รายงานฉบับสมบูรณ์

โครงการวิจัยเรื่อง

เมตาโบไลท์ของอะฟลาท็อกซิน บี 1 ในกุ้ง

(Metabolites of Aflatoxin B1 in Shrimp)

งบประมาณประจำปี 2540

615.952
923
อ153ม

โดย

ผู้ช่วยศาสตราจารย์ สัตวแพทย์หญิง ดร. อนงค์ บิณฑวิหค

กันยายน 2541

รายงานฉบับสมบูรณ์โครงการวิจัย

ชื่อโครงการ เมตาโบไลท์ของอะฟลาท็อกซิน บี 1 ในกุ้ง

Metabolites of Aflatoxin B1 in Shrimp

หัวหน้าโครงการ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ สัตวแพทย์หญิง ดร. อนงค์ บิณฑวิหค

ที่ปรึกษาโครงการ รองศาสตราจารย์ นายสัตวแพทย์ ดร. จิรศักดิ์ ตั้งตรงไพโรจน์

รองศาสตราจารย์ สัตวแพทย์หญิง ดร. วรา พานิชเกรียงไกร

รองศาสตราจารย์ นายสัตวแพทย์ ระบิล รัตนพานี

ผู้ร่วมโครงการ อาจารย์ สัตวแพทย์หญิง อรัญญา พลพรพิสิฐ

หน่วยงานที่รับผิดชอบ ภาควิชาเภสัชวิทยา คณะสัตวแพทยศาสตร์

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ถนนอังรีดูนังต์ ปทุมวัน

กทม.10330

โทรศัพท์ 2189728 โทรสาร 2189731

ความสำคัญและที่มาของปัญหาที่ทำการวิจัย

ประเทศไทยอยู่ในเขตภูมิอากาศร้อนชื้น มีสภาวะเหมาะสมให้เกิดการปนเปื้อนของเชื้อราจำพวกแอสเปอร์จิลลัสฟลาวัส และแอสเปอร์จิลลัสพาราซิติกัส ในผลิตผลทางการเกษตร เช่น ข้าวโพด ถั่วลิสง ข้าวสาลี ข้าวฟ่าง มันสำปะหลัง ปลาป่น เป็นต้น ซึ่งเชื้อราเหล่านี้สามารถผลิตสารพิษอะฟลาท็อกซิน และแทรกซึมอยู่ในเนื้อสารของผลิตผลทางการเกษตร ซึ่งเมื่อนำมาผสมเป็นอาหารสัตว์ จึงมักมีการปนเปื้อนของสารพิษนี้ด้วย

โดยธรรมชาติจะพบสารพิษอะฟลาท็อกซินชนิด บี1 บี2 จี1 และจี2 ซึ่งชนิดบี1มีความเป็นพิษรุนแรงมากที่สุด ถึงขั้นให้ผู้บริโภคเสียชีวิตได้ เมื่อสัตว์ได้รับสารพิษเหล่านี้ผ่านมาทางอาหารสัตว์และเข้าสู่ร่างกาย จะเกิดการเปลี่ยนแปลงทางเคมีและได้เมตาโบไลท์ของอะฟลาท็อกซินบี1ขึ้น เช่น เกิดเป็นอะฟลาท็อกซินเอ็ม1 พี1 คิว1 อาร์ศูนย์หรืออะฟลาท็อกซิโคล เป็นต้น ซึ่งเมตาโบไลท์เหล่านี้ มีความเป็นพิษรุนแรงลดลงหรือน้อยกว่าอะฟลาท็อกซินบี1 ไม่ทำให้ผู้บริโภคมีอันตรายถึงแก่ชีวิต แต่บั่นทอนสุขภาพและผล

6 ม.ค. 2541

ผลิตต่างๆ เช่น เจริญเติบโตช้า ความต้านทานโรคลดลง ไข่ลด น้ำนมลด อัตราการผสมติดลดลง อัตราการเปลี่ยนเนื้อลดลง เป็นต้น นอกจากนี้สารพิษยังสามารถผ่านไปตามกระแสโลหิต ทำลายระบบการทำงานต่างๆของร่างกายให้เสื่อมโทรมลง รวมทั้งเกิดการสะสมหรือตกค้างตามเนื้อเยื่ออวัยวะต่างๆและผ่านสู่ผลิตภัณฑ์ที่ได้จากสัตว์ เช่น น้ำนม ไข่ เป็นต้น อันตรายของสารพิษนี้จัดเป็นสารก่อมะเร็งมีโทษถึงแก่ชีวิตได้

มีการศึกษาสารพิษอะฟลาท็อกซินและเมตาโบไลท์ในปศุสัตว์และสัตว์น้ำ เช่น ไก่ เป็ด สุกร โค ปลา เป็นต้น แต่การศึกษาในกุ้งมีน้อยมาก จึงเห็นควรทำการศึกษาในกุ้งกุลาดำ ซึ่งเป็นสัตว์น้ำที่นิยมเลี้ยงเพื่อการบริโภคเป็นอาหาร และจัดเป็นสัตว์เศรษฐกิจที่ทำรายได้ให้กับการส่งออกของประเทศปีละมากกว่าหมื่นล้านบาท

วัตถุประสงค์ของโครงการ

1. เพื่อศึกษาถึงเมตาโบไลท์ของอะฟลาท็อกซินบี1ในกุ้ง
2. เพื่อศึกษาถึงผลของอะฟลาท็อกซิน บี1 ที่มีต่อการเปลี่ยนแปลงสภาวะสุขภาพในร่างกายของกุ้ง
3. เพื่อศึกษาถึงปริมาณสารพิษตกค้างในกล้ามเนื้อกุ้ง

วิธีดำเนินงาน

การทดลองที่ 1

1. วางแผนการทดลองแบบ Completely Randomized Design ใช้กุ้งกุลาดำ อายุ 3 เดือนครึ่ง จำนวน 500 ตัว จากฟาร์มเลี้ยงกุ้งเอกชน ซึ่งเลี้ยงในบ่อธรรมชาติด้วยความเค็มของน้ำ 1-2 ppt (part per thousand) นำกุ้งมาเลี้ยงในบ่อพักก่อนการทดลอง ซึ่งมีความจุ 1.6 x 3.1 x 1.0 ลูกบาศก์เมตร ความสูงของน้ำ 0.7 เมตร ด้วยความเค็มของน้ำเท่าเดิม เลี้ยงด้วยอาหารปกติเป็นเวลา 10 วัน จนกุ้งที่รอดตายสามารถปรับตัวได้แล้ว จึงแบ่งกุ้งทดลองออกเป็น 4 กลุ่มโดยน้ำหนัก กลุ่มละ 90 ตัว โดยทำ 3 ซ้ำๆละ 30 ตัว นำกุ้งมาเลี้ยงในบ่อทดลอง ซึ่งมีความจุ 0.86 x 0.86 x 0.9 ลูกบาศก์เมตร ความสูงของน้ำ 0.5 เมตร และความเค็มของน้ำเท่าเดิม จำนวนกุ้งบ่อละ 30 ตัว รวม 12 บ่อ และใช้กุ้งในการทดลองรวม 360 ตัว

2. ให้อาหารที่ผสมอะฟลาท็อกซิน บี1 (Sigma,USA.)ในขนาด 0, 5, 10 และ 20 ไมโครกรัมต่อกิโลกรัมอาหาร (ppb หรือ part per billion) ในกุ้งทดลองกลุ่มที่ 1, 2, 3 และ 4 ตามลำดับ โดยกุ้งกลุ่มที่ 1 เป็นกลุ่มควบคุมคือให้อาหารปลอดจากสารพิษอะฟลาท็อกซิน ทำการเลี้ยงกุ้งทดลองด้วยอาหารดังกล่าวติดต่อกันทุกวัน

3. ในระหว่างทำการทดลอง ให้จดบันทึกข้อมูลด้านสุขภาพ เช่น น้ำหนักกุ้ง การกินอาหาร อัตราการตาย เป็นต้น

4. ทำการเจาะเลือด hemolymph และฆ่ากุ้งบ่อละ 10 ตัว รวมกลุ่มละ 30 ตัว ในวันที่ 7 ของการทดลอง และทำเช่นเดิมสำหรับกุ้งที่เหลือทั้งหมดในวันที่ 10 ของการทดลอง ทำการเก็บตัวอย่าง hepatopancreas และกล้ามเนื้อของกุ้งทดลอง

5. นำ hemolymph มาแยกซีรั่มเก็บที่ -20° ซ เพื่อตรวจวิเคราะห์ทางชีวเคมีด้วยเครื่องตรวจ dry chem. ของ Kodak EKTACHEM DT 60 II และ DTSC II นำ hepatopancreas มาวิเคราะห์ทางจุลพยาธิวิทยา โดยใช้ Davidson' s fixative แล้วนำมาผ่านกระบวนการเตรียมเนื้อเยื่อ, paraffin embedding, sectioning และย้อมสีด้วย H&E (hematoxylin and eosin) ตรวจดูทางพยาธิฮีสโตของ hepatopancreatic damage degree คือ ดูลักษณะของการเกิด necrosis ของ tubule epithelium, ปริมาณการเกิด vacuolation ของเซลต่างๆในแต่ละ tubule, bacterial clump ใน tubule โดยแบ่งระดับของ damage degree (grading index) เป็น 5 ระดับ คือ 0 (ไม่มีความผิดปกติต่างๆที่กล่าวมา), 1 (มีความผิดปกติเฉพาะ tubule epithelium necrosis เป็นบางบริเวณ), 2 (มี necrosis ของ tubule, vacuolation เป็นบริเวณมากขึ้น), 3 (มี necrosis ของ tubule, vacuolation เป็นบริเวณมากขึ้น), 4 (มี necrosis ของ tubule และ vacuolation เกือบทั้ง lobe)

นำกล้ามเนื้อมาเก็บที่ -20° ซ เพื่อตรวจหาสารพิษอะฟลาท็อกซินและเมตาโบไลท์ตกค้าง โดยสกัดตัวอย่างด้วยวิธี Association of Official Analytical Chemistry (AOAC Sec. 982.24, ปี ค.ศ. 1995) ทำให้บริสุทธิ์โดยใช้ sep-pak silica cartridge (Sugano et.al 1993) วัดหาปริมาณสารพิษอะฟลาท็อกซินและเมตาโบไลท์โดยใช้

HPLC (High Performance Liquid Chromatography,Shimadzu,Japan) ด้วย fluorescence HPLC monitor RF-535, LC-6A pump, SCL-6B system controller, column oven CTO-6A และ C-R3A chromatopac ใช้ normal phase column system ตรวจหา aflatoxin B1,B2,G1 และ G2 โดยใช้ nucleosil 50-10 column (30 cm x 4.6 mm) mobile phase ใช้ water saturated with chloroform : cyclohexane : acetonitrile : ethanol (50+15+2+1) ด้วย 1 ml/min flow rate และใช้ reverse phase column system ตรวจหา aflatoxin M1 และ aflatoxicol (R0) โดยใช้ micro-bondapak C 18 column (15 cm x 4.6 mm) mobile phase ใช้ 45% methanol ด้วย 1 ml/min flow rate

6. นำผลที่ได้มาวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ Analysis of variance, Duncan's multiple range test, Statistical analysis system

การทดลองที่ 2

1. วางแผนการทดลองแบบ Completely Randomized Design ใช้กุ้งกุลาดำ อายุ 3 เดือนครึ่ง จำนวน 1200 ตัว จากฟาร์มเลี้ยงกุ้งเอกชน เลี้ยงในบ่อพักก่อนการทดลอง (ขนาดเช่นเดียวกับการทดลองที่ 1) ใช้ความเค็มของน้ำ 10 ppt เลี้ยงกุ้งด้วยอาหารปกติเป็นเวลา 5 วัน จนกุ้งที่รอดตายสามารถปรับตัวได้แล้ว จึงแบ่งกุ้งทดลองออกเป็น 4 กลุ่มโดยน้ำหนัก กลุ่มละ 240 ตัว โดยทำ 4 ซ้ำๆละ 60 ตัว รวมใช้บ่อทดลอง 16 บ่อ (ขนาดเช่นเดียวกับการทดลองที่ 1) ด้วยความเค็มของน้ำ 4 ppt จำนวนกุ้งบ่อละ 60 ตัว รวมใช้กุ้งในการทดลอง 960 ตัว

2. ให้อาหารที่ผสมอะฟลาท็อกซินบี1 ขนาด 0, 5, 10 และ 20 ไมโครกรัมต่อกิโลกรัมอาหาร ในกุ้งทดลองกลุ่มที่ 1, 2, 3 และ 4 ตามลำดับ ซึ่งกุ้งกลุ่มที่ 1 เป็นกลุ่มควบคุม ให้อาหารที่ปลอดจากสารพิษอะฟลาท็อกซิน ทำการเลี้ยงกุ้งทดลองด้วยอาหารดังกล่าวติดต่อกันทุกวัน

3. ในระหว่างทำการทดลอง ให้จดบันทึกข้อมูลด้านสุขภาพ เช่น น้ำหนักกุ้ง การกินอาหาร อัตราการตาย เป็นต้น

พระมงกุฎเกล้า จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

4. ทำการเจาะเลือด hemolymph และฆ่ากุ้งบ่อละ 10 ตัว รวมกลุ่มละ 40 ตัว ในวันที่ 8 ของการทดลอง และทำเช่นเดิมสำหรับกุ้งที่เหลือทั้งหมดในวันที่ 10 ของการทดลอง ทำการเก็บตัวอย่าง hepatopancreas, gill filament และ lymphoid organ และกล้ามเนื้อของกุ้งทดลอง เพื่อวิเคราะห์ในห้องปฏิบัติการต่อไป

5. นำ hemolymph จำนวน 0.1 ซีซี (มิลลิลิตร) ผสมใน 10% formalin 0.2 ซีซี และเก็บไว้ที่ 6° ซ เพื่อทำการตรวจนับจำนวนเม็ดเลือด total hemocyte count โดยใช้เครื่อง Coulter Z1 ซึ่งจะนับขนาด particle ตามที่กำหนด ในการทดลองครั้งนี้ได้วัดขนาดความกว้างยาวของเม็ดเลือดกุ้งด้วย micrometer ได้ขนาดเฉลี่ย 12.0 μm จึงกำหนดขนาด particle ที่ใช้วัดด้วยเครื่อง Coulter Z1 ที่ 11.39-12.40 μm โดยทำการวัดตัวอย่างละ 5 ครั้ง ส่วนการนับจำนวนเม็ดเลือดตามชนิด agranulocytes หรือ granulocytes ใช้ตรวจดูจากกล้องจุลทรรศน์ กำลังขยาย 40x สำหรับ hemolymph ที่เหลือนำมาแยกซีรั่มและเก็บที่ -20° ซ เพื่อตรวจวิเคราะห์ทางชีวเคมีด้วยเครื่องตรวจ dry chem. ของ Kodak EKTACHEM DT 60 II และ DTSC II

นำ hepatopancreas, gill filament และ lymphoid organ มาวิเคราะห์ทางจุลพยาธิวิทยา เช่นเดียวกับการทดลองที่ 1 รวมทั้งการพิจารณา hepatopancreatic damage degree ส่วน gill filament ตรวจการเกิด hyperplasia และ hypertrophy ของ filament ดูการเกิด edema ในบริเวณต่างๆ ใช้ grading index 5 ระดับ คือ 0 (ไม่มีลักษณะดังกล่าว), 1 (มี hypertrophy บางบริเวณ), 2 (มี hypertrophy และ hyperplasia บางบริเวณ), 3 (มี hypertrophy และ edema หรือ hyperplasia และ edema ในบางบริเวณ), 4 (มี edema เป็นบริเวณกว้างร่วมกับ hypertrophy และ hyperplasia) สำหรับ lymphoid organ ตรวจการเกิด necrotic area,cell atrophy, vacuolation ใช้ grading index 5 ระดับ คือ 0 (ไม่มีลักษณะดังกล่าว), 1 (มี necrotic lobule <30%), 2 (มี necrotic lobule 30-50%), 3 (มี necrotic lobule >50%), 4 (มี necrotic lobule >50%, มี vacuolation และ cell atrophy) นอกจากนี้ยังตรวจการมี inclusion bodies ของ Monodon Baculovirus และ

Hepatopancreatic parvo-like virus เพราะเป็น virus ที่พบได้ทั่วไปในกุ้งกุลาดำ ถ้ามีการติดเชื้อ virus นี้ จะทำให้กุ้งมีสุขภาพไม่แข็งแรง มีโอกาสเจ็บป่วยได้มากกว่ากุ้งปกติ ถึงแม้ไม่ทำให้กุ้งตายแต่อาจทำให้ผลรบกวนการทดลอง แต่ในกรณีของไวรัสอื่นๆ เช่น ไวรัสที่ทำให้เกิดโรคหัวเหลือง ถ้ามีการติดเชื้อจะทำให้กุ้งตายเป็นจำนวนมากและไม่สามารถทำการทดลองได้อยู่แล้วจึงไม่ได้ทำการตรวจสอบ

นำกล้ามเนื้อซึ่งเก็บไว้ที่ -20° ซ มาตรวจหาสารพิษอะฟลาท็อกซินและเมตาโบไลท์ตกค้าง โดยใช้ HPLC เช่นเดียวกับการทดลองที่ 1

6. นำผลที่ได้มาวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ Analysis of variance, Duncan's multiple range test, Statistical analysis system

ผลการทดลอง

จากการทดลองที่ 1 แสดงในตารางที่ 1-5 และการทดลองที่ 2 แสดงในตารางที่ 6-12 ซึ่งผลการทดลองพอสรุปได้ว่าสารพิษอะฟลาท็อกซินมีผลต่อการเปลี่ยนแปลงสภาวะสุขภาพของร่างกายกุ้ง ทำให้น้ำหนักลดลง อัตราการตายสูงกว่าเมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม มีผลทำให้สุขภาพทรุดโทรมและมีการทำลายอวัยวะสำคัญเกิดขึ้นบ้างเมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม โดยพิจารณาจากผลของการตรวจนับเม็ดเลือด hemolymph ค่าทางชีวเคมี และจุลพยาธิวิทยา เช่น hepatopancreas, gill filament, lymphoid organ, SGOT (serum glutamic oxaloacetic transaminase), SGPT (serum glutamic pyruvic transaminase), ALP (alkaline phosphatase), LDH (lactate dehydrogenase), TG (triglyceride), TP (total protein) เป็นต้น

กุ้งทดลองมีอัตราการกินอาหารไม่แตกต่างกันเมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม ยกเว้นกลุ่มที่ได้รับ AFB1 20 ppb ในระยะท้ายของการทดลองกินอาหารลดลงทำให้แสดงผลอันตรายจากสารพิษไม่เด่นชัดนักเมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มที่ได้รับสารพิษ 10 ppb หรือ 5 ppb แต่อย่างไรก็ตามกุ้งกินอาหารได้น้อยกว่ามากเมื่อเปรียบเทียบกับการเลี้ยงในบ่อธรรมชาติ ซึ่งอาจมีผลมาจากการถูกรบกวนระหว่างมีการทดลองเลี้ยงในบ่อ

ทดลอง เช่น การเปลี่ยนน้ำ การเก็บอาหารที่เหลือกิน การตรวจหากุ้งตาย ความเค็มของน้ำ แสงสว่าง อุณหภูมิ เป็นต้น นอกจากนี้การตรวจกล้ามเนื้อกุ้งเพื่อหาสารพิษตกค้างนั้น ไม่พบสารอะฟลาท็อกซินและเมตาโบไลท์ตกค้างในเนื้อกุ้งทดลองทุกกลุ่มการทดลอง แสดงว่าปริมาณอะฟลาท็อกซิน บี1 ที่อาจมีปนเปื้อนได้ในอาหารกุ้ง ต่ำกว่า 20 ppb จัดว่าปลอดภัยต่อผู้บริโภคเนื้อกุ้งเป็นอาหาร แต่อย่างไรก็ตาม การทดลองครั้งนี้ใช้เวลาเพียง 10 วัน กุ้งทดลองอาจยังไม่ปรากฏผลอย่างเด่นชัดนัก หากมีการกินอาหารที่ปนเปื้อนสารพิษนี้เป็นระยะเวลายาวนานในบ่อเลี้ยงธรรมชาติ ทำให้สารพิษเกิดการสะสมในร่างกายและอวัยวะของกุ้งมากขึ้น และสามารถตรวจพบได้ จึงจัดว่าก่ออันตรายให้กับผู้บริโภค ซึ่งสมควรมีการศึกษาต่อไป

วิจารณ์และเสนอแนะ

จากการทดลองใช้อะฟลาท็อกซิน บี1 ขนาด 5, 10 และ 20 ppb ผสมในอาหารให้กุ้งกินเป็นเวลา 10 วัน จัดว่าใช้ปริมาณน้อยและระยะเวลาสั้น เมื่อเปรียบเทียบกับค่า LD_{50} 100.5 mg/kg (Wiseman et.al. 1982) ในกุ้งตระกูล Penaeid shrimp ซึ่งแสดงพิษเฉียบพลัน แต่อย่างไรก็ตามการทดลองนี้ใช้ขนาดสารพิษอะฟลาท็อกซินที่อนุญาตให้มีได้ในอาหารเป็นเกณฑ์การทดลอง (Gilbert 1991; Van Egmond 1991) เพื่อประโยชน์ในการผลิตและส่งออกในสินค้าที่มีคุณภาพ ซึ่งระดับ maximum tolerated level ของอะฟลาท็อกซินบี 1 ในอาหารในประเทศแถบเอเชีย คือ 5-50 พีพีบี ยกเว้นประเทศสิงค์โปร์และเวียตนามที่กำหนดเป็นศูนย์ และจากการตรวจพบสารพิษอะฟลาท็อกซินปนเปื้อนในอาหารกุ้งทั่วไป ในปริมาณโดยเฉลี่ยน้อยกว่า 1 พีพีบี (อนงค์ บิณฑวิหค และคณะ 2541) ซึ่งจัดว่าอาหารกุ้งโดยทั่วไปปลอดภัยและใช้เลี้ยงกุ้งได้

การวินิจฉัยที่สอดคล้องกับการวิจัยของนักวิจัยอื่นๆ เช่น การพบ necrosis หรือ atrophy ของ hepatopancreas (Lightner and Redman 1982) การเปลี่ยนแปลงของจำนวนเม็ดเลือด (Aquamed 1994) เป็นต้น ซึ่งจัดว่ามีการเปลี่ยนแปลงน้อยมาก แต่อย่างไรก็ตามในการทดลองนี้มีสิ่งแวดล้อมและการเลี้ยงดูในบ่อทดลองเป็นตัวแปร

สำคัญด้วย (Sindermann 1987) จึงใช้การเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุมเป็นเกณฑ์กลาง ซึ่งอาจให้ค่าที่แตกต่างจากการทดลองอื่นๆ นอกจากนี้การทดลองในสัตว์น้ำส่วนใหญ่เป็นการศึกษาในปลาเรนโบว์เทราต์ หรือ ปลาซาลมอน ซึ่งมีความไวต่อสารพิษนี้สูง (Wyllie and Morehouse 1978) ส่วนการทดลองในกุ้งกุลาดำที่เลี้ยงในประเทศไทยยังมีการศึกษาน้อยมาก จึงเห็นควรมีการศึกษาต่อเนื่องต่อไป เพื่อประโยชน์ในการเพิ่มคุณภาพอาหารที่มาจากสัตว์น้ำจำพวกกุ้ง และเพิ่มเศรษฐกิจด้านการเลี้ยงกุ้งให้มีคุณภาพและประสิทธิภาพดียิ่งขึ้น รวมทั้งเป็นแนวทางในการกำหนดคุณภาพอาหารกุ้งและผลิตภัณฑ์จากเนื้อกุ้งเพื่อประโยชน์ต่อเกษตรกรและผู้บริโภคต่อไปอย่างดียิ่ง

กิตติกรรมประกาศ

งานวิจัยนี้ได้รับการอุดหนุนเงินจากงบประมาณแผ่นดินปี 2540 คณะผู้ดำเนินงานขอขอบพระคุณสำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติที่ให้การสนับสนุน และขอขอบคุณ นายอนาวิล ปิติวรรณ, นายมนัส แตงอ่อน และนายปิยวัฒก์ วสยางกูร ที่ให้ความช่วยเหลือในการตรวจนับเม็ดเลือดกุ้งกุลาดำทดลองในงานนี้

เอกสารอ้างอิง

1. Aquamed, (1994). An aquatic animal pathobiology course, shrimp. BatonRouge, LA and Galveston, Tx. June 6- July 1, 1994.

2. Association of Official Analytical Chemistry (1995). Official method of analysis : natural poisons, 16th ed., Vol.II, Assoc.Off.Anal.Chem. Gaithersburg, Maryland, USA., 31-32.

3. Gilbert,J. (1991). Regulatory aspects of mycotoxins in the European community and USA. In : Fungi and mycotoxins in stored products (B.R. Champ; E.Highley; A.D.Hocking and J.I.Pitt eds.) ACIAR Proceedings No.36, 194-197.

4. Lightner D.V. and Redmann, R.M. (1982). Histopathology of aflatoxicosis in marine shrimp *Penaeus stylirostris* and *P.vannanei*. Journal of Intervertebrate Pathology.40, 279-291.

5. Sindermann, C.J. (1987). Aflatoxicosis of Penaeid shrimp. Disease Diagnosis and Control in North American Marine Aquaculture. 2nd edition, 96-99.

6. Sugano, K., Bintvihok, A., Tanacharoenwatch, P., Sookthinthai, L. and Intraraksa, R. (1993). Simple and rapid cleanup method for determination of aflatoxin B1 in mixed feed by sep-pak florisil cartridge. Proceedings of Japanese Association of Mycotoxicology No.37, 43-45.

7. Van Egmond,H.D. (1991). Regulatory aspects of mycotoxins in Asia and Africa. In : Fungi and mycotoxins in stored products (B.R. Champ; E.Highley; A.D. Hocking and J.I.Pitt, eds.) ACIAR Proceedings No.36, 198-204.

8. Wisemann, M.O., Price, R.L., Lightner, D.V. and Williams, R.R. (1982). Toxicity of aflatoxin B1 to Penaeus shrimp. Applied and Environmental Microbiology., 1479-1481.

9. Wyllie, D.T. and Morehouse, L.G. (1978). The effects of mycotoxins in aquatic animals. Mycotoxic Fungi Mycotoxins, Mycotoxicoses of Domestic and Laboratory Animals, Poultry and Aquatic Invertebrates and Vertebrates., 498-502.

10. อนงค์ บิณฑวิหค, ดานิศ ทวีติยานนท์ และศุภรัตน์ โฆษิตเจริญกุล (2541) การตรวจหาสารพิษอะฟลาท็อกซินตกค้างในอาหารกุ้ง จุฬาวิจัย 17(8), 18-21.

ตารางที่ 1 น้ำหนักเฉลี่ย (กรัม) ของกุ้งกุลาดำที่ได้รับอาหารผสมอะฟลาท็อกซิน บี 1 (AFB1) ในขนาด 0, 5, 10 และ 20 ppb เป็นเวลา 7 และ 10 วัน

กลุ่มที่ได้รับ	น้ำหนักเฉลี่ยของกุ้งต่อตัว (กรัม)		
AFB1(ppb)	ก่อนการทดลอง	7 วันของการทดลอง	10 วันของการทดลอง
0	14.3	15.3	15.66
5	14.3	9.8*	6.71*
10	14.3	12.7	8.12*
20	14.5	14.13	8.57*

* แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ $p<0.05$ เมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม

ตารางที่ 2 อัตราการตายของกุ้งกุลาดำ (%) ที่ได้รับอาหารผสมอะฟลาท็อกซิน บี1 (AFB1)ในขนาด 0, 5, 10 และ 20 ppb เป็นเวลา 7 และ 10 วัน

กลุ่มที่ได้รับ	อัตราการตาย ตัวตาย/ทั้งหมด (%)	
AFB1(ppb)	7 วันของการทดลอง	10 วันของการทดลอง
0	18/90 (20.00)	34/90 (37.78)
5	22/90 (24.44)	56/90 (62.22)*
10	33/90 (36.67)*	59/90 (65.55)*
20	41/90 (45.55)*	58/90 (64.44)*

*แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ $P<0.05$ เมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม

ตารางที่ 3 ค่าทางชีวเคมีของกุ้งกุลาดำที่ได้รับอาหารผสมอะฟลาท็อกซิน บี1 (AFB1) ในขนาด 0, 5, 10 และ 20 ppb เป็นเวลา 7 วัน

ค่าทางชีวเคมี	กลุ่มที่ได้รับ AFB1(ppb)			
(mean±SE)	0	5	10	20
SGOT (units)	261.67±1.53	244.50±1.39	228.33±2.08	187.67±2.59*
SGPT (units)	21.00±1.99	47.50±1.63*	41.12±1.38*	37.50±2.50*
Glucose (mg%)	43.13±2.83	48.30±2.08	47.50±2.76	47.11±2.56
Urea N (mg%)	7.00±0.94	7.00±1.29	7.33±1.54	7.12±1.24
Creatin (mg%)	1.00±0.02	0.88±0.04	1.35±0.08	0.73±0.06
TP (mg%)	6.40±0.62	7.55±1.06	8.00±0.91	7.35±1.34
P (mEq/l)	2.80±0.03	2.30±0.07	2.33±0.08	2.07±0.13

* แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ $P<0.05$ เมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม

ตารางที่ 4 ค่าทางชีวเคมีของกุ้งกุลาดำที่ได้รับอาหารผสมอะฟลาท็อกซิน บี1 (AFB1) ในขนาด 0, 5, 10 และ 20 ppb เป็นเวลา 10 วัน

ค่าทางชีวเคมี	กลุ่มที่ได้รับ AFB1(ppb)			
(mean±SE)	0	5	10	20
SGOT (units)	255.11±1.34	152.08±1.71*	218.23±1.63	193.36±2.56*
SGPT (units)	20.12±1.06	45.11±1.86*	39.44±2.45*	28.10±1.40
Glucose (mg%)	36.00±1.25	34.00±1.39	35.50±1.57	32.12±1.06
Urea N (mg%)	7.00±0.13	7.00±1.23	6.50±1.45	6.55±1.67
Creatin (mg%)	0.90±0.07	0.50±0.04	0.95±0.12	0.55±0.23
TP (mg%)	6.40±0.05	6.60±1.34	7.40±1.56	6.60±1.29
P (mEq/l)	2.41±0.07	2.00±0.09	2.25±0.34	2.33±0.76

* แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ $P<0.05$ เมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม

ตารางที่ 5 ผลทางจุลพยาธิวิทยาของ hepatopancreas ของกุ้งกุลาดำที่ได้รับอาหารผสมอะฟลาท็อกซิน บี1(AFB1)ในขนาด 0, 5, 10 และ 20 ppb เป็นเวลา 7 และ10 วัน

กลุ่มที่ได้รับ	ค่าเฉลี่ย hepatopancreatic damage degree	
AFB1(ppb)	7 วันของการทดลอง	10 วันของการทดลอง
0	0.15	0
5	1.67	1.17
10	1.75	0.58
20	1.00	0.67

ตารางที่ 6 น้ำหนักเฉลี่ย (กรัม) ของกุ้งกุลาดำที่ได้รับอาหารผสมอะฟลาท็อกซิน บี1 (AFB1) ในขนาด 0, 5, 10 และ 20 ppb เป็นเวลา 8 และ 10 วัน

กลุ่มที่ได้รับ	น้ำหนักเฉลี่ยของกุ้งต่อตัว (กรัม)		
AFB1(ppb)	ก่อนการทดลอง	8 วันของการทดลอง	10 วันของการทดลอง
0	15.05	16.47	16.95
5	14.85	13.87*	13.12*
10	14.92	15.50	13.42*
20	15.27	15.62	12.24*

* แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ $P<0.05$ เมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม

ตารางที่ 7 อัตราการตายของกุ้งกุลาดำ (%) ที่ได้รับอาหารผสมอะฟลาท็อกซิน บี1 (AFB1) ในขนาด 0, 5, 10 และ 20 ppb เป็นเวลา 8 และ 10 วัน

กลุ่มที่ได้รับ	อัตราการตาย ตัวตาย/ทั้งหมด (%)	
AFB1(ppb)	7 วันของการทดลอง	10 วันของการทดลอง
0	98/240 (40.83)	111/240 (46.25)
5	156/240 (65.00)*	163/240 (67.92)*
10	133/240 (55.42)*	152/240 (63.33)*
20	120/240 (50.00)	135/240 (56.25)

* แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ $P<0.05$ เมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม

ตารางที่ 8 ค่าทางชีวเคมีของกุ้งกุลาดำที่ได้รับอาหารผสมอะฟลาท็อกซิน บี1 (AFB1) ในขนาด 0, 5, 10 และ 20 ppb เป็นเวลา 8 วัน

ค่าทางชีวเคมี	กลุ่มที่ได้รับ AFB1 (ppb)			
(mean±SE)	0	5	10	20
SGOT (units)	177.63±2.73	141.25±3.45	134.40±2.56*	114.38±3.22*
LDH (units)	182.63±3.45	147.38±3.67*	179.21±3.88	154.34±4.67*
Glucose (mg%)	44.00±1.29	42.00±3.09	36.67±2.68	37.29±2.33
Urea N (mg%)	6.25±0.08	4.13±0.34	4.11±0.67	5.71±0.56
Creatin (mg%)	1.71±0.05	1.31±0.78	1.78±0.56	0.96±0.45
TP (mg%)	6.39±0.78	5.84±0.67	4.16±0.44*	5.57±0.39
Ca (mEq/l)	44.30±1.67	42.96±2.45	48.49±2.87	57.40±2.98
P (mEq/l)	1.70±0.07	1.80±0.12	1.36±0.08	1.39±0.34

* แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ $P<0.05$ เมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม

ตารางที่ 9 ค่าทางชีวเคมีของกุ้งกุลาดำที่ได้รับอาหารผสมอะฟลาท็อกซิน บี1 (AFB1) ในขนาด 0, 5, 10 และ 20 ppb เป็นเวลา 10 วัน

ค่าทางชีวเคมี	กลุ่มที่ได้รับ AFB1 (ppb)			
(mean±SE)	0	5	10	20
SGOT (units)	152.67±3.24	130.00±2.56	156.43±3.55	213.09±3.78*
LDH (units)	132.44±2.56	119.67±3.78	205.57±4.23*	126.88±4.16
ALP (units)	37.67±0.89	21.50±3.25*	44.56±2.87	26.89±4.66*
TG (mg%)	22.67±1.45	35.00±2.67*	28.33±2.87	30.00±2.56
Glucose (mg%)	79.44±4.56	43.67±3.89*	65.14±3.67	76.40±3.88
Urea N (mg%)	5.33±0.88	5.33±0.13	5.14±0.25	5.60±0.67
Creatin (mg%)	0.97±0.05	0.97±0.24	0.89±0.36	0.84±0.55
TP (mg%)	5.97±0.89	6.80±0.23	5.84±0.67	6.98±0.46
Ca (mEq/l)	59.80±0.36	46.13±0.78	53.57±0.87	47.56±0.79
P (mEq/l)	2.48±0.77	2.63±0.25	4.24±1.48*	4.72±1.89*

* แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ $P<0.05$ เมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม

ตารางที่ 10 ผลทางจุลพยาธิวิทยาของ hepatopancreas (HP), gill filament (GF), lymphoid organ (LO), monodon baculo virus (MBV) และ hepatopancreatic parvo-like virus (HPV) ของกุ้งกุลาดำที่ได้รับอาหารผสมอะฟลาท็อกซิน บี1 (AFB1) ในขนาด 0, 5, 10 และ 20 ppb เป็นเวลา 8 และ 10 วัน

กลุ่มที่ได้รับ	ค่าเฉลี่ย damage degree									
AFB1(ppb)	8 วันของการทดลอง					10 วันของการทดลอง				
	HP	GF	LO	MBV	HPV	HP	GF	LO	MBV	HPV
0	1.13	0.13	0.38	0.88	0.38	1.50	0.63	1.13	0.13	0
5	2.00	0	1.25	0.50	0	0.75	0.25	1.25	0.25	0
10	2.25	0.75	2.38	1.00	0	1.63	1.25	2.38	0.38	0
20	2.25	1.38	2.38	0.88	0.63	1.63	1.38	1.50	0.13	0

ตารางที่ 11 จำนวนเม็ดเลือด (total hemocyte count) ของกุ้งกุลาดำที่ได้รับอาหารผสมอะฟลาท็อกซิน บี1 (AFB1) ในขนาด 0, 5, 10 และ 20 ppb เป็นเวลา 8 และ 10 วัน

กลุ่มที่ได้รับ	ค่าเฉลี่ยจำนวนเม็ดเลือด ($x10^5$ cell/ml)	
AFB1(ppb)	8 วันของการทดลอง	10 วันของการทดลอง
0	9.12	8.59
5	12.40	9.15
10	14.05*	10.15
20	13.93*	14.83*

* แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ $P<0.05$ เมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม

ตารางที่ 12 จำนวนเม็ดเลือดตามชนิด agranulocyte และ granulocyte ของกุ้งกุลาดำที่ได้รับอาหารผสมอะฟลาท็อกซิน บี1 (AFB1) ในขนาด 0, 5, 10 และ 20 ppb เป็นเวลา 10 วัน

กลุ่มที่ได้รับ	ค่าเฉลี่ยเม็ดเลือด ($x10^5$cell/ml)	
AFB1(ppb)	agranulocytes	granulocytes
0	6.37	2.49
5	7.86	2.89
10	7.27	3.33
20	10.65*	3.76

* แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ $P<0.05$ เมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม