

บทที่ 2

วรรณกรรมและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

1. ชีววิทยาของปลานิล

อนุกรมวิธานของปลานิล

Phylum Vertebrata

Class Osteichthyes

Order Perciformes

Family Cichlidae

Genus Oreochromis

Species niloticus

ปลานิลมีชื่อทางวิทยาศาสตร์ว่า *Oreochromis niloticus* (Linn.) อยู่ในวงศ์ Cichlidae ชื่อสามัญคือ Nile tilapia มีถิ่นกำเนิดในทวีปแอฟริกา สามารถอาศัยอยู่ได้ในน้ำจืด และน้ำกร่อย และสามารถขยายพันธุ์ได้ดีจนกระจายทั่วทุกภูมิภาคของโลก ปลานิลได้ถูกนำเข้ามาในประเทศไทยครั้งแรกโดยสมเด็จพระจักรพรรดิอากิฮิโตะ แห่งประเทศญี่ปุ่น เมื่อครั้งดำรงพระอิสริยยศมกุฎราชกุมาร (ศักดิ์ชัย ชูโชติ, 2536) ได้ทรงจัดส่งปลานิล จำนวน 50 ตัว มาทูลเกล้าถวายแด่พระบาทสมเด็จพระเจ้าอยู่หัวภูมิพลอดุลยเดชเมื่อปี พ.ศ. 2508 ทรงพระราชทานชื่อปลาชนิดนี้ว่า “ปลานิล” และได้ทรงพระราชทานปลานิลให้แก่อธิบดีกรมประมงเพื่อนำไปเพาะเลี้ยงขยายพันธุ์ เมื่อขยายพันธุ์ได้มากพอจึงได้เริ่มแจกจ่ายให้แก่ราษฎรนำไปเพาะเลี้ยงต่อไป ลักษณะทั่วไปของปลานิลมีรูปร่างลักษณะคล้ายปลาหมอเทศ ลำตัวสั้น แบนข้าง ลักษณะเด่นคือริมฝีปากบนและล่างเสมอกัน บริเวณแก้มมีเกล็ด 4 แถว สีของลำตัวเปลี่ยนแปลงตามสภาพแวดล้อมตั้งแต่สีน้ำตาลจนถึงสีเขียวดำ ท้องสีขาว มีลายพาดขวาง 9-10 แถบ ครีบหลัง ครีบกัน และครีบท้องมีจุดสีดำและสีขาวตัดขวาง มีเกล็ด 3 บริเวณแก้ม และอีกหนึ่งแถวบริเวณเหนือเส้นข้างลำตัวเล็กน้อย ครีบหลังมีอันเดียวยาวจรดถึงกอดหาง ครีบหลังประกอบด้วยก้านครีบแข็ง 15-18 อันและก้านครีบอ่อน 9-10 อัน ครีบท้องตัดตรง มีเกล็ดตามแนวเส้นข้างตัว 33 เกล็ด ทางด้านข้างมีเกล็ดตามแนวเฉียงจากตอนต้นของครีบท้องมาถึงเส้นข้างลำตัว 5 เกล็ด และจากเส้นข้างลำตัวมาถึงส่วนหน้าของครีบกัน 13 เกล็ด ตรงกลางเกล็ดมีสีเข้ม และครีบท้องนั้นจะมีจุดสีขาวและเส้นสีดำตัดขวางคู่คล้ายลายข้าวตอกที่กระดุกแก้มมีสีเข้มอยู่จุดหนึ่ง ลักษณะพื้นบริเวณขากรรไกรและคอหอยจะมีหลายขนาด ตั้งแต่ก่อนข้างหยาบจนถึงละเอียด เหนือก็มีซี่กรอง 15-17 อัน (อุคม เรืองนพคุณ, 2550) ลักษณะนิสัยของ

ปลานิลชอบอยู่รวมกันเป็นฝูง ตามแม่น้ำ ห้วย หนอง คลอง บึง ทะเลสาบ ที่เป็นแหล่งน้ำจืดและสามารถน้ำไปเลี้ยงได้ในน้ำกร่อย ปลานิลสามารถทนต่อการเปลี่ยนแปลงสภาพแวดล้อมได้ดี สามารถมีชีวิตอยู่ได้ในน้ำที่มีอุณหภูมิ 8-14 องศาเซลเซียส ทนต่อความเป็นกรดต่างของน้ำได้ พบว่าเมื่อน้ำมีความเป็นกรดต่าง 5.5-6.5, 4.5-5.5 และ 3.5-4.5 มีการตาย 10, 70 และ 100 เปอร์เซ็นต์ตามลำดับ สามารถทนความเค็มในน้ำได้สูงถึง 20 ส่วนในพันส่วน ปลานิลกินทั้งพืชน้ำชนิดต่าง ๆ สัตว์ ซากอินทรีย์ อนินทรีย์และแบคทีเรีย ปลาในตระกูลปลานิลที่นำเข้ามาในประเทศไทยมี 4 ชนิด ได้แก่ ปลาหมอเทศ (*Oreochromis mossambicus*) ปลาหมอเทศข้างลาย (*Sarotherodon melanotheron*) ปลานิลสายพันธุ์อียิปต์ (*Oreochromis niloticus*) และปลานิลอิสราเอล (*Oreochromis aureus*) ปลานิลที่มีบทบาทสำคัญในการเพาะเลี้ยงในประเทศไทย มี 2 สายพันธุ์คือ ปลานิล และปลาหมอเทศ ปลานิลในประเทศไทยได้รับการพัฒนาสายพันธุ์จากสถาบันวิจัยและพัฒนาพันธุ์สัตว์น้ำ กรมประมง และหน่วยงานเอกชน ทำให้เกิดปลานิลสายพันธุ์ใหม่ขึ้นประมาณ 4 สายพันธุ์ คือ สายพันธุ์จิตรลดา 1, 2, 3 และสายพันธุ์ปลาทับทิม

ปลานิลสายพันธุ์จิตรลดา 1 เป็นสายพันธุ์ที่ปรับปรุงและพัฒนาจากปลานิลที่เลี้ยงในตำหนักจิตรลดาธาร โทฐานเป็นเวลา 7 รุ่น (generation) โดยกรมประมงคัดเลือกสายพันธุ์ใหม่ที่มีความเจริญเติบโตเร็วกว่าสายพันธุ์ที่เลี้ยงในสวนจิตรลดา ประมาณ 22 เปอร์เซ็นต์ (ยุพินท์ วิวัฒน์ชัยเศรษฐ์ และ พันธุ์ศักดิ์ ชัยบุตร, 2543)

ปลานิลสายพันธุ์จิตรลดา 2 (Generation Male Tilapia, GMT) คือลูกปลาที่ผลิตจากพ่อพันธุ์ YY หรือปลานิลที่เรียกว่า ซุปเปอร์เมด ซึ่งเป็นปลาที่ถูกเปลี่ยนแปลงโครโมโซมให้เป็น YY ซึ่งตามปกติเมื่อนำพ่อพันธุ์ซึ่งมีโครโมโซม YY ไปผสมกับแม่ปลานิลทั่วไปจะให้ลูกเป็นเพศผู้เฉลี่ย 95.6 เปอร์เซ็นต์ (Mair et al., 1997) อย่างไรก็ตาม ปลานิลสายพันธุ์นี้ไม่เป็นที่นิยมเนื่องจากการเจริญเติบโตช้ากว่าลูกปลานิลเพศผู้ที่ได้รับการแปลงเพศ (Tuan et al., 1998)

ปลานิลสายพันธุ์จิตรลดา 3 (Generation Improved Farmed Tilapia, GIFT) เป็นปลาที่ได้รับการปรับปรุงจากการคัดพันธุ์ปลานิล 7 สายพันธุ์คือ สายพันธุ์อียิปต์ กานา เคนยา สิงคโปร์ เซเนกัล อิสราเอล และได้หวัน ของหน่วยงานราชการในประเทศฟิลิปปินส์ ปลาสายพันธุ์นี้มีส่วนหัวเล็ก ลำตัวหนา และกว้าง การเจริญเติบโตดีในระยะ 6-8 เดือน ขนาด 3-4 ตัวต่อกิโลกรัม ให้ผลผลิตสูงกว่าปลานิลทั่วไปประมาณ 40 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งเป็นปลานิลที่นิยมเลี้ยงกันอย่างแพร่หลายในปัจจุบัน (ยุพินท์ วิวัฒน์ชัยเศรษฐ์ และ พันธุ์ศักดิ์ ชัยบุตร, 2543)

สายพันธุ์ทับทิม เป็นปลานิลที่มีการคัดเลือกสายพันธุ์โดยบริษัทเจริญโภคภัณฑ์ (ซี.พี.) มีการเจริญเติบโตเร็ว และทนทานความเค็มได้ถึง 30 ส่วนในพันส่วน ความเค็มที่เหมาะสมสำหรับการเจริญเติบโตคือ 5 ถึง 20 ส่วนในพันส่วน ปลาสายพันธุ์นี้มีโครงกระดูกเล็ก เนื้อหนังช่องท้องมีสี

ขาว มีกลิ่นคาวและผิวหนังเป็นสีแดง หัวเล็ก สันหนา มีปริมาณเนื้อมากถึง 40 เปอร์เซ็นต์ของน้ำหนักตัว โตเร็ว กล้ามเนื้อสีขาว มีการเจริญเติบโตได้ดีแม้มีการเลี้ยงในสภาพที่มีความหนาแน่นสูง เหมาะที่จะนำมาเลี้ยงในกระชัง ให้ผลผลิตสูงถึง 25 กิโลกรัมต่อลูกบาศก์เมตร ในระยะเวลา 3 เดือน (ยุพินท์ วิวัฒน์ชัยเศรษฐ์ และ พันธุ์ศักดิ์ ชัยบุตร, 2543)

2. สารพิษอะฟลาทอกซิน

อะฟลาทอกซิน (Aflatoxin) เป็นสารพิษจากเชื้อราที่ทำให้เกิดความเสียหายทางเศรษฐกิจมากที่สุด เนื่องจากการปนเปื้อนในอาหารคนและอาหารสัตว์ มีรายงานการปนเปื้อนอะฟลาทอกซินในผลผลิตทางการเกษตรทั่วโลก การปนเปื้อนอะฟลาทอกซินพบมากใน ข้าวโพด เมล็ดฝ้าย และพืชตระกูลถั่ว ธัญพืชและเมล็ดพืชที่มีน้ำมัน อะฟลาทอกซินถูกสร้างขึ้นโดยเชื้อรา *Aspergillus flavus* และ *Aspergillus parasiticus* โดยเชื้อรา *Aspergillus flavus* สร้างสารพิษอะฟลาทอกซิน บี1 และ บี2 ส่วนเชื้อรา *Aspergillus parasiticus* นอกจากจะสร้างอะฟลาทอกซินบี1 และ บี2 แล้วยังสามารถสร้างอะฟลาทอกซินจี1 และจี2 การสร้างอะฟลาทอกซินของเชื้อราทั้ง 2 ชนิดนี้ พบได้ในบางสายเชื้อ (strain) ของเชื้อราทั้ง 2 ชนิดเท่านั้น (Ellis et al.,1991; คมกริช พิมพ์ภักดี, 2550)

อะฟลาทอกซินที่เกิดขึ้นตามธรรมชาติมี 4 ชนิด คือ อะฟลาทอกซิน บี1 (Aflatoxin B1, AFB₁) บี2 จี1 และจี2 เท่านั้น ส่วนอะฟลาทอกซิน เอ็ม1 เป็นสารเมตาโบไลต์ของอะฟลาทอกซิน บี1 ในสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม ซึ่งพบในน้ำนมสัตว์ที่กินอาหารที่ปนเปื้อนด้วยอะฟลาทอกซิน บี1 การจัดชนิดอะฟลาทอกซิน บี1 และ บี2 นั้น คุกจากคุณสมบัติเรืองแสงในช่วงสีน้ำเงิน (Blue) ส่วนอะฟลาทอกซิน จี1 และอะฟลาทอกซิน จี2 มีคุณสมบัติเรืองแสงในช่วงสีเขียว (Green) ภายใต้อุณหภูมิต่ำ 256-365 นาโนเมตร ความเข้มของแสงที่เรืองเป็นสัดส่วนโดยตรงกับปริมาณของอะฟลาทอกซิน คุณสมบัติการเรืองแสงนี้ถูกนำมาเป็นวิธีการวัดปริมาณ ติดตามและทดสอบอะฟลาทอกซิน ได้อย่างถูกต้องและรวดเร็ว

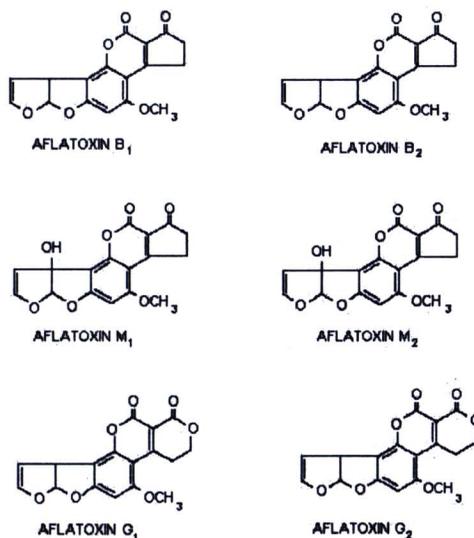
สภาวะเหมาะสมที่ทำให้อะฟลาทอกซินเกิดได้ดี คือ ภายใต้อุณหภูมิ 18-30 องศาเซลเซียส และยังเจริญเติบโตได้ดีในอาหารที่มีความชื้นสัมพัทธ์ในอากาศตั้งแต่ 75% ขึ้นไป เราจะสังเกตเชื้อรานี้ได้ด้วยตาเปล่า เพราะจะมีสีเขียวอมเหลืองหรือสีเขียวเข้ม นอกจากนี้เชื้อรายังเจริญได้ดีในวัตถุดิบทางการเกษตรหรือเมล็ดพืชที่เสื่อมสภาพ แดกหัก หรือเสียหายจากการทำลายของแมลง นก หรือหนู ซึ่งจัดเป็นแหล่งอาหารที่อุดมสมบูรณ์ของเชื้อรา *A. flavus* และ *A. parasiticus* ภูมิอากาศแบบร้อนชื้นทำให้เชื้อราเจริญเติบโต และสามารถสร้างสารพิษอะฟลาทอกซินได้ดี โดยสารพิษจะอยู่ภายในเมล็ดพืชหรือวัตถุดิบเหล่านั้น และไม่สามารถมองเห็นได้ด้วย



ตาเปล่า ประเทศไทยอยู่ในภูมิภาคดังกล่าว จึงทำให้มีความเสี่ยงสูงต่อการเกิดสารพิษอะฟลาทอกซินกับผลิตผลทางการเกษตร (อภิษฐา ช่างสุพรรณ, 2548)

อะฟลาทอกซินมักพบปนเปื้อนอยู่ในเมล็ดพืชที่มีน้ำมัน และธัญพืช เช่น เมล็ดฝ้าย ถั่วลิสง ข้าวโพด และเมล็ดทานตะวัน (Wilson and Payne, 1994) เมล็ดพืชเหล่านี้นำมาใช้เป็นวัตถุดิบในการผลิตอาหารสัตว์น้ำ การปนเปื้อนดังกล่าวสามารถเกิดขึ้นได้ทุกขั้นตอน ตั้งแต่ การเพาะปลูก การเก็บเกี่ยว การเก็บรักษา และการนำผลิตผลทางการเกษตรมาผลิตเป็นอาหารคนหรืออาหารสัตว์ การจัดการผลิตอาหารสัตว์ทั้งในระดับชาวบ้านและโรงงาน รวมถึงสภาพแวดล้อมของการเลี้ยงสัตว์ ก็มีผลต่อการปนเปื้อนของสารพิษเนื่องจากอะฟลาทอกซินจากเชื้อราในอาหารสัตว์เช่นกัน (ดวงจันทร์ สุประเสริฐ และ วนิกา ชูบุญดี, 2545) ประวัติการเกิดพิษของอะฟลาทอกซินพบว่า เป็นสาเหตุของโรคเอ็ช ในไก่งวง (Turkey X) ที่ได้ทำลายไก่งวง 100,000 ตัว ในประเทศอังกฤษปี 1960 และการระบาดที่คล้ายคลึงกันในลูกเป็ดและไก่ฟ้า เพราะการปนเปื้อนของลูกนัทจากประเทศบราซิล (อินทรีรา กระหม่อมทอง, 2540 อ้างถึงใน Lancaster et al., 1961)

อะฟลาทอกซินเป็นสารพิษประเภท heterocyclic compound สูตรโครงสร้างทางเคมีประกอบด้วยอนุพันธ์ของไดคูมาริน (dicoumarin) เกาะกับวงแหวนไฮโดรฟูแรน (dihydrofuran ring) (Jones, 1972) สูตรโครงสร้างของอะฟลาทอกซินแต่ละชนิด แสดงในภาพที่ 1



ภาพที่ 1 โครงสร้างของอะฟลาทอกซิน

จากสูตรโครงสร้าง พบว่า อะฟลาทอกซินชนิด G มีสูตรโครงสร้างคล้ายคลึงกับอะฟลาทอกซินชนิด B เพียงแต่เพิ่มออกซิเจนขึ้นมาอีก 1 ตัวซึ่งการเปลี่ยนแปลงนี้ทำให้ลดความเป็นพิษลงได้ครั้งหนึ่งของอะฟลาทอกซินชนิด B กล่าวคือ เมื่ออะฟลาทอกซินชนิด B₁ และ G₁ มีไฮโดรเจนเพิ่มขึ้นที่ตำแหน่งด้านนอกของวงแหวนฟิวเรน (furan ring) จะเปลี่ยนไปเป็นอะฟลาทอกซินชนิด B₂ และ G₂ ตามลำดับ ความเป็นพิษจะลดลงประมาณ 4.5 เท่า และถ้าเพิ่มหมู่ ไฮดรอกซิล (hydroxyl group; -OH) ก็จะเปลี่ยนไปเป็นอะฟลาทอกซินชนิด M₁ และ M₂ ตามลำดับ (เขาวมาลย์ คำเจริญ และคณะ, 2543)

อะฟลาทอกซินมีสมบัติละลายน้ำได้เล็กน้อย แต่ละลายได้ดีในตัวทำละลายอินทรีย์ เช่น คลอโรฟอร์ม เบนซีน อะซีโตน เอทานอล และเมทานอล ไม่ละลายในเฮกเซน อีเทอร์ และปิโตรเลียมอีเทอร์ มีความทนทานต่อความร้อนสูงถึง 260 องศาเซลเซียส ซึ่งเป็นอุณหภูมิที่สารพิษสลายตัว ดังนั้นการหุงต้ม อบ หรือนึ่งฆ่าเชื้อจึงไม่สามารถทำลายอะฟลาทอกซินให้หมดไปได้แต่อาจลดความเป็นพิษได้บ้าง แต่มีสารเคมีบางชนิดสามารถลดความเป็นพิษ หรือทำลายพิษของอะฟลาทอกซินได้บ้าง เช่น ไฮโปคลอไรท์ แอมโมเนีย ค่างแก่ ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ และเลื่อมสลายภายใต้อุณหภูมิต่ำ แสงแดด และแสงรังสีแกมมา ซึ่งจะทำให้โครงสร้างของอะฟลาทอกซินเปลี่ยนแปลงไปในสภาวะต่าง แต่สามารถกลับสู่โครงสร้างเดิมได้ในสภาวะกรดหรือกลาง ดังนั้นจึงไม่สามารถใช้สภาวะทางฟิสิกส์หรือทางเคมีทำลายอะฟลาทอกซิน (ไมตรี สุทธิจิตต์, 2529)

อะฟลาทอกซินถูกดูดซึมเข้าสู่ร่างกายทางลำไส้เล็ก หลังจากนั้นจะมีการรวมตัวรวมตัวกับอัลบูมินในกระแสเลือด และกระจายไปยังอวัยวะต่างๆ ของร่างกาย อะฟลาทอกซิน บางส่วนจะถูกขับออกจากร่างกาย ในหนูพบว่า 80-90 เปอร์เซ็นต์ ภายใน 24 ชั่วโมง ขับออกทางอุจจาระ 50-60 เปอร์เซ็นต์ ปัสสาวะ 20-30 เปอร์เซ็นต์ มีการสะสมที่บริเวณไตและในอวัยวะต่ำกว่า 1 เปอร์เซ็นต์ (Shang and Wogan, 1965)

เมื่ออะฟลาทอกซินมีการเคลื่อนย้ายไปสู่ตับและอวัยวะอื่น ๆ จะมีการเปลี่ยนแปลงเป็นพวกอีพอกไซด์ (Epoxide) ซึ่งจะไปรวมตัวกับดีเอ็นเอ (DNA) และอาร์เอ็นเอ (RNA) ทำให้ดีเอ็นเอเกิดความเสียหาย เอ็นไซม์ที่เกี่ยวข้องทำหน้าที่ไม่ได้ เช่น เอ็นไซม์พอลิเมอเรส (polymerase) ไม่สามารถทำงานได้ตามปกติ ทำให้การสร้างดีเอ็นเอและอาร์เอ็นเอลดลง แต่จะกลับเข้าสู่ภาวะปกติในระยะเวลา 12 ชั่วโมงหลังจากการได้รับอะฟลาทอกซินเพียงครั้งเดียว (เขาวมาลย์ คำเจริญ และคณะ, 2545) นอกจากนี้ ยังมีรายงานว่า สารพิษยังมีผลทำให้ไรโบโซม (ribosome) ในเซลล์มีลักษณะผิดปกติ และมีจำนวนลดลง มีการเสื่อมสลายของไมโทคอนเดรีย (mitochondria) ซึ่งมีผลต่อ

กระบวนการขนส่งอิเล็กตรอน ในกระบวนการหายใจของเซลล์เสียไป จึงมีผลทำให้ค่าต่าง ๆ ทางชีวเคมีเปลี่ยนแปลงไป (Roger and Newberne, 1967; Friedman et al., 1978)

การนำอาหารสัตว์ที่มีการปนเปื้อนของอะฟลาทอกซินไปเลี้ยงสัตว์ เป็นสาเหตุสำคัญที่ทำให้เกิดการสูญเสียทางเศรษฐกิจด้านการปศุสัตว์ รวมทั้งผลผลิตและผลิตภัณฑ์ที่ได้จากสัตว์ เช่น สัตว์มีอัตราการเจริญเติบโตลดลง อัตราการตายเพิ่มขึ้น ผลผลิตเนื้อ นม ไข่ลดลง คุณภาพไข่ลดลง ขนาดไข่ลดลง การฟักไข่ลดลง เปลือกไข่บางลง นอกจากนี้อะฟลาทอกซินยังสามารถผ่านไปตามกระแสโลหิต เกิดการสะสมในเนื้อเยื่ออวัยวะต่าง ๆ และผ่านไปสู่ผลิตภัณฑ์ที่ได้จากสัตว์ เมื่อคนบริโภคผลิตภัณฑ์ที่ได้จากสัตว์ อะฟลาทอกซินสามารถถ่ายทอดสู่คนได้ (เขาวมาลย์ คำเจริญ, 2543: คมกริช พิมพ์ภักดี, 2550)

ความเป็นพิษของอะฟลาทอกซิน มีทั้งพิษแบบเฉียบพลันและพิษแบบเรื้อรัง ซึ่งถ้าได้รับสารพิษจำนวนมาก ในระยะเวลาอันสั้นจะเกิดอาการเป็นพิษแบบเฉียบพลัน แต่ถ้าได้รับปริมาณน้อยและได้รับต่อเนื่องจะเป็นพิษแบบเรื้อรังและทำให้เกิดตับผิดปกติและเกิดมะเร็งที่ตับตามมา พิษในสัตว์มีความแตกต่างกันขึ้นกับชนิดของสัตว์ อายุ และความแตกต่างของสัตว์แต่ละตัว สัตว์แต่ละชนิดมีความไวรับต่อพิษของอะฟลาทอกซินแตกต่างกัน ขนาดของสารพิษ และระยะเวลาที่ได้รับพิษ (คมกริช พิมพ์ภักดี, 2550) นอกจากนี้ ความเป็นพิษในคนยังขึ้นกับ ภาวะของอาหารการกิน อายุ เพศ ฮอร์โมน การทำงานของเอ็นไซม์ต่าง ๆ ในตับ จำนวนครั้งและขนาดของสารพิษที่เข้าสู่ร่างกายของคนนั้น ๆ (ประสงค์ คุณานูวัฒน์, 2523) อะฟลาทอกซิน บี1 เป็นชนิดที่มีความรุนแรงที่สุด รองลงมาคือ จี1, บี2 และ จี2 ตามลำดับ (เขาวมาลย์ คำเจริญ, 2543) อะฟลาทอกซิน บี 1 มีพิษมากที่สุด โดยมีประสิทธิภาพหยุดยั้งการสร้างดีเอ็นเอและโปรตีนในเซลล์ตับ เนื้อตับถูกทำลาย เกิดภาวะไขมันแทรกในตับ (Fatty liver) ทำให้การทำหน้าที่ของตับเสียหายและเกิดมะเร็งตับ และทำลายระบบภูมิคุ้มกันซึ่งเกิดขึ้นได้ทั้งเป็นพิษแบบเฉียบพลันและแบบเรื้อรัง นอกจากนี้อะฟลาทอกซินยังสามารถกดภูมิคุ้มกันในลูกอ่อน โดยผ่านทางมดลูกของแม่สัตว์ทำให้ลูกสัตว์ขาดความต้านทานต่อโรค และไม่สามารถตอบสนองต่อการให้วัคซีนได้ดีเท่าที่ควร (โสมทัต วงศ์สว่าง, 2540) จะเห็นได้ว่าเรื่องของสารพิษอะฟลาทอกซินนี้จัดเป็นปัญหาทางสาธารณสุขอย่างหนึ่งที่ควรหาทางป้องกันและแก้ไข เนื่องจากการปนเปื้อนในอาหารหลายชนิดและในน้ำนม และเป็นสารก่อมะเร็ง ในคน ระยะแรกมีการทดลองความเป็นพิษในปลาเทราท์ (trout) ความเข้มข้นที่ทำให้ตายครึ่งหนึ่ง (LD_{50}) มีค่า 0.5-1.0 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัมของอะฟลาทอกซินที่ค่า 8 ไมโครกรัมต่อกิโลกรัม ในอาหารมีผลทำให้เกิดเนื้องอกที่ตับ (hepatoma) ในอัตราที่สูงและเกิดมะเร็งตับ ความเป็นพิษเฉียบพลัน (Acute toxicity) เกิดขึ้นเนื่องจากการได้รับอะฟลาทอกซินเข้าไปเป็นจำนวนมาก ในระยะเวลาอันสั้น อาการที่แสดงออกคือ การเกิดพิษต่อตับอย่างเฉียบพลัน การแข็งตัวของเลือด

ผิดปกติ เส้นเลือดฝอยฝักขาได้ง่าย เกิดเลือดออกเพิ่มระยะเวลาของการแข็งตัวของเลือด สัตว์อาจจะตายภายในไม่กี่ชั่วโมง หรือภายใน 2-3 วัน ในลูกเป็ดอายุ 1 วัน พบว่าค่า LD₅₀ มีค่า 0.364 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัมของอะฟลาทอกซิน สัตว์แบ่งเป็นกลุ่มที่ไวต่อพิษอะฟลาทอกซิน ได้แก่ เป็ด ไก่ ลูกโค หนูตะเภา และลูกสุกร ส่วนกลุ่มที่มีความต้านทานต่อพิษ ได้แก่ แกะ แพะ และหนู การเกิดพิษแบบเฉียบพลันในลูกเป็ดมีความต้านทานต่ออะฟลาทอกซินต่ำมาก จะแสดงอาการชักและตาย พบลักษณะหัว คอ และขาบิดไปข้างหน้า ลำตัวแอ่นไปข้างหน้า จากการผ่าซากพบจุดเลือดออกใต้ผิวหนังและอวัยวะภายใน ตับโตสีเหลืองซีด ไต ตับอ่อนและม้ามขยายใหญ่ มีอาการบวม น้ำรอบ ๆ หัวใจและหน้าแข้ง กรณีเกิดพิษแบบเรื้อรังเซลล์ตับจะเปลี่ยนแปลงเป็นเซลล์มะเร็ง ซึ่งพบในลูกเป็ดที่เลี้ยงด้วยอาหารที่ปนเปื้อนอะฟลาทอกซิน 35 ไมโครกรัมต่ออาหาร 1 กิโลกรัม เป็นเวลา 14 เดือน ในไก่ทดลองให้อาหารปนเปื้อนอะฟลาทอกซินระดับ 1.5 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม เกิดการเปลี่ยนแปลงทางพยาธิสภาพตับมีไขมันแทรก (fatty liver) และตับเกิดเนื้อตาย (necrosis) ถุงน้ำดีขยายใหญ่ (bile duct hyperplasia) ในไก่ไข่ที่ให้อาหารปนเปื้อนอะฟลาทอกซินให้ไข่น้อยลงและไข่มิขนาดลดลง (คมกริช พิมพ์ภักดี, 2550) การเกิดพิษเฉียบพลันในสุกรจะแสดงอาการผอม ขนหยาบกร้าน อุจจาระร่วงและมีสีเหลืองจัด ขาหลังอ่อนแรง ขึ้นตัวโก่ง ดิข่าน โลหิตจาง และตายภายใน 1-5 วัน กรณีการเกิดพิษเรื้อรังในสุกรพบภาวะตับเหลืองซีด มีการสะสมไขมันในเซลล์ตับ ถุงน้ำดีบวมและมีจุดเลือดออกรอบผิวหนัง มีน้ำคั่งในช่องอกหรือช่องท้อง ไตบวมและมีจุดเลือดออก พบเซลล์ตับตาย เซลล์บุท่อน้ำดีเพิ่มจำนวนมากขึ้น มีการเพิ่มปริมาณของเนื้อเยื่อเกี่ยวพันของตับ และพบการเพิ่มจำนวนเซลล์ตับ ในแกะมีความทนต่อพิษได้สูงที่ระดับ 3 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัมขึ้นไปและต้องได้รับอย่างต่อเนื่องเป็นเวลานานไม่ต่ำกว่า 4-6 สัปดาห์ขึ้นไป พบว่าถ้าได้รับอะฟลาทอกซินที่ระดับ 1.75 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม นาน 3.5 ปี ถึงจะทำให้เกิดมะเร็งตับและในระยะเวลา 45 ปี พบว่าทำให้เกิดมะเร็งโพรงจมูกมากกว่า 50 เปอร์เซ็นต์ของสัตว์ทดลอง (เยาวมาลย์ คำเจริญ และคณะ, 2545) สำหรับในโคและกระบือ นั้น การเกิดพิษในลูกโคและกระบือนั้นมีความรุนแรงมากกว่าในโคและกระบือตัวโตเต็มวัยลูกโคและกระบือจะแสดงอาการกระสับกระส่าย พยายามถ่ายหรือเบ่งมากจนทวารหนักทะลักและตายในที่สุด ในแม่โคนมแสดงอาการ ซึม เบื่ออาหาร น้ำหนักลด น้ำนมลด และมีอาการท้องมาน อวัยวะภายในต่าง ๆ บวม น้ำ มีการเพิ่มปริมาณของเนื้อเยื่อเกี่ยวพันของตับ เซลล์บุท่อน้ำดีเพิ่มจำนวนมากขึ้น เซลล์บุหลอดเลือดดำของตับมีการอักเสบอย่างเรื้อรัง ตับขยายใหญ่ขึ้น (อภิษฐา ช่างสุพรรณ, 2548) ในโคนมที่ได้รับอะฟลาทอกซินปนเปื้อนในข้าวโพดที่ระดับ 120 ไมโครกรัมต่อกิโลกรัม ทำให้น้ำนมลดลงถึง 28 เปอร์เซ็นต์ และมีการทดลองในโคนมพันธุ์ขาวดำ (Holstein Friesian) ทดลองเลี้ยงด้วยอาหารที่ปนเปื้อนอะฟลา

ทอกซินบี 1 นาน 7 วัน พบมีการขับออกของอะฟลาทอกซินเอ็ม 1 ในน้ำนม ค่าเฉลี่ย 1-2 เปอร์เซ็นต์ของอะฟลาทอกซินบี 1 (คมกริช พิมพ์ภักดี, 2550)

อะฟลาทอกซินเป็นสารที่ก่อให้เกิดอันตรายต่อสัตว์น้ำเช่นเดียวกับในสัตว์มีกระดูกสันหลังอื่น ๆ โดยมีผลทำให้การเกิดเนื้องอกและมะเร็งในตับปลาเทราท์สายรุ้ง (rainbow trout) (Wunder and Korn, 1982; Ruiz-perez et al., 1986) และมีอัตราการตายเพิ่มขึ้น (Tuan et al., 2002) ส่งผลกระทบต่ออัตราการรอด การเจริญเติบโตรวมทั้งระบบภูมิคุ้มกัน อ่อนแอ ป่วยง่าย (Harvey et al., 1992) ซึ่งทำให้มีผลกระทบต่อเนื้อไปถึงสุขภาพ และคุณภาพ รวมถึงปริมาณของผลผลิตของสัตว์น้ำด้วย (Chavez-Sanchez, 1994) อะฟลาทอกซินทำให้สัตว์น้ำโตช้า อ่อนแอ ว่ายน้ำผิดปกติ บวม น้ำ โลหิตจาง ตับเสื่อม มีเนื้อตาย มะเร็งตับและอัตราการตายสูง (Halver et al., 1966; Bruenger and Greuel, 1982; Jantrarotai and Lovell, 1990; Tengjaroenkul et al., 2006) ปลาเขตน้้ำอุ่นมีความไวต่ออะฟลาทอกซินน้อยกว่าปลาในเขตน้้ำเย็น ปลาเรนโบว์เทราท์ได้รับอะฟลาทอกซินบี 1 ระดับ 0.02 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัมอาหาร นาน 8 เดือน เป็นมะเร็งตับ 58% และมีค่า LD₅₀ เท่ากับ 0.81 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัมอาหาร ในปลานิลไนล์พบอัตราการโตลดลงและเกิดมะเร็งตับ เมื่อกินอาหารที่มีอะฟลาทอกซินบี 1 เกิน 1.88 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัมอาหาร นาน 75 วัน ปลาคูก (*Ictalurus punctatus*) ที่ได้รับอะฟลาทอกซินที่ระดับ 10 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัมอาหาร นาน 10 สัปดาห์ มีอัตราการเจริญโตลดลง มีรอยโรค มีรอยโรคที่อวัยวะภายในแต่ไม่เกิดมะเร็งตับ เนื่องจากปลาคูกมีเอนไซม์ที่มีประสิทธิภาพในการลดอันตรายจากสารพิษ ปลานิลนิ้วลูกผสมจิตรลดาที่ได้รับสารพิษอะฟลาทอกซินบี 1 ระดับ 100 มิลลิเมตรต่อกิโลกรัมอาหาร นาน 3 สัปดาห์ มีอัตราการตายมากกว่า 76% (เขาวมาลัย คำเจริญ และคณะ, 2545) ผลของอะฟลาทอกซินในปลาคูกผสมและปลานิลแปลงเพศ ทำให้อัตราการเลี้ยงรอดลดลง น้ำหนักเฉลี่ยและประสิทธิภาพการใช้อาหารลดลง (เขาวมาลัย คำเจริญ และคณะ, 2542; อรุษา อุสัน โน และคณะ, 2548; Harvey et al., 1989; Beaver et al., 1990; Lindemann et al., 1993) ปริมาณฮีโมโกลบินและโปรตีนในพลาสมามีค่าต่ำ เนื้อเยื่อตับและตับอ่อนมีการอักเสบ เซลล์บวมพอง นิวเคลียสขยายขนาด และเกิดเซลล์ตาย ความรุนแรงสัมพันธ์กับความเข้มข้นของอะฟลาทอกซิน ในกึ่งกุลาค่า อะฟลาทอกซินทำให้เซลล์ท่อตับฝ่อ (atrophy) มีการเพิ่มจำนวนของเซลล์เนื้อเยื่อระหว่างท่อตับ (hyperplasia of intertubular tissue) และการตายของเซลล์ตับ (necrosis) อย่างรุนแรง

ในคนการเกิดพิษเฉียบพลันนั้นไม่สามารถทดลองได้เหมือนในสัตว์ แต่ได้มีการศึกษาทางระบาดวิทยาโดยดูจากความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณที่มีอยู่ในอาหาร หรือในเลือด ปีศาจ และอวัยวะต่าง ๆ ที่อาจมีเชื้อราและอาการของโรคที่เกิดขึ้นภายหลัง พบในประเทศที่ขาดแคลนอาหารจากรายงานทางระบาดวิทยา โรคที่เกิดจากพิษของอะฟลาทอกซิน เช่น โรคตับอักเสบ อาการทาง



สมองในเด็กและมะเร็งตับ พบบ่อยในประเทศที่มีปัญหาการปนเปื้อนเชื้อราและอะฟลาทอกซินในอาหารประจำวัน เช่น ประเทศไต้หวัน อินเดีย เกาหลี อุกันดา และภาคตะวันออกเฉียงเหนือของประเทศไทย ซึ่งเป็นประเทศที่อยู่ในแถบเอเชียและแอฟริกา ซึ่งอากาศอบอุ่นและความร้อนสูง เป็นภาวะที่เหมาะสมต่อการเจริญเติบโตของเชื้อราได้ง่าย จากรายงานทางระบาดวิทยาในประเทศไทย ร่วมกับการตรวจโรคสมองในเด็กที่จังหวัดอุดรธานี (Udom Encephalopathy) ผู้ป่วยเข้ารักษาที่โรงพยาบาลประจำจังหวัด จำนวน 139 คน ชาย 63 คน หญิง 76 คน ด้วยอาการไข้ตัวร้อน คลื่นไส้ ท้องเดินบางรายมีอาการชัก และบางรายมีอาการหัวใจร่วมด้วย ส่วนใหญ่อาการรุนแรงและเสียชีวิตภายใน 48 ชั่วโมง นอกจากนี้ ผลจากการตรวจทางห้องปฏิบัติการยังมีระดับกลูโคสเพียง 2-10 มิลลิกรัมต่อเลือด 100 มิลลิกรัมเท่านั้นและมีระดับแอมโมเนียในเลือดสูงและมีรายงานการแยกวิเคราะห์และตรวจหาอะฟลาทอกซินบี 1 และบี 2 ทั้งในอวัยวะปัสสาวะ และอุจจาระพบว่า มีปริมาณสูงกว่าเด็กที่เป็นโรคอื่นอย่างชัดเจน ส่วนการเกิดพิษเรื้อรังนั้นในเด็กพบว่ามีอาการคล้ายกับ Reye's syndrome กล่าวคือ เด็กจะมีอาการชัก หมดสติเกิดความผิดปกติของเซลล์ตับและเซลล์สมอง เด็กจะเสียชีวิตภายในเวลา 2-3 วันเท่านั้น ซึ่งนับว่าเป็นภาวะของโรคที่เกิดขึ้นอย่างเฉียบพลัน หลังจากได้รับสารพิษแล้ว นับว่าเป็นอันตรายร้ายแรงต่อชีวิตเด็กเป็นอย่างมากในผู้ใหญ่มักเกิดในรูปแบบของการสะสมพิษเป็นเวลานานจึงจะแสดงอาการ ส่วนพิษแบบเรื้อรัง (Chronic toxicity) เกิดจากการกินอาหารที่ปนเปื้อนอะฟลาทอกซินในขนาดที่ต่ำ เป็นเวลานาน ได้มีการศึกษาความเป็นพิษของสารพิษนี้กันอย่างกว้างขวาง ผลสรุปได้ว่า สารพิษอะฟลาทอกซินไปทำอันตรายต่อเซลล์ตับ โดยมีไขมันสะสมมากที่ตับ ตับแข็ง ตับอักเสบ เลือดออกในตับ เซลล์ตับถูกทำลาย หากได้รับสารพิษนี้ในปริมาณมากถึงระดับหนึ่ง และได้รับเป็นเวลานานก็จะเกิดมะเร็งตับและมะเร็งท่อน้ำดี (Hepatocellular carcinoma หรือ Cholangio carcinoma) และตายในที่สุด (ประสงค์ คุณานุวัฒน์, 2523)

วิธีการตรวจหาสารอะฟลาทอกซินที่ปนเปื้อนในอาหารคน อาหารสัตว์พืชผลทางการเกษตร และวัตถุดิบอาหารสัตว์ แบ่งออกเป็น 2 กลุ่มใหญ่ ได้แก่ วิธีทางกายภาพและเคมีและวิธีทางชีววิทยา (คมกริช พิมพ์ภักดิ์, 2550)

วิธีการตรวจหาสารอะฟลาทอกซิน โดยวิธีทางกายภาพและเคมี ยังแบ่งออกดังนี้

1) วิธีทางโครมาโตกราฟี (Chromatographic Method)

- วิธีโครโทกราฟีทินเลเยอร์ (แบบผิวนาง) (Thin-Layer Chromatography, TLC)

- วิธีโครมาโตกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง (High Performance Liquid

Chromatography, HPLC)

- วิธีโครมาโตกราฟีแก๊ส (Gas chromatography, GC)



- 2) วิธีโดยอาศัยเครื่องมือ (Instrumental Method)
 - ฟลูออเดนซิตี (Fluordensity)
 - สเปกโทรโฟโตเมตรี (Spectrophotometry)
- 3) วิธีการตรวจวิเคราะห์อย่างรวดเร็ว (Rapid method)
 - บลู-กรีน-เยลโล-ฟลูออเรสเซนซ์เทส (Blue-green-yellow fluorescence test, BGYE)
 - มินิคอลัมน์ (Minicolumn detection)

วิธีการตรวจหาสารอะฟลาทอกซิน โดยวิธีทางชีววิทยา ยังแบ่งออกดังนี้

- 1) การสอบวิเคราะห์โดยชีววิธี (Bioassay)
 - การทดสอบโดยใช้เอ็มบริโอของไก่ (Chick embryo)
 - การทดสอบโดยใช้ลูกกุ้ง (brine shrimp larvae)
 - การทดสอบโดยใช้ลูกเป็ดอายุ 1 วัน (day-old duckling)
 - การทดสอบโดยใช้ปลาเทราท์ (trout)
 - การทดสอบโดยใช้จุลินทรีย์ (microorganism)
- 2) วิธีการวิเคราะห์โดยการวัดปฏิกิริยาแอนติเจน-แอนติบอดี (immunoassay)
 - เรดิโออิมมูโนแอสเซย์ (Radioimmunoassay, RIA)
 - อีไลซ่า (Enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA)

วิธีการตรวจหาอะฟลาทอกซิน มี 4 ขั้นตอนดังนี้ คือ

1) การชักตัวอย่าง (Sampling) และการเตรียมตัวอย่าง (Sample preparation) คือ การสุ่มตัวอย่างที่จะนำมาวิเคราะห์ ขั้นตอนนี้สำคัญมาก ตัวอย่างที่ชักมาต้องเป็นตัวแทนของกลุ่ม นำตัวอย่างที่ได้มาบด บั่น ให้มีขนาดเล็กลง เพื่อให้การสกัดมีประสิทธิภาพ

2) การสกัด (Extraction) ใช้ตัวทำละลายที่มีขั้วเล็กน้อย เช่น อะซีโตน คลอโรฟอร์ม หรือ เมธานอลผสมกับน้ำปริมาณเล็กน้อย สกัดแยกอะฟลาทอกซินออกจากตัวอย่างให้ได้มากที่สุด และอะฟลาทอกซินไม่เปลี่ยนแปลง

3) การกำจัดสิ่งเจือปนออก เพื่อให้ได้อะฟลาทอกซินเท่านั้น (clean-up and purification) เป็นการกำจัดสิ่งเจือปนออก เพื่อให้ได้อะฟลาทอกซินที่บริสุทธิ์ มาวิเคราะห์หาปริมาณ

4) การแยกและวิเคราะห์หาปริมาณ (Separation and quantification) ใช้วิธีการโครมาโตกราฟี (TLC และ HPLC) โดยเปรียบเทียบอะฟลาทอกซินที่ต้องการวิเคราะห์หาปริมาณกับอะฟลาทอกซินมาตรฐานที่ทราบปริมาณแน่นอน โดยเปรียบเทียบการเรืองแสง fluorescence วิธีการโครมาโตกราฟี (TLC และ HPLC) เป็นวิธีที่ใช้อ้างอิงได้



อะฟลาทอกซินที่ปนเปื้อนในอาหารและอาจตกค้างในผลิตภัณฑ์ที่ได้จากสัตว์ที่กินอาหารที่ปนเปื้อนสารพิษดังกล่าว ซึ่งอาจเป็นอันตรายต่อผู้บริโภคได้ องค์การอาหารและเกษตรกรรมแห่งโลก (FAO) กำหนดให้มีการปนเปื้อนอะฟลาทอกซินในอาหารได้ไม่เกิน 30 ไมโครกรัมต่อกิโลกรัม องค์การอาหารและของยาสหรัฐ (FDA) ให้มีในอาหารคนและอาหารสัตว์ได้ไม่เกิน 20 ไมโครกรัมต่อกิโลกรัม และประเทศเยอรมันให้มีในอาหารได้ไม่เกิน 5 ไมโครกรัมต่อกิโลกรัม เท่านั้น ส่วนในประเทศไทย (อรอุษา อุสัน โน, 2546) ซึ่งตามประกาศกระทรวงสาธารณสุขได้กำหนดไว้ว่า ต้องมีอะฟลาทอกซินอยู่ในอาหารไม่เกิน 20 ไมโครกรัมต่อกิโลกรัม (เขาวมาลัย คำเจริญ และคณะ, 2545)

3. สารดูดซับ (absorbents)

จากการที่สารพิษจากเชื้อราที่ปนเปื้อนในอาหารสัตว์ ส่งผลกระทบต่อคุณภาพ และผลผลิตของสัตว์เลี้ยง จึงทำให้มีการศึกษาวิธีที่ใช้ในการลดสารพิษจากเชื้อรานั้นอย่างจริงจัง เขาวมาลัย คำเจริญ และคณะ (2539) ซึ่งสอดคล้องกับ ไมตรี สุทธิจิตต์ และคณะ (2529) รายงานว่า การลดการปนเปื้อนของสารพิษจากเชื้อรามีหลายวิธีดังนี้

วิธีทางกายภาพ (Physical methods) หรือวิธีทางฟิสิกส์ ได้แก่ การคัดเลือกเมล็ดพืชที่มีเชื้อรา โดยการหยิบออกหรือกรองออก โดยเลือกเมล็ดที่มีการแตกหัก สีเปลี่ยน น้ำหนักเบา ลีบ เล็ก อาจจะใช้วิธีการตรวจสอบสารพิษจากเชื้อราโดยการฉายแสงอุลตราไวโอเลตบนเมล็ดแล้วเลือกเมล็ดที่มีแสงสีเขียวและสีฟ้าออก ในที่นี้ใช้ได้กับเมล็ดที่มีปริมาณอะฟลาทอกซินสูงที่ผิวของเมล็ดเท่านั้น การต้ม นึ่ง ภายใต้อุณหภูมิและการทอด สามารถลดพิษลงได้บ้างแต่ไม่หมดสิ้น อะฟลาทอกซินชนิดเอ็ม 1 ในน้ำมันสามารถทนต่อขบวนการพลาสมาเจอร์ไรเซชัน นอกจากนี้แสงแดดและแสงอุลตราไวโอเลตสามารถทำลายอะฟลาทอกซินได้ และเกิดเป็นสารใหม่ที่ไม่เรืองแสงมีพิษน้อยต่อลูกอ่อนไก่เมื่อเทียบกับอะฟลาทอกซินเดิม การใช้รังสีอิออนไนซ์ เช่น รังสีเอ็กซ์ รังสีแกมมา ให้ทั้งผลบวกและผลลบ สารสกัดด้วยสารละลายอินทรีย์ต่าง ๆ ได้แก่ อะซีโตน (acetone) คลอโรฟอร์ม (chloroform) เบนซีน (benzene) เป็นต้น และการใช้สารดูดซับ (Absorbents) เช่น สารเบนโทไนท์ (bentonite) ไปจับกับตัวสารพิษเพื่อยับยั้งการทำงานของสารพิษในทางเดินอาหาร

วิธีทางเคมี (Chemical methods) มีการนำสารเคมีหลายชนิดมาใช้ในการลดความเป็นพิษของสารพิษจากเชื้อรา เช่น แคลเซียมไฮดรอกไซด์ (calcium hydroxide) ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ (hydrogen peroxide) โซเดียมไบซัลเฟต (sodium bisulfate) กรดไฮโดรคลอริก (hydrochloric acid) ฟอร์มัลดีไฮด์ (formaldehyde) และแอมโมเนียมไฮดรอกไซด์ (ammonium hydroxide) ซึ่งพบว่าสารเหล่านี้มีผลในการต่อต้านพิษราจำพวก deoxynivalenol, ซีราลีโนน (zearalenone) ที-2 (T-2 toxin)

และอะฟลาทอกซิน และพบว่าวิธีการแอมโมเนียชัน (ammoniation) ได้รับความสนใจเป็นอย่างมากในการลดความปนเปื้อนของอะฟลาทอกซิน การใช้สารเคมีส่วนมากจะมีปฏิกิริยาหลายชนิดที่ถูกนำมาใช้ในการทำลายสารพิษอะฟลาทอกซิน เช่น ปฏิกิริยาออกซิเดชัน-รีดักชัน (oxidation-reduction) ปฏิกิริยาไฮดรอกซิเลชัน (hydroxylation) ปฏิกิริยาไฮโดรไลซิส (hydrolysis) และปฏิกิริยาแอมโมเนียชัน (ammoniation) ในสหรัฐอเมริกายอมรับวิธีนี้ โดยใช้ก๊าซแอมโมเนียมหรือ 1-2% สารละลายแอมโมเนียไฮดรอกไซด์

วิธีการทางจุลชีววิทยา (microbiological methods) เป็นกระบวนการหมักวัตถุดิบอาหารสัตว์ด้วยเชื้อจุลินทรีย์ชนิดต่าง ๆ เช่น ยีสต์ รา แบคทีเรียและสาหร่าย เป็นต้น กรดแลคติก (lactic acid) มีเอ็นไซม์ที่มีความสามารถในการต่อต้านพิษที่เกิดจากเชื้อราได้ ถูกสร้างจากแบคทีเรียในกระบวนการหมักทางธรรมชาติ โดยพบว่าแบคทีเรียจะไฮโดรไลซ์ (hydrolyze) ฟูโมนิซินบี 1 (fumonisin B1) เป็นอะมิโนฟีนอล (aminophenol) และไตรคาบอลลิติก แอซิด tricaballytic acid จากนั้นจุลินทรีย์จะทำลายพิษของ aminophenol โดยการปล่อยคาร์บอนไดออกไซด์ (CO₂) ออกมา การใช้ผนังเซลล์ยีสต์ (yeast cell wall) ในการลดพิษอะฟลาทอกซินในอาหารปลานิล โดยใช้อะฟลาทอกซินระดับ 1, 10 และ 50 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม ผสมผนังเซลล์ยีสต์ 0.2 เปอร์เซ็นต์นาน 8 สัปดาห์ พบว่าผนังเซลล์ยีสต์ 0.2 เปอร์เซ็นต์ สามารถลดพิษอะฟลาทอกซินในปลานิลได้ (Tengjaroenkul et al., 2006) วิธีการลดหรือทำลายสารพิษอะฟลาทอกซินมีหลายวิธีตามที่ได้กล่าวมาข้างต้น แต่ในปัจจุบันวิธีหนึ่งที่มีประสิทธิภาพ เป็นที่ยอมรับเนื่องจากมีราคาถูก และสามารถนำไปใช้ได้จริงในทางปฏิบัติ คือ การใช้สารดูดซับสารพิษ (Smith, 1980; New, 1987; Diekman and Green, 1992; Phillip et al., 1995)

ปัจจุบันวิธีกำจัดสารพิษอะฟลาทอกซินในอาหารสัตว์มีหลายวิธี เช่นวิธี ทางกายภาพ เคมิ และชีวภาพ (Phillips et al., 1995) แต่วิธีที่ได้รับความสนใจและนำมาใช้มาก คือ การใช้สารดูดซับ (adsorbents) เช่น สารพวกไฮเดรตโซเดียมแคลเซียมอะลูมิเนียมซิลิเกต (hydrated sodium calcium aluminosilicate, HSCAS) และเบนโทไนท์โดยใช้ผสมในอาหารสัตว์ (New, 1987; Winfree and Allred, 1992; Phillips et al., 1995; Ellis, 2000) เนื่องจากเป็นวิธีที่ง่ายต่อการปฏิบัติ ราคาถูก มีประสิทธิภาพสูงและลดความเป็นพิษในสัตว์ได้ดี สารดูดซับสารพิษอะฟลาทอกซิน ได้มีการผลิตและจำหน่ายอย่างแพร่หลาย โดยเฉพาะสารดูดซับประเภทสารอะลูมิเนียมซิลิเกต ได้แก่ สารพวกไฮเดรตโซเดียมแคลเซียมอะลูมิเนียมซิลิเกต (hydrated sodium calcium aluminosilicate, HSCAS) เป็นสารดูดซับในกลุ่มของผงดินเหนียว (clay) นอกจากนี้ยังมี สารซีโอไลท์และสารเบนโทไนท์ โดยใช้ผสมในอาหารสัตว์ โดยมีสารอะลูมิเนียมออกไซด์ (Al₂O₃) และซิลิกาออกไซด์ (SiO₂) เป็นองค์ประกอบหลักในการดูดซับพิษ สารเหล่านี้ทำหน้าที่ในการดูดซับพิษให้เกาะติดอนุภาค (Particle) ที่

พื้นผิวเพื่อป้องกันไม่ให้สารพิษถูกดูดซึมเข้าร่างกาย (เกรียงศักดิ์ พูนสุข, 2540) สารดูดซับมีคุณสมบัติเป็นดินเหนียว และมีเกลือแร่เป็นส่วนประกอบอยู่ภายใน เช่น แคลเซียม และแมกนีเซียม เป็นต้น เกลือแร่เหล่านี้มีความจำเป็นต่อร่างกาย และมีผลต่อสรีรวิทยาของสัตว์ เช่น เป็นส่วนประกอบของโปรตีนเนื้อเยื่อของเซลล์ กระบวนการออสโมซิส และระบบภูมิคุ้มกันของร่างกาย (จิรัมย์พร เจริญวิทย์, 2542) ดังนั้น จึงนิยมนำสารดูดซับมาผสมในอาหารให้สัตว์เลี้ยงกิน เพื่อลดความเป็นพิษจากสารพิษของเชื้อราซึ่งปนเปื้อนในอาหารของสัตว์เลี้ยง โดยการดูดซับสารพิษในระบบทางเดินอาหาร ช่วยให้การดูดซึมของสารพิษจากระบบการย่อยอาหารลดลง ทำให้สัตว์น้ำมีการเจริญเติบโตที่ดีขึ้น และมีความต้านทานโรคที่ดีขึ้นด้วย (จิรัมย์พร เจริญวิทย์, 2542) นอกจากนี้ ยังมีการศึกษาเกี่ยวกับกลไกการดูดซับสารพิษอะฟลาทอกซินว่าสารพิษนี้จะถูกดูดจับไว้ที่พื้นผิวโพรง รอยต่อระหว่างชั้นของโมเลกุลของสารดูดซับ ซึ่งเป็นเหตุให้สารพิษอะฟลาทอกซินนี้ไม่สามารถดูดซึมผ่านผนังลำไส้ แล้วเข้าสู่ร่างกายไปทำความเสียหายอวัยวะต่าง ๆ ได้ (Philip et al., 1995; Ellis et al., 2000)

เบนโทไนท์

เบนโทไนท์เป็นชื่อทางการค้าของแร่ดินเหนียวชนิดมอนต์มอริลโลไนต์ มาจากชื่อเมืองมอนต์มอริลโลนประเทศฝรั่งเศสเป็นที่แรกที่มีการจำแนกและใช้ดินเหนียวชนิดนี้ เนื่องจากสารดูดซับสารพิษกลุ่มเบนโทไนท์นี้มีธาตุที่เป็นองค์ประกอบหลักคือ มอนต์มอริลโลไนต์ (Montmorillonite) ซึ่งในบางกรณีก็อาจนำมาใช้เป็นชื่อเรียกแทนคำว่าเบนโทไนท์ก็ได้ (Eren et al., 2009) แหล่งดินเบนโทไนท์ที่สำคัญอยู่ที่รัฐไวโอมิง (Wyoming) ประเทศสหรัฐอเมริกา รองลงมาคือ ประเทศกรีซ เยอรมัน ญี่ปุ่น และตุรกี ประเทศไทยนั้นพบดินเบนโทไนท์มากที่สุดที่อำเภอชัยบาดาล จังหวัดลพบุรี เป็นชนิดแคลเซียมเบนโทไนท์ ประโยชน์ของดินเบนโทไนท์ มีหลายอย่าง เช่น การใช้เป็นสารหล่อเย็นในการขุดเจาะ เป็นสารฟอกสี หรือเพื่อทำความสะอาดในอุตสาหกรรมกลั่นน้ำมัน สารดูดซับ สามารถพอกทาแก้โรคผิวหนัง เช่น กลากเกลื้อนและบรรเทาอาการท้องร่วง

สารเบนโทไนท์มีแร่ดินเหนียวชนิดมอนต์มอริลโลไนต์ เป็นองค์ประกอบหลัก รองลงมาได้แก่ ซิลิกาออกไซด์ เหล็กออกไซด์ แคลเซียมออกไซด์ จากองค์ประกอบนี้เองทำให้เบนโทไนท์เป็นสารดูดซับที่ดี และสามารถเกิดการแลกเปลี่ยนไอออนได้ สารเบนโทไนท์เป็นสารดูดซับในกลุ่มสารอนินทรีย์ที่อยู่ในกลุ่มของผงดินเหนียว (clay) ในกลุ่มของอะมิโนซิลิเกต ซึ่งนอกจากเบนโทไนท์แล้วยังมีสารชนิดอื่นได้แก่ ซีโอไลท์ (zeolite) และไฮเดรตโซเดียมแคลเซียมอะลูมิโนซิลิเกต (hydrate sodium calcium aluminosilicate, HSCAS) เป็นต้น (Chung, 1994) ซึ่งสารกลุ่มนี้เป็นกลุ่มที่ถูกนำมาใช้ทดสอบความสามารถในการดูดซับสารพิษจากเชื้อรามากที่สุด เบนโทไนท์

แบ่งออกเป็น 3 กลุ่มดังนี้ โขเดียมเบนโทไนท์ แคลเซียมเบนโทไนท์และโพแทสเซียมเบนโทไนท์ ขึ้นกับว่ามีสารใดประกอบ เช่น โพแทสเซียม โขเดียม แคลเซียมและอลูมิเนียม เบนโทไนท์ เป็นต้น เบนโทไนท์ที่มีโซเดียมแทนที่มอนต์มอริลโลไนต์อยู่ในโครงสร้างเป็นปริมาณมากจะสามารถดูดซับน้ำได้ดีกว่าเบนโทไนท์ที่มีแคลเซียมหรือโพแทสเซียมแทนที่ในโครงสร้าง โขเดียมเบนโทไนท์เมื่อดูดซับน้ำแล้วสามารถในการพองตัวได้มาก 15-20 เท่าจากปริมาตรเดิม มีสมบัติเป็นตัวหล่อลื่นและกันการแพร่ผ่าน โดยนิยมใช้เป็นหัวเจาะโคลน และใช้ดูดหรือยาแนวขอบเขื่อนทำนบ สำหรับแคลเซียมและแคลเซียม-แมกนีเซียมเบนโทไนต์ มีความสามารถในการพองตัวได้น้อยกว่าโซเดียมเบนโทไนต์ ดังนั้นจึงนิยมใช้เป็นสารฟอกสี หรือเป็นสารคิเทอร์เจนต์ในการดูดซับน้ำมันจากพืชและสัตว์ นอกจากนี้ยังมีการนำไปดัดแปรโดยทำปฏิกิริยากับกรดได้แอคติเวเตดเคลย์ (Activated clays) สำหรับใช้เป็นตัวเร่งปฏิกิริยา หรือทำปฏิกิริยากับโซดาไฟเปลี่ยนจากแคลเซียมเป็นโซเดียมเบนโทไนต์ สำหรับสารดูดซับสารพิษกลุ่มเบนโทไนท์นี้สามารถพบได้ตามธรรมชาติในพื้นที่ต่างๆ ทั่วโลกโดยมีต้นกำเนิดมาจากการระเบิดของภูเขาไฟเช่นเดียวกับดินเหนียว (clay) ชนิดอื่น ๆ โครงสร้างโดยพื้นฐานของเบนโทไนท์ประกอบขึ้นมาจากแผ่นเตตระฮีดรัลลิโคออคติเนทเต็ดชีท (tetrahedrally coordinated sheets) จำนวน 2 แผ่นเชื่อมกันโดยอะตอมของซิลิกอนไอออน (silicon ions) แล้วเรียงตัวล้อมรอบโครงสร้างแบบแซนด์วิชของออกตะฮีดรัลลิโคออคติเนทเต็ดชีท (octahedrally coordinated sheet) และอะตอมของอลูมิเนียมไอออน (aluminum ions) โดยที่บนแผ่น tetrahedral จะมีไอออนของ Al^{3+} สำหรับจับกับไอออนของ Si^{4+} และในแผ่น octahedral จะมีไอออนของ Mg^{2+} สำหรับจับกับ Fe^{3+} และ Al^{3+} ซึ่งจากการเกิดโครงสร้างดังที่ได้กล่าวมานั้นทำให้ประจุรวมบนพื้นผิวของโมเลกุลสารดูดซับกลุ่มนี้เป็นลบ (Luckham et al., 1999)

เมื่อเปรียบเทียบกับ clay ชนิดอื่น ๆ แล้วสารดูดซับสารพิษกลุ่มเบนโทไนท์มีคุณสมบัติที่ดีมากในการดูดซับสารพิษ และการยึดเกาะกันกับตัวสารพิษนั้นสามารถเกิดขึ้นได้ทั้งในส่วนของแผ่นด้านใน (interlayer space) และบริเวณผิวด้านนอกของโมเลกุลสารดูดซับ ซึ่งจากการศึกษาการเกิดการเกาะจับกันระหว่างสารดูดซับสารพิษกลุ่มเบนโทไนท์และสารพิษพบว่าสามารถเกิดขึ้นได้ 2 กลไก กลไกแรกคือ เกิดจากการแลกเปลี่ยนประจุระหว่างกันของสารทั้งสองในตำแหน่งเกาะจับ และกลไกที่สองคือ เกิดจากการเกิด โครงสร้างเชิงซ้อนขึ้นขึ้นกับหมู่ไฮดรอกซิล (hydroxyl group, OH) (Abolino et al., 2003) กลไกการดูดซับสารพิษอะฟลาทอกซินพบว่าสารพิษนี้จะถูกดูดจับไว้ที่พื้นผิว โพรงหรือรอยต่อระหว่างชั้นของโมเลกุลของสารดูดซับ ทำให้สารพิษอะฟลาทอกซินนี้ไม่สามารถดูดซึมผ่านผนังลำไส้ แล้วเข้าสู่ร่างกาย ไปทำลายเซลล์อวัยวะต่าง ๆ ได้ (Phillips et al., 1995; Ellis et al., 2000) มีการใช้สารดูดซับโซเดียมเบนโทไนท์ที่ระดับ 0.5% ขึ้นไป พบว่ามีประสิทธิภาพในการดูดซับอะฟลาทอกซินปี 1 (อรประพันธ์ พุ่มอินทร์, 2536; Lindemann et al.,

1993; Chung, 1994; Santurio et al., 1999) นอกจากนี้ สารดูดซับกลุ่มนี้จะไม่รบกวนต่อการใช้ประโยชน์ของไฟเคท ฟอสฟอรัส วิตามินเอ วิตามินบี1 และแมงกานีส แต่ถ้าใช้ผสมในอัตรา 1% พบว่าจะมีผลต่อการใช้ประโยชน์ของสังกะสีในอาหารได้ (Chung et al., 1990)

สารดูดซับสารพิษกลุ่มเบนโทไนท์นอกจากใช้ในการดูดซับสารพิษแล้ว ยังมีการนำมาประยุกต์ใช้ในอุตสาหกรรมต่าง ๆ เช่น ใช้ในปฏิกิริยาแคลริฟิเคชัน (clarification) ในอุตสาหกรรมการผลิตเครื่องดื่ม และในปฏิกิริยาคัลเลอร์เรชัน (decoloration) ในอุตสาหกรรมการผลิตน้ำมัน เป็นต้น (var et al., 2008)

ในด้านการใช้ดูดซับสารพิษที่เคยได้มีการศึกษา เช่น การนำสารดูดซับสารพิษกลุ่มเบนโทไนท์มาใช้ในการดูดซับสารพิษอะฟลาทอกซินชนิด M_1 (AFM₁) ในน้ำนม จากการศึกษาพบว่าสามารถจับพิษได้ถึง 65-79% และสามารถจับสารพิษออกได้ถึง 100% เมื่อใช้ในการดูดซับสารพิษอะฟลาทอกซินในสารละลายที่เป็นของเหลว (Diaz et al., 2002) เป็นต้น สำหรับการศึกษาเปรียบเทียบกับสารดูดซับชนิดอื่น เช่น การศึกษาเปรียบเทียบประสิทธิภาพในการดูดซับสารพิษอะฟลาทอกซินชนิด M_1 ในน้ำนมระหว่างสารดูดซับสารพิษกลุ่มเบนโทไนท์ และกลุ่มไฮเดรตโซเดียมแคลเซียมอะลูมิเนียมซิลิเกต (hydrate sodium calcium aluminosilicate, HSCAS) ซึ่งเป็นสารดูดซับสารพิษอีกกลุ่มหนึ่งซึ่งมีความสามารถในการดูดซับสารพิษต่าง ๆ ได้หลายชนิด จากการศึกษาพบว่า สารดูดซับสารพิษกลุ่มเบนโทไนท์มีประสิทธิภาพดีกว่าในการดูดซับสารพิษอะฟลาทอกซินชนิด M_1 ในน้ำนม (Veldman, 1992)

นอกจากนี้ ยังมีรายงานวิจัยการทดลองใช้โซเดียมเบนโทไนท์ (sodium bentonite) ในการทดสอบสารพิษของ Aflatoxin B1 (AFB₁) ซึ่งจากการทดลองพบว่าสารดังกล่าวสามารถป้องกันการดูดซึม AFB₁ ที่บริเวณลำไส้เล็กได้ (Rosa et al., 2001) ซึ่งในการศึกษาต่อมา ยังพบอีกว่าเบนโทไนท์มีประสิทธิภาพดีทั้งในการเข้าจับสารพิษ และการลดความเป็นพิษของสารพิษ (Magnoli et al., 2008) การศึกษาอื่น ได้แก่ การทดลองผสมเบนโทไนท์ในอาหารของเป็ดไก่แล้วทดลองให้เป็ดไก่กิน พบว่าที่ส่วนผสม 0.3% ของเบนโทไนท์มีผลให้น้ำหนักของตัวไก่เป็ดลดลง ส่วนอัตราของอาหารที่กินได้ของสัตว์นั้นพบว่า ไม่มีนัยสำคัญ เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม (Miazzo et al., 2005) สารดูดซับโซเดียมเบนโทไนท์ ที่ระดับ 0.5% ขึ้นไป มีประสิทธิภาพในการดูดซับอะฟลาทอกซินบี1 (อรประพันธ์ พุ่มอินทร์, 2536; Lindemann et al., 1993; Chung, 1994; Santurio et al., 1999) สามารถลดพิษของอะฟลาทอกซินได้ ทั้งในสารละลายและดูดซับอะฟลาทอกซินเอ็ม 1 ในน้ำนมดิบ สารดูดซับโซเดียมเบนโทไนท์ไม่มีผลกระทบต่อสัตว์ ในปลาเทราท์สายรุ้ง (rainbow trout) การเติมโซเดียมเบนโทไนท์ (Sodium bentonite) 2 เปอร์เซ็นต์ในอาหารที่ปนเปื้อนอะฟลาทอกซินบี 1 พบว่า โซเดียมเบนโทไนท์ จะขัดขวางไม่ให้อะฟลาทอกซินในอาหาร

ถูกดูดซึมเข้าสู่ผนังลำไส้ คับ และไต ได้ 80 ± 10 เปอร์เซ็นต์ และพบการขับออกทางของเสีย (Ellis et al., 2000)

4. จุลทรรศน์อิเล็กตรอน

จุลทรรศน์อิเล็กตรอน เป็นวิชาวิทยาการแขนงใหม่ซึ่งได้วิวัฒนาการมาในรอบ 75 ปีที่ผ่านมา เป็นการศึกษาสิ่งทีเล็กทีไม่สามารถแจกแจงรายละเอียดโดยใช้กล้องจุลทรรศน์ธรรมดา ต้องใช้กล้องที่เรียกว่า กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอน (Electron Microscope) และอุปกรณ์ที่เกี่ยวข้องและวิธีการเพื่อหาข้อมูลเพื่อวิเคราะห์และแปลผล เพื่อศึกษาให้เข้าใจถึงองค์ประกอบและโครงสร้าง รวมทั้งหน้าที่ที่เกี่ยวข้องกับโครงสร้างให้ลึกซึ้งยิ่งขึ้น อุปกรณ์ที่จำเป็นสำหรับงานด้านจุลทรรศน์อิเล็กตรอนคือกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอน ช่วยให้เห็นรายละเอียดได้ชัดเจนยิ่งขึ้น มีกำลังขยายสูง และมีการแจกแจงรายละเอียดได้ดีกว่ากล้องจุลทรรศน์ชนิดธรรมดา สามารถแจกแจงรายละเอียดได้ถึงระดับโมเลกุล (เวคิน นพนิตย์, 2524) กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนเป็นเครื่องมือที่มีประสิทธิภาพสูงสุดในการขยายภาพมีกำลังขยายสูงสุดถึง 1 ล้านเท่า และมีความสามารถในการแยกจุดสองจุดที่อยู่ใกล้กันทีสุดใกล้เคียงกันเป็นสองจุด ที่เรียกว่า รีโซลูชัน (Resolution) ได้ละเอียดถึง 0.1 นาโนเมตร (สุภลักษณ์ โรมรัตนพันธ์, 2545) กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนมี 2 แบบ คือ กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องผ่าน (Transmission Electron Microscope - TEM) ลำแสงอิเล็กตรอนผ่านทะลุได้ ใช้ศึกษารายละเอียดขององค์ประกอบภายในของตัวอย่างซึ่งได้ตัดไว้บางโดยวิธีพิเศษ และกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด (Scanning Electron Microscope - SEM) ใช้ศึกษารายละเอียดของพื้นผิว (Surface) ของตัวอย่าง ภาพที่เกิดขึ้นคือภาพสามมิติที่มีความลึก ใช้ประโยชน์ในการศึกษาลักษณะภายนอกของตัวอย่าง เช่นผิวนอกของเนื้อเยื่อ และเซลล์ หรือหน้าตัดของโลหะหรือวัสดุทุกชนิดตามต้องการ

4.1 หลักการของกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอน (ณรงค์ จึงสมานญาติ, 2536)

กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอน เป็นเครื่องมือที่กำเนิดลำแสงอิเล็กตรอน (Electron Beam) เคลื่อนที่ตรงไปกระทบตัวอย่าง (Specimens) จะเกิดปฏิกิริยาชนกันระหว่างอิเล็กตรอนที่เคลื่อนที่ไปกระทบกับอิเล็กตรอนของตัวอย่างทำให้เกิดปรากฏการณ์ดังนี้

- 4.1.1 เกิดอิเล็กตรอนสะท้อนกลับ (Reflected Electron)
- 4.1.2 เกิดอิเล็กตรอนที่ถูกดูดจับไว้ในตัวอย่าง (Absorbed Electron)
- 4.1.3 เกิดรังสีแม่เหล็กไฟฟ้า (Electromagnetic Radiation)
- 4.1.4 เกิดอิเล็กตรอนเปล่งออกจากตัวอย่าง (Emitted electron)

4.1.5 เกิดรังสีไฟฟ้าประจุบวก (Positive charged Ion)

4.1.1 อิเล็กตรอนที่ผ่านทะลุตัวอย่าง

อิเล็กตรอน (Primary Electron) จำนวนหนึ่ง จะวิ่งผ่านทะลุตัวอย่างที่บางออกมา โดยไม่ชนกับอะตอมของตัวอย่างเลย (primary Unscattered Electron) หรืออิเล็กตรอนวิ่งชนกับอะตอมของตัวอย่างที่ไม่มีการยืดหยุ่นก็จะถูกลดความเร็วลง (Inelastically scattered primary electron) หรืออิเล็กตรอนวิ่งชนอะตอมของตัวอย่างที่ยืดหยุ่นได้ก็จะทำให้อิเล็กตรอนเปลี่ยนทิศทางไปเป็นมุมกว้างหรือมุมแคบ (Wideangle or narrow elastically scattered primary electron)

4.1.2 อิเล็กตรอนที่สะท้อนกลับ

เมื่ออิเล็กตรอนส่องกระทบตัวอย่างที่แข็ง อิเล็กตรอนที่วิ่งกระทบจะหันเหเปลี่ยนทิศทางเป็นมุมกว้างโดยไม่เสียพลังงาน ส่วนหนึ่งของอิเล็กตรอนที่เปลี่ยนทิศทางเหล่านี้ไหล่พื้นผิวของตัวอย่างขึ้นมาตรงจุดที่วิ่งชน เรียกว่า Backscatter Primary Electrons ซึ่งส่วนใหญ่เป็นปฏิกิริยาชนกัน ระหว่างอิเล็กตรอนที่วิ่งไปกระทบกับนิวเคลียสของอะตอม มีการเสียพลังงานน้อยมากเมื่อเทียบกับปฏิกิริยาชนกัน ระหว่างอิเล็กตรอนกับอิเล็กตรอน Backscatter Electron สามารถขึ้นมาจากส่วนลึกของตัวอย่างที่ลึกจากผิวหลาย Micrometer ถึงแม้ Backscattered Electron จะมีพลังงานเกือบเท่าพลังงานของลำแสงอิเล็กตรอน แต่อิเล็กตรอนที่ไหล่พื้นผิวขึ้นมาจะเกิด 50 eV (รูป 1-1)

เมื่ออิเล็กตรอนที่วิ่งไปกระทบชนอิเล็กตรอนของตัวอย่างที่ไม่มีการยืดหยุ่น (Inelastic collision) ก็จะทำให้อิเล็กตรอนของตัวอย่างซึ่งเรียกว่า Secondary Electron หลุดออกจากอะตอมของตัวอย่างตรงบริเวณที่ชน แล้วเคลื่อนที่ไปทุกทิศทางและบางส่วนของ Secondary Electron ไหล่พื้นผิวของตัวอย่างออกมา ซึ่งส่วนใหญ่มีพลังงาน 2-5 eV Secondary Electron มาจากส่วนของตัวอย่างที่ลึกลงไป 5-10 mm (รูป 1-1)

4.1.3 อิเล็กตรอนที่ถูกดูดซับไว้ในตัวอย่าง

เมื่อตัวอย่างถูกลำแสงอิเล็กตรอน อิเล็กตรอนส่วนหนึ่งจะถูกดูดซับไว้ในตัวอย่างซึ่งอิเล็กตรอนเหล่านั้นจะมารวมกันอยู่ที่ผิวของตัวอย่างถ้าไม่ต่อให้ลงดินโดยให้ผ่านทางที่มีความต้านทานต่ำ (Low-Resistance Path) อิเล็กตรอนที่สะสมอยู่ที่ผิวตัวอย่างเหล่านี้จะเพิ่มประจุไฟฟ้าขึ้นเรื่อย ๆ ทำให้อิเล็กตรอนที่วิ่งไปกระทบ ถูกผลักเปลี่ยนทิศทางออกไปจากผิวตัวอย่าง (Marshall, 1975) เป็นผลทำให้เพิ่มความสว่างผิดปกติ (Brightness) ของภาพที่เกิดจาก Secondary Electron ซึ่งส่วนหนึ่งอาจเป็นเพราะบริเวณรอบ ๆ นั้นมืด เนื่องจากเป็นบริเวณที่เกือบจะไม่มีอิเล็กตรอนสะสมอยู่ หรือส่วนหนึ่งอาจจะเป็นเพราะ Effective Secondary Electron Coefficient

เพิ่มขึ้น ซึ่งมีความสำคัญมากสำหรับตัวอย่างของสิ่งมีชีวิต (Biological Specimens) ที่ผิวขรุขระ ลักษณะเกิดการเปลี่ยนแปลงของความสว่างของภาพนี้เรียกว่า Charging Artifacts ตัวอย่างที่ไม่เป็นตัวนำของกระแสไฟฟ้าโดยเฉพาะพวกตัวอย่างของสิ่งมีชีวิต ที่ทำให้แห้งแล้วจะป้องกันไม่ให้อิเล็กตรอนที่สะสมอยู่ในตัวอย่างถ่ายเทลงดิน ดังนั้น กรแก้ไข Charging กระทำได้โดยการเคลือบผิวตัวอย่างด้วยฟิล์มบาง ๆ ของไอ โลหะ ที่เหมาะสม

อิเล็กตรอนที่ถูกดูดซับอยู่ในตัวอย่างนี้สามารถจะนำมาทำให้เกิดภาพในกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบลำแสงส่องกราด โดยให้อิเล็กตรอนผ่านตัวด้านที่มีค่าสูง แล้วแปลงเป็นความสว่างของ Display Tube Spot ก่อนที่จะให้ผ่านลงในดิน วิธีนี้มีประโยชน์มากในการศึกษาโครงสร้างของโลหะและตัวนำไฟฟ้า (Conductors)

4.1.4 รังสีแม่เหล็กไฟฟ้า

เมื่ออิเล็กตรอนที่วิ่งไปกระทบมีพลังงานสูง (High-Energy Incident Electron) วิ่งชนกับอิเล็กตรอนวงนอกของสารชนิดหนึ่ง แล้วสารนั้น เปล่งพลังงานแม่เหล็กไฟฟ้า (Electromagnetic quanta) ออกมาในช่วงคลื่นแสงที่มองเห็นได้ (Visible spectrum) ปรากฏการณ์นี้เรียกว่า Cathodoluminescence ซึ่งมันเกิดขึ้นในขณะที่อะตอมของตัวอย่างที่ถูกชนด้วยอิเล็กตรอนที่ยิง (Incident Electron) นั้นคลายตัวกลับสู่ภาวะสมดุล โดยการเปล่งพลังงานส่วนหนึ่งที่รับมาจากลำแสงอิเล็กตรอนออกมาในรูปของแสงสว่าง ตัวอย่างของ Cathodoluminescence ที่เห็นง่าย ได้แก่ จอทีวี หรือภาพที่เกิดบน Fluorescent Screen ในกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบลำแสงส่องผ่าน (TEM) ซึ่งเกิดจากลำแสงอิเล็กตรอนวิ่งชน Fluorescent particles (ZnS) สารที่มีโมเลกุลขนาดใหญ่ และสามารถเกิด Cathodoluminescence ในกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบลำแสงส่องกราด (SEM) ได้มีหลายชนิดตัวอย่าง เช่น Amino acids (Tryptophan และ Tyrosine), Nucleic acid bases (Adenine, Thymine, และ Guanine) และ Thymus DNA ของลูกโค ยาฆ่าวัชพืช (Herbicides) ที่ใช้กันส่วนใหญ่จะแสดง cathodoluminescence เมื่อถูกชนด้วยอิเล็กตรอน ดังนั้น จึงใช้คุณสมบัติอันนี้ในการหาตำแหน่งของยาฆ่าวัชพืชบนผิวใบพืช

เมื่อลำแสงอิเล็กตรอนที่มีพลังงานสูงพอวิ่งชน solid specimen จะเกิดปฏิกิริยาชนกัน 2 ชนิดที่ทำให้เกิด x-rays, ปฏิกิริยาชนกันของอิเล็กตรอนทั้งสองชนิดนี้เป็นการแตกตัวของอิเล็กตรอนวงใน (inner shell ionization) และ core scattering การแตกตัวของอิเล็กตรอนวงในจะได้ characteristic x-rays และส่วน core scattering จะทำให้เกิดการแผ่รังสี x-rays ติดต่อกัน characteristic x-rays เปล่งออกมาจากแร่ธาตุชนิดหนึ่ง โดยเกิดปฏิกิริยาชนกันของอิเล็กตรอนที่วิ่งไปกระทบชนกับอิเล็กตรอนวงในของอะตอมที่ประกอบขึ้นเป็นตัวอย่าง ถ้าอิเล็กตรอนที่วิ่งชนมีพลังงานมากพอ ทำให้ชนผลัก core electron ออกจากอะตอมเดิม และเกิดช่องว่างขึ้น (orbital



vacancy) ในวงอิเล็กตรอนนั้น (shell) ดังนั้น เพื่อให้จะให้อะตอมนี้กลับสู่สภาพเดิม (ground level) อิเล็กตรอนหนึ่งที่อยู่ใวนวงนอก (outer shell) จะเข้ามาแทนที่ช่องว่างใวนวงใน (inner shell) ที่อิเล็กตรอนถูกชนออกไป สภาวะนี้เรียกว่า electronic relaxation การคลายตัวกลับสู่สภาพเดิมของอะตอมจะคลายพลังงานโดยการปล่อย photon ออกมา การคลายพลังงานนี้เกิดขึ้นเพราะอิเล็กตรอนของวงนอก (เช่น L Shell) ซึ่งมีพลังงานสูงกว่า จะให้พลังงานออกมากเมื่อมันตกเข้าไปแทนที่อิเล็กตรอนชั้นใน (เช่น K Shell) (รูป 1-2)

การเปล่งรังสี x-ray photon จะมีพลังงานเท่ากับ ความแตกต่างระหว่างพลังงานของอิเล็กตรอน 2 วง เพราะว่า atomic electrons จะมีระดับพลังงานขึ้นอยู่กับจำนวนพลังงานของอะตอม (quantum number of the atom) ดังนั้น ความยาวคลื่นของ characteristic x-rays จะมีลักษณะเฉพาะสำหรับอะตอมของธาตุที่มี atomic number จำนวนหนึ่ง การปรากฏ characteristic x-rays line แสดงว่ามีแร่ธาตุเฉพาะชนิดหนึ่ง (specific element) ในตัวอย่าง (atomic number สูงขึ้นจะได้ความยาวคลื่น x-rays ต่ำลง) ด้วยเหตุนี้สามารถใช้ x-ray lines เหล่านี้แสดงส่วนประกอบของตัวอย่าง (แสดง atomic composition ของบริเวณที่ลำแสงอิเล็กตรอนตกกระทบ) โดยการวัดความยาวคลื่นของ x-rays ที่เปล่งออกมา แต่ใช้ไม่ได้กับแร่ธาตุที่มี atomic number ต่ำมาก ๆ

เมื่ออิเล็กตรอนมีพลังงานสูงพอวิ่งชนอะตอมของตัวอย่าง จะเกิด continuous radiation หรือ continuum แต่ออกมาเหนือจาก characteristic x-rays continuum ประกอบด้วย photons ที่เปล่งออกมาโดยอิเล็กตรอนชนกับอะตอม ถ้าตัวอย่างมี atomic number สูงก็จะมี nuclear scattering (มี photon เปล่งออกหรือ continuum) มากกว่า และ continuum จะเข้มข้นขึ้นด้วยถ้าเพิ่ม voltage

4.1.5 อิเล็กตรอนที่เปล่งออกจากตัวอย่าง

เมื่ออิเล็กตรอนวงในของอะตอมตัวอย่างถูกชนด้วยอิเล็กตรอนที่มีพลังงานสูง อิเล็กตรอนวงในจะเกิดแตกตัวปล่อยอิเล็กตรอนออกไป ดังนั้น ก็เกิดที่ว่างขึ้น อิเล็กตรอนจากวงนอก ซึ่งมีพลังงานสูงกว่าจะเข้าแทนที่ อะตอมก็มีพลังงานสูงขึ้น อะตอมจึงปล่อยรังสี x-ray photon หรือ auger electron ออกมา พลังงานของ auger electron เกือบเท่าพลังงานที่แตกต่างระหว่างอิเล็กตรอน 2 ชั้น ดังนั้น แต่ละอะตอมจะให้ auger electron ซึ่งสามารถใช้ identify atom ได้ auger electron ที่ถูกปล่อยออกจากอะตอมจะถูกนำไปยังผิวของตัวอย่างและกลายเป็นประจุเชื่อมต่อที่ผิวนอกก่อนที่จะหลุดเข้าไปในสุญญากาศการเกิด auger electron ขึ้นอยู่กับ atomic number ของ elements ที่มีอยู่ในตัวอย่างลึกจากผิวประมาณ 1 nm ดังนั้น auger analysis จึงตรวจจับเฉพาะส่วนประกอบของตัวอย่างที่อยู่ถัดจากผิวหน้าตัวอย่างเท่านั้น และมี energy ประมาณ 5-2,000 eV

จากปรากฏการณ์ทั้งหลายเหล่านี้พอจะแบ่งตามลักษณะของลำแสงอิเล็กตรอนที่จะทำให้เกิดภาพของตัวอย่างได้ 2 แบบ ดังนี้ คือ

แบบแรก เป็นลำแสงอิเล็กตรอนที่อยู่กับที่และมีความสม่ำเสมอ เป็นเนื้อที่ค่อนข้างกว้าง (ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง $(1 \mu\text{m} - 1 \text{mm})$) ใช้ตัวอย่างได้บริเวณกว้าง กำลังขยายของภาพทำได้โดยปรับอิเล็กตรอนเลนส์ ซึ่งมี resolving power อยู่ในขีดจำกัด ลักษณะของลำแสงอิเล็กตรอนแบบนี้เรียกว่า fixed beam, flood beam หรือ conventional operation

แบบที่สอง เป็นลำแสงอิเล็กตรอนที่ถูกทำให้เป็นจุดเล็กมากและเข้มมาก ๆ โฟกัสลงบนตัวอย่างเป็นจุดแสงสว่างเล็ก ๆ (ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง $2^\circ\text{A} - 200^\circ\text{A}$) แล้วเคลื่อนจุดแสงสว่างเล็ก ๆ นี้ไปทางด้านข้างโดยใช้สนามแม่เหล็กดึงลำแสงอิเล็กตรอน ดังนั้น จุดแสงสว่างจะเคลื่อนผ่านขวางส่องกราด (scan) ไปบนตัวอย่าง (รูป 1-3) เป็นเส้นมีขนาดเท่ากับขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางของลำแสง แล้วลำแสงจะถูกดึงกลับอย่างรวดเร็วมาที่เดิม ตั้งต้นส่องกราดไปบนตัวอย่างถัดจากบริเวณแรก ลำแสงจะถูกดึงมาส่องกราดไปบนตัวอย่างทำนองเดียวกันนี้จนทั่วทั้งผิวดตัวอย่าง ลักษณะแบบของเส้นลำแสงที่ส่องกราดไปบนตัวอย่างทำนองเดียวกันนี้จนทั่วทั้งผิวดตัวอย่าง ลักษณะแบบของเส้นลำแสงที่ส่องกราดไปบนตัวอย่างนี้เรียกว่า raster (ซึ่งเราสามารถเห็นลักษณะ raster นี้ได้จากจอทีวีเมื่อเวลาดูใกล้ ๆ) ในขณะที่ลำแสงถูกดึงให้ส่องกราดไปบนตัวอย่างนั้น อิเล็กตรอนที่สะท้อนกลับ (secondary และ primary backscatter electron) จะถูกจับด้วย detector แล้วเปลี่ยนและขยายเป็นสัญญาณไฟฟ้าไปให้เป็นจุดแสงสว่างบนจอทีวี (CTR) ซึ่งจุดแสงสว่างนี้จะเคลื่อนส่องกราดไปบนจอเช่นเดียวกัน โดยใช้ scan generator ตัวเดียวเป็นตัวควบคุมกระแสไฟฟ้าที่จะเข้า probe scan coils และ display scan (รูป 1-4) เพื่อทำให้เกิดสนามแม่เหล็ก ดึงจุดแสงสว่างให้เคลื่อนไปพร้อมกัน โดย probe scan coils จะทำหน้าที่ดึงลำแสงอิเล็กตรอนให้เคลื่อนผ่านไปบนตัวอย่างและในขณะเดียวกัน display scan coils ก็จะทำหน้าที่ดึงลำแสงในจอทีวี (cathode ray tube) ให้เคลื่อนไปบน fluorescence screen เช่นกัน จึงทำให้เราเห็นภาพของตัวอย่างบนจอทีวีได้ กำลังขยายของภาพที่เห็นคืออัตราส่วนระหว่างความยาวของ scan line บนตัวอย่างกับความยาวของ scan line บนจอทีวี ไม่มีการใช้เลนส์ ความสามารถในการเห็นรายละเอียดของตัวอย่าง (resolving power) ขึ้นอยู่กับขนาดของจุดแสงสว่างของลำแสงอิเล็กตรอน (probe spot) วิธีการดังกล่าวนี้เรียกว่า scanning หรือ scan mode

ในทางทฤษฎีน่าจะใช้ทั้ง convention และ scanning modes ในการตรวจสอบหรือบันทึกปรากฏการณ์ทั้งหลาย ดังกล่าวข้างต้น แต่ในทางปฏิบัติมีการพัฒนาเครื่องมือที่ตรวจสอบปรากฏการณ์ดังกล่าวที่สำคัญมีดังนี้ คือ

1. Transmission Electron Microscope (TEM)
2. Scanning Transmission Electron Microscope (STEM)
3. Scanning Electron Microscope (SEM)
4. Electron Probe x-ray Microanalyser (EXMA)

4.2 กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องผ่าน (Transmission Electron Microscope - TEM)

กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องผ่าน ซึ่ง เอิร์น รุสกา สร้างขึ้นครั้งแรก เมื่อปี พ.ศ. 2475 ใช้ในการศึกษาโครงสร้างภายในของเซลล์โดยลำแสงอิเล็กตรอนจะส่องผ่านเซลล์หรือตัวอย่างซึ่งมีการเตรียมเป็นพิเศษและบางเป็นพิเศษ กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องผ่าน (TEM) ใช้ศึกษาโครงสร้างหรือองค์ประกอบเซลล์และเนื้อเยื่อในระดับโมเลกุล การใช้ต้องมีการเตรียมตัวอย่างด้วยเทคนิคพิเศษที่เรียกว่า ไอออนเทคซิง (ionteching) เป็นการนำตัวอย่างมาฉาบด้วยโลหะ เพื่อให้ภาพออกมาชัดเจน สำหรับดูตัวอย่างในลักษณะภาพตัดขวาง (cross section)

4.3 ระบบของกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องผ่าน (TEM) ประกอบด้วยระบบที่สำคัญ 4 ระบบ

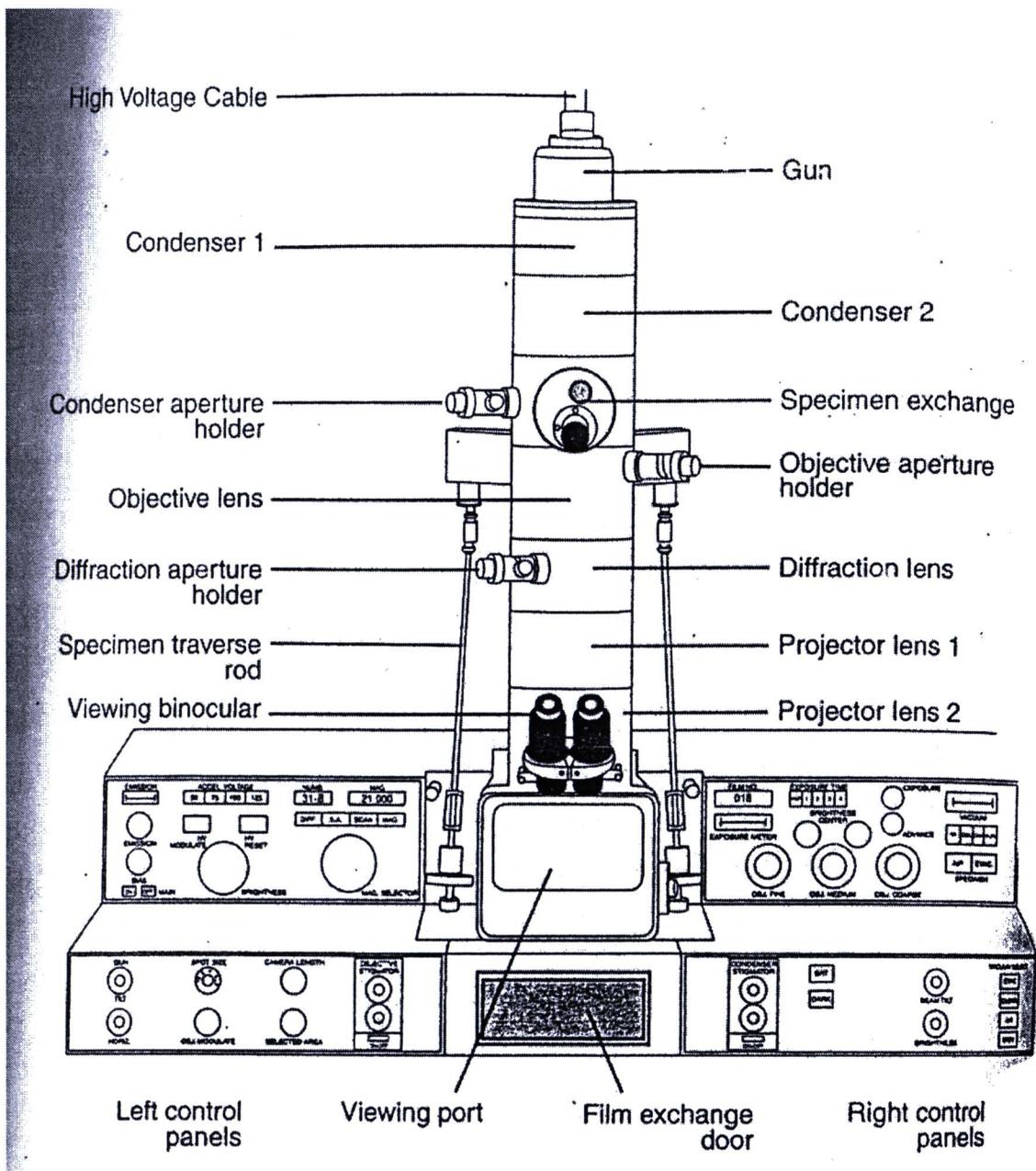
4.3.1 ระบบแสง (Illuminating System) ประกอบด้วย Electron Gun และ Condenser Lens

โดย Electron Gun ประกอบด้วยส่วนที่สำคัญคือ Filament (Cathode) ซึ่งเป็นแหล่งกำเนิดอิเล็กตรอนทำจากลวดทังสเตนบริสุทธิ์ งามเป็นรูปตัว V เมื่อให้กระแสไฟฟ้าแก่ Filament มันจะร้อนแดงและปล่อยอิเล็กตรอนวงนอกสุดออกมาโดยรอบ ในขณะที่เดียวกัน Cathode Shield และ Anode ต่างก็ได้รับกระแสไฟฟ้าทำให้เกิดสนามไฟฟ้าลบและบวกตามลำดับ สนามไฟฟ้าลบจะเบี่ยงเบนอิเล็กตรอนให้มารวมเป็นจุดเดียวกัน ส่วนสนามไฟฟ้าบวกจะดึงอิเล็กตรอนจากจุดรวมกันนั้นให้พุ่งเป็นลำแสงอิเล็กตรอน (Electron Beam) โดยอาศัยความต่างศักย์ ซึ่งมีหน่วยเป็น KV ส่วน Condenser Lens เป็นเลนส์แม่เหล็กไฟฟ้า เมื่อให้กระแสไฟฟ้าจะเกิดสนามแม่เหล็กไฟฟ้าซึ่งจะดึงอิเล็กตรอนให้วิ่งเป็นแนวตั้งฉากออกจากสนามแม่เหล็ก อิเล็กตรอนที่ผ่าน Condenser Lens จะเบนเข้าหากันอีกครั้งบนตัวอย่างพอดี บริเวณ Condenser Lens จะมีแผ่น Condenser Aperture ที่มีช่องขนาดต่าง ๆ ถ้าให้ลำแสงอิเล็กตรอนผ่านช่องที่มีขนาดเล็ก ลำแสงก็จะผ่านได้น้อย ทำให้ภาพมีรายละเอียดดีกว่า Aperture ใหญ่

4.3.2 ระบบภาพ (Imaging System) ประกอบด้วยเลนส์แม่เหล็กไฟฟ้า 3 ตัว คือ Objective Lens, Intermediate และ Projective Lens เมื่อทำการฉายลำแสงอิเล็กตรอนบนตัวอย่าง ลำอิเล็กตรอนจะผ่านตัวอย่างไปยัง Objective Lens ที่อยู่ใต้ช่องตัวอย่างและ Condenser Lens ซึ่ง Objective Lens จะทำหน้าที่ในการขยายภาพ นอกจากนั้นยังมีฉากรับภาพและส่วนนั้นลำแสงอิเล็กตรอนจะผ่านไปยัง Intermediate Lens เพื่อทำการขยายภาพ

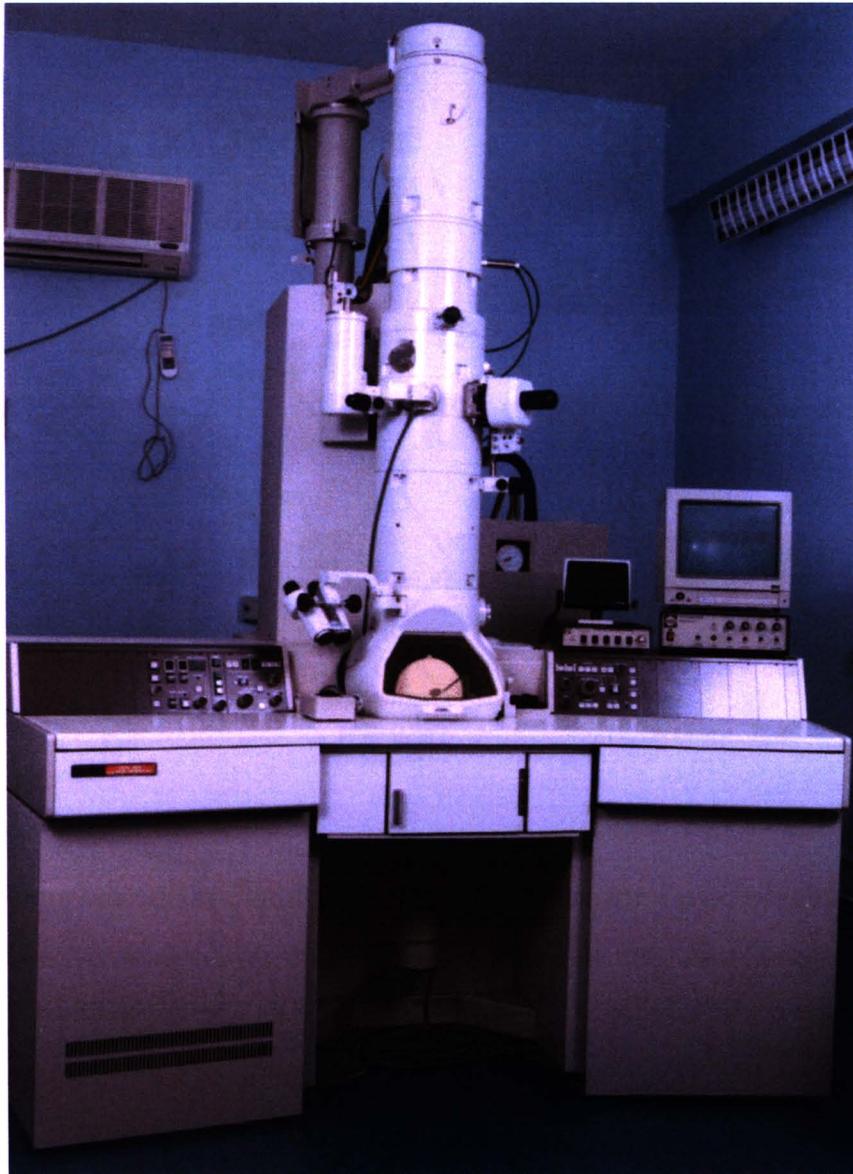
4.3.3 ระบบสุญญากาศ (Vacuum System) ภายใน Column ของกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนจำเป็นต้องเป็นสุญญากาศเพื่อไม่ให้อิเล็กตรอนที่หลุดออกจาก Filament ชนกับโมเลกุลของอากาศซึ่งจะทำให้ความเร็วของอิเล็กตรอนไม่คงที่ และอิเล็กตรอนกระจายออกทุกทิศทุกทาง มีผลให้ Resolution และความคมชัดของภาพลดลง นอกจากนี้ยังหลีกเลี่ยงการเกิดลวดประจุ ความต่างศักย์ที่สูง ซึ่งจะทำให้เสียดสภาพความต่างศักย์ที่สูงระหว่าง Anode และ Cathode นอกจากนี้ยังรักษาอายุการใช้งาน เพราะถ้ามีอากาศโดยเฉพาะก๊าซออกซิเจนอยู่มาก Oxidation Filament ขาดทันที

4.3.4 ระบบบันทึกภาพหรือถ่ายภาพ (Photographic System) เป็นระบบที่เอื้ออำนวยความสะดวกในการบันทึกรายละเอียดที่จะได้รับจากระบบภาพไว้บนแผ่นฟิล์มชนิดพิเศษที่ใช้ในการบันทึกภาพที่เกิดจากลำแสงอิเล็กตรอน ระบบนี้ประกอบด้วยส่วนที่ทำหน้าที่คล้ายกล้องถ่ายภาพ shutter และมิเตอร์วัดแสง ซึ่งอยู่ใต้ Projector lens ส่วนที่เป็น shutter จะกั้นเปิดและปิดให้ลำแสงอิเล็กตรอนตกกระทบบนแผ่น Fluorescent screen เมื่อจะทำการถ่ายภาพ fluorescent screen และ shutter จะทำงานประสานกันคือ ให้ลำแสงที่อยู่บนฟิล์มที่อยู่ใต้ Fluorescent screen ซึ่งจะต้องเปิดออกเมื่อมีการถ่ายภาพ (เวคิน นพนิตย์, 2524)

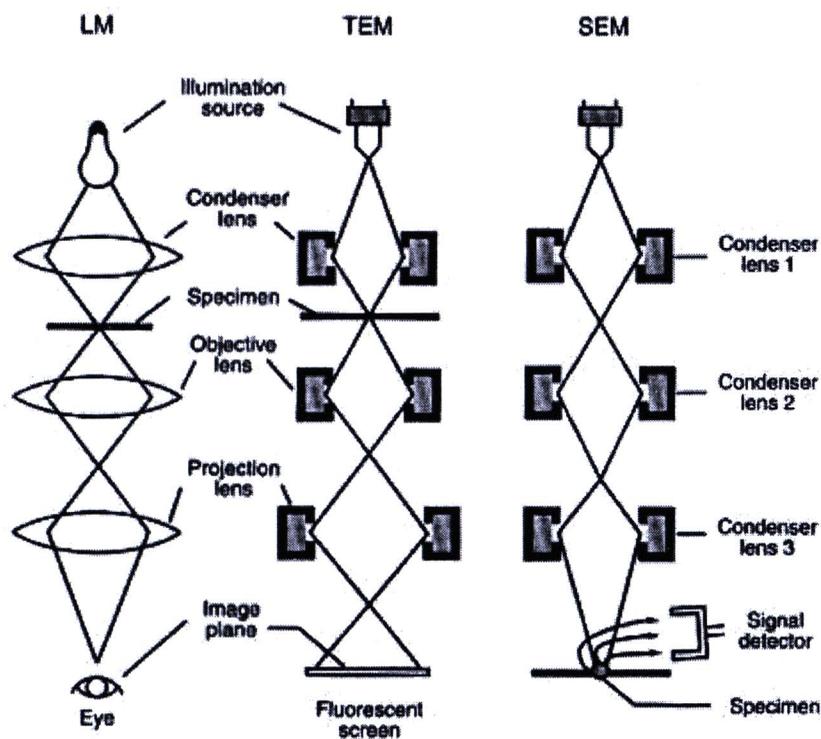


ภาพที่ 2 ไดอะแกรมแสดงกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องผ่าน (TEM)

ที่มา: John J. Bozzola, & Lonnie D. Russell, 1999



ภาพที่ 3 ภาพกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องผ่าน (TEM)



ภาพที่ 4 ภาพแสดงการเปรียบเทียบส่วนประกอบและการเกิดภาพระหว่างกล้องจุลทรรศน์ธรรมดา (Light Microscope, LM), กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องผ่าน (Transmission Electron Microscope, TEM) และกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด (Scanning Electron Microscope, SEM)

ที่มา: John J. Bozzola, & Lonnie D. Russell, 1999