ่านไป 12 ชั่วโมงของการสลบ และระดับของ plasma glucose จะเพิ่มขึ้นสูงสุด (92.70±9.61 mg/dL) หลังจากผ่าน 2 ชั่วโมงของการสลบ

Weber *et al.* (2009) ได้ทดสอบประสิทธิภาพของน้ำมันกานพลูที่ใช้กับปลา Senegalese sole (*Solea senegalensis* Kaup 1858) พบว่าความเข้มข้นที่เหมาะสมที่เหนี่ยวนำให้เกิดการสลบอยู่ที่ 30 ppm

Saydmohammed and Pal (2009) ได้ศึกษาการใช้สาร Eugenol กับกุ้งก้ามกราม (*Macrobrachium rosenbergii*) พบว่าเมื่อแช่กุ้งก้ามกรามในสาร Eugenol ที่ความเข้มข้น 200 ไมโครลิตรต่อลิตรเป็นเวลา 30 นาที สารนี้จะอยู่ในเนื้อเยื่อประมาณ 24 ชั่วโมงและจะถูกขับออกจากร่างกายทั้งหมดเมื่อพ้นช่วงเวลาดังกล่าว

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

อุปกรณ์และวิธีการ

อุปกรณ์

1. สัตว์ทดลอง

สัตว์น้ำที่ใช้ในการทดลองได้แก่ ปลานิลแปลงเพศ น้ำหนักเฉลี่ย 0.30±0.01 กรัม ความยาวเฉลี่ย 2.63±0.25 เซนติเมตร ปลานิลขนาดลงกระชัง น้ำหนักเฉลี่ย 70.85±1.03 กรัม ความยาวเฉลี่ย 15.25±1.03 เซนติเมตร และปลาสวยงามได้แก่ ปลาหางไหม้น้ำหนักเฉลี่ย 3.01±0.48 กรัม และความยาวเฉลี่ย 6.93±0.28 เซนติเมตร ลูกปลานิลที่ใช้ในการทดลองครั้งนี้ได้มาจากสถานีวิจัยประมงกำแพงแสน คณะประมง มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ปลนิลขนาดลงกระชังได้จากฟาร์มบ่อดินของเอกชน และปลาหางไหม้ได้จากตลาดนัดปลาสวยงามที่สวนจตุจักร ทั้งนี้ต้องปรับสภาพปลาที่นำมาทดลองก่อนประมาณ 1 สัปดาห์ โดยให้อาหารเม็ดสำเร็จรูปวันละ 2 ครั้ง เช้า-เย็น และงดอาหารก่อนการทดลองเป็นเวลา 24 ชั่วโมง

2. สารเคมีที่ใช้เป็นยาสลบ

2.1 สารยูจีนอล (Eugenol)

สารยูจีนอลเป็นสารที่ได้จากวิธีการสังเคราะห์ซึ่งมีความเข้มข้นของสารออกฤทธิ์ 100% ลักษณะของสารจะเป็นของเหลว หนืด และเกิดฟองง่าย สารนี้ใช้เพื่อการทดสอบประสิทธิภาพในการสลบปลา โดยใช้ในระดับความเข้มข้นที่เป็นมิลลิกรัมต่อลิตร (ppm) สามารถใช้ได้โดยตรงด้วยการผสมน้ำ เก็บรักษาไว้ที่อุณหภูมิห้องและพ้นจากแสงเพื่อป้องกันการเสื่อมสภาพของสาร สารนี้ได้รับความอนุเคราะห์จากคณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล

2.2 น้ำมันกานพลู (Clove oil)

น้ำมันกานพลูซึ่งมีความเข้มข้นของสารออกฤทธิ์ 99% ใช้เปรียบเทียบประสิทธิภาพกับสารยูจีนอลสังเคราะห์ในการสลบปลา โดยใช้ในระดับความเข้มข้นที่เป็นมิลลิกรัมต่อลิตร

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

(ppm) สามารถใช้โดยตรงด้วยการผสมน้ำ เก็บรักษาไว้ในอุณหภูมิห้องและพ้นจากแสง เพื่อป้องกันการเสื่อมสภาพของสาร สารนี้ได้รับความอนุเคราะห์จากคณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล

2.3 สาร MS-222 (tricane methansulfonate)

สาร MS-222 ใช้เปรียบเทียบประสิทธิภาพในการสลบปลากับสารยูจีนอลสังเคราะห์ ลักษณะของสารเป็นผงสีขาวและละลายน้ำได้ดี สารนี้ใช้ในความเข้มข้นเป็นมิลลิกรัมต่อลิตร (ppm) สามารถใช้ด้วยการผสมน้ำโดยตรง เก็บรักษาให้ห่างจากความชื้นและแสง สารนี้สั่งซื้อจาก Sigma Inc. (St. Louis, Missouri U.S.A.)

3. อุปกรณ์และสารเคมีสำหรับศึกษาการเปลี่ยนแปลงทางด้านสรีรวิทยาและการตอบสนองทางภูมิคุ้มกัน

3.1 อุปกรณ์

3.1.1 หลอดเซนตริฟิวส์พลาสติกขนาด 1.5 มิลลิลิตร
3.1.2 หลอดเซนตริฟิวซ์พลาสติกขนาด 15 มิลลิลิตร
3.1.3 ปิเปตอัตโนมัติ (Automatic pipette/Tip: 10 μl, 200 μl, 1000 μl) COSTAR
3.1.4 ปิเปตอัตโนมัติแบบหลายช่อง COSTAR
3.1.5 Microplate 96 หลุม ชนิดก้นแบน และก้นโค้งมน
3.1.6 เครื่อง Microplate reader
3.1.7 หม้อนึ่งฆ่าเชื้อความดันไอน้ำ HIRAYAMA
3.1.8 เครื่องเขย่าตะกอน Vortex-2 Genie
3.1.9 ตู้บ่มเชื้อ MEMMERT
3.1.10 ตู้อบไอร้อน MEMMERT
3.1.11 เครื่องเขย่าปรับอุณหภูมิ
3.1.12 แผ่น slide แก้ว และ cover slip
3.1.13 จานแก้วสำหรับเลี้ยงเชื้อ
3.1.14 กระบอกฉีดยาขนาด 1 มิลลิลิตร และหัวเข็ม 24 G x 1 (0.55 x 25 มิลลิเมตร)
3.1.15 เครื่องปั่นเหวี่ยงแบบควบคุมอุณหภูมิ (Fix) TOMY MX-301

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

3.1.16 เครื่องปั่นเหวี่ยงแบบควบคุมอุณหภูมิ (Swing rotors) Hettich Zentrifugen

3.1.17 สไลด์นับเม็ดเลือด (Haemacytometer)/ ตัวนับ (Counter)

3.1.18 กล้องจุลทรรศน์ OLYMPUS

3.1.19 ชุดเครื่องมือผ่าตัด

3.1.20 หัวกรอง (Filter set/ 0.2 and 0.45 μm filter)

3.1.21 ผ้ากรองไนลอน/หลอดฝามน

3.1.22 แท่งแก้ว/พลาสติกสำหรับบดตัวอย่าง

3.1.23 ขวด/บีกเกอร์/กระบอกตวง

3.1.24 เครื่องชั่งทศนิยม 3 ตำแหน่ง

3.2 สารเคมี

3.2.1 น้ำเกลือ 0.85% ที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว

3.2.2 อาหารเลี้ยงเซลล์ RPMI-1640

3.2.3 สีย้อมเม็ดเลือด (Diff-quick staining)

3.2.4 สารป้องกันการแข็งตัวของเลือด (Heparin)

3.2.5 สารแยกเม็ดเลือด (Lymphopep)

3.2.6 1 N HCl และ 1 NaOH สำหรับปรับค่าความเป็นกรด-เป็นด่างของสาร

3.2.7 Nitroblue Tetrazolium (NBT)

3.2.8 KOH

3.2.9 DMSO

3.2.10 Methanol

3.2.11 PBS (Phosphate buffer saline)

3.2.12 100 IU ml/1 penicillin

3.2.13 0.1 mg ml/1 streptomycin

3.2.14 4 mM L-glutamine

3.2.15 อาหารเลี้ยงเชื้อ Trypticase Soy Agar (TSA) และ Brain Heart Infusion Agar (BHIA)

3.2.16 อาหารเลี้ยงเชื้อ Trypticase Soy Broth (TSB) และ Brain Heart Infusion Broth (BHIB)

3.2.17 Latex bead

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

4. อุปกรณ์และสารเคมีสำหรับการวิเคราะห์คุณภาพน้ำ

4.1 อุปกรณ์

4.1.1 ขวดเก็บตัวอย่างน้ำขนาด 1 ลิตร
4.1.2 เครื่องแก้ว เช่น Beaker Flask และ Pasteur pipette
4.1.3 เครื่องวัดค่าการดูดกลืนแสง (Spectrophotometer)
4.1.4 เครื่องวัดค่าความเป็นกรด-เป็นด่าง (pH meter)
4.1.5 เครื่องวัดปริมาณออกซิเจนที่ละลายน้ำ (DO meter)
4.1.6 แท่งวัดอุณหภูมิ (Thermometer)

4.2 สารเคมี

4.2.1 Sodium hydroxide (NaOH)
4.2.2 Magnesium sulphate ($MgSO_4.7H_2O$)
4.2.3 Phenol C_6H_5OH
4.2.4 Disodium nitroprusside dehydrate ($Na_2Fe(CN)_5NO.2H_2O$)
4.2.5 Potassium iodide (KI)
4.2.6 Sodium iodide (NaI)
4.2.7 Sulfuric acid (H_2SO_4)
4.2.8 Hypochlorite
4.2.9 Thiosulfate
4.2.10 Ammonium chloride (NH_4Cl)
4.2.11 Sulfanilamide
4.2.12 Hydrochloric acid (HCl)
4.2.13 N-(1-naphthyl)-ethylenediamine dihydrochloride
4.2.14 Sodium nitrite ($NaNO_2$)
4.2.15 อาหารเลี้ยงเชื้อ Plate Count Agar (PCA)

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

5. อุปกรณ์สำหรับการเลี้ยงและขนส่งปลา

5.1 ถุงพลาสติก (40 x 60 เซ็นติเมตร) และขนาด (20 x 20 เซ็นติเมตร) และยางรัด
5.2 กล่องโฟม
5.3 ถังออกซิเจน
5.4 ผ้ายางและกระสอบป่าน
5.5 บ่อปูนขนาดบรรจุ 1.5 ลูกบาศก์เมตร
5.6 ถังไฟเบอร์กลาสขนาดบรรจุ 1 ลูกบาศก์เมตร และ 500 ลิตร
5.7 โหลแก้วขนาดบรรจุ 10 ลิตร
5.8 ตู้ปลาขนาดบรรจุ 40 ลิตร
5.9 อุปกรณ์ในการให้อากาศในน้ำ เช่น สายยาง หัวทราย
5.10 สวิง และอุปกรณ์สำหรับเปลี่ยนถ่ายน้ำ

6. จุลชีพที่ใช้ในการทดลอง

เชื้อ *Streptococcus agalactiae* ใช้เพื่อเตรียมเป็นวัคซีนและใช้เป็น antigen สำหรับการทำ Agglutination test

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

วิธีการ

1. การหาความเข้มข้นของยาสลบที่ทำให้ลูกปลานิลแปลงเพศตายได้ 50% (LC_{50}) ภายในระยะเวลา 24 ชั่วโมง

การทดลองในส่วนนี้เป็นการหาค่ากลางของความเป็นพิษเพื่อนำมาประเมินความเข้มข้นสูงสุดของยาสลบที่สามารถนำมาใช้ได้โดยมีผลกระทบต่อปลาน้อยที่สุด โดยใช้วิธีการทดสอบความเป็นพิษเฉียบพลัน (Acute toxicity test) แบบ Static bioassy คือ การทดลองในตู้กระจกโดยการเติมสารทดลองเพียงครั้งเดียวเพื่อหาค่าความเป็นพิษของยาสลบแต่ละชนิดที่ทำให้ลูกปลานิลขนาด 0.30±0.01 กรัม ตายได้ 50% ภายในเวลา 24 ชั่วโมง โดยยาสลบที่ใช้ในการทดลองส่วนนี้ได้แก่ สารยูจีนอลสังเคราะห์ น้ำมันกานพลู และสาร MS-222 โดยแบ่งออกเป็น 2 ส่วน คือ

1.1 การหาช่วงของความเข้มข้น (Range finding test)

การทดลองส่วนนี้เป็นการหาช่วงของความเข้มข้นต่ำสุดที่ทำให้ปลาตาย 100% จนถึงความเข้มข้นสูงสุดที่ไม่มีการตายของปลาเพื่อนำไปใช้ในการทดลองขั้นสุดท้าย (Definitive test) ต่อไป ความเข้มข้นเริ่มต้นของสารที่ใช้ในการทดลองนี้ ได้แก่ 0, 5, 10, 15, 20, 25 และ 30 ppm สำหรับสารยูจีนอลสังเคราะห์และน้ำมันกานพลู และ 30, 45, 60, 75, 90 และ 105 ppm สำหรับสาร MS-222 ปลาที่ใช้ในการทดลองนี้เป็นลูกปลานิลแปลงเพศ น้ำหนักเฉลี่ย 0.30±0.01 กรัม ความยาวเฉลี่ย 2.63±0.25 เซนติเมตร โดยนำลูกปลา 10 ตัวจากบ่อพักมาใส่ในโหลแก้วที่มียาสลบละลายอยู่ในน้ำตามระดับความเข้มข้นที่แบ่งไว้ ความเข้มข้นละ 3 ซ้ำ ตามชนิดของสารที่ทำการทดลอง การทดลองจะใช้เวลาในการบันทึกผล 24 ชั่วโมง โดยช่วงเวลา 12 ชั่วโมงแรกจะบันทึกผลการตายของปลาในทุก 3 ชั่วโมง และหลังจากนั้นให้บันทึกผลทุก 6 ชั่วโมงจนครบเวลา 24 ชั่วโมง สำหรับการตายของปลานั้นสังเกตจากการเปิดปิดแผ่นปิดเหงือก ถ้าปลาไม่มีการเปิดปิดแผ่นปิดเหงือกเกิน 15 นาทีแสดงว่าปลานั้นตายแล้ว

1.2 การทดลองขั้นสุดท้าย (Definitive test)

การทดลองส่วนนี้เป็นการทดลองต่อจากการทดลองในส่วนแรกโดยนำช่วงของความเข้มข้นต่ำสุดที่ทำให้ปลาตาย 100% จนถึงความเข้มข้นสูงสุดที่ไม่มีการตายของปลาจากการทดลอง

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

แรกมาแบ่งช่วงความเข้มข้นใหม่เป็นแบบ logarithm แล้วทำการทดลองโดยใช้วิธีการเดียวกับการทดลองครั้งแรก เมื่อได้ผลจากการทดลองให้นำข้อมูลการตายของปลาในแต่ละความเข้มข้นไปหาค่า LC_{50} ที่ 24 ชั่วโมง โดยวิเคราะห์จากวิธี Probit Analysis (Finney, 1971)

2. การหาความเข้มข้นที่เหมาะสมของสารยูจีนอลสังเคราะห์ น้ำมันกานพลู และสาร MS-222 เพื่อใช้ในการสลบปลา

การศึกษานี้ดำเนินการเพื่อเปรียบเทียบประสิทธิภาพของสารยูจีนอลที่ได้จากการสังเคราะห์กับน้ำมันกานพลู และสาร MS-222 โดยทำการศึกษาในปลานิลซึ่งเป็นตัวแทนของกลุ่มปลาที่เป็นอาหาร และปลาหางไหม้ซึ่งเป็นตัวแทนของกลุ่มปลาสวยงาม สำหรับขั้นตอนในการหาระดับความเข้มข้นที่เหมาะสมมีดังนี้

2.1 หาช่วงของความเข้มข้นเริ่มต้นของยาสลบทั้งสามชนิดโดยพิจารณาจากเอกสารอ้างอิงและกลุ่มของสัตว์ทดลอง จากนั้นเลือกระดับความเข้มข้นของยาสลบที่ใช้ในการทดลองทั้งสามชนิด สำหรับส่วนนี้ได้ระบุความเข้มข้นที่ใช้ในแต่ละระดับไว้ดังตารางที่ 9

ตารางที่ 9 ระดับความเข้มข้นของยาสลบแต่ละชนิดที่ใช้เพื่อการหาความเข้มข้นที่เหมาะสมในการสลบปลา

ชนิดของสาร	ระดับความเข้มข้นที่เลือกใช้ (ppm)		
	ปลานิลขนาดเล็ก	ปลานิลขนาดลงกระชัง	ปลาหางไหม้
สารยูจีนอลสังเคราะห์	5, 10, 15, 20, 25	10, 20, 30, 40, 50	5, 10, 15, 20, 25
น้ำมันกานพลู	5, 10, 15, 20, 25	10, 20, 30, 40, 50	5, 10, 15, 20, 25
สาร MS-222	30, 45, 60, 75, 90, 105, 120	55, 100, 145, 190, 235	30, 45, 60, 75, 90

2.2 ในแต่ละระดับความเข้มข้นของชุดการทดลองจะใช้สัตว์ทดลอง 30 ตัว สำหรับลูกปลานิลเล็กขนาด 0.30±0.01 กรัม และ 10 ตัว สำหรับปลานิลขนาด 70.85±1.03 กรัม (ขนาดลงกระชัง) และปลาหางไหม้ขนาด 3.01±0.48 กรัม ปลาแต่ละชนิดจะถูกนำมาเลี้ยงเพื่อปรับสภาพเป็นระยะเวลา 7 วัน ในบ่อปูนขนาด 1 ตันที่มีปริมาตรน้ำ 800 ลิตร โดยแบ่งปลาแต่ละชนิดออกเป็น 3

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

บ่อ จำนวนปลาที่เลี้ยงต่อ 1 บ่อ คือ 250 ตัวต่อบ่อ สำหรับลูกปลานิลขนาดเล็ก ส่วนปลานิลขนาดลงกระชังและปลาหางไหม้มีปลาทั้งหมด 60 ตัวต่อบ่อ

2.3 ใส่น้ำในโหลแก้วขนาด 10 ลิตร ให้ได้ปริมาตร 2.5 ลิตร สำหรับปลานิลเล็ก และ 5 ลิตร สำหรับปลานิลขนาดลงกระชัง และปลาหางไหม้ ละลายยาสลบแต่ละชนิดในน้ำ เพื่อให้ได้ความเข้มข้นสุดท้ายที่ระดับความเข้มข้นดังตารางที่ 9

2.4 สุ่มตัวอย่างปลาจากบ่อพักปลาที่ได้แบ่งไว้ 3 บ่อ สำหรับลูกปลานิลขนาดเล็กสุ่มมาบ่อละ 10 ตัว จะได้จำนวนปลาทั้งหมด 30 ตัว เพื่อใช้สำหรับการสลบในแต่ละระดับความเข้มข้นของสารแต่ละชนิด ในกรณีของปลานิลขนาดลงกระชังและปลาหางไหม้ ใช้ปลาสำหรับการสลบในแต่ละระดับความเข้มข้นของสารแต่ละชนิดจำนวน 10 ตัวโดยสุ่มตัวอย่างจากบ่อทดลองเป็น 3, 3, 4 ตัว จากบ่อพักปลา 3 บ่อ

2.5 นำปลามาใส่ในน้ำที่มียาสลบทั้งสามชนิดของแต่ละระดับความเข้มข้น โดยจับเวลาทันทีที่ปลาสัมผัสกับน้ำที่มียาสลบและให้ปลาอยู่ในน้ำที่มียาสลบเป็นระยะเวลา 20 นาที จากนั้นเมื่อครบเวลาที่กำหนด นำปลาที่สลบไปทำให้ฟื้นในน้ำปกติในตู้ปลาขนาด 40 ลิตร ที่มีการให้อากาศตลอดเวลา โดยจับเวลาทันทีที่ปลาสัมผัสกับน้ำปกติ

2.6 บันทึกผลในส่วนของพฤติกรรม และอัตรารอดของสัตว์น้ำตั้งแต่เริ่มต้นจนสิ้นสุดการทดลอง รวมทั้งพิจารณาถึงระยะเวลาที่ทำให้สัตว์น้ำเข้าสู่ระยะต่าง ๆ ของการสลบและเวลาในการฟื้นตัวของสัตว์น้ำหลังจากนำมาใส่น้ำปกติ ลักษณะของการสลบในแต่ละระยะอ้างอิงจาก Summerfelt and Smith (1990) ลักษณะของการฟื้นอ้างอิงจาก Iwama and Ackerman (1994)

2.7 นำข้อมูลของระยะเวลาที่เหนี่ยวนำให้เกิดการสลบแต่ละระยะและเวลาที่ปลาฟื้นมาหาค่าเฉลี่ย

2.8 นำข้อมูลที่ได้มาเลือกเฉพาะระดับความเข้มข้นของยาสลบต่ำสุดที่ทำให้ปลาเข้าสู่ระยะ sedation (กิจกรรมต่าง ๆ ของร่างกายลดลงแต่สมดุลของร่างกายยังปกติ อัตราการเปิดปิด operculum ลดลง) และระยะที่ 4 ของการสลบ (ปลาสูญเสียสมดุลร่างกายและการทรงตัว ไม่มีการตอบสนองต่อสิ่งกระตุ้น ความเจ็บปวด แรงกดระดับลึก และอัตราการหายใจต่ำลงมาก) ได้เร็วที่สุด

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ภายในเวลาประมาณ 3 นาที และมีการฟื้นตัวเป็นปกติ (stage 3 of recovery) เมื่ออยู่ในน้ำปกติได้เร็วที่สุดประมาณ 10 นาทีหรือน้อยกว่า เพื่อนำมาใช้เป็นระดับความเข้มข้นที่เหมาะสมสำหรับการทดลองในขั้นตอนต่อไป (ดัดแปลงจาก วิธีการของ Gilderhus and Marking, 1987 และ Iversen *et al*., 2003)

2.9 ปลาที่ฟื้นจากการสลบในทุกระยะของการสลบและในทุกความเข้มข้นที่ทำการทดลองได้ถูกนำไปเลี้ยงต่อในตู้กระจกขนาด 100 ลิตร (ลูกปลานิลและปลาหางไหม้) และถังพลาสติกขนาด 300 ลิตร (ปลานิลขนาดลงกระชัง) เป็นระยะเวลา 7 วัน โดยให้อากาศตลอดเวลา และให้อาหารสำเร็จรูปวันละ 1 มื้อ เพื่อประเมินถึงผลกระทบของปลาหลังจากการใช้ยาสลบ

3. การศึกษาผลของการใช้สารยูจีนอลสังเคราะห์และสาร MS-222 ต่อการเปลี่ยนแปลงระดับ cortisol และ glucose ในซีรั่มของปลานิลหลังจากกระตุ้นให้เกิดความเครียด

การทดลองส่วนนี้เป็นการศึกษาประสิทธิภาพของยาสลบในการลดความเครียดของปลาโดยอาศัยการตรวจวัดปัจจัยทางด้านสรีรวิทยาที่เกิดการเปลี่ยนแปลงขึ้นเนื่องจากการเหนี่ยวนำของความเครียด ได้แก่ การเปลี่ยนแปลงของระดับ cortisol และ glucose ในซีรั่ม

3.1 การวางแผนการทดลอง

รูปแบบของการทดลองนี้เป็นการจำลองสถานการณ์ที่ทำให้ปลาเกิดความเครียดโดยเลียนแบบการขนส่ง เนื่องจากในขั้นตอนของกิจกรรมการขนส่งมักเป็นสาเหตุหลักของการเหนี่ยวนำให้เกิดความเครียดในปลา วางแผนการทดลองเป็นแบบสุ่มสมบูรณ์ (Completely Randomized Design) โดยแบ่งชุดการทดลองออกเป็น 3 ชุด ซึ่งประกอบด้วย 3 ซ้ำ คือ

<u>ชุดการทดลองที่ 1</u> ให้ปลาอยู่ในสภาวะเครียดโดยเลียนแบบการขนส่งและไม่ใช้ยาสลบ (ชุดควบคุม)

<u>ชุดการทดลองที่ 2</u> ให้ปลาอยู่ในสภาวะเครียดโดยเลียนแบบการขนส่งและใช้สารยูจีนอลสังเคราะห์เป็นยาสลบ

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ชุดการทดลองที่ 3 ให้ปลาอยู่ในสภาวะเครียดโดยเลียนแบบการขนส่งและใช้สาร MS-222 เป็นยาสลบ

การทดลองนี้ใช้เวลาในการทำให้ปลาเครียด 3 ชั่วโมง โดยมีการตรวจวัดระดับของ cortisol และ glucose ในซีรั่มในสภาพปกติก่อนการทดลองทำให้ปลาเครียด และหลังการทดลองที่เวลา 0 ชั่วโมง, 1 ชั่วโมง, 6 ชั่วโมง และ 12 ชั่วโมง และใช้สารยูจีนอลสังเคราะห์ และสาร MS-222 ในระดับความเข้มข้นที่ทำให้ปลาลดกิจกรรมลง ไม่ได้สลบโดยสมบูรณ์ และไม่เสียสมดุล (ระยะ 1-2 ของการสลบ หรือ sedation stage) ซึ่งระดับความเข้มข้นที่ใช้นี้ได้จากข้อมูลของการทดลองที่ 2 สำหรับสัตว์ทดลองที่ใช้ คือ ปลานิลขนาดลงกระชัง (น้ำหนักเฉลี่ย 70.85±1.03 กรัม ความยาวเฉลี่ย 15.25±1.03 เซนติเมตร) ทั้งนี้เพื่อให้ง่ายต่อการเก็บเลือดในการแยกส่วนของซีรั่มมาศึกษาปริมาณของ cortisol และ glucose ที่เกิดขึ้นเพื่อตอบสนองต่อความเครียด

3.2 ขั้นตอนการทดลอง

3.2.1 ปรับสภาพปลานิลโดยการนำมาเลี้ยงในบ่อปูนขนาด 1 ตัน 3 บ่อ ในระดับความหนาแน่นที่เหมาะสม ให้อากาศอย่างเพียงพอ และมีการหมุนเวียนของน้ำเพื่อให้ปลามีสุขภาพดีก่อนนำมาทดลอง โดยใช้เวลาในการปรับสภาพปลา 7 วัน ให้อาหารเม็ดสำเร็จรูป 2 ครั้งต่อวัน เช้า-เย็น และงดอาหารก่อนทำการทดลองเป็นเวลา 24 ชั่วโมง

3.2.2 หลังจากปรับสภาพปลาเป็นระยะเวลา 7 วันแล้ว เริ่มการทดลองโดยสุ่มตัวอย่างปลา 10 ตัว จากบ่อพักมาเก็บเลือด เพื่อนำไปตรวจวัดระดับของ cortisol และ glucose เริ่มต้นก่อนการขนส่ง

3.2.3 เตรียมถุงพลาสติกขนาดความกว้าง 16 นิ้ว x ความยาว 26 นิ้ว โดยใส่น้ำสะอาดที่ลดอุณหภูมิลงเหลือ 24 ^{o}C ในถุงพลาสติกปริมาตร 3 ลิตร จำนวน 36 ถุง (ชุดการทดลองละ 12 ถุง)

3.2.4 ใส่ยาสลบแต่ละชนิดให้เข้ากันโดยทั่วกับน้ำในถุงพลาสติกทุกใบตามความเข้มข้นในระดับที่ทำให้ปลาสงบลง

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

3.2.5 ใส่ปลานิลที่ผ่านการปรับสภาพแล้วเป็นเวลา 7 วัน ในถุงพลาสติกทุกใบ จำนวน 5 ตัว/ถุง (ปลา 1 ถุง แทน 1 ซ้ำ)

3.2.6 อัดอากาศจนเต็มถุง โดยให้มีพื้นที่ของอากาศ 2 ส่วน ต่อพื้นที่ของน้ำในถุง 1 ส่วน จากนั้นรัดปากถุงด้วยยางวงให้แน่น

3.2.7 ทิ้งให้ปลาอยู่ในถุงเพื่อกระตุ้นให้เกิดความเครียดเป็นเวลา 3 ชั่วโมง

3.2.8 เมื่อสิ้นสุดระยะเวลาที่กระตุ้นให้เกิดความเครียด สุ่มเก็บตัวอย่างเลือดปลา 10 ตัวต่อชุดการทดลอง (3, 3 และ 4 ตัว จาก 3 ถุง) ที่เวลา 0 ชั่วโมงหลังการขนส่งทันที ส่วนปลาที่เหลือของแต่ละชุดการทดลองให้นำไปพักไว้ในบ่อปูนขนาด 1 ตัน ซึ่งมีน้ำอยู่ 800 ลิตร ชุดการทดลองละ 3 บ่อ (1 บ่อ แทน 1 ซ้ำ) แต่ละบ่อจะมีปลาอยู่ 15 ตัว เพื่อใช้ในการเก็บตัวอย่างของช่วงเวลาที่ 1, 6 และ 12 ชั่วโมง หลังการขนส่งต่อไป โดยการเก็บตัวอย่าง จะสุ่มมา 10 ตัว ต่อชุดการทดลอง เหมือนที่เวลา 0 ชั่วโมงหลังการขนส่ง (3, 3 และ 4 ตัว จาก 3 บ่อ)

3.2.9 เลือดที่ได้จากตัวอย่างปลาในแต่ละช่วงเวลา จะถูกนำไปปั่นเหวี่ยงด้วยเครื่องปั่นเหวี่ยงแบบควบคุมอุณหภูมิที่ 3,000 rpm เป็นเวลา 10 นาที เพื่อแยกส่วนของซีรั่มไปใช้ในการตรวจวัดระดับ cortisol และ glucose ต่อไป โดยที่การวิเคราะห์หา cortisol นั้น จะใช้ซีรั่มที่สุ่มมาจากปลา 5 ตัว ของแต่ละช่วงเวลาที่สุ่มตัวอย่างข้างต้น

3.3 วิธีการตรวจวัดระดับ cortisol และ glucose ในซีรั่ม

การตรวดวัดระดับ cortisol และ glucose จะดำเนินการตามช่วงเวลาคือ ก่อน และหลังการกระตุ้นให้เกิดความเครียด ที่ 0, 1, 6 และ 12 ชั่วโมง ในการตรวจวัดระดับ cortisol จะใช้เครื่อง ADVIA Centaur CP โดยอาศัยหลักการ CMIA (Chemiluminescent microparticle immunoassay) ส่วนการตรวจวัดระดับ glucose ใช้ชุดทดสอบ Liquid –Glucose (BIOTECH REAGENT) โดยอาศัยวิธี GOD-PAP Method และวัด end point โดยอาศัย Enzymatic Colorimetric Test

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

3.4 การวิเคราะห์ข้อมูล

วิเคราะห์ความแตกต่างของระดับ cortisol และ glucose ในแต่ละชุดการทดลองโดยใช้การวิเคราะห์ความแปรปรวน (Analysis of variance) ตามแผนการทดลองแบบสุ่มสมบูรณ์ (Completely Randomized Design) และเปรียบเทียบความแตกต่างทางสถิติของค่าเฉลี่ยระหว่างชุดการทดลองโดยใช้ Duncan's New Multiple Range Test ที่ระดับความเชื่อมั่น 95% (จรัญ, 2549; อัจฉริยา, 2552; Steel and Torrie, 1986)

4. การศึกษาผลของการใช้สารยูจีนอลสังเคราะห์และสาร MS-222 ต่อการตอบสนองของระบบภูมิคุ้มกันแบบไม่จำเพาะของปลานิลหลังกระตุ้นให้เกิดความเครียด

4.1 การวางแผนการทดลอง

รูปแบบของการทดลองนี้เป็นการจำลองสถานการณ์ที่ทำให้ปลาเกิดความเครียดโดยเลียนแบบการขนส่ง เนื่องจากในขั้นตอนของกิจกรรมการขนส่งมักเป็นสาเหตุหลักของการเหนี่ยวนำให้เกิดความเครียดในปลา และความเครียดอาจมีผลกระทบในด้านลบต่อการทำงานในระบบต่าง ๆ ของร่างกาย เช่น การเสื่อมลงของระบบภูมิคุ้มกันทั้งแบบจำเพาะและไม่จำเพาะ ซึ่งการทดลองในส่วนนี้จะเป็นการทดลองผลที่เกิดขึ้นต่อการตอบสนองของระบบภูมิคุ้มกันแบบไม่จำเพาะโดยพิจารณาจากขบวนการ Phagocytosis และการผลิต Superoxide anion ของเม็ดเลือดขาว ซึ่งมีการวางแผนการทดลองเป็นแบบสุ่มสมบูรณ์ (Completely Randomized Design) โดยแบ่งชุดการทดลองออกเป็น 3 ชุด ซึ่งประกอบด้วย 3 ซ้ำ คือ

<u>ชุดการทดลองที่ 1</u> ให้ปลาอยู่ในสภาวะเครียดโดยการเลียนแบบการขนส่งและไม่ใช้ยาสลบ (ชุดควบคุม)

<u>ชุดการทดลองที่ 2</u> ให้ปลาอยู่ในสภาวะเครียดโดยการเลียนแบบการขนส่งและใช้สารยูจีนอลสังเคราะห์เป็นยาสลบ

<u>ชุดการทดลองที่ 3</u> ให้ปลาอยู่ในสภาวะเครียดโดยการเลียนแบบการขนส่งและใช้สาร MS-222 เป็นยาสลบ

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

การทดลองนี้ใช้เวลาในการให้ปลาอยู่ในสภาวะเครียด 3 ชั่วโมง โดยมีการสุ่มตัวอย่างปลาทั้งในสภาพปกติก่อนและหลังการทดลองที่เวลา 0 ชั่วโมง, 1 วัน, 3 วัน และ 7 วัน เพื่อเก็บไตส่วนหน้าและเลือดสำหรับนำไปใช้ในการตรวจวัดการทำงานของระบบภูมิคุ้มกันแบบไม่จำเพาะ

ใช้สารยูจีนอลสังเคราะห์ และสาร MS-222 ในระดับความเข้มข้นที่ทำให้ปลาลดกิจกรรมลง ไม่ได้สลบโดยสมบูรณ์ และไม่เสียสมดุล (ระยะ 1-2 ของการสลบ หรือ sedation stage) ซึ่งได้จากการทดลองที่ 2

สัตว์ทดลองที่ใช้ คือ ปลานิลขนาดลงกระชัง (น้ำหนักเฉลี่ย 70.85±1.03 กรัม ความยาวเฉลี่ย 15.25±1.03 เซนติเมตร)

4.2 ขั้นตอนการทดลอง

4.2.1 ปรับสภาพปลานิลโดยการนำมาเลี้ยงในบ่อปูนขนาด 1 ตัน 3 บ่อ ในระดับความหนาแน่นที่เหมาะสม ให้อากาศอย่างเพียงพอ และมีการหมุนเวียนของน้ำเพื่อให้ปลามีสุขภาพดีก่อนนำมาทำการทดลอง โดยใช้เวลาในการปรับสภาพปลา 7 วัน ให้อาหารเม็ดสำเร็จรูป 2 ครั้งต่อวัน เช้า-เย็น และงดอาหารก่อนทำการทดลองเป็นเวลา 24 ชั่วโมง

4.2.2 หลังจากปรับสภาพปลาเป็นระยะเวลา 7 วันแล้ว เริ่มการทดลองโดยแต่ละชุดการทดลองจะสุ่มตัวอย่างปลามา 10 ตัว จากบ่อปูน 3 บ่อ (3, 3, 4 ตัวต่อบ่อ) สำหรับเก็บไตส่วนหน้าเพื่อนำไปตรวจวัดค่าที่ต้องการศึกษาในระบบภูมิคุ้มกันแบบไม่จำเพาะที่เวลาเริ่มต้นก่อนการทำให้เกิดความเครียด

4.2.3 เตรียมถุงพลาสติกขนาดความกว้าง 16 นิ้ว x ความยาว 26 นิ้ว โดยใส่น้ำสะอาดที่ลดอุณหภูมิลงเหลือ 24 องศาเซลเซียส ในถุงพลาสติกปริมาตร 3 ลิตร จำนวน 36 ถุง

4.2.4 ใส่ยาสลบแต่ละชนิดให้เข้ากันโดยทั่วกับน้ำในถุงพลาสติกทุกใบตามความเข้มข้นในระดับที่ทำให้ปลาสงบลง

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

4.2.5 ใส่ปลานิลที่ผ่านการปรับสภาพแล้วเป็นเวลา 7 วัน ในถุงพลาสติกทุกใบ จำนวน 5 ตัวต่อถุง

4.2.6 อัดอากาศจนเต็มถุง โดยให้มีพื้นที่ของอากาศ 3 ส่วน ต่อพื้นที่ของน้ำในถุง 1 ส่วน จากนั้นรัดปากถุงด้วยยางวงให้แน่น

4.2.7 ทิ้งให้ปลาอยู่ในถุงเพื่อกระตุ้นให้เกิดความเครียดเป็นเวลา 3 ชั่วโมง

4.2.8 สุ่มเก็บตัวอย่าง 10 ตัวต่อชุดการทดลองที่ 0 ชั่วโมงทันที ส่วนปลาที่เหลือของแต่ละชุดการทดลองให้นำไปพักไว้ในบ่อปูนขนาด 1 ตัน ซึ่งมีน้ำอยู่ 800 ลิตร 3 บ่อ (1 บ่อ แทน 1 ซ้ำ) แต่ละบ่อจะมีปลาอยู่ 15 ตัว เพื่อใช้ในการเก็บตัวอย่างของช่วงเวลาที่ 1, 3 และ 7 วัน หลังการขนส่งต่อไป โดยการเก็บตัวอย่างจะสุ่มมา 10 ตัว ต่อชุดการทดลองเหมือนที่ 0 ชั่วโมง

4.3 การศึกษาระบบภูมิคุ้มกันแบบไม่จำเพาะ

4.3.1 การแยกเซลล์เม็ดเลือดขาวจากไตส่วนหน้า

การแยกเซลล์เม็ดเลือดขาวจากไตส่วนหน้าดัดแปลงจากวิธีการของ Christybapita *et al*. (2007) และ Ortuno *et al*. (2003) โดยการตัดไตส่วนหน้าใส่ใน plate แก้ว ที่มี sRPMI-1640 medium I (RPMI-1640 เสริมด้วย sodium heparin 50 IU ต่อ มิลลิลิตร, penicillin 100 IU ต่อ มิลลิลิตร และstreptomycin 0.1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร) อยู่ 3 มิลลิลิตร ตัดด้วยกรรไกรที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว ให้ชิ้นไตละเอียดที่สุด จากนั้นดูดส่วนใสจาก plate ผ่านผ้ากรองไนลอนขนาดตา 100 μm ที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้วลงในหลอด polyethylene (conical tube) ขนาด 10 มิลลิลิตร ให้ได้ปริมาตรสุทธิ 3 มิลลิตร แล้วโหลดตัวอย่างบนสารแยกชั้น (lymphopep) ที่มีอยู่ 3 มิลลิลิตร ปั่นเหวี่ยงที่ 400xg เป็นเวลา 30 นาที ที่อุหภูมิ 25 องศาเซลเซียส ด้วยเครื่องปั่นเหวี่ยงแบบ swing rotor จากนั้นแยกเม็ดเลือดขาวที่แยกชั้นอยู่ตรงกลางออกมาใส่ใน conical tube อีกหลอดแล้วล้างเซลล์ 3 ครั้งด้วย PBS ในครั้งสุดท้ายของการล้างให้เติมอาหารเลี้ยงเซลล์ sRPMI-1640 medium II (RPMI-1640 เสริมด้วย penicillin 100 IU มิลลิลิตร ต่อ ลิตร, streptomycin 0.1 มิลลิกรัม ต่อ มิลลิลิตร และ L-glutamine 4 mM) ปริมาตร 1 มิลลิลิตร และ ผสมให้เข้ากัน จากนั้นนำไปนับจำนวนเซลล์ (เซลล์ควรมีเปอร์เซ็นต์การรอดตาย > 98 %) เพื่อปรับจำนวนเซลล์ให้ได้ $1x10^6$ เซลล์ ต่อ 200 μl sRPMI-

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

1640 medium II สำหรับการศึกษา Phagocytosis และ $1x10^6$ เซลล์ ต่อ 600 µl sRPMI-1640 medium II สำหรับตรวจวัดการผลิต superoxide anion ของเม็ดเลือดขาว

4.3.2 การวัดประสิทธิภาพเกี่ยวกับขบวนการ Phagocytosis ของเซลล์เม็ดเลือดขาว

วิธีการนี้ได้ดัดแปลงจาก Ai *et al*. (2006) โดยวางแผ่น cover slip บน plate แก้ว จากนั้นหยด 200 µl ของเม็ดเลือดขาว ($1x10^6$ เซลล์ต่อมิลลิตร) ที่เตรียมจากข้อ 4.3.1 ลงบนแผ่น cover slip และทิ้งให้เม็ดเลือดเกาะ 1.5 ชั่วโมง เมื่อเวลาครบที่กำหนดให้ดูด media ทิ้งและล้างเซลล์ด้วย PBS โดยพ่นด้วยปลาย tip เบา ๆ 1 ครั้ง จากนั้นหยด 200 µl ของ latex beads ($1x10^7$ เซลล์ต่อมิลลิตร) (Beads ต้องบ่มด้วย serum 7% เป็นเวลา 1 ชั่วโมง ก่อนใช้) แล้วบ่มในกล่องความชื้นที่อุณหภูมิห้อง 2 ชั่วโมง จากนั้นดูด media ทิ้ง ล้างเซลล์ด้วย PBS 3 ครั้ง ย้อมเซลล์ด้วย Diff Quick ทิ้งให้แห้ง นับจำนวน 300 เซลล์ต่อ 1 cover slip และนับอัตราการจับกินของเม็ดเลือดขาวภายใต้กล้องจุลทัศน์ เพื่อนำไปคำนวณหาเปอร์เซ็นต์กิจกรรม phagocytosis จากสมการ

$$\text{Phagocytic Activity (PA, \%)} = \frac{\text{จำนวนเม็ดเลือดที่จับกิน latex beads}}{\text{จำนวนเม็ดเลือดทั้งหมด}} \times 100$$

4.3.3 การวัดปริมาณ Superoxide anion (O_2^-) ภายในเซลล์โดยวิธี NBT Reduction

NBT Reduction เป็นการวัดกิจกรรมของเซลล์เม็ดเลือดขาวในการกำจัดสิ่งแปลกปลอม โดยวัดจากปริมาณ O_2^- ที่ปล่อยออกมาจากเซลล์เม็ดเลือดขาวซึ่งใช้ Nitroblue Tetrazolium (NBT) เป็นตัวทำปฏิกิริยากับ O_2^- ได้ สารประกอบสีน้ำเงิน เรียกว่า Formazan จากนั้นละลาย Formazan ด้วย KOH และ DMSO และวัดค่า OD ด้วย Microplate Reader (Biorad) ในการทดลองนี้ใช้วิธีการของ Christybapita *et al*. (2007) ในการวิเคราะห์หาปริมาณ O_2^- โดยหยดเซลล์เม็ดเลือดขาวจากไตส่วนหน้าที่ปรับความเข้มข้นแล้ว $1x10^6$ เซลล์ ต่อ sRPMI Medium II 175 ในหลุมของ Microtiter plate (3 หลุมต่อ 1 ตัวอย่าง) จากนั้นใส่ NBT 25 ไมโครลิตร บ่มทิ้งไว้ 2 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส ดูดสารละลายส่วนบนทิ้งแล้วเติม 100% Methanol ทิ้งไว้ 5 นาที แล้วดูดออก ล้างหลุมด้วย 70% Methanol 125 ไมโครลิตร จำนวน 2 ครั้ง ดูดออกให้หมด จากนั้นปล่อยให้แห้ง แล้วเติม 2N KOH 125 ไมโครลิตร ตามด้วย DMSO 150 ไมโครลิตร นำไปวัดที่เครื่องวัดการดูดกลืนคลื่นแสงที่ความยาวคลื่น 655 นาโนเมตร โดยสารละลายมาตรฐานใช้สารเคมี

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

เช่นเดียวกับตัวอย่างแต่แตกต่างตรงที่ไม่มีการเติมเซลล์เม็ดเลือดขาว จากนั้นนำค่าดูดกลืนคลื่นแสงที่วัดได้ไปคำนวณการผลิต superoxide anion ของเม็ดเลือดขาวจากสมการ

Spontaneous O_2^- production = NBT- (sRPMI Medium II)

4.4 การวิเคราะห์ข้อมูล

วิเคราะห์ข้อมูลของการตอบสนองทางภูมิคุ้มกันแบบไม่จำเพาะต่าง ๆ ในแต่ละชุดการทดลองโดยใช้การวิเคราะห์ความแปรปรวน (Analysis of variance) ตามแผนการทดลองแบบสุ่มสมบูรณ์ (Completely Randomized Design) และเปรียบเทียบความแตกต่างทางสถิติของค่าเฉลี่ยระหว่างชุดการทดลองโดยใช้ Duncan's New Multiple Range Test ที่ระดับความเชื่อมั่น 95% (จรัญ, 2549; อัจฉริยา, 2552; Steel and Torrie, 1986)

5. การศึกษาผลของการใช้สารยูจีนอลสังเคราะห์ที่มีต่อการตอบสนองของระบบภูมิคุ้มกันแบบจำเพาะในเชิงการสร้าง Antibody หลังจากได้รับวัคซีนของเชื้อ *Streprococcus agalactiae*

การทดลองส่วนนี้ใช้ วิธี Agglutination test (ดัดแปลงจาก Chen and Light, 1994) เพื่อวิเคราะห์ปริมาณ antibody titer ทั้งก่อนและหลังการได้รับวัคซีน โดยมีการใช้ยาสลบในขั้นตอนของการให้วัคซีน ทั้งนี้เพื่อเป็นการศึกษาถึงประสิทธิภาพของยาสลบในการควบคุมการเกิดความเครียดของปลาที่อาจมีผลต่อการเสื่อมของระบบภูมิคุ้มกันแบบจำเพาะในเชิงการสร้าง antibody

5.1 การวางแผนการทดลอง

แผนการทดลองเป็นแบบสุ่มสมบูรณ์ (Completely Randomized Design) มี 3 ซ้ำของชุดการทดลอง โดยแบ่งชุดการทดลองออกเป็น 3 ชุด ดังนี้

<u>ชุดการทดลองที่ 1</u> สลบปลาด้วยสารยูจีนอลสังเคราะห์ก่อนการให้วัคซีน

<u>ชุดการทดลองที่ 2</u> ไม่ใช้ยาสลบก่อนการให้วัคซีน (ชุดควบคุมที่ 1)

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ชุดการทดลองที่ 3 ไม่ใช้ยาสลบก่อนการฉีดน้ำเกลือ 0.85% (ชุดควบคุมที่ 2)

ความเข้มข้นของสารยูจีนอลสังเคราะห์ที่ใช้ในการทดลองนี้เป็นความเข้มข้นที่ทำให้ปลาเข้าสู่ระยะ 4 ของการสลบ (ระยะที่ปลามีอาการสลบอย่างสมบูรณ์) ซึ่งได้มาจากข้อมูลของการทดลองที่ 1 และสัตว์ทดลองที่ใช้ คือ ปลานิลขนาดลงกระชัง (น้ำหนักเฉลี่ย 70.85±1.03 กรัม ความยาวเฉลี่ย 15.25±1.03 เซนติเมตร) โดยเลี้ยงปลาในบ่อปูนขนาด 1 ตัน ที่มีปริมาตรน้ำ 800 ลิตร และให้อาหาร 2 ครั้งต่อวัน เช้า-เย็น เพื่อปรับสภาพปลาก่อนการทดลอง 7 วัน

วัคซีน และ antigen เพื่อใช้วัด antibody titer โดยวิธี Agglutination test เตรียมจากการนำเชื้อ *Streptococcus agalactiae* มาเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อชนิด Brain Heart Infusion (BHI) Broth เป็นเวลา 24 ชั่วโมง นำเชื้อที่เจริญไปปั่นด้วยเครื่อง Centrifuge ที่ความเร็วประมาณ 2,500 รอบต่อนาทีเป็นเวลา 15 นาที เพื่อให้แบคทีเรียตกตะกอน เทสารละลายส่วนบนทิ้ง ปั่นล้างด้วยน้ำเกลือ 0.85% ที่ผ่านการฆ่าเชื้อ ทำเช่นเดิมจนครบ 3 ครั้ง ครั้งสุดท้ายให้เจือจางลง 1 เท่า และเติมฟอร์มาลินให้มีความเข้มข้นประมาณ 1 % เพื่อฆ่าเชื้อแบคทีเรีย เก็บที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 24 ชั่วโมง นำมาปั่นล้างเซลล์อีกครั้งด้วยน้ำเกลือ 0.85% ที่ผ่านการฆ่าเชื้อ ตรวจสอบการเจริญของเชื้อโดยการเขี่ยสารละลายแบคทีเรียที่ได้ลงใน BHI agar นำไปบ่มเลี้ยงที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 24 ชั่วโมง ถ้าไม่มีเชื้อเจริญ ทำการเจือจางสารละลายแบคทีเรียที่เตรียมไว้ให้มีเชื้อปริมาณ 10^9 CFU ต่อ มิลลิลิตร โดยวัดค่า Absorbance ด้วยเครื่อง Spectrophotometer ให้ได้เท่ากับ 0.15 ใช้ความยาวคลื่นแสงที่ 560 nm จากนั้นจึงเติมฟอร์มาลินให้มีความเข้มข้น 0.1% และเก็บที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส จนกว่าจะใช้งาน

5.2 ขั้นตอนการทดลอง

5.2.1 นำปลานิลที่ผ่านการเลี้ยงปรับสภาพในบ่อพักมาแยกเลี้ยงในบ่อทดลองขนาด 1 ตันจำนวน 9 บ่อ ซึ่งมีน้ำอยู่ 600 ลิตร บ่อละ 15 ตัว โดย 1 บ่อ คือ 1 ซ้ำของแต่ละชุดการทดลอง ปรับสภาพปลาในบ่อเป็นเวลา 7 วัน ให้อาหารเม็ดสำเร็จรูป 2 ครั้งต่อวัน เช้า-เย็น และให้ปลาอดอาหารเป็นเวลา 24 ชั่วโมงก่อนการให้วัคซีนหรือเจาะเลือด

5.2.2 เก็บเลือดปลา 10 ตัว ก่อนการให้วัคซีนเพื่อใช้เป็นข้อมูลพื้นฐานในการทดลอง หลังจากนั้นให้วัคซีนปลาในชุดการทดลองที่ 1 และ 2 โดยใช้สารยูจีนอลสังเคราะห์เป็นยาสลบใน

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ชุดการทดลองที่ 1 ส่วนชุดการทดลองที่ 2 ไม่ใช้ยาสลบซึ่งใช้เป็นชุดควบคุมที่ 1 การให้วัคซีนเป็นการฉีดเข้าทางช่องท้อง (Intraperitoneal injection) ปริมาตรตัวละ 0.2 มิลลิลิตร โดยใช้เข็มฉีดยาขนาด 24 G x 1 (0.55 x 25 มิลลิเมตร) และกระบอก syringe ขนาด 1 มิลลิลิตร สำหรับชุดการทดลองที่ 3 ใช้เป็นชุดควบคุมที่ 2 โดยการฉีดน้ำเกลือ 0.85% ที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว แทนการให้วัคซีนและไม่ใช้ยาสลบ

5.2.3 เก็บเลือดปลาทุก ๆ สัปดาห์ตามชุดการทดลองที่ได้ระบุไว้ข้างต้น การเก็บเลือดปลาจะเก็บที่ตำแหน่งเส้นเลือด caudal vein โดยใช้เข็มขนาด 24 G x 1 (0.55 x 25 มิลลิเมตร) และกระบอก syringe ขนาด 1 มิลลิลิตร เก็บเลือดให้ได้ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ต่อปลา 1 ตัว แต่ละชุดการทดลองใช้ตัวอย่างปลา 10 ตัว ในการเก็บเลือด โดยสุ่มตัวอย่างเป็น 3, 3, 4 จากบ่อทั้ง 3 ของแต่ละชุดการทดลอง

5.2.4 นำเลือดปลาที่ได้ใส่ใน Microcentrifuge tube ขนาด 1 มิลลิลิตร แล้วปล่อยทิ้งให้เลือดแข็งตัวที่ในแนวเฉียง 45 องศา ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 1 ชั่วโมง แล้วนำไปปั่นเหวี่ยงด้วยเครื่อง centrifuge ที่ความเร็วรอบ 3,000 รอบต่อนาที (rpm) เพื่อแยกเอาส่วนของซีรั่มออกจากเม็ดเลือด โดยส่วนของซีรั่มนี้จะนำไปใช้ในการวัดค่า antibody titer ด้วยวิธี Agglutination test

5.2.5 เก็บเลือดปลาสัปดาห์ละครั้งหลังการให้วัคซีนครั้งแรกเพื่อแยกเอาส่วนของซีรั่มมาวัดปริมาณ antibody titer ด้วยวิธี Agglutination test จนกระทั่งปริมาณ antibody titer ขึ้นสูงสุดแล้วเริ่มลดต่ำลง จึงกระตุ้นโดยการให้วัคซีนครั้งที่สอง แล้วทำการเก็บเลือดและวัดปริมาณ antibody titer สัปดาห์ละครั้งเช่นเดิม จนกระทั่งปริมาณของ antibody titer เริ่มคงที่ จึงหยุดการทดลอง

5.3 การวิเคราะห์ข้อมูล

ค่าเฉลี่ยของ antibody titer ของแต่ละช่วงเวลาในการเก็บตัวอย่างหลังการให้วัคซีนทั้ง 2 ครั้ง จะแสดงออกมาในรูปของกราฟ ส่วนการวิเคราะห์ข้อมูลจะใช้วิธีวิเคราะห์ตามแผนการทดลองแบบสุ่มตลอด (Completely Randomized Design) และเปรียบเทียบความแตกต่างทางสถิติของค่าเฉลี่ยของ antibody titer ในแต่ละช่วงเวลาของการเก็บตัวอย่างของการให้วัคซีนทั้ง 2 ครั้ง

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ด้วยวิธี Duncan's New Multiple Range Test ที่ระดับความเชื่อมั่น 95% (จรัญ, 2549; อัจฉริยา, 2552; Steel and Torrie, 1986)

6. การศึกษาประสิทธิภาพของสารยูจีนอลสังเคราะห์เป็นยาสลบเพื่อการขนส่งปลา

การทดลองส่วนนี้เป็นการจำลองการขนส่งสัตว์น้ำให้มีสภาพที่คล้ายคลึงกับการปฏิบัติกันโดยทั่วไปในธุรกิจการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำ โดยใช้วิธีการขนส่งระบบปิดคือการบรรจุลงถุงพลาสติกและใช้ยาสลบกับสัตว์น้ำ ซึ่งมีวัตถุประสงค์เพื่อเพิ่มความหนาแน่นในภาชนะบรรจุระหว่างการขนส่งและเพิ่มอัตรารอดหลังการขนส่ง โดยอาศัยการทำงานของยาสลบในการลดกิจกรรมของปลาลงระหว่างการขนส่ง โดยศึกษาเปรียบเทียบกันระหว่างชุดการทดลองที่มีการใช้ยาสลบแต่ละชนิด คือ สารยูจีนอลสังเคราะห์ น้ำมันกานพลู และสาร MS-222 กับชุดการทดลองที่ไม่ได้ใช้ยาสลบ ทั้งนี้จะพิจารณาจากข้อมูลในส่วนของสุขภาพสัตว์น้ำ อัตรารอดหลังการขนส่ง และ คุณภาพน้ำในถุงทั้งก่อนและหลังการขนส่ง สำหรับการทดลองนี้ สัตว์น้ำที่ใช้ทดลองมี 2 ชนิด ชนิดแรก คือ ลูกปลานิลขนาดเล็ก ใช้เป็นตัวแทนของปลาที่เป็นอาหารที่มีการเพาะเลี้ยงกันอย่างแพร่หลายและมีการขนส่งในปริมาณที่หนาแน่น ชนิดที่สอง คือ ปลาหางไหม้ ซึ่งใช้เป็นตัวแทนของปลาสวยงามที่มีการส่งออกในปริมาณมาก และเป็นที่ต้องการของต่างประเทศ

6.1 การขนส่งลูกปลานิล

6.1.1 การวางแผนการทดลอง

การวางแผนการทดลองเป็นแบบแฟกทอเรียล (Factorial in Completely Randomized Design) กรณี 2 ปัจจัย ได้แก่

<u>ปัจจัยที่ 1</u> การไม่ใช้และการใช้ยาสลบแต่ละชนิดในการทดลอง ได้แก่สารยูจีนอลสังเคราะห์ น้ำมันกานพลู และสาร MS-222 ในระดับความเข้มข้นที่ทำให้ปลาลดกิจกรรมลงไม่ได้สลบโดยสมบูรณ์ และไม่เสียสมดุล (สลบในระยะ sedation) ซึ่งระดับความเข้มข้นที่ใช้นี้ได้จากข้อมูลของการทดลองที่ 2

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ปัจจัยที่ 2 ระยะเวลาในการขนส่งแบ่งออกเป็น 2 ช่วงเวลา ได้แก่ 6 และ 12 ชั่วโมง ในส่วนนี้มีจุดประสงค์เพื่อหาระยะเวลาที่เหมาะสมสำหรับการขนส่งปลาโดยการใช้ยาสลบ

โดยทำการทดลองทั้งหมด 3 ซ้ำ และปัจจัยที่นำมาพิจารณาถึงอิทธิพลที่มีต่อค่าสังเกตุ คือ คุณภาพน้ำและอัตรารอดหลังเลียนแบบการขนส่งด้วยความหนาแน่น 1,000 ตัวต่อปริมาตรน้ำ 3 ลิตร และ 1,200 ตัวต่อปริมาตรน้ำ 3 ลิตร

6.1.2 ขั้นตอนการทดลอง

ก. นำลูกปลานิลขนาดเล็ก น้ำหนักเฉลี่ย 0.30±0.01 กรัม ความยาวเฉลี่ย 2.63±0.25 เซนติเมตร มาพักในบ่อปูนขนาด 1 ตัน ที่ความหนาแน่นเหมาะสม มีการให้อากาศอย่างเพียงพอ และเปิดน้ำให้มีการไหลผ่านเพื่อปรับสภาพปลาให้มีสุขภาพที่ดีก่อนการทดลอง ให้ปลาปรับสภาพอยู่ในบ่อปูนก่อนการทดลอง 7 วัน ให้อาหารเม็ดสำเร็จรูป 2 ครั้งต่อวัน เช้า-เย็น และงดอาหารก่อนทำการทดลองเป็นเวลา 24 ชั่วโมง

ข. เตรียมถุงพลาสติกขนาดความกว้าง 16 นิ้ว x ความยาว 26 นิ้ว โดยใส่น้ำสะอาดปริมาตร 3 ลิตร ตัวอย่างน้ำเริ่มต้นที่ใช้สำหรับการขนส่งนี้จะถูกเก็บไว้เพื่อนำไปวิเคราะห์หาคุณภาพน้ำเปรียบเทียบกับคุณภาพน้ำหลังการขนส่งต่อไป

ค. ใส่เกลือ 0.01% และยาสลบให้เข้ากันโดยทั่วกับน้ำในถุงพลาสติกทุกใบตามความเข้มข้นในระดับที่ทำให้ปลามีกิจกรรมลดลง (sedation stage) ซึ่งความเข้มข้นที่ใช้ได้จากการทดลองที่ 1

ง. ใส่ปลาที่ผ่านการปรับสภาพแล้วเป็นเวลา 7 วัน ในถุงพลาสติกที่ความหนาแน่นตามชนิดของปลาที่ศึกษา ซึ่งได้กำหนดไว้ข้างต้น (ปลา 1 ถุง แทน 1 ซ้ำ)

จ. อัดอากาศจนเต็มถุง โดยให้มีพื้นที่ของอากาศ 3 ส่วนต่อพื้นที่ของน้ำในถุง 1 ส่วน จากนั้นรัดปากถุงด้วยยางวงให้แน่น

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ฉ. นำถุงพลาสติกที่บรรจุปลาแล้วไปทดลองเลียนแบบการขนส่งโดยใช้รถกระบะ ซึ่งได้มีการปูกระบะรถด้วยกระสอบป่านที่ชุ่มน้ำก่อนนำถุงปลาไปวาง จากนั้นพรมน้ำที่ถุงปลาอีกครั้งก่อนจะปิดทับด้วยผ้ายาง เพื่อรักษาอุณหภูมิของน้ำระหว่างการขนส่งไม่ให้เปลี่ยนแปลงมากเกินไป

ช. เมื่อสิ้นสุดการขนส่งตามระยะเวลาที่กำหนดคือ 6 และ 12 ชั่วโมง ให้เก็บตัวอย่างน้ำเพื่อนำไปวิเคราะห์คุณภาพน้ำหลังการขนส่ง โดยวิเคราะห์ค่าความเป็นกรด-เป็นด่าง (pH) ด้วยเครื่องวัดค่าความเป็นกรด-เป็นด่าง วัดค่าปริมาณออกซิเจนที่ละลายน้ำ (มิลลิกรัมต่อลิตร) ด้วยเครื่องวัดปริมาณออกซิเจนที่ละลายน้ำ วัดอุณหภูมิ (องศาเซลเซียส) ด้วยแท่งวัดอุณหภูมิ ส่วนแอมโมเนียทั้งหมดในน้ำ (มิลลิกรัมต่อลิตร) และไนไตรท์ (มิลลิกรัมต่อลิตร) วิเคราะห์ตามวิธีการที่ได้ระบุไว้ในภาคผนวก จากนั้นนับจำนวนปลาที่ยังมีชีวิตอยู่ในถุงหลังการขนส่งเพื่อหาอัตรารอดหลังการขนส่ง แล้วสุ่มปลาจำนวน 100 ตัว ไปเลี้ยงต่อในตู้ขนาด 100 ลิตร ที่มีปริมาตรน้ำอยู่ 80 ลิตร เป็นเวลา 7 วันเพื่อสังเกตพฤติกรรมและหาอัตรารอดหลังการขนส่งที่เวลา 7 วัน

6.1.3 การเก็บข้อมูลและการวิเคราะห์ข้อมูล

ข้อมูลที่ได้จากการทดลองนี้ คือ พฤติกรรมของปลาในระหว่างการทดลองขนส่ง อัตรารอดหลังการขนส่งเมื่อสิ้นสุดระยะเวลาที่กำหนด อัตรารอดหลังการขนส่งเมื่อนำปลาไปเลี้ยงต่อในสภาวะปกติเป็นระยะเวลา 7 วัน คุณภาพน้ำทั้งก่อนการขนส่งและเมื่อสิ้นสุดการขนส่งตามระยะเวลาที่กำหนด

วิเคราะห์ข้อมูลที่ได้ในแต่ละชุดการทดลองโดยการวิเคราะห์ความแปรปรวน (Analysis of variance) ตามแผนการทดลองแบบแฟกทอเรียลในแผนแบบสุ่มสมบูรณ์ (Factorial in CRD) และในกรณีที่พบความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติจะทำการตรวจสอบความแตกต่างเป็นรายคู่ที่ระดับความเชื่อมั่น 95% โดยวิธี Fisher's Least-Significant Different (LSD) เพื่อเปรียบเทียบค่าเฉลี่ย (จรัญ, 2549; อัจฉริยา, 2552; Steel and Torrie, 1986)

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

6.2 การขนส่งปลาหางไหม้ขนาด 0.30±0.48 กรัม

6.2.1 การวางแผนการทดลอง

การวางแผนการทดลองเป็นแบบแฟกทอเรียล (Factorial in Completely Randomized Design) กรณี 2 ปัจจัย โดยทำการทดลองทั้งหมด 3 ซ้ำ และปัจจัยที่นำมาพิจารณาถึงอิทธิพลที่มีต่อค่าสังเกต คือ คุณภาพน้ำและอัตรารอดหลังเลียนแบบการขนส่งด้วยเวลา 24 ชั่วโมง ได้แก่

ปัจจัยที่ 1 การไม่ใช้และการใช้ยาสลบแต่ละชนิดในการทดลอง ได้แก่สารยูจีนอลสังเคราะห์ และสาร MS-222 ในระดับความเข้มข้นที่ทำให้ปลาลดกิจกรรมลง ไม่ได้สลบโดยสมบูรณ์ และไม่เสียสมดุล (สลบในระยะ sedation) ซึ่งระดับความเข้มข้นที่ใช้นี้ได้จากข้อมูลของการทดลองที่ 2

ปัจจัยที่ 2 ความหนาแน่นของปลาที่บรรจุในถุงแบ่งเป็น ความหนาแน่นเริ่มต้นซึ่งเป็นระดับที่ใช้กันในการขนส่งปลาหางไหม้ คือ 50 ตัวต่อปริมาตรน้ำ 3 ลิตร และเพิ่มจำนวนปลาขึ้นอีก 4 ระดับคือ 60, 75, 100 และ 125 ตัวต่อปริมาตรน้ำ 3 ลิตร เพื่อศึกษาถึงศักยภาพของยาสลบในการเพิ่มจำนวนปลาระหว่างการขนส่ง

6.2.2 ขั้นตอนการทดลอง

ก. นำปลาหางไหม้มาพักในบ่อปูนขนาด 1 ตัน ที่ความหนาแน่นเหมาะสม มีการให้อากาศอย่างเพียงพอ และเปิดน้ำให้มีการไหลผ่านเพื่อปรับสภาพปลาให้มีสุขภาพที่ดีก่อนการทดลอง ให้ปลาปรับสภาพอยู่ในบ่อปูนก่อนการทดลอง 7 วัน ให้อาหารเม็ดสำเร็จรูป 2 มื้อต่อวัน เช้า-เย็น และงดอาหารก่อนทำการทดลองเป็นเวลา 48 ชั่วโมง

ข. เตรียมถุงพลาสติกขนาดความกว้าง 16 นิ้ว x ความยาว 26 นิ้ว โดยใส่น้ำสะอาดปริมาตร 3 ลิตร ในถุงพลาสติกจำนวน 45 ถุง และเก็บตัวอย่างน้ำเริ่มต้นที่ใช้ในการขนส่งไปวิเคราะห์หาคุณภาพน้ำสำหรับเปรียบเทียบกับคุณภาพหลังการขนส่ง

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ค. ใส่เกลือ 0.01% และยาสลบให้เข้ากันโดยทั่วกับน้ำในถุงพลาสติกทุกใบของแต่ละชุดการทดลองตามความเข้มข้นในระดับที่ทำให้ปลาสงบลง ซึ่งความเข้มข้นที่ใช้ได้จากการทดลองที่ 1

ง. ใส่ปลาที่ผ่านการปรับสภาพแล้วเป็นเวลา 7 วัน ในถุงพลาสติกตามความหนาแน่นที่ได้กำหนดไว้ข้างต้น 3 ถุงต่อชุดการทดลอง (ปลา 1 ถุง แทน 1 ซ้ำ)

จ. อัดอากาศจนเต็มถุง โดยให้มีพื้นที่ของอากาศ 3 ส่วน ต่อพื้นที่ของน้ำในถุง 1 ส่วน จากนั้นรัดปากถุงด้วยยางวงให้แน่น

ฉ. นำถุงพลาสติกที่บรรจุปลาแล้วไปพักไว้ในพื้นที่ที่ปูด้วยกระสอบป่านชุ่มน้ำ จากนั้นพรมน้ำที่ถุงปลาอีกครั้งก่อนจะปิดทับด้วยผ้ายาง เพื่อรักษาอุณหภูมิของน้ำไม่ให้เปลี่ยนแปลงมากเกินไป ใช้เวลาในการทดลองเลียนแบบการขนส่ง 24 ชั่วโมง

ช. เมื่อครบระยะเวลาที่กำหนด เก็บตัวอย่างน้ำเพื่อนำไปวิเคราะห์คุณภาพน้ำ โดยจะวิเคราะห์ค่าความเป็นกรด-เป็นด่าง (pH) ค่าปริมาณออกซิเจนที่ละลายน้ำ (mg/L) อุณหภูมิ (^{o}C) แอมโมเนียทั้งหมดในน้ำ (mg/L) และไนไตรท์ (mg/L) จากนั้นนับจำนวนปลาที่ยังมีชีวิตอยู่ในถุงเพื่อหาอัตรารอด แล้วสุ่มปลาจำนวน 20 ตัวต่อซ้ำ ไปเลี้ยงต่อในตู้ขนาด 100 ลิตร ที่มีปริมาตรน้ำอยู่ 80 ลิตร เป็นเวลา 7 วันเพื่อสังเกตพฤติกรรมและหาอัตรารอดหลังการขนส่งที่เวลา 7 วัน

6.2.3 การเก็บข้อมูลและการวิเคราะห์ข้อมูล

ข้อมูลที่เก็บจากการทดลองนี้ คือ พฤติกรรมของปลาในระหว่างการทดลองขนส่ง อัตรารอดหลังการขนส่งเมื่อสิ้นสุดระยะเวลาที่กำหนด อัตรารอดหลังการทดลองเมื่อนำปลาไปเลี้ยงต่อในสภาวะปกติเป็นระยะเวลา 7 วัน คุณภาพน้ำทั้งก่อนและเมื่อสิ้นสุดการทดลองตามระยะเวลาที่กำหนด

วิเคราะห์ข้อมูลที่ได้ในแต่ละชุดการทดลองโดยการวิเคราะห์ความแปรปรวน (Analysis of variance) ตามแผนการทดลองแบบแฟกทอเรียลในแผนแบบสุ่มสมบูรณ์ (Factorial in CRD) และในกรณีที่พบความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติจะทำการตรวจสอบความแตกต่าง

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

เป็นรายคู่ที่ระดับความเชื่อมั่น 95% โดยวิธี Fisher's Least-Significant Different (LSD) เพื่อเปรียบเทียบค่าเฉลี่ย (จรัญ, 2549; อัจฉริยา, 2552; Steel and Torrie, 1986)

สถานที่และระยะเวลาทำการวิจัย

ห้องปฏิบัติการการจัดการสุขภาพสัตว์น้ำ ภาควิชาเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำ คณะประมง มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ โดยดำเนินการทำวิจัยในระหว่างเดือนมิถุนายน 2551 - ธันวาคม 2552

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ผลและวิจารณ์

ผล

1. ความเข้มข้นของยาสลบที่ทำให้ลูกปลานิลตายได้ 50% (LC_{50}) ภายในระยะเวลา 24 ชั่วโมง

จากการทดสอบหาค่าความเป็นพิษของยาสลบที่มีต่อลูกปลานิลขนาดความยาวเฉลี่ย 2.63±0.25 เซนติเมตร และน้ำหนักเฉลี่ย 0.30±0.01 กรัม โดยการหาความเข้มข้นที่ทำให้ลูกปลานิลตายได้ 50% (LC_{50}) ภายในระยะเวลา 24 ชั่วโมง ซึ่งใช้วิธีการทดลองแบบชีววิเคราะห์ระบบน้ำนิ่ง (Static acute toxicity test) พบว่าค่า LC_{50} ที่ 24 ชั่วโมง ของสารยูจีนอลสังเคราะห์ น้ำมันกานพลู และสาร MS-222 คือ 16.98, 16.95 และ 72.50 มิลลิกรัมต่อลิตร ตามลำดับ และพบว่าค่า lower limit ที่ 95% คือ 16.35, 16.25 และ 71.61 มิลลิกรัมต่อลิตร ตามลำดับ ส่วนค่า upper limit ที่ 95% คือ 17.60, 17.65 และ 73.39 มิลลิกรัมต่อลิตร ตามลำดับ สำหรับค่า margin of safety ของสารยูจีนอลสังเคราะห์ น้ำมันกานพลู และสาร MS-222 ในการทดลองนี้มีค่าเท่ากับ 0.17, 0.17 และ 0.73 มิลลิกรัมต่อลิตร ตามลำดับ (ตารางที่ 10)

ตารางที่ 10 ค่า LC_{50} ที่ 24 ชั่วโมงของยาสลบแต่ละชนิดเมื่อทดสอบกับลูกปลานิล

Anesthetics	LC_{50} (mg/L)	Lower limit at 95% (mg/L)	Upper limit at 95% (mg/L)	Margin of Safety (mg/L)
Synthetic eugenol	16.98	16.35	17.60	0.17
Clove oil	16.95	16.25	17.65	0.17
MS-222	72.50	71.61	73.39	0.73

2. ความเข้มข้นที่เหมาะสมของสารยูจีนอลสังเคราะห์ น้ำมันกานพลู และสาร MS-222 เพื่อใช้ในการสลบปลา

การทดลองนี้เป็นการหาข้อมูลพื้นฐานเกี่ยวกับความเข้มข้นที่เหมาะสมของยาสลบที่จะนำไปใช้กับสัตว์น้ำในแต่ละวัตถุประสงค์ของกิจกรรมการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำ เช่น การสลบปลาก่อนการฉีดวัคซีนหรือฮอร์โมน และการใช้ยาสลบเพื่อลดกิจกรรมของปลาระหว่างการขนส่ง ทั้งนี้ใน

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

การทดลองหาความเข้มข้นที่เหมาะสมนั้นจะพิจารณาจากความเข้มข้นต่ำสุดของยาสลบที่ทำให้ปลาเข้าสู่ระยะ sedation (กิจกรรมต่าง ๆ ของร่างกายลดลงแต่สมดุลของร่างกายยังปกติ อัตราการเปิดปิด operculum ลดลง) และ ระยะที่ 4 ของการสลบ (ปลาเริ่มสูญเสียสมดุลร่างกายและการทรงตัว ไม่มีการตอบสนองต่อสิ่งกระตุ้น ความเจ็บปวด แรงกด และอัตราการหายใจต่ำลง) ได้เร็วที่สุดประมาณ 3 นาที และมีการฟื้นตัวเป็นปกติ (stage 3 of recovery) เมื่ออยู่ในน้ำปกติได้เร็วที่สุดประมาณ 10 นาทีหรือน้อยกว่า (ดัดแปลงจาก วิธีการของ Gilderhus and Marking, 1987 และ Iversen *et al*., 2003) ทั้งนี้ระยะของการสลบและระยะฟื้นที่ใช้ในการทดลองนี้ พิจารณาจากการแบ่งระยะตามลักษณะของการสลบและการฟื้นโดยวิธีของ Summerfelt and Smith (1990) และ Iwama and Ackerman (1994) ตามลำดับ และใช้เวลา 20 นาทีในการทดสอบหาระยะสลบของปลาที่ผ่านการสลบด้วยสารแต่ละชนิด ซึ่งผลของการสลบและการฟื้นจากการสลบนี้สามารถบ่งบอกถึงประสิทธิภาพของยาสลบที่สามารถนำไปใช้กับปลาชนิดนั้น ๆ ได้

สำหรับผลของการสลบและการฟื้นจากการสลบนั้นสามารถประเมินได้จากเวลาที่เหนี่ยวนำให้เกิดการสลบและเวลาที่ทำให้ปลาฟื้นจากการสลบอย่างสมบูรณ์ ทั้งนี้ความแตกต่างทางสถิติของเวลาที่เหนี่ยวนำให้เกิดการสลบและเวลาที่เหนี่ยวนำให้ปลาฟื้นจะขึ้นอยู่กับระดับความเข้มข้นของยาสลบที่ใช้ ในกรณีของการทดลองนี้ ผลที่ได้สามารถแบ่งออกเป็น 3 ส่วนตามชนิดและขนาดของปลาที่ทำการทดลอง คือ ลูกปลานิล ปลานิลขนาดลงกระชัง และปลาหางไหม้ ซึ่งมีรายละเอียดดังนี้

2.1 การสลบและการฟื้นจากการสลบของลูกปลานิล

จากข้อมูลในตารางที่ 11 พบว่าความเข้มข้นของสารยูจีนอลสังเคราะห์ที่เหนี่ยวนำให้ลูกปลานิลขนาดความยาวเฉลี่ย 2.63$\pm$0.25 เซนติเมตร และน้ำหนักเฉลี่ย 0.30$\pm$0.01 กรัม เข้าสู่ระยะแรกของการสลบ (sedation stage) อยู่ที่ 5 มิลลิกรัมต่อลิตร ภายในเวลา 13.89$\pm$0.25 นาที ส่วนที่ความเข้มข้น 20 มิลลิกรัมต่อลิตร นั้นสามารถทำให้ปลาเข้าสู่ระยะ 4 ของการสลบ ซึ่งเป็นระยะที่ปลามีการสลบอย่างสมบูรณ์ได้ภายในเวลาเฉลี่ย 2.09$\pm$0.05 นาที และปลาได้ฟื้นอย่างสมบูรณ์จากการสลบในระยะนี้โดยใช้เวลาเฉลี่ย 7.70$\pm$0.11 นาที จากการทดลองนี้พบว่าเกือบทุกความเข้มข้นของสารยูจีนอลสังเคราะห์สามารถเหนี่ยวนำให้ปลาเข้าสู่ระยะต่าง ๆ ของการสลบได้ 100% ยกเว้นที่ความเข้มข้น 10 มิลลิกรัมต่อลิตร เนื่องจากปลาถูกเหนี่ยวนำให้เข้าสู่ระยะที่ 4 ของการสลบเพียง 76.66% ทั้งนี้ไม่มีการตายของปลาเกิดขึ้นในทุกความเข้มข้นของสารที่ทำการทดลอง

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ประสิทธิภาพในการเป็นยาสลบของน้ำมันกานพลูที่ทำการศึกษามีผลที่คล้ายคลึงกับสารยูจีนอลสังเคราะห์ ซึ่งแสดงผลไว้ดังตารางที่ 12 คือ ที่ความเข้มข้น 5 มิลลิกรัมต่อลิตร ของน้ำมันกานพลูสามารถใช้เพื่อลดกิจกรรมของปลาลงได้ โดยใช้เวลาประมาณ 13.40±0.47 นาที เพื่อเหนี่ยวนำให้ปลาเข้าสู่ระยะ sedation และที่ความเข้มข้น 20 มิลลิกรัมต่อลิตร ของสารนี้สามารถเหนี่ยวนำให้ปลาเข้าสู่ระยะที่ 4 ของการสลบได้ภายในเวลา 3 นาที และหลังจากครบ 20 นาที ของการสลบ พบว่าปลาได้ฟื้นจากการสลบเมื่ออยู่ในน้ำปกติด้วยเวลาเฉลี่ย 5.26±0.11 นาที ทั้งนี้ทุกความเข้มข้นของน้ำมันกานพลูที่ใช้ในการทดลองนี้สามารถเหนี่ยวนำให้ปลาเข้าสู่ทุกระยะของการสลบได้ 100% และ ที่ความเข้มข้น 25 มิลลิกรัมต่อลิตร พบว่าลูกปลาจะถูกเหนี่ยวนำให้เข้าสู่ระยะที่ 6 ของการสลบ แต่มีการตายเกิดขึ้น 6.66% หลังจากครบ 20 นาที ของการทดลอง

จากตารางที่ 13 ได้แสดงให้เห็นผลของประสิทธิภาพในการเป็นยาสลบของสาร MS-222 โดยพบว่าลูกปลาจะเข้าสู่ระยะ sedation เมื่ออยู่ในน้ำที่มีสาร MS-222 ละลายอยู่ 30 มิลลิกรัมต่อลิตร และปลาได้ถูกเหนี่ยวนำให้เข้าสู่ระยะ 4 ของการสลบที่เวลาเฉลี่ยประมาณ 1.44±0.01 นาที เมื่อได้สัมผัสกับสาร MS-222 ที่ความเข้มข้น 120 มิลลิกรัมต่อลิตร และฟื้นจากการสลบด้วยเวลาเฉลี่ย 12.6±0.34 นาที เมื่อผ่านการสัมผัสกับสารนี้ที่ความเข้มข้นดังกล่าวเป็นเวลา 20 นาที และพบว่าปลาที่สัมผัสกับสาร MS-222 ที่ความเข้มข้น 45 มิลลิกรัมต่อลิตร ถูกเหนี่ยวนำให้เข้าสู่ระยะที่สองของการสลบ 60% และมีเพียง 26.66% เท่านั้นที่สามารถเข้าสู่ระยะที่ 4 และ 6 ของการสลบได้เมื่อสัมผัสกับสาร MS-222 ที่ความเข้มข้น 60 และ 105 มิลลิกรัมต่อลิตร ตามลำดับ นอกจากนี้ความเข้มข้นที่ 105 และ 120 มิลลิกรัมต่อลิตร ยังทำให้ปลาตาย 26.66% และ 50% ตามลำดับ หลังจากการสลบครบ 20 นาที

หลังการทดลองสลบปลาเสร็จสิ้น ปลาที่ผ่านการทดลองทั้งหมดได้ถูกนำไปเลี้ยงต่อเป็นเวลา 1 สัปดาห์ เพื่อประเมินผลกระทบต่อปลาทางด้านพฤติกรรมและสุขภาพ ทั้งนี้พบว่าปลาที่ผ่านการสลบมีพฤติกรรม การว่ายน้ำ และการกินอาหารเป็นปกติ อีกทั้งไม่มีการตายของปลาเกิดขึ้นหลังจาก 1 สัปดาห์ ที่ทำการเลี้ยง

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ตารางที่ 11 เวลาเฉลี่ยที่เหนี่ยวนำให้ลูกปลานิลขนาด 0.30±0.01 กรัม สลบและฟื้นจากการสลบ เมื่อสัมผัสกับสารยูจีนอลสังเคราะห์ที่ระดับความเข้มข้นต่าง ๆ เป็นเวลา 20 นาที

Conc.	Induction time (min)						Recovery time	Mortality
(mg/L)	Stage 1	Stage 2	Stage 3	Stage 4	Stage 5	Stage 6	(min)	(%)
5	13.89±0.25	na	na	na	na	na	0.35±0.01	0
10	1.43±0.03	3.11±0.05	6.04±0.14	13.23±0.40	na	na	3.37±0.14	0
15	1.21±0.05	2.00±0.05	2.86±0.07	4.20±0.14	6.99±0.27	na	6.09±0.13	0
20	0.35±0.02	0.84±0.05	1.35±0.02	2.09±0.05	3.40±0.14	na	7.70±0.11	0
25	0.23±0.01	0.44±0.01	1.08±0.02	1.36±0.02	2.14±0.06	na	10.77±0.23	0

หมายเหตุ na ปลาไม่ถูกเหนี่ยวนำให้เข้าสู่ระยะของการสลบเมื่อครบเวลา 20 นาที

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ตารางที่ 12 เวลาเฉลี่ยที่เหนี่ยวนำให้ลูกปลานิลขนาด 0.30±0.01 กรัม สลบและฟื้นจากการสลบ เมื่อสัมผัสกับน้ำมันกานพลูที่ระดับความเข้มข้นต่าง ๆ เป็นเวลา 20 นาที

Conc.	Induction time (min)						Recovery time	Mortality
(mg/L)	Stage 1	Stage 2	Stage 3	Stage 4	Stage 5	Stage 6	(min)	(%)
5	13.40±0.47	na	na	na	na	na	0.33±0.05	0
10	2.69±0.09	4.10±0.09	8.26±0.24	15.85±0.35	18.10±0.65	na	2.45±0.04	0
15	0.83±0.06	1.58±0.06	3.02±0.09	5.31±0.36	7.61±0.32	na	5.14±0.18	0
20	0.34±0.05	0.75±0.11	1.36±0.06	1.98±0.09	2.86±0.16	na	5.26±0.11	0
25	0.28±0.02	0.58±0.06	0.85±0.07	1.18±0.08	2.01±0.14	19.40±0.13	7.44±0.29	6.66

หมายเหตุ na ปลาไม่ถูกเหนี่ยวนำให้เข้าสู่ระยะของการสลบเมื่อครบเวลา 20 นาที

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ตารางที่ 13 เวลาเฉลี่ยที่เหนี่ยวนำให้ลูกปลานิลขนาด 0.30±0.01 กรัม สลบและฟื้นจากการสลบ เมื่อสัมผัสกับสาร MS-222 ที่ระดับความเข้มข้นต่าง ๆ เป็นเวลา 20 นาที

Conc.	Induction time (min)						Recovery time	Mortality
(mg/L)	Stage 1	Stage 2	Stage 3	Stage 4	Stage 5	Stage 6	(min)	(%)
30	15.82±0.31	na	na	na	na	na	0.29±0.02	0
45	7.93±0.30	16.87±0.57	na	na	na	na	1.11±0.05	0
60	1.75±0.08	4.43±0.22	6.77±0.22	18.27±0.64	na	na	2.98±0.10	0
75	1.18±0.04	2.21±0.05	3.52±0.06	13.01±0.35	na	na	2.72±0.10	0
90	0.48±0.01	1.26±0.01	2.74±0.06	6.37±0.18	13.03±2.04	na	4.00±0.07	0
105	0.30±0.01	0.60+0.04	1.2±0.04	3.15±0.06	4.07+0.19	19.25+0.21	9.15±2.77	26.66
120	0.22±0.01	0.35+0.01	0.55±0.17	1.44±0.01	2.16+0.02	9.08+0.24	12.6±0.34	50

หมายเหตุ na ปลาไม่ถูกเหนี่ยวนำให้เข้าสู่ระยะของการสลบเมื่อครบเวลา 20 นาที

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

2.2 การสลบและการฟื้นจากการสลบของปลานิลขนาดลงกระชัง

เมื่อใช้สารยูจีนอลสังเคราะห์ที่ความเข้มข้น 10 มิลลิกรัมต่อลิตร พบว่าสามารถทำให้ปลานิลขนาดลงกระชัง (ความยาวเฉลี่ย 15.25±1.03 เซนติเมตร และน้ำหนักเฉลี่ย 70.85±1.03 กรัม) ลดกิจกรรมลงและเข้าสู่เฉพาะระยะ sedation ของการสลบ โดยใช้เวลาเฉลี่ย 5.25±0.44 นาที และเมื่อสลบปลานิลด้วยสารยูจีนอลสังเคราะห์ที่ความเข้มข้น 30 มิลลิกรัมต่อลิตร พบว่าปลาได้ถูกเหนี่ยวนำให้เข้าสู่ระยะที่ 4 ของการสลบโดยใช้เวลาเฉลี่ย 2.32±0.32 นาที และฟื้นจากการสลบอย่างสมบูรณ์โดยใช้เวลาเฉลี่ย 10.22±0.89 นาที ซึ่งเมื่อพิจารณาถึงการเหนี่ยวนำให้ปลาเข้าสู่ทุกระยะของการสลบโดยใช้สารยูจีนอลสังเคราะห์ในแต่ละความเข้มข้นพบว่า ทุกความเข้มข้นของสารยูจีนอลสังเคราะห์ที่ใช้ในการทดลองนี้สามารถเหนี่ยวนำให้ปลาเข้าสู่ทุกระยะของการสลบได้ 100% และไม่มีการตายเกิดขึ้นหลังจากการสลบปลาครบ 20 นาที (ตารางที่ 14)

สำหรับการสลบและการฟื้นจากการสลบของปลาเมื่อได้รับน้ำมันกานพลูที่ระดับความเข้มข้นต่าง ๆ ซึ่งแสดงไว้ในตารางที่ 15 นั้น พบว่าจะมีข้อมูลที่ได้คล้ายคลึงกันกับผลของการใช้สารยูจีนอลสังเคราะห์เป็นยาสลบเนื่องจาก ที่ความเข้มข้น 10 มิลลิกรัมต่อลิตร ของน้ำมันกานพลูสามารถทำให้ปลาเข้าสู่เฉพาะระยะ sedation ของการสลบ และใช้เวลาเฉลี่ยเพียง 4.71±0.38 นาที ในการเข้าสู่ระยะดังกล่าว ทั้งนี้เมื่อพิจารณาถึงความเข้มข้นที่เหมาะสมต่อการสลบปลา พบว่าที่ความเข้มข้น 30 มิลลิกรัมต่อลิตร ของน้ำมันกานพลูสามารถทำให้ปลาสลบเข้าสู่ระยะ 4 ได้เช่นเดียวกับสารยูจีนอลสังเคราะห์ โดยเวลาเฉลี่ยที่ปลาสลบและฟื้นจากการสลบอยู่ที่ 2.18±0.14 และ 11.44±0.29 นาที ตามลำดับ ดังนั้นความเข้มเข้นนี้จึงเป็นความเข้มข้นที่เหมาะสมสำหรับน้ำมันกานพลูที่จะนำมาใช้ในการสลบปลานิลขนาดลงกระชัง เนื่องจากเวลาดังกล่าวนี้อยู่ในเกณฑ์ของการเลือกระดับความเข้มข้นที่เหมาะสมในการใช้สลบปลา เช่นเดียวกับสารยูจีนอลสังเคราะห์ ทั้งนี้ทุกความเข้มข้นของน้ำมันกานพลูที่ใช้ สามารถเหนี่ยวนำให้ปลาเข้าสู่ทุกระยะของการสลบได้ 100% และไม่มีการตายของปลาเกิดขึ้นหลังจากทดลองสลบปลาเป็นเวลา 20 นาที

ในกรณีของการสลบปลานิลขนาดลงกระชังด้วยสาร MS-222 พบว่าที่ความเข้มข้น 55 มิลลิกรัมต่อลิตร สามารถเหนี่ยวนำให้ปลาเข้าสู่ระยะ sedation ได้โดยใช้เวลาเฉลี่ย 4.97±0.24 นาที และ ความเข้มข้นต่ำสุดที่เหนี่ยวนำให้ปลาเข้าสู่ระยะ 4 ของการสลบภายในเวลา 3 นาที และฟื้นจากการสลบภายในเวลา 10 นาที อยู่ที่ 190 มิลลิกรัมต่อลิตร ซึ่งในการทดลองส่วนนี้ ปลาทุกตัวที่ได้สัมผัสกับสาร MS-222 ในทุกความเข้มข้น ถูกเหนี่ยวนำให้เข้าสู่ระยะต่าง ๆ ของการสลบได้ 100%

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

และไม่เกิดการตายของปลาหลังจากการสลบที่เวลา 20 นาที สำหรับระยะเวลาที่ใช้ในการเหนี่ยวนำให้ปลาเข้าสู่ระยะต่างๆของการสลบนั้นได้แสดงไว้ดังตารางที่ 16

หลังการทดลองสลบปลาเสร็จสิ้น ปลาที่ผ่านการทดลองทั้งหมดได้ถูกนำไปเลี้ยงต่อในสภาพแวดล้อมที่เหมาะสมเป็นเวลา 1 สัปดาห์ เพื่อการประเมินผลกระทบต่อพฤติกรรมและสุขภาพของปลา ทั้งนี้พบว่าปลาที่ผ่านการสลบมีพฤติกรรม การว่ายน้ำ และการกินอาหารเป็นปกติ อีกทั้งไม่มีการตายของปลาเกิดขึ้นหลังจากการเลี้ยง 1 สัปดาห์

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ตารางที่ 14 เวลาเฉลี่ยที่เหนี่ยวนำให้ปลานิลขนาดลงกระชัง น้ำหนักเฉลี่ย 70.85±1.03 กรัม สลบและฟื้นจากการสลบ เมื่อสัมผัสกับสารยูจีนอลสังเคราะห์ที่ระดับความเข้มข้นต่าง ๆ เป็นเวลา 20 นาที

Conc.	Induction time (min)						Recovery time	Mortality
(mg/L)	Stage 1	Stage 2	Stage 3	Stage 4	Stage 5	Stage 6	(min)	(%)
10	5.25±0.44	na	na	na	na	na	0.53±0.27	0
20	0.55±0.20	1.19±0.10	2.25±0.13	4.62±0.62	7.07±0.54	na	5.85±0.60	0
30	0.38±0.04	0.71±0.25	1.41±0.08	2.32±0.32	2.96±0.33	na	10.22±0.89	0
40	0.34±0.05	0.54±0.05	1.16±0.06	1.42±0.26	2.22±0.18	na	13.99±1.23	0
50	0.24±0.03	0.36±0.03	0.51±0.05	1.02±0.15	1.23±0.09	na	16.44±0.68	0

หมายเหตุ na ปลาไม่ถูกเหนี่ยวนำให้เข้าสู่ระยะของการสลบเมื่อครบเวลา 20 นาที

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ตารางที่ 15 เวลาเฉลี่ยที่เหนี่ยวนำให้ปลานิลขนาดลงกระชัง น้ำหนักเฉลี่ย 70.85±1.03 กรัม สลบและฟื้นจากการสลบ เมื่อสัมผัสกับน้ำมันกานพลูที่ระดับความเข้มข้นต่าง ๆ เป็นเวลา 20 นาที

Conc.	Induction time (min)						Recovery time	Mortality
(mg/L)	Stage 1	Stage 2	Stage 3	Stage 4	Stage 5	Stage 6	(min)	(%)
10	4.71±0.38	na	na	na	na	na	0.41±0.07	0
20	0.75±0.33	1.23±0.05	2.13±0.23	4.76±0.46	6.77±0.84	na	6.68±0.41	0
30	0.36±0.03	0.81±0.29	2.16±0.05	2.18±0.14	2.48±0.34	na	11.44±0.29	0
40	0.34±0.04	0.51±0.03	1.10±0.05	1.33±0.08	2.05±0.20	na	14.16±0.82	0
50	0.27±0.02	0.40±0.05	0.52±0.04	1.07±0.06	1.24±0.07	na	16.49±1.29	0

หมายเหตุ na ปลาไม่ถูกเหนี่ยวนำให้เข้าสู่ระยะของการสลบเมื่อครบเวลา 20 นาที

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ตารางที่ 16 เวลาเฉลี่ยที่เหนี่ยวนำให้ปลานิลขนาดลงกระชัง น้ำหนักเฉลี่ย 70.85±1.03 กรัม สลบและฟื้นจากการสลบ เมื่อสัมผัสกับสาร MS-222 ที่ระดับความเข้มข้นต่าง ๆ เป็นเวลา 20 นาที

Conc.	Induction time (min)						Recovery time	Mortality
(mg/L)	Stage 1	Stage 2	Stage 3	Stage 4	Stage 5	Stage 6	(min)	(%)
55	4.97±0.24	na	na	na	na	na	1.09±1.70	0
100	1.39±0.10	2.35±0.07	4.76±0.57	na	na	na	2.49±0.33	0
145	1.05±0.03	1.50±0.39	2.14±0.28	5.83±1.11	8.41±1.05	na	4.28±0.28	0
190	0.33±0.02	0.52±0.02	1.30±0.13	1.88±0.41	2.63±0.33	na	6.37±0.16	0
235	0.32±0.02	0.46±0.02	0.95±0.19	1.32±0.14	2.33±0.10	na	10.84±0.46	0

หมายเหตุ na ปลาไม่ถูกเหนี่ยวนำให้เข้าสู่ระยะของการสลบเมื่อครบเวลา 20 นาที

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

2.3 การสลบและการฟื้นจากการสลบของปลาหางไหม้

หลังจากทำการสลบปลาหางไหม้ (น้ำหนักเฉลี่ย 3.01±0.48 กรัม และความยาวเฉลี่ย 6.93±0.28 เซนติเมตร) ด้วยสารยูจีนอลสังเคราะห์ พบว่าที่ความเข้มข้น 5 มิลลิกรัมต่อลิตร ของสารนี้สามารถทำให้ปลาเข้าเฉพาะสู่ระยะ sedation ด้วยเวลาเฉลี่ย 3.32±0.08 นาที และเมื่อพิจารณาถึงความเข้มข้นที่เหมาะสมซึ่งสามารถทำให้ปลาหางไหม้สลบเข้าสู่ระยะ 4 พบว่าความเข้มข้นที่ 20 มิลลิกรัมต่อลิตร สามารถทำให้ปลาสลบได้ที่เวลาเฉลี่ย 1.96±0.22 นาที และฟื้นจากการสลบที่เวลาเฉลี่ย 7.37±0.13 นาที ซึ่งอยู่ในเกณฑ์การพิจารณาความเข้มข้นที่เหมาะสมเพื่อนำไปใช้กับปลาหางไหม้ต่อไป ทั้งนี้ในทุกความเข้มข้นที่ทำการทดลองสามารถทำให้ปลาเข้าสู่ระยะต่างๆของการสลบได้ 100% และไม่เกิดการตายของปลาหลังจากการสลบที่เวลา 20 นาที (ตารางที่ 17)

การทดลองนี้พบว่าน้ำมันกานพลูและสารยูจีนอลสังเคราะห์ให้ประสิทธิภาพที่ใกล้เคียงกัน คือน้ำมันกานพลูที่ความเข้มข้น 5 มิลลิกรัมต่อลิตร มีผลทำให้ปลาเข้าสู่ระยะ sedation เพียงระยะเดียวโดยใช้เวลา 3.27±0.11 นาที และเมื่อใช้ความเข้มข้น 20 มิลลิกรัมต่อลิตร สลบปลา พบว่าปลาจะสลบเข้าสู่ระยะ 4 ภายในเวลาเฉลี่ย 1.56±0.18 นาที และฟื้นจากการสลบภายในเวลาเฉลี่ย 7.67±0.29 นาที โดยที่ไม่มีการตายของปลาเกิดขึ้นเมื่อสิ้นสุดเวลาในการสลบ 20 นาที และปลาสามารถสามารถเข้าสู่ระยะต่างๆของการสลบได้ 100% เมื่อสัมผัสกับน้ำมันกานพลูในทุกความเข้มข้น (ตารางที่ 18)

ในกรณีของสาร MS-222 พบว่าความเข้มข้นที่เหนี่ยวนำให้ปลาหางไหม้เข้าสู่ระยะ sedation เพียงระยะเดียวอยู่ที่ 30 มิลลิกรัมต่อลิตร โดยใช้เวลาเฉลี่ย 1.67±0.24 นาที และความเข้มข้นต่ำสุดที่เหนี่ยวนำให้ปลาสลบเข้าสู่ระยะที่ 4 อยู่ที่ 75 มิลลิกรัมต่อลิตร โดยใช้เวลาเฉลี่ย 2.68±0.48 นาที และฟื้นจากการสลบด้วยเวลาเฉลี่ย 7.17±2.10 นาที ทั้งนี้ปลาที่ทำการทดลองสามารถเข้าสู่ทุกระยะของการสลบได้ 100% ในทุกความเข้มข้นของสารที่ใช้ แต่ที่ความเข้น 90 มิลลิกรัมต่อลิตร พบการตายของปลาเกิดขึ้น 20% หลังจากสลบจนครบเวลาสลบ 20 นาที ส่วนที่ความเข้มข้นอื่น ๆ ไม่มีการตายของปลาเกิดขึ้น (ตารางที่ 19)

สำหรับผลของการศึกษาพฤติกรรมและสุขภาพของปลาหลังจากการสลบ โดยเลี้ยงปลาในสภาพแวดล้อมเหมาะสมเป็นเวลา 7 วัน พบว่าปลาที่ผ่านการสลบในทุกชุดการทดลองมีการว่ายน้ำและกินอาหารเป็นปกติ และมีอัตรารอดของปลา 100% เมื่อสิ้นสุดการเลี้ยง

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

สำหรับทุกการทดลองเกี่ยวกับการหาระยะการสลบและการฟื้นของปลาได้ทำการตรวจวัดคุณภาพน้ำโดยน้ำที่ใช้ในการทดลองนี้เป็นน้ำประปาที่ผ่านการให้อากาศเพื่อปรับสภาพน้ำ 24 ชั่วโมง ซึ่งน้ำที่ตรวจวัดก่อนการทดลองมีอุณหภูมิเท่ากับ 29 องศาเซลเซียส มี pH เท่ากับ 7 และมีค่าออกซิเจนที่ละลายน้ำเท่ากับ 4 มิลลิกรัมต่อลิตร

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ตารางที่ 17 เวลาเฉลี่ยที่เหนี่ยวนำให้ปลาหางไหม้ ขนาด 3.01±0.48 กรัม สลบและฟื้นจากการสลบ เมื่อสัมผัสกับสารยูจีนอลสังเคราะห์ที่ระดับความเข้มข้นต่าง ๆ เป็นเวลา 20 นาที

Conc.	Induction time (min)						Recovery time	Mortality
(mg/L)	Stage 1	Stage 2	Stage 3	Stage 4	Stage 5	Stage 6	(min)	(%)
5	3.32±0.08	na	na	na	na	na	1.06±0.17	0
10	0.53±0.04	2.30±0.06	na	na	na	na	3.40±0.06	0
15	0.19±0.01	0.43±0.02	3.19±0.10	na	na	na	4.71±0.26	0
20	0.15±0.01	0.34±0.03	0.90±0.22	1.96±0.22	5.24±0.91	na	7.37±0.13	0
25	0.10±0.01	0.14±0.04	0.26±0.05	0.45±0.03	1.02±0.17	na	8.40±0.25	0

หมายเหตุ na ปลาไม่ถูกเหนี่ยวนำให้เข้าสู่ระยะของการสลบเมื่อครบเวลา 20 นาที

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ตารางที่ 18 เวลาเฉลี่ยที่เหนี่ยวนำให้ปลาหางไหม้ ขนาด 3.01±0.48 กรัม สลบและฟื้นจากการสลบ เมื่อสัมผัสกับน้ำมันกานพลูที่ระดับความเข้มข้นต่าง ๆ เป็นเวลา 20 นาที

Conc.	Induction time (min)						Recovery time	Mortality
(mg/L)	Stage 1	Stage 2	Stage 3	Stage 4	Stage 5	Stage 6	(min)	(%)
5	3.27±0.11	na	na	na	na	na	1.03±0.02	0
10	0.52±0.03	2.19±0.10	na	na	na	na	3.33±0.06	0
15	0.19±0.01	0.43±0.02	2.62±0.44	18.51±0.50	na	na	5.37±0.07	0
20	0.15±0.01	0.30±0.01	0.84±0.23	1.56±0.18	4.69±0.94	na	7.67±0.29	0
25	0.10±0.01	0.14±0.02	0.27±0.03	0.44±0.06	1.07±0.06	na	8.82±0.33	0

หมายเหตุ na ปลาไม่ถูกเหนี่ยวนำให้เข้าสู่ระยะของการสลบเมื่อครบเวลา 20 นาที

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ตารางที่ 19 เวลาเฉลี่ยที่เหนี่ยวนำให้ปลาหางไหม้ ขนาด 3.01±0.48 กรัม สลบและฟื้นจากการสลบ เมื่อสัมผัสกับสาร MS-222 ที่ระดับความเข้มข้นต่าง ๆ เป็นเวลา 20 นาที

Conc.	Induction time (min)						Recovery time	Mortality (%)
(mg/L)	Stage 1	Stage 2	Stage 3	Stage 4	Stage 5	Stage 6	(min)	
30	1.67±0.24	na	na	na	na	na	0.74±0.23	0
45	0.71±0.22	7.46±0.96	na	na	na	na	2.10±0.05	0
60	0.29±0.01	0.83±0.29	2.61±0.35	5.15±0.59	na	na	3.14±0.10	0
75	0.16±0.02	0.62±0.22	1.55±0.34	2.68±0.48	8.29±0.50	na	7.17±2.10	0
90	0.11±0.03	0.20±0.02	0.40±0.10	1.12±0.20	1.83±0.38	13.69±2.71	11.90±2.77	20

หมายเหตุ na ปลาไม่ถูกเหนี่ยวนำให้เข้าสู่ระยะของการสลบเมื่อครบเวลา 20 นาที

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

3. ผลของการใช้สารยูจีนอลสังเคราะห์และสาร MS-222 ต่อการเปลี่ยนแปลงระดับ cortisol และ glucose ในซีรั่มของปลานิลหลังจากการกระตุ้นให้เกิดความเครียด

เมื่อทำการทดลองโดยเหนี่ยวนำให้ปลานิลวัยรุ่นขนาดลงกระชัง (น้ำหนักเฉลี่ย 70.85±1.03 กรัม และความยาวเฉลี่ย 15.25±1.03 เซนติเมตร) เกิดความเครียดเป็นเวลา 3 ชั่วโมง โดยการเลียนแบบการขนส่งในระบบปิดซึ่งใช้ถุงพลาสติกเป็นภาชนะบรรจุปลา และใส่ยาสลบลงไปในน้ำที่ใช้ขนส่งปลา ได้แก่ สารยูจีนอลสังเคราะห์ และสาร MS-222 ในระดับความเข้มข้นที่ทำให้ปลาลดกิจกรรมลง (sedation) จากนั้นทำการเจาะเลือดเพื่อนำมาตรวจวัดระดับของ cortisol และ glucose ในซีรั่มของปลา ซึ่งเป็นดัชนีที่บ่งบอกถึงเปลี่ยนแปลงทางด้านสรีรวิทยาอันเนื่องมาจากความเครียด โดยทำการตรวจวัดทั้งช่วงที่ปลาอยู่ในสภาพปกติก่อนการกระตุ้นให้เกิดความเครียด และหลังจากกระตุ้นให้เกิดความเครียดแล้ว ที่เวลา 0, 1, 6, 12 และ 24 ชั่วโมง สำหรับผลของการทดลองนี้ได้แบ่งออกเป็น 2 ส่วน ซึ่งแสดงรายละเอียดดั้งต่อไปนี้

3.1 ผลของการเปลี่ยนแปลงระดับ cortisol ในกระแสเลือด

จากการตรวจวัดปริมาณของ cortisol ในซีรั่มเริ่มต้นนั้นพบว่ามีค่าอยู่ที่ 12.22 µg/dl และเมื่อพิจารณาในส่วนของระดับของ cortisol ที่ได้จากปลาในชุดการทดลองที่ถูกกระตุ้นให้เกิดความเครียดทั้งในส่วนของชุดการทดลองที่ใช้และไม่ใช้ยาสลบ พบว่าระดับของ cortisol จะเพิ่มสูงขึ้นและเพิ่มขึ้นสูงสุดที่เวลา 1 ชั่วโมงหลังจากการกระตุ้นให้เกิดความเครียด จากนั้นระดับ cortisol จึงลดลงต่ำสุดที่เวลา 24 ชั่วโมง เมื่อนำข้อมูลความเข้มข้นของ cortisol ในทุกช่วงเวลาที่ตรวจวัดมาทำการวิเคราะห์หาความแตกต่างทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95% พบว่าหลังจากการกระตุ้นให้เกิดความเครียดแล้วเป็นเวลา 1 ชั่วโมง ชุดการทดลองที่ใช้สารยูจีนอลเป็นยาสลบเพื่อลดกิจกรรมของปลาระหว่างการเหนี่ยวนำให้เกิดความเครียดนั้น มีค่าความเข้มข้นของ cortisol ที่วัดได้ต่ำกว่าชุดการทดลองอื่นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.05$) ส่วนในช่วงเวลาอื่น ๆ ที่ทำการตรวจวัดพบว่าชุดการทดลองที่ใช้สารยูจีนอลสังเคราะห์เป็นยาสลบมีแนวโน้มของปริมาณ cortisol ต่ำกว่าชุดการทดลองอื่น ๆ แต่ไม่มีความแตกต่างทางสถิติ ($P\geq0.05$) (ตารางที่ 20 และภาพที่ 3)

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ตารางที่ 20 ความเข้มข้นเฉลี่ยของ cortisol ในซีรั่มของปลานิล (ug/dl) ก่อนและหลังการเหนี่ยวนำให้เกิดความเครียด ณ ช่วงเวลาที่กำหนด

Treatment	Time					
	Initial	0 hr	1 hr	6 hr	12 hr	24 hr
Control	12.22±6.16[a]	18.36±4.29[a]	33.38±8.30[a]	27.18±4.22[a]	18.24±10.18[a]	15.04±5.03[a]
Eugenol	12.22±6.16[a]	14.06±5.11[a]	20.17±8.03[b]	19.66±11.68[a]	15.12±3.21[a]	12.3±2.42[a]
MS-222	12.22±6.16[a]	22.06±10.39[a]	34.04±11.51[a]	25.88±18.81[a]	14.46±8.10[a]	11.7±1.59[a]

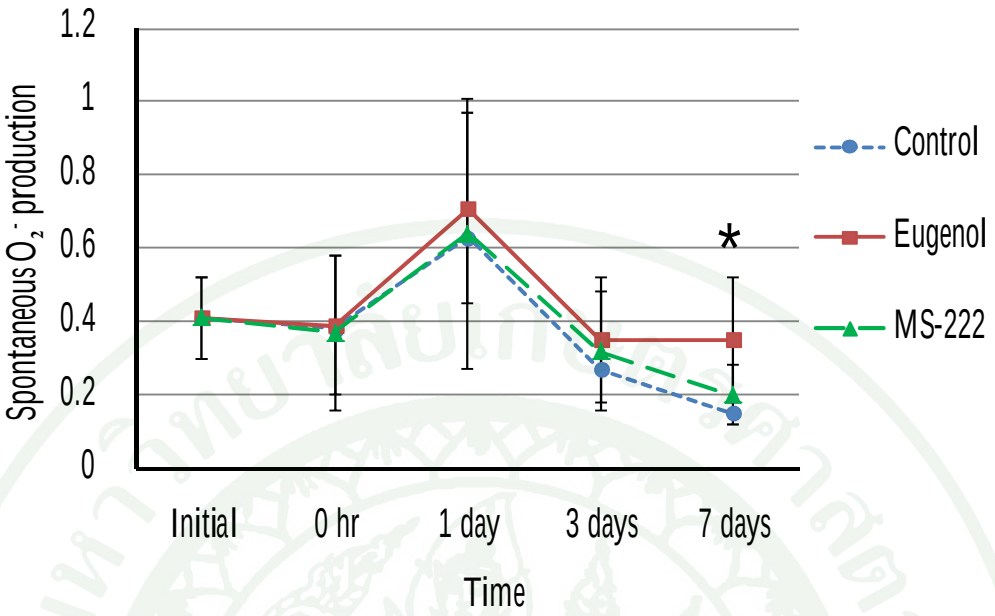
หมายเหตุ Initial = ข้อมูลเริ่มต้นก่อนการเหนี่ยวนำให้เกิดความเครียด

0 hr = ข้อมูลที่ได้จากการเก็บตัวอย่างทันทีที่ครบเวลา 3 ชั่วโมงของการเหนี่ยวนำให้เกิดความเครียด

1, 6, 12 และ 24 hr = ข้อมูลที่ได้จากการเก็บตัวอย่างระหว่างที่ปลาเริ่มฟื้นตัวจากความเครียด

[1]ค่าเฉลี่ยที่กำกับด้วยตัวอักษรต่างกันในแต่ละคอลัมน์มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ *(P*<0.05) โดยใช้วิธี Duncan's New Multiple Range Test ที่ระดับความเชื่อมั่น 95%

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์



ภาพที่ 3 ความเข้มข้นของ cortisol ในซีรั่มของปลานิล (ug/dl) ก่อนและหลังการเหนี่ยวนำให้เกิดความเครียด ณ ช่วงเวลาที่กำหนด

หมายเหตุ Initial = ข้อมูลเริ่มต้นก่อนการเหนี่ยวนำให้เกิดความเครียด

0 hr = ข้อมูลที่ได้จากการเก็บตัวอย่างทันทีที่ครบเวลา 3 ชั่วโมงของการเหนี่ยวนำให้เกิดความเครียด

1, 6, 12 และ 24 hr = ข้อมูลที่ได้จากการเก็บตัวอย่างระหว่างที่ปลาเริ่มฟื้นตัวจากความเครียด

* มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่นเท่ากับ 95 %

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

3.2 ผลของการเปลี่ยนแปลงของระดับ glucose ในกระแสเลือด

จากตารางที่ 21 และภาพที่ 4 ได้แสดงค่าของ glucose ในซีรั่มของปลาที่ตรวจวัด เริ่มต้นอยู่ที่ 36.1±10.03 mg/dl และหลังจากที่ปลาถูกกระตุ้นให้เกิดความเครียดแล้วพบว่าปริมาณ glucose ในกระแสเลือดจะค่อย ๆ สูงขึ้นในระดับหนึ่งแล้วจะลดลงเมื่อปลาอยู่ในสภาพที่เหมาะสม โดยที่เวลา 0 ชั่วโมงหลังการเหนี่ยวนำให้เกิดความเครียด ระดับ glucose จะเพิ่มสูงสุดในชุดการทดลองที่ใช้สารยูจีนอลสังเคราะห์และสาร MS-222 เป็นยาสลบ ส่วนที่เวลา 1 ชั่วโมงหลังการเหนี่ยวนำให้เกิดความเครียดนั้นระดับ glucose ของชุดควบคุมจะเพิ่มขึ้นสูงสุด และจากปริมาณ glucose ที่เพิ่มขึ้นนี้ เมื่อพิจารณาที่เวลา 0, 1 และ 6 ชั่วโมงหลังจากการเหนี่ยวนำให้เกิดความเครียด พบว่าชุดควบคุมจะมีปริมาณ glucose ที่ตรวจวัดได้สูงกว่าชุดการทดลองอื่นที่ใช้ยาสลบและมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.05$) ทั้งนี้เมื่อเปรียบเทียบกันระหว่างชุดการทดลองที่ใช้ยาสลบทั้ง 2 ชนิด คือ สารยูจีนอลสังเคราะห์และสาร MS-222 พบว่าไม่มีความแตกต่างทางสถิติในทุกช่วงเวลาที่ตรวจวัด ($P\geq0.05$) แต่อย่างไรก็ตามชุดการทดลองที่ใช้สารยูจีนอลสังเคราะห์เป็นยาสลบมีแนวโน้มของระดับ glucose ที่ต่ำกว่าชุดการทดลองที่ใช้สาร MS-222 เล็กน้อย

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ตารางที่ 21 ความเข้มข้นเฉลี่ยของ glucose ในซีรั่มของปลานิล (mg/dl) ก่อนและหลังการเหนี่ยวนำให้เกิดความเครียด ณ ช่วงเวลาที่กำหนด

Treatment	Time					
	Initial	0 h	1 h	6 h	12 h	24 h
Control	36.1±10.03[a]	160.81±55.01[a]	195.98±79.15[a]	100.27±62.56[a]	51.65±13.71[a]	44.20±5.98[a]
Eugenol	36.1±10.03[a]	117.21±26.91[b]	77.75±26.23[b]	34.98±15.27[b]	35.02±14.88[a]	36.85±16.12[a]
MS-222	36.1±10.03[a]	118.89±25.26[a]	91.26±18.37[a]	43.48±18.60[b]	40.60±11.11[a]	44.50±10.14[a]

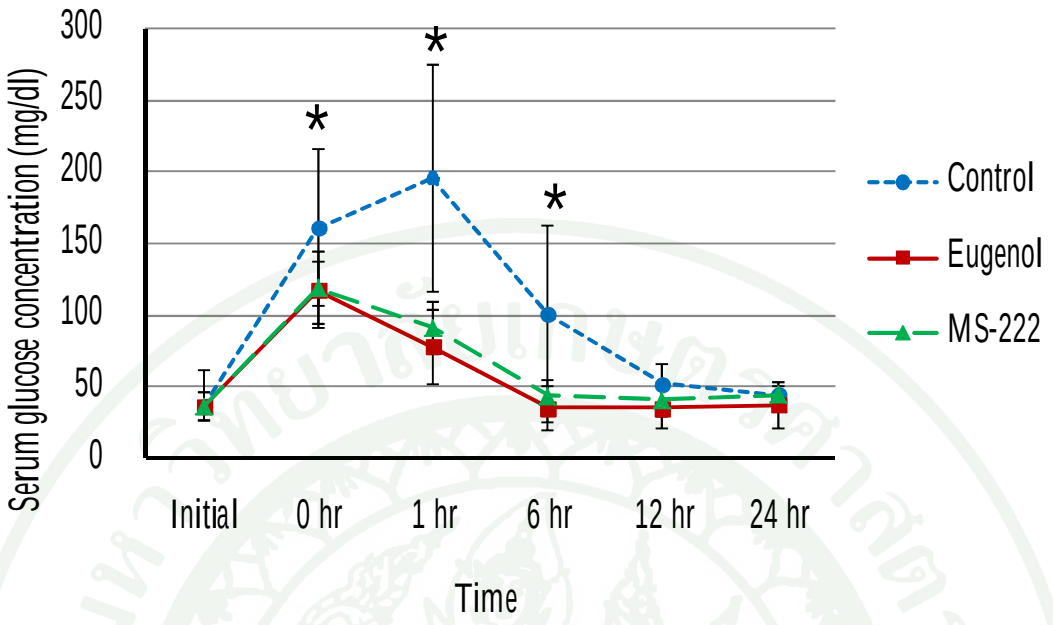
หมายเหตุ Initial = ข้อมูลเริ่มต้นก่อนการเหนี่ยวนำให้เกิดความเครียด

0 hr = ข้อมูลที่ได้จากการเก็บตัวอย่างทันทีที่ครบเวลา 3 ชั่วโมงของการเหนี่ยวนำให้เกิดความเครียด

1, 6, 12 และ 24 hr = ข้อมูลที่ได้จากการเก็บตัวอย่างระหว่างที่ปลาเริ่มฟื้นตัวจากความเครียด

[1]ค่าเฉลี่ยที่ตามด้วยตัวอักษรต่างกันในแต่ละคอลัมน์มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ *(P<0.05)* โดยใช้วิธี Duncan's New Multiple Range Test ที่ระดับความเชื่อมั่น 95%

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์



ภาพที่ 4 ความเข้มข้นของ glucose ในซีรั่มของปลานิล (mg/dl) ก่อนและหลังการเหนี่ยวนำให้เกิดความเครียด ณ ช่วงเวลาที่กำหนด

หมายเหตุ Initial = ข้อมูลเริ่มต้นก่อนการเหนี่ยวนำให้เกิดความเครียด

0 hr = ข้อมูลที่ได้จากการเก็บตัวอย่างทันทีที่ครบเวลา 3 ชั่วโมงของการเหนี่ยวนำให้เกิดความเครียด

1, 6, 12 และ 24 hr = ข้อมูลที่ได้จากการเก็บตัวอย่างระหว่างที่ปลาเริ่มฟื้นตัวจากความเครียด

* มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่นเท่ากับ 95 %

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

4. ผลของการใช้สารยูจีนอลสังเคราะห์และสาร MS-222 ต่อการตอบสนองของระบบภูมิคุ้มกันแบบไม่จำเพาะ ของปลานิลหลังการกระตุ้นให้เกิดความเครียด

การศึกษาผลของการใช้ยาสลบเพื่อลดความเครียดในปลานั้นนอกจากจะสามารถตรวจวัดได้จากการเปลี่ยนแปลงของระบบต่อมไร้ท่อที่เกิดขึ้นแล้ว ความเครียดก็ยังเชื่อมโยงต่อการเปลี่ยนแปลงของระบบภูมิคุ้มกันซึ่งมีผลต่อการเสื่อมลงของสุขภาพของสัตว์น้ำที่ได้รับความเครียด และการใช้ดัชนีชี้วัดที่เกี่ยวกับการเปลี่ยนแปลงทางภูมิคุ้มกันนี้เองก็เป็นสิ่งหนึ่งที่สามารถบ่งบอกเกี่ยวกับระดับของความเครียดที่ปลาได้รับ ซึ่งจากการทดลองเปรียบเทียบคุณสมบัติของยาสลบสองชนิดคือสารยูจีนอลสังเคราะห์และสาร MS-222 ในการลดกิจกรรมของปลานิลวัยรุ่นขนาดลงกระชัง (ความยาวเฉลี่ย 15.25±1.03 เซนติเมตร และน้ำหนักเฉลี่ย 70.85±1.03 กรัม) ระหว่างการเหนี่ยวนำให้ปลาเกิดความเครียดโดยเลียนแบบการขนส่งในระบบปิดเป็นเวลา 3 ชั่วโมง และเก็บตัวอย่างเซลล์เม็ดเลือดขาวจากไตส่วนหน้าของปลาเพื่อนำมาตรวจวัดคุณสมบัติในการตอบสนองทางภูมิคุ้มกันแบบไม่จำเพาะ โดยการเก็บตัวอย่าง จะดำเนินการตามระยะเวลาที่กำหนดทั้งก่อนและหลังการเหนี่ยวนำให้เกิดความเครียดที่เวลา 1, 3 และ 7 วัน และตัวอย่างที่ได้จะนำมาตรวจวัดผลของการแสดงออกทางภูมิคุ้มกันแบบไม่จำเพาะสองส่วนด้วยกันคือ การตรวจวัด % phagocytosis และการหาค่า spontaneous O_2^- production ซึ่งมีรายละเอียดของผลการทดลองดังนี้

4.1 ค่า % phagocytosis ของเซลล์เม็ดเลือดขาว

หลังจากเหนี่ยวนำให้ปลาเกิดความเครียดเป็นเวลา 3 ชั่วโมงแล้ว พบว่าค่า % phagocytosis ของทุกชุดการทดลองจะลดลงจากค่าเริ่มต้นอย่างต่อเนื่อง โดยลดลงต่ำสุดในวันที่ 3 ของการตรวจวัด และเพิ่มขึ้นเล็กน้อยที่ 7 วันของการตรวจวัด สำหรับการทดลองส่วนนี้ ชุดการทดลองที่ใช้สารยูจีนอลสังเคราะห์ในการลดกิจกรรมของปลาระหว่างเหนี่ยวนำให้เกิดความเครียดมีค่า % phagocytosis สูงกว่าชุดการทดลองที่ใช้สาร MS-222 และชุดควบคุมในทุกช่วงเวลาของการตรวจวัดอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.05$) นอกจากนี้เมื่อพิจารณาแนวโน้มการเปลี่ยนแปลงของค่า % phagocytosis พบว่าชุดการทดลองที่ใช้สารยูจีนอลสังเคราะห์มีการเปลี่ยนแปลงจากค่าเริ่มต้นไม่มากนัก (ตารางที่ 22 และภาพที่ 5)

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ตารางที่ 22 % phagocytosis ของปลานิล ก่อนและหลังการเหนี่ยวนำให้เกิดความเครียด ณ ช่วงเวลาที่กำหนด

Treatment	Time				
	Initial	0 h	1 day	3 days	7 days
Control	22.49±5.35[a]	14.06±1.48[a]	10.47±3.38[a]	8.10±3.00[a]	9.70±3.51[a]
Eugenol	22.49±5.35[a]	21.36±5.10[b]	20.80±2.90[b]	20.65±4.50[b]	24.80±4.68[b]
MS-222	22.49±5.35[a]	16.65±4.83[ab]	15.73±4.86[c]	13.99±3.73[c]	20.92±3.84[c]

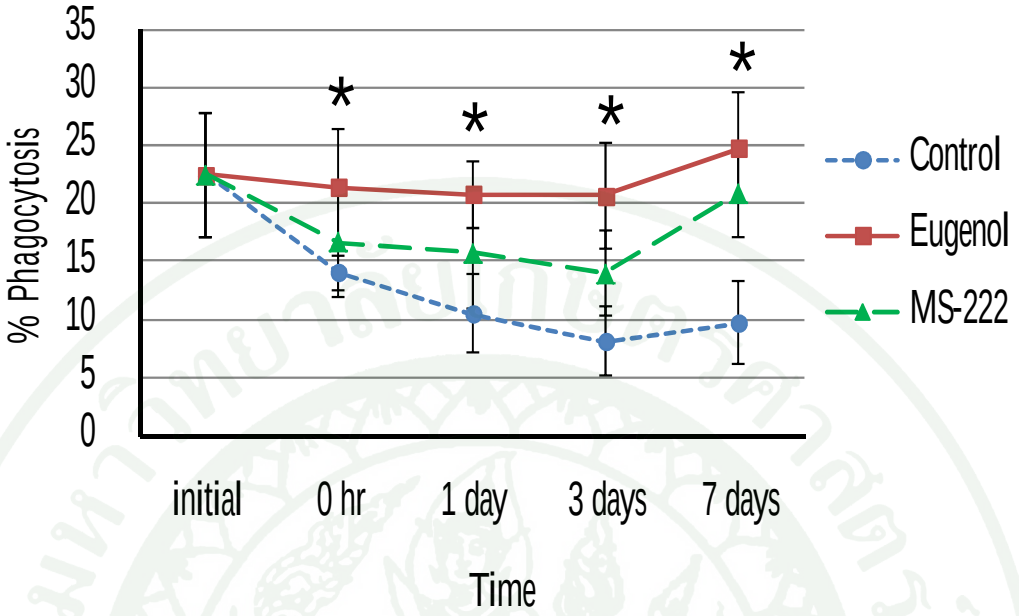
หมายเหตุ Initial = ข้อมูลเริ่มต้นก่อนการเหนี่ยวนำให้เกิดความเครียด

0 hr = ข้อมูลที่ได้จากการเก็บตัวอย่างทันทีที่ครบเวลา 3 ชั่วโมงของการเหนี่ยวนำให้เกิดความเครียด

1, 3 และ 7 days = ข้อมูลที่ได้จากการเก็บตัวอย่างระหว่างที่ปลาเริ่มฟื้นตัวจากความเครียด

[1]ค่าเฉลี่ยที่ตามด้วยตัวอักษรต่างกันในแต่ละคอลัมน์มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ *(P*<0.05) โดยใช้วิธี Duncan's New Multiple Range Test ที่ระดับความเชื่อมั่น 95%

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์



ภาพที่ 5 ค่า % phagocytosis ของเม็ดเลือดขาวจากไตส่วนหน้าของปลานิล ก่อนและหลังการเหนี่ยวนำให้เกิดความเครียด ณ ช่วงเวลาที่กำหนด

หมายเหตุ Initial = ข้อมูลเริ่มต้นก่อนการเหนี่ยวนำให้เกิดความเครียด

0 hr = ข้อมูลที่ได้จากการเก็บตัวอย่างทันทีที่ครบเวลา 3 ชั่วโมงของการเหนี่ยวนำให้เกิดความเครียด

1, 3 และ 7 days = ข้อมูลที่ได้จากการเก็บตัวอย่างระหว่างที่ปลาเริ่มฟื้นตัวจากความเครียด

* มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่นเท่ากับ 95 %

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

4.2 ปริมาณ O_2^- ภายในเซลล์โดยวิธี NBT Reduction

จากผลการทดลองซึ่งได้แสดงไว้ในกราฟข้อมูล (ตารางที่ 23 และภาพที่ 6) พบว่าค่าของ spontaneous O_2^- production มีแนวโน้มที่ลดลงตามระยะเวลาหลังการขนส่ง แต่ที่เวลา 1 วันหลังการขนส่ง พบว่าค่าของ spontaneous O_2^- production เพิ่มขึ้นในทุกการทดลองและลดลงต่ำสุดที่เวลา 7 วันหลังการขนส่ง แต่เมื่อพิจารณาแนวโน้มของค่าที่ลดลงพบว่า ชุดการทดลองที่ใช้สารยูจีนอลสังเคราห์เป็นยาสลบมีการลดลงเล็กน้อยเมื่อเทียบกับชุดการทดลองอื่น และเมื่อนำข้อมูลของทุกชุดการทดลองมาวิเคราะห์หาความแตกต่างทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95% พบว่าที่เวลา 7 วันหลังการขนส่งเท่านั้นที่มีความแตกต่างทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญ ($P<0.05$) โดยชุดการทดลองที่ใช้สารยูจีนอลเป็นยาสลบมีค่า spontaneous O_2^- production ที่สูงกว่าชุดการทดลองอื่นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.05$)

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ตารางที่ 23 ค่า spontaneous O_2^- production ของปลานิล ก่อนและหลังการเหนี่ยวนำให้เกิดความเครียด ณ ช่วงเวลาที่กำหนด

Treatment	Time				
	Initial	0 h	1 day	3 days	7 days
Control	0.41±0.11 [a]	0.38±0.21 [a]	0.63±0.37 [a]	0.27±0.16 [a]	0.15±0.08 [a]
Eugenol	0.41±0.11 [a]	0.39±0.19 [a]	0.71±0.26 [a]	0.35±0.17 [a]	0.35±0.17 [b]
MS-222	0.41±0.11 [a]	0.37±0.24 [a]	0.64±0.25 [a]	0.32±0.20 [a]	0.20±0.10 [a]

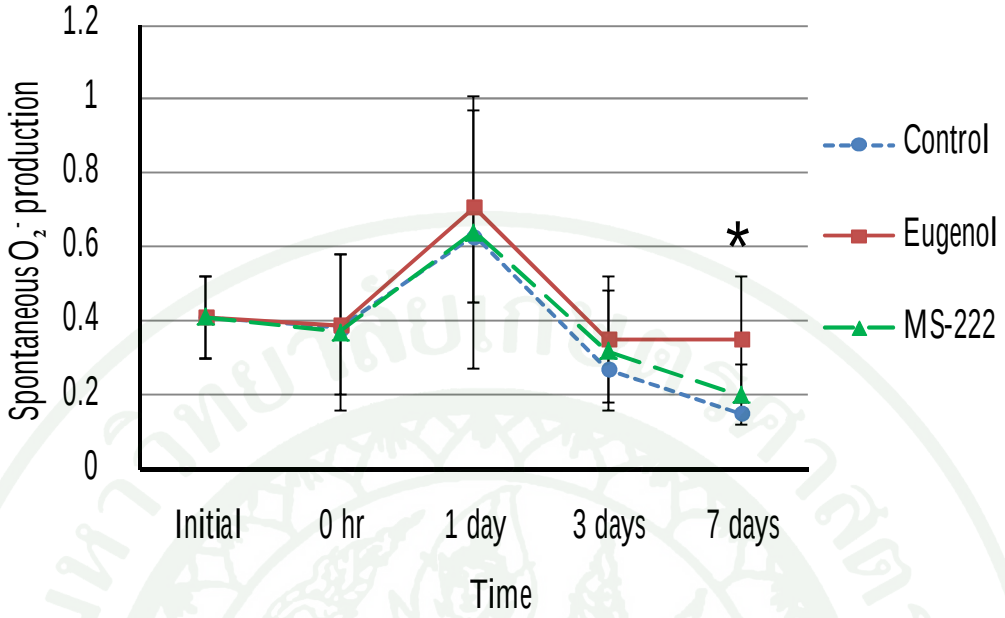
หมายเหตุ Initial = ข้อมูลเริ่มต้นก่อนการเหนี่ยวนำให้เกิดความเครียด

0 hr = ข้อมูลที่ได้จากการเก็บตัวอย่างทันทีที่ครบเวลา 3 ชั่วโมงของการเหนี่ยวนำให้เกิดความเครียด

1, 3 และ 7 days = ข้อมูลที่ได้จากการเก็บตัวอย่างระหว่างที่ปลาเริ่มฟื้นตัวจากความเครียด

[1]ค่าเฉลี่ยที่กำกับด้วยตัวอักษรต่างกันในแต่ละคอลัมน์มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ *(P*<0.05) โดยใช้วิธี Duncan's New Multiple Range Test ที่ระดับความเชื่อมั่น 95%

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์



ภาพที่ 6 ค่า spontaneous O_2^- production ของเม็ดเลือดขาวจากไตส่วนหน้าของปลานิล ก่อนและหลังการเหนี่ยวนำให้เกิดความเครียด ณ ช่วงเวลาที่กำหนด

หมายเหตุ Initial = ข้อมูลเริ่มต้นก่อนการเหนี่ยวนำให้เกิดความเครียด

0 hr = ข้อมูลที่ได้จากการเก็บตัวอย่างทันทีที่ครบเวลา 3 ชั่วโมงของการเหนี่ยวนำให้เกิดความเครียด

1, 3 และ 7 days = ข้อมูลที่ได้จากการเก็บตัวอย่างระหว่างที่ปลาเริ่มฟื้นตัวจากความเครียด

* มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่นเท่ากับ 95 %

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

5. การศึกษาผลของการใช้สารยูจีนอลสังเคราะห์ที่มีต่อการตอบสนองของระบบภูมิคุ้มกันแบบจำเพาะในเชิงการสร้าง Antibody หลังจากได้รับวัคซีนของเชื้อ *Streptococcus agalactiae*

จากการศึกษาผลของการสลบปลาด้วยสารยูจีนอลสังเคราะห์ที่มีต่อการทำงานของระบบภูมิคุ้มกันแบบจำเพาะ โดยการสลบปลาด้วยสารนี้ก่อนการฉีดวัคซีนของเชื้อ *Streptococcus agalactiae* เข้าที่ช่องท้องของปลา (intra peritoneal injection) แล้วตรวจวัดระดับของ antibody titer ด้วยวิธี Agglutination test และเปรียบเทียบกับการไม่ใช้ยาสลบก่อนการฉีดวัคซีน โดยพบว่าหลังจากการฉีดวัคซีนครั้งแรกนั้น ปลามีการตอบสนองต่อวัคซีนได้น้อยเนื่องจากระดับของ antibody titer ที่ตรวจวัดได้มีค่าต่ำทั้งในส่วนของการใช้และไม่ใช้ยาสลบก่อนการฉีดวัคซีน ซึ่งค่า antibody titer ในช่วงแรกจะขึ้นสูงสุดในช่วงสัปดาห์ที่ 3 และ เมื่อระดับของ antibody titer ลดลงในสัปดาห์ที่ 5 จึงได้ฉีดวัคซีนกระตุ้นเป็นครั้งที่ 2 ซึ่งหลังจากการฉีดวัคซีน พบว่าค่าของ antibody titer เพิ่มสูงขึ้นและมีค่าสูงสุดในสัปดาห์ที่ 7 จากนั้นจึงค่อยๆลดลงในช่วงสัปดาห์ที่ 8 และ 9 ทั้งนี้เมื่อพิจารณาถึงแนวโน้มของค่า antibody titer พบว่าชุดการทดลองที่ใช้สารยูจีนอลสังเคราะห์สลบปลาก่อนการให้วัคซีนจะมีระดับของ antibody titer สูงกว่าชุดการทดลองที่ไม่ใช้ยาสลบก่อนการให้วัคซีน (Control 1) แต่เมื่อนำข้อมูล antibody titer ของแต่ละชุดการทดลองที่ตรวจวัดในแต่ละสัปดาห์มาหาความแตกต่างทางสถิติของค่าเฉลี่ยโดยใช้วิธี Duncan's New Multiple Range Test ที่ระดับความเชื่อมั่น 95% พบว่าชุดการทดลองที่ใช้สารยูจีนอลเป็นยาสลบก่อนการฉีดวัคซีนและชุดการทดลองที่ไม่ใช้ยาสลบก่อนการฉีดวัคซีนให้ผลที่ไม่แตกต่างทางสถิติที่ความเชื่อมั่น 95% สำหรับข้อมูลเกี่ยวกับระดับของ antibody titer ในแต่ละสัปดาห์ที่เก็บข้อมูลได้แสดงไว้ในตารางที่ 24 และภาพที่ 7

ระหว่างที่ดำเนินการทดลองเกี่ยวกับการศึกษาผลของการใช้สารยูจีนอลสังเคราะห์เป็นยาสลบก่อนการฉีดวัคซีน ได้มีการตรวจวัดคุณภาพน้ำระหว่างการทดลอง โดยทำการเก็บข้อมูลในส่วนของ อุณหภูมิ และค่าออกซิเจนที่ละลายน้ำ สัปดาห์ละครั้ง ซึ่งอุณหภูมิเฉลี่ยของน้ำระหว่างทำการทดลองทุกสัปดาห์ที่ได้อยู่ที่ 29.13$\pm$0.19 องศาเซลเซียส และค่าเฉลี่ยของออกซิเจนที่ละลายน้ำได้แก่ 4.05$\pm$0.11 มิลลิกรัมต่อลิตร

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ตารางที่ 24 ค่า antibody titer หลังจากการฉีดวัคซีนโดยใช้สารยูจีนอลสังเคราะห์เป็นยาสลบและไม่ใช้ยาสลบในแต่ละสัปดาห์

Treatment	Week									
	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9
Eugenol	00±00	0.90 ±0.31	5.20 ±2.46	19.60 ±9.08	9.60 ±6.60	1.30 ±0.47	20.80 ±9.85	972.80 ±436.35	195.20 ±95.66	49.60 ±18.64
Control 1	00±00	0.80 ±0.41	4.40 ±2.01	16.80 ±9.14	9.20 ±7.00	1.10 ±0.31	16.80 ±8.57	896.00 ±487.85	160.00 ±101.72	56.00 ±33.04
Control 2	00±00	00±00	00±00	00±00	00±00	00±00	00±00	00±00	00±00	00±00

หมายเหตุ Control 1 ชุดการทดลองที่ฉีดวัคซีนโดยไม่ใช้ยาสลบ

Control 2 ชุดควบคุมที่ฉีดน้ำเกลือ 0.85%

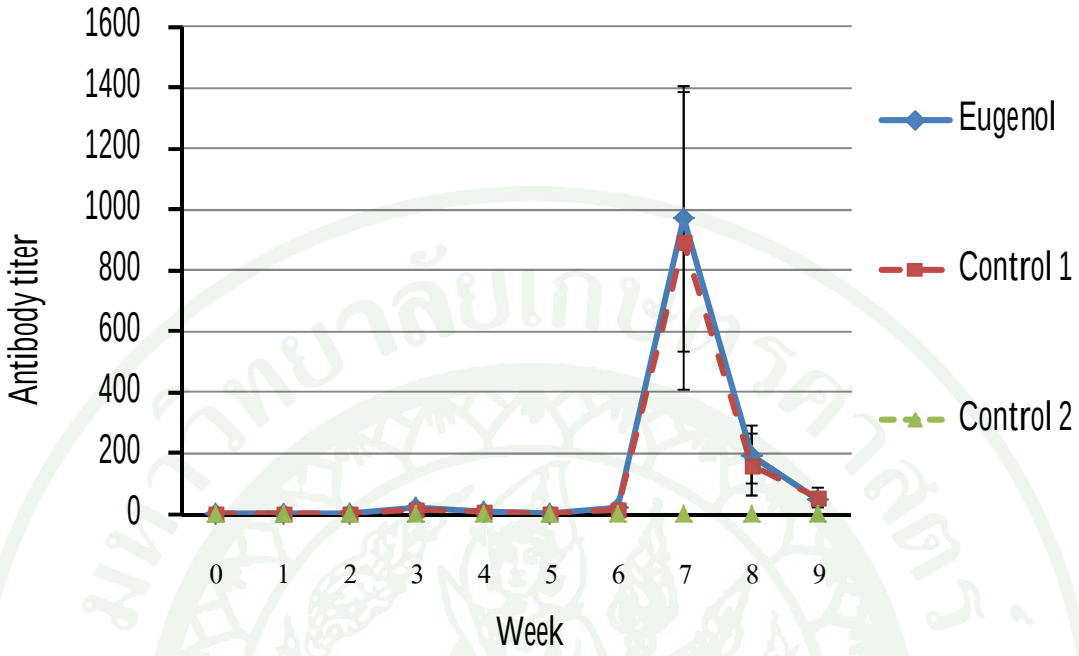
Eugenol ชุดการทำลองที่ใช้สารยูจีนอลสังเคราะห์เป็นยาสลบก่อนการฉีดวัคซีน

การฉีดวัคซีนครั้งแรก (Primary injection) เริ่มสัปดาห์ที่ 0

การฉีดวัคซีนครั้งที่สอง (Secondary injection) เริ่มสัปดาห์ที่ 5

ไม่พบความแตกต่างทางสถิติระหว่างชุดการทดลองในทุกสัปดาห์ที่ทำการเก็บตัวอย่าง

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์



ภาพที่ 7 ค่า antibody titer เฉลี่ยในแต่ละสัปดาห์ของปลานิลที่ได้รับวัคซีนของเชื้อ *Streptococcus agalactiae* โดยการใช้และไม่ใช้สารยูจีนอลสังเคราะห์ในการสลบปลาก่อนการฉีดวัคซีน

หมายเหตุ Control 1 ชุดการทดลองที่ฉีดวัคซีนโดยไม่ใช้ยาสลบ

Control 2 ชุดควบคุมที่ฉีดน้ำเกลือ 0.85%

Eugenol ชุดการทำลองที่ใช้สารยูจีนอลสังเคราะห์เป็นยาสลบก่อนการฉีดวัคซีน

การฉีดวัคซีนครั้งแรก (Primary injection) เริ่มสัปดาห์ที่ 0

การฉีดวัคซีนครั้งที่สอง (Secondary injection) เริ่มสัปดาห์ที่ 5

ไม่พบความแตกต่างทางสถิติระหว่างชุดการทดลองในทุกสัปดาห์ที่ทำการเก็บตัวอย่าง

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

6. ประสิทธิภาพของสารยูจีนอลสังเคราะห์ในการใช้เป็นยาสลบเพื่อขนส่งปลา

6.1 การขนส่งลูกปลานิลที่ความหนาแน่น 1,000 ตัวต่อน้ำ 3 ลิตร

จากการทดลองเลียนแบบการขนส่งลูกปลานิล (ขนาดความยาวเฉลี่ย 2.63±0.25 เซนติเมตร และน้ำหนักเฉลี่ย 0.30±0.01 กรัม) ที่ความหนาแน่น 1,000 ตัวต่อน้ำ 3 ลิตร เพื่อประเมินปัจจัยที่สนใจคือผลของการใช้ยาสลบและระยะเวลาในการขนส่งลูกปลานิล โดยใช้การทดลองแบบแฟกทอเรียลในแผนแบบสุ่มสมบูรณ์ (Factorial in Completely Randomized Design) และพิจารณาอิทธิพลของตัวแปรดังกล่าวจากข้อมูลที่ตรวจวัด ได้แก่ ข้อมูลของการเปลี่ยนแปลงคุณภาพน้ำในภาชนะขนส่งและอัตรารอดหลังจากการขนส่งปลา ซึ่งได้ผลจากการทดลองดังต่อไปนี้

6.1.1 คุณภาพน้ำในภาชนะขนส่งปลา

การศึกษาอิทธิพลของการใช้ยาสลบและระยะเวลาในการขนส่งลูกปลานิลที่มีต่อการเปลี่ยนแปลงคุณภาพน้ำในภาชนะขนส่งนั้น ได้ทำการตรวจวัดค่าของคุณภาพน้ำที่สำคัญ ได้แก่ ปริมาณออกซิเจนที่ละลายน้ำ ค่าความเป็นกรด-เป็นด่าง อุณหภูมิ แอมโมเนียทั้งหมด และไนไตรต์ โดยมีรายละเอียดดังนี้

ก. ออกซิเจนที่ละลายน้ำ (DO)

จากการวิเคราะห์ความแปรปรวนสำหรับการทดลองแบบแฟคทอเรียลในแผนแบบสุ่มสมบูรณ์นั้นพบว่าไม่มีอิทธิพลร่วมกันระหว่างการใช้ยาสลบแต่ละชนิดและระยะเวลาที่ใช้ในการขนส่งปลาที่มีต่อค่าออกซิเจนที่ละลายน้ำในภาชนะขนส่ง เนื่องจากค่า *P-value* ที่ได้คือ 0.81 ซึ่งมากกว่าระดับนัยสำคัญที่กำหนดคือ 0.05 (ตารางที่ 25) ทั้งนี้เมื่อพิจารณาอิทธิพลของปัจจัยที่สนใจทีละปัจจัยโดยเริ่มจากปัจจัยแรกคือการใช้ยาสลบแต่ละชนิดในการขนส่งปลา พบว่ามีอิทธิพลต่อค่าของออกซิเจนที่ละลายน้ำ เนื่องจากค่า *P-value* ที่ได้น้อยกว่า 0.05 และเมื่อทำการตรวจสอบความแตกต่างเป็นรายคู่ที่ระดับความเชื่อมั่น 95% โดยวิธี Fisher's Least-Significant Different (LSD) เพื่อเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยของชุดการทดลองต่างๆ พบว่าชุดการทดลองที่ใช้น้ำมันกานพลูเป็นยาสลบมีค่าเฉลี่ยมากที่สุดแต่ไม่แตกต่างทางสถิติ ($P \geq 0.05$) เมื่อเปรียบเทียบกับชุดการทดลองที่ใช้สารยูจีนอลสังเคราะห์และสาร MS-222 เป็นยาสลบ แต่เมื่อเปรียบเทียบกับชุดการ

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ทดลองที่ไม่ใช้ยาสลบ พบว่าชุดการทดลองที่ใช้ยาสลบทั้งสามชนิดมีความแตกต่างทางสถิติกับชุดการทดลองที่ไม่ใช้ยาสลบอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95% (ตารางที่ 26) และจากการพิจารณาในส่วนของระยะเวลาที่ใช้ในการขนส่ง พบว่าปัจจัยดังกล่าวมีอิทธิพลต่อค่าออกซิเจนที่ละลายน้ำในภาชนะขนส่งเช่นกัน โดยพบว่าการใช้เวลาในการขนส่งปลา 6 ชั่วโมงมีค่าเฉลี่ยของออกซิเจนที่ละลายน้ำในภาชนะขนส่งมากกว่าการใช้เวลาในการขนส่งปลา 12 ชั่วโมงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.05$) (ตารางที่ 27)

ข. ความเป็นกรด-ด่าง (pH)

จากการวิเคราะห์ความแปรปรวนสำหรับการทดลองแบบแฟคทอเรียลในแผนแบบสุ่มสมบูรณ์นั้นพบว่าไม่มีอิทธิพลร่วมกันระหว่างการใช้ยาสลบแต่ละชนิดและระยะเวลาที่ใช้ในการขนส่งปลาที่มีต่อค่าความเป็นกรด-เป็นด่างของน้ำในภาชนะขนส่ง เนื่องจากค่า *P-value* ที่ได้เท่ากับ 0.37 ซึ่งมากกว่าระดับนัยสำคัญที่กำหนดคือ 0.05 (ตารางที่ 25) ทั้งนี้เมื่อพิจารณาอิทธิพลของปัจจัยที่สนใจทีละปัจจัยโดยเริ่มจากปัจจัยแรกคือการใช้ยาสลบแต่ละชนิดในการขนส่งปลา พบว่าไม่มีอิทธิพลต่อค่าความเป็นกรด-เป็นด่างของน้ำในภาชนะขนส่งเนื่องจากค่า *P-value* ที่ได้มากกว่า 0.05 (ตารางที่ 26) แต่จากการพิจารณาปัจจัยที่สองคือระยะเวลาที่ใช้ในการขนส่ง พบว่าปัจจัยนี้มีอิทธิพลต่อค่าความเป็นกรด-เป็นด่างของน้ำในภาชนะขนส่งโดยพบว่าการใช้เวลาในการขนส่งปลา 6 ชั่วโมงมีค่าเฉลี่ยของค่าความเป็นกรด-เป็นด่างต่ำกว่าการใช้เวลาในการขนส่งปลา 12 ชั่วโมงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.05$) (ตารางที่ 27)

ค. อุณหภูมิ

การทดลองนี้พบว่าเกิดปฏิสัมพันธ์ขึ้นระหว่างการใช้ยาสลบแต่ละชนิดและระยะเวลาที่ใช้ในการขนส่งปลาซึ่งแสดงให้เห็นถึงการมีอิทธิพลร่วมกันของปัจจัยทั้งสองที่มีต่อค่าของอุณหภูมิของน้ำภายในภาชนะขนส่ง เนื่องจากค่า *P-value* ที่ได้จากการวิเคราะห์คือ 0.00 ซึ่งน้อยกว่าระดับนัยสำคัญที่กำหนดคือ 0.05 (ตารางที่ 25) และเมื่อพิจารณาจากภาพ Profile Plots พบว่ามีการตัดกันของเส้นกราฟข้อมูลที่แสดงถึงการมีอิทธิพลร่วมกัน (ภาพที่ 8) เมื่อพบว่ามีปฏิสัมพันธ์ร่วมกันระหว่างปัจจัยทั้งสอง จึงได้ทำการวิเคราะห์ความแตกต่างเป็นรายคู่ที่ระดับความเชื่อมั่น 95% โดยวิธี Fisher's Least-Significant Different (LSD) เพื่อเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยของชุดการทดลองต่าง ๆ พบว่าชุดการทดลองที่ใช้น้ำมันกานพลูเป็นยาสลบและขนส่งปลาโดยใช้เวลา 6

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ชั่วโมง จะมีค่าเฉลี่ยของอุณหภูมิน้ำในภาชนะขนส่งที่สูงกว่าชุดการทดลองอื่นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.05$) ส่วนชุดการทดลองที่ใช้สาร MS-222 เป็นยาสลบและขนส่งปลาด้วยเวลา 12 ชั่วโมง จะมีค่าเฉลี่ยของอุณหภูมิน้ำในภาชนะขนส่งต่ำกว่าชุดการทดลองอื่นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.05$) (ตารางที่ 25)

ง. แอมโมเนียทั้งหมด

จากการวิเคราะห์ความแปรปรวนสำหรับการทดลองแบบแฟคทอเรียลในแผนแบบสุ่มสมบูรณ์นั้นพบว่าไม่มีอิทธิพลร่วมกันระหว่างการใช้ยาสลบแต่ละชนิดและระยะเวลาที่ใช้ในการขนส่งปลาที่มีต่อค่าแอมโมเนียทั้งหมดของน้ำในภาชนะขนส่ง เพราะมีค่า *P-value* ที่วิเคราะห์ได้ เท่ากับ 0.20 ซึ่งมากกว่าระดับนัยสำคัญที่กำหนดคือ 0.05 (ตารางที่ 25) เมื่อพิจารณาอิทธิพลของปัจจัยที่สนใจทีละปัจจัย พบว่าการใช้ยาสลบแต่ละชนิดในการขนส่งปลามีอิทธิพลต่อค่าของแอมโมเนียทั้งหมดเนื่องจากค่า *P-value* ที่ได้น้อยกว่า 0.05 และจากการตรวจสอบความแตกต่างเป็นรายคู่ที่ระดับความเชื่อมั่น 95% โดยวิธี Fisher's Least-Significant Different (LSD) เพื่อเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยของชุดการทดลองต่าง ๆ ที่มีผลเกี่ยวข้องกับปัจจัยดังกล่าว พบว่าชุดการทดลองที่ไม่ใช้ยาสลบมีค่าเฉลี่ยของแอมโมเนียทั้งหมดสูงที่สุดแต่ไม่แตกต่างทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบกับชุดการทดลองที่ใช้น้ำมันกานพลูเป็นยาสลบ ส่วนชุดการทดลองที่ใช้สารยูจีนอลสังเคราะห์เป็นยาสลบจะมีค่าเฉลี่ยของแอมโมเนียทั้งหมดต่ำที่สุดแต่ไม่แตกต่างทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบกับชุดการทดลองที่ใช้สาร MS-222 (ตารางที่ 26) และเมื่อพิจารณาในส่วนของระยะเวลาที่ใช้ในการข่นส่งปลาพบว่าปลาที่ขนส่งด้วยเวลา 6 ชั่วโมงมีค่าเฉลี่ยของแอมโมเนียทั้งหมดน้อยกว่าการใช้เวลาในการขนส่งปลา 12 ชั่วโมงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.05$) (ตารางที่ 27)

จ. ไนไตรท์

จากข้อมูลในตารางที่ 25 พบว่าผลการวิเคราะห์ความแปรปรวนได้แสดงถึงปฏิสัมพันธ์ที่เกิดขึ้นระหว่างปัจจัยเกี่ยวกับการใช้ยาสลบแต่ละชนิดในการขนส่งปลาและระยะเวลาที่ใช้ในการขนส่ง เนื่องจากมีค่า *P-value* ที่ได้จากการวิเคราะห์น้อยกว่าระดับนัยสำคัญ 0.05 และมีการตัดกันของเส้นกราฟข้อมูลบนภาพ Profile Plots ซึ่งแสดงถึงลักษณะของปฏิสัมพันธ์ที่เกิดขึ้น และเมื่อพิจารณาแนวโน้มของกราฟข้อมูลพบว่าแนวโน้มของเส้นกราฟจะเพิ่มขึ้นแสดงถึงค่าเฉลี่ยของไนไตรต์ของน้ำในภาชนะขนส่งจากการใช้ยาสลบแต่ละชนิดมีค่าต่ำเมื่อใช้เวลาในการขนส่ง

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ปลา 6 ชั่วโมง และมีค่าสูงขึ้นเมื่อใช้เวลาในการขนส่งปลา 12 ชั่วโมง เมื่อพิจารณาในส่วนของการใช้ยาสลบพบว่าการขนส่งปลาโดยใช้สารยูจีนอลสังเคราะห์มีค่าไนไตรท์ต่ำกว่าการขนส่งโดยใช้น้ำมันการพลู สาร MS-222 และไม่ใช้ยาสลบ ดังแสดงในภาพที่ 9 ซึ่งจากอิทธิพลร่วมกันของปัจจัยทั้งสองที่เกิดขึ้นนี้จึงได้ทำการตรวจสอบความแตกต่างเป็นรายคู่ที่ระดับความเชื่อมั่น 95% โดยวิธี Fisher's Least-Significant Different (LSD) เพื่อเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยของชุดการทดลองต่าง ๆ พบว่าชุดการทดลองที่ใช้สารยูจีนอลสังเคราะห์ในการลดกิจกรรมของปลาและขนส่งปลาด้วยเวลา 6 ชั่วโมงจะมีค่าเฉลี่ยของไนไตรท์ต่ำกว่าชุดการทดลองอื่นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.05$) ส่วนชุดการทดลองที่มีค่าเฉลี่ยของไนไตรท์มากที่สุดอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.05$) ได้แก่ชุดการทดลองที่ไม่ใช้ยาสลบและขนส่งปลาด้วยเวลา 12 ชั่วโมง

6.1.2 อัตรารอดของลูกปลานิลหลังจากการขนส่ง

ก. อัตรารอดของลูกปลาที่ตรวจวัดทันทีหลังการขนส่ง

จากผลการวิเคราะห์ความแปรปรวนในตารางที่ 25 พบว่าไม่มีอิทธิพลร่วมกันระหว่างการใช้ยาสลบแต่ละชนิดและระยะเวลาที่ใช้ในการขนส่งปลา ที่มีต่ออัตรารอดของลูกปลานิลซึ่งทำการประเมินทันทีหลังจากการขนส่ง เพราะมีค่า *P-value* จากการวิเคราะห์มากกว่าระดับนัยสำคัญ 0.05 ทั้งนี้เมื่อพิจารณาถึงอิทธิพลของปัจจัยในส่วนของการใช้ยาสลบแต่ละชนิดที่มีต่ออัตรารอดของลูกปลา พบว่าการใช้สารยูจีนอลเป็นยาสลบมีผลให้ค่าเฉลี่ยของอัตรารอดหลังการขนส่งมากกว่าชุดการทดลองอื่น (99.57%) แต่เมื่อเปรียบเทียบกับชุดการทดลองที่ใช้น้ำมันกานพูลเป็นยาสลบ (99.33%) พบว่าไม่มีความแตกต่างทางสถิติ และเมื่อพิจารณาชุดการทดลองที่ไม่ใช้ยาสลบ (98.53) พบว่ามีอัตรารอดของลูกปลาน้อยกว่าชุดการทดลองอื่นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.05$) (ตารางที่ 26) และจากการพิจารณาอิทธิพลของระยะเวลาในการขนส่งที่มีต่ออัตรารอดของลูกปลานิลซึ่งแสดงในตารางที่ 27 พบว่าชุดการทดลองที่ขนส่งลูกปลานิลด้วยเวลา 6 ชั่วโมง (99.63%) มีอัตรารอดมากกว่าชุดการทดลองที่ใช้เวลา 12 ชั่วโมง (98.58%) ในการขนส่งลูกปลานิลอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.05$)

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ข. อัตรารอดของลูกปลานิลหลังจากผ่านการขนส่งเป็นระยะเวลา 7 วัน

เมื่อพิจารณาถึงอิทธิพลของการใช้ยาสลบแต่ละชนิดในการขนส่งปลาและระยะเวลาที่ใช้ในการขนส่งที่มีต่ออัตรารอดของลูกปลานิลหลังจากผ่านการขนส่งเป็นระยะเวลา 7 วัน นั้นพบว่าปัจจัยทั้งสองไม่มีอิทธิพลร่วมกันเช่นเดียวกับอัตรารอดที่ตรวจวัดทันทีหลังจากการขนส่ง ซึ่งพิจารณาได้จากค่าของ *P-value* ที่มากกว่าระดับนัยสำคัญที่กำหนดคือ 0.05 (ตารางที่ 25) และเมื่อพิจารณาถึงอิทธิพลของปัจจัยในส่วนของการใช้ยาสลบแต่ละชนิดที่มีต่ออัตรารอดของลูกปลานิลในตารางที่ 26 พบว่าการใช้สารยูจีนอลเป็นยาสลบมีผลให้ค่าเฉลี่ยของอัตรารอดหลังการขนส่ง 7 วัน (42.67%) มีค่ามากกว่าชุดการทดลองอื่นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.05$) ส่วนในการศึกษาเกี่ยวกับอิทธิพลของระยะเวลาที่ใช้ในการขนส่งที่มีต่ออัตรารอดของลูกปลานิลนั้นพบว่าชุดการทดลองที่ขนส่งลูกปลานิลด้วยเวลา 6 ชั่วโมง (36.75%) มีอัตรารอดมากกว่าชุดการทดลองที่ใช้เวลา 12 ชั่วโมง ในการขนส่งปลา (33.42%) อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.05$) (ตารางที่ 27) ทั้งนี้เมื่อพิจราณาอัตรารอดโดยรวมของทุกชุดการทดลองพบว่ามีค่าต่ำเนื่องจากปลาที่ใช้ทดลองมีการติดเชื้อ *Streptococcus agalactiae* มาจากฟาร์ม จึงทำให้อัตรารอด 7 วัดที่ตรวจวัดได้มีค่าต่ำกว่าความเป็นจริง

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ตารางที่ 25 ผลการวิเคราะห์เกี่ยวกับปฏิสัมพันธ์ระหว่างระยะเวลาขนส่งและการใช้ยาสลบแต่ละชนิดที่มีต่อคุณภาพน้ำและอัตรารอดของลูกปลานิลหลังจากการขนส่งด้วยความหนาแน่น 1,000 ตัวต่อน้ำ 3 ลิตร

Interaction effect	Water quality					Survival rate after transport (%)	
	DO (mg/L)	pH	Temperature (^{o}C)	Total ammonia (mg/L NH_3-N)	Nitrite (mg/L NO_2^--N)	Immediately	After 7 days
6 hr*Control	3.00±0.20	6.26±0.05	28.30±0.00^{a}	1.62±0.06	0.03±0.00^{a}	99.17±0.25	27.67±4.71
6 hr*MS-222	3.83±0.21	6.25±0.05	28.40±0.10^{a}	1.59±0.07	0.03±0.00^{a}	99.70±0.20	36.67±2.51
6 hr*Clove oil	3.87±0.42	6.25±0.05	28.57±0.12^{b}	1.60±0.07	0.03±0.00^{a}	99.73±0.21	38.33±4.93
6 hr*Eugenol	3.97±0.21	6.22±0.01	28.30±0.00^{a}	1.52±0.01	0.02±0.00^{a}	99.90±0.00	44.33±0.57
12 hr*Control	2.63±0.25	6.51±0.04	27.40±0.00^{c}	1.86±0.10	0.09±0.02^{b}	97.90±0.36	26.33±3.21
12 hr*MS-222	3.27±0.21	6.37±0.11	27.03±0.12^{d}	1.65±0.02	0.06±0.01^{c}	98.27±0.38	31.67±4.72
12 hr*Clove oil	3.57±0.38	6.43±0.13	27.37±0.06^{c}	1.72±0.03	0.07±0.01^{c}	98.93±0.50	34.67±5.69
12 hr*Eugenol	3.43±0.25	6.34±0.03	27.40±0.00^{c}	1.64±0.12	0.06±0.01^{c}	99.23±0.38	41.00±1.00
P-value	0.81	0.37	0.00	0.20	0.04	0.16	0.87

หมายเหตุ [1]ค่า *P-value* แสดงถึงปฏิสัมพันธ์ระหว่างเวลาที่ใช้ในการขนส่งและการใช้ยาสลบแต่ละชนิด

[2]ค่าเฉลี่ยที่กำกับด้วยตัวอักษรต่างกันในแต่ละคอลัมน์มีความแตกต่างกันที่ระดับความเชื่อมั่นเท่ากับ 95 % โดยใช้วิธี Fisher's Least-Significant Different (LSD)

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ตารางที่ 26 ผลการวิเคราะห์เกี่ยวกับอิทธิพลหลักของการใช้ยาสลบแต่ละชนิดที่มีต่อคุณภาพน้ำและอัตรารอดของลูกปลานิลหลังจากการขนส่งด้วยความหนาแน่น 1,000 ตัวต่อน้ำ 3 ลิตร

Type of anesthetic	Water quality					Survival rate after transport (%)	
	DO (mg/L)	pH	Temperature (^{o}C)	Total ammonia (mg/L NH_3-N)	Nitrite (mg/L NO^{-}_2-N)	Immediately	After 7 days
Control	2.82±0.29^{a}	6.38±0.14	27.85±0.49^{a}	1.74±0.15^{a}	0.06±0.04^{a}	98.53±0.75^{a}	27.00±3.69^{a}
MS-222	3.55±0.36^{b}	6.31±0.10	27.72±0.76^{b}	1.62±0.06^{b}	0.04±0.02^{b}	98.98±0.83^{b}	34.17±4.36^{b}
Clove oil	3.72±0.39^{b}	6.34±0.13	27.97±0.66^{c}	1.66±0.08^{ab}	0.05±0.03^{ab}	99.33±0.56^{bc}	36.50±5.17^{b}
Eugenol	3.70±0.36^{b}	6.28±0.07	27.85±0.49^{a}	1.58±0.10^{b}	0.04±0.02^{b}	99.57±0.44^{c}	42.67±1.97^{c}
P-value	0.00	0.11	0.00	0.01	0.01	0.00	0.00

หมายเหตุ [1]ค่า *P-value* แสดงถึงอิทธิพลของการใช้ยาสลบแต่ละชนิดที่มีต่อคุณภาพน้ำและอัตรารอดของลูกปลานิลหลังจากการขนส่ง

[2]ค่าเฉลี่ยที่กำกับด้วยตัวอักษรต่างกันในแต่ละคอลัมน์มีความแตกต่างกันที่ระดับความเชื่อมั่นเท่ากับ 95 % โดยใช้วิธี Fisher's Least-Significant Different (LSD)

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

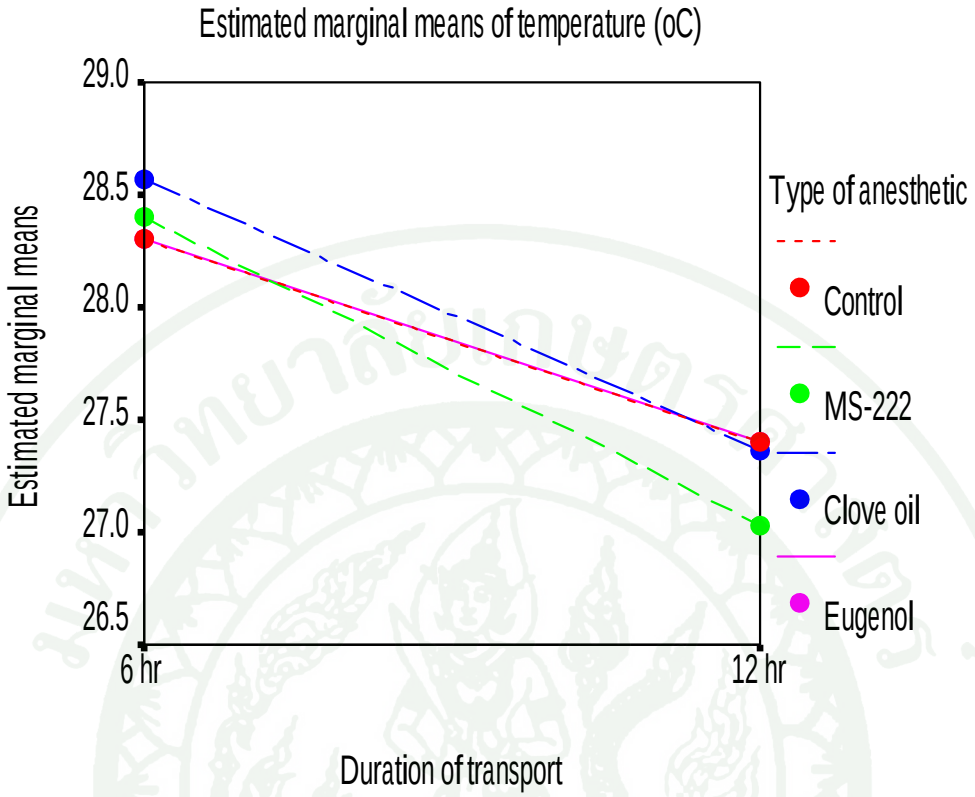
ตารางที่ 27 ผลการวิเคราะห์เกี่ยวกับอิทธิพลหลักของระยะเวลาขนส่งปลาที่มีต่อคุณภาพน้ำและอัตรารอดของลูกปลานิลหลังจากการขนส่งด้วยความหนาแน่น 1,000 ตัวต่อน้ำ 3 ลิตร

Dutation of transport	Water quality					Survival rate after transport (%)	
	DO (mg/L)	pH	Temperature (^{o}C)	Total ammonia (mg/L NH_3-N)	Nitrite (mg/L NO^{-}_2-N)	Immediately	Ater 7 days
6 hr	3.67±0.47[a]	6.25±0.04[a]	28.39±0.13[a]	1.58±0.06[a]	0.03±0.00[a]	99.63±0.33[a]	36.75±6.97[a]
12 hr	3.23±0.44[b]	6.41±0.10[b]	27.30±0.17[b]	1.72±0.12[b]	0.07±0.02[b]	98.58±0.65[b]	33.42±6.53[b]
P-value	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.05

หมายเหตุ [1]ค่า *P-value* แสดงถึงอิทธิพลของเวลาขนส่งปลาที่มีต่อคุณภาพน้ำและอัตรารอดของลูกปลานิลหลังจากการขนส่ง

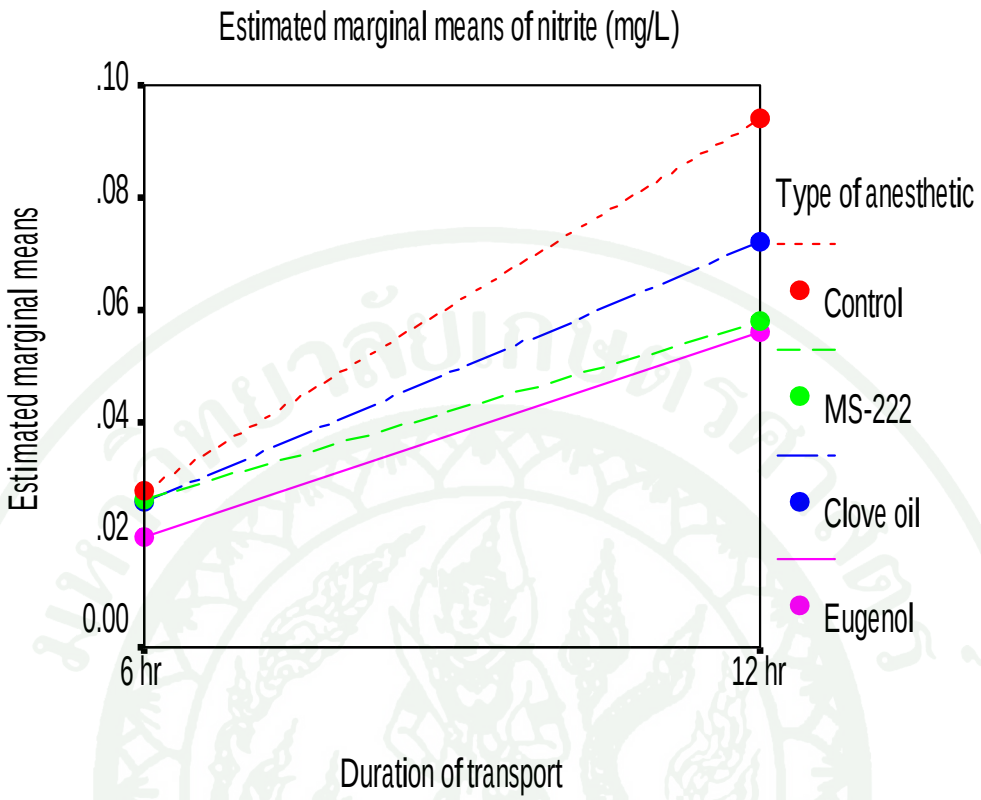
[2]ค่าเฉลี่ยที่กำกับด้วยตัวอักษรต่างกันในแต่ละคอลัมน์มีความแตกต่างกันที่ระดับความเชื่อมั่นเท่ากับ 95 % โดยใช้วิธี Fisher's Least-Significant Different (LSD)

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์



ภาพที่ 8 Profile Plots ที่แสดงถึงปฏิสัมพันธ์ระหว่าง 2 ปัจจัย คือการใช้ยาสลบแต่ละชนิด และระยะเวลาขนส่ง ซึ่งมีอิทธิพลต่ออุณหภูมิของน้ำหลังจากการขนส่งลูกปลานิลด้วยความหนาแน่น 1,000 ตัวต่อน้ำ 3 ลิตร

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์



ภาพที่ 9 Profile Plots ที่แสดงถึงปฏิสัมพันธ์ระหว่าง 2 ปัจจัย คือการใช้ยาสลบแต่ละชนิด และระยะเวลาขนส่ง ซึ่งมีอิทธิพลต่อค่าไนไตรต์ของน้ำหลังจากการขนส่งลูกปลานิลด้วยความหนาแน่น 1,000 ตัวต่อน้ำ 3 ลิตร

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

6.2 การขนส่งลูกปลานิลที่ความหนาแน่น 1,200 ตัวต่อน้ำ 3 ลิตร

จากการทดลองเลียนแบบการขนส่งลูกปลานิล (ขนาดความยาวเฉลี่ย 2.63±0.25 เซนติเมตร และน้ำหนักเฉลี่ย 0.30±0.01 กรัม) ที่ความหนาแน่น 1,200 ตัวต่อน้ำ 3 ลิตร เพื่อประเมินปัจจัยที่สนใจ 2 ปัจจัยคือ ประสิทธิภาพของการใช้ยาสลบและระยะเวลาที่เหมาะสมในการขนส่งลูกปลานิล โดยใช้การทดลองแบบแฟกทอเรียลในแผนแบบสุ่มสมบูรณ์ (Factorial in Completely Randomized Design) และพิจารณาอิทธิพลของตัวแปรดังกล่าวจากข้อมูลที่ตรวดวัด คือคุณภาพน้ำในภาชนะขนส่งและอัตรารอดหลังจากการขนส่งปลา ซึ่งได้ผลจากการทดลองดังต่อไปนี้

6.2.1 คุณภาพน้ำในภาชนะขนส่งปลา

การศึกษาอิทธิพลของการใช้ยาสลบและระยะเวลาในการขนส่งลูกปลานิลที่มีต่อการเปลี่ยนแปลงคุณภาพน้ำในภาชนะขนส่งนั้น ได้ทำการตรวจวัดค่าของคุณภาพน้ำที่สำคัญ ได้แก่ ปริมาณออกซิเจนที่ละลายน้ำ ค่าความเป็นกรด-เป็นด่าง อุณหภูมิ แอมโมเนียทั้งหมด และไนไตรท์ โดยมีรายละเอียดดังนี้

ก. ออกซิเจนที่ละลายน้ำ (DO)

จากผลการทดลองในตารางที่ 28 พบว่าไม่มีอิทธิพลร่วมกันระหว่างการใช้ยาสลบแต่ละชนิดและระยะเวลาในการขนส่งลูกปลานิลที่มีต่อค่าออกซิเจนที่ละลายน้ำในภาชนะขนส่ง เนื่องจากค่า *P-value* ที่ได้จากการวิเคราะห์มีคาเท่ากับ 0.21 ซึ่งมากกว่าระดับนัยสำคัญที่กำหนด คือ 0.05 ทั้งนี้เมื่อพิจารณาอิทธิพลของปัจจัยแรกคือการใช้ยาสลบแต่ละชนิดในการขนส่งพบว่ามีอิทธิพลต่อค่าของออกซิเจนที่ละลายน้ำเนื่องจากค่า *P-value* ที่ได้น้อยกว่าระดับนัยสำคัญ 0.05 และเมื่อทำการตรวจสอบความแตกต่างเป็นรายคู่ที่ระดับความเชื่อมั่น 95% โดยวิธี Fisher's Least-Significant Different (LSD) เพื่อเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยของชุดการทดลองต่าง ๆ พบว่าชุดการทดลองที่ใช้สารยูจีนอลสังเคราะห์มีค่าเฉลี่ยของออกซิเจนที่ละลายน้ำในภาชนะขนส่งสูงกว่าชุดการทดลองอื่น แต่ไม่แตกต่างทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบกับค่าเฉลี่ยของชุดการทดลองที่ใช้น้ำมันการพลู (ตารางที่ 29) และจากการพิจารณาปัจจัยถึงระยะเวลาที่ใช้ในการขนส่งซึ่งแสดงในตารางที่ 30 พบว่าปัจจัยนี้มีอิทธิพลต่อค่าออกซิเจนที่ละลายน้ำในภาชนะขนส่งเช่นกันโดยการใช้เวลาในการ

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ขนส่งปลา 6 ชั่วโมงมีค่าเฉลี่ยของออกซิเจนที่ละลายน้ำในภาชนะขนส่งสูงกว่าการใช้เวลาในการขนส่งปลา 12 ชั่วโมงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.05$)

ข. ความเป็นกรด-ด่าง (pH)

จากการผลการวิเคราะห์ความแปรปรวนสำหรับการทดลองแบบแฟคทอเรียลในแผนแบบสุ่มสมบูรณ์นั้นพบว่าไม่มีอิทธิพลร่วมกันระหว่างการใช้ยาสลบแต่ละชนิดและระยะเวลาที่ใช้ในการขนส่งปลาที่มีต่อค่าความเป็นกรด-เป็นด่างของน้ำในภาชนะขนส่ง เนื่องจากค่า *P-value* ที่ได้เท่ากับ 0.14 ซึ่งมากกว่าระดับนัยสำคัญ 0.05 (ตารางที่ 28) ทั้งนี้เมื่อพิจารณาอิทธิพลของการใช้ยาสลบแต่ละชนิดในการขนส่งและระยะเวลาที่ใช้ในการขนส่ง พบว่าไม่มีอิทธิพลต่อค่าความเป็นกรด-เป็นด่างของน้ำในภาชนะขนส่งเช่นกัน เนื่องจากค่า *P-value* ที่ได้มากกว่า 0.05 แสดงให้เห็นว่าค่าเฉลี่ยของความเป็นกรด-เป็นด่างของน้ำในภาชนะขนส่งไม่แตกต่างกันทางสถิติ ($P<0.05$) (ตารางที่ 29 และ30)

ค. อุณหภูมิ

จากผลการทดลองในตารางที่ 28 พบว่าไม่มีปฏิสัมพันธ์กันระหว่างการใช้ยาสลบแต่ละชนิดและระยะเวลาที่ใช้ในการขนส่งปลา เนื่องจากค่า *P-value* ที่ได้จากการวิเคราะห์คือ 0.21 ซึ่งมากกว่าระดับนัยสำคัญ 0.05 และเมื่อพิจารณาแยกเฉพาะปัจจัยโดยเริ่มจากการใช้ยาสลบแต่ละชนิดพบว่าปัจจัยดังกล่าวไม่มีอิทธิพลต่อค่าเฉลี่ยของอุณหภูมิน้ำในภาชนะขนส่งของแต่ละชุดการทดลองเช่นกัน เนื่องจากค่า *P-value* ที่วิเคราะห์ได้มากกว่า 0.05 (ตารางที่ 29) แต่เมื่อพิจารณาในส่วนของระยะเวลาที่ใช้ในการขนส่งพบว่ามีค่า *P-value* น้อยกว่า 0.05 ดังนั้นระยะเวลาในการขนส่งจึงมีผลต่อค่าเฉลี่ยของอุณหภูมิน้ำ โดยที่การขนส่งปลาที่ระยะเวลา 6 ชั่วโมงมีค่าเฉลี่ยของอุณหภูมิน้ำสูงกว่าการขนส่งปลาด้วยเวลา 12 ชั่วโมงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.05$) (ตารางที่ 30)

ง. แอมโมเนียทั้งหมด

จากการวิเคราะห์ความแปรปรวนสำหรับการทดลองแบบแฟคทอเรียลในแผนแบบสุ่มสมบูรณ์นั้นพบว่าไม่มีอิทธิพลร่วมกันระหว่างการใช้ยาสลบแต่ละชนิดและระยะเวลา

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ที่ใช้ในการขนส่งปลาที่มีต่อค่าแอมโมเนียทั้งหมดของน้ำในภาชนะขนส่ง เพราะมีค่า *P-value* เท่ากับ 0.68 ซึ่งมากกว่าระดับนัยสำคัญที่กำหนดคือ 0.05 (ตารางที่ 28) และเมื่อพิจารณาอิทธิพลของปัจจัยที่สนใจทีละปัจจัย พบว่าการใช้ยาสลบแต่ละชนิดในการขนส่งปลามีอิทธิพลต่อค่าของแอมโมเนียทั้งหมดเนื่องจากค่า *P-value* ที่ได้น้อยกว่า 0.05 ซึ่งจากการวิเคราะห์ความแตกต่างของค่าเฉลี่ยเป็นรายคู่ที่ระดับความเชื่อมั่น 95% โดยวิธี Fisher's Least-Significant Different (LSD) พบว่าชุดการทดลองที่ใช้สารยูจีนอลสังเคราะห์เป็นยาสลบมีค่าเฉลี่ยของแอมโมเนียทั้งหมดต่ำกว่าชุดการทดลองอื่นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.05$) (ตารางที่ 29) และเมื่อพิจารณาในส่วนของระยะเวลาที่ใช้ในการข่นส่งปลา พบว่าการขนส่งปลาด้วยเวลา 6 ชั่วโมงมีค่าเฉลี่ยของแอมโมเนียทั้งหมดต่ำกว่าการใช้เวลาในการขนส่งปลา 12 ชั่วโมงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.05$) (ตารางที่ 30)

จ. ไนไตรท์

จากข้อมูลในตารางที่ 28 พบว่าการใช้ยาสลบแต่ละชนิดในการขนส่งปลาและระยะเวลาที่ใช้ในการขนส่งมีอิทธิพลร่วมกันต่อค่าไนไตรท์ของน้ำในภาชนะขนส่ง เนื่องจากมีค่า *P-value* ที่น้อยกว่าระดับนัยสำคัญ 0.05 และมีการตัดกันของเส้นกราฟ Profile Plots ซึ่งแสดงถึงลักษณะของปฏิสัมพันธ์ร่วมกันที่เกิดขึ้น และพบว่าแนวโน้มของเส้นกราฟจะเพิ่มขึ้นซึ่งแสดงถึงค่าเฉลี่ยของไนไตรต์ของน้ำในภาชนะขนส่งจากการใช้ยาสลบแต่ละชนิดมีค่าต่ำเมื่อใช้เวลาในการขนส่งปลา 6 ชั่วโมง และจะมีค่าสูงขึ้นเมื่อใช้เวลาในการขนส่งปลา 12 ชั่วโมง (ภาพที่ 10) เมื่อทำการตรวจสอบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยเป็นรายคู่ที่ระดับความเชื่อมั่น 95% โดยวิธี Fisher's Least-Significant Different (LSD) พบว่าชุดการทดลองที่ไม่ใช้ยาสลบและขนส่งปลาด้วยระยะเวลา 12 ชั่วโมง มีค่าเฉลี่ยของไนไตรท์สูงที่สุดแต่ไม่แตกต่างทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบกับชุดการทดลองที่ใช้สาร MS-222 เป็นยาสลบและขนส่งด้วยเวลา 12 ชั่วโมง ส่วนที่เวลา 6 ชั่วโมงของการขนส่งจะมีค่าเฉลี่ยของไนไตรต์ต่ำและไม่มีความแตกต่างทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบกันในส่วนของการใช้ยาสลบ

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

6.2.2 อัตรารอดของลูกปลานิลหลังจากการขนส่ง

ก. อัตรารอดของลูกปลาที่ตรวจวัดทันทีหลังการขนส่ง

เมื่อพิจารณาอิทธิพลร่วมกันระหว่างการใช้ยาสลบแต่ละชนิดและระยะเวลาที่ใช้ในการขนส่งปลาที่มีต่ออัตรารอดของลูกปลานิลที่ตรวจวัดทันทีหลังจากการขนส่งดังในตารางที่ 28 พบว่ามีค่า *P-value* ที่ได้มากกว่า 0.05 ดังนั้น ปัจจัยทั้งสองจึงไม่มีปฏิสัมพันธ์กัน ทั้งนี้เมื่อพิจารณาถึงอิทธิพลของการใช้ยาสลบแต่ละชนิดที่มีต่ออัตรารอดของลูกปลา พบว่าการใช้สารยูจีนอลสังเคราะห์เป็นยาสลบมีผลให้ค่าเฉลี่ยของอัตรารอดหลังการขนส่งสูงกว่าชุดการทดลองอื่น (93.01%) แต่เมื่อเปรียบเทียบกับชุดการทดลองที่ใช้น้ำมันกานพูลเป็นยาสลบ (92.54%) พบว่าไม่มีความแตกต่างทางสถิติ ($P \geq 0.05$) (ตารางที่ 29) และจากการศึกษาเกี่ยวกับอิทธิพลของระยะเวลาที่ใช้ในการขนส่งที่มีต่ออัตรารอดของลูกปลานิลพบว่า ชุดการทดลองที่ขนส่งลูกปลานิลด้วยเวลา 6 ชั่วโมง (93.48%) มีอัตรารอดสูงกว่าชุดการทดลองที่ใช้เวลา 12 ชั่วโมง (87.97%) อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.05$) (ตารางที่ 30)

ข. อัตรารอดของลูกปลานิลหลังจากผ่านการขนส่งเป็นระยะเวลา 7 วัน

จากการทดลองนี้เมื่อพิจารณาปฏิสัมพันธ์ร่วมกันระหว่างการใช้ยาสลบแต่ละชนิดและระยะเวลาที่ใช้ในการขนส่งปลาที่มีต่ออัตรารอดของลูกปลานิลหลังจากผ่านการขนส่ง 7 วัน พบว่ามีค่า *P-value* เท่ากับ 0.00 ซึ่งน้อยกว่าระดับนัยสำคัญที่กำหนดคือ 0.05 และเมื่อพิจารณาภาพ Profile Plots พบว่ามีการตัดกันของเส้นกราฟซึ่งแสดงถึงการมีอิทธิพลร่วมกันของปัจจัยทั้งสอง (ภาพที่ 11) จากนั้นได้ทำการวิเคราะห์ความแตกต่างเป็นรายคู่เพื่อเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยของชุดการทดลองต่างๆ โดยวิธี Fisher's Least-Significant Different (LSD) ที่ระดับความเชื่อมั่น 95% พบว่าชุดการทดลองที่ไม่ใช้ยาสลบและขนส่งปลาด้วยเวลา 12 ชั่วโมงมีค่าเฉลี่ยของอัตรารอดของลูกปลานิลหลังการขนส่ง 7 วันต่ำกว่าชุดการทดลองอื่นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.05$) ส่วนชุดการทดลองที่ใช้ยาสลบทั้งสามชนิดและขนส่งด้วยเวลา 6 และ 12 ชั่วโมง มีอัตรารอดหลังการขนส่ง 7 วัน 100% (ตารางที่ 24)

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ตารางที่ 28 ผลการวิเคราะห์เกี่ยวกับปฏิสัมพันธ์ระหว่างระยะเวลาขนส่งและการใช้ยาสลบแต่ละชนิดที่มีต่อคุณภาพน้ำและอัตรารอดของลูกปลานิลหลังจากการขนส่งด้วยความหนาแน่น 1,200 ตัวต่อน้ำ 3 ลิตร

Interaction effect	Water quality					Survival rate after transport (%)	
	DO (mg/L)	pH	Temperature (^{o}C)	Total ammonia (mg/L NH_3-N)	Nitrite (mg/L NO^{-}_{2}-N)	Immediately	7 days
6 hr*Control	3.00±0.10	6.58±0.10	29.47±0.21	1.47±0.06	0.01±0.00^{a}	92.25±0.88	89.00±3.61^{a}
6 hr*MS-222	3.47±0.51	6.49±0.02	29.27±0.15	1.36±0.03	0.01±0.00^{a}	92.33±0.90	100.00±0.00^{b}
6 hr*Clove oil	5.00±0.75	3.5±0.07	29.30±0.00	1.34±0.04	0.01±0.00^{a}	93.75±1.42	100.00±0.00^{b}
6 hr*Eugenol	5.23±0.15	6.58±0.09	29.00±0.44	1.24±0.14	0.01±0.00^{a}	95.58±0.33	100.00±0.00^{b}
12 hr*Control	1.83±0.38	6.51±0.05	28.70±0.00	1.52±0.09	0.06±0.01^{b}	84.92±1.53	47.67±14.57^{c}
12 hr*MS-222	1.93±0.31	6.53±0.17	28.80±0.10	1.47±0.09	0.05±0.01^{b}	84.14±3.12	100.00±0.00^{b}
12 hr*Clove oil	2.77±0.15	6.64±0.05	28.73±0.06	1.42±0.04	0.02±0.01^{c}	91.33±1.53	100.00±0.00^{b}
12 hr*Eugenol	3.07±0.85	6.72±0.02	28.70±0.00	1.36±0.06	0.02±0.00^{c}	90.44±1.47	100.00±0.00^{b}
P-value	0.21	0.14	0.21	0.68	0.00	0.06	0.00

หมายเหตุ [1]ค่า *P-value* แสดงถึงปฏิสัมพันธ์ระหว่างเวลาที่ใช้ในการขนส่งและการใช้ยาสลบแต่ละชนิดเพื่อลดกิจกรรมของลูกปลาระหว่างขนส่ง

[2]ค่าเฉลี่ยที่กำกับด้วยตัวอักษรต่างกันในแต่ละคอลัมน์มีความแตกต่างกันที่ระดับความเชื่อมั่นเท่ากับ 95 % โดยใช้วิธี Fisher's Least-Significant Different (LSD)

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ตารางที่ 29 ผลการวิเคราะห์เกี่ยวกับอิทธิพลหลักของการใช้ยาสลบแต่ละชนิดที่มีต่อคุณภาพน้ำและอัตรารอดของลูกปลานิลหลังจากการขนส่งด้วยความหนาแน่น 1,200 ตัวต่อน้ำ 3 ลิตร

Type of anesthetic	Water quality					Survival rate after transport (%)	
	DO (mg/L)	pH	Temperature (^{o}C)	Total ammonia (mg/L NH_3-N)	Nitrite (mg/L NO^{-}_{2}-N)	Immediately	7 days
Control	2.42±0.69[a]	6.55±0.09	29.08±0.44	1.49±0.08[a]	0.03±0.03[a]	88.58±4.17[a]	68.33±24.55[a]
MS-222	2.70±0.92[a]	6.51±0.11	29.03±0.28	1.41±0.09[b]	0.03±0.02[a]	88.76±4.41[a]	100.00±0.00[b]
Clove oil	3.88±1.32[b]	6.57±0.09	29.02±0.31	1.38±0.06[b]	0.02±0.01[b]	92.54±1.87[b]	100.00±0.00[b]
Eugenol	4.15±1.31[b]	6.65±0.09	28.85±0.32	1.30±0.12[c]	0.02±0.01[b]	93.01±2.97[b]	100.00±0.00[b]
P-value	0.00	0.07	0.18	0.00	0.00	0.00	0.00

หมายเหตุ [1]ค่า *P-value* แสดงถึงอิทธิพลของการใช้ยาสลบแต่ละชนิดที่มีต่อคุณภาพน้ำและอัตรารอดของลูกปลานิลหลังจากการขนส่ง

[2]ค่าเฉลี่ยที่กำกับด้วยตัวอักษรต่างกันในแต่ละคอลัมน์มีความแตกต่างกันที่ระดับความเชื่อมั่นเท่ากับ 95 % โดยใช้วิธี Fisher's Least-Significant Different (LSD)

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

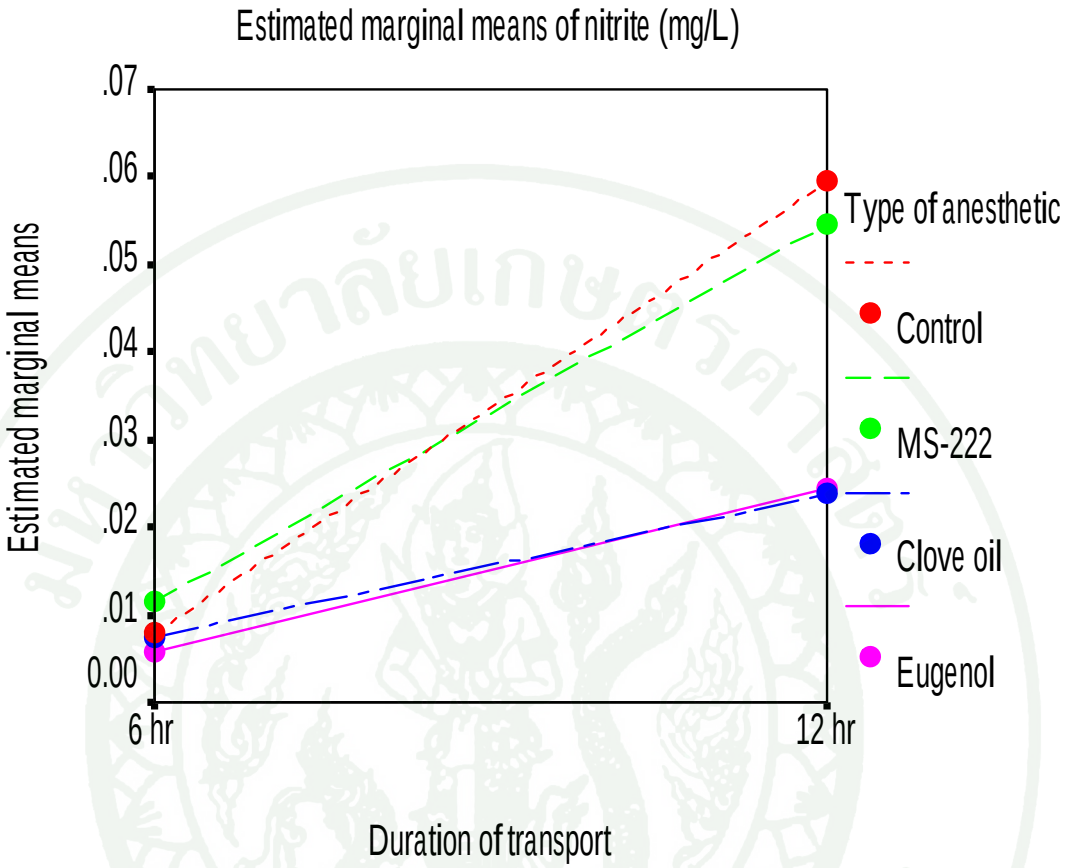
ตารางที่ 30 ผลการวิเคราะห์เกี่ยวกับอิทธิพลหลักของระยะเวลาขนส่งปลาที่มีต่อคุณภาพน้ำและอัตรารอดของลูกปลานิลหลังจากการขนส่งด้วยความหนาแน่น 1,200 ตัวต่อน้ำ 3 ลิตร

Dutation of transport	Water quality					Survival rate after transport (%)	
	DO (mg/L)	pH	Temperature (^{o}C)	Total ammonia (mg/L NH_3-N)	Nitrite (mg/L NO^-_2-N)	Immediately	7 days
6 hr	4.18±1.08[a]	6.54±0.08	29.26±0.28[a]	1.35±0.11[a]	0.01±0.00[a]	93.48±1.64[a]	97.25±5.21[a]
12 hr	2.40±0.70[b]	6.60±0.12	28.73±0.07[b]	1.44±0.09[b]	0.04±0.02[b]	87.97±3.52[b]	86.92±24.47[b]
P-value	0.00	0.11	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00

หมายเหตุ [1]ค่า *P-value* แสดงถึงอิทธิพลของเวลาขนส่งปลาที่มีต่อคุณภาพน้ำและอัตรารอดของลูกปลานิลหลังจากการขนส่ง

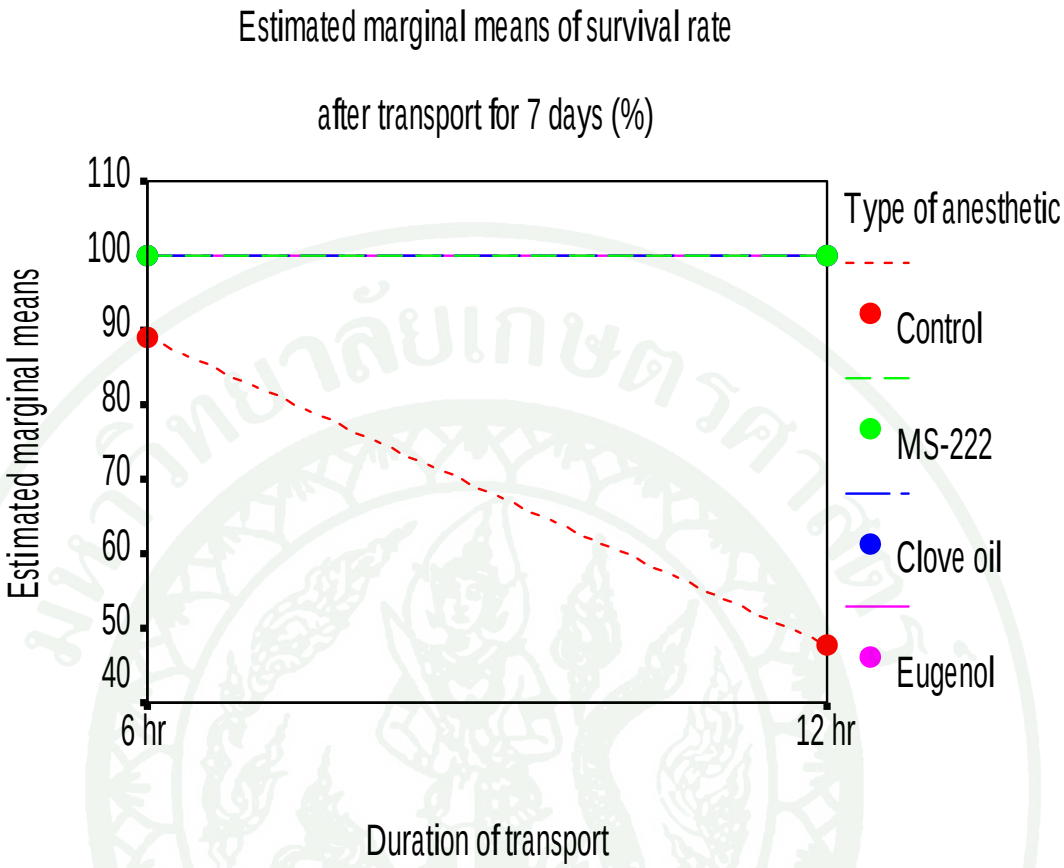
[2]ค่าเฉลี่ยที่กำกับด้วยตัวอักษรต่างกันในแต่ละคอลัมน์มีความแตกต่างกันที่ระดับความเชื่อมั่นเท่ากับ 95 % โดยใช้วิธี Fisher's Least-Significant Different (LSD)

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์



ภาพที่ 10 Profile Plots ที่แสดงถึงปฏิสัมพันธ์ระหว่าง 2 ปัจจัย คือการใช้ยาสลบแต่ละชนิด และระยะเวลาขนส่ง ซึ่งมีอิทธิพลต่อค่าไนไตรต์ของน้ำหลังจากการขนส่งลูกปลานิลด้วยความหนาแน่น 1,200 ตัวต่อน้ำ 3 ลิตร

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์



ภาพที่ 11 Profile Plots ที่แสดงถึงปฏิสัมพันธ์ระหว่าง 2 ปัจจัย คือการใช้ยาสลบแต่ละชนิด และระยะเวลาขนส่ง ซึ่งมีอิทธิพลต่ออัตรารอดของลูกปลานิลหลังจากผ่านการขนส่งด้วยความหนาแน่น 1,200 ตัวต่อน้ำ 3 ลิตร เป็นระยะเวลา 7 วัน

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

6.3 การขนส่งปลาหางไหม้

ในการทดลองส่วนนี้เป็นการเลียนแบบการขนส่งปลาหางไหม้ (น้ำหนักเฉลี่ย 3.01±0.48 กรัม และความยาวเฉลี่ย 6.93±0.28 เซนติเมตร) เป็นเวลา 24 ชั่วโมง เพื่อประเมินถึงประสิทธิภาพของการใช้ยาสลบและความหนาแน่นที่เหมาะสมในการขนส่งปลาหางไหม้ โดยใช้การทดลองแบบแฟกทอเรียลในแผนแบบสุ่มสมบูรณ์ (Factorial in Completely Randomized Design) และพิจารณาอิทธิพลของตัวแปรดังกล่าวจากข้อมูลที่ตรวดวัด ได้แก่ คุณภาพน้ำในภาชนะขนส่งและอัตรารอดหลังจากการขนส่งปลา ซึ่งผลจากการทดลองมีรายละเอียดดังนี้

6.3.1 คุณภาพน้ำในภาชนะขนส่งปลา

การศึกษาอิทธิพลของการใช้ยาสลบและความหนาแน่นในการขนส่งปลาหางไหม้ที่มีต่อการเปลี่ยนแปลงคุณภาพน้ำในภาชนะขนส่งนั้น ได้ทำการตรวจวัดค่าของคุณภาพน้ำที่สำคัญ ได้แก่ ปริมาณออกซิเจนที่ละลายน้ำ ค่าความเป็นกรด-เป็นด่าง อุณหภูมิ แอมโมเนียทั้งหมด และไนไตรท์ โดยมีรายละเอียดดังนี้

ก. ออกซิเจนที่ละลายน้ำ (DO)

จากผลการทดลองที่ได้ พบว่าไม่มีอิทธิพลร่วมระหว่างการใช้ยาสลบแต่ละชนิดและความหนาแน่นในการขนส่งปลาที่มีต่อค่าออกซิเจนที่ละลายน้ำ เนื่องจากค่า *P-value* ที่ได้จากการวิเคราะห์เท่ากับ 0.25 ซึ่งมากกว่าระดับนัยสำคัญที่กำหนดคือ 0.05 (ตารางที่ 31) ทั้งนี้เมื่อพิจารณาถึงอิทธิพลของการใช้ยาสลบแต่ละชนิดในการขนส่งปลา พบว่าปัจจัยดังกล่าวมีอิทธิพลต่อค่าของออกซิเจนที่ละลายน้ำเนื่องจากค่า *P-value* ที่ได้น้อยกว่าระดับนัยสำคัญ 0.05 จากนั้นได้การตรวจสอบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยเป็นรายคู่ที่ระดับความเชื่อมั่น 95% โดยวิธี Fisher's Least-Significant Different (LSD) พบว่าชุดการทดลองที่ใช้สารยูจียอลสังเคราะห์มีค่าเฉลี่ยของออกซิเจนที่ละลายน้ำในภาชนะขนส่งสูงกว่าชุดการทดลองอื่น แต่ไม่แตกต่างทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบกับค่าเฉลี่ยของชุดการทดลองที่ใช้สาร MS-222 (ตารางที่ 32) และจากการพิจารณาในส่วนของความหนาแน่นที่ใช้ในการขนส่งซึ่งแสดงไว้ในตารางที่ 33 พบว่ามีอิทธิพลต่อค่าออกซิเจนที่ละลายน้ำเช่นกัน โดยการขนส่งปลาด้วยความหนาแน่น 50 ตัวต่อน้ำ 3 ลิตร มีค่าเฉลี่ยของออกซิเจนที่ละลายน้ำสูงกว่าชุดการทดลองอื่นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.05$)

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ข. ความเป็นกรด-ด่าง (pH)

จากผลการวิเคราะห์ความแปรปรวนในส่วนของค่าความเป็นกรด-เป็นด่างของน้ำในภาชนะขนส่ง พบว่าการใช้ยาสลบแต่ละชนิดและความหนาแน่นที่ใช้ในการขนส่งปลาไม่มีอิทธิพลร่วมกันต่อค่านี้ เนื่องจากค่า *P-value* ที่ได้มากกว่า 0.05 (ตารางที่ 31) ทั้งนี้เมื่อพิจารณาอิทธิพลของการใช้ยาสลบแต่ละชนิดเพื่อลดกิจกรรมของปลาระหว่างการขนส่ง พบว่าปัจจัยดังกล่าวมีอิทธิพลต่อค่าความเป็นกรด-เป็นด่างของน้ำในภาชนะขนส่งเนื่องจากค่า *P-value* ที่ได้น้อยกว่า 0.05 และเมื่อตรวจสอบความแตกต่างเป็นรายคู่ที่ระดับความเชื่อมั่น 95% โดยวิธี Fisher's Least-Significant Different (LSD) เพื่อเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยของชุดการทดลองต่างๆ พบว่าชุดการทดลองที่ไม่ใช้ยาสลบจะมีค่าเฉลี่ยของค่าความเป็นกรด-เป็นด่างสูงกว่าชุดการทดลองอื่นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.05$) (ตารางที่ 32) และจากการพิจารณาถึงความหนาแน่นที่ใช้ในการขนส่งพบว่าปัจจัยนี้มีอิทธิพลต่อค่าความเป็นกรด-เป็นด่างของน้ำเช่นกัน โดยชุดการทดลองที่ใช้ความหนาแน่น 50 ตัวต่อน้ำ 3 ลิตร จะมีค่าความเป็นกรด-เป็นด่างเฉลี่ยสูงกว่าชุดการทดลองอื่นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.05$) (ตารางที่ 33)

ค. อุณหภูมิ

การทดลองนี้เกิดมีปฏิสัมพันธ์ระหว่างการใช้ยาสลบแต่ละชนิดและความหนาแน่นที่ใช้ในการขนส่งปลาซึ่งแสดงให้เห็นถึงการมีอิทธิพลร่วมกันของปัจจัยทั้งสองที่มีต่ออุณหภูมิของน้ำภายในภาชนะขนส่ง เนื่องจากค่า *P-value* ที่ได้จากการวิเคราะห์คือ 0.02 ซึ่งน้อยกว่าระดับนัยสำคัญที่กำหนดคือ 0.05 และเมื่อพิจารณาจากภาพ Profile Plots พบว่ามีการตัดกันของเส้นกราฟที่แสดงถึงปฏิสัมพันธ์ที่เกิดขึ้นระหว่างสองปัจจัย (ภาพที่ 12) ทั้งนี้หลังจากตรวจสอบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยเป็นรายคู่ที่ระดับความเชื่อมั่น 95% โดยวิธี Fisher's Least-Significant Different (LSD) ชี้ให้เห็นว่าชุดการทดลองที่ใช้สาร MS-222 เป็นยาสลบ และขนส่งปลาด้วยความหนาแน่น 125 ตัวต่อน้ำ 3 ลิตร มีค่าเฉลี่ยของอุณหภูมิน้ำสูงกว่าชุดการทดลองอื่นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.05$) ส่วนชุดการทดลองที่ใช้สาร MS-222 และขนส่งปลาด้วยความหนาแน่น 50 ตัวต่อน้ำ 3 ลิตร จะมีค่าเฉลี่ยของอุณหภูมิต่ำกว่าชุดการทดลองอื่นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.05$) (ตารางที่ 31)

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ง. แอมโมเนียทั้งหมด

ในส่วนนี้พบว่าไม่มีอิทธิพลร่วมกันระหว่างการใช้ยาสลบแต่ละชนิดและความหนาแน่นที่ใช้ในการขนส่งปลาหางไหมที่มีต่อค่าแอมโมเนียทั้งหมดของน้ำในภาชนะขนส่ง เพราะมีค่า *P-value* เท่ากับ 0.29 ซึ่งมากกว่าระดับนัยสำคัญที่กำหนดคือ 0.05 (ตารางที่ 27) และเมื่อพิจารณาอิทธิพลของการใช้ยาสลบแต่ละชนิดในการขนส่งปลาว่ามีอิทธิพลต่อค่าของแอมโมเนียหรือไม่ พบว่าปัจจัยนี้มีอิทธิพลต่อค่าของแอมโมเนียทั้งหมดเนื่องจากค่า *P-value* ที่ได้น้อยกว่า 0.05 ซึ่งจากการตรวจสอบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยเป็นรายคู่ที่ระดับความเชื่อมั่น 95% โดยวิธี Fisher's Least-Significant Different (LSD) ชี้ให้เห็นว่าชุดการทดลองที่ใช้สารยูจีนอลสังเคราะห์เป็นยาสลบเพื่อลดกิจกรรมของปลาระหว่างการขนส่ง มีค่าเฉลี่ยของแอมโมเนียทั้งหมดต่ำกว่าชุดการทดลองอื่น แต่ไม่แตกต่างทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบกับชุดการทดลองที่ใช้สาร MS-222 เป็นยาสลบ (ตารางที่ 28) และเมื่อพิจารณาในส่วนของความหนาแน่นที่ใช้ในการขนส่งปลา พบว่าที่ความหนาแน่นที่ 50 ตัวต่อน้ำ 3 ลิตร มีค่าเฉลี่ยของแอมโมเนียทั้งหมดต่ำกว่าชุดการทดลองอื่นแต่ไม่แตกต่างทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบกับชุดการทดลองที่ใช้ความหนาแน่น 60 ตัวต่อน้ำ 3 ลิตรในการขนส่งปลา (ตารางที่ 29)

จ. ไนไตรท์

จากการทดลองนี้พบว่าผลการวิเคราะห์ความแปรปรวนได้แสดงถึงปฏิสัมพันธ์ที่เกิดขึ้นระหว่างปัจจัยที่เกี่ยวข้องกับการใช้ยาสลบแต่ละชนิดในการขนส่งปลาและความหนาแน่นที่ใช้ เนื่องจากมีค่า *P-value* น้อยกว่าระดับนัยสำคัญ 0.05 และมีการตัดกันของเส้นกราฟข้อมูลบนภาพ Profile Plots (ภาพที่ 13) ซึ่งจากอิทธิพลร่วมกันของทั้งสองปัจจัยที่เกิดขึ้นนี้ จึงได้ทำการตรวจสอบความแตกต่างเป็นรายคู่ที่ระดับความเชื่อมั่น 95% โดยวิธี Fisher's Least-Significant Different (LSD) เพื่อเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยของชุดการทดลองต่าง ๆ ซึ่งจากผลการวิเคราะห์ข้อมูลพบว่าชุดการทดลองที่ไม่ใช้ยาสลบและขนส่งด้วยความหนาแน่น 100 ตัวต่อน้ำ 3 ลิตร มีค่าเฉลี่ยของค่าไนไตรท์สูงกว่าชุดการทดลองอื่นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.05$) (ตารางที่ 31)

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

6.3.2 อัตรารอดของปลาหางไหม้หลังจากการขนส่ง

ก. อัตรารอดของปลาหางไหม้ที่ประเมินทันทีหลังการขนส่ง

การทดลองนี้ได้แสดงถึงผลของอิทธิพลร่วมกันระหว่างการใช้ยาสลบแต่ละชนิดและความหนาแน่นที่ใช้ในการขนส่งที่มีต่ออัตรารอดของปลาหางไหม้เมื่อทำการตรวจวัดทันทีหลังจากการขนส่ง เพราะมีค่า *P-value* ที่ได้น้อยกว่า 0.05 และมีการตัดกันของเส้นกราฟในภาพ Profile Plots ทั้งนี้เมื่อพิจารณาถึงผลการตรวจสอบความแตกต่างเป็นรายคู่ที่ระดับความเชื่อมั่น 95% เพื่อเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยของชุดการทดลองต่าง ๆ โดยวิธี Fisher's Least-Significant Different (LSD) พบว่าชุดการทดลองที่ไม่ใช้ยาสลบและขนส่งปลาด้วยความหนาแน่น 50, 60 และ 75 ตัวต่อน้ำ 3 ลิตร ชุดการทดลองที่ใช้สารยูจีนอลสังเคราะห์เป็นยาสลบและขนส่งปลาด้วยความหนาแน่น 50, 60 และ 75 ตัวต่อน้ำ 3 ลิตร และชุดการทดลองที่ใช้สาร MS-222 เป็นยาสลบและใช้ความหนาแน่น 50 และ 60 ตัวต่อน้ำ 3 ลิตรขนส่งปลา มีอัตรารอดของปลาหลังการขนส่ง 100% แต่ไม่แตกต่างทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบกับชุดการทดลองที่ใช้สาร MS-222 เป็นยาสลบแล้วใช้ความหนาแน่นของปลา 75 ตัวต่อน้ำ 3 ลิตรในการขนส่ง (98.67%) ($P \geq 0.05$) ส่วนที่ความหนาแน่น 100 และ 125 ตัวต่อน้ำ 3 ลิตร พบว่ามีอัตรารอดของปลาต่ำกว่า 50% โดยการขนส่งปลาที่ความหนาแน่น 125 ตัวต่อน้ำ 3 ลิตรและไม่ใช้ยาสลบ จะมีอัตรารอดของปลาหลังการขนส่งต่ำที่สุด (ตารางที่ 31)

ข. อัตรารอดของปลาหางไหม้หลังจากผ่านการขนส่งเป็นระยะเวลา 7 วัน

เมื่อพิจารณาปฏิสัมพันธ์ร่วมกันระหว่างการใช้ยาสลบแต่ละชนิดและความหนาแน่นที่ใช้ในการขนส่งปลาที่มีต่ออัตรารอดของปลาหางไหม้หลังจากผ่านการขนส่ง 7 วัน ในการทดลองนี้พบว่าผลที่ได้มีค่า *P-value* มากกว่าระดับนัยสำคัญที่ 0.05 จึงไม่มีอิทธิพลร่วมกันของปัจจัยทั้งสองต่ออัตรารอดที่เกิดขึ้น (ตารางที่ 31) และเมื่อพิจารณาถึงการใช้ยาสลบในการขนส่งพบว่าไม่มีอิทธิพลต่ออัตรารอดหลังจากการขนส่งปลาที่เวลา 7 วันเช่นกัน (ตารางที่ 32) แต่เมื่อพิจารณาในส่วนของความหนาแน่นที่ใช้ในการขนส่งพบว่ามีอิทธิพลต่ออัตรารอดของปลา เนื่องจากมีค่า *P-value* น้อยกว่า 0.05 สำหรับผลทดสอบความแตกต่างทางสถิติของค่าเฉลี่ยของชุดการทดลองเป็นรายคู่ โดยวิธี Fisher's Least-Significant Different (LSD) ชี้ให้เห็นว่าที่ความหนาแน่น 50 ตัวต่อ 3 ลิตร มีค่าเฉลี่ยของอัตรารอดหลังจากการขนส่ง 7 วัน เท่ากับชุดการทดลองที่ใช้ความหนาแน่น 60 ตัวต่อน้ำ 3 ลิตร คือมีอัตรารอด 100% แต่ไม่แตกต่างทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบกับชุดการทดลองที่ใช้ความหนาแน่น 75 ตัวต่อน้ำ 3 ลิตร ($P \geq 0.05$) ซึ่งมีอัตรารอด 98.89% (ตารางที่ 33)

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ตารางที่ 31 ผลการวิเคราะห์เกี่ยวกับปฏิสัมพันธ์ระหว่างความหนาแน่น และการใช้ยาสลบแต่ละชนิดที่มีต่อคุณภาพน้ำและอัตรารอดของปลาหางไหม้หลังจากการขนส่งด้วยเวลา 24 ชั่วโมง

Interaction effect	Water quality					Survival rate after transport (%)	
	DO (mg/L)	pH	Temperature (^{o}C)	Total ammonia (mg/L NH_3-N)	Nitrite (mg/L NO^{-}_{2}-N)	Immediately	7 days
Control*50 fish /3L	4.68±0.45	6.63±0.04	29.07±0.25^{abc}	1.49±0.05	0.03±0.00^{a}	100.00±0.00^{a}	100.00±0.00
Control*60 fish/3L	4.07±0.68	6.56±0.01	29.47±0.06^{cde}	1.51±0.02	0.03±0.00^{ab}	100.00±0.00^{a}	100.00±0.00
Control*75 fish/3L	3.28±0.15	6.52±0.03	29.43±0.23^{cde}	1.54±0.05	0.05±0.01^{ef}	100.00±0.00^{a}	98.33±0.00
Control*100 fish/3L	3.33±0.17	6.39±0.08	29.53±0.06^{cdef}	1.62±0.07	0.08±0.02^{h}	19.00±1.00^{b}	91.67±2.89
Control*125 fish/3L	2.72±0.08	6.35±0.03	29.83±0.23^{efg}	1.72±0.13	0.04±0.00^{abc}	8.27±1.22^{c}	90.00±2.89
MS-222*50 fish /3L	5.65±0.50	6.55±0.02	28.83±0.29^{a}	1.44+0.02	0.04±0.00^{bcd}	100.00±0.00^{a}	100.00±0.00
MS-222*60 fish/3L	4.66±0.72	6.50±0.03	29.37±0.06^{bcde}	1.40±0.02	0.06±0.00^{f}	100.00±0.00^{a}	100.00±0.00
MS-222*75 fish/3L	3.54±0.21	6.51±0.01	29.63±0.15^{defg}	1.51±0.01	0.07±0.01^{g}	98.67±0.00^{a}	98.33±2.89
MS-222*100 fish/3L	3.5±0.33	6.36±0.05	29.83±0.06^{efg}	1.53±0.07	0.07±0.01^{g}	23.67±1.53^{d}	96.67±2.89
MS-222*125 fish/3L	3.39±0.37	6.38±0.03	30.13±0.06^{g}	1.58±0.06	0.05±0.01^{def}	11.73±2.81^{e}	93.33±2.89

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ตารางที่ 31 (ต่อ)

Interaction effect	Water quality					Survival rate after transport (%)	
	DO (mg/L)	pH	Temperature (^{o}C)	Total ammonia (mg/L NH_3-N)	Nitrite (mg/L NO^{-}_{2}-N)	Immediately	7 days
Eugenol*50 fish /3L	5.38±0.12	6.55±0.04	29.30±0.10^{abcd}	1.41±0.03	0.03±0.00^{a}	100.00±0.00^{a}	100.00±0.00
Eugenol*60 fish/3L	4.45±0.09	6.55±0.03	29.50±0.40^{cdef}	1.40±0.03	0.03±0.00^{ab}	100.00±0.00^{a}	100.00±0.00
Eugenol*75 fish/3L	4.15±0.39	6.48±0.03	28.93±0.78^{ab}	1.48±0.03	0.05±0.00^{cde}	100.00±0.00^{a}	100.00±0.00
Eugenol*100 fish/3L	4.11±0.13	6.32±0.02	30.00±0.10^{fg}	1.53±0.06	0.04±0.01^{abc}	23.33±1.53^{d}	95.00±5.00
Eugenol*125 fish/3L	3.75±0.09	6.37±0.05	29.70±0.10^{defg}	1.59±0.06	0.03±0.00^{ab}	13.43±1.83^{e}	93.33±2.89
P-value	0.25	0.09	0.02	0.29	0.00	0.00	0.48

หมายเหตุ [1]ค่า *P-value* แสดงถึงปฏิสัมพันธ์ระหว่างความหนาแน่นและการใช้ยาสลบแต่ละชนิดเพื่อลดกิจกรรมของปลาหางไหม้ระหว่างการขนส่ง

[2]ค่าเฉลี่ยที่กำกับด้วยตัวอักษรต่างกันในแต่ละคอลัมน์มีความแตกต่างกันที่ระดับความเชื่อมั่นเท่ากับ 95 %
โดยใช้วิธี Fisher's Least-Significant Different (LSD)

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ตารางที่ 32 ผลการวิเคราะห์เกี่ยวกับอิทธิพลหลักของความหนาแน่นในการขนส่งปลาที่มีต่อคุณภาพน้ำและอัตรารอดของปลาหางไหม้หลังจากการขนส่งด้วยเวลา 24 ชั่วโมง

Loading density	Water quality					Survival rate after transport (%)	
	DO (mg/L)	pH	Temperature (^{o}C)	Total ammonia (mg/L NH_3-N)	Nitrite (mg/L NO^{-}_{2}-N)	Immediately	7 days
50 fish /3L	5.23±0.55^{a}	6.57±0.05^{a}	29.07±0.28^{a}	1.45±0.10^{a}	0.03±0.00^{a}	100.00±0.00^{a}	100.00±0.00^{a}
60 fish/3L	4.39±0.56^{b}	6.54±0.04^{b}	29.44±0.21^{b}	1.48±0.08^{ab}	0.04±0.01^{b}	100.00±0.00^{a}	100.00±0.00^{a}
75 fish/3L	3.66±0.44^{c}	6.50±0.03^{b}	29.33±0.52^{b}	1.51±0.09^{b}	0.05±0.01^{c}	99.56±0.67^{a}	98.89±2.20^{a}
100 fish/3L	3.65±0.41^{c}	6.36±0.05^{c}	29.79±0.21^{c}	1.56±0.17^{c}	0.06±0.02^{d}	22.00±2.55^{b}	94.44±3.91^{b}
125 fish/3L	3.29±0.49^{d}	6.37±0.04^{c}	29.89±0.23^{c}	1.63±0.23^{d}	0.04±0.01^{b}	11.14±2.90^{c}	92.22±2.64^{c}
P-value	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00

หมายเหตุ [1]ค่า *P-value* แสดงถึงอิทธิพลของความหนาแน่นที่มีต่อคุณภาพน้ำและอัตรารอดของปลาหางไหม้หลังจากการขนส่ง

[2]ค่าเฉลี่ยที่กำกับด้วยตัวอักษรต่างกันในแต่ละคอลัมน์มีความแตกต่างกันที่ระดับความเชื่อมั่นเท่ากับ 95 % โดยใช้วิธี Fisher's Least-Significant Different (LSD)

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

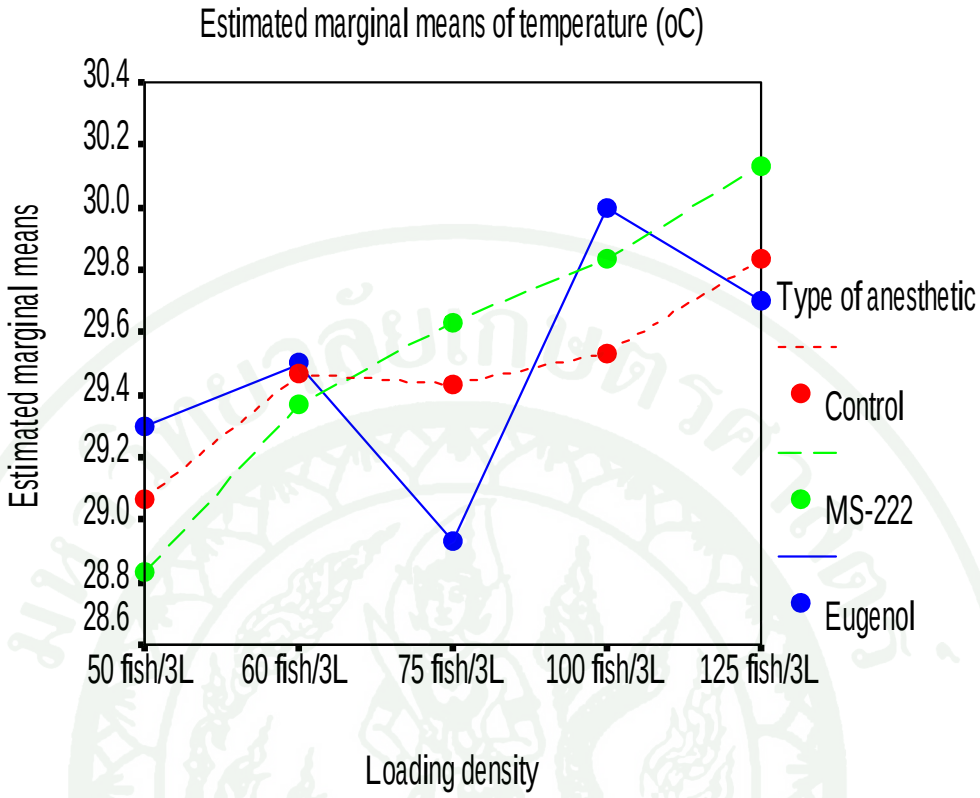
ตารางที่ 33 ผลการวิเคราะห์เกี่ยวกับอิทธิพลหลักของการใช้ยาสลบแต่ละชนิดที่มีต่อคุณภาพน้ำและอัตรารอดของปลาหางไหม้หลังจากการขนส่งด้วยเวลา 24 ชั่วโมง

Type of anesthetic	Water quality					Survival rate after transport (%)	
	DO (mg/L)	pH	Temperature (^{o}C)	Total ammonia (mg/L NH_3-N)	Nitrite (mg/L NO^{-}_{2}-N)	Immediately	7 days
Control	3.62±0.78^{a}	6.49±0.12^{a}	29.47±0.30	1.58±0.11^{a}	0.05±0.02^{a}	65.45±43.94^{a}	96.00±4.71
MS-222	4.15±0.99^{b}	6.46±0.08^{b}	29.56±0.47	1.51±0.06^{b}	0.06±0.01^{b}	66.81±41.71^{b}	97.67±3.72
Eugenol	4.37±0.59^{b}	6.46±0.10^{b}	29.49±0.50	1.49±0.08^{b}	0.04±0.00^{c}	67.35±41.52^{b}	97.67±3.20
P-value	0.00	0.03	0.61	0.00	0.00	0.00	0.08

หมายเหตุ [1]ค่า *P-value* แสดงถึงอิทธิพลของการใช้ยาสลบแต่ละชนิดที่มีต่อคุณภาพน้ำและอัตรารอดของปลาหางไหม้หลังจากการขนส่ง

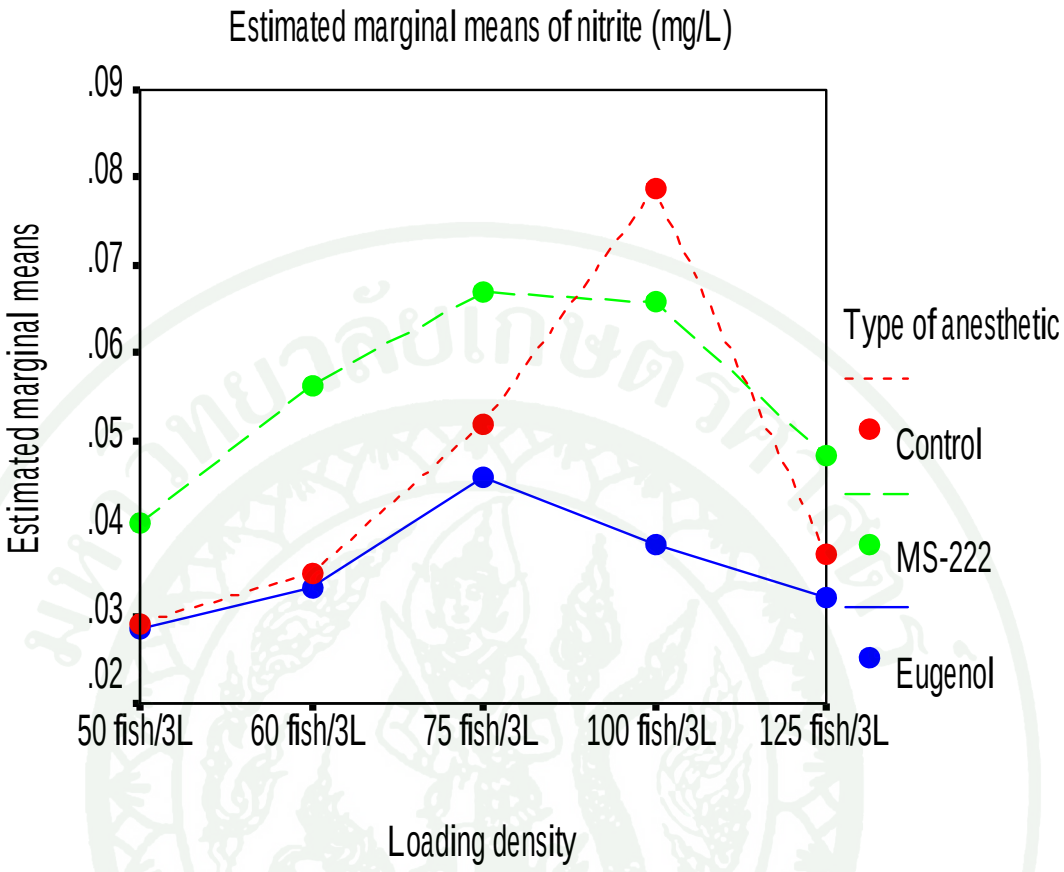
[2]ค่าเฉลี่ยที่กำกับด้วยตัวอักษรต่างกันในแต่ละคอลัมน์มีความแตกต่างกันที่ระดับความเชื่อมั่นเท่ากับ 95 % โดยใช้วิธี Fisher's Least-Significant Different (LSD)

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์



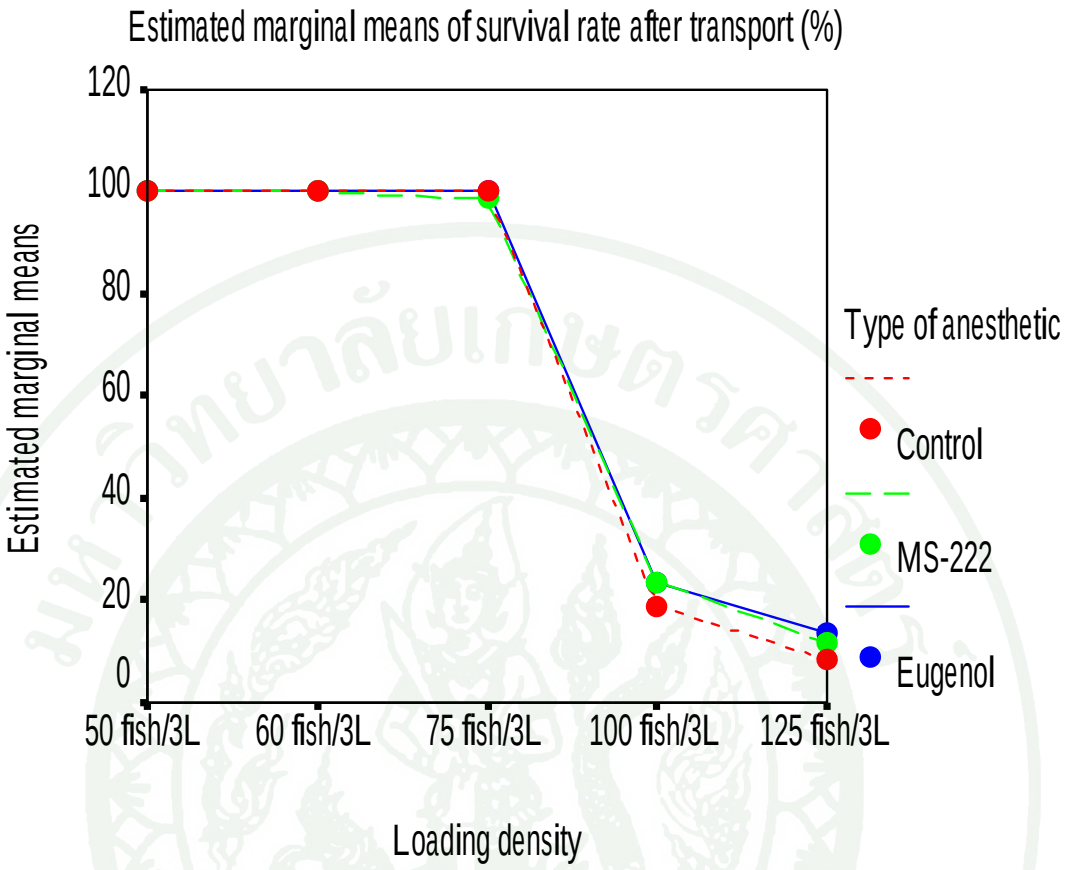
ภาพที่ 12 Profile Plots ที่แสดงถึงปฏิสัมพันธ์ระหว่าง 2 ปัจจัย คือการใช้ยาสลบแต่ละชนิด และความหนาแน่นที่ใช้ในการขนส่งซึ่งมีอิทธิพลต่ออุณหภูมิของน้ำหลังจากการขนส่งปลาหางไหม้ด้วยเวลา 24 ชั่วโมง

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์



ภาพที่ 13 Profile Plots ที่แสดงถึงปฏิสัมพันธ์ระหว่าง 2 ปัจจัย คือการใช้ยาสลบแต่ละชนิด และความหนาแน่นที่ใช้ขนส่งซึ่งมีอิทธิพลต่อค่าไนไตรท์ของน้ำหลังจากการขนส่งปลาหางไหม้ด้วยเวลา 24 ชั่วโมง

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์



ภาพที่ 14 Profile Plots ที่แสดงถึงปฏิสัมพันธ์ระหว่าง 2 ปัจจัย คือการใช้ยาสลบแต่ละชนิด และความหนาแน่นที่ใช้ในการขนส่ง ซึ่งมีอิทธิพลต่ออัตรารอดของปลาหางไหม้ หลังจากการขนส่งด้วยเวลา 24 ชั่วโมง

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

วิจารณ์

1. ความเข้มข้นของยาสลบที่ทำให้ลูกปลานิลตายได้ 50% (LC_{50}) ภายในระยะเวลา 24 ชั่วโมง

ปัจจุบันมีการใช้ยาสลบกับสัตว์น้ำในกิจกรรมเกี่ยวกับอุตสาหกรรมการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำ การวิจัยด้านชีววิทยาของสัตว์น้ำและการประมง (Summerfelt and Smith, 1990; Iversen *et al*., 2003; Pirhonen and Schreck, 2003; Small, 2003) ซึ่งยาสลบในอุดมคตินั้นต้องเหนี่ยวนำให้ปลาสลบอย่างรวดเร็ว ทำให้ปลาเกิดความเครียดน้อย และมีการฟื้นจากการสลบที่รวดเร็ว ทั้งนี้ยาสลบที่มีประสิทธิภาพต้องใช้ได้ในความเข้มต่ำ และระดับความเข้มข้นที่เป็นพิษต่อสัตว์น้ำต้องห่างจากค่าความเข้มข้นที่ใช้ได้อย่างปลอดภัยในช่วงกว้าง โดยพิจารณาจากข้อมูลของค่าความเป็นพิษเฉียบพลัน (Coyle *et al*., 2004)

ในศึกษานี้พบว่าค่า LC_{50} ที่ 24 ชั่วโมงของสารยูจีนอลสังเคราะห์ เมื่อทดสอบกับลูกปลานิล (ขนาดน้ำหนักเฉลี่ย 0.30$\pm$0.01 กรัม) อยู่ที่ 16.98 มิลลิกรัมต่อลิตร และเมื่อเปรียบเทียบกับน้ำมันกานพลูและสาร MS-222 พบว่าสารยูจีนอลสังเคราะห์มีค่า LC_{50} ใกล้เคียงกับน้ำมันกานพลู (16.95 มิลลิกรัมต่อลิตร) แต่มีค่าต่ำกว่าสาร MS-222 (72.50 มิลลิกรัมต่อลิตร) จากผลการศึกษาชี้ให้เห็นว่าสารยูจีนอลสังเคราะห์และน้ำมันกานพลูมีความเป็นพิษมากกว่าสาร MS-222 ดังนั้นการใช้สารยูจีนอลสังเคราะห์และน้ำมันกานพลูจึงต้องใช้อย่างระมัดระวังในระดับความเข้มข้นที่ต่ำ แต่ถ้าพิจารณาด้านประสิทธิภาพในการสลบปลาของการทดลองนี้ พบว่าสารยูจีนอลสังเคราะห์และน้ำมันกานพลูสามารถใช้ได้อย่างมีประสิทธิภาพมากกว่าสาร MS-222 เนื่องจากสามารถใช้ได้ในระดับความเข้มข้นที่ต่ำกว่า

สำหรับการศึกษาความเป็นพิษแบบเฉียบพลันของสารยูจีนอลกับสัตว์น้ำนั้น ในเบื้องต้นได้มีรายงานต่าง ๆ ซึ่งศึกษาค่าความเป็นพิษของสารนี้ แต่ส่วนใหญ่สารที่ใช้มักอยู่ในรูปของน้ำมันกานพลู เช่น Keene *et al*. (1998) ซึ่งระบุว่าค่า LC_{50} ที่เวลา 0.5-96 ชั่วโมงของน้ำมันกานพลูเมื่อทดสอบกับลูกปลา rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss* Walbaum) น้ำหนัก 20 กรัม ยาว 12 เซนติเมตร มีค่าอยู่ที่ 65-9 มิลลิกรัมต่อลิตร ตามลำดับ ต่อมา Taylor and Roberts (1999) ได้รายงานว่าค่า LC_{50} ที่ 10 นาที ของน้ำมันกานพลูเมื่อทดสอบกับลูกปลา white sturgeon (*Acipenser transmontanus*), chinook salmon (*Oncorhynchus tshawytscha* Walbaum) และ coho salmon (*Oncorhynchus kisutch*) อยู่ที่ 526, 62 และ 96 มิลลิกรัมต่อลิตร ตามลำดับ และในปี ค.ศ. 2003 นั้น

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

Hangono ได้ศึกษาค่า LC_{50} ที่ 24 ชั่วโมงในลูกปลากระพงขาว (*Lates calcarifer* Bloch) น้ำหนักเฉลี่ย 0.45±0.74 กรัม และความยาวเฉลี่ย 3.10 ±0.15 เซนติเมตร โดยพบว่ามีค่า LC_{50} ที่ 24 ชั่วโมงอยู่ที่ 30 มิลลิกรัมต่อลิตร จากนั้น Grush *et al.* (2004) ได้ศึกษาประสิทธิภาพในการใช้น้ำมันกานพลูเพื่อเป็นยาสลบปลา zebrafish (*Danio rerio* Hamilton)โดยพิจารณาจากค่า LC_{50} ที่ 96 ชั่วโมงและเปรียบเทียบประสิทธิภาพกับสาร MS-222 ภายใต้สภาพของการทดลองเดียวกัน พบว่าน้ำมันกานพลูมีค่า LC_{50} อยู่ที่ 21 มิลลิกรัมต่อลิตร และมีประสิทธิภาพดีกว่าสาร MS-222 ซึ่งผลที่ได้มีลักษณะเช่นเดียวกับผลที่เกิดขึ้นในงานวิจัยนี้ และในปีต่อมาได้มีศึกษาผลของความเป็นพิษแบบเฉียบพลันของน้ำมันกานพลูที่มีต่อปลาคาร์พ (*Cyprinus carpio* L.) น้ำหนักเฉลี่ย 15.00±5.00 กรัม ความยาวเฉลี่ย 110.00±21.00 มิลลิเมตร พบว่าค่า LC_{50} ที่ 10 นาที ค่า $LC_{0.1}$ ที่ 10 นาที ค่า $LC_{99.9}$ ที่ 10 นาที ค่า LC_{50} ที่ 96 ชั่วโมง ค่า $LC_{0.1}$ ที่ 96 ชั่วโมง และ ค่า $LC_{99.9}$ ที่ 96 ชั่วโมง มีค่าเท่ากับ 74.3, 51.6, 110.1, 18.10, 15.45 และ 19.80 มิลลิกรัมต่อลิตร ตามลำดับ (Velisek *et al*. 2005)

อย่างไรก็ตามไม่เฉพาะการทดลองในปลาเท่านั้น ยังมีการศึกษาค่าความเป็นพิษเฉียบพลันในกุ้ง เช่น Soltani *et al*. (2004) ได้ทดลองความเป็นพิษเฉียบพลันของน้ำมันกานพลูที่มีต่อกุ้ง *Penaeus semisulcatus* พบว่า ค่า EC_{50} ที่ 1 ชั่วโมง (ความเข้มข้นที่มีผลให้สัตว์ทดลองตายได้ 50%) ค่า LC_{50} ที่ 1 ชั่วโมง (ความเข้มข้นที่ทำให้ปลาตายได้ 50% หลังจาก 1 ชั่วโมง) และค่า LC_{50} ที่ 24 ชั่วโมง (ความเข้มข้นที่ทำให้ปลาตายได้ 50% หลังจาก 24 ชั่วโมง) มีค่าเท่ากับ 25, 130 และ 30 มิลลิกรัมต่อลิตร ตามลำดับ โดยทำการศึกษาที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ความเค็ม 40 ppt pH 8.6 และ ออกซิเจนที่ละลายในน้ำมากกว่า 6 มิลลิกรัมต่อลิตร จากนั้น Akbari *et al*. (2010) ได้รายงานการศึกษาเกี่ยวกับค่า LC_{50} ที่ 24 ชั่วโมงของสารยูจีนอลในลูกกุ้ง white Indian shrimp (*Fenneropenaeus indicus*) ระยะ post lavae พบว่ามีค่า LC_{50} อยู่ที่ 5.2 มิลลิกรัมต่อลิตร โดยมีค่าต่ำสุดของความเชื่อมั่นอยู่ที่ 5.0 มิลลิกรัมต่อลิตร และค่าสูงสุดอยู่ที่ 5.3 มิลลิกรัมต่อลิตร

จากผลการทดลองที่ได้ในงานวิจัยนี้และรายงานต่าง ๆ ที่เกี่ยวข้องกับการทดสอบหาค่าความเป็นพิษแบบเฉียบพลันของสารยูจีนอลสังเคราะห์ พบว่าค่า LC_{50} ที่วิเคราะห์ได้ของแต่ละการทดลองมีความแตกต่างกัน ทั้งนี้เนื่องจากปัจจัยต่าง ๆ ที่ใช้ในการทดสอบมีความแตกต่าง เช่น ชนิด ขนาดและช่วงชีวิตของสัตว์ที่ศึกษา ชนิดและความเข้มข้นของสารที่ใช้ รวมทั้งเวลาที่ใช้ในการทดสอบ ทั้งนี้ Metcafe (2000) ได้รายงานว่าปัจจัยต่าง ๆ ทั้งทางเคมี กายภาพ และทางชีวภาพล้วนแต่มีผลต่อระดับของความเป็นพิษที่จะส่งผลต่อปลา อีกทั้งยังขึ้นอยู่กับคุณสมบัติในการละลายน้ำของสารเคมีที่ใช้ คุณภาพน้ำ และเส้นทางการรับสารเคมี ซึ่งความเป็นพิษที่เกิดขึ้นจากสารเคมีนั้น

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

อาจมีผลต่อเนื้อเยื่อของปลา เช่น เยื่อบุผิวที่เหงือก (gill epithelium) ที่บอบบางและเป็นทางผ่านที่สารเคมีสามารถเข้าสู่ร่างกายได้ง่าย

จากรายงานเกี่ยวกับการศึกษาในส่วนของชีวเคมีของเลือดและพยาธิสภาพของเนื้อเยื่อ พบว่าการใช้น้ำมันกานพลูไม่ทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงทางพยาธิสภาพของเนื้อเยื่อที่เหงือกของปลาคาร์พและไม่มีผลต่อการเปลี่ยนแปลงทางด้านชีวเคมีของเลือด (Velisek *et al*., 2005)

ในการใช้ยาสลบกับปลานั้นส่วนใหญ่อาศัยการละลายสารเคมีลงไปในน้ำที่ต้องการสลบปลา ซึ่งตัวสารเคมีที่อยู่ในน้ำจะซึมผ่านเหงือก เข้าสู่เส้นเลือดแดงเพราะเป็นเส้นทางที่สั้นที่สุดเพื่อจะนำยาสลบไปออกฤทธิ์ที่ระบบประสาทส่วนกลาง (central nervous system) (Keene *et al*., 1998; Ross and Ross, 1999) และเมื่อพิจารณาในส่วนของชนิดของปลาที่ตอบสนองต่อความเป็นพิษของสารเคมีนั้น Sprague (1985) ได้ชี้ให้เห็นถึงความผันแปรของความเป็นพิษที่เกิดขึ้นว่าเกี่ยวข้องกับชนิดของสัตว์ทดลองมากกว่าสภาพแวดล้อมที่ทำการทดลอง ความผันแปรนี้สามารถทำให้เกิดผลต่อเนื่องไปสู่ความแตกต่างของอัตราการเผาผลาญสารอาหาร (metabolic rates) และการเปลี่ยนแปลงทางสรีรวิทยาของปลา ซึ่งอาจนำไปสู่ความแตกต่างของค่าความเป็นพิษที่ตรวจวัดได้

ระดับความเป็นพิษของยาสลบที่มีต่อปลานั้นอาจประเมินได้จากอัตราการเต้นของหัวใจที่ต่ำลง เพราะเมื่อปลาได้รับยาสลบเข้าไปในร่างกายจะมีอัตราการหายใจลดลงโดยสังเกตได้จากการเปิด-ปิดแผ่นปิดเหงือกที่ช้าลง ซึ่งเป็นผลจากการที่ตัวยาสลบไปกดการทำงานของสมองส่วนเมดัลลา (medulla) ที่ควบคุมการหายใจทำให้การเต้นของหัวใจลดลง และปริมาณเลือดที่ไปแลกเปลี่ยนก๊าซที่เหงือกลดลง ส่งผลให้เกิดสภาวะ hypoxia ตามมา ถ้าปลาอยู่ในสภาวะเช่นนี้เป็นเวลานานอาจทำให้ปลาตายได้ โดยปลาที่ตายจะมีลักษณะของแผ่นปิดเหงือกเปิดอ้าค้างไว้ซึ่งแสดงถึงลักษณะของการตายเนื่องจากการขาดออกซิเจน (Hikasa *et al*., 1986; Hanggono, 2003; Iversen *et al*., 2003)

Cooke *et al*. (2004) ได้ประเมินการเต้นของหัวใจ (Cardiovascular) ในปลา Largemouth bass (*Micropterus salmoides*) พบว่าปลาที่ได้รับน้ำมันกานพลูในระดับความเข้มข้นต่าง ๆ จะมีการหายใจและอัตราการเต้นของหัวใจเพิ่มขึ้นหลังจากนั้นอัตราการเต้นของหัวใจก็จะช้าลง และ Sladky *et al*. (2001) รายงานว่าปลา red pacu (*Piaractus brachpomus*) ที่ได้รับน้ำมันกานพลูที่ความเข้มข้นสูงมาก (100-200 มิลลิกรัมต่อลิตร) มีผลต่อการเต้นของหัวใจเพิ่มขึ้นซึ่งอาจเป็นผลมาจากการ

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ไหลเวียนของเลือดที่ไม่ปกติ การลำเลียงออกซิเจนไม่พอ จึงต้องการลำเลียงที่ความเข้มข้นสูงขึ้น โดยการแสดงออกมาในรูปของการเต้นของหัวใจที่เพิ่มขึ้นในช่วงท้ายก่อนที่ปลาจะตาย

2. ความเข้มข้นที่เหมาะสมของสารยูจีนอลสังเคราะห์ น้ำมันกานพลู และสาร MS-222 เพื่อใช้ในการสลบสัตว์น้ำ

ยาสลบที่ใช้กันทั่วไปในปัจจุบันคือสาร MS-222 (tricaine methanesulfonate) (Marking and Meyer, 1985) อย่างไรก็ตามสารนี้ได้ถูกพิจารณาว่าเป็นสารก่อมะเร็ง และในกรณีที่ใช้กับปลาบริโภคต้องมีระยะหยุดยา 21 วัน นอกจากนี้สาร MS-222 เป็นสารที่มีราคาแพง และต้องใช้ในความเข้มข้นสูง ซึ่งสารยูจีนอลสังเคราะห์ก็เป็นทางเลือกหนึ่งของยาสลบที่สามารถใช้ได้กับปลา เนื่องจากมีข้อดีหลายอย่าง คือไม่ต้องการระยะหยุดยา ไม่ก่อให้เกิดมะเร็งและการกลายพันธุ์ ใช้ได้ในความเข้มข้นต่ำ และมีราคาถูก นอกจากนี้ยังสามารถใช้ได้ในทางทันตกรรม ใช้เป็นยาคลายกล้ามเนื้อ และเป็นสารที่ใช้ในการแต่งกลิ่นถนอมอาหาร (Guenette *et al*., 2007)

เมื่อพิจารณาถึงประสิทธิภาพของยาสลบที่ดีนั้น พบว่าขึ้นอยู่กับหลายปัจจัยด้วยกัน ซึ่ง Stehly and Gingerich (1999) ได้รายงานว่า การเพิ่มขึ้นของอุณหภูมิสามารถเพิ่มประสิทธิภาพของยาสลบได้ เนื่องจากอัตราเมทาบอริซึมของปลาจะเพิ่มขึ้นทำให้การนำยาสลบเข้าสู่ร่างกายเป็นไปได้เร็ว นอกจากนี้ความเข้มข้นของยาสลบที่ใช้ก็บ่งบอกถึงประสิทธิภาพของยาสลบเช่นกันเนื่องจากความเข้มข้นที่สูงจะทำให้การสลบเกิดขึ้นได้เร็ว (Taylor and Roberts, 1999) ทั้งนี้ในส่วนของปัจจัยทางด้านสรีรวิทยาของปลา พบว่าช่วงของวงจรชีวิต อายุ ขนาด น้ำหนัก ปริมาณไขมันสะสมในร่างกาย และสภาวะการเกิดโรค ล้วนแต่มีผลต่ออัตราเมทาบอริซึมของปลาทั้งสิ้น และเมื่อพิจารณาถึงคุณสมบัติทางด้านเภสัชจลศาสตร์ (pharmacokinetics) พบว่ามักมีผลร่วมกันระหว่างโครงสร้างทางเคมีของยาสลบและปัจจัยทางด้านสิ่งแวดล้อม เช่น อุณหภูมิ ค่าความเป็นกรด-เป็นด่าง เนื่องจากสิ่งเหล่านี้มีผลต่ออัตราเมทาบอริซึมของร่างกาย และทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงของการซึมผ่านที่เหงือก ทำให้มีการเพิ่มหรือลดประสิทธิภาพของยาสลบได้ ซึ่งปัจจุบันไม่มีคำจำกัดความเฉพาะเกี่ยวกับการทดสอบประสิทธิภาพของการใช้ยาสลบในปลา และงานวิจัยต่าง ๆ มักทำการศึกษาประสิทธิภาพของการใช้ยาสลบในส่วนที่เกี่ยวกับการทำให้ปลาสงบลงเพื่อให้สามารถจับได้ง่ายเท่านั้น (Gilderhus and Marking, 1987; Hamácková *et al*., 2001; Walsh and Pease, 2002; Woody *et al*., 2002) ทั้งนี้ความผันแปรของการทดลองเพื่อทดสอบประสิทธิภาพของการใช้ยาสลบกับสัตว์น้ำ พบว่าส่วนใหญ่ขึ้นอยู่กับผู้ทำการทดลอง วิธีการทดลอง และปัจจัยที่ต้องการศึกษา โดยมัก

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

พิจารณาถึงความเกี่ยวข้องของปัจจัยด้านชีววิทยาของสัตว์ทดลอง และผลกระทบที่มีต่อสิ่งแวดล้อม (Ross and Ross, 1999)

การเลือกชนิดและความเข้มข้นของยาสลบในอุดมคติสำหรับใช้กับปลานั้นควรพิจารณาจากคุณสมบัติหลายอย่างได้แก่ ยาสลบนั้นต้องสามารถทำให้ปลาเข้าสู่สภาวะของการสลบได้ภายในเวลา 3-5 นาที และมีการฟื้นจากการสลบในช่วงเวลาน้อยกว่า 10 นาที ราคาถูก ไม่มีสารตกค้าง ปลอดภัยกับคนและปลาที่สัมผัสกับยาสลบนั้น ๆ (Ross, 2001; Tsantilas *et al*., 2005) การใช้ยาสลบในความเข้มข้นต่ำสามารถลดอัตราเมทาบอลิซึมของสัตว์น้ำระหว่างการขนส่งได้ เป็นผลให้ความเครียดของสัตว์น้ำ การใช้ออกซิเจน และการขับของเสียในรูปของแอมโมเนียและคาร์บอนไดออกไซด์ระหว่างการขนส่งลดลงได้ (Wedemeyer, 1996; Ross and Ross, 1999)

งานวิจัยนี้ได้ทำการศึกษาถึงคุณสมบัติของสารยูจีนอลสังเคราะห์ในด้านต่าง ๆ เพื่อประเมินประสิทธิภาพในการใช้สารนี้เป็นยาสลบและลดกิจกรรมของปลาระหว่างการขนส่ง โดยพิจารณาจากปัจจัยต่าง ๆ ที่สามารถบ่งบอกถึงประสิทธิภาพของตัวสารและผลกระทบที่มีต่อสัตว์น้ำ ซึ่งในอดีตสารยูจีนอลที่ใช้กันทั่วไปอยู่ในรูปของน้ำมันกานพลู แต่สารยูจีนอลในรูปนี้มีขั้นตอนการเตรียมที่ยุ่งยากเนื่องจากตัวสารมีลักษณะเป็นน้ำมันที่ไม่ละลายน้ำ จึงต้องอาศัยตัวทำละลายได้แก่ สาร ethanol เพื่อให้สามารถละลายน้ำได้ ซึ่งการละลายด้วยสารนี้อาจส่งผลกระทบทางด้านลบต่อสัตว์น้ำที่เราต้องการจะสลบมากขึ้น (Brown, 1993) อีกทั้งน้ำมันกานพลูเป็นสารที่ได้จากการสกัดซึ่งอาจมีการเจือปนของสารอื่นซึ่งอาจจะมีข้อดีในส่วนของการเสริมฤทธิ์ของการสลบหรือในทางกลับกันสารนั้นอาจเป็นสารก่อมะเร็งซึ่งอาจมีผลเสียต่อทั้งสัตว์น้ำและตัวผู้ใช้ในระยะยาว ดังนั้นจึงได้มีการพัฒนาสารยูจีนอลในรูปแบบของสารสังเคราะห์ขึ้น ซึ่งมีคุณสมบัติเช่นเดียวกับสารออกฤทธิ์ที่อยู่ในน้ำมันกานพลู แต่มีความสะดวกในการใช้งานมากกว่า สามารถเตรียมได้ในความเข้มข้นของสารออกฤทธิ์ 100% และยังเป็นสารที่ทางองค์การอาหารและยาของสหรัฐอเมริกา (USFDA) รับรองว่าสามารถนำมาใช้ได้อย่างปลอดภัยกับสัตว์น้ำ (Generally Regarded as Safe; GRAS) (Summerfelt and Smith, 1990; Anderson *et al*., 1997)

สำหรับการทดสอบประสิทธิภาพของยาสลบโดยพิจารณาจากระยะเวลาที่ปลาสลบและเวลาที่ปลาฟื้นจากกการสลบ การทดลองนี้ชี้ให้เห็นว่าสารยูจีนอลสังเคราะห์มีประสิทธิภาพมากกว่าสาร MS-222 เนื่องจากพบว่าสารยูจีนอลสังเคราะห์และน้ำมันกานพลูสามารถเหนี่ยวนำให้ปลาสลบเข้าสู่ระยะต่าง ๆ ของการสลบได้ด้วยความเข้มข้นต่ำ และใช้เวลาสั้นกว่าสาร MS-222 ซึ่งแนวโน้ม

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ของผลการทดลองที่เกิดขึ้นนี้คล้ายกับผลการทดลองที่รายงานไว้ของ Keene *et al*. (1998) และ Grush *et al*. (2004) ที่ระบุว่าประสิทธิภาพของสารยูจีนอลในน้ำมันกานพลูดีกว่าสาร MS-222 เช่นกัน นอกจากนี้สารยูจีนอลสังเคราะห์ยังมีคุณสมบัติเป็นยาสลบที่ดีตามลักษณะของยาสลบปลาในอุดมคติ (Marking and Mayer, 1985)

จากผลการศึกษาครั้งนี้พบว่าลูกปลานิลขนาด 0.30±0.01 กรัม และปลาหางไหม้ขนาด 3.01±0.48 กรัม จะถูกเหนี่ยวนำให้เข้าสู่เฉพาะระยะ sedation ของการสลบได้ เมื่อใช้สารยูจีนอลสังเคราะห์และน้ำมันกานพลูที่ความเข้มข้น 5 มิลลิกรัมต่อลิตร ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยของ Hangono (2003) ที่ใช้น้ำมันกานพลูในระดับความเข้มข้นนี้เพื่อลดกิจกรรมของลูกปลาลูกปลากะพงขาว (*Lates calcarifer* Bloch) น้ำหนักเฉลี่ย 0.45±0.74 กรัม และความยาวเฉลี่ย 3.10±0.15 เซนติเมตร ระหว่างการขนส่ง และต่อมา Cooke *et al*. (2004) ก็ได้แนะนำว่าความเข้มข้นนี้สามารถในการลดกิจกรรม ของปลา largemouth bass (*Micropterus salmoilde*s) น้ำหนักเฉลี่ย 99.00±0.70 กรัม และความยาวเฉลี่ย 206.00±4.00 เซนติเมตรระหว่างการขนส่งได้เช่นกัน อย่างไรก็ตาม เมื่อพิจารณาถึงความเข้มข้นที่เหนี่ยวนำให้ปลานิลขนาด 70.85±1.03 กรัม เกิดการสลบระยะ sedation พบว่าความเข้มข้นที่ 10 มิลลิกรัมต่อลิตร ของสารยูจีนอลสังเคราะห์และน้ำมันกานพลูเป็นระดับความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถใช้กับปลานิลขนาดนี้ได้

เมื่อพิจารณาถึงความเข้มข้นที่เหมาะสมซึ่งสามารถทำให้ปลาสลบได้อย่างสมบูรณ์ ในการทดลองนี้พบว่าความเข้มข้นที่ 20 มิลลิกรัมต่อลิตร ของสารยูจีนอลสังเคราะห์และน้ำมันกานพลูเป็นความเข้มข้นที่เหมาะสมซึ่งสามารถใช้กับลูกปลานิลขนาด 0.30±0.01 กรัม และปลาหางไหม้ขนาด 3.01±0.48 กรัมได้ และพบว่าผลที่ได้ดังกล่าวสอดคล้องกับงานวิจัยของของ Keene *et al*. (1998) ที่รายงานว่าปลาปลา rainbow trout ขนาด 20.46±0.37 กรัม สามารถสลบได้ภายในเวลา 1.8-0.6 นาที ด้วยการใช้น้ำมันกานพลูที่ความเข้มข้น 20-100 มิลลิกรัมต่อลิตร และต่อมา Stehly and Gingerich (1999) ก็ได้ให้ข้อมูลว่าความเข้มข้นของน้ำมันกานพลูที่ 20 มิลลิกรัมต่อลิตร สามารถทำให้ปลา channel catfish (*Ictalurus punctatus*) ขนาด 1.20-12.70 เซนติเมตร สลบได้ด้วยเวลา 5.3 นาที ส่วนปลา bluegill (*Lepomis macrochirus*) ขนาด 1.20-12.70 เซนติเมตร สามารถสลบได้ด้วยเวลา 1.2 นาที ทั้งนี้ Cho and Heath (2000) ก็ได้รายงานเช่นกันว่าความเข้มข้นที่ 20 มิลลิกรัมต่อลิตร ของน้ำมันกานพลูสามารถเหนี่ยวนำให้ปลา Chinook salmon ขนาด 40.20±0.60 กรัม สลบได้ในน้ำที่อุณหภูมิ 7 องศาเซลเซียสโดยใช้เวลาในการสลบ 20 นาที และในปี ค.ศ. 2003 Hangono ก็ได้ศึกษาพบว่าน้ำมันกานพลูสามารถใช้สลบลูกปลากะพงขาว (*Lates calcarifer* Bloch) ขนาด 0.45±0.74

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

กรัม ด้วยความเข้มข้น 20 มิลลิกรัมต่อลิตรเช่นกัน แต่อย่างไรก็ตาม ในส่วนของความความเข้มข้นที่เหมาะสมของสารยูจีนอลสังเคราะห์และน้ำมันกานพลูที่ใช้เพื่อสลบปลานิลขนาด 70.85±1.03 กรัม พบว่ามีความเข้มข้นอยู่ที่ 30 มิลลิกรัมต่อลิตร ซึ่งแสดงให้เห็นถึงความแตกต่างของขนาดปลาที่มีผลต่อการตอบสนองของยาสลบ

การศึกษาการใช้สารยูจีนอล น้ำมันกานพลู และ อนุพันธ์ของสารยูจีนอลเป็นยาสลบนั้นได้มีรายงานต่าง ๆ เกี่ยวกับการวิจัยในเบื้องต้นที่บ่งบอกถึงประสิทธิภาพของการใช้สารนี้เป็นยาสลบปลาได้แก่ งานวิจัยของ Taylor and Roberts (1999) ซึ่งให้ความสนใจในการใช้น้ำมันกานพลูกับปลา white sturgeon ขนาด 16 กรัม ด้วยความเข้มข้นของน้ำมันกานพลู 25 มิลลิกรัมต่อลิตร โดยพบว่าสารนี้สามารถทำให้ปลาสลบได้ภายในเวลา 3 นาที และต่อมา Durville and Collet (2001) ได้ใช้น้ำมันกานพลูที่ความเข้มข้น 25 มิลลิกรัมต่อลิตร เพื่อทำให้ลูกปลา mullet (*Valamugil cunnesius*) ขนาด 9 กรัม สลบได้ภายในเวลาอันสั้น นอกจากนี้ Woody *et al*. (2002) ได้แนะนำว่าความเข้มข้นของน้ำมันกานพลูที่ 50 มิลลิกรัมต่อลิตร สามารถใช้เพื่อสลบปลา sockeye salmon (*Oncorhynchus nerka*) ขนาดความยาว 400-550 มิลลิเมตร ที่อุณหภูมิ 9-10 องศาเซลเซียสได้ และ Inoue *et al*. (2003) ได้รายงานว่าน้ำมันกานพลูสามารถใช้สลบลูกปลา matrinxã (*Brycon cephalus* Gunther, 1869) ขนาดเฉลี่ย 44.40±4.60 กรัมโดยใช้ความเข้มข้น 40 มิลลิกรัมต่อลิตร ซึ่งสามารถทำให้ปลาสลบได้ภายในเวลา 1 นาที

Roubach *et al*. (2005) ได้ศึกษาพบว่าสารยูจีนอลที่ความเข้มข้น 65 มิลลิกรัมต่อลิตร สามารถใช้ในการเหนี่ยวนำให้ปลา tamaqui (*Colossoma macropomum* Cuvier) ขนาด 56.60±7.70 กรัมสลบได้ และพบว่าปลาไม่มีการตายเกิดขึ้นเมื่ออยู่ในยาสลบที่ระดับความเข้มข้นนี้เป็นเวลา 30 นาที และความเข้มข้นนี้สามารถใช้ได้กับทั้งลูกปลาและปลาตัวเต็มวัยโดยให้ผลของการสลบและการฟื้นจากการสลบไม่แตกต่างกันมากนัก

Hajek *et al.* (2006) ได้ศึกษาผลของการใช้น้ำมันกานพลูกับปลาคาร์พ (*Cyprinus carpio* L.) ขนาด 32.60±8.20 กรัม พบว่าความเข้มข้นของยาสลบที่เหมาะสมกับการใช้ในการสลบปลาอยู่ในช่วง 30-50 มิลลิกรัมต่อลิตร เพื่อให้ปลาสลบเป็นเวลามากกว่า 5 นาที ส่วน Weber *et al.* (2009) ได้ทดสอบประสิทธิภาพของน้ำมันกานพลูที่ใช้กับปลา Senegalese sole (*Solea senegalensis* Kaup 1858) ขนาด 74±40 กรัม พบว่าความเข้มข้นที่เหมาะสมที่สามารถเหนี่ยวนำให้เกิดการสลบอยู่ที่ 30 มิลลิกรัมต่อลิตร

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

วีระศักดิ์ และคณะ (2549) ได้เปรียบเทียบประสิทธิภาพในการสลบของน้ำมันกานพลูกับ quinaldine โดยใช้ความเข้มข้นของน้ำมันกานพลูที่ 80 มิลลิกรัมต่อลิตร และ quinaldine 35 มิลลิกรัมต่อลิตร พบว่าน้ำมันกานพลูมีระยะเวลาเฉลี่ยที่เหนี่ยวนำให้ปลาคาร์พสลบอยู่ที่ 0.70 นาที ส่วน quinaldine มีเวลาเฉลี่ยที่ 3.52 นาที โดยให้ผลแตกต่างทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญ ($P<0.01$) ระยะเวลาฟื้นตัวของปลาที่สลบด้วยน้ำมันกานพลูมีค่าเฉลี่ย 3.15 นาที ส่วน quinaldine มีค่าเฉลี่ย 2.63 นาที พบว่าไม่มีความแตกต่างทางสถิติ ($P>0.05$) และเมื่อพิจารณาผลของยาสลบต่ออัตราการหายใจพบว่าอัตราการหายใจขณะสลบและหลังการสลบของน้ำมันกานพลูมีอัตราการหายใจน้อยกว่าการสลบด้วย quinaldine

เมื่อพิจารณาในส่วนของการใช้สาร MS-222 ซึ่งมีคุณสมบัติเป็น asphyxiant คือจะทำให้ร่างกายมีออกซิเจนลดลง และทำให้เกิดสภาวะเมทาบอลิซึมแบบไม่ใช้ออกซิเจนตามมา (Stoskopf, 1993) พบว่าสารนี้มีประสิทธิภาพในการเป็นยาสลบต่ำกว่าน้ำมันกานพลูและสารยูจีนอลสังเคราะห์ เนื่องจากสารนี้ใช้ความเข้มข้น 30 มิลลิกรัมต่อลิตร ในการทำให้ลูกปลานิลและปลาหางไหม้เข้าสู่เฉพาะระยะ sedation ของการสลบ ส่วนปลานิลขนาดลงกระชังจะใช้ความเข้มข้นของสารที่ 55 มิลลิกรัมต่อลิตร และเมื่อพิจารณาถึงการสลบปลาโดยสมบูรณ์คือเข้าสู่ระยะที่ 4 พบว่าความเข้มข้นที่ 120 มิลลิกรัมต่อลิตร 190 มิลลิกรัมต่อลิตร และ 75 มิลลิกรัมต่อลิตร สามารถใช้สลบลูกปลานิล ปลานิลขนาดลงกระชัง และปลาหางไหม้ได้ ตามลำดับ

จากการทดลองต่าง ๆ ที่ผ่านมาของนักวิจัยหลายท่าน พบว่าสาร MS-222 สามารถสลบสัตว์น้ำด้วยความเข้มข้นที่สูงเช่นเดียวกับผลที่ได้จากการศึกษาครั้งนี้ เช่น Anderson *et al*. (1997) และ Keene *et al*. (1998) ได้ระบุว่าความเข้มข้นที่ 60 และ 120 ppm ของสาร MS-222 สามารถทำให้ปลา rainbow trout ขนาด 20.46±0.73 กรัม สลบได้ ต่อมา Akbari and Khajavi (2004) พบว่าต้องใช้สาร MS-222 ในความเข้มข้นสูงกว่าความเข้มข้นที่ใช้ในปลาเพื่อเหนี่ยวนำให้กุ้ง *Penaeus indicus* สลบ และได้มีการเปรียบเทียบประสิทธิภาพของสาร MS-222 และสารยูจีนอลที่มีต่อลูกกุ้ง *Fenneropeneus indicus* พบว่าสารยูจีนอลมีประสิทธิภาพที่ดีกว่าสาร MS-222 ซึ่งใช้ความเข้มข้นสูง คือ 3,700 มิลลิกรัมต่อลิตร ในการเหนี่ยวนำให้กุ้ง *F. indicus* สลบ ส่วนสารยูจีนอลจะใช้ความเข้มข้นต่ำคือ 22.5 มิลลิกรัมต่อลิตร และเป็นความเข้มข้นที่เพียงพอสำหรับการสลบกุ้งในกลุ่มเดียวกัน

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ในส่วนของผลการฟื้นจากการสลบของการศึกษานี้ พบว่าที่ความเข้มข้นสูงจะทำให้ระยะเวลาที่ปลาฟื้นจากการสลบเพิ่มมากขึ้น และเมื่อพิจารณาถึงการฟื้นจากการสลบของปลาหลังจากสลบด้วยยาสลบชนิดต่าง ๆ พบว่าสารยูจีนอลสังเคราะห์และน้ำมันกานพลูมีระยะเวลาของการฟื้นจากการสลบนานกว่าสาร MS-222 ซึ่งสอดคล้องกับรายงานของ Munday and Wilson (1997) ที่ได้ระบุว่าระยะเวลาฟื้นจากการสลบของปลา rainbow trout ที่สัมผัสกับน้ำมันกานพลูอยู่ที่ 6-10 เท่า เมื่อเปรียบเทียบกับความเข้มข้นเดียวกันของสาร MS-222 นอกจากนี้ได้ระบุระยะเวลาในการฟื้นของปลาจากการสลบด้วยน้ำมันกานพลูว่า ปลาจะมีเวลาในการฟื้นจากการสลบเป็น 2-3 เท่าของระยะฟื้นจากการสลบด้วย quinaldine, benzocaine และ 2-phenoxyethanol

Pirhonen and Schreck (2003) พบว่าการฟื้นจากการสลบของปลา steelhead trout (*Oncorhynchus mykiss*) ที่สลบด้วยน้ำมันกานพลูจะใช้เวลานานกว่าการสลบด้วยสาร MS-222 และจากการศึกษาครั้งนี้พบว่าเมื่อใช้ความเข้มข้นของน้ำมันกานพลูมากขึ้นระยะเวลาของการฟื้นสลบก็จะนานขึ้น ซึ่งจะเป็นประโยชน์อย่างยิ่งต่อการควบคุมปลาในการทำกิจกรรมต่าง ๆ เช่น การรีดไข่หรือการเก็บเลือดเป็นต้น (Mylonas *et al*., 2005) ส่วนสาร MS-222 จะถูกกำจัดออกได้รวดเร็วกว่าทำให้ปลาทดลองใช้เวลาในการฟื้นเร็วกว่าน้ำมันกานพลู (Ross and Ross, 1999; Ross, 2001)

Sladky *et al*. (2001) กล่าวว่าเวลาที่มากขึ้นของการฟื้นจากการสลบเกิดจากการเพิ่มเวลาในการแช่ปลาในน้ำที่มีน้ำมันกานพลูละลายอยู่ หรือเกี่ยวของกับคุณสมบัติของตัวน้ำมันกานพลูเอง เนื่องจากน้ำมันกานพลูหรือยูจีนอลมีคุณสมบัติในการเข้าเกาะกับโครงสร้างของอะตอมต่าง ๆ ซึ่งอาจจะเข้าไปอยู่ที่เยื่อบุผิวของเหงือก ด้วยเหตุนี้จึงทำให้ปลาอยู่ในสภาพของการสลบได้นาน และจากรายงานของ Guenette *et al*. (2007) ซึ่งได้ศึกษาเกี่ยวกับเภสัชจลศาสตร์ของสารยูจีนอลในปลา rainbow trout โดยพบว่าสารนี้จะมีค่าครึ่งชีวิตอยู่ที่ 12.14 ชั่วโมง และมีการดูดซับภายในเนื้อเยื่อปลาและขับออกจากตัวปลาได้ดี สารยูจีนอลสังเคราะห์มีผลต่ออัตราการหายใจและการเต้นของหัวใจได้มากกว่าสาร MS-222 พิจารณาจากอัตราการเต้นของหัวใจและอัตราการหายใจของปลาที่ช้าลงซึ่งเป็นสาเหตุให้สารยูจีนอลสามารถอยู่ในกระแสเลือดได้นานขึ้น (McFarland, 1959; Keene *et al*., 1998) ด้วยข้อมูลสนับสนุนที่ได้นี้อาจใช้เป็นเหตุผลได้ว่าทำไมสารยูจีนอลสามารถทำให้ปลาเข้าสู่ระยะของการสลบได้เร็ว มีระยะเวลาในการฟื้นจากการสลบที่นานกว่าและใช้ความเข้มข้นที่ต่ำกว่าสาร MS-222

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ในการศึกษาต่าง ๆ แม้ว่าการฟื้นจากการสลบของน้ำมันกานพลูจะมากกว่าการฟื้นจากการสลบด้วยสาร MS-222 และสารอื่นจากรายงานการวิจัยต่าง ๆ เช่น benzocaine, quinaldine และ 2-phenoxyethanol แต่เวลาฟื้นจากการสลบที่พิจารณาเพื่อประกอบการเลือกใช้ความเข้มข้นที่เหมาะสมนั้นต้องใกล้เคียงหรือน้อยกว่า 10 นาที (Munday and Wilson, 1997; Keene *et al*., 1998; Waterstral, 1999; Tort *et al*., 2000; Walsh and Pease, 2002) ซึ่งในกรณีทั่วไปการเหนี่ยวนำที่เร็วของยาสลบเป็นที่ต้องการของผู้ใช้ ส่วนการฟื้นจากการสลบที่ใช้เวลานานนั้นเป็นที่ต้องการเมื่อผู้ใช้อยากให้ปลาอยู่ในสภาพสลบเป็นเวลานาน เช่นการเคลื่อนย้ายปลาหรือการคัดขนาดปลา แต่อย่างไรก็ตามการฟื้นที่เร็วเป็นสิ่งที่ต้องการสำหรับผู้ใช้มากกว่า (Marking and Meyer, 1985; Stoskopf, 1993)

Hisaka *et al*. (1985) ได้ทำการศึกษาประสิทธิภาพของสาร MS-222 สารยูจีนอล และสาร thiopental sodium ที่มีต่อปลาคาร์พ โดยพิจารณาจากการตอบสนองของพฤติกรรม การเปลี่ยนแปลงอัตราการหายใจระหว่างที่ปลาสลบและฟื้นจากการสลบ ทั้งนี้อุณหภูมิของน้ำที่มีผลต่อการฟื้นของปลาจากการสลบก็เป็นอีกปัจจัยที่ศึกษา ได้แก่ อุณหภูมิที่ 10 และ 20 องศาเซลเซียส พบว่าช่วงความเข้มข้นที่ 25-100 มิลลิกรัมต่อลิตร ของสารยูจีนอล และ 200-300 มิลลิกรัมต่อลิตร ของสาร thiopental sodium สามารถทำให้ปลาสลบได้เร็วและฟื้นจากการสลบในระยะเวลาที่นาน ซึ่งขึ้นอยู่กับความเข้มข้นที่ใช้ ส่วนสาร MS-222 สามารถทำให้ปลาสลบได้เร็วเช่นกันเมื่อใช้ความเข้มข้นที่ 50-200 มิลลิกรัมต่อลิตร แต่มีการฟื้นจากการสลบที่เร็วกว่า เมื่อพิจารณาผลของอุณหภูมิพบว่าที่อุณหภูมิ 20 องศาเซลเซียส ทำให้การสลบและการฟื้นจากการสลบได้เร็วกว่าที่อุณหภูมิ 10 องศาเซลเซียส

Cunha and Rosa (2006) ทดสอบประสิทธิภาพของน้ำมันกานพลูกับปลาที่อยู่ในแนวปะการัง 7 ชนิด ได้แก่ *Abudefduf saxatilis*, *Stegastes variabilis*, *Pareques acuminatus*, *Acanthurus chirurgus*, *Sparisoma axillare*, *Lutjanus apodus* และ *Bathygobius soporator* โดยเปรียบเทียบประสิทธิภาพจากเวลาที่เหนี่ยวนำให้เกิดการสลบและการฟื้นที่ความเข้มข้นต่าง ๆ คือ 20, 30, 40, 50 และ 60 มิลลิกรัมต่อลิตร พบว่าปลาสามารถสลบภายในเวลา 180 วินาที และฟื้นจากการสลบภายในเวลา 300 วินาที โดยความเข้มข้นที่สามารถใช้ได้กับปลาทั้ง 7 ชนิดนี้อย่างปลอดภัยอยู่ที่ 20 มิลลิกรัมต่อลิตร

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

จากข้อมูลข้างต้นนี้ จะเห็นว่าสารยูจีนอลสังเคราะห์และน้ำมันกานพลูสามารถใช้ได้อย่างมีประสิทธิภาพในการสลบปลาด้วยความเข้มข้นต่ำและมีประสิทธิภาพที่ดีกว่าสาร MS-222

3. ผลของการใช้สารยูจีนอลสังเคราะห์และสาร MS-222 ต่อการเปลี่ยนแปลงระดับ cortisol และ glucose ในซีรั่มของปลานิลหลังการกระตุ้นให้เกิดความเครียด

โดยทั่วไปแล้วสิ่งที่สนใจเกี่ยวกับคุณสมบัติของการใช้ยาสลบนั้นคือการลดความเครียดของปลา ด้วยคุณสมบัติของตัวยาสลบที่ไปควบคุมการทำงานของ hypothalamus-pituitary-interrenal (HPI) axis มีผลให้การตอบสนองต่อความเครียดลดลง (Olsen *et al*., 1995; Keene *et al*., 1998) เมื่อพิจารณาถึงการใช้ยาสลบแล้ว การใช้ยาสลบในความเข้มข้นที่สูงเกินไปมักจะทำให้เกิดผลทางด้านลบต่อสัตว์น้ำเช่นกัน เนื่องจากปลาจะเกิดความเครียดเพราะอัตราเมทาบอลิซึมที่ผิดปกติ การหายใจที่ผิดปกติ รวมทั้งความดันเลือดและการตอบสนองทางด้านสรีรวิทยาของเลือดผิดปกติ แต่ในทางตรงกันข้าม การใช้ยาสลบในความเข้มข้นที่เหมาะสมสามารถช่วยลดผลทางด้านลบเหล่านี้และทำให้ปลาลดการตอบสนองต่อความเครียดได้ (Summerfelt and Smith, 1990)

ความเครียดในปลามักถูกเหนี่ยวนำโดยการเปลี่ยนแปลงของสภาพแวดล้อมและร่างกายมีการปรับเพื่อให้เกิดความสมดุลซึ่งนำไปสู่การเปลี่ยนแปลงของพฤติกรรมและการเปลี่ยนแปลงทางด้านสรีรวิทยาของสัตว์น้ำ (Akbari and Shariff, 2003; Li and Brouwer, 2007) ความเครียดที่เกิดขึ้นในสัตว์น้ำนั้นล้วนเกี่ยวข้องกับกระบวนการในการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำ การทำงานวิจัย งานทดสอบเกี่ยวกับยาและสารเคมี รวมทั้งการเคลื่อนย้ายสัตว์น้ำ ส่วนความหนาแน่นของสัตว์น้ำและคุณภาพน้ำที่สัตว์น้ำอยู่ก็เป็นปัจจัยหนึ่งที่สามารถทำให้สัตว์น้ำเกิดความเครียดได้ เช่น ในสภาพของการเลี้ยงสัตว์น้ำแบบพัฒนาที่อาศัยการเลี้ยงด้วยความหนาแน่นสูง ซึ่งสภาพเช่นนี้ล้วนนำมาสู่การเสื่อมของคุณภาพน้ำในบ่อเลี้ยง แล้วอาจส่งผลต่อการเกิดความเครียดในสัตว์น้ำ ทำให้สัตว์น้ำเกิดโรคเนื่องจากร่างกายมีความต้านทานโรคต่ำ (Pickering, 1998)

สำหรับความเครียดที่เกิดขึ้นในปลาจากการขนส่งนั้นถูกจัดให้อยู่ในกลุ่มของการเกิดความเครียดแบบเฉียบพลัน เนื่องจากเป็นสาเหตุให้เกิดการเพิ่มขึ้นของระดับ cortisol ในกระแสเลือดของสัตว์น้ำได้ (Barton and Iwama, 1991) ซึ่งการหลั่งของ cortisol จะเกิดขึ้นทันทีที่ปลามีการเปลี่ยนแปลงจากสภาวะสมดุล และจากรายงานต่าง ๆ พบว่าการเพิ่มขึ้นของระดับ cortisol มีผลดีในการช่วยลดการเปลี่ยนแปลงที่เกิดขึ้นจากสภาพเครียดที่ปลาได้รับและยังทำให้เกิดความต้านทาน

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

โรคหลังจากที่ปลาสามารถฟื้นตัวจากสภาพเครียดที่เกิดขึ้น (Webster *et al*., 2002; Bilodeau *et al*., 2003) แต่ถ้าระดับ cortisol ที่เกิดขึ้นมากเกินไปก็สามารถทำให้การทำงานของระบบภูมิคุ้มกันเสื่อมลงได้ ทำให้ปลาอ่อนแอและเกิดโรคง่าย (Ainsworth *et al*., 1991) ทั้งนี้ ในการศึกษาผลของการใช้ยาสลบบางชนิด พบว่าสามารถทำให้ระดับของ cortisol ที่ตอบสนองต่อความเครียดในปลาเพิ่มขึ้นได้เช่นกัน (Iwama *et al*., 1989; Thomas and Robertson, 1991; Small, 2003)

การตอบสนองต่อความเครียดในปลา โดยทั่วไปแล้วสามารถประเมินได้จากระดับของ cortisol และ gulcose ในเลือดที่เพิ่มขึ้น ซึ่งค่าทั้งสองนี้สามารถใช้เป็นดัชนีชี้วัดเกี่ยวกับการตอบสนองของความเครียดได้อย่างมีประสิทธิภาพ (Schreck, 1982; Barton, 2002) และในการศึกษานี้ได้ก็พบว่าสารยูจีนอลสังเคราะห์สามารถแสดงถึงคุณสมบัติที่ดีในการควบคุมการเปลี่ยนแปลงของระดับ cortisol และ glucose ในเลือดของปลานิลที่ถูกกระตุ้นให้อยู่ในสภาวะเครียดได้ โดยพบว่าระดับ cortisol และ glucose มีค่าต่ำในทุก ๆ ช่วงเวลาที่ทำการตรวจวัด ตลอดจนครบเวลา 24 ชั่วโมงที่ทำการทดลอง ซึ่งสอดคล้องกับรายงานของ Small (2003) ที่ได้ศึกษาการใช้สารยูจีนอลกับปลา catfish โดยพบว่าไม่ทำให้ระดับของ cortisol เพิ่มขึ้นเช่นกัน

ในกรณีที่เกี่ยวข้องกับ plasma cortisol นั้น Barton (2002) ได้พบว่า ระดับของ cortisol จะเพิ่มขึ้นสูงสุดที่เวลา 30 นาที หลังจากผ่านการกระตุ้นให้เกิดความเครียดโดยไม่ใช้ยาสลบ และเพิ่มขึ้นเป็น 5 เท่าเมื่อเปรียบเทียบกับค่าเริ่มต้น แต่สำหรับการทดลองนี้พบว่าระดับของ cortisol มีการเพิ่มขึ้นสูงสุดที่เวลา 1 ชั่วโมงหลังผ่านการกระตุ้นให้เกิดความเครียด ซึ่งการใช้สารยูจีนอลสังเคราะห์สามารถลดระดับของ cortisol ลงได้และแนวโน้มของระดับ cortisol ที่พบจากการทดลองนี้มีค่าน้อยกว่าเมื่อเปรียบเทียบกับชุดการทดลองที่ใช้สาร MS-222 เป็นยาสลบและชุดควบคุม ทั้งนี้ได้มีรายงานการศึกษาเกี่ยวกับประสิทธิภาพที่ดีในการควบคุมการเพิ่มขึ้นของระดับ cortisol เมื่อใช้สารยูจีนอลเป็นยาสลบในปลาหลายชนิด ได้แก่ ปลา stealhead trout (*Oncorhynchus mykiss*) (Pirhonen and Schreck, 2003), ปลา channel catfish (*Ictalurus punctatus*) (Small, 2003), ปลา fathead minnow (*Pimephales promelas*) (Palic *et al*., 2006) และ ปลา kelp grouper (*Epinephelus bruneus*) (Park *et al*., 2008)

โดยปกติแล้วปรากฏการณ์ที่ระดับ cotisol ของปลาเพิ่มขึ้นนั้นเป็นสิ่งแรกที่เกิดขึ้นหลังจากปลาได้รับความเครียด ส่วนการที่ระดับของ glucose สูงขึ้นจากการเกิดความเครียดนั้นเป็นผลที่เกิดขึ้นหลังจากระดับ cortisol เพิ่มขึ้นแล้ว จะเห็นว่าการเปลี่ยนแปลงขั้นแรกอันเนื่องมาจากผลของ

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ความเครียดคือการเปลี่ยนแปลงของฮอร์โมนที่เกี่ยวข้องกับการตอบสนองต่อความเครียด ซึ่งได้แก่ coticosteroids ส่วนการเปลี่ยนแปลงในขั้นตอนที่สองคือการเพิ่มขึ้นของระดับ glucose ในเลือดซึ่งเกิดจากการสลายตัวของ glycogen ที่ตับ (Barton and Iwama, 1991) สำหรับแนวโน้มของการเปลี่ยนแปลงทางสรีรวิทยาที่เกิดขึ้นนี้ได้มีการรายงานไว้ในปลา grey mullet (*Mugil cephalus*) (Chang and Hur, 1999)

อย่างไรก็ตามผลจากการศึกษานี้ได้แสดงให้เห็นถึงความสอดคล้องกันระหว่างการเพิ่มขึ้นของระดับ cortisol และ glucose ในชุดควบคุมซึ่งจะมีระดับของค่าทั้งสองเพิ่มขึ้นสูงสุดที่เวลา 1 ชั่วโมงหลังจากการกระตุ้นให้เกิดความเครียด และเมื่อพิจารณาในส่วนของชุดการทดลองที่ใช้สารยูจีนอลสังเคราะห์และสาร MS-222 พบว่าระดับของ cortisol ก็จะเพิ่มขึ้นสูงสุดที่เวลา 1 ชั่วโมงเช่นกัน แต่เมื่อพิจารณาระดับของ cortisol ที่เวลาดังกล่าวพบว่าชุดการทดลองที่ใช้ยูจีนอลสังเคราะห์มีระดับของ cortisol ต่ำกว่าชุดการทดลองที่ใช้ MS-222 และชุดควบคุมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ แสดงถึงประสิทธิภาพของสารยูจีนอลสังเคราะห์ในการควบคุมความเครียดที่ดีกว่า MS-222 ผลการทดลองนี้มีความคล้ายกับการทดลองของ Barcellos *et al*. (2001) ที่รายงานว่า cortisol ในน้ำเลือดของปลา *Rhamdia quelen* จะสูงขึ้นหลังจากย้ายปลาไปยังถังพักแล้วเป็นเวลา 1 ชั่วโมง แต่จะมีความแตกต่างจากบางงานวิจัยที่ได้ศึกษาเกี่ยวกับการเพิ่มขึ้นของ cortisol หลังจากได้รับความเครียด เช่น ในงานวิจัยของ Robertson *et al*. (1988) ที่ได้ทำการวิเคราะห์ความผันแปรของ cortisol ในน้ำเลือดของลูกปลา *Sciaenops ocellatus* ระหว่างการขนส่งด้วยน้ำความเค็ม 32 ppt พบว่าระดับ cortisol จะเพิ่มขึ้นสูงสุดหลังจาก 1 ชั่วโมง 30 นาที ของการขนส่ง และหลังจาก 2 วันที่ปลาอยู่ในถังพัก ความเข้มข้นของ cortisol จะลดลงสู่ค่าเริ่มต้นอีกครั้ง นอกจากนี้ได้มีการรายงานว่ามีการเพิ่มขึ้นของระดับ cortisol ของปลา Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) (Sandodden *et al*., 2001) และปลา Eurasian Perch (*Perca fluviatilis*) (Acerete *et al*., 2004) หลังจาก 4 ชั่วโมงของการกระตุ้นให้เกิดความเครียดด้วยการขนส่ง ทั้งนี้จากรายงานของ Park *et al*. (2008) ที่ได้ศึกษาระดับ plasma cortisol จากการใช้น้ำมันกานพลูที่ความเข้มข้น 150 มิลลิกรัมต่อลิตร เพื่อเป็นยาสลบปลา kelp grouper (*Epinephelus bruneus*) ที่อุณหภูมิ 22 องศาเซลเซียส พบว่าระดับของ plasma cortisol จะเพิ่มขึ้นสูงสุด 4.24±1.57 ug/dL เมื่อเวลาผ่านไป 12 ชั่วโมงของการสลบ

สำหรับการเปลี่ยนแปลงของระดับ glucose นั้น การศึกษาครั้งนี้พบว่า glucose จะเพิ่มขึ้นสูงสุดหลังสิ้นสุดการเหนี่ยวนำให้เกิดความเครียดทันที ทั้งนี้ที่เวลา 1 ชั่วโมงหลังจากการกระตุ้นให้ปลาเกิดความเครียดพบว่าชุดการทดลองที่ไม่ใช้ยาสลบ (ชุดควบคุม) มีระดับของ glucose มากกว่า

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ชุดการทดลองอื่นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P \leq 0.05$) แต่เมื่อพิจารณาในส่วนของชุดการทดลองที่ใช้สารยูจีนอลและสาร MS-222 เป็นยาสลบพบว่าไม่แตกต่างทางสถิติ ซึ่งจากการเพิ่มขึ้นของระดับ glucose นี้ Park *et al.* (2008) ได้รายงานว่าการใช้น้ำมันกานพลูที่ความเข้มข้น 150 มิลลิกรัมต่อลิตร เพื่อเป็นยาสลบปลา kelp grouper (*Epinephelus bruneus*) ที่อุณหภูมิ 22 องศาเซลเซียสทำให้ระดับของ plasma glucose เพิ่มขึ้นสูงสุด (92.70±9.61 mg/dL) หลังจากผ่าน 2 ชั่วโมงของการสลบ

จากการศึกษาครั้งนี้ได้แสดงให้เห็นว่าการใช้สาร MS-222 ไม่สามารถควบคุมการทำงานของ HPI axis และการเพิ่มขึ้นของระดับ cortisol ได้ และเป็นไปในแนวทางเดียวกับการศึกษาของ Barton (2002) ที่พบว่าค่า cortisol จะเพิ่มขึ้นสูงเป็น 5 เท่าของค่าเริ่มต้นเมื่อปลาได้ถูกกระตุ้นให้เกิดความเครียดมาแล้ว 30 นาที แต่จะเพิ่มขึ้นเป็น 6 เท่าเมื่อใช้สาร MS-222 เป็นยาสลบซึ่งแสดงถึงคุณสมบัติที่ช้ากว่าในการควบคุม cortisol ที่เกิดจากการกระตุ้นด้วยความเครียด

Pirhonen and Schreck (2003) ได้ศึกษาผลของการสลบปลา steelhead trout (*Oncorhynchus mykiss*) โดยการใช้ สาร MS-222 น้ำมันกานพลู และคาร์บอนไดออกไซด์ เพื่อศึกษาการเปลี่ยนแปลงของระดับ plasma cortisol หลังการสลบที่เวลา 4, 24 และ 48 ชั่วโมง พบว่าระดับ plasma cortisol จะเพิ่มขึ้นสูงสุดที่เวลา 48 ชั่วโมงหลังการสลบ แต่เมื่อพิจารณาภายในชุดการทดลองพบว่าปลาที่สลบด้วยน้ำมันกานพลูจะมีระดับของ plasma cortisol ต่ำสุดเมื่อเทียบกับการสลบด้วยวิธีอื่น

Holloway *et al.* (2004) ได้ศึกษาผลของการสลบปลา rainbow trout ด้วยสารยูจีนอลที่ได้จากน้ำมันกานพลู โดยพิจารณาจากผลที่มีต่อ plasma cortisol, glucose, growth hormone และ thyroid hormones สองชนิดได้แก่ tri-iodothyronine และ thyroxine โดยเปรียบเทียบกับการสลบด้วยสาร MS-222 และการทำให้เครียดโดยการเขย่าหัวปลา จากการศึกษาพบว่าการเขย่าหัวปลาจะทำให้ระดับ cortisol และ glucose ในเลือดปลาสูงขึ้น และการใช้ยาสลบทั้งสองชนิดไม่มีผลต่อการเปลี่ยนแปลงของระดับฮอร์โมน cortisol ของปลา การใช้สารยูจีนอลไม่ทำให้ระดับ cortisol เพิ่มขึ้นและมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบกับการใช้สาร MS-222 แต่ไม่มีความแตกต่างกันเมื่อเปรียบเทียบในส่วนของระดับ glucose และ growth hormone ทั้งนี้เมื่อพิจารณาในส่วนของ tri-iodothyronine และ thyroxine พบว่าการใช้สารยูจีนอลทำให้ฮอร์โมนเหล่านี้มีค่าเพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบการใช้สาร MS-222

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

จากข้อมูลข้างต้นเป็นสิ่งยืนยันได้ว่าสารยูจีนอลสังเคราะห์มีคุณสมบัติที่ดีในการควบคุมการเกิดความเครียดในปลา และมีประสิทธิภาพดีกว่าสาร MS-222

4. ผลของการใช้สารยูจีนอลสังเคราะห์และสาร MS-222 ต่อการตอบสนองของระบบภูมิคุ้มกันแบบไม่จำเพาะของปลานิลหลังการกระตุ้นให้เกิดความเครียด

ความเครียดสามารถทำให้สุขภาพของปลาเสื่อมลงอย่างต่อเนื่องเพราะความผิดปกติทางด้านพยาธิวิทยาและมีการเสื่อมลงของการทำงานในระบบภูมิคุ้มกันของปลา (Barton and Iwama, 1991; Weddelaar Bonga, 1997) ทั้งนี้ความเครียดสามารถทำให้ระดับ cortisol ในกระแสเลือดเพิ่มขึ้น ประกอบกับการเสื่อมลงของระบบภูมิคุ้มกันทั้งในปลาและสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม (Ortuno *et al*., 2002; Small, 2003) โดยมีรายงานว่าความเครียดทำให้เกิดการเพิ่มขึ้นของระดับ corticosteroids ซึ่งเป็นสาเหตุของการลดบทบาทในการทำงานของเม็ดเลือดขาวชนิด neutrophil ในคน เช่น ลดบทบาทในการทำงานที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการ phagocytosis การเคลื่อนตัวของเซลล์ไปยังบริเวณที่ติดเชื้อ และการเกิดกระบวนการ Oxidative burst (Roth and Kaeberle, 1981; Smith and Lumsden, 1983) และจากการทดลองแบบ *in vitro* ในปลาคาร์พ และปลานิล ของ Law *et al*. (2001) พบว่า cortisol สามารถยั้งการเกิดกระบวนการ phagocytosis ของ leukocytes ได้ นอกจากนี้ Ainsworth *et al*. (1991) ได้ทดลองฉีด hydrocortisone ในปลา channel catfish พบว่าปลาจะมี phagocytic activity และ bacterial killing ลดลง แต่การฉีดสารนี้จะไม่ทำให้เกิดผลดังกล่าวขึ้นในปลาที่ได้รับความเครียดมาแล้ว ดังนั้นการศึกษาเกี่ยวกับผลจากการตอบสนองต่อความเครียดนอกจากศึกษาจากการเปลี่ยนแปลงดัชนีชี้วัดที่บ่งบอกถึงความเครียดโดยตรงแล้ว การตรวจวัดปัจจัยทางภูมิคุ้มกันก็เป็นอีกทางหนึ่งที่สามารถบ่งบอกถึงสภาวะเครียดที่เกิดขึ้นในปลาได้เช่นกัน

การศึกษานี้ได้พิจารณาถึงการตอบสนองของระบบภูมิคุ้มกันแบบไม่จำเพาะ โดยประเมินจากการตอบสนองทางภูมิคุ้มกันระดับเซลล์ ซึ่งจะพิจารณาในส่วนของกิจกรรมการจับกินของเซลล์ (% phagocytosis) และการทำงานของ reactive oxygen species เพื่อพิจารณาถึงคุณสมบัติของสารยูจีนอลสังเคราะห์ในการลดความเสื่อมของบทบาททางภูมิคุ้มกันอันเป็นผลเนื่องมาจากความเครียด

การประเมินเกี่ยวกับกิจกรรมในการจับกินของเซลล์จากค่า % phagocytosis ที่ได้จากการทดลองนี้ เมื่อพิจารณาจากการใช้สารยูจีนอลเป็นยาสลบพบว่า % phagocytosis มีค่าใกล้เคียงกับค่า

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

เริ่มต้นในทุกช่วงเวลาที่ทำการตรวจวัด แต่ชุดการทดลองที่ใช้สาร MS-222 ไม่สามารถป้องกันการลดลงของค่านี้ได้ ซึ่งสอดคล้องกับการศึกษาของ Ortuno *et al*. (2002) และในส่วนของการพิจารณาการทำงานของ reactive oxygen species ที่แสดงผลในรูปของค่า spontaneous O_2^- production หรือ oxidative burst พบว่าค่าที่ได้จากชุดการทดลองที่ใช้สารยูจีนอลสังเคราะห์มีมากกว่าชุดการทดลองอื่นในทุกช่วงเวลาที่ทำการตรวจวัด แต่จะมีความแตกต่างทางสถิติเกิดขึ้นเฉพาะที่เวลา 7 วัน หลังจากปลาฟื้นจากการกระตุ้นด้วยความเครียด

เมื่อพิจารณาถึงการตอบสนองต่อความเครียดและการตอบสนองของระบบภูมิคุ้มกันแบบไม่จำเพาะพบว่าการตอบสนองทางภูมิคุ้มกันมักจะลดลงหลังจากเกิดการเปลี่ยนแปลงทางสรีวิทยาอันเนื่องมาจากผลของความเครียด ซึ่งจากผลการศึกษาที่เกิดขึ้นนี้และจากรายงานต่าง ๆ แสดงให้เห็นว่าการเพิ่มขึ้นของระดับ cortisol สามารถทำให้เกิดการกดการทำงานทางภูมิคุ้มกันได้ (Schreck *et al*., 1993) และเมื่อพิจารณาในส่วนของการใช้สารยูจีนอลกับการลดผลของความเครียดที่มีต่อการทำงานของระบบภูมิคุ้มกันนั้น Palic *et al*. (2006) ก็ได้ทำการศึกษาใน seabream และพบว่าสารนี้สามารถลดผลของความเครียดต่อการทำงานของ neutrophil แต่เมื่อพิจารณาในส่วนของการใช้สาร MS-222 พบว่าไม่สามารถทำได้ นอกจากนี้สาร MS-222 ยังไม่สามารถลดความเสื่อมลงของการทำงานทางภูมิคุ้มกันในกระบวนการต่าง ๆ เมื่ออยู่ในสภาวะเครียด เช่น การทำงานของ complement activity การทำงานของ respiratoty burst และ phagocytic activity (Ortuno *et al*., 2002)

5. ผลของการใช้สารยูจีนอลสังเคราะห์ที่มีต่อการตอบสนองของระบบภูมิคุ้มกันแบบจำเพาะในเชิงการสร้าง Antibody หลังจากได้รับวัคซีนของเชื้อ *Streptococcus agalactiae*

การใช้ยาสลบนั้นสามารถทำให้การทำงานของระบบภูมิคุ้มกันแบบจำเพาะดีขึ้นซึ่งจากการทดลองใช้สารยูจีนอลสังเคราะห์สลบปลานิลก่อนการฉีดวัคซีนที่ได้จากเชื้อ *Streptococcus agalactiae* โดยพบว่าระดับของ antibody titer ของปลาที่ถูกฉีดวัคซีนภายใต้สภาวะของการสลบด้วยสารยูจีนอลสังเคราะห์ มีค่ามากกว่าระดับ antibody titer ของปลาที่ฉีดวัคซีนโดยไม่ใช้ยาสลบ แต่จากการทดสอบความแตกต่างทางสถิติระหว่างวิธีการให้วัคซีนทั้งสองนั้นพบว่าไม่มีความแตกต่างทางสถิติ

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

เมื่อพิจารณาข้อแตกต่างระหว่างการใช้และไม่ใช้ยาสลบในการให้วัคซีนกับสัตว์น้ำนั้น ได้มีการศึกษาโดยใช้ยาสลบชนิดอื่นที่มีคุณสมบัติในการเพิ่มประสิทธิภาพในการทำงานของระบบภูมิคุ้มกันแบบจำเพาะเช่นกัน คือการใช้สาร propiscin ในการสลบปลา rainbow trout ก่อนการให้วัคซีนของเชื้อ *Yersinia ruckeri* โดยพบว่าการใช้ยาสลบสามารถเพิ่มการตอบสนองทางภูมิคุ้มกันแบบจำเพาะและไม่จำเพาะได้ เนื่องจาก immunoglobulin secreting cell และ specific antibody secreting cell จะมีระดับสูงสุดเมื่อปลาถูกแช่ในวัคซีนหรือฉีดวัคซีนภายใต้สภาพของการสลบ ทั้งนี้ระดับ total Ig และ antibody titer ก็มีค่าสูงในปลาที่ได้รับวัคซีนร่วมกับการสลบ และเมื่อนำปลาที่ฉีดวัคซีนภายใต้การสลบไปแช่เชื้อ *Yersinia ruckeri* พบว่าปลาจะมีอัตรารอดสูงขึ้นเช่นกัน (Siwiki *et al*., 2002)

Cubero and Molinero (1997) ระบุว่าการจับสัตว์น้ำสามารถทำให้เกิดความเครียดและทำให้มีผลต่อเซลล์เม็ดเลือดขาวทั้งที่อยู่ในกระแสเลือดและเซลล์เม็ดเลือดที่เนื้อเยื่อได้แก่ ไทมัส ม้าม และไตส่วนหน้า โดยหลังจากเกิดความเครียดขึ้นเซลล์เม็ดเลือดขาวในกระแสเลือดจะลดจำนวนลงและกลับเป็นปกติหลังจากถูกกระตุ้นด้วยความเครียดมาแล้ว 24 ชั่วโมง ส่วนเซลล์ที่อยู่ในเนื้อเยื่อจะมีการฟื้นตัวเกิดขึ้นภายหลัง จากข้อมูลส่วนนี้อาจเป็นสิ่งที่อธิบายได้ว่าความเครียดสามารถทำให้เกิดผลกระทบต่อการทำงานในระบบภูมิคุ้มกันแบบจำเพาะเนื่องจากการลดลงของเม็ดเลือดขาวที่มีผลต่อการทำงานในระบบภูมิคุ้มกันดังกล่าว ส่วนการใช้ยาสลบปลานั้นสามารถลดความเครียดของปลาที่จะไปขัดขวางการทำงานของระบบภูมิคุ้มกันแบบจำเพาะได้

6. ประสิทธิภาพของสารยูจีนอลสังเคราะห์ในการใช้เป็นยาสลบเพื่อขนส่งปลา

การขนส่งปลาเป็นกิจกรรมที่เกิดขึ้นเสมอในการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำ (Carmichael *et al*., 2001) ซึ่งมักดำเนินการโดยใช้การขนส่งในระบบปิดที่ใช้ถุงพลาสติกบรรจุน้ำและอัดด้วยอากาศ (Berka, 1986) แต่วิธีการนี้มีข้อจำกัด หรือข้อควรระวังเพราะอาจมีความเครียดของปลาระหว่างการขนส่งเข้ามาเกี่ยวข้อง เนื่องจากการสะสมของเสียในภาชนะขนส่ง เช่น คาร์บอนไดออกไซด์และแอมโมเนีย รวมทั้งการที่ออกซิเจนที่ละลายน้ำ และค่า pH ของน้ำลดลง (Amend *et al*., 1982; Berka, 1986; Gomes *et al*., 2003)

สำหรับการใช้ยาสลบเพื่อการขนส่งปลามีวัตถุประสงค์เพื่อการลดอัตราเมทาบอลิซึมของปลาเพื่อลดการใช้ออกซิเจนของปลา และลดการปล่อยของเสียเช่นแอมโมเนีย รวมทั้งก๊าซ

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

คาร์บอนไดออกไซด์ในน้ำระหว่างการขนส่ง (Wedmeyer, 1996; Ross and Ross, 1999) ซึ่งความเข้มข้นของยาสลบที่เหนี่ยวนำให้ปลาแข้าสู่ระยะ light sedation สามารถใช้ได้อย่างปลอดภัยในการขนส่งปลา เนื่องจากความเข้มข้นดังกล่าวเพียงทำให้ปลาว่ายน้ำช้าลง การหายใจช้าลง แต่ยังคงรักษาสมดุลของร่างกายอยู่ รวมทั้งไม่ทำให้เกิดความเครียดระหว่างการจับและขนส่งปลา (Jolly *et al*., 1972; Piper *et al*., 1982) แต่จากรายงานของ McFarland (1959) และ Summerflet and Smith (1990) ได้แนะนำว่าควรใช้ความเข้มข้นที่เหนี่ยวนำให้ปลาเข้าสู่ระยะ deep sedation เป็นระยะที่ใช้ในการขนส่งปลา

สำหรับการศึกษาครั้งนี้ได้ทดลองใช้สารยูจีนอลสังเคราะห์ในระดับความเข้มข้นที่ทำให้ปลาเข้าสู่ระยะ light sedation เพื่อการขนส่งลูกปลานิลและปลาหางไหม้ โดยเปรียบเทียบประสิทธิภาพกับการขนส่งโดยน้ำมันกานพลู สาร MS-222 และการไม่ใช้ยาสลบในการขนส่งปลา ทั้งนี้ได้พิจารณาถึงเวลาขนส่งและความหนาแน่นที่เหมาะสมเพื่อใช้ในการขนส่งปลาทั้งสองชนิด โดยไม่ทำให้เกิดความเสื่อมของคุณภาพน้ำในภาชนะขนส่งมากนัก และมีผลให้อัตรารอดหลังขนส่งรวมทั้งสุขภาพปลาที่ผ่านการขนส่งดีขึ้น

จากการขนส่งปลานิลขนาด 0.30±0.01 กรัม และปลาหางไหม้ขนาด 3.01±0.48 กรัม โดยใช้สารยูจีนอลสังเคราะห์ และน้ำมันกานพลู ที่ความเข้มข้น 5 มิลลิกรัมต่อลิตร รวมทั้งสาร MS-222 ที่ความเข้มข้น 30 มิลลิกรัมต่อลิตร เพื่อลดกิจกรรมของปลาระหว่างการขนส่ง พบว่าสารยูจีนอลสังเคราะห์มีประสิทธิภาพในการลดกิจกรรมของปลาดีกว่าสารอื่น เนื่องจากการใช้สารนี้ไม่ทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงของคุณภาพน้ำที่ตรวจวัดมากเกินไป อีกทั้งสามารถทำให้ปลามีสุขภาพดีและมีอัตรารอดหลังการขนส่งมากขึ้นเมื่อเปรียบเทียบกับการไม่ใช้ยาสลบในการส่งปลา เมื่อเปรียบเทียบประสิทธิภาพของสารนี้กับน้ำมันกานพลูและสาร MS-222 พบว่าสารยูจีนอลสังเคราะห์มีประสิทธิภาพในการลดกิจกรรมของปลาระหว่างการขนส่งได้ดีกว่า แต่ไม่แตกต่างจากการใช้น้ำมันกานพลูมากนัก ส่วนการใช้สาร MS-222 เป็นยาสลบพบว่ามีประสิทธิภาพในการลดกิจกรรมของปลาระหว่างการขนส่งน้อยกว่าสารยูจีนอลสังเคราะห์และน้ำมันกานพลู ซึ่งสอดคล้องกับรายงานของ Coyle *et al*. (2005) ที่ระบุว่าสาร MS-222 ไม่มีประสิทธิภาพที่ดีในการขนส่งลูกกุ้งก้ามกราม (*Macrobrachium rosenbergii*)

ผลการทดลองครั้งนี้พบว่ามีความสอดคล้องกับงานวิจัยต่าง ๆ ที่เกี่ยวข้องกับการใช้สารยูจีนอลหรืออนุพันธ์ของนี้เป็นยาสลบ โดยงานวิจัยเหล่านี้ต่างระบุเกี่ยวกับประสิทธิภาพที่ดีของการ

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ใช้สารนี้ในการขนส่งปลาทั้งในส่วนของการเพิ่มอัตรารอดและการควบคุมคุณภาพน้ำระหว่างการขนส่ง เช่น งานวิจัยของ Cooke *et al*. (2004) ซึ่งพบว่าความเข้มข้นที่ 5-9 มิลลิกรัมต่อลิตร ของน้ำมันกานพลูสามารถใช้ในการสงบปลา largemouth bass (*Micropterus salmoides*) ขนาด 93.00±7.00 กรัม เพื่อการขนส่งได้ นอกจากนี้ได้มีรายงานการใช้น้ำมันกานพลูที่ 5 มิลลิกรัมต่อลิตร ว่าสามารถใช้เพื่อลดกิจกรรมของลูกปลากระพงขาว *(Lates calcarifer* Bloch) ขนาด 0.45±0.74 กรัม ระหว่างการขนส่งได้เช่นกัน (Hangono, 2003) จะเห็นได้ว่างานวิจัยที่กล่าวมาข้างต้นใช้ความเข้มข้นระดับเดียวกันกับความเข้มข้นที่ใช้ในการศึกษานี้

นอกจากการใช้สารยูจีนอลกับการขนส่งปลาแล้ว ได้มีงานวิจัยต่าง ๆ ที่เกี่ยวกับการใช้สารนี้ในการขนส่งสัตว์น้ำชนิดอื่น ซึ่งเมื่อไม่นานมานี้ได้มีการนำสารยูจีนอลมาใช้เพื่อการลดกิจกรรมของกุ้งระหว่างการขนส่ง แต่พบว่าความเข้มข้นของสารที่ใช้มากกว่าความเข้มข้นที่ใช้ในปลา ซึ่งสามารถยืนยันได้จากการศึกษาของ Coyle *et al*. (2005) ที่พบว่าการใช้ Aqui-S (iso-eugenol) ในการขนส่งลูกกุ้งก้ามกรามสามารถใช้ได้อย่างมีประสิทธิภาพเมื่อใช้ด้วยความเข้มข้นที่มากกว่าความเข้มข้นที่ใช้กับปลา 5-10 เท่า

Vartak and Singh (2006) ได้ทำการศึกษาผลของการใช้น้ำมันกานพลูในการจับและการขนส่งลูกกุ้งก้ามกราม (*Macrobranchium rosenbergii* De Man) ระยะ post lavae (ขนาดความยาว 13.42±0.84 เซนติเมตร) โดยพบว่าความเข้มข้นที่ 15 มิลลิกรัมต่อลิตร ของน้ำมันกานพลูสามารถใช้เพื่อขนส่งลูกกุ้งระยะดังกล่าวเป็นเวลา 3 ชั่วโมงได้อย่างปลอดภัย และต่อมาได้มีการศึกษาพบว่าสารยูจีนอลสามารถใช้ในการลดกิจกรรมในการขนส่งลูกกุ้งได้อย่างมีประสิทธิภาพโดยใช้ความเข้มข้น 1.3 มิลลิกรัมต่อลิตร ด้วยเวลาในการขนส่ง 12 ชั่วโมง เนื่องจากสารนี้สามารถลดการใช้ออกซิเจน การขับของแอมโมเนีย รวมทั้งสามารถเพิ่มอัตรารอดของลูกกุ้งหลังการขนส่งได้ (Akbari *et al*., 2010)

ความหนาแน่นของปลาที่ขนส่งและระยะเวลาที่ใช้ในการขนส่งมีผลต่อการเกิดความเครียดและอาจทำให้สุขภาพของปลาเสื่อมลงและมีผลต่ออัตรารอดหลังการขนส่ง (Amend *et al*., 1982) ทั้งนี้สิ่งที่เหนี่ยวนำให้เกิดความเครียดซึ่งเห็นได้ชัดเจนเกิดจากของเสียที่ปลาขับถ่ายออกมาระหว่างขนส่ง ทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงของคุณภาพน้ำ และส่วนหนึ่งเกิดจากการปะทะกันเองของปลาหรือกระแทกกับภาชนะในระหว่างการขนส่ง

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

Kaiser and Vine (1998) ได้ศึกษาเกี่ยวกับความหนาแน่นในการขนส่งปลาทอง (*Carassius auratus*) ขนาด 3.93±1.99 กรัม ว่าสามารถขนส่งได้โดยใช้ความหนาแน่น 50 ตัวต่อน้ำ 500 มิลลิลิตร และควรมีออกซิเจนที่ละลายน้ำมากกว่า 3.8 มิลลิกรัมต่อลิตรจึงจะเหมาะสำหรับใช้เพื่อขนส่งปลา เนื่องจากอัตราการตายของปลาทองจะเพิ่มขึ้นเมื่อออกซิเจนที่ละลายน้ำมีค่าต่ำกว่า 3 มิลลิกรัมต่อลิตร นอกจากนี้ได้เสนอแนะว่าการขนส่งปลาที่มีความหนาแน่นมากเกินไปอาจทำให้ปลาเครียด อย่างไรก็ตามการขนส่งด้วยความหนาแน่นน้อยอาจไม่คุ้มทุนในส่วนของค่าขนส่ง ทั้งนี้ต้องพิจารณาถึงความหนาแน่นที่เหมาะสมจากชนิดและขนาดของปลาที่ใช้ในการขนส่ง รวมทั้งอุณหภูมิและระยะเวลาที่ใช้ในการขนส่งด้วย

Adamante *et al*. (2008) ได้ศึกษาความเครียดของลูกปลา *Salminus brasiliensis* เนื่องจากความหนาแน่นในการขนส่งที่แตกต่างกัน โดยทำการทดลองที่ความหนาแน่น 5, 10 และ 15 กรัมต่อลิตร และขนส่งด้วยเวลา 4, 8, 12 ชั่วโมง หลังจากนั้นได้ทำการตรวจวัดระดับของ cortisol ในเนื้อเยื่อของปลา ผลจากการทดลองพบว่าระดับของ cortisol จะเพิ่มขึ้นในทุกความหนาแน่นที่ทำการทดลองหลังจากการขนส่งด้วยเวลา 4 ชั่วโมง จากนั้นระดับ cortisol จะมีค่าใกล้เคียงกันเมื่อสิ้นสุดระยะเวลาในการทดลอง เมื่อพิจารณาค่า electrical conductivity ของน้ำพบว่าจะเพิ่มขึ้นเมื่อความหนาแน่นและระยะเวลาในการขนส่งเพิ่มขึ้น ทั้งนี้การขนส่งนั้นสามารถทำให้เกิดความเครียดในปลาได้ถ้ามีระยะเวลาในการขนส่งที่ยาวนานขึ้นและมีความหนาแน่นมากเกินไป สำหรับการขนส่งลูกปลา *Salminus brasiliensis* พบว่าสามารถทำได้โดยไม่มีการตายและการบาดเจ็บของปลาถ้าใช้ความหนาแน่นสูงสุดที่ 15 กรัมต่อน้ำ 1 ลิตร โดยใช้เวลาขนส่ง 12 ชั่วโมง

จากข้อมูลที่ได้ในการศึกษาครั้งนี้พบว่าการใช้ยาสลบในการลดกิจกรรมของปลาระหว่างการขนส่งมีผลต่อการลดความเสื่อมลงของคุณภาพน้ำได้ โดยปัจจัยที่เห็นได้ชัดเจนถึงการเปลี่ยนแปลงของคุณภาพน้ำที่เกี่ยวข้องกับกิจกรรมของปลาที่เกิดขึ้นภายในภาชนะขนส่งนั้น ได้แก่ ค่าออกซิเจนที่ละลายน้ำ แอมโมเนีย และไนไตรท์ ส่วนค่าความเป็นกรด-ด่าง (pH) ของน้ำหลังการขนส่งปลาที่ได้จากการทดลองนี้พบว่าไม่สอดคล้องสมมติฐานเบื้องต้น ที่ค่า pH ของการขนส่งแบบใช้ยาสลบควรสูงกว่าแบบไม่ใช้ยาสลบซึ่งแสดงถึงการละลายของก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ที่เพิ่มสูงขึ้นแล้วทำให้ pH ของน้ำต่ำลง (Cole *et al*., 1999) เหตุที่เป็นเช่นนี้เนื่องจากจุดวิกฤติบางจุดเกิดขึ้นในการเก็บตัวอย่างน้ำเพื่อนำมาวัดค่า pH เพราะในสภาวะเดิมก่อนการเก็บตัวอย่าง pH ในภาชนะขนส่งระบบปิดจะมีค่าต่ำซึ่งเป็นผลจากปริมาณคาร์บอนไดออกไซด์ที่เพิ่มขึ้นจากการหายใจของสัตว์น้ำและกระบวนการย่อยสลายสารอินทรีย์ในน้ำที่ขนส่งปลา และเมื่อเปิดภาชนะขนส่งออก

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

อาจทำให้คาร์บอนไดออกไซด์ซึ่งมีความสามารถในการแพร่กระจายได้ดีกว่าออกซิเจนระเหยออกมาสู่ภายนอกได้เร็วทำให้ค่า pH ในน้ำหลังการขนส่งเพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็ว (Cole *et al*., 1999) ดังนั้นข้อมูลของคุณภาพน้ำที่เกี่ยวกับการเปลี่ยนแปลงของ pH หลังการขนส่ง ในทางปฏิบัติแล้วไม่สามารถนำมาใช้เป็นดัชนีชี้วัดที่แน่นอนในการเปรียบเทียบประสิทธิภาพของการทดลองเกี่ยวกับการขนส่งในภาชนะปิดด้วยวิธีการต่าง ๆ ได้เนื่องจากความต่างของสิ่งแวดล้อมที่ศึกษาอาจทำให้ผลที่เกิดขึ้นคลาดเคลื่อนไป

สำหรับอุณหภูมิของน้ำก็เป็นอีกปัจจัยหนึ่งที่ไม่สามารถนำมาใช้เป็นดัชนีชี้วัดที่แน่นอนได้ เพราะถ้าการทดลองมีการเก็บข้อมูลที่เวลาต่างกัน แน่นอนว่าอุณหภูมิที่ตรวจวัดได้ในช่วงกลางวันย่อมสูงกว่ากลางคืน และผลของอุณหภูมิอาจต่างกันด้วยสาเหตุของตำแหน่งในการวางภาชนะขนส่ง เช่นบางจุดที่วางภาชนะอาจมีอุณหภูมิสูงกว่าอีกบริเวณหนึ่ง จะเห็นได้ว่าผลของอุณหภูมิที่ตรวจวัดไม่ได้เกิดจากกิจกรรมของสัตว์น้ำภายในภาชนะขนส่งเพียงอย่างเดียว แต่อาจเกิดจากปัจจัยภายนอกเข้ามาร่วมด้วย ดังนั้นอุณภูมิของน้ำในภาชนะขนส่งที่ตรวจวัดได้อาจให้ข้อมูลได้ไม่แน่นอนเกี่ยวกับกิจกรรมของสัตว์น้ำระหว่างการขนส่ง

Wedmeyer (1996) ให้ข้อมูลว่าการใช้ยาสลบเพื่อลดการใช้ออกซิเจนของปลาในภาชนะขนส่งนั้น สามารถทำให้ระดับของปริมาณคาร์บอนไดออกไซด์ที่ปลาปล่อยออกมาลดลง หากมีระดับคาร์บอนไดออกไซด์ในภาชนะขนส่งมากก็จะส่งผลต่อการเพิ่มคาร์บอนไดออกไซด์ในเลือดของปลามากขึ้น (hypercapnia) และทำให้ประสิทธิภาพในการนำออกซิเจนของ hemoglobin ลดลงเนื่องจากเกิด Bohr effect

แอมโมเนียทั้งหมดคือของเสียหลัก ๆ ที่ได้จากการขับถ่ายของปลาโดยเกิดจากเมทาบอลิซึมของโปรตีน ซึ่งแอมโมเนียรูปที่มีความเป็นพิษต่อปลามากที่สุดคือแอมโมเนียในรูปที่ไม่เป็นไอออน (Berka, 1986) ความเข้มข้นของแอมโมเนียในรูปที่ไม่เป็นไอออนในน้ำควรมีค่าไม่เกิน 0.01 มิลลิกรัมต่อลิตร ทั้งนี้ความเข้มข้นของแอมโมเนียทั้งหมดในน้ำที่ต่ำกว่า 0.02 มิลลิกรัมต่อลิตร ถือว่าเป็นความเข้มข้นที่ปลอดภัยต่อปลาโดยส่วนใหญ่ (Vinatea, 1997; Baldisserotto, 2002; Foss *et al*., 2003) สำหรับการขนส่งในระบบปิดนั้นแหล่งที่มีของแอมโมเนียส่วนใหญ่เกิดจากการขับถ่ายของปลา และบางส่วนเกิดจากการย่อยสลายสารอินทรีย์ในภาชนะขนส่ง เช่น มูลของปลาและซากของปลาที่ตายในภาชนะขนส่ง ซึ่งจากการทดลองของ Hanggono (2003) พบว่าการใช้น้ำมันกานพลูเป็นยาสลบในการขนส่งลูกปลากระพงขาว ด้วยเวลา 4 และ 8 ชั่วโมง สามารถลดปริมาณ

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ของแอมโมเนียในภาชนะขนส่งได้ และการใช้วัตถุแลกเปลี่ยนไอออน เช่น clinoptiolite เพื่อลดการสะสมของแอมโมเนียในน้ำระหว่างการขนส่งปลาก็เป็นอีกทางเลือกหนึ่งที่ใช้ในการขนส่งปลา (Bowe and Turner, 1982) นอกจากนี้การงดอาหารปลาเป็นเวลา 24 ชั่วโมงเพื่อให้ลำไส้ปราศจากอาหารระหว่างการขนส่งปลาจะขับของเสียออกมาน้อยซึ่งมีผลดีในการลดความเสื่อมของคุณภาพน้ำในภาชนะขนส่งได้ (Amend *et al*., 1982; Berka, 1986; Toe *et al*., 1989)

นอกจากแอมโมเนียแล้วพบว่าค่าของไนไตรท์ก็เป็นสิ่งสำคัญที่ควรพิจารณาเช่นกัน เนื่องจากไนไตรท์มีความเป็นพิษต่อปลาได้เช่นเดียวกับแอมโมเนียโดยเฉพาะไนไตรท์ที่อยู่ในรูปที่เป็นไอออนของ Nitrous acid (HNO_2) (Lawson, 1995) ซึ่งพิษของไนไตรท์สามารถนำไปสู่ผลกระทบต่อการลำเลียงก๊าซออกซิเจน เนื่องจากเกิด methemoglobin ซึ่งทำให้เลือดของปลาเปลี่ยนไปเป็นสีน้ำตาล (brown blood disease) (Lewis *et al*., 1986; Wedemeyer, 1996) สำหรับการแก้ปัญหาเกี่ยวกับปริมาณไนไตรท์นี้พบว่าการเติมเกลือลงในน้ำที่ใช้ขนส่งปลาสามารถลดการเกิดพิษของไนไตรท์และลดความเครียดของปลาลงได้ และทำให้อัตรารอดของปลาที่ผ่านการขนส่งมากขึ้น (Swanson *et al*., 1996)

เมื่อพิจารณาเกี่ยวกับการใช้ยาสลบและการควบคุมคุณภาพน้ำระหว่างการขนส่งปลานั้น จากข้อมูลโดยภาพรวมของการศึกษานี้ พบว่าการใช้สารยูจีนอลสังเคราะห์มีส่วนช่วยในการลดการเสื่อมของคุณภาพน้ำลงเนื่องจากปัจจัยด้านคุณภาพน้ำที่ตรวจวัดอยู่ในระดับที่ดีเมื่อเปรียบเทียบกับการไม่ใช้ยาสลบและการใช้น้ำมันกานพลู และสาร MS-222 โดยพิจารณาจากค่าออกซิเจนที่ละลายน้ำซึ่งตรวจวัดหลังการขนส่งปลา พบว่ามีค่าสูงกว่าการไม่ใช้ยาสลบและการใช้สารอื่นเป็นยาสลบ ทั้งนี้เมื่อพิจารณาในส่วนของระดับของแอมโมเนียและไนไตรท์ของน้ำหลังการขนส่ง พบว่ามีค่าต่ำกว่าการขนส่งด้วยยาสลบชนิดอื่นและที่ไม่ใช้ยาสลบ

จากการพิจารณาผลที่ได้โดยรวมของการศึกษานี้จะเห็นได้ว่าความหนาแน่นและระยะเวลาที่ใช้ในการขนส่งปลานั้นมีผลต่ออัตรารอดและสุขภาพของปลาหลังการขนส่งโดยตรง แต่เนื่องจากการขนส่งมักมีข้อจำกัดในส่วนของต้นทุนค่าขนส่ง เกษตรกรจึงต้องการหาวิธีที่จะเพิ่มความหนาแน่นของปลาในการขนส่งโดยมีผลกระทบต่อปลาน้อยที่สุดเพื่อเป็นการลดต้นทุนการขนส่ง การลดกิจกรรมของปลาระหว่างการขนส่งจึงเป็นทางเลือกหนึ่งที่สามารถนำมาให้ในการขนส่งทั้งในส่วนของการลดอุณหภูมิและการใช้ยาสลบเพื่อลดกิจกรรมของปลา ซึ่งจากการศึกษานี้พบว่าเมื่อใช้สารยูจีนอลสังเคราะห์เป็นยาสลบที่ความเข้มข้น 5 มิลลิกรัมต่อลิตร สามารถเพิ่มความหนาแน่น

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

และเวลาที่ใช้ขนส่งลูกปลานิลขนาด 0.30±0.01 กรัมได้ ซึ่งปกติแล้วเกษตรกรมักขนส่งลูกปลานิลที่ความหนาแน่น 1,000 ตัวต่อน้ำ 3 ลิตร ใช้เวลาในการขนส่งประมาณ 3 ชั่วโมง แต่การทดลองนี้พบว่าหลังจากใช้สารยูจีนอลสังเคราะห์เป็นยาสลบ สามารถขนส่งปลาได้ที่ความหนาแน่น 1,000 ตัว ต่อน้ำ 3 ลิตร ด้วยเวลาที่มากกว่าเดิมคือ 6 ชั่วโมง และเมื่อเพิ่มความหนาแน่นในการขนส่งปลาขึ้นอีก 20% คือ 1,200 ตัวต่อน้ำ 3 ลิตร พบว่ามีประสิทธิภาพที่ดีถ้าใช้เวลาในการขนส่งน้อยกว่า 6 ชั่วโมง ซึ่งเป็นช่วงเวลาขนส่งที่มีการใช้อยู่เป็นปกติ ทั้งนี้เมื่อเปรียบเทียบกับการขนส่งโดยใช้สาร MS-222 และน้ำมันกานพลูเป็นยาสลบ พบว่าสารยูจีนอลสังเคราะห์มีประสิทธิภาพที่ดีกว่าสาร MS-222

ในส่วนของการขนส่งปลาหางไหม้ขนาด 3.01±0.48 กรัม ซึ่งปกติแล้วเกษตรจะใช้ความหนาแน่นในการขนส่งปลาที่ 50 ตัวต่อน้ำ 3 ลิตรโดยขนส่งเป็นระยะเวลา 12 ชั่วโมง จากการทดลองนี้พบว่าเมื่อใช้สารยูจีนอลสังเคราะห์ที่ความเข้มข้น 5 มิลลิกรัมต่อลิตร สามารถเพิ่มความหนาแน่นของปลาได้เป็น 75 ตัวต่อน้ำ 3 ลิตร ซึ่งคิดเป็น 50% ที่เพิ่มขึ้นจากความหนาแน่นเดิมที่ใช้อยู่ปกติ และสามารถเพิ่มเวลาในการขนส่งได้เป็น 24 ชั่วโมง โดยผลจากการทดลองนี้พบว่าการขนส่งปลาด้วยความหนาแน่นระดับนี้สามารถทำให้อัตรารอดของปลาหลังการขนส่งเกิดขึ้นเกือบ 100% และมีการเสื่อมลงของคุณภาพน้ำหลังการขนส่งไม่มากนักเมื่อเปรียบเทียบกับการไม่ใช้ยาสลบและใช้สารอื่นเป็นยาสลบ ซึ่งการขนส่งที่มีความหนาแน่นเพิ่มขึ้นนี้จะช่วยให้ค่าใช้จ่ายในการขนส่งปลาลดลง

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

สรุป

1. สารยูจีนอลสังเคราะห์มีค่า LC_{50} ที่ 24 ชั่วโมงเมื่อทำการทดสอบในลูกปลานิลขนาด 0.30±0.01 กรัม ใกล้เคียงกับน้ำมันกานพลู โดยมีค่าเท่ากับ 16.98 มิลลิกรัมต่อลิตร และ 16.95 มิลลิกรัมต่อลิตร ตามลำดับ และค่าที่ได้ของสารทั้งสองต่ำกว่าค่า LC_{50} ที่ 24 ชั่วโมงของสาร MS-222 (72.50 มิลลิกรัมต่อลิตร) จากผลที่ได้แสดงให้เห็นว่าสารยูจีนอลสังเคราะห์และน้ำมันกานพลูมีความเป็นพิษสูงกว่าสาร MS-222 ดังนั้น การใช้เป็นยาสลบจึงควรใช้อย่างระมัดระวังมากกว่าสาร MS-222

2. สารยูจีนอลสังเคราะห์สามารถเหนี่ยวนำให้ปลาเกิดการสลบได้ด้วยความเข้มข้นต่ำและมีประสิทธิภาพดีกว่าสาร MS-222 แต่มีประสิทธิภาพใกล้เคียงกับน้ำมันกานพลู ซึ่งความเข้มข้นของสารยูจีนอลสังเคราะห์ที่ทำให้ลูกปลานิลขนาด 0.30±0.01 กรัม ปลาหางไหม้ขนาด 3.01±0.48 กรัม และปลานิลขนาด 70.85±1.03 กรัม (ขนาดลงกระชัง) เข้าสู่เฉพาะระยะ sedation ซึ่งปลาจะสงบลงแต่ไม่เสียสมดุลร่างกาย คือ 5, 5 และ 10 มิลลิกรัมต่อลิตร ตามลำดับ ส่วนความเข้มข้นของสารยูจีนอลสังเคราะห์ที่เหมาะสมเพื่อใช้ในการสลบลูกปลานิล ปลาหางไหม้ และปลานิลขนาดลงกระชัง ให้เข้าสู่ระยะที่ 4 ซึ่งเป็นระยะที่ปลาสลบโดยสมบูรณ์และไม่มีการตอบสนองต่อสิ่งกระตุ้นต่าง ๆ อยู่ที่ 20, 20 และ 30 มิลลิกรัมต่อลิตร ตามลำดับ

3. ความเข้มข้นของสารยูจีนอลสังเคราะห์ที่เหนี่ยวนำให้ปลาเข้าสู่เฉพาะระยะ sedation ของการสลบหรือลดกิจกรรมของร่างกายลง สามารถใช้ในการควบคุมการเกิดความเครียดของปลานิลระหว่างการขนส่งได้ เพราะปัจจัยชี้วัดการตอบสนองต่อความเครียดได้แก่ ความเข้มข้นของ cortisol และglucose ในเลือด ยังคงรักษาระดับได้ใกล้เคียงกับค่าเริ่มต้นก่อนการกระตุ้นให้เกิดความเครียดด้วยการเลียนแบบการขนส่งในสภาพหนาแน่นเป็นเวลา 3 ชั่วโมง ทั้งนี้เมื่อเปรียบเทียบประสิทธิภาพกับสาร MS-222 พบว่าสารยูจีนอลสังเคราะห์สามารถใช้ได้ในความเข้มข้นที่ต่ำกว่าและสามารถควบคุมการเกิดความเครียดในปลานิลระหว่างการขนส่งได้ดีกว่าสาร MS-222

4. สารยูจีนอลสังเคราะห์ที่ความเข้มข้นซึ่งสามารถเหนี่ยวนำให้ปลาเข้าสู่เฉพาะระยะ sedation ของการสลบสามารถลดผลกระทบของความเครียดต่อการตอบสนองทางภูมิคุ้มกันแบบไม่จำเพาะได้ เมื่อประเมินจากค่า % phagocytosis และ spontaneous O_2^- production พบว่าไม่เปลี่ยนแปลงจากค่าเริ่มต้นที่ปลาอยู่ในสภาพปกติมากนัก และเมื่อเปรียบเทียบกับสาร MS-222 พบว่าสารยูจีนอลสังเคราะห์สามารถรักษาระดับการตอบสนองทางภูมิคุ้มกันแบบไม่จำเพาะในปลา

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

นิลที่ถูกกระตุ้นด้วยความเครียดจากการขนส่งได้ดีกว่า และใช้ความเข้มข้นที่ต่ำกว่าเพื่อเหนี่ยวนำให้ปลาลดกิจกรรมลงระหว่างการขนส่งนาน 3 ชั่วโมง

5. การศึกษานี้พบว่าการใช้สารยูจีนอลสังเคราะห์ที่ความเข้มข้นซึ่งสามารถทำให้ปลาสลบได้อย่างสมบูรณ์ สามารถทำให้การตอบสนองทางภูมิคุ้มกันแบบจำเพาะมีการทำงานได้ดีขึ้น การศึกษานี้พบว่าการตอบสนองทางภูมิคุ้มกันแบบจำเพาะของปลานิลที่มีต่อวัคซีนของเชื้อ *Streptococcus agalactiae* ภายใต้สภาวะของการสลบด้วยสารยูจีนอลสังเคราะห์ มีระดับ antibody titer ในซีรั่มสูงกว่าปลาที่ถูกฉีดวัคซีนโดยไม่ใช้ยาสลบ แต่เมื่อทดสอบทางสถิติพบว่าไม่แตกต่างกัน

6. สารยูจีนอลสังเคราะห์ที่ความเข้มข้น 5 มิลลิกรัมต่อลิตร สามารถใช้เพื่อลดกิจกรรรมของลูกปลานิลขนาดเล็กและปลาหางไหม้ระหว่างการขนส่งได้ โดยพบว่าการขนส่งปลานิลที่เหมาะสมควรใช้ความหนาแน่น 1,000 ตัวต่อน้ำ 3 ลิตร ด้วยเวลาในการขนส่ง 6 ชั่วโมง ร่วมกับการใช้สารยูจีนอลสังเคราะห์ และอาจเพิ่มความหนาแน่นในการขนส่งได้อีก 20% คือขนส่งด้วยความหนาแน่น 1,200 ตัวต่อน้ำ 3 ลิตร ร่วมกับการใช้สารยูจีนอลสังเคราะห์และใช้เวลาในการขนส่งน้อยกว่า 6 ชั่วโมง ส่วนการขนส่งปลาหางไหม้ สามารถใช้ความหนาแน่น 75 ตัวต่อน้ำ 3 ลิตร ร่วมกับการใช้สารยูจีนอลสังเคราะห์เพื่อการขนส่งปลาด้วยเวลา 24 ชั่วโมง การใช้สารยูจีนอลสังเคราะห์กับการขนส่งปลานั้นสามารถควบคุมการเปลี่ยนแปลงของคุณภาพน้ำระหว่างขนส่ง เพิ่มอัตรารอดหลังขนส่ง และลดความอ่อนแอของปลาที่ผ่านการขนส่งได้ รวมทั้งมีประสิทธิภาพที่ดีและใช้ได้ในความเข้มข้นที่ต่ำกว่าเมื่อเปรียบเทียบกับสาร MS-222

เมื่อพิจารณาประสิทธิภาพของสารยูจีนอลสังเคราะห์โดยประเมินจากการทดลองข้างต้นทำให้สามารถยืนยันได้ว่าสารนี้มีประสิทธิภาพที่ดีสำหรับการใช้เพื่อเป็นยาสลบปลาทั้งในส่วนของการสลบปลาเพื่อให้เกิดความสะดวกต่อการทำกิจกรรมต่าง ๆ ในกระบวนการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำและกิจกรรมการขนส่งสัตว์น้ำ เนื่องจากสารนี้มีประสิทธิภาพที่ดีในการสลบปลาโดยใช้ความเข้มข้นต่ำสามารถลดการเกิดความเครียด และป้องกันการความบกพร่องของการทำงานในระบบภูมิคุ้มกันของปลาที่ถูกกระตุ้นให้เกิดความเครียดจากกิจกรรมต่าง ๆ รวมทั้งยังเป็นสารที่มีราคาถูก ใช้ง่าย และได้มีการรับรองให้สามารถใช้ได้อย่างปลอดภัยจากองค์การอาหารและยา (Generally Regarded as Safe) จึงไม่มีผลต่อกระทบทางด้านลบต่อสัตว์น้ำ ผู้ใช้ รวมทั้งสิ่งแวดล้อม ดังนั้นสารยูจีนอลสังเคราะห์จึงเป็นยาสลบสัตว์น้ำชนิดหนึ่งที่เป็นทางเลือกสำหรับนำไปใช้ได้อย่างกว้างขวางในวงการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำหรือกิจกรรมต่าง ๆ ที่เกี่ยวข้องกับสัตว์น้ำต่อไป

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

เอกสารและสิ่งอ้างอิง

จรัญ จันทลักขณา. 2549. **สถิติ: การวิเคราะห์และการวางแผนงานวิจัย**. สำนักพิมพ์มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ.

ชาญณรงค์ รอดคำ. 2550. โรคสำคัญที่ส่งผลกระทบต่อการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำในประเทศไทย, น. 319-326. *ใน* **ประมวลเรื่องการประชุมวิชาการทางสัตวแพทย์และการเลี้ยงสัตว์ครั้งที่ 33**. ภาควิชาจุลชีววิทยา, คณะสัตวแพทยศาสตร์, จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.

ฎิลก วงศ์เสถียร และ ธีรพงศ์ โปธา. 2550. ระยะเวลาการสลบและการฟื้นสลบของน้ำมันการพลูในปลาทอง (*Carassius auratus* Linn.). **วารสารสัตวแพทยศาสตร์ มข**. 17 (3): 1-11.

ณัฐพงศ์ แสงศัพท์, ณัฐวุฒิ จุติวัฒนานนท์, นีรนารา ภัทรภานนท์ และบัณฑิตย์ เต็งเจริญกุล. 2547. **การศึกษาผลการใช้น้ำมันกานพลูในการชักนำ สลบและการควบคุมสลบในปลาหางนกยูง** (*Poecilia reticulate*). ปัญหาพิเศษปริญญาตรี, คณะสัตวแพทยศาสตร์, มหาวิทยาลัยขอนแก่น.

ทวีศักดิ์ ชัยเรืองยศ. 2551. **"ปลาฉลามหางไหม้" จะต้องเลี้ยงเป็นฝูง**. โต๊ะกาแฟ สำนักวิจัยและพัฒนาประมงชายฝั่ง กรมประมง. แหล่งที่มา: http://www.coastalaqua.com/webboard/index.php?topic=958.0. 10 ตุลาคม 2552.

ทัศนีย์ ภูพิพัฒน์. 2524. **ชีวประวัติของปลานิล**. เอกสารวิชาการฉบับที่ 7/2524. กองประมงน้ำจืด กรมประมง กระทรวงเกษตรและสหกรณ์, กรุงเทพฯ.

ไพศาล สิทธิกรกุล. 2548. **วิทยาภูมิคุ้มกันสำหรับการเรียนการสอนและการวิจัย**. ศูนย์สื่อเสริมกรุงเทพ, กรุงเทพฯ.

ภูมิไทยฟาร์ม. 2551. **รูปแบบการขนส่งลูกปลานิล**. บทความ. แหล่งที่มา: http://www.tilapiathailand.com/th/news_activities/article_detail.php?frm_id=16&frmc_code_id=6. 10 ตุลาคม 2552.

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

มานพ ตั้งตรงไพโรจน์, ภาพนุ เทวรัตน์มณีกุล, พรรณศรี จริโมภาส, สุจินต์ หนูขวัญ, กำชัย ลาวัณยวุฒิ และ วิมล จันทรโรทัย. 2536. **การพัฒนาการเพาะเลี้ยงปลานิล**. เอกสารเผยแพร่ฉบับที่ 23. สถาบันวิจัยเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำจืด กรมประมง กระทรวงเกษตรและสหกรณ์, กรุงเทพฯ.

มาวิน มหาวงศ์, เมธา คชาภิชาติ, ปฏิพัทธ์ อภิธนะกุล และ ประโยชน์ บุญประเสริฐ. 2549. กานพลูพืชสารพัดประโยชน์ และการทดลองเบื้องต้นในการใช้น้ำมันกานพลูเป็นยาสลบในปลาน้ำจืดที่สำคัญทางเศรษฐกิจบางชนิด. **วารสารการประมง** 59 (6): 524-532.

วรวุฒิ เกิดปราง. 2547. **การเลี้ยงปลาน้ำจืดเศรษฐกิจ**. โอเดียนสโตร์, กรุงเทพฯ.

วีระศักดิ์ ฟุ้งเฟื่อง, ชวลิต ตั้งสมบูรณ์กิตติ, พลวรรษ มิตรวัฒนากุล, สุกัญญา แซ่เตียว, คีรีรัฐ เอี่ยมบุญ และ วารยา วงศ์นิมิตกุล. 2549. **การเปรียบเทียบฤทธิ์การสลบของน้ำมันกานพลูกับควินอลดินในปลาคาร์พ**. สัตวแพทยสมาคมแห่งประเทศไทยในพระบรมราชูปถัมภ์: ประมวลเรื่องการประชุมวิชาการทางสัตวแพทย์และการเลี้ยงสัตว์ ครั้งที่ 32, 1-3 พฤศจิกายน 2549, โรงแรมแอมบาสเดอร์, กรุงเทพฯ.

สถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทย (วว.). 2549. **กานพลู**. ฐานข้อมูลน้ำมันหอมระเหยไทย. แหล่งที่มา: http://www.tistr.or.th/essentialoils/indexv2.htm, 10 ตุลาคม 2552.

สุรศักดิ์ วงศ์กิตติเวช. 2542. **ปลาไทย**. บ. เอม ซัพพลายจำกัด, กรุงเทพฯ.

อัจฉริยา ปราบอริพ่าย. 2552. **เทคนิคการวิเคราะห์สถิติโดยใช้โปรแกรม SPSS: ทฤษฎีและภาคปฏิบัติ**. สัมนักพิมพ์มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ.

อัญชนา สงแก้ว, ชมพร โชคบุญมงคล, รัชต์ ขัตติยะ, ฎิลก วงศ์เสถียร, เกรียงศักดิ์ เม่งอำพัน และ สุรชัย พิกุลแก้ว. 2550. ระยะเวลาในการเหนี่ยวนำให้เกิดการสลบ พฤติกรรมการสลบและการฟื้นสลบในปลาบึก (*Pangasianodon gigas*) ที่ใช้น้ำมันกานพลูและไตรเคน มีเทนซัลโฟเนต. **สัตวแพทยสาร** 58 (2): 12-21.

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

อุดม เรืองนพคุณ. 2549. **การเพาะพันธุ์และการเลี้ยงปลานิล.** เกษตรสยามบุ๊ค, กรุงเทพฯ.

Abbas, A. K., A. H. Lichtman and J. S. Pober. 2000. Cellular and Molecular Immunology. 4th ed. W. B. Saunders Company, Philadelphia, Pennsylvania.

Acerete, L., J. C. Balasch and E. Espinosa. 2004. Physiological responses in Eurasian Perch (*Perca fluviatilis*) subjected to stress to transport and handling. Aquaculture 237: 167-178.

Adamante, W. B., A. P. O. Nuñer, L. J. G. Barcellos, A. B. Soso and J. A. Finco. 2008. Stress in *Salminus brasiliensis* fingerlings due to different densities and times of transportation. Arq. Bras. Med. Vet. Zootec. 60: 755-761.

Adams, S. M. 1990. Biological indicators of stress in fish. American Fisheries Society Symposium Series 8, Bethesda, Maryland.

Ai, Q., K. Mai, B. Tan, W. Xu, W. Zhang, H. Ma and Z. Liufu. 2006. Effects of dietary vitamin C on survival, growth, and immunity of large yellow croaker, *Pseudosciaena crocea*. Aquaculture 261: 327-336.

Ainsworth, A. J., C. Dexiang and P. R. Waterstrat. 1991. Changes in peripheral blood leukocyte percentages and function of neutrophils in stressed channel catfish. J. Aquat. Anim. Health 3: 41-47.

Akbari, S. and M. Shariff. 2003. Stress response of red snapper, *Lutjanus argentimaculatus* exposed to sublethal concentrations of crude oil. Arhc. Razi Inst. 54: 49-64.

_____. and A. Khajavi. 2004. Comparison between MS-222 and eugenol as sedative and anesthetic agent in shrimp, *Penaeus indicus,* pp. 144. *In* 7th Asian Fisheries Forum, 30 November- 4 December, Penang, Malaysia.

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

Akbari, S., M. J. Khoshnod, H. Rajaian and M. Afsharnasab. 2010. The use of eugenol as an anesthetic in transportation of with indian shrimp (*Fenneropenaeus indicus*) post larvae. Turk. J. Fish. Aquat. Sci. 10: 423-429.

Amend, D. F., T. R. Croy, B. A. Goven, K. A. Johnson and D. H. McCarthy. 1982. Transportation of fish in closed systems: methods to control ammonia, carbon dioxide, pH and bacterial growth. Trans. Am. Fish. Soc. 111: 603-611.

Anderson, W. G., R. S. McKinley and M. Colavecchia. 1997. The use of clove oil as an anaesthetic for rainbow trout and its effects on swimming performance. North Am. J. Fish. Manage. 17: 301-307.

Arason, G. J. 1996. Lectins as defence molecules in vertebrates and invertebrates. Fish Shellfish Immunol. 6: 277-289.

Areechon, N., M. Endo, D. Jantawan, P. Srisapoome and N. Pirarat. 2005. Streptococcal infection in Tilapia culture of Thailand, pp. 166-174. *In* Proceedings of the JSPS-NRCT international symposium joint seminar 2005: productivity techniques and effective utilization of aquatic animal resources into the new century, 19-21 December 2005, Kasetsart University, Bangkok.

Avella, M., C. B. Schreck, and P. Prunet. 1991. Plasma prolactin and cortisol concentrations of stressed coho salmon, *Oncorhynchus kisutch*, in fresh water or salt water. Gen. Comp. Endocrinol. 81: 21-27.

Baldisserotto, B. 2002. Fisiologia de peixes aplicada à piscicultura. Editora da UFSM, Santa Maria.

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

Barcellos, L. G., V. M. Woehl and G. F. Wassermann. 2001. Plasma levels of cortisol and glucose in response to capture and tank transference in *Rhamdia quelen* (Quoy & Gaimard), a South American catfish. Aquacult. Res. 32: 121-123.

Barton, B. A. 2002. Stress in fishes: A diversity of responses with particular reference to changes in circulating corticosteroids. Integ. Comp. Biol. 42: 517-525.

_____ and G. K. Iwama. 1991. Physiological changes in fish from stress in aquaculture with emphasis on the response and effects of corticosteroids. Ann. Rev. Fish Dis. 1: 3-26.

_____, C. B. Schreck and L. A. Sigismondi. 1986. Multiple acute disturbances evoke cumulative physiological stress responses in juvenile chinook salmon. Trans. Am. Fish. Soc. 115: 245-251

Baynes, J. W. and M. Dominiczak. 2009. Medical Biochemistry. 3rd ed. Elsevier Limited. Philadelphia.

Berka, R. 1986. The transport of live fish: a review. EIFAC Technical Paper 48.

Bilodeau, A. L., B. C. Small and W. R. Walters. 2003. Pathogen loads, clearance and plasma cortisol response in channel catfish, *Ictalurus punctatus* (Rafinesque), following challenge with *Edwardsiella ictaluri*. J. Fish Dis. 26: 433-437.

Bols, N. C., J. L. Brubacher, R. C. Ganassin and L. E. J. Lee. 2001. Ecotoxicology and innate immunity in fish. Dev. Comp. Immunol. 25: 853-873.

Bower, C. E. and D. T. Turner. 1982. Ammonia removal by clinoptilolite in the transport of ornamental freshwater fishes. Prog. Fish-Cult. 44: 19-23.

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

Boyd, C. E. 1979. Water Quality in Warmwater Fishponds. Auburn University. Craftmaster Printers, Auburn, Alabama.

_____. 1990. Water Quality in Ponds for Aquaculture. Alabama Agriculture Experiment Stations, Auburn University, Auburn, Alabama.

Brown, L. 1993. Anesthesia and restraint, pp. 79-90. *In* M. K. Stoskopf, ed. Fish Medicine. WB Saunders Company, Mexico.

Brown, S., K. Fedoruk and J. G. Eales. 1978. Physical injury due to injection or blood removal causes transitory elevations of plasma thyroxine in rainbow trout, *Salmo gairdneri*. Can. J. Zool. 56: 1998-2003.

Carmichael, G. J., G. A. Wedemeyer, J. P. McCraren and J. L. Millard. 1983. Physiological effects of handling and hauling stress on small mouth bass. Prog. Fish-Cult. 45: 110-113.

_____, J. R. Tomasso and T. E. Schedler. 2001. Fish transportation, pp. 641-660. *In* G. A. Wedemeyer, ed. Fish Hatchery Management, 2nd ed. American Fisheries Society, Bethesda.

Chang, Y. J. and J. W. Hur. 1999. Physiological responses of grey mullet (*Mugil cephalus*) and Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) by rapid changes in salinity of rearingwater. J. Korean Fish. Soc. 32: 310-316.

Chen, M. F. and T. S. Light. 1994. Specificity of the channel catfish antibody to *Edwardsiella ictaluri*. J. Aquat. Anim. Health 6: 226-270.

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

Cho, G. K. and D. D. Heath. 2000. Comparison of tricaine methanesulphonate (MS222) and clove oil anesthesia effects on the physiology of juvenile chinook salmon *Oncorhynchus tshawytscha* (Walbaum). Aquacult. Res. 31: 537-546.

Christybapita, D., M. Divyagnaneswari and R. D. Michael. 2007. Oral administration of *Eclipta alba* leaf aqueous extract enhances the non-specific immune responses and disease resistance of *Oreochromis mossambicus*. Fish Shellfish Immunol. 23: 840-852.

Chrousos, G. P. 1998. Stressors, stress and neuroendocrine integration of the adaptive response. Ann. N. Y. Acad. Sci. 851: 311-335.

Cole, B., C. S. Tamaru, R. Bailey, C. Brown and H. Ako. 1999. Shipping Practices in the Ornamental Fish Industry. Center for Tropical and Subtropical Aquaculture Publication Number 131.

Conner, D. E. and L. R. Beuchat. 1984. Effects of essential oils from plants on growth of food spoilage yeasts. J. Food Sci. 49 (2): 429-34.

Cooke, S. J., C. D. Suski, K. G. Ostrand, B. L. Tufts and D. H. Wahl. 2004. Behavioral and physiological assessment of low concentrations of clove oil anaesthetic for handling and transporting largemouth bass (*Micropterus salmoides*). Aquaculture 239: 509-529.

Cooper, D. Y. and O. Rosendalh. 1962. Action of noradrenaline and ascobic acid on C-21 hydroxylation of steroids by adrenocortical microsomes. Arch. Biochem. 96: 331-335.

Coyle, S. D., R. M. Durborow and J. H. Tidwell. 2004. Anesthetics in Aquaculture. SRAC Publication No. 3900.

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

Coyle, S. D., S. Dasgupta, T. H. Tidwell, T. Beavers, L. A. Brightand and D. K. Yasharian. 2005. Comparative efficacy of anesthetics for the freshwater prawn *Macrobrachium rosenbergii*. J. World Aquaculture Soc. 36: 282-290.

Crosby, T. C., J. E. Hill, C. V. Martinez, C. A. Watson, D. B. Pouder and R. P.E. Yanong. 2007. FA-119 On-farm transport of ornamental fish. Available Source: http://edis.ifas.ufl.edu, June 20, 2009.

Cubero, L. and A. Molinero. 1997. Handling, confinement and anaesthetic exposure induces changes in the blood and tissue immune characteristics of gilthead sea bream. Dis. Aquat. Org. 31: 89-94.

Cunha, F. E. A. and I. L. Rosa. 2006. Anaesthetic effects of clove oil on seven species of tropical reef teleosts. J. Fish Biol. 69: 1504-1512.

Danilova, N., V. S. Hohman, E. H. Kim and L. A. Steiner. 2000. Immunoglobulin variable-region diversity in the zebrafish. Immunogenetics 52: 81-91.

Dixon, B. and R. J. Stet. 2001. The relationship between major histocompatibility receptors and innate immunity in teleost fish. Dev. Comp. Immunol. 25: 683-699.

Donaldson, E. M. 1981. The pituitary-interrenal axis as an indicator of stress in fish, pp. 11-47. *In* A. D. Pickering , ed. Stress and Fish. Academic Press, New York.

Duke, J. A. and S. M. Beckstrom-Sternberg. 1994. "Acceptable" levels of flavoring ingredients?, pp. 741 – 758. *In* G. Charalambous, ed. Spices, Herbs and Edible Fungi. Elsevier Science B V, Netherlands.

Du Pasquier, L. 2001. The immune system of invertebrates and vertebrates. Comp. Biochem. Physiol. B: Biochem. Mol. Biol. 129: 1-15

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

Dupree, H. K. and J. V. Huner. 1984. Third Report to Fish Farmers. U.S. Fish and Wildlife Service, Washington, D.C.

Durville, P. and A. Collet. 2001. Clove oil used as an anaesthetic with juvenile tropical marine fish. SPC Live Reef Fish Inform. Bull. 9: 1-4.

Ellis, A. E. 2001. Innate host defense mechanisms of fish against viruses and bacteria. Dev. Comp. Immunol. 25: 827-839.

Evans, W. C. 2002. Trease and Evans Pharmacognosy. 15th ed. Harcout Publisher Limited, Edinburgh.

Farrell, K. T. 1990. Spices, Condiments and Seasonings. 2nd ed. Von Nostrand Reinhold, USA.

Farrell, P., T. Garthwaite and A. Gustafson. 1983. Plasma adrenocorticotropin and Cortisol responses to submaximal and exhaustive exercise. J. Appl. Physiol. 55: 1441-1444.

Fast, M. D., S. Hosoya, S. C. Johnson and L. O. B. Afonso. 2008. Cortisol response and immune-related effects of Atlantic salmon (*Salmo salar* Linnaeus) subjected to short-and long-term stress. Fish Shellfish Immunol. 24: 194-204.

Finney, D. J. 1971. Probit Analysis. Cambridge University Press. England.

Flos, R., L. Reig, P. Torres, and L. Tort. 1988. Primary and secondary stress responses to grading and hauling in rainbow trout, *Salmo gairdneri*. Aquaculture 71: 99-106.

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

Foss, A., T. H. Evensen and T. Vollen. 2003. Effects of chronic ammonia exposure on growth and food conversion efficiency in juvenile spotted wolfish. Aquaculture 228: 215-224.

Frisch, A. and T. Anderson. 2005. Physiological stress responses of two species of coral trout (*Plectropomus leopardus* and *Plectropomus maculatus*). Comp. Biochem. Physiol. A: Mol. Integr. Physiol. 140: 317-327.

Fritsche, R., S. G. Reid, S. Thomas and S. F. Perry. 1993. Serotonin mediated release of catecholamines in the rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*. J. Exp. Biol. 178:191-204.

Froese, R. 1988. Relationship between body weight and loading densities in fish transport using the plastic bag method. Aquacult. Fish. Manage. 19: 275-281.

_____. 1998. Insulating properties of styrofoam boxes used for transporting live fish. Aquaculture 159: 283-292.

Ghelardini, C., N. Galeotti, L. Di Cesare Mannelli, G. Mazzanti and A. Bartolini. 2001. Local anaesthetic activity of β-caryophyllene. Il Farmaco 56: 387-389.

Gilderhus, P. A. and L. L. Marking. 1987. Comparative efficacy of 16 anesthetic chemicals on rainbow trout. North Am. J. Fish. Manage. 7: 288-292.

Glaser, W. D., K. N Anderson and L. E. Anderson. 1992. The Mosby Medical Encyclopedia. Plume, New York.

Golombieski, J. I., L. V. F. Silva, B. Baldisserotto and J. H. S. da Silva. 2003. Transport of silver catfish (*Rhamdia quelen*) fingerlings at different times, load densities, and temperatures. Aquaculture 216: 95-102.

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

Gomes, L. C., C. A. R. M. Araújo-Lima and R. Roubach. 2003. Effect of fish density during transportation on stress and mortality of juvenile tambaqui *Colossoma macropomum*. J. World Aquac. Soc. 34: 76-84.

Grush, J., D. L. G. Noakes and R. D. Moccia. 2004. The efficacy of clove oil as an anesthetic for the zebrafish, *Danio rerio* (Hamilton). Zebrafish 1: 46-54.

Guenette, S. A., F. C. Uhland, P. Helie, F. Beaudry and P. Vachon. 2007. Pharmacokinetics of eugenol in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). Aquaculture 266: 262-265.

Guo, F.C., L.H. Teo and T.W. Chen. 1995. Effects of anaesthetics on the water parameters in a simulated transport experiment of platyfish, *Xiphophorus maculates* (Gunther). Aquacult. Res. 26: 265-271.

Haddy, J. A. and N. W. Pankhurst. 1999. Stress-induced changes in concentrations of plasma sex steroids in black bream. J. Fish Biol. 55: 1304-1316.

Hajek, G. J., B. Klyszejko and R. Dziaman. 2006. The anaesthetic effect of clove oil on common carp, *Cyprinus carpio* L. Acta Ichthyol. Piscat. 36 (2): 93-97.

Hamáckoá, J., M. A. Sedova, S. V. Pjanova and A. Lepicá. 2001. The effect of 2-phenoxyethanol, clove oil and propiscin anaesthetics on perch (*Perca fluvatilis*) in relation to water temperature. Czech J. Anim. Sci. 46: 469-473.

Hangono, B. 2003. Application of clove oil as anesthetic for sea bass (*Lates calcarifer* Bloch). M. S. Thesis, Kasetsart University.

Hansen, J. D., E. D. Landis and R. B. Phillips. 2005. Discovery of a unique Ig heavy-chain isotype (IgT) in rainbow trout: Implications for a distinctive B cell developmental pathway in teleost fish. Proc. Natl. Acad. Sci. 102: 6919-6924.

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

Harmon, T. S. 2009. Methods for reducing stressors and maintaining water quality associated with live fish transport in tanks: a review of the basics. Rev. Aquaculture 1: 58-66

Hayano M., R. I. Saba, R. I. Dorfman and O. Hechter. 1956. Some aspects of the biogenesis of adrenal hormones. Recent. Prog. Horm. Res. 12: 79-123.

Hikasa, Y., K. Takase, T. Ogasawara and S. Ogasawara. 1986. Anesthesia and recovery with tricaine methanesulfonate, eugenol and thiopental sodium in the carp, *Cyprinus carpio*. Jpn. J. Vet. Sci. 48(2): 341-351.

Holloway, A. C., J. L. Keene, D. G. Noakes and R. D. Moccia. 2004. Effects of clove oil and MS-222 on blood hormone profiles in rainbow trout *Oncorhynchus mykiss*, Walbaum. Aquacult. Res. 35: 1025-1030.

Idler, D. R. and B. Truscott. 1967. 1α-Hydroxycorticosterone: synthesis *in vitro* and properties of an interrenal steroid in the blood of cartilagenous fish (Genus *Raja*). Steroids 9: 457-477.

Inoue, L. A. K. A., C. S. Neto and G. Moraes. 2003. Clove oil as anaesthetic for juveniles of matrinxã *Brycon cephalus* (Gunther, 1869). Ciência Rural, Santa Maria 33: 943-947.

Iversen, M., B. Finstad, R. S. McKinley and R. A. Eliassen. 2003. The efficacy of metomidate, clove oil, Aqui-S and Benzoak as anaesthetics in Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) smolts, and their potential stress-reducing capacity. Aquaculture 221: 549-566.

Iwama, G. K., J. C. McGeer and M. P. Pawluk. 1989. The effects of five fish anaesthetics on acid-base balance, hematocrit, blood gases, cortisol, and adrenaline in rainbow trout. Can. J. Zool. 67: 2065-2073.

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

Iwama, G. K. and P. A. Ackerman. 1994. Anaesthetics, pp. 1-15. *In* Hochachka and Mommsen, eds. Biochemistry and Molecular Biology of Fishes volume 3. Elsevier Science B.V., London.

_____, A. D. Pickering, J. P. Sumpter and C. B. Schreck. 1997. Fish stress and health in aquaculture. Soc. Exp. Biol. Sem. Ser. 62. Cambridge Univ. Press, Cambridge, U.K.

_____, P. T. Thomas, R. B. Forsyth and M. M. Vijayan. 1998. Heat shock protein expression in fish. Rev. Fish Biol. Fish. 8: 35-56.

Jensen, G. L. 1990. Transportation of WarmWater Fish Procedures and Loading Rates. SRAC Publication 392.

Jolly, D. W., L.E. Mawdesley-Thomas and D. Bucke. 1972. Anaesthesia of fish. Vet. Rec. 91 (18), 424-426.

Kaiser, H. and N. Vine. 1998. The effect of 2-phenoxyethanol and transport packing density on the post-transport survival rate and metabolic activity in the goldfish, *Carassius auratus*. Aquarium Sci. Conserv. 2: 1-7.

Kaiser, P., L. Rothwell, S. Avery and S. Balu. 2004. Evolution of the interleukins. Dev. Comp. Immunol. 28: 375-394.

Kakizawa, S., T. Kaneko, S. Hasegawa and T. Hirano. 1995. Effects of feeding, fasting, background adaptation, acute stress, and exhaustive exercise on the plasma somatolactin concentrations in rainbow trout. Gen. Comp. Endocrinol. 98: 137-146.

Keene, J. L., D. L. G. Noakes, R. D. Moccia and C. G. Soto. 1998. The efficacy of clove oil as an anaesthetic for rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum). Aquacult. Res. 29: 89-101.

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

Kildea, M. A., G. L. Allan and R. E. Kearney. 2004. Accumulation and clearance of the anaesthetics clove oil and AQUI-S® from the edible tissue of silver perch (Bidyanus bidyanus). Aquaculture 232: 265-277.

Killen, S. S., C. D. Suski, M. B. Morrissey, p. Dyment, M. Furimsky and L. Tufts. 2003. Physiological Responses of Walleyes to Live-Release Angling Tournaments. N. Am. J. Fish. Manage. 23:1238-1246.

King, M. W. 2005. Lange Q&A USMLE Step 1. 6th ed. Medical Pub. Division, McGraw-Hill, New York.

Kitabchi, A. E. 1967. Ascorbic Acid in steroidgenesis. Nature 215: 1385-1386.

Klein, J. and V. Horejsi. 1997. Immunology. Blackwell Science Inc, Oxford.

Kottelat, M. 2001. Fishes of Laos. WHT Publications Ltd., Colombo 5, Sri Lanka.

Law, W. Y., W. H. Chen, Y. L. Song, S. Dufour and C. F. Chang. 2001. Differential *in vitro* suppressive effects of steroids on leukocyte phagocytosis in two teleosts, tilapia and common carp. Gen. Comp. Endocrinol. 121(2): 163-172.

Lawson, T. B. 1995. Fundamentals of Aquacultural Engineering. Chapman & Hall, New York.

Lee, K. G. and T. Shibamoto. 2001. Antioxidant property of aroma extract isolated from clove buds [*Syzygium aromaticum* (L.) Merr. Et Perry]. Food Chem. 74: 443-448.

Lewis, Jr. W. M. and D. P. Morris. 1986. Toxicity of nitrite to fish: a review. Trans. Am. Fish. Soc. 115: 183-195.

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

Li, T. and M. Brouwer. 2007. Hypoxia-inducible factor, gsHIF, of the grass shrimp *Palaemonetes pugio*: Molecular characterization and response to hypoxia. Comp. Biochem. Physiol. 147(B): 11-19.

Lim, L. C., P. Dhert and P. Sorgeloos. 2003. Recent developments and improvements in ornamental fish packaging systems for air transport. Aquac. Res. 34: 923-935.

Lindzey, J. and K. Korach. 1997. Steroid hormones, pp 49-60. *In* P. Com, ed. Endocrinology: Basic and Clinical Principals. NY Human Press, Totowa.

Jones, S. R. 2001. The occurrence and mechanisms of innate immunity against parasites in fish. Dev. Comp. Immunol. 25: 841-852.

Magnadottir, B. 2006. Innate immunity of fish. Fish Shellfish Immunol. 20: 137-151.

Marking, L. L. and F. P. Meyer. 1985. Are better anesthetics needed in fisheries?. Fisheries 10 (6): 2-5.

Maule, A. G., C. B. Schreck, C. S. Bradford, and B. A. Barton. 1988. Physiological effects of collecting and transporting emigrating juvenile chinook salmon past dams on the Columbia River. Trans. Am. Fish. Soc. 117: 245-261.

Mazeaud, M. M., F. Mazeaud and E. M. Donaldson. 1977. Primary and secondary effects of stress in fish. Trans. Am. Fish. Soc. 106: 201-212.

McFarland, W. N. 1959. A study of the effects of anesthetics on the behavior and physiology of fishes. Publ. Inst. Mar. Sci. Univ. Texas. 6: 337-342.

McFarland, W. N. 1960. The use of anesthetics for the handling and transport of fishes. Calif. Fish Game 46: 407-431.

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

Metcalfe, C. D. 2000. Toxicology, pp 617-630. *In* G. K. Ostrander, ed. The Laboratory Fish. Academic Press, London.

Miller, N. W. and L. W. Clem. 1984. Temperature-mediated processes in teleost immunity: differential effects of temperature on catfish *in vitro* antibody responses to thymus-independent and thymus-dependent antigens. J. Immunol. 133: 2356-2359.

Mommsen, T. P., M. M. Vijayan and T. W. Moon. 1999. Cortisol in teleosts: dynamics, mechanisms of action and metabolic regulation. Rev. Fish Biol. Fish. 9: 211-268.

Munday, P. L. and S. K. Wilson. 1997. Comparative efficacy of clove oil and other chemicals in anaesthetization of *Pomacentrus amboinensis*, a coral reef fish. J. Fish Biol. 51: 931-938.

Mylonas, C. C., T, G. Cardinaletti, I. Sigelaki and A. P. Magni. 2005. Comparative efficacy of clove oil and 2-phenoxyethanol as anesthetics in the aquaculture of European sea bass (*Dicentrarchus labrax*) and gilthead sea bream (*Sparus aurata*) at different temperatures. Aquaculture 246: 467-481.

Nagababu, E. and N. Lakshmaiah. 1992. Inhibitory effect of eugenol on nonenzymatic lipid peroxidation in rat liver mitochondria. Biochem. Pharmacol. 43: 2393-2400.

Nakatani, N. 1994. Antioxidative and antimicrobial constituents of herbs and spices, pp. 251-271. *In* G. Charalambous, ed. Spices, herbs and edible fungi. Elsevier Science B.V., Netherlands.

Nandi, J. 1962. The structure of the interrenal gland in teleost fishes. Univ. Calif. Publ. Zool. 65: 129-212.

Nelson, J. S. 1994. Fishes of the World. 3rd ed. John Wiley and Sons Inc., New York.

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

Ng, H. H. and M. Kottelat. 2007. *Balantiocheilos ambusticauda*, a new and possibly extinct species of cyprinid fish from Indochina (Cypriniformes: Cyprinidae). Zootaxa 1463: 13-20.

Olsen, Y. A., I. E. Einarsdottir and K. J. Nilssen. 1995. Metomidate anesthesia in Atlantic salmon, *Salmo salar*, prevents plasma cortisol increase during stress. Aquaculture 134: 155-168.

Ortuno, J., M. A. Esteban and J. Meseguer. 2001. Effects of short-term crowding stress on the gilthead seabream (*Sparus aurata* L.) innate immune response. Fish Shellfish Immunol. 11: 187-197.

_____, _____ and _____. 2002 a. Lack of effect of combining different stressors on innate immune responses of seabream (*Sparus aurata* L.). Vet. Immunol. Immunopathol. 84: 17-27.

_____, _____ and _____. 2002 b. Effects off four anaesthetics on the innate immune response of gilthead seabream (*Sparus aurata* L.). Fish Shellfish Immunol. 12: 49-59.

_____, _____ and _____. 2002 c. Effects of phenoxyethanol on the innate immune system of gilthead seabream (*Sparus aurata* L.) exposed to crowding stress. Vet. Immunol. Immunopathol. 89: 29-36

_____, _____ and _____. 2003. The effect of dietary intake of vitamins C and E on the stress response of gilthead seabream (*Sparus aurata* L.). Fish Shellfish Immunol. 14: 145-156.

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

Palacios, R. and I. Sugawara. 1982. Hydrocortisone abrogates proliferation of T cells in autologous mixed lymphocyte reaction by rendering the interleukin-2 Producer T cells unresponsive to interleukin-1 and unable to synthesize the T-cell growth factor. Scand. J. Immunol. 15 (1): 25-31.

Palic, D., D. M. Herolt, C. B. Andreasen, B. W. Menzel and J. A. Roth. 2006. Anesthetic efficacy of tricaine methanesulfonate, metomidate and eugenol: Effects on plasma cortisol concentration and neutrophil function in fathead minnows (*Pimephales promelas* Rafinesque, 1820). Aquaculture 254: 675-685.

Pankhurst, N. W. and M. Dedual. 1994. Effects of capture and recovery on plasma levels of cortisol, lactate and gonadal steroids in a natural population of rainbow trout. J. Fish Biol. 45: 1013-1025.

Pardue S. L. and J. P. Thaxton. 1984. Ascorbic acid and physiological stress, *pp.* 25-31. *In* Wegger I, F. J. Tagwarker and J. Moustgarrd, eds. Proceedings of Workshop on Ascorbic Acid in Domestic Animals. The Royal Danish Agriculture Society, Copenhagen, Denmark.

Park, M. O., W. J. Hur, S. Y. Im, D. W. Seol1, J. Lee and I. S. Park. 2008. Anaesthetic efficacy and physiological responses to clove oil-anaesthetized kelp grouper *Epinephelus bruneus*. Aquacult. Res. 39: 877-884.

Paterson, B. D., M. A. Rimmer, G. M. Meikle and G. L. Semmens. 2003. Physiological responses of the Asian sea bass, *Lates calcarifer* to water quality deterioration during simulated live transport: acidosis, red-cell swelling, and levels of ions and ammonia in the plasma . Aquaculture 218: 717-728.

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

Pavlidis, M., L. Angelloti, N. Papandroulakis and P. Divanach. 2003. Evaluation of transportation procedures on water quality parameters and fry performance in red porgy (*Pagrus pagrus*) fry. Aquaculture 218: 187-202.

Perez-Casnova, J. C., L. O. B. Afonso, S. C. Johnson, S. Curroe and A. K. Gamperl. 2008. The stress and metabolic responses of juvenile Atlantic cod *Gadus morhua* L. to an acute thermal challenge. J. Fish Biol. 72: 899-916.

Pickering, A. D. 1981. Introduction: the concept of biological stress, pp. 1-9. *In* A.D. Pickering, ed. Stress and Fish. Academic Press, London.

_____. T. G. Pottinger, J. Carragher and J. P. Sumpter. 1987. The effects of acute and chronic stress on the levels of reproductive hormones in the plasma of mature male brown trout, *Salmo trutta* L. Gen. Comp. Endocrinol. 68:249-259.

_____. 1998. Stress responses of farmed fish, pp. 222-243. *In* , K. D. Black and A. D. Pickering, eds. Biology of Farmed Fish. Sheffield Academic Press, Sheffield.

Pirhonen, J. and C. B. Schreck. 2003. Effects of anesthesia with MS-222, clove oil and CO_2 on feed intake and plasma cortisol in steelhead trout (*Oncorhynchus mykiss*). Aquaculture 220: 507-514.

Piroli, G. G., C. A. Grillo, L. R. Reznikov, S. Adams, B. S. McEwen, M. J. Charron and L. P. Reagan. 2007. Corticosterone impairs insulin-stimulated translocation of GLUT4 in the rat hippocampus. Neuroendocrinology 85 (2): 71-80.

Piper, R. G., I. B. McElwain, L. E. Orme, J. P. McCraren, L. G. Fowler and J. R. Leonard. 1982. Fish Hatchery Management. US Department of the Interior Fish and Wildlife Service, Washington.

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

Posey W. C., H. S. Nelson, B. Branch and D. S. Pearlman. 1978. The effects of acute corticosteroid therapy for asthma on serum immunoglobulin levels. J. Allergy Clin. Immunol. 62 (6): 340-348.

Post, G. 1987. Textbook of Fish Health. TFH Publ. Inc. Ltd., Neptune City, New Jersey.

Pottinger, T. G., P. Prunet, and A. D. Pickering. 1992. The effects of confinement stress on circulating prolactin levels in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) in fresh water. Gen. Comp. Endocrinol. 88:454-460.

Prez-Casanova, J. C., M. L. Rise, B. Dixon, L. O. B. Afonso, J. R. Hall, S. C. Johnson and A.K. Gamperl. 2008. The immune and stress responses of Atlantic cod to long-term increases in water temperature. Fish Shellfish Immunol. 24: 600-609.

Pruthi, J. S. 1980. Spices and Condiments: Chemistry, Microbiology, Technology. Academic Press Inc., New York, USA.

Rainboth, W. J. 1996. Fishes of the Cambodian Mekong. FAO Species Identification Field Guide for Fishery Purposes. FAO, Rome.

Rand-Weaver, M., T. G. Pottinger and J. P. Sumpter. 1993. Plasma somatolactin concentrations in salmonid fish are elevated by stress. J. Endocrinol. 138:509-515.

Randall, D. J. and S. F. Perry. 1992. Catecholamines, pp. 255-300. *In* W. S. Hoar and D. J. Randall, eds. Fish Physiology; *Vol*. 12B. Academic Press, New York.

Reid, S. G., N. J. Bernier and S. F. Perry. 1998. The adrenergic stress response in fish: Control of catecholamine storage and release. Comp. Biochem. Physiol. 120C: 1-27.

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

Roberson, L., P. Thomas and R. Arnoldc. 1988. Plasma cortisol and secondary stress responses of cultured Red Drum (*Sciaenops ocellatus*) to several transportation procedures. Aquaculture 68 115-130.

Ross, L. G. and B. Ross. 1999. Anaesthetic and Sedative Techniques for Aquatic Animals. 2nded. Blackwell Science Ltd., Great Britain.

_____. 2001. Restraint, anaesthesia and euthanasia, pp. 75-83. *In* H. W. Wildgoose, ed. BSAVA Manual of Ornamental Fish, 2nded. British Small Animal Vetinary Association. Gloucester, England.

Roth, J. A. and M. L. Kaeberle. 1981. Isolation of neutrophils and eosinophils from the peripheral blood of cattle and comparison of their functional activities. J. Immunol. Methods 5: 153-164.

Roubach, R., L. C. Gomes, F. A. L. Fonseca and A. L. Val. 2005. Eugenol as an efficacious anaesthetic for tambaqui, *Colossoma macropomum* (Cuvier). Aquacult. Res. 36: 1056-1061.

Sandodden, R., B. Finstad and M. Iversen. 2001. Transport stress in atlantic salmon (*Salmo salar* L.): anaesthesia and recovery. Aquacult. Res. 32: 87-90.

Saydmohammed, M. and A. K. Pal. 2009. Anesthetic effect of eugenol and menthol on handling stress in *Macrobrachium rosenbergii*. Aquaculture 298: 162-167.

Schreck, C. B. 1982. Stress and rearing of salmonids. Aquaculture 28: 241-249.

_____, A. G. Maule and S. L. Kaattari. 1993. Stress and disease resistance, pp. 170-175 *In* R. J. Roberts and J. F. Muir, eds. Recent Advances in Aquaculture. Blackwell, Oxford.

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

Schreck, C. B. 2000. Accumulation and long-term effects of stress in fish, pp. 147-158. *In* G. P. Moberg and J. A. Mench, eds. The Biology of Animal Stress. CABI Publishing, Wallingford, U.K.

Secombes, C. J., J. Zou, K. Laing, G. D. Daniels and C. Cunningham. 1999. Cytokine genes in fish. Aquaculture 172: 93-102.

Selye, H. 1973. The evolution of the stress concept. Am. Sci. 61: 692-699.

_____. 1974. Stress Without Distress. McClelland Stewart, Toronto.

Singh, K. R., V. R. Vartak, A. K. Balange and M. M. Ghughuskar. 2004. Water quality management during transportation of fry of Indian major carps, *Catla catla* (Hamilton), *Labeo rohita* (Hamilton) and *Cirrhinus mrigala* (Hamilton). Aquaculture 235: 297-302.

Siwicki, A. K., M. Morand, K. Kazuñ, N. Keck, E. Gtqbski and J. Mataczewska. 2002. Application of anti-stress products in aquaculture: influence of propiscin on the effectiveness of an anti-*Yersinia ruckeri* vaccine in rainbow trout *Oncorhynchus mykiss* (Wal.). Arch. Pol. Fish. 10: 143-152.

Sladky, K. K., C. R. Swanson, M. K. Stoskopf, M. R. Loomis and G. A. Lewbart. 2001. Comparative efficacy of tricaine methanosulfonate and clove oil for use as anesthetics in red pacu (*Piaractus brachpomus*). Am. J. Vet. Res. 62: 337-342.

Small, B. C. 2003. Anesthetic efficacy of metomidate and comparison of plasma cortisol responses to tricaine methanesulfonate, quinaldine and clove oil anesthetized channel catfish *Ictalurus punctatus*. Aquaculture 218: 177-185.

Smith, G. S. and J. H. Lumsden. 1983. Review of neutrophil adherence, chemotaxis, phagocytosis and killing. Vet. Immunol. Immunopathol. 4: 177-236.

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

Soltani, M., G. H. Marmari and M. R. Mehrabi. 2004. Acute toxicity and anesthetic effects of clove oil in *Penaeus semisulcatus* under various water quality conditions. Aquaculture International 12: 457-466.

Soto, C. G. and Burhanuddin. 1995. Clove oil as a fish anaestethic for measuring length and weight of rabbit fish. Aquaculture 136: 149-152.

Sprague, J. B. 1985. Factors that modify toxicity, pp 124-163. *In* G. M. Rand and S. R. Petrocelli, eds. Fundamentals of Aquatic Toxicology: Methods and Applications. Hemisphere Publishing Corporation, New York.

Steel, R. G. D. and J. H. Torrie. 1986. Principles and Procedures in Statistics. McGraw-Hill, New York.

Stehly, G. R. and W. H. Gingerich. 1999. Evaluation of AQUI-S (efficacy and minimum toxic concentration) as a fish anaesthetic sedative for public aquaculture in the United States. Aquacult. Res. 30: 365-372.

Stoskopf, M. 1993. Anaesthesia, pp. 161- 167. *In* L. Brown, ed. Aquaculture for Veterinarians Fish Husbandry and Medicine. Pergamon Press Ltd., London.

Subasinghe, S. 1997. Live fish-handling and transportation. INFOFISH Int. 2: 39-43.

Summerfelt, R.A. and L.S. Smith. 1990. Anesthesia, surgery and release techniques, pp. 213-272. *In* C.B. Schreck and P.B. Moyle, eds. Methods for Fish Biology. American Fisheries Society, Maryland.

Suresh, A. V. and C. K. Lin. 1992. Tilapia culture in saline waters: a review. Aquaculture 106: 201-226.

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

Swann, L. 1993. Transportation of fish in bags. NCRAC Fact Sheet Series 104: 1-4.

Swanson, C., R. C. Mager, S. I. Doroshov and J. J. Cech, Jr. 1996. Use of salts, anesthetics and polymers to minimize handling and transport mortality in delta smelt. Trans. Am. Fish. Soc. 125: 326-329.

Taylor, P. W. and S. D. Roberts. 1999. Clove oil: an alternative anaesthetic for aquaculture. N. Am. J. Aquacult. 61: 150-155.

Teo, L. H., T. W. Chen and B. H. Lee. 1989. Packaging of the guppy, *Poecilia reticulata*, for air transport in a closed system. Aquaculture 78: 321- 332.

Thomas, P. and L. Roberson. 1991. Plasma cortisol and glucose stress responses of red drum (*Sciaenops ocellatus*) to handling and shallow water stressors and anaesthesia with MS-222, quinaldine sulfate and metomidate. Aquaculture 96: 69-86.

Tort, L., M. Puigcerver, S. Crespo and F. Pedrós. 2002. Cortisol and haematological response in sea bream and trout subjected to the anaesthetics clove oil and 2-phenoxyethanol. Aquacult. Res. 33: 907-910.

Treves-Brown, K. M. 2000. Aquaculture Series 3: Applied Fish Pharmacology. Kluwer Academic Publishers, Netherlands.

Tsantilas, H., A. D. Galatos, F. Athanassopoulou, N. N. Prassinos and K. Kousoulaki. 2006. Efficacy of 2-phenoxyethanol as an anaesthetic for two size classes of white sea bream, *Dilodus sargus* L., and sharp snout sea bream, *Diplodus puntazzo* C. Aquaculture 253: 64-70.

Varner, P. W. 2000. Anesthetics, pp. 33-38. *In* R.R. Stickney, ed. Encyclopedia of Aquaculture. John Wiley and Sons Inc., New York.

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

Vartak, V. and R. K. Singh. 2006. Anesthetic effects of clove oil during handling and transportation of the freshwater prawn, *Macrobrachium rosenbergii* (De Man). Isr. J. Aquac. Bamidgeh 58(1), 46-54.

Velisek, J., Z. Svobodova and V. Piackova. 2005. Effects of clove oil anaesthesia on rainbow trout *(Oncorhynchus mykiss)*. Acta Vet. Brno. 74: 139-146.

Velisek, J., Z. Svobodova, V. Piackova, L. Groch and L. Nepejchalova. 2005. Effects of clove oil anaesthesia on common carp (*Cyprinus carpio* L.). Vet. Med.-Czech 6: 269-275.

Vinatea-Arana, L. 1997. Principios quimicos da qualidade da agua em aquicultura: uma revisao para peixes e camaroes. Editora da EFSC, Florianópolis.

Wagner, E., R. Arndt and B. Hilton. 2002. Physiological stress responses, egg survival and sperm motility for rainbow trout broodstock anesthetized with clove oil, tricaine methanesulfonate or carbon dioxide. Aquaculture 211: 353-366.

Warr, G. W. 1995. The immunoglobulin genes of fish. Dev. Comp. Immunol. 19: 1-12.

Walsh, C. T. and B. C. Pease. 2002. The use of clove oil as anesthetic for the longfinned eel, *Anguilla reinhardtii* (Steindachner). Aquac. Res. 33: 627-635.

Walter, R. H. 1972. β-caryophyllene in native clove bud oil. Phytochem. 11: 405-406.

Waterstrat, P. R. 1999. Introduction and recovery from anesthesia in channel catfish, *Ictalurus punctatus* fingerlings exposed to clove oil. J. W. Aquaculture Soc. 30(2): 250-255.

Weber, R. A., J. B. Peleteiro, L.O. García Martín and M. Aldegunde. 2009. The efficacy of 2-phenoxyethanol, metomidate, clove oil and MS-222 as anaesthetic agents in the Senegalese sole (*Solea senegalensis* Kaup 1858). Aquaculture 288: 147-150.

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

Webster, J. I., L. Tonelli and E. M. Sternberg. 2002. Neuroendocrine regulation of immunity. Annu. Rev. Immunol. 20: 125-163.

Wedemeyer, G. A. 1996. Physiology of Fish in Intensive Culture Systems. Chapman and Hall, New York.

_____. 1997. Effects of rearing conditions on the health and physiological quality of fish in intensive culture, pp. 35-71. *In* G. K. Iwama, A. D. Pickering, J. P. Sumpter and C. B. Schreck, eds. Fish Stress and Health in Aquaculture. Cambridge University Press, Cambridge, UK.

_____, B. A. Barton and D. J. McLeay. 1990. Stress and acclimation , pp. 451-489 *In* C. B. Schreck and P. B. Moyle, eds. Methods for Fish Biology. American Fisheries Society, Bethesda, Maryland.

_____and D. J. McLeay. 1981. Methods for determining the tolerance of fishes to environmental stressors, pp. 247-275. *In* A. D. Pickering, ed. Stress and Fish. Academic Press, New York.

Weiss, E. A. 1997. Essential Oil Crops. University Press Cambridge, London.

Wendelaar Bonga, S. E. 1997. The stress response in fish. Physiol. Rev. 77: 591-625.

Whyte, S. K. 2007. The innate immunity response of finfish-a review of current knowledge. Fish Shellfish Immunol. 23 (6): 1127-1151.

Wikipedia. nd. Eugenol. The Free Encyclopedia. Available source: http://en.wikipedia.org/wiki/Eugenol. June 12, 2009.

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

Winberg, S. and G. E. Nilsson. 1993. Roles of brain monoamine neurotransmitters in agonistic behaviour and stress reactions, with particular reference to fish. Comp. Biochem. Physiol. 106C: 597-614.

Winberg, S., A. Nilsson, P. Hylland, V. Soderstom and G. E. Nilsson. 1997. Serotonin as a regulator of hypothalamic-pituitaryinterrenal activity in teleost fish. Neurosci. Lett. 230:113-116.

Woody, C. A., J. Nelson and K. Ramstad. 2002. Clove oil as an anesthetic for adult sockeye salmon: field trials. J. Fish Biol. 60: 340-347.

Zarkadis, I. K., D. Mastellos and J. D. Lambris. 2001. Phylogenetic aspects of the complement system. Dev. Comp. Immunol. 25: 745-762.

Zhang, Z. and P. Perschbacher. 2003. Comparison of the zeolite sodium chabazite and activated charcoal for ammonia control in sealed containers. Asian Fish. Sci. 16: 141-145.

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ภาคผนวก

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

1. **วิธีวิเคราะห์แอมโมเนีย ด้วยวิธีการ** Koroleff's indophenol blue method

1.1 การเตรียมสารเคมีที่ใช้วิเคราะห์แอมโมเนีย

1.1.1 น้ำกลั่นแบบ Deionized distilled water

1.1.2 Sodium hydroxide 0.5 N

เตรียม NaOH 20 กรัม ละลายในน้ำกลั่นปราศจากแอมโมเนีย 1 ลิตร เก็บในขวดพลาสติกปิดฝา

1.1.3 Magnesium sulfate solution

เตรียม $MgSO_4.7H_2O$ 50 กรัม ละลายในน้ำกลั่นประมาณ 100 มิลลิลิตร เติม 0.5 N NaOHจนกระทั่งเริ่มเกิดตะกอน นำไปใส่ลูกปัดกันเดือดแล้วต้มไล่แอมโมเนีย ต้มจนปริมาณเหลือน้อยกว่า 100มิลลิลิตร ทิ้งให้เย็นแล้วปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นให้เท่ากับ 100 มิลลิลิตร เก็บในขวดแก้วปิดฝา

1.1.4 Phenol reagent

ละลาย Phenol (C_6H_5OH) 38 กรัม และ Disodium nitrorusside dehydrate ($Na_2Fe(CH)_5NO.2H_2O$) 0.4 กรัม ในน้ำกลั่นปราศจากแอมโมเนีย 1,000 มิลลิลิตร ใส่ในขวดแก้วสีชาแล้วเก็บไว้ในตู้เย็น 38

1.1.5 Hypochlorite reagent

สารละลายไฮโปคลอไรด์ หรือ chlorox

1.1.6 Standard ammonia solution

ละลาย NH_4Cl (ที่แห้งสนิทโดยการอบที่อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 90 นาทีแล้วทำให้เย็นใน desiccator) จำนวน 0.3819 กรัม ในน้ำกลั่นปราศจากแอมโมเนียแล้วปรับปริมาตรให้เป็น 1000 มิลลิลิตร เก็บในตู้เย็นโดยใส่ขวดแก้ว สารละลายนี้จะมีความเข้มข้นของ NH_3-N 100 มิลลิกรัมต่อลิตร

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

1.2 การเตรียม Standard curve

นำ Standard ammonia solution (100 มิลลิกรัมต่อลิตร) มาจำนวน 10.00 มิลลิลิตร ใส่ไว้ใน volumetric flask ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นให้เป็น 100 มิลลิลิตร จะได้สารละลายที่มีความเข้มข้น NH_3-N 10 มิลลิกรัมต่อลิตร แล้ว เตรียมสารละลายเพื่อทำ standard curve ตามความเข้มข้นต่อไปนี้ (ใช้ volumetric pipet ในการดูดสาร)

Ammonia-Nitrogen (mg/l)	จำนวน ml ของ 10.00 mg/l NH_3-N ที่ pipet มาแล้วเจือจางด้วยน้ำกลั่นให้เป็น 100 ml
0.00	0.00
0.10	1.00
0.20	2.00
0.30	3.00
0.40	4.00
0.50	5.00

1.3 วิธีการวิเคราะห์แอมโมเนีย

ตวงน้ำตัวอย่าง 50 มิลลิลิตร ใส่ในขวดแก้วที่มีฝาปิด แล้วเติม magnesium sulfate ในอัตราส่วนต่อไปนี้

- 1.0 มิลลิลิตร สำหรับน้ำจืด
- 0.8 มิลลิลิตร สำหรับน้ำที่มีความเค็มระหว่าง 5-15‰
- 0.5 มิลลิลิตร สำหรับน้ำที่มีความเค็มระหว่าง 15-25‰
- น้ำที่มีความเค็มสูงกว่า 25‰ ไม่ต้องเติม magnesium sulfate

หลังจากนั้นเติม Phenol reagent จำนวน 1.5 มิลลิลิตร ตามด้วย Hypochlorite reagent จำนวน 1.5 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันแล้วปิดฝาให้สนิท ทิ้งไว้ 6 ชั่วโมงหรือข้ามคืน แล้วนำเฉพาะส่วนของเหลวใสๆชั้นบนไปวัดค่าการดูดกลืนแสง ด้วยเครื่อง Spectrophotometer ที่ความยาวคลื่น 630 นาโนเมตร

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

2. วิธีวิเคราะห์ไนไตรท์ ด้วยวิธีการ Colorimetric method

2.1 การเตรียมสารเคมีที่ใช้วิเคราะห์ไนไตรท์

2.1.1 น้ำกลั่นแบบ Deionized distilled water

2.1.2 Sulfanilamide reagent

ผสม Conc HCl จำนวน 50 มิลลิลิตร กับน้ำกลั่นจำนวน 300 มิลลิลิตร แล้วเติม Sulfanilamide จำนวน 5 กรัม ผสมให้เข้ากัน แล้วปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นให้เป็น 500 มิลลิลิตร

2.1.3 N-(1-napthyl)-ethylenediamine dihydrochloride solution

ละลาย dihydrochloride 0.5 กรัม ในน้ำกลั่น 500 มิลลิลิตร เก็บสารละลายในขวดสีชาในที่มืด เตรียมสารละลายใหม่ทุกๆเดือน หรือเมื่อสารละลายเปลี่ยนเป็นสีน้ำตาล

2.1.4 Standard nitrite solution

ละลาย $NaNO_3$ (ที่แห้งสนิทโดยการอบที่อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 60 นาที แล้วทำให้เย็นใน desiccator) จำนวน 0.4925 กรัม (น้ำหนักนี้คำนวณจาก $NaNO_2$ ที่มีความบริสุทธิ์ 99% ถ้าเป็นเปอร์เซ็นความบริสุทธิต่างจากนี้ให้คำนวณน้ำหนักใหม่ ตามวิธีที่ระบุใน Standard Method for the Examination of Water and Wastewater ในน้ำกลั่นแล้วปรับปริมาตรให้เป็น 1000 มิลลิลิตร เก็บในขวดสีชาในที่มืด สารละลายนี้จะมีความเข้มข้นของ NO_2^- - N 100 มิลลิกรัมต่อลิตร

2.2 การเตรียม Standard curve

นำ Standard nitrite solution (100 มิลลิกรัมต่อลิตร) มาจำนวน 10 มิลลิลิตร ใส่ไว้ใน volumetric flask ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นให้เป็น 1000 มิลลิลิตร จะได้สารละลายที่มีความเข้มข้นของ NO_2^- - N 100 มิลลิกรัมต่อลิตร แล้วดูดสารละลายเพื่อทำ standard curve ตามความเข้มข้นต่อไปนี้ (ใช้ volumetric pipet ในการดูดสาร)

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

Nitrite -Nitrogen (mg/l)	จำนวน ml ของ 1.00 mg/l NO_2^- - N ที่ pipet มาแล้วเจือจางด้วยน้ำกลั่นให้เป็น 100 ml
0.00	0.00
0.02	2.00
0.04	4.00
0.06	6.00
0.08	8.00
0.10	10.00
0.15	15.00
0.20	20.00

2.3 วิธีการวิเคราะห์ไนไตรท์

กรองน้ำตัวอย่างด้วยกระดาษกรองเบอร์ 3 (8 ไมโครเมตร) ตวงน้ำตัวอย่างมา 50 มิลลิลิตร เติม Sulfanilamide จำนวน 1.0 มิลลิลิตร ผสมทิ้งไว้ 2 นาที แต่ไม่เกิน 8 นาที แล้วเติม N-(1-napthyl)-ethylenediamine dihydrochloride solution จำนวน 1.0 มิลลิลิตร ผสมทิ้งไว้อย่างน้อย 10 นาทีแต่ไม่เกิน 2 ชั่วโมง วัดค่าการดูดกลืนแสงด้วยเครื่อง Spectrophotometer ที่ความยาวคลื่น 543 นาโนเมตร

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ประวัติการศึกษาและการทำงาน

ชื่อ-นามสกุล	นายอุทร เจริญเดช
วัน เดือน ปี ที่เกิด	16 กันยายน 2527
สถานที่เกิด	อำเภอเชียรใหญ่ จังหวัดนครศรีธรรมราช
ประวัติการศึกษา	วท.บ.(เทคโนโลยีการประมง) คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ วิทยาเขตปัตตานี
ตำแหน่งหน้าที่การงานปัจจุบัน	นักวิชาการประมง
สถานที่ทำงานปัจจุบัน	บริษัท ไบโอมิน (ประเทศไทย) จำกัด
ผลงานดีเด่นและรางวัลทางวิชาการ	ประกาศเกียรติคุณ รางวัลงานวิจัยระดับชมเชย อุทร เจริญเดช นนทวิทย์ อารีย์ชน ประพันธ์ศักดิ์ ศีรษะภูมิ และ ดวงดาว ฉันทศาสตร์. ประสิทธิภาพของสารยูจีนอลสังเคราะห์ในการสลบลูกปลานิล (*Oreochromis niloticus* Linn.) การประชุมวิชาการ ครั้งที่ 47 มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์
ทุนการศึกษาที่ได้รับ	สถาบันวิจัยและพัฒนาแห่งมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ สำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์