



ใบรับรองวิทยานิพนธ์
บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต (วิทยาศาสตรการประมง)

ปริญญา

วิทยาศาสตรการประมง

ชีววิทยาประมง

สาขา

ภาควิชา

เรื่อง การประเมินประสิทธิภาพของสารไอโซยูจีนอลเพื่อใช้เป็นยาสลบสำหรับกุ้งขาวแวนนาไม
(*Litopenaeus vannamei*)

Evaluation of Ioeugenol as an Anesthetic for Pacific White Shrimp
(*Litopenaeus vannamei*)

นามผู้วิจัย นางสาวทิพย์ภาพร หล่อสิงห์คำ

ได้พิจารณาเห็นชอบโดย

อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก

(รองศาสตราจารย์ชลอ ลิ้มสุวรรณ, Ph.D.)

อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์นิติ ชูเชิด, Ph.D.)

อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์วัชรียา ภูริวิโรจน์กุล, ปร.ศ.)

หัวหน้าภาควิชา

(รองศาสตราจารย์ณรงค์ วีระไวทยะ, Ph.D.)

บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์รับรองแล้ว

(รองศาสตราจารย์กัญญา วีระกุล, D.Agr.)

คณบดีบัณฑิตวิทยาลัย

วันที่ เดือน พ.ศ.

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

วิทยานิพนธ์

เรื่อง

การประเมินประสิทธิภาพของสารไอโซยูจีนอลเพื่อใช้เป็นยาสลบสำหรับกุ้งขาวแวนนาไม
(*Litopenaeus vannamei*)

Evaluation of Isoeugenol as an Anesthetic for Pacific White Shrimp
(*Litopenaeus vannamei*)

โดย

นางสาวทิพย์ภาพร หล่อสิงห์คำ

เสนอ

บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์
เพื่อความสมบูรณ์แห่งปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต (วิทยาศาสตรการประมง)

พ.ศ. 2554

ทิพย์ภาพร หล่อสิงห์คำ 2554: การประเมินประสิทธิภาพของสารไอโซยูจินอลเพื่อใช้เป็นยาสลบ
สำหรับกุ้งขาวแวนนาไม (*Litopenaeus vannamei*) ปรินญาวิทยาศาสตร์มหาบัณฑิต (วิทยาศาสตร์การ
ประมง) สาขาวิทยาศาสตร์การประมง ภาควิชาชีววิทยาประมง อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก:
รองศาสตราจารย์ชลอ ถิ่นสุวรรณ, Ph.D. 105 หน้า

การศึกษาความเป็นพิษเฉียบพลันของสารไอโซยูจินอลที่ระดับความเข้มข้นต่างๆ ได้แก่ 5, 15 และ 25
พีเอสบู ที่ทำให้ลูกกุ้งขาวแวนนาไมระยะโพสลาฟวาดาย 50 เปอร์เซ็นต์ ที่ระยะเวลา 48 ชั่วโมง (48-hr LC₅₀) พบว่า
สารไอโซยูจินอลจะมีค่าความเป็นพิษลดลงในน้ำที่มีระดับความเค็มเพิ่มขึ้น โดยที่ความเค็ม 5 พีเอสบู ค่า 48-hr LC₅₀
ของสารไอโซยูจินอลมีค่าเท่ากับ 19.93 ± 2.40 พีพีเอ็ม และที่ความเค็ม 15 และ 25 พีเอสบู มีค่า 48-hr LC₅₀ เท่ากับ
 20.58 ± 1.83 และ 22.53 ± 1.65 พีพีเอ็ม ตามลำดับ ส่วนความเข้มข้นของสารไอโซยูจินอลที่ทำให้กุ้งขาวแวนนา
ไมขนาด 15-20 กรัม สลบภายในระยะเวลาสั้น (2 นาที) มีค่า 95 พีพีเอ็ม และความเข้มข้นที่ทำให้กุ้งขาวแวนนาไม
สลบภายในระยะเวลาปานกลาง (10 นาที) มีค่า 70 พีพีเอ็ม ระยะเวลาที่กุ้งฟื้นจากการสลบ หลังจากได้รับสาร
ไอโซยูจินอลความเข้มข้น 95 พีพีเอ็ม และ 70 พีพีเอ็ม มีค่าเท่ากับ 7.81 ± 3.09 และ 11.98 ± 5.28 นาที ตามลำดับ
การเตรียมสารไอโซยูจินอลที่อุณหภูมิห้อง (28 ± 1 องศาเซลเซียส) และทิ้งไว้เป็นระยะเวลาต่างกันว่า 0, 3, 6, 12,
24 และ 48 ชั่วโมง หลังจากใช้ระดับความเข้มข้น 95 พีพีเอ็ม พบว่าสามารถทำให้กุ้งสลบได้ภายในระยะเวลา 2.00 ± 0.00 ,
 4.41 ± 1.52 , 5.87 ± 1.76 , 7.58 ± 2.84 , 8.09 ± 3.07 และ 11.14 ± 4.84 นาที ตามลำดับ ซึ่งมีความแตกต่าง
กันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$) และที่อุณหภูมิ 23-25 องศาเซลเซียส สารไอโซยูจินอลระดับความเข้มข้น
เดียวกันทำให้กุ้งสลบได้ภายในระยะเวลา 2.00 ± 0.00 , 4.42 ± 1.55 , 5.56 ± 1.99 , 7.09 ± 2.58 , 8.19 ± 2.63 และ
 9.35 ± 3.26 นาที ตามลำดับ ซึ่งมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$) การผสมสารไอโซยูจินอล
ทิ้งไว้เป็นเวลานานขึ้นจะทำให้ต้องใช้เวลาในการสลบนานขึ้นด้วย การใช้สารไอโซยูจินอลสลบกุ้งได้ผลดีที่สุด
ในครั้งแรก ส่วนการใช้ในครั้งต่อไประยะเวลาในการสลบจะเพิ่มขึ้นเรื่อยๆ เนื่องจากสารไอโซยูจินอลที่เหลือใน
น้ำจะลดลง เมื่อนำความเข้มข้นที่สามารถทำให้กุ้งขาวสลบถึงระยะที่ 3 ภายในเวลา 2 นาที คือ 95 พีพีเอ็ม ไปใช้
ก่อนย้ายกุ้งจากถังไฟเบอร์กลาสไปใส่ในตู้กระจกและวัดระดับภูมิคุ้มกัน ได้แก่ ปริมาณเม็ดเลือดรวม, กระบวนการ
การกลืนกินสิ่งแปลกปลอม, ความว่องไวของเอนไซม์ phenoloxidase, กิจกรรมการทำลายแบคทีเรียของน้ำเลือด
กุ้ง, การผลิตเอนไซม์ superoxide dismutase ที่ระยะเวลา 0, 6, 12, 24 และ 48 ชั่วโมง หลังจากการเคลื่อนย้าย
พบว่า กุ้งที่ได้รับยาสลบมีระดับภูมิคุ้มกันไม่แตกต่างจากกุ้งก่อนการเคลื่อนย้ายอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P > 0.05$)
แต่แตกต่างจากกุ้งที่ไม่ได้รับยาสลบอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$) อย่างไรก็ตามระดับภูมิคุ้มกันของกุ้งขาว
แวนนาไมในกลุ่มที่ได้รับยาสลบ และไม่ได้รับยาสลบที่ระยะเวลา 6, 12, 24 และ 48 ชั่วโมงหลังการขนย้ายกุ้งไม่มี
ความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P > 0.05$) การทดลองนี้แสดงให้เห็นว่าการใช้สารไอโซยูจินอลก่อน
การขนย้ายกุ้งระยะเวลาสั้นสามารถลดความเครียดของกุ้งในระหว่างการขนย้ายได้

ลายมือชื่อนิสิต

ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก

Tippaporn Lorsingcum 2011: Evaluation of Isoeugenol as an Anesthetic for Pacific White Shrimp (*Litopenaeus vannamei*). Master of Science (Fisheries Science), Major Field: Fisheries Science, Department of Fishery Biology. Thesis Advisor: Associate Professor Chalor Limsuwan, Ph.D. 105 pages.

The efficacy of isoeugenol as an anesthetic for Pacific white shrimp (*Litopenaeus vannamei*) was investigated. Acute toxicity test of isoeugenol in postlarval stage *L. vannamei* (48-hr LC₅₀) was tested in various salinity concentration (5, 15, 25 psu). The result indicated that the 48-hr LC₅₀ value was 19.93 ± 2.40 ppm and the toxicity was lower at the salinity 15 and 25 psu which was 20.58 ± 1.83 and 22.53 ± 1.65 ppm, respectively. Optimum concentration of isoeugenol for use as an anesthetic for juvenile *L. vannamei* (15-20 g) for 2 minutes was 95 ppm while the concentration was 70 ppm for 10 minutes. Recovery time of the concentration of 95 ppm and 70 ppm were 7.81 ± 3.09 minutes and 11.98 ± 5.28 minutes respectively. Degradation rate of isoeugenol (95 ppm) at room temperature (28 ± 1 °C) within 0, 3, 6, 12, 24 and 48 hours were 2.00 ± 0.00 , 4.41 ± 1.52 , 5.87 ± 1.76 , 7.58 ± 2.84 , 8.09 ± 3.07 and 11.14 ± 4.84 minutes respectively and degradation rate of isoeugenol at 23-25°C within 0, 3, 6, 12, 24 and 48 hours were 2.00 ± 0.00 , 4.42 ± 1.55 , 5.56 ± 1.99 , 7.09 ± 2.58 , 8.19 ± 2.63 and 9.35 ± 3.26 minutes respectively significantly different ($P < 0.05$) at both the temperature that is at 28 ± 1 °C and 23-25°C the degradation rate of isoeugenol achieved at 0 hours is significantly different from the degradation rate at 3, 6, 12, 24 and 48 hours. Moreover, isoeugenol gave the best effective result at the first time. For the next time, more time for anesthetic needed because the concentration of isoeugenol in the water decreases. *L. vannamei* exposed to isoeugenol at 95 ppm which cause anesthesia to stage 3 within 2 minutes in fiberglass tanks before being transferred into glass aquaria for recovery and immune parameters (total haemocyte count, percentage phagocytosis, phenoloxidase activating system, bactericidal activity, superoxide dismutase) was analysed at 0, 6, 12, 24 and 48 hrs. The results showed that shrimp exposed to isoeugenol were not significantly ($P > 0.05$) different from pre-stressed shrimp before transportation but significantly different ($P < 0.05$) from shrimp, that were transported without being exposed to isoeugenol. However, shrimp that exposed to isoeugenol showed all the immune parameters not significantly different ($P > 0.05$) from shrimp which were not exposed to isoeugenol at 6, 12, 24 and 48 hrs after transportation. The results indicated that isoeugenol could be used as an anesthetic for handling and short transportation purpose for *L. vannamei*.

Student's signature

Thesis Advisor's signature

___ / ___ / ___

กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบพระคุณ รองศาสตราจารย์ ดร. ชลอ ลีมสุวรรณ อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. วัชรียา ภูริวิโรจน์กุล และ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. นิติ ชูเชิด อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วมที่ให้ความอนุเคราะห์ในการให้คำปรึกษาในด้านการทดลองและการตรวจแก้ไขข้อมูลต่างๆ ตลอดจนให้ความช่วยเหลือในทุกๆ ด้าน จนวิทยานิพนธ์ฉบับนี้สำเร็จด้วยดี

ขอขอบพระคุณบริษัท Bayer Thai Co., Ltd. ประเทศไทย ที่ให้การสนับสนุนทุนในการทำวิจัย

ขอขอบพระคุณ รศ. ดร. วราห์ เทพาหุดี ประธานการสอบวิทยานิพนธ์ และขอขอบพระคุณ ดร. เต็มดวง สมศิริ ผู้ทรงคุณวุฒิจากภายนอกสถาบัน ที่ ตรวจแก้ไขวิทยานิพนธ์นี้ฉบับมีความสมบูรณ์ยิ่งขึ้น

ขอขอบคุณจรัญฟาร์ม จังหวัดจันทบุรี และ ดร. พยุง ภัทรกุลชัย เจ้าของฟาร์มเลี้ยงกุ้งขาว แวนนาไม จังหวัดตราดที่ให้ความอนุเคราะห์กุ้งขาวแวนนาไมในการทดลอง

ขอขอบคุณทุกคนที่ศูนย์วิจัยธุรกิจเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำที่ช่วยเหลือเป็นอย่างดีในการเก็บข้อมูล ระหว่างการทำวิจัย การวิเคราะห์ข้อมูล คำแนะนำต่างๆ รวมทั้งการดูแลความเรียบร้อยในห้องปฏิบัติการ

ขอกราบขอบพระคุณ บิดา มารดา และญาติพี่น้องทุกท่านที่ได้ให้การสนับสนุนการศึกษา และเป็นกำลังใจในการทำงานจนสำเร็จลุล่วงจนจบการศึกษาในครั้งนี้

ทิพย์ภาพร หล่อสิงห์คำ

พฤษภาคม 2554

สารบัญ

	หน้า
สารบัญ	(1)
สารบัญตาราง	(2)
สารบัญภาพ	(5)
คำนำ	1
วัตถุประสงค์	3
การตรวจเอกสาร	4
อุปกรณ์และวิธีการ	31
ผลและวิจารณ์ผล	48
สรุปและข้อเสนอแนะ	70
สรุป	70
ข้อเสนอแนะ	71
เอกสารและสิ่งอ้างอิง	72
ภาคผนวก	85
ภาคผนวก ก ตัวอย่างการวิเคราะห์ข้อมูลเพื่อหาค่า LC_{50} และช่วงแห่งความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซนต์	86
ภาคผนวก ข ตารางแสดงคุณสมบัติของน้ำก่อนและหลังใส่สารไอโซยูจินอลในการทดลองเพื่อหาค่า LC_{50} ต่อกุ้งขาวแวนนาไมระยะโพสลาร์ว่า 8-10	98
ภาคผนวก ค การเตรียมสารเคมี	100
ประวัติการศึกษาและการทำงาน	105

สารบัญตาราง

ตารางที่		หน้า
1	อัตราการตายสะสมของลูกกุ้งแวนนาไมระยะโพสลาร์ว่า 8-10 ที่ได้รับสารไอโซยูจินอลในระดับต่างๆ กันในน้ำความเค็ม 5 พีเอสยู	49
2	อัตราการตายสะสมของลูกกุ้งแวนนาไมระยะโพสลาร์ว่า 8-10 ที่ได้รับสารไอโซยูจินอลในระดับต่างๆ กันในน้ำความเค็ม 15 พีเอสยู	51
3	อัตราการตายสะสมของลูกกุ้งแวนนาไมระยะโพสลาร์ว่า 8-10 ที่ได้รับสารไอโซยูจินอลในระดับต่างๆ กันในน้ำความเค็ม 25 พีเอสยู	53
4	ค่า LC_{50} ในเวลา 48 ชั่วโมงของไอโซยูจินอลที่ระดับความเค็มต่างกันต่อลูกกุ้งขาวแวนนาไม ระยะโพสลาร์ว่า 8-10	53
5	ปริมาณของสารไอโซยูจินอลที่เหมาะสมเพื่อใช้ในการสลบกุ้งขาวแวนนาไมภายในระยะเวลา 2 นาที และ 10 นาที	54
6	ระยะเวลาที่กุ้งขาวแวนนาไมฟื้นจากการได้รับสารไอโซยูจินอลความเข้มข้น 95 พีพีเอ็ม ที่ทำให้กุ้งสลบภายในเวลา 2 นาที เป็นระยะเวลาต่างๆ กัน	55
7	ระยะเวลาที่กุ้งขาวแวนนาไมฟื้นจากการได้รับสารไอโซยูจินอลความเข้มข้น 70 พีพีเอ็ม ที่ทำให้กุ้งสลบภายในเวลา 10 นาที เป็นระยะเวลาต่างๆ กัน	56
8	แสดงอัตราค่าเสื่อมของสารไอโซยูจินอล 95 พีพีเอ็ม ที่อุณหภูมิห้อง (28 ± 1 องศาเซลเซียส) ภายใน ระยะเวลา 3, 6, 12, 24 และ 48 ชั่วโมง	58
9	แสดงอัตราค่าเสื่อมของสารไอโซยูจินอล 95 พีพีเอ็ม ที่อุณหภูมิ 24 ± 1 องศาเซลเซียส ภายในระยะเวลา 3, 6, 12, 24 และ 48 ชั่วโมง	59
10	แสดงอัตราค่าเสื่อมของสารไอโซยูจินอลในการใช้สารฆ่า	60
11	ปริมาณเม็ดเลือดรวม ($\times 10^6$ เซลล์ต่อมิลลิลิตร) ของกุ้งขาวแวนนาไม เมื่อได้รับสารไอโซยูจินอล 95 พีพีเอ็ม ภายในระยะเวลา 2 นาทีก่อนการขนย้าย และไม่ได้รับสารไอโซยูจินอลก่อนการขนย้าย ที่ระยะเวลา 0, 6, 12, 24 และ 48 ชั่วโมง	62

สารบัญตาราง (ต่อ)

ตารางที่		หน้า
12	ความเข้มข้นของซีรัมของกุ้งขาวแวนนาไมที่สามารถลดปริมาณเชื้อ <i>Vibrio harveyi</i> ได้ 50 เปอร์เซ็นต์ เมื่อเทียบกับกุ้งขาวแวนนาไมในกลุ่มที่ได้สารไอโซยูจินอล 95 พีพีเอ็ม ภายในระยะเวลา 2 นาที่ก่อนการขนย้าย และไม่ได้รับสารไอโซยูจินอล ก่อนการขนย้าย ที่ระยะเวลา 0, 6, 12, 24 และ 48 ชั่วโมง	63
13	ร้อยละของเมล็ดเลือดของกุ้งขาวแวนนาไมที่เกิดการกลืนกินสิ่งแปลกปลอม เมื่อได้รับสารไอโซยูจินอล 95 พีพีเอ็ม ภายในระยะเวลา 2 นาที่ก่อนการขนย้าย และไม่ได้รับสารไอโซยูจินอลก่อนการขนย้าย ที่ระยะเวลา 0, 6, 12, 24 และ 48 ชั่วโมง	64
14	ปริมาณเอนไซม์ phenoloxidase ของกุ้งขาวแวนนาไม เมื่อได้รับสารไอโซยูจินอล 95 พีพีเอ็ม ภายในระยะเวลา 2 นาที่ก่อนการขนย้าย และไม่ได้รับสารไอโซยูจินอลก่อนการขนย้าย ที่ระยะเวลา 0, 6, 12, 24 และ 48 ชั่วโมง	65
15	ปริมาณเอนไซม์ superoxide dismutase ของกุ้งขาวแวนนาไม เมื่อได้รับสารไอโซยูจินอล 95 พีพีเอ็ม ภายในระยะเวลา 2 นาที่ก่อนการขนย้าย และไม่ได้รับสารไอโซยูจินอลก่อนการขนย้าย ที่ระยะเวลา 0, 6, 12, 24 และ 48 ชั่วโมง	67

ตารางผนวกที่

ก1	วิธีการคำนวณความลาดชันและจุดตัดแกนตั้งตามวิธีวิเคราะห์แบบโปรบิท	88
ก2	การคำนวณครั้งที่ 1	89
ก3	การคำนวณครั้งที่ 2	90
ก4	การเปลี่ยนเปอร์เซ็นต์การตายเป็นไพรกัลโปรบิท	94
ก5	ค่าโปรบิทต่ำสุด (Minimum Probit) โปรบิทสูงสุด (Maximum Probit)	95

สารบัญตาราง (ต่อ)

ตารางผนวกที่		หน้า
ก6	สัมประสิทธิ์ของการถ่วงน้ำหนัก (w)	
ข1	ค่าพิสัยของคุณสมบัติของน้ำก่อนและหลังใส่สารไอโซยูจินอลต่อ กุ้งขาวแวนนาไมระยะโพสลาร์ว 8-10 ที่ระดับความเค็ม 5 พีเอสยู	97 99
ข2	ค่าพิสัยของคุณสมบัติของน้ำก่อนและหลังใส่สารไอโซยูจินอลต่อ กุ้งขาวแวนนาไมระยะโพสลาร์ว 8-10 ที่ระดับความเค็ม 15 พีเอสยู	99
ข3	ค่าพิสัยของคุณสมบัติของน้ำก่อนและหลังใส่สารไอโซยูจินอลต่อ กุ้งขาวแวนนาไมระยะโพสลาร์ว 8-10 ที่ระดับความเค็ม 25 พีเอสยู	99

สารบัญภาพ

ภาพที่		หน้า
1	การสังเคราะห์สารไอโซยูจินอลจากยูจินอล	9
2	กระบวนการแข็งตัวของเลือด	20
3	การทำงานของสารโปรตีนพวก peroxinectin	23
4	ขั้นตอนการเตรียมสารละลายมาตรฐานของชุดทดลองสำเร็จรูป RANSOD [®] superoxide dismutase	42
5	บรรจุภัณฑ์ของสารไอโซยูจินอล	44
6	ลักษณะของสารไอโซยูจินอลลักษณะเป็นของเหลวสีเหลืองหนืด	44
7	ลักษณะของสารละลายไอโซยูจินอล เข้มข้น (stock solution) 500 มิลลิกรัม ต่อลิตร	45
8	ลูกกุ้งขาวแวนนาไมระยะโพสลา รว 8-10 ที่ใช้ในการทดลอง	45
9	กุ้งขาวแวนนาไมขนาด 15-20 กรัมที่ใช้ในการทดลอง	46
ภาพผนวกที่		
ก1	ความสัมพันธ์ระหว่างอัตราการตายสะสมและความเข้มข้นของสารไอโซ ยูจินอลที่ใช้ในการประเมินค่า LC ₅₀ ของกุ้งขาวแวนนาไมระยะโพสลา รว 8-10 ที่ระดับความเค็ม 5 พีเอสยู	93

การประเมินประสิทธิภาพของสารไอโซยูจีนอลเพื่อใช้เป็นยาสลบสำหรับ
กุ้งขาวแวนนาไม (*Litopenaeus vannamei*)

Evaluation of Isoeugenol as an Anesthetic for Pacific White Shrimp
(*Litopenaeus vannamei*)

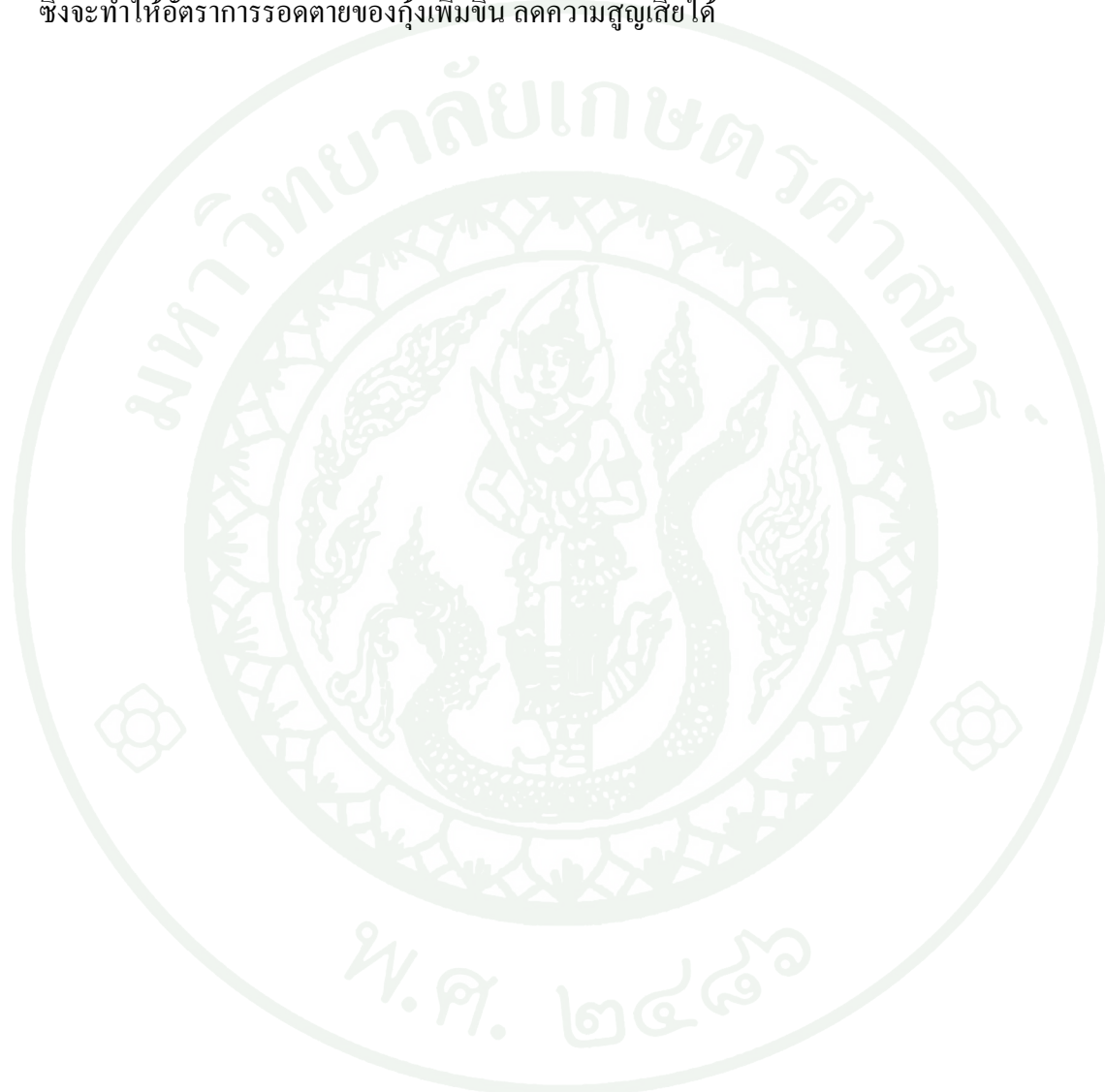
คำนำ

ประเทศไทยเป็นผู้ส่งออกกุ้งกุลาดำ (*Penaeus monodon*) ตั้งแต่ปี พ.ศ. 2534 ซึ่งมีการเลี้ยงอย่างกว้างขวางตั้งแต่ปี พ.ศ. 2530 จนกระทั่งปี พ.ศ. 2547 เกษตรกรส่วนใหญ่เปลี่ยนจากการเลี้ยงกุ้งกุลาดำมาเป็นกุ้งขาวแวนนาไม (*Litopenaeus vannamei*) เนื่องจากกุ้งชนิดนี้ได้ผ่านการปรับปรุงสายพันธุ์มาเป็นระยะเวลานานจึงมีการเจริญเติบโตเร็ว เลี้ยงง่าย ใช้ระยะเวลาในการเลี้ยงน้อยกว่ากุ้งกุลาดำ และให้ผลผลิตสูง ทำให้มีการเลี้ยงกุ้งขาวแวนนาไมเพิ่มมากขึ้น (ชลอและพรเลิศ, 2547) อย่างไรก็ตามกุ้งขาวแวนนาไมนั้นอ่อนแอและตายง่ายต่อการสัมผัสโดยเฉพาะอย่างยิ่งในระหว่างการจับและการขนส่ง

ในธุรกิจการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำนั้นได้มีการนำเอายาสลบมาใช้กันมากขึ้นเพื่อลดความเครียดโดยการลดอัตราการเผาผลาญ และลดการบาดเจ็บที่มักจะเกิดขึ้นในขณะที่มีการจับและการขนส่งสัตว์น้ำ รวมทั้งเพื่อจะทำให้สัตว์น้ำหมดความรู้สึกในระหว่างการผ่าตัด (Munday and Wilson, 1997; Small, 2000) ปัจจุบันมียาสลบหลายชนิดที่นำมาใช้ในปลา เช่น Tricane methanesulfonate (MS-222), Benzocaine, Quinaldine, 2-Phenoxyethanol, Metomidate, Eugenol และ Isoeugenol (Amani and James, 2007)

Aqui-S™ เป็นยาสลบสำหรับสัตว์น้ำที่ได้รับการวิจัยและพัฒนาโดยห้องปฏิบัติการวิจัยอาหารทะเลในเทศนิวยอร์กซึ่งในปัจจุบันใช้ในเทศนิวยอร์ก และออสเตรเลีย ประกอบด้วยสารไอโซยูจีนอล 50 เปอร์เซ็นต์ และ โพลีซอร์เบต 80 50 เปอร์เซ็นต์

อย่างไรก็ตามในปัจจุบันแม้ว่าจะมีการศึกษาการใช้สารไอโซยูจินอลเป็นยาสลบที่แพร่หลายมากขึ้น แต่ส่วนใหญ่เป็นการศึกษาในปลาซึ่งขาดข้อมูลด้านปริมาณที่เหมาะสมของการใช้ยาสลบในการเพาะเลี้ยงกุ้ง เพื่อใช้ในการขนส่งกุ้งทั้งในกุ้งขนาดเล็ก และในกุ้งขนาดใหญ่โดยการใช้ยาสลบในระดับที่เหมาะสมนั้นจะช่วยในการลดความบอบช้ำ และความเครียดระหว่างการขนส่ง ซึ่งจะทำให้อัตราการรอดตายของกุ้งเพิ่มขึ้น ลดความสูญเสียได้



วัตถุประสงค์

1. เพื่อศึกษาผลของความเค็มต่อความเป็นพิษแบบเฉียบพลันของสารไอโซยูจินอล ที่มีต่อลูกกุ้งขาวแวนนาไมระยะโพสลาร์วา
2. เพื่อศึกษาปริมาณของสารไอโซยูจินอลที่เหมาะสมในการใช้เพื่อสลับกุ้งขาวแวนนาไมภายในระยะเวลาต่างๆ กัน
3. เพื่อศึกษาหาระยะเวลาพักฟื้นกุ้งหลังจากการสลับด้วยระดับความเข้มข้นต่างๆ กัน
4. เพื่อศึกษาอัตราการเสื่อมของสารไอโซยูจินอลในระดับที่ใช้สลับกุ้งที่อุณหภูมิห้อง (28 ± 1 องศาเซลเซียส) และที่อุณหภูมิ 24 ± 1 องศาเซลเซียส ภายในระยะเวลา 3, 6, 12, 24 และ 48 ชั่วโมง
5. เพื่อศึกษาค่าเสื่อมของสารไอโซยูจินอลในระดับที่ใช้สลับกุ้งเมื่อใช้สารซ้ำ
6. เพื่อศึกษาการตอบสนองทางภูมิคุ้มกันแบบไม่จำเพาะของกุ้งขาวแวนนาไมหลังจากได้รับสารไอโซยูจินอลในระดับที่ใช้สลับกุ้งที่ระยะเวลาพักฟื้นที่ 0, 6, 12, 24 และ 48 ชั่วโมง

การตรวจเอกสาร

1. ยาสลบ

ยาสลบ หรือ Anaesthetic หมายถึง สารเคมีที่ทำให้เกิดอาการสูญเสียความรู้สึกบางส่วน หรือความรู้สึกทั้งหมดโดยยาสลบจะแพร่เข้าสู่ระบบประสาทส่วนกลางไปยับยั้งการทำงานของ เซลล์ประสาทในส่วนของการส่งถ่ายข้อมูลไปสู่เซลล์ประสาทอื่นๆ ทำให้สูญเสียการตอบสนองต่อการกระตุ้นจากภายนอก (ฉวีวรรณ, 2553)

การนำยาสลบใช้กับสัตว์น้ำส่วนมากมีการศึกษาในปลาโดยวัตถุประสงค์ของการนำยาสลบ มาใช้ในปลาเพื่อลดความบอบช้ำ และความเครียดระหว่างการจับหรือขนส่ง ซึ่งจะทำให้เกิดการ เปลี่ยนแปลงทางสรีระ เช่น การเพิ่มการหลั่งฮอร์โมนหลายชนิดรวมทั้ง cortisol เข้าสู่ระบบหมุนเวียน เลือดกระตุ้นให้หัวใจเต้นแรงและเร็วขึ้นส่งผลให้เลือดที่ไปบริเวณเหงือกมีแรงดันและปริมาณมาก ขึ้น เพื่อให้ได้รับปริมาณออกซิเจนเพียงพอกับที่ร่างกายต้องการ ในขณะที่เดียวกันก็ส่งผลให้มีการ สูญเสียอิออน (ion) ออกจากร่างกายผ่านทางเหงือกจากการเปิดพื้นที่แลกเปลี่ยนก๊าซเช่นกัน ซึ่งใน ปลาขนาดเล็กภาวะการสูญเสียอิออน เป็นสาเหตุให้ปลาตายง่ายกว่าปลาขนาดใหญ่ นอกจากนี้ cortisol ยังส่งผลทำให้ภูมิคุ้มกันของปลาลดลง และยอมรับการติดเชื้อได้ง่ายขึ้น ด้วยสาเหตุนี้จึง พบว่าภายหลังการขนส่งปลามักป่วยเป็นโรคได้ง่ายขึ้นถ้าไม่ได้รับการป้องกันหรือดูแลอย่างดี

ในปัจจุบันมีรายงานการใช้ยาสลบในปลามากกว่า 25 ชนิด ในจำนวนนี้มีอยู่ 14 ชนิดที่ McFarland (1959) พบว่าก่อให้เกิดการสลบกับปลาที่ใช้ในการทดลองในพฤติกรรมที่คล้ายๆกัน และได้แบ่งพฤติกรรมของการสลบเป็นลำดับขั้น ดังนี้

ระยะที่ 1 เรียกว่า ระยะ sedation เป็นระยะซึ่งปลาไม่มีปฏิกิริยาโต้ตอบใดๆ ต่อสิ่งรบกวน จากภายนอก ยกเว้นแรงกดดันแรงๆ และอัตราการปิดเปิดของกระพุ้งแก้ม (operculum) จะช้าลงกว่าปกติ เล็กน้อย การว่ายน้ำช้าลง

ระยะที่ 2 เรียกว่า ระยะ loss of equilibrium เป็นระยะที่ปลาสูญเสียการควบคุมการทำงาน ของกล้ามเนื้อทั้งหมดจะมีปฏิกิริยากับการกระตุ้นที่แรงมากๆเท่านั้น อัตราการปิดเปิดของกระพุ้ง แก้มลดลงต่ำกว่าปกติ

ระยะที่ 3 เรียกว่า ระยะ loss of reflex reactivity เป็นระยะที่ปลาสูญเสียปฏิกิริยาการตอบสนองต่อสิ่งเร้าทั้งหมด อัตราการหายใจช้ามาก รวมทั้งอัตราการเต้นของหัวใจช้าลง

ระยะที่ 4 เรียกว่า ระยะ medullary collapse เป็นระยะที่กระพุ้งแก้มไม่มีการเคลื่อนไหว เนื่องจากปลาหยุดการหายใจและหลายนาที่ต่อมาหัวใจจะหยุดเต้น หลังจากนั้นปลาไม่สามารถฟื้นกลับมามีชีวิตได้อีก

ในการสลบของกึ่งมีระยะของการเปลี่ยนแปลงและแบ่งแยกแตกต่างจากปลาเนื่องจากมีหลากหลายขั้นตอนก่อนที่จะเข้าสู่ระยะการสลบลึก (full anesthesia) ในแต่ละขั้นตอนของการสลบนั้นกึ่งจะมีพฤติกรรมที่เปลี่ยนแปลงไปเป็นลำดับขั้น ดังนี้

ระยะที่ 1 สูญเสียการตอบสนองจากสิ่งเร้าภายนอก

ระยะที่ 2 สามารถทนต่อการสัมผัส

ระยะที่ 3 สูญเสียการสะบัดของหางตามปกติ หางส่วนที่เคยโค้งงอสะบัดได้ก็จะวางในแนวตรงกับลำตัว

ระยะที่ 4 สูญเสียการควบคุมของกล้ามเนื้อส่วนหาง

ระยะที่ 5 สูญเสียการทำงานของ maxilla activity

ในปัจจุบันยาสลบที่ใช้ในสัตว์น้ำมีหลายชนิด แต่ส่วนมากมีการนำมาใช้ในปลาที่นิยมใช้กันมาก (Amani and James, 2007) ได้แก่

1. MS-222 ชื่อทางเคมี 3-aminobenzoic acid ethylester methanesulfonate หรือชื่อทางการค้า Tricane methanesulfonate และ Meta-caine ลักษณะเป็นผงละเอียดสีขาวสามารถละลายน้ำได้ดีทั้งในน้ำจืดและน้ำเค็ม จึงซึมผ่านเข้าเหงือกอย่างรวดเร็ว ซึ่งเป็นยาสลบชนิดเดียวที่ได้รับการจดทะเบียนจากองค์การอาหารและยาของประเทศสหรัฐอเมริกาและประเทศทางยุโรปให้ใช้กับปลาที่

ใช้เป็นอาหารได้ แต่ต้องพักปลาไว้เป็นเวลาอย่างน้อย 21 วันหลังจากการใส่ยา จึงนำมาบริโภคได้ แต่ยาสลบชนิดนี้มีราคาที่สูงแพง

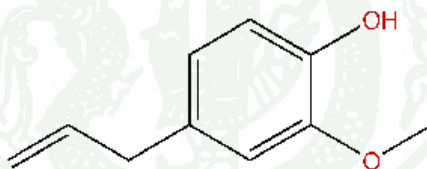
2. Benzocaine มีชื่อทางเคมี ethyl-p-aminobenzoate ลักษณะเป็นผงสีขาว แต่ละลายในน้ำได้น้อยมาก ละลายได้ดีในอะซิโตนและเอทานอล ไม่ทำให้คุณภาพน้ำเปลี่ยน หากอยู่ในรูปของ Benzocain-hydrochloride จะละลายน้ำได้ดีขึ้น แต่จะทำให้พีเอช (pH) ของน้ำลดลง สามารถละลายได้ในน้ำจืดและน้ำเค็มเช่นเดียวกัน และมีแนวโน้มว่าจะได้รับการรับรองจากองค์การอาหารและยาของสหรัฐอเมริกาให้นำมาใช้เพื่อเป็นอีกทางเลือกหนึ่งนอกจาก MS-222 เนื่องจากราคาถูกกว่า

3. 2-Phenoxyethanol มีชื่อทางการค้า เช่น phenoxethol, phenylmonoglycol ether และ rose ether ลักษณะเป็นของเหลวคล้ายน้ำมันสีเหลืองอ่อน มีกลิ่นเล็กน้อย ละลายน้ำได้ปานกลาง คุณสมบัติพิเศษ คือ เป็นสารฆ่าเชื้อแบคทีเรียและราได้ จึงมีการนำมาใช้เป็นส่วนผสมของยารักษาโรคและเครื่องสำอางค์ ยาสลบชนิดนี้มีการนำมาใช้ในปลามากพอสมควรเนื่องจากมีราคาไม่แพง แต่องค์การอาหารและยาของสหรัฐอเมริกาไม่ให้นำใช้กับปลาที่เป็นอาหาร

4. Quinaldine มีชื่อทางเคมี คือ 2-4-methyquinoline ลักษณะเป็นของเหลวคล้ายน้ำมันสีเหลืองน้ำตาล ละลายในน้ำได้น้อย ละลายได้ดีในอะซิโตนหรือแอลกอฮอล์ มีกลิ่นฉุน ประสิทธิภาพจะลดลงในน้ำที่มี พีเอชต่ำกว่า 5 และเมื่อเติม quinaldine ลงไปในน้ำจะทำให้เกิดสถานะเป็นกรดเพิ่มขึ้น ยาสลบชนิดนี้องค์การอาหารและยาของสหรัฐอเมริกาไม่ให้นำใช้กับปลาที่เป็นอาหารเช่นเดียวกัน

ยาสลบทั้ง 4 ชนิดที่กล่าวมาแล้วข้างต้น มีเพียง MS-222 ชนิดเดียวที่ได้รับการจดทะเบียนจากองค์การอาหารและยาของสหรัฐอเมริกา และประเทศทางยุโรปให้ใช้กับปลาที่เป็นอาหารได้ แต่ต้องพักปลาไว้อย่างน้อย 21 วันหลังจากใส่ยาจึงนำมาบริโภคได้ เนื่องจากมีสารตกค้าง แม้ว่ายาสลบทั้ง 4 ชนิดยังสามารถช่วยลดการตอบสนองต่อสิ่งกระตุ้นจากภายนอกได้ แต่ก็มีผลทำให้ฮอร์โมน cortisol ของปลาที่ได้รับยาสลบเพิ่มสูงขึ้นซึ่งจะมีผลกระทบต่อระบบภูมิคุ้มกัน ประกอบกับการใช้สารเคมีเหล่านี้ยังมีราคาสูงและทำให้เกิดการสะสมสารเคมี ทั้งยังสร้างปัญหาต่ออุตสาหกรรมส่งออกสัตว์น้ำจำพวกอาหารทะเล จนกลายเป็นสาเหตุหนึ่งในข้ออ้างการกีดกันทางการค้าสัตว์เศรษฐกิจอีกทางหนึ่ง

ในปัจจุบันได้มีการพัฒนาสมุนไพรไทยมาใช้เป็นยาสลับแทนการใช้สารเคมี ซึ่งสมุนไพรที่กล่าวคือ กานพลู ซึ่งมีสารยูจินอล (eugenol) หรือ 2-methoxy-4-(2-propenyl) phenol สกัดมาจากต้นอ่อน ใบ หรือลำต้นของต้นกานพลู (*Eugenia caryophyllata*) มีสูตรเคมีคือ $C_{10}H_{12}O_2$ น้ำหนักโมเลกุล 164.20 กรัม/โมล ความหนาแน่น 1.06 กรัม/ลูกบาศก์เซนติเมตร จุดหลอมเหลว -9 องศาเซลเซียส จุดเดือด 256 องศาเซลเซียส มีความเป็นพิษที่อุณหภูมิต่ำกว่า 104 องศาเซลเซียส มีลักษณะใส สีเหลืองอ่อน มีฤทธิ์เป็นยาชาเฉพาะที่และสามารถออกฤทธิ์เป็นยาสลับสำหรับสัตว์น้ำ ลดการเคลื่อนไหว ทำให้กล้ามเนื้อคลายตัว การเผาผลาญในร่างกายลดลง จนถึงทำให้สัตว์ซึมลึกและสลบโดยไม่ทำให้สัตว์น้ำเกิดความระคายเคือง แต่มีข้อจำกัดด้านประสิทธิภาพ เนื่องจากน้ำมันกานพลูไม่ละลายน้ำแต่สามารถออกฤทธิ์ได้ทั้งน้ำจืด และน้ำเค็มคุณสมบัติเด่นของน้ำมันกานพลูคือ สามารถระเหยไปตามธรรมชาติ ไม่เกิดการตกค้างในสัตว์น้ำ แต่เนื่องจาก ยูจินอลที่เป็นสารประกอบหลักในน้ำมันกานพลูประกอบด้วย allylbenzene มีพันธะคู่ที่ตำแหน่ง 2 และ 3 ของคาร์บอนบนสายโซ่ hydrocarbon จึงมีความเป็นไปได้ที่ ยูจินอลอาจจะเป็นสารก่อมะเร็ง (FDA, 2002) และ ยูจินอลไม่ได้รับการจดทะเบียนจากองค์การอาหารและยาของประเทศสหรัฐอเมริกาและประเทศทางยุโรป ให้ใช้กับปลาที่เป็นอาหารได้ (Coyle *et al.*, 2004)

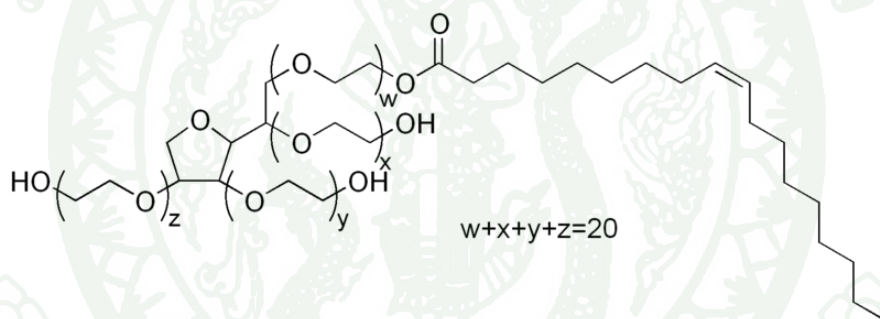


สูตรโมเลกุลของสารยูจินอล

Aqui-S™ เป็นชื่อทางการค้าของสารไอโซยูจินอลที่ใช้ในการสลบปลา ซึ่งพัฒนาโดย Seafood Research Laboratory ในประเทศนิวซีแลนด์ ประกอบด้วยสาร isoeugenol 50 เปอร์เซ็นต์ และ Polysorbate 80 50 เปอร์เซ็นต์ ในปัจจุบันได้นำสารตัวนี้ใช้กับปลาที่เป็นอาหารในประเทศนิวซีแลนด์ และออสเตรเลียโดยไม่ต้องพักปลาก่อนที่จะนำมาบริโภค ในการศึกษาพบว่าสาร Aqui-S™ ที่ความเข้มข้น 20 มิลลิกรัม/ลิตร มีประสิทธิภาพในการสลบปลาหลายชนิด และไม่ก่อให้เกิดความเครียดในปลา

โพลีซอร์เบต 80 (Polysorbate 80) หรือ Polyoxyethylene (20) sorbitan monooleate (หมายเลข 20 หมายถึงจำนวน oxyethylene ในสูตรโมเลกุล) มีชื่อทางการค้าว่า Tween 80 เป็น

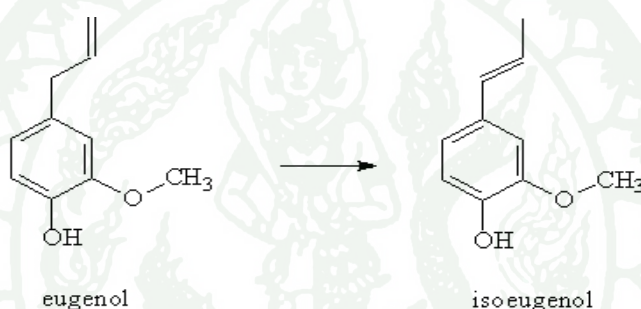
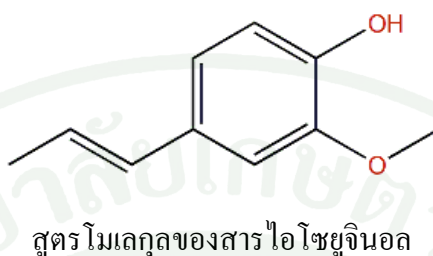
เครื่องหมายการค้าจดทะเบียนของบริษัทไอซีไออเมริกา (ICI Americas, Inc.) ลักษณะของสารมีพื้นผิวเป็น non ionic และมีมลพิษจากซอร์บิทอลที่มาจากผลไม้และผลเบอร์รี่ สูตรเคมีคือ $C_{64}H_{124}O_{26}$ น้ำหนักโมเลกุล 1310 กรัม/โมล มีความหนาแน่น 1.06-1.09 กรัม/มิลลิลิตร มีจุดเดือดมากกว่า 100 องศาเซลเซียส ละลายได้ในน้ำและละลายได้ใน ethanol, cotton seed oil, corn oil, ethyl acetate, methanol, toluene ซึ่งเป็นสารลดความตึงผิว และทำให้ส่วนผสมของ polyethoxylated และ oleic acid สามารถละลายเข้ากันได้ สาร Polysorbate 80 มีลักษณะเป็นของเหลวสีเหลืองและหนืด เพราะเป็นสารประกอบของกลุ่ม poly ethers หรือ กลุ่ม polyoxyethylene ซึ่งเป็นโพลิเมอร์ของกลุ่ม ethylene oxide มักใช้เป็นส่วนผสมในอาหารเช่น ไอศกรีม นม และผลิตภัณฑ์อื่นๆ เช่น ยาหยอดตา เป็นต้น ซึ่งทำให้มีมลพิษมีความคงตัวมากขึ้น สารชนิดนี้อาจก่อให้เกิดอาการคัน และระคายเคืองต่อผู้ใช้ได้ แต่โดยทั่วไปสารนี้มีความปลอดภัยและเป็นที่ยอมรับ มีจำนวนเล็กน้อยของผู้ใช้ที่แพ้สารนี้ (Hendry, 2010)



สูตรโมเลกุลของโพลีซอร์เบต 80

ไอโซยูจีนอล (Isoeugenol) หรือ 2-methoxy-4-(1-propenyl) phenol มีสูตรเคมีคือ $CH_2CH_2CH_2C_6H_3(OCH_3)OH$ น้ำหนักโมเลกุล 164.20 กรัม/โมล จุดหลอมเหลว -10 องศาเซลเซียส จุดเดือด 266 – 268 องศาเซลเซียส ความหนาแน่น 5.7 ลักษณะเป็นของเหลวสีเหลืองหนืด ละลายน้ำได้เล็กน้อย สามารถละลายได้ทั้งในน้ำจืด และน้ำเค็ม และไม่พบว่าเป็นอันตรายต่อผู้ใช้ เป็นสารประกอบที่มีประสิทธิภาพ และมีความปลอดภัยกว่าสาร ยูจีนอล หรือ น้ำมันกานพลู จึงมีความเหมาะสมที่จะนำมาใช้ในการสลับปลาที่ใช้เป็นอาหารและไม่ต้องพักปลาหลังจากใช้ในสารประกอบของ isoeugenol คือ propenylbenzene ซึ่งเป็น isomer ของ eugenol ซึ่งมีพันธะคู่ที่ตำแหน่ง 1 และ 2 ในสายโซ่คาร์บอน ซึ่ง isoeugenol นั้นสังเคราะห์มาจากสาร eugenol อย่างไรก็ตาม isoeugenol นั้นมีความน่าจะเป็นสารก่อมะเร็งน้อยกว่า eugenol ดังนั้นจึงมีการพิจารณาสารนี้มาใช้

ในการสลับสำหรับสัตว์น้ำบนพื้นฐานของประสิทธิภาพและความปลอดภัย (Dore and Frimodt, 1987)



ภาพที่ 1 การสังเคราะห์ isoeugenol จาก eugenol

ที่มา: คัดแปลงมาจาก Simon (n.d.)

ยาสลับชนิดต่างๆ ที่กล่าวมาแล้วข้างต้น มีคุณสมบัติเฉพาะตัวที่แตกต่างกัน เช่น ความรุนแรงที่มีต่อปลา ระยะเวลาที่ทำให้เกิดการสลับ ความสะดวกในการใช้ ความปลอดภัยต่อปลาและมนุษย์ ตลอดจนราคาที่แตกต่างกัน รวมทั้งความเหมาะสมที่จะนำไปใช้ในงานกิจการต่างๆ ทางด้านการประมง เช่น การชั่งน้ำหนัก การทำเครื่องหมาย และการขนส่งก็ต่างกันด้วย แต่ก็มีหลักในการพิจารณาความเหมาะสมขึ้นพื้นฐานของยาสลับที่จะนำไปใช้ในงานกิจการต่างๆ ทางด้านการประมง ดังนี้ (Durve, 1970)

1. สามารถละลายน้ำได้ง่าย

2. ความเข้มข้นของยาสลบที่เหมาะสมที่จะใช้ในการขนส่งควรจะต่ำ เพื่อเป็นการประหยัดค่าใช้จ่าย

3. ช่วงเวลาที่ทำให้เกิดการสลบ และทำให้ฟื้นควรรใช้เวลานาน

4. สัตว์น้ำสามารถอยู่ในสภาวะของยาสลบนั้นที่ความเข้มข้นต่ำๆ ได้โดยปลอดภัย แม้ว่าจะแช่อยู่เป็นเวลานานหลายชั่วโมง

5. หลังจากใช้ยาสลบชนิดนั้นๆ ต่อสัตว์น้ำแล้ว ไม่ก่อให้เกิดผลกระทบข้างเคียงใดๆ ตามมา (side effect)

6. ระดับของความเข้มข้นของยาสลบที่ทำให้สัตว์นั้นควรจะสูงกว่าระดับความเข้มข้นที่ทำให้สลบ เพื่อที่สัตว์น้ำจะได้ไม่เกิดการตายเมื่อเกิดการผิดพลาดในกรณีที่ความเข้มข้นที่ใช้เกินระดับที่เหมาะสมในขณะที่ขนส่งเป็นเวลานานๆ

2. การใช้ยาสลบทางด้านการประมง

ส่วนใหญ่การใช้สารเคมีชนิดต่างๆ เพื่อเป็นยาสลบในสัตว์น้ำที่ผ่านมาเป็นการศึกษาในปลา ซึ่ง McFarland (1960) ได้ทำการจำแนกการใช้ยาสลบในปลาออกเป็น 2 กรณี คือ

1. operation procedures เป็นการใช้ยาสลบในการทดลอง ผ่าตัด ทำเครื่องหมาย และการชั่งน้ำหนัก เป็นต้น การใช้ยาสลบในกิจการเหล่านี้จำเป็นต้องทำให้ปลาสลบลึกถึงระยะที่ loss of equilibrium เป็นต้นไป

2. transportation procedures เป็นการใช้ยาสลบเพื่อการขนส่งสัตว์น้ำต่างๆ ทั้งที่เป็นอาหารและที่เลี้ยงไว้เพื่อความสวยงาม การใช้ยาสลบเพื่อใช้ในการขนส่งนี้มักทำให้สลบถึงเพียงระยะที่ sedation เท่านั้น เพื่อต้องการระงับการตอบสนองจากสิ่งเร้าภายนอกโดยไม่ทำให้ปลาเสียสมดุล และได้มีผู้ศึกษาพบว่า สามารถช่วยลดปริมาณการใช้ออกซิเจนของสัตว์น้ำและสิ่งขับถ่ายของสัตว์น้ำแต่ละตัวที่ปล่อยออกมา (Nemoto, 1957; Jirasek *et al.*, 1978)

การศึกษาเกี่ยวกับการใช้ยาสลบในสัตว์ไม่มีกระดูกสันหลังกลุ่ม crustacean ยังไม่เป็นที่แพร่หลาย โดยส่วนใหญ่การเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำกลุ่ม crustacean จะทำให้สลบได้โดยไม่ต้องใช้ยาสลบ แต่จะใช้การลดอุณหภูมิโดยเติมน้ำแข็งลงไปในพื้นที่ต้องการให้กุ้งสลบ ปัญหาที่พบส่วนใหญ่ ในการลุ่มกุ้งที่มีขนาดใหญ่ ในระหว่างการทดลอง คือการจับและการควบคุมให้กุ้งไม่กระโดดเพื่อความสะดวกในการทำงาน และในการขนส่งทางไกลๆ เมื่ออุณหภูมิของน้ำเพิ่มขึ้นจากปริมาณ น้ำแข็งที่ใช้ลดอุณหภูมิไม่เพียงพอจะพบว่ากุ้ง มีการกินกันเองซึ่งตามปกติสัตว์ในกลุ่ม crustacean จะมีการกินกันเองมากกว่าปลา ทำให้ผู้เลี้ยงสัตว์น้ำจึงเกิดความสนใจในการใช้ยาสลบมากขึ้น โดยเฉพาะอย่างยิ่งในการขนส่ง แต่การตอบสนองของสัตว์น้ำกลุ่ม crustacean นั้นมีความแตกต่างกับสัตว์น้ำจำพวกปลาเพราะว่ามีระบบประสาทแบบ synaptic receptor sites จึงทำให้ประสิทธิภาพของยาสลบไม่ได้ผลเท่ากับใช้ในปลา หรือต้องใช้ยาสลบในปริมาณที่มากกว่าการสลบปลา 5-10 เท่า (Coyle *et al.*, 2004)

Davidson *et al.* (2000) พบว่า ข้อมูลการใช้สาร isoeugenol ส่วนใหญ่จะจำกัดในกลุ่มปลาแซลมอน โดยการใช้สาร isoeugenol สลบปลา rainbow trout พบว่าไม่มีผลในการลดความเครียดจากปลาทั้งหมด

แต่ Small (2004) รายงานว่าปลา channel catfish (*Ictalurus punctatus*) ถูกกระตุ้นให้เกิดความเครียด พบว่าปลากลุ่มที่ได้รับยาสลบ isoeugenol มีระดับ plasma cortisol ต่ำกว่า ปลาที่ไม่ได้รับยาสลบถึง 60 เปอร์เซ็นต์ แต่ระดับ glucose และ lactate ของปลาทั้ง 2 กลุ่มพบว่าไม่มีความแตกต่างกัน ส่วนการทดลองเมื่อปลาได้รับแอมโมเนียในระดับสูงเป็นระยะเวลา 24 ชั่วโมง ปลากลุ่มที่ได้รับยาสลบมีระดับ plasma cortisol, glucose และ lactate ต่ำกว่าปลาที่ไม่ได้รับยาสลบ

มีการใช้น้ำมันกานพลูเพื่อเป็นยาสลบโดย Erdmann (1999) สรุปว่า ควรใช้น้ำมันกานพลูแทนไซยาไนด์ (cyanide)

Frisch *et al.* (2007) ศึกษาประสิทธิภาพน้ำมันกานพลู กับหินปะการัง *Pocillopora damicornis* (Linnaeus) พบว่า การใช้น้ำมันกานพลูที่ความเข้มข้น 0.5 ppm ไม่มีผลกระทบต่อสีของหินปะการัง หรือประสิทธิภาพในการสังเคราะห์แสง การใช้น้ำมันกานพลูที่ความเข้มข้น 5 ppm สีของหินปะการังเริ่มซีดลงทำให้มีผลในการสังเคราะห์แสงลดลง และการใช้น้ำมันกานพลูที่ความเข้มข้น 50 ppm พบว่าหินปะการังจะตายทันที ภายในเวลา 1 นาที

Coyle *et al.* (2005) ได้ศึกษาเปรียบเทียบประสิทธิภาพของยาสลบ 5 ชนิด คือ น้ำมันกานพลู, Aquí-S™, Quinaldine, MS-222 และ 2-Phenoxyethanol ที่มีต่อกุ้งก้ามกราม *Macrobrachium rosenbergii* พบว่า MS-222 และ 2-Phenoxyethanol ที่ความเข้มข้น 25 และ 100 มิลลิกรัม/ลิตร ไม่มีผลในการสลบกุ้งก้ามกราม Brown *et al.* (1996) พบว่า MS-222 ที่ความเข้มข้นสูงสุด คือ 1000 มิลลิกรัม/ลิตร ไม่มีผลในการสลบต่อ crayfish (*Oronectes viris*) แต่กลับพบว่า น้ำมันกานพลู และ Aquí-S™ มีผลในการสลบกุ้งก้ามกรามโดย น้ำมันกานพลู จะใช้เวลาในการสลบน้อยกว่า Aquí-S™ แต่จะใช้เวลาในการพักฟื้นนานกว่า Aquí-S™ ส่วนสาร Quinaldine มีความเหมาะสมที่จะใช้ในการขนส่งกุ้งก้ามกรามแต่ไม่ได้รับการจดทะเบียนจากองค์การอาหารและยาของประเทศสหรัฐอเมริกาและประเทศทางยุโรป เนื่องจากอาจเป็นสารที่สามารถก่อมะเร็งได้ (Summerfelt and Smith, 1990) Munday and Wilson (1997) พบว่า coral reef fish (*Pomacentrus amboinensis*) ใช้ระยะเวลาในการพักฟื้นนาน 2-3 เท่าหลังจากใช้ยาสลบน้ำมันกานพลู

Ozeki (1975) พบว่าเมื่อใช้น้ำมันกานพลู ที่ความเข้มข้น 200-1000 มิลลิกรัม/ลิตร เพื่อสลบ crayfish (*Procambarus clarkii*) หลังจากพักฟื้นแล้วพบว่าไม่มีการตายของ crayfish แต่ น้ำมันกานพลู ไม่ได้รับการจดทะเบียนจากองค์การอาหารและยาของประเทศสหรัฐอเมริกาและประเทศทางยุโรปให้ใช้ในปลาที่เป็นอาหารและสัตว์กลุ่ม crustacean อย่างไรก็ตาม Aquí-S™ ที่ความเข้มข้น 100 มิลลิกรัม/ลิตร มีประสิทธิภาพในการสลบกุ้งได้ดีและเหมาะสมในการขนส่งกุ้งก้ามกราม ซึ่งตรงกับการศึกษาของ Gardner (1997)

Iversen *et al.* (2003) รายงานว่า ที่ความเข้มข้นของ AQUÍ-S™ 20 มิลลิกรัม/ลิตร สามารถลดความเครียดและการหลั่งฮอร์โมน cortisol ได้

Young (2009) ศึกษาถึงประสิทธิภาพของยาสลบ Aquí-S™ ในการสลบปลา western rainbowfish, *Melanotaenia australis* เมื่อทดสอบที่ความเข้มข้นแตกต่างกัน 5 ความเข้มข้น พบว่า การใช้ Aquí-S™ ที่ความเข้มข้น 80 มิลลิกรัม/ลิตร จะมีประสิทธิภาพมากที่สุดในการสลบ โดยระยะเวลาในการสลบเท่ากับ 140.4 ± 8.9 วินาที ระยะเวลาในการฟื้นเท่ากับ 180.2 ± 8.9 วินาที และหลังจากระยะเวลาที่ทำการทดลอง 1 เดือนไม่พบการตายของปลา western rainbowfish

จากที่กล่าวมาแล้วข้างต้นจะเห็นได้ว่า การใช้ยาสลบกับสัตว์น้ำกลุ่ม crustacean และสัตว์ไม่มีกระดูกสันหลังมีการตอบสนองต่อยาสลบแตกต่างจากสัตว์น้ำจำพวกปลาเพราะระบบประสาทที่

ไม่ค่อยพัฒนาและการตอบสนองต่อยาสลับที่ไม่ดีเท่าที่ควร ซึ่งต้องเพิ่มความเข้มข้นของยาสลับมากกว่าความเข้มข้นที่ใช้ในปลา

3. ระบบภูมิคุ้มกันของกุ้ง

กุ้งเป็นสัตว์น้ำที่ไม่มีกระดูกสันหลัง จัดอยู่ในกลุ่ม arthropod มีระบบภูมิคุ้มกันแบบไม่จำเพาะเจาะจง (non-specific immune response) เป็นระบบภูมิคุ้มกันที่มีมาแต่กำเนิด (Bachère *et al.*, 2000) โดยจะไม่มี การตอบสนองและการสร้างสารน้ำที่เรียกว่า แอนติบอดี (antibody) หรืออิมมูโนโกลบูลิน (immunoglobulin) (กิจการ และคณะ, 2543 ง) เนื่องจากระบบหมุนเวียนเลือดของกุ้งเป็นระบบเปิด (open circulatory system) (Söderhäll *et al.*, 1996) ประกอบด้วยหัวใจ แอ่งเลือด และน้ำเหลือง เลือดจากหัวใจจะไหลเข้าไปในแอ่งเลือด จากนั้นจะไปเลี้ยงส่วนต่างๆของร่างกาย อวัยวะในการสร้างเม็ดเลือด เรียกว่า hematopoietic tissue พบที่ตำแหน่งด้านบนของกระเพาะอาหาร และโคนขาเดิน พบอยู่เป็นชุดๆ ภายในเนื้อเยื่อเกี่ยวพัน และบริเวณใกล้เคียงกับแอ่งเลือด น้ำเลือดกุ้งมีแร่ธาตุคาร์บอน (C), ไนโตรเจน (N), ไฮโดรเจน (H), ซัลเฟอร์ (S) และคอปเปอร์ (Cu) เป็นองค์ประกอบที่สำคัญ โดยแร่ธาตุคอปเปอร์ ทำให้น้ำเลือดของกุ้งมีสีน้ำเงิน ในน้ำเลือดกุ้งมีรงควัตถุที่ทำหน้าที่ในการแลกเปลี่ยนก๊าซ คือ hemocyanin (Ratcliffe *et al.*, 1985) โดยมีประมาณ 60-95 เปอร์เซ็นต์ในน้ำเลือดทั้งหมด (Djangmah, 1970) ซึ่งจะมีการเปลี่ยนแปลงตามเพศ ขนาดของตัวกุ้ง และวงจรการลอกคราบของกุ้ง (Chen and Cheng, 1993) กุ้งมีกลไกการป้องกันตัวเองจากสิ่งแปลกปลอมหรือเชื้อที่ก่อให้เกิดโรค โดยเม็ดเลือด น้ำเลือด และเนื้อเยื่อต่างๆในร่างกาย (Söderhäll and Cerenius, 1992) ซึ่งสามารถแบ่งออกเป็น 2 กลไก คือ

3.1 กลไกการป้องกันตนเองโดยโครงสร้างภายนอกของร่างกาย (external defence mechanism)

กุ้งมีโครงสร้างแข็งภายนอก (exoskeleton structure) เป็นสารพวก chitin และ chitosan โดยบริเวณเนื้อเยื่อภายใต้โครงสร้างปกคลุมที่เรียกว่า เปลือก จะมีเซลล์ที่ทำหน้าที่ในการสร้างสารเมือก (mucopolysaccharide หรือ mucous) และหลังสารยับยั้งการทำงานของเอนไซม์โปรตีเอส (protease inhibitor) ที่สร้างจากเชื้อก่อโรคได้ นอกจากนี้ในขณะที่กุ้งลอกคราบ (molting) เพื่อการเจริญเติบโต กุ้งก็จะสามารถกำจัดพวกปรสิตบริเวณผิวหนังตัวออกไปพร้อมกับเปลือกที่ลอกออกไปด้วย

3.2 กลไกการป้องกันตัวเองภายในร่างกาย (internal defence mechanism)

เมื่อสิ่งแปลกปลอมหรือเชื้อก่อโรคสามารถเข้าสู่ร่างกายได้ กุ้งจะมีการตอบสนองภายในร่างกาย 2 ระบบ คือ

3.2.1 ระบบภูมิคุ้มกันที่อาศัยเซลล์ (cellular defence mechanism) การทำงานของเซลล์เม็ดเลือดในการทำลายสิ่งแปลกปลอมหรือเชื้อก่อโรคสามารถเข้าสู่ร่างกาย เซลล์เม็ดเลือดที่มีบทบาทสำคัญ ได้แก่ เซลล์เม็ดเลือด (hemocyte) 3 ชนิด คือ hyaline cell, semi-granular และ large granular (Martin and Graves, 1985; Hose *et al.*, 1987) กระจายอยู่ทั่วไปตามเนื้อเยื่อ ภายในกระแสเลือด ต่อม้ำเหลือง (lymphoid organ) กล้ามเนื้อหัวใจ hepatopancreas และอวัยวะอื่นๆ

กิกการ และคณะ (2543 ง) จำแนกเซลล์เม็ดเลือดของกุ้งเป็น 3 ชนิด โดยใช้การมีหรือไม่มีกรานูล (granule) ในเซลล์เป็นหลัก คือ

1) hyaline cell หรือ hyaline hemocyte (hyalinocyte) เป็นเซลล์เม็ดเลือดที่มีขนาดเล็กที่สุด รูปร่างแบน กลม ผิวเรียบ บางครั้งอาจพบคล้ายรูปกระสวย หรือพระจันทร์เสี้ยว มีนิวเคลียสขนาดใหญ่อยู่ตรงกลางเซลล์ มีไมโทคอนเดรีย (mitochondria), smooth endoplasmic reticulum (SER) และ rough endoplasmic reticulum (RER) น้อย พบ cytoplasmic granules ในปริมาณน้อยมากหรือไม่พบเลย และไม่พบ microvilli หรือเท้าเทียม (pseudopodium) ที่ผิวเซลล์ ขนาดของเซลล์มีเส้นผ่านศูนย์กลาง 6.4-8.3 ไมโครเมตร ในกรณีที่เป็นเซลล์กลม (หรือมีความกว้าง 2.5-3.6 ไมโครเมตร ยาว 6.8-13.9 ไมโครเมตร) ในกรณีที่เป็นเซลล์รูปรีหรือรูปกระสวย (กิกการ และคณะ, 2543 ก)หน้าที่เกี่ยวข้องกับการกำจัดสิ่งแปลกปลอม โดยกระบวนการกลืนกิน (phagocytosis) (Söderhäll and Smith, 1986)

2) semi-granular cell หรือ semi-granular hemocyte (semi-granulocyte) มีรูปร่างเป็นรูปไข่หรือรูปกระสวย นิวเคลียสอยู่ตรงกลางหรือขอบเซลล์พบ SER และ RER ได้มาก มี cytoplasmic granules ขนาดเล็ก และจำนวนน้อย เป็นเซลล์ที่เกาะพื้นผิวแก้วได้ดี มีส่วนยื่นของเซลล์ (cell process) หรือเท้าเทียมค่อนข้างมาก บริเวณผิวเซลล์อาจพบ microvilli ได้เล็กน้อย ขนาดของเซลล์มีความกว้าง 4.2-6.8 ไมโครเมตร และยาว 9.0-14.2 ไมโครเมตร ลักษณะของ cytoplasmic granules ภายในไซโทพลาซึม (cytoplasm) มีขนาดเล็กและพบจำนวนน้อย สังเกตได้ไม่ชัดเจนจากผิวนอก

(กิจการ และคณะ, 2543 ก) ทำหน้าที่โดยตรงในการห่อหุ้ม และทำลายสิ่งแปลกปลอมหรือเชื้อก่อโรคได้ โดยกระบวนการที่เรียกว่า nodule formation และ encapsulation รวมทั้งในกระบวนการ prophenoloxidase activating system และเซลล์เม็ดเลือดชนิด semi-granular cell นี้ยังสามารถกำจัดสิ่งแปลกปลอมโดยกระบวนการกลืนกินได้อีกด้วย (Söderhäll and Cerenius, 1992)

3) large granular cell หรือ large granular hemocyte (granulocyte) มีขนาดใหญ่ที่สุด รูปร่างเป็นรูปไข่ คล้ายกับ semi-granular cell แต่ขนาดของเซลล์จะโตกว่า นิวเคลียสอยู่บริเวณขอบ เซลล์มี SER และ RER ปานกลางและพบ cytoplasmic granules มาก ขนาดของกรานูลในไซโทพลาซึมมีเส้นผ่านศูนย์กลาง 0.7-1 ไมโครเมตร (กิจการ และคณะ , 2543 ก) ซึ่งใหญ่กว่ากรานูลใน semi-granular cell ลักษณะการยึดของเท้าเทียมหรือส่วนยื่นของเซลล์ชนิดนี้เห็นได้ชัดเจน ขนาดของเซลล์มีเส้นผ่านศูนย์กลาง 8-10 ไมโครเมตร ความยาว 12.2-14.6 ไมโครเมตร และความกว้าง 7.2-7.8 ไมโครเมตร มีหน้าที่หลักในการทำงานในกระบวนการ prophenoloxidase activating system รวมทั้งยังสามารถทำการห่อหุ้มและทำลายสิ่งแปลกปลอมหรือเชื้อก่อโรคได้โดยกระบวนการที่เรียกว่า nodule formation และ encapsulation (Söderhäll and Cerenius, 1992)

ปริมาณเม็ดเลือดรวมที่เพิ่มมากขึ้นจะส่งผลให้ประสิทธิภาพการทำงานของระบบภูมิคุ้มกันจะมีค่าสูงขึ้น (พรรณวไล , 2551) ร่างกายของสัตว์น้ำจะสามารถต่อต้านสิ่งแปลกปลอมหรือเชื้อโรคที่จะเข้าสู่ร่างกายได้อย่างมีประสิทธิภาพ เนื่องจากเซลล์เม็ดเลือดเป็นศูนย์กลางในการตอบสนองแบบไม่จำเพาะของกุ้ง โดยอาศัยการทำงานของเซลล์เม็ดเลือดและสารน้ำในการกำจัดสิ่งแปลกปลอมที่เข้าสู่ร่างกาย

การศึกษาเม็ดเลือดของกุ้งโดยใช้เทคนิคทางด้านชีวโมเลกุล (molecular technique) ร่วมกับเทคนิคทางด้านภูมิคุ้มกันมาศึกษาโปรตีนในน้ำเลือดทั้ง 3 ชนิด โดยใช้เทคนิค *in situ* hybridization (Keyser, 1999), enzyme activity (Söderhäll and Smith, 1983 a; Smith and Soderhall, 1983; Sequeira *et al.*, 1996), immunogold (Liang *et al.*, 1992), immunofluorescence (Johansson *et al.*, 1999) และ immunoprecipitation (Liang *et al.*, 1992) โปรตีนชนิด prophenoloxidase (proPO) และ peroxinectin สามารถพบได้ในเม็ดเลือดชนิด semi-granular cell และ large granular cell ส่วนโปรตีนชนิด cell-surface superoxide dismutase และ α -macroglobulin พบมากในเม็ดเลือดชนิด semi-granular cell และ large granular cell แต่พบน้อยในเม็ดเลือดชนิด hyaline cell ส่วนโปรตีนชนิด transglutaminase พบได้ในเม็ดเลือดชนิด hyaline cell และ semi-granular cell แต่ไม่พบในเม็ด

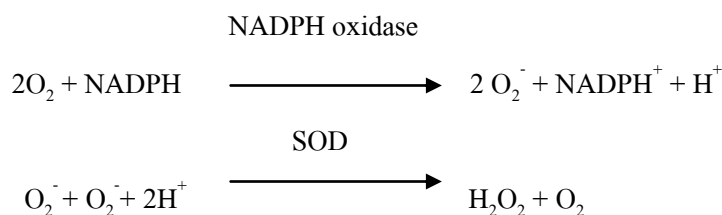
เลือดชนิด large granular cell เม็ดเลือดทั้ง 3 ชนิดนี้จะไหลเวียนไปกับเลือดทั่วร่างกาย ปริมาณเม็ดเลือดภายในตัวกึ่งมีการเปลี่ยนแปลงตลอดเวลา และจะมีปริมาณลดลงเมื่อเกิดการติดเชื้อโรค จากนั้นเม็ดเลือดใหม่จะถูกสร้างขึ้นมาทดแทนเม็ดเลือดที่ตายไปในปริมาณที่เหมาะสม

ระบบภูมิคุ้มกันที่อาศัยเซลล์ มีกระบวนการป้องกันและทำลายสิ่งแปลกปลอมหรือเชื้อก่อโรค โดยมีกระบวนการหลักๆ 3 แบบ ได้แก่

1) กระบวนการกลืนกินสิ่งแปลกปลอม

เป็นกลไกพื้นฐานในการทำลายหรือกำจัดเมื่อมีสิ่งแปลกปลอมผ่านชั้นผิวปกคลุมเข้ามาสู่ร่างกาย โดยการทำงานของเซลล์เม็ดเลือด hyaline cell เป็นหลัก และมีการทำงานร่วมกับ semi-granular cell บ้าง โดยกระบวนการนี้เป็นกระบวนการที่ไม่จำเพาะ ซึ่งจะเริ่มจากการยึดกันระหว่างสิ่งแปลกปลอมกับผิวของเซลล์เม็ดเลือด หลังจากนั้นผิวของเซลล์จะเว้าเข้าไปหรือมีการโอบล้อม โดยการใช้ไซโทพลาซึมยืดออกเป็นเท้าเทียม เกิดเป็น phagosome ซึ่งจะสัมผัสกับ lysosome ที่อยู่ในเซลล์ ได้เป็น phago-lysosome ภายใน lysosome บรรจุเอนไซม์หลายชนิดที่ทำหน้าที่ย่อยสลาย เรียกว่า acid hydrolases รวมถึงเอนไซม์ที่สามารถทำลายสารพันธุกรรมทั้ง deoxyribonucleic acid (DNA) ได้แก่ เอนไซม์ DNases, เอนไซม์ที่ทำลายสาร ribonucleic acid (RNA) ได้แก่ เอนไซม์ Rnases, เอนไซม์ที่สามารถทำลายสารโปรตีน ได้แก่ proteases, เอนไซม์ที่สามารถทำลายสารจำพวกฟอสเฟต ได้แก่ phosphatases และเอนไซม์ที่สามารถทำลายสารพวกไขมัน ได้แก่ lipases ที่สามารถไปลดขนาดของโมเลกุลของสิ่งแปลกปลอมทั้งหลายให้เหลือเป็นหน่วยย่อยๆ และกระตุ้นให้เกิดกระบวนการ hydrolysis ที่ผนังเซลล์ของแบคทีเรีย โดยจำแนกได้เป็น 6 ชนิด ได้แก่ c-type, g-type, plant lysosome, phage lysosome, i-type, bacteria-lysosome (Hikima *et al.*, 2003)

การที่สิ่งแปลกปลอมเกาะบนผนังเซลล์ของเซลล์เม็ดเลือด และมีการยื่นไซโทพลาซึมล้อมรอบสิ่งแปลกปลอม นำไปสู่การเพิ่มการนำออกซิเจน (O_2) เข้าสู่เซลล์ (respiratory burst) ซึ่งออกซิเจนเหล่านี้จะถูกรีดิวซ์ (reduce) เป็น superoxide anion (O_2^-) ด้วยเอนไซม์ nicotinamide adenine dinucleotide phosphate oxidase (NADPH oxidase) ต่อจากนั้น superoxide anion จะถูกเปลี่ยนเป็น hydrogen peroxide (H_2O_2) โดยการเร่งปฏิกิริยาด้วยเอนไซม์ superoxide dismutase (SOD) (สมบัติ, 2542; Klein, 1982) ดังสมการต่อไปนี้



superoxide anion อาจถูกเปลี่ยนเป็น hydrogen peroxide ได้อีกทางหนึ่งโดยการเกิดเองตามธรรมชาติไม่ต้องอาศัยเอนไซม์ และได้ออกซิเจน 1 โมเลกุล (singlet oxygen; $^1\text{O}_2$) เป็นผลพลิตร่วมกับ hydrogen peroxide นอกจากนี้ superoxide anion ยังทำปฏิกิริยาร่วมกับ hydrogen peroxide เกิดเป็น hydroxyl radicle (OH) (สมบัติ, 2542; Klein, 1982) ดังสมการต่อไปนี้



จากปฏิกิริยาข้างต้น superoxide anion, hydrogen peroxide, ออกซิเจน 1 โมเลกุล และ hydroxyl radicle มีบทบาทสำคัญในการทำลายสิ่งแปลกปลอมที่ถูกเซลล์เม็ดเลือดนำเข้าสู่เซลล์ ซึ่งมีผู้รายงานไว้ในกึ่งกลางดำ (สมบัติ, 2542; Song and Hsieh, 1994; Sung and Song, 1996)

2) กระบวนการ nodule formation

เป็นกระบวนการที่เกิดขึ้นเมื่อมีสิ่งแปลกปลอมหรือเชื้อก่อโรคที่มีขนาดเล็กบุกรุกเข้ามาเป็นจำนวนมากเกินกว่าความสามารถที่กระบวนการกลืนทำลายจะกำจัดได้ (Jiravanichpaisan *et al.*, 2006) โดยจะมีการล้อมสิ่งแปลกปลอมโดยเซลล์เม็ดเลือด ทำให้เกิดเป็น nodule จะเกิดขึ้นเพื่อป้องกันไม่ให้สิ่งแปลกปลอมกระจายทั่วร่างกาย มักพบการสร้าง nodule ที่เหงือก และ hepatopancreas พร้อมทั้งการสร้างเม็ดสี melanin ในกระบวนการ prophenoloxidase activating system ซึ่งเป็นกระบวนการตอบสนองทางด้านระบบภูมิคุ้มกันในน้ำเลือด เซลล์เม็ดเลือดที่ทำหน้าที่ในการห่อหุ้มสิ่งแปลกปลอม ได้แก่ semi-granular cell และ large granular cell (Johansson and Soderhall, 1989)

3) กระบวนการ encapsulation

เป็นกระบวนการที่เกิดขึ้นเมื่อมีสิ่งแปลกปลอมหรือเชื้อก่อโรคที่มีขนาดใหญ่กว่า 10 ไมโครเมตร (Lackie, 1980) เช่น เชื้อรา หนองตัวกลม ไข่ของปรสิต และสัตว์เซลล์เดียวขนาดใหญ่ เป็นต้น (Jiravanichpaisan *et al.*, 2006) จนเซลล์เม็ดเลือดไม่สามารถกำจัดได้ทัน นอกจากนี้กลไกการกำจัดสิ่งแปลกปลอมโดยกระบวนการ encapsulation จะอาศัยองค์ประกอบในกระบวนการ prophenoloxidase activating system พร้อมกับการเกิดเม็ดสี melanin (Ratcliff *et al.*, 1985) เซลล์เม็ดเลือดที่ทำหน้าที่ในการห่อหุ้มสิ่งแปลกปลอมเป็นชนิดเดียวกันกับการเกิดกระบวนการ nodule formation จากการศึกษาของ กิจการ และคณะ (2543 ค) ได้ทำการทดลองโดยใช้ยีสต์ (*S. cerevisiae*) เป็นสิ่งแปลกปลอมเพื่อติดตามและตรวจสอบการตอบสนองของเซลล์และเนื้อเยื่อที่ทำหน้าที่เกี่ยวข้องในระบบภูมิคุ้มกันโรคของกิ้งกูดดำ ด้วยวิธีนับเม็ดเลือดรวมและเนื้อเยื่อวิทยา จากการทดลองหลังจากฉีดเซลล์ยีสต์เข้าสู่ตัวกิ้ง 1 ชั่วโมง ปริมาณเม็ดเลือดในระบบไหลเวียนลดลง หลังจากนั้นปริมาณเม็ดเลือดค่อยๆ เพิ่มขึ้นภายใน 24 ชั่วโมง และผลการศึกษาเนื้อเยื่อพบว่า เหงือก ต่อมน้ำเหลือง หัวใจ hepatopancreas และเนื้อเยื่อเกี่ยวพัน สามารถกำจัดสิ่งแปลกปลอมได้ดี ส่วนกล้ามเนื้อและระบบประสาทกำจัดได้เพียงเล็กน้อย โดยพบเซลล์เม็ดเลือดและเซลล์ที่จับกินอยู่กับที่ (fixed phagocyte) ทำหน้าที่ในการดักจับสิ่งแปลกปลอมในเนื้อเยื่อดังกล่าว กลไกการกำจัดสิ่งแปลกปลอมเกิดขึ้นโดยเริ่มจากเซลล์เด็วเข้ามาล้อมจับ หลังจากนั้นชั่วโมงที่ 3-9 พบว่าเซลล์เม็ดเลือดขาวเข้ามารายล้อมมากขึ้นจนกลายเป็นลักษณะที่เรียกว่า nodule formation และ encapsulation ทำให้ปริมาณเม็ดเลือดในระบบไหลเวียนลดลงและสุดท้ายมีการสร้างเม็ดสี melanin ขึ้น และถูกกำจัดออกนอกร่างกาย ผลการศึกษาด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนพบความแตกต่างของโครงสร้างเม็ดเลือด และเซลล์ที่จับกินอยู่กับที่ โดยเซลล์ไม่พบ granule ภายในไซโทพลาซึมมี vacuole ขนาดใหญ่ในไซโทพลาซึมและพบเศษเซลล์ (debris) และลักษณะของ myelin figure แสดงให้เห็นถึงการจับกินสิ่งแปลกปลอมและเกิด autophagic vacuole (กิจการ และคณะ, 2543 ง)

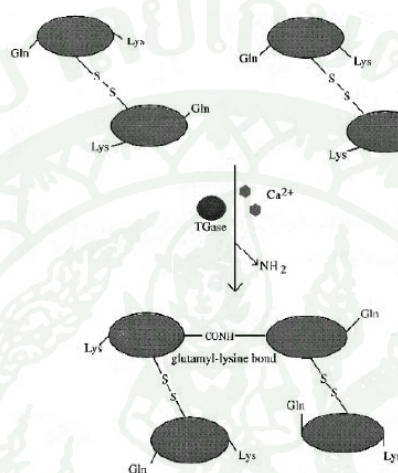
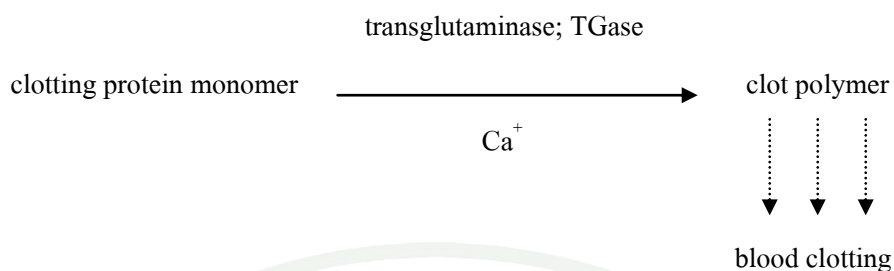
3.2.2 ระบบภูมิคุ้มกันในน้ำเลือด (humoral immunity) มีการทำงานต่อหรือพร้อมกับระบบภูมิคุ้มกันที่อาศัยเซลล์ โดยเซลล์เม็ดเลือดของกิ้งจะมีการผลิตสารโปรตีนทำหน้าที่ช่วยในการจดจำและเข้าจับกันได้กับโมเลกุลของสิ่งแปลกปลอมหรือเชื้อก่อโรค ซึ่งมีชื่อเรียกว่า pattern recognition protein (PRPs) มีโมเลกุลขนาด 100 กิโลดาลตัน (kDa) จะไหลเวียนอยู่ในกระแสเลือด โดย PRPs มีชื่อเรียกต่างๆ กันตามความสามารถในการจับกับโมเลกุลของเชื้อก่อโรค เช่น ถ้า PRPs จับกับ

โมเลกุลของเบต้ากลูแคน ซึ่งสามารถสกัดได้จากผนังเซลล์ (cell wall) ของยีสต์ (yeast) และ hyphae ของเชื้อรา จะมีชื่อเรียกว่า β -glucan binding protein (Vargas-Albores and Yepiz-Plascencia, 2000) ในส่วนของเปปติโดกลัยแคนสามารถสกัดได้จากผนังเซลล์แบคทีเรียแกรมบวก จะมีชื่อเรียกว่า peptidoglycan binding protein และไลโปโพลีแซคคาไรด์ สามารถสกัดได้จากผนังเซลล์แบคทีเรียแกรมลบ จะมีชื่อเรียกว่า lipopolysaccharide binding protein (ชัยชาญ, 2545)

โดยโมเลกุลของสารเบต้ากลูแคน ไลโปโพลีแซคคาไรด์ และเปปติโดกลัยแคน เรียก รวมๆ ว่า pathogen associated molecular pattern (PAMPs) เมื่อ PAMPs แต่ละชนิดเข้ามาในกระแส เลือด กิ่ง โมเลกุลของ PRPs จะเคลื่อนที่เข้าไปจับกับ PAMPs ส่งผลให้ได้เป็น โมเลกุลเชิงซ้อน (protein complex) ได้แก่ β -1,3-glucan-binding protein complex (Sritunyaluksana *et al.*, 1999), lipopolysaccharide-binding protein complex และ peptidoglycan-binding protein complex (ชัยชาญ, 2545) โมเลกุลเชิงซ้อนที่เกิดขึ้นจะไปกระตุ้นเซลล์เม็ดเลือดให้เคลื่อนที่เข้ามา (migration) ซึ่งบนผิวของเซลล์เม็ดเลือดชนิด semi-granular cell และ large granular cell มีตัวรองรับแบบ จำเพาะ (receptor) ซึ่งสามารถรองรับ โมเลกุลเชิงซ้อน และกระตุ้นให้เกิดกระบวนการ degranulation ของเม็ดเลือด (Vargas-Albores and Yepiz-Plascencia, 2000) ซึ่งภายในกรานูลจะ ประกอบไปด้วยเอนไซม์และสารประกอบ โปรตีนต่างๆ ได้แก่ เอนไซม์ transglutaminase (TGase), lectin, peroxinectin, protein released และเอนไซม์ในกระบวนการ prophenoloxidase activating system โดยสารทั้งหมดที่หลั่งออกมากระตุ้นให้เกิดกระบวนการต่างๆ ดังนี้

1) กระบวนการแข็งตัวของเลือด

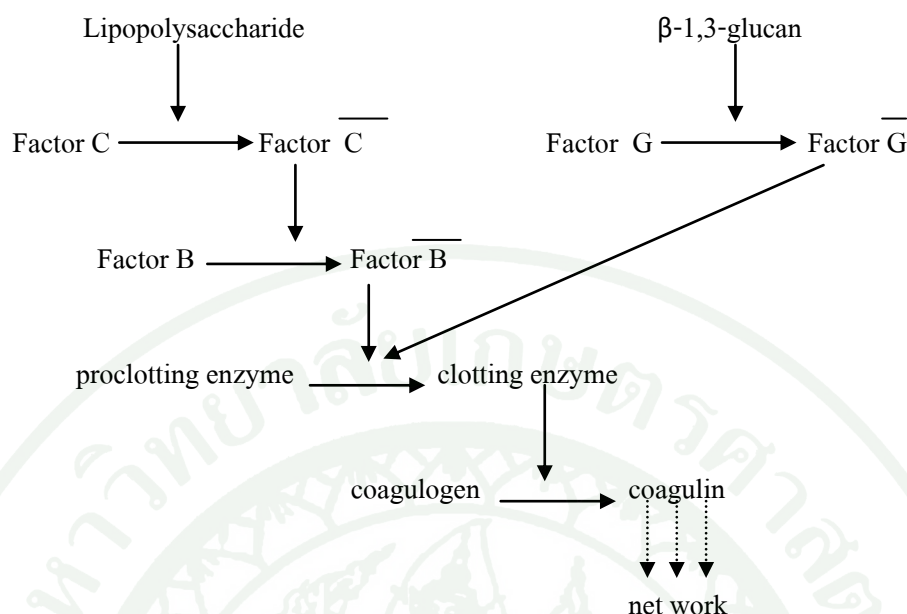
เป็นปฏิกิริยาที่สำคัญเพื่อป้องกันการสูญเสียเลือดจากบาดแผล โดยเอนไซม์ transglutaminase จะ ไปกระตุ้นโปรตีนหลักที่เกี่ยวข้องกับการแข็งตัวของเลือด (clotting protein) ซึ่ง ไหลเวียนอยู่ในน้ำเลือด (วัชรียา, 2547) โดย transglutaminase จะทำงานร่วมกับแคลเซียมไอออน (Ca^{2+}) กระตุ้น clotting protein monomer ส่งผลให้เกิดกระบวนการทางชีวเคมี ได้เป็นสารที่เกิดการ จับตัวเป็นก้อน (clot polymer) ทำให้เม็ดเลือดเกิดการแข็งตัว (blood clotting) ดังแสดงในสมการ ต่อไปนี้



ภาพที่ 2 กระบวนการแข็งตัวของเลือด

ที่มา: Sritunyalucksana *et al.* (1999)

ในกระแสดำเลือดของแมงดาทะเล (horseshoe crab) ชนิด *Tachypleus tridentatus* มีสารโปรตีน 5 ชนิด ซึ่งทำหน้าที่ในการแข็งตัวของเลือดได้ ได้แก่ serineproteinase zymogen factor C, B, G และ proclotting enzyme ไหลเวียนอยู่ในกระแสดำเลือด โดย factor C จะเป็นโปรตีนที่ไวต่อการกระตุ้นจากไลโปโพลีแซคคาไรด์ และ factor G จะเป็นโปรตีนที่ไวต่อการกระตุ้นของ β -1,3-glucan (Nakamura *et al.*, 1989; Seki *et al.*, 1994) โดย proclotting enzyme กระตุ้นให้เกิดการเปลี่ยนแปลงทางเคมีของ coagulogen ได้เป็นสาร coagulin ส่งผลให้เกิดการจับตัวเป็นร่างแห เกิดการแข็งตัวของเลือดและเลือดไม่สามารถไหลออกจากร่างกายได้ (Iwanaga, 1993) ดังสมการต่อไปนี้



Yeh *et al.* (1998) ได้ศึกษากลไกการแข็งตัวของเลือดกึ่งกุลาดำ โดยแยก clottable protein จากน้ำเลือดโดยใช้เทคนิค sequential DEAE anion-exchange chromatography ซึ่งโปรตีนนี้จะเกิดการแข็งตัวเมื่อมีแคลเซียมไอออน และเอนไซม์ TGase ที่ปล่อยออกมาจากเซลล์เม็ดเลือด ซึ่งสามารถทนต่อความร้อนได้ถึง 66 องศาเซลเซียส จากการศึกษาในครั้งนี้ยังพบว่า clottable protein มีขนาด 380 kDa โดยการแยกด้วยเทคนิค SDS-PAGE และ MALDI-TOF mass spectrometry และยังพบว่า มีโครงสร้างของ amino acid และขนาดของโปรตีนคล้ายกับที่พบในกุ้งชนิดอื่นๆ ทั้ง prawn, lobster และ crayfish ด้วย

Wang *et al.* (2006) ได้ศึกษากลไกการแข็งตัวของเลือดในกุ้ง crayfish พบว่าในเม็ดเลือดทั้งชนิด semi-granular cell และ large granular cell รวมถึงเนื้อเยื่อของกล้ามเนื้อมีกิจกรรมที่เกิดจากการแข็งตัวของเลือดอันเนื่องมาจากการทำงานของเอนไซม์ TGase แต่กิจกรรมดังกล่าวกลับไม่พบใน hepatopancreas และน้ำเลือด เมื่อเปรียบเทียบโครงสร้างของ nucleotide พบว่าลำดับเบสของเอนไซม์ TGase ของกุ้ง crayfish มีความคล้ายคลึงกันมากกับสัตว์ไม่มีกระดูกสันหลังชนิดอื่นและสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม

Huang *et al.* (2004) ได้ศึกษากิจกรรมของเอนไซม์ TGase ในกุ้งกุลาดำพบว่ามีความคล้ายคลึงกับกุ้ง crayfish สัตว์มีกระดูกสันหลัง และไม่มีกระดูกสันหลังชนิดอื่นๆ และสามารถ

ตรวจสอบพบได้ในทุกอวัยวะ นอกจากนี้ยังพบว่ามีการแสดงออกมาในปริมาณสูงในเนื้อเยื่อส่วน hematopoietic tissue อีกด้วย

2) การหลั่งสาร lectin

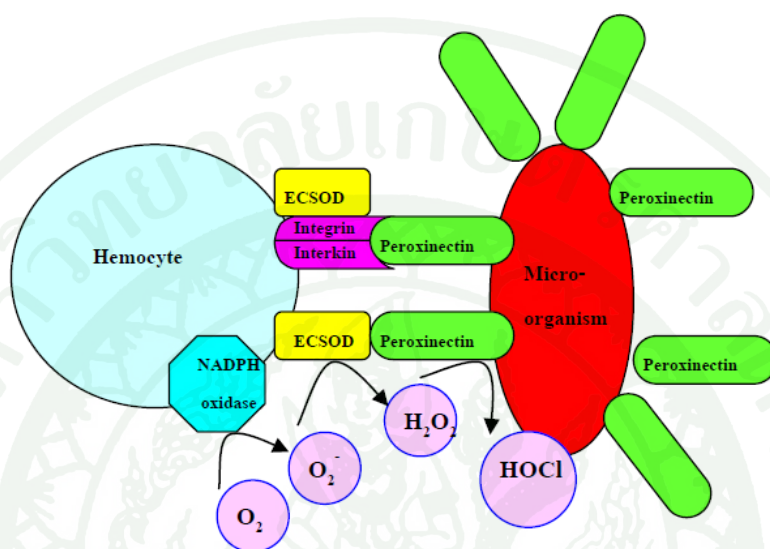
เป็นสารชนิดโปรตีนหรือไกลโคโปรตีน (glycoprotein) ที่มีคุณสมบัติในการจับได้อย่างจำเพาะกับสารพวกคาร์โบไฮเดรตบนผนังเซลล์แบคทีเรีย โดยเรียกว่า carbohydrate-recognition domain (CRD) มี 2 ชนิด คือ C-type lectins และ S-type lectins (Freire Marques and Barracco, 2000) โดย lectin มีลักษณะเป็น bivalent จึงสามารถเชื่อมต่อกับเซลล์แบคทีเรียได้ถึง 2 เซลล์ ทำให้เกิดการตกตะกอนของเซลล์แบคทีเรียได้ รวมทั้งทำหน้าที่ opsonin ได้อีกด้วย (เสาวลักษณ์, 2550) สาร lectin สามารถพบได้ทั้งในสัตว์ที่มีกระดูกสันหลังและไม่มีกระดูกสันหลัง พบว่ามีบทบาทสำคัญในการตอบสนองแบบไม่จำเพาะของสัตว์ไม่มีกระดูกสันหลัง (Vasta *et al.*, 1994)

3) การหลั่งสารโปรตีนพวก peroxinectin

เป็นสารที่คล้ายไซโตไคน์ (cytokine-like factors) ในสัตว์มีกระดูกสันหลัง ทำหน้าที่ช่วยในการประสานงาน (พชรวดี, 2549) ในระบบภูมิคุ้มกันของร่างกาย โดยสาร peroxinectin เป็นสารชนิดโปรตีนมีขนาดของโมเลกุลประมาณ 89.1 kDa (Liu *et al.*, 2004) จะทำหน้าที่เป็นสาร opsonin เคลือบบนผนังเซลล์ของเชื้อที่ก่อโรคที่อยู่ในกระแสเลือด โดยจะกระตุ้นให้เซลล์เม็ดเลือดเคลื่อนที่เข้าและเกิดกระบวนการกลืนกินสิ่งแปลกปลอมของเม็ดเลือด (Smith and Chisholm, 1992) nodule formation และ encapsulation โดยช่วยในการยึดติดระหว่างเซลล์เม็ดเลือดกับเชื้อก่อโรค และช่วยให้เซลล์เม็ดเลือดเกิดกระบวนการ degranulation มากขึ้น ส่งผลให้เอนไซม์และสารโปรตีนต่างๆภายในกรานูลถูกปล่อยออกมามากขึ้น โดยเฉพาะเอนไซม์ในกระบวนการ prophenoloxidase activating system

บนผนังเซลล์ของเซลล์เม็ดเลือดกึ่งมีส่วนรองรับ (receptor) แบบจำเพาะกับสาร peroxinectin ที่เรียกว่า integrin, interkin และ extracellular superoxide dismutase (ECSOD) ทำหน้าที่เป็นส่วนรองรับของเซลล์เม็ดเลือดชนิด hyaline cell ทำให้เกิดกระบวนการกลืนกินสิ่งแปลกปลอมและมีการหลั่งเอนไซม์ NADPH oxidase ออกสู่ผิวเซลล์เม็ดเลือด มีการใช้ออกซิเจนสูง

มากภายนอกเซลล์ ได้ผลิตเป็น reactive oxygen intermediates (ROI) ชนิดต่างๆ ซึ่งได้แก่ superoxide anion, hydrogen peroxide และ (HOCl) ที่มีคุณสมบัติในการฆ่าเชื้อโรค โดยเฉพาะ hypochlorous acid ซึ่งมีสภาพเป็นกรดรุนแรง ส่งผลให้ผนังเซลล์เชื้อแบคทีเรียแตกออกได้ Smith and Chisholm (1992) (ภาพที่ 3)



ภาพที่ 3 การทำงานของสารโปรตีนพวก peroxinectin

ที่มา: ดัดแปลงมาจาก Smith and Chisholm (1992)

4) การหลั่งสารโปรตีน (protein released)

เป็นสารโปรตีนที่ทำหน้าที่ในการต่อต้านแบคทีเรียก่อโรค (antimicrobial peptide) มีการหลั่งอย่างรวดเร็วเมื่อเกิดกระบวนการ degranulation ของเซลล์เม็ดเลือดและมีการตอบสนองอย่างรวดเร็วต่อแบคทีเรีย โดยมีขนาดโมเลกุลโปรตีนประมาณ 6.5 kDa สารโปรตีนบางชนิดที่หลั่งออกมานั้นมีความจำเพาะต่อเชื้อแบคทีเรียบางชนิดมาก เช่น

α -2 macroglobulin (α -2M) มีหน้าที่ในการยับยั้งหรือทำให้พิษจากเชื้อก่อโรคเป็นกลาง (neutralization) รวมทั้งยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ proteinase (เอนไซม์ที่สามารถย่อยโปรตีน) ของเชื้อก่อโรค และทำหน้าที่ในการควบคุมการสร้าง proteinase ในกระบวนการ prophenoloxidase activating system อีกด้วย (Aspan *et al.*, 1990; Dieguez-uribeondo and Cerenius, 1998)

lysosome C type มีหน้าที่ในการยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย โดยทำลายระบบ osmoregulation ของผนังเซลล์แบคทีเรีย ส่งผลให้ผนังเซลล์ของแบคทีเรียถูกทำลาย

penedin เป็นสาร โปรตีนที่มีประจุบวก (cationic antibacterial peptide) หน้าที่เข้าไปเคลือบผนังเซลล์เชื้อก่อโรค ส่งผลให้ประจุของเชื้อก่อโรคมีสภาวะเป็นกลางและหมดความสามารถในการก่อโรค (Destoumieux *et al.*, 1997)

crustin มีหน้าที่เข้าไปเคลือบบนผนังเซลล์ทำให้เกิดการจับกันเป็น nodule เพื่อป้องกันการแพร่กระจายของเชื้อแบคทีเรีย (Cuthbertson *et al.*, 2002)

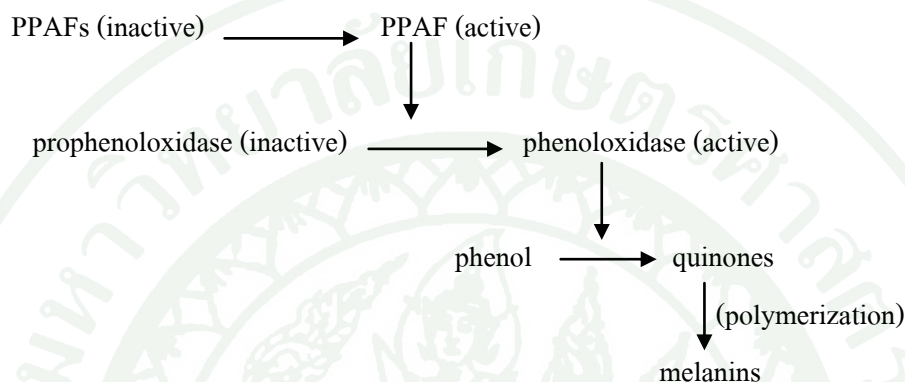
peptide (Schnapp *et al.*, 1996) และ callinectin (Khoo *et al.*, 1999)

สารโปรตีนพวก protein released สามารถพบได้ทั้งส่วนของน้ำ ซีรัม และในสารละลายเม็ดเลือดที่แตก (hemocyte lysate supernatant)

5) กระบวนการ prophenoloxidase activating system

เป็นกระบวนการที่สำคัญในการทำลายสิ่งแปลกปลอมและควบคุมการกระจายของเชื้อโรคภายในตัวกุ้ง เมื่อเกิดกระบวนการ degranulation ส่งผลให้เกิดการหลั่งสารพวก proenzyme และ substrates ต่างๆ ได้แก่ เอนไซม์ prophenoloxidase ซึ่งเป็นสารที่สำคัญในกระบวนการ prophenoloxidase activating system โดยเอนไซม์ prophenoloxidase ซึ่งเป็นสารที่อยู่ในรูปที่ไม่สามารถทำงานได้ (inactive) จะต้องถูกกระตุ้นด้วยสารที่เรียกว่า serine proteinase homologues (SPHs) ทำหน้าที่เป็นโคแฟกเตอร์ ร่วมกับเอนไซม์ prophenoloxidase activating factor/enzyme (PPAFs) (Söderhäll and Cerenius, 1998) และมีการทำงานร่วมกับแคลเซียมไอออนกระตุ้นให้เอนไซม์ prophenoloxidase สามารถทำงานได้ (active) (Hose *et al.*, 1987) โดยเปลี่ยนเป็นสารที่เรียกว่า เอนไซม์ phenoloxidase (PO) ที่ไวต่อการเกิดปฏิกิริยา สามารถกระตุ้นให้เกิดปฏิกิริยา hydroxylation เปลี่ยน tyrosinase ให้เป็น dihydroxyphenylalanine (DOPA) ให้เป็นสารประกอบควิโนน (quinone) หลังจากนั้นควิโนนจะเปลี่ยนไปอยู่ในรูปของ dopachrome และเกิดกระบวนการ polymerization เกิดเป็นสาร melanin กระบวนการเกิดสาร melanin มีชื่อเรียกอีกว่า melanin formation หรือ melanization ดังสมการ โดยหน้าที่ของ melanin จะช่วยในการยับยั้งหรือป้องกัน

การเจริญของเชื้อแบคทีเรียและเชื้อรา (Smith and Chisholm, 1992; Söderhäll and Cerenius, 1992; Bachère *et al.*, 2004) และป้องกันไม่ให้สิ่งแปลกปลอมแพร่กระจายไปยังส่วนต่างๆของร่างกาย (Söderhäll and Smith, 1986; Sung *et al.*, 1996) และทำหน้าที่เป็นสารต่อต้านแบคทีเรีย (antibacterial substances)



โดยเอนไซม์ prophenoloxidase อยู่ในกรานูลในไซโทพลาซึมของเม็ดเลือดถึง 90 เปอร์เซ็นต์ รวมถึงในซีรัมของกุ้ง (Perrazzolo and Barracco, 1997) และมีการแพร่กระจายอยู่ในเนื้อเยื่อหลายส่วนของตัวกุ้ง (Sung and Song, 1996; Perrazzolo and Barracco, 1997) จากการศึกษาของ Söderhäll and Smith (1983 b) ได้ทำการแยกเซลล์เม็ดเลือดของสัตว์ในกลุ่ม crustacean หลายชนิดโดยใช้สายละลาย Percoll 60 เปอร์เซ็นต์ พบว่าเซลล์เม็ดเลือดชนิด granular cell มีค่าเอนไซม์ prophenoloxidase สูงถึง $1,249.51 \pm 313.36$ หน่วยต่อนาที่ต่อมิลลิกรัมโปรตีน ส่วนใน hyaline cell มีค่าเอนไซม์ prophenoloxidase ค่อนข้างต่ำ คือ 198.95 ± 78.75 หน่วยต่อนาที่ต่อมิลลิกรัมโปรตีน

ทวิศักดิ์ (2547) รายงานว่าปริมาณของเอนไซม์ prophenoloxidase ในกุ้งกุลาดำ อายุ 1-4 เดือน มีการเพิ่มขึ้นตามอายุที่เพิ่มขึ้นของกุ้ง โดยกุ้งกุลาดำ อายุ 1-4 เดือน พบว่ามีค่าอยู่ในช่วง 14.22-36.44 หน่วยต่อนาที่ต่อมิลลิกรัมโปรตีน ส่วนกุ้งกุลาดำอายุ 4 เดือน มีปริมาณเอนไซม์ prophenoloxidase สูงที่สุด

Moullac *et al.* (1998) พบว่าปฏิกิริยาของเอนไซม์ prophenoloxidase ในสัตว์กลุ่ม crustacean ลดลงเมื่ออยู่ในสภาวะเครียด ช่วงระยะเวลาของการลอกคราบ (intermoult) และระยะก่อนการลอกคราบ (premoult) มีผลกระทบต่อกิจกรรมของเอนไซม์ prophenoloxidase

การตอบสนองต่อสิ่งแปลกปลอมหรือเชื้อก่อโรคที่เข้าสู่ร่างกายกึ่ง มีการทำงานของเซลล์เม็ดเลือดทั้ง 3 ชนิด โดยจะตอบสนองทั้งภูมิคุ้มกันที่อาศัยเซลล์เม็ดเลือดและภูมิคุ้มกันในน้ำเลือด ส่งผลให้ปริมาณของเซลล์เม็ดเลือดมีการเปลี่ยนแปลงหลังจากที่ได้รับเชื้อก่อโรค โดยจำนวนเซลล์เม็ดเลือดจะลดลงทันทีในช่วงชั่วโมงแรกและลดลงอย่างต่อเนื่องในช่วง ชั่วโมงที่สองและที่สาม ปริมาณเม็ดเลือดจะไม่มีการเปลี่ยนแปลงซึ่งอยู่ในระดับต่ำคงที่หลังจากชั่วโมงที่สี่ จากนั้นปริมาณเม็ดเลือดในกึ่งจะค่อยๆ เพิ่มขึ้นภายใน 24 ชั่วโมง (กิจการ และคณะ, 2543 ง) นอกจากนี้พบว่าอวัยวะได้แก่ หัวใจ และต่อมน้ำเหลือง เป็นบริเวณที่มีการกำจัดสิ่งแปลกปลอมได้ และผลผลิตสุดท้ายของการกำจัดสิ่งแปลกปลอมก็จะมีการสร้างเม็ดสี melanin ขึ้น เนื่องจากกระบวนการ prophenoloxidase activating system

เนื้อเยื่อที่เกี่ยวข้องกับระบบภูมิคุ้มกันในกึ่ง คือ ต่อมน้ำเหลือง (Martin *et al.*, 1993) hemopoietic tissue ซึ่งเป็นเซลล์ที่ทำหน้าที่สร้างเม็ดเลือด รวมทั้งเซลล์เม็ดเลือดทั้งสามชนิด โดยเซลล์เม็ดเลือดมีการกระจายอยู่ตามเนื้อเยื่อหลายส่วน เช่น หัวใจ หัวใจ เหงือก ทางเดินอาหาร เซลล์เม็ดเลือดที่มักจะพบ คือ hyaline cell ซึ่งพบเศษเซลล์ และลักษณะของ myelin figure ซึ่งแสดงให้เห็นถึงการจับกินสิ่งแปลกปลอมและการเกิด autophagic vacuoles (กิจการ และคณะ, 2543 ง)

Fontaine and Lightner (1975) ศึกษาเกี่ยวกับระบบการตอบสนองของเซลล์ต่อการบาดเจ็บของกึ่งสกุล *Penaeus* พบว่าเมื่อกึ่งได้รับอันตรายจากสิ่งแปลกปลอม มีการทำให้เกิดการบาดเจ็บหรือเป็นแผลขึ้นปฏิกิริยาแรกที่กึ่งมีการตอบสนอง คือ มีการเคลื่อนที่ของ เซลล์เม็ดเลือดไปยังบริเวณที่มีเกิดการบาดเจ็บ จากนั้นเซลล์เม็ดเลือดกึ่งจะเกิดกระบวนการกลืนกินสิ่งแปลกปลอมขึ้น ซึ่งเป็นการกำจัดเชื้อโรคในขั้นตอนแรก จากนั้นจะเกิดปฏิกิริยา encapsulation มี cellular infiltration จะเกิดโครงข่ายของ fibroblast หนาแน่นขึ้น และมี collagen-like fibers เกิดเป็นแผลถาวรและมีการสร้างเม็ดสี melanin จากกระบวนการ melanization

4. ปัจจัยที่มีผลต่อระบบภูมิคุ้มกันของกุ้ง

4.1 คุณภาพน้ำ

สภาพแวดล้อมในการเลี้ยงกุ้งที่ไม่เหมาะสมเป็นปัจจัยหลักที่ส่งผลให้กุ้งเกิดความเครียด มีการลดลงของการตอบสนองทางด้านภูมิคุ้มกันของกุ้ง ส่งผลให้กุ้งอ่อนแอ ง่ายต่อการติดเชื้อ โดยคุณภาพน้ำที่สำคัญมีผลต่อระบบภูมิคุ้มกันของกุ้ง ได้แก่

4.1.1 ความเป็นกรดเป็นด่างหรือพีเอชของน้ำ ถ้ามีการเปลี่ยนแปลงมากในรอบวันหรือมีค่าต่ำหรือสูงเกินไปจะส่งผลให้ความสามารถในการกำจัดเชื้อแบคทีเรียในน้ำลดลง แต่จะไม่มีผลต่อการเปลี่ยนแปลงปริมาณเม็ดเลือดรวมและความว่องไวของเอนไซม์ phenoloxidase (กิจการ และคณะ, 2543 ง)

4.1.2 ปริมาณออกซิเจนที่ละลายในน้ำ ในสภาวะที่ออกซิเจนที่ละลายในน้ำต่ำ จะมีผลต่อระบบภูมิคุ้มกันของกุ้งและพฤติกรรมการดำรงชีวิต โดยกุ้งจะเคลื่อนที่ช้าลงเพื่อลดกิจกรรมการใช้ออกซิเจนในร่างกาย และจะว่ายน้ำสู่ผิวน้ำเพื่อรับออกซิเจน ปริมาณออกซิเจนที่ละลายต่ำลงส่งผลให้ปริมาณเม็ดเลือดรวม ความว่องไวของเอนไซม์ phenoloxidase ค่าความสามารถในการกำจัดเชื้อแบคทีเรียในน้ำเลือด และความสามารถของเม็ดเลือดในการกำจัดสิ่งแปลกปลอมลดลง ซึ่งสอดคล้องกับการศึกษา Sediman and Lawrence (1986) พบว่าที่ระดับออกซิเจนที่ละลายในน้ำต่ำกว่า 4 มิลลิกรัมต่อลิตร ส่งผลให้กุ้งกุลาดำ กุ้งแชบ๊วย และกุ้งขาวแวนนาไม (Martinez-Palacios *et al.*, 1996) มีอัตราการเจริญเติบโต และน้ำหนักตัวลดลง

4.1.3 อุณหภูมิของน้ำ เนื่องจากกุ้งเป็นสัตว์เลือดเย็น ดังนั้นอุณหภูมิของน้ำจะมีผลต่อระบบภูมิคุ้มกัน พบว่าในสภาวะที่อุณหภูมิต่ำ (25 องศาเซลเซียส) มีผลให้ปริมาณเม็ดเลือดรวม ความว่องไวของ phenoloxidase และความสามารถในการกำจัดเชื้อแบคทีเรียในน้ำเลือดลดลงกว่ากุ้งที่เลี้ยงในสภาวะที่อุณหภูมิสูง (30 องศาเซลเซียส) จากการศึกษาของ Yu (1993) เมื่ออุณหภูมิต่ำลง และมีการเลี้ยงกุ้งในอัตราความหนาแน่นที่สูง ส่งผลให้ค่าเฉลี่ยของเม็ดเลือดรวมจะลดลง ซึ่งทำให้กุ้งมีอัตราการหายใจและน้ำหนักตัวลดลง โดยกุ้งที่เลี้ยงในตู้ทดลองที่มีอุณหภูมิค่อนข้างต่ำ และมีการเปลี่ยนแปลงของอุณหภูมิในรอบวันมาก ส่งผลให้กุ้งเกิดความเครียดและมีผลต่อโปรตีนในซีรัมมากที่สุด

4.1.4 ความเค็มของน้ำ เนื่องจากความเค็มที่เปลี่ยนแปลงไปส่งผลต่อความเข้มข้นของแร่ธาตุในน้ำ โดยน้ำที่มีความเค็ม 25 พีพีที มีค่า osmolality ใกล้เคียงกับในตัวกุ้ง เนื่องจากกุ้งขาวแวนนาไมมีค่า isoosmotic point (IOP) เท่ากับน้ำความเค็ม 24.7 practical salinity unit (psu) จึงทำให้กุ้งขาวแวนนาไมที่เลี้ยงในน้ำที่มีความเค็ม 25 psu ไม่ต้องการปรับตัวให้เข้ากับสภาพแวดล้อม พลังงานและสารอาหารที่ได้รับมาจากอาหาร สามารถนำไปใช้ในการเจริญเติบโตได้อย่างเต็มที่ ซึ่งแตกต่างจากกุ้งที่เลี้ยงในน้ำความเค็มต่ำหรือสูงเกินไป กุ้งต้องนำพลังงานที่ได้มาใช้ในการปรับตัวเป็นส่วนใหญ่ ทำให้เหลือพลังงานที่ใช้ในการเจริญเติบโตมีน้อยลง

Vargas-Albores *et al.* (1998) รายงานว่ากุ้ง *Penaeus californiensis* ที่อาศัยอยู่ในน้ำที่อุณหภูมิและความเค็มน้ำสูงหรือต่ำกว่าปกติจะมีผลให้ความว่องไวของเอนไซม์ phenoloxidase และค่าโปรตีนในน้ำเลือดลดลง

กิจการ และคณะ (2543 ข) ได้ทำการศึกษาปัจจัยสิ่งแวดล้อมบางประการต่อองค์ประกอบเลือดและระบบภูมิคุ้มกันของกุ้งกุลาดำ พบว่าในสภาพที่พีเอชของน้ำต่ำกว่าค่าปกติ (6.0) ไม่มีผลต่อการเปลี่ยนแปลงปริมาณเม็ดเลือดรวม และความว่องไวของเอนไซม์ phenoloxidase แต่มีผลให้ความสามารถในการกำจัดเชื้อแบคทีเรียในน้ำเลือดลดลงแตกต่างจากชุดควบคุมที่พีเอชปกติ (7.8) จากการศึกษาผลของปริมาณออกซิเจนที่ละลายน้ำที่มีต่อระบบภูมิคุ้มกัน พบว่าในสภาวะที่ออกซิเจน ละลายน้ำต่ำ (0.9-1.2 มิลลิกรัมต่อลิตร) มีผลให้ปริมาณเม็ดเลือดรวมความว่องไวของเอนไซม์ phenoloxidase ค่าความสามารถในการกำจัดเชื้อแบคทีเรียใน น้ำเลือด และความสามารถของเม็ดเลือดในการกำจัดสิ่งแปลกปลอมลดลงเมื่อเทียบกับสภาวะที่มีออกซิเจน ละลายน้ำปกติ (5.0-5.8 มิลลิกรัมต่อลิตร) ส่วนผลของอุณหภูมิต่อระบบภูมิคุ้มกันพบว่าในสภาวะที่อุณหภูมิต่ำ (25 องศาเซลเซียส) มีผลให้ปริมาณเม็ดเลือดรวม ความว่องไวของเอนไซม์ phenoloxidase และความสามารถในการกำจัดเชื้อแบคทีเรียในน้ำเลือดต่ำกว่าชุดควบคุมที่เลี้ยงในสภาวะอุณหภูมิสูง

Martin and Graves (1985) ได้รายงานว่าที่อุณหภูมิต่ำส่งผลให้ปริมาณเม็ดเลือดลดลงและมีผลให้ค่าความว่องไวของเอนไซม์ phenoloxidase ต่ำลงด้วย

4.2 ชีวิตวิทยาบางประการของกุ้ง

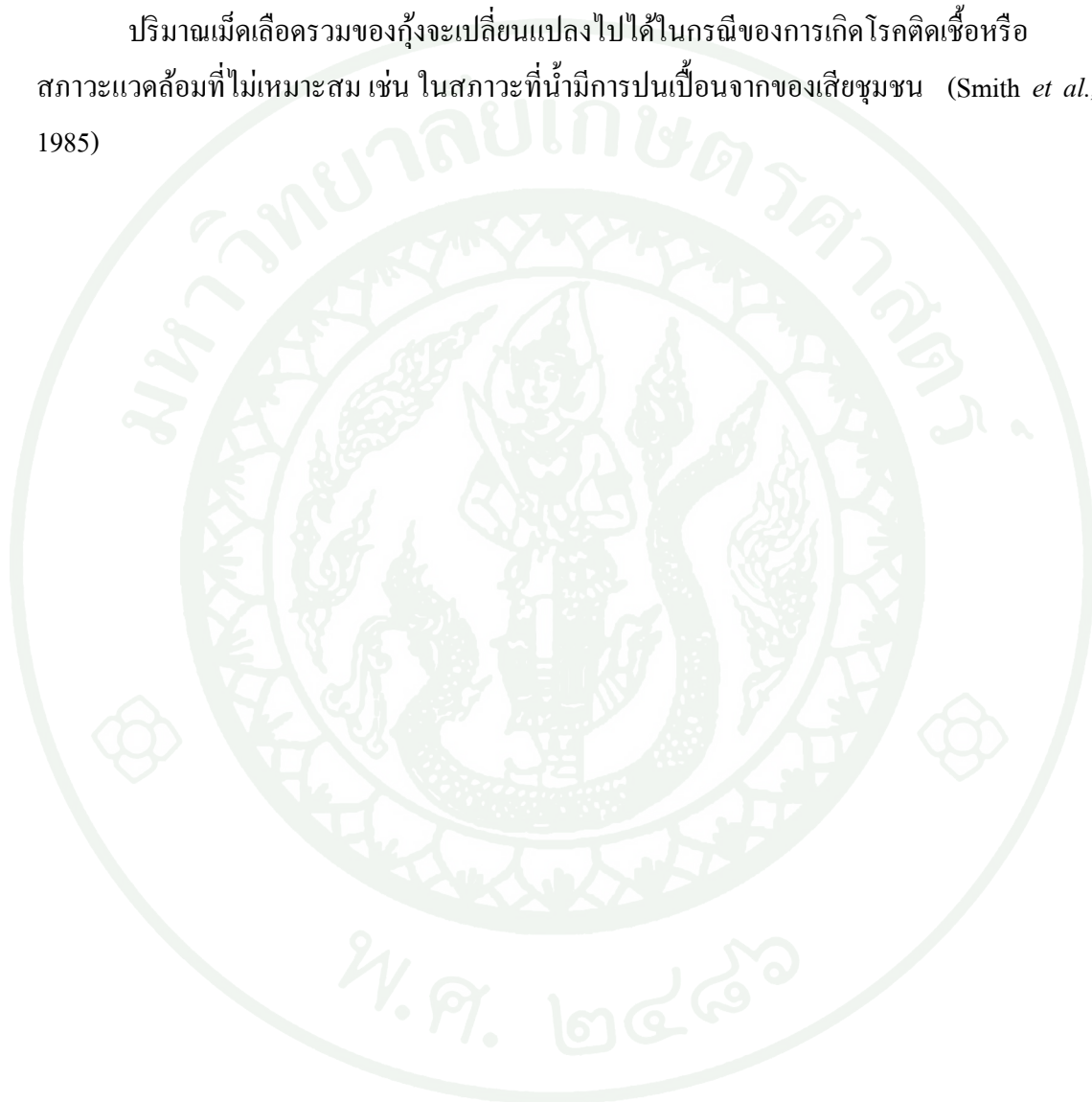
กุ้งมีช่วงระยะเวลาของการลอกคราบและระยะก่อนการลอกคราบ ซึ่งจะมีผลกระทบต่อการทำงานของระบบภูมิคุ้มกัน (Moullac *et al.*, 1998) กุ้งขาวแวนนาไมที่เลี้ยงในน้ำความเค็มต่ำหรือสูงเกินไปจะส่งผลกระทบต่อกระบวนการลอกคราบของกุ้ง เนื่องจากน้ำจากตัวกุ้งจะมีการแพร่ออกและน้ำจากภายนอกจะมีการแพร่เข้าสู่ร่างกาย โดยกุ้งเมื่อเข้าสู่ระยะลอกคราบตัวกุ้งจะดึงน้ำเข้าสู่ร่างกายเพื่อให้ร่างกายขยายตัวและลอกคราบออกจากเดิม เมื่อลอกคราบเสร็จตัวกุ้งจะมีการดึงแร่ธาตุกลับเข้าสู่ร่างกาย โดยเฉพาะแร่ธาตุแคลเซียม เพื่อใช้ในการกระบวนการสร้างเปลือกส่งผลให้กุ้งที่เลี้ยงในน้ำความเค็มต่ำแร่ธาตุในน้ำมีไม่เพียงพอในการสร้างเปลือกร่วมกับ มีน้ำแพร่เข้าสู่ตัวกุ้งตลอดเวลา ส่งผลให้กุ้งอ่อนแอและตายขณะที่เปลือกยังนิ่มอยู่ และเมื่อเลี้ยงกุ้งในน้ำที่ความเค็มสูงทำให้ น้ำในร่างกายกุ้งมีการแพร่ออกตลอดเวลาแม้จะอยู่ในระยะก่อนลอกคราบซึ่งกุ้งจะต้องใช้พลังงาน มากในการดึงน้ำเข้าสู่ร่างกาย ส่งผลให้กุ้งลอกคราบไม่ได้และตายในที่สุดและ Sentos and Nary (1987) ได้ทำการศึกษาในปู *Chasmagnathus granulata* ที่อาศัยบริเวณปากแม่น้ำ พบว่าความเค็ม ของน้ำส่งผลให้น้ำตาลในเลือดลดลงอย่างรวดเร็วเมื่อเปลี่ยนจากน้ำทะเลความเค็ม 30 พีพีที ไปเป็นน้ำจืด

กิจการ และคณะ (2543 ค) ได้ทำการศึกษาองค์ประกอบและระบบภูมิคุ้มกันในเลือดกุ้งกุลาดำโดยแยกตามเพศ น้ำหนักและวงจรการลอกคราบ พบว่าปริมาณเม็ดเลือดรวมสูงในระยะก่อนลอกคราบ (premolt, D-stage) และมีค่าต่ำสุดหลังลอกคราบ (postmolt; A, B-stage) เอนไซม์ phenoloxidase มีค่าสูงสุดในระยะระหว่างลอกคราบปกติ (intermolt, C-stage) ลดลงในระยะก่อนลอกคราบและมีค่าต่ำสุดหลังลอกคราบ พบว่าปริมาณเม็ดเลือดรวมและปริมาณเอนไซม์ phenoloxidase และปริมาณน้ำตาลในเลือดไม่ขึ้นไม่ขึ้นกับเพศและขนาดของกุ้ง ส่วนระยะการลอกคราบของกุ้งจะมีผลต่อปริมาณเม็ดเลือดในระบบไหลเวียน โดยกุ้งที่อยู่ในระยะก่อนลอกคราบ ปริมาณเม็ดเลือดในระบบไหลเวียนสูงกว่ากุ้งในระยะที่คราบแข็งแรง และระยะหลังลอกคราบ กุ้งที่อยู่ในระยะหลังลอกคราบมีระบบภูมิคุ้มกันลดต่ำลง ส่งผลให้กุ้งเกิดการติดเชื้อได้มากกว่าระยะอื่นๆ

Le *et al.* (1997) ได้ทำการศึกษาปริมาณเม็ดเลือดรวมเฉลี่ยของกุ้ง *Penaeus stylirostris* ในระยะคราบแข็งจะต่ำกว่าระยะก่อนลอกคราบ และความว่องไวของเอนไซม์ phenoloxidase จะมีค่าลดลงในระหว่างการลอกคราบและมีค่าสูงขึ้นในระยะที่คราบแข็งแรงดี

Yu (1993) ได้ทำการศึกษาปริมาณเม็ดเลือดรวมเฉลี่ยของกุ้ง *Penaeus japonicus* ปกติมีค่าต่ำสุดในระยะคราบแข็งและจะมีค่าสูงสุดในระยะก่อนลอกคราบและปริมาณเม็ดเลือดรวมจะลดลงเมื่ออุณหภูมิต่ำลงและในสภาวะของการเลี้ยงที่หนาแน่นสูง

ปริมาณเม็ดเลือดรวมของกุ้งจะเปลี่ยนแปลงไปได้ในกรณีของการเกิดโรคติดเชื้อหรือสภาวะแวดล้อมที่ไม่เหมาะสม เช่น ในสภาวะที่น้ำมีการปนเปื้อนจากของเสียชุมชน (Smith *et al.*, 1985)



อุปกรณ์และวิธีการ

1. การศึกษาผลของความเค็มต่อความเป็นพิษแบบเฉียบพลันของสารไอโซยูจินอลต่อกุ้งขาวแวนนาไมระยะโพสลาร์วา

ดำเนินการทดลองเพื่อหาความเป็นพิษของสารไอโซยูจินอล ที่ทำให้สัตว์ทดลองตาย 50 เปอร์เซ็นต์ (median lethal concentration, LC_{50}) ภายในเวลา 24 และ 48 ชั่วโมง โดยวิธีชีววิเคราะห์แบบน้ำนิ่ง (static bioassay)

1. การเตรียมการทดลอง

1.1 กุ้งขาวแวนนาไม ระยะโพสลาร์วา 8-10 (พี 8-10)

1.2 การเตรียมสารเคมี สารเคมีที่ใช้ในการทดลอง คือ สารไอโซยูจินอล (ในรูปแบบของผลิตภัณฑ์ Aqui-S™ ที่มีปริมาณสารไอโซยูจินอล 50 เปอร์เซ็นต์ จากบริษัท Bayer Thai Co., Ltd. ประเทศไทย) เตรียมสารละลายไอโซยูจินอลเข้มข้น (stock solution) 500 มิลลิกรัมต่อลิตร โดยใช้ปิเปตดูดสาร 1 มิลลิลิตร ละลายในน้ำปริมาตร 1,000 มิลลิลิตร ที่ระดับความเค็ม 5, 15 และ 25 พีเอสยู

1.3 ภาชนะทดลอง ใช้โหลแก้วทรงกระบอกขนาด 8x12 นิ้ว บรรจุน้ำเค็ม ความเค็ม 5, 15 และ 25 พีเอสยู ปริมาตร 3 ลิตร สำหรับกุ้งขาวแวนนาไมระยะโพสลาร์วา

1.4 การเตรียมน้ำทดลอง น้ำสำหรับทดลองใช้น้ำทะเลที่มีความเค็ม 100-150 พีเอสยู จากนาเกลือมาเจือจางกับน้ำจืดให้ได้ความเค็มของน้ำที่ต้องการคือ 5, 15 และ 25 พีเอสยู ในถังไฟเบอร์กลาส 400 ลิตร เติมอากาศในน้ำตลอดเวลาเพื่อให้ น้ำเค็มผสมกับน้ำจืดอย่างทั่วถึง วัดค่าระดับความเค็มของน้ำโดยใช้ salinometer

2. การดำเนินการทดลอง

การทดลองประกอบด้วย 2 ขั้นตอน ดังนี้

2.1 การทดลองขั้นต้น (preliminary test) เป็นการทดลองเพื่อหาระดับความเข้มข้นช่วงกว้างๆ คือ ระดับความเข้มข้นต่ำสุดของสาร ไอโซยูจินอล ที่ทำให้กุ้งขาวแวนนาไมระยะโพสลาร์วา (พี 8-10) ตาย 100 เปอร์เซ็นต์ และความเข้มข้นสูงสุดที่กุ้งขาวแวนนาไมรอด 100 เปอร์เซ็นต์ ทำการทดลองโดยเติมสาร ไอโซยูจินอล ในความเข้มข้นต่างๆ ลงในโหลแก้วก่อนที่จะนำกุ้งขาวแวนนาไมระยะโพสลาร์วาใส่ลงโหลๆ ละ 20 ตัว นำค่าความเข้มข้นที่ได้จากการทดลองขั้นต้นนี้ไปใช้ในการจัดระดับความเข้มข้นในการทดลองอย่างละเอียดต่อไป

2.2 การทดลองอย่างละเอียด (full scale test) เป็นการทดลองระดับความเข้มข้นของสาร ไอโซยูจินอล ที่ใช้ในการทดลอง ซึ่งอยู่ในช่วงที่สัตว์ทดลองตาย 100 เปอร์เซ็นต์ และมีชีวิตรอด 100 เปอร์เซ็นต์ โดยแบ่งความเข้มข้นเป็น 6 ระดับตามมาตราส่วนลอการิทึม พร้อมกับมีกลุ่มควบคุมเพื่อใช้ในการเปรียบเทียบ แต่ละระดับความเข้มข้นใช้กุ้งขาวแวนนาไมระยะโพสลาร์วา 20 ตัว (3 ซ้ำ/ความเข้มข้น) สังเกตลักษณะอาการและบันทึกจำนวนกุ้งขาวแวนนาไมระยะโพสลาร์วาที่ตายในเวลา 24 และ 48 ชั่วโมง โดยใช้เกณฑ์การตัดสินว่า กุ้งขาวแวนนาไมระยะโพสลาร์วาไม่มีการเคลื่อนไหวและไม่แสดงอาการตอบสนองเมื่อใช้แท่งแก้วจี้ที่ตัวกุ้ง กุ้งที่ตายจะถูกนำออกจากโหลทดลองทันทีที่สังเกตเห็น เปอร์เซ็นต์การตายสะสมของกุ้งขาวแวนนาไมระยะโพสลาร์วาในแต่ละระดับความเข้มข้นตลอดการทดลองจะนำไปคำนวณหาค่าความเข้มข้นที่ทำให้กุ้งขาวแวนนาไมระยะโพสลาร์วา ตาย 50 เปอร์เซ็นต์ ในเวลา 48 ชั่วโมง ตามวิธีของ Finney (1971)

2.3 การศึกษาคุณสมบัติของน้ำ ระหว่างการทดลองใช้วิธี การวิเคราะห์ของ APHA *et al.* (1995) โดยวิเคราะห์ค่าออกซิเจนที่ละลายในน้ำ พีเอช ความกระด้าง ความเป็นด่าง แอมโมเนียรวม และไนไตรท์ในเวลาก่อนการทดลอง และหลังการทดลอง 48 ชั่วโมง เพื่อศึกษาการเปลี่ยนแปลงคุณสมบัติของน้ำที่อาจเกิดขึ้นจากสาร ไอโซยูจินอล

2. การศึกษาปริมาณของสารไอโซยูจินอลที่เหมาะสมเพื่อใช้ในการสลบกุ้งขาวแวนนาไม

2.1 นำกุ้งขาวแวนนาไมขนาด 15-20 กรัม จากฟาร์มเลี้ยงกุ้ง จ. จันทบุรีมาปรับสภาพก่อนเริ่มการทดลองเป็นระยะเวลา 3 วันโดยปรับสภาพในถังไฟเบอร์กลาสขนาดความจุ 5,000 ลิตร ที่มีความเค็มของน้ำที่ใช้ในการทดลอง 25 พีเอสยู ในระหว่างที่ทำการปรับสภาพมีการให้อาหารสำเร็จรูปสำหรับกุ้งขาวแวนนาไมวันละ 3 เวลาและติดตั้งเครื่องให้อากาศอย่างเพียงพอ

2.2 การเตรียมสารเคมี สารเคมีที่ใช้ในการทดลอง คือ สารไอโซยูจินอล (ในรูปแบบของผลิตภัณฑ์ Aqui-S™ ที่มีปริมาณสารไอโซยูจินอล 50 เปอร์เซ็นต์ จากบริษัท Bayer Thai Co., Ltd. ประเทศไทย) เตรียมสารละลายไอโซยูจินอลเข้มข้น (stock solution) 500 มิลลิกรัมต่อลิตร โดยใช้ปิเปตดูดสาร 1 มิลลิลิตร ละลายในน้ำปริมาตร 1,000 มิลลิลิตร ที่ระดับความเค็ม 25 พีเอสยู

2.3 นำกุ้งขนาด 15-20 กรัมใส่ในตู้กระจกตู้ละ 5 ตัวโดยเตรียมความเข้มข้นละ 6 ชั่วโมง ภายในตู้มีปริมาตรน้ำ 40 ลิตร ความเค็ม 25 พีเอสยู

2.4 สลบกุ้งโดยใช้สารไอโซยูจินอลที่ความเข้มข้นต่างๆ จำนวน 40 ความเข้มข้นได้แก่ 2.5, 5.0, 7.5, 10.0, 12.5, 15.0, 17.5, 20.0, 22.5, 25.0, 27.5, 30.0, 32.5, 35.0, 37.5, 40.0, 42.5, 45.0, 47.5, 50.0, 52.5, 55.0, 57.5, 60.0, 62.5, 65.0, 67.5, 70.0, 72.5, 75.0, 77.5, 80.0, 82.5, 85.0, 87.5, 90.0, 92.5, 95.0, 97.5 และ 100.0 พีพีเอ็ม

2.5 เมื่อครบ 2 นาที่ นับปริมาณกุ้งที่สลบในแต่ละความเข้มข้น โดยพิจารณาจากการสลบถึงระยะที่ 3 จดบันทึกผลความเข้มข้นที่ทำให้กุ้งสลบถึงระยะที่ 3

2.6 นำกุ้งขนาด 15-20 กรัมใส่ในตู้กระจกตู้ละ 5 ตัวโดยเตรียมความเข้มข้นละ 6 ชั่วโมง ภายในตู้มีปริมาตรน้ำ 40 ลิตร ความเค็ม 25 พีเอสยู

2.7 สลบกุ้งโดยใช้สารไอโซยูจินอลที่ความเข้มข้นต่างๆ จำนวน 40 ความเข้มข้นได้แก่ 2.5, 5.0, 7.5, 10.0, 12.5, 15.0, 17.5, 20.0, 22.5, 25.0, 27.5, 30.0, 32.5, 35.0, 37.5, 40.0, 42.5, 45.0, 47.5, 50.0, 52.5, 55.0, 57.5, 60.0, 62.5, 65.0, 67.5, 70.0, 72.5, 75.0, 77.5, 80.0, 82.5, 85.0, 87.5, 90.0, 92.5, 95.0, 97.5 และ 100.0 พีพีเอ็ม

2.8 เมื่อครบ 10 นาที นับปริมาณกึ่งที่สลับในแต่ละความเข้มข้น โดยพิจารณาจากการสลับถึงระยะที่ 3 จดบันทึกผลความเข้มข้นที่ทำให้กึ่งสลับถึงระยะที่ 3

3. การศึกษาหาระยะเวลาฟื้นของกึ่งขาวแว่นาไมหลังจากการสลับ

3.1 การเตรียมสัตว์ทดลองในการทดลองที่ 3 ใช้วิธีการเตรียมเช่นเดียวกับการเตรียมสัตว์ทดลองที่อธิบายในการทดลองที่ 2

3.2 การเตรียมสารเคมีในการทดลองที่ 3 ใช้วิธีการเตรียมเช่นเดียวกับกับการเตรียมสารเคมีที่อธิบายในการทดลองที่ 2

3.3 ผสมสารไอโซยูจินอลความเข้มข้นที่ทำให้กึ่งสลับในระยะเวลา 2 นาที (จากการทดลองที่ 2) ในตู้กระจกตู้ละ 5 ตัวโดยเตรียมความเข้มข้นละ 6 ซ้ำ ซึ่งภายในตู้มีปริมาตรน้ำ 40 ลิตร ความเค็ม 25 พีเอสยู

3.4 แช่วกึ่งในสารไอโซยูจินอล เป็นเวลา 2, 5, 10, 15 นาที พอลบระยะเวลาที่กำหนดนำกึ่งใส่น้ำเค็มที่สะอาด จับระยะเวลาที่กึ่งเริ่มฟื้น บันทึกรายละเอียด

3.5 ผสมสารไอโซยูจินอลความเข้มข้นที่ทำให้กึ่งสลับในระยะเวลา 10 นาที (จากการทดลองที่ 2) ในตู้กระจกตู้ละ 5 ตัวโดยเตรียมความเข้มข้นละ 6 ซ้ำ ซึ่งภายในตู้มีปริมาตรน้ำ 40 ลิตร ความเค็ม 25 พีเอสยู

3.6 แช่วกึ่งในสารไอโซยูจินอล เป็นเวลา 10, 15, 20 นาที พอลบระยะเวลาที่กำหนดนำกึ่งใส่น้ำเค็มที่สะอาด จับระยะเวลาที่กึ่งเริ่มฟื้น บันทึกรายละเอียด

4. การศึกษาหาอัตราการเสื่อมของสารไอโซยูจินอล

4.1 การเตรียมสัตว์ทดลองในการทดลองที่ 4 ใช้วิธีการเตรียมเช่นเดียวกับการเตรียมสัตว์ทดลองที่อธิบายในการทดลองที่ 2

4.2 การเตรียมสารเคมีในการทดลองที่ 4 ใช้วิธีการเตรียมเช่นเดียวกับกับการเตรียมสารเคมีที่อธิบายในการทดลองที่ 2

4.3 เมื่อได้ระดับความเข้มข้นของสารไอโซยูจินอลที่ทำให้กึ่งสลับ 2 นาติ (จากการทดลองที่ 2) นำความเข้มข้นดังกล่าวมาหารระยะเวลาการเสื่อมของสารโดยผสมสารไอโซยูจินอลในตู้กระจก ตั้งทิ้งไว้ระยะเวลาต่างๆ ได้แก่ 3, 6, 12, 24 และ 48 ชั่วโมง

4.4 เมื่อครบระยะเวลาที่กำหนดระยะเวลาตามเวลาที่ได้กล่าวในข้อ 4.3 นำกึ่งจำนวน 10 ตัว/ซ้ำ จำนวน 5 ซ้ำ มาทำการสลับในตู้กระจกที่ตั้งสารไอโซยูจินอล จับเวลาที่กึ่งใช้ในการสลับ

5. การศึกษาหาอัตราค่าเสื่อมของสารไอโซยูจินอลในการใช้สารซ้ำ

5.1 เตรียมตู้กระจกใส่น้ำปริมาตร 40 ลิตร ความเค็ม 25 พีเอสยู ผสมสารไอโซยูจินอลความเข้มข้นที่ทำให้กึ่งสลับเป็นระยะเวลา 2 นาติ (จากการทดลองที่ 2)

5.2 นำกึ่งใส่ตู้ครั้งละ 10 ตัว/ซ้ำ จำนวน 3 ซ้ำ เมื่อครบ 2 นาติ นำไปใส่ในน้ำเค็มสะอาดจับระยะเวลาพักฟื้น

5.3 ทำเช่นเดียวกับวิธีข้างต้น โดยใส่กึ่งทดลองชุดใหม่แต่ใช้สารที่เตรียมไว้ในตู้กระจกเดิมเพื่อศึกษาว่าสารไอโซยูจินอลที่ผสมไว้สามารถนำกลับมาใช้ซ้ำได้กี่ครั้งหรือจะสามารถทำให้กึ่งสลับต้องใช้เวลานานเพิ่มขึ้นในการที่จะสลับกึ่งในครั้งต่อไป

6. การศึกษาการตอบสนองทางภูมิคุ้มกันแบบไม่จำเพาะของกึ่งขาวแวนนาไมที่ได้รับสารไอโซยูจินอลและระยะเวลาพื้นที่ 0, 6, 12, 24 และ 48 ชั่วโมง

การทดลองนี้เป็นการศึกษาการตอบสนองทางภูมิคุ้มกันแบบไม่จำเพาะของกึ่งขาวแวนนาไม เมื่อขนย้ายกึ่งขาวจากถังเลี้ยงไปยังตู้กระจก ซึ่งเป็นการทดสอบประสิทธิภาพของยาสลับในการเคลื่อนย้ายกึ่งช่วงสั้น เพื่อประโยชน์ในการชั่งน้ำหนัก หรือการ handling โดยเปรียบเทียบกึ่งที่ขนย้ายโดยใช้ยาสลับ และกึ่งกลุ่มควบคุมซึ่งขนย้ายโดยวิธีปกติ

6.1 นำกุ้งขาวแวนนาไมขนาด 15-20 กรัม จากฟาร์มเลี้ยงกุ้งเอกชน มาปรับสภาพก่อนเริ่มการทดลองเป็นระยะเวลา 3 วัน โดยปรับสภาพในถังไฟเบอร์กลาสขนาดความจุ 5,000 ลิตร ที่มีความเค็ม 25 พีเอสยู ซึ่งในระหว่างที่ทำการปรับสภาพมีการให้อาหารสำเร็จรูปสำหรับกุ้งขาวแวนนาไมวันละ 3 เวลา และติดตั้งเครื่องให้อากาศอย่างเพียงพอ

6.2 สุ่มกุ้งจากถังไฟเบอร์กลาสจำนวน 450 ตัว มาเลี้ยงในถังไฟเบอร์กลาสขนาด 500 ลิตร โดยแบ่งเป็น 3 ชุดการทดลอง ชุดการทดลองละ 5 ถัง ถังละ 30 ตัว ได้แก่

ชุดการทดลองที่ 1 กุ้งชุดควบคุม เป็นกุ้งกลุ่มปกติที่ยังไม่มีการเคลื่อนย้าย และไม่ได้รับสารไอโซยูจินอล

ชุดการทดลองที่ 2 กุ้งกลุ่มการทดลองที่ได้รับสารไอโซยูจินอลก่อนการขนย้าย

ชุดการทดลองที่ 3 กุ้งกลุ่มการทดลองที่ไม่ได้รับสารไอโซยูจินอลก่อนการขนย้าย

ปรับสภาพก่อนเริ่มการทดลองเป็นระยะเวลา 3 วัน โดยปรับสภาพในถังไฟเบอร์กลาสขนาด 500 ลิตร ที่มีความเค็ม 25 พีเอสยู ซึ่งในระหว่างที่ทำการปรับสภาพมีการให้อาหารสำเร็จรูปสำหรับกุ้งขาวแวนนาไมวันละ 3 เวลา และติดตั้งเครื่องให้อากาศอย่างเพียงพอ

6.3 เมื่อเริ่มการทดลองทำการคัดเลือกกุ้งจากชุดการทดลองที่ 1 (ชุดควบคุม) เป็นกุ้งปกติหรือก่อนเริ่มการทดลอง

6.4 ทำการให้ยาสลบระดับความเข้มข้นที่ทำให้กุ้งสลบภายใน 2 นาที (จากการทดลองที่ 2) ในกุ้งชุดการทดลองที่ 2 สำหรับกุ้งในชุดการทดลองที่ 3 ไม่ได้ให้ยาสลบ

6.5 นำกุ้งชุดการทดลองที่ 2 หลังจากใส่ยาสลบและชุดการทดลองที่ 3 ขนย้ายกุ้งใส่ในตู้กระจกที่มีน้ำเค็มสะอาดบรรจุอยู่ โดยชุดการทดลองละ 15 ตู้ แต่ละตู้ใส่กุ้งจำนวน 10 ตัว

6.6 ทำการศึกษาระดับภูมิคุ้มกันในกุ้งจากแต่ละถังที่ระยะเวลา 0, 6, 12, 24 และ 48 ชั่วโมง

6.7 โดยเจาะเลือดจากแอ่งเลือด (ventral sinus) ปริมาณ 0.5 มิลลิลิตร ด้วยเข็มฉีดยาซึ่งภายในบรรจุสารป้องกันการเลือดแข็งตัว (anticoagulant) อัตราส่วนเลือดต่อสารป้องกัน เลือดแข็งตัว

เท่ากับ 1:2 นำเลือดที่ได้ไปวิเคราะห์ปริมาณของเม็ดเลือดรวม กิจกรรมของกระบวนการกลืนกินสิ่งแปลกปลอมของเม็ดเลือดกึ่ง กิจกรรมการทำลายแบคทีเรียของน้ำเลือด กิจกรรมของเอนไซม์ phenoloxidase (phenoloxidase activating system) และการผลิต superoxide dismutase

วิเคราะห์ความแตกต่างทางสถิติโดยวิธี T-test ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์ ด้วยโปรแกรมสำเร็จรูปทางสถิติ (อนันต์ชัย, 2542)

ขั้นตอนการวิเคราะห์ระบบภูมิคุ้มกันในแต่ละพารามิเตอร์ มีรายละเอียดดังนี้

1. การตรวจนับปริมาณเม็ดเลือดรวมของกึ่ง

1.1 คูดเลือดจากแอ่งเลือด โดยในหลอดนิตยาบรรจุสารป้องกันการแข็งตัวของเลือดในอัตราส่วน 2:1 นำเลือดใส่ในหลอดขนาด 1.5 มิลลิลิตร ที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว ใส่ลงในน้ำแข็งเพื่อให้เกิดปฏิกิริยาการแข็งตัวของเลือดช้าลง

1.2 ใช้ micropipette คูดเลือดกึ่งปริมาตร 20 ไมโครลิตร เพื่อนำไปนับจำนวนเซลล์โดยใช้ hemocytometer

1.3 คำนวณปริมาณเม็ดเลือดเป็นจำนวนเซลล์ต่อลูกบาศก์มิลลิเมตร โดยหาค่าได้จาก

$$\begin{aligned}\text{ปริมาตรของ Hemocytometer} &= \text{กว้าง} \times \text{ยาว} \times \text{สูง} \\ &= 1 \text{ มิลลิเมตร} \times 1 \text{ มิลลิเมตร} \times 0.1 \text{ มิลลิเมตร} \\ &= 0.1 \text{ ลูกบาศก์มิลลิเมตร}\end{aligned}$$

$$\text{จำนวนเซลล์เม็ดเลือดต่อลูกบาศก์มิลลิเมตร} = \text{เซลล์เม็ดเลือดที่นับได้}$$

$$\text{จำนวนเซลล์เม็ดเลือดต่อลูกบาศก์มิลลิเมตร} = \text{เซลล์เม็ดเลือดที่นับได้} \times 10^4 \times \text{ค่า dilution}$$

2. กิจกรรมการทำลายแบคทีเรียของน้ำเลือดกุ้ง ตามวิธีของกิจการ และคณะ (2543 จ)

2.1 เตรียมเชื้อแบคทีเรีย *V. harveyi* บริสุทธิ์ โดยนำมาเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อ TSA (Tryptic Soy Agar) บ่มเป็นเวลา 24 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส (เนื่องจากเชื้อที่อยู่บนอาหารเลี้ยงเชื้อ TSA สามารถนำไปละลายในน้ำเกลือได้ง่ายกว่าเชื้อที่เลี้ยงบนอาหาร TCBS จึงนิยมใช้เลี้ยงบนอาหารเลี้ยงเชื้อ TSA)

2.2 เตรียมสารละลายเชื้อ *V. harveyi* โดยนำเชื้อที่เป็นโคโลนีเดี่ยว ละลายในน้ำเกลือปลอดเชื้อที่ความเข้มข้น 1.5 เปอร์เซ็นต์ โดยเตรียมน้ำเกลือประมาณ 10 มิลลิลิตร (หรือมากจนเกินพอสำหรับการทดลองครั้งนั้นๆ) จากนั้นนำสารละลายเชื้อที่ได้ไปวัดค่าดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 640 นาโนเมตร ให้ได้ค่า OD ประมาณ 0.08-0.1 บันทึกค่า OD ที่เลือกใช้

2.3 เจาะเลือดกุ้งจากแอ่งเลือด โดยใช้สารป้องกันการแข็งตัวของเลือด ในอัตราส่วน 1:1 โดยดูดเลือดกุ้ง 1 มิลลิลิตร ในหลอดฉีดยาที่มีสารป้องกันการแข็งตัวของเลือดปริมาณ 1 มิลลิลิตร

2.4 นำมาแยกซีรัมออกจากเม็ดเลือดกุ้งโดยนำมาหมุนเหวี่ยงด้วยเครื่อง centrifuge ที่ความเร็วรอบ 1,000 rpm นาน 10 นาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส นำส่วนใสด้านบนมาใช้

2.5 นำซีรัมมาเจือจางโดยใช้สารละลายโซเดียมคลอไรด์ 2.6 เปอร์เซ็นต์ เป็นตัวเจือจางในอัตราส่วน 1:2 1:4 1:8 1:16 และ 1:32 โดยปรับปริมาตรในการเจือจางให้ได้หลอดละ 0.5 มิลลิลิตร

2.6 นำสารละลายเชื้อแบคทีเรียที่เตรียมไว้ มาเติมในหลอดทดลองที่เจือจางซีรัม ในแต่ละความเข้มข้นไว้แล้ว เติมสารละลายเชื้อแบคทีเรียปริมาณ 0.1 มิลลิลิตร และบ่มที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 3 ชั่วโมง

2.7 นำส่วนผสมแต่ละหลอดมานับปริมาณเชื้อแบคทีเรีย ทำการเจือจางส่วนผสมแต่ละหลอด โดยใช้ น้ำเกลือปลอดเชื้อที่ความเข้มข้น 1.5 เปอร์เซ็นต์ ใช้วิธี spread plate ในอาหารเลี้ยงเชื้อ TCBS agar จดบันทึกค่าของการเจือจางซีรัมที่สามารถลดปริมาณเชื้อแบคทีเรียลงได้ 50 เปอร์เซ็นต์ ในระยะเวลา 3 ชั่วโมง โดยเปรียบเทียบกับชุดควบคุมที่ใช้สารละลายโซเดียมคลอไรด์ 2.6 เปอร์เซ็นต์ ปริมาณ 0.5 มิลลิลิตร รวมกับสารละลายแบคทีเรีย 0.1 มิลลิลิตร

3. การศึกษากระบวนการกลืนกินสิ่งแปลกปลอมเม็ดเลือดกึ่ง ตามวิธีของ Itami *et al.* (1994)

3.1 เจาะเลือดจากแอ่งเลือด โดยใช้สารป้องกันการแข็งตัวของเลือด ในอัตราส่วน (เลือดกึ่ง:anticoagulant) 1:2 โดยดูดเลือดกึ่ง 0.5 มิลลิลิตร ในหลอดฉีดยาที่มีสารป้องกันการแข็งตัวของเลือดปริมาณ 1 มิลลิลิตร

3.2 หมุนเหวี่ยงที่ความเร็ว 1,000 rpm เป็นเวลา 10 นาที อุณหภูมิที่ 5 องศาเซลเซียส เพื่อแยกเซลล์เม็ดเลือดกึ่ง โดยนำส่วนใสด้านบนทิ้ง ทำการล้างตะกอนเม็ดเลือด โดยเติม shrimp saline 2-3 มิลลิลิตร โดยใช้ pipette ดูดขึ้นลงเบาๆ เพื่อให้สารละลายเข้ากัน

3.3 หมุนเหวี่ยงที่ความเร็ว 1,000 rpm เป็นเวลา 10 นาที โดยมีการควบคุมอุณหภูมิที่ 4 องศาเซลเซียส โดยทำเช่นนี้ 2 ครั้ง

3.4 ละลายตะกอนเม็ดเลือดใน shrimp saline 1 มิลลิลิตร และใช้ pipette ดูดขึ้นลงเบาๆ เพื่อให้สารละลายเข้ากัน

3.5 นำสารละลายที่ได้ผสมกับ trypan blue ในอัตราส่วน 1:1 โดยใช้ trypan blue 50 ไมโครลิตรและสารละลายเม็ดเลือด 50 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากัน นำมา 50 ไมโครลิตร นับจำนวนเม็ดเลือดกึ่งใน hemocytometer แล้วนำมาคำนวณให้ได้เซลล์ประมาณ 1×10^5 เซลล์ต่อมิลลิลิตร

3.6 นำสารละลายเซลล์เม็ดเลือดปริมาตร 200 ไมโครลิตร เลี้ยงบน cover glass โดย spread ทิ้งไว้ 20 นาที

3.7 ล้างด้วย shrimp saline 3 ครั้ง ครั้งละ 5 นาที

3.8 หยอดสารละลาย heat- killed yeast 2 มิลลิลิตร ทิ้งไว้เป็นเวลา 2 ชั่วโมง

3.9 ล้างด้วย shrimp saline 5 ครั้ง

3.10 หยอดน้ำยา fixative 1 มิลลิลิตร ทิ้งไว้ 10 นาที

3.11 ล้างด้วยน้ำกลั่น 3 ครั้ง ทิ้งให้แห้ง 20- 60 นาที

3.12 ย้อมด้วยสี Giemsa stain 5 นาที

3.13 ล้างด้วยน้ำกลั่น 3 ครั้ง ตั้งทิ้งให้แห้งข้ามคืน

3.14 ปิดสไลด์ด้วย permount

นำข้อมูลไปวิเคราะห์ โดยการนับจำนวนเซลล์ โดยสุ่มนับจำนวนเซลล์เม็ดเลือดทั้งหมด 200 เซลล์ ในแต่ละ cover glass นับเซลล์เม็ดเลือดที่กินยีสต์ และไม่กินยีสต์เข้าไป คำนวณค่าได้จาก

$$\text{ร้อยละของเม็ดเลือดกึ่งที่เกิดกระบวนการกลืนกินสิ่งแปลกปลอม (\% phagocytosis)} = \frac{\text{จำนวนเซลล์เม็ดเลือดที่กินเซลล์ยีสต์เข้าไป}}{\text{จำนวนเซลล์เม็ดเลือดทั้งหมด}} \times 100$$

4. กิจกรรมของเอนไซม์ phenoloxidase

การเก็บตัวอย่างเลือดกึ่งและการเตรียม hemocyte lysate (HLS) ตามวิธีของกิจการ และคณะ (2543 จ)

4.1 เก็บตัวอย่างเลือดจากกึ่งแต่ละตัว โดยเจาะเลือดจากบริเวณแอ่งเลือด ประมาณ 0.5 มิลลิลิตรผสมกับสารละลาย K-199 พีเอช 7.4 ที่เติม L-cystein 5 เปอร์เซ็นต์ เป็นสารป้องกันเลือดแข็งตัวจนได้ปริมาณครบ 1 มิลลิลิตร

4.2 หมุนเหวี่ยงที่ความเร็ว 6,500 rpm เป็นเวลา 2 นาที อุณหภูมิที่ 4 องศาเซลเซียส

4.3 นำส่วนใสด้านบนทิ้ง นำส่วนตะกอนเม็ดเลือดที่ได้นำมาล้างในสารละลาย K -199 และละลายในสารละลาย cacodylate buffer พีเอช 7.4

4.4 ทำให้ส่วนของเซลล์เม็ดเลือดแตก โดยใช้ Sonicator : vibracell ที่แอมพลิจูด 30 เป็นเวลา 5 วินาที

4.5 นำสารละลายที่ได้มาหมุนเหวี่ยงให้ตกตะกอน ที่ 10,000 rpm เป็นเวลา 10 นาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

4.6 แยกส่วนใสด้านบนออก ซึ่งเป็น hemocyte lysate (HLS) เก็บไว้ใช้ในขั้นตอนต่อไป

การวิเคราะห์ความว่องไวของเอนไซม์ phenoloxidase คัดแปลงจากวิธีการของ Söderhall and Hall (1984)

1. นำ HLS ที่เตรียมได้ 200 ไมโครลิตร ผสมรวมกับสารละลายทริปซิน (0.1 เปอร์เซ็นต์ ใน cacodylate buffer) 200 ไมโครลิตร ทิ้งให้เกิดปฏิกิริยาประมาณ 2 นาที ที่อุณหภูมิห้อง (28 องศาเซลเซียส)

2. เติมสารละลาย L-dihydroxyphenylalanine (L-DOPA 4 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร) 200 ไมโครลิตร และทิ้งให้เกิดปฏิกิริยาที่อุณหภูมิห้อง

3. นำมาวัดค่าดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 490 นาโนเมตร ทุกๆ 2 นาที โดยเปรียบเทียบกับสารละลายควบคุม (blank) ซึ่งใช้น้ำกลั่นผสมกับสารละลายป้องกันเลือดแข็งตัว สารละลาย K-199 พีเอช 7.4 ที่เติม L-cystein 5 เปอร์เซ็นต์ ผสมกับทริปซิน L-dihydroxyphenylalanine และ cacodylate buffer แทนการใช้ HLS ทำการวัดค่า OD จนปฏิกิริยาเกิดอย่างสมบูรณ์

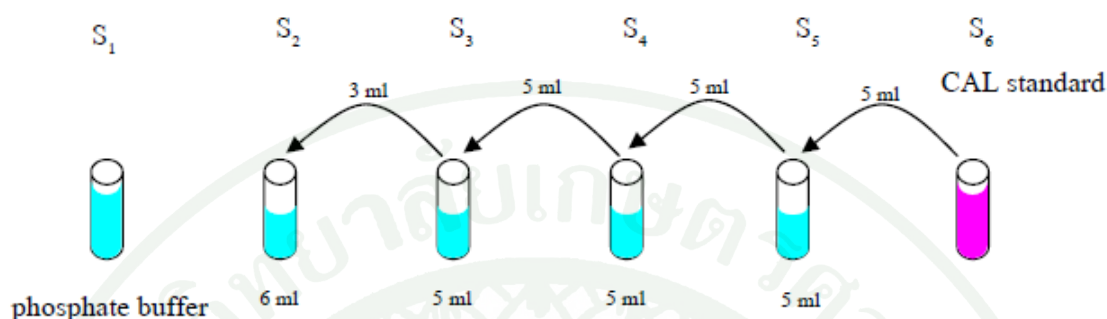
4. วิเคราะห์ปริมาณโปรตีนใน HLS โดยวิธีของ Lowry *et al.* (1951) นำค่าที่ได้มาคำนวณหน่วย (unit) ของเอนไซม์ฟีนอลออกซิเดส โดยคำนวณหาค่าดังนี้

$$1 \text{ หน่วยของฟีนอลออกซิเดส} = \Delta \text{OD}_{490} / \text{นาที} / \text{มิลลิกรัมโปรตีน}$$

5. การศึกษาการผลิตเอนไซม์ superoxide dismutase

ทำการศึกษาโดยใช้ชุดการทดลองสำเร็จรูป test kit (RANSOD[®] superoxide dismutase) โดยเตรียมชุดมาตรฐานใช้ในการเปรียบเทียบเพื่อหาปริมาณเอนไซม์ superoxide dismutase ในตัวอย่างเม็ดเลือดกึ่ง

5.1 เตรียมสารละลายมาตรฐาน S_1 - S_6 จากสารละลาย CAL standard และสารละลาย phosphate buffer 0.01 เปอร์เซ็นต์ ดังภาพที่ 4



ภาพที่ 4 ขั้นตอนการเตรียมสารละลายมาตรฐานของชุดทดลองสำเร็จรูป RANSOD[®] superoxide dismutase

5.2 นำสารละลายมาตรฐาน S_1 - S_6 เตรียมให้ได้ 50 ไมโครลิตร ผสมกับ R_1 1,700 ไมโครลิตรและเติมสารละลาย R_2 250 ไมโครลิตร มาวัดค่าดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 505 นาโนเมตร โดยจดบันทึกค่า A_1 ที่ 30 วินาที และจดบันทึกค่า A_2 ที่ 3 นาที 30 วินาที โดยเปรียบเทียบกับ air blank

วิธีการหาปริมาณเอนไซม์ superoxide dismutase ในตัวอย่างเม็ดเลือดกึ่ง

1. เก็บตัวอย่างเลือดจากกึ่งแต่ละตัว โดยเจาะเลือดจากบริเวณแอ่งเลือด ประมาณ 0.5 มิลลิลิตร ผสมกับสารละลาย K-199 ทีเอช 7.4 ที่เติม L-cystein 5 เปอร์เซ็นต์ เป็นสารป้องกันเลือดแข็งตัวจนได้ปริมาณครบ 1 มิลลิลิตร

2. หมุนเหวี่ยงด้วยความเร็ว 3,000 rpm เป็นเวลา 10 นาที อุณหภูมิที่ 4 องศาเซลเซียส

3. นำส่วนใสด้านบนทิ้ง นำส่วนตะกอนเม็ดเลือดที่ได้นำมาล้างในสารละลายโซเดียมคลอไรด์ 0.9 เปอร์เซ็นต์ โดยเติมโซเดียมคลอไรด์ 3 มิลลิลิตร ผสมด้วย dropper แก้วเบาๆ

4. หมุนเหวี่ยงด้วยความเร็ว 3,000 rpm เป็นเวลา 10 นาที อุณหภูมิที่ 4 องศาเซลเซียส

5. ล้างด้วยสารละลายโซเดียมคลอไรด์ 4 ครั้ง (ทำซ้ำข้อ 3-4) นำสารละลายส่วนใสด้านบนทิ้ง

6. ละลายตะกอนเม็ดเลือดด้วยน้ำกลั่นชนิด tri-distilled water ที่เย็น ปริมาตร 2 มิลลิลิตร

7. นำสารละลายเม็ดเลือดที่เตรียมได้ 50 ไมโครลิตร ผสมรวมกับ R_1 1,700 ไมโครลิตร และเติมสารละลาย R_2 250 ไมโครลิตร

8. นำมาวัดค่าดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 505 นาโนเมตร โดยจดบันทึกค่า A_1 ที่ 30 วินาที และจดบันทึกค่า ที่ 3 นาที 30 วินาที โดยเปรียบเทียบกับ air blank

9. นำค่า A_1 และ ค่าที่ได้มาคำนวณหาเปอร์เซ็นต์ inhibition โดยคำนวณหาดังนี้

$$\Delta A / \text{min of standard or sample } (B_n) = \frac{A_2 - A_1}{3}$$

$$\% \text{ inhibition} = \frac{B_n}{B_{s_1}} \times 100$$

10. นำค่าเปอร์เซ็นต์ inhibition ของสารละลายมาตรฐาน S_1 - S_6 มาสร้างกราฟ log ฐาน 10 เพื่อนำค่าเปอร์เซ็นต์ inhibition ของตัวอย่างเลือดทั้งหมดมาหาค่าปริมาณเอนไซม์ superoxide dismutase ในหน่วยเอนไซม์ superoxide dismutase units ต่อมิลลิลิตร (SOD units/ml)



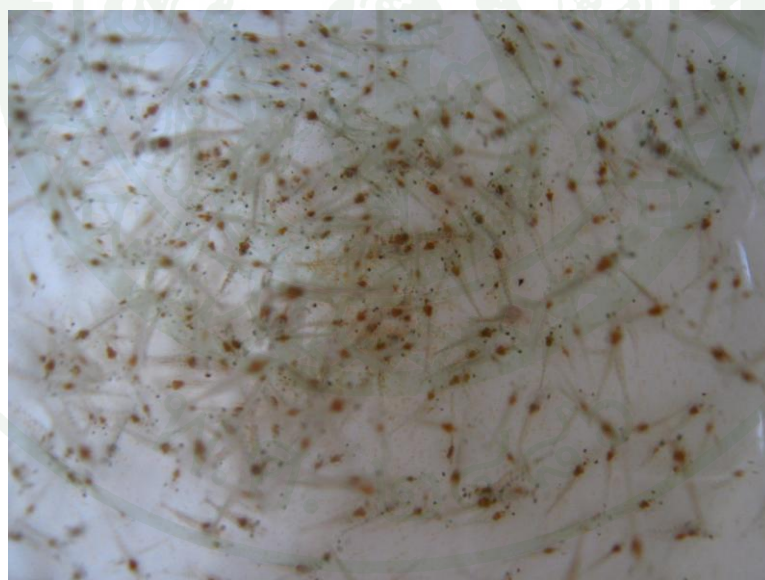
ภาพที่ 5 บรรจุภัณฑ์ของสารไอโซยูจินอล



ภาพที่ 6 ลักษณะของสารไอโซยูจินอลเป็นของเหลวหนืดมีสีเหลือง



ภาพที่ 7 ลักษณะของสารละลายไอโซยูจินอลเข้มข้น (stock solution) 500 มิลลิกรัมต่อลิตร



ภาพที่ 8 ลูกกุ้งขาวแวนนาไม่ระยะโพสตัวราว 8-10 ที่ใช้ในการทดลอง



ภาพที่ 9 กุ้งขาวแวนนาไมขนาด 15-20 กรัมที่ใช้ในการทดลอง

สถานที่และระยะเวลาทำการวิจัย

1.สถานที่ทำการวิจัย

อาคารปฏิบัติการศูนย์วิจัยธุรกิจเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำ ภาควิชาชีววิทยาประมง คณะประมง มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

2.ระยะเวลาทำการวิจัย

ดำเนินการทดลองระหว่างเดือนเมษายน พ.ศ. 2553 – ธันวาคม พ.ศ. 2553

ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

นำผลการศึกษาไปประยุกต์เลือกใช้ระดับความเข้มข้นของสาร โซลูจินอลที่สามารถลดความเครียดจากการขนย้ายกุ้งขาวแวนนาไม

แหล่งทุนสนับสนุน

ได้รับทุนสนับสนุนจาก บริษัท Bayer Thai Co., Ltd. ประเทศไทย

ผลและวิจารณ์

1. การศึกษาผลของความเค็มต่อความเป็นพิษแบบเฉียบพลันของสารไอโซยูจินอลต่อกุ้งขาวแวนนาไมระยะโพสลาร์วา

จากการศึกษาความเป็นพิษเฉียบพลันของสารไอโซยูจินอล ต่อกุ้งขาวแวนนาไมระยะโพสลาร์วา 8-10 ที่ระดับความเค็ม 5, 15 และ 25 พีเอสยู ได้ผลการศึกษาดังนี้

1.1 พิษเฉียบพลันที่ระดับความเค็ม 5 พีเอสยู

การทดลองในขั้นต้น พบว่าระดับความเข้มข้นต่ำสุดของสารไอโซยูจินอลที่ทำให้กุ้งขาวแวนนาไม ระยะ โพสลาร์วา 8-10 ตาย 100 เปอร์เซ็นต์ คือ 45.00 พีพีเอ็ม และระดับความเข้มข้นสูงสุดของสารไอโซยูจินอลที่ไม่ทำให้ลูกกุ้งขาวตาย คือ 15.00 พีพีเอ็ม เมื่อนำความเข้มข้นดังกล่าวมาจัดระดับช่วงความเข้มข้นตามสัดส่วนลอการิทึมเพื่อใช้ในการทดลองขั้นละเอียด 6 ระดับ ได้เป็น 15.00, 18.69, 23.28, 28.99, 36.11 และ 45.00 พีพีเอ็ม

หลังจากเติมสารไอโซยูจินอล พบว่าที่ระดับความเข้มข้นต่ำสุด 15.00 พีพีเอ็ม ลูกกุ้ง ไม่มีอาการผิดปกติและไม่ตายตลอดการทดลอง แต่ที่ระดับความเข้มข้นสูงขึ้นคือ 18.69, 23.28, 28.99, 36.11 และ 45.00 พีพีเอ็ม ลูกกุ้งเริ่มตายที่ 24 ชั่วโมงและ เมื่อครบระยะเวลา 48 ชั่วโมง ลูกกุ้งจะตายเพิ่มขึ้น และที่ความเข้มข้น 45.00 พีพีเอ็ม ลูกกุ้งจะตายหมด (ตารางที่ 1)

เมื่อนำอัตราการตายสะสมของกุ้งขาวแวนนาไม ระยะ โพสลาร์วา 8-10 ที่ได้รับสารไอโซยูจินอลเป็นระยะเวลา 48 ชั่วโมง ในน้ำความเค็ม 5 พีเอสยู ที่ระดับความเข้มข้นต่างๆ มาคำนวณหา LC_{50} ที่ 48 ชั่วโมง ตามวิธีของ Finney (1971) มีค่าเท่ากับ 19.93 (17.53-22.33) พีพีเอ็ม (ตารางที่ 1) ทุกกลุ่มการทดลองมีการวิเคราะห์คุณภาพน้ำทั้งก่อนและหลังการเติมสารไอโซยูจินอล ซึ่งมีค่าพีเอช ค่าความกระด้าง ความเป็นด่าง และไนไตรท์ ไม่มีความแตกต่างกันมาก ยกเว้นแอมโมเนีย ก่อนใส่สารไอโซยูจินอลจะมีค่าสูงกว่าหลังจากสิ้นสุดการทดลอง อาจเนื่องมาจากการทดลองมีกุ้งจำนวนมาก ทำให้มีปริมาณแอมโมเนียอยู่ในระดับสูง 1.11 มิลลิกรัมต่อลิตร เมื่อสิ้นสุดการทดลองมีเพียง 0.2-0.25 มิลลิกรัมต่อลิตรเท่านั้น สารไอโซยูจินอลมีผลทำให้เมแทบอลิซึมของกุ้ง

ลดลง สิ่งขับถ่ายที่ออกมาจึงมีปริมาณลดลงด้วย มีผลต่อปริมาณแอมโมเนียที่ลดลงเมื่อสิ้นสุดการทดลอง

ตารางที่ 1 อัตราการตายสะสมของลูกกุ้งแวนนาไมระยะโพสลาร์วา 8-10 ที่ได้รับสารไอโซยูจินอลในระดับต่างๆ กันในน้ำความเค็ม 5 พีเอสยู

ความเข้มข้นของสารไอโซยูจินอล (พีพีเอ็ม)	เวลา (ชั่วโมง)	จำนวนซ้ำ			รวม	เฉลี่ย	เปอร์เซ็นต์
		1	2	3			
0 (กลุ่มควบคุม)	24	0	0	0	0	0	0
	48	0	0	0	0	0	0
15	24	0	0	0	0	0	0
	48	0	0	0	0	0	0
18.69	24	8	10	8	26	8.67	43.33
	48	14	12	12	38	12.67	63.33
23.28	24	12	12	10	34	11.33	56.67
	48	16	16	12	44	14.67	73.33
28.99	24	14	14	12	40	13.33	66.67
	48	18	18	16	52	17.33	86.67
36.11	24	14	16	14	44	14.67	73.33
	48	20	18	16	54	18.00	90.00
45.00	24	16	18	14	48	16.00	80
	48	20	20	20	60	20.00	100.00

1.2 พืชยับยั้งที่ระดับความเค็ม 15 พีเอสยู

การทดลองในขั้นต้น พบว่าระดับความเข้มข้นต่ำสุดของสารไอโซยูจินอลที่ทำให้กุ้งแวนนาไม ระยะ โพสลาร์วา 8-10 ตาย 100 เปอร์เซ็นต์คือ 30.00 พีพีเอ็ม และระดับความเข้มข้นสูงสุดของสารไอโซยูจินอลที่ไม่ทำให้ลูกกุ้งขาวตาย คือ 15.00 พีพีเอ็ม เมื่อนำความเข้มข้นดังกล่าว

มาจัดระดับช่วงความเข้มข้นตามสัดส่วนลอการิทึมเพื่อใช้ในการทดลองชั้นละเอียด 6 ระดับ ได้เป็น 15.00, 17.23, 19.79, 22.74, 26.12 และ 30.00 พีพีเอ็ม

หลังจากเติมสารไอโซยูจินอล พบว่า ที่ระดับความเข้มข้นต่ำสุด 15.00 พีพีเอ็ม ลูกกุ้ง ไม่มีอาการผิดปกติและไม่ตายตลอดการทดลอง แต่ที่ระดับความเข้มข้นสูงขึ้นคือ 17.23, 19.79, 22.74, 26.12 และ 30.00 พีพีเอ็ม ลูกกุ้งเริ่มตายที่ 24 ชั่วโมงและเมื่อครบระยะเวลา 48 ชั่วโมง ลูกกุ้งจะตายเพิ่มขึ้นและที่ความเข้มข้น 30.00 พีพีเอ็ม ลูกกุ้งจะตายหมด (ตารางที่ 2)

เมื่อนำอัตราการตายสะสมของกุ้งขาวแวนนาไม ระยะโพสลาร์วาที่ได้รับสารไอโซยูจินอล เป็นระยะเวลา 48 ชั่วโมง ในน้ำความเค็ม 15 พีเอสยู ที่ระดับความเข้มข้นต่างๆ มาคำนวณหาค่า LC_{50} ที่ 48 ชั่วโมง ตามวิธีของ Finney (1971) มีค่าเท่ากับ 20.58 (18.75-22.43) พีพีเอ็ม (ตารางที่ 2) ทุกกลุ่มการทดลองมีการวิเคราะห์คุณภาพน้ำทั้งก่อนและหลังการเติมสารไอโซยูจินอล ซึ่งมีค่าพีเอช ค่าความกระด้าง ความเป็นด่าง และไนไตรท์ ไม่มีความแตกต่างกันมาก มีเพียงปริมาณแอมโมเนียก่อนใส่สารไอโซยูจินอลที่มีถึง 3.45 มิลลิกรัมต่อลิตร แต่หลังจากสิ้นสุดการทดลอง 48 ชั่วโมง แอมโมเนียมีค่าอยู่ระหว่าง 0.2-0.36 มิลลิกรัมต่อลิตรเท่านั้น ผลจากสารไอโซยูจินอลที่ทำให้กุ้งมีปฏิกิริยาต่อการตอบสนองสิ่งกระตุ้นต่างๆ ลดลง มีผลต่อการขับถ่ายของเสีย ซึ่งอยู่ในรูปแอมโมเนียลดลงไปด้วย

ตารางที่ 2 อัตราการตายสะสมของลูกกุ้งแวนนาไมระยะโพสลาร์ว่า 8-10 ที่ได้รับสารไอโซยูจินอลในระดับต่างๆ กันในน้ำความเค็ม 15 พิเอสยู

ความเข้มข้นของสาร ไอโซยูจินอล (พีพีเอ็ม)	เวลา (ชั่วโมง)	จำนวนซ้ำ			รวม	เฉลี่ย	เปอร์เซ็นต์
		1	2	3			
0 (กลุ่มควบคุม)	24	0	0	0	0	0	0
	48	0	0	0	0	0	0
15.00	24	0	0	0	0	0	0
	48	0	0	0	0	0	0
17.23	24	4	4	4	12	4.00	20.00
	48	10	8	8	26	8.67	43.33
19.79	24	6	6	8	20	6.67	33.33
	48	12	10	12	34	11.33	56.67
22.74	24	8	10	10	28	9.33	46.67
	48	10	14	12	36	12.00	60.00
26.12	24	14	12	12	38	12.67	63.33
	48	16	14	14	44	14.67	73.33
30.00	24	14	14	18	46	15.33	76.67
	48	20	20	20	60	20.00	100.00

1.3 พืชเลี้ยงปลาน้ำจืดที่ระดับความเค็ม 25 พิเอสยู

การทดลองในขั้นต้น พบว่าระดับความเข้มข้นต่ำสุดของสารไอโซยูจินอลที่ทำให้กุ้งชาวแวนนาไม ระยะโพสลาร์ว่า 8-10 ตาย 100 เปอร์เซ็นต์ คือ 37.50 พีพีเอ็ม และระดับความเข้มข้นสูงสุดของสารไอโซยูจินอลที่ไม่ทำให้ลูกกุ้งชาวตาย คือ 15.00 พีพีเอ็ม เมื่อนำความเข้มข้นดังกล่าวมาจัดระดับช่วงความเข้มข้นตามสัดส่วนลอการิทึมเพื่อใช้ในการทดลองขั้นละเอียด 6 ระดับ ได้เป็น 15.00, 18.02, 21.65, 26.00, 31.22 และ 37.50 พีพีเอ็ม

หลังจากเติมสารไอโซยูจินอล พบว่า ที่ระดับความเข้มข้นต่ำสุด 15.00 พีพีเอ็ม ลูกกุ้ง ไม่มีอาการผิดปกติและไม่ตายตลอดการทดลอง แต่ที่ระดับความเข้มข้นสูงขึ้น คือ 18.02, 21.65, 26.00, 31.22 และ 37.50 พีพีเอ็ม ลูกกุ้งเริ่มตายที่ 24 ชั่วโมงและเมื่อครบระยะเวลา 48 ชั่วโมง ลูกกุ้งจะตายเพิ่มขึ้น และที่ความเข้มข้น 37.50 พีพีเอ็ม ลูกกุ้งจะตายหมด (ตารางที่ 3)

เมื่อนำอัตราการตายสะสมของกุ้งขาวแวนนาไม ระยะโพสลาร์วาที่ได้รับสารไอโซยูจินอล ที่ 48 ชั่วโมง ในน้ำความเค็ม 25 พีเอสยู ที่ระดับความเข้มข้นต่างๆ มาคำนวณหาค่า LC_{50} ที่ 48 ชั่วโมง ตามวิธีของ Finney (1971) มีค่าเท่ากับ 22.53 (21.88-23.18) พีพีเอ็ม (ตารางที่ 3) ทุกกลุ่มการทดลองมีการวิเคราะห์คุณภาพน้ำทั้งก่อนและหลังการเติมสารไอโซยูจินอล ซึ่งมีค่าพีเอช ค่าความกระด้าง ความเป็นด่าง และไนไตรท์ ไม่มีความแตกต่างกันมาก ยกเว้นระดับแอมโมเนียก่อนการทดลองได้สารไอโซยูจินอลอยู่ในระดับสูง 4.86 มิลลิกรัมต่อลิตร แต่เมื่อสิ้นสุดการทดลองมีเพียง 0.2-0.29 มิลลิกรัมต่อลิตร แสดงว่ากุ้งบางส่วนที่ตายแล้วนำออกไป รวมทั้งกุ้งที่มีชีวิตเหลือรอดลดปฏิกิริยาต่างๆ ในร่างกาย ทำให้การขับถ่ายของเสียในรูปของแอมโมเนียลดลงด้วย แต่โดยภาพรวมแล้วสารไอโซยูจินอลจะไม่มีผลต่อคุณสมบัติของน้ำที่สำคัญๆ ได้แก่ พีเอช ความกระด้างและความเป็นด่าง

จากผลการทดลองในทุกระดับความเค็ม พบว่าค่าความเป็นพิษของสารไอโซยูจินอลจะต่ำลง เมื่อระดับความเค็มเพิ่มขึ้นดังแสดงในตารางที่ 4

ตารางที่ 3 อัตราการตายสะสมของลูกกุ้งแวนนาไมระยะโพสลาร์วา 8-10 ที่ได้รับสารไอโซยูจินอลในระดับต่างๆ กันในน้ำความเค็ม 25 พีเอสยู

ความเข้มข้นของสาร ไอโซยูจินอล (พีพีเอ็ม)	เวลา (ชั่วโมง)	จำนวนซ้ำ			รวม	เฉลี่ย	เปอร์เซ็นต์
		1	2	3			
0 (กลุ่มควบคุม)	24	0	0	0	0	0	0
	48	0	0	0	0	0	0
15.00	24	0	0	0	0	0	0
	48	0	0	0	0	0	0
18.02	24	2	2	4	8	2.67	13.33
	48	4	2	4	10	3.33	16.67
21.65	24	2	2	4	8	2.67	13.33
	48	10	10	14	34	11.33	56.67
26.00	24	4	6	6	14	4.67	23.33
	48	10	8	8	26	8.67	43.33
31.22	24	10	10	6	26	8.67	73.33
	48	18	18	16	52	18.00	90.00
37.50	24	14	18	16	48	16.00	80.00
	48	20	20	20	20	60.00	100.00

ตารางที่ 4 ค่า LC_{50} ในเวลา 48 ชั่วโมงไอโซยูจินอลที่ระดับความเค็มต่างกันต่อของกุ้งขาวแวนนาไมระยะโพสลาร์วา 8-10

สารเคมี	ระดับความเค็ม (พีเอสยู)	ค่า 48 ชั่วโมง LC_{50} (พีพีเอ็ม)
ไอโซยูจินอล	5	19.93 (17.53-22.33)
	15	20.58 (18.75-22.43)
	25	22.53 (21.88-23.18)

2. การศึกษาปริมาณของสารไอโซยูจินอลที่เหมาะสมเพื่อใช้ในการสลบกุ้งขาวแวนนาไม

การทดสอบปริมาณของสารไอโซยูจินอล ที่ความเข้มข้นต่างๆ จำนวน 40 ความเข้มข้น ได้แก่ 2.5, 5.0, 7.5, 10.0, 12.5, 15.0, 17.5, 20.0, 22.5, 25.0, 27.5, 30.0, 32.5, 35.0, 37.5, 40.0, 42.5, 45.0, 47.5, 50.0, 52.5, 55.0, 57.5, 60.0, 62.5, 65.0, 67.5, 70.0, 72.5, 75.0, 77.5, 80.0, 82.5, 85.0, 87.5, 90.0, 92.5, 95.0, 97.5 และ 100.0 พีพีเอ็ม พบว่าระยะเวลา 2 นาที ที่ต้องการให้กุ้งสลบอย่างรวดเร็วเพื่อการขนย้าย หรือในการสุมกุ้งเพื่อชั่งน้ำหนัก เป็นต้น ต้องใช้ความเข้มข้นของสารไอโซยูจินอล 95 พีพีเอ็ม (ตารางที่ 5) และที่ระยะเวลา 10 นาที ที่ต้องการให้กุ้งสลบใช้ความเข้มข้นของสารไอโซยูจินอล 70 พีพีเอ็ม (ตารางที่ 5) ซึ่งทำให้กุ้งขาวแวนนาไมสลบเข้าสู่ระยะที่ 3 (สูญเสียการสับัดของหาง โดยส่วนที่เคยโค้งงอสะบัดได้ก็จะอยู่ในแนวตรงกับลำตัว) ถึงระยะที่ 4 (สูญเสียการควบคุมของกล้ามเนื้อส่วนหาง) ซึ่งสอดคล้องกับการศึกษาของ Coyle *et al.* (2004) ที่พบว่าการตอบสนองของสัตว์น้ำกลุ่ม crustacean นั้นมีความแตกต่างกับสัตว์น้ำจำพวกปลาเพราะว่ามีระบบประสาทแบบ synaptic receptor sites จึงทำให้ประสิทธิภาพของยาสลบไม่ได้ผลเท่ากับใช้ในปลา หรือต้องใช้ปริมาณยาสลบมากกว่าที่ใช้ในการสลบปลา 5-10 เท่า

ตารางที่ 5 ปริมาณของสารไอโซยูจินอลที่เหมาะสมเพื่อใช้ในการสลบกุ้งขาวแวนนาไมภายในระยะเวลา 2 นาที และ 10 นาที

ระยะเวลาที่ใช้ในการสลบ (นาที)	ความเข้มข้นของสารที่ทำให้สลบ (พีพีเอ็ม)
2	95
10	70

3. การศึกษาหาระยะเวลาฟื้นของกุ้งขาวแวนนาไมหลังจากการสลบ

การทดลองหาระยะเวลาในการฟื้นของกุ้งขาวแวนนาไมหลังจากสลบด้วยสารไอโซยูจินอลความเข้มข้น 95 พีพีเอ็ม ที่ทำให้กุ้งสลบเข้าสู่ระยะที่ 3 (สูญเสียการสับัดของหาง หางส่วนที่เคยโค้งงอสะบัดได้ก็จะวางในแนวตรงกับลำตัว) ถึงระยะที่ 4 (สูญเสียการควบคุมของกล้ามเนื้อส่วนหาง) ภายใน 2 นาที หลังจากนั้นนำกุ้งไปใส่ในตู้กระจกที่มีการให้ออกซิเจนอย่างเต็มที่ กุ้งจะฟื้นตัวจากการสลบภายในระยะเวลา 7.81 ± 3.09 นาที (ตารางที่ 6) ส่วนกุ้งที่ใช้สารไอโซยูจินอล 95

พีพีเอ็ม เป็นระยะเวลา 5 และ 10 นาที กุ้งจะฟื้นตัวจากการสลบภายในระยะเวลา 7.94 ± 2.82 และ 9.42 ± 1.60 นาที ตามลำดับ (ตารางที่ 6) ซึ่งไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P > 0.05$) แต่กุ้งที่สัมผัสสารไอโซยูจินอลเป็นเวลานาน 15 และ 20 นาที กุ้งจะฟื้นตัวจากการสลบภายในระยะเวลา 11.67 ± 3.63 และ 20.21 ± 5.40 นาที ตามลำดับซึ่งมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$) ส่วนกุ้งขาวแวนนาไมในกลุ่มที่เติมสารไอโซยูจินอล 95 พีพีเอ็ม เป็นเวลานาน 175 นาที กุ้งจะสลบเข้าสู่ระยะที่ 5 คือ สูญเสียการทำงานของ maxilla activity หลังจากนำไปใส่ในน้ำที่เตรียมไว้ให้ฟื้นตัวปรากฏว่ากุ้งทุกตัวไม่ฟื้น

ตารางที่ 6 ระยะเวลาที่กุ้งขาวแวนนาไมฟื้นจากการได้รับสารไอโซยูจินอลความเข้มข้น 95 พีพีเอ็ม ที่ทำให้กุ้งสลบภายในเวลา 2 นาที เป็นระยะเวลาต่างๆ กัน

ความเข้มข้นของสารไอโซยูจินอล (พีพีเอ็ม)	ระยะเวลาที่ใช้ในการสลบ (นาที)	เวลาที่ฟื้นจากการสลบ (นาที)
95	2	7.81 ± 3.09^a
	5	7.94 ± 2.82^a
	10	9.42 ± 1.60^a
	15	11.67 ± 3.63^b
	20	20.21 ± 5.40^c
	175	ไม่ฟื้น

หมายเหตุ: ค่าเฉลี่ยที่กำกับด้วยอักษรแตกต่างกันในคอลัมน์เดียวกัน หมายถึงมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$)

การทดลองหาระยะเวลาในการฟื้นของกุ้งหลังจากสลบด้วยความเข้มข้นของสารไอโซยูจินอล 70 พีพีเอ็ม ซึ่งสามารถจะทำให้กุ้งขาวแวนนาไมสลบเข้าสู่ระยะที่ 3 (สูญเสียการสับัดของหาง ส่วนที่เคียวโค้งงอสะบัดได้ก็จะวางในแนวตรงกับลำตัว) ถึงระยะที่ 4 (สูญเสียการควบคุมของกล้ามเนื้อส่วนหาง) ภายใน 10 นาที หลังจากนำกุ้งใส่ในน้ำที่สะอาดที่มีการให้อากาศอย่างเต็มที่ กุ้งจะฟื้นตัวจากการสลบภายในระยะเวลา 11.98 ± 5.28 นาที (ตารางที่ 7) ส่วนที่ระยะเวลานานเพิ่มขึ้นเป็น 15 และ 20 นาที กุ้งจะฟื้นตัวจากการสลบภายในระยะเวลา 13.19 ± 2.48 และ $23.21 \pm$

2.77 นาที ตามลำดับ ซึ่งไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P>0.05$) สำหรับความเข้มข้นสารไอโซยูจินอล 70 พีพีเอ็ม เพื่อให้กุ้งสลบเข้าสู่ระยะที่ 5 คือ สูญเสียการทำงานของ maxilla activity ซึ่งใช้เวลานานประมาณ 195 นาที และกุ้งที่เข้าสู่ระยะนี้จะไม่สามารถฟื้นกลับมาได้

ระยะเวลาฟื้นของกุ้งขาวแวนนาไมจะเพิ่มขึ้นตามความเข้มข้นของสารและระยะเวลาที่ได้รับสารไอโซยูจินอล จากผลการศึกษาข้างต้นชี้ให้เห็นว่าสารไอโซยูจินอลมีประสิทธิภาพที่ดีในการสลบกุ้งขาวแวนนาไม โดยพิจารณาจากความเข้มข้นที่ใช้ในการสลบ และระยะเวลาในการฟื้นตัว ซึ่งใช้เวลาไม่นานมาก ส่วนระยะเวลาที่กุ้งจะสลบจนถึงระดับที่ไม่สามารถจะฟื้นกลับมาได้ใช้เวลานานมากกว่า 3 ชั่วโมง ซึ่งในการใช้ยาสลบสำหรับกุ้งในการปฏิบัติงานตามวัตถุประสงค์ต่างๆ ไม่น่าจะกินเวลานานมาก

ตารางที่ 7 ระยะเวลาที่กุ้งขาวแวนนาไมฟื้นจากการได้รับสาร ไอโซยูจินอลความเข้มข้น 70 พีพีเอ็ม ที่ทำให้กุ้งสลบภายในเวลา 10 นาที เป็นระยะเวลาต่างๆ กัน

ความเข้มข้นของสาร ไอโซยูจินอล (พีพีเอ็ม)	ระยะเวลาที่ใช้ในการสลบ (นาที)	เวลาที่ฟื้นจากการสลบ (นาที)
70	10	11.98 ± 5.28^a
	15	13.19 ± 2.48^a
	20	23.21 ± 2.77^b
	195	ไม่ฟื้น

หมายเหตุ: ค่าเฉลี่ยที่กำกับด้วยอักษรแตกต่างกันในคอลัมน์เดียวกัน หมายถึงมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.05$)

Small (2005) ศึกษาถึงประสิทธิภาพของยาสลบ AQUI-S™ ในการสลบปลา Channel catfish เมื่อทดสอบที่ความเข้มข้น 3 ความเข้มข้น พบว่า การใช้ AQUI-S™ ที่ความเข้มข้น 20 มิลลิกรัม/ลิตร โดยใช้ระยะเวลาในการสลบเท่ากับ 8.0 นาที ระยะเวลาในการฟื้นเท่ากับ 2.1 นาที ความเข้มข้น 40 มิลลิกรัม/ลิตร ใช้ระยะเวลาในการสลบเท่ากับ 3.9 นาที ระยะเวลาในการฟื้นเท่ากับ 2.8 นาที และความเข้มข้น 60 มิลลิกรัม/ลิตร โดยใช้ระยะเวลาในการสลบเท่ากับ 3.7 นาที ระยะเวลาในการฟื้นเท่ากับ 5.3 นาที ตามลำดับ

4. การศึกษาหาอัตราค่าเสื่อมของสารไอโซยูจินอล

4.1 การเสื่อมของสารไอโซยูจินอลที่อุณหภูมิ 28 ± 1 องศาเซลเซียส

หลังจากที่ได้ผสมสารไอโซยูจินอลความเข้มข้น 95 พีพีเอ็ม ซึ่งเป็นระดับที่ทำให้กุ้งขาวแวนนาไมสลบเข้าสู่ระยะที่ 3 และ 4 ภายในเวลา 2 นาที ในตู้กระจก และทำการตั้งทิ้งไว้ที่ระยะเวลา 3, 6, 12, 24 และ 48 ชั่วโมงที่อุณหภูมิห้อง (28 ± 1 องศาเซลเซียส) เพื่อศึกษาค่าเสื่อมของสารไอโซยูจินอลพบว่า การผสมสารใช้ทันที (0 ชั่วโมง) สามารถทำให้กุ้งสลบได้รวดเร็วโดยใช้ระยะเวลา 2.00 ± 0.00 นาที หลังจากตั้งสารทิ้งไว้ 3 ชั่วโมงต้องใช้ระยะเวลาในการทำให้กุ้งสลบเพิ่มสูงขึ้นเป็น 4.41 ± 1.52 นาที แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$) กับการผสมสารไอโซยูจินอลใช้ทันที และเมื่อตั้งสารทิ้งไว้เป็นเวลานานขึ้นคือ 6, 12, 24 และ 48 ชั่วโมง มีผลทำให้ต้องใช้ระยะเวลาในการทำให้กุ้งสลบนานขึ้นเป็น 5.87 ± 1.76 , 7.58 ± 2.84 , 8.09 ± 3.07 และ 11.14 ± 4.84 นาที ตามลำดับ (ตารางที่ 8)

การทดลองนี้แสดงให้เห็นว่าการเตรียมสารไอโซยูจินอลไว้โดยที่ไม่ได้ใช้แม้นในที่ที่มีอุณหภูมิปกติจะทำให้การออกฤทธิ์ของสารในการสลบกุ้งนั้นน้อยลง หรือต้องใช้ปริมาณสารที่เพิ่มมากขึ้นเพื่อให้การออกฤทธิ์ของสารมีค่าเท่าเดิมเหมือนกับที่เตรียมสารใหม่ทุกครั้งจากการทดลองนี้แสดงให้เห็นว่าสารไอโซยูจินอลนั้นน่าจะมีการระเหยไปตามธรรมชาติได้ คล้ายกับคุณสมบัติเด่นของน้ำมันกานพลู หรือ ยูจินอล สามารถระเหยไปตามธรรมชาติ (ฉวีวรรณ, 2553)

ตารางที่ 8 อัตราค่าเสื่อมของสารไอโซยูจินอล 95 พีพีเอ็ม ที่อุณหภูมิห้อง (28 ± 1 องศาเซลเซียส) ภายในระยะ เวลา 3, 6, 12, 24 และ 48 ชั่วโมง

ระยะเวลาที่ตั้งสารทิ้งไว้ (ชั่วโมง)	ระยะเวลาที่ใช้ในการสลับกึ่ง (นาทีก)
0	2.00 ± 0.00^a
3	4.41 ± 1.52^b
6	5.87 ± 1.76^c
12	7.58 ± 2.84^{cd}
24	8.09 ± 3.07^{de}
48	11.14 ± 4.84^e

หมายเหตุ: ค่าเฉลี่ยที่กำกับด้วยอักษรแตกต่างกันในคอลัมน์เดียวกัน หมายถึงมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$)

4.2 การเสื่อมของสารไอโซยูจินอลที่อุณหภูมิ 24 ± 1 องศาเซลเซียส

หลังจากที่ได้ผสมสารไอโซยูจินอลความเข้มข้น 95 พีพีเอ็มซึ่งเป็นระดับที่ทำให้กุ้งขาวแวนนาไมสลับเข้าสู่ระยะที่ 3 และ 4 ภายในเวลา 2 นาทีก ในตู้กระจก และทำการตั้งทิ้งไว้ที่ระยะเวลา 3, 6, 12, 24 และ 48 ชั่วโมงที่อุณหภูมิ 24 ± 1 องศาเซลเซียส เพื่อศึกษาค่าเสื่อมของสารไอโซยูจินอลพบว่า การผสมสารใช้ทันที (0 ชั่วโมง) สามารถทำให้กุ้งสลับได้รวดเร็วโดยใช้ระยะเวลา 2.00 ± 0.00 นาทีก หลังจากตั้งสารทิ้งไว้ 3 ชั่วโมงต้องใช้ระยะเวลาเพิ่มสูงขึ้นเป็น 4.42 ± 1.55 นาทีก แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$) กับการผสมสารไอโซยูจินอลที่ใช้ทันทีและเมื่อตั้งสารทิ้งไว้เป็นระยะเวลานานขึ้นคือ 6, 12, 24 และ 48 ชั่วโมง มีผลทำให้ต้องใช้ระยะเวลาในการทำให้กุ้งสลับนานขึ้นเป็น 5.56 ± 1.99 , 7.09 ± 2.58 , 8.19 ± 2.63 และ 9.35 ± 3.26 นาทีก ตามลำดับ (ตารางที่ 9)

การทดลองแสดงให้เห็นว่าการเตรียมสารไอโซยูจินอลในตู้กระจกทิ้งไว้ที่อุณหภูมิ 24 ± 1 องศาเซลเซียส เป็นเวลานานทำให้การออกฤทธิ์ของสารลดลงไปเรื่อยๆ ตามระยะเวลาที่เพิ่มขึ้น

เช่นเดียวกับที่อุณหภูมิ 28 ± 1 องศาเซลเซียส แต่มีแนวโน้มว่าการเสื่อมของสารไอโซยูจินอลที่อุณหภูมิ 24 ± 1 องศาเซลเซียส น้อยกว่าที่อุณหภูมิ 28 ± 1 องศาเซลเซียส เล็กน้อยอาจเนื่องมาจากการระเหยของสารที่อุณหภูมิสูงรวดเร็วกว่าที่อุณหภูมิต่ำกว่า

ตารางที่ 9 อัตราค่าเสื่อมของสารไอโซยูจินอล 95 พีพีเอ็ม ที่อุณหภูมิ 24 ± 1 องศาเซลเซียส ภายในระยะเวลา 3, 6, 12, 24 และ 48 ชั่วโมง

ระยะเวลาที่ตั้งสารทิ้งไว้ (ชั่วโมง)	ระยะเวลาที่ใช้ในการสลับกึ่ง (นาทีก)
0	2.00 ± 0.00^a
3	4.42 ± 1.55^b
6	5.56 ± 1.99^{bc}
12	7.09 ± 2.58^{cd}
24	8.19 ± 2.63^{cd}
48	9.35 ± 3.26^d

หมายเหตุ: ค่าเฉลี่ยที่กำกับด้วยอักษรแตกต่างกันในคอลัมน์เดียวกัน หมายถึงมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$)

5. การศึกษาหาอัตราค่าเสื่อมของสารไอโซยูจินอลในการใช้สารซ้ำ

จากการศึกษาอัตราค่าเสื่อมของสารไอโซยูจินอลในการใช้สารซ้ำต่อการเตรียมสารไอโซยูจินอล 1 ครั้งในตู้กระจกน้ำปริมาตร 40 ลิตร เพื่อทำการสลับกึ่งขาววนนาไมครั้งละ 10 ตัว/ซ้ำ จำนวน 3 ซ้ำ โดยใช้ความเข้มข้นระดับที่ทำให้กึ่งสลับถึงระยะที่กึ่งไม่มีการตอบสนองคือระยะ 3 และ 4 ภายในเวลา 2 นาที พบว่าในครั้งแรกของการใช้สารไอโซยูจินอลเข้มข้น 95 พีพีเอ็ม ทำให้กึ่งสลับใช้เวลา 2.00 ± 0.00 นาที และในการใช้สารไอโซยูจินอลในการทำให้กึ่งสลับครั้งที่ 2, 3, 4, 5, 6, 7 และ 8 ใช้ระยะเวลาในการสลับเท่ากับ 2.85 ± 0.57 , 4.22 ± 1.07 , 8.11 ± 2.33 , 13.96 ± 3.59 , 20.11 ± 2.34 , 25.22 ± 5.00 และ 31.50 ± 4.83 นาที ตามลำดับ (ตารางที่ 10) เมื่อมีการใช้สารไอโซยูจินอลซ้ำตั้งแต่ครั้งที่ 3 จะพบว่าใช้เวลาในการสลับเป็น 2 เท่า ซึ่งถ้าใช้สารไอโซยูจินอลที่เตรียม

เพียง 1 ครั้งเพื่อให้กุ้งสลบนั้น ควรที่จะใช้สารซ้ำต่อการเตรียมสาร 1 ครั้ง หรือ 2 ครั้งเท่านั้นถ้าต้องการให้กุ้งสลบเข้าสู่ระยะที่ 3 ภายในระยะเวลารวดเร็ว หรือถ้าต้องการใช้สารในตู้กระจกเดิมเพื่อทำการสลบกุ้งนั้นควรที่จะมีการเติมสารไอโซยูจินอลเพิ่มลงไปในตัวกระจกเดิมเพื่อที่จะทำให้กุ้งมีการสลบได้รวดเร็วภายในระยะเวลา 2 นาที จากผลการศึกษาในครั้งนี้ พบว่าอัตราค่าเสื่อมของสารไอโซยูจินอลในการใช้สารซ้ำตั้งแต่ครั้งที่ 1 ถึง ครั้งที่ 8 นั้นมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$)

ตารางที่ 10 อัตราค่าเสื่อมของสารไอโซยูจินอลในการใช้สารซ้ำ

จำนวนครั้งในการใช้สารซ้ำ	ระยะเวลาที่ใช้ในการสลบ (นาที)
1	2.00 ± 0.00^a
2	2.85 ± 0.57^b
3	4.22 ± 1.07^c
4	8.11 ± 2.33^d
5	13.96 ± 3.59^e
6	20.11 ± 2.34^f
7	25.22 ± 5.00^g
8	31.50 ± 4.83^h

หมายเหตุ: ค่าเฉลี่ยที่กำกับด้วยอักษรแตกต่างกันในคอลัมน์เดียวกัน หมายถึงมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$)

ผลการทดลองครั้งนี้แสดงว่าทุกครั้งที่แช่กุ้งในน้ำที่มีสารไอโซยูจินอลจะมีบางส่วนเข้าไปในตัวกุ้งโดยเฉพาะจากการหายใจทางเหงือก ทำให้ความเข้มข้นของไอโซยูจินอลในน้ำลดลง เมื่อนำกุ้งจำนวนเท่าเดิมแช่ลงไปอีกทำให้ต้องใช้เวลานานมากกว่าเดิมในการทำให้กุ้งสลบเข้าสู่ระยะที่ 3 ซึ่งทุกครั้งสารไอโซยูจินอลบางส่วนจะเข้าไปในตัวกุ้ง ทำให้ความเข้มข้นที่เหลือในน้ำลดลงเรื่อยๆ โดยเฉพาะหลังจากครั้งที่ 4 จะต้องใช้เวลาานมากกว่า 10 นาที ซึ่งนานเกินไปเพราะตามปกติในการใช้ยาสลบสำหรับสัตว์น้ำต้องการให้สัตว์นั้นๆ สลบภายในระยะเวลารวดเร็วหรือไม่ควรจะมากกว่า 10 นาที

6. การศึกษาการตอบสนองทางภูมิคุ้มกันแบบไม่จำเพาะของกุ้งขาวแวนนาไมที่ได้รับสารไอโซยูจินอลและระยะเวลาพักฟื้นที่ 0, 6, 12, 24 และ 48 ชั่วโมง

จากการศึกษาทางด้านการตอบสนองทางภูมิคุ้มกันของกุ้งขาวแวนนาไมที่ได้รับสารไอโซยูจินอล (95 พีพีเอ็ม ภายในระยะเวลา 2 นาที) และไม่ได้รับสารไอโซยูจินอล หลังจากทำการขนย้ายกุ้งจากบ่อทดลองขึ้นตู้กระจก เป็นระยะเวลา 0, 6, 12, 24 และ 48 ชั่วโมง โดยวิเคราะห์ปริมาณเม็ดเลือดรวม กิจกรรมการทำลายแบคทีเรียของน้ำเลือดกุ้ง กิจกรรมของกระบวนการกลืนกินสิ่งแปลกปลอมของเม็ดเลือดกุ้ง กิจกรรมของเอนไซม์ phenoloxidase และการผลิตเอนไซม์ superoxide dismutase ให้ผลดังนี้

1) ปริมาณเม็ดเลือดรวมของกุ้งขาวแวนนาไม

ปริมาณเม็ดเลือดรวมเฉลี่ยของกุ้งในกลุ่มควบคุมซึ่งเป็นกุ้งก่อนการขนย้ายเท่ากับ $170.52 \pm 5.48 \times 10^5$ เซลล์ต่อมิลลิลิตร ภายหลังจากการขนย้ายกุ้งได้ตรวจสอบปริมาณเม็ดเลือดรวมของกุ้งทันที พบว่ากลุ่มที่ได้รับสารไอโซยูจินอล 95 พีพีเอ็ม เป็นระยะเวลา 2 นาที มีปริมาณเม็ดเลือดรวมเฉลี่ยของกุ้งเท่ากับ $169.70 \pm 6.33 \times 10^5$ เซลล์ต่อมิลลิลิตร และกุ้งกลุ่มที่ไม่ได้รับสารไอโซยูจินอลมีปริมาณเม็ดเลือดรวมเฉลี่ยของกุ้งเท่ากับ $135.49 \pm 3.86 \times 10^5$ เซลล์ต่อมิลลิลิตร ซึ่งกุ้งขาวแวนนาไมที่ได้รับสารไอโซยูจินอลก่อนทำการขนย้ายนั้น มีปริมาณเม็ดเลือดรวมไม่ได้แตกต่างจากกุ้งกลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$) แต่กุ้งขาวแวนนาไมที่ไม่ได้รับสารไอโซยูจินอลก่อนการขนย้ายมีปริมาณเม็ดเลือดรวมแตกต่างจากกุ้งกลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P > 0.05$) (ตารางที่ 11) อย่างไรก็ตามปริมาณเม็ดเลือดรวมของกุ้งขาวแวนนาไมในกลุ่มที่ได้รับสารไอโซยูจินอลก่อนทำการขนย้าย และไม่ได้รับสารไอโซยูจินอล พบว่าไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ที่ระยะเวลา 6, 12, 24 และ 48 ชั่วโมง หลังจากการขนย้ายกุ้ง

ตารางที่ 11 ปริมาณเม็ดเลือดรวม ($\times 10^5$ เซลล์ต่อมิลลิลิตร) ของกึ่งขาวแวนนาไม เมื่อได้รับสารไอโซยูจินอล 95 พีพีเอ็ม ภายในระยะเวลา 2 นาที่ก่อนการขนย้าย และไม่ได้รับสารไอโซยูจินอลก่อนการขนย้าย ที่ระยะเวลา 0, 6, 12, 24 และ 48 ชั่วโมง

ระยะเวลา (ชั่วโมง)	THC ($\times 10^5$ เซลล์ต่อมิลลิลิตร)		
	กลุ่มควบคุม	กลุ่มการทดลองที่ได้รับสารไอโซยูจินอล	กลุ่มการทดลองที่ไม่ได้รับสารไอโซยูจินอล
0	170.52 ± 5.48^a	169.70 ± 6.33^a	135.49 ± 3.86^b
6	170.52 ± 5.48^a	165.48 ± 14.79^a	167.03 ± 12.88^a
12	170.52 ± 5.48^a	170.82 ± 5.47^a	165.77 ± 10.44^a
24	170.52 ± 5.48^a	171.52 ± 5.48^a	170.67 ± 6.32^a
48	170.52 ± 5.48^a	165.03 ± 15.79^a	166.05 ± 14.09^a

หมายเหตุ: ค่าเฉลี่ยที่กำกับด้วยอักษรแตกต่างกันในแถวเดียวกัน หมายถึงมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$)

2) กิจกรรมการทำลายแบคทีเรียของน้ำเลือดกึ่งขาวแวนนาไม

กิจกรรมการทำลายแบคทีเรียของน้ำเลือดกึ่งในกลุ่มควบคุมซึ่งเป็นกึ่งก่อนการขนย้ายมีค่าอัตราส่วนการเจือจางต่ำที่สุดของซีรัมที่สามารถลดปริมาณเชื้อของแบคทีเรีย 50 เปอร์เซ็นต์เท่ากัน คือ 1:4 ภายหลังการขนย้ายกึ่งแล้วตรวจสอบกิจกรรมการทำลายแบคทีเรียของน้ำเลือดกึ่งทันทีพบว่า กึ่งกลุ่มที่ได้รับสารไอโซยูจินอล 95 พีพีเอ็ม เป็นระยะเวลา 2 นาที่ก่อนการขนย้าย และไม่ได้รับสารไอโซยูจินอลก่อนการขนย้าย พบว่ามีค่าอัตราส่วนการเจือจางต่ำที่สุดของซีรัมที่สามารถลดปริมาณเชื้อของแบคทีเรีย 50 เปอร์เซ็นต์เท่ากัน คือ 1:4 ซึ่งไม่มีความแตกต่างจากกลุ่มควบคุม (ตารางที่ 12) อย่างไรก็ตามกิจกรรมการทำลายแบคทีเรียของน้ำเลือดกึ่งขาวแวนนาไมในกลุ่มที่ได้รับสารไอโซยูจินอลก่อนขนย้าย และกลุ่มที่ไม่ได้รับสารไอโซยูจินอล พบว่าไม่มีความแตกต่างกัน ที่ระยะเวลา 6, 12, 24 และ 48 ชั่วโมง ภายหลังจากการขนย้ายกึ่ง

ตารางที่ 12 ความเข้มข้นของซีรัมของกุ้งขาวแวนนาไมที่สามารถลดปริมาณเชื้อ *Vibrio harveyi* ได้ 50 เปอร์เซ็นต์ เมื่อเทียบกับกุ้งขาวแวนนาไมในกลุ่มที่ได้สารไอโซยูจินอล 95 พีพีเอ็ม ภายในระยะเวลา 2 นาที่ก่อนการขนย้าย และไม่ได้รับสารไอโซยูจินอล ก่อนการขนย้ายที่ระยะเวลา 0, 6, 12, 24 และ 48 ชั่วโมง

ระยะเวลา (ชั่วโมง)	กิจกรรมการทำลายแบคทีเรียของน้ำเลือดกุ้ง		
	กลุ่มควบคุม	กลุ่มการทดลองที่ได้รับ สารไอโซยูจินอล	กลุ่มการทดลองที่ไม่ได้รับ สารไอโซยูจินอล
0	1:4	1:4	1:4
6	1:4	1:4	1:4
12	1:4	1:4	1:4
24	1:4	1:4	1:4
48	1:4	1:4	1:4

หมายเหตุ: ค่าเฉลี่ยที่กำกับด้วยอักษรแตกต่างกันในแถวเดียวกัน หมายถึงมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$)

3) กิจกรรมของกระบวนการกลืนกินสิ่งแปลกปลอมของเม็ดเลือดกุ้งขาวแวนนาไม

การทดสอบกิจกรรมของกระบวนการกลืนกินสิ่งแปลกปลอมของเม็ดเลือดกุ้งกลุ่มควบคุม มีเปอร์เซ็นต์ของกระบวนการกลืนกินสิ่งแปลกปลอมของเม็ดเลือดกุ้งเท่ากับ 33.37 ± 7.27 เปอร์เซ็นต์ ภายหลังการขนย้ายกุ้งแล้วตรวจสอบกิจกรรมของกระบวนการกลืนกินสิ่งแปลกปลอมของเม็ดเลือดกุ้งทันทีพบว่า กลุ่มที่ได้รับสารไอโซยูจินอล 95 พีพีเอ็ม เป็นระยะเวลา 2 นาที่ มีเปอร์เซ็นต์ของกระบวนการกลืนกินสิ่งแปลกปลอมของเม็ดเลือดกุ้งเท่ากับ 32.00 ± 6.50 เปอร์เซ็นต์ และกุ้งกลุ่มที่ไม่ได้รับสารไอโซยูจินอลมีเปอร์เซ็นต์ของกระบวนการกลืนกินสิ่งแปลกปลอมของเม็ดเลือดกุ้งเท่ากับ 25.97 ± 5.04 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งกุ้งขาวแวนนาไมที่ได้รับสารไอโซยูจินอลก่อนการขนย้ายนั้น มีเปอร์เซ็นต์ของกระบวนการกลืนกินสิ่งแปลกปลอมของเม็ดเลือดไม่ได้แตกต่างจากกุ้งกลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$) แต่กุ้งขาวแวนนาไมที่ไม่ได้รับสารไอโซยูจินอล

ก่อนการขนย้ายมีเปอร์เซ็นต์ของกระบวนการกลั่นกินสิ่งแปลกปลอมของเม็ดเลือดแตกต่างจากกึ่งกลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P>0.05$) (ตารางที่ 13) อย่างไรก็ตามกิจกรรมของกระบวนการกลั่นกินสิ่งแปลกปลอมของเม็ดเลือดกึ่งขาวเวนนาไม่ในกลุ่มที่ได้รับสารไอโซยูจินอลก่อนการขนย้าย และไม่ได้รับสารไอโซยูจินอล พบว่าไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ที่ระยะเวลา 6, 12, 24 และ 48 ชั่วโมง หลังจากทำการขนย้ายกึ่ง

ตารางที่ 13 ร้อยละของเม็ดเลือดของกึ่งขาวเวนนาไม่ที่เกิดการกลั่นกินสิ่งแปลกปลอม เมื่อได้รับสารไอโซยูจินอล 95 พีพีเอ็ม ภายในระยะเวลา 2 นาทีก่อนการขนย้าย และไม่ได้รับสารไอโซยูจินอลก่อนการขนย้าย ที่ระยะเวลา 0, 6, 12, 24 และ 48 ชั่วโมง

ระยะเวลา (ชั่วโมง)	ร้อยละของเม็ดเลือดกึ่งขาวเวนนาไม่ที่เกิดการกลั่นกินสิ่งแปลกปลอม		
	กลุ่มควบคุม	กลุ่มการทดลองที่ได้รับ สารไอโซยูจินอล	กลุ่มการทดลองที่ไม่ได้รับ สารไอโซยูจินอล
0	33.37 ± 7.27^a	32.00 ± 6.50^a	25.97 ± 5.04^b
6	33.37 ± 7.27^a	31.77 ± 6.00^a	34.00 ± 4.23^a
12	33.37 ± 7.27^a	33.07 ± 5.71^a	33.80 ± 4.94^a
24	33.37 ± 7.27^a	33.03 ± 5.69^a	34.40 ± 5.10^a
48	33.37 ± 7.27^a	32.87 ± 5.65^a	34.10 ± 4.90^a

หมายเหตุ: ค่าเฉลี่ยที่กำกับด้วยอักษรแตกต่างกันในแถวเดียวกัน หมายถึงมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.05$)

4) กิจกรรมของเอนไซม์ phenoloxidase

กิจกรรมของเอนไซม์ phenoloxidase ในกลุ่มควบคุมซึ่งเป็นกึ่งก่อนการขนย้าย มีค่าปริมาณเอนไซม์ phenoloxidase เท่ากับ 343.67 ± 72.66 หน่วย/นาที่/มิลลิกรัม โปรตีน ภายหลังการขนย้ายกึ่งแล้วตรวจสอบค่าปริมาณเอนไซม์ phenoloxidase ทันทีพบว่ากลุ่มที่ได้รับสารไอโซยูจินอล 95 พีพีเอ็ม ภายในระยะเวลา 2 นาที มีปริมาณเอนไซม์ phenoloxidase ของกึ่งเท่ากับ 330.00 ± 65.02

หน่วย/นาทีก/มิลลิกรัม โปรตีน และกึ่งกลุ่มที่ไม่ได้รับสารไอโซยูจินอลมีปริมาณเอนไซม์ phenoloxidase ของกึ่งเท่ากับ 269.67 ± 50.41 หน่วย/นาทีก/มิลลิกรัม โปรตีน ซึ่งกึ่งขาวแวนนาไมที่ได้รับสารไอโซยูจินอลก่อนการขนย้ายนั้น มีค่าปริมาณเอนไซม์ phenoloxidase ไม่ได้แตกต่างจากกึ่งกลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$) แต่กึ่งขาวแวนนาไมที่ไม่ได้รับสารไอโซยูจินอลก่อนการขนย้ายมีปริมาณเอนไซม์ phenoloxidase แตกต่างจากกึ่งกลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P > 0.05$) (ตารางที่ 14) อย่างไรก็ตามปริมาณเอนไซม์ phenoloxidase ของกึ่งขาวแวนนาไมในกลุ่มที่ได้รับสารไอโซยูจินอลก่อนการขนย้าย และไม่ได้รับสารไอโซยูจินอล พบว่าไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ที่ระยะเวลา 6, 12, 24 และ 48 ชั่วโมง หลังจากทำการขนย้ายกึ่ง

ตารางที่ 14 ปริมาณเอนไซม์ phenoloxidase ของกึ่งขาวแวนนาไม เมื่อได้รับสารไอโซยูจินอล 95 พีพีเอ็ม ภายในระยะเวลา 2 นาทีก่อนการขนย้าย และไม่ได้รับสารไอโซยูจินอลก่อนการขนย้าย ที่ระยะเวลา 0, 6, 12, 24 และ 48 ชั่วโมง

ระยะเวลา (ชั่วโมง)	Phenoloxidase activity (หน่วย/นาทีก/มิลลิกรัม โปรตีน)		
	กลุ่มควบคุม	กลุ่มการทดลองที่ได้รับ สารไอโซยูจินอล	กลุ่มการทดลองที่ไม่ได้รับ สารไอโซยูจินอล
0	343.67 ± 72.66^a	330.00 ± 65.02^a	269.67 ± 50.41^b
6	343.67 ± 72.66^a	327.67 ± 60.04^a	350.00 ± 42.35^a
12	343.67 ± 72.66^a	340.67 ± 57.05^a	348.00 ± 49.37^a
24	343.67 ± 72.66^a	340.33 ± 56.90^a	354.00 ± 51.03^a
48	343.67 ± 72.66^a	338.67 ± 56.49^a	351.67 ± 53.95^a

หมายเหตุ: ค่าเฉลี่ยที่กำกับด้วยอักษรแตกต่างกันในแถวเดียวกัน หมายถึงมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$)

5) การศึกษาการผลิตเอนไซม์ superoxide dismutase

จากการศึกษาการผลิตเอนไซม์ superoxide dismutase ในกลุ่มควบคุมซึ่งเป็นกึ่งก่อนการขนย้ายมีปริมาณเอนไซม์ superoxide dismutase เท่ากับ 37.04 ± 8.07 หน่วย SOD/มิลลิลิตร ภายหลังการขนย้ายกึ่งแล้วศึกษาการผลิตเอนไซม์ superoxide dismutase ทันทีพบว่า กลุ่มที่ได้รับสารไอโซ ยูจินอล 95 พีพีเอ็ม ภายในระยะเวลา 2 นาที มีปริมาณเอนไซม์ superoxide dismutase ของกึ่งเท่ากับ 35.52 ± 7.22 หน่วย SOD/มิลลิลิตร และกึ่งกลุ่มที่ไม่ได้รับสารไอโซยูจินอลมีปริมาณเอนไซม์ superoxide dismutase ของกึ่งเท่ากับ 29.15 ± 5.55 หน่วย SOD/มิลลิลิตร ซึ่งกึ่งขาวแวนนาไมที่ได้รับสารไอโซยูจินอลก่อนการขนย้ายนั้น มีปริมาณเอนไซม์ superoxide dismutase ไม่ได้แตกต่างจากกึ่งกลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$) แต่กึ่งขาวแวนนาไมที่ไม่ได้รับสารไอโซยูจินอลก่อนการขนย้ายมีปริมาณเอนไซม์ superoxide dismutase แตกต่างจากกึ่งกลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P > 0.05$) (ตารางที่ 15) อย่างไรก็ตามปริมาณเอนไซม์ superoxide dismutase ของกึ่งขาวแวนนาไมในกลุ่มที่ได้รับสารไอโซยูจินอลก่อนการขนย้าย และไม่ได้รับสารไอโซยูจินอล พบว่าไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ที่ระยะเวลา 6, 12, 24 และ 48 ชั่วโมง หลังจากการขนย้ายกึ่ง

ตารางที่ 15 ปริมาณเอนไซม์ superoxide dismutase ของกุ้งขาวแวนนาไม เมื่อได้รับสารไอโซยูจินอล 95 พีพีเอ็ม ภายในระยะเวลา 2 นาที่ก่อนการขนย้าย และไม่ได้รับสารไอโซยูจินอลก่อนการขนย้าย ที่ระยะเวลา 0, 6, 12, 24 และ 48 ชั่วโมง

ระยะเวลา (ชั่วโมง)	การผลิตเอนไซม์ superoxide dismutase (หน่วย SOD/มิลลิลิตร)		
	กลุ่มควบคุม	กลุ่มการทดลองที่ได้รับ สารไอโซยูจินอล	กลุ่มการทดลองที่ไม่ได้รับ สารไอโซยูจินอล
0	37.04 ± 8.07 ^a	35.52 ± 7.22 ^a	29.15 ± 5.55 ^b
6	37.04 ± 8.07 ^a	35.26 ± 6.66 ^a	37.74 ± 4.70 ^a
12	37.04 ± 8.07 ^a	36.70 ± 6.33 ^a	37.52 ± 5.48 ^a
24	37.04 ± 8.07 ^a	36.67 ± 6.32 ^a	38.18 ± 5.66 ^a
48	37.04 ± 8.07 ^a	36.48 ± 6.27 ^a	37.66 ± 6.77 ^a

หมายเหตุ: ค่าเฉลี่ยที่กำกับด้วยอักษรแตกต่างกันในแถวเดียวกัน หมายถึงมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$)

จากผลการศึกษาการตอบสนองทางภูมิคุ้มกันแบบไม่จำเพาะของกุ้งขาวแวนนาไมที่ได้รับสารไอโซยูจินอลและระยะเวลาพักฟื้นที่ 0, 6, 12, 24 และ 48 ชั่วโมง ทุกพารามิเตอร์พบว่าหลังจากการขนย้าย พบว่า กุ้งที่ได้รับยาสลบมีระดับภูมิคุ้มกันไม่แตกต่างจากกุ้งก่อนการเคลื่อนย้ายอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P > 0.05$) แต่แตกต่างจากกุ้งที่ไม่ได้รับยาสลบอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$) อย่างไรก็ตามระดับภูมิคุ้มกันของกุ้งขาวแวนนาไมในกลุ่มที่ได้รับยาสลบ และไม่ได้รับยาสลบ ไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ที่ระยะเวลา 6, 12, 24 และ 48 ชั่วโมงหลังการขนย้ายกุ้ง แสดงให้เห็นว่าไอโซยูจินอลไม่มีผลต่อระบบภูมิคุ้มกันแบบไม่จำเพาะเจาะจงของกุ้งแม้ว่าจะใช้ในระดับที่มีความเข้มข้นสูง ซึ่งทำให้กุ้งสลบได้ภายในเวลา 2 นาทีก็ตาม ในขณะที่กุ้งกลุ่มที่ไม่ได้รับยาสลบก่อนการขนย้ายที่มีผลทำให้กุ้งเครียดส่งผลกระทบต่อระดับภูมิคุ้มกันของกุ้งลดลงเกือบทุกพารามิเตอร์ที่ทำการศึกษา

Iversen (2003) รายงานว่า การใช้สารละลาย AQUI-S™ มากกว่า 20 มิลลิกรัมต่อลิตร สามารถยับยั้งการหลั่ง cortisol ในน้ำเลือดของปลาได้ เนื่องจาก cortisol ส่งผลทำให้ภูมิคุ้มกันของปลาต่ำลง และยอมรับการติดเชื้อได้ง่ายขึ้น ซึ่งสอดคล้องกับการศึกษาของ Small (2005) พบว่า เมื่อทดสอบประสิทธิภาพของยาสลบ AQUI-S™ ในการสลบปลา channel catfish ด้วยความเข้มข้น 40 มิลลิกรัม/ลิตร พบว่าในน้ำเลือดจะพบค่า lactatae และ chloride ต่ำ ซึ่งแสดงให้เห็นว่ายาสลบ AQUI-S™ สามารถลดความเครียดที่เกิดขึ้นในระหว่างการ handling ได้

นอกจากนี้ยังสอดคล้องกับการศึกษาของ Bosworth *et al.* (2007) ศึกษาผลกระทบด้านสรีรวิทยาและคุณภาพของเนื้อปลา *Ictalurus punctatus* ที่ได้รับยาสลบ AQUI-S™ พบว่า ปลาที่ได้รับยาสลบ AQUI-S™ 25 และ 35 มิลลิกรัมต่อลิตร ในน้ำเลือดมีค่า lactate, cortisol และ glucose ต่ำ และในน้ำเลือดจะมีค่าพีเอชสูงกว่าปลากลุ่มที่ไม่ได้รับยาสลบ AQUI-S™

Iversen and Eliassen (2009) ศึกษาผลของยาสลบ AQUI-S™ 5.0 มิลลิกรัมต่อลิตร เปรียบเทียบกับกลุ่มที่ไม่ได้รับยาสลบสลบที่มีผลต่อ primary stress (cortisol), secondary stress (osmoregulation) และ tertiary stress (ตาย) ของลูกปลาแซลมอน, *Salmo salar* L. พบว่า ในขณะที่มีการขนส่งลูกปลาแซลมอนกลุ่มที่ได้รับยาสลบและไม่ได้รับยาสลบลูกปลาจะมีความเครียดแบบ primary stress (cortisol) ทั้ง 2 กลุ่มการทดลอง แต่ลูกปลาแซลมอนกลุ่มที่ได้รับยาสลบจะมีอัตราการตายต่ำกว่าลูกปลากลุ่มที่ไม่ได้รับยาสลบ ซึ่งตลอดการขนส่งจะไม่พบความเครียดแบบ secondary stress (osmoregulation)

Elwood *et al.* (2009) ศึกษาอาการต่างๆ ที่แสดงถึงความเครียดในสัตว์น้ำกลุ่ม crustacean พบว่าเมื่อสัตว์น้ำกลุ่ม crustacean เกิดความเครียดจะมีการตอบสนองทางระบบภูมิคุ้มกันในน้ำเลือด (hormonal responses) ซึ่งมีหน้าที่คล้ายกับ glucocorticoid ในสัตว์มีกระดูกสันหลัง

Taylor *et al.* (2004) พบว่า การใช้ยาสลบ Xylocaine® สามารถลดความเครียดในระหว่างการตัดก้านตากุ้งขาวแวนนาไมเพศเมียได้และกุ้งมีอัตราการรอด 100 เปอร์เซ็นต์

Mercier *et al.* (2009) ศึกษาอัตราการเผาผลาญ (glucose, lactate, total protein, chloesterol, triglyceride, total lipid, hemocyanin และ carotenoid content) และระดับภูมิคุ้มกัน (ปริมาณเม็ดเลือดรวม, การผลิตเอนไซม์ superoxide anion และการผลิตเอนไซม์ superoxide dismutase) ของกุ้ง

L. vannamei ที่เลี้ยงภายในถังคอนกรีตกลางแจ้งและที่เลี้ยงภายในถังพลาสติกในร่มซึ่งทั้ง 2 กลุ่ม การทดลองนั้นได้รับความเครียดซ้ำจากการ handling เป็นระยะเวลา 4 สัปดาห์เปรียบเทียบกับกลุ่มที่ไม่ได้รับความเครียด ผลการศึกษาพบว่ากุ้งที่เลี้ยงภายในถังคอนกรีตกลางแจ้งมีค่าความเข้มข้นของ total protein, triglyceride และ total lipid ในน้ำเลือดต่ำ และมีค่าความเข้มข้นของ carbohydrates ในกล้ามเนื้อต่ำอย่างมีนัยสำคัญ กุ้งที่เลี้ยงภายในถังพลาสติกในร่มมีค่าความเข้มข้นของ glucose และ total lipid สูงในน้ำเลือด แต่พบ carbohydrates ในตับต่ำ การศึกษาระดับภูมิคุ้มกันของกุ้งที่เลี้ยงภายในถังคอนกรีตกลางแจ้งและที่เลี้ยงภายในถังพลาสติกในร่มซึ่งทั้ง 2 กลุ่ม การทดลองเมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มที่ไม่ได้รับความเครียดนั้นพบว่าไม่มีความแตกต่างกัน และในการทดลองให้กุ้งได้รับความเครียดซ้ำจากการ handling เป็นระยะเวลา 4 สัปดาห์พบว่าไม่มีผลทำให้ระดับภูมิคุ้มกันของกุ้งลดลง

Saydmohammed and Pal (2009) ศึกษาการใช้สารยูจินอล และ เมน โทลเพื่อลดความเครียดที่เกิดจากการ handling กับกุ้งก้ามกราม (*Macrobrachium rosenbergii*) พบว่ากุ้งกลุ่มที่ได้รับยาสดับมีระดับ glycogen และ acetylcholine esterase (AchE) ต่ำ

สรุปและข้อเสนอแนะ

สรุป

1. ความเป็นพิษเฉียบพลันของสารไอโซยูจินอลต่อลูกกุ้งขาวแวนนาไมระยะโพสลาร์ว่า 8-10 ที่ระดับความเค็ม 5, 15 และ 25 พีพีที พบว่า ค่า LC_{50} ที่ 48 ชั่วโมง มีค่าเท่ากับ 19.93 (17.53-22.33), 20.58 (18.75-22.43) และ 22.53 (21.88-23.18) พีพีเอ็ม ตามลำดับ ความเค็มของน้ำมีผลต่อค่าความเป็นพิษของสารไอโซยูจินอลคือ ถ้าความเค็มของน้ำต่ำค่าความเป็นพิษของสารจะสูงขึ้นในทางตรงกันข้าม ถ้าความเค็มของน้ำเพิ่มสูงขึ้นความเป็นพิษของสารก็จะต่ำลง

3. ความเข้มข้นของสารไอโซยูจินอลที่เหมาะสมกับกุ้งขาวแวนนาไมขนาด 15-20 กรัม เพื่อให้กุ้งสลบภายในเวลา 2 นาที ก่อนการขนย้ายมีค่าเท่ากับ 95 พีพีเอ็ม และความเข้มข้นที่เหมาะสมในการทำให้กุ้งขาวแวนนาไมสลบในเวลาประมาณ 10 นาที มีค่าเท่ากับ 70 พีพีเอ็ม

4. ระยะเวลาพักฟื้นของกุ้งจะเพิ่มขึ้นตามความเข้มข้นของสารและระยะเวลาที่สัมผัส คือ ความเข้มข้นของสารไอโซยูจินอลที่ทำให้กุ้งสลบภายใน 2 นาที มีค่าเท่ากับ 95 พีพีเอ็ม กุ้งจะฟื้นตัวจากการสลบภายในระยะเวลา 7.81 ± 3.09 นาที และที่ความเข้มข้นของสารไอโซยูจินอลที่ทำให้กุ้งสลบภายใน 10 นาที มีค่าเท่ากับ 70 พีพีเอ็ม กุ้งจะฟื้นตัวจากการสลบภายในระยะเวลา 11.98 ± 5.28 นาที

5. ค่าเสื่อมของสารไอโซยูจินอลที่ตั้งทิ้งไว้ที่ระยะเวลา 3, 6, 12, 24 และ 48 ชั่วโมงที่อุณหภูมิห้อง (28 ± 1 องศาเซลเซียส) พบว่า ที่ระยะเวลาที่ 0 ชั่วโมงที่ไม่ได้มีการตั้งสารทิ้งไว้นั้นที่ความเข้มข้น 95 พีพีเอ็ม สามารถทำให้กุ้งสลบได้รวดเร็วภายในระยะเวลา 2.00 ± 0.00 นาที ที่ระยะเวลา 3, 6, 12, 24 และ 48 ชั่วโมงที่ได้ตั้งสารทิ้งไว้กุ้งต้องใช้เวลาเพิ่มขึ้นจึงจะสลบโดยใช้เวลา 4.41 ± 1.52 , 5.87 ± 1.76 , 7.58 ± 2.84 , 8.09 ± 3.07 และ 11.14 ± 4.84 นาที ตามลำดับ

6. ค่าเสื่อมของสารไอโซยูจินอลที่ตั้งทิ้งไว้ที่ระยะเวลา 3, 6, 12, 24 และ 48 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิ 23-25 องศาเซลเซียส พบว่าถ้าเตรียมสารละลายไอโซยูจินอลเข้มข้น 95 พีพีเอ็มแล้วใช้ทันที สามารถทำให้กุ้งสลบได้รวดเร็วภายในระยะเวลา 2.00 ± 0.00 นาที ถ้าทิ้งไว้นาน 3, 6, 12, 24 และ 48 ชั่วโมง จะทำให้กุ้งสลบได้ภายในระยะเวลา 4.42 ± 1.55 , 5.56 ± 1.99 , 7.09 ± 2.58 , 8.19 ± 2.63 และ 9.35 ± 3.26 นาที ตามลำดับ

7. จากการศึกษาอัตราค่าเสื่อมของสารไอโซยูจินอลในการใช้สารซ้ำต่อการเตรียมสารไอโซยูจินอล 1 ครั้ง เพื่อทำการสลบกุ้งขาวแวนนาไม พบว่าในครั้งแรกของการใช้สารไอโซยูจินอลความเข้มข้น 95 พีพีเอ็ม ใช้เวลาในการสลบเท่ากับ 2.00 ± 0.00 นาที และในการใช้สารไอโซยูจินอลครั้งที่ 2, 3, 4, 5, 6, 7 และ 8 ใช้ระยะเวลาในการสลบเท่ากับ 2.85 ± 0.57 , 4.22 ± 1.07 , 8.11 ± 2.33 , 13.96 ± 3.59 , 20.11 ± 2.34 , 25.22 ± 5.00 และ 31.50 ± 4.83 นาที ตามลำดับ การใช้สารไอโซยูจินอลซ้ำตั้งแต่ครั้งที่ 3 นั้นจะใช้เวลาในการสลบมากกว่า 2 นาที ซึ่งถ้าใช้สารไอโซยูจินอลที่เตรียมเพียง 1 ครั้งเพื่อทำให้กุ้งสลบภายในเวลาเท่าเดิมหรือใกล้เคียง ควรที่จะใช้สารซ้ำต่อการเตรียมสาร 1 ครั้ง หรือ 2 ครั้งเท่านั้น แต่ถ้าต้องการใช้สารเดิมเพื่อทำการสลบกุ้งควรที่จะมีการเติมสารไอโซยูจินอลเพิ่มลงไปเพื่อที่จะทำให้กุ้งมีการสลบได้รวดเร็วภายในระยะเวลา 2 นาที

8. เมื่อนำความเข้มข้นที่ใช้ในการขนย้ายกุ้งระยะสั้น (95 พีพีเอ็ม) นำไปใช้เพื่อขนย้ายกุ้งจากถังเลี้ยงไปยังตู้กระจกและวัดระดับภูมิคุ้มกัน (ปริมาณเม็ดเลือดรวม, กระบวนการกลืนกินสิ่งแปลกปลอม, ความว่องไวของเอนไซม์ phenoloxidase, กิจกรรมการทำลายแบคทีเรียของน้ำเลือดกุ้ง, การผลิตเอนไซม์ superoxide dismutase) ที่ระยะเวลา 0, 6, 12, 24 และ 48 ชั่วโมง หลังจากการเคลื่อนย้าย พบว่า กุ้งที่ได้รับยาสลบมีระดับภูมิคุ้มกันไม่แตกต่างจากกุ้งกลุ่มควบคุมก่อนการขนย้ายอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P > 0.05$) แต่แตกต่างจากกุ้งที่ไม่ได้รับยาสลบอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$) อย่างไรก็ตามระดับภูมิคุ้มกันของกุ้งในกลุ่มที่ได้รับยาสลบ และไม่ได้รับยาสลบ ไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ที่ระยะเวลา 6, 12, 24 และ 48 ชั่วโมงหลังการขนย้ายกุ้ง

ข้อเสนอแนะ

1. ไอโซยูจินอลสามารถใช้ในการลดความเครียดของกุ้งในระหว่างการขนย้ายได้ โดยพิจารณาจากระบบภูมิคุ้มกันของกุ้งที่แตกต่างจากกุ้งปกติก่อนการทดลอง

2. ในการเตรียมสารละลายไอโซยูจินอล เพื่อที่จะใช้สลบกุ้งนั้น ควรมีการเตรียมใหม่ทุกครั้งที่จะใช้ ไม่ควรเตรียมสารทิ้งไว้เป็นเวลานานก่อนนำมาใช้

3. การลำเลียงขนส่งกุ้งขาวแวนนาไมจำนวนมากในระยะทางไกลและใช้เวลาในการขนส่งนาน นอกจากวิธีการขนส่งแบบโดยใช้วิธีการอัดออกซิเจนและลดอุณหภูมิในการขนส่งแล้วนั้น อาจจะมีการใช้ยาสลบเพื่อลดเมแทบอลิซึมของกุ้ง และปฏิกิริยาในการตอบสนองต่อสิ่งรบกวนภายนอกจะทำให้กุ้งเครียดน้อยลง อัตราการรอดตายสูงขึ้นด้วย

เอกสารและสิ่งอ้างอิง

กิจการ สุภมาตย์,สุภาพ เกียรติทับทิว และ Rudlf Hoffmann. 2543 ก. ระบบภูมิคุ้มกันโรคในกุ้ง
 กุลาคำ: III. การศึกษาทางจุลทรรศน์อิเล็กตรอนของเม็ดเลือดกุ้งกุลาคำ. ว. สงขลา
 นครินทร์ . ฉบับวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี 22 (ฉบับพิเศษ): 589-596.

_____, จีรพร เรืองศรี ,สุภฎา คีรีรัฐนิคม และนเรศ ช้วนยุค . 2543 ข . ระบบภูมิคุ้มกันโรคในกุ้ง
 กุลาคำ: V. ผลของอุณหภูมิ ปริมาณ ออกซิเจนละลายน้ำและความเป็นกรด-ด่างของน้ำต่อ
 ระบบภูมิคุ้มกันโรคและองค์ประกอบเลือดในกุ้งกุลาคำ . ว. สงขลานครินทร์ . ฉบับ
 วิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี 22 (ฉบับพิเศษ): 605-613.

_____, จีรพร เรืองศรี ,สุภฎา คีรีรัฐนิคม และนเรศ ช้วนยุค . 2543 ค . ระบบภูมิคุ้มกันโรคในกุ้ง
 กุลาคำ: VII. องค์ประกอบเลือดและระบบภูมิคุ้มกันโรคในกุ้งกุลาคำบนพื้นฐานของเพศ
 และวงจรการลอกคราบ . ว. สงขลานครินทร์. ฉบับวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี 22 (ฉบับ
 พิเศษ): 623-632.

_____, วุฒิพร พรหมขุนทอง ,สุติมา ตันติภักดี และ Rudlf Hoffmann. 2543 ง. ภูมิคุ้มกันโรคใน
 กุ้งกุลาคำ: II. เซลล์และเนื้อเยื่อที่เกี่ยวข้องกับการกำจัดสิ่งแปลกปลอมในกุ้งกุลาคำ . ว.
 สงขลานครินทร์. ฉบับวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี 22 (ฉบับพิเศษ): 581-588.

_____, อุษณีย์ เอกปนิธานพงศ์, Toshiaki Itami และ จิราพร เกสรจันทร์. 2543 จ. ระบบ
 ภูมิคุ้มกันโรคในกุ้งกุลาคำ: I. เทคนิคในการศึกษาระบบภูมิคุ้มกันโรคและองค์ประกอบ
 เลือดในกุ้งกุลาคำ. ว. สงขลานครินทร์. ฉบับวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี 22 (ฉบับพิเศษ):
 567-580.

ฉวีวรรณ หนูนน. 2553. ยาสลบในปลา . แหล่งที่มา: [http://www.nicaonline.com/articles7/
 site/view_article.asp?idarticle=118](http://www.nicaonline.com/articles7/site/view_article.asp?idarticle=118), 12 มีนาคม 2553.

ชลอ ลิ้มสุวรรณ และ พรเลิศ จันทรรักษ์กุล . 2547. อุตสาหกรรมการเลี้ยงกุ้งในประเทศไทย .

สนับสนุนการจัดการพิมพ์โดยสำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ เพื่อเฉลิมพระเกียรติพระบาทสมเด็จพระเจ้าอยู่หัวภูมิพลอดุลยเดช เนื่องในวโรกาสพระราชพิธีมหามงคลเฉลิมพระชนมพรรษา 5 ธันวาคม พ.ศ . 2547 . บริษัทเมจิก พับบลิชัน จำกัด.

ชัยชาญ ไตรศรีศิลป์. 2545 . ฟีนอลออกซิเดสที่เกี่ยวข้องกับระบบภูมิคุ้มกันในกุ้งกุลาดำ โรคกุ้งกุลาดำ *Penaeus monodon*. วิทยานิพนธ์ปริญญาโท, จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.

ทวีศักดิ์ ศรีชนะ. 2547. องค์ประกอบบางประการของระบบภูมิคุ้มกันในน้ำเลือดของกุ้งกุลาดำ (*Penaeus monodon* Fabricius) ที่ระยะต่างๆ . วิทยานิพนธ์ปริญญาโท, มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

พรวดี เลาหะมงคลรักษ์. 2549. การใช้วิตามินซีเป็นสารกระตุ้นภูมิคุ้มกันในกุ้งกุลาดำ . วิทยานิพนธ์ปริญญาโท, มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

พรณวไล จันทรปาน. 2551. การเจริญเติบโต การรอดตาย และระบบภูมิคุ้มกันของกุ้งขาวแวนนาไม (*Litopenaeus vannamei*) ที่ได้รับอาหารผสม AQUANIN PLUS (Beta-Cyclodextrin Cystemine Hydrochloride). วิทยานิพนธ์ปริญญาโท, มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

วัชรียา ภูริวิโรจน์กุล. 2547. ระบบภูมิคุ้มกันโรคของกุ้ง, น. 48-64 . ใน การฝึกอบรมเชิงปฏิบัติการ เรื่อง การวินิจฉัยและการป้องกันโรคสัตว์น้ำ. ภาควิชาเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำ คณะประมง มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

สมบัติ รักประธานพร . 2542. การเสริมภูมิคุ้มกันโรคในกุ้งกุลาดำ *Penaeus monodon* ด้วย *Bacillus* สายพันธุ์ S11. วิทยานิพนธ์ปริญญาโท, จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.

เสาวลักษณ์ อ่อนมิ่ง . 2550. การสืบค้นยีนที่เกี่ยวข้องกับระบบภูมิคุ้มกันโดยใช้เทคนิค Expressed Sequence Tags (ESTs) ในเซลล์เม็ดเลือดของกุ้งก้ามกรามปกติและกุ้งที่ได้รับเบต้ากลูแคนในอาหาร . วิทยานิพนธ์ปริญญาโท, มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

อนันต์ชัย เขื่อนธรรม. 2542. **หลักการวางแผนการทดลอง**. ภาควิชาสถิติ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ. 350 น.

Amani, A.Y. and C.M. James. 2007. Anesthetics in aquaculture : the emerging popularity of clove oil. **Aquaculture AsiaPacific Magazine**. September-October 2007: 32-34.

APHA, AWWA and AWCA. 1995. **Standard Methods for Examination Water and Wastewater**. 20th ed. United Book Press, Maryland.

Aspan, A., M. Hall and K. Soderhall. 1990. The effect of endogeneous proteinase inhibitors on the prophenoloxidase activating enzyme, a serine proteinase from crayfish haemocytes. **Insect Biochem.** 20: 485-492.

Bachère, E., D. Destoumieux and P. Bulet. 2004. Penaeidins, antimicrobial peptide of shrimp: a comparison with other effect of innate immunity. **Aquaculture** 191: 71-81.

Bosworth, B.G., B.C. Small, D. Gregory, J. Kim, S. Black and A. Jerrett. 2007. Effect of rested-harvest using the anesthetic AQUI-STM on channel catfish, *Ictalurus punctatus*, physiology and fillet quality. **Aquaculture** 262: 302-318.

Brown, P.B., M.R. White, J. Chaille, M. Russel and C. Oseto. 1996. Evaluation of three anesthetic agents for crayfish (*Oronectes viris*). **J. Shellfish Res.** 15(2): 433-435.

Chen, J.C. and S.Y. Cheng 1993. Studies on hemocyanin and haemolymph protein levels of *Penaeus japonicus* based on sex, size and moulting cycle. **Comp. Biochem. Physiol.** 106: 293-296.

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

- Coyle, S.D., D. Siddhartha, J. H. Tidwell, B. Thomas, L.A. Bright and D.K. Yasharian. 2005. Comparative efficacy of anesthetics for the freshwater prawn (*Macrobrachium rosenbergii*). **J. World Aquacult. Soc.** 36 (3): 282-290.
- Cuthbertson, B.J., E.F. Shepard, R.W. Chapman and P.S. Gross. 2002. Diversity of the penaeid in antimicrobial peptides in two shrimp species. **Immunogenetics** 54: 442-445.
- Davidson, G.W., P.S. Davie, G. Young and R.T. Fowler. 2000. Physiological responses of rainbow trout *Oncorhynchus mykiss* to crowding and anesthesia with AQUI-STM. **J. World Aquacult. Soc.** 31: 105-114.
- Destoumieux, D., P. Bulet, D. Loew, A.V. Dorsselaer, J. Rodriguez and E. Bachere. 1997. Panaeidsins, a new family of antimicrobial peptides isolated from the shrimp *Penaeus vannamei* (Decapod). **J. Biol. Chem.** 272: 28398-28406.
- Dieguez-uribeondo, J. and J. Cerenius. 1998. The inhibition of extracellular proteinase from *Aphanomyces* spp. by three different proteinase inhibitors from crayfish blood. **Mycol. Res.** 120: 820-824.
- Djangmah, J.S. 1970. The effect of feeding and starvation on copper in the blood and hepatopancreas and on blood proteins of *Crangon vulgaris* (Fabricius). **Comp. Biochem. Physiol.** 32: 709-731.
- Dore, I. and C. Frimodt. 1987. **An Illustrated Guide to Shrimp of the World.** Osprey Books.
- Durve, V.S. 1970. Effect of anesthetics on the behaviour of mullet fingerings and the scope of using these in different fishery procedures II. **Indian J. Fish.** 13: 158-182.

Elwood, R.W., S. Barr and L. Patterson. 2009. Pain and stress in crustacean?. **App. Ani. Behav. Sci.** 118: 128-136.

Erdmann, M.V. 1999. Clove oil: an 'eco-friendly' alternative to cyanide use in the live reef fish industry?. **SPC Live Reef Fish Inf. Bull.** 5: 4-7.

Finney, D.J. 1971. **Probit Analysis**. 3rd ed., Cambridge University.

Fontaine, C.T. and D.V. Lightner. 1975. Cellular response to injury in penaeid shrimp. **Mar. Fish. Rev.** 37: 4-19.

Food and Drug Administration (FDA). 2002. **Guidance for the Industry 150: Status of Clove Oil and Eugenol for Anesthesia of Fish**. U.S. Department of Health and Human Services, Food and Drug.

Freire Marques, M.R. and M.A. Barracco. 2000. Lectins, as non-recognition factor, in crustaceans. **Aquaculture** 191: 23-44.

Frisch, A.J., K.E. Ulstrup and A.H. Jean-Paul. 2007. The effects of clove oil on coral: An experimental evaluation using *Pocillopora damicornis* (Linnaeus). **J. Exp. Mar. Biol. Ecol.** 345: 101-109.

Gardner, C. 1997. Options for humanely immobilizing and killing crabs. **J. Shellfish Res.** 16(1): 219-224.

Hendry, G. 2010. **Polysorbate 80**. source: <http://www.wisegeek.com/what-is-polysorbate-80.html>, 20 August 2010.

- Hikima, S., J.I. Hikima, J. Rojtinnakorn, I. Hirono and T. Aoki. 2003. Characterization and function of kuruma shrimp lysozyme possessing lytic activity against *Vibrio* species. **Gene**. 316: 187-195.
- Hose, J.E., G.E. Matin, V.A. Nguyen, J. Lucas and T. Rusentein. 1987. Cytochemical features of shrimp hemocyte. **Biol. Bull. Mar. Biol.** 173(1): 178-187.
- Huang, C.C., K. Sritunyalucksana, K. Söderhäll and Y.L. Song 2004. Molecular cloning and characterization of tiger shrimp (*Penaeus monodon*) transglutaminase. **Dev. Comp. Immunol.** 28: 279-294.
- Itami, T., Y. Takahashi, E. Tsuchihira, H. Igasu and M. Kondo. 1994. Enhancement of disease resistance of kuruma prawn *Penaeus japonicus* and increase in phagocytic activity of prawn hemocytes after oral administration of β -1,3-glucan (Schizophyllan). **In Proceeding of the Third Asian Fisheries Forum Singapore 26-30 October 1992.** The Asian Fisheries Society Manila, Philippines.
- Iversen, M., B. Finstad, R.S. McKinley and R.A. Eliassen. 2003. The efficacy of metomidate, clove oil, Aqui-S™ and benzoak as anesthetics in Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) smolts, and their potential stress-reducing capacity. **Aquaculture** 221: 549-566.
- Iversen, M. and R.A. Eliassen. 2009. The effect of AQUIS® sedation on primary, secondary and tertiary stress responses during salmon smolt, *Salmo salar* L., transport and transfer to sea. **World. Aquac. Soc.** 40: 216-225.
- Iwanaga, S. 1993. The limulus clotting reaction. **Curr. Opin. Immunol.** 5: 74-82.
- Jiravanichpaisan, P., B.L. Lee and K. Soderhall. 2006. Cell-mediated immunity in arthropod: Hematopoiesis, coagulation, melanization and opsonization. **Immunol.** 211: 213-236.

- Jirasek, J., A. Adamek and P.M. Giang. 1978. The effects of administration of the anesthetic. MS-222 (Sandoz) and R. 7464 (Propoxate) on oxygen consumption in the tentch (*Tinca tinca* L.). **Zivocisna Vyroba**. 23: 835-840.
- Johansson, M. W., T. Holmblad, P.O. Thornqvist, M. Cammarata, N. Parrinello and K. Soderhall. 1999. A cell-surface superoxide dismutase is a binding protein for peroxinectin, a cell adhesive peroxidase in crayfish. **J. Cell Sci.** 112: 917-925.
- _____ and K. Soderhall. 1989. A cell adhesion factor from crayfish haemocytes has degranulating activity towards crayfish granular cell. **Insect. Biochem.** 19: 183-190.
- Keyser, P. 1999. **Crustacean Immunity: Characterization of Some Crayfish Blood Proteins.** Comprehensive Summaries of Uppsala Dissertations from the Faculty of Science and Technology.
- Khoo, L., D.W. Robinette and E.J. Noga. 1999. Callinectin, an antibacterial peptide from blue crab, *Callinectes sapidus*, hemocytes. **Mar. Biotechnol.** 1: 44-51.
- Klein, J. 1982. **Immunology : The Science of Self-nonsel Discrimination.** USA: A Wiley Interscience Publication.
- Lackie, A.M. 1980. Invertebrate immunity. **Parasitology** 80: 393-412.
- Le, M.G., G.M. Le, D. Ansquer, S. Froissard and P. Levy. 1997. Haematological and phenoloxidase activity changes in the shrimp *Penaeus stylirostris* in relation with the moult cycle: Protection against vibriosis. **Fish Shellfish Immunol.** 7: 227-234.
- Liang, Z., P. Lindblad, A. Beauvais, M.W. Johansson, J.P. Latge', M. Hall, L. Cerenius and K. Söderhäll. 1992. Crayfish alpha-macroglobulin and 76 kDa protein; their biosynthesis and subcellular localization of the 76kDa protein. **J. Insect Physiol.** 38: 987-995.

- Liu, C.H., W. Cheng, C. -M. Kuo and J. -C. Chen. 2004. Molecular cloning and characterization of a cell adhesion molecule, peroxinectin from the white shrimp *Litopenaeus vannamei*. **Fish Shellfish Immunol.** 17: 13-26.
- Lowry, O.H., N.J. Rosebrough, A.L. Farr and R.J. Randall. 1951. Protein measurement with the folin phenol reagent. **J. Biol. Chem.** 193: 265-275.
- Martin, G.G. and L.B. Graves. 1985. Fine structure and classification of shrimp hemocyte. **J. Morphol.** 185: 339-349.
- _____, D. Poole, C. Poole, J.E. Hose, M. Arias, L. Reynolds, N. Mckrell and A. Whang. 1993. Clearance of bacteria injected into hemolymph of the penaeid shrimp, *Sicyonia ingentis*. **J. Inver. Pathol.** 62: 308-315.
- Martinez-Palacios, C.A., L.G. Ross and V.L. Jimenez. 1996. The effects of temperature and body weight on the oxygen consumption of *Penaeus vannamei*. Boone, 1931. **J. Aquacult. Trop.** 11(1): 59-65.
- McFarland, W.N. 1959. A study of the effects of anesthetics on the behavior and physiology of fishes. **Pubs. Inst. Mar. Sci.** 6: 23-55.
- _____. 1960. The use of anesthetic for the handling and the transport of fishes. **Calif. Fish and Game.** 46: 407-431.
- Mercier, L., E. Palacios., Á. Campa-Córdova, I. D. Tovar-Ramírez, R. Hernández-Herrera and I. S. Racotta. Metabolic and immune responses in Pacific whiteleg shrimp *Litopenaeus vannamei* exposed to a repeated handling stress. **Aquaculture** 258: 633-640.

- Moullac G.L., C. Soyeux, D. Sauliner, D. Ansquer, J. Avarre and P. Levy. 1998. The effect of hypoxic stress on the immune response and resistance to vibriosis of the shrimp *Penaeus stylirostris*. **Fish Shellfish Immunol.** 8: 621-629.
- Munday, P.L. and S.K. Wilson. 1997. Comparative efficacy of clove oil and other chemicals in anaesthetization of *Pomacentrus amboinensis*, a coral reef fish. **J. Fish Biol.** 51:931-938.
- Nakamura, T., T. Morita and S. Iwanaga. 1989. Lipopolysaccharide-sensitive serine-protease zymogen (factor C) found in *Limulus* hemocytes. Isolation and characterization. **Eur. J. Biochem.** 154: 511-21.
- Nemoto, C.M. 1957. Experiment with methods for transport of live fish. **Prog. Fish-Cult.** 19: 147-157.
- Ozeki, M. 1975. The effect of eugenol on the nerve and muscle in crayfish. **Comp. Biochem. Physiol.** 50:183-191.
- Perazzolo, L.M. and M.A. Barracco. 1997. The prophenoloxiase activating system of the shrimp *Penaeus paulensis* and associated factors. **Dev. Comp. Immunol.** 21: 385-395.
- Ratcliffe, N.A., A.F. Rowley, S.W. Fitzgerald and C.P. Rhodes. 1985. Invertebrate immunity: basic concepts and recent advances. **Inter. Rev. Cytology.** 97: 183 - 350.
- Santos, E.A. and L.E.M. Nary. 1987. Blood glucose regulation in an estuarine crab, *Chasmagnathus granulata* (Dana, 1851) exposed to different salinities. **Comp. Biochem. Physiol.** 87A(4): 1033-1035.
- Saydmohammed, M. and A.K. Pal. 2009. Anesthetic effect of eugenol and mentol on handling stress in *Macrobrachium rosenbergii*. **Aquaculture** 298: 162-167.

- Schnapp, D., G.D. Kemp and V.J. Smith. 1996. Purification and characterization of a prolinerich antibacterial peptide, with sequence similarity to bactenecin-7, from the haemocytes of the shore crab, *Carcinus maenas*. **Eur. J. Biochem.** 240: 532-539.
- Seidman, E.R. and A.L. Lawrence. 1986. Growth, feed digestibility, and proximate body composition of *Penaeus vannamei* and *Penaeus monodon* growth at different dissolved oxygen levels. **J. World Maricult. Soc.** 16: 333-346.
- Seki, N., T. Mata, T. Oda, D. Iwaki, K.I. Kma, T. Miyata and S. Iwanaga. 1994. Horseshoe crab (1, 3)- β -D-glucan-sensitive coagulation factor G. **J. Biol. Chem.** 269: 1370-1374.
- Sequeira, T., D. Tavares and M. Arala-Chaves. 1996. Evidence for circulating hemocyte proliferation in the shrimp *Penaeus japonicus*. **Dev. Comp. Immunol.** 20: 97-104.
- Simon, C. n.d. **Vanillin**. source: <http://www.chm.bris.ac.uk/motm/vanillin/vanillinjm.htm>, 14 สิงหาคม 2553.
- Small, B.C. 2000. Anesthetic efficacy of metomidate and comparison of plasma cortisol responses to tricaine methanesulfonate, quinaldine and clove oil anesthetized channel catfish *Ictalurus punctatus*. **Aquaculture** 620: 1-9.
- Small, B.C. 2004. Effect of isoeugenol sedation on plasma cortisol, glucose and lactate dynamics in channel catfish *Ictalurus punctatus* exposed to three stressors. **Aquaculture** 238: 469-481.
- Small, B.C. 2005. Routine measures of stress are reduced in mature channel catfish during and after AQUI-STM anesthesia and recovery. **Aquaculture** 67: 72-78
- Smith, L.L., P.G. Lee, A.L. Lawrence and K. Strawn. 1985. Growth and digestibility by three size of *Penaeus vannamei* Boone: effect of dietary protein and protein source. **Aquaculture** 46: 85-96.

Smith, V.J. and K. Soderhall. 1983. Induction of degranulation and lysis of haemocytes in the freshwater crayfish, *Astacus astacus*, by components of the prophenoloxidase activating system in vitro. **Cell Tissue Res.** 233: 295–303.

_____ and J.R.S. Chisholm. 1992. Non-cellular immunity in crustaceans. **Fish Shellfish Immunol.** 2(1): 1-31.

Söderhäll, K. and L. Cerenius. 1992. Crustacean immunity. **Annu. Rev. J. Fish. Dis.** 2: 3–23.

_____ and L. Cerenius. 1998. Role of the prophenoloxidase-activating system in invertebrate immunity. **Curr. Opin. Immunol.** 10: 23-28.

_____ and L. Hall. 1984. Lipopolysacchride induced activation of prophenoloxidase activating system in crayfish hemocyte lysate. **Biochem. Biophys. Acta.** 797: 99-104.

_____ and V.J. Smith. 1983 a. Separation of the haemocyte populations of *Carcinus maenus* and other marine decapods, and prophenoloxidase distribution. **Dev. Comp. Immunol.** 7: 229–239.

_____ and V.J. Smith. 1983 b. The prophenoloxidase activating system a complement-like pathway in arthropod, pp. 160 - 167. *In* J. Asit and D.W. Roberts (eds.). **Infection Processes of Fungi.** Rockefeller Foundation, New York.

_____ and V.J. Smith. 1986. The prophenoloxidase activating cascade as a recognition in arthropod, pp. 251-258. *In* A.P. Gupta, ed. **Hemolytic and Humoral Immune Response in Arthropod.** John Wiley & Sons, Inc., New York.

Söderhäll, K., L. Cerenius and M.W. Johansson. 1996. The prophenoloxidase activating system in invertebrates, pp. 229-253. *In* **New Directions in Invertebrate Immunology.** SOS Publications, Fair Harven.

- Song, Y.L. and Y.T. Hsieh. 1994. Immunostimulation of tiger shrimp (*Penaeus monodon*) hemocytes for generation of microbicidal substances: analysis of reactive oxygen species. **Dev. Comp. Immunol.** 18: 201-209.
- Sritunyalucksana, K., L. Cerenius and K. Söderhäll. 1999. Molecular cloning and characterization of prophenoloxidase in the black tiger shrimp, *Penaeus monodon*. **Dev. Comp. Immunol.** 23(3): 179 - 186.
- Summerfelt, R.C. and L.S. Smith. 1990. Anesthesia, surgery, and related techniques. pp. 213-272. In C.B. Schreck and P.B. Moyle, editors, **Methods for Fish Biology**. Am. Fish Soc., Maryland, USA.
- Sung, H.H. and Y.L. Song. 1996. Tissue location of *Vibrio* antigen delivered by immersion to tiger shrimp (*Penaeus monodon*). **Aquaculture** 145: 41-45.
- Taylor, J., L. Vinatea, R. Ozorio., R. Schuweitze and E.R. Andreatta. 2004. Minimizing the effects of stress during eyestalk ablation of *Litopenaeus vannamei* females with topical anesthetic and a coagulating agent. **Aquaculture** 233: 173-179.
- Vargas-Albores, F. and G. Yepiz-Plascencia. 2000. Beta glucan binding protein and its role in shrimp immune response. **Aquaculture** 191: 13-21.
- Vargas-Albores, F., P. Hinojosa-Baltazar, G. Portillo-Clark and F. Magallon-Barajas. 1998. Influence of temperature and salinity on the yellow leg shrimp. *Penaeus californis* Holmes, phenoloxidase system. **Aquaculture** 29(8): 549-553.
- Vasta, G.R., H. Ahmed, N.E. Fink, M.T. Elola, A.G. Marsh, A. Snowden and E.W. Odom. 1994. Animal lectin as self/non-self recognition molecules. **Ann. N. Y. Acad. Sci.** 712: 55-73.

- Wang, Y.C., P.S. Chang and H.Y. Chen. 2006. Tissue distribution of prophenoloxidase transcript in the Pacific white shrimp *Litopenaeus vannamei*. **Fish Shellfish Immunol.** 20: 414-418.
- Yeh, M.S., Y.L. Chen and I.H. Tsai. 1998. The hemolymph clottable protein of tiger shrimp (*Penaeus monodon*) and related species. **Comp. Biochem. Physiol.** 121: 169-176.
- Young, M.J. 2009. The efficacy of the aquatic anesthetic AQUI-S™ for anesthesia rainbowfish, *Melanotaenia australis*. **J. Fish Biol.** 75: 7, 1888-1894.
- Yu, J. 1993. Hemocyte classification, density and percentage of the prawn *Penaeus japonicus*. **J. Ocean-Oniv. Qingdao-Qingdao-Haiyang-Dao-xeu-Xuedao.** 23(1): 107-114.





ภาคผนวก ก

ตัวอย่างการวิเคราะห์ข้อมูลเพื่อหาค่า LC_{50} และช่วงแห่งความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซนต์

การวิเคราะห์ข้อมูลเพื่อหาค่า LC_{50} และช่วงแห่งความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซนต์

จากข้อมูลความเข้มข้นของสารไอโซยูจินอลและอัตราการตายในแต่ละระดับ นำมาประเมินค่าความเข้มข้นของสารไอโซยูจินอลที่ทำให้กุ้งขาวแวนนาไมระยะโพสลาړว 8-10 ตาย 50 เปอร์เซนต์ (LC_{50}) และช่วงแห่งความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซนต์ โดยวิธีวิเคราะห์แบบโพรบิต (Probit analysis) ตามวิธีของ Finney (1971) ตามตัวอย่างต่อไปนี้

กำหนดให้

C	=	ความเข้มข้นของสารละลาย
x	=	ค่า log ของระดับความเข้มข้นของสารไอโซยูจินอล
r	=	จำนวนสัตว์ทดลองที่ตายเนื่องจากสารไอโซยูจินอล
n	=	จำนวนสัตว์ทดลองที่ใช้ในการทดลอง
p	=	เอ็มไพริคัลของอัตราการตาย (r/n)
y^*	=	เอ็มไพริคัลโพรบิต ได้จากการเปลี่ยนค่าเปอร์เซนต์การตายโดยใช้ตารางผนวกที่ 5
Y	=	ค่าโพรบิตคาดคะเน (Expected probit)
y_0	=	ค่าโพรบิตต่ำสุด (Minimum probit) ได้จากตารางผนวกที่ 6
y_1	=	ค่าโพรบิตสูงสุด (Maximum probit) ได้จากตารางผนวกที่ 6
A	=	ช่วง (Ranges) ได้จากตารางผนวกที่ 6
Y	=	ค่าโพรบิตสำหรับการคำนวณ (Working probit) ได้จากการคำนวณจากค่าโพรบิตที่คาดคะเนได้จากสูตร $Y = y_0 + pA$ หรือ $Y = y_1 - (1-p)A$
w	=	สัมประสิทธิ์ของการถ่วงน้ำหนัก (Working- coefficient) ได้จากตารางผนวกที่ 7

วิธีการ

ความเข้มข้นของสารไอโซยูจินอล(C) ซึ่งมีอยู่ 6 ระดับ จำนวนกุ้งขาวแวนนาไม ระยะโพสลา รัว 8-10 ตาย (x) และจำนวนกุ้งขาวแวนนาไมระยะโพสลา รัว 8-10 ที่ใช้ในการทดลอง (n)

คำนวณหาค่า x จาก $x = 1 + \log C$ และ $p = r/n$ หาค่าเอ็มไพริคัล โพรบิท (y^*) จาก การนำค่า p มาเปิดตารางผนวกที่ 6

ประมาณค่าคาดคะเนโพรบิทจากข้อมูล y^* และ x ด้วยวิธีการ plot กราฟ และปรับ เส้นตรงด้วยสายตาโดยให้น้ำหนักแต่ละจุดเท่ากัน หรือคำนวณจากสมการถดถอยอย่างง่าย

ตัวอย่างการคำนวณ

ตารางผนวกที่ ก1 วิธีการคำนวณความลาดชันและจุดตัดแกนตั้ง ตามวิธีวิเคราะห์แบบโพรบิท

C	x	R	n	p	y^*	Y
15	1.18	0	20	0	-	5.12
18.69	1.27	13	20	0.65	5.39	5.43
23.28	1.37	15	20	0.75	5.67	5.77
28.99	1.46	18	20	0.9	6.28	6.07
36.11	1.56	18	20	0.9	6.28	6.41
45	1.56	20	20	1	-	6.72

ตารางผนวกที่ ก2 การคำนวณครั้งที่ 1

x	y	W	Wx	Wx ²	Wxy	Wy	Wy ²	Y
1.18	3.74	12.68	14.96	17.66	55.96	26.57	177.36	4.27
1.27	5.39	12.02	15.27	19.39	82.28	64.79	349.21	4.85
1.37	5.67	10.06	13.78	18.88	78.15	57.04	323.42	5.49
1.46	6.26	8.10	11.83	17.27	74.03	50.71	317.42	6.07
1.56	6.27	6.04	9.42	14.70	59.08	37.87	237.45	6.71
1.56	7.17	4.16	6.86	11.33	49.21	29.83	213.86	7.29
Σ		53.06	72.12	99.23	398.71	287.66	1618.72	

$$\begin{aligned}
 S_{xx} &= 99.23 - (72.12)^2 / 53.06 = 1.2 \\
 S_{xy} &= 398.71 - (72.12)(287.66) / 53.06 = 7.7 \\
 S_{yy} &= 1618.72 - (287.66)^2 / 53.06 = 59.20 \\
 \bar{x} &= 72.12 / 53.06 = 1.36 \\
 \bar{y} &= 287.66 / 53.06 = 5.42 \\
 b &= 7.72 / 1.20 = 6.43 \\
 \hat{a} &= 5.42 - 6.43(1.36) = -3.32
 \end{aligned}$$

ดังนั้นสมการเส้นตรงของการคำนวณครั้งนี้คือ $Y = -3.32 + 6.43x$

ตารางผนวกที่ ก3 การคำนวณครั้งที่ 2

x	y	W	Wx	Wx ²	Wxy	Wy	Wy ²	Y
1.18	3.53	10.64	12.56	14.82	44.32	37.56	132.58	3.95
1.27	5.38	12.68	16.10	20.45	86.64	68.22	367.01	4.83
1.37	5.67	11.62	15.92	21.81	90.26	65.89	317.0	5.81
1.46	6.26	8.10	11.83	17.27	74.03	50.71	330.01	6.68
1.56	8.23	4.16	6.49	10.12	53.41	34.24	411.38	7.66
1.56	7.68	1.52	2.51	4.14	19.26	11.67	89.65	8.54
Σ		48.72	65.41	88.61	367.92	268.29	1562.00	

$$S_{xx} = 88.61 - (65.41)^2 / 48.72 = 0.79$$

$$S_{xy} = 367.92 - (65.41)(268.29) / 48.72 = 7.72$$

$$S_{yy} = 1562 - (268.29)^2 / 48.72 = 84.59$$

$$\bar{x} = 65.41 / 48.72 = 1.34$$

$$\bar{y} = 268.29 / 48.72 = 5.51$$

$$b = 7.72 / 0.79 = 9.77$$

$$\hat{a} = 5.51 - 9.77(1.34) = -7.58$$

ดังนั้นสมการเส้นตรงของการคำนวณครั้งนี้คือ $Y = -7.58 + 9.77x$

เมื่อเปรียบเทียบค่าคาดคะเนโพรบิท ที่ใช้ในการคำนวณครั้งที่ 2 (ช่องสุดท้ายของการคำนวณครั้งที่ 2) กับค่าที่ได้จากการคำนวณครั้งที่ 1 (ช่องสุดท้ายของการคำนวณครั้งที่ 1) จะพบว่าผลต่างต่ำกว่าหรือใกล้เคียงกับ 0.2 ดังนั้น จึงนับว่าค่า a และ b ที่ได้รับ เป็นค่าประมาณที่ดีของ a และ b แล้ว จึงดำเนินการทดสอบความเป็นเส้นตรงต่อไป จากสมการ

$$x^2 = S_{yy} - S_{xy}^2 / S_{xx}$$

จะได้

$$x^2 = 58.28 - (14.88^2 / 4.1) = 9.15$$

ซึ่งมีขั้นแห่งความเป็นอิสระเท่ากับ $(6-2) = 4$ ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซนต์ ค่า $\chi^2 = 9.49$ ซึ่งสูงกว่าค่าที่คำนวณได้ จึงหมายความว่า ผลการทดลองในรูปของโปรบิทไม่เบี่ยงเบนไปจากเส้นตรง

ค่าสื่อการกิริยาของมัธยฐานของความทนต่อสารไอโซยูจินอลของกุ้งขาวแวนนาไมระยะโพสลาตัว 8-10 จึงเท่ากับ

$$\hat{m} = \frac{((5 - \hat{a}) / \hat{b})}{1} \\ \hat{m} = \frac{5 - (-7.583.51) / 3.63}{1} = 1.29$$

และค่ามัธยฐานของความทนต่อสารไอโซยูจินอลจะเท่ากับ

$$TL_m = \text{antilog}(1.29) = 19.5 \text{ พีพีเอ็ม}$$

การคำนวณหาช่วงความเชื่อมั่นของ m ตามสมการ

$$m_L, m_U = \frac{(\hat{m} - g(V_{12} / V_{22}) \pm 1.96 / b \sqrt{V_{11} - 2m V_{12} + m^2 V_{22} - g((V_{11} - (V_{12}^2 / V_{22})))}}{1 - g}$$

$$\begin{aligned} \text{โดยที่ } V_{11} &= \frac{\sum Wx^2}{(S_{xx} \sum W)} = 2.30 \\ V_{12} &= \frac{\bar{x}}{S_{xx}} = 1.70 \\ V_{22} &= 1 / S_{xx} = 1.27 \\ g &= (1.96)^2 V_{22} / b^2 = 0.05 \end{aligned}$$

จากการแทนค่าในสมการข้างต้น จะได้ช่วงแห่งความเชื่อมั่น $1 + m$

$$= \frac{(1.29 - 0.067) \pm 0.2 \sqrt{2.3 - 4.39 + 2.11 - 0.001}}{0.95}$$

$$= \frac{(1.29 - 0.067) \pm 0.2(0.14)}{0.95}$$

$$0.95$$

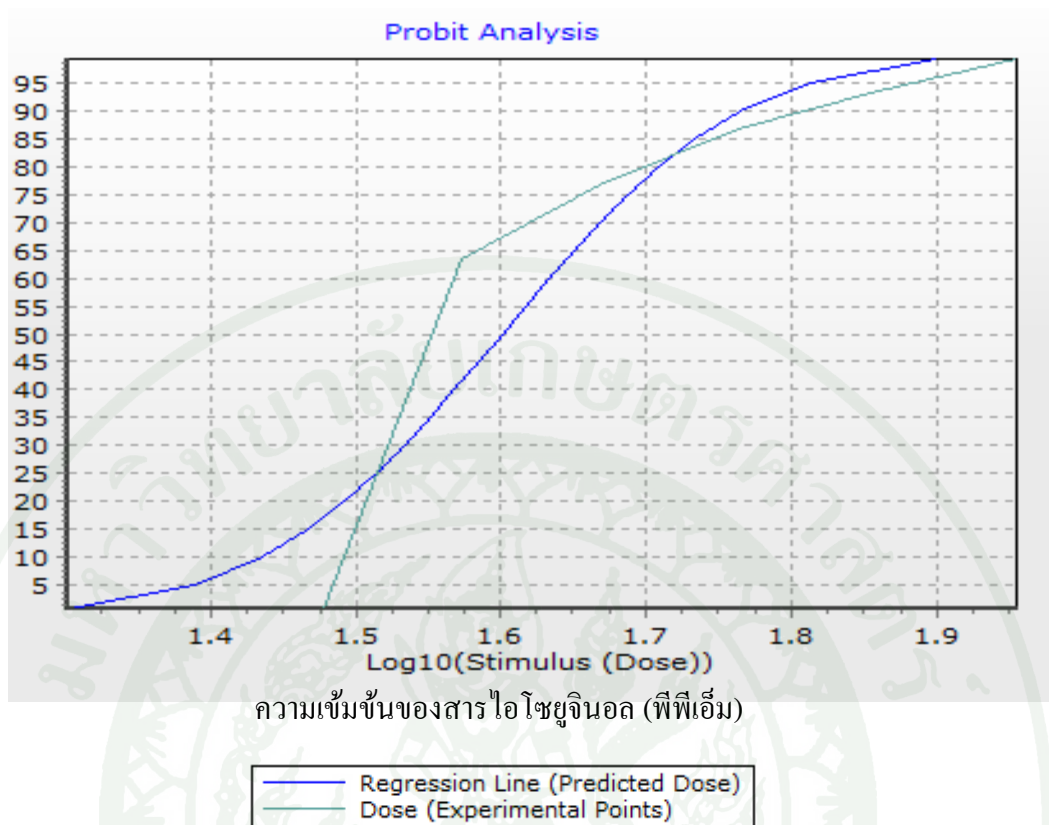
$$= 1.28 \pm 0.03$$

$$= 1.25 - 1.31$$

เพราะฉะนั้น ช่วงแห่งความเชื่อมั่นที่ 95 เปอร์เซนต์ ของมัธยฐานของความทนต่อสาร
ไฮโซยูจินอลต่อกุ้งขาวแวนนาไมระยะโพสลาร์วา 8-10 จึงเท่ากับ antilog (1.25) ถึง antilog (1.31)
ซึ่งเท่ากับ 17.78 ถึง 20.42 พีพีเอ็ม

$$\text{ดังนั้น } LC_{50} = 19.5 (17.78-20.42) \text{ พีพีเอ็ม}$$

อัตราการตายสะสม (เปอร์เซ็นต์) ตามมาตรฐานส่วนโปรบิท



ความเข้มข้นของสารไอโซยูจินอล (พีพีเอ็ม)

ภาพผนวกที่ ก1 ความสัมพันธ์ระหว่างอัตราการตายสะสมและความเข้มข้นของสารไอโซยูจินอลที่ใช้ในการประเมินค่า LC_{50} ของกุ้งขาวแวนนาไมระยะโพสটারว 8-10 ที่ระดับความเต็ม 5 พีเอสยู

จากภาพผนวกที่ ก1 เมื่อทำการ antilog (1.59) คือ ค่าความเข้มข้นของสารไอโซยูจินอลในรูปของผลิตภัณฑ์ Aqui-STM มีค่าเท่ากับ 38.90 พีพีเอ็ม และค่าความเข้มข้นของสารไอโซยูจินอลที่มีปริมาณสารไอโซยูจินอล 50 เปอร์เซ็นต์มีค่าเท่ากับ 19.45 พีพีเอ็ม

ตารางผนวกที่ ก4 การเปลี่ยนเปอร์เซ็นต์การตายเป็นไพริกัลโปรบิท

อัตรา	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9
0	-	2.67	2.95	3.12	3.25	3.36	3.45	3.52	3.59	3.66
0.1	3.72	3.77	3.82	3.87	3.92	3.96	4.01	4.05	4.08	4.12
0.2	4.16	4.19	4.23	4.26	4.29	4.33	4.36	4.39	4.42	4.45
0.3	4.48	4.50	4.53	4.56	4.59	4.61	4.64	4.67	4.69	4.72
0.4	4.75	4.77	4.80	4.82	4.85	4.87	4.90	4.92	4.95	4.97
0.5	5.00	5.03	5.05	5.08	5.10	5.13	5.15	5.18	5.20	5.23
0.6	5.25	5.28	5.31	5.33	5.36	5.39	5.41	5.44	5.47	5.50
0.7	5.52	5.55	5.58	5.61	5.64	5.67	5.71	5.74	5.77	5.81
0.8	5.84	5.88	5.92	5.95	5.99	6.04	6.08	6.13	6.18	6.23
0.9	6.28	6.34	6.41	6.48	6.55	6.64	6.75	6.88	7.05	7.33

ตารางผนวกที่ ๓ ค่าโปรบิตต่ำสุด (Minimum Probit) โปรบิตสูงสุด (Maximum Probit)

Expected Probit	Minimum Working (y_0)	Range (A)	Maximum Working (y_1)	Expected Probit (Y)
1.1	0.8579	5033.8402	9.1421	8.9
1.2	0.9522	3425.2797	9.0478	8.8
1.3	1.0462	2354.158	8.9538	8.7
1.4	1.1400	1634.2486	8.8600	8.6
1.5	1.2334	1145.8917	8.7666	8.5
1.6	1.3266	811.54	8.6734	8.4
1.7	1.4194	580.5282	8.5806	8.3
1.8	1.5118	419.4475	8.4882	8.2
1.9	1.6038	306.1081	8.3962	8.1
2.0	1.6954	225.6395	8.3046	8.0
2.1	1.7866	167.9957	8.2134	7.9
2.2	1.8772	126.3352	8.1228	7.8
2.3	1.9673	95.9607	8.0327	7.7
2.4	2.0568	73.6216	7.9432	7.6
2.5	2.1457	57.0506	7.8543	7.5
2.6	2.339	44.6538	7.7661	7.4
2.7	2.3214	35.3020	7.6787	7.3
2.8	2.4081	28.1832	7.5919	7.2
2.9	2.4938	22.7357	7.5062	7.1
3.0	2.5786	18.5216	7.4214	7.0
3.1	2.6624	15.2402	7.3376	6.9
3.2	2.7449	12.6662	7.2551	6.8
3.3	2.8261	10.6327	7.1739	6.7
3.4	2.9060	9.0154	7.0940	6.6
3.5	2.9842	7.7210	7.0158	6.5
3.6	3.0606	6.6788	6.9394	6.4

ตารางผนวกที่ ก5 (ต่อ)

Expected Probit	Minimum Working (y_0)	Range (A)	Maximum Working (y_1)	Expected Probit (Y)
3.7	3.1351	5.8354	6.8649	6.3
3.8	3.2074	5.1497	6.7926	6.2
3.9	3.2773	4.5903	6.7227	6.1
4.0	3.3443	4.1327	6.6557	6.0
4.1	3.4083	3.7582	6.5917	5.9
4.2	3.4687	3.4519	6.5313	5.8
4.3	3.5251	3.2025	6.4749	5.7
4.4	3.5770	3.0010	6.4230	5.6
4.5	3.6236	2.8404	6.3764	5.5
4.6	3.6643	2.7154	6.3357	5.4
4.7	3.6982	2.6220	6.3018	5.3
4.8	3.7241	2.5573	6.2759	5.2
4.9	3.7407	2.5192	6.2593	5.1
5.0	3.7467	2.5066	6.2533	5.0
5.1	3.7401	2.5192	6.2599	4.9
5.2	3.7187	2.5573	6.2813	4.8
5.3	3.6798	2.6220	6.3202	4.7
5.4	3.6203	2.7154	6.3797	4.6
5.5	3.5360	2.8404	6.4640	4.5
5.6	3.4220	3.0010	6.5780	4.4
5.7	3.2724	3.2025	6.7276	4.3
5.8	3.0794	3.4519	6.9206	4.2
5.9	2.8335	3.7582	7.1665	4.1
6.0	2.5229	4.1327	7.4771	4.0
6.1	2.1325	4.5903	7.8675	3.9
6.2	1.6429	5.1497	8.3571	3.8

ตารางผนวกที่ ก5 (ต่อ)

Expected Probit	Minimum Working (y_0)	Range (A)	Maximum Working (y_1)	Expected Probit (Y)
6.3	1.0295	5.8354	8.9705	3.7
6.4	0.2606	6.6786	9.7394	3.6
6.5	-0.7050	7.7210	10.7051	3.5

ตารางผนวกที่ ก6 สัมประสิทธิ์ของการถ่วงน้ำหนัก (w)

Y	0.0	0.1	0.2	0.3	0.4	0.5	0.6	0.7	0.8	0.9
1	0.001	0.001	0.001	0.002	0.002	0.003	0.005	0.006	0.008	0.011
2	0.015	0.019	0.025	0.031	0.040	0.050	0.062	0.076	0.092	0.110
3	0.131	0.154	0.180	0.208	0.238	0.269	0.302	0.336	0.370	0.405
4	0.439	0.471	0.503	0.532	0.558	0.581	0.601	0.616	0.627	0.634
5	0.637	0.634	0.627	0.616	0.601	0.581	0.558	0.532	0.503	0.047
6	0.436	0.405	0.370	0.336	0.302	0.269	0.238	0.208	0.180	0.015
7	0.131	0.110	0.092	0.076	0.062	0.050	0.040	0.031	0.025	0.019
8	0.015	0.011	0.008	0.006	0.005	0.003	0.002	0.002	0.001	0.001



ภาคผนวก ข

ตารางแสดงคุณสมบัติของน้ำก่อนและหลังใส่สารไอโซยูจินอล
ในการทดลองเพื่อหาค่า LC_{50} ต่อกุ้งขาวแวนนาไมระยะโพสตัว 8-10

ตารางผนวกที่ ข1 ค่าพิสัยของคุณสมบัติของน้ำก่อนและหลังใส่สารไอโซยูจินอลต่อ
กุ้งขาวแวนนาไมระยะโพสลาร์ว 8-10 ที่ระดับความเค็ม 5 พีเอสยู

	พีเอช	ความกระด้าง (mg/L)	ความเป็นด่าง (mg/L)	แอมโมเนีย (mg/L)	ไนไตรท์ (mg/L)
ก่อนใส่สาร	7.05	1472	104	1.11	0.08
หลังใส่สาร	7.91-8.05	1280-1378.28	102.07-113.93	0.2-0.25	0.02-0.04

ตารางผนวกที่ ข2 ค่าพิสัยของคุณสมบัติของน้ำก่อนและหลังใส่สารไอโซยูจินอลต่อ
กุ้งขาวแวนนาไมระยะโพสลาร์ว 8-10 ที่ระดับความเค็ม 15 พีเอสยู

	พีเอช	ความกระด้าง (mg/L)	ความเป็นด่าง (mg/L)	แอมโมเนีย (mg/L)	ไนไตรท์ (mg/L)
ก่อนใส่สาร	7.89	3912	116	3.45	0.07
หลังใส่สาร	7.43-7.59	3258.07-3409.93	117.3-127.46	0.2-0.36	0.07-0.23

ตารางผนวกที่ ข3 ค่าพิสัยของคุณสมบัติของน้ำก่อนและหลังใส่สารไอโซยูจินอลต่อ
กุ้งขาวแวนนาไมระยะโพสลาร์ว 8-10 ที่ระดับความเค็ม 25 พีเอสยู

	พีเอช	ความกระด้าง (mg/L)	ความเป็นด่าง (mg/L)	แอมโมเนีย (mg/L)	ไนไตรท์ (mg/L)
ก่อนใส่สาร	7.71	5756	130	4.86	0.14
หลังใส่สาร	7.97-8.05	5230.55-6138.21	77.97-120.89	0.2-0.29	0.14-0.24



การเตรียมสารเคมี

1. ส่วนผสม K-199 (อาหารเลี้ยงเซลล์เม็ดเลือด) (กิจการ และคณะ, 2543 ง) จำนวน 100 มิลลิลิตร

M-199 สั่งซื้อจากบริษัท ใช้จำนวน 50 มิลลิลิตร

Salt mixture 10 มิลลิลิตร

โซเดียมคลอไรด์ (NaCl) 10 มิลลิลิตร

CaCl₂ · 2H₂O 10 มิลลิลิตร

L-glutamine 1 มิลลิลิตร

Hepes 0.238 กรัม

L-cystein 5 กรัม

De-ionized water ผ่านการฆ่าเชื้อที่ 121 องศาเซลเซียส เป็นตัวทำละลายสาร (ทุกชนิดที่ใช้เตรียมสารเคมี)

วิธีการเตรียมสารแต่ละชนิด คือ

1.1 M-199 ปริมาตร 50 มิลลิลิตร (ส่วนที่เหลือเก็บไว้ใช้ได้ เก็บที่ 4 องศาเซลเซียส) โดยวิธีเตรียมคือใช้ M-199 1 ซองกับ NaHCO₃ 2.2 กรัม ละลายด้วยน้ำ De-ionized water ปรับปริมาตรครบ 500 มิลลิลิตร กรองผ่านกระดาษกรองขนาด 0.2 ไมโครเมตร

1.2 Salt mixture ปริมาตร 10 มิลลิลิตร ซึ่งประกอบด้วย

โพแทสเซียมคลอไรด์ (KCl) 0.4 กรัม

MgCl · 6H₂O 3.3 กรัม

MgSO₄ · 7H₂O 3.0 กรัม

NaH₂PO₄ · 2H₂O 0.05 กรัม

ปรับปริมาตรด้วย De-ionized water ให้ได้ 100 มิลลิลิตร

1.3 สารละลายโซเดียมคลอไรด์ ปริมาตร 10 มิลลิลิตร

ละลายโซเดียมคลอไรด์ 11 กรัม ในน้ำด้วย De-ionized water ปรับปริมาตรให้ได้ 100 มิลลิลิตร

1.4 $\text{CaCl}_2 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$ ปริมาตร 10 มิลลิลิตร

ละลาย $\text{CaCl}_2 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$ 0.9 กรัม ในน้ำด้วย De-ionized water ปรับปริมาตรให้ได้ 100 มิลลิลิตร

1.5 L-glutamine 1 มิลลิลิตร

L-glutamine 0.015 กรัม ผสมกับน้ำ De-ionized water 1 มิลลิลิตร กรองผ่านกระดาษกรอง ขนาด 0.2 ไมโครเมตร

1.6 HEPES จำนวน 0.238 กรัม

1.7 L-cysteine จำนวน 5 กรัม

วิธีการเตรียม K-199 จำนวน 100 มิลลิลิตร โดยนำสายละลายจากข้อ 1.1-1.7 ผสมกันตามลำดับ ปรับปริมาตรให้ครบ 100 มิลลิลิตร ด้วยน้ำ De-ionized water ปรับพีเอช ด้วยกรดไฮโดรคลอริก (HCl) และโซเดียมไฮดรอกไซด์ (NaOH) ให้พีเอชอยู่ในช่วง 7.3-7.6 กรองด้วยหัวกรอง ขนาด 0.2 ไมโครเมตรใน Laminar flow

2. Shrimp saline

โซเดียมคลอไรด์	28.4 กรัม
$\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	1.0 กรัม
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	2.0 กรัม
$\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	2.25 กรัม
โพแทสเซียมคลอไรด์	0.7 กรัม
Glucose (Dextrose)	1.0 กรัม
Hepes	2.38 กรัม

ผสมสารทั้งหมดในน้ำ De-ionized water 1 ลิตร กรองด้วยกระดาษกรองขนาด 0.22

ไมโครเมตร ในขวดที่ผ่านการฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส และอบให้แห้ง เก็บสารละลายไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

3. การเตรียม Heat-killed yeast

Baker's yeast

0.9 เปอร์เซนต์ โซเดียมคลอไรด์

shrimp saline

นำ Baker's yeast ละลายใน 0.9 เปอร์เซนต์ โซเดียมคลอไรด์ ต้มเป็นเวลา 1 ชั่วโมง จากนั้นทำการล้าง yeast ด้วย shrimp saline ที่ 3,000 rpm. 5 ครั้ง ครั้งละ 10 นาที โดยใช้อัตราส่วนระหว่าง shrimp saline : yeast เท่ากับ 1 : 1 หลังจากนั้นล้างด้วย shrimp saline เพื่อให้ได้สารละลายที่มีเซลล์จำนวน 5×10^8 เซลล์ต่อมิลลิลิตร เก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

4. การเตรียมสารละลาย phosphate buffer 0.01 โมลต่อลิตร พีเอช 7.0

KH_2PO_4 1.3609 กรัม

ปรับปริมาตรด้วย De-ionized water ให้ได้ 1,000 มิลลิลิตร ปรับพีเอชให้ได้ 7.0 ด้วยกรดไฮโดรคลอริก (HCl) และโซเดียมไฮดรอกไซด์ (NaOH)

5. การเตรียมสารในชุดการทดลองสำเร็จรูป (test kit) RANSOD[®] Superoxide dismutase

5.1) สารละลาย Reagent 1 (R_{1a}) ทำการเติมสารละลาย R_{1b} ลงในขวดสาร R_{1a} ปริมาตร 20 มิลลิลิตร

5.2) สารละลาย Reagent 2 (R_2) ทำหน้าที่เป็น Xanthine oxidase (enzyme) โดยเติมน้ำกลั่น ชนิด tri-distilled water ปริมาตร 10 มิลลิลิตร

5.3) สารละลายมาตรฐาน CAL standard (S_0) โดยเติมน้ำกลั่นชนิด tri-distilled water ปริมาตร 10 มิลลิลิตร



ประวัติการศึกษาและการทำงาน

ชื่อ	นางสาวทิพย์ภาพร หล่อสิงห์คำ
เกิดวันที่	26 พฤศจิกายน 2528
สถานที่เกิด	อำเภอสามเสนนอก จังหวัดกรุงเทพมหานคร
ประวัติการศึกษา	วท.บ. (ประมง) มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์
ตำแหน่งปัจจุบัน	-
สถานที่ทำงานปัจจุบัน	คณะประมง มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์
ผลงานดีเด่นและ/หรือรางวัลทางวิชาการ	-
ทุนการศึกษาที่ได้รับ	-