



ใบรับรองวิทยานิพนธ์
บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ปรัชญาดุษฎีบัณฑิต (เพาะเลี้ยงสัตว์น้ำ)

ปริญญา

เพาะเลี้ยงสัตว์น้ำ

เพาะเลี้ยงสัตว์น้ำ

สาขา

ภาควิชา

เรื่อง ประสิทธิภาพของการใช้ Cortisol และ Heat Shock Protein 70 เป็นตัวบ่งชี้
ความเครียดในปลานิล (*Oreochromis niloticus* Linn.)

Efficiency of Cortisol and Heat Shock Protein 70 as Stress Indicators in
Nile Tilapia (*Oreochromis niloticus* Linn.)

نامผู้วิจัย นายพงศ์เชษฐ์ พิชิตกุล

ได้พิจารณาเห็นชอบโดย

ประธานกรรมการ

(รองศาสตราจารย์ยนต์ มุสิก, Ph.D.)

กรรมการ

(รองศาสตราจารย์ประทีพย์ ตาบทิพย์วรรณ, Doc. 3Cycle)

กรรมการ

(รองศาสตราจารย์วราห์ เทพาคูดี, Ph.D.)

กรรมการ

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์สุริยัน รัชกิจจานุกิจ, Dr. Scient.)

กรรมการ

(อาจารย์ประพันธ์ศักดิ์ ศิริษะภูมิ, Ph.D.)

หัวหน้าภาควิชา

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์พงศ์เชษฐ์ พิชิตกุล, Ph.D. Candidate)

บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์รับรองแล้ว

(รองศาสตราจารย์กัญญา ชีระกุล, D.Agr.)

คณบดีบัณฑิตวิทยาลัย

วันที่ เดือน พ.ศ.

สืบสันทิ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

วิทยานิพนธ์

เรื่อง

ประสิทธิภาพของการใช้ Cortisol และ Heat Shock Protein 70 เป็นตัวบ่งชี้ความเครียดในปลานิล
(*Oreochromis niloticus* Linn.)

Efficiency of Cortisol and Heat Shock Protein 70 as Stress Indicators in Nile Tilapia
(*Oreochromis niloticus* Linn.)

โดย

นายพงศ์เชษฐ์ พิชิตกุล

เสนอ

บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์
เพื่อความสมบูรณ์แห่งปริญญาปรัชญาดุษฎีบัณฑิต (เพาะเลี้ยงสัตว์น้ำ)
พ.ศ. 2557

พงศ์เชษฐ์ พิชิตกุล 2557: ประสิทธิภาพของการใช้ Cortisol และ Heat Shock Protein 70 เป็นตัวบ่งชี้ความเครียดในปลานิล (*Oreochromis niloticus* Linn.) ปริญญาปรัชญาดุษฎีบัณฑิต (เพาะเลี้ยงสัตว์น้ำ) สาขาเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำ ภาควิชาเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำ ปรธานกรรมการที่ปรึกษา: รองศาสตราจารย์ ยนต์ มุสิก, Ph.D. 105 หน้า

การศึกษาประสิทธิภาพของการใช้ระดับความเข้มข้นของฮอร์โมน Cortisol ในเลือด และการแสดงออกของยีน Heat Shock Protein 70 (HSP70) ด้วยเทคนิค Reverse-transcription (RT)-PCR ในเนื้อเยื่อเหงือกของปลานิลในการเป็นดัชนีบ่งบอกความเครียดภายหลังการกระตุ้นด้วยตัวก่อความเครียด 2 ชนิด คือ อุณหภูมิที่ระดับ 22, 27 และ 32 °C และความเค็มที่ระดับ 0, 5 และ 15 ส่วนในพันส่วน พบว่าปริมาณ Cortisol ในเลือดของปลาที่ได้รับอุณหภูมิที่ระดับต่าง ๆ มีการขึ้นลงที่ไม่เป็นรูปแบบที่แน่นอน และไม่สอดคล้องกับระดับอุณหภูมิที่ปลาได้รับ ซึ่งให้ผลตรงกันข้ามกับการแสดงออกของยีน HSP70 ที่พบว่าทำให้อุณหภูมิที่ 22 และ 32 °C มีผลที่ทำให้ HSP70 มีการแสดงออกสูงกว่าปลาในกลุ่มที่ได้รับอุณหภูมิในสภาวะปกติที่ 27 °C ชั่วโมงที่ 3 และ 6 อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.05$) นอกจากนี้ยังพบว่าหลังจากที่ปลาได้รับอุณหภูมิเป็นเวลา 12-168 ชั่วโมง ปลาในกลุ่มที่ได้รับอุณหภูมิ 32 °C เท่านั้นที่มีระดับการแสดงออกของยีน HSP70 สูงกว่าปลาในกลุ่มอื่น ๆ อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.05$) ซึ่งให้ผลคล้ายคลึงกับผลของความเค็มที่พบว่าปริมาณของ Cortisol ในเลือดมีระดับที่ไม่เป็นรูปแบบภายหลังการที่ได้รับ ความเค็ม ขณะที่การแสดงออกของยีน HSP70 จะมีค่าสูงขึ้นอย่างชัดเจนในปลาที่ได้รับ ความเค็มที่ 5 และ 15 ส่วนในพันส่วน ในชั่วโมงที่ 6 และ 12 ตามลำดับ

การศึกษาความสัมพันธ์ของอุณหภูมิและการเกิดโรค Streptococcosis ในปลานิล พบว่าเมื่อปลาได้รับอุณหภูมิที่ 32 °C และเชื้อ *Streptococcus agalactiae* ปลาทดลองจะแสดงอาการของโรคและตายอย่างต่อเนื่องในช่วงสัปดาห์แรก และมีอัตราการตายสูงสุดในวันที่ 21 ของการทดลองเป็น $31.67\pm3.51\%$ ซึ่งแตกต่างกับปลาในกลุ่มที่อยู่ในอุณหภูมิ 22 และ 27 °C อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.05$) โดยมีอัตราการตายเพียง 8.33 ± 1.53 และ $8.33\pm0.58\%$ ตามลำดับเท่านั้น ซึ่งให้ผลสอดคล้องกับระดับ HSP70 มีการแสดงออกมากในช่วงแรกเช่นกันเดียวกัน

การศึกษานี้แสดงให้เห็นว่าการใช้ระดับการแสดงออกของยีน HSP70 ด้วยวิธี RT-PCR สามารถใช้เป็นตัวบ่งชี้การเกิดความเครียดในปลานิลได้อย่างมีประสิทธิภาพ ทั้งในส่วนการตอบสนองต่อความเค็มและอุณหภูมิของน้ำ เนื่องจาก HSP70 นั้นเป็นโมเลกุลที่มีความสำคัญที่ปลาใช้ในการตอบสนองต่อภาวะการเกิดความเครียดต่าง ๆ เพื่อพยายามปรับสภาพร่างกายที่อยู่ในภาวะเครียดให้อยู่ในภาวะที่สมดุลและมีรูปแบบ (pattern) ของการตอบสนองต่อตัวก่อความเครียดที่แน่นอน สามารถนำไปพัฒนาเพื่อหาวิธีการอื่น ๆ เพื่อให้สามารถตรวจวัดการตอบสนองของยีนชนิดนี้ให้มีความแม่นยำ สะดวก และมีประสิทธิภาพมากยิ่งขึ้น

ลายมือชื่อนิติ

ลายมือชื่อประธานกรรมการ

Phongchate Pichitkul 2014: Efficiency of Cortisol and Heat Shock Protein 70 as Stress Indicators in Nile Tilapia (*Oreochromis niloticus* Linn.). Doctor of Philosophy (Aquaculture), Major Field: Aquaculture, Department of Aquaculture. Thesis Advisor: Associate Professor Yont Musig, Ph.D. 105 pages.

Efficiency of cortisol concentration in blood plasma and expression of Heat Shock Protein 70 gene (HSP70) from gill tissue as stress indicators in Nile Tilapia using reverse transcription (RT)-PCR technique. In this study, stressors were temperature at 22, 27 and 32 °C and salinity at 0, 5 and 15 ppt. Results revealed that concentration of cortisol in blood plasma was responding to temperature stressors as irregularly pattern as comparing to ambient temperature. In contrast to relative expression of (HSP70) which indicated that fish rear at temperature of 22 and 32 °C showed significantly higher level of HSP70 than those keeping at control temperature (27 °C) in 3 and 6 hours after being stress induced ($P<0.05$). However, during hours 12-168, significant different of HSP70 levels were observed only in fish treated with 32 °C water. Similar tendency was also found in experimental which salinity was used to test concentration of cortisol was irregularly responded to level of salinity while the level of HSP70 was significantly higher in group of Nile tilapia that stressed with 5 and 15 ppt after 6 and 12 hours exposure respectively.

Study on relationship between temperature and the Streptococcosis disease in Nile tilapia, revealed that in group which was kept at 32 °C with *Streptococcus agalactiae*, fish were obviously infected by bacteria and showed constantly dead. Significantly higher of mortality approximately 36.67% was observed in this group while low mortality rates at 8.33 ± 1.53 % and 8.33 ± 0.58 % were showed in fish which treated in 22 and 27 °C water respectively.

This study showed that the use of expression of heat shock protein HSP70 gene by RT-PCR technique may be an effective stress indicator for Nile tilapia in both salinity and temperature. Since the HSP70 was an important molecule for fish to correspond with various stressors in order to adjust new balance and constantly responding pattern in fish body. Results from this study might be a precious information which can be developed to find the precisely, conveniently and effectively techniques or tools for detecting of expression of HSP70 gene in the future.

Student's signature

Thesis Advisor's signature

กิตติกรรมประกาศ

ข้าพเจ้าขอขอบพระคุณรองศาสตราจารย์ยงค์ มุสิก ประธานกรรมการที่ปรึกษา
รองศาสตราจารย์ประทีป ตาบทิพย์วรรณ รองศาสตราจารย์วราห์ เทพาหุดี ผู้ช่วยศาสตราจารย์
สุริยัน ัญญิกจานุกิจ ดร. ประพันธ์ศักดิ์ ศิริษะภูมิ กรรมการร่วม และผู้ช่วยศาสตราจารย์นิติ ชูเชิด
ผู้แทนบัณฑิตวิทยาลัย เป็นอย่างยิ่ง ที่ให้คำแนะนำ ปรึกษา และตรวจแก้ไขวิทยานิพนธ์จนกระทั่ง
เรียบเรียงเสร็จสมบูรณ์ในครั้งนี้

ขอขอบคุณความช่วยเหลือที่มีให้อย่างล้นเหลือทั้งร่างกายและแรงใจจากพี่ ๆ เพื่อน ๆ น้อง
ๆ และบุคลากรในภาควิชาเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำที่ได้มีส่วนช่วยในการทำวิทยานิพนธ์ครั้งนี้

สุดท้ายนี้ข้าพเจ้าขอกราบขอบพระคุณ คุณปู่ คุณย่า และบิดา ที่ล่วงลับไปแล้ว รวมถึง มารดา
และครอบครัวพิชิตกุลของข้าพเจ้าทุกท่าน ที่คอยให้กำลังใจตลอดมา จนทำให้ข้าพเจ้าประสบความสำเร็จ
ในครั้งนี้

พงศ์เชษฐ์ พิชิตกุล

มีนาคม 2557

สารบัญ

หน้า

สารบัญ	(1)
สารบัญตาราง	(2)
สารบัญภาพ	(4)
คำนำ	1
วัตถุประสงค์	3
การตรวจเอกสาร	4
อุปกรณ์และวิธีการ	24
อุปกรณ์	24
วิธีการ	26
ผลและวิจารณ์	37
ผล	37
วิจารณ์	68
สรุป	86
เอกสารและสิ่งอ้างอิง	88
ประวัติการศึกษาและการทำงาน	105

สารบัญตาราง

ตารางที่	หน้า
1	ไพรเมอร์ที่ใช้ในการศึกษา Reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR) 31
2	ปริมาณ Cortisol (ไมโครกรัมต่อลิตร) ในซีรัมปลานิลที่อยู่ในอุณหภูมิของน้ำที่ต่างกัน 38
3	การแสดงออกของยีน Heat Shock Protein 70 (HSP70) ในเหงือกปลานิลที่อยู่ในอุณหภูมิของน้ำที่ต่างกัน 41
4	ค่าอุณหภูมิของน้ำในตู้เลี้ยงปลานิล 44
5	ออกซิเจนละลายน้ำ (มิลลิกรัมต่อลิตร) ในตู้เลี้ยงปลานิลที่มีสภาวะอุณหภูมิของน้ำที่ต่างกัน 45
6	ความเป็นกรด-ด่างของน้ำในตู้เลี้ยงปลานิลที่มีสภาวะอุณหภูมิของน้ำที่ต่างกัน 47
7	ความนำไฟฟ้าของน้ำ (ไมโครซีเมนส์ต่อเซนติเมตร) ในตู้เลี้ยงปลานิลที่มีสภาวะอุณหภูมิของน้ำที่ต่างกัน 48
8	ความเค็มของน้ำ (ส่วนในพันส่วน) ในตู้เลี้ยงปลานิลที่มีสภาวะอุณหภูมิของน้ำที่ต่างกัน 49
9	การตายสะสมและค่าเฉลี่ยอัตราการตายสะสมของปลานิลที่เครียดจากการเปลี่ยนแปลงอุณหภูมิเป็นเวลา 168 ชั่วโมงภายหลังการได้รับเชื้อ <i>Streptococcus agalactiae</i> 51
10	ปริมาณ Cortisol (ไมโครกรัมต่อลิตร) ในซีรัมปลานิลที่อยู่ในน้ำความเค็มที่ต่างกัน 54
11	การแสดงออกของยีน Heat Shock Protein 70 (HSP70) ในเหงือกปลานิลที่อยู่ในความเค็มของน้ำที่ต่างกัน 58
12	อุณหภูมิของน้ำในตู้เลี้ยงปลานิลที่มีความเค็มของน้ำที่ต่างกัน 61
13	ออกซิเจนละลายน้ำ (มิลลิกรัมต่อลิตร) ในตู้เลี้ยงปลานิลที่มีความเค็มของน้ำที่ต่างกัน 62

สารบัญตาราง (ต่อ)

ตารางที่		หน้า
14	ความเป็นกรดด่างของน้ำในตู้เลี้ยงปลานิลที่มีความเค็มของน้ำที่ต่างกัน	64
15	ความนำไฟฟ้าของน้ำในตู้เลี้ยงปลานิลที่มีความเค็มของน้ำที่ต่างกัน	65
16	ความเค็มของน้ำในตู้เลี้ยงปลานิลที่มีความเค็มของน้ำที่ต่างกัน	67
17	ปริมาณ Cortisol และการแสดงออกของยีน Heat Shock Protein 70 (HSP70) ของปลานิลที่อยู่ในน้ำอุณหภูมิที่ต่างกัน	71
18	ปริมาณ Cortisol และการแสดงออกของยีน Heat Shock Protein 70 (HSP70) ของปลานิลที่อยู่ในน้ำความเค็มที่ต่างกัน	75

สารบัญภาพ

ภาพที่		หน้า
1	โครงสร้างของฮอร์โมน Cortisol	10
2	การควบคุมการหลั่ง Cortisol	11
3	หน้าที่ของ HSP70 ที่เป็น molecular chaperone โดยจะช่วยให้สายโปรตีนที่เพิ่ง สร้างคงสภาพเพื่อให้โปรตีนขดตัวได้อย่างถูกต้อง	15
4	กลไกในการเพิ่มระดับของ Heat Shock Protein ในเซลล์ของคนและแมลงหวี่	16
5	ปริมาณ Cortisol ในซีรัมปลานิลที่อยู่ในอุณหภูมิของน้ำต่างกัน	38
6	การแสดงออกของยีน HSP70 ในเหงือกปลานิลที่อยู่ในอุณหภูมิของน้ำที่ต่างกัน	42
7	ค่าเฉลี่ยอัตราการตายสะสมของปลานิลที่เครียดจากการเปลี่ยนแปลงอุณหภูมิ เป็นเวลา 168 ชั่วโมงภายหลังการได้รับเชื้อ <i>Streptococcus agalactiae</i>	52
8	ปริมาณ Cortisol ในซีรัมปลานิลที่อยู่ในน้ำความเค็มที่ต่างกัน	55
9	การแสดงออกของยีน HSP70 ในเหงือกปลานิลที่อยู่ในความเค็มของน้ำที่ต่างกัน	59

ประสิทธิภาพของการใช้ Cortisol และ Heat Shock Protein 70 เป็นตัวบ่งชี้ ความเครียดในปลานิล (*Oreochromis niloticus* Linn.)

Efficiency of Cortisol and Heat Shock Protein 70 as Stress Indicators in Nile Tilapia (*Oreochromis niloticus* Linn.)

คำนำ

ปลานิล (*Oreochromis niloticus*) เป็นปลาน้ำจืดที่มีถิ่นกำเนิดดั้งเดิมอยู่ในทวีปแอฟริกาที่มีคุณค่าทางเศรษฐกิจของประเทศไทย นับตั้งแต่ปี พ.ศ. 2508 เป็นต้นมา เพราะเลี้ยงง่าย สามารถเลี้ยงได้ในทุกสภาพ โตเร็ว และเนื้อปลามีรสชาติดี ทำให้มีผู้นิยมบริโภคกันอย่างกว้างขวาง จากคุณสมบัติต่าง ๆ เหล่านี้ของปลานิลทำให้มีการเพาะเลี้ยงกันอย่างแพร่หลายในปัจจุบัน (กรมประมง, 2544) ทำให้ในปี พ.ศ. 2550 มีผลผลิตปลานิลที่ผลิตได้จากการเพาะเลี้ยงสูงถึงกว่า 213,800 ตัน (กรมประมง, 2550) และมีการเพิ่มปริมาณผลผลิตมาอย่างต่อเนื่อง

การเพาะเลี้ยงปลานิลในประเทศไทยมีการขยายตัวอย่างรวดเร็ว และมีการพัฒนาระบบการเลี้ยงเป็นเชิงพาณิชย์มากขึ้น ซึ่งในระบบการเลี้ยงปลานิล โดยเฉพาะระบบการเลี้ยงแบบหนาแน่นนั้นทำให้ปลาเกิดความเครียดได้ เพราะสภาพที่มีการเปลี่ยนแปลงอย่างมากในปัจจัยคุณภาพน้ำต่าง ๆ เช่น การเปลี่ยนแปลงอุณหภูมิของน้ำ การเปลี่ยนแปลงความเค็มของน้ำอย่างกะทันหัน ซึ่งสิ่งเหล่านี้ทำให้ปลาเกิดความเครียด และมีผลต่อปลาในทุกระยะของการเจริญเติบโต โดยทำให้ปลาตอบสนองต่อความเครียดในระยะแรกที่แสดงออกโดยการหลั่งฮอร์โมนที่ทำให้เกิดความเครียด (เช่น Cortisol) ออกมาในระบบหมุนเวียนเลือด การตอบสนองต่อความเครียดในระยะที่สองจะประกอบด้วย การเปลี่ยนแปลงอย่างมากในเลือด อวัยวะ และเนื้อเยื่อของสัตว์ (เช่น ปริมาณ Heat Shock Protein ในเหงือกและไตส่วนท้าย) ซึ่งมีผลมาจากฮอร์โมนที่ทำให้เกิดความเครียด และการตอบสนองต่อความเครียดในระยะที่สามจะเกิดการเปลี่ยนแปลงในร่างกายซึ่งเชื่อมโยงกับความเครียด ซึ่งถ้าปลาปรับตัวไม่ได้ต่อความเครียดแล้วจะทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงในร่างกายปลาเกิดขึ้น

ในปัจจุบันการศึกษาความเครียดในปลานิล โดยใช้ตัวบ่งชี้สภาวะความเครียด ทั้ง Cortisol และ Heat Shock Protein 70 ในประเทศไทยยังมีการศึกษากันน้อยมาก ดังนั้นการศึกษากครั้งนี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อหาตัวบ่งชี้สภาวะความเครียดที่เหมาะสมในปลานิล โดยเฉพาะปัจจัยคุณภาพน้ำต่าง ๆ ที่มีความสัมพันธ์กับการเกิดความเครียดในปลานิล คือ การเปลี่ยนแปลงอุณหภูมิของน้ำ และการเปลี่ยนแปลงความเค็มของน้ำ ซึ่งตัวบ่งชี้สภาวะความเครียดในปลาเหล่านี้ มีประโยชน์ในด้านของการนำไปวางแผนประยุกต์ใช้ในการจัดการระบบการเลี้ยงปลานิลที่มีความสำคัญทางเศรษฐกิจของประเทศไทยได้อย่างเหมาะสม เพื่อให้ได้ประโยชน์สูงสุดในการเลี้ยงต่อไป การวิจัยครั้งนี้มุ่งเน้นการศึกษาความเป็นไปได้ของการใช้ Cortisol และ Heat Shock Protein 70 เป็นตัวบ่งชี้ความเครียดในปลานิล เพื่อกำหนดค่าบ่งชี้ความเครียดที่น่าเชื่อถือ และนำไปใช้ในการวิจัยและพัฒนาเทคโนโลยีในการเพาะเลี้ยงปลานิลต่อไป

วัตถุประสงค์

1. เพื่อเปรียบเทียบประสิทธิภาพของการใช้ Cortisol และ Heat Shock Protein 70 เป็นตัวบ่งชี้ความเครียดในปลานิลภายใต้อุณหภูมิและความเค็มของน้ำที่ต่างกัน
2. เพื่อศึกษาผลของภาวะความเครียดที่เกิดจากอุณหภูมิต่อการยอมรับเชื้อ *Streptococcus agalactiae* ของปลานิล

การตรวจเอกสาร

ปลานิล

ปลานิล (*Oreochromis niloticus*) มีชื่อสามัญว่า Nile tilapia เป็นปลาน้ำจืดที่อยู่ในครอบครัวชิลิดี (Cichlidae) ลักษณะโดยทั่วไปเป็นปลาที่มีเกล็ด ริมฝีปากบนและล่างเสมอกัน ที่บริเวณแก้มมีเกล็ด 4 แถว ตามลำตัวมีลายพาดขวางจำนวน 9-10 แถว ครีบหลังมีเพียง 1 ครีบ ประกอบด้วยก้านครีบแข็ง 15-18 อัน และก้านครีบอ่อน 12-147 อัน ครีบกันประกอบด้วยก้านครีบแข็ง 3 อัน และก้านครีบอ่อน 9-10 อัน มีเกล็ดตามแนวเส้นข้างตัว 33 เกล็ด ลำตัวมีสีเขียวปนน้ำตาล ตรงกลางเกล็ดมีสีเข้ม ที่กระดูกแก้มมีจุดสีเข้มอยู่จุดหนึ่ง บริเวณส่วนอ่อนของครีบหลัง ครีบกัน และครีบหางนั้นจะมีจุดสีขาวและสีดำคั่นขวางแลดูคล้ายลายข้าวตอกอยู่โดยทั่วไป ปลานิลเป็นปลาที่มีถิ่นกำเนิดดั้งเดิมอยู่ในทวีปแอฟริกา พบทั่วไปตามหนอง บึง และทะเลสาบในประเทศซูดาน ยูกันดา แทนแกนยีกา โดยที่ปลาชนิดนี้เจริญเติบโตเร็วและเลี้ยงง่าย จึงได้รับความนิยมและเลี้ยงกันแพร่หลายในภาคพื้นเอเชีย รวมถึงประเทศไทย (กรมประมง, 2544) ปลานิลสามารถทนต่อสภาพแวดล้อมที่เป็นน้ำกร่อยได้ เนื่องจากมีความทนทานต่อการเปลี่ยนแปลงของสภาพแวดล้อมได้ดี ทนต่ออุณหภูมิและความเค็มในช่วงกว้าง (Suresh and Lin, 1992)

ความเครียด

ความเครียด หมายถึงการที่สัตว์ตอบสนองต่อสิ่งกระตุ้น (Stimulus) แล้วมีปฏิกิริยาตอบโต้ต่อสิ่งกระตุ้นนั้น จึงทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงสภาวะสมดุลย์ของร่างกาย (Pickering, 1981) ซึ่งสัตว์จะมีการตอบสนองทั้งทางกายภาพ และทางสรีรวิทยาต่อสภาวะการเกิดความเครียด โดยการหลั่งฮอร์โมน Catecholamine และ Corticosteroid ซึ่งจะส่งผลให้เกิดการเปลี่ยนแปลง Metabolic rate ของร่างกาย เช่น ระดับของกลูโคส และกรดไขมันในเลือดสูงขึ้น สมดุลย์แร่ธาตุและเกลือแร่ในร่างกายเปลี่ยนแปลงไป นอกจากนี้ยังมีผลทำให้เกิดการกดระบบภูมิคุ้มกัน (Imunosuppression) ของร่างกาย ซึ่งทำให้สัตว์น้ำอ่อนแอ มีภูมิคุ้มกันต้านโรคร้าย เกิดการติดเชื้อได้ง่ายรวมถึงทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงพฤติกรรมต่าง ๆ อีกด้วย

ความเครียดในปลา

ความเครียดที่เกิดขึ้นในปลากระดุกเจ็งบ่งเกิดจากการเปลี่ยนแปลงของฮอร์โมน Cortisol โดยตรง ภาวะความเครียดมีผลโดยตรงต่อการรอดตาย ระบบภูมิคุ้มกัน การเจริญเติบโต การรักษาสมดุลเกลือแร่ในปลา ตลอดจนการพัฒนาของระบบสืบพันธุ์ โดย Cortisol จะมีผลต่อการเพิ่มระดับกลูโคสเข้าสู่กระแสเลือด เพื่อสลายเป็นพลังงานในการลดภาวะเครียด และมีผลต่อเมตาบอลิซึมของคาร์โบไฮเดรต และจะกระตุ้นให้เกิดกระบวนการ Gluconeogenesis ที่จะเปลี่ยนโปรตีนให้เป็นกลูโคสที่ตับ และยังมีผลต่อการลด การสังเคราะห์โปรตีนในเนื้อเยื่อต่าง ๆ รวมทั้งยังเพิ่มการสลายโปรตีน เพื่อนำไปสลายเป็นพลังงาน นอกจากนี้ Cortisol ยังมีผลต่อเมตาบอลิซึมของไขมัน โดยไปลดการสังเคราะห์ไขมันจากคาร์โบไฮเดรต และทำให้มีการสลายเอกรดไขมันอิสระออกจากกล้ามเนื้อ ทำให้มีกรดไขมันอิสระในเลือดเพิ่มสูงขึ้นและถูกนำไปใช้เป็นพลังงานแทนกลูโคส ซึ่งจะช่วยในการสลายกรดไขมันมาใช้เป็นพลังงานฉุกเฉิน การหลั่งของ Cortisol อาศัยการควบคุมจากระบบประสาท โดยที่ภาวะเครียดต่าง ๆ มีผลต่อศูนย์ประสาทในสมอง กระตุ้นให้หลั่งฮอร์โมน Cortisol และจะส่งผลให้เกิดเมตาบอลิซึมภายในร่างกายเพื่อลดความเครียด

Selye (1950) ได้แบ่งระยะของการเกิดความเครียดออกเป็น 3 ระยะ คือ

1. The alarm reaction เป็นระยะที่ปลารับรู้ถึงความผิดปกติ หรือการเปลี่ยนแปลงที่เกิดขึ้น เช่น การเปลี่ยนแปลงของอุณหภูมิ การได้รับบาดเจ็บ การติดเชื้อ เป็นต้น
2. The stage of resistance เป็นระยะที่ปลาตอบสนองต่อสิ่งแปลกปลอม หรือการเปลี่ยนแปลงที่เกิดขึ้นนั้นในทางการปรับตัวให้เข้าสู่ภาวะปกติ หรือภาวะสมดุล
3. The stage of exhaustion เป็นระยะที่ปลาไม่สามารถที่จะปรับตัวให้เข้าสู่ภาวะปกติได้ มีผลทำให้ปลาอ่อนแอ เนื่องจากการสูญเสียพลังงานอย่างมาก รวมทั้งการสูญเสียสมดุลของอวัยวะในร่างกายอีกด้วย

คุณภาพน้ำบางประการที่มีผลต่อความเครียดของปลา

คุณภาพน้ำมีความสำคัญต่อการดำรงชีวิตของสัตว์น้ำ โดยสัตว์น้ำจะอ่อนแอ เจริญเติบโตช้า และง่ายต่อการเกิดโรค เมื่อมีการเปลี่ยนแปลงคุณภาพน้ำไปจากค่ามาตรฐาน (Meyer, 1979; Moore *et al.*, 1984; Kabata, 1985) ความสัมพันธ์ระหว่างสิ่งมีชีวิตและคุณภาพน้ำมีลักษณะเฉพาะแตกต่างกันไปในแต่ละแหล่ง คุณภาพน้ำที่สำคัญที่มีผลต่อความเครียดของปลามีดังนี้

1. อุณหภูมิ (Temperature)

ปลาเป็นสัตว์เลือดเย็น ซึ่งอุณหภูมิของร่างกายจะอยู่ในระดับเดียวกับอุณหภูมิของน้ำ และเปลี่ยนแปลงไปตามการเปลี่ยนแปลงอุณหภูมิของน้ำ การเพิ่มอุณหภูมิ 10 องศาเซลเซียสจะเพิ่มปฏิกิริยาทางชีวเคมี 2 เท่าโดยประมาณ (Moncrief and Jones, 1977) สัตว์น้ำในเขตร้อนจะมีการเจริญเติบโตลดลงเมื่ออุณหภูมิลดลงต่ำกว่า 26-28 องศาเซลเซียส และอาจจะตายถ้าอุณหภูมิลดลงต่ำกว่า 10-15 องศาเซลเซียส สัตว์น้ำในเขตอบอุ่นเจริญเติบโตได้ดีที่สุดที่ระดับอุณหภูมิ 20-28 องศาเซลเซียส แต่สามารถมีชีวิตอยู่ได้ที่อุณหภูมิใกล้ 0 องศาเซลเซียส สัตว์น้ำในเขตหนาวเจริญเติบโตได้ดีที่อุณหภูมิต่ำกว่า 20 องศาเซลเซียส และอาจตายได้ที่อุณหภูมิสูงกว่า 25 องศาเซลเซียส ปลาที่อ่อนแอเนื่องจากการเปลี่ยนแปลงของอุณหภูมิจะทำให้ Energy change (EC) Plasma glucose cortisol และ Chloride ในตัวปลาเกิดความไม่สมดุลของร่างกาย และมีผลทำให้ปลาตายได้ในที่สุด (Kindle and Whitemore, 1986) พบว่าในปลานิลที่ถูกเลี้ยงอยู่ในสภาวะที่มีอุณหภูมิสูงนาน ๆ (Chronic condition) ปลาจะสามารถติดเชื้อได้ง่ายกว่าปลาที่ถูกเลี้ยงในระดับอุณหภูมิปกติ (Rodkhum *et al.*, 2011)

2. ความเค็ม (Salinity)

ปลาและสัตว์น้ำแต่ละชนิดสามารถอาศัยอยู่ได้ในระดับความเค็มที่แตกต่างกันออกไป สำหรับปลาน้ำจืดทั่ว ๆ ไปแล้วสามารถอยู่ได้ในน้ำที่มีความเค็มสูงถึง 7 ส่วนในพันส่วน เนื่องจากในเลือดปลาจะมีแรงดันออสโมติกเท่ากับแรงดันออสโมติกของไฮเดียมคลอไรด์ คือ 7 ส่วนในพันส่วนเช่นกัน (McKee and Wolf, 1963) แต่มีปลาน้ำจืดหลายชนิดที่สามารถทนทานต่อระดับความเค็มค่อนข้างมากทำให้สามารถเลี้ยงได้ในน้ำจืด น้ำกร่อย หรือน้ำทะเล เช่น ปลาเรนโบว์เทราท์ (*Salmo gairdneri*) ปลาเงา (*Ctenopharyngodon idellus*) ปลาหมอเทศ (*Tilapia mossabica*) (Boy

and Tucker, 1992) แต่อย่างไรก็ตามสัตว์น้ำส่วนมากจะดำรงชีวิตและเจริญเติบโตได้ดีเฉพาะความเค็มจำกัด

การตอบสนองต่อความเครียดของสัตว์น้ำ

Selye (1973) อธิบายทฤษฎีการตอบสนองต่อความเครียดของสิ่งมีชีวิตที่เรียกว่า General Adaptation Syndrome (GAS) โดยแบ่งออกเป็น 3 ขั้นตอน คือ

ขั้นตอนที่ 1 เป็นการตอบสนองโดยการหลั่งฮอร์โมนที่ก่อให้เกิดความเครียด คือ Catecholamine และ Corticosteroid

ขั้นตอนที่ 2 เป็นขั้นตอนการปรับตัว เพื่อต่อต้านความเครียดที่เกิดขึ้น

ขั้นตอนที่ 3 เป็นขั้นสุดท้ายของการปรับตัว ถ้าหากสัตว์น้ำสามารถปรับตัวได้ก็จะกลับคืนสู่สภาพปกติ แต่ถ้าหากปรับตัวไม่ได้อาจทำให้ร่างกายเกิดความผิดปกติ และอาจตายได้ในที่สุด

ส่วน Mazeaud *et al.* (1977) ได้แบ่งขั้นตอนการตอบสนองต่อความเครียดของสัตว์น้ำได้ 3 ขั้นตอน ได้แก่

1. Primary effect เป็นการเปลี่ยนแปลงระดับฮอร์โมนในร่างกาย เมื่อร่างกายได้รับสิ่งกระตุ้นที่ก่อให้เกิดความเครียด ร่างกายจะมีการตอบสนอง โดยการหลั่งฮอร์โมน Catecholamine และ Corticosteroid ในพลาสมา รวมถึงปริมาณของ Adrenaline และ Noradrenaline หลังจากนั้น 2-3 นาที จะเกิดอาการขาดออกซิเจนในเลือด มีอาการกระวนกระวายในปลาปากกลม ปลากระตุก อ่อน และปลากระตุกแข็ง

ระดับของ Adrenaline หรือ Noradrenaline จะขึ้นอยู่กับชนิดของสัตว์น้ำ เช่น ในปลาคาร์พ (*Cyprinus carpio*) จะพบ Noradrenaline สูงสุดเมื่อร่างกายมีบาดแผล และเมื่อปลาถูกย้ายจากน้ำเย็นไปอยู่ในน้ำอุ่น เช่นเดียวกัน หากปลาคาร์พเกิดอาการเครียดจะพบการไหลเวียนของ Corticosteroid ในเลือดสูงขึ้น รวมถึงปลาในกลุ่ม Salmonid และปลาทอง (*Carassius auratus*) ส่วนปลาในกลุ่ม Pacific salmon จะพบ Catecholamine ในเลือด ส่วน Cortisol นั้นนักวิจัยเป็น

จำนวนมากรายงานว่ามีการเพิ่มระดับ Plasma cortisol ชั่วขณะหนึ่งในระหว่างที่เลี้ยงปลาหนาแน่น (Ruane *et al.*, 2002; Barcellos *et al.*, 1999; Tort *et al.*, 1996)

2. Secondary effect เป็นการเปลี่ยนแปลงของสรีระ เพื่อตอบสนองกับปริมาณของฮอร์โมนที่เพิ่มขึ้นในร่างกาย โดยจะมีผลต่อกระบวนการเมตาบอลิซึม (Metabolism) ต่าง ๆ ของร่างกาย เช่น มีการสลายไกลโคเจน (Glycogen) ที่ตับ ทำให้มีระดับกลูโคสในเลือดสูง มีการสลายไขมันในร่างกาย และมีผลต่อระบบสมดุลเกลือแร่ในร่างกาย นอกจากนี้ Corticosteroid ยังมีผลต่อการกดการทำงานของระบบภูมิคุ้มกัน (Immunosuppression) ทำให้ปลาอ่อนแอเกิดการติดเชื้อได้ง่าย

3. Tertiary effect เป็นการเปลี่ยนแปลงของร่างกายที่เป็นผลมาจาก Secondary effect เช่น เกิดการตายของเนื้อเยื่อ หรือร่างกายอ่อนแอจนเกิดการติดเชื้อ โดยที่ Tertiary effect มีความสัมพันธ์กับการเลี้ยงสัตว์น้ำ คือ ทำให้ความต้านทานโรคของสัตว์น้ำลดลง และมีผลต่อระบบภูมิคุ้มกัน เมื่อระดับของ Cortisol ซึ่งเป็นสารที่พบเป็นส่วนใหญ่ของ Corticosteroid เพิ่มขึ้น (Pickering, 1989) การเพิ่มขึ้นของ Cortisol ในระบบหมุนเวียนเลือด มีผลต่อระบบภูมิคุ้มกันของปลากระดุกแฉ่ง โดยจะทำให้จำนวนเม็ดเลือดขาวลดลง (Pickering and Pottinger, 1985) มีผลต่อระบบภูมิคุ้มกันแบบไม่จำเพาะเจาะจง (Non-specific immune response) คือ ยับยั้งกิจกรรม Respiratory burst (Stave and Robertson, 1985) ยับยั้งกระบวนการ Phagocytosis (Ainsworth *et al.*, 1991) ทำให้การเคลื่อนที่ของเม็ดเลือดขาวช้าลง เมื่อมีการฉีด Cortisol เข้าสู่ร่างกาย (MacArthur and Fletcher, 1985)

นอกจากนี้ Cortisol ยังมีผลต่อระบบภูมิคุ้มกันแบบจำเพาะเจาะจง (Specific immune response) คือ มีผลต่อการตอบสนองต่อสิ่งแปลกปลอม โดยการสร้างแอนติบอดีของร่างกายลดลง เมื่อปลาอยู่ในภาวะเกิดความเครียด (Ellsaesser and Clem, 1986) ผลกระทบจากการยับยั้งการทำงานของเม็ดเลือดขาว จะมีผลต่อการให้วัคซีนแก่ปลา โดยปลาที่ให้วัคซีนอย่างเดียวจะมีอัตราการตายน้อยกว่าปลากลุ่มที่ให้วัคซีนและทำให้เกิดความเครียด (Houghton and Matthews, 1986) Strange *et al.* (1977) พบว่าปลา Chinook salmon ที่ถูกกักขังในกระชังขนาดเล็กเป็นเวลา 24 ชั่วโมง จะมีฮอร์โมน Cortisol เพิ่มขึ้น และในปลา Cutthroat trout ที่ถูกย้ายจากอุณหภูมิ 13 องศาเซลเซียส ไปอยู่ที่อุณหภูมิ 26 องศาเซลเซียส อย่างฉับพลันจะทำให้ระดับฮอร์โมน Cortisol เพิ่มขึ้นเช่นกัน Anderson (1990) รายงานว่าปลาที่อยู่ในน้ำที่มีสารฟีนอล (Phenol) จะมีผลทำให้การสร้าง

แอนติบอดีลดลง และอนุพันธ์ของสารเคมีกำจัดแมลงจะมีผลยับยั้งการแบ่งตัวของเม็ดเลือดขาว
 สุรพงษ์ (2548) ศึกษาพบว่าภาวะความเครียดจากการเลี้ยงในที่หนาแน่นและที่อุณหภูมิต่ำ (24
 องศาเซลเซียส) มีผลต่อระบบภูมิคุ้มกันแบบไม่จำเพาะและลักษณะทางจุลกายวิภาคของอวัยวะ
 ปลาอุกค้ำ

การวัดการตอบสนองต่อความเครียดของสัตว์น้ำ

การวัดการตอบสนองต่อความเครียดของสัตว์น้ำนั้นเป็นการวัดการตอบสนองต่อการ
 เปลี่ยนแปลงทางสรีรวิทยาของสัตว์น้ำ สามารถทำได้โดยการ Challenge (Mason, 1975) โดยการ
 เปรียบเทียบการตอบสนองในภาวะปกติต่อสิ่งกระตุ้นหลาย ๆ แบบ ซึ่งสามารถวัดได้จาก

1. การเปลี่ยนแปลงของระดับฮอร์โมนที่ก่อให้เกิดความเครียด ได้แก่ ฮอร์โมน
 Catecholamine และ Corticosteroid ซึ่งสามารถวัดในรูปของฮอร์โมน Cortisol และ Cortisone
 (Donalson, 1981) Adrenalin และ Noradrenalin (Mazeaud and Mazeaud, 1981) นอกจากนี้ยัง
 สามารถวัดปริมาณของฮอร์โมน Adenocorticotrophic (ACTH) ที่หลั่งมาจาก Adenohypophysis ซึ่ง
 เป็นตัวกระตุ้น Hypothalamus ให้หลั่งฮอร์โมนที่ก่อให้เกิดความเครียดออกมา

2. การเปลี่ยนแปลงในทางสรีรวิทยาของสัตว์น้ำ ได้แก่

- การเปลี่ยนแปลงองค์ประกอบทางเคมีของเลือด เช่น ภาวะการเกิด Hyperglycemia,
 Hyperlacticemia, Hypochloremia, Leucopenia และการแข็งตัวของเลือดช้า

- การเปลี่ยนแปลงในระดับของเนื้อเยื่อ เช่น ปริมาณไกลโคเจนในตับลดลง และ
 ปริมาณวิตามินซีในไตลดลง

- การเปลี่ยนแปลงของ Metabolic ต่าง ๆ ในร่างกาย เช่น สมดุลของไนโตรเจน และ
 ความต้องการออกซิเจนเพิ่มขึ้น รวมถึงการเปลี่ยนแปลงปริมาณไอออนในเลือด

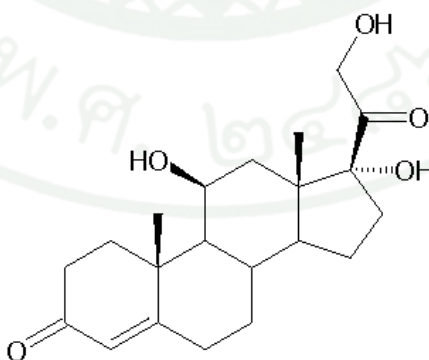
3. การเปลี่ยนแปลงที่เกิดกับพฤติกรรมของสัตว์น้ำ เช่น การเจริญเติบโต การพัฒนารูปร่าง ความสามารถในการสืบพันธุ์ลดลง และความต้านทานโรคลดลง ตลอดจนทำให้อัตราการรอดตายต่ำ

ฮอร์โมน Cortisol กับ การตอบสนองต่อความเครียดของสัตว์น้ำ

Cortisol เป็น Corticosteroid hormone สร้างโดย Adrenal gland (ใน Zona fasciculata ของ Adrenal cortex) เป็น Stress hormone ที่เกี่ยวข้องกับการตอบสนองต่อความเครียด ทำให้ความดันเลือดและปริมาณน้ำตาลในเลือดเพิ่มขึ้น และลดภูมิคุ้มกัน

1. โครงสร้างของ Cortisol

Cortisol มีชื่อทางเคมีว่า 11β , 17, 21 - Tihydroxy - 4 - pregnene - 3, 20 - dione ลักษณะโครงสร้างของฮอร์โมน Cortisol ปรากฏที่ 1 พบว่ามีคาร์บอนทั้งหมด 21 ตัว จัดเป็น Pregnane แต่มีพันธะคู่อยู่ 1 คู่ อยู่ระหว่างคาร์บอนที่ 4 และ 5 จึงเปลี่ยนคำลงท้ายสารตั้งต้นจาก Pregnane เป็น Pegnene พร้อมทั้งระบุตำแหน่งของพันธะคู่เป็น 4 - Pegnene - คำเต็มหน้าเขียนเป็น 11β , 17, 21 - Tihydroxy - เนื่องจากมีกลุ่มไฮดรอกซิล 3 กลุ่ม เข้ามาเกาะที่คาร์บอนตำแหน่งที่ 11, 17 และ 21 โดยที่คาร์บอนตำแหน่งที่ 11 เป็นเส้นทึบ จึงเขียนเป็น 11β คำลงท้ายเขียนเป็น 3, 20 - Dione เนื่องจากมีคีโตน 2 กลุ่ม เข้ามาเกาะที่คาร์บอนตำแหน่งที่ 3 และ 20 (วีรพงษ์, 2546)

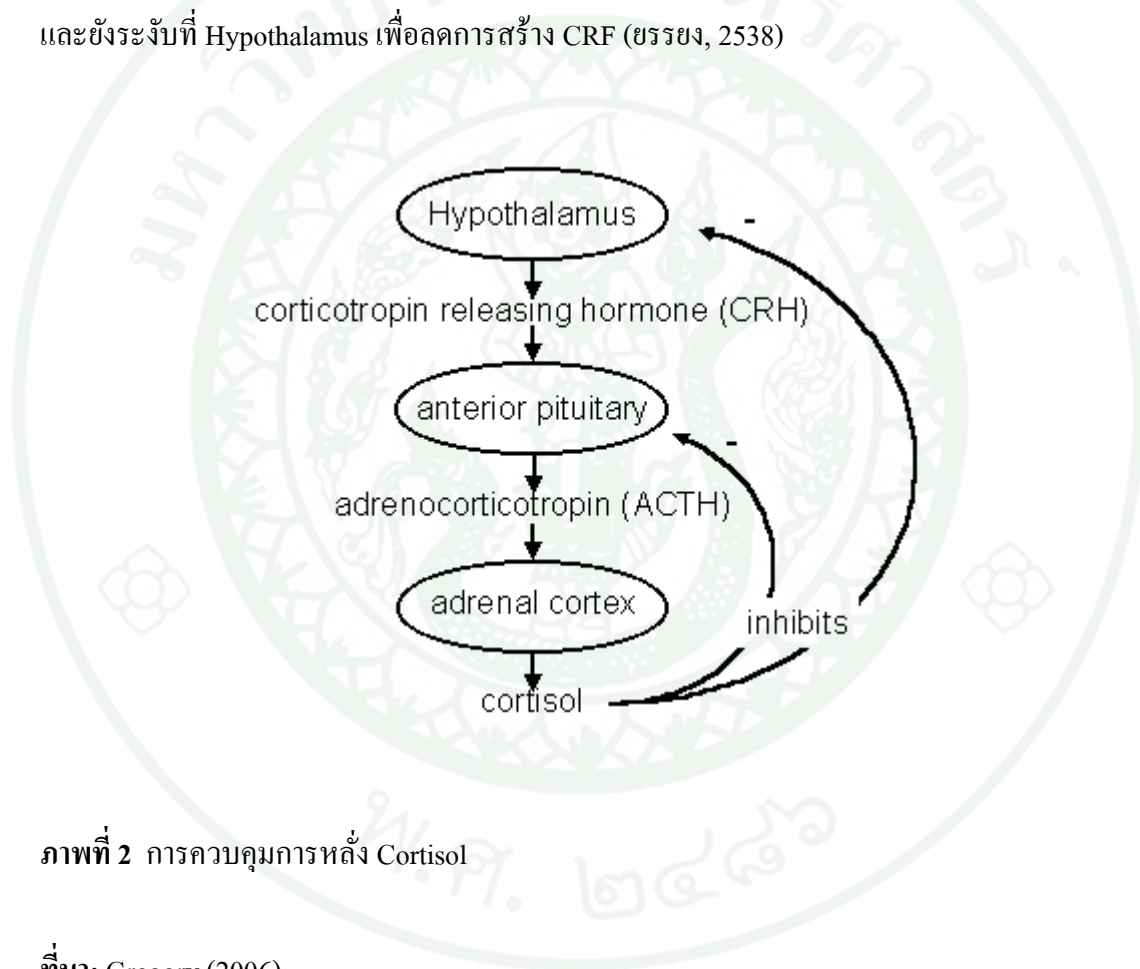


ภาพที่ 1 โครงสร้างของฮอร์โมน Cortisol

ที่มา: Ruckpaul and Rein (1990)

2. การควบคุมการหลั่ง Cortisol

การควบคุมการหลั่ง Cortisol ดังรายละเอียดในภาพที่ 2 จะพบว่าฮอร์โมน ACTH (Adrenocorticotropin) จากต่อมใต้สมองส่วนหน้า (Anterior pituitary gland) จะมีอิทธิพลต่อการสร้าง Cortisol การควบคุมการหลั่ง ACTH จะขึ้นอยู่กับ Corticotrophin releasing factor (CRF) ซึ่งถูกสร้างมาจาก Hypothalamus และลงสู่กระแสเลือดแล้วมีผลต่อการหลั่ง ACTH อีกต่อหนึ่ง Cortisol ที่เพิ่มขึ้นในกระแสเลือดจะมีผลไปยับยั้งที่ต่อมใต้สมองส่วนหน้า เพื่อลดการสร้าง ACTH และยับยั้งที่ Hypothalamus เพื่อลดการสร้าง CRF (ขรรยง, 2538)



ภาพที่ 2 การควบคุมการหลั่ง Cortisol

ที่มา: Gregory (2006)

3. การศึกษา Cortisol กับการตอบสนองต่อความเครียดในปลา

Strange *et al.* (1977) พบว่าปลา Chinook salmon ที่ถูกกักขังในกระชังขนาดเล็กเป็นเวลา 24 ชั่วโมง จะมีฮอร์โมน Cortisol เพิ่มขึ้น และในปลา Cutthroat trout ที่ถูกย้ายจากอุณหภูมิ 13 องศาเซลเซียส ไปอยู่ที่อุณหภูมิ 26 องศาเซลเซียส อย่างเฉียบพลันจะทำให้ระดับฮอร์โมน Cortisol เพิ่มขึ้นเช่นกัน

วิชัยและคณะ (2539) ทำการศึกษาการเปลี่ยนแปลงของฮอร์โมน Cortisol และองค์ประกอบไอออนในพลาสมาระหว่างการลำเลียงปลาพ่อแม่พันธุ์ ซึ่งการลำเลียงเป็นอีกปัจจัยหนึ่งที่ทำให้เกิดความเครียด พบว่าการเปลี่ยนแปลงของ Cortisol และกลูโคสในพลาสมา มีการเปลี่ยนแปลงเพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็วภายในเวลา 15-90 นาที การขนส่งทำให้เกิดภาวะเครียดและเกิดขบวนการ Glycogenolysis โดยไปสลาย Glycogen ในตับมาเป็นกลูโคส เพื่อสลายมาเป็นพลังงานในการลดความเครียดที่เกิดขึ้น และพบว่าการลดลงของ Cortisol และกลูโคสสู่ภาวะปกติใช้เวลา 1-2 วัน

Campbell *et al.* (1994) ศึกษาพบว่า การขังปลา Rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) และ Brown (*Salmo trutta*) ที่อยู่ในช่วงการพัฒนาระบบสืบพันธุ์ระยะสุดท้ายเป็นเวลานานไม่มีผลต่อการสืบพันธุ์ของปลา Trout แต่ทำให้ขนาดของไข่ปลา Rainbow trout ลดลง (*Oncorhynchus mykiss*) และทำให้ลูกปลา Brown และ Rainbow trout ที่ได้จากปลาในกลุ่มทดลองความเครียดมีอัตราการต่ำกว่าลูกปลาที่ได้จากกลุ่มควบคุม หลังขังปลา 2 สัปดาห์วัดระดับ Cortisol, Testosterone, 17β - estradiol และ Vitellogenin ในพลาสมา พบว่าในปลา Trout ระดับ Cortisol เพิ่มขึ้นในทุกกลุ่มทดลอง ขณะที่ระดับ Testosterone ลดลง ความเครียดจากการกักขังไม่มีผลต่อระดับ 17β - estradiol ขณะที่ระดับ Vitellogenin ในปลา Rainbow trout เพศเมียของกลุ่มทดลองลดลง ปลา Rainbow trout เพศเมียที่เลี้ยงในที่กักขังเป็นเวลา 1 และ 3 เดือนให้ไข่ที่เล็กกว่าไข่ปลาในกลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ และอัตราการรอดของลูกปลาที่ได้จากปลา Brown และ Rainbow trout กลุ่มทดลองต่ำกว่ากลุ่มควบคุม ซึ่งบ่งชี้ได้ว่า ความเครียดมีผลต่อคุณภาพเซลล์สืบพันธุ์ของปลา Trout

Iwama *et al.* (1997) ได้รายงานผลการทดลองฉีด Cortisol เข้าไปในปลานิลเพศเมีย พบว่า ทำให้เกิดภาวะเครียดขึ้นอย่างรุนแรง ส่งผลให้ระดับ Testosterone และ Estradiol ใน

พลาสมาลดลงอย่างมีนัยสำคัญเมื่อเทียบกับชุดควบคุม และยังมีผลทำให้ขนาดของไข่และรังไข่ลดลง ผลจากการศึกษาเบื้องต้นในปลาเรนโบว์เทราซ์ (*Oncorhynchus mykiss*) ได้แสดงให้เห็นว่าการตอบสนองของ Cortisol ต่อความเครียด อยู่ในระดับที่คงที่ตลอดเวลา (Pottinger *et al.*, 1992) ยิ่งไปกว่านั้นการเพาะพันธุ์จากพ่อแม่พันธุ์ที่คัดเลือกจากพ่อแม่พันธุ์ที่ตอบสนองต่อระดับ Cortisol สูงและต่ำ มีผลต่อลูกพันธุ์เช่นเดียวกับในพ่อแม่พันธุ์ (Fevolden *et al.*, 1991; Pottinger and Carrick, 1999) ได้ชี้ให้เห็นว่าการตอบสนองต่อ cortisol เป็นการถ่ายทอดไปยังลูกได้ (Pottinger and Carrick, 1999; Tanck *et al.*, 2001; Fevolden *et al.*, 2002)

Cuesta *et al.* (2006) ศึกษาพบว่าในปลา Seabream (*Sparus aurata* L.) ที่ทำให้เครียดอย่างฉับพลัน ระดับ Cortisol และกลูโคสในพลาสมาเพิ่มขึ้น ความเข้มข้นของ Cortisol ในกลุ่มทดลองเพิ่มขึ้นถึง 70-140 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร ในการทดลองฉีด Cortisol 50 มิลลิกรัมต่อน้ำหนักปลา 1 กรัม พบว่าหลังจากฉีดเป็นเวลา 5 วัน ระดับ Cortisol เพิ่มขึ้น 10 เท่า การย้ายปลาไปไว้ในน้ำความเค็มสูง (55 ppt) ทำให้ Cortisol เพิ่มขึ้นการเพิ่มขึ้นของ Cortisol ในพลาสมาหลังจากเกิดความเครียดมีผลต่อการปรับตัวและระบบภูมิคุ้มกัน

Fast *et al.* (2008) ศึกษาผลของความเครียดในช่วงสั้นและยาวต่อระดับ Cortisol และระบบภูมิคุ้มกันในปลา Atlantic salmon (*Salmo salar* Linnaeus) พบว่าในการศึกษาความเครียดระยะสั้นโดยการนำปลาขึ้นจากน้ำ 15 วินาที ระดับ cortisol ในพลาสมาเพิ่มขึ้นหลังจากผ่านไปแล้ว 1 และ 3 ชั่วโมง ระดับของกลูโคสในพลาสมาในชั่วโมงที่ 1, 3 และ 6 สูงกว่ากลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ interleukin - 1b (IL - 1 β) ในชั่วโมงที่ 1 และ 3 ของกลุ่มทดลองสูงกว่ากลุ่มควบคุม ในการศึกษาความเครียดระยะยาวโดยการนำปลาขึ้นจากน้ำวันละ 15 วินาทีเป็นเวลา 4 สัปดาห์ ระดับกลูโคสในพลาสมาของกลุ่มทดลองเพิ่มขึ้นในสัปดาห์ที่ 1 IL - 1 β ในสัปดาห์ที่ 1, 2 และ 3 ในกลุ่มทดลองลดลง Macrophages ของปลาในกลุ่มทดลองแสดงให้เห็นว่าอัตราการอดของปลาลดลง

Lister *et al.* (2008) ศึกษาผลของน้ำที่มีน้ำมันต่อการสืบพันธุ์และความเครียดในปลาทอง *Carassius auratus* พบว่า ระดับของ Testosterone และ 17 β - estradiol ของปลาเพศผู้และเพศเมียในกลุ่มทดลองลดลง และระดับฮอร์โมน Cortisol ในพลาสมาสูงกว่ากลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ

Heat Shock Protein (HSP) กับการตอบสนองต่อความเครียดของสัตว์น้ำ

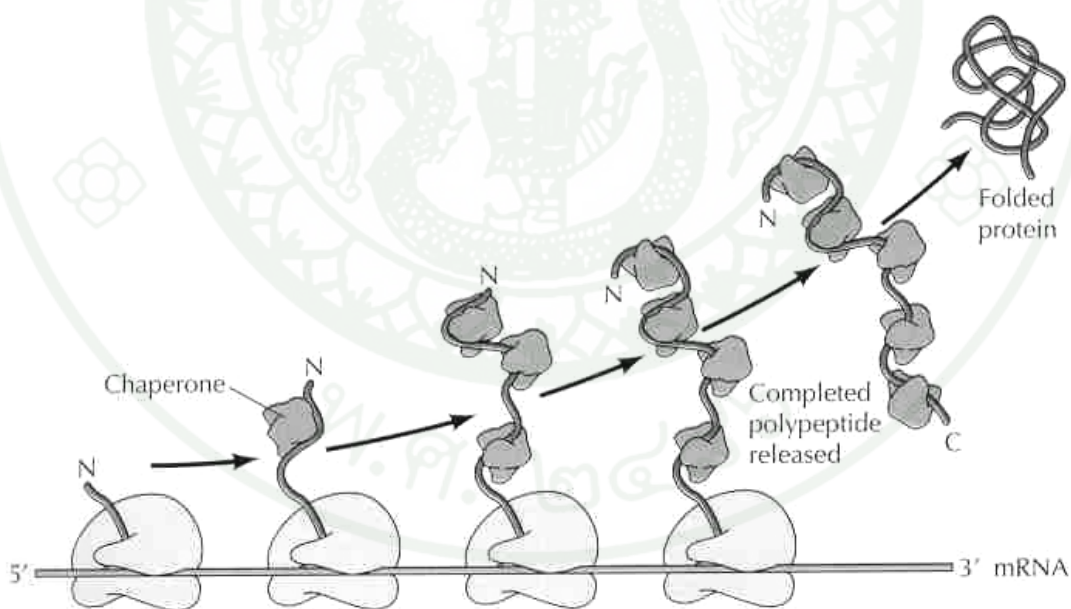
1. Heat Shock Protein (HSP)

Heat Shock Protein (HSP) หรือโปรตีนความเครียด (Stress protein) เป็นโปรตีนในกลุ่ม Chaperone ซึ่งมีลักษณะที่อนุรักษ์สูง (Conserve) พบในสิ่งมีชีวิตทุกชนิด (Basu *et al.*, 2002) หน้าที่หลักของ HSP คือการคงสภาพของโปรตีนภายในเซลล์ให้ทำหน้าที่ได้ตามปกติ ช่วยในการย่อยโปรตีนที่เสื่อมสภาพ และเคลื่อนย้ายโปรตีนไปสู่ส่วนต่าง ๆ ของเซลล์ เพื่อให้ทำงานได้อย่างมีประสิทธิภาพ (Fairfield, 2004) เมื่อสิ่งมีชีวิตเกิดความเครียดจากสิ่งแวดล้อม สารเคมี หรือทางสรีระวิทยา จะมีการตอบสนองต่อความเครียด โดยการทำให้เซลล์สังเคราะห์ HSP ในปริมาณที่มากขึ้น ซึ่งรายงานฉบับแรกของการค้นพบ Heat Shock Protein รายงานโดย Ritossa (1962) พบว่าเซลล์ต่อมน้ำลายของแมลงหวี่ (*Drosophila melanogaster*) เมื่อได้รับอุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 30 นาที และนำกลับมาอุณหภูมิปกติที่ 25 องศาเซลเซียส พบว่ามีการแสดงออกของโปรตีนที่มีมวลโมเลกุล 70 และ 26 กิโลดาลตันเพิ่มมากขึ้นและต่อมาพบในสิ่งมีชีวิตทั้งจุลินทรีย์ พืชและสัตว์ (Taiz and Zeiger, 1998) ซึ่งโปรตีนเหล่านี้ต่อมาได้ถูกเรียกว่า Heat Shock Protein

Heat Shock Protein จะช่วยให้สิ่งมีชีวิตสามารถดำรงชีวิตอยู่ได้ในอุณหภูมิแวดล้อมที่สูงขึ้นจากปกติ (Lindquist and Craig, 1988) สามารถพบได้ทั้งใน prokaryotes และ eukaryotes ซึ่งจะมีโครงสร้างที่อนุรักษ์มาก และจะถูกกระตุ้นให้แสดงออกมากในเซลล์ที่ได้รับความเครียดเนื่องจากความร้อน ซึ่งนอกจากความร้อนแล้ว โลหะหนัก การติดเชื้อเนื่องจากจุลินทรีย์ สารพิษ และฮอร์โมนต่าง ๆ ยังสามารถชักนำให้เกิดการแสดงออกของ Heat Shock Protein ได้อีกด้วย (Kiang and Tsokos, 1998)

ปัจจุบันพบว่า Heat Shock Protein หลายกลุ่มย่อย โดยใช้น้ำหนักโมเลกุลของโปรตีนเป็นเกณฑ์ในการแบ่ง คือ HSP110, HSP100, HSP90, HSP70, HSP60, HSP40, HSP10 และ small HSP families (Vierling, 1991) ในเซลล์ที่ไม่ได้รับความเครียด โปรตีนเหล่านี้จะมีหน้าที่สำคัญในกระบวนการเมตาบอลิซึมต่าง ๆ ในเซลล์ตลอดเวลา โดย HSP90 จะถูกกระตุ้นโดยส่วนประกอบต่าง ๆ ของ cytoskeleton และพวก steroid hormone receptor (Young *et al.*, 2001) HSP70 จะเป็นตัวช่วยให้สายโพลีเปปไทด์ขดตัว (folding) และเป็นตัวกลางในการซ่อมแซมและการย่อยสลายโปรตีนที่เสียหายไปของเซลล์ (Kiang and Tsokos, 1998) ส่วน HSP พวกที่มีมวลโมเลกุลต่ำ ๆ

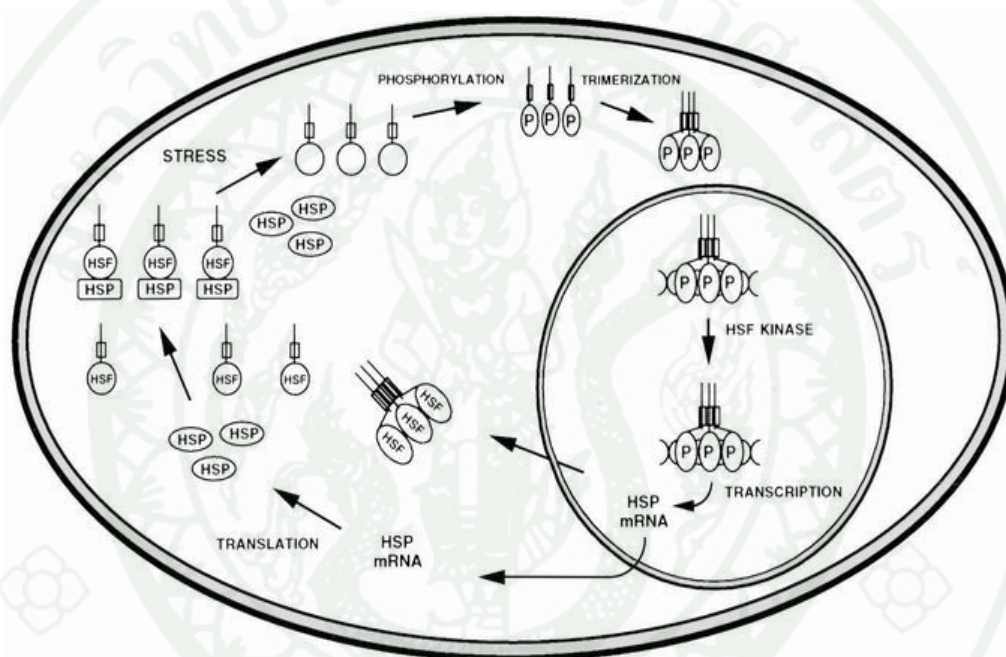
จะมีหน้าที่แตกต่างกันไป ขึ้นอยู่กับชนิดของเซลล์ ซึ่งจะไม่เหมือนกับ Heat Shock Protein ชนิดอื่น ๆ เพราะโปรตีนเหล่านี้ยังไม่ทราบหน้าที่ปกติในเซลล์ที่ไม่ได้รับความเครียด และจะถูกกระตุ้นให้แสดงออกในเฉพาะกรณีเกิดความเครียดขึ้นเท่านั้น (Ciocca *et al.*, 1993) Heat Shock Protein ส่วนใหญ่เกี่ยวข้องกับกระบวนการช่วยม้วนพับสายโพลีเปปไทด์ให้กลายเป็นโมเลกุลโปรตีนที่ถูกต้องและสมบูรณ์ เรียกโปรตีนที่มีหน้าที่นี้ว่า molecular chaperone การทำงานของ molecular chaperone ในการช่วยม้วนพับสายโพลีเปปไทด์ในเซลล์ในสภาวะปกติเกิดขึ้นได้ทั้งกระบวนการ translation (ภาพที่ 3) และกระบวนการเคลื่อนย้ายโมเลกุลโปรตีนผ่าน membrane เข้าสู่ organelle ต่าง ๆ ของเซลล์ นอกจากนี้ molecular chaperone ยังเกี่ยวข้องกับการช่วยม้วนพับโมเลกุลโปรตีนที่เสียดสภาพและคลายตัวเมื่อเซลล์ได้รับภาวะร้อน ซึ่งคาดว่าโปรตีนที่มีการสร้างเพิ่มขึ้นนี้ถูกกระตุ้นด้วยความร้อนมีการตอบสนองแบบชั่วคราว (transient expression) และถึงแม้ว่า Heat Shock Protein ถูกพบว่ามีปริมาณเพิ่มขึ้นเมื่อได้รับการกระตุ้นด้วยความร้อนแต่ก็มีรายงานว่า Heat Shock Protein แต่ละชนิดมีปริมาณเพิ่มขึ้นเมื่อได้รับการกระตุ้นด้วยปัจจัยทางกายภาพอื่น ๆ หรือสารเคมีบางชนิด (Morimoto *et al.*, 1994)



ภาพที่ 3 หน้าที่ของ HSP70 ที่เป็น molecular chaperone โดยจะช่วยให้สายโปรตีนที่เพิ่งสร้างลงสภาพเพื่อให้โปรตีนขดตัวได้อย่างถูกต้อง

ที่มา: Cooper (2000)

ในสภาวะปกติ Heat Shock Protein จะรวมตัวอยู่กับ Heat Shock Factor (HSF) แต่เมื่อเซลล์เกิดสภาวะเครียด หรือเกิด heat shock ขึ้น HSF จะแยกตัวออกจาก Heat Shock Protein แล้ว HSF จะถูกเติมด้วยหมู่ฟอสเฟต (phosphorylation) และรวมตัวกันเป็นไตรเมอร์ (trimer) จากนั้นจะเคลื่อนเข้าสู่นิวเคลียส และจับกับ heat shock element (HSE) ซึ่งเป็นส่วน promotor ของยีน Heat Shock Protein ทำให้เกิดกระบวนการ transcription และ translation เป็น Heat Shock Protein ออกมาทำหน้าที่ต่าง ๆ ภายในเซลล์ตามลำดับ (Kiang and Tsokos, 1998) ดังภาพที่ 4



ภาพที่ 4 กลไกในการเพิ่มระดับของ Heat Shock Protein ในเซลล์ของคนและแมลงหวี่

ที่มา: Kiang and Tsokos (1998)

กลไกในการชักนำให้เกิดการแสดงออกของ Heat Shock Protein ยังไม่ชัดเจนนัก ซึ่งการควบคุมการแสดงออกของ Heat Shock Protein ส่วนใหญ่จะศึกษาในระดับของกระบวนการ transcription (Nover, 1991) การ characterize ยีน Heat Shock Protein และการเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ในส่วน promotor ของยีนจากสิ่งมีชีวิตต่าง ๆ ทำให้สามารถจำแนก HSE ได้ ซึ่งโดยทั่วไปจะมีลำดับนิวคลีโอไทด์ดังนี้ คือ CNGAANNTTCNNG (Bienz and Pelham, 1987) รวมถึงการชักนำให้สร้าง Heat Shock Protein เกิดจากการรวมตัวกันของ HSF กับ HSE ในส่วน upstream ของยีน Heat Shock Protein (Morimoto *et al.*, 1992) ซึ่งโดยปกติทั่วไปยีน Heat Shock

Protein จะไม่มี intron อยู่เลย มีผลทำให้ mRNA ถูก translate ไปเป็นโปรตีนได้อย่างรวดเร็วภายในเวลาไม่กี่นาทีหลังจากเซลล์ได้รับความเครียด (Basu *et al.*, 2002)

2. Heat Shock Protein70 (HSP70)

เมื่อเซลล์ของสิ่งมีชีวิตได้รับอุณหภูมิที่สูงขึ้นเซลล์จะมีการแสดงออกของ HSP70 ชัดเจนมาก ซึ่งโปรตีนชนิดนี้มีโครงสร้างของลำดับนิวคลีโอไทด์อนุรักษ์มาก (Highly conserve) ทำหน้าที่สำคัญในการปกป้องเซลล์โดยจะรวมตัวกับโปรตีนที่สูญเสียสภาพ และจะทำให้โปรตีนเหล่านั้นขดตัวใหม่ (refolding) ให้สามารถกลับไปทำหน้าที่ดั้งเดิมได้ (Morimoto *et al.*, 1994) ปกติในเซลล์ที่ไม่ได้รับความเครียด HSP70 จะทำหน้าที่เป็น molecular chaperone หรือโปรตีนที่ช่วยโปรตีนอื่น ๆ ในการขดตัว โดยจะเข้าไปจับและช่วยให้โปรตีนนั้นคงสภาพ จนทำให้โปรตีนต่าง ๆ มีการขดตัวได้อย่างถูกต้อง (Cooper, 2000) HSP70 เป็น Heat Shock Protein กลุ่มหลักที่จะถูกสร้างเพิ่มขึ้นเมื่อได้รับการกระตุ้นด้วยความร้อนและทำหน้าที่ช่วยในการม้วนพับของสายโพลีเปปไทด์ให้กลายเป็นโมเลกุลโปรตีนที่สมบูรณ์ โดยทำงานร่วมกับ Heat Shock Protein ชนิดอื่น ๆ และโมเลกุลบางชนิด โดยหน้าที่ที่เกี่ยวข้องกับการม้วนพับของสายโพลีเปปไทด์ให้กลายเป็นโมเลกุลโปรตีนที่สมบูรณ์นั้นเกิดขึ้นทั้งในสภาพปกติและสภาพที่เซลล์ได้รับการกระตุ้นด้วยความร้อน Heat Shock Protein ชนิดนี้มีขนาดประมาณ 70 กิโลดาลตัน (kDa) พบได้ทั่วไปทั้งใน cytoplasm matrix ของ mitochondria และ stroma ของ chloroplast โครงสร้างของโมเลกุลแบ่งออกเป็น 2 ส่วนหลักคือ

1. ATPase domain เป็นบริเวณที่อยู่ทางด้าน N-terminal ของโปรตีน มีขนาดประมาณ 40 kDa

2. Peptide binding domain เป็นบริเวณที่อยู่ทางด้าน C-terminal ของโปรตีน มีขนาดประมาณ 25 kDa

ทั้งสองส่วนถูกแบ่งด้วย hinge region ที่เกี่ยวข้องกับ protease cleavage และบริเวณปลายของด้าน C-terminal ที่มีขนาดประมาณ 5 kDa ของ HSP70 หลายชนิดจะทำหน้าที่ร่วมกับ co-chaperone

หน้าที่ของ ATPase domain จะเกี่ยวข้องกับ ATP hydrolysis และ Peptide binding domain ทำหน้าที่ในการจับกับ hydrophobic region ของสายโพลีเปปไทด์ซึ่งยังไม่ได้เกิดการม้วนพับที่สมบูรณ์ โดยการจับกับโมเลกุล ATP จะทำให้เกิดกระบวนการเปลี่ยนแปลงรูปร่างของ ATPase domain และส่งผลทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงรูปร่างของ Peptide binding domain และทำให้สามารถจับกับ hydrophobic region ของสาย โพลีเปปไทด์ได้ (Miernyk and Hayman, 1996)

การศึกษากลไกการควบคุมการทำงานของ HSP70 นั้นได้มาจากการศึกษาการทำงานของ HSP40 ของ *E. coli* ซึ่งทำหน้าที่คล้ายคลึงกับ HSP70 ในสิ่งมีชีวิตชั้นสูง โดยพบว่าการทำงานของ HSP70 จะทำงานเป็นวัฏจักรร่วมกับ HSP40 เรียกว่า “HSP70 cycle” โดยมีกลไกการทำงานดังนี้

1. ATP จับกับ ATPase domain และทำให้เกิดกระบวนการเปลี่ยนแปลงรูปร่างของ ATPase domain และส่งผลทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงรูปร่างของ Peptide binding domain ทำให้สามารถจับกับ hydrophobic region ของสายโพลีเปปไทด์ได้แต่ความสามารถในการจับยังไม่มี (low binding affinity)
2. HSP40 จะทำหน้าที่ในการนำสายโพลีเปปไทด์มายังโมเลกุล HSP70
3. HSP40 จับกับบริเวณ ATPase domain ของ HSP70 และส่งต่อสายโพลีเปปไทด์ไปยัง Peptide binding domain
4. HSP40 ทำหน้าที่กระตุ้นให้บริเวณที่จับกับสายโพลีเปปไทด์ของ Peptide binding domain ทำงานได้ดีขึ้น ซึ่งขั้นตอนนี้เป็นขั้นตอนควบคุม (rate-limiting reaction) ในการจับกับสายโพลีเปปไทด์
5. GrpE ซึ่งเป็นโปรตีนที่ทำหน้าที่จับกับ HSP40 และ ADP จะทำหน้าที่ดึงเอา HSP40 และ ADP ออกจาก HSP70 และเริ่มต้นวัฏจักรใหม่

การทำงานของ HSP70 ยังเกี่ยวข้องกับโปรตีน Hip ที่มีลักษณะเป็น tetratricopeptide repeat protein ซึ่งค้นพบครั้งแรกในพืชตระกูล Arabidopsis (Hohfeld *et al.*, 1995) ซึ่งจะทำหน้าที่

ในการจับกับ ATPase domain ของ HSP70 และทำให้สภาวะที่มีการจับของ ADP บน ATPase domain มีเสถียรภาพ รักษาความสามารถในการจับกับสายโพลีเปปไทด์ของ Peptide binding domain และความสามารถในการม้วนพับสายโพลีเปปไทด์ของ HSP70 นอกจากนี้ยังมีการค้นพบโปรตีน Hop ที่มีลักษณะเป็น tetratricopeptide repeat protein ทำหน้าที่ในการจับ HSP70 และ HSP90 รวมกันเป็นกลุ่มเพื่อทำหน้าที่ในการม้วนพับสายโพลีเปปไทด์ (multi-chaperone complex) และโปรตีน Bag-1 มีหน้าที่เป็น negative regulator โดยจะจับกับบริเวณ ATPase domain เพื่อกระตุ้นการเกิด ATP hydrolysis และเกิดการหลุดออกของ ADP ซึ่งหน้าที่นี้คล้ายคลึงกับการทำงานของ GrpE

ในสภาพปกติ HSP70 มักอยู่รวมกันเป็นกลุ่มซึ่งอาจจับเป็น dimer, trimer หรือ oligomer ซึ่งการอยู่รวมกลุ่มกันนี้จะเป็นลักษณะของ inactive form และเมื่อเข้าสู่ภาวะเครียดก็จะมี การแยกตัวกลับมาเป็นโมเลกุลเดี่ยว เพื่อทำงานอีกครั้ง ซึ่งปัจจัยที่กำหนดการรวมกลุ่มกันของ โมเลกุล HSP70 นี้มีรายงานว่าเกี่ยวข้องกับปริมาณของสายโพลีเปปไทด์ในเซลล์ (Benaroudj *et al.*, 1997)

ยีน HSP70 ของสิ่งมีชีวิตโดยทั่ว ๆ ไปจะไม่มี intron และจะประกอบด้วย HSE 3 copies อยู่ในส่วนของ promoter ซึ่ง HSE จะเป็นที่จับของ HSF ในการกระตุ้นให้มีการแสดงออก ของ HSP70 มากขึ้นเมื่อเกิดสภาวะเครียดต่าง ๆ (Halloran *et al.*, 2000) ในคนจะมียีน HSP70 อยู่ 2 ยีนที่เหมือนกันอยู่ 2 ตำแหน่ง (duplicated locus) ในตำแหน่งใกล้เคียงกับยีน major histocompatibility complex (MHC) ซึ่งจะห่างกัน 12 กิโลเบส (Sugimoto *et al.*, 2003)

การควบคุมการแสดงออกของยีน HSP70 นั้นเกี่ยวข้องกับการอยู่ภายใต้สภาวะการเกิด ความเครียด โดยเฉพาะความร้อน โดยพบว่า HSP70 ส่วนใหญ่จะถูกกระตุ้นให้มีการสร้างเพิ่มขึ้น ภายใน 30 นาที ถึง 4 ชั่วโมง หลังจากเซลล์ได้รับการกระตุ้นด้วยอุณหภูมิ 37 ถึง 45 องศาเซลเซียส (Li *et al.*, 1999) โดยในพืชตระกูล Arabidopsis พบว่า HSP70 อย่างน้อยหนึ่งยีนได้รับการกระตุ้น ให้มีการแสดงออกเพิ่มขึ้นถึง 20 เท่าเมื่อได้รับอุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส อย่างไรก็ตามมีรายงานว่า ยีน HSP70 บางชนิดถูกกระตุ้นให้มีการแสดงออกได้ด้วยที่อุณหภูมิต่ำ (Guy and Li, 1998)

การควบคุมการแสดงออกของยีน HSP70 นั้นเกี่ยวข้องกับการทำงานของ heat shock transcription factors (HSFs) และ heat shock elements (HSEs) ที่มีตำแหน่งอยู่บน promoter โดย

HSF จะทำหน้าที่ในการจับกับ HSE ที่อยู่บน promoter ของยีน HSP หลายชนิดรวมทั้ง HSP70 เพื่อกระตุ้นการแสดงออกของยีน HSP70 (Schoffl *et al.*, 1998) ในสภาพปกติ HSF ที่อยู่ในสภาพ inactive ร่วมกับ HSP70 หรืออาจอยู่เป็นอิสระก็ได้ แต่เมื่อได้รับการกระตุ้นด้วยภาวะร้อนปริมาณ HSP70 (HSP70 pool) จะลดลงเนื่องจากไปทำหน้าที่ในการจับกับโมเลกุลโปรตีนที่คลายตัวเนื่องจากความร้อน HSF ที่อยู่ร่วมกับ HSP70 และแยกตัวออกเป็นอิสระจะไปทำหน้าที่จับกับ HSE และกระตุ้นการแสดงออกของยีน HSP70 และมีการเพิ่มปริมาณ HSP70 ในเซลล์ หากมีปริมาณ HSP70 มากเกินไปในเซลล์ HSP70 ก็จะจับกับ HSF อิสระเพื่อยับยั้งไม่ให้ไปกระตุ้นการแสดงออกของยีน HSP70

การควบคุมการแสดงออกของยีน HSP70 อาจเกี่ยวข้องกับอีกกระบวนการหนึ่งที่เรียกว่า Unfolding protein pathway (UPR) ซึ่งเป็นกระบวนการที่เกี่ยวข้องกับการคลายตัวของโมเลกุลโปรตีนกลายเป็นสายโพลีเปปไทด์เพื่อการเคลื่อนย้ายผ่านเมมเบรนเข้าสู่ organelle ต่าง ๆ pathway นี้ จะกระตุ้นการแสดงออกของยีนกลุ่ม HSP70 เพื่อทำหน้าที่ในการช่วยการคลายตัวและม้วนพับตัวของสายโพลีเปปไทด์ (Sung *et al.*, 2001)

นอกจากนี้ HSP70 ยังทำงานร่วมกับ HSP90 เพื่อช่วยในการตอบสนองของเซลล์ โดยช่วยให้ Glucocorticoid Receptor (GR) สามารถจับกับฮอร์โมน cortisol และช่วยให้ GR ที่ถูกกระตุ้นสามารถเคลื่อนที่จากไซโตพลาสซึมไปยังนิวเคลียส ทำให้เกิดกระบวนการ transcription และ translation เกิดการสร้างโปรตีนที่ใช้ในการตอบสนองต่อความเครียดต่าง ๆ ของเซลล์หรือร่างกาย (Bruner, 1997) ฮอร์โมน cortisol จะจับกับ GR ในไซโตพลาสซึม ซึ่งการเข้ามาจับของฮอร์โมนจะทำให้เกิดการแยกตัวของ HSP70 และ HSP90 ออกจาก GR ซึ่งในภาวะปกติ GR จะรวมตัวกับ HSP70 1 โมเลกุล และ HSP90 2 โมเลกุลเพื่อช่วยคงสภาพโครงสร้างของ GR และทำให้สามารถจับกับฮอร์โมนได้ จากนั้น hormone-receptor complex จะรวมตัวกันเป็น dimer การเปลี่ยนแปลงรูปร่างของ GR ดังกล่าวจะทำให้เกิดการส่งสัญญาณการเคลื่อนย้าย GR-dimer ไปยังนิวเคลียส จากนั้น GR-dimer จะเข้าไปจับกับ promoter sequence ที่จำเพาะของยีนต่าง ๆ หรือ glucocorticoid response element (GRE) มีผลทำให้เกิดการกระตุ้นหรือยับยั้งการแสดงออกของยีนต่าง ๆ ที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการตอบสนองของเซลล์ (Kino *et al.*, 2003)

ภาวะร้อนซึ่งทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงภายในเซลล์ในหลายลักษณะ สิ่งหนึ่งที่เกิดขึ้นคือ การชะลอกระบวนการสร้างโปรตีนทั่วไป และโปรตีนที่มีอยู่ในเซลล์ตลอดจนสายโพลีเปป

โพลีเปปไทด์ที่อยู่ในระหว่างการพับตัวเกิดความผิดปกติซึ่งนำไปสู่การม้วนพับกลายเป็นโมเลกุลที่ผิดปกติหรือเกิดการเกาะกลุ่มกันเป็นก้อน ในสภาวะเครียดเช่นนี้ มีรายงานว่า Heat Shock Protein โดยเฉพาะ HSP70 จะถูกกระตุ้นให้มีการสร้างเพิ่มมากขึ้นเพื่อช่วยในกระบวนการรักษาโมเลกุลโปรตีนให้เกิดการม้วนพับตัวที่ถูกต้องและป้องกันการเกาะกลุ่มกันของโปรตีน

องค์ประกอบของสายโพลีเปปไทด์ในเซลล์ของพืชตระกูล Arabidopsis ที่ได้รับภาวะร้อน พบว่า มีสายโพลีเปปไทด์อย่างน้อย 12 ชนิดที่อยู่ในกลุ่ม HSP70 เพิ่มขึ้น (Wu *et al.*, 1988) สอดคล้องกับการศึกษาการแสดงออกของยีนที่พบว่ามียีน mRNA ที่เกี่ยวข้องกับ Heat Shock Protein กลุ่ม HSP70 เพิ่มขึ้น มีการศึกษารูปแบบการแสดงออกของยีน HSP70 ในพืชตระกูล Arabidopsis โดยวิธี reverse transcription พบว่ายีน HSP70 อย่างน้อย 11 ยีน ถูกกระตุ้นให้มีการแสดงออกเพิ่มขึ้น 2 ถึง 20 เท่าเมื่อได้รับภาวะร้อนที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส ซึ่งยีนกลุ่มนี้เป็นยีนที่เกี่ยวข้องกับ HSP70 ที่ทำงานทั้งใน cytosol, endoplasmic reticulum, mitochondrial matrix และ plastid stroma (Sung *et al.*, 2001)

3. การศึกษา HSP กับการตอบสนองต่อความเครียดในปลา

Forreiter and Nover (1998) พบว่า Heat Shock Protein นั้นมีอยู่ 3 กลุ่มใหญ่ คือ HSP90, HSP70 และ HSP ที่มีน้ำหนักโมเลกุลต่ำ (Low-molecular-mass HSPs) โดย HSP70 มีบทบาทสำคัญในการซ่อมสร้างหรือทำลายโปรตีนที่ชำรุดหรือเสียสภาพไป โดย Molina *et al.* (2000) กล่าวว่า HSP70 มีบทบาทสำคัญในขบวนการเมตาโบลิซึมของโปรตีนทั้งในสภาพปกติและภายใต้สภาวะความเครียด

Srivastava (2002) ได้ศึกษาพบว่า HSP เป็นโปรตีนที่สร้างขึ้นภายในเซลล์ ซึ่งมีบทบาทในการทำหน้าที่ เหนี่ยวนำการตอบสนองต่อสภาวะความเครียดที่เกิดจากปัจจัยทางกายภาพ เช่น สภาวะอุณหภูมิที่เพิ่มสูงขึ้น สภาวะออกซิเจนละลายที่ลดต่ำลง การได้รับไอออนของโลหะหนัก เช่นเดียวกันกับความเครียดที่เกิดจากปัจจัยทางชีวภาพ เช่น การได้รับการติดเชื้อแบคทีเรียเข้าไปในร่างกาย รวมทั้งมีบทบาทที่สำคัญในเซลล์ ทั้งการควบคุม การสร้างและการสลายโปรตีนหลายชนิด

Basu *et al.* (2002) ทำการศึกษา ยีนและบทบาทหน้าที่ที่สำคัญของ HSP ในปลา พบว่า ปัจจัยทางกายภาพ และชีวภาพมีผลต่อความเครียดของปลา และการทำงานของ HSP ภายในเซลล์

โดยปัจจัยทางกายภาพ ได้แก่ สภาวะอุณหภูมิของน้ำที่เปลี่ยนแปลงอย่างฉับพลัน สภาวะของความเค็มของน้ำที่เปลี่ยนไป สภาวะการปนเปื้อนของโลหะหนักในแหล่งน้ำ การปนเปื้อนมลสารทางน้ำจากโรงงานอุตสาหกรรม ยาปราบศัตรูพืช และสารกลุ่มอโรมาติกไฮโดรคาร์บอน เป็นต้น (Sender, 1993; Iwama *et al.*, 1998) ส่วนปัจจัยทางชีวภาพ ได้แก่ การเผชิญหน้ากับศัตรูผู้ล่าอาหารในธรรมชาติ และการได้รับเชื้อโรคแบคทีเรีย และไวรัสที่อยู่ในสภาพแวดล้อมเข้าสู่ร่างกายของปลา (Young, 1990) ผลการทดลองในปลาพบว่า มีผลทำให้ HSP70 ที่เพิ่มปริมาณขึ้นในเซลล์ตับและไตเป็นสัญญาณบ่งบอกถึงสภาวะการติดเชื้อโรค และพบว่ามีความสัมพันธ์กันระหว่าง HSP กับการติดเชื้อของปลา (Ackerman and Iwama, 2001)

การศึกษา Heat Shock Protein ในปลา เป็นการศึกษาระดับโปรตีน ลำดับเบส และระดับความเครียดที่มีความสัมพันธ์กับ mRNA (Basu *et al.*, 2002) การโคลนยีน HSP70 ในปลานิล (*Oreochromis mossambicus*) (Molina *et al.*, 2000) การแสดงออกของยีน HSP70 และกลไกการตอบสนองต่อความเครียดของ HSF1 ใน mRNA ในปลาหมอสี (Rabergh *et al.*, 2000) โดยมียีน β -actin เป็นยีนควบคุมในการทดลอง ซึ่งเป็นยีน House keeping gene ที่มีอยู่ในสิ่งมีชีวิตทุกชนิด

Iwama *et al.* (2004) กล่าวว่าในปัจจุบันนั้นมีการใช้ HSP เป็นตัวบ่งบอกถึงความเครียดที่เกิดจากสิ่งกระตุ้นในปลาเริ่มมีการใช้กันมากขึ้นเพราะมีความเหมาะสมในการใช้วัดความเครียดของปลา โดยการศึกษาความสัมพันธ์ของคอร์ติซอลและ HSP ในปลานั้น Deane *et al.* (1999) พบว่าการฉีดคอร์ติซอลเข้าไปในปลา Silver sea bream ทุกวันไม่ได้ทำให้ระดับ HSP70 เปลี่ยนแปลงแต่อย่างใด ในขณะที่ Vijayan *et al.* (2000) พบว่าที่ระดับความเข้มข้นของคอร์ติซอล 1,000 ng/ml จะไปหยุดยั้งการเพิ่มของ HSP70 และ HSP 90 ในเซลล์ตับของปลาเรนโบว์เทราท์ ซึ่ง Basu *et al.* (2001) กล่าวว่าข้อมูลที่มีอยู่ในปัจจุบันส่วนใหญ่เป็นข้อมูลของปลากลุ่มแซลมอน และ มีข้อมูลเกี่ยวกับเรื่องนี้ของปลาในเขตร้อนน้อยมาก สมควรมีการศึกษาเพิ่มเติมต่อไป

Jana *et al.* (2010) ทำการศึกษาเรื่อง HSP ในการกระตุ้นภูมิคุ้มกันโรคในสัตว์น้ำ ซึ่งวิธีการดังกล่าวน่าจะจะสามารถจะนำมาใช้ในการป้องกันโรคในสัตว์น้ำได้ โดยทำการศึกษาบทบาทของ HSP ในการป้องกันโรคในปลาน้ำจืด ในปลา Platyfish (*Xiphophorus maculatus*) ที่ได้รับเชื้อ *Yersinia ruckeri* โดยดูอัตราการรอดตาย พบว่าทำการเปรียบเทียบอัตราการรอดตายของชุดการทดลองแรกเป็นปลาที่ได้รับเชื้อ และได้รับ GroEL ร่วมกับ DnaK bacterial HSPs และชุดการทดลองหลังเป็นปลาที่ทำการทดลองซึ่งได้รับเชื้อ และได้รับ Nonlethal heatshock protein ร่วมกับ

Bacterial HSPs ผลการศึกษาพบว่าปลาที่ได้รับ GroEL ร่วมกับ DnaK bacterial HSPs มีอัตราการรอดที่สูงกว่าอีกชุดการทดลองอย่างมีนัยสำคัญ ดังนั้นจึงมีความเป็นไปได้ในการนำ HSP มาใช้ในการป้องกันโรคสัตว์น้ำ ด้วยวิธีการที่ HSP จะไปเหนี่ยวนำภูมิคุ้มกันโรคในสัตว์น้ำให้เพิ่มสูงขึ้น

Prasell and Lindquist (1993) ทำการศึกษาพบว่า HSP 90, HSP 60 และ HSP (MW<40DKa) มีบทบาทในการทำให้เซลล์ในหีองทดลองสามารถต้านทานสภาวะที่อุณหภูมิเปลี่ยนแปลงไปอย่างเฉียบพลัน (Thermal shock) และ Sarah *et al.* (1998) ได้ศึกษาผลของ HSP70 ในปลาแอตแลนติกแซลมอน (*Salmo salar*) โดยพบว่าปลาแซลมอนที่ได้รับสภาวะการเพิ่มอุณหภูมิน้ำที่ 26 เซลเซียสเป็นระยะเวลา 15 นาที (Heat shock) มีการสร้าง HSP70 และมีอัตราการรอดที่สูงกว่าชุดควบคุม โดยสามารถปรับตัวอยู่รอดจากสภาวะน้ำที่มีความเค็มสูง 45 ส่วนในพันส่วนได้ แสดงให้เห็นว่า HSP มีบทบาทเกี่ยวข้องในการปรับตัวอยู่ในสภาวะความเค็มน้ำที่เปลี่ยนแปลงไป (Osmotic shock) และมีความเป็นไปได้ในการนำ HSP ไปใช้ในการป้องกันสภาวะความเครียดของสัตว์น้ำจากการเปลี่ยนแปลงความเค็มของน้ำ

Hightower *et al.* (1999) ทำการศึกษายาทบาทของ HSP กับอุณหภูมิในสภาวะแวดล้อมตามธรรมชาติ ในปลาที่อาศัยในแหล่งน้ำบริเวณพื้นที่เขตร้อน 2 ชนิด และปลาที่อาศัยในแหล่งน้ำบริเวณพื้นที่เขตทะเลทราย 6 ชนิด พบความสัมพันธ์ระหว่าง HSP70 ในเซลล์ปลาเขตร้อน (สภาวะอุณหภูมิปกติเท่ากับ 32 องศาเซลเซียส) และ พบความสัมพันธ์ระหว่าง HSP30 ในเซลล์ปลาเขตทะเลทราย (สภาวะอุณหภูมิปกติเท่ากับ 37 องศาเซลเซียส) และสรุปว่าระดับ HSP ในเซลล์ของปลาที่อาศัยอยู่ตามเขตภูมิอากาศต่าง ๆ มีความผันแปรขึ้นลงไปตามอุณหภูมิของสภาพแวดล้อมตามฤดูกาล

Dong *et al.* (2009) ทำการศึกษาระดับ HSP ในเซลล์ตับของปลาสเตอร์เจียนวัยอ่อน (*Acipenser transmontanus*) ที่ให้อาหารในอัตราที่ต่างกัน โดยทำการเปลี่ยนแปลงอุณหภูมิจาก 18 ไปที่ 26 องศาเซลเซียส (Heat shock) โดยปรับเพิ่ม 1 องศาเซลเซียสในทุก 15 นาที และเริ่มทำการให้อาหารในอัตรา ร้อยละ 5, 15 และ 25 ของน้ำหนักตัว พบว่าปลาที่ผ่านการปรับอุณหภูมิ มีระดับ HSP 60 และ HSP70 ที่สูงกว่า โดยที่ HSP70 มีในสัดส่วนที่มากกว่า HSP 60 และปลาที่ได้รับอาหารร้อยละ 25 ของน้ำหนักตัว มีระดับ HSP มากกว่าปลาที่ได้รับอาหารร้อยละ 55 และ 15 ของน้ำหนักตัวตามลำดับ โดยการปรับอุณหภูมิมีผลต่อการเพิ่มขึ้น HSP60 และ HSP70 อย่างมีนัยสำคัญ

อุปกรณ์และวิธีการ

อุปกรณ์

1. ปลานิล ขนาดประมาณ 10-15 เซนติเมตร จำนวน 1,000 ตัว
2. ตู้กระจก ขนาดความจุน้ำ 100 ลิตร จำนวน 20 ใบ
3. ถังไฟเบอร์กลาส ขนาด 1,000 ลิตร จำนวน 2 ใบ
4. ชุดทดสอบฮอร์โมนสำเร็จรูปของบริษัท Adaltis Italia S.P.A และเครื่องวัดปริมาณรังสีแกมมา (Gamma counter)
5. เครื่องมือ อุปกรณ์ สำหรับวิเคราะห์คุณภาพน้ำ
 - 5.1 เครื่องวัดออกซิเจนละลายน้ำ YSI Model 200
 - 5.2 เครื่องวัดความเป็นกรด-ด่าง (pH) ความนำไฟฟ้า และความเค็ม รุ่น YSI Model 63
6. เครื่องมือ อุปกรณ์ สำหรับงานอนุชีวโมเลกุล
 - 6.1 Chloroform; CHCl_3 (Merck)
 - 6.2 Diethyl pyrocarbonate (DEPC); $\text{C}_6\text{H}_{10}\text{O}_5$ (Sigma)
 - 6.3 Ethidium bromide; EtBr (Sigma)
 - 6.4 Ethylene diamine tetraacetic acid (EDTA), disodium salt dehydrate (Fluka)
 - 6.5 GeneRuler™ 100 bp DNA Ladder Plus 0.05 mg (Ward Medic)
 - 6.6 Isopropanol (Merck)
 - 6.7 Trizol reagent (Molecular Research Center)
 - 6.8 Absolute ethanol; $\text{C}_2\text{H}_5\text{OH}$ (Merck)
 - 6.9 Agarose (Conda)
 - 6.10 Thermal cycler machine (Takara, Japan)
 - 6.11 First strand cDNA Synthesis kit (Fermentas, USA)

7. อุปกรณ์อื่น ๆ

- 7.1 กระบอกฉีดยาขนาด 1 และ 3 มิลลิลิตร
- 7.2 เข็มฉีดยาขนาด 24Gx1.5 นิ้ว
- 7.3 Autoclave (Hirayama)
- 7.4 Centrifuge DYNAC II (Centrifuge Clay Adams)
- 7.5 Automatic micropipette ขนาด 20, 200 และ 1000 ไมโครลิตร (Bio-Rad)
- 7.6 Cylinder ขนาด 100, 500 และ 1000 มิลลิลิตร
- 7.7 Electrophoresis machine, MyRun (Bioactive)
- 7.8 Erlenmeyer flask ขนาด 125, 250 และ 1,000 มิลลิลิตร
- 7.9 Microcentrifuge tube ขนาด 1.5 มิลลิลิตร
- 7.10 Gel documentation (Syngene)
- 7.11 Hot air oven (Mettler)
- 7.12 Microwave oven (Sanyo Electric)
- 7.13 Microcentrifuge MIKRO 200R (Herrich)
- 7.14 Minicentrifuge (Profuge 6K, Korea)
- 7.15 Pipette tips ขนาด 20, 200 และ 1,000 ไมโครลิตร (Costar)
- 7.16 PCR tube ขนาด 0.2 มิลลิลิตร (Costar)
- 7.17 Spectrophotometer, Spectronic 401 (Milton Roy)
- 7.18 Spectrophotometer, Spectronic 2000 (Bausch&Lomb)
- 7.19 Vortex-2 Genie (Scientific Industries, USA)
- 7.20 100 mM dNTP (Ward Medic)

วิธีการ

1. การศึกษาผลของอุณหภูมิต่อปริมาณ Cortisol และการแสดงออกของยีน Heat Shock Protein 70 (HSP70)

1.1 การเตรียมสัตว์ทดลอง

นำปลานิลขนาด 10-15 เซนติเมตร สายพันธุ์จิตรลดาที่ได้มาจากสถาบันวิจัยและพัฒนาพันธุ์กรรมสัตว์น้ำ กรมประมง จำนวน 500 ตัว มาเลี้ยงในถังไฟเบอร์กลาสขนาด 1,000 ลิตร มาเลี้ยงในห้องทดลอง เพื่อปรับตัวเป็นเวลา 1 เดือน ให้อาหารวันละ 2 ครั้ง โดยทำการทดลองในเดือนธันวาคม 2551

1.2 การวางแผนการทดลอง

วางแผนการทดลองแบบสุ่มตลอด (Completely Randomized Design; CRD) เพื่อศึกษาผลของอุณหภูมิต่อปริมาณ Cortisol และ Heat Shock Protein ที่อุณหภูมิแตกต่างกัน 3 ระดับ คือ 22, 27 และ 32 องศาเซลเซียส ตามลำดับ (Treatment) ภายใต้สภาวะการจัดการระบบน้ำที่เหมือนกัน แต่ละชุดการทดลองประกอบด้วย 3 ซ้ำ (Replication)

1.3 การเตรียมระบบการทดลอง

ใช้ตู้กระจก ขนาด 100 ลิตร จำนวน 9 ใบ แบ่งเป็น 3 ชุดการทดลอง (น้ำอุณหภูมิ 22, 27 และ 32 องศาเซลเซียส) ชุดการทดลองละ 3 ซ้ำ โดยวิธีจับสลากแบบสุ่ม ปลอ่ยปลา 20 ตัว ลงในแต่ละตู้ทดลองที่มีการปรับอุณหภูมิของห้อง และปรับอุณหภูมิของน้ำและรักษาอุณหภูมิของน้ำด้วยเครื่องควบคุมอุณหภูมิ ให้ออกซิเจนโดยการเพิ่มอากาศระบบหัวทราย ให้อาหารวันละ 2 ครั้ง ดูแลก่อนที่ก้นตู้ทดลองและเปลี่ยนถ่ายน้ำร้อยละ 10 ต่อวันจนสิ้นสุดการทดลอง

1.4 การตรวจวัด Cortisol

เก็บตัวอย่างเลือดจากปลานิลในแต่ละตู้ทดลอง ที่ช่วงเวลา 1, 3, 6, 12, 24, 48, 72 และ 168 ชั่วโมง ตามลำดับ โดยสุ่มเก็บน้ำเลือดของปลานิลในตู้แต่ละ 1 ตัว ใช้ปลานิลจำนวน 3 ชุดการทดลอง (น้ำมีอุณหภูมิ 22, 27 และ 32 องศาเซลเซียส) และใช้ชุดการทดลอง ชุดละ 3 ชั่วโมง รวมตัวอย่างเลือดปลาที่เก็บได้ทั้งหมด 8 ตัวอย่างต่อหนึ่งตู้ รวมตัวอย่างเลือดปลาที่เก็บได้ทั้ง 3 ชุดการทดลอง รวมทั้งสิ้น 72 ตัวอย่าง ทำการตรวจวัดฮอร์โมน Cortisol ในเลือดปลาโดยใช้วิธี Radioimmunoassay (RIA) (Sufi *et al.*, 1986) ในการวิเคราะห์เลือกใช้ชุดทดสอบฮอร์โมนสำเร็จรูปของบริษัท Adaltis Italia S.p.A จากนั้นทำการวัดปริมาณรังสีแกมมาด้วยเครื่อง Gamma counter และนำข้อมูลที่ได้ไปแปลผลโดยใช้โปรแกรมสำเร็จรูป Gamma counter GMS version 3.05: GAMMA - C12

1.5 การตรวจวัดการแสดงออกของยีน Heat Shock Protein 70 (HSP70)

1.5.1 การศึกษาการแสดงออกของยีน Heat Shock Protein 70 (HSP70) ในเหงือกของปลานิล โดยวิธี Reverse Transcription PCR (RT-PCR)

(1) การเก็บตัวอย่างเหงือกและการเตรียม Total RNA จากเหงือกของปลานิล

ทำการเก็บตัวอย่างในช่วงเวลาเดียวกับข้อ 1.4 โดยเก็บตัวอย่างเหงือกปลานิลในแต่ละตู้ทดลอง ที่ช่วงเวลา 1, 3, 6, 12, 24, 48, 72 และ 168 ชั่วโมง ตามลำดับ โดยสุ่มเก็บเหงือกปลานิลตู้ละ 1 ตัว ใช้ปลานิล 3 ชุดการทดลอง (น้ำมีอุณหภูมิ 22, 27 และ 32 องศาเซลเซียส) และใช้ชุดการทดลอง ชุดละ 3 ชั่วโมง รวมตัวอย่างเหงือกปลาที่เก็บได้ทั้งหมด 8 ตัวอย่างต่อหนึ่งตู้ รวมตัวอย่างเหงือกปลาที่เก็บได้ทั้ง 3 ชุดการทดลอง รวมทั้งสิ้น 72 ตัวอย่าง การเก็บตัวอย่างเนื้อเยื่อบริเวณเหงือก ใช้กรรไกรที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว ตัดเก็บเหงือกของปลานิลของทุกชุดการทดลอง ใส่ในหลอด Microcentrifuge tube ขนาด 1.5 มิลลิลิตร เติม Trizol reagent 500 ไมโครลิตร แล้วบดเนื้อเยื่อเหล่านั้น ด้วยโกร่งบดเนื้อเยื่อ (Homogenizer) เมื่อบดละเอียดแล้ว จึงดูดเอาสารละลายดังกล่าวใส่ลงในหลอด Microcentrifuge tube ขนาด 1.5 มิลลิลิตร แล้วเติม Trizol reagent อีก 500 ไมโครลิตร แล้วนำไปสกัด Total RNA ตามกรรมวิธีของบริษัท (Molecular research center, Inc.) โดยมีรายละเอียดดังนี้คือ

ใช้เข็มขนาด 24G และกระบอกฉีดยาปริมาตร 3 มิลลิลิตร คูดสารละลายของตัวอย่างทั้งหมดขึ้นลง 3-5 นาที ทั้งนี้เพื่อทำลาย Genomic DNA จากนั้นบ่มที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 5 นาที แล้วเติม Chloroform ปริมาตร 200 ไมโครลิตร ผสมสารละลายให้เข้ากันโดยการพลิกหลอดกลับไปกลับมา นานประมาณ 15 วินาที จากนั้นจึงบ่มที่อุณหภูมิห้องนาน 3 นาที นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 12,000 รอบต่อนาที ใช้อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที คูดส่วนใสด้านบน ที่เป็นชั้นของ RNA ออกไปใส่ในหลอด Microcentrifuge tube ขนาด 1.5 มิลลิลิตร หลอดใหม่ แล้วเติม Isopropyl alcohol ปริมาตร 500 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันโดยการพลิกหลอดกลับไปมา แล้วบ่มที่อุณหภูมิห้อง นาน 10 นาที จากนั้นนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 12,000 รอบต่อนาที ใช้อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลานาน 10 นาที คูดสารละลายส่วนใสด้านบนทิ้ง แล้วเติม 75% Ethanol 1 มิลลิลิตร และเก็บรักษาตะกอน RNA ที่อุณหภูมิ -80 องศาเซลเซียส

นำตัวอย่าง Total RNA ที่เก็บอยู่ใน 75% Ethanol ที่อุณหภูมิ -80 องศาเซลเซียส มาปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 7,500 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส นาน 5 นาที จากนั้นจึงคูดเอาส่วนของ 75% Ethanol ออก เหลือเฉพาะตะกอนสีขาว ตกให้แห้ง แล้วจึงเติม DEPC water ลงในหลอดเพื่อละลายตะกอน RNA ที่ได้ โดยปริมาณของ DEPC treated water ที่ได้ในแต่ละตัวอย่าง จะแตกต่างกันตามปริมาณของ Total RNA ที่สกัดได้

(2) การตรวจสอบคุณภาพและการวัดปริมาณความเข้มข้นของ Total RNA

นำเอาสารละลาย Total RNA ที่ได้จากข้อ 1.5.1.1 ปริมาตร 2 ไมโครลิตร ผสมกับ DEPC treated water ปริมาตร 68 ไมโครลิตร ในหลอดขนาดปริมาตร 0.6 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน จากนั้นนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสง (Absorbance) ด้วยเครื่อง Spectrophotometer ที่ความยาวคลื่น 260 นาโนเมตร (A_{260}) และที่ความยาวคลื่น 280 นาโนเมตร (A_{280})

(3) การสังเคราะห์ First strand cDNA (Complementary DNA)

นำตัวอย่าง Total RNA ที่ได้มาสังเคราะห์ First strand cDNA synthesis โดยใช้ชุดสำเร็จรูป RevertAid™ M-MuLV Reverse Transcriptase Kit โดยทำตามวิธีการของชุดสำเร็จรูปของบริษัท (Fermentas, USA) โดยมีรายละเอียดขั้นตอนการดำเนินงานดังนี้

เติม Oligo (dT)₂₀ primer ลงในหลอด PCR หลังจากนั้นจึงเติมตัวอย่าง Total RNA และ Nuclease-free water ที่แปรผันตามปริมาณความเข้มข้นของ RNA ที่วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ได้จากเครื่อง Spectrophotometer โดยปริมาณ RNA กำหนดให้มีความเข้มข้นเท่ากับ 1 µg (1,000 ng) ตามรายละเอียดดังนี้

Oligo (dT) ₁₈ primer	1.0	ไมโครลิตร
Total RNA (ความเข้มข้น 1 µg)	X	ไมโครลิตร
Nuclease-free water	11-X	ไมโครลิตร

จากนั้นผสมสารละลายทั้งหมดให้เข้ากันโดยใช้ Vortex และปั่นอย่างรวดเร็วโดยใช้เครื่องปั่นเหวี่ยง (Centrifuge) แล้วจึงนำไปป้อนในเครื่อง Thermal cycler machine ที่อุณหภูมิ 70 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที แล้วนำไปแช่ในน้ำแข็งอย่างรวดเร็ว แล้วจึงเติม 5X Reaction buffer (250 mM Tris-HCl (pH 8.3 at 25°C), 250 mM KCl, 20 mM MgCl₂, 50 mM DTT), RiboLock™ RNase Inhibitor และ 10 mM dNTP Mix ตามรายละเอียดดังนี้

5X Reaction buffer	4.0	ไมโครลิตร
RiboLock™ RNase Inhibitor	1.0	ไมโครลิตร
10 mM dNTP Mix	2.0	ไมโครลิตร

ผสมส่วนผสมดังกล่าวให้เข้ากันโดยใช้ Vortex และปั่นเหวี่ยงอย่างรวดเร็ว แล้วจึงนำไปป้อนด้วยเครื่อง Thermal cycler machine ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 5 นาที แล้วจึงเติม RevertAid™ M-MuLV Reverse Transcriptase ปริมาตร 1 ไมโครลิตร ผสมส่วนผสมดังกล่าวให้เข้ากันโดยใช้เครื่อง Vortex และปั่นเหวี่ยงอย่างรวดเร็วอีกครั้ง แล้วจึงนำไปป้อนด้วยเครื่อง Thermal cycler machine ที่อุณหภูมิ 42 องศาเซลเซียส นาน 60 นาที และ 70 องศาเซลเซียส นาน 10 นาที เก็บ First strand cDNA Product ที่ได้ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส จนกว่าจะใช้

(4) การทำ Reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR)

เพื่อศึกษาการแสดงออกของยีน Heat Shock Protein 70 (HSP70) โดยใช้ cDNA ที่สร้างจาก Total RNA ของเหือกในแต่ละชุดการทดลองและแต่ละช่วงเวลาเป็น Template และใช้ไพรเมอร์ซึ่งออกแบบจากยีนให้มีความจำเพาะต่อยีน HSP70 และยีน Beta-actin (β -actin) ซึ่งนำมาใช้เป็น Internal control (ตารางที่ 1)

ซึ่งสารเคมีที่ใช้ในการทำปฏิกิริยา ประกอบด้วย cDNA, 10X *Taq* Buffer, 10 μ M Forward Primer, 10 μ M Reverse Primer, 2.5 mM dNTP, *Taq* DNA Polymerase และ Distilled water โดยมีรายละเอียดดังนี้

cDNA templates	1.0	ไมโครลิตร
10X <i>Taq</i> Buffer	2.0	ไมโครลิตร
10 μ M Forward Primer	1.5	ไมโครลิตร
10 μ M Reverse Primer	1.5	ไมโครลิตร
2.5 mM dNTP	2.0	ไมโครลิตร
<i>Taq</i> DNA Polymerase	0.1	ไมโครลิตร
Distilled water	21.9	ไมโครลิตร
ปริมาตรรวม	30.0	ไมโครลิตร

ตารางที่ 1 ไพรเมอร์ที่ใช้ในการศึกษา Reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR)

Primer name	Nucleotide sequence 5'-----> 3'	Amplicon size (bp)	Reference (Gene Bank Accession number)
HSP70-F	GAGTCCTACGCCTTCAACATGA	381	FJ213839.1
HSP70-R	ATCTTCAGGGCCTCTTTAGTCC		
β -actin-F	GGTCATCACCATTGGCAATG	529	EU887951.1
β -actin-R	ACTGAAGCCATGCCAATGAG		

ใส่ส่วนผสมของสารทั้งหมดในหลอด PCR จากนั้นจึงนำไปใส่ในเครื่อง Thermal cycler machine เพื่อเพิ่มปริมาณ DNA เป้าหมายโดยกำหนดให้สภาวะในการทำงานเป็นดังนี้คือ ช่วงแรก ใช้อุณหภูมิ 95 องศาเซลเซียส นาน 5 นาที ช่วงที่สองใช้อุณหภูมิ 95 องศาเซลเซียส นาน 30 วินาที, 55 องศาเซลเซียส นาน 30 วินาที และ 72 องศาเซลเซียส นาน 1 นาที 30 วินาที จำนวน 25 รอบ และช่วงที่สาม 72 องศาเซลเซียส นาน 5 นาที

ตรวจสอบผลการแสดงออกของยีน HSP70 และยีน Beta-actin ด้วยวิธี Agarose gel electrophoresis โดยใช้ Agarose gel ที่มีความเข้มข้น 1.5% ในบัฟเฟอร์ 1X TBE และใช้ความต่างศักย์ไฟฟ้า 100 โวลต์ จากนั้นจึงตรวจสอบแถบ DNA ด้วยการย้อมใน Ethidium bromide ที่ความเข้มข้น 0.5 ไมโครกรัมต่อมิลลิตร ตรวจสอบแถบ DNA และถ่ายภาพภายใต้แสงอัลตราไวโอเล็ต ด้วยเครื่อง Gel documentation โดยถ้าตัวอย่างใดมีแถบ DNA เกิดขึ้น แสดงว่ามีการแสดงออกของยีนชนิดนั้น ส่วนปริมาณการแสดงออกจะสังเกตได้จากระดับความเข้มของแถบ DNA ที่เกิดขึ้น กล่าวคือ ถ้ามีความเข้มของแถบ DNA มาก ก็แสดงว่าการแสดงออกของยีนดังกล่าวมากด้วย ในทางกลับกันถ้ามีความเข้มของแถบ DNA น้อย ก็แสดงว่ามีการแสดงออกของยีน

ดังกล่าวน้อยตามไปด้วย ทำการรายงานค่าของการแสดงออกของยีน HSP70 เป็นค่า Relative expression ratio

$$\text{โดยค่า Relative expression ratio} = \frac{\text{ค่าความเข้มแสงจาก Destination ของยีน HSP70}}{\text{ค่าความเข้มแสงจาก Destination ของยีน Beta-actin}} \times 100$$

1.6 การตรวจวัดคุณภาพน้ำ

คุณภาพน้ำในแต่ละตู้ทดลองจะตรวจวิเคราะห์ ณ เวลาที่ทำการเก็บตัวอย่างเลือดจากปลาในตู้ โดยมีการวัดค่าต่าง ๆ ที่ตรวจวัด คือ อุณหภูมิ น้ำ วัดโดยใช้เครื่องวัดอุณหภูมิในเครื่องวัดรุ่น YSI Model 63 ปริมาณออกซิเจนละลาย (DO) วัดโดยใช้เครื่องวัดออกซิเจนละลายรุ่น YSI Model 200 ความเป็นกรด-ด่าง (pH) วัดโดยใช้เครื่องวัด pH รุ่น YSI Model 63 ความนำไฟฟ้า วัดโดยใช้เครื่องวัดความนำไฟฟ้ารุ่น YSI Model 63 ความเค็มวัดโดยใช้เครื่องวัดความเค็มรุ่น YSI Model 63 ตามลำดับ

1.7 การวิเคราะห์ข้อมูล

ข้อมูลที่ได้นำมาวิเคราะห์เปรียบเทียบเพื่อดูผลของระดับของ Cortisol และการแสดงออกของยีน Heat Shock Protein 70 (HSP70) ภายหลังการเปลี่ยนแปลงอุณหภูมิ ในแต่ละช่วงเวลาที่ทำการทดลอง โดยวิเคราะห์ความแปรปรวนความเข้มข้นของ Cortisol และค่า Relative expression ratio ของยีน HSP70 และยีน Beta-actin ของปลาในทั้ง 3 กลุ่ม ในแต่ละช่วงเวลา ด้วยวิธี Analysis of variance (ANOVA) ตามแผนการทดลองแบบสุ่มตลอด (Completely Randomized Design; CRD) และเปรียบเทียบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยของข้อมูลต่าง ๆ ด้วยวิธี Duncan's New Multiple Range Test ที่ระดับความเชื่อมั่น 95%

2. การศึกษาอัตราการตายของปลานิลที่อยู่ในสภาวะอุณหภูมิที่ต่างกัน ภายหลังจากได้รับเชื้อ *Streptococcus agalactiae*

1. ใช้ตู้กระจก ขนาด 100 ลิตร จำนวน 9 ใบ แบ่งเป็น 3 ชุดการทดลอง (น้ำอุณหภูมิ 22, 27 และ 32 องศาเซลเซียส) ชุดการทดลองละ 3 ซ้ำ โดยวิธีจับปลาแบบสุ่ม ปล่อยปลา 20 ตัว ลงในแต่ละตู้ทดลองที่มีการปรับอุณหภูมิของห้อง และปรับอุณหภูมิของน้ำและรักษาอุณหภูมิของน้ำด้วยฮีตเตอร์ ให้ออกซิเจนโดยการเพิ่มอากาศระบบหัวทราย ให้อาหารวันละ 2 ครั้ง คูดะก่อนที่ก้นตู้ทดลองและเปลี่ยนถ่ายน้ำร้อยละ 10 ต่อวันจนถึงสิ้นสุดการทดลอง

2. นำเชื้อแบคทีเรีย *Streptococcus agalactiae* strain AQSA001 ซึ่งเตรียมได้จากปลาเป็นโรค นำมาใส่ลงในตู้ทดลองเลี้ยงปลานิลที่อุณหภูมิที่ต่างกันชุดดังกล่าว (22, 27 และ 32 องศาเซลเซียส) ให้ค่าความเข้มข้นสุดท้ายของเชื้อ *S. agalactiae* ที่ปลานิลในแต่ละตู้ทดลองได้รับเท่ากับ 1×10^8 Colony forming unit/มิลลิลิตร และทำการเลี้ยงปลานิล โดยให้อาหารต่อไปเป็นระยะเวลา 3 สัปดาห์

3. ในระหว่างนี้ทำการสังเกตอาการของปลา ตลอดระยะเวลาการเลี้ยง บันทึกจำนวนการตายของปลานิลในแต่ละตู้ทดลอง ทุกวันตลอดระยะเวลา 3 สัปดาห์ และทำการตรวจวัดอัตราการตายของปลานิลในแต่ละชุดการทดลอง

3. การศึกษาผลของความเครียดต่อปริมาณ Cortisol และการแสดงออกของยีน Heat Shock Protein 70 (HSP70)

3.1 สัตว์ทดลอง

นำปลานิลขนาด 10-15 เซนติเมตร สายพันธุ์จิตรลดาที่ได้มาจากสถาบันวิจัยและพัฒนาพันธุ์กรรมสัตว์น้ำ กรมประมง จำนวน 500 ตัว มาเลี้ยงในถังไฟเบอร์กลาสขนาด 1,000 ลิตร มาเลี้ยงในห้องทดลอง เพื่อปรับตัวเป็นเวลา 1 เดือน ให้อาหารวันละ 2 ครั้ง โดยทำการทดลองในเดือนพฤษภาคม 2552

3.2 การวางแผนการทดลอง

วางแผนการทดลองแบบสุ่มตลอด (Completely Randomized Design; CRD) เพื่อศึกษาผลของความเครียดต่อปริมาณ Cortisol ที่ความเครียดที่ต่างกัน 3 ระดับ คือ 0, 5 และ 15 ส่วนในพันส่วน ตามลำดับ และ Heat Shock Protein 70 ที่ความเครียดที่ต่างกัน 3 ระดับ คือ 0, 5 และ 15 ส่วนในพันส่วน ตามลำดับ (treatment) ภายใต้สภาวะการจัดการระบบน้ำที่เหมือนกัน แต่ละชุดการทดลองประกอบด้วย 3 ซ้ำ (replication)

3.3 การเตรียมระบบการทดลอง

ใช้ตู้กระจก ขนาด 100 ลิตร จำนวน 9 ใบ แบ่งเป็น 3 ชุดการทดลอง (น้ำความเครียด 0, 5 และ 15 ส่วนในพันส่วน) ชุดการทดลองละ 3 ซ้ำ โดยวิธีจับสลากแบบสุ่ม ปล่อยปลาลงในตู้ทดลองตู้ละ 20 ตัว ดำเนินการปรับความเค็มของน้ำในแต่ละชุดการทดลอง ให้ออกซิเจนโดยการเพิ่มอากาศระบบหัวทราย ให้อาหารวันละ 2 ครั้ง คัดตะกอนที่ก้นตู้ทดลองและเปลี่ยนถ่ายน้ำร้อยละ 10 ต่อวันจนสิ้นสุดการทดลอง

3.4 การตรวจวัด Cortisol

เก็บตัวอย่างเลือดจากปลานิลในแต่ละตู้ทดลอง ช่วงเวลา 1, 3, 6, 12, 24, 48, 72, 96, 120, 144 และ 168 ชั่วโมง ตามลำดับ โดยสุ่มเก็บน้ำเลือดปลานิลตู้ละ 1 ตัว ใช้ปลานิล 3 ชุดการทดลอง (น้ำมีความเค็ม 0, 5 และ 15 ส่วนในพันส่วน) ชุดการทดลอง ชุดละ 3 ซ้ำ รวมตัวอย่างเลือดปลาที่เก็บได้ 11 ตัวอย่างต่อหนึ่งตู้ รวมตัวอย่างเลือดปลาที่เก็บได้ รวมทั้งสิ้น 165 ตัวอย่าง ทำการตรวจวัดฮอร์โมน Cortisol โดยวิธี Radioimmunoassay (RIA) (Sufi *et al.*, 1986) ใช้ชุดทดสอบฮอร์โมนสำเร็จรูปของบริษัท Adaltis Italia S.p.A วัดปริมาณรังสีแกมมาด้วยเครื่อง Gamma counter และนำข้อมูลที่ได้อ่านไปแปลผลโดยใช้โปรแกรมสำเร็จรูป Gamma counter GMS version 3.05: GAMMA - C12

3.5 การตรวจวัดการแสดงออกของยีน Heat Shock Protein 70 (HSP70)

วิธีดำเนินการเช่นเดียวกับในหัวข้อ 1.5

3.6 การตรวจวัดคุณภาพน้ำ

คุณภาพน้ำในแต่ละตู้ทดลองจะตรวจวิเคราะห์ ณ เวลาที่ทำการเก็บตัวอย่างเลือดจากปลานิลในแต่ละตู้ โดยมีพารามิเตอร์ต่าง ๆ ที่ตรวจวัด คือ อุณหภูมิ น้ำ วัดโดยใช้เครื่องวัดอุณหภูมิในเครื่องวัดรุ่น YSI Model 63 ปริมาณออกซิเจนละลาย (DO) วัดโดยใช้เครื่องวัดออกซิเจนละลายรุ่น YSI Model 200 ความเป็นกรด-ด่าง (pH) วัดโดยใช้เครื่องวัด pH รุ่น YSI Model 63 ความนำไฟฟ้า วัดโดยใช้เครื่องวัดความนำไฟฟ้ารุ่น YSI Model 63 ความเค็มวัดโดยใช้เครื่องวัดความเค็มรุ่น YSI Model 63 ตามลำดับ

3.7 การวิเคราะห์ข้อมูล

ข้อมูลที่ได้นำมาวิเคราะห์เปรียบเทียบเพื่อดูผลของระดับของ Cortisol และการแสดงออกของยีน Heat Shock Protein 70 (HSP70) ภายหลังการเปลี่ยนแปลงความเค็ม ในแต่ละช่วงเวลาที่ทำการทดลอง โดยวิเคราะห์ความแปรปรวนความเข้มข้นของ Cortisol และค่า Relative expression ratio ของยีน HSP70 และยีน Beta-actin ของปลาในทั้ง 3 กลุ่ม ในแต่ละช่วงเวลาดังกล่าว

Analysis of variance (ANOVA) ตามแผนการทดลองแบบสุ่มตลอด (Completely Randomized Design; CRD) และเปรียบเทียบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยของข้อมูลต่าง ๆ ด้วยวิธี Duncan's New Multiple Range Test ที่ระดับความเชื่อมั่น 95%

สถานที่และระยะเวลาในการทดลอง

สถานที่ทำการศึกษา

ศูนย์วิจัยและถ่ายทอดเทคโนโลยีปาล์วยางและพรมไม้ประดับ คณะประมง มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ บางเขน เขตจตุจักร กรุงเทพมหานคร

ระยะเวลาในการศึกษา

ระยะเวลาในการศึกษา 7 เดือน ตั้งแต่เดือนธันวาคม 2551-มิถุนายน 2552

ผลและวิจารณ์

ผล

1. ผลของอุณหภูมิต่อตัวบ่งชี้สภาวะความเครียดของปลานิล

1.1 ผลของอุณหภูมิต่อปริมาณ Cortisol ในปลานิล

ผลการศึกษาปริมาณ Cortisol ในซีรัมปลานิล ที่นำมาเลี้ยงในตู้ทดลองที่มีสภาวะอุณหภูมิของน้ำที่แตกต่างกัน 3 ระดับ คือ 22, 27 และ 32 องศาเซลเซียส ซึ่งได้เก็บตัวอย่างเลือดจากปลานิลในแต่ละตู้ ณ ช่วงเวลา 1, 3, 6, 12, 24, 48, 72 และ 168 ชั่วโมง ตามลำดับ (ตารางที่ 2 และ ภาพที่ 5) มีรายละเอียดดังต่อไปนี้

ปลานิลที่อยู่ในอุณหภูมิของน้ำที่ 22 องศาเซลเซียส มีปริมาณ Cortisol ในซีรัมปลานิล ชั่วโมงที่ 1, 3, 6, 12, 24, 48, 72 และ 168 มีค่าเท่ากับ 5.63 ± 5.08 , 34.80 ± 26.41 , 105.87 ± 25.14 , 38.23 ± 42.32 , 14.80 ± 17.17 , 71.53 ± 24.90 , 3.47 ± 4.61 และ 2.67 ± 1.69 ไมโครกรัมต่อลิตร ตามลำดับ โดยพบว่าค่าปริมาณ Cortisol ในซีรัมปลานิลสูงสุดพบที่ชั่วโมงที่ 6 ซึ่งมีค่าเท่ากับ 105.87 ± 25.14 ไมโครกรัมต่อลิตร รองลงมาคือชั่วโมงที่ 48 เท่ากับ 71.53 ± 24.90 ไมโครกรัมต่อลิตร และค่าปริมาณ Cortisol ในซีรัมปลานิลต่ำสุดพบที่ชั่วโมงที่ 168 ซึ่งมีค่าเท่ากับ 2.67 ± 1.69 ไมโครกรัมต่อลิตร

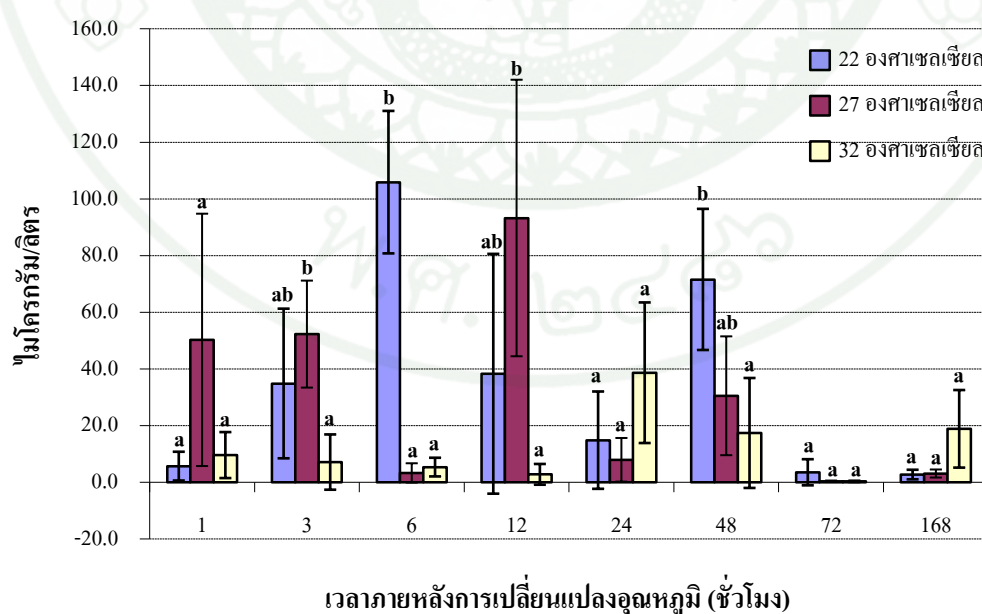
ปลานิลที่อยู่ในอุณหภูมิของน้ำที่ 27 องศาเซลเซียส มีปริมาณ Cortisol ในซีรัมปลานิล ชั่วโมงที่ 1, 3, 6, 12, 24, 48, 72 และ 168 มีค่าเท่ากับ 50.20 ± 44.54 , 52.23 ± 18.88 , 3.24 ± 3.41 , 93.22 ± 48.80 , 7.87 ± 7.70 , 30.47 ± 20.97 , 0.28 ± 0.26 และ 3.03 ± 1.42 ไมโครกรัมต่อลิตร ตามลำดับ โดยพบว่าค่าปริมาณ Cortisol ในซีรัมปลานิลสูงสุดพบที่ชั่วโมงที่ 12 ซึ่งมีค่าเท่ากับ 93.22 ± 48.80 ไมโครกรัมต่อลิตร รองลงมาคือชั่วโมงที่ 3 เท่ากับ 52.23 ± 18.88 ไมโครกรัมต่อลิตร และค่าปริมาณ Cortisol ในซีรัมปลานิลต่ำสุดพบที่ชั่วโมงที่ 72 ซึ่งมีค่าเท่ากับ 0.28 ± 0.26 ไมโครกรัมต่อลิตร

ตารางที่ 2 ปริมาณ Cortisol (ไมโครกรัมต่อลิตร) ในซีรัมปลานิลที่อยู่ในอุณหภูมิน้ำที่ต่างกัน

ชั่วโมงที่	ชุดทดลอง		
	22 องศาเซลเซียส	27 องศาเซลเซียส	32 องศาเซลเซียส
1	5.63±5.08 ^a	50.20±44.54 ^a	9.53±8.11 ^a
3	34.80±26.41 ^{ab}	52.23±18.88 ^b	7.07±9.75 ^a
6	105.87±25.14 ^b	3.24±3.41 ^a	5.30±3.29 ^a
12	38.23±42.32 ^{ab}	93.22±48.80 ^b	2.74±3.66 ^a
24	14.80±17.17 ^a	7.87±7.70 ^a	38.60±24.81 ^a
48	71.53±24.90 ^b	30.47±20.97 ^{ab}	17.34±19.40 ^a
72	3.47±4.61 ^a	0.28±0.26 ^a	0.26±0.21 ^a
168	2.67±1.69 ^a	3.03±1.42 ^a	18.80±13.69 ^a

หมายเหตุ ปริมาณ Cortisol แสดงโดยค่าเฉลี่ย ± ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน (Mean±SD)

และพัยชนะที่แตกต่างกันที่เวลาต่าง ๆ แสดงระดับความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.05$)



ภาพที่ 5 ปริมาณ Cortisol ในซีรัมปลานิลที่อยู่ในอุณหภูมิน้ำที่ต่างกัน

ปลานิลที่อยู่ในอุณหภูมิน้ำที่ 32 องศาเซลเซียส มีปริมาณ Cortisol ในซีรัมปลานิล ชั่วโมงที่ 1, 3, 6, 12, 24, 48, 72 และ 168 มีค่าเท่ากับ 9.53 ± 8.11 , 7.07 ± 9.75 , 5.30 ± 3.29 , 2.74 ± 3.66 , 38.60 ± 24.81 , 17.34 ± 19.40 , 0.26 ± 0.21 และ 18.80 ± 13.69 ไมโครกรัมต่อลิตร ตามลำดับ โดยพบว่า ค่าปริมาณ Cortisol ในซีรัมปลานิลสูงสุดพบที่ชั่วโมงที่ 24 ซึ่งมีค่าเท่ากับ 38.60 ± 24.81 ไมโครกรัมต่อลิตร รองลงมาคือชั่วโมงที่ 168 เท่ากับ 18.80 ± 13.69 ไมโครกรัมต่อลิตร และค่าปริมาณ Cortisol ในซีรัมปลานิลต่ำสุดพบที่ชั่วโมงที่ 72 ซึ่งมีค่าเท่ากับ 0.26 ± 0.21 ไมโครกรัมต่อลิตร

และเมื่อนำปริมาณ Cortisol ของปลาทุกกลุ่มมาพิจารณาพบว่า Cortisol ในซีรัมปลานิลหลังการกระตุ้นให้เกิดความเครียดด้วยอุณหภูมิของน้ำที่ 22 องศาเซลเซียสมีค่าเพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็วและมีปริมาณสูงที่สุดเท่ากับ 105.87 ± 25.14 ไมโครกรัมต่อลิตร ซึ่งมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติกับปริมาณ Cortisol ในซีรัมปลานิลที่กระตุ้นให้เกิดความเครียดด้วยอุณหภูมิของน้ำที่ 27 และ 32 องศาเซลเซียส ที่มีค่าเท่ากับ 3.24 ± 3.41 และ 5.30 ± 3.29 ไมโครกรัมต่อลิตร ($P < 0.05$) ตามลำดับ ในชั่วโมงที่ 6 หลังการกระตุ้นให้เกิดความเครียด ส่วน Cortisol ในซีรัมปลานิลหลังการกระตุ้นให้เกิดความเครียดด้วยอุณหภูมิของน้ำที่ 27 องศาเซลเซียสมีค่าเพิ่มขึ้นช้าและมีปริมาณสูงที่สุดเท่ากับ 93.22 ± 48.80 ไมโครกรัมต่อลิตร ซึ่งมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติกับปริมาณ Cortisol ในซีรัมปลานิลที่กระตุ้นให้เกิดความเครียดด้วยอุณหภูมิของน้ำที่ 32 องศาเซลเซียส ที่มีค่าเท่ากับ 2.74 ± 3.66 ไมโครกรัมต่อลิตร ($P < 0.05$) แต่ไม่แตกต่างกันทางสถิติกับปริมาณ Cortisol ในซีรัมปลานิลที่กระตุ้นให้เกิดความเครียดด้วยอุณหภูมิของน้ำที่ 22 องศาเซลเซียส ที่มีค่าเท่ากับ 38.23 ± 42.32 ไมโครกรัมต่อลิตร ($P > 0.05$) ในชั่วโมงที่ 12 หลังการกระตุ้นให้เกิดความเครียด และ Cortisol ในซีรัมปลานิลหลังการกระตุ้นให้เกิดความเครียดด้วยอุณหภูมิของน้ำที่ 32 องศาเซลเซียสมีค่าเพิ่มขึ้นช้าที่สุดและมีปริมาณสูงที่สุดเท่ากับ 38.60 ± 24.81 ไมโครกรัมต่อลิตร ซึ่งไม่แตกต่างกันทางสถิติกับปริมาณ Cortisol ในซีรัมปลานิลที่กระตุ้นให้เกิดความเครียดด้วยอุณหภูมิของน้ำที่ 22 และ 27 องศาเซลเซียส ที่มีค่าเท่ากับ 14.80 ± 17.17 และ 7.87 ± 7.70 ไมโครกรัมต่อลิตร ($P > 0.05$) ตามลำดับ ในชั่วโมงที่ 24 หลังการกระตุ้นให้เกิดความเครียด

จากผลการศึกษาพบว่าผลของอุณหภูมิต่อปริมาณ Cortisol ในซีรัมปลานิลในแต่ละชุดการทดลอง จะเกิดขึ้นในช่วงระยะแรกที่กระตุ้นให้เกิดความเครียดด้วยอุณหภูมิของน้ำ ซึ่งปลาได้สัมผัสกับอุณหภูมิที่เปลี่ยนแปลงไป โดยพบว่า Cortisol ในซีรัมปลานิลหลังการกระตุ้นให้เกิดความเครียดด้วยอุณหภูมิของน้ำที่ 22 องศาเซลเซียสมีค่าเพิ่มขึ้นรวดเร็วที่สุดโดยสูงสุดในชั่วโมงที่

6 และมีความเปลี่ยนแปลงในช่วงกว้างที่สุด รองลงมาคือการกระตุ้นให้เกิดความเครียดด้วยอุณหภูมิของน้ำที่ 27 องศาเซลเซียสโดยสูงสุดในชั่วโมงที่ 12 และการกระตุ้นให้เกิดความเครียดด้วยอุณหภูมิของน้ำที่ 32 องศาเซลเซียสซ้ำที่ สุดโดยสูงสุดในชั่วโมงที่ 24 ซึ่งแสดงให้เห็นว่าปลานิลจะสามารถปรับตัวให้เข้ากับสภาพการเปลี่ยนแปลงอุณหภูมิที่เกิดขึ้นได้ในระยะเวลาหนึ่งซึ่งเป็นช่วงสั้น ๆ เท่านั้น

1.2 ผลของอุณหภูมิต่อการแสดงออกของยีน Heat Shock Protein 70 (HSP) ในปลานิล

ผลการศึกษาการแสดงออกของยีน Heat Shock Protein (HSP70) ในเหงือกปลานิล ที่นำมาเลี้ยงในตู้ทดลองที่มีสภาวะอุณหภูมิของน้ำที่แตกต่างกัน 3 ระดับ คือ 22, 27 และ 32 องศาเซลเซียส ซึ่งได้เก็บตัวอย่างเหงือกจากปลานิลในแต่ละตู้ ที่ช่วงเวลา 1, 3, 6, 12, 24, 48, 72 และ 168 ชั่วโมง ตามลำดับ (ตารางที่ 3 และภาพที่ 6) มีรายละเอียดดังต่อไปนี้

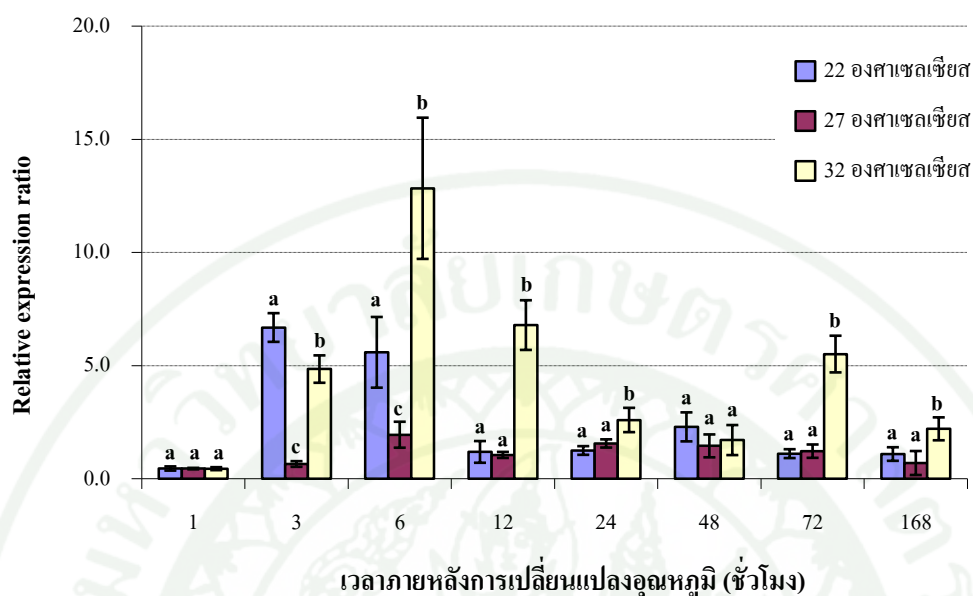
ปลานิลที่อยู่ในอุณหภูมิของน้ำที่ 22 องศาเซลเซียส มีการแสดงออกของยีน HSP70 ในเหงือกปลา ณ ชั่วโมงที่ 1, 3, 6, 12, 24, 48, 72 และ 168 มีค่าเท่ากับ 0.46 ± 0.09 , 6.69 ± 0.63 , 5.59 ± 1.56 , 1.19 ± 0.48 , 1.25 ± 0.19 , 2.30 ± 0.64 , 1.11 ± 0.20 และ 1.10 ± 0.30 ตามลำดับ โดยพบว่าการแสดงออกของยีน HSP70 ในเหงือกปลาสูงสุดพบที่ชั่วโมงที่ 3 ซึ่งมีค่าเท่ากับ 6.69 ± 0.63 รองลงมาคือชั่วโมงที่ 6 เท่ากับ 5.59 ± 1.56 และการแสดงออกของยีน HSP70 ในเหงือกปลาดำสุดพบที่ชั่วโมงที่ 1 ซึ่งมีค่าเท่ากับ 0.46 ± 0.09

ปลานิลที่อยู่ในอุณหภูมิของน้ำที่ 27 องศาเซลเซียส มีการแสดงออกของยีน HSP70 ในเหงือกปลา ณ ชั่วโมงที่ 1, 3, 6, 12, 24, 48, 72 และ 168 มีค่าเท่ากับ 0.45 ± 0.03 , 0.66 ± 0.13 , 1.95 ± 0.57 , 1.06 ± 0.13 , 1.56 ± 0.18 , 1.46 ± 0.51 , 1.22 ± 0.29 และ 0.70 ± 0.53 ตามลำดับ โดยพบว่าการแสดงออกของยีน HSP70 ในเหงือกปลาสูงสุดพบที่ชั่วโมงที่ 6 ซึ่งมีค่าเท่ากับ 1.95 ± 0.57 รองลงมาคือชั่วโมงที่ 24 เท่ากับ 1.56 ± 0.18 และการแสดงออกของยีน HSP70 ในเหงือกปลาดำสุดพบที่ชั่วโมงที่ 1 ซึ่งมีค่าเท่ากับ 0.45 ± 0.03

ตารางที่ 3 การแสดงออกของยีน Heat Shock Protein 70 (HSP70) ในเหงือกปลานิลที่อยู่ในอุณหภูมิของน้ำที่ต่างกัน

ชั่วโมงที่	ชุดทดลอง		
	22 องศาเซลเซียส	27 องศาเซลเซียส	32 องศาเซลเซียส
1	0.46±0.09 ^a	0.45±0.03 ^a	0.45±0.07 ^a
3	6.69±0.63 ^a	0.66±0.13 ^c	4.85±0.61 ^b
6	5.59±1.56 ^a	1.95±0.57 ^c	12.84±3.12 ^b
12	1.19±0.48 ^a	1.06±0.13 ^a	6.79±1.10 ^b
24	1.25±0.19 ^a	1.56±0.18 ^a	2.60±0.54 ^b
48	2.30±0.64 ^a	1.46±0.51 ^a	1.71±0.66 ^a
72	1.11±0.20 ^a	1.22±0.29 ^a	5.51±0.81 ^b
168	1.10±0.30 ^a	0.70±0.53 ^a	2.21±0.51 ^b

หมายเหตุ ค่าของการแสดงออกของยีน HSP70 แสดงโดยค่าเฉลี่ย ± ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน (Mean ±SD) และพยัญชนะที่แตกต่างกันที่เวลาต่าง ๆ แสดงระดับความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.05$)



ภาพที่ 6 การแสดงออกของยีน HSP70 ในเหงือกปลาชนิดที่อยู่ในอุณหภูมิของน้ำที่ต่างกัน

ปลาชนิดที่อยู่ในอุณหภูมิของน้ำที่ 32 องศาเซลเซียส มีการแสดงออกของยีน HSP70 ในเหงือกปลา ณ ชั่วโมงที่ 1, 3, 6, 12, 24, 48, 72 และ 168 มีค่าเท่ากับ 0.45 ± 0.07 , 4.85 ± 0.61 , 12.84 ± 3.12 , 6.79 ± 1.10 , 2.60 ± 0.54 , 1.71 ± 0.66 , 5.51 ± 0.81 และ 2.21 ± 0.51 ตามลำดับ โดยพบว่า การแสดงออกของยีน HSP70 ในเหงือกปลาสูงสุดพบที่ชั่วโมงที่ 6 ซึ่งมีค่าเท่ากับ 12.84 ± 3.12 รองลงมาคือชั่วโมงที่ 12 เท่ากับ 1.56 ± 0.18 และการแสดงออกของยีน HSP70 ในเหงือกปลาต่ำสุดพบที่ชั่วโมงที่ 1 ซึ่งมีค่าเท่ากับ 0.45 ± 0.07

และเมื่อนำค่าของการแสดงออกของยีน HSP70 ของปลาทุกกลุ่มมาพิจารณาค่าของการแสดงออกของยีน HSP70 ในเหงือกปลาชนิดหลังการกระตุ้นให้เกิดความเครียดด้วยอุณหภูมิของน้ำที่ 22 องศาเซลเซียสมีค่าเพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็วและมีปริมาณสูงที่สุดเท่ากับ 6.69 ± 0.63 ซึ่งมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติกับค่าของการแสดงออกของยีน HSP70 ในเหงือกปลาชนิดที่กระตุ้นให้เกิดความเครียดด้วยอุณหภูมิของน้ำที่ 27 และ 32 องศาเซลเซียส ที่มีค่าเท่ากับ 0.66 ± 0.13 และ 4.85 ± 0.61 ($P > 0.05$) ตามลำดับ ในชั่วโมงที่ 3 หลังการกระตุ้นให้เกิดความเครียด ส่วนค่าของการแสดงออกของยีน HSP70 ในเหงือกปลาชนิดหลังการกระตุ้นให้เกิดความเครียดด้วยอุณหภูมิของน้ำที่ 27 องศาเซลเซียสมีค่าเพิ่มขึ้นช้ากว่าและมีปริมาณสูงที่สุดเท่ากับ 1.95 ± 0.57 ซึ่งมีการ

เปลี่ยนแปลงในช่วงที่แคบที่สุด และมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติกับค่าของการแสดงออกของยีน HSP70 ในเหงือกปลานิลที่กระตุ้นให้เกิดความเครียดด้วยอุณหภูมิของน้ำที่ 22 และ 32 องศาเซลเซียส ที่มีค่าเท่ากับ 5.59 ± 1.56 และ 12.84 ± 3.12 ($P < 0.05$) ตามลำดับ ในชั่วโมงที่ 6 หลังการกระตุ้นให้เกิดความเครียด และค่าของการแสดงออกของยีน HSP70 ในเหงือกปลานิลหลังการกระตุ้นให้เกิดความเครียดด้วยอุณหภูมิของน้ำที่ 32 องศาเซลเซียสมีค่าเพิ่มขึ้นช้ากว่า เช่นเดียวกับการกระตุ้นให้เกิดความเครียดด้วยอุณหภูมิของน้ำที่ 27 องศาเซลเซียสและมีปริมาณสูงที่สุดเท่ากับ 12.84 ± 13.21 ซึ่งมีความเปลี่ยนแปลงในช่วงกว้างที่สุด และมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติกับค่าของการแสดงออกของยีน HSP70 ในเหงือกปลานิลที่กระตุ้นให้เกิดความเครียดด้วยอุณหภูมิของน้ำที่ 22 และ 27 องศาเซลเซียส ที่มีค่าเท่ากับ 5.59 ± 1.56 และ 1.95 ± 0.57 ($P < 0.05$) ตามลำดับ ในชั่วโมงที่ 6 หลังการกระตุ้นให้เกิดความเครียด

จากผลการศึกษาพบว่าผลของอุณหภูมิต่อค่าของการแสดงออกของยีน HSP70 ในเหงือกปลานิลในแต่ละชุดการทดลอง จะเกิดขึ้นในช่วงระยะแรกที่กระตุ้นให้เกิดความเครียดด้วยอุณหภูมิของน้ำ ซึ่งปลาได้สัมผัสกับอุณหภูมิที่เปลี่ยนแปลงไป โดยพบว่าค่าของการแสดงออกของยีน HSP70 ในเหงือกปลานิลหลังการกระตุ้นให้เกิดความเครียดด้วยอุณหภูมิของน้ำที่ 22 องศาเซลเซียสมีค่าเพิ่มขึ้นรวดเร็วที่สุดโดยสูงสุดในชั่วโมงที่ 3 รองลงมาคือการกระตุ้นให้เกิดความเครียดด้วยอุณหภูมิของน้ำที่ 27 องศาเซลเซียสและอุณหภูมิของน้ำที่ 32 องศาเซลเซียส โดยสูงสุดในชั่วโมงที่ 6 การกระตุ้นให้เกิดความเครียดด้วยอุณหภูมิของน้ำที่ 27 องศาเซลเซียสมีค่าการเปลี่ยนแปลงของการแสดงออกของยีน HSP70 ในเหงือกปลานิลอยู่ในช่วงที่แคบที่สุด ส่วนการกระตุ้นให้เกิดความเครียดด้วยอุณหภูมิของน้ำที่ 32 องศาเซลเซียสมีค่าการเปลี่ยนแปลงของการแสดงออกของยีน HSP70 ในเหงือกปลานิลอยู่ในช่วงที่กว้างที่สุด และหลังจากชั่วโมงที่ 6 ค่าของการแสดงออกของยีน HSP70 ในเหงือกปลานิลหลังการกระตุ้นให้เกิดความเครียดมีค่าลดน้อยลงเรื่อย ๆ ตามลำดับ ซึ่งแสดงให้เห็นว่าปลานิลจะสามารถปรับตัวให้เข้ากับสภาพการเปลี่ยนแปลงอุณหภูมิที่เกิดขึ้นได้ในระยะเวลาหนึ่งซึ่งเป็นช่วงสั้น ๆ เท่านั้น

1.3 คุณภาพน้ำในตู้ทดลองเลี้ยงปลานิล

ผลการศึกษาคุณภาพน้ำในตู้ทดลองเลี้ยงปลานิล ที่มีสภาวะอุณหภูมิของน้ำที่แตกต่างกัน 3 ระดับ คือ 22, 27 และ 32 องศาเซลเซียส ตามลำดับ ซึ่งได้เก็บตัวอย่างน้ำไปวิเคราะห์ หาค่า

ดัชนีคุณภาพน้ำ คือ ค่าความเป็นกรด-ด่าง ความนำไฟฟ้า และออกซิเจนละลายในน้ำในแต่ละตู้ทดลอง ที่ช่วงเวลา 1, 3, 6, 12, 24, 48, 72 และ 168 ชั่วโมง ตามลำดับ มีรายละเอียดดังต่อไปนี้

1. อุณหภูมิ ค่าอุณหภูมิของน้ำในตู้ทดลองเลี้ยงปลานิล ที่อุณหภูมิของน้ำ 22 องศาเซลเซียส ณ ชั่วโมงที่ 1, 3, 6, 12, 24, 48, 72 และ 168 มีค่าเท่ากับ 22.10 ± 0.17 , 22.15 ± 0.17 , 22.10 ± 0.17 , 22.20 ± 0.26 , 22.03 ± 0.06 , 21.20 ± 0.17 , 21.20 ± 0.17 และ 21.00 ± 0.00 องศาเซลเซียส ตามลำดับ โดยพบว่าค่าอุณหภูมิมีการเปลี่ยนแปลงอยู่ในช่วงแคบมาก (ตารางที่ 4)

ค่าอุณหภูมิของน้ำในตู้ทดลองเลี้ยงปลานิล ที่อุณหภูมิของน้ำ 27 องศาเซลเซียส ณ ชั่วโมงที่ 1, 3, 6, 12, 24, 48, 72 และ 168 มีค่าเท่ากับ 27.10 ± 0.10 , 27.13 ± 0.12 , 27.20 ± 0.10 , 27.23 ± 0.06 , 27.23 ± 0.12 , 27.37 ± 0.15 , 27.37 ± 0.15 และ 27.37 ± 0.15 องศาเซลเซียส ตามลำดับ โดยพบว่าค่าอุณหภูมิมีการเปลี่ยนแปลงอยู่ในช่วงแคบมากเช่นกัน

ตารางที่ 4 อุณหภูมิของน้ำในตู้เลี้ยงปลานิล

ชั่วโมงที่	ชุดทดลอง		
	22 องศาเซลเซียส	27 องศาเซลเซียส	32 องศาเซลเซียส
1	22.10 ± 0.17	27.10 ± 0.10	32.27 ± 0.06
3	22.15 ± 0.17	27.13 ± 0.12	32.10 ± 0.17
6	22.10 ± 0.17	27.20 ± 0.10	32.27 ± 0.06
12	22.20 ± 0.26	27.23 ± 0.06	32.37 ± 0.06
24	22.03 ± 0.06	27.23 ± 0.12	32.30 ± 0.10
48	21.20 ± 0.17	27.37 ± 0.15	32.27 ± 0.15
72	21.20 ± 0.17	27.37 ± 0.15	32.33 ± 0.06
168	21.00 ± 0.00	27.37 ± 0.15	32.47 ± 0.25

หมายเหตุ ค่าเฉลี่ย $\pm$ ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน (Mean $\pm$ SD)

ค่าอุณหภูมิของน้ำในตู้ทดลองเลี้ยงปลานิล ที่อุณหภูมิของน้ำ 32 องศาเซลเซียส ณ ชั่วโมงที่ 1, 3, 6, 12, 24, 48, 72 และ 168 มีค่าเท่ากับ 32.27 ± 0.06 , 32.10 ± 0.17 , 32.27 ± 0.06 , 32.37 ± 0.06 , 32.30 ± 0.10 , 32.27 ± 0.15 , 32.33 ± 0.06 และ 32.47 ± 0.25 องศาเซลเซียส ตามลำดับ โดยพบว่าค่าอุณหภูมิมีการเปลี่ยนแปลงอยู่ในช่วงแคบเหมือนกัน

2. ออกซิเจนละลาย ค่าออกซิเจนละลายของน้ำในตู้ทดลองเลี้ยงปลานิล ที่อุณหภูมิของน้ำ 22 องศาเซลเซียส ณ ชั่วโมงที่ 1, 3, 6, 12, 24, 48, 72 และ 168 มีค่าเท่ากับ 8.36 ± 0.04 , 8.34 ± 0.01 , 8.47 ± 0.03 , 8.39 ± 0.03 , 8.36 ± 0.07 , 8.18 ± 0.13 , 8.15 ± 0.24 และ 9.16 ± 0.04 มิลลิกรัมต่อลิตร ตามลำดับ โดยพบว่าค่าออกซิเจนละลายมีการเปลี่ยนแปลงอยู่ในช่วงแคบ ๆ ค่าสูงสุดพบที่ชั่วโมงที่ 168 ซึ่งมีค่าเท่ากับ 9.16 ± 0.04 มิลลิกรัมต่อลิตร และค่าออกซิเจนละลายต่ำสุดพบที่ชั่วโมงที่ 72 ซึ่งมีค่าเท่ากับ 8.15 ± 0.24 มิลลิกรัมต่อลิตร (ตารางที่ 5)

ตารางที่ 5 ออกซิเจนละลายน้ำ (มิลลิกรัมต่อลิตร) ในตู้เลี้ยงปลานิลที่มีสภาวะอุณหภูมิของน้ำที่ต่างกัน

ชั่วโมงที่	ชุดทดลอง		
	22 องศาเซลเซียส	27 องศาเซลเซียส	32 องศาเซลเซียส
1	8.36 ± 0.04	7.59 ± 0.09	6.97 ± 0.84
3	8.34 ± 0.01	7.59 ± 0.09	7.06 ± 0.07
6	8.47 ± 0.03	7.59 ± 0.12	7.07 ± 0.04
12	8.39 ± 0.03	7.60 ± 0.08	7.24 ± 0.28
24	8.36 ± 0.07	7.65 ± 0.06	7.13 ± 0.02
48	8.18 ± 0.13	7.27 ± 0.05	6.76 ± 0.05
72	8.15 ± 0.24	7.07 ± 0.09	6.59 ± 0.08
168	9.16 ± 0.04	8.07 ± 0.20	7.72 ± 0.09

หมายเหตุ ค่าเฉลี่ย $\pm$ ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน (Mean $\pm$ SD)

ค่าออกซิเจนละลายของน้ำในตู้ทดลองเลี้ยงปลานิล ที่อุณหภูมิของน้ำ 27 องศาเซลเซียส ณ ชั่วโมงที่ 1, 3, 6, 12, 24, 48, 72 และ 168 มีค่าเท่ากับ 7.59 ± 0.09 , 7.59 ± 0.09 , 7.59 ± 0.12 , 7.60 ± 0.08 , 7.65 ± 0.06 , 7.27 ± 0.05 , 7.07 ± 0.09 และ 8.07 ± 0.20 มิลลิกรัมต่อลิตร ตามลำดับ โดยพบว่าค่าออกซิเจนละลายมีการเปลี่ยนแปลงอยู่ในช่วงแคบ ๆ ค่าสูงสุดพบที่ชั่วโมงที่ 168 ซึ่งมีค่าเท่ากับ 8.07 ± 0.20 มิลลิกรัมต่อลิตร และค่าออกซิเจนละลายต่ำสุดพบที่ชั่วโมงที่ 72 ซึ่งมีค่าเท่ากับ 7.07 ± 0.09 มิลลิกรัมต่อลิตร

ค่าออกซิเจนละลายของน้ำในตู้ทดลองเลี้ยงปลานิล ที่อุณหภูมิของน้ำ 32 องศาเซลเซียส ณ ชั่วโมงที่ 1, 3, 6, 12, 24, 48, 72 และ 168 มีค่าเท่ากับ 6.97 ± 0.84 , 7.06 ± 0.07 , 7.07 ± 0.04 , 7.24 ± 0.28 , 7.13 ± 0.02 , 6.76 ± 0.05 , 6.59 ± 0.08 และ 7.72 ± 0.09 มิลลิกรัมต่อลิตร ตามลำดับ โดยพบว่าค่าออกซิเจนละลายมีการเปลี่ยนแปลงอยู่ในช่วงแคบ ๆ ค่าสูงสุดพบที่ชั่วโมงที่ 168 ซึ่งมีค่าเท่ากับ 7.72 ± 0.09 มิลลิกรัมต่อลิตร และค่าออกซิเจนละลายต่ำสุดพบที่ชั่วโมงที่ 72 ซึ่งมีค่าเท่ากับ 6.59 ± 0.08 มิลลิกรัมต่อลิตร

3. ความเป็นกรด-ด่าง ค่าความเป็นกรด-ด่างของน้ำในตู้ทดลองเลี้ยงปลานิล ที่อุณหภูมิของน้ำ 22 องศาเซลเซียส ณ ชั่วโมงที่ 1, 3, 6, 12, 24, 48, 72 และ 168 มีค่าเท่ากับ 7.57 ± 0.08 , 7.59 ± 0.10 , 7.78 ± 0.02 , 7.76 ± 0.10 , 7.76 ± 0.04 , 7.78 ± 0.16 , 7.78 ± 0.16 และ 7.98 ± 0.17 ตามลำดับ โดยพบว่าค่าความเป็นกรด-ด่าง มีการเปลี่ยนแปลงอยู่ในช่วงแคบ ๆ ค่าสูงสุดพบที่ชั่วโมงที่ 168 ซึ่งมีค่าเท่ากับ 7.98 ± 0.17 รองลงมาคือชั่วโมงที่ 6 เท่ากับ 7.78 ± 0.02 และค่าความเป็นกรด-ด่างต่ำสุดพบที่ชั่วโมงที่ 1 ซึ่งมีค่าเท่ากับ 7.57 ± 0.08 (ตารางที่ 6)

ค่าความเป็นกรด-ด่างของน้ำในตู้ทดลองเลี้ยงปลานิล ที่อุณหภูมิของน้ำ 27 องศาเซลเซียส ณ ชั่วโมงที่ 1, 3, 6, 12, 24, 48, 72 และ 168 มีค่าเท่ากับ 8.34 ± 0.02 , 8.22 ± 0.03 , 8.07 ± 0.05 , 8.05 ± 0.04 , 8.22 ± 0.03 , 8.17 ± 0.04 , 8.22 ± 0.06 และ 8.22 ± 0.03 ตามลำดับ โดยพบว่าค่าความเป็นกรด-ด่าง มีการเปลี่ยนแปลงอยู่ในช่วงแคบ ๆ ค่าสูงสุดพบที่ชั่วโมงที่ 1 ซึ่งมีค่าเท่ากับ 8.34 ± 0.02 และค่าความเป็นกรด-ด่างต่ำสุดพบที่ชั่วโมงที่ 12 ซึ่งมีค่าเท่ากับ 7.99 ± 0.03

ค่าความเป็นกรด-ด่างของน้ำในตู้ทดลองเลี้ยงปลานิล ที่อุณหภูมิของน้ำ 32 องศาเซลเซียส ณ ชั่วโมงที่ 1, 3, 6, 12, 24, 48, 72 และ 168 มีค่าเท่ากับ 8.31 ± 0.01 , 8.21 ± 0.01 , 8.05 ± 0.03 , 7.99 ± 0.03 , 8.12 ± 0.03 , 8.08 ± 0.02 , 8.13 ± 0.02 และ 8.21 ± 0.01 ตามลำดับ โดยพบว่าค่า

ความเป็นกรด-ด่าง มีการเปลี่ยนแปลงอยู่ในช่วงแคบ ๆ ค่าสูงสุดพบที่ชั่วโมงที่ 1 ซึ่งมีค่าเท่ากับ 8.31 ± 0.01 และค่าความเป็นกรด-ด่างต่ำสุดพบที่ชั่วโมงที่ 12 ซึ่งมีค่าเท่ากับ 8.05 ± 0.04

4. ความนำไฟฟ้า ค่าความนำไฟฟ้าของน้ำในตู้ทดลองเลี้ยงปลานิล ที่อุณหภูมิของน้ำ 22 องศาเซลเซียส ณ ชั่วโมงที่ 1, 3, 6, 12, 24, 48, 72 และ 168 มีค่าเท่ากับ 318.53 ± 7.65 , 320.80 ± 6.17 , 320.70 ± 9.01 , 321.43 ± 7.66 , 324.57 ± 7.47 , 330.63 ± 8.33 , 336.43 ± 7.98 และ 325.97 ± 6.64 ไมโครซีเมนส์ต่อเซนติเมตร ตามลำดับ โดยพบว่าค่าความนำไฟฟ้ามีการเปลี่ยนแปลงอยู่ในช่วงแคบ ค่าสูงสุดพบที่ชั่วโมงที่ 72 ซึ่งมีค่าเท่ากับ 336.43 ± 7.98 ไมโครซีเมนส์ต่อเซนติเมตร และค่าความนำไฟฟ้าต่ำสุดพบที่ชั่วโมงที่ 1 ซึ่งมีค่าเท่ากับ 318.53 ± 7.65 ไมโครซีเมนส์ต่อเซนติเมตร (ตารางที่ 7)

ตารางที่ 6 ความเป็นกรด-ด่างของน้ำในตู้เลี้ยงปลานิลที่มีสภาวะอุณหภูมิของน้ำที่ต่างกัน

ชั่วโมงที่	ชุดทดลอง		
	22 องศาเซลเซียส	27 องศาเซลเซียส	32 องศาเซลเซียส
1	7.57 ± 0.08	8.34 ± 0.02	8.31 ± 0.01
3	7.59 ± 0.10	8.22 ± 0.03	8.21 ± 0.01
6	7.78 ± 0.02	8.07 ± 0.05	8.05 ± 0.03
12	7.76 ± 0.10	8.05 ± 0.04	7.99 ± 0.03
24	7.76 ± 0.04	8.22 ± 0.03	8.12 ± 0.03
48	7.78 ± 0.16	8.17 ± 0.04	8.08 ± 0.02
72	7.78 ± 0.16	8.22 ± 0.06	8.13 ± 0.02
168	7.98 ± 0.17	8.22 ± 0.03	8.21 ± 0.01

หมายเหตุ ค่าเฉลี่ย $\pm$ ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน (Mean $\pm$ SD)

ตารางที่ 7 ความนำไฟฟ้าของน้ำ (ไมโครซีเมนส์ต่อเซนติเมตร) ในตู้เลี้ยงปลานิลที่มีสถานะ
อุณหภูมิของน้ำที่ต่างกัน

ชั่วโมงที่	ชุดทดลอง		
	22 องศาเซลเซียส	27 องศาเซลเซียส	32 องศาเซลเซียส
1	318.53±7.65	342.00±5.68	336.60±10.32
3	320.80±6.17	342.47±5.86	337.03±10.33
6	320.70±9.01	344.07±5.92	338.50±11.08
12	321.43±7.66	345.77±6.85	339.23±12.19
24	324.57±7.47	347.60±6.76	343.60±12.85
48	330.63±8.33	347.60±6.76	351.77±16.29
72	336.43±7.98	361.60±7.33	357.10±16.59
168	325.97±6.64	338.53±2.40	325.97±4.75

หมายเหตุ ค่าเฉลี่ย ± ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน (Mean±SD)

ค่าความนำไฟฟ้าของน้ำในตู้ทดลองเลี้ยงปลานิล ที่อุณหภูมิของน้ำ 27 องศาเซลเซียส ณ ชั่วโมงที่ 1, 3, 6, 12, 24, 48, 72 และ 168 มีค่าเท่ากับ 342.00±5.68, 342.47±5.86, 344.07±5.92, 345.77±6.85, 347.60±6.76, 347.60±6.76, 361.60±7.33 และ 338.53±2.40 ไมโครซีเมนส์ต่อเซนติเมตร ตามลำดับ โดยพบว่าค่าความนำไฟฟ้ามีการเปลี่ยนแปลงอยู่ในช่วงแคบ ค่าสูงสุดพบที่ ชั่วโมงที่ 72 ซึ่งมีค่าเท่ากับ 361.60±7.33 ไมโครซีเมนส์ต่อเซนติเมตร และค่าความนำไฟฟ้าต่ำสุดพบที่ ชั่วโมงที่ 1 ซึ่งมีค่าเท่ากับ 342.00±5.68 ไมโครซีเมนส์ต่อเซนติเมตร

ค่าความนำไฟฟ้าของน้ำในตู้ทดลองเลี้ยงปลานิล ที่อุณหภูมิของน้ำ 32 องศาเซลเซียส ณ ชั่วโมงที่ 1, 3, 6, 12, 24, 48, 72 และ 168 มีค่าเท่ากับ 336.60±10.32, 337.03±10.33, 338.50±11.08, 339.23±12.19, 343.60±12.85, 351.77±16.29, 357.10±16.59 และ 325.97±4.75 ไมโครซีเมนส์ต่อเซนติเมตร ตามลำดับ โดยพบว่าค่าความนำไฟฟ้ามีการเปลี่ยนแปลงอยู่ในช่วงแคบ ค่าสูงสุดพบที่ ชั่วโมงที่ 72 ซึ่งมีค่าเท่ากับ 357.10±16.59 ไมโครซีเมนส์ต่อเซนติเมตร และค่าความนำไฟฟ้าต่ำสุดพบที่ ชั่วโมงที่ 1 ซึ่งมีค่าเท่ากับ 336.60±10.32 ไมโครซีเมนส์ต่อเซนติเมตร

5. ความเต็ม ค่าความเต็มของน้ำในตู้ทดลองเลี้ยงปลานิล ที่อุณหภูมิของน้ำ 22, 27 และ 32 องศาเซลเซียส ณ ชั่วโมงที่ 1, 3, 6, 12, 24, 48, 72 และ 168 มีค่าเท่ากับ 0.20 ± 0.00 ส่วนในพิน ส่วน โดยไม่มีการเปลี่ยนแปลงตลอดระยะเวลาการทดลองทั้งใน 3 ชุดการทดลองที่ได้รับอุณหภูมิแตกต่างกัน (ตารางที่ 8)

ตารางที่ 8 ความเต็มของน้ำ (ส่วนในพินส่วน) ในตู้เลี้ยงปลานิลที่มีสภาวะอุณหภูมิของน้ำที่ต่างกัน

ชั่วโมงที่	ชุดทดลอง		
	22 องศาเซลเซียส	27 องศาเซลเซียส	32 องศาเซลเซียส
1	0.20 ± 0.00	0.20 ± 0.00	0.20 ± 0.00
3	0.20 ± 0.00	0.20 ± 0.00	0.20 ± 0.00
6	0.20 ± 0.00	0.20 ± 0.00	0.20 ± 0.00
12	0.20 ± 0.00	0.20 ± 0.00	0.20 ± 0.00
24	0.20 ± 0.00	0.20 ± 0.00	0.20 ± 0.00
48	0.20 ± 0.00	0.20 ± 0.00	0.20 ± 0.00
72	0.20 ± 0.00	0.20 ± 0.00	0.20 ± 0.00
168	0.20 ± 0.00	0.20 ± 0.00	0.20 ± 0.00

หมายเหตุ ค่าเฉลี่ย $\pm$ ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน (Mean $\pm$ SD)

2. การศึกษาอัตราการตายของปลานิลที่อยู่ในสถานะอุณหภูมิที่ต่างกัน ภายหลังจากได้รับเชื้อ *Streptococcus agalactiae*

อัตราการตายสะสมและค่าเฉลี่ยอัตราการตายสะสมของปลานิลที่ได้รับสถานะความเครียดจากการเปลี่ยนแปลงอุณหภูมิเป็นเวลา 168 ชั่วโมงภายหลังจากได้รับเชื้อ *S. agalactiae* ปรากฏดังในตารางที่ 9 และภาพที่ 7 ดังต่อไปนี้

ปลานิลที่อยู่ในอุณหภูมิของน้ำที่ 22 องศาเซลเซียส ที่ได้สัมผัสกับเชื้อโรค *S. agalactiae* และทำการเลี้ยงไปจนครบ 21 วัน พบว่าปลานิลเริ่มตายในวันที่ 6 ของการทดลอง โดยพบปลานิลตายไป จำนวน 1 ตัว ในวันที่ 10 จำนวน 1 ตัว ส่วนในวันที่ 17 พบปลานิลตายไป จำนวน 3 ตัว จากจำนวนปลานิลที่เลี้ยง 60 ตัว ปลานิลที่ตายไปตลอดระยะเวลาการทดลอง 21 วัน มีจำนวน 5 ตัว โดยเหลือปลานิลภายหลังสิ้นสุดการทดลองทั้งหมด จำนวน 55 ตัว พบอัตราการตายสะสมหลังที่ได้สัมผัสกับเชื้อโรค *S. agalactiae* และอยู่ในอุณหภูมิของน้ำที่ 22 องศาเซลเซียส มีค่าเท่ากับร้อยละ 8.33 ± 1.53

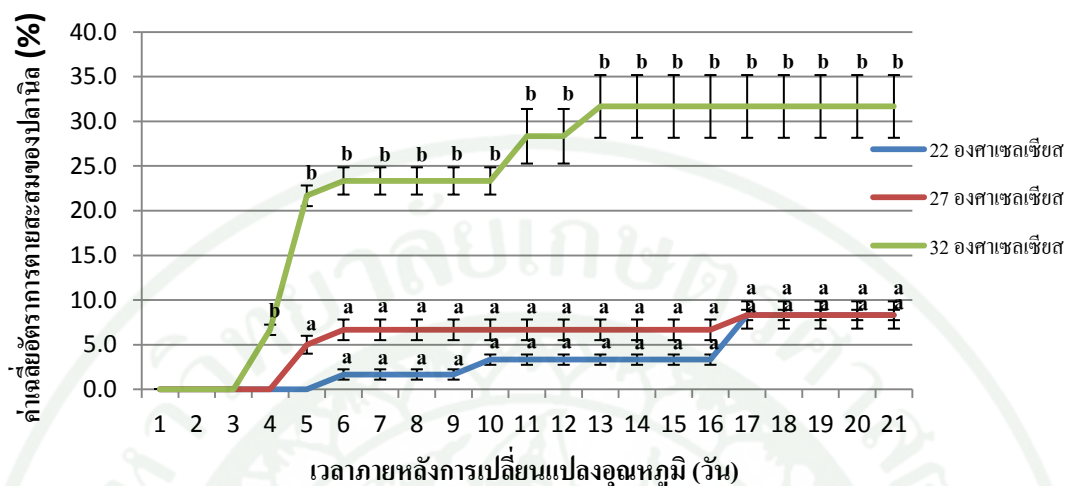
ปลานิลที่อยู่ในอุณหภูมิของน้ำที่ 27 องศาเซลเซียส ที่ได้สัมผัสกับเชื้อโรค *S. agalactiae* และทำการเลี้ยงไปจนครบ 21 วัน พบว่าปลานิลเริ่มตายในวันที่ 5 ของการทดลอง โดยพบปลานิลตายไป จำนวน 3 ตัว ในวันที่ 6 จำนวน 1 ตัว ส่วนในวันที่ 17 จำนวน 1 ตัว (เป็นปลาในตู้ที่ 2) จำนวนปลานิลที่เลี้ยง 60 ตัว มีปลานิลตายไปตลอดระยะเวลาการทดลอง 21 วัน จำนวน 5 ตัว โดยเหลือปลานิลภายหลังสิ้นสุดการทดลองทั้งหมด จำนวน 55 ตัว พบอัตราการตายสะสมหลังที่ได้สัมผัสกับเชื้อโรค *S. agalactiae* และเลี้ยงในอุณหภูมิของน้ำที่ 27 องศาเซลเซียส มีค่าเท่ากับร้อยละ 8.33 ± 0.58

ปลานิลที่อยู่ในอุณหภูมิของน้ำที่ 32 องศาเซลเซียส ที่ได้สัมผัสกับเชื้อโรค *S. agalactiae* และทำการเลี้ยงไปจนครบ 21 วัน พบว่าปลานิลเริ่มตายในวันที่ 4 ของการทดลอง โดยพบปลานิลตายไป จำนวน 4 ตัว ในวันที่ 5 จำนวน 9 ตัว ในวันที่ 6 จำนวน 1 ตัว ในวันที่ 11 จำนวน 3 ตัว ส่วนในวันที่ 13 จำนวน 2 ตัว จำนวนปลานิลที่เลี้ยง 60 ตัว มีปลานิลตายไปตลอดระยะเวลาการทดลอง 21 วัน จำนวน 19 ตัว โดยเหลือปลานิลภายหลังสิ้นสุดการทดลองทั้งหมด จำนวน 41 ตัว พบอัตราการตายสะสมหลังที่ได้สัมผัสกับเชื้อโรค *S. agalactiae* และเลี้ยงในอุณหภูมิของน้ำที่ 32 องศาเซลเซียส มีค่าเท่ากับร้อยละ 31.67 ± 3.51

ตารางที่ 9 การตายสะสมและค่าเฉลี่ยอัตราการตายสะสมของปลานิลที่เครียดจากการเปลี่ยนแปลงอุณหภูมิเป็นเวลา 168 ชั่วโมงภายหลังการได้รับเชื้อ *Streptococcus agalactiae*

วันที่	22 องศาเซลเซียส		27 องศาเซลเซียส		32 องศาเซลเซียส	
	ปลาตาย	ค่าเฉลี่ยอัตรา	ปลาตาย	ค่าเฉลี่ยอัตรา	ปลาตาย	ค่าเฉลี่ยอัตรา
	สะสม (ตัว)	การตายสะสม (%)	สะสม (ตัว)	การตายสะสม (%)	สะสม (ตัว)	การตายสะสม (%)
1	0	0±0 ^a	0	0±0 ^a	0	0±0 ^a
2	0	0±0 ^a	0	0±0 ^a	0	0±0 ^a
3	0	0±0 ^a	0	0±0 ^a	0	0±0 ^a
4	0	0±0 ^a	0	0±0 ^a	4	6.67±0.58 ^b
5	0	0±0 ^a	3	5.00±1.00 ^a	13	21.67±1.15 ^b
6	1	1.67±0.58 ^a	4	6.67±1.15 ^a	14	23.33±1.53 ^b
7	1	1.67±0.58 ^a	4	6.67±1.15 ^a	14	23.33±1.53 ^b
8	1	1.67±0.58 ^a	4	6.67±1.15 ^a	14	23.33±1.53 ^b
9	1	1.67±0.58 ^a	4	6.67±1.15 ^a	14	23.33±1.53 ^b
10	2	3.33±0.58 ^a	4	6.67±1.15 ^a	14	23.33±1.53 ^b
11	2	3.33±0.58 ^a	4	6.67±1.15 ^a	17	28.33±3.06 ^b
12	2	3.33±0.58 ^a	4	6.67±1.15 ^a	17	28.33±3.06 ^b
13	2	3.33±0.58 ^a	4	6.67±1.15 ^a	19	31.67±3.51 ^b
14	2	3.33±0.58 ^a	4	6.67±1.15 ^a	19	31.67±3.51 ^b
15	2	3.33±0.58 ^a	4	6.67±1.15 ^a	19	31.67±3.51 ^b
16	2	3.33±0.58 ^a	4	6.67±1.15 ^a	19	31.67±3.51 ^b
17	5	8.33±1.53 ^a	5	8.33±0.58 ^a	19	31.67±3.51 ^b
18	5	8.33±1.53 ^a	5	8.33±0.58 ^a	19	31.67±3.51 ^b
19	5	8.33±1.53 ^a	5	8.33±0.58 ^a	19	31.67±3.51 ^b
20	5	8.33±1.53 ^a	5	8.33±0.58 ^a	19	31.67±3.51 ^b
21	5	8.33±1.53 ^a	5	8.33±0.58 ^a	19	31.67±3.51 ^b

หมายเหตุ ค่าเฉลี่ยอัตราการตายสะสมของปลานิลที่มีพญูษณะที่แตกต่างกันที่เวลาต่าง ๆ แสดงระดับความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.05$)



ภาพที่ 7 ค่าเฉลี่ยอัตราการตายสะสมของปลานิลที่เครียดจากการเปลี่ยนแปลงอุณหภูมิเป็นเวลา 168 ชั่วโมงหลังการได้รับเชื้อ *Streptococcus agalactiae*

จากการศึกษาครั้งนี้พบว่าปลานิลที่ได้สัมผัสกับเชื้อโรค *S. agalactiae* และเลี้ยงในอุณหภูมิของน้ำที่แตกต่างกัน เมื่อพิจารณาการตายของปลานิลที่ได้ทำการทดลอง เริ่มตั้งแต่วันที่ 1 และเลี้ยงปลาต่อไปจนถึงวันที่ 21 พบปลานิลที่ได้สัมผัสกับเชื้อโรค *S. agalactiae* และเลี้ยงในอุณหภูมิของน้ำที่ 32 องศาเซลเซียส เริ่มมีปลาตายในวันที่ 4, 5 และ 6 โดยมีจำนวนปลาตายสะสมเท่ากับ 4, 13 และ 14 ตัว ตามลำดับ หลังจากนั้น พบปลาตายเพิ่มในวันที่ 11 และ 13 โดยมีจำนวนปลาตายสะสมเท่ากับ 17 และ 19 ตัว โดยมีค่าเฉลี่ยอัตราการตายสะสม $31.67 \pm 3.51\%$ ในขณะที่ปลานิลที่ได้สัมผัสกับเชื้อโรค *S. agalactiae* และเลี้ยงในอุณหภูมิของน้ำที่ 27 และ 22 องศาเซลเซียส เริ่มมีปลาตายในวันที่ 5 และ 6 ในจำนวน 3 และ 1 ตัวตามลำดับ และในวันที่ 17 พบว่าปลาทั้งสองชุดการทดลองดังกล่าว มีจำนวนปลาตายสะสมเท่ากัน คือ 5 ตัว และไม่มีปลาตายเพิ่มเลยจนถึงวันสิ้นสุดการทดลอง (วันที่ 21) โดยทั้งสองชุดการทดลองมีจำนวนปลาตายสะสม ณ วันสิ้นสุดการทดลองเท่ากันคือ 5 ตัว โดยมีค่าเฉลี่ยอัตราการตายสะสม $8.33 \pm 0.58\%$ และ $8.33 \pm 1.53\%$ ตามลำดับ

ภายใต้สภาวะการเลี้ยงปลานิลที่น้ำอุณหภูมิ 22, 27 และ 32 องศาเซลเซียส พบว่ามีค่าเฉลี่ยอัตราการตายสะสมของปลานิลที่ได้รับเชื้อโรค *S. agalactiae* เท่ากับ 8.33 ± 1.53 , 8.33 ± 0.58 และ $31.67 \pm 3.51\%$ ตามลำดับ โดยปลานิลทั้ง 3 ชุดการทดลองเริ่มตายในระยะเวลาใกล้เคียงกัน คือ ระหว่างวันที่ 4-6 หลังจากได้รับเชื้อโรคดังกล่าว โดยการเลี้ยงปลานิลที่อุณหภูมิ 32 องศาเซลเซียส

มีการตายของปลานิลเร็วกว่า และมีการตายอย่างต่อเนื่อง โดยปลานิลเริ่มตายในวันที่ 4 หลังจากการสัมผัสกับเชื้อโรค *S. agalactiae* และตายอย่างต่อเนื่องจนถึงวันที่ 13 แต่ปลานิลที่เลี้ยงที่น้ำอุณหภูมิ 27 และ 22 องศาเซลเซียส มีปลานิลเริ่มตายในวันที่ 5 และ 6 ตามลำดับ และมีการตายต่ำกว่าอย่างเห็นได้ชัด โดยผลจากการศึกษาพบว่าตั้งแต่วันที่ 4 เป็นต้นไป การตายสะสมและค่าเฉลี่ยอัตราการตายสะสมของปลานิลที่เครียดจากการเปลี่ยนแปลงอุณหภูมิเป็นเวลา 168 ชั่วโมงภายหลังการได้รับเชื้อ *S. agalactiae* ที่เลี้ยงในอุณหภูมิของน้ำที่ 32 องศาเซลเซียส มีค่าสูงกว่าชุดการทดลองเลี้ยงปลานิลที่น้ำอุณหภูมิ 22 และ 27 องศาเซลเซียสอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.05$) เพราะมีจำนวนปลาตายสะสมเพิ่มขึ้นต่อเนื่องในระหว่างวันที่ 4-13 ภายหลังที่ได้รับเชื้อ *S. agalactiae*

3. ผลของความเค็มต่อตัวบ่งชี้สถานะความเครียดของปลานิล

3.1 ผลของความเค็มต่อปริมาณ Cortisol ในปลานิล

ผลการศึกษาปริมาณ Cortisol ในซีรัมปลานิล ที่นำมาเลี้ยงในตู้ทดลองที่มีความเค็มที่แตกต่างกัน 5 ระดับ คือ 0, 5 และ 15 ส่วนในพันส่วน ตามลำดับ (treatment) ซึ่งได้เก็บตัวอย่างเลือดจากปลานิลในแต่ละตู้ ที่ช่วงเวลา 1, 3, 6, 12, 24, 48, 72, 96, 120, 144 และ 168 ชั่วโมงตามลำดับ (ตารางที่ 10 และภาพที่ 8) มีรายละเอียดดังต่อไปนี้

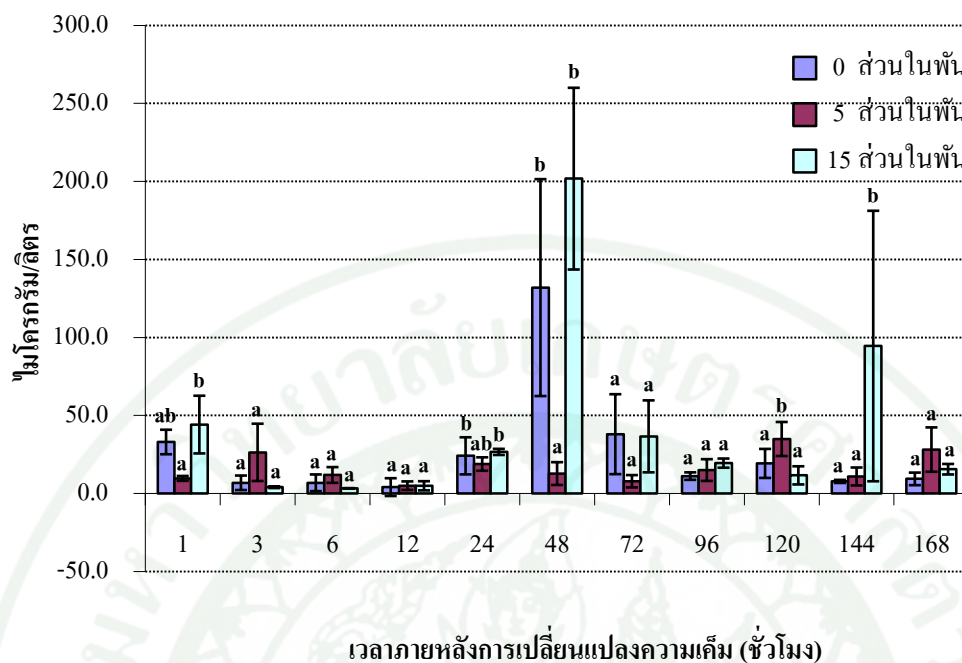
ปลานิลที่อยู่ในน้ำที่ความเค็ม 0 ส่วนในพันส่วน มีปริมาณ Cortisol ในซีรัมปลานิล ชั่วโมงที่ 1, 3, 6, 12, 24, 48, 72, 96, 120, 144 และ 168 มีค่าเท่ากับ 33.75 ± 7.85 , 6.88 ± 4.64 , 6.88 ± 5.34 , 4.12 ± 5.71 , 24.15 ± 11.88 , 131.96 ± 69.50 , 38.03 ± 25.62 , 11.17 ± 2.40 , 19.29 ± 9.29 , 7.76 ± 0.98 และ 9.39 ± 5.69 ไมโครกรัมต่อลิตร ตามลำดับ โดยพบว่าค่าปริมาณ Cortisol ในซีรัมปลานิลสูงสุดพบที่ชั่วโมงที่ 48 ซึ่งมีค่าเท่ากับ 131.96 ± 69.50 ไมโครกรัมต่อลิตร รองลงมาคือชั่วโมงที่ 72 เท่ากับ 38.03 ± 25.62 ไมโครกรัมต่อลิตร และค่าปริมาณ Cortisol ในซีรัมปลานิลต่ำสุดพบที่ชั่วโมงที่ 12 ซึ่งมีค่าเท่ากับ 4.12 ± 5.71 ไมโครกรัมต่อลิตร

ปลานิลที่อยู่ในน้ำที่ความเค็ม 5 ส่วนในพันส่วน มีปริมาณ Cortisol ในซีรัมปลานิล ชั่วโมงที่ 1, 3, 6, 12, 24, 48, 72, 96, 120, 144 และ 168 มีค่าเท่ากับ 9.69 ± 1.56 , 26.38 ± 18.36 , 11.89 ± 5.04 , 5.01 ± 2.76 , 18.90 ± 4.31 , 12.78 ± 7.31 , 7.87 ± 3.95 , 15.04 ± 6.96 , 34.95 ± 10.91 ,

ตารางที่ 10 ปริมาณ Cortisol (ไมโครกรัมต่อลิตร) ในซีรัมปลานิลที่อยู่ในน้ำความเค็มที่ต่างกัน

ชั่วโมงที่	ชุดทดลอง		
	0 ส่วนในพันส่วน	5 ส่วนในพันส่วน	15 ส่วนในพันส่วน
1	33.75±7.85 ^{ab}	9.69±1.56 ^a	44.19±18.48 ^b
3	7.38±4.64 ^a	26.38±18.36 ^a	4.05±0.55 ^a
6	6.88±5.34 ^a	11.89±5.04 ^a	3.30±0.17 ^a
12	4.12±5.71 ^a	5.01±2.76 ^a	4.95±2.95 ^a
24	24.15±11.88 ^b	18.90±4.31 ^{ab}	26.67±1.96 ^b
48	131.96±69.50 ^b	12.78±7.31 ^a	201.77±58.22 ^b
72	38.03±25.62 ^a	7.87±3.95 ^a	36.64±23.06 ^a
96	11.17±2.40 ^a	15.04±6.96 ^a	19.48±2.93 ^a
120	19.29±9.29 ^a	34.95±10.91 ^b	11.64±5.82 ^a
144	7.76±0.98 ^a	10.93±5.74 ^a	94.51±86.67 ^b
168	9.44±5.69 ^a	28.17±14.21 ^a	15.58±3.37 ^a

หมายเหตุ ปริมาณ Cortisol แสดงโดยค่าเฉลี่ย ± ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน (Mean±SD) และ
 พยัญชนะที่แตกต่างกันที่เวลาต่าง ๆ แสดงระดับความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทาง
 สถิติ ($P<0.05$)



ภาพที่ 8 ปริมาณ Cortisol ในซีรัมปลานิลที่อยู่ในน้ำความเค็มที่ต่างกัน

10.93±5.74 และ 28.17±14.21 ไมโครกรัมต่อลิตร ตามลำดับ โดยพบว่าค่าปริมาณ Cortisol ในซีรัมปลานิลสูงสุดพบที่ชั่วโมงที่ 120 ซึ่งมีค่าเท่ากับ 34.95±10.91 ไมโครกรัมต่อลิตร รองลงมาคือ ชั่วโมงที่ 168 เท่ากับ 28.17±14.21 ไมโครกรัมต่อลิตร และค่าปริมาณ Cortisol ในซีรัมปลานิลต่ำสุดพบที่ชั่วโมงที่ 12 ซึ่งมีค่าเท่ากับ 5.01±2.76 ไมโครกรัมต่อลิตร

ปลานิลที่อยู่ในน้ำที่ความเค็ม 15 ส่วนใน 15 ส่วน มีปริมาณ Cortisol ในซีรัมปลานิล ชั่วโมงที่ 1, 3, 6, 12, 24, 48, 72, 96, 120, 144 และ 168 มีค่าเท่ากับ 44.19±18.48, 4.05±0.55, 3.30±0.17, 4.95±2.95, 26.67±1.96, 201.77±58.22, 36.64±23.06, 19.48±2.93, 11.64±5.82, 94.51±86.67 และ 15.58±3.37 ไมโครกรัมต่อลิตร ตามลำดับ โดยพบว่าค่าปริมาณ Cortisol ในซีรัมปลานิลสูงสุดพบที่ชั่วโมงที่ 48 ซึ่งมีค่าเท่ากับ 201.77±58.22 ไมโครกรัมต่อลิตร รองลงมาคือ ชั่วโมงที่ 144 เท่ากับ 94.51±86.67 ไมโครกรัมต่อลิตร และค่าปริมาณ Cortisol ในซีรัมปลานิลต่ำสุดพบที่ชั่วโมงที่ 6 ซึ่งมีค่าเท่ากับ 3.30±0.17 ไมโครกรัมต่อลิตร 4.05±0.55

และเมื่อนำปริมาณ Cortisol ของปลาทุกกลุ่มมาพิจารณาพบว่า Cortisol ในซีรัมปลานิลหลังการกระตุ้นให้เกิดความเครียดด้วยความเค็มของน้ำที่ 15 ส่วนใน 15 ส่วนมีค่าเพิ่มขึ้นอย่าง

เห็นได้ชัดเจนและมีปริมาณสูงที่สุดเท่ากับ 201 ± 58.22 ไมโครกรัมต่อลิตร ซึ่งมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติกับปริมาณ Cortisol ในซีรัมปลานิลที่กระตุ้นให้เกิดความเครียดด้วยความเค็มของน้ำที่ 5 ส่วนในพันส่วน ที่มีค่าเท่ากับ 12.78 ± 7.31 ไมโครกรัมต่อลิตร ($P < 0.05$) แต่ไม่แตกต่างกันทางสถิติกับปริมาณ Cortisol ในซีรัมปลานิลที่กระตุ้นให้เกิดความเครียดด้วยความเค็มของน้ำที่ 0 ส่วนในพันส่วน ที่มีค่าเท่ากับ 131.96 ± 69.50 ไมโครกรัมต่อลิตร ($P > 0.05$) ในชั่วโมงที่ 48 หลังการกระตุ้นให้เกิดความเครียด ซึ่งการเปลี่ยนแปลง Cortisol ในซีรัมปลานิลหลังการกระตุ้นให้เกิดความเครียดด้วยความเค็มของน้ำที่ 0 ส่วนในพันส่วนมีค่าเพิ่มขึ้นอย่างเห็นได้ชัดเจนรองลงมาและมีปริมาณสูงที่สุดเท่ากับ 131 ± 69.50 ไมโครกรัมต่อลิตร ซึ่งมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติกับปริมาณ Cortisol ในซีรัมปลานิลที่กระตุ้นให้เกิดความเครียดด้วยความเค็มของน้ำที่ 5 ส่วนในพันส่วน ที่มีค่าเท่ากับ 12.78 ± 7.31 ไมโครกรัมต่อลิตร ($P < 0.05$) แต่ไม่แตกต่างกันทางสถิติกับปริมาณ Cortisol ในซีรัมปลานิลที่กระตุ้นให้เกิดความเครียดด้วยความเค็มของน้ำที่ 15 ส่วนในพันส่วน ที่มีค่าเท่ากับ 201 ± 58.22 ไมโครกรัมต่อลิตร ($P > 0.05$) ในชั่วโมงที่ 48 หลังการกระตุ้นให้เกิดความเครียด ส่วน Cortisol ในซีรัมปลานิลหลังการกระตุ้นให้เกิดความเครียดด้วยความเค็มของน้ำที่ 5 ส่วนในพัน มีค่าเพิ่มขึ้นช้าและมีปริมาณสูงที่สุดเท่ากับ 34.95 ± 10.91 ไมโครกรัมต่อลิตร ซึ่งมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติกับปริมาณ Cortisol ในซีรัมปลานิลที่กระตุ้นให้เกิดความเครียดด้วยความเค็มของน้ำที่ 0 ส่วนในพันส่วน และ 15 ส่วนในพันส่วน ที่มีค่าเท่ากับ 19.29 ± 9.29 และ 11.64 ± 5.82 ไมโครกรัมต่อลิตร ($P < 0.05$) ตามลำดับ ในชั่วโมงที่ 120 หลังการกระตุ้นให้เกิดความเครียด

จากผลการศึกษาพบว่าผลของความเค็มต่อปริมาณ Cortisol ในซีรัมปลานิลในแต่ละชุดการทดลอง จะเกิดขึ้นและเห็นได้ชัดเจนหลังจากช่วงระยะ 48 ชั่วโมงจากการกระตุ้นให้เกิดความเครียดด้วยความเค็มของน้ำซึ่งปลาได้สัมผัสกับความเค็มน้ำที่เปลี่ยนแปลงไป โดยพบว่า Cortisol ในซีรัมปลานิลหลังการกระตุ้นให้เกิดความเครียดด้วยความเค็มของน้ำที่ 15 ส่วนในพันส่วนมีค่าเพิ่มขึ้นเห็นได้ชัดเจนกว่า โดยสูงสุดในชั่วโมงที่ 48 รองลงมาคือการกระตุ้นให้เกิดความเครียดด้วยความเค็มของน้ำที่ 0 ส่วนในพันส่วน โดยสูงสุดในชั่วโมงที่ 48 เช่นกัน และการกระตุ้นให้เกิดความเครียดด้วยความเค็มของน้ำที่ 5 ส่วนในพันส่วนเกิดช้าที่สุดโดยสูงสุดในชั่วโมงที่ 120 ซึ่งแสดงให้เห็นว่าปลานิลจะสามารถปรับตัวให้เข้ากับสภาพการเปลี่ยนแปลงความเค็มที่เกิดขึ้นได้ในระยะเวลาหนึ่งซึ่งเป็นช่วงหลังจาก 48 ชั่วโมงเป็นต้นไป

3.2 ผลของความเค็มต่อการแสดงออกของยีน Heat Shock Protein 70 (HSP70) ในปลานิล

ผลการศึกษาการแสดงออกของยีน Heat Shock Protein 70 (HSP70) ในเหงือกปลานิล ที่นำมาเลี้ยงในตู้ทดลองที่มีสภาวะความเค็มของน้ำที่แตกต่างกัน 3 ระดับ คือ 0, 5 และ 15 ส่วนในพันส่วน ซึ่งได้เก็บตัวอย่างเหงือกจากปลานิลในแต่ละตู้ที่ช่วงเวลา 1, 3, 6, 12, 24, 48, 72 และ 168 ชั่วโมง ตามลำดับ (ตารางที่ 11 และภาพที่ 9) มีรายละเอียดดังต่อไปนี้

ปลานิลที่อยู่ในความเค็มของน้ำที่ 0 ส่วนในพันส่วน มีการแสดงออกของยีน HSP70 ในเหงือกปลา ณ ชั่วโมงที่ 1, 3, 6, 12, 24, 48, 72 และ 168 มีค่าเท่ากับ 1.38 ± 0.32 , 1.41 ± 0.27 , 1.17 ± 0.27 , 1.21 ± 0.31 , 1.60 ± 0.34 , 2.09 ± 0.15 , 1.54 ± 0.21 และ 1.58 ± 0.30 ตามลำดับ โดยพบว่าการแสดงออกของยีน HSP70 ในเหงือกปลาสูงสุดพบที่ชั่วโมงที่ 48 ซึ่งมีค่าเท่ากับ 2.09 ± 0.15 รองลงมาคือชั่วโมงที่ 24 เท่ากับ 1.60 ± 0.34 และการแสดงออกของยีน HSP70 ในเหงือกปลาต่ำสุดพบที่ชั่วโมงที่ 6 ซึ่งมีค่าเท่ากับ 1.17 ± 0.27

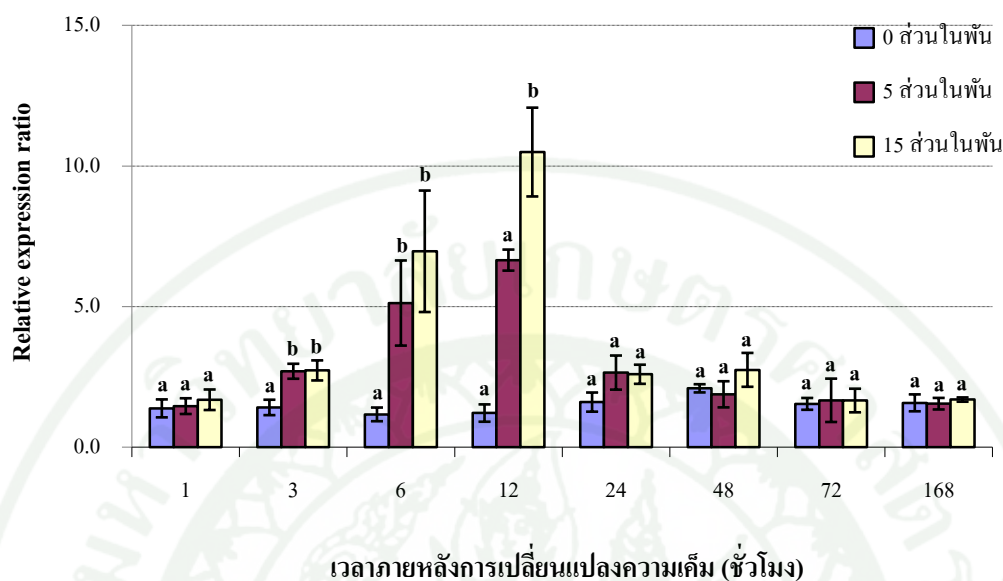
ปลานิลที่อยู่ในความเค็มของน้ำที่ 5 ส่วนในพันส่วน มีการแสดงออกของยีน HSP70 ในเหงือกปลา ณ ชั่วโมงที่ 1, 3, 6, 12, 24, 48, 72 และ 168 มีค่าเท่ากับ 1.46 ± 0.28 , 2.70 ± 0.27 , 5.13 ± 1.51 , 6.65 ± 0.37 , 2.65 ± 0.61 , 1.88 ± 0.46 , 1.67 ± 0.77 และ 1.55 ± 0.21 ตามลำดับ โดยพบว่าการแสดงออกของยีน HSP70 ในเหงือกปลาสูงสุดพบที่ชั่วโมงที่ 12 ซึ่งมีค่าเท่ากับ 6.65 ± 0.37 รองลงมาคือชั่วโมงที่ 6 เท่ากับ 5.13 ± 1.51 และการแสดงออกของยีน HSP70 ในเหงือกปลาต่ำสุดพบที่ชั่วโมงที่ 1 ซึ่งมีค่าเท่ากับ 1.46 ± 0.28

ปลานิลที่อยู่ในความเค็มของน้ำที่ 15 ส่วนในพันส่วน มีการแสดงออกของยีน HSP70 ในเหงือกปลา ณ ชั่วโมงที่ 1, 3, 6, 12, 24, 48, 72 และ 168 มีค่าเท่ากับ 1.69 ± 0.37 , 2.73 ± 0.36 , 6.97 ± 2.16 , 10.50 ± 1.58 , 2.59 ± 0.34 , 2.75 ± 0.60 , 1.66 ± 0.42 และ 1.69 ± 0.08 ตามลำดับ โดยพบว่าการแสดงออกของยีน HSP70 ในเหงือกปลาสูงสุดพบที่ชั่วโมงที่ 12 ซึ่งมีค่าเท่ากับ 10.50 ± 1.58 รองลงมาคือชั่วโมงที่ 6 เท่ากับ 6.97 ± 2.16 และการแสดงออกของยีน HSP70 ในเหงือกปลาต่ำสุดพบที่ชั่วโมงที่ 72 ซึ่งมีค่าเท่ากับ 1.66 ± 0.42

ตารางที่ 11 การแสดงออกของยีน Heat Shock Protein 70 (HSP70) ในเหงือกปลานิลที่อยู่ในความเค็มของน้ำที่ต่างกัน

ชั่วโมงที่	ชุดทดลอง		
	0 ส่วนในพันส่วน	5 ส่วนในพันส่วน	15 ส่วนในพันส่วน
1	1.38±0.32 ^a	1.46±0.28 ^a	1.69±0.37 ^a
3	1.41±0.27 ^a	2.70±0.27 ^b	2.73±0.36 ^b
6	1.17±0.27 ^a	5.13±1.51 ^b	6.97±2.16 ^b
12	1.21±0.31 ^a	6.65±0.37 ^a	10.50±1.58 ^b
24	1.60±0.34 ^a	2.65±0.61 ^a	2.59±0.34 ^a
48	2.09±0.15 ^a	1.88±0.46 ^a	2.75±0.60 ^a
72	1.54±0.21 ^a	1.67±0.77 ^a	1.66±0.42 ^a
168	1.58±0.30 ^a	1.55±0.21 ^a	1.69±0.08 ^a

หมายเหตุ ค่าของการแสดงออกของยีน HSP70 แสดงโดยค่าเฉลี่ย ± ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน (Mean ±SD) และพยัญชนะที่แตกต่างกันที่เวลาต่าง ๆ แสดงระดับความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.05$)



ภาพที่ 9 การแสดงออกของยีน HSP70 ในเหงือกปลาไนที่อยู่ในความเค็มของน้ำที่ต่างกัน

และเมื่อนำค่าของการแสดงออกของยีน HSP70 ของปลาทุกกลุ่มมาพิจารณาค่าของการแสดงออกของยีน HSP70 ในเหงือกปลาไนหลังการกระตุ้นให้เกิดความเครียดด้วยความเค็มของน้ำที่ 15 ส่วนในพันมีค่าค่อย ๆ เพิ่มขึ้นและมีปริมาณสูงที่สุดเท่ากับ 10.50 ± 1.58 ซึ่งมีความเปลี่ยนแปลงในช่วงกว้างที่สุด และมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติกับค่าของการแสดงออกของยีน HSP70 ในเหงือกปลาไนที่กระตุ้นให้เกิดความเครียดด้วยความเค็มของน้ำที่ 0 ส่วนในพัน และความเค็มของน้ำที่ 5 ส่วนในพัน ที่มีค่าเท่ากับ 1.21 ± 0.31 และ 6.65 ± 0.37 ($P < 0.05$) ตามลำดับ ในชั่วโมงที่ 12 หลังการกระตุ้นให้เกิดความเครียด และค่าของการแสดงออกของยีน HSP70 ในเหงือกปลาไนหลังการกระตุ้นให้เกิดความเครียดด้วยความเค็มของน้ำที่ 5 ส่วนในพันมีค่าค่อย ๆ เพิ่มขึ้นและมีปริมาณสูงที่สุดเท่ากับ 6.65 ± 0.37 ซึ่งมีการเปลี่ยนแปลงในช่วงที่แคบกว่า และมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติกับค่าของการแสดงออกของยีน HSP70 ในเหงือกปลาไนที่กระตุ้นให้เกิดความเครียดด้วยความเค็มของน้ำที่ 15 ที่มีค่าเท่ากับ 10.50 ± 1.58 แต่ไม่แตกต่างกันทางสถิติกับค่าของการแสดงออกของยีน HSP70 ในเหงือกปลาไนหลังการกระตุ้นให้เกิดความเครียดด้วยความเค็มของน้ำที่ 0 ส่วนในพัน ที่มีค่าเท่ากับ 1.21 ± 0.31 ($P > 0.05$) ในชั่วโมงที่ 12 หลังการกระตุ้นให้เกิดความเครียด และค่าของการแสดงออกของยีน HSP70 ในเหงือกปลาไนหลังการกระตุ้นให้เกิดความเครียดด้วยความเค็มของน้ำที่ 0 ส่วนในพันมีค่าเพิ่มขึ้นช้าที่สุดโดยมี

ปริมาณสูงที่สุดเท่ากับ 2.09 ± 0.15 ซึ่งมีความเปลี่ยนแปลงในช่วงแคบที่สุด และไม่แตกต่างกันทางสถิติกับค่าของการแสดงออกของยีน HSP70 ในเหงือกปลานิลหลังการกระตุ้นให้เกิดความเครียดด้วยความเค็มของน้ำที่ 5 และ 15 ส่วนในพัน ที่มีค่าเท่ากับ 1.88 ± 0.46 และ 2.75 ± 0.60 ($P > 0.05$) ตามลำดับ ในชั่วโมงที่ 48 หลังการกระตุ้นให้เกิดความเครียด

จากผลการศึกษาพบว่าผลของความเค็มต่อค่าของการแสดงออกของยีน HSP70 ในเหงือกปลานิลในแต่ละชุดการทดลอง จะเกิดขึ้นอย่างช้า ๆ ในช่วงระยะแรกที่เกิดการกระตุ้นให้เกิดความเครียดด้วยความเค็มของน้ำซึ่งปลาได้สัมผัสกับความเค็มของน้ำที่เปลี่ยนแปลงไป โดยพบว่าค่าของการแสดงออกของยีน HSP70 ในเหงือกปลานิลหลังการกระตุ้นให้เกิดความเครียดด้วยความเค็มของน้ำที่ 15 ส่วนในพันมีค่าเพิ่มขึ้นรวดเร็วที่สุดและมีความเปลี่ยนแปลงในช่วงกว้างที่สุดโดยสูงสุดในชั่วโมงที่ 12 เช่นเดียวกันกับการกระตุ้นให้เกิดความเครียดด้วยความเค็มของน้ำที่ 5 ส่วนในพัน โดยสูงสุดในชั่วโมงที่ 12 เช่นกัน แต่มีความเปลี่ยนแปลงในช่วงที่แคบกว่า และค่าของการแสดงออกของยีน HSP70 ในเหงือกปลานิลหลังการกระตุ้นให้เกิดความเครียดด้วยความเค็มของน้ำ 0 ส่วนในพันมีค่าเพิ่มขึ้นช้าที่สุดและมีความเปลี่ยนแปลงในช่วงแคบที่สุด และหลังจากชั่วโมงที่ 48 ค่าของการแสดงออกของยีน HSP70 ในเหงือกปลานิลหลังการกระตุ้นให้เกิดความเครียดมีค่าลดน้อยลงเรื่อย ๆ และมีค่าไม่แตกต่างกันทางสถิติตามลำดับ ซึ่งแสดงให้เห็นว่าปลานิลจะสามารถปรับตัวให้เข้ากับสภาพการเปลี่ยนแปลงความเค็มที่เกิดขึ้นได้ในระยะเวลาหนึ่งเท่านั้น

3.3 คุณภาพน้ำในตู้ทดลองเลี้ยงปลานิล

ผลการศึกษาคุณภาพน้ำในตู้ทดลองเลี้ยงปลานิล ที่มีความเค็มแตกต่างกัน 3 ระดับ คือ 0, 5 และ 15 ส่วนในพันส่วน ตามลำดับ ซึ่งได้เก็บตัวอย่างน้ำไปวิเคราะห์หาค่าดัชนีคุณภาพน้ำ คือ อุณหภูมิ ออกซิเจนละลาย ค่าความเป็นกรด-ด่าง ความนำไฟฟ้า และความเค็ม ในแต่ละตู้ทดลอง ที่ช่วงเวลา 1, 3, 6, 12, 24, 48, 72, 96, 120, 144 และ 168 ชั่วโมง ตามลำดับ มีรายละเอียดดังต่อไปนี้

1. อุณหภูมิ ค่าอุณหภูมิของน้ำในตู้ทดลองเลี้ยงปลานิล ที่มีความเค็ม 0 ส่วนในพันส่วน ที่ช่วงเวลา 1, 3, 6, 12, 24, 48, 72, 96, 120, 144 และ 168 ชั่วโมง ตามลำดับ มีค่าเท่ากับ 27.73 ± 0.15 , 27.70 ± 0.12 , 27.90 ± 0.10 , 28.43 ± 0.06 , 28.37 ± 0.06 , 28.27 ± 0.06 , 28.10 ± 0.00 , 27.43 ± 0.15 , 27.47 ± 0.06 , 28.13 ± 0.06 และ 28.03 ± 0.15 องศาเซลเซียส ตามลำดับ โดยพบว่าค่าอุณหภูมิของน้ำมีการเปลี่ยนแปลงอยู่ในช่วงแคบ ๆ ค่าสูงสุดพบที่ชั่วโมงที่ 12 ซึ่งมีค่าเท่ากับ

28.37±0.06 องศาเซลเซียส และค่าอุณหภูมิของน้ำต่ำสุดพบที่ชั่วโมงที่ 96 ซึ่งมีค่าเท่ากับ 27.43±0.15 องศาเซลเซียส (ตารางที่ 12)

ตารางที่ 12 อุณหภูมิของน้ำในตู้เลี้ยงปลานิลที่มีความเค็มต่างกัน

ชั่วโมงที่	ชุดทดลอง		
	0 ส่วนในพันส่วน	5 ส่วนในพันส่วน	15 ส่วนในพันส่วน
1	27.73±0.15	27.33±0.06	27.10±0.00
3	27.70±0.12	27.43±0.06	27.23±0.00
6	27.90±0.10	27.63±0.06	27.47±0.06
12	28.43±0.06	28.13±0.06	28.07±0.15
24	28.37±0.06	28.17±0.12	28.00±0.00
48	28.27±0.06	28.20±0.10	27.97±0.06
72	28.10±0.00	28.10±0.10	27.93±0.06
96	27.43±0.15	27.67±0.21	27.40±0.10
120	27.47±0.06	27.43±0.06	27.33±0.06
144	28.13±0.06	28.10±0.00	28.07±0.06
168	28.03±0.15	28.07±0.15	28.07±0.06

หมายเหตุ ค่าเฉลี่ย ± ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน (Mean ±SD)

ค่าอุณหภูมิของน้ำในตู้ทดลองเลี้ยงปลานิล ที่มีความเค็ม 5 ส่วนในพันส่วน ที่ช่วงเวลา 1, 3, 6, 12, 24, 48, 72, 96, 120, 144 และ 168 ชั่วโมง ตามลำดับ มีค่าเท่ากับ 27.33±0.06, 27.43±0.06, 27.63±0.06, 28.13±0.06, 28.17±0.12, 28.20±0.10, 28.10±0.10, 27.67±0.21, 27.43±0.06, 28.10±0.00 และ 28.07±0.15 องศาเซลเซียส ตามลำดับ โดยพบว่าค่าอุณหภูมิของน้ำมีการเปลี่ยนแปลงอยู่ในช่วงแคบ ๆ ค่าสูงสุดพบที่ชั่วโมงที่ 48 ซึ่งมีค่าเท่ากับ 28.20±0.10 องศาเซลเซียส และค่าอุณหภูมิของน้ำต่ำสุดพบที่ชั่วโมงที่ 1 ซึ่งมีค่าเท่ากับ 27.33±0.06 องศาเซลเซียส

ค่าอุณหภูมิของน้ำในตู้ทดลองเลี้ยงปลานิล ที่มีความเค็ม 15 ส่วนในพันส่วน ที่ช่วงเวลา 1, 3, 6, 12, 24, 48, 72, 96, 120, 144 และ 168 ชั่วโมง ตามลำดับ มีค่าเท่ากับ 27.10±0.00,

27.23 $\pm$ 0.00, 27.47 $\pm$ 0.06, 28.07 $\pm$ 0.15, 28.00 $\pm$ 0.00, 27.97 $\pm$ 0.06, 27.93 $\pm$ 0.06, 27.40 $\pm$ 0.10, 27.33 $\pm$ 0.06, 28.07 $\pm$ 0.06 และ 28.07 $\pm$ 0.06 องศาเซลเซียส ตามลำดับ โดยพบว่าค่าอุณหภูมิของน้ำมีการเปลี่ยนแปลงอยู่ในช่วงแคบ ๆ ค่าสูงสุดพบที่ชั่วโมงที่ 12 ซึ่งมีค่าเท่ากับ 28.07 $\pm$ 0.15 องศาเซลเซียส และค่าอุณหภูมิของน้ำต่ำสุดพบที่ชั่วโมงที่ 1 ซึ่งมีค่าเท่ากับ 27.10 $\pm$ 0.00 องศาเซลเซียส

2. ออกซิเจนละลาย ค่าออกซิเจนละลายน้ำในตู้ทดลองเลี้ยงปลานิล ที่มีความเต็ม 0 ส่วนในพันส่วน ที่ช่วงเวลา 1, 3, 6, 12, 24, 48, 72, 96, 120, 144 และ 168 ชั่วโมง ตามลำดับ มีค่าเท่ากับ 6.80 $\pm$ 0.24, 6.74 $\pm$ 0.34, 6.44 $\pm$ 0.32, 6.49 $\pm$ 0.45, 6.83 $\pm$ 0.22, 6.59 $\pm$ 0.26, 6.62 $\pm$ 0.11, 6.72 $\pm$ 0.64, 6.92 $\pm$ 0.15, 7.04 $\pm$ 0.20 และ 7.10 $\pm$ 0.09 มิลลิกรัมต่อลิตร ตามลำดับ โดยพบว่าค่าออกซิเจนละลายน้ำมีการเปลี่ยนแปลงอยู่ในช่วงแคบ ๆ ค่าสูงสุดพบที่ชั่วโมงที่ 168 ซึ่งมีค่าเท่ากับ 7.10 $\pm$ 0.09 มิลลิกรัมต่อลิตร และค่าออกซิเจนละลายน้ำต่ำสุด พบที่ชั่วโมงที่ 6 ซึ่งมีค่าเท่ากับ 6.44 $\pm$ 0.32 มิลลิกรัมต่อลิตร (ตารางที่ 13)

ตารางที่ 13 ออกซิเจนละลายน้ำในตู้เลี้ยงปลานิลที่มีความเต็มของน้ำที่ต่างกัน

ชั่วโมงที่	ชุดทดลอง		
	0 ส่วนในพันส่วน	5 ส่วนในพันส่วน	15 ส่วนในพันส่วน
1	6.80 $\pm$ 0.24	7.17 $\pm$ 0.06	7.16 $\pm$ 0.11
3	6.74 $\pm$ 0.34	7.30 $\pm$ 0.09	7.29 $\pm$ 0.13
6	6.44 $\pm$ 0.32	6.98 $\pm$ 0.10	7.10 $\pm$ 0.20
12	6.49 $\pm$ 0.45	7.11 $\pm$ 0.13	7.05 $\pm$ 0.27
24	6.83 $\pm$ 0.22	7.13 $\pm$ 0.09	7.01 $\pm$ 0.17
48	6.59 $\pm$ 0.26	7.06 $\pm$ 0.07	7.00 $\pm$ 0.11
72	6.62 $\pm$ 0.11	6.95 $\pm$ 0.14	6.88 $\pm$ 0.20
96	6.72 $\pm$ 0.64	6.89 $\pm$ 0.06	6.78 $\pm$ 0.20
120	6.92 $\pm$ 0.15	7.22 $\pm$ 0.09	7.16 $\pm$ 0.22
144	7.04 $\pm$ 0.20	7.18 $\pm$ 0.07	7.11 $\pm$ 0.11
168	7.10 $\pm$ 0.09	7.25 $\pm$ 0.08	7.15 $\pm$ 0.15

หมายเหตุ ค่าเฉลี่ย $\pm$ ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน (Mean $\pm$ SD)

ค่าออกซิเจนละลายน้ำในตู้ทดลองเลี้ยงปลานิล ที่มีความเต็ม 5 ส่วนในพันส่วน ที่ช่วงเวลา 1, 3, 6, 12, 24, 48, 72, 96, 120, 144 และ 168 ชั่วโมง ตามลำดับ มีค่าเท่ากับ 7.17 ± 0.06 , 7.30 ± 0.09 , 6.98 ± 0.10 , 7.11 ± 0.13 , 7.13 ± 0.09 , 7.06 ± 0.07 , 6.95 ± 0.14 , 6.89 ± 0.06 , 7.22 ± 0.09 , 7.18 ± 0.07 และ 7.25 ± 0.08 มิลลิกรัมต่อลิตร ตามลำดับ โดยพบว่าค่าออกซิเจนละลายน้ำมีการเปลี่ยนแปลงอยู่ในช่วงแคบ ๆ ค่าสูงสุดพบที่ชั่วโมงที่ 3 ซึ่งมีค่าเท่ากับ 7.30 ± 0.09 มิลลิกรัมต่อลิตร และค่าออกซิเจนละลายน้ำต่ำสุด พบที่ชั่วโมงที่ 96 ซึ่งมีค่าเท่ากับ 6.89 ± 0.06 มิลลิกรัมต่อลิตร

ค่าออกซิเจนละลายน้ำในตู้ทดลองเลี้ยงปลานิล ที่มีความเต็ม 15 ส่วนในพันส่วน ที่ช่วงเวลา 1, 3, 6, 12, 24, 48, 72, 96, 120, 144 และ 168 ชั่วโมง ตามลำดับ มีค่าเท่ากับ 7.16 ± 0.11 , 7.29 ± 0.13 , 7.10 ± 0.20 , 7.05 ± 0.27 , 7.01 ± 0.17 , 7.00 ± 0.11 , 6.88 ± 0.20 , 6.78 ± 0.20 , 7.16 ± 0.22 , 7.11 ± 0.11 และ 7.15 ± 0.15 มิลลิกรัมต่อลิตร ตามลำดับ โดยพบว่าค่าออกซิเจนละลายน้ำมีการเปลี่ยนแปลงอยู่ในช่วงแคบ ๆ ค่าสูงสุดพบที่ชั่วโมงที่ 3 ซึ่งมีค่าเท่ากับ 7.29 ± 0.13 มิลลิกรัมต่อลิตร และค่าออกซิเจนละลายน้ำต่ำสุด พบที่ชั่วโมงที่ 96 ซึ่งมีค่าเท่ากับ 6.78 ± 0.20 มิลลิกรัมต่อลิตร

3. ความเป็นกรด-ด่าง ค่าความเป็นกรด-ด่างของน้ำในตู้ทดลองเลี้ยงปลานิล ที่มีความเต็ม 0 ส่วนในพันส่วน ที่ช่วงเวลา 1, 3, 6, 12, 24, 48, 72, 96, 120, 144 และ 168 ชั่วโมง ตามลำดับ มีค่าเท่ากับ 8.34 ± 0.03 , 8.19 ± 0.04 , 8.07 ± 0.05 , 8.08 ± 0.08 , 8.27 ± 0.09 , 8.17 ± 0.09 , 8.25 ± 0.05 , 7.93 ± 0.43 , 8.35 ± 0.08 , 8.39 ± 0.12 และ 8.43 ± 0.06 ตามลำดับ โดยพบว่าค่าความเป็นกรด-ด่างมีการเปลี่ยนแปลงอยู่ในช่วงแคบ ๆ ค่าสูงสุดพบที่ชั่วโมงที่ 168 ซึ่งมีค่าเท่ากับ 8.39 ± 0.12 และความเป็นกรด-ด่างของน้ำต่ำสุด พบที่ชั่วโมงที่ 96 ซึ่งมีค่าเท่ากับ 7.93 ± 0.43 (ตารางที่ 14)

ค่าความเป็นกรด-ด่างของน้ำในตู้ทดลองเลี้ยงปลานิล ที่มีความเต็ม 5 ส่วนในพันส่วน ที่ช่วงเวลา 1, 3, 6, 12, 24, 48, 72, 96, 120, 144 และ 168 ชั่วโมง ตามลำดับ มีค่าเท่ากับ 8.34 ± 0.02 , 8.22 ± 0.03 , 8.07 ± 0.05 , 8.05 ± 0.04 , 8.22 ± 0.03 , 8.17 ± 0.04 , 8.22 ± 0.06 , 8.16 ± 0.02 , 8.25 ± 0.04 , 8.30 ± 0.04 และ 8.32 ± 0.04 ตามลำดับ โดยพบว่าค่าความเป็นกรด-ด่างมีการเปลี่ยนแปลงอยู่ในช่วงแคบ ๆ ค่าสูงสุดพบที่ชั่วโมงที่ 1 ซึ่งมีค่าเท่ากับ 8.34 ± 0.02 และความเป็นกรด-ด่างของน้ำต่ำสุด พบที่ชั่วโมงที่ 12 ซึ่งมีค่าเท่ากับ 8.05 ± 0.04

ตารางที่ 14 ความเป็นกรด-ด่างของน้ำในตู้เลี้ยงปลานิลที่ความเค็มของน้ำที่ต่างกัน

ชั่วโมงที่	ชุดทดลอง		
	0 ส่วนในพันส่วน	5 ส่วนในพันส่วน	15 ส่วนในพันส่วน
1	8.34±0.03	8.34±0.02	8.29±0.02
3	8.19±0.04	8.22±0.03	8.21±0.01
6	8.07±0.05	8.07±0.05	8.07±0.02
12	8.08±0.08	8.05±0.04	7.95±0.06
24	8.27±0.09	8.22±0.03	8.03±0.08
48	8.17±0.09	8.17±0.04	8.02±0.07
72	8.25±0.05	8.22±0.06	8.01±0.10
96	7.93±0.43	8.16±0.02	8.01±0.13
120	8.35±0.08	8.25±0.04	8.12±0.10
144	8.39±0.12	8.30±0.04	8.14±0.08
168	8.43±0.06	8.32±0.04	8.18±0.11

หมายเหตุ ค่าเฉลี่ย ± ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน (Mean ±SD)

ค่าความเป็นกรด-ด่างของน้ำในตู้ทดลองเลี้ยงปลานิล ที่มีความเค็ม 15 ส่วนในพันส่วน ที่ช่วงเวลา 1, 3, 6, 12, 24, 48, 72, 96, 120, 144 และ 168 ชั่วโมง ตามลำดับ มีค่าเท่ากับ 8.29±0.02, 8.21±0.01, 8.07±0.02, 7.95±0.06, 8.03±0.08, 8.02±0.07, 8.01±0.10, 8.01±0.13, 8.12±0.10, 8.14± 0.08 และ 8.18±0.11 ตามลำดับ โดยพบว่าค่าความเป็นกรด-ด่างมีการเปลี่ยนแปลงอยู่ในช่วงแคบ ๆ ค่าสูงสุดพบที่ชั่วโมงที่ 1 ซึ่งมีค่าเท่ากับ 8.29±0.02 และความเป็นกรด-ด่างของน้ำต่ำสุด พบที่ชั่วโมงที่ 12 ซึ่งมีค่าเท่ากับ 7.95±0.06

4. ความนำไฟฟ้า ค่าความนำไฟฟ้าของน้ำในตู้ทดลองเลี้ยงปลานิล ที่มีความเค็ม 0 ส่วนในพันส่วน ที่ช่วงเวลา 1, 3, 6, 12, 24, 48, 72, 96, 120, 144 และ 168 ชั่วโมง ตามลำดับ มีค่าเท่ากับ 0.37±0.05, 0.35±0.01, 0.34±0.01, 0.35±0.01, 0.36±0.01, 0.37±0.02, 0.39±0.02, 0.40±0.02, 0.41±0.01, 0.42±0.01 และ 0.43±0.01 มิลลิซีเมนส์ต่อเซนติเมตร ตามลำดับ โดยพบว่าความนำไฟฟ้าของน้ำมีการเปลี่ยนแปลงอยู่ในช่วงแคบ ค่าสูงสุดพบที่ชั่วโมงที่ 168 ซึ่งมีค่าเท่ากับ

0.43 ± 0.01 มิลลิซีเมนส์ต่อเซนติเมตร และความนำไฟฟ้าของน้ำต่ำสุด พบที่ชั่วโมงที่ 6 ซึ่งมีค่าเท่ากับ 0.34 ± 0.01 มิลลิซีเมนส์ต่อเซนติเมตร (ตารางที่ 15)

ตารางที่ 15 ความนำไฟฟ้าของน้ำในตู้เลี้ยงปลานิลที่มีความเค็มของน้ำที่ต่างกัน

ชั่วโมงที่	ชุดทดลอง		
	0 ส่วนในพันส่วน	5 ส่วนในพันส่วน	15 ส่วนในพันส่วน
1	0.37 ± 0.05	9.09 ± 0.02	24.92 ± 0.04
3	0.35 ± 0.01	9.09 ± 0.03	24.92 ± 0.00
6	0.34 ± 0.01	9.09 ± 0.03	24.92 ± 0.03
12	0.35 ± 0.01	9.09 ± 0.03	24.93 ± 0.03
24	0.36 ± 0.01	9.11 ± 0.06	24.97 ± 0.04
48	0.37 ± 0.02	9.14 ± 0.04	25.00 ± 0.04
72	0.39 ± 0.02	9.13 ± 0.03	24.91 ± 0.03
96	0.40 ± 0.02	9.16 ± 0.04	24.98 ± 0.02
120	0.41 ± 0.01	9.16 ± 0.03	24.91 ± 0.03
144	0.42 ± 0.01	9.18 ± 0.04	24.98 ± 0.03
168	0.43 ± 0.01	9.18 ± 0.05	24.97 ± 0.03

หมายเหตุ ค่าเฉลี่ย $\pm$ ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน (Mean $\pm$ SD)

ค่าความนำไฟฟ้าของน้ำในตู้ทดลองเลี้ยงปลานิล ที่มีความเค็ม 5 ส่วนในพันส่วน ที่ช่วงเวลา 1, 3, 6, 12, 24, 48, 72, 96, 120, 144 และ 168 ชั่วโมง ตามลำดับ มีค่าเท่ากับ 9.09 ± 0.02 , 9.09 ± 0.03 , 9.09 ± 0.03 , 9.09 ± 0.03 , 9.11 ± 0.06 , 9.14 ± 0.04 , 9.13 ± 0.03 , 9.16 ± 0.04 , 9.16 ± 0.03 , 9.18 ± 0.04 และ 9.18 ± 0.05 มิลลิซีเมนส์ต่อเซนติเมตร ตามลำดับ โดยพบว่าความนำไฟฟ้าของน้ำมีการเปลี่ยนแปลงอยู่ในช่วงแคบ ค่าสูงสุดพบที่ชั่วโมงที่ 168 ซึ่งมีค่าเท่ากับ 9.18 ± 0.05 มิลลิซีเมนส์ต่อเซนติเมตร และความนำไฟฟ้าของน้ำต่ำสุด พบที่ชั่วโมงที่ 1 ซึ่งมีค่าเท่ากับ 9.09 ± 0.02 มิลลิซีเมนส์ต่อเซนติเมตร

ค่าความนำไฟฟ้าของน้ำในตู้ทดลองเลี้ยงปลานิล ที่มีความเค็ม 15 ส่วนในพันส่วน ที่ช่วงเวลา 1, 3, 6, 12, 24, 48, 72, 96, 120, 144 และ 168 ชั่วโมง ตามลำดับ มีค่าเท่ากับ 24.92 ± 0.04 , 24.92 ± 0.00 , 24.92 ± 0.03 , 24.93 ± 0.03 , 24.97 ± 0.04 , 25.00 ± 0.04 , 24.91 ± 0.03 , 24.98 ± 0.02 , 24.91 ± 0.03 , 24.98 ± 0.03 และ 24.97 ± 0.03 มิลลิซีเมนส์ต่อเซนติเมตร ตามลำดับ โดยพบว่าความนำไฟฟ้าของน้ำมีการเปลี่ยนแปลงอยู่ในช่วงแคบ ค่าสูงสุดพบที่ชั่วโมงที่ 48 ซึ่งมีค่าเท่ากับ 25.00 ± 0.04 มิลลิซีเมนส์ต่อเซนติเมตร และความนำไฟฟ้าของน้ำต่ำสุด พบที่ชั่วโมงที่ 72 และ 120 ซึ่งมีค่าเท่ากับ 24.91 ± 0.03 มิลลิซีเมนส์ต่อเซนติเมตร

5. ความเค็ม ค่าความเค็มของน้ำในตู้ทดลองเลี้ยงปลานิล ที่มีความเค็ม 0 ส่วนในพันส่วน ที่ช่วงเวลา 1, 3, 6, 12, 24, 48, 72, 96, 120, 144 และ 168 ชั่วโมง ตามลำดับ มีค่าเท่ากับ 0.20 ± 0.00 , 0.20 ± 0.00 , 0.20 ± 0.00 , 0.20 ± 0.00 , 0.20 ± 0.00 , 0.20 ± 0.00 , 0.20 ± 0.00 , 0.20 ± 0.00 , 0.20 ± 0.00 , 0.20 ± 0.00 , 0.20 ± 0.00 และ 0.20 ± 0.00 ส่วนในพันส่วน ตามลำดับ โดยพบว่าความเค็มของน้ำมีค่าคงที่ตลอดทุกช่วงเวลา (ตารางที่ 16)

ค่าความเค็มของน้ำในตู้ทดลองเลี้ยงปลานิล ที่มีความเค็ม 5 ส่วนในพันส่วน ที่ช่วงเวลา 1, 3, 6, 12, 24, 48, 72, 96, 120, 144 และ 168 ชั่วโมง ตามลำดับ มีค่าเท่ากับ 5.07 ± 0.06 , 5.10 ± 0.00 , 5.10 ± 0.00 , 5.07 ± 0.06 , 5.07 ± 0.06 , 5.10 ± 0.00 , 5.10 ± 0.00 , 5.10 ± 0.00 , 5.10 ± 0.00 , 5.10 ± 0.00 และ 5.10 ± 0.00 ส่วนในพันส่วน ตามลำดับ โดยพบว่าความเค็มของน้ำมีการเปลี่ยนแปลงเพียงเล็กน้อย ประมาณ 0.10 ส่วนในพันส่วนเท่านั้น

ค่าความเค็มของน้ำในตู้ทดลองเลี้ยงปลานิล ที่มีความเค็ม 15 ส่วนในพันส่วน ที่ช่วงเวลา 1, 3, 6, 12, 24, 48, 72, 96, 120, 144 และ 168 ชั่วโมง ตามลำดับ มีค่าเท่ากับ 15.10 ± 0.00 , 15.10 ± 0.00 , 15.10 ± 0.00 , 15.10 ± 0.00 , 15.13 ± 0.06 , 15.17 ± 0.06 , 15.10 ± 0.00 , 15.13 ± 0.06 , 15.10 ± 0.00 , 15.13 ± 0.06 และ 15.13 ± 0.06 ส่วนในพันส่วน ตามลำดับ โดยพบว่าความเค็มของน้ำมีการเปลี่ยนแปลงเพียงเล็กน้อยประมาณ 0.17 ส่วนในพันส่วนเท่านั้น

ตารางที่ 16 ความเค็มของน้ำในตู้เลี้ยงปลาชนิดที่มีความเค็มของน้ำที่ต่างกัน

ชั่วโมงที่	ชุดทดลอง		
	0 ส่วนในพันส่วน	5 ส่วนในพันส่วน	15 ส่วนในพันส่วน
1	0.20±0.00	5.07±0.06	15.10±0.00
3	0.20±0.00	5.10±0.00	15.10±0.00
6	0.20±0.00	5.10±0.00	15.10±0.00
12	0.20±0.00	5.07±0.06	15.10±0.00
24	0.20±0.00	5.07±0.06	15.13±0.06
48	0.20±0.00	5.10±0.00	15.17±0.06
72	0.20±0.00	5.10±0.00	15.10±0.00
96	0.20±0.00	5.10±0.00	15.13±0.06
120	0.20±0.00	5.10±0.00	15.10±0.00
144	0.20±0.00	5.10±0.00	15.13±0.06
168	0.20±0.00	5.10±0.00	15.13±0.06

หมายเหตุ ค่าเฉลี่ย ± ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน (Mean ±SD)

วิจารณ์

1. การเปรียบเทียบตัวบ่งชี้สภาวะความเครียดในปลานิลที่ถูกกระตุ้นโดยอุณหภูมิและความเค็ม

1.1 ผลของอุณหภูมิต่อปริมาณ Cortisol และการแสดงออกของยีน Heat Shock Protein 70 (HSP70) ในปลานิล

จากผลการศึกษาพบว่าผลของอุณหภูมิต่อปริมาณ Cortisol ในซีรุ่มปลานิลในแต่ละชุดการทดลอง จะเกิดขึ้นในช่วงระยะแรกที่กระตุ้นให้เกิดความเครียดด้วยอุณหภูมิของน้ำ ซึ่งปลาได้สัมผัสกับอุณหภูมิที่เปลี่ยนแปลงไป โดยพบว่า Cortisol ในซีรุ่มปลานิลหลังการกระตุ้นให้เกิดความเครียดด้วยอุณหภูมิของน้ำที่ 22 องศาเซลเซียสมีค่าเพิ่มขึ้นรวดเร็วที่สุดโดยสูงสุดในชั่วโมงที่ 6 หลังจากนั้นก็มีแนวโน้มลดลงมาอยู่ในระดับปกติอย่างเห็นได้ชัด รองลงมาคือการกระตุ้นให้เกิดความเครียดด้วยอุณหภูมิของน้ำที่ 27 องศาเซลเซียสโดยสูงสุดในชั่วโมงที่ 12 และการกระตุ้นให้เกิดความเครียดด้วยอุณหภูมิของน้ำที่ 32 องศาเซลเซียสช้าที่สุดโดยสูงสุดในชั่วโมงที่ 24 ซึ่งแสดงให้เห็นว่าปลานิลจะสามารถปรับตัวให้เข้ากับสภาพการเปลี่ยนแปลงอุณหภูมิที่เกิดขึ้นได้ในระยะเวลาหนึ่งซึ่งเป็นช่วงสั้น ๆ เท่านั้น โดยหลังจาก 6 ชั่วโมงเป็นต้นไป ปริมาณ Cortisol ในซีรุ่มปลานิลมีรูปแบบที่ไม่แน่นอน แต่หลังจากชั่วโมงที่ 48 ปริมาณ Cortisol มีแนวโน้มลดลงและมีค่าไม่แตกต่างกันทางสถิติ ซึ่งสอดคล้องกับที่ Iwama (2006) สรุปว่าในปลาทั่วไปภายหลังจากเผชิญกับความเครียด ระดับ Cortisol จะค่อย ๆ เพิ่มขึ้นจนถึงจุดสูงสุด และมักจะกลับสู่ภาวะปกติในเวลาประมาณ 6 ชั่วโมง ซึ่ง Roberson *et al.* (1987) พบว่าในปลา red drum ที่อยู่ใต้ภาวะการดูแลที่เป็นพิเศษเพื่อกระตุ้นให้ปลาเติบโตอย่างรวดเร็ว ระดับของ Cortisol จะค่อย ๆ ลดระดับลงจนกลับเข้าสู่ภาวะปกติภายในเวลา 48 ชั่วโมง ส่วนในปลา common dentex (*Dentex dentex*) นั้น Morales *et al.* (2005) พบว่าการเพิ่มขึ้นของ Cortisol จะมีทันทีหลังจากถูกจับและกลับค่อย ๆ กลับลดลงสู่ระดับปกติภายในเวลาไม่เกิน 8 ชั่วโมง ส่วนปลาไน (*Cyprinus carpio*) จะมีระดับ Cortisol เพิ่มขึ้นทันทีหลังจากถูกจับขังไว้ในกระชังที่นักตกปลานิยมใช้ขังปลา และกลับสู่ระดับปกติภายในระยะเวลา 4 ชั่วโมง (Pottinger, 1998) แต่ผลการศึกษาของ Fiess *et al.* (2007) ที่พบว่าผลของอุณหภูมิต่อปริมาณ Cortisol ในซีรุ่มปลาหมอเทศ (*Oreochromis mossambicus*) หลังการกระตุ้นให้เกิดความเครียดด้วยอุณหภูมิของน้ำที่ 20 และ 35 องศาเซลเซียสมีค่าไม่แตกต่างกันหลังจาก 168 ชั่วโมงผ่านไป แต่ปริมาณ Cortisol ในซีรุ่มปลาหมอเทศหลังการกระตุ้นให้เกิดความเครียดด้วยอุณหภูมิของน้ำที่ 28 องศาเซลเซียสมีค่าน้อยกว่าอย่างมีนัยสำคัญยิ่งเมื่อเปรียบเทียบกับที่อุณหภูมิ

20 และ 35 องศาเซลเซียส ซึ่งการที่ปลามีการปรับตัวเพื่อลดระดับ Cortisol ให้เข้าสู่ระดับปกติขึ้น เพื่อป้องกันเนื้อเยื่อถูกทำลาย ซึ่งภาวะการทำลายเนื้อเยื่อนี้จะพบได้ในปลาปลาแซลมอนที่ตาย เนื่องจากได้รับ Cortisol ในระดับสูงเป็นเวลานาน (Wendelaar-Bonga, 1997) โดยความสามารถในการขจัด สอร์โมน Cortisol ออกจากกระแสโลหิตในปลาแต่ละชนิดไม่เท่ากัน ซึ่ง Mommsen *et al.* (1999) รายงานว่าอัตรา metabolic clearance rate (MCR) ของ Cortisol ในปลาไหลอเมริกัน (*Anguilla rostrata*) มีค่า 45 มิลลิลิตรต่อกิโลกรัมต่อชั่วโมง ในขณะที่ปลา sockeye salmon มีค่าเท่ากับ 270 มิลลิลิตรต่อกิโลกรัมต่อชั่วโมง และปลา sea raven (*Hemitripterus americanus*) มีค่าสูงถึง 449 มิลลิลิตรต่อกิโลกรัมต่อชั่วโมง โดยปัจจัยสิ่งแวดล้อมที่มีผลต่อการขจัดสอร์โมน Cortisol ในร่างกายปลา คือ ความเครียด ความเค็มของน้ำที่ปลาอาศัยอยู่ วัชของปลา และสภาวะทางโภชนาการของปลา อย่างไรก็ตามพบว่าวิธีการในการเก็บตัวอย่างเพื่อศึกษาระดับ Cortisol ในร่างกายก็มีผลด้วยเช่นกัน (Barcellos *et al.*, 1999)

ส่วนผลของอุณหภูมิต่อการแสดงออกของยีน HSP70 ในเหงือกปลานิลในแต่ละชุดการทดลอง พบว่าจะเกิดขึ้นในช่วงระยะแรกที่กระตุ้นให้เกิดความเครียดด้วยอุณหภูมิของน้ำ ซึ่งปลาได้สัมผัสกับอุณหภูมิที่เปลี่ยนแปลงไป โดยพบว่าค่าของการแสดงออกของยีน HSP70 ในเหงือกปลานิลหลังการกระตุ้นให้เกิดความเครียดด้วยอุณหภูมิของน้ำที่ 22 องศาเซลเซียสมีค่าเพิ่มขึ้นรวดเร็วที่สุดโดยสูงสุดในชั่วโมงที่ 3 รองลงมาคือการกระตุ้นให้เกิดความเครียดด้วยอุณหภูมิของน้ำที่ 27 องศาเซลเซียสและอุณหภูมิของน้ำที่ 32 องศาเซลเซียส โดยสูงสุดในชั่วโมงที่ 6 การกระตุ้นให้เกิดความเครียดด้วยอุณหภูมิของน้ำที่ 27 องศาเซลเซียสมีค่าการเปลี่ยนแปลงของการแสดงออกของยีน HSP70 ในเหงือกปลานิลอยู่ในช่วงที่แคบที่สุด ส่วนการกระตุ้นให้เกิดความเครียดด้วยอุณหภูมิของน้ำที่ 32 องศาเซลเซียสมีค่าการเปลี่ยนแปลงของการแสดงออกของยีน HSP70 ในเหงือกปลานิลอยู่ในช่วงที่กว้างที่สุด และพบว่าหลังจากชั่วโมงที่ 6 ค่าของการแสดงออกของยีน HSP70 ในเหงือกปลานิลหลังการกระตุ้นให้เกิดความเครียดมีแนวโน้มลดลงเรื่อย ๆ ตามลำดับ ซึ่งแสดงให้เห็นว่าปลานิลจะสามารถปรับตัวให้เข้ากับสภาพการเปลี่ยนแปลงอุณหภูมิที่เกิดขึ้นได้ในระยะเวลาหนึ่งซึ่งเป็นช่วงเวลาด้าน ๆ แต่ยังคงมีการตอบสนองอยู่ได้ต่อเนื่องถ้าถูกกระตุ้นจากปัจจัยที่ทำให้เกิดความเครียดซึ่งเปลี่ยนแปลงไปมาก โดยพบว่าหลังจากชั่วโมงที่ 6 ปริมาณ HSP70 ในเหงือกปลานิลหลังการกระตุ้นให้เกิดความเครียดด้วยอุณหภูมิของน้ำที่ 32 องศาเซลเซียสมีค่าสูงกว่าอย่างแตกต่างกันทางสถิติเมื่อเทียบกับที่อุณหภูมิ 22 และ 27 องศาเซลเซียส ซึ่ง Mazur (1996) ได้รายงานว่าการเพิ่มขึ้นของ HSP70 ในเหงือก ปลา ไตส่วนหน้า และกล้ามเนื้อ ของปลาที่ถูกกระตุ้นด้วยความร้อนเป็นเวลา 2 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิ 10 องศาเซลเซียส

(12.4-22.4 องศาเซลเซียส) เช่นกัน โดย HSP70 จะเพิ่มปริมาณขึ้นในเนื้อเยื่อทุกชนิด (ยกเว้นในกล้ามเนื้อ) หลังจากอยู่ในสภาพพักฟื้นเป็นเวลา 1 ชั่วโมง และในระยะเวลา 48 ชั่วโมง หลังจากถูกนำกลับไปเลี้ยงไว้ที่อุณหภูมิควบคุม และพบว่ามี การตรวจพบ HSP70 ในเซลล์เม็ดเลือดแดงของปลา Cutthroat trout (*Oncorhynchus clarki*) ที่ถูกกระตุ้นด้วยความร้อนเป็นระยะเวลา 2 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิ 16.2 องศาเซลเซียส (6.2-22.4 องศาเซลเซียส) และระดับ HSP70 ไม่มีการเปลี่ยนแปลง ภายหลังจากการพักฟื้นเป็นเวลา 1 ชั่วโมง และมีค่าเพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญ เมื่อเวลาผ่านไป 5 วัน หลังจากถูกนำกลับไปเลี้ยงไว้ที่อุณหภูมิควบคุม การคงตัวอยู่ในระดับสูงเป็นเวลานานของ HSP70 ในปลา ยังพบได้ในเนื้อเยื่อเหงือกของปลาชนิดนี้ ที่ถูกนำไปไว้ที่อุณหภูมิ 15 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 2 ชั่วโมง และการเพิ่มขึ้นของ HSP70 ยังคงมีอย่างต่อเนื่องเป็นระยะเวลา 3 สัปดาห์ ภายหลังจากที่นำปลา กลับไปเลี้ยงไว้ที่อุณหภูมิควบคุม โดย Likongwe *et al.* (1996) พบว่าปลานิล เป็นปลาที่ปรับตัวให้อยู่ในสภาพอุณหภูมิต่างกันได้ดีในช่วงกว้าง โดยสามารถปรับตัวได้ดีในการเปลี่ยนแปลงอุณหภูมิในสถานที่เลี้ยงจาก 28 องศาเซลเซียสไปเป็น 24 และ 32 องศาเซลเซียส โดยพบว่าปลาที่เลี้ยงในอุณหภูมิ 28 และ 32 องศาเซลเซียส มีอัตราการเจริญเติบโตที่ดีกว่าปลาที่เลี้ยงในอุณหภูมิที่ต่ำกว่าคือ 24 องศาเซลเซียสเล็กน้อย ซึ่งแสดงให้เห็นว่าภายหลังจากที่ปลาสามารถปรับตัวให้เข้ากับสภาพการเปลี่ยนแปลงอุณหภูมิที่เกิดขึ้นได้แล้ว ปลาจะสามารถเจริญเติบโตได้ตามปกติตามสภาพอุณหภูมิที่เปลี่ยนแปลงได้ต่อไป และ Philippart and Ruwet (1982), Sifa *et al.* (2002), Atwood *et al.* (2003) และ Charo-Karisa *et al.* (2005) ได้สรุปว่าปลานิลเป็นปลาประเภท eurythermal (ปลาที่สามารถปรับตัวให้เข้ากับสภาพการเปลี่ยนแปลงอุณหภูมิที่เกิดขึ้นได้ใน ช่วงกว้าง) ที่ทนอยู่ได้ในช่วงอุณหภูมิ 8-42 องศาเซลเซียส โดยมีช่วงที่เหมาะสมในการเจริญเติบโต อยู่ระหว่าง 31-36 องศาเซลเซียส

เมื่อนำค่าปริมาณ Cortisol และ Heat Shock Protein 70 ของปลานิลที่อยู่ในน้ำอุณหภูมิ ที่ต่างกันมาพิจารณา (ตารางที่ 17) พบว่าปริมาณ Cortisol ในซีรัมปลานิลภายหลังการกระตุ้นให้ เกิดความเครียดด้วยอุณหภูมินั้นมีแนวโน้มค่อย ๆ เพิ่มขึ้น แต่ปริมาณ Cortisol ในปลานิลที่อยู่ใน น้ำอุณหภูมิต่ำ (22 องศาเซลเซียส) เพิ่มขึ้นเร็วที่สุด โดยมีค่าสูงสุดในชั่วโมงที่ 6 รองลงมาคือที่ อุณหภูมิ 27 และ 32 องศาเซลเซียส มีค่าสูงสุดในชั่วโมงที่ 12 และ 24 ตามลำดับ ส่วนค่าของการ แสดงออกของยีน HSP70 ในเหงือกปลานิลภายหลังการกระตุ้นให้เกิดความเครียดด้วยอุณหภูมินั้น มีแนวโน้มค่อย ๆ เพิ่มขึ้นเช่นกัน แต่เกิดได้เร็วกว่าเมื่อเทียบกับการเกิดปริมาณ Cortisol โดยค่าของ การแสดงออกของยีน HSP70 ในปลานิลที่อุณหภูมิต่ำ (22 องศาเซลเซียส) เพิ่มขึ้นเร็วที่สุด โดยมี

ค่าสูงสุดในชั่วโมงที่ 3 รองลงมาคือที่อุณหภูมิ 27 และ 32 องศาเซลเซียสซึ่งมีค่าสูงสุดในชั่วโมงที่ 6

ตารางที่ 17 ปริมาณ Cortisol และการแสดงออกของยีน Heat Shock Protein 70 (HSP70) ของปลานิลที่อยู่ในน้ำอุณหภูมิที่ต่างกัน

ชั่วโมงที่	ชุดทดลอง					
	22 องศาเซลเซียส		27 องศาเซลเซียส		32 องศาเซลเซียส	
	Cortisol (มก./ล.)	HSP70	Cortisol (มก./ล.)	HSP70	Cortisol (มก./ล.)	HSP70
1	5.63 ± 5.08	0.46 ± 0.09	50.20 ± 44.54	0.45 ± 0.03	9.53 ± 8.11	0.45 ± 0.07
3	34.80 ± 26.41	6.69 ± 0.63	52.23 ± 18.88	0.66 ± 0.13	7.07 ± 9.75	4.85 ± 0.61
6	105.87 ± 25.14	5.59 ± 1.56	3.24 ± 3.41	1.95 ± 0.57	5.30 ± 3.29	12.84 ± 3.12
12	38.23 ± 42.32	1.19 ± 0.48	93.22 ± 48.80	1.06 ± 0.13	2.74 ± 3.66	6.79 ± 1.10
24	14.80 ± 17.17	1.25 ± 0.19	7.87 ± 7.70	1.56 ± 0.18	38.60 ± 24.81	2.60 ± 0.54
48	71.53 ± 24.90	2.30 ± 0.64	30.47 ± 20.97	1.46 ± 0.51	17.34 ± 19.40	1.71 ± 0.66
72	3.47 ± 4.61	1.11 ± 0.20	0.28 ± 0.26	1.22 ± 0.29	0.26 ± 0.21	5.51 ± 0.81
168	2.67 ± 1.69	1.10 ± 0.30	3.03 ± 1.42	0.70 ± 0.53	18.80 ± 13.69	2.21 ± 0.51

หมายเหตุ ค่าเฉลี่ย ± ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน (Mean ± SD)

ค่าของการแสดงออกของยีน HSP70 ในเหงือกปลานิลจะเกิดขึ้นได้เร็วหลังจากกระตุ้นให้เกิดความเครียดด้วยอุณหภูมิของน้ำ ซึ่งปลาได้สัมผัสกับอุณหภูมิที่เปลี่ยนแปลงไป โดยจะมีระยะเวลาที่มีการแสดงออกของยีน HSP70 เร็วกว่าการเกิดค่าสูงสุดของ Cortisol ในซีรัม ปลานิลภายหลังการกระตุ้นให้เกิดความเครียดด้วยอุณหภูมิที่แตกต่างกันในทุกชุดการทดลอง โดยค่าของการแสดงออกของยีน HSP70 มีแนวโน้มของรูปแบบการเปลี่ยนแปลงที่ชัดเจนกว่าการเปลี่ยนแปลงของปริมาณ Cortisol ซึ่งเห็นได้ชัดจากค่าของการแสดงออกของยีน HSP70 ในเหงือกปลานิลมีความน่าเชื่อถือกว่าค่าปริมาณ Cortisol โดยเห็นได้ชัดเจนจากค่าความแตกต่างของค่าของการแสดงออกของยีน HSP70 ในเหงือกปลานิลที่อุณหภูมิของน้ำ 27 องศาเซลเซียสนั้นมีค่าการเปลี่ยนแปลงของการแสดงออกของยีน HSP70 ในเหงือกปลานิลอยู่ในช่วงที่แคบมาก เพราะอุณหภูมิของน้ำปกติในช่วงการทดลองของอุณหภูมิที่อยู่ที่ 28-29 องศาเซลเซียส แต่ค่าปริมาณ Cortisol กลับมีความแตกต่างกันพอสมควร จึงถือว่าปริมาณ Cortisol ในซีรัมมีรูปแบบการเปลี่ยนแปลงไม่ชัดเจนและไม่สอดคล้องกับระดับความเครียดที่ปลาได้รับ เห็นได้ชัดเจนว่าการ

แสดงออกของยีน Heat Shock Protein 70 มีแนวโน้มของการเพิ่มขึ้นและลดลงที่จะเห็นได้ชัดเจนกว่าปริมาณ Cortisol ดังนั้นจึงสมควรให้ใช้การแสดงออกของยีน Heat Shock Protein 70 เป็นตัวบ่งชี้สภาวะความเครียดในปลานิล ซึ่งเกิดจากการเปลี่ยนแปลงอุณหภูมิของน้ำ และจากผลการศึกษาที่ได้พบว่าปลานิลที่อยู่ในน้ำอุณหภูมิ 32 องศาเซลเซียส มีปริมาณ HSP70 ในเหงือกหลังการกระตุ้นให้เกิดความเครียดสูงกว่าและแตกต่างกันทางสถิติเมื่อเทียบกับที่อุณหภูมิ 22 และ 27 องศาเซลเซียส ซึ่งผลการศึกษาของ Rodkhum *et al.* (2011) พบว่าการแช่ปลานิลในน้ำที่มีแบคทีเรียที่ก่อให้เกิดโรคได้ (*Streptococcus agalactiae*) จะเข้าไปเพิ่มจำนวนในตัวปลา โดยอุณหภูมิของน้ำมีผลต่อการตายสะสมของปลา ยิ่งอุณหภูมิสูง (อุณหภูมิมากกว่า 30 องศาเซลเซียสขึ้นไป) การติดเชื้อยังมีมาก และอุณหภูมิมีผลต่อการตายของปลาเช่นกัน เนื่องจากการตอบสนองต่อทั้งระบบภูมิคุ้มกันแบบจำเพาะเจาะจงและระบบภูมิคุ้มกันแบบไม่จำเพาะเจาะจง โดยในปลากระดุกเข็งจะมีค่าลดลงอย่างมีนัยสำคัญทั้งในอุณหภูมิที่สูงกว่าและต่ำกว่าช่วงอุณหภูมิปกติที่เหมาะสมสำหรับปลานิล (29-30 องศาเซลเซียส) ซึ่งจากผลการศึกษาที่ได้ในครั้งนี้นี้พบว่าค่าของการแสดงออกของยีน HSP70 ในเหงือกปลานิลหลังจากกระตุ้นให้เกิดความเครียดด้วยอุณหภูมิของน้ำ 32 องศาเซลเซียสภายหลังจากที่มีปริมาณเพิ่มขึ้นไปจนสูงสุดในชั่วโมงที่ 6 แล้วลดลงมานั้นได้มีการเพิ่มกลับขึ้นมาอีกแต่ไม่สูงเท่าก่อนหน้านั้น โดยกลับมาสูงอีกครั้งในชั่วโมงที่ 72 ทำให้สามารถกล่าวได้ว่าปลานิลยังคงมีการตอบสนองต่ออุณหภูมิที่เปลี่ยนแปลงไปอย่างต่อเนื่อง จึงเห็นสมควรนำปลานิลไปทดสอบอัตราการตายของปลานิลที่อยู่ในสภาวะอุณหภูมิที่ต่างกันต่อไปอีก 3 สัปดาห์ (21 วัน)

1.2 ผลของความเครียดต่อปริมาณ Cortisol และการแสดงออกของยีน Heat Shock Protein 70 (HSP70) ในปลานิล

จากผลการศึกษาพบว่าผลของความเครียดต่อปริมาณ Cortisol ในซีรัมปลานิลในแต่ละชุดการทดลอง จะเกิดขึ้นและเห็นได้ชัดเจนหลังจากช่วงระยะ 48 ชั่วโมงจากการกระตุ้นให้เกิดความเครียดด้วยความเค็มของน้ำซึ่งปลาได้สัมผัสกับความเค็มน้ำที่เปลี่ยนแปลงไป โดยพบว่า Cortisol ในซีรัมปลานิลหลังการกระตุ้นให้เกิดความเครียดด้วยความเค็มของน้ำที่ 15 ส่วนในพันส่วนมีค่าเพิ่มขึ้นเห็นได้ชัดเจนกว่า โดยสูงสุดในชั่วโมงที่ 48 ซึ่งสอดคล้องกับผลการศึกษาของ Kammerer *et al.* (200) ที่พบว่าผลของความเครียดต่อปริมาณ Cortisol ในซีรัมปลาหมอเทศ (*Oreochromis mossambicus*) หลังการกระตุ้นให้เกิดความเครียดด้วยความเค็มของน้ำที่ 25 ส่วนในพันส่วนมีค่าเพิ่มขึ้นเห็นได้ชัดเจนหลังจาก 3 ชั่วโมงผ่านไป โดยสูงสุดในวันที่ 3 (72 ชั่วโมง) และ

ลดลงเป็นปกติในระยะเวลา 5 วัน (120 ชั่วโมง) รองลงมาคือการกระตุ้นให้เกิดความเครียดด้วยความเค็มของน้ำที่ 0 ส่วนในพันส่วน โดยสูงสุดในชั่วโมงที่ 48 เช่นกัน และการกระตุ้นให้เกิดความเครียดด้วยความเค็มของน้ำที่ 5 ส่วนในพันส่วนเกิดซ้ำที่สุดโดยสูงสุดในชั่วโมงที่ 120 ซึ่งแสดงให้เห็นว่าปลานิลจะสามารถปรับตัวให้เข้ากับสภาพการเปลี่ยนแปลงความเค็มที่เกิดขึ้นได้ในระยะเวลาหนึ่ง โดยหลังจาก 12 ชั่วโมงเป็นต้นไป ปริมาณ Cortisol ในซีรัมปลานิลมีรูปแบบที่ไม่แน่นอน แต่หลังจากชั่วโมงที่ 48 ปริมาณ Cortisol มีแนวโน้มลดลงและมีค่าไม่แตกต่างกันทางสถิติ ซึ่งสอดคล้องกับผลการศึกษาของอุณหภูมิต่อปริมาณ Cortisol ในซีรัมปลานิลดังที่ได้กล่าวไปแล้ว

จากผลการศึกษาพบว่าผลของความเค็มต่อการแสดงออกของยีน HSP70 ในเหงือกปลานิลในแต่ละชุดการทดลอง จะเกิดขึ้นอย่างช้า ๆ ในช่วงระยะแรกที่กระตุ้นให้เกิดความเครียดด้วยความเค็มของน้ำ ซึ่งปลาได้สัมผัสกับความเค็มของน้ำที่เปลี่ยนแปลงไป โดยพบว่าค่าของการแสดงออกของยีน HSP70 ในเหงือกปลานิลหลังการกระตุ้นให้เกิดความเครียดด้วยความเค็มของน้ำที่ 15 ส่วนในพันส่วนมีค่าเพิ่มขึ้นรวดเร็วที่สุดและมีความเปลี่ยนแปลงในช่วงกว้างที่สุดโดยสูงสุดในชั่วโมงที่ 12 เช่นเดียวกับการกระตุ้นให้เกิดความเครียดด้วยความเค็มของน้ำที่ 5 ส่วนในพันส่วนโดยสูงสุดในชั่วโมงที่ 12 เช่นกัน แต่มีการเปลี่ยนแปลงในช่วงที่แคบกว่า และค่าของการแสดงออกของยีน HSP70 ในเหงือกปลานิลหลังการกระตุ้นให้เกิดความเครียดด้วยความเค็มของน้ำที่ 0 ส่วนในพันส่วนมีค่าเพิ่มขึ้นช้าที่สุดและมีการเปลี่ยนแปลงในช่วงแคบที่สุด และหลังจากชั่วโมงที่ 12 ค่าของการแสดงออกของยีน HSP70 ในเหงือกปลานิลหลังการกระตุ้นให้เกิดความเครียดยังมีแนวโน้มลดลงเรื่อย ๆ และมีค่าไม่แตกต่างกันทางสถิติตามลำดับ ซึ่งแสดงให้เห็นว่าปลานิลจะสามารถปรับตัวให้เข้ากับสภาพการเปลี่ยนแปลงความเค็มที่เกิดขึ้นได้ในระยะเวลาหนึ่งและเป็นช่วงสั้น ๆ เท่านั้น ซึ่งสอดคล้องกับผลการศึกษาของ Likongwe *et al.* (1996) ที่พบว่าปลานิลสามารถปรับตัวได้ดีในการเปลี่ยนแปลงความเค็มในสถานที่เลี้ยงจาก 0 ส่วนในพันส่วนไปเป็น 8, 12 และ 16 ส่วนในพันส่วน โดยพบว่าปลาที่เลี้ยงในทุกความเค็มมีอัตราการเจริญเติบโตไม่แตกต่างกัน ซึ่งแสดงให้เห็นว่าภายหลังจากที่ปลาสามารถปรับตัวให้เข้ากับสภาพการเปลี่ยนแปลงความเค็มที่เกิดขึ้นได้แล้ว ปลาจะสามารถเจริญเติบโตได้ตามปกติตามสภาพความเค็มที่เปลี่ยนแปลงได้ต่อไป และแสดงให้เห็นว่าความเค็มที่เปลี่ยนแปลงไปจากเดิมไม่ได้มีผลต่อการเจริญเติบโตของปลานิล และยังสอดคล้องกับผลการศึกษาของ Fridman *et al.* (2012) ที่พบว่าปลานิลเป็นปลาประเภท euryhaline (ปลาที่สามารถปรับตัวให้เข้ากับสภาพการเปลี่ยนแปลงความเค็มที่เกิดขึ้นได้ในช่วงกว้าง) ที่สามารถเจริญเติบโตได้ดีในน้ำจืดจนถึงน้ำกร่อยที่มีความเค็มของน้ำ 20 ส่วนในพันส่วน จากผลการศึกษาที่พบในครั้งนี้นำมาทำให้สามารถกล่าวได้ว่าการเปลี่ยนแปลงความเค็มของน้ำที่ใช้เลี้ยงปลานิล

มีผลต่อความเครียดของปลานิลน้อยมาก โดยมีผลเพียงในระยะเวลาสั้น ๆ เท่านั้น โดยหลังจากเวลาผ่านไปมากกว่า 12 ชั่วโมง ปลานิลจะกลับมาอยู่ในสภาพปกติแม้จะยังอาศัยอยู่ในน้ำที่มีการเปลี่ยนแปลงความเค็มก็ตาม

เมื่อนำค่าปริมาณ Cortisol และ Heat Shock Protein 70 ของปลานิลที่อยู่ในน้ำความเค็มที่ต่างกันมาพิจารณา (ตารางที่ 18) พบว่าปริมาณ Cortisol ในซีรัมปลานิลภายหลังการกระตุ้นให้เกิดความเครียดด้วยความเค็มนั้นมีแนวโน้มค่อย ๆ เพิ่มขึ้นช้า ๆ แต่ปริมาณ Cortisol ในปลานิลที่อยู่ในน้ำความเค็มสูง (15 ส่วนในพันส่วน) เพิ่มขึ้นเร็วที่สุด โดยมีค่าสูงสุดในชั่วโมงที่ 48 เช่นเดียวกับ ปริมาณ Cortisol ในปลานิลที่อยู่ในน้ำความเค็ม 0 ส่วนในพัน รองลงมาคือที่ความเค็ม 5 ส่วนในพันส่วน มีค่าสูงสุดในชั่วโมงที่ 168 ส่วนค่าของการแสดงออกของยีน HSP70 ในเหงือกปลานิลภายหลังการกระตุ้นให้เกิดความเครียดด้วยความเค็มนั้นมีแนวโน้มค่อย ๆ เพิ่มขึ้นเช่นกัน แต่เกิดได้เร็วกว่าเมื่อเทียบกับการเกิดปริมาณ Cortisol โดยค่าของการแสดงออกของยีน HSP70 ในปลานิลที่ความเค็มสูง (15 ส่วนในพันส่วน) เพิ่มขึ้นเร็วที่สุด โดยมีค่าสูงสุดในชั่วโมงที่ 12 เช่นเดียวกับค่าของการแสดงออกของยีน HSP70 ในเหงือกปลานิลที่อยู่ในน้ำความเค็มสูง 5 ส่วนในพันส่วน รองลงมาคือที่ความเค็ม 0 ส่วนในพันส่วนซึ่งมีค่าสูงสุดในชั่วโมงที่ 48

ค่าของการแสดงออกของยีน HSP70 ในเหงือกปลานิลจะเกิดขึ้นได้เร็วหลังจากกระตุ้นให้เกิดความเครียดด้วยความเค็มของน้ำซึ่งปลาได้สัมผัสกับความเค็มน้ำที่เปลี่ยนแปลงไป โดยจะมีระยะเวลาที่เกิดค่าสูงสุดของค่าของการแสดงออกของยีน HSP70 เร็วกว่าการเกิดค่าสูงสุดของ Cortisol ในซีรัมปลานิลภายหลังการกระตุ้นให้เกิดความเครียดด้วยความเค็มที่แตกต่างกันในทุกชุดการทดลอง โดยค่าของการแสดงออกของยีน HSP70 มีแนวโน้มของรูปแบบการเปลี่ยนแปลงที่ชัดเจนกว่าการเปลี่ยนแปลงของปริมาณ Cortisol ซึ่งเห็นได้ชัดจากค่าของการแสดงออกของยีน HSP70 ในเหงือกปลานิลมีความน่าเชื่อถือกว่าค่าปริมาณ Cortisol โดยเห็นได้ชัดเจนจากค่าความแตกต่างของค่าของการแสดงออกของยีน HSP70 ในเหงือกปลานิลที่ความเค็มของน้ำ 0 ส่วนในพันส่วนนั้นมีค่าการเปลี่ยนแปลงของการแสดงออกของยีน HSP70 ในเหงือกปลานิลอยู่ในช่วงที่แคบมาก เพราะความเค็มของน้ำปกติในช่วงการทดลองของความเค็มน้ำอยู่ที่ 0-1 ส่วนในพัน แต่ค่าปริมาณ Cortisol กลับมีความแตกต่างกันพอสมควร จึงถือว่าปริมาณ Cortisol ในซีรัมมีรูปแบบการเปลี่ยนแปลงไม่ชัดเจนและไม่สอดคล้องกับระดับความเครียด เห็นได้ชัดเจนว่าการแสดงออกของยีน Heat Shock Protein 70 มีแนวโน้มของการเพิ่มขึ้นและลดลงที่จะเห็นได้ชัดเจนกว่าปริมาณ Cortisol ดังนั้นจึงสมควรให้ใช้การแสดงผลของยีน Heat Shock Protein 70

เป็นตัวบ่งชี้สภาวะความเครียดในปลานิลซึ่งเกิดจากการเปลี่ยนแปลงความเค็ม แต่จากผลการศึกษาที่พบในครั้งนี้ทำให้สามารถกล่าวได้ว่าการเปลี่ยนแปลงความเค็มของน้ำที่ใช้เลี้ยงปลานิลมีผลต่อความเครียดของปลานิลน้อยมาก โดยมีผลเพียงในระยะเวลาสั้น ๆ เท่านั้น โดยหลังจากผ่านไปมากกว่า 12 ชั่วโมง ปลานิลจะกลับมามีสุขภาพปกติแม้จะยังอาศัยอยู่ในน้ำที่มีการเปลี่ยนแปลงความเค็มก็ตาม ซึ่งสอดคล้องกับที่ Likongwe *et al.* (1996) ได้ศึกษาไว้ และเป็นไปตามที่ Fridman *et al.* (2012) สรุปไว้ว่าปลานิลเป็นปลาที่สามารถปรับตัวให้เข้ากับสภาพการเปลี่ยนแปลงความเค็มที่เกิดขึ้นได้ในช่วงกว้าง ที่สามารถเจริญเติบโตได้ดีในน้ำจืดจนถึงน้ำกร่อยที่มีความเค็มของน้ำ 20 ส่วนในพันส่วน จากผลการศึกษาที่พบในครั้งนี้ทำให้สามารถกล่าวได้ว่าการเปลี่ยนแปลงความเค็มของน้ำที่ใช้เลี้ยงปลานิลมีผลต่อความเครียดของปลานิลน้อยมาก ซึ่งกิจกรรมการเลี้ยงปลานิลของไทยส่วนใหญ่อยู่ในพื้นที่น้ำจืดซึ่งมีความเค็มต่ำกว่า 15 ส่วนในพันส่วนอยู่แล้ว ดังนั้นความเค็มจึงไม่ใช่สาเหตุที่ทำให้เกิดความเครียด และผลจากการทดลองครั้งนี้พบว่าน้ำที่ระดับความเค็มตั้งแต่ 15 ส่วนในพันลงมา จะมีผลต่อปลานิลในช่วงระยะเวลาสั้น ๆ ที่ร่างกายปรับความสมดุลของเกลือแร่ในร่างกายให้เข้าสู่ความเค็มใหม่เท่านั้น ดังนั้นการตรวจวัดความเครียดในปลานิลที่เลี้ยงโดยมีการเปลี่ยนแปลงความเค็มที่สูงขึ้นในระยะยาวจึงไม่มีความจำเป็นแต่อย่างใด

ตารางที่ 18 ปริมาณ Cortisol และการแสดงออกของยีน Heat Shock Protein 70 (HSP70) ของปลานิลที่อยู่ในน้ำความเค็มที่ต่างกัน

ชั่วโมงที่	ชุดทดลอง					
	0 ส่วนในพันส่วน		5 ส่วนในพันส่วน		15 ส่วนในพันส่วน	
	Cortisol (มคก./ล.)	HSP	Cortisol (มคก./ล.)	HSP	Cortisol (มคก./ล.)	HSP
1	33.75 ± 7.85	1.38 ± 0.32	9.69 ± 1.56	1.46 ± 0.28	44.19 ± 18.48	1.69 ± 0.37
3	6.88 ± 4.64	1.41 ± 0.27	26.38 ± 18.36	2.70 ± 0.27	4.05 ± 0.55	2.73 ± 0.36
6	6.88 ± 5.34	1.17 ± 0.27	11.89 ± 5.04	5.13 ± 1.51	3.30 ± 0.17	6.97 ± 2.16
12	4.12 ± 5.71	1.21 ± 0.31	5.01 ± 2.76	6.65 ± 0.37	4.95 ± 2.95	10.50 ± 1.58
24	24.15 ± 11.88	1.60 ± 0.34	18.90 ± 4.31	2.65 ± 0.61	26.67 ± 1.96	2.59 ± 0.34
48	131.96 ± 69.50	2.09 ± 0.15	12.78 ± 7.31	1.88 ± 0.46	201.77 ± 58.22	2.75 ± 0.60
72	38.03 ± 25.62	1.54 ± 0.21	7.87 ± 3.95	1.67 ± 0.77	36.64 ± 23.06	1.66 ± 0.42
168	9.39 ± 5.69	1.58 ± 0.30	28.17 ± 14.21	1.55 ± 0.21	15.58 ± 3.37	1.69 ± 0.08

หมายเหตุ ค่าเฉลี่ย ± ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน (Mean ± SD)

1.3 คุณภาพน้ำในตู้ทดลองเลี้ยงปลานิล

1.3.1 ผลการศึกษาคุณภาพน้ำในตู้ทดลองเลี้ยงปลานิล ที่มีสภาวะอุณหภูมิของน้ำที่แตกต่างกัน

ผลการศึกษาคุณภาพน้ำในตู้ทดลองเลี้ยงปลานิล ที่มีสภาวะอุณหภูมิของน้ำที่แตกต่างกัน 3 ระดับ คือ 22, 27 และ 32 องศาเซลเซียส ตามลำดับ ซึ่งได้เก็บตัวอย่างน้ำไปวิเคราะห์หาค่าดัชนีคุณภาพน้ำ คือ ออกซิเจนละลาย ความเป็นกรด-ด่าง ความนำไฟฟ้า และความเค็มมีรายละเอียดดังต่อไปนี้

ก. ออกซิเจนละลาย ค่าออกซิเจนละลายของน้ำในตู้ทดลองเลี้ยงปลานิลที่อุณหภูมิของน้ำ 22 องศาเซลเซียส มีค่าเท่ากับ 8.18 ± 0.13 ถึง 9.16 ± 0.04 มิลลิกรัมต่อลิตร โดยพบว่าค่าออกซิเจนละลายมีการเปลี่ยนแปลงอยู่ในช่วงแคบ ๆ ค่าออกซิเจนละลายของน้ำในตู้ทดลองเลี้ยงปลานิล ที่อุณหภูมิของน้ำ 27 องศาเซลเซียส มีค่าเท่ากับ 7.27 ± 0.05 ถึง 8.07 ± 0.20 มิลลิกรัมต่อลิตร ตามลำดับ โดยพบว่าค่าออกซิเจนละลายมีการเปลี่ยนแปลงอยู่ในช่วงแคบ ๆ และค่าออกซิเจนละลายของน้ำในตู้ทดลองเลี้ยงปลานิลที่อุณหภูมิของน้ำ 32 องศาเซลเซียส มีค่าเท่ากับ 6.59 ± 0.08 ถึง 7.72 ± 0.09 มิลลิกรัมต่อลิตร โดยพบว่าค่าออกซิเจนละลายมีการเปลี่ยนแปลงอยู่ในช่วงแคบ ๆ เช่นกัน และค่าที่ได้อยู่ในเกณฑ์มาตรฐานของการดำรงชีวิตของสัตว์น้ำ (กรมประมง, 2530) คือไม่ต่ำกว่า 3.0 มิลลิกรัมต่อลิตร

ข. ความเป็นกรด-ด่าง ค่าความเป็นกรด-ด่างของน้ำในตู้ทดลองเลี้ยงปลานิลที่อุณหภูมิของน้ำ 22 องศาเซลเซียส มีค่าเท่ากับ 7.57 ± 0.08 ถึง 7.98 ± 0.17 โดยพบว่าค่าความเป็นกรด-ด่าง มีการเปลี่ยนแปลงอยู่ในช่วงแคบ ๆ ค่าความเป็นกรด-ด่างของน้ำในตู้ทดลองเลี้ยงปลานิล ที่อุณหภูมิของน้ำ 27 องศาเซลเซียส มีค่าเท่ากับ 8.05 ± 0.04 ถึง 8.34 ± 0.02 โดยพบว่าค่าความเป็นกรด-ด่าง มีการเปลี่ยนแปลงอยู่ในช่วงแคบ ๆ และค่าความเป็นกรด-ด่างของน้ำในตู้ทดลองเลี้ยงปลานิลที่อุณหภูมิของน้ำ 32 องศาเซลเซียส มีค่าเท่ากับ 7.99 ± 0.03 ถึง 8.31 ± 0.01 โดยพบว่าค่าความเป็นกรด-ด่าง มีการเปลี่ยนแปลงอยู่ในช่วงแคบ ๆ เช่นกัน และค่าที่ได้อยู่ในเกณฑ์มาตรฐานของการดำรงชีวิตของสัตว์น้ำ (กรมประมง, 2530) คืออยู่ในช่วง 5.0-9.0

ค. ความนำไฟฟ้า ค่าความนำไฟฟ้าของน้ำในตู้ทดลองเลี้ยงปลานิลที่อุณหภูมิของน้ำ 22 องศาเซลเซียส มีค่าเท่ากับ 318.53 ± 7.65 ถึง 336.43 ± 7.98 ไมโครซีเมนส์ต่อเซนติเมตร โดยพบว่าค่าความนำไฟฟ้ามีการเปลี่ยนแปลงอยู่ในช่วงแคบ ค่าความนำไฟฟ้าของน้ำในตู้ทดลองเลี้ยงปลานิลที่อุณหภูมิของน้ำ 27 องศาเซลเซียส มีค่าเท่ากับ 338.53 ± 2.40 ถึง 361.60 ± 7.33 ไมโครซีเมนส์ต่อเซนติเมตร โดยพบว่าค่าความนำไฟฟ้ามีการเปลี่ยนแปลงอยู่ในช่วงแคบ และค่าความนำไฟฟ้าของน้ำในตู้ทดลองเลี้ยงปลานิลที่อุณหภูมิของน้ำ 32 องศาเซลเซียส มีค่าเท่ากับ 325.97 ± 4.75 ถึง 357.10 ± 16.59 ไมโครซีเมนส์ต่อเซนติเมตร โดยพบว่าค่าความนำไฟฟ้ามีการเปลี่ยนแปลงอยู่ในช่วงแคบเช่นกัน

ง. ความเค็ม ค่าความเค็มของน้ำในตู้ทดลองเลี้ยงปลานิลที่อุณหภูมิของน้ำ 22, 27 และ 32 องศาเซลเซียส มีค่าเท่ากับ 0.20 ± 0.00 ส่วนในพันส่วน โดยไม่มีการเปลี่ยนแปลงตลอดระยะเวลาการทดลองทั้งใน 3 ชุดการทดลองที่ได้รับอุณหภูมิแตกต่างกัน

1.3.2 ผลการศึกษาคุณภาพน้ำในตู้ทดลองเลี้ยงปลานิล ที่มีสภาวะความเค็มของน้ำที่แตกต่างกัน

ผลการศึกษาคุณภาพน้ำในตู้ทดลองเลี้ยงปลานิล ที่มีความเค็มแตกต่างกัน 3 ระดับ คือ 0, 5 และ 15 ส่วนในพันส่วน ตามลำดับ ซึ่งได้เก็บตัวอย่างน้ำไปวิเคราะห์หาค่าดัชนีคุณภาพน้ำ คือ อุณหภูมิ ออกซิเจนละลาย ความเป็นกรด-ด่าง และความนำไฟฟ้า มีรายละเอียดดังต่อไปนี้

ก. อุณหภูมิ ค่าอุณหภูมิของน้ำในตู้ทดลองเลี้ยงปลานิลที่มีความเค็ม 0 ส่วนในพันส่วน มีค่าเท่ากับ 27.43 ± 0.15 ถึง 28.43 ± 0.06 องศาเซลเซียส โดยพบว่าค่าอุณหภูมิของน้ำมีการเปลี่ยนแปลงอยู่ในช่วงแคบ ๆ ค่าอุณหภูมิของน้ำในตู้ทดลองเลี้ยงปลานิลที่มีความเค็ม 5 ส่วนในพันส่วน มีค่าเท่ากับ 27.33 ± 0.06 ถึง 28.20 ± 0.10 องศาเซลเซียส โดยพบว่าค่าอุณหภูมิของน้ำมีการเปลี่ยนแปลงอยู่ในช่วงแคบ ๆ และค่าอุณหภูมิของน้ำในตู้ทดลองเลี้ยงปลานิลที่มีความเค็ม 15 ส่วนในพันส่วน มีค่าเท่ากับ 27.10 ± 0.00 ถึง 28.07 ± 0.15 องศาเซลเซียส โดยพบว่าค่าอุณหภูมิของน้ำมีการเปลี่ยนแปลงอยู่ในช่วงแคบ ๆ เช่นกัน และค่าที่ได้อยู่ในเกณฑ์มาตรฐานของการดำรงชีวิตของสัตว์น้ำ (กรมประมง, 2530) คืออยู่ระหว่าง 23-32 องศาเซลเซียส

ข. ออกซิเจนละลาย ค่าออกซิเจนละลายน้ำในตู้ทดลองเลี้ยงปลานิลที่มีความเค็ม 0 ส่วนในพันส่วน มีค่าเท่ากับ 6.44 ± 0.32 ถึง 7.10 ± 0.09 มิลลิกรัมต่อลิตร โดยพบว่าค่าออกซิเจนละลายน้ำมีการเปลี่ยนแปลงอยู่ในช่วงแคบ ๆ ค่าออกซิเจนละลายน้ำในตู้ทดลองเลี้ยงปลานิลที่มีความเค็ม 5 ส่วนในพันส่วน มีค่าเท่ากับ 6.89 ± 0.06 ถึง 7.25 ± 0.08 มิลลิกรัมต่อลิตร โดยพบว่าค่าออกซิเจนละลายน้ำมีการเปลี่ยนแปลงอยู่ในช่วงแคบ ๆ และค่าออกซิเจนละลายน้ำในตู้ทดลองเลี้ยงปลานิลที่มีความเค็ม 15 ส่วนในพันส่วน มีค่าเท่ากับ 6.78 ± 0.20 ถึง 7.29 ± 0.13 มิลลิกรัมต่อลิตร โดยพบว่าค่าออกซิเจนละลายน้ำมีการเปลี่ยนแปลงอยู่ในช่วงแคบ ๆ เช่นกัน และค่าที่ได้อยู่ในเกณฑ์มาตรฐานของการดำรงชีวิตของสัตว์น้ำ (กรมประมง, 2530) คือไม่ต่ำกว่า 3.0 มิลลิกรัมต่อลิตร

ค. ความเป็นกรด-ด่าง ค่าความเป็นกรด-ด่างของน้ำในตู้ทดลองเลี้ยงปลานิลที่มีความเค็ม 0 ส่วนในพันส่วน มีค่าเท่ากับ 7.93 ± 0.43 ถึง 8.43 ± 0.06 โดยพบว่าค่าความเป็นกรด-ด่างมีการเปลี่ยนแปลงอยู่ในช่วงแคบ ๆ ค่าความเป็นกรด-ด่างของน้ำในตู้ทดลองเลี้ยงปลานิลที่มีความเค็ม 5 ส่วนในพันส่วน มีค่าเท่ากับ 8.05 ± 0.04 ถึง 8.34 ± 0.028 โดยพบว่าค่าความเป็นกรด-ด่างมีการเปลี่ยนแปลงอยู่ในช่วงแคบ ๆ และค่าความเป็นกรด-ด่างของน้ำในตู้ทดลองเลี้ยงปลานิลที่มีความเค็ม 15 ส่วนในพันส่วน มีค่าเท่ากับ 7.95 ± 0.06 ถึง 8.29 ± 0.02 โดยพบว่าค่าความเป็นกรด-ด่างมีการเปลี่ยนแปลงอยู่ในช่วงแคบ ๆ เช่นกัน และค่าที่ได้อยู่ในเกณฑ์มาตรฐานของการดำรงชีวิตของสัตว์น้ำ (กรมประมง, 2530) คืออยู่ในช่วง 5.0-9.0

ง. ความนำไฟฟ้า ค่าความนำไฟฟ้าของน้ำในตู้ทดลองเลี้ยงปลานิลที่มีความเค็ม 0 ส่วนในพันส่วน มีค่าเท่ากับ 0.34 ± 0.01 ถึง 0.43 ± 0.01 มิลลิซีเมนส์ต่อเซนติเมตร โดยพบว่าความนำไฟฟ้าของน้ำมีการเปลี่ยนแปลงอยู่ในช่วงแคบ ค่าความนำไฟฟ้าของน้ำในตู้ทดลองเลี้ยงปลานิลที่มีความเค็ม 5 ส่วนในพันส่วน มีค่าเท่ากับ 9.09 ± 0.02 ถึง 9.18 ± 0.05 มิลลิซีเมนส์ต่อเซนติเมตร โดยพบว่าความนำไฟฟ้าของน้ำมีการเปลี่ยนแปลงอยู่ในช่วงแคบ และค่าความนำไฟฟ้าของน้ำในตู้ทดลองเลี้ยงปลานิลที่มีความเค็ม 15 ส่วนในพันส่วน มีค่าเท่ากับ 24.91 ± 0.03 ถึง 25.00 ± 0.04 มิลลิซีเมนส์ต่อเซนติเมตร โดยพบว่าความนำไฟฟ้าของน้ำมีการเปลี่ยนแปลงอยู่ในช่วงแคบเช่นกัน

สรุปในภาพรวมจะพบได้ว่าดัชนีคุณภาพน้ำตัวอื่น ๆ ที่ไม่ได้ใช้เป็นตัวทดสอบความเครียดในปลานิลนั้นมีความเหมาะสมต่อการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำตามเกณฑ์มาตรฐานของการ

ดำรงชีวิตของสัตว์น้ำ (กรมประมง, 2530) และมีการเปลี่ยนแปลงในระหว่างการทดลองอยู่ในช่วงแคบมาก จึงไม่ส่งผลต่อการทดสอบความเครียดของปลานิลแต่อย่างใด

2. ผลของอุณหภูมิต่อการเกิดโรค Streptococcosis ในปลานิล

การศึกษาในส่วนนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อเชื่อมโยงให้เห็นถึงความสัมพันธ์ของผลของการเกิด ความเครียดอันเป็นผลมาจากการได้รับอุณหภูมิที่แตกต่างกันและการตอบสนองของยีน HSP70 รวมทั้งการเกิดโรค Streptococcosis ซึ่งโดยทั่วไปจะพบว่าการเกิดโรสดังกล่าวจะเกิดขึ้นในช่วงฤดูร้อนซึ่งอุณหภูมิของอากาศและน้ำมีค่าสูง โดยผลการศึกษาพบว่าภายใต้สภาวะการเลี้ยงปลานิลที่ น้ำอุณหภูมิ 22, 27 และ 32 องศาเซลเซียส พบว่ามีค่าเฉลี่ยอัตราการตายสะสมของปลานิลที่ได้รับ เชื้อโรค *Streptococcus agalactiae* ที่สิ้นสุดการทดลองมีค่าเท่ากับ 8.33 ± 1.53 , 8.33 ± 0.58 และ 31.67 ± 3.51 % ตามลำดับ โดยปลานิลทั้ง 3 ชุดการทดลองเริ่มตายในระยะเวลาใกล้เคียงกัน คือ ระหว่างวันที่ 4-6 หลังจากได้รับเชื้อโรสดังกล่าว โดยการเลี้ยงปลานิลที่อุณหภูมิ 32 องศาเซลเซียส มีการตายของปลานิลเร็วกว่า และมีการตายอย่างต่อเนื่อง โดยปลานิลเริ่มตายในวันที่ 4 หลังจาก การสัมผัสกับเชื้อโรค *S. agalactiae* และตายอย่างต่อเนื่องจนถึงวันที่ 13 แต่ปลานิลที่เลี้ยงที่น้ำ อุณหภูมิ 27 และ 22 องศาเซลเซียส มีปลานิลเริ่มตายในวันที่ 5 และ 6 ตามลำดับ และมีการตายต่ำ กว่าอย่างเห็นได้ชัด โดยผลจากการศึกษาพบว่าตั้งแต่วันที่ 4 เป็นต้นไป การตายสะสมและค่าเฉลี่ย การตายสะสมของปลานิลที่เครียดจากการเปลี่ยนแปลงอุณหภูมิเป็นเวลา 168 ชั่วโมงภายหลังการ ได้รับเชื้อ *S. agalactiae* ที่เลี้ยงในอุณหภูมิของน้ำที่ 32 องศาเซลเซียส มีค่าสูงกว่าชุดการทดลอง เลี้ยงปลานิลที่น้ำอุณหภูมิ 22 และ 27 องศาเซลเซียสอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$) โดยพบว่ามี จำนวนปลาตายสะสมเพิ่มขึ้นต่อเนื่องในระหว่างวันที่ 4-13 ภายหลังที่ได้รับเชื้อ *S. agalactiae* ซึ่ง แสดงให้เห็นได้อย่างชัดเจนว่าในสภาวะที่น้ำมีอุณหภูมิ 32 องศาเซลเซียสทำให้ปลานิลมีความ ด้านทานต่อเชื้อโรค *S. agalactiae* ในระดับที่ต่ำกว่าปลาที่ได้รับเชื้อ *S. agalactiae* ที่เลี้ยงในสภาวะ ที่น้ำมีอุณหภูมิ 22 และ 27 องศาเซลเซียส ซึ่งความสัมพันธ์ดังกล่าวสอดคล้องกับการตายอัน เนื่องมาจากการเกิดโรคของปลานิลในฤดูร้อน โดยผลการศึกษาของ Rodkhum *et al.* (2011) สรุปว่าปลานิลจะมีความทนทานต่อเชื้อ *S. agalactiae* ได้น้อยลง เมื่ออุณหภูมิของน้ำมีค่า 30 องศา เซลเซียสขึ้นไป โดยอุณหภูมิของน้ำมีผลต่อการตายสะสมของปลา ยิ่งอุณหภูมิสูงการติดเชื้อยิ่ง เพิ่มขึ้น ทั้งนี้จะมีผลมาจากการตอบสนองต่อทั้งระบบภูมิคุ้มกันแบบจำเพาะเจาะจงและระบบ ภูมิคุ้มกันแบบไม่จำเพาะเจาะจงมีการทำงานได้ด้อยประสิทธิภาพลง โดยในปลากระดุกแจ่งจะมีค่า ลดลงอย่างมีนัยสำคัญทั้งในอุณหภูมิที่สูงกว่าและต่ำกว่าช่วงอุณหภูมิปกติที่เหมาะสมสำหรับปลา

นิล (29-30 องศาเซลเซียส) ซึ่งพบได้ในทำนองเดียวกันในปลาหมอเทศที่ฉีดด้วยเชื้อ *S. iniae* ซึ่งจะตายมากที่สุดในช่วงอุณหภูมิ 19 องศาเซลเซียส และ 35 องศาเซลเซียส ซึ่งอยู่นอกช่วงอุณหภูมิที่เหมาะสมในการดำรงชีวิตของปลากลุ่มนี้ นอกจากนี้ผลจากการศึกษาในครั้งนี้ก็ได้ชี้ให้เห็นอย่างชัดเจนว่าการแสดงออกของยีน Heat Shock Protein 70 ของปลานิลที่อยู่ในน้ำอุณหภูมิ 32 องศาเซลเซียสมิแนวน้ำเพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็วในช่วงชั่วโมงที่ 3-6 โดยเฉพาะกลุ่มของปลาที่ได้รับอุณหภูมิที่ 22 และ 32 องศาเซลเซียส ตามลำดับ อย่างไรก็ตามที่ชั่วโมงที่ 12-168 กลับพบว่าปลาในกลุ่มที่ได้รับอุณหภูมิที่ 32 องศาเซลเซียสเท่านั้นที่ยังคงมีการแสดงออกของยีน HSP70 สูงกว่ากลุ่มอื่นเป็นระยะอย่างมีนัยสำคัญเกือบทุกช่วงเวลา ยกเว้นชั่วโมงที่ 48 แสดงให้เห็นว่าการที่ปลาได้รับอุณหภูมิในช่วงสูงกว่าระดับที่เหมาะสมต่อการเจริญเติบโตปกติอย่างต่อเนื่อง ปลาจะมีการตอบสนองโดยการสร้าง HSP70 ออกมาอย่างต่อเนื่องเช่นกัน แสดงให้เห็นว่าที่อุณหภูมิสูงอาจมีโปรตีนที่สร้างออกมาในภาวะดังกล่าวนี้ถูกทำให้เสียสภาพ ร่างกายของปลาจึงจำเป็นต้องมีการสร้าง HSP70 ออกมาเพื่อซ่อมแซมโปรตีนที่เสียสภาพในสภาวะความเครียดดังกล่าวนี้ ซึ่งสอดคล้องกับอัตราการตายของปลาที่ได้รับเชื้อ *S. agalactiae* และอยู่ในสภาวะที่มีอุณหภูมิสูงซึ่งพบว่าการแสดงอัตราการตายออกมาอย่างต่อเนื่อง แตกต่างกับปลาในกลุ่มอื่น ๆ อย่างชัดเจน ดังนั้นการศึกษานี้จึงอาจเป็นเครื่องยืนยันถึงสาเหตุของการตายของปลาในสภาวะที่มีอุณหภูมิสูงว่าอาจเป็นผลมาจากความถดถอยของระบบภูมิคุ้มกันของปลา และความรุนแรงของเชื้อก่อโรค ซึ่งเป็นผลให้เกิดการตายในสภาวะที่มีอุณหภูมิสูงอย่างต่อเนื่อง ดังนั้น HSP70 จึงอาจเป็นอีกปัจจัยหนึ่งที่ปลาพยายามใช้ในการปรับสภาพให้ร่างกายให้รอดพ้นจากทั้งสภาวะการเกิดความเครียดอันเป็นผลของการเพิ่มอุณหภูมิ และเชื้อก่อโรคที่เข้ามาในร่างกายของตัวปลา

โดยการแสดงออกของยีน Heat Shock Protein 70 จะเห็นการเปลี่ยนแปลงได้ชัดเจนกว่าปริมาณ Cortisol กล่าวคือที่ชั่วโมงที่ 6 การแสดงออกของยีน Heat Shock Protein 70 ของปลานิลที่อยู่ในน้ำอุณหภูมิ 32 องศาเซลเซียสมีค่าสูงสุดถึง 12.84 ± 3.12 ซึ่งมีค่าสูงกว่าค่าสูงสุดของการแสดงออกของยีน Heat Shock Protein 70 ของปลานิลที่อยู่ในน้ำอุณหภูมิ 22 และ 27 องศาเซลเซียส ซึ่งมีค่าสูงสุดที่ชั่วโมง 3 และ 6 ในปริมาณ 6.69 ± 0.63 และ 1.95 ± 0.57 ตามลำดับ ซึ่งมีค่าแตกต่างกันมาก และมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ และการแสดงออกของยีน Heat Shock Protein 70 หลังการกระตุ้นให้เกิดความเครียดด้วยอุณหภูมิของน้ำที่ 22 และ 27 องศาเซลเซียสมิค่าไม่แตกต่างกันหลังจาก 168 ชั่วโมงผ่านไป แต่การแสดงออกของยีน HSP70 หลังการกระตุ้นให้เกิดความเครียดด้วยอุณหภูมิของน้ำที่ 32 องศาเซลเซียสมิค่าแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญโดยมีค่าสูงกว่าเมื่อเปรียบเทียบกับที่อุณหภูมิ 22 และ 27 องศาเซลเซียส เห็นได้อย่างชัดเจนว่าหลังจาก

ชั่วโมงที่ 6 ปริมาณ HSP70 ในเหงือกปลานิลหลังการกระตุ้นให้เกิดความเครียดด้วยอุณหภูมิของน้ำที่ 32 องศาเซลเซียสมีค่าสูงกว่าอย่างแตกต่างกันทางสถิติเมื่อเทียบกับที่อุณหภูมิ 22 และ 27 องศาเซลเซียส ซึ่งเป็นการบ่งบอกว่าปลานิลที่อยู่ในน้ำอุณหภูมิ 32 องศาเซลเซียสมีความเครียดต่อเนื่องอยู่มากที่สุด

ซึ่งโดยทั่วไปการเปลี่ยนแปลงที่ตอบสนองต่อความเครียดในปลานั้นสามารถแบ่งได้เป็น 3 ระยะคือ ระยะแรกจะเกิดการเปลี่ยนแปลงของระดับฮอร์โมนชนิดต่าง ๆ โดยเฉพาะอย่างยิ่งระดับการไหลเวียนของ Cortisol และ Catecholamines จากนั้นจะเกิดการตอบสนองในระยะที่สอง ซึ่งเกิดจากการตอบสนองของต่อมไร้ท่อ ส่งผลให้เกิดการเปลี่ยนแปลงของระดับกลูโคสในเลือด แลคเตท กรดแลคติก และไอออนชนิดต่าง ๆ เช่น คลอไรด์ ไอออน โซเดียม ไอออน และโปแตสเซียม ไอออน เป็นต้น รวมไปถึงเกิดการเปลี่ยนแปลงของระดับไกลโคเจนในเนื้อเยื่อ และการเปลี่ยนแปลงของระดับการแสดงออกของ HSP และในระยะที่สามจะมีผลต่อการเจริญเติบโต ความต้านทานโรค รวมไปถึงพฤติกรรมต่าง ๆ ของปลา ซึ่งการเปลี่ยนแปลงที่เกิดขึ้นในระยะที่สามนี้ส่งผลต่อเนื่องมาจากการตอบสนองในระยะแรกและระยะที่สอง (Barton, 2002) แต่อย่างไรก็ตาม จากผลการศึกษาครั้งนี้อัตราการตายสะสมของปลานิลที่ได้รับเชื้อโรค *S. agalactiae* กลับไม่สัมพันธ์กับปริมาณ Cortisol ในซีรัมปลานิลที่อยู่ในน้ำอุณหภูมิ 32 องศาเซลเซียส ทั้งนี้เพราะระดับของ Cortisol มีการเปลี่ยนแปลงตอบสนองที่รวดเร็วต่อความเครียดจึงมีความเป็นไปได้ว่าในขั้นตอนการจับปลาเพื่อเก็บตัวอย่างอาจส่งผลต่อการเปลี่ยนแปลงของระดับ Cortisol ในซีรัมของปลาได้ (Cleary *et al.*, 2002; Tsunoda *et al.*, 1999) ซึ่งเป็นอีกเหตุผลหนึ่งที่สมควรใช้การแสดงออกของยีน Heat Shock Protein 70 เป็นตัวบ่งชี้สถานะความเครียดในปลานิลซึ่งเกิดจากการเปลี่ยนแปลงอุณหภูมิของน้ำหรือสภาวะแวดล้อมอื่นรอบตัวปลา

จากข้อมูลในปัจจุบัน เป็นที่ทราบแน่ชัดแล้วว่า Heat Shock Protein (HSP) ส่วนใหญ่จะมีหน้าที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการช่วยม้วนพับสายโพลีเปปไทด์ให้ได้เป็นโมเลกุลโปรตีนที่ถูกต้องและสมบูรณ์ โดยมีลักษณะของการทำงานคือ การช่วยม้วนพับสายโพลีเปปไทด์ในเซลล์และกระบวนการเคลื่อนย้ายโมเลกุลโปรตีนผ่าน membrane เข้าสู่ organelle ต่าง ๆ ของเซลล์ นอกจากนี้ยังมีหน้าที่เกี่ยวข้องกับการช่วยม้วนพับโมเลกุลโปรตีนที่เสียสภาพและคลายตัวเมื่อเซลล์อยู่ภายใต้สภาวะการเกิดความเครียด ซึ่งส่วนใหญ่โปรตีนที่เพิ่งสร้างออกมาใหม่ๆ จะเสียสภาพไปตามการเกิดสภาวะความเครียด ส่งผลทำให้โปรตีนส่วนใหญ่ไม่สามารถทำหน้าที่ปกติได้ จนส่งผลให้เกิดความผิดปกติต่าง ๆ ขึ้นกับระบบการทำงานต่าง ๆ ของร่างกาย โดยเฉพาะความร้อน ถึงแม้ HSP จะ

ถูกพบว่าปริมาณเพิ่มขึ้นเมื่อได้รับความร้อนแต่ก็มีรายงานว่า HSP มีปริมาณเพิ่มขึ้นเมื่อได้รับการกระตุ้นด้วยปัจจัยทางกายภาพหรือสารเคมีบางชนิด (Morimoto *et al.*, 1994)

HSP70 ยังมีหน้าที่ในการช่วยม้วนพับสายโปรตีนที่เพิ่งสังเคราะห์ใหม่ให้มีการม้วนพับที่ถูกต้องสมบูรณ์ และช่วยสายโปรตีนที่ม้วนพับผิดปกติและไม่สามารถทำงานได้ ให้กลับมาพับได้ถูกต้องและทำงานได้อีกครั้ง รวมถึงช่วยในการเคลื่อนย้ายโปรตีนและสารชนิดต่าง ๆ เข้าไปในเซลล์ด้วย โดยเมื่ออยู่ในเซลล์จะช่วยในการม้วนพับสายโปรตีนและทำหน้าที่เป็นเหมือนตัวส่งสัญญาณเมื่อเซลล์มีความต้องการพลังงานมากขึ้นและช่วยควบคุมคุณภาพในการสังเคราะห์โปรตีนสายใหม่ให้มีโครงสร้างของโปรตีนถูกต้องและใช้งานได้ (Cooper, 2000)

บทบาทของ HSP70 ในการช่วยม้วนพับสายโปรตีนที่เพิ่งสังเคราะห์ใหม่และยังไม่สามารถทำงานได้นั้นสามารถแบ่งได้เป็น 3 หน้าที่คือ ป้องกันการรวมตัวหรือพับตัวของสายโปรตีนที่เพิ่งสังเคราะห์เสร็จ ช่วยให้สายโปรตีนม้วนพับได้ถูกต้องและสามารถทำงานได้ตามปกติ และทำหน้าที่คล้ายสารละลายในการช่วยให้สายโปรตีนที่เกิดการรวมตัวกันอยู่นั้นแยกออกจากกัน จากนั้นจึงช่วยม้วนพับสายโปรตีนให้ถูกต้องและทำงานได้ HSP70 ที่อยู่ในเซลล์นั้นจะทำหน้าที่ควบคุมไม่ให้เกิดการม้วนพับของสายโปรตีนที่ไม่ถูกต้องและช่วยควบคุมคุณภาพของโปรตีนสายใหม่ที่สังเคราะห์ขึ้นมาให้เป็นโปรตีนที่สามารถทำงานได้อย่างสมบูรณ์ (Bachelet *et al.*, 1998)

อย่างไรก็ตามจากผลการศึกษาครั้งนี้แสดงให้เห็นว่าค่าบ่งชี้ความเครียดในปลานิลที่มีความเหมาะสมและสามารถนำไปใช้เมื่อปลานิลเกิดความเครียดจากการเปลี่ยนแปลงอุณหภูมิและความเค็มคือการแสดงออกของยีน Heat Shock Protein 70 เนื่องจากมีแนวโน้มของการเปลี่ยนแปลงที่ชัดเจน อีกทั้งยังมีความสอดคล้องกับระดับของความเครียดที่เกิดขึ้นซึ่งแสดงออกสอดคล้องกับอัตราการตายของปลานิลที่มีค่าสูงในสภาวะอุณหภูมิที่สูง ซึ่งแตกต่างจากค่าบ่งชี้ค่าหนึ่งคือปริมาณ Cortisol ในซีรัมที่มีแนวโน้มของการเปลี่ยนแปลงไม่ชัดเจนนัก โดยเฉพาะในการเปลี่ยนแปลงอุณหภูมิ

ในส่วน of Cortisol นั้น แม้ว่าจะเคยเป็นตัวบ่งชี้ความเครียดที่เคยได้รับความนิยมใช้กันอย่างแพร่หลายมาก่อน แต่พบว่ามีข้อด้อยหลายประการเนื่องจาก Cortisol มีความผันแปรค่อนข้างสูงและมีปัจจัยจำกัดในการตรวจวัดมาก จึงเป็นตัวบ่งชี้ความเครียดที่อาจจะไม่ دقيق แต่นักวิจัยหลายท่านเห็นว่าไม่สมควรวัด Cortisol ออกจากดัชนีในการวัดความเครียดของปลา เช่น Mitne-

Porchas *et al.* (2009) กล่าวว่าแม้ระดับการตรวจวัดของ Cortisol จะมีความผันแปรอย่างมาก ทั้งนี้เนื่องจากปัจจัยภายในตัวปลา และจากวิธีการในการตรวจวัดค่า อย่างไรก็ตามควรนำข้อมูล Cortisol มาสัมพันธ์กับข้อมูลด้านอื่น เช่น สอร์โมนที่ก่อให้เกิดความเครียดชนิดอื่น ๆ HSPs ค่าของเม็ดโลหิต (Hematocrit) รวมไปถึงการใช้วิธีการในการตรวจวัดที่ก่อให้เกิดความเครียดต่อปลาน้อยที่สุด โดยระดับของสอร์โมน Cortisol มีความเหมาะสมสำหรับการทดลองที่ต้องการศึกษาผลกระทบแบบเฉียบพลันมากกว่าการศึกษาที่เป็นแบบเรื้อรัง (Chronic) และต้องมีการติดตามการเปลี่ยนแปลงความเครียดในช่วงระยะเวลาหนึ่ง ๆ ในการใช้ Cortisol เป็นดัชนีในการชี้วัดความเครียด ต้องมีการปรับสภาพทางสรีระวิทยาของปลาให้เข้าสู่สภาวะที่ปลาไม่มีความเครียดก่อนนำไปทดลอง ซึ่งผลจากการศึกษาครั้งนี้การที่ค่า Cortisol ในซีรัมที่มีแนวโน้มของการเปลี่ยนแปลงไม่ชัดเจนนักโดยเฉพาะในการเปลี่ยนแปลงอุณหภูมิ อาจเกิดจากการความผิดพลาดในขั้นตอนในการเก็บตัวอย่างมาตรวจวัด ซึ่งในที่นี้คือการเก็บตัวอย่างเลือดปลา โดยไม่ได้มีการวางยาสลบก่อน

ผลที่ได้จากการศึกษาในครั้งนี้ พบว่าการแสดงออกของยีน Heat Shock Protein 70 ในเหงือกสามารถแสดงให้เห็นถึงการเปลี่ยนแปลงที่ชัดเจนในการตอบสนองต่อความเครียด อย่างไรก็ตามจากการรายงานของนักวิจัยหลายท่านพบว่าการเปลี่ยนแปลงของ HSP อาจจะมีการแปรปรวนได้ด้วยปัจจัยที่เป็นสาเหตุหลายประการ เช่น ชนิดของเนื้อเยื่อที่ใช้ศึกษา ปัจจัยที่ก่อให้เกิดความเครียด ชนิดของสัตว์ที่ใช้ทดลอง อายุของสัตว์ทดลอง และฤดูกาล ดังรายละเอียดต่อไปนี้

ก. ชนิดของเนื้อเยื่อที่ใช้ศึกษาโดย Rabergh *et al.* (2000) พบว่าเนื้อเยื่อที่มาจากอวัยวะต่างกันของปลาม้าลาย มีผลต่อความเข้มข้นของ HSP ที่แตกต่างกัน กล่าวคือเหงือกซึ่งเป็นอวัยวะในกลุ่มแรกสัมผัสความร้อน และตับซึ่งเป็นอวัยวะที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการ metabolism จะมีการตอบสนองโดยการสร้าง HSP ออกมาในปริมาณมากกว่าเมื่อเทียบกับ gonad ซึ่งเป็นอวัยวะที่เกี่ยวข้องกับการสืบพันธุ์ เช่นเดียวกับ Smith *et al.* (1999) ที่พบว่าในปลา Atlantic Salmon ระยะ juvenile พบว่ามีการสังเคราะห์ HSP จากเนื้อเยื่อเหงือก เนื้อเยื่อตับ และเซลล์เม็ดเลือดแดง หลังจากถูกกระตุ้นด้วยความร้อน แต่ชนิดของ HSP ที่อวัยวะต่าง ๆ สร้างขึ้นจะมีปริมาณไม่เท่ากัน โดยเนื้อเยื่อเหงือกและเม็ดเลือดแดงจะสร้างโปรตีนที่มีน้ำหนักประมาณ 65 kDa (HSP70) ในขณะที่ตับมีการสร้างโปรตีนที่มีน้ำหนัก 86-102 kDa (HSP90, HSP70 และ HSP60) ในปริมาณที่แตกต่างกันออกไป

ข. ปัจจัยที่ก่อให้เกิดความเครียดที่ต่างกันจะมีผลต่อระดับ HSP70 โดย Airaksinen *et al.*, (2003) พบว่าปลาหมากลายมีการตอบสนองต่อสารละลายที่มีโลหะหนักต่างชนิดกัน ด้วยเวลาที่แตกต่างกัน โดยปลาจะตอบสนองต่อแคดเมียมได้เร็วกว่าทองแดง นอกจากนี้ยังพบอีกว่าเหงือกซึ่งเป็นอวัยวะที่สัมผัสกับสารละลายโลหะหนักโดยตรง จะตอบสนองต่อโลหะหนักได้เร็วที่สุด เมื่อเทียบกับเม็ดโลหิตแดงและตับ

ค. ชนิดของสัตว์ที่ใช้ทดลอง ซึ่งจะมีผลต่อระดับการแสดงออกของยีน HSP ที่ความแตกต่างกัน โดย Basu *et al.* (2001) เปรียบเทียบการตอบสนองต่อความร้อนด้วยระดับ HSP70 ในปลา 2 ชนิดซึ่งมาจากเขตร้อนได้แก่ปลานิล (*Oreochromis niloticus*) และปลาที่มาจากเขตหนาวคือปลา rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) พบว่า rainbow trout มีการสร้าง HSP70 ที่สูงกว่าปลานิลในอุณหภูมิทดลองเดียวกันอย่างมีนัยสำคัญ ส่วน Nakano and Iwama (2002) รายงานว่าปลาในสกุลเดียวกัน 2 ชนิดที่ซึ่งอยู่ในแหล่งที่อยู่อาศัยที่แตกต่างกันคือ Tidepool sculpin (*Oligocottus maculatus*) ซึ่งชอบอยู่ในแอ่งน้ำที่อยู่ในเขตน้ำแข็งในช่วงน้ำลง และปลา Fluffy sculpin (*O. synideri*) ที่ชอบอยู่ในแอ่งน้ำที่อยู่บริเวณที่น้ำลงต่ำสุด พบว่าปลาสองชนิดมีระดับความเข้มข้นของ HSP70 ในเลือดขณะเวลาน้ำลงที่ต่างกันโดยในปลา Tidepool sculpin ซึ่งมีความทนทานต่อน้ำแข็งมากกว่า จะมีระดับของ HSP70 ในตับที่สูงกว่าปลา Fluffy sculpin อย่างมีนัยสำคัญ นอกจากนี้ปลา tidepool sculpin ยังมีระดับของ HSP70 ในร่างกายที่ค่อนข้างคงที่ ซึ่งเป็นการบ่งชี้ว่าปลาชนิดนี้สามารถทนทานต่ออุณหภูมิสูงได้มากกว่า

ง. อายุของสัตว์ทดลอง Santacruz *et al.* (1997) ทำการศึกษาการแสดงออกของ HSP โดยเน้นไปที่ HSP70 ใน embryo ของปลาหมากลายระยะต่าง ๆ พบว่า embryo ที่มีอายุ 1 วันสามารถที่จะตอบสนองต่อการกระตุ้นด้วยความร้อนได้ด้วยการสร้าง HSP ในปริมาณที่ต่างกันด้วย ทั้งนี้ในสภาวะปกติลูกปลาจะมีการสร้าง HSP70 เพื่อตอบสนองต่อการเปลี่ยนแปลงรูปร่างของเซลล์บางกลุ่ม โดยเฉพาะอย่างยิ่งในส่วนที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการสร้างเซลล์ประสาท (neurogenesis) และกระบวนการสร้างกล้ามเนื้อ (somitogenesis) เนื่องจากมีการตรวจพบระดับโปรตีน HSP70 ที่มีความเข้มข้นมากในบริเวณที่จะพัฒนาไปเป็นกล้ามเนื้อ และส่วนที่ใกล้กับ notochord ซึ่งจะเปลี่ยนไปเป็นระบบประสาท อย่างไรก็ตามพบว่าสามารถตรวจพบ HSP70 ลูกปลาได้ตั้งแต่ในระยะ epiboly และค่อย ๆ เพิ่มความเข้มข้นมากขึ้นเมื่อเข้าสู่ระยะ somites stage หลังจากนั้นจะลดลงเล็กน้อย และอยู่ในระดับที่ค่อนข้างคงตัว และเมื่อกระตุ้นด้วยอุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียสกับลูกปลาที่อายุ 1 วันพบว่าปลาจะตอบสนองด้วยการสร้าง HSP70 และ HSP90 ออกมา หลังจากที่ถูก

กระตุ้นเป็นระยะเวลา 1 ชั่วโมง ส่วน Lele *et al.* (1997) รายงานว่าตรวจไม่พบยีนที่สร้าง HSP70 ในระยะ embryo ของปลาม้าลาย ในขณะที่ลูกปลาเมื่อฟักเป็นตัวออกมาแล้วจะตรวจพบว่าการแสดงออกของยีน HSP 70-4 และ HSP 70-15 และพบว่าการสลายตัวของ HSP70 ในปลาม้าลายมีการเพิ่มขึ้นตามระยะเวลาของการตอบสนองที่เพิ่มขึ้น จะช้าหรือเร็วขึ้นอยู่กับปัจจัยหลาย ๆ อย่าง ทั้งในและนอกตัวสัตว์

จ. ฤศกาล Fader *et al.* (1994) รายงานว่าปลา 4 ชนิดได้แก่ *Pimephales promelas*, *Salmo trutta*, *Ictalurus natalis* และ *Ambloplites rupestris* จะมีการสังเคราะห์ HSP70 เพื่อเป็นการตอบสนองต่อการเปลี่ยนแปลงอุณหภูมิที่แตกต่างกัน โดยปลาทั้ง 4 ชนิดมีแนวโน้มการสังเคราะห์ HSP ที่เหมือนกัน กล่าวคือจะมีค่าความเข้มข้นต่ำสุดในช่วงฤดูหนาว และค่อย ๆ เพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญจากช่วงฤดูใบไม้ผลิจนสูงสุดในช่วงฤดูร้อน แล้วค่อย ๆ ปรับลดลงอย่างมีนัยสำคัญในช่วงฤดูใบไม้ร่วง

ทั้งนี้เทคนิคที่ใช้ในการวัดระดับการแสดงออกของยีน HSP70 นั้นเป็นเพียงการวัดปริมาณ mRNA เท่านั้น ไม่ใช่การวิเคราะห์โปรตีนโดยตรง ในอนาคตอาจทดลองให้มีการตรวจวัดระดับของโปรตีนโดยตรงซึ่งผลการทดลองที่ได้อาจจะมีความชัดเจนมากยิ่งขึ้น ซึ่ง Iwama *et al.* (2004) ได้ตั้งข้อสังเกตสำหรับการใช้ HSP ในการเป็นดัชนีชี้วัดความเครียดของปลาว่า HSP อาจจะใช้ได้แต่ต้องมีการศึกษาเกี่ยวกับคุณสมบัติเฉพาะของตัวเหี่ยวนำความเครียดกับชนิดของปลา เนื่องจากการตอบสนองของร่างกายปลาแต่ละชนิด และอวัยวะที่ตอบสนอง ยังมีความผันแปรสูงในปลาชนิดต่าง ๆ และ HSP อาจจะเหมาะสมกับการชี้วัดความเครียดแบบเรื้อรัง และควรมีการศึกษาเกี่ยวกับความสัมพันธ์ระดับเซลล์ต่อการตอบสนองต่อปัจจัยส่งเสริมความเครียดหลาย ๆ ปัจจัยเมื่อปลาต้องเผชิญสิ่งต่าง ๆ เหล่านี้พร้อม ๆ กัน

สรุป

1. Cortisol และ Heat Shock Protein 70 ในปลานิลที่กระตุ้นให้เกิดความเครียดโดยอุณหภูมิของน้ำต่างกันนั้น พบว่าค่าบ่งชี้ความเครียดที่มีความเหมาะสมที่จะนำมาใช้กับปลานิลที่เกิดความเครียดคือ Heat Shock Protein 70 เนื่องจากมีแนวโน้มของการเปลี่ยนแปลงที่มีรูปแบบชัดเจนมากกว่า Cortisol คือเมื่อกระตุ้นให้เกิดความเครียดโดยอุณหภูมิสูงจะพบว่ามี Heat Shock Protein 70 ในเหงือกสูง และมีการตอบสนองออกมาอย่างต่อเนื่องเมื่อได้รับสภาวะที่มีอุณหภูมิสูงอย่างต่อเนื่องเช่นกัน

2. Cortisol และ Heat Shock Protein 70 ในปลานิลที่กระตุ้นให้เกิดความเครียดโดยความเค็มของน้ำต่างกันนั้น พบว่าค่าบ่งชี้ความเครียดที่มีความเหมาะสมที่จะนำมาใช้กับปลานิลที่เกิดความเครียดคือ Heat Shock Protein 70 เนื่องจากมีแนวโน้มของการเปลี่ยนแปลงที่มีรูปแบบชัดเจนมากกว่า Cortisol คือเมื่อกระตุ้นให้เกิดความเครียดโดยความเค็มสูงจะพบว่ามี Heat Shock Protein 70 ในเหงือกสูง แต่เมื่อกระตุ้นให้เกิดความเครียดโดยความเค็มต่ำจะพบว่ามี Heat Shock Protein 70 ในเหงือกต่ำกว่า โดยมีค่าแตกต่างกันทางสถิติอย่างชัดเจนในช่วงเวลาที่ 3-12 แต่หลังจากนั้นก็มีค่าไม่แตกต่างกัน แสดงถึงค่าความเค็มที่เปลี่ยนแปลงไปว่ามีผลให้เกิดความเครียดในปลานิลในระยะเวลาดังนั้น ๆ เท่านั้น

3. ความสัมพันธ์ของผลของการเกิดความเครียดอันเป็นผลมาจากการได้รับอุณหภูมิที่แตกต่างกันและการตอบสนองของยีน HSP70 รวมทั้งการเกิดโรค Streptococcosis พบว่าการเลี้ยงปลานิลที่อุณหภูมิ 32 องศาเซลเซียส มีการตายของปลานิลเร็วกว่า และมีการตายอย่างต่อเนื่องชี้ให้เห็นอย่างชัดเจนว่าการแสดงออกของยีน Heat Shock Protein 70 ของปลานิลที่อยู่ในน้ำอุณหภูมิ 32 องศาเซลเซียสมีแนวโน้มเพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็วในช่วงช่วงเวลาที่ 3-6 อย่างไรก็ตามที่ช่วงเวลาที่ 12-168 กลับพบว่าปลาในกลุ่มที่ได้รับอุณหภูมิที่ 32 องศาเซลเซียสเท่านั้นที่ยังคงมีการแสดงออกของยีน HSP70 สูงกว่ากลุ่มอื่นเป็นระยะอย่างมีนัยสำคัญเกือบทุกช่วงเวลา ยกเว้นช่วงเวลาที่ 48 แสดงให้เห็นว่าการที่ปลาได้รับอุณหภูมิในช่วงสูงกว่าระดับที่เหมาะสมต่อการเจริญเติบโตอย่างต่อเนื่อง ปลาจะมีการตอบสนองโดยการสร้าง HSP70 ออกมาอย่างต่อเนื่องเช่นกัน แสดงให้เห็นว่าที่อุณหภูมิสูงอาจมีโปรตีนที่สร้างออกมาในภาวะดังกล่าวนั้นถูกทำให้เสียสภาพ ร่างกายของปลาจึงจำเป็นต้องมีการสร้าง HSP70 ออกมาเพื่อซ่อมแซมโปรตีนที่เสียสภาพในสภาวะความเครียดดังกล่าวนี้ ซึ่งสอดคล้องกับอัตราการตายของปลาที่ได้รับเชื้อ *S. agalactiae* และอยู่ใน

สภาวะที่มีอุณหภูมิสูงซึ่งพบว่ามี การแสดงอัตราการตายออกมอย่าง ต่อเนื่อง แตกต่างกับปลาใน กลุ่มอื่น ๆ อย่างชัดเจน ดังนั้นการศึกษาค้างนี้ อาจเป็นเครื่องยืนยันถึงสาเหตุของการตายของปลาใน สภาวะที่มีอุณหภูมิสูงว่าอาจเป็นผลมาจากความผิดปกติของระบบภูมิคุ้มกันของปลา และความ รุนแรงของเชื้อก่อโรค ซึ่งเป็นผลให้เกิดการตายในสภาวะที่มีอุณหภูมิสูงอย่างต่อเนื่อง ดังนั้น HSP70 จึงอาจเป็นอีกปัจจัยหนึ่งที่ปลาพยายามใช้ในการปรับสภาพให้ร่างกายให้รอดพ้นจากทั้ง สภาวะการเกิดความเครียดอันเป็นผลของการเพิ่มอุณหภูมิ และเชื้อก่อโรคที่เข้ามาในร่างกายของ ตัวปลา

4. Heat Shock Protein 70 ควรได้รับการเลือกเป็นตัวบ่งชี้ความเครียดของปลานิล แต่ เทคนิคที่ใช้ในการวัดระดับการแสดงออกของยีน HSP70 นั้นเป็นเพียงการวัดปริมาณ mRNA เท่านั้น ไม่ใช่การวิเคราะห์โปรตีนโดยตรง อาจศึกษาให้มีการตรวจวัดระดับของโปรตีนโดยตรงซึ่ง ผลการทดลองที่ได้ อาจจะมี ความชัดเจนมากยิ่งขึ้น ซึ่งในอนาคตควรมีการพัฒนาเทคนิคหรือวิธีการ ให้สามารถตรวจสอบ HSP70 ดังกล่าวได้ง่าย รวดเร็ว และแม่นยำ และเป็นที่ยอมรับของผู้นำไปใช้ งานในอนาคต อย่างไรก็ตามการเปลี่ยนแปลงของ HSP อาจมีความแปรปรวนได้ด้วยปัจจัยที่เป็น สาเหตุหลายประการ เช่น ชนิดของเนื้อเยื่อที่ใช้ศึกษา ปัจจัยที่ก่อให้เกิดความเครียด ชนิดของสัตว์ที่ ใช้ทดลอง อายุของสัตว์ทดลอง และฤดูกาล

เอกสารและสิ่งอ้างอิง

- กรมประมง. 2544. การเลี้ยงปลานิล. กองส่งเสริมการประมง, กรมประมง, กรุงเทพฯ.
- กรมประมง. 2550. สถิติการประมงแห่งประเทศไทย พ.ศ. 2549. ศูนย์สารสนเทศ,
กรมประมง, กรุงเทพฯ.
- กรมประมง. 2530. เกณฑ์คุณภาพน้ำเพื่อการคุ้มครองทรัพยากรสัตว์น้ำจืด. เอกสารวิชาการ
ฉบับที่ 75/2530 สถาบันประมงน้ำจืดแห่งประเทศไทย, กรมประมง, กรุงเทพฯ.
- ขรรชง อินทรรักษา. 2538. สรีรวิทยาระบบต่อมไร้ท่อและสืบพันธุ์. ภาควิชาสรีรวิทยา,
คณะสัตวแพทยศาสตร์, มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ.
- วิชัย วัฒนกุล, เรณู ยาชโร และ พิษณุ นอนันต์. 2539. การเปลี่ยนแปลงคอริดรีซอลและ
องค์ประกอบไอออนในปลาสมาระหว่างการลำเลียงพ่อแม่พันธุ์ปลาตะเล 4 ชนิด,
น. 153 - 156. ใน รายงานการสัมมนาวิชาการประจำปี 2539. กรมประมง, กรุงเทพฯ.
- วีรพงศ์ วุฒิปันธุ์ชัย. 2546. เอกสารประกอบการสอนวิชา วิทยาต่อมไร้ท่อของปลาและครึ่งเตี๋ย.
ภาควิชาวชิรศาสตร์, คณะวิทยาศาสตร์, มหาวิทยาลัยบูรพา, ชลบุรี.
- สุรพงษ์ อาทิตยวงศ์, ปรียา อุดมกุศลศรี, ศิริรักษ์ จันทกร, สันติ แก้วโมกุล และ อุไร พงษ์ชัย
ฤกษ์. 2548. ผลของภาวะเครียดต่อลักษณะทางจุลกายวิภาคของผิวหนัง อวัยวะภายใน
และระบบภูมิคุ้มกันที่ไม่จำเพาะของปลาตุ๊ก (*Clarias batrachus*). ภาควิชากายวิภาค
ศาสตร์, คณะสัตวแพทยศาสตร์, มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ.
- Ackerman, P.A. and G.K. Iwama. 2001. Physiology and cellular stress responses of juvenile
rainbow trout to Vibriosis. **J. Aquat. Anim. Health** 13:173-180.
- Aderem, A. and R. J. Ulevitch. 2000. Toll-like receptors in the induction of the innate immune
response. **Nature** 406 (6797): 782-787.

- Ainsworth, J.A., C. Dexiang and P.R. Waterstrat. 1991. High physiological concentrations of cortisol in vivo can initiate phagocyte suppression. **J. Aquat. Anim. Health** 3: 41-47.
- Airaksinen, S., C.M.I. Rabergh, A. Lahti, A. Kaatrasalo, L. Sistonen and M. Nikinmaa. 2003. Stressor-dependent regulation of the heat shock response in zebrafish, *Danio rerio*. **Comp. Biochem. Physiol.** 134: 839-846.
- Alexander, C. and E.T. Rietschel. 2001. Invited review: bacterial lipopolysaccharides and innate immunity. **J. Endotoxin Res.** 7 (3): 167-202.
- Anderson, D.P. 1990. Immunological indicators: effect of environmental stress on immune protection and disease outbreaks. **Am. Fish. Soc. Symp.** 8: 38-50.
- Atwood, H.L., J.R. Tomaso, K. Webb and D.M. Gatlin. 2003. Low-temperature tolerance of Nile tilapia, *Oreochromis niloticus*: effects of environmental and dietary factors. **Aquacult. Res.** 34: 241-251.
- Bachelet, M., C. Adrie and B.S. Polla. 1998. Macrophages and heat shock proteins. **Res. Immunol.** 149: 727-732.
- Barcellos, L.J.G., S. Nicolaiewsky, S.M.G. de Souza and F. Lulhier. 1999. Plasmatic levels of cortisol in the response to acute stress in Nile tilapia, *Oreochromis niloticus* (L.), previously exposed to chronic stress. **Aquacult. Res.** 30: 437-444.
- 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.
- Basu, N., A.E. Todgham, P.A. Ackerman, M.R. Bibeau, O.K. Nakan, P.M. Schulte and G.K. Iwana. 2002. Heat Shock Protein genes and their functional significance in fish. **Gene** 295: 173-183.

- _____, T. Nakano, E.G. Grau and G.K. Iwama. 2001. The effects of cortisol on heat shock protein 70 levels in two fish species. **Gen. Comp. Endocrinol.** 124: 97-105.
- Benaroudj, N., B. Fouchaq and M.M. Ladjimi. 1997. COOH- terminal peptide binding domain is essential for self association of the molecular chaperone HSC70. **J. Biol. Chem.** 272: 8744-8751.
- Berczi, I. 1998. Neurohormonal host defense in endotoxin shock. **Ann. N.Y. Acad. Sci.** 840 (1): 787-802.
- Bienz, M. and H.R. Pelham. 1987. Mechanisms of heat shock gene activation in higher eukaryotes. **Adv. Genet.** 24: 31-72.
- Bonga, S.W. 1997. The stress response in fish. **Physiol. Rev.** 77 (3): 591-625.
- Boyed, C.E. and C.S. Tucker. 1992. **Water Quality and Pond Soil Analyses for Aquaculture.** Alabama Agricultural Experiment Station, Auburn University, Auburn, Alabama.
- Burrell, R. 1994. Human responses to bacterial endotoxin. **Cir. Shock.** 43 (3): 137-153.
- Campbell, P.M., T.G. Pottinger and J.P. Sumpter. 1994. Preliminary evidence that chronic confinement stress reduced the quality of gametes produced by brown and rainbow trout. **Aquaculture** 120: 151-169.
- Colt, J., R. Ludwig, G. Tchobanoglobus and J.J. Cech. 1981. The Effects of nitrite on the short-term growth and survival of channel catfish, *Ictalurus punctatus*. **Aquaculture** 24: 111-122.
- Charo-Karisa, H., M.A. Rezk, H. Bovenhuis and H. Komen. 2005. Heritability of cold tolerance in Nile tilapia, *Oreochromis niloticus*, juveniles. **Aquaculture** 249: 115-123.

- Cheng, A.C., S.A. Cheng, Y.Y. Chen and J.C. Chen. 2009. Effects of temperature change on the innate cellular and humoral immune responses of orange-spotted grouper *Epinephelus coioides* and its susceptibility to *Vibrio alginolyticus*. **Fish Shellfish Immunol.** 26 (5): 768-772.
- Ciocca, D.R., S. Oesterreich, G.C. Chamness, W.L. McGuire and S.A. Fuqua. 1993. Biological and clinical implications of Heat Shock Protein 27,000 (HSP27). **J. Natl. Cancer Inst.** 85: 1558-1570.
- Cleary, J.J., S.C. Battaglene and N.W. Pankhurst. 2002. Capture and handling stress affects the endocrine and ovulatory response to exogenous hormone treatment in snapper, *Pagrus auratus* (Bloch & Schneider). **Aquacult. Res.** 33: 829-838.
- Cooper, G.M. 2000. **The Cell: A Molecular Approach**. 2nd ed. Sinauer Associates Inc., Washington, D.C.
- Cuesta, A., R.L. Carrio, F. Arjona, M.P. Rio, J. Meseguer, J.M. Mancera and M.A. Esteban. 2006. Effect of PRL, GH and cortisol on the serum complement and IgM levels in gilthead seabream (*Sparus aurata* L.). **Fish Shellfish Immunol.** 20: 427-432.
- Currie, S. and B.L. Tufts. 1997. Synthesis of stress protein 70 (Hsp70) in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) red blood cells. **J. Exp. Biol.** 200 (3):607-614.
- Deane, E.E., S.P. Kelly, C.K.M. Lo and N.Y.S. Woo. 1999. Effects of GH, prolactin and cortisol on hepatic Heat Shock Protein 70 expression in a marine teleost *Sparus sarba*. **J. Endocrinol.** 161: 413-421.
- Donalson, E.M. 1981. The pituitary-interrenal axis as indicator of stress in fish, pp. 11-48. In A.D. Pickering, ed. **Stress and Fish**. Academic Press Inc., London.

- Dong, F.D., C. Wang., S. Lee., S. Bai and S.S.O. Hung. 2009. Feeding rate affect Heat Shock rotein levels in liver of lavar white sturgeon (*Acispincer transmotanus*). **Aquaculture** 287:23-226.
- Duffy, L.K., E. Scofield, T. Rodgers, M. Patton and R.T. Bowyer. 1999. Comparative baseline levels of mercury, Hsp 70 and Hsp 60 in subsistence fish from the Yukon-Kuskokwim delta region of Alaska. **Comp. Biochem. Physiol. Part C: Pharmacol. Toxicol.** 124 (2): 181-186.
- Ellsaesser, C.E. and L.W. Clem. 1986. Haematological and immunological changes in channel catfish stressed by handling and transport. **J. Fish. Biol.** 28: 511-521.
- Fairfield, D.A. 2004. **Heat shock transcription factor1 (HSF1) and the stress response in the auditory system**. Ph.D. Thesis, Michigan University.
- Fader, S.C., Z. Yu and J.R. Spotila. 1994. Seasonal variation in heat shock proteins (hsp70) in stream fish under natural conditions. **J. Therm. Biol.** 19: 335-341.
- 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.
- Fevolden, S.E., K.H. Roed and K.T. Fjalestad. 2002. Selection response of cortisol and lysozyme in rainbow trout and correlation to growth. **Aquaculture** 205: 61– 75.
- _____, T. Refstie and K.H. Roed. 1991. Selection for high and low cortisol stress response in Atlantic salmon (*Salmo salar*) and rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). **Aquaculture** 95: 53–65.

- Fiess, J.C., A. Kunkel-Patterson, L. Mathias, L.G. Riley, P.H. Yancey, T. Hirano and E.G. Grau. 2007. Effects of environmental salinity and temperature on osmoregulatory ability, organic osmolytes, and plasma hormone profiles in the Mozambique tilapia (*Oreochromis mossambicus*). **Comp. Biochem. Physiol. Part A: Physiol.** 146:252-294.
- Forreiter, C. and L. Nover. 1998. Heat induced stress proteins and the concept of molecular chaperone. **J. Biosci.** 23: 287-302.
- Fridman, S., J. Bron and K. Rana. 2012. Influence of salinity on embryogenesis, survival, growth and oxygen consumption in embryos and yolk-sac larvae of the Nile tilapia. **Aquaculture** 334-337: 182-190.
- Gregory, M.J. 2006. **Endocrine system.** Biology. Available Source: <http://faculty.clintoncc.suny.edu>, September 9, 2007.
- Grôsvik, B.E., and A. Goksôyr. 1996. Biomarker protein expression in primary cultures of salmon (*Salmo salar* L.) hepatocytes exposed to environmental pollutants. **Biomarkers** 1(1): 45-53.
- Guy, C.L. and Q.B. Li. 1998. The organization and evolution of the spinach stress 70 molecular chaperone gene family. **Plant Cell** 10: 539-556.
- Halloran, M.C., M. Sato-Maeda, J.T. Warren, F. Su, Z. Lele, P.H. Krone, J.Y. Kuwada and W. Shoji. 2000. Laser-induced gene expression in specific cells of transgenic zebrafish. **Development** 127: 1953-1960.
- Hassanein, H. M. A., M.A. Banhaway, F.M.Soliman, S.A. Abdel-Rehim, W.E.G. Müller, and H.C. Schröder. 1999. Induction of hsp70 by the herbicide oxyfluorfen (Goal) in the Egyptian Nile fish, *Oreochromis niloticus*. **Arch. Environ. Contam. Toxicol.** 37(1): 78-84.

- Haukenes, A. H. and B.A. Barton. 2004. Characterization of the cortisol response following an acute challenge with lipopolysaccharide in yellow perch and the influence of rearing density. **J. Fish. Biol.** 64 (4): 851-862.
- Hightower, L.E., C.E. Norris, P.S. Dilorio and E. Fielding. 1999. Heat shock responses of closely Related species of tropical and desert fish, **Am. Zool.** 39:877-888.
- Hohfeld, J., Y. Minami and F.U. Hartl. 1995. Hip, a novel cochaperone involved in the eucaryotic HSC70/HSP40 reaction cycle. **Cell** 83: 589-598.
- Houghton, G. and R.A. Matthews. 1986. Immunosuppression of carp (*Cyprinus carpio* L.) to ichthyophthiriasis using the corticosteroid triaminolone acetone. **Vet. Immunol. Immunopathol.** 12: 413-419.
- Iwama, G.K., A.D. Pickering, J.P. Sumpter and C.B. Schreck. 1997. **Fish stress and health in Aquaculture.** Cambridge University Press, Cambridge.
- _____, G.K., L.O.B. Afonso, A. Todgham, P. Ackerman and K. Nakano. 2004. Are HSPs suitable for indicating stressed states in fish? **J. Exp. Biol.** 207(1): 15-19.
- _____, L.O. Afonso and M.M. Vijayan. 2006. Stress in fishes, pp. 392-342. In E.D. Evan and J.B. Claiborne, eds. **The Physiology of fishes** 3rd edition. Taylor and Francis, USA.
- _____, P.T. Thomas, R.B. Forsyth and M.M. Vijayan. 1998. Heat Shock Protein expression In fish. **Rev. Fish Biol. Fisher.** 8:35-56.
- Jana, R., F. Pasmans, E. Tobback, L. Duchateau, A. Decostere, F. Haesebrouck, P. Sorgeloos and P. Bossier. 2010. Heat shock proteins protect platyfish (*Xiphophorus maculatus*) from *Yersinia ruckeri* induced mortality. **Fish Shellfish Immunol.** 28: 288-231.

- Kabata, Z. 1985. **Parasite and Diseases of Fish Cultured in the Tropic**. S. Taylor and Francis, London.
- Kammerer, B.D., J.J. Cech and D. Kultz. 2010. Rapid changes in plasma cortisol, osmolality, and respiration in response to salinity stress in tilapia (*Oreochromis mossambicus*). **Comp. Biochem. Physiol. Part A: Physiol.** 157:260-265.
- Kiang, J.G. and G.C. Tsokos. 1998. Heat Shock Proteins 70kDa: Molecular biology, biochemistry and physiology. **Pharmacol. Ther.** 80: 183-201.
- Kindle, K. R. and D. H. Whitmore. 1986. Biochemical indicators of thermal stress in *Tilapia aurea* (Steindachner). **J. Fish. Biol.** 29:243-256.
- Kino, T., E. Charmandari and G.P. Chrousos. 2003. **Glucocorticoid receptor**. Available Source: <http://www.endotext.org/adrenal/adrenal6/adrenalframe6.html>, September 9, 2009.
- Le Morvan, C., D. Troutaud and P. Deschaux. 1998. Differential effects of temperature on specific and nonspecific immune defenses in fish. **J. Exp. Biol.** 201, 165-168.
- Lele, Z., S. Engel and P.H. Krone. 1997. Hsp47 and hsp70 gene expression is differentially regulated in a stress- and tissue-specific manner in zebrafish embryos. **Dev. Genet.** 21: 123-133.
- Li, Q.B., D.W. Haskell and C.L. Guy. 1999. Coordinate and non-coordinate expression of the stress 70 family and other molecular chaperones at high and low temperature in spinach and tomato. **Plant. Mol. Biol.** 39: 21-34.
- Likongwe, J.S., T.D. Stecko, J.R. Stauffer and R.F. Carline. 1996. Combined effects of water temperature and salinity on growth and feed utilization of juvenile Nile tilapia *Oreochromis niloticus* (Linnaeus). **Aquaculture** 146: 37-46.

Lindquist, S. and E.A. Craig. 1988. The Heat-Shock Proteins. **Annu. Rev. Genet.** 22: 631-677.

Lister, A., V. Nero, A. Farwell, D.G. Dixon and G. Van Der Kraak. 2008. Reproductive and stress hormone levels in goldfish (*Carassius auratus*) exposed to oil sands process-affected water. **Aquat. Toxicol.** 87: 170–177.

Littell, L.C., P.R. Henry and C.B. Ammerman. 1998. Statistical analysis of repeated measures data using SAS procedures. **J. Anim. Sci.** 76: 1216-1231.

MacArthur, J. I. and T.C. Fletcher. 1985. Phagocytosis in fish, pp. 29-46. *In* M.J. Manning and M.F. Tatner, eds. **Fish Immunology**. Academic Press, London.

Martínez-Porchas, M., L.R. Martínez-Córdova and R. Ramos-Enriquez. 2009. Cortisol and glucose: reliable indicators of fish stress. **Pan-Am. J. Aquat. Sci.** 4 (2): 158-178.

Mason, J.W. 1975. A historical view of the stress field. Part I. **J. Human Stress** 1: 6-12.

Mazeaud, M.M., F. Mazeaud and E.M. Donaldson. 1977. Primary and secondary effect of stress in fish: some new data with a general review. **Trans. Am. Fish. Soc.** 160: 201-202.

_____ and F. Mazeaud. 1981. Adrenergic response to stress in fish, pp. 49-75. *In* A.D. Pickering, ed. **Stress and Fish**. Academic Press Inc., London.

Mazur, C.F. 1996. **The heat shock protein response and physiological stress in aquatic organisms**. Ph.D. Thesis, The University of British Columbia.

Mckee, J.E. and H.W. Wolf. 1963. **Water Quality Criteria**. 2nd ed. California State Water Resources Control Board, Publication No. 3-A, Sacramento.

Meyer, F.P. 1979. The role of stress in fish disease, pp. 7-8. *In* J.A. Plumb, ed. **Principal Disease of Farm-Raised Catfish**. Auburn University, Auburn.

Miernyk, J.A. and G.T. Hayman. 1996. ATPase activity and molecular chaperone function of the stress70 proteins. **Plant. Physiol.** 110: 419-424.

Molina, A., F. Biemar, F. Muller, A. Iyengar, P. Prunet, N. Maclean, J. A. Martial and M.

Muller. 2000. Cloning and expression analysis of an inducible HSP70 gene from tilapia fish. **FEBS Letters** 474: 5-10.

Moncrief, J.W. and W.H. Jones. 1977. **Elements of Physical Chemistry**. Addison Wesley Publ. Co., Inc., Reading Mass.

Moore, H.R., J.M. Andrew, R.G. Billy and L.H. Glemm. 1984. Parasites and diseases of pond fishes, pp. 177-269. *In* H.K. Dupree and J.V. Hunter, eds. **Third Report to the Fishes Farmer. U.S. Fish and Wildlife Service**. Washington, D.C.

Morales, A.E., G. Cardenete, E. Abellán and L. García-Rejón. 2005. Stress-related physiological responses to handling in common dentex (*Dentex dentex Linnaeus*, 1758). **Aquacult. Res.** 36 (1): 33-40.

Morimoto, R.I., A. Tissiere and C. Georgopoulos. 1994. **Stress Proteins in Biology and Medicine**. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York.

_____, K.D. Sarge and K. Abravaya. 1992. Transcriptional regulation of Heat Shock genes. **J. Biol. Chem.** 267: 21987-21990.

- Nakano, K. and G.K. Iwama. 2002. The 70-kDa heat shock protein response in two intertidal sculpins, *Oligocottus maculosus* and *O. snyderi*: relationship of hsp70 and thermal tolerance. **Comp. Biochem. Physiol. Part A: Physiol.** 133: 79-94.
- Nakhl, A.N., A.J. Szalai, J.H. Banoub and K.M. Keough. 1997. Serum anti-LPS antibody production by rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) in response to the administration of free and liposomally-incorporated LPS from *Aeromonas salmonicida*. **Fish Shellfish Immunol.** 7 (6): 387-401.
- Nayak, S.K., P. Swain, P.K. Nanda, S. Dash, S. Shukla, P.K. Meher and N.K. Maiti. 2008. Effect of endotoxin on the immunity of Indian major carp, *Labeo rohita*. **Fish Shellfish Immunol.** 24 (4): 394-399.
- Nover, L. 1991. **Heat Shock Response**. CRC Press, Boca Raton, FL.
- Ottaviani, E. and C. Franceschi. 1996. The neuroimmunology of stress from invertebrates to man. **Progr. Neurobiol.** 48 (4): 421-440.
- Palacios, R.S.I. 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.
- Pepels, P.P., H. Van Helvoort, S.W. Bonga and P.H. Balm. 2004. Corticotropin-releasing hormone in the teleost stress response: rapid appearance of the peptide in plasma of tilapia (*Oreochromis mossambicus*). **J. Endocrinol.** 180(3): 425-438.
- Pickering, A.D. 1981. Introduction: the concept of biological stress, pp. 1-9. *In* A.D. Pickering, ed. **Stress and Fish**. Academic Press Inc., London.

- _____. 1989. Stress responses and disease resistance in farmed fish, pp. 35-49.
In Aqua. Nor. 87, Conference 2 and 3. Trondheim, Norway.
- _____ and T.G. Pottinger. 1985. Cortisol can increase the susceptibility of brown trout, (*Salmo trutta* L.) to disease without reducing the white blood cell count. **J. Fish. Biol.** 27: 611-619.
- Parsell, D.A and S. Lindquist. 1993. The function of heat shock proteins in stress tolerance: degradation and reactivation of damage proteins. **Annu. Rev. Genet.** 27: 437-496.
- Philippart, J.C.L and J.C.L. Ruwet. 1982. Ecology and Distribution of Tilapias, pp.15-60. *In* R.S.V Pullin and R.H. Lowe-McConnell, eds. **The Biology and Culture of Tilapias**, International Centre for Living Aquatic Resources Management. (ICRAM) conference proceedings.
- Pottinger, T.G. 1998. Changes in blood cortisol, glucose and lactate in carp retained in angler keepnets. **J. Fish. Biol.** 53 (4): 728-742.
- _____ and T.R. Carrick. 1999. Modification of the plasma cortisol response to stress in rainbow trout by selective breeding. **Gen. Comp. Endocrinol.** 116: 122-132.
- _____, A.D. Pickering and M.A. Hurley. 1992. Consistency in the stress response of individuals of two strains of rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*. **Aquaculture** 103: 275-289.
- Rabergh, C.M.I., S. Airaksinen, A. Soitomo, H.V. Bjorklund, T. Johansson, M. Nikinmaa and L. Sistonen. 2000. Tissue-specific expression of zebrafish (*Danio rerio*) heat shock factor1 mRNA in response to heat stress. **J. Exp. Biol.** 203: 1817-1824.

- Ritossa, F. 1962. A new puffing pattern induced by temperature shock and DNP in *Drosophila*.
Experientia 18: 517-573.
- Robertson, L., P. Thomas and C.R. Arnold. 1988. Plasma cortisol and secondary stress responses of cultured red drum (*Sciaenops ocellatus*) to several transportation procedures.
Aquaculture 68(2): 115-130.
- Rodkhum, C. and P. Kayansamruaj and N. Pirarat. 2011. Effect of water temperature on susceptibility to *Streptococcus agalactiae* serotype Ia infection in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). **Thai J. Vet. Med.** 41(3): 309-314.
- Ruane, N.M., E.C. Carballo and J. Komen. 2001. Plasma cortisol and metabolite level profiles in two isogenic strains of common carp during confinement. **J. Fish Biol.** 59: 1-12.
- _____. 2002. Increased stocking density influences the acute physiological stress response of common carp, *Cyprinus carpio* (L.). **Aquacult. Res.** 33: 777-784.
- Ruckpaul, K. and H.E. Rein. 1990. Frontiers in Biotransformation, **Molecular Mechanisms of Adrenal Steroidogenesis and Aspects of Regulation and Application** vol. 3. Taylor & Francis, London.
- Sarah, F.D., P. Feng, C.T. George and M.B. Terence. 1998. Thermal shock of salmon in vivo induces the Heat Shock Protein HSP70 and confers protection against osmotic shock.
Aquaculture 168: 311-323.
- Sanders, B.M. 1993. Stress proteins in aquatic organisms: An environmental perspective.
Crit. Rev. Toxicol. 23: 49-75.

- Sanders, B.M., J. Nguyen, L.S.Martin, S.R. Howe and S. Coventry. 1995. Induction and subcellular localization of two major stress proteins in response to copper in the fathead minnow (*Pimephales promelas*). **Comp. Biochem. Physiol. Part C: Pharmacol. Toxicol.** 112 (3): 335-343.
- Santacruz, H., S. Vríz and N. Angelier. 1997. Molecular characterization of a heat shock cognate cDNA of zebrafish, hsc70, and developmental expression of the corresponding transcripts. **Dev. Genet.** 21: 223-233.
- Schoffl, F., R. Prandl and A. Reindl. 1998. Regulation of heat shock response. **Plant. Physiol.** 117: 1135-1141.
- Selvaraj, V., K. Sampath and V. Sekar. 2006. Adjuvant and immunostimulatory effects of β -glucan administration in combination with lipopolysaccharide enhances survival and some immune parameters in carp challenged with *Aeromonas hydrophila*. **Vet. Immunol. Immunopathol.** 114 (1): 15-24.
- Selye, H. 1950. **Stress: The Physiology and Pathology of Exposure to Systemic Stress.** Acta Inc., Montreal.
- Selye, H. 1973. The evolution of the stress concept. **Am. Sci.** 61: 692-699.
- Sifa, L., L. Chenhong, M. Dey, F. Gaglac and R. Dunham. 2002. Cold tolerance of three strains of Nile tilapia, *Oreochromis niloticus*, in China. **Aquaculture** 213: 123-129.
- Smith, T.R., G.C. Tremblay and T.M. Bradley. 1999. Characterization of the heat shock protein response of Atlantic salmon (*Salmo salar*). **Fish Physiol. Biochem.** 20: 279-292.
- Stave, J.W. and B.S. Robertson. 1985. Hydrocortisone suppresses the chemiluminescent response of stripped bass phagocytes. **Dev. Comp. Immunol.** 9: 77-84.

- Strange, R.J., C.B. Schreck and J.T. Golden. 1977. Corticoid stress responses to handling and temperature in salmonids. **Trans. Am. Fish. Soc.** 106: 213-218.
- Sufi, S.B, A. Donaldson and S.L. Jefcoste. 1986. **Method manual of W.H.O. special programme of research development and research training in human reproduction.** 10th Ed.W.H.O. Coollabaration Center for Research and Refereance Service in Immunoassay of Hormonees in Human Reproduction. pp.57-95.
- Sugimoto, M., H. Furuoka and Y. Sugimoto. 2003. Deletion of one of the duplicated HSP70 genes causes hereditary myopathy of diaphragmatic muscles in Holstein-Friesian cattle. **Anim. Genet.** 34: 191-197.
- Sung, D.L., F. Kaplan and C.L. Guy. 2001. Plant HSP70 molecular chaperones: Protein structure, gene family expression and function. **Physiol. Plantarum.** 113: 443-451.
- Suresh, A.V. and C.K. Lin. 1992. Tilapia culture in saline waters: a review. **Aquaculture** 106: 201-206.
- Taiz, L. and E. Zeiger. 1998. **Plant Physiology.** 2nd ed. Sinauer Associates, Massachusetts.
- Takeda, K. and S. Akira. 2005. Toll-like receptors in innate immunity. **Int. Immunol.** 17 (1): 1-14.
- Tanck, M.W.T., K.Vermeulen, H. Bovenhuis and H.Komen. 2001. Heredity of stress related cortisol response in androgenetic common carp (*Cyprinus carpio* L.). **Aquaculture** 199: 283-294.
- Tort, L., J.O. Sunyer, E. Go'mez and A. Molinero. 1996. Crowding stress induces changes in serum haemolytic and agglutinating activity in the gilthead sea bream *Sparus aurata*. **Vet. Immunol. Immunopathol.** 51: 179-188.

- Tsunoda, A., A. Purbayanto, S. Akiyama and T. Arimoto. 1999. Plasma cortisol level for stress management of Japanese whiting *Sillago japonica* captured by sweeping trammel net. **Nippon Suisan Gakkaishi** 65: 457-463.
- Utke, K., H. Kock, H. Schuetze, S.M. Bergmann, N. Lorenzen, K.Einer-Jensen, U.Fischer. 2008. Cell-mediated immune responses in rainbow trout after DNA immunization against the viral hemorrhagic septicemia virus. **Dev. Comp. Immunol.** 32 (3): 239-252.
- Vierling, E. 1991. The roles of heat shock proteins in plants. **Annu. Rev. Plant. Physiol. Plant. Mol. Biol.** 42: 579-620.
- Vijayan, M.M., C. Pereira, G. Kruzynski and G.K. Iwama. 1998. Sublethal concentrations of contaminant induce the expression of hepatic heat shock protein 70 in two salmonids. **Aquat. Toxicol.** 40 (2): 101-108.
- _____, T. Campbell, E. Strutt and R. Sathiyaa. 2000. Cortisol modulates heat shock protein expression in primary cultures of rainbow trout hepatocytes. *In* **Proceedings, 4th International Symposium on Fish Endocrinology**. Seattle, WA.
- Watzke, J., K. Schirmer and S.Scholz. 2007. Bacterial lipopolysaccharides induce genes involved in the innate immune response in embryos of the zebrafish (*Danio rerio*). **Fish Shellfish Immunol.** 23 (4): 901-905.
- Wedemeyer, G. 1969. Pituitary activation by bacterial endotoxins in the rainbow trout (*Salmo gairdneri*). **J. Bacteriol.** 100 (1): 542-543.
- Williams, J.H., N.S. Petersen, P.A.Young, M.A.Stansbury, A.M. Farag and H.L. Bergman.1996. Accumulation of hsp70 in juvenile and adult rainbow trout gill exposed to metal-contaminated water and/or diet. **Environ. Toxicol. Chem.** 15(8):1324-1328.

Wu, C.W., T. Casper, J. Browse, S. Lindquist and C. Somerville. 1988. Characterization of an HSP70 gene family in Arabidopsis. **Plant. Physiol.** 88: 731-740.

Yada, T., and T. Nakanishi. 2002. Interaction between endocrine and immune systems in fish. **Int. Rev. Cytol.** 220: 35-92.

Young, J.C., I. Moarefi and F.U. Hartl. 2001. HSP90: A specialized but essential protein folding tool. **J. Cell. Biol.** 154: 267-273.

Young, R.A. 1990. Stress proteins and immunology. **Annu. Rev. Immunol.** 8:401-420.

ประวัติการศึกษาและการทำงาน

ชื่อ	นายพงศ์เชษฐ์ พิชิตกุล
เกิดวันที่	12 กันยายน 2512
สถานที่เกิด	อำเภอเมือง จังหวัดนครศรีธรรมราช
ประวัติการศึกษา	วท.บ. (ประมง) มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ (พ.ศ. 2534) วท.ม. (วิทยาศาสตร์การประมง) มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ (พ.ศ. 2537)
ตำแหน่งปัจจุบัน	ผู้ช่วยศาสตราจารย์
สถานที่ทำงานปัจจุบัน	ภาควิชาเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำ คณะประมง มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์
ผลงานดีเด่นและ/หรือรางวัลทางวิชาการ	-
ทุนการศึกษาที่ได้รับ	-