

ความเป็นพิษและประสิทธิภาพของคลอโรไซลิโนลต่อการนำสลบปลานิล
(*Oreochromis niloticus*) และปลาทอง (*Carassius auratus*)
Toxicity and anesthetic efficiency of chloroxylenol on Nile tilapia
(*Oreochromis niloticus*) and goldfish (*Carassius auratus*)

พัชรี คุรุขันธ์¹, เกษมณี สวนสี¹ และศุภาพิชญ์ วิสวาท¹

¹ ภาควิชาชีววิทยาประมง คณะประมง มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ จตุจักร กรุงเทพฯ 10900

*E-mail: ffsprk@ku.ac.th

บทคัดย่อ

การศึกษาความเป็นพิษของคลอโรไซลิโนลที่มีผลต่อปลานิล (*Oreochromis niloticus*) ขนาดความยาวเฉลี่ย 3.22 ± 0.49 เซนติเมตร และน้ำหนักเฉลี่ย 0.67 ± 0.01 กรัม และปลาทอง (*Carassius auratus*) ขนาดความยาวเฉลี่ย 8.79 ± 0.76 เซนติเมตร และน้ำหนักเฉลี่ย 5.97 ± 1.45 กรัม โดยวิธีชีววิเคราะห์แบบน้ำนิ่ง (static bioassay) งดให้อาหารเป็นเวลา 24 ชั่วโมงก่อนทำการทดลอง และในระหว่างการทดลอง พบว่าระดับความเข้มข้นของคลอโรไซลิโนลที่ทำให้ปลาตาย 50 เปอร์เซ็นต์ ภายในระยะเวลา 5 นาที (5-min LC_{50}) ของปลานิลและปลาทองมีค่าเท่ากับ 13.24 และ 29.95 มิลลิกรัมต่อลิตร ตามลำดับ โดยมีช่วงความเชื่อมั่นที่ระดับ 95 เปอร์เซ็นต์ มีค่าเท่ากับ 11.36-15.67 และ 29.05-30.89 มิลลิกรัมต่อลิตร ตามลำดับ และระดับความเข้มข้นของคลอโรไซลิโนลที่เหมาะสมในการสลบระยะที่ 3 (Stage III: Loss of reflex reactivity) ภายในระยะเวลา 2 นาที และมีระยะเวลาการฟื้นสลบเร็วที่สุดของปลานิลและปลาทองคือ 12.0 และ 24.0 มิลลิกรัมต่อลิตร ตามลำดับ โดยเป็นความเข้มข้นที่ทำให้ปลาหมดการรอดตาย 100 เปอร์เซ็นต์หลังจากการฟื้นตัวจากการสลบที่ 24 ชั่วโมง และพบว่าการเพิ่มความเข้มข้นของคลอโรไซลิโนลส่งผลให้ปลานิลและปลาทองสลบเร็วขึ้นและสลบได้นานกว่า โดยมีความแตกต่างกันทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญ ($p < 0.05$)

คำสำคัญ: คลอโรไซลิโนล; การสลบ; ปลานิล; ปลาทอง

Abstract

The toxicity of chloroxylenol on Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) (average total length 3.22 ± 0.49 cm and average weight 0.67 ± 0.01 g) and goldfish (*Carassius auratus*) (average total length 8.79 ± 0.76 cm and average weight 5.97 ± 1.45 g) were determined by static bioassay method. Fish were starved for 24 hours before and during the experiment. The 5-min median lethal concentration (5-min LC_{50}) of chloroxylenol for Nile tilapia and goldfish were 13.24 and 29.95 mg/L, respectively, with a 95% confidence interval from 11.36-15.67 and 29.05-30.89 mg/L, respectively. The optimal concentration of chloroxylenol as an anesthetic for Nile tilapia and goldfish to produce rapid anesthesia in phase 3 (Stage III: Loss of reflex reactivity) at 2 min and quick recovery were 12.0 และ 24.0 mg/L, respectively, with 100% fish survival after trial 24 hours. The higher concentration of chloroxylenol caused Nile tilapia and goldfish to reach the anesthesia quicker and longer, significantly differed among concentrations ($p < 0.05$).

Keywords: Chloroxylenol; Anesthesia; Nile tilapia; Goldfish

บทนำ

การสลบปลา (fish anesthesia) เป็นการเหนี่ยวนำทำให้ปลามีอาการซึมลง ไร้ความรู้สึก ไม่มีอาการต้านหรือตอบสนอง ถือได้ว่าเป็นการลดความเครียดและความทรมานของปลาน้อยที่สุดในอุตสาหกรรมเลี้ยงปลาสวยงามได้มีการนำยาสลบมาใช้กันอย่างแพร่หลายมากขึ้น เพื่อลดความเครียดและลดการบาดเจ็บจากการจับหรือการขนส่ง รวมถึงช่วยในการควบคุมสัตว์น้ำให้อยู่ในอาการสงบนิ่ง เพื่อความสะดวกในการผ่าตัด การชั่งน้ำหนัก การวัดขนาด การผสมเทียม การทำเครื่องหมาย หรือในระหว่างขั้นตอนการรักษาโรคที่จำเป็นต้องมีการผ่าตัดทำศัลยกรรม [1], [2] เป็นต้น ซึ่งหลักเกณฑ์ในการพิจารณาความเหมาะสมเบื้องต้นของการเป็นยาสลบเพื่อใช้ในกิจกรรมต่างๆ ด้านการประมงควรมีคุณสมบัติดังนี้คือ สามารถละลายน้ำได้ดี ความเข้มข้นที่ทำให้ปลาสลบควรอยู่ในระดับต่ำ สามารถเหนี่ยวนำให้ปลาสลบได้เร็ว ซึ่งควรใช้เวลาน้อยกว่า 3 นาที และจะต้องทำให้ปลาฟื้นจากการสลบได้ในระยะเวลาสั้นที่สุด คือประมาณ 5 นาทีเมื่อปลาถูกย้ายมาอยู่ในน้ำที่สะอาด และประการสำคัญคือ ไม่เป็นพิษต่อสัตว์น้ำและผู้ใช้ มีความปลอดภัยแม้จะแช่อยู่เป็นเวลานาน ชั่วโมง ไม่มีช่วงเวลาการหยุดใช้ยา เป็นสารที่สามารถขับออกมาจากตัวปลาได้เร็ว ไม่มีการตกค้าง และไม่ส่งผลกระทบต่อเปลี่ยนแปลงสรีรวิทยา ระบบภูมิคุ้มกัน หรือพฤติกรรมของสัตว์น้ำที่ส่งผลต่อการอยู่รอดของปลา [3], [4], [5], [6], [7] ปัจจุบันมีสารที่ใช้ในการเหนี่ยวนำการสลบอยู่หลายชนิดที่นำมาใช้ในสัตว์น้ำ เช่น Tricane Methanesulphonate (MS222), Benzocaine, Quinaldine, 2-phenoxyethanol, Eugenol, Isoeugenol และ น้ำมันกานพลู (clove oil) เป็นต้น

ในช่วงหลายปีที่ผ่านมา ประเทศไทยมีงานวิจัยเกี่ยวกับการใช้สารเหนี่ยวนำการสลบหลายชนิดในปลาชนิดต่าง ๆ ทั้งในด้านทดสอบความเป็นพิษ หรือการหาความเข้มข้นที่นำมาใช้ในการสลบปลา เช่น การใช้ MS-222 ในปลากัด (*Betta splendens*) [8], ปลาบึก (*Pangasius*)

gigas) [2], [9] การใช้ Quinaldine sulfate ในปลานิล (*Oreochromis niloticus*) [10] การใช้ 2-phenoxyethanol ในปลาบึก [2] และปลานิล [10] การใช้น้ำมันกานพลูในปลาบึก [2], [9], ปลากัดจีน [11], [12], ปลาตะเพียนขาว (*Puntius gonionotus*) [13], [14], ปลายี่สกเทศ (*Labeo rohita*) [14], [15], ปลาทอง (*Carassius auratus*) [16], ปลานิล, ปลาไน (*Cyprinus carpio*), ปลานวลจันทร์เทศ (*Cirrhinus cirrhosus*), ปลากดเหลือง (*Mystus nemurus*) และปลาเทพา (*Pangasius sanitwongsei*) [14] และการใช้ eugenol ในปลากัดจีน [12] เป็นต้น

นอกจากนี้ในกลุ่มผู้เลี้ยงปลาสวยงามของประเทศไทย ได้มีการนำสารคลอโรไลนอลที่เป็นส่วนผสมในน้ำยาฆ่าเชื้อโรคยี่ห้อหนึ่งที่มีขายตามร้านค้าและร้านขายยาทั่วไป โดยสารคลอโรไลนอลเป็นสารต้านจุลชีพที่ใช้ควบคุมการเจริญเติบโตของเชื้อแบคทีเรีย และมีส่วนประกอบเป็นสารในกลุ่มสารประกอบฟีนอล (Phenolic compounds) [17] เช่นเดียวกัน eugenol และน้ำมันกานพลู [8], [18] มีฤทธิ์เป็นยาชาเฉพาะที่มาใช้ในการสลบปลาเพื่อทำศัลยกรรมผ่าตัดในปลาคาร์ฟและปลาอะโรวาน่าเป็นส่วนใหญ่ ซึ่งสารชนิดนี้สามารถหาซื้อง่าย ราคาถูก และเป็นผลิตภัณฑ์ที่ใช้ในครัวเรือนสำหรับทำความสะอาดและฆ่าเชื้อโรคสิ่งต่าง ๆ โดยอัตราส่วนความเข้มข้นในการใช้เหนี่ยวนำการสลบปลานั้นมีความแตกต่างกันขึ้นอยู่กับประสบการณ์ของผู้ใช้และการใช้น้ำยาฆ่าเชื้อเพื่อการเหนี่ยวนำการสลบในปลานี้ยังไม่มีการศึกษาค้นคว้าหรือทำการทดลองในเชิงลักษณะงานวิจัยมาก่อน ดังนั้นการศึกษาครั้งนี้จึงทดลองใช้น้ำยาฆ่าเชื้อเป็นสารเหนี่ยวนำการสลบในปลานิล และปลาทอง โดยมีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาระดับความเข้มข้นต่ำสุดของสารคลอโรไลนอลที่ทำให้ปลาสลบภายใน 2 นาที และเวลาฟื้นสลบของปลา และศึกษาความเข้มข้นของสารคลอโรไลนอลที่ทำให้ปลาทาย 50 เปอร์เซ็นต์ (LC50) ซึ่งจากการศึกษาครั้งนี้ข้อมูลที่ได้จะสามารถเป็นประโยชน์ในการนำสารชนิดนี้มาใช้ในการเหนี่ยวนำการสลบในสัตว์น้ำได้

เป็นอีกทางเลือกหนึ่งในการนำไปใช้ประโยชน์ โดยเฉพาะในด้านการทำศัลยกรรมหรือด้านอื่น ๆ ทราบถึงระดับความเข้มข้นที่เหมาะสมของยาสลบ รวมถึงสามารถนำไปใช้ในแง่ความปลอดภัยในการใช้ยาได้อีกด้วย

วัตถุประสงค์และวิธีการวิจัย

1. การเตรียมสัตว์ทดลอง

ลูกปลานิลนำมาจากสถานีวิจัยประมงกำแพงแสน คณะประมง มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ จังหวัดนครปฐม ขนาดความยาวประมาณ 3 เซนติเมตร จำนวน 1,500 ตัว และปลาทองนำมาจากฟาร์มเพาะพันธุ์ในจังหวัดนครปฐม ขนาดความยาวประมาณ 8 เซนติเมตร จำนวน 1,200 ตัว มาอนุบาลในถังไฟเบอร์กลาสขนาด 1,000 ลิตร จำนวน 4 ถัง (ถังละประมาณ 750 ตัว) เพื่อปรับสภาพเป็นเวลา 1 สัปดาห์ โดยให้อาหารสำเร็จรูป ที่มีระดับโปรตีนร้อยละ 40 วันละ 2 ครั้ง (9.00 และ 15.00 น.) และให้อากาศตลอดระยะเวลาที่ปรับสภาพ จากนั้นทำการคัดขนาดปลาที่มีขนาดใกล้เคียงกัน จำนวนชนิดละ 1,000 ตัว เพื่อใช้ในการทดลองต่อไป โดยปลานิลมีความยาวเฉลี่ยเฉลี่ย 3.22 ± 0.49 เซนติเมตร และน้ำหนักเฉลี่ย 0.67 ± 0.01 กรัม และปลาทอง ขนาดความยาวเฉลี่ยเฉลี่ย 8.79 ± 0.76 เซนติเมตร และน้ำหนักเฉลี่ย 5.97 ± 1.45 กรัม โดยก่อนทำการทดลองจะงดอาหารเพื่อเตรียมความพร้อมของปลา เป็นเวลา 24 ชั่วโมงและในระหว่างการทดลอง

2. วิธีการทดลอง

การทดลองที่ 1: การศึกษาความเป็นพิษของคลอโรไซลิโนลที่สามารถทำให้ปลาตาย 50 เปอร์เซ็นต์

การทดลองนี้เป็นการหาค่าความเข้มข้นของคลอโรไซลิโนลที่ทำให้ปลาตาย 50 เปอร์เซ็นต์ภายใน 5 นาที (5-min LC₅₀) ด้วยวิธีซีวีวิเคราะห์แบบน้ำนิ่ง ตามวิธีของ American Public Health Association [19] โดยแบ่งเป็น 2 ขั้นตอน คือ

1.1 การทดลองเบื้องต้น โดยหาช่วงความเข้มข้นของคลอโรไซลิโนลสูงสุดที่ทำให้ปลารอดตาย 100 เปอร์เซ็นต์ และความเข้มข้นต่ำสุดที่ทำให้ปลาตาย 100 เปอร์เซ็นต์ เพื่อนำไปประมาณช่วงความเข้มข้นที่จะใช้ในการทดลองอย่างละเอียด โดยสังเกตและบันทึกจำนวนปลาที่ตายในระยะเวลา 5 นาที โดยใช้ความเข้มข้นที่ 0, 4.8, 9.6, 14.4, 19.2, 24 และ 28.8 มิลลิกรัมต่อลิตร ในปลานิล และระดับความเข้มข้นที่ 0, 12, 24, 36 และ 48 มิลลิกรัมต่อลิตร ในปลาทอง

1.2 การทดลองอย่างละเอียด ทำการทดลองโดยใช้ช่วงความเข้มข้นที่ได้จากผลการทดลองที่ 1.1 มาแบ่งอย่างละเอียดโดยวิธีลอกการีธิม จำนวน 6 ช่วงระดับความเข้มข้นในปลานิล และ 5 ช่วงระดับความเข้มข้นในปลาทอง โดยเตรียมสารละลายคลอโรไซลิโนลในแต่ละความเข้มข้นใส่ลงในโหลแก้วทรงกระบอกขนาดความจุ 12 ลิตร ที่บรรจุน้ำปริมาตร 4 ลิตร จากนั้นแบ่งปลานิลออกเป็น 6 กลุ่มการทดลอง ๆ ละ 3 ซ้ำ ๆ ละ 10 ตัว และปลาทองเป็น 5 กลุ่มการทดลอง ๆ ละ 5 ซ้ำ ๆ ละ 5 ตัว สังเกตอาการและบันทึกจำนวนปลาที่ตายในระยะเวลา 5 นาที นำข้อมูลที่ได้ไปวิเคราะห์หาค่า 5-min LC₅₀ และค่าขอบเขตความปลอดภัย (margin of safety) ในปลานิล และปลาทองต่อไป

การทดลองที่ 2: การศึกษาความเข้มข้นของคลอโรไซลิโนลในการชักนำสลบ การฟื้นสลบ และอัตราการรอดของปลา

เพื่อหาความเข้มข้นของสารคลอโรไซลิโนลที่มีผลทำให้ปลาสลบเร็วที่สุด ภายในระยะเวลา 2 นาที และระยะเวลาการฟื้นตัวจากการสลบเร็วที่สุด และอัตราการรอดตายหลังจากการฟื้นตัวที่ 24 ชั่วโมง ดังนี้

2.1 การศึกษาระยะเวลาชักนำการสลบ โดยเตรียมสารละลายคลอโรไซลิโนลที่ระดับความเข้มข้น 0, 4.8, 6.0, 7.2, 8.4, 9.6, 10.8, 12.0 และ 13.2 มิลลิกรัมต่อลิตร ในปลานิล และ ที่ระดับความเข้มข้น 0, 24, 28.8, 33.6, 38.4, 43.2, 48.0, 52.8 และ 57.6 มิลลิกรัมต่อลิตร ในปลาทอง ใน

โหลแก้วทรงกระบอกขนาดความจุ 12 ลิตร ที่บรรจุน้ำปริมาตร 4 ลิตร จากนั้นนำปลานิลมาแช่ในแต่ละความเข้มข้น ๆ ละ 3 ชั่วโมง ละ 10 ตัว และปลาทองมาแช่ในแต่ละความเข้มข้น ๆ ละ 5 ชั่วโมง ละ 5 ตัว สังเกตการตอบสนองของปลาและ

บันทึกเวลาตั้งแต่ปลาสัมผัสน้ำจนเข้าสู่ระยะการสลบที่ 3 จนถึงเวลา 2 นาที ซึ่งระยะการสลบและพฤติกรรมของปลาที่ตอบสนองเมื่อได้รับยาสลบอธิบายไว้ใน Table 1

Table 1 Stage of anesthesia and behavioral response of fish during anesthesia

Stage of anesthesia	Descriptor	Behavioral response of fish
0	Normal	Reactive to external stimuli; opercular rate and muscle tone normal
1	Sedation	Partial loss of reaction in response to external stimuli; slight decrease in opercular rate: equilibrium
2	Equilibrium loss	Swimming ability disrupt; Loss of equilibrium in which locomotion ceases; respond to pressure on caudal peduncle
3	Reflex reactivity loss	Loss of reflex reactivity or failure to respond to strong external stimuli
4	Medullary collapse	Respiratory movement or opercular movement ceased; fish death

Modified from McFarland [1] and Summer felt and Smith [20]

2.2 การศึกษาระยะเวลาการฟื้นตัวจากการสลบ นำปลาที่สลบแล้วจากการทดลองที่ 2.1 มาทำให้ฟื้นในโหลแก้วที่มีน้ำสะอาด และมีการให้อากาศตลอดเวลา เริ่มจับเวลาตั้งแต่เริ่มปล่อยปลา จนถึงเวลาที่ปลาฟื้นจากการสลบและว่ายน้ำในสภาวะปกติ บันทึกข้อมูลระยะเวลาที่ใช้ไปทั้งหมด

2.3 การศึกษาอัตราการรอดตายหลังการฟื้นตัว นำปลาจากแต่ละชุดการทดลองที่ฟื้นตัวจากการสลบมาแยกใส่โหลที่มีน้ำสะอาดที่มีการให้อากาศอย่างต่อเนื่องตลอดเวลา และทำการบันทึกอัตราการรอดตายหลังจากการฟื้นตัวที่ 24 ชั่วโมง

3. การวิเคราะห์ผล

การวิเคราะห์หาค่า 5-min LC₅₀ ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์ โดยวิธี Probit analysis วิเคราะห์ความแปรปรวน (Analysis of variance: ANOVA) เพื่อศึกษาเปรียบเทียบ

ค่าเฉลี่ยของแต่ละชุดการทดลองด้วยวิธีของ Tukey ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์ โดยใช้โปรแกรมทางสถิติสำเร็จรูป SPSS

ผลการทดลอง

การทดลองที่ 1: การศึกษาความเป็นพิษของคลอโรไซลิโนลที่สามารถทำให้ปลาตาย 50 เปอร์เซ็นต์

จากการทดลองเบื้องต้นพบว่าระดับความเข้มข้นสูงสุดที่ทำให้ปลารอดตาย 100 เปอร์เซ็นต์ และความเข้มข้นต่ำสุดที่ทำให้ปลาตาย 100 เปอร์เซ็นต์ในปลานิลมีค่าเท่ากับ 4.8 และ 24 มิลลิกรัมต่อลิตร ตามลำดับ และในปลาทอง มีค่าเท่ากับ 24 และ 36 มิลลิกรัมต่อลิตร ตามลำดับ และนำค่าที่ได้ไปทำการทดลองขั้นละเอียดต่อไป

จากการศึกษาขั้นเบื้องต้นนำค่ามาทำการศึกษาในขั้นละเอียด โดย แบ่งระดับความ

เข้มข้นเป็น 6 ระดับความเข้มข้น คือ 4.80, 6.62, 9.14, 12.61, 17.39 และ 24.00 มิลลิกรัมต่อลิตร ในปลานิล และ 5 ระดับความเข้มข้น คือ 24, 26.56, 29.39, 32.53 และ 36 มิลลิกรัมต่อลิตร ในปลาทอง (Table 2) พบว่าค่า 5-min LC₅₀ ของ คลอโรไซลิโนลในปลานิลมีค่าเท่ากับ 13.24 มิลลิกรัมต่อลิตร โดยมีช่วงความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์ อยู่ระหว่าง 11.36-15.67 มิลลิกรัมต่อ

ลิตร และค่า 5-min LC₅₀ ของคลอโรไซลิโนลใน ปลาทอง มีค่าเท่ากับ 29.95 มิลลิกรัมต่อลิตร และมีช่วงความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์ อยู่ระหว่าง 29.05-30.89 มิลลิกรัมต่อลิตร และค่า margin of safety ของคลอโรไซลิโนลที่มีผลต่อปลานิลและ ปลาทองมีค่าเท่ากับ 0.13 และ 0.30 มิลลิกรัมต่อ ลิตร ตามลำดับ (Table 3)

Table 2 Mortality percentage of Nile tilapia and goldfish when exposed to various concentrations of chloroxylenol for 5 minutes

Concentration (mg/L)	Number of dead fish ¹	Mortality (%)
Nile tilapia		
Range-finding test		
0.0	0	0
4.8	0	0
9.6	9.00±1.00	90.00
14.4	9.00±1.00	90.00
19.2	9.33±1.15	93.33
24.0	10.00±0.00	100.00
28.8	10.00±0.00	100.00
Definitive test		
4.80	0	0
6.62	0.33±0.58	3.33
9.14	1.67±1.53	16.67
12.61	2.00±0.00	20.00
17.39	9.00±1.00	90.00
24.00	10.00±0.00	100.00
Goldfish		
Range-finding test		
0.0	0	0
12.0	0	0
24.0	0	0
36.0	5±0.00	100.00
48.0	5±0.00	100.00
Definitive test		
24.00	0	0
26.56	0.60±0.55	12.00
29.39	2.60±0.55	52.00
32.53	3.40±0.89	68.00
36.00	5.00±0.00	100.00

¹ Values are represented as mean ± standard deviation

Table 3 The 5-min median lethal concentration (LC₅₀) with 95% confidence intervals (CI) and margin of safety of chloroxylenol for Nile tilapia and goldfish.

Fish	5-min LC ₅₀ (mg/l)	95% CI (mg/l)	Margin of safety (mg/l)
Nile tilapia	13.24	11.36-15.67	0.13
Goldfish	29.95	29.05-30.89	0.30

การทดลองที่ 2: ขนาดของคลอโรไซลินอลในการชักนำสลบ การฟื้นสลบ และอัตราการรอดของปลา

2.1 การศึกษาระยะเวลาการชักนำการสลบ

จากการศึกษาความเข้มข้นของคลอโรไซลินอลในการชักนำสลบได้เร็วที่สุดภายในระยะเวลา 2 นาทีในปลาชนิดคือ ที่ระดับความเข้มข้น 12.0 และ 13.2 มิลลิกรัมต่อลิตร โดยทำให้ปลาสลบภายในระยะเวลาเฉลี่ยเท่ากับ 1.52 ± 1.18 และ 1.50 ± 0.27 นาที ตามลำดับ โดยทั้งสองระดับความเข้มข้นไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ ($p > 0.05$) ในขณะที่ระดับความเข้มข้น 4.8 มิลลิกรัมต่อลิตร ไม่มีการชักนำให้ปลาสลบได้ ซึ่งจะเห็นได้ว่าเมื่อระดับความเข้มข้นสูงขึ้น จะทำให้ปลาสลบเร็วขึ้น เช่นเดียวกับการศึกษาในปลาทองที่พบว่าทุกระดับความเข้มข้นทำให้ปลาสลบภายในระยะเวลา 2 นาที แต่ที่ระดับความเข้มข้นทำให้ปลาสลบเร็วที่สุด คือ 52.8 มิลลิกรัมต่อลิตร โดยทำให้ปลาสลบภายในระยะเวลาเฉลี่ยเท่ากับ 1.05 ± 0.07 นาที รองลงมาที่ระดับความเข้มข้น 57.6, 48.0, 43.2 และ 38.4 มิลลิกรัมต่อลิตร ตามลำดับ (Table 4)

2.2 การศึกษาระยะเวลาการฟื้นตัวจากการสลบ

ระยะเวลาที่ใช้ในการฟื้นตัวจากการสลบของปลาในทุกระดับความเข้มข้นใช้เวลาไม่น้อยกว่า 5 นาที โดยระดับความเข้มข้นต่ำสุดคือ 6.0 มิลลิกรัมต่อลิตร ทำให้ปลาฟื้นตัวจากการสลบเร็วที่สุดคือ 0.51 ± 0.43 นาที และที่ระดับความเข้มข้นสูงสุดคือ 13.2 มิลลิกรัมต่อลิตร ทำให้ระยะเวลา

ฟื้นตัวจากการสลบได้นานที่สุดคือ 3.42 ± 1.76 นาที นั่นคือ เมื่อระดับความเข้มข้นสูงจะทำให้ปลาใช้ระยะเวลาในการฟื้นตัวนานกว่าความเข้มข้นต่ำ และเป็นไปทิศทางเดียวกันกับการศึกษาในปลาทอง แต่ระยะเวลาการฟื้นตัวจากการสลบของปลาทองแตกต่างกันในทุกระดับความเข้มข้นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) โดยความเข้มข้นที่ทำให้ปลาทองฟื้นตัวจากการสลบเร็วที่สุดคือ 24.0 มิลลิกรัมต่อลิตร โดยมีระยะเวลาฟื้นตัวจากการสลบในระยะเวลา 17.18 ± 3.55 นาที และระดับความเข้มข้นที่ทำให้ปลาใช้ระยะเวลาฟื้นตัวจากการสลบนานที่สุด คือ 57.6 มิลลิกรัมต่อลิตร โดยระยะเวลาการฟื้นตัวจากการสลบในระยะเวลา 71.40 ± 1.03 นาที (Table 4)

2.3 การศึกษาอัตราการรอดตายหลังการฟื้นตัวจากการสลบ ที่ 24 ชั่วโมง

เมื่อปลาฟื้นตัวจากการสลบแล้ว นำมาสังเกตพฤติกรรมและอัตราการรอดตายหลังจากการฟื้นตัวที่ 24 ชั่วโมง พบว่า ที่ระดับความเข้มข้น 13.2 มิลลิกรัมต่อลิตร ทำให้มีปลานิลตาย 1 ตัว คิดเป็นอัตราการรอดตาย 96.67 เปอร์เซ็นต์ และที่ระดับความเข้มข้นที่ต่ำกว่านี้ ปลามีอัตราการรอดตาย 100 เปอร์เซ็นต์ เช่นเดียวกับการศึกษาปลาทอง พบว่าระดับความเข้มข้นสูงสุดคือ 57.6 มิลลิกรัมต่อลิตร ทำให้มีการตายของปลาทองจำนวน 1 ตัว คิดเป็น 96.00 เปอร์เซ็นต์และระดับความเข้มข้นต่ำลงมา ไม่ส่งผลให้เกิดการตายของปลาทองในทุกระดับความเข้มข้น (Table 4)

วิจารณ์ผลการทดลอง

จากการศึกษาความเป็นพิษของคลอโรไซลิ นอลที่สามารถทำให้ปลาตาย 50 เปอร์เซ็นต์ (5-min Lethal Dose 50% หรือ 5-min LC₅₀) ต่อ ปลานิลและปลาทองมีค่าเท่ากับ 13.24 และ 29.95 มิลลิกรัมต่อลิตร ตามลำดับ แสดงให้เห็นว่า ระดับความเป็นพิษต่อปลานิลมีมากกว่าปลาทอง แต่ทั้งนี้อาจจะเป็นผลมาจากขนาดของปลาที่ทำการทดลอง เพราะการทดลองครั้งนี้ใช้ปลานิล ขนาดความยาวเฉลี่ย 3.22±0.49 เซนติเมตร และ น้ำหนักเฉลี่ย 0.67±0.01 กรัม และปลาทองขนาด ความยาวเฉลี่ย 8.79±0.76 เซนติเมตร และ น้ำหนักเฉลี่ย 5.97±1.45 กรัม ซึ่งมีขนาดและ น้ำหนักแตกต่างกันเกือบ 3 เท่า แต่เมื่อพิจารณา ระยะเวลารวมที่ชักนำการสลบและระยะเวลาการฟื้นตัวจากการสลบของปลานิลจะใช้เวลาน้อยกว่า ปลาทอง โดยปลาทองจะใช้ระยะเวลาในการฟื้น ตัวจากการสลบนานมากคือเกือบ 1 ชั่วโมงใน ระดับความเข้มข้นที่สูง ซึ่งโดยทั่วไประยะเวลารวม ที่ใช้ในการสลบปลาควรใช้เวลาประมาณ 2-6 นาที [21] การเพิ่มระดับความเข้มข้นให้สูงขึ้นจะชักนำ ให้ปลาสลบได้เร็วขึ้น แต่ส่งผลทำให้ระยะเวลาใน การฟื้นตัวจากการสลบยาวนานขึ้นด้วยเช่นกัน ซึ่ง สอดคล้องกับการศึกษาของ Soto and Burhanuddin [22] ที่ทำการศึกษากับปลา rabbitfish (*Siganus lineatus*) และ Pirhonen and Schreck [23] ที่ ศึกษาในปลา steelhead trout (*Oncorhynchus mykiss*) และจากการศึกษาความเป็นพิษของสาร ที่ชักนำการสลบชนิดอื่นที่ทำให้ปลาตาย 50 เปอร์เซ็นต์ (LC₅₀) ที่ผ่านมา พบว่าค่า LC₅₀ ของ Quinaldine Sulfate และ 2-Phenoxyethanol ที่ 72 ชั่วโมงในปลานิลวัยรุ่นลูกผสม (น้ำหนักเฉลี่ย 25±1.27 กรัม) มีค่าเท่ากับ 13.14 และ 0.22 มิลลิกรัมต่อลิตร ตามลำดับ [10] ค่า LC₅₀ ของ น้ำมันกานพลูที่ 24 ชั่วโมง ที่มีปลาต่อปลากัดจีน (ความยาวเฉลี่ย 5.5-6.5 เซนติเมตร) มีค่าเท่ากับ 21.77 มิลลิกรัมต่อลิตร [11] และมีผลต่อปลาทอง (ความยาวเฉลี่ย 5.08±2.54 เซนติเมตร) มีค่า เท่ากับ 70.40 มิลลิกรัมต่อลิตร [16] จะเห็นได้ว่า

ชนิด ขนาด และ เวลาที่ใช้ในการทดลองของสารที่ ชักนำการสลบแต่ละชนิดจะให้ผลที่แตกต่างกัน แต่ทั้งนี้สัตว์น้ำที่มีขนาดใหญ่จะมีพื้นที่ผิวในการรับ สารมากกว่าสัตว์น้ำขนาดเล็กโดยเฉพาะในส่วน ของเหงือก ทำให้แม้จะมีการใช้สารในระดับที่มี ความเข้มข้นต่ำ แต่สารยังสามารถซึมผ่านร่างกาย ของสัตว์น้ำขนาดใหญ่ได้ในปริมาณที่มากกว่าสัตว์ น้ำขนาดเล็ก และชนิดพันธุ์ก็มีผลต่อความทนทาน ของยาสลบที่แตกต่างกันด้วย โดยชนิดพันธุ์ที่มี ความแข็งแรงจะมีความทนทานต่อยาสลบมากกว่า ชนิดพันธุ์ที่อ่อนแอ [16] การทำให้ปลาสลบได้เร็ว จะเป็นการลดการบาดเจ็บจากการจับหรือการ ขนส่ง ซึ่งยาสลบที่ดีควรทำให้ปลาสลบได้เร็วที่สุด (ประมาณ 1-5 นาที) และฟื้นคืนสลบได้เร็วที่สุด (ไม่ควรเกิน 5 นาที) [24] เมื่อพิจารณาระยะเวลา การชักนำให้ปลาสลบในระยะที่ 3 ซึ่งเป็นระยะที่ ปลาสลบอย่างสมบูรณ์ภายในระยะเวลา 2 นาที ระยะเวลากการฟื้นตัวจากการสลบ และอัตราการ รอดของปลานิล และปลาทอง พบว่า ระดับความ เข้มข้นที่เหมาะสมที่ทำให้ปลานิลสลบได้เร็วภายใน ระยะเวลาไม่เกิน 2 นาที ระยะเวลาฟื้นตัวจากการ สลบได้เร็ว และเป็นระดับความเข้มข้นที่ต่ำสุดและ มีอัตราการรอด 100 เปอร์เซ็นต์ คือที่ระดับ 12.0 มิลลิกรัมต่อลิตร ซึ่งใช้ระยะเวลารวมทั้งหมด ประมาณ 5.30 นาที ส่วนระดับความเข้มข้นที่ เหมาะสมในการสลบในปลาทอง คือที่ระดับ 24.0 มิลลิกรัมต่อลิตร โดยใช้ระยะเวลารวมประมาณ 19.11 นาที และพบว่าเมื่อใช้ในระดับความเข้มข้น ที่สูงขึ้นจะทำให้อัตราการตายของปลาเพิ่มสูงขึ้น ในขณะที่การศึกษาของ Seetapan *et al.* [2] พบว่าความเข้มข้นที่เหมาะสมของน้ำมันกานพลู และ MS-222 ที่ทำให้ปลาบิกขนาดเล็กสลบใน ระยะที่ 3 ภายในเวลา 2 นาทีเท่ากับ 110 และ 200 มิลลิกรัมต่อลิตร ตามลำดับ ในขณะที่ 2- phenoxyethanol ไม่สามารถทำให้ปลาบิกสลบได้ ตั้งแต่ระดับความเข้มข้น 20–260 มิลลิกรัมต่อลิตร โดยที่ น้ำมันกานพลูมีระยะเวลาการฟื้นสลบ เท่ากับ 12.20±1.37 นาที และการศึกษาของ King *et al.* [25] ได้รายงานว่าการใช้ metomidate

เข้มข้น 20 มิลลิกรัมต่อลิตร, น้ำมันกานพลูเข้มข้น 15 มิลลิกรัมต่อลิตร, MS-222 เข้มข้น 70 มิลลิกรัมต่อลิตร และ 2-phenoxyethanol เข้มข้น 200 มิลลิกรัมต่อลิตร สามารถทำให้ปลา black sea bass (*Centropristis striata* L.) ขนาดเล็ก (juvenile) เข้าสู่ระยะการสลบในระดับ 2 ได้ภายในเวลา 3-5 นาที จากข้อมูลข้างต้นเห็นได้ว่าการใช้ยาสลบในสัตว์น้ำนั้นขึ้นอยู่กับชนิดของสารและปริมาณที่แตกต่างกัน ซึ่งมีผลต่อการนำสลบ

และระยะเวลาการฟื้นคืนสลบได้แตกต่างกัน ดังนั้นผู้ใช้ควรพิจารณาถึงความเหมาะสมต่อชนิดและขนาดของปลา รวมถึงความแข็งแรงของปลา ด้วยการเลือกใช้ในปริมาณที่สูงเกินไปอาจส่งผลต่ออัตราการรอดของปลา และการใช้ในปริมาณที่ต่ำเกินไปจะไม่ชักนำให้ปลาสลบ ซึ่งจะส่งผลเสียต่อปลาได้ เนื่องจากทำให้สัตว์น้ำใช้พลังงานอย่างมากในการต้านการสลบ ทำให้ปลาอ่อนแอและอาจตายได้ [26]

Table 4 Induction times of anesthesia, recovery times and survival rate after 24 hour for Nile tilapia and goldfish

Concentration (mg/l)	Induction time ¹ (min)	Recovery time ¹ (min)	Survival rate (%)
Nile tilapia			
0 (control)	- ²	-	-
4.8	-	-	-
6.0	5.54±2.24 ^{c3}	0.51±0.43 ^a	100.00
7.2	5.06±2.30 ^c	1.00±0.08 ^a	100.00
8.4	3.30±1.39 ^b	2.36±1.17 ^b	100.00
9.6	2.52±1.15 ^{ab}	2.40±1.00 ^b	100.00
10.8	2.20±1.06 ^{ab}	3.02±1.36 ^{bc}	100.00
12.0	1.52±1.18 ^a	3.38±2.22 ^c	100.00
13.2	1.50±0.27 ^a	3.42±1.76 ^c	96.67
Goldfish			
0 (control)	-	-	-
24.0	1.53±0.27 ^d	17.18±3.55 ^a	100.00
28.8	1.30±0.27 ^c	22.16±4.19 ^b	100.00
33.6	1.25±0.05 ^{bc}	30.29±0.35 ^c	100.00
38.4	1.18±0.12 ^{abc}	42.54±0.58 ^d	100.00
43.2	1.18±0.03 ^{abc}	46.21±0.10 ^e	100.00
48.0	1.16±0.07 ^{ab}	49.34±0.41 ^f	100.00
52.8	1.05±0.07 ^a	57.22±3.16 ^g	100.00
57.6	1.15±0.10 ^{bc}	71.40±1.03 ^h	96.00

¹ Values are represented as mean ± standard deviation

² -, Not effective

³ Mean bearing different letters in the same column are significantly different ($p < 0.05$);

สรุปผลการทดลอง

ระดับความเข้มข้นของคลอโรไลนอลที่ทำให้ปลาตาย 50 เปอร์เซ็นต์ ในเวลา 5 นาที (5-min LC₅₀) ในปลานิลมีค่าเท่ากับ 13.24 มิลลิกรัมต่อลิตร (ช่วงความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์ อยู่ในช่วง 11.36-15.67 มิลลิกรัมต่อลิตร) และปลาทองมีค่าเท่ากับ 29.95 มิลลิกรัมต่อลิตร (ช่วงความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์ อยู่ในช่วง 29.05-30.89 มิลลิกรัมต่อลิตร) และระดับความเข้มข้นของคลอโรไลนอลที่เหมาะสมในการสลบปลาระยะที่ 3 (Stage III: Loss of reflex reactivity) ของปลานิลและปลาทองคือ 12.0 และ 24.0 มิลลิกรัมต่อลิตร ตามลำดับ โดยเป็นความเข้มข้นที่ทำให้ปลาสลบได้เร็วภายในเวลา 2 นาที และฟื้นคืนสลบได้เร็วด้วยเช่นกัน และเป็นความเข้มข้นที่ทำให้ปลารอดตาย 100 เปอร์เซ็นต์หลังจากการทดลองแล้ว 24 ชั่วโมง ทั้งนี้การใช้คลอโรไลนอลเป็นยาสลบนั้น ต้องใช้ในปริมาณเหมาะสมด้วย

กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบคุณสถานีวิจัยประมงกำแพงแสน คณะประมง มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ที่เอื้อเฟื้ออุปกรณ์ที่ใช้ในการวิจัย ศูนย์วิจัยธุรกิจเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำ และศูนย์ปลาสวยงามและพรรณไม้สวยงาม คณะประมง มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ที่ให้ความอนุเคราะห์สถานที่และเครื่องมือต่าง ๆ ภาควิชาชีววิทยาประมงที่ให้การสนับสนุน และรวมถึงผู้ที่เกี่ยวข้องในการวิจัยทุกท่านสำหรับคำแนะนำ และความช่วยเหลือต่างๆ ที่ทำให้งานวิจัยครั้งนี้สำเร็จไปได้ด้วยดี

เอกสารอ้างอิง

- [1] McFarland, W. N. 1959. A study of the effects of anesthetics on the behavior and physiology of fishes. **Publ Inst Mar Sci, Univ Tex** 6: 23-55.
- [2] Seetapan, K., Mahawong, N., Boonkong, K., Moojareinsup, T. and Kongha, V. 2553. The efficiency of three anaesthetic agents effect to juvenile Mekong giant catfish (*Pangasianodon gigas*). **UP-J** 3 (1): 8-14. (in Thai).
- [3] Durve, V. S. 1970. Effects of anesthetics on the behavior of mullet fingerlings and the scope of using these in different fishery procedures II. **Indian J Fish** 13: 158-182.
- [4] Marking, L.L. and Meyer, F.P. 1985. Are better anesthetics needed in fisheries?. **Fisheries** 10(6): 2-5.
- [5] Bell, G. 1987. An outline of anesthetic and anesthesia for salmonids, a guide for fish culturists in British Columbia. 16 pp. Canadian Technical Report of Fisheries Aquatic Sciences No.1534.
- [6] Gilderhus, P. A. and Marking, L. L. 1987. Comparative efficacy of 16 anesthetic chemicals in rainbow trout. **North Am J Fish Manage** 7: 288-292.

- [7] Ackerman, P.A., Morgan, J.D. and Iwama G.K. **Anesthetics**. http://www.ccac.ca/Documents/Standards/Guidelines/Add_PDFs/Fish_Anesthetics.pdf. Accessed 22 June 2017.
- [8] Mahasawasde, S. 1989. Use of Sodium Chloride and MS-222 in Transportation of Juvenile Siamese Fighting Fish (*Betta splendens*). **KU J: Nat Sci** 23: 349-357. (in Thai)
- [9] Songkaew, A., Chokboonmongkol, C., Khattiya, R., Wongsathein, D., Mengumpun, K. and Pikulkaew, S. 2007. Induction time and behavior of anesthesia and recovery in Mekong Giant Catfish (*Pangasianodon gigas*) after anesthetized with clove oil and tricaine methanesulfonate (MS-222). **J Thai Vet Med Assoc** 58(2): 12-21. (in Thai)
- [10] Tengjaroenkul, B., Pimpukdee, K. and Tengjaroenkul, U. 2004. Anesthetic dosages of quinaline sulfate and 2-phenoxyethanol for induction, maintenance and lethal dose 50 in the juvenile hybrid tilapia. **KKU Res J** 9(2): 49-58. (in Thai)
- [11] Somjai, D., Pansue, O. and Chiayvareesajja, S. 2008. Toxicity and Efficacy of Clove Oil for Anesthetizing Siamese Fighting Fish (*Betta splendens*). **Thaksin J** 11(2): 30-38. (in Thai)
- [12] Pattanasiri, T., Taparhudee, W. and Suppakul, P. 2016. Acute toxicity and anaesthetic effect of clove oil and Eugenol on Siamese fighting fish, *Betta splendens*. **Aquacult Int** 25(1): 163-175.
- [13] Kulkham, J., Champasri, S. and Vanichkul, K. 2017. Effect of Clove Oil as Anesthetizing in Handling and Transportation for *Puntius gonionotus*. **Khon Kaen Agr J** 45 Suppl 1: 879-883. (in Thai)
- [14] Mahawong, N., Khachaphichat, M., Apitanakul, P. and Boonprasert, P. 2006. **Experiment of using clove oil as an anesthetic in several commercially important freshwater fish**. 22 pp. Phayao Provincial Fisheries Office, Extension paper No.1. (in Thai)
- [15] Wongkaew, P. and Nonwachai, T. 2015. Concentrations of Clove Oil for anesthesia in Rohu (*Labeo rohita*). **Khon Kaen Agr J** 43 Suppl 1: 208-214. (in Thai)
- [16] Nonwachai, T. 2016. **Evaluation of Clove Oil as an Anesthetic for Goldfish (*Carassius auratus*)**. Rajamangala University of Technology Suvarnabhumi Press.
- [17] Environmental Health and Safety. **8.2.8 Phenolic compounds**. <https://ehs.research.uiowa.edu/828-phenolic-compounds>. Accessed 22 June 2017.

- [18] Mylonas, C.C., Cardinaletti, G., Sigelaki, I. and Polzonetti-Magni, A. 2005. Comparative efficacy of clove oil and 2-phenoxyethanol as anesthetics in the aquaculture of european sea bass (*Dicentrarchus labrax*) and gilthead sea bream (*Sparus aurata*) at different temperatures. **Aquaculture** 246: 467-481.
- [19] American Public Health Association. 1971. **Standard methods for the examination of water and wastewater**. American Public Health Association, Washington, DC.
- [20] Summerfelt, R. C. and Smith, L.S. 1990. **Methods for fish biology**. pp 213-272. I Schreck CB, Moyle PB (eds) Anesthesia, surgery and related techniques. American Fisheries Society, Bethesda, MD.
- [21] Tyler, P. and Hawkins, A.D. 1981. **Vivisection, anaesthetics and minor surgery**. In: Aquarium systems. A.D. Hawkins (Ed.) Academic Press, London, UK.
- [22] Soto, C.G. and Burhanuddin. 1995. Clove oil as a fish anaesthetic for measuring length and weight of rabbitfish (*Siganus lineatus*). **Aquaculture** 136: 149-152.
- [23] Pirhonen, J. and Schreck, C.B. 2003. Effects of anaesthesia with MS-222, clove oil and CO₂ on feed intake and plasma cortisol in steelhead trout (*Oncorhynchus mykiss*). **Aquaculture** 220: 507-514.
- [24] Brown, L.A. 2011. Anaesthesia for fish. **Vietfish** 8(2). https://www.pharmaq.no/sfiles/08/9/file/2011_aquaculture_anesthesia_lydia.pdf. Accessed 23 June 2017.
- [25] King V, W., Hooper, B., Hillsgrove, S., Benton, C. and Berlinsky, D.L. 2005. The use of clove oil, metomidate, tricaine methanesulphonate and 2-phenoxyethanol for inducing anaesthesia and their effect on the cortisol stress response in black sea bass (*Centropristis striata* L.). **Aquac Res** 36: 1442-1449.
- [26] Sharma, K.P., Al-Nasiri, S.K. and Bhatli, M.N. 1978. Toxicity and efficacy of MS-222 on three fishes of Iraq. **Bangladesh J Zool** 6: 107-112.