



ใบรับรองวิทยานิพนธ์
บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

วิทยาศาสตร์มหาบัณฑิต (เพาะเลี้ยงสัตว์น้ำ)

ปริญญา

เพาะเลี้ยงสัตว์น้ำ

เพาะเลี้ยงสัตว์น้ำ

สาขา

ภาควิชา

เรื่อง ผลของแมนแนนโอลิโกแซคคาไรด์ต่อการเจริญเติบโต ระบบภูมิคุ้มกัน
และความต้านทานโรคของปลานิล (*Oreochromis niloticus*, Linn.)

Effect of Mannan-oligosaccharide on Growth, Immunity and Disease Resistance of
Nile Tilapia (*Oreochromis niloticus*, Linn.)

نامผู้วิจัย นางสาวจินนพัทธ์ สำรองพันธุ์

ได้พิจารณาเห็นชอบโดย

อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก

(รองศาสตราจารย์นนทวิทย์ อารีรักษ์, Ph.D.)

อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์เรืองวิทย์ ยืนพันธ์, D.Tech.Sc.)

หัวหน้าภาควิชา

()

ศาสตราจารย์อุทัยรัตน์ ฌ นคร, Ph.D.

บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์รับรองแล้ว

(รองศาสตราจารย์กัญจนา ชีระกุล, D.Agr.)

คณบดีบัณฑิตวิทยาลัย

วันที่ เดือน พ.ศ.

สืบสิงห์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

วิทยานิพนธ์

เรื่อง

ผลของแมนแนนโอลิโกแซคคาไรด์ต่อการเจริญเติบโต ระบบภูมิคุ้มกัน
และความต้านทานโรคของปลานิล (*Oreochromis niloticus*, Linn.)

Effect of Mannan-oligosaccharide on Growth, Immunity and Disease Resistance of
Nile Tilapia (*Oreochromis niloticus*, Linn.)

โดย

นางสาวจิณณพัทธ์ สำรองพันธุ์

เสนอ

บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์
เพื่อขอความสมบูรณ์แห่งปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต (เพาะเลี้ยงสัตว์น้ำ)

พ.ศ. 2553

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

จินณพัทธ์ สารองพันธ์ 2553: ผลของแมนแนนโอลิโกแซคคาไรด์ต่อการเจริญเติบโต ระบบภูมิคุ้มกัน และความต้านทานโรคของปลานิล (*Oreochromis niloticus*, Linn.) ปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต (เพาะเลี้ยงสัตว์น้ำ) สาขาเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำ ภาควิชาเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำ อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์
หลัก: รองศาสตราจารย์ ดร. อารีย์ชน, Ph.D. 132 หน้า

การทดลองเสริมแมนแนนโอลิโกแซคคาไรด์ ที่ 0, 2, 4 และ 6 กรัม ต่ออาหาร 1 กิโลกรัม ในอาหารลูก กุ้งเบอร์ศูนย์ผสมฮอร์โมนเพศผู้ 17 α -methyl testosterone ในการอนุบาลลูกปลานิล (*Oreochromis niloticus* Linn.) ขนาดน้ำหนัก 0.013 กรัมเป็นเวลา 21 วัน ที่อัตราปล่อย 100, 200 และ 300 ตัวต่อตู้บรรจุน้ำ 80 ลิตร พบว่าที่ระดับ 4 และ 6 กรัม ส่งผลให้น้ำหนักและความยาวมากกว่าชุดควบคุมในทุกอัตราปล่อย อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$) การเสริมแมนแนนโอลิโกแซคคาไรด์ในอาหารที่ระดับ 4 และ 6 กรัม มีผลต่ออัตราการเจริญเติบโตต่อวัน (ADG) อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$) ที่อัตราปล่อย 100 ตัวต่อตู้เท่านั้น ส่วนการเสริมแมนแนนโอลิโกแซคคาไรด์ในอาหารที่ 4 และ 6 กรัมกับปลา 200 ตัวต่อตู้ และที่ 6 กรัมกับปลา 300 ตัวต่อตู้ตามลำดับมีผลต่ออัตราการเปลี่ยนอาหารเป็นเนื้อ (FCR) อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$) การเสริมแมนแนนโอลิโกแซคคาไรด์ในอาหารทุกความเข้มข้น ไม่มีผลต่ออัตราการรอดของลูกปลานิลเมื่อสิ้นสุดการอนุบาล 21 วัน การศึกษาทางพยาธิสภาพพบว่าการเสริมแมนแนนโอลิโกแซคคาไรด์ในอาหารที่ระดับ 4 และ 6 กรัม ส่งผลให้ microvilli ที่ผนังลำไส้ส่วนต้นสมบูรณ์และมีพื้นที่ในการดูดซึมอาหารเพิ่มขึ้น และมีการสะสมไขมันที่ตับเพิ่มขึ้น นอกจากนี้การเสริมแมนแนนโอลิโกแซคคาไรด์ในอาหารทุกระดับมีผลช่วยให้ลูกปลานิลที่อัตราปล่อย 100 ตัวต่อตู้มีความต้านทานต่อเชื้อ *Streptococcus agalactiae* ได้ดีกว่าชุดควบคุมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$) ส่วนที่อัตราปล่อย 200 และ 300 ตัวต่อตู้พบว่าเฉพาะที่ระดับ 4 และ 6 กรัมเท่านั้นที่มีความต้านทานต่อเชื้อ *S. agalactiae* ได้ดีกว่าชุดควบคุมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$) การเสริมแมนแนนโอลิโกแซคคาไรด์ที่ระดับเดียวกันในปลานิลวัยรุ่นน้ำหนักเฉลี่ยประมาณ 60 กรัม พบว่าที่ระดับ 6 กรัม มีผลให้มีการตอบสนองต่อวัคซีนแบบ secondary immune response ได้เร็วและสูงกว่าชุดการทดลองอื่นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$) แต่การเสริมแมนแนนโอลิโกแซคคาไรด์ในอาหารทุกระดับไม่มีผลต่อค่าต่าง ๆ ทางโลหิตวิทยาและกิจกรรมที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการ phagocytosis ส่วนการศึกษาการแสดงออกของยีนทางภูมิคุ้มกันในกลุ่ม Cytokines คือ Transforming Growth Factor $\beta 1$, Interleukin 1 β , Interleukin 8 และ Tumor necrosis Factor α จากม้ามและไตส่วนหน้า พบว่าให้ผลไม่ชัดเจนซึ่งอาจเกิดจากระยะเวลาของการตอบสนองของแต่ละยีนที่แตกต่างกัน

จากการศึกษาครั้งนี้แสดงให้เห็นว่าการเสริมแมนแนนโอลิโกแซคคาไรด์ที่ระดับ 4 กรัมต่ออาหาร 1 กิโลกรัม ช่วยเสริมการเจริญเติบโต และความต้านทานต่อเชื้อ *S. agalactiae* ในการอนุบาลลูกปลานิล ส่วนการเสริมแมนแนนโอลิโกแซคคาไรด์ในอาหารปลาวัยรุ่น พบว่าให้ผลไม่ชัดเจนในการยกระดับการทำงานของระบบภูมิคุ้มกันแบบไม่จำเพาะ และแบบจำเพาะ

Chinnapat Samrongpan 2010: Effect of Mannan-oligosaccharide on Growth, Immunity and Disease Resistance of Nile Tilapia (*Oreochromis niloticus*, Linn.). Master of Science (Aquaculture), Major Field: Aquaculture, Department of Aquaculture. Thesis Advisor: Associate Professor Nontawith Areechon, Ph.D. 132 pages.

Supplementation of mannan-oligosaccharide (MOS) in diet of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus* Linn.) fry (average weight of 0.013 gm) at 0, 2, 4 and 6 gm per kg feed and mixed with 60 mg per kg 17 α -methyl testosterone was conducted for 21 days in glass tank holding 80 liters of water with stocking rate of 100, 200 and 300 fry per tank. The study on growth indicated that the 4 and 6 gm MOS tilapia fry had significantly higher weight and length than the control at all stocking rate ($P < 0.05$), however these MOS levels could significantly enhance the average daily growth (ADG) of 100 fry per tank only. For feed conversion rate (FCR), it was found that only 4 and 6 gm per kg MOS for 200 fry per tank and 6 gm per kg MOS for 300 fry per tank did show significantly better FCR than other treatments. However, supplementation of MOS at all concentrations and stocking rates did not have any significant impact on the survival rate of tilapia fry after 21 day feeding trial. Histopathological study revealed that tilapia fry fed with 4 and 6 gm per kg MOS for 21 days had better development of microvilli in the intestine and higher amount of fat accumulation in the liver. Supplementation of MOS at all levels did significantly enhance the resistance against pathogenic *Streptococcus agalactiae* of tilapia fry at 100 fry per tank while at 200 and 300 fry per tank, it required 4 and 6 gm MOS to achieve the same resistance level ($P < 0.05$). The study on the effect of MOS on specific immune response of juvenile tilapia with average weight of 60 gm indicated the significant improvement of secondary immune response in fish fed with 6 gm MOS in term of antibody titer and time of response. However, MOS did not have significant impact on some hematological parameters and phagocytic-related activities. The study on cytokine gene expression including Transforming Growth Factor $\beta 1$, Interleukin 1 β , Interleukin 8 and Tumor Necrosis Factor α from spleen and anterior kidney did not show a clear pattern of improvement of gene expression after MOS treatment for one month. This might be due to the different period of expression of each gene.

This study clearly indicated the benefits of MOS at 4 gm per kg which could significantly enhance the growth and disease resistance of tilapia fry after 21 days of feed supplementation. However, the supplementation of MOS in juvenile tilapia diet did not show a significant improvement of immunity for both non-specific and specific immune response.

Student's signature

Thesis Advisor's signature

กิตติกรรมประกาศ

ผู้วิจัยขอกราบขอบพระคุณรองศาสตราจารย์ ดร.นนทวิทย์ อารีขันธ์ อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก ที่ให้คำปรึกษา ความรู้ และคำแนะนำในการตรวจแก้ไขวิทยานิพนธ์จนกระทั่งเสร็จสมบูรณ์ อีกทั้งให้คำปรึกษาในด้านการเรียน การค้นคว้าวิจัย ตลอดจนการดำเนินชีวิต รวมถึงเป็นกำลังใจ สนับสนุนและส่งเสริมให้ผู้วิจัยได้มีโอกาสทางด้านการศึกษา และการทำงานมากขึ้น

ขอกราบขอบพระคุณผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. เรืองวิทย์ ยืนพันธ์ อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม ที่กรุณาให้คำปรึกษาแนะนำในการตรวจแก้ไขวิทยานิพนธ์ให้มีความถูกต้องสมบูรณ์มากยิ่งขึ้น ขอกราบขอบพระคุณรองศาสตราจารย์ สว่างศรี มหาสวัสดิ์ ผู้แทนบัณฑิตวิทยาลัย ในการสอบประมวลความรู้ ขอกราบขอบพระคุณรองศาสตราจารย์ ดร. วราห์ เทพาหุดี ประธานการสอบขั้นสุดท้าย และ ดร. ปกรณ์ อุ่นประเสริฐ ผู้ทรงคุณวุฒิภายนอกในการสอบปากเปล่าขั้นสุดท้าย ขอกราบขอบพระคุณอาจารย์ ดร.ประพันธ์ศักดิ์ ศิริษะภูมิ อาจารย์ ดร.จุฑาดี ปานพรหมมินท์ และอาจารย์ ดร. กิตติมา วานิชกุล ที่ให้คำปรึกษาและแนะนำความรู้ที่เป็นประโยชน์ในระหว่างการค้นคว้าวิจัย ขอกราบขอบพระคุณอาจารย์ภาควิชาเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำทุกท่าน ที่อบรมสั่งสอน และมอบความรู้อันเป็นประโยชน์อย่างยิ่งแก่ผู้วิจัย และขอกราบขอบพระคุณบริษัท Alltech Biotechnology จำกัด ที่เอื้อเฟื้อตัวอย่างแม่นยำ โอลิโกแซคคาไรด์ในการวิจัยครั้งนี้

ขอขอบคุณสถานีวิจัยประมงกำแพงแสนและเกษตรกรผู้เลี้ยงปลานิล ที่ให้ความเอื้อเฟื้อและสนับสนุนตัวอย่างปลานิลในการวิจัย ขอขอบคุณห้องปฏิบัติการสุขภาพสัตว์น้ำ และห้องปฏิบัติการพันธุศาสตร์สัตว์น้ำ ภาควิชาเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำ ที่เอื้อเฟื้ออุปกรณ์และสถานที่ในการทำงานวิจัย และขอขอบคุณเพื่อน พี่ น้อง สมาชิกห้องปฏิบัติการสุขภาพสัตว์น้ำที่คอยแนะนำและให้ความช่วยเหลือในการทำวิจัยครั้งนี้

ขอกราบขอบพระคุณ คุณพ่อ คุณแม่ ที่ได้ให้ชีวิต อบรม เลี้ยงดู ให้คำปรึกษา เป็นกำลังใจ สนับสนุน ให้โอกาสในชีวิตและการศึกษากับลูกคนนี้ตลอดจนสำเร็จการศึกษา รวมถึงญาติ อาจารย์ เพื่อนกลุ่มโรงเรียนสระบุรีวิทยาคม เพื่อน ๆ มินกร 53 และทุก ๆ คนที่ให้ความรู้ คำปรึกษา ให้กำลังใจ ให้ความช่วยเหลือ ความห่วงใย และคอยอยู่เคียงข้างกันเสมอ

จิณณพัต ตำรองพันธุ์

พฤษภาคม 2553

สารบัญ

หน้า

สารบัญ	(1)
สารบัญตาราง	(2)
สารบัญภาพ	(4)
คำนำ	1
วัตถุประสงค์	3
การตรวจเอกสาร	4
อุปกรณ์และวิธีการ	23
อุปกรณ์	23
วิธีการ	26
ผลและวิจารณ์	44
ผลการทดลอง	44
วิจารณ์ผลการศึกษา	94
สรุปและข้อเสนอแนะ	107
สรุป	107
ข้อเสนอแนะ	108
เอกสารและสิ่งอ้างอิง	109
ภาคผนวก	127
ประวัติการศึกษา และการทำงาน	132

สารบัญตาราง

ตารางที่		หน้า
1	Gene specific primers เพื่อใช้ในการศึกษา RT-PCR	39
2	ส่วนผสมของปฏิกิริยา PCR เพื่อหาปริมาณของ Magnesium chloride ที่เหมาะสม	40
3	ปริมาณของ $MgCl_2$ และจำนวนรอบในการทำ PCR ที่เหมาะสม	41
4	อัตราการรอดของลูกปลานิลแปลงเพศหลังได้รับอาหารเสริมแมนแนน โอลิโกแซคคาไรด์เป็นเวลา 21 วัน ที่อัตราปล่อย 100, 200 และ 300 ตัว/ตู้	45
5	น้ำหนักเฉลี่ยของลูกปลานิลแปลงเพศหลังได้รับอาหารเสริมแมนแนน-โอลิโกแซคคาไรด์เป็นเวลา 21 วัน ที่อัตราปล่อย 100, 200 และ 300 ตัว/ตู้	47
6	ความยาวมาตรฐานเฉลี่ยของลูกปลานิลแปลงเพศหลังได้รับอาหารเสริมแมนแนน โอลิโกแซคคาไรด์เป็นเวลา 21 วัน ที่อัตราปล่อย 100, 200 และ 300 ตัว/ตู้	49
7	อัตราการเจริญเติบโตต่อวันเฉลี่ยของลูกปลานิลแปลงเพศหลังได้รับอาหารเสริมแมนแนน โอลิโกแซคคาไรด์เป็นเวลา 21 วัน ที่อัตราปล่อย 100, 200 และ 300 ตัว/ตู้	51
8	อัตราการเปลี่ยนอาหารเป็นเนื้อเฉลี่ยของลูกปลานิลแปลงเพศหลังได้รับอาหารเสริมแมนแนน โอลิโกแซคคาไรด์เป็นเวลา 21 วัน ที่อัตราปล่อย 100, 200 และ 300 ตัว/ตู้	53
9	อัตราการตายเฉลี่ยของลูกปลานิลแปลงเพศที่ได้รับอาหารเสริมแมนแนน โอลิโกแซคคาไรด์เป็นเวลา 21 วัน ที่อัตราปล่อย 100, 200 และ 300 ตัว/ตู้ หลังแช่ด้วยเชื้อ <i>S. agalactiae</i> ที่ 10^8 CFU/ml	61
10	ค่าเฉลี่ย Antibody titer เปรียบเทียบระหว่างชุดการทดลอง	64
11	ค่าเฉลี่ยสูงสุดของ Antibody titer เปรียบเทียบระหว่างชุดการทดลองหลังได้รับวัคซีนทั้ง 2 ครั้ง	66
12	ค่าเฉลี่ยปริมาณเม็ดเลือดแดงรวม (Total red blood cells) ของปลานิลที่ได้รับอาหารเสริมแมนแนน โอลิโกแซคคาไรด์ตามระดับและระยะเวลาที่กำหนด ($\times 10^8$ cells/ml)	69

สารบัญตาราง (ต่อ)

ตารางที่		หน้า
13	ค่า Hematocrit เฉลี่ยของปลานิลที่ได้รับอาหารเสริมแมนแนน โอลิโกแซคคาไรด์ตามระดับและระยะเวลาที่กำหนด (เปอร์เซ็นต์)	71
14	ค่า Hemoglobin เฉลี่ยของปลานิลที่ได้รับอาหารเสริมแมนแนน โอลิโกแซคคาไรด์ตามระดับและระยะเวลาที่กำหนด (g/dL)	73
15	ค่าเฉลี่ยปริมาณเม็ดเลือดขาวในกระแสเลือด (Peripheral blood leukocytes) ของปลานิลที่ได้รับอาหารเสริมแมนแนน โอลิโกแซคคาไรด์ตามระดับและระยะเวลาที่กำหนด ($\times 10^7$ cells/ml)	75
16	ค่าเฉลี่ย percent phagocytosis ของปลานิลที่ได้รับอาหารเสริมแมนแนน โอลิโกแซคคาไรด์ตามระดับและระยะเวลาที่กำหนด	77
17	ค่าเฉลี่ย phagocytic index ของปลานิลที่ได้รับอาหารเสริมแมนแนน โอลิโกแซคคาไรด์ตามระดับและระยะเวลาที่กำหนด	79
18	ค่าเฉลี่ย superoxide anion ของปลานิลที่ได้รับอาหารเสริมแมนแนน โอลิโกแซคคาไรด์ตามระดับและระยะเวลาที่กำหนด (O.D.)	81

สารบัญภาพ

ภาพที่		หน้า
1	อัตราการรอดเฉลี่ยของลูกปลานิลแปลงเพศหลังได้รับอาหารเสริม แมนแนนโอลิโกแซคคาไรด์เป็นระยะเวลา 21 วัน	46
2	น้ำหนักเฉลี่ยของลูกปลานิลแปลงเพศหลังได้รับอาหารเสริม แมนแนนโอลิโกแซคคาไรด์เป็นระยะเวลา 21 วัน	48
3	ความยาวมาตรฐานเฉลี่ยของลูกปลานิลแปลงเพศหลังได้รับอาหารเสริม แมนแนนโอลิโกแซคคาไรด์เป็นระยะเวลา 21 วัน	50
4	อัตราการเจริญเติบโตต่อวันเฉลี่ยของลูกปลานิลแปลงเพศหลังได้รับอาหารเสริม แมนแนนโอลิโกแซคคาไรด์เป็นระยะเวลา 21 วัน	52
5	อัตราการเปลี่ยนอาหารเป็นเนื้อเฉลี่ยของลูกปลานิลแปลงเพศหลังได้รับอาหาร เสริมแมนแนนโอลิโกแซคคาไรด์เป็นระยะเวลา 21 วัน	54
6	ลักษณะทางพยาธิสภาพบริเวณลำไส้ส่วนต้นของลูกปลานิลแปลงเพศหลังได้รับ อาหารกึ่งเบอร์สุนด์ผสมฮอร์โมนเพศผู้ 17 α -methyl testosterone (17 α -MT) ใน อัตรา 60 มิลลิกรัม ต่ออาหาร 1 กิโลกรัม ผสมแมนแนนโอลิโกแซคคาไรด์ 6 กรัม ต่ออาหาร 1 กิโลกรัม	55
7	ลักษณะทางพยาธิสภาพบริเวณลำไส้ส่วนต้นของลูกปลานิลแปลงเพศหลังได้รับ อาหารกึ่งเบอร์สุนด์ผสมฮอร์โมนเพศผู้ 17 α -methyl testosterone (17 α -MT) ใน อัตรา 60 มิลลิกรัม ต่ออาหาร 1 กิโลกรัม ผสมแมนแนนโอลิโกแซคคาไรด์ 4 กรัม ต่ออาหาร 1 กิโลกรัม พบการฉีกขาดของ microvilli (Laceration; L)	56
8	ลักษณะทางพยาธิสภาพบริเวณลำไส้ส่วนต้นของลูกปลานิลแปลงเพศหลังได้รับ อาหารกึ่งเบอร์สุนด์ผสมฮอร์โมนเพศผู้ 17 α -methyl testosterone (17 α -MT) ใน อัตรา 60 มิลลิกรัม ต่ออาหาร 1 กิโลกรัม ผสมแมนแนนโอลิโกแซคคาไรด์ 2 กรัม ต่ออาหาร 1 กิโลกรัม พบการฉีกขาดของ microvilli (Laceration; L)	57

สารบัญภาพ (ต่อ)

ภาพที่		หน้า
9	ลักษณะทางพยาธิสภาพบริเวณลำไส้ส่วนต้นของลูกปลานิลแปลงเพศหลังได้รับอาหารกึ่งเบอร์สุน์ผสมฮอร์โมนเพศผู้ 17 α -methyl testosterone (17 α -MT) ในอัตรา 60 มิลลิกรัม ต่ออาหาร 1 กิโลกรัม (ชุดควบคุม) พบการฉีกขาดของ microvilli (Laceration; L)	58
10	เซลล์ตับ (Hepatocyte; H) มีการสะสมของไขมัน (Fat droplet; F) อยู่ในเซลล์	59
11	อัตราการตายเฉลี่ยของลูกปลานิลแปลงเพศที่ได้รับอาหารเสริมแมนแนน โอลิโกแซคคาไรด์เป็นระยะเวลา 21 วัน หลังแช่ด้วยเชื้อ <i>S. agalactiae</i> ที่ 10^8 CFU/ml	62
12	ค่าเฉลี่ย Antibody titer เปรียบเทียบระหว่างชุดการทดลอง	65
13	ค่าเฉลี่ยสูงสุดของ Antibody titer เปรียบเทียบระหว่างชุดการทดลองหลังได้รับวัคซีนทั้ง 2 ครั้ง	67
14	ค่าเฉลี่ยปริมาณเม็ดเลือดแดงรวม (Total red blood cells) ของปลานิลที่ได้รับอาหารเสริมแมนแนน โอลิโกแซคคาไรด์ตามระดับและระยะเวลาที่กำหนด	70
15	ค่า Hematocrit เฉลี่ยของปลานิลที่ได้รับอาหารเสริมแมนแนน โอลิโกแซคคาไรด์ตามระดับและระยะเวลาที่กำหนด (เปอร์เซ็นต์)	72
16	Hemoglobin เฉลี่ยของปลานิลที่ได้รับอาหารเสริมแมนแนน โอลิโกแซคคาไรด์ตามระดับและระยะเวลาที่กำหนด (g/dL)	74
17	ค่าเฉลี่ยปริมาณเม็ดเลือดขาวในกระแสเลือด (Peripheral blood leukocytes) ของปลานิลที่ได้รับอาหารเสริมแมนแนน โอลิโกแซคคาไรด์ตามระดับและระยะเวลาที่กำหนด ($\times 10^7$ cells/ml)	76
18	ค่าเฉลี่ย percent phagocytosis ของปลานิลที่ได้รับอาหารเสริมแมนแนน โอลิโกแซคคาไรด์ตามระดับและระยะเวลาที่กำหนด	78
19	ค่าเฉลี่ย phagocytic index ของปลานิลที่ได้รับอาหารเสริมแมนแนน โอลิโกแซคคาไรด์ตามระดับและระยะเวลาที่กำหนด	80

สารบัญภาพ (ต่อ)

ภาพที่		หน้า
20	ค่าเฉลี่ย superoxide anion ของปลานิลที่ได้รับอาหารเสริม แมนแนน โอลิโกแซคคาไรด์ตามระดับและระยะเวลาที่กำหนด (O.D.)	82
21	การแสดงออกของยีน Interleukin 1 β จากไตส่วนหน้าและม้ามของปลานิล	83
22	การแสดงออกของยีน Interleukin 8 จากไตส่วนหน้าและม้ามของปลานิล	84
23	การแสดงออกของยีน Transforming growth factor β 1 จากไตส่วนหน้าและม้าม ของปลานิล	85
24	การแสดงออกของยีน Tumor necrosis factor α จากไตส่วนหน้าและม้ามของ ปลานิล	86
25	การแสดงออกของยีน β -actin จากไตส่วนหน้าและม้ามของปลานิล	87
26	ค่าเฉลี่ย relative fluorescence units ของยีน Interleukin 1 β ในปลานิลที่ได้รับ อาหารเสริมแมนแนน โอลิโกแซคคาไรด์ที่ระดับแตกต่างกัน	88
27	ค่าเฉลี่ย relative fluorescence units ของยีน Interleukin 8 ในปลานิลที่ได้รับอาหาร เสริมแมนแนน โอลิโกแซคคาไรด์ที่ระดับแตกต่างกัน	90
28	ค่าเฉลี่ย relative fluorescence units ของยีน Transforming growth factor β 1 ใน ปลานิลที่ได้รับอาหารเสริมแมนแนน โอลิโกแซคคาไรด์ที่ระดับแตกต่างกัน	91
29	ค่าเฉลี่ย relative fluorescence units ของยีน Tumor necrosis factor α ในปลานิลที่ ได้รับอาหารเสริมแมนแนน โอลิโกแซคคาไรด์ที่ระดับแตกต่างกัน	93

**ผลของแมนแนนโอลิโกแซคคาไรด์ต่อการเจริญเติบโต ระบบภูมิคุ้มกัน
และความต้านทานโรคของปลานิล (*Oreochromis niloticus*, Linn.)**

**Effect of Mannan-oligosaccharide on Growth, Immunity and Disease Resistance
of Nile Tilapia (*Oreochromis niloticus*, Linn.)**

คำนำ

ปลานิล (*Oreochromis niloticus* Linnaeus) เป็นปลาน้ำจืดที่มีการเลี้ยงอยู่ทั่วทุกภูมิภาคของประเทศไทย มีความสำคัญต่อเศรษฐกิจและมีผลผลิตเป็นอันดับหนึ่งของประเทศไทย ดังเห็นได้จากสถิติผลผลิตของการเพาะเลี้ยงปลานิลปี 2548 มีปริมาณ 244,300 ตัน คิดเป็นมูลค่า 7,254.1 ล้านบาท (ข้อมูลจากศูนย์สารสนเทศ, กรมประมง) หากพิจารณาถึงสถานการณ์ปลานิลของไทยปัจจุบัน ในส่วนของระดับความนิยมหรือภาคการตลาด มีแนวโน้มที่ยังเป็นไปในด้านบวก คือ ยังเป็นที่นิยมอันดับต้น ๆ สำหรับผู้บริโภคและราคาก็อยู่ในระดับที่ผู้บริโภคได้รับได้ ปลานิลเป็นปลาที่เลี้ยงง่ายและเจริญเติบโตได้อย่างรวดเร็ว สามารถกินอาหารได้หลากหลายดำรงชีวิตอยู่ได้ทั้งในน้ำจืดและน้ำกร่อยอีกทั้งยังเป็นปลาที่มีรสชาติดีสามารถนำมาประกอบอาหารได้หลากหลาย ธุรกิจการเลี้ยงปลานิลนั้นใช้ระยะเวลาไม่นานก็สามารถมีผลผลิตออกสู่ตลาดได้ ตลอดจนปัจจุบันได้มีการพัฒนาระบบการเลี้ยงให้เลี้ยงได้หนาแน่นเพื่อเพิ่มผลผลิตให้มากขึ้น หากยังสามารถควบคุมและจัดการผลผลิตให้มีคุณภาพดีและได้มาตรฐานในเรื่องของขนาด และน้ำหนัก รวมถึงความสามารถในการต้านทานโรคด้วยแล้วก็จะก่อให้เกิดประโยชน์แก่ผู้ประกอบการ

ในขณะเดียวกันจากการขยายตัวของการเลี้ยงที่เพิ่มขึ้นและการจัดการของผู้เลี้ยงในบางครั้งที่ยังไม่ดีพอ ทำให้เกิดปัญหาการระบาดของโรคตามมา โดยเฉพาะโรคที่เกิดจากเชื้อแบคทีเรียชนิด *Streptococcus agalactiae* (ครีนิญา และคณะ, 2550) ซึ่งสร้างความเสียหายต่อธุรกิจการเพาะเลี้ยงปลานิลเป็นอย่างมาก ทำให้เกษตรกรหันมาใช้ยาปฏิชีวนะและสารเคมีเพื่อจัดการกับปัญหาที่เกิดขึ้นซึ่งในบางครั้งการแก้ไขปัญหาดังกล่าวนั้นเกษตรกรบางส่วนยังขาดความรู้และความเข้าใจ ทำให้ไม่ได้ผลเท่าที่ควรและยังไปกว่านั้นอาจก่อให้เกิดปัญหาการดื้อยาตามมา นอกจากนั้นแล้วอาจก่อให้เกิดสารตกค้างในแหล่งน้ำและในเนื้อปลา ซึ่งส่งผลกระทบต่อสิ่งแวดล้อมและผู้บริโภคอีกด้วย ด้วยเหตุนี้การศึกษาถึงคุณสมบัติขององค์ประกอบของจุลชีพ หรือจากสมุนไพรธรรมชาติเพื่อ

เป็นสารกระตุ้นภูมิคุ้มกัน (Immunostimulants) จึงเป็นอีกทางเลือกหนึ่งที่น่าสนใจ เนื่องจากไม่ก่อให้เกิดสารพิษและสิ่งตกค้างที่เป็นอันตราย

แมนแนน โอลิโกแซคคาไรด์ (Mannan-oligosaccharide) เป็นองค์ประกอบของจุลชีพที่ได้จากผนังเซลล์ยีสต์ และมีคุณสมบัติในการเสริมสร้างระบบภูมิคุ้มกันในสัตว์มีกระดูกสันหลัง ดังนั้น การศึกษาครั้งนี้จึงมีวัตถุประสงค์ที่จะศึกษาถึงระดับความเข้มข้นที่เหมาะสมของแมนแนน โอลิโกแซคคาไรด์ที่ผสมในอาหาร ต่อการเจริญเติบโต อัตรารอด และความต้านทานโรคของลูกปลานิล และระบบภูมิคุ้มกันของปลานิลวัยรุ่น เพื่อเป็นแนวทางที่ช่วยเพิ่มศักยภาพในการเพาะเลี้ยงปลานิลต่อไปในอนาคต

วัตถุประสงค์

1. ศึกษาผลของแมนแนนโอลิโกแซคคาไรด์ต่อการเจริญเติบโต อัตรารอด และความต้านทานต่อเชื้อแบคทีเรีย *Streptococcus agalactiae* ของลูกปลานิล
2. ศึกษาผลของแมนแนนโอลิโกแซคคาไรด์ต่อระบบภูมิคุ้มกันของปลานิลวัยรุ่น
3. ศึกษาการแสดงออกของยีนในกลุ่ม Cytokines ของปลานิลวัยรุ่นที่ได้รับอาหารผสม แมนแนนโอลิโกแซคคาไรด์ในระดับที่แตกต่างกัน

การตรวจเอกสาร

ปลานิล

อนุกรมวิธานของปลานิล

ปลานิล (*Oreochromis niloticus*) เป็นพันธุ์ปลาหนึ่งใน 16 ชนิดของครอบครัว Cichlidae รูปร่างและการดำรงชีวิตคล้ายคลึงกับปลาหมอเทศ (*Tilapia mossambica* Peters) หรือ Java tilapia โดยมีถิ่นฐานดั้งเดิมของปลาในครอบครัวนี้อยู่ในทวีปแอฟริกา พบทั่วไปตามหนอง บึง และทะเลสาบในประเทศซูดาน อุแกนดา แทนแกนยิกา เป็นต้น (ชาญชัย, 2522) สำหรับประเทศไทย เจ้าฟ้าชายอาคิฮิโตะได้จัดส่งปลานิลจำนวน 50 ตัว มาทูลเกล้าฯ ถวายพระบาทสมเด็จพระเจ้าอยู่หัว เมื่อปี พ.ศ. 2508 (สุปราณี, 2550) และเนื่องจากปลานิลเป็นปลาที่เลี้ยงง่าย ทนต่อสภาพแวดล้อมต่าง ๆ ได้ดี พระบาทสมเด็จพระเจ้าอยู่หัวจึงมอบหมายให้กรมประมงเป็นผู้เผยแพร่ และส่งเสริมให้มีการเลี้ยงปลานิลจนมีการเลี้ยงอย่างแพร่หลายในปัจจุบัน

อนุกรมวิธานของปลานิล

Kingdom	Animalia
Phylum	Chordata
Class	Actinopterygii
Order	Perciformes
Family	Cichlidae
Genus	<i>Oreochromis</i>
Species	<i>niloticus</i>

ชื่อวิทยาศาสตร์ *Oreochromis niloticus*

ลักษณะทั่วไปของปลานิล

ปลานิลมีรูปร่างลักษณะคล้ายกับปลาหมอเทศ ลำตัวสั้น แบนข้าง แต่ลักษณะพิเศษของปลานิลคือ ริมฝีปากบนและล่างเสมอกัน ซึ่งปลาชนิดอื่น ๆ มักจะมีริมฝีปากบนสั้นกว่าริมฝีปากล่าง บริเวณแก้มมีเกล็ด 4 แถว สีของลำตัวเปลี่ยนไปตามสภาพแวดล้อมของแหล่งที่อยู่อาศัยคือตั้งแต่สีดำอ่อนจนถึงสีเขียวดำ ท้องสีขาว ที่ลำตัวมีลายพาดขวางประมาณ 9-10 แถบตั้งแต่หัวจรดโคนหาง แม้แต่ลูกปลาก็มีลายพาดขวางนี้เห็นชัดเจนไม่น้อยกว่า 7 แถบทั้งเพศผู้และเพศเมีย แต่เพศเมียสีจะจางกว่าเพศผู้มาก ครีบหลัง ครีบกัน และครีบหางมีจุดสีขาวและเส้นสีดำตัดขวาง มีเกล็ด 3 แถวที่บริเวณแก้ม และอีก 1 แถวที่บริเวณเหนือเส้นข้างลำตัวเล็กน้อย ครีบหลังมีอันเดียวยาวจรดถึงคอ หาง ครีบหลังประกอบด้วยก้านครีบแข็ง 15-18 อัน และก้านครีบอ่อน 12-14 อัน ครีบกันประกอบด้วยก้านครีบแข็ง 3 อัน และก้านครีบอ่อน 9-10 อัน ครีบหางตัดตรง บนแถบเส้นข้างลำตัวมีเกล็ด 33 เกล็ด ทางด้านข้างมีเกล็ดตามแนวเฉียงจากตอนต้นของครีบหลังลงมาถึงเส้นข้างลำตัว 5 เกล็ด และจากเส้นข้างลำตัวลงมาถึงส่วนหน้าของครีบกัน 13 เกล็ด ตรงกลางเกล็ดมีสีเข้ม บริเวณปลายอ่อนของครีบหลัง ครีบกัน และครีบหางมีจุดสีขาวและเส้นสีดำตัดขวางคล้ายลายข้าวตอกอยู่โดยทั่วไป ที่กระดูกแก้มมีจุดสีเข้มอยู่ 1 จุด ลักษณะพื้นบริเวณขากรรไกรและคอหอยจะมีหลายขนาด ตั้งแต่ค่อนข้างหยาบจนถึงละเอียด เหนืออวัยวะประมาณ 15-17 อัน ปลานิลเมื่อมีอายุได้ประมาณ 3 เดือนเศษจะเริ่มมีลักษณะแตกต่างทางเพศ ปลานิลที่พบมีขนาดใหญ่ที่สุดมีน้ำหนักประมาณ 2.5 กิโลกรัม (อุดม, 2549)

ปลานิลมีนิสัยชอบอยู่รวมกันเป็นฝูง มีความอดทนและปรับตัวเข้ากับสภาพแวดล้อมได้ดี ตามปกติรูปร่างภายนอกของปลานิลเพศผู้และเพศเมียจะมีลักษณะคล้ายคลึงกันมาก แต่จะสังเกตลักษณะเพศได้โดยการดูอวัยวะเพศที่บริเวณใกล้กับช่องทวาร โดยเพศผู้จะมีอวัยวะเพศลักษณะเรียวยาวยื่นออกมา สำหรับเพศเมียมีลักษณะของอวัยวะเพศเป็นรูค่อนข้างใหญ่และกลม ขนาดปลาที่จะแยกเพศได้ชัดเจนต้องเป็นปลาที่มีขนาดยาวตั้งแต่ 10 เซนติเมตรขึ้นไป สำหรับปลาที่มีขนาดโตเต็มที่ที่สามารถสังเกตเพศได้ด้วยการดูสีที่ลำตัว โดยสีบริเวณใต้หางและลำตัวของปลาเพศผู้จะมีสีเข้มกว่าปลาเพศเมีย เมื่อถึงฤดูผสมพันธุ์สีจะยิ่งเข้มขึ้น (สุปราณี, 2550)

ตามธรรมชาติแล้วปลานิลชอบอาศัยอยู่รวมกันเป็นฝูง (ยกเว้นเวลาสืบพันธุ์) ตามแม่น้ำ บึง ลำคลอง ทะเลสาบ ที่เป็นแหล่งน้ำจืด แต่สามารถนำไปเลี้ยงในบริเวณที่เป็นน้ำกร่อยได้ เนื่องจากมีความทนทานต่อการเปลี่ยนแปลงของสภาพแวดล้อมได้ดี สามารถมีชีวิตอยู่ได้ในช่วงการ

เปลี่ยนแปลงของอุณหภูมิกว้างมากคือตั้งแต่ 11-42 องศาเซลเซียส แต่ในอุณหภูมิต่ำกว่า 10 องศาเซลเซียส พบว่าปลานิลปรับตัวและเจริญเติบโตได้ไม่ด้นัก ทั้งนี้เป็นเพราะถิ่นกำเนิดเดิมของปลานิลนี้อยู่ในเขตร้อน ส่วนความทนทานของปลานิลต่อความเป็นกรดเป็นด่างของน้ำ (pH) โดยเจริญเติบโตได้ดีในช่วง 6.5-8.5 ปลานิลจะเริ่มตายในน้ำที่มี pH 6.5-5.5 เฉลี่ย 10% และที่ pH 5.5-4.5 เฉลี่ย 70% และตายหมดที่ pH 4.5-3.5 นอกจากนี้ปลานิลยังมีความทนทานต่อความเค็ม กล่าวคือ ปลานิลสามารถอยู่ได้ปกติในน้ำที่มีความเค็มสูงสุด 20 ส่วนในพันส่วน ซึ่งนับว่าเป็นปลาที่เหมาะสมนำไปเลี้ยงในบ่อดินได้เป็นอย่างดี (อุดม, 2549)

การแพร่ขยายพันธุ์

ปลานิลสามารถผสมพันธุ์ได้ตลอดปี โดยปกติวงจรการสืบพันธุ์วางไข่ของปลานิลจะใช้เวลาประมาณ 1 เดือน แต่อาจจะไม่ได้เกิดขึ้นทุกเดือน ขึ้นอยู่กับความสมบูรณ์ของแม่ปลาและสภาพแวดล้อม (ศิริ, 2542) เนื่องจากขนาด อายุและช่วงการสืบพันธุ์ของปลาแต่ละตัวจะแตกต่างกันไปตามสภาพแวดล้อม และสภาพทางสรีรวิทยาของปลาเอง โดยพบว่าปลานิลจะเริ่มมีพัฒนาการของไข่และน้ำเชื้อเมื่อมีความยาวประมาณ 6.5 เซนติเมตร

ในช่วงผสมพันธุ์วางไข่ ปลานิลเพศผู้จะแยกออกจากฝูงแล้วเริ่มสร้างรัง โดยเลือกบริเวณเชิงลาดหรือก้นบ่อที่มีระดับน้ำลึกระหว่าง 0.5-1 เมตร วิธีการสร้างรังก้นบ่อจะปักหัวลงโดยตัวของมันจะอยู่ในระดับตั้งฉากกับพื้นดิน แล้วใช้ปากพร้อมกับการเคลื่อนไหวของลำตัวเขี่ยดินตะกอนออก จากนั้นจะอมดินตะกอนและจับเศษสิ่งของต่าง ๆ ออกไปทิ้งนอกรัง ทำเช่นนี้จนกว่าจะได้รังที่มีลักษณะค่อนข้างกลม เส้นผ่านศูนย์กลางประมาณ 20-25 เซนติเมตร ลึกประมาณ 3-6 เซนติเมตร ความกว้างและความลึกของรังที่ใช้วางไข่ขึ้นอยู่กับขนาดของพ่อปลา หลังจากสร้างรังเสร็จเรียบร้อยแล้ว มันจะไล่ปลาตัวอื่น ๆ ให้ออกไปนอกรัศมีของรังประมาณ 2-3 เมตร ขณะเดียวกันพ่อปลาที่สร้างรังจะแผ่ครีบท้อง และอ้าปากกว้างในขณะที่มีปลาเพศเมียว่ายน้ำเข้ามาใกล้ ๆ รัง และเมื่อเลือกปลาเพศเมียได้ถูกใจแล้ว จะแสดงอาการจับคู่กัน โดยใช้หางดีดและกัดกันเบา ๆ การเคล้าเคลียดังกล่าวใช้เวลาไม่นานนัก ปลาเพศผู้จะใช้บริเวณหน้าผากคุนที่ใต้ท้องของปลาเพศเมียเพื่อเป็นการกระตุ้นเร่งเร้าปลาเพศเมียให้วางไข่ ซึ่งปลาเพศเมียจะวางไข่ครั้งละ 10-15 ฟอง ปริมาณไข่ที่วางรวมกันแต่ละครั้งมีประมาณ 50-600 ฟอง ทั้งนี้ขึ้นอยู่กับขนาดของแม่ปลา เมื่อปลาเพศเมียวางไข่แต่ละครั้ง ปลาเพศผู้จะว่ายน้ำไปเหนือไข่พร้อมกับปล่อยน้ำเชื้อลงไป จากนั้นปลาเพศเมียจะเก็บไข่ที่ได้รับการผสมแล้วไว้ในปาก ทำเช่นนี้จนกว่าการผสมพันธุ์แล้วเสร็จ

โดยใช้เวลา 1-2 ชั่วโมง ปลาเพศเมียจะว่ายออกจากรัง ส่วนปลาเพศผู้จะคอยหาโอกาสคล้าเคลียกับปลาเพศเมียตัวอื่นต่อไป

ไข่ที่ปลาเพศเมียอมไว้ในปากจะมีพัฒนาการขึ้นเป็นลำดับ ไข่ปลานิลเป็นประเภทไข่จม มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางประมาณ 1.8-2.0 มิลลิเมตร ไข่แดงมีขนาดใหญ่ ไข่จะฟักเป็นตัวภายในเวลา 4 วัน ในน้ำที่อุณหภูมิ 27-28 องศาเซลเซียส ไข่ปลานิลจะพัฒนาเป็นปลานิลตัวอ่อน 5 ระยะ คือ

ระยะที่ 1 ไม่มีตา (Uneyed) ระยะนี้ไข่ยังคงเป็นสีเหลืองอ่อนตลอดทั้งฟอง ยังไม่มีพัฒนาการใด ๆ ให้เห็น

ระยะที่ 2 มีตา (Eyed) ไข่ยังคงมีสีเหลือง และมีจุดดำรอบ ๆ ไข่

ระยะที่ 3 ก่อนฟักเป็นตัว (Pre-hatch) เป็นระยะที่ไข่เปลี่ยนเป็นสีน้ำตาล มีการพัฒนาจนสังเกตเห็นส่วนตาและหางชัดเจน

ระยะที่ 4 ฟักเป็นตัวอ่อน (Hatch fry หรือ Yolk sac fry) เป็นระยะที่ลูกปลาฟักออกเป็น ตัวแต่ยังมีถุงไข่แดงติดอยู่

ระยะที่ 5 ตัวอ่อนที่ว่ายน้ำ (Swim-up fry) เป็นระยะที่ถุงไข่แดงยุบและลูกปลาสามารถว่ายน้ำได้

แม่ปลาฟักไข่ในปากโดยการขยับปากให้น้ำไหลเข้าออกในช่องปากอยู่เสมอ เพื่อช่วยให้ไข่ที่อมไว้ได้รับน้ำที่สะอาดทั้งยังเป็นการป้องกันศัตรูที่จะมากินไข่ด้วย

ไข่จะพัฒนาเป็นลูกปลาที่ถุงอาหารยังไม่ยุบ ภายใน 8 วันลูกปลานิลจะเกาะรวมกันเป็นกลุ่มโดยว่ายวนเวียนอยู่บริเวณหัวของแม่ปลาและเข้าไปหลบซ่อนอยู่ในช่องปากเมื่อมีภัย เมื่อมีอายุครบ 13-14 วัน นับจากวันที่แม่ปลาวางไข่ ลูกปลานิลจะเริ่มกินอาหารจำพวกพืชและไรน้ำขนาดเล็ก และหลังจากมีอายุ 3 สัปดาห์ขึ้นไป ลูกปลาจะกระจายแตกฝูงไปหากินเลี้ยงตัวเองได้โดยลำพัง (สุปรานี, 2550)

อาหารและการกินอาหาร

นิสัยการกินอาหารของปลานิลสามารถกินได้ทั้งสัตว์และพืชรวมทั้งซากที่เน่าเปื่อย ปลานิลกินซากพืช สาหร่าย โรติเฟอร์ สัตว์หน้าดิน และแพลงก์ตอนสัตว์ เช่น ตัวอ่อนของแมลงน้ำและไรน้ำ กินอาหารตั้งแต่ระดับผิวน้ำไปถึงพื้นท้องน้ำ นอกจากนี้ยังสามารถฝึกให้ปลานิลกินอาหารเม็ดหรืออาหารผสมและเศษอาหารได้ง่าย (อุดม, 2549) การเลี้ยงปลานิลในบ่อนั้นนิยมให้อาหารจำพวก รำ เศษอาหาร พืชจำพวกแห่น รวมทั้งมูลสัตว์และปุ๋ยวิทยาศาสตร์ เป็นต้น ต่อมาได้มีการปรับปรุงคุณภาพของอาหารปลานิลโดยเน้นรายละเอียดเกี่ยวกับปริมาณโปรตีนในอาหารผสม ให้ได้ระดับที่ต้องการเพื่อช่วยให้ปลาโตเร็วขึ้น และใช้ส่วนผสมของรำ ปลาขี้ขาว กากถั่วเหลือง ใบกระถินแห้ง ปลาป่น เกลือแร่และวิตามิน เป็นต้น (ชาญชัย, 2522)

โรคและปรสิตที่พบในปลานิล

สุปราณี (2550) รายงานว่า ส่วนใหญ่เป็นโรคที่เกิดจากปรสิตภายนอกและปรสิตภายในแบคทีเรีย และเชื้อรา

โรคจุดขาว เกิดจากโปรโตซัวชนิด *Ichthyophthirius multifiliis* ส่วนใหญ่จะพบในปลานิลวัยอ่อน โดยจะพบจุดขาวกลมขนาดเล็กเท่าปลายเข็มหรือเล็กกว่าหัวเข็มหมุดกระจายอยู่ตามตัว ช่องปาก จมูก และเหงือก ปลาจะขับเมือกออกมามาก มีสีฟุ้งครึบเปื่อย ว่ายน้ำเฉื่อยชา และมีอัตราการตายสูงมากภายในเวลา 2-3 วัน โรคนี้สามารถแพร่กระจายได้อย่างรวดเร็ว

โรคเห็บระฆัง เกิดจากโปรโตซัวชนิด *Trichodina* spp. ปลานิลจะมีอาการลอยหัว เหงือกซีด ผิวดำ ครีบ และรอบปากเปื่อย มีแผลเลือดออกขนาดเล็กกระจายอยู่ตามลำตัว มีคราบขาว ๆ เกาะตามผิวดำปลา โรคนี้มักเกิดกับปลาวัยอ่อนที่เลี้ยงอย่างหนาแน่น โดยจะทำให้ปลาตายอย่างรวดเร็วในระยะเวลานั้น

โรคที่เกิดจากปรสิตกลุ่มครัสเตเชียน มักพบเกาะตามเหงือกของปลานิล สามารถเคลื่อนที่ได้เร็วมาก อาจทำให้ปลานิลตายหรือเจริญเติบโตช้า บริเวณที่เกาะจะมีอาการบวม มีแผลเลือดออกขนาดเล็ก ตัวอย่างปรสิตกลุ่มครัสเตเชียนที่พบในปลานิล เช่น หนอนสมอ (*Lernaea* sp.) พบเกาะที่เพดานปากและตามโคนครีบต่าง ๆ ของปลานิล เห็บก้ามปู (*Ergasilus* sp.) พบเกาะตามเหงือกและ

ฝังตัวอยู่ในปากปลาชนิด ปลิงใส (Monogenea) พบเกาะตามเหงือกและผิวหนัง พยาธิตัวแบน (Trematode) พบเกาะตามตัว เหงือก หรือตาของปลานิล

โรคที่เกิดจากปรสิตภายใน ส่วนใหญ่จะเป็นพวกโปรโตซัวและเมตาซัวที่พบภายในลำไส้ของปลานิล ทำให้ปลาพอม วายน้ำขุ่น และติดตามลำตัวปลาอาจมีสีเข้มขึ้น แต่ไม่ทำให้ปลาตาย

โรคที่เกิดจากแบคทีเรีย มักพบในบ่อที่มีอินทรีย์วัตถุสะสมมาก ๆ ชนิดของแบคทีเรียที่ทำให้เกิดโรคในปลานิลได้แก่

Streptococcus agalactiae ปลามีอาการว่ายลอยหัวที่ผิวน้ำ เลิกการทรงตัว วายน้ำหนุ่นแบบควง ส่วน ตาโปนหรือขุนขาวทั้งสองข้างหรือเพียงข้างเดียว โคนครีบทูบวม มักพบร่วมกับอาการภายใน ได้แก่ ตับบวมและมีสีซีด ม้ามโต ถุงน้ำดีโต มีของเหลวอยู่มากในลำไส้และช่องท้อง (ศรีบุญญา และคณะ, 2550)

Aeromonas spp. และ *Pseudomonas* spp. ทำให้เกิดแผลเลือดออกขนาดเล็กในอวัยวะและเนื้อเยื่อต่างๆ

Mycobacterium spp. ทำให้เกิดอาการอักเสบแบบเรื้อรัง พบก้อนสีขาวครีมขนาดเล็กบริเวณตับ ไต ม้าม และกล้ามเนื้อลำตัวจำนวนมาก

Flavobacterium columnaris ทำให้ลำตัวปลาเป็นแผลสีเทาที่มีลักษณะลึกลงแบบอานม้า ลำตัวคล้ำ ครีบหลังเน่า วายน้ำขุ่น และตายในที่สุด

โรคที่เกิดจากเชื้อรา ไม่ได้ก่อให้เกิดโรคโดยตรง แต่จะทำให้เกิดอาการแทรกซ้อนในกรณีที่ปลาอ่อนแอหรือมีบาดแผลบริเวณลำตัว

ระบบภูมิคุ้มกันของปลา

เอกพล (2551) รายงานว่า ปลาเป็นสัตว์มีกระดูกสันหลัง (Vertebrate) ที่มีวิวัฒนาการต่ำที่สุดที่มีระบบภูมิคุ้มกันคล้ายคลึงกับสัตว์มีกระดูกสันหลังชั้นสูงอย่างเช่น สัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม (Mammals) โดยเฉพาะปลากระดูกแข็ง (Teleost fish) จัดเป็นกลุ่มของสัตว์มีกระดูกสันหลังที่มีระบบภูมิคุ้มกันที่พัฒนาค่อนข้างดี (Zarkadis *et al.*, 2001) ซึ่งระบบภูมิคุ้มกันปลาสามารถแยกออกเป็น 2 ส่วน (Magor and Magor, 2001) คือ

1. ระบบภูมิคุ้มกันที่มีมาตั้งแต่กำเนิด (Innate Immunity)

ปลากระดูกแข็งเป็นสิ่งมีชีวิตที่พบอาศัยอยู่ได้ทั้งในน้ำจืดและน้ำเค็ม ระบบภูมิคุ้มกันที่มีมาตั้งแต่กำเนิดของสัตว์ในกลุ่มนี้ถือได้ว่ามีความสำคัญต่อการอยู่รอดอย่างมาก เนื่องจากปลาอาศัยอยู่ในน้ำที่เป็นแหล่งแพร่กระจายและอยู่อาศัยของเชื้อโรคหลายชนิด ดังนั้นสิ่งป้องกันทางกายภาพจึงเป็นองค์ประกอบหรือด่านแรกที่ทำหน้าที่ในการตอบสนองทางภูมิคุ้มกัน (Jones, 2001) นอกจากนี้ยังมีการทำงานของเซลล์บางกลุ่มและการหลั่งสารโปรตีนบางชนิดในระบบการตอบสนองแบบนี้ด้วย ซึ่งส่วนใหญ่พบว่าเป็นการตอบสนองแบบไม่จำเพาะเจาะจง (Non specific response) และไม่มีการจดจำ (No memory) (Bols *et al.*, 2001) กลไกที่ทำหน้าที่ในการป้องกันเชื้อโรคเข้าสู่ร่างกายในระบบนี้แบ่งได้เป็น 3 กลไก (Magnadottir, 2006) ได้แก่

1.1 กลไกการป้องกันตัวโดยโครงสร้างทางกายภาพ (Physical defenses)

ผิวหนัง (Skin)

ผิวหนังของปลาคือเป็นด่านแรกที่ป้องกันเชื้อโรคหรือสิ่งแปลกปลอมทั้งหลายไม่ให้เข้าสู่ร่างกาย ซึ่งโดยทั่วไปแบ่งเป็น 4 ชั้น ได้แก่ Cuticle, Epidermis, Dermis และ Hypodermis โดยชั้น Cuticle จะอยู่ชั้นนอกสุดมีลักษณะเป็นชั้นบาง ๆ โครงสร้างส่วนใหญ่จะเป็นเยื่อเมือก (Mucus) ซึ่งถูกขับออกมาจากเซลล์ชนิด Mucus หรือ Goblet cell (Bols *et al.*, 2001) ในชั้น Epidermis ของปลาบางชนิดจะมีส่วนของผิวหนังที่ค่อนข้างหนาและแข็งแรงทำให้ยากต่อการทำอันตรายของเชื้อโรคปลาบางชนิด เช่น ปลากลุ่ม Catfish (Yoakim and Grizzle, 2006) จะมีเซลล์ชนิดพิเศษเรียกว่า Alarm substance cell หรือ Club cell ในชั้น Epidermis ที่ทำหน้าที่ในการสร้างสารเตือนภัย (Alarm substance) ออกมาเมื่อมีการถูกรบกวนหรือถูกทำร้ายด้วยศัตรู (Chivers *et al.*, 2007)

เมือก (Mucus)

เมือกจัดเป็นองค์ประกอบที่อยู่นอกสุดของผิวหนัง ซึ่งสัมผัสกับสภาพแวดล้อมโดยตรง ด้วยคุณสมบัติที่เหนียว จึงมีคุณสมบัติในการดักจับเชื้อโรคอย่างไม่จำเพาะเจาะจงและยังพบว่าปลา มีการขับเมือกออกมาตลอดเวลาทำให้เชื้อโรคที่ติดมากับเมือกหลุดลอกออกไป ทำให้ไม่สามารถเข้าสู่ตัวปลาได้ นอกจากนี้จากการศึกษายังพบว่าการเคลื่อนตัวไปมาระหว่างชั้นผิวหนังของ

โปรตีนและเซลล์เม็ดเลือดขาวบางชนิดในชั้นนี้ ทำให้เป็นการเพิ่มความสามารถในการป้องกันเชื้อโรคหรือสิ่งแปลกปลอมได้ดียิ่งขึ้น (Bols *et al.*, 2001)

เกล็ด (Scale)

เกล็ดถือเป็นโครงสร้างพิเศษของปลาที่ใช้ป้องกันอันตรายต่าง ๆ ทั้งที่เป็นของแข็งและเชื้อโรคหรือสิ่งแปลกปลอมชนิดต่าง ๆ เนื่องจากมีลักษณะแข็ง ซึ่งทำให้ยากต่อการบุกรุก นอกจากนี้ยังมีเมือกปกคลุมโครงสร้างนี้ด้วย (Magnadottir, 2006)

1.2 กลไกการป้องกันตัวโดยใช้เซลล์ (Cellular defenses)

กลไกการป้องกันตัวในระบบนี้จะเป็นส่วนสำคัญในการตอบสนองต่อเชื้อโรคหรือสิ่งแปลกปลอมภายหลังจากที่เชื้อโรคหรือสิ่งแปลกปลอมได้ผ่านกลไกทางกายภาพเข้ามา โดยเซลล์ที่ทำหน้าที่สำคัญในระบบนี้ได้แก่ Phagocytes ซึ่งหลาย เช่น Macrophage และ Polymorphonuclei (PMN) cells ที่มีโครงสร้างคล้าย ๆ กับ Neutrophils (Ellis, 2001) ของสัตว์ชั้นสูง โดยเซลล์ในกลุ่มนี้จะทำหน้าที่จับกิน (Engulfment) เชื้อโรคและสิ่งแปลกปลอมอย่างไม่จำเพาะเจาะจง โดยขบวนการ Phagocytosis อย่างไรก็ตามในสัตว์ชั้นสูงมีการศึกษาพบว่าเซลล์เหล่านี้มีความจดจำในการตอบสนองต่อสิ่งแปลกปลอมได้ด้วย เซลล์ในกลุ่มนี้ยังทำหน้าที่ในการเตรียมแอนติเจน (Antigen) สำหรับเซลล์บางกลุ่ม เพื่อตอบสนองในขบวนการตอบสนองสิ่งแปลกปลอมอย่างจำเพาะเจาะจงจึงเรียกเซลล์กลุ่มนี้อีกชื่อว่า Antigen presenting (processing) cells

1.3 กลไกการป้องกันตัวโดยผ่านสารน้ำ (Humoral defenses)

ปลากระดูกแข็งโดยทั่วไปมีการหลั่งสารโปรตีนสำคัญออกมาในระบบหมุนเวียนของเลือดเช่นเดียวกับสัตว์ชั้นสูง เพื่อทำหน้าที่สำคัญในการทำลายเชื้อโรคหรือสิ่งแปลกปลอม โดยมีฤทธิ์ทำให้เกิดการแตกสลาย (Lysis) ของเซลล์เชื้อโรคอย่างไม่จำเพาะเจาะจงที่สำคัญได้แก่ Complements ซึ่งเป็นโปรตีนที่มีอยู่ทั่วไปในร่างกาย สามารถกำจัดสิ่งแปลกปลอมได้อย่างไม่จำเพาะเจาะจงโดยทำให้เกิดการสลายตัวของเซลล์และเสริมขบวนการ Phagocytosis รวมทั้งยังเกี่ยวข้องกับการอักเสบ (Inflammatory) ของร่างกาย (Zarkadis *et al.*, 2001) Lytic enzyme ชนิดต่าง ๆ เช่น Lysozyme เป็นโปรตีนที่สำคัญในการตอบสนองทางภูมิคุ้มกันของสัตว์ทั้งพวกที่มี

กระตุ้นหลังและไม่มีกระตุ้นหลัง โดยสามารถย่อยผนังเซลล์ของแบคทีเรียและกระตุ้นระบบ Complement system และ Phagocytosis ได้อีกด้วย (Magnadottir, 2006) นอกจากนี้ยังมีเอนไซม์ที่สำคัญอื่น ๆ ในกลไกการตอบสนองทางระบบภูมิคุ้มกันอีกหลายชนิด เช่น Agglutinin และ Precipitins ซึ่งเป็นเอนไซม์ที่ทำหน้าที่คล้ายกับ Lectin และ Pentraxins ซึ่งสามารถทำปฏิกิริยากับ คาร์โบไฮเดรตได้ และสามารถกระตุ้นระบบ Opsonization, Phagocytosis และ Complement system ได้อีกด้วย (Arason, 1996) นอกจากนี้ยังมีสารที่สำคัญที่ถูกสร้างขึ้นในการกระตุ้นภูมิคุ้มกัน คือ Cytokines และ Chemokines ซึ่งถือได้ว่าเป็นตัวควบคุม (Control) และเป็นสัญญาณโมเลกุล (Signaling molecules) ในการทำงานร่วมกันระหว่างระบบภูมิคุ้มกันแบบ Innate immunity และ Acquire หรือ Adaptive immunity (Secombes *et al.*, 1996)

2. ระบบภูมิคุ้มกันที่เกิดขึ้นภายหลังจากที่ได้รับการกระตุ้น (Adaptive or Acquired Immunity)

การตอบสนองทางภูมิคุ้มกันประเภทนี้ถือได้ว่าเป็นระบบที่มีการพัฒนาดีที่สุด พบได้ตั้งแต่ในปลากระดูกอ่อนไปจนถึงมนุษย์ ซึ่งยังไม่ปรากฏในสัตว์ไม่มีกระดูกสันหลัง (Invertebrate) ทั้งในส่วนของแมลงและสัตว์จำพวกกุ้งหรือปู (Pasquier, 2001) ระบบการตอบสนองแบบนี้จะเกิดขึ้นก็ต่อเมื่อมีการกระตุ้นด้วยสิ่งแปลกปลอมและการตอบสนองจะมีความรุนแรงและรวดเร็วกว่าการตอบสนองในครั้งแรกเมื่อเซลล์ของระบบภูมิคุ้มกันพบกับสิ่งแปลกปลอมชนิดเดิมอีกครั้ง เนื่องจากระบบการตอบสนองต่อสิ่งแปลกปลอมที่มีความสามารถในการจดจำและมีความจำเพาะเจาะจงสูงมาก การตอบสนองในระบบนี้จะอาศัยการทำงานร่วมกันของกลุ่มเซลล์เม็ดเลือดขาวหลาย ๆ ชนิด และอาศัยโปรตีนบนผิวเซลล์เป็นสื่อกลางในการติดต่อสื่อสารเพื่อการจดจำเชื้อโรคหรือสิ่งแปลกปลอมที่บุกรุกเข้ามาในร่างกาย (Miller and Clem, 1984) ระบบการตอบสนองนี้สามารถแบ่งออกเป็น 2 ส่วนที่สำคัญคือ

2.1 การตอบสนองโดยผ่านสารน้ำหรือของเหลวในเลือด (Humoral immune response)

การตอบสนองทางภูมิคุ้มกันแบบนี้จะมีเซลล์เม็ดเลือดขาว (Leukocytes) หลายชนิดเข้ามาร่วมกันทำงาน ซึ่งผลของการตอบสนองจะมีการสร้างโปรตีนที่สามารถทำหน้าที่ในการจดจำเชื้อโรคหรือสิ่งแปลกปลอมอย่างจำเพาะเจาะจง ที่เรียกว่า Antibody หรือ Immunoglobulin (Ig) ในสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนมจะมี Ig อยู่ 5 ชนิด ซึ่งได้แก่ IgM, IgD, IgG, IgA และ IgE การศึกษาในช่วงแรก ๆ พบว่าปลากระดูกแข็งมีการสร้าง Ig เพียงสองชนิดเท่านั้นคือ IgM และ IgD (Warr, 1995) แต่

ในปัจจุบันมีการศึกษาพบว่าในปลากระดูกแข็งมีการสร้าง IgT ได้อีกชนิดหนึ่ง (Raida and Buchmann, 2008) โดยเซลล์เม็ดเลือดขาวที่ทำหน้าที่ในการตอบสนองทางระบบภูมิคุ้มกันในระบบนี้ ได้แก่

Antigen presenting cell (APC)

ในสัตว์ชั้นสูงโดยทั่วไปเซลล์กลุ่มนี้ได้แก่ Neutrophils, Monocytes (Macrophages) และ Dendritic cell ซึ่งจะทำหน้าที่ในการดักจับเชื้อโรคหรือสิ่งแปลกปลอมที่เข้ามาในร่างกายด้วยกระบวนการ Phagocytosis แล้วทำการย่อยสลายและตกแต่งโครงสร้าง Antigen โดยเลือกเอาเฉพาะส่วนที่มีคุณสมบัติที่ดีที่สุดในการกระตุ้นระบบภูมิคุ้มกันที่เรียกว่า Epitope หรือ Antigenic determinant ไปแสดงไว้ที่ผิวเซลล์ โดยอาศัยโปรตีนบนผิวเซลล์ (Surface protein) ที่เรียกว่า Major histocompatibility complex (MHC) class II เป็นสื่อกลางให้ T cell (Helper T cell) มาจดจำภายหลังจากที่ Helper T cell มาตรวจพบ Epitope ของสิ่งแปลกปลอมแล้ว จะปล่อยสารที่สำคัญบางชนิดคือ Cytokines (Whyte, 2007) ออกมาเพื่อกระตุ้นให้กลุ่มของ APC มีการแบ่งเซลล์อย่างรวดเร็วและยังกระตุ้นให้ APC มีการตอบสนองได้อย่างมีประสิทธิภาพมากยิ่งขึ้นและบางส่วนยังมีการพัฒนาตัวไปเป็น Memory APC เพื่อการตอบสนองและจดจำ Antigen ตัวเดิมในครั้งต่อไป (Dixon and Stet, 2001)

Lymphocytes

Lymphocytes ที่พบในสัตว์ชั้นสูงสามารถแบ่งได้เป็น 2 กลุ่มใหญ่ ๆ ได้แก่ B และ T lymphocytes (B และ T cells) ในปลาถึงแม้ว่ายังไม่มีการพิสูจน์ได้ชัดเจนว่ามี B และ T cells อยู่จริง แต่จากการกระตุ้น Lymphocytes ของปลาด้วย Mitogen ซึ่งเป็นสารที่มีคุณสมบัติในการกระตุ้นให้ B และ T cell มีการแบ่งเซลล์แบบ Mitosis ในสัตว์ชั้นสูง ก็พบว่า Lymphocytes ของปลาก็มีการตอบสนองต่อสาร Mitogen ออกเป็นสองกลุ่ม เช่นเดียวกับในสัตว์ชั้นสูง จึงมีความเชื่อว่า Lymphocytes ของปลาน่าจะแบ่งออกเป็น B และ T cells เหมือนในสัตว์ชั้นสูงเช่นเดียวกัน (ประพันธ์ศักดิ์, 2547)

B cells

ในการตอบสนองภูมิคุ้มกันแบบจำเพาะเจาะจงนั้น B cell จะมีบทบาทสำคัญอย่างยิ่งในการสร้างสารที่ทำหน้าที่ในการจดจำและทำลายสิ่งแปลกปลอมที่เรียกว่า Antibody ซึ่ง B cell 1 ชนิด จะสามารถสร้าง Antibody ต่อ Antigen หรือ Epitope เพียงชนิดเดียวเท่านั้น เมื่อ B cell พบกับ Antigen ที่จำเพาะเจาะจงเป็นครั้งแรกจะมีที่รับ Antigen ที่จำเพาะอยู่บนผิว B cell นั่นก็คือ Antibody ชนิด IgM ที่อยู่ในรูป Membrane form ซึ่งจะเป็นตัวพา Antigen เข้าสู่เซลล์ และตกแต่ง Antigen เพื่อให้อยู่ในรูป Epitope ที่พร้อมจะกระตุ้นภูมิคุ้มกันโดยจะมี MHC class II เป็นตัวพา Epitope เหล่านี้ไปไว้ที่ผิวเซลล์ (Ollila and Vihinen, 2005) เมื่อ Helper T cell ที่มีความจำเพาะต่อ Epitope ชนิดนี้มาจับและตรวจพบก็จะหลั่งสารสำคัญหลายชนิดออกมา เช่น Interleukin II เพื่อทำให้ B cell มีการแบ่งเซลล์เพิ่มจำนวนอย่างรวดเร็ว (Proliferation) และมีการจำแนกตัวเอง (Differentiation) เพื่อกำหนดหน้าที่ในการสร้างชนิดของ Ig ที่จำเพาะและพัฒนาตัวเองไปเป็น Plasma B cell ที่สามารถสร้าง Antibody ในรูป Secreted form ออกไปสู่ระบบหมุนเวียนเลือดเพื่อตอบสนองต่อ Antigen ชนิดนั้น ๆ ในเลือดหรืออวัยวะอื่นที่มี Antigen ชนิดนั้นอยู่ (Kaiser *et al.*, 2004) นอกจากนี้ยังพบว่า B cell บางส่วนมีการพัฒนาตัวเองไปเป็น Memory B cell เพื่อจดจำและตอบสนองต่อ Antigen ตัวเดิมในครั้งต่อไป ซึ่งเรียกการตอบสนองของระบบภูมิคุ้มกันต่อ Antigen ในครั้งแรกนี้ว่า Primary immune response ผลของการตอบสนองจะมีการสร้าง Ig ออกมาในระดับที่ไม่มากนักและการตอบสนองจะเกิดค่อนข้างช้า แต่จะพบว่ามีการสร้างเซลล์ที่มีความจำเพื่อรองรับการเข้ามาอีกครั้งของ Antigen ชนิดเดิม

T cells

T cell ในสัตว์ชั้นสูงโดยทั่วไปแล้วแบ่งออกเป็น 3 ชนิดได้แก่ Helper T cell, Cytotoxic T cell และ Suppressor T cell แต่ชนิดที่เกี่ยวข้องกับการสร้าง Ig คือ Helper T cell เท่านั้น โดยจะทำหน้าที่จดจำ Epitope ของ Antigen ที่แสดงโดย MHC class II บนผิวเซลล์ของ B cell หลังจากตรวจพบ Epitope ที่จำเพาะแล้ว จะหลั่งสารจำพวก Cytokines ออกมาซึ่งจะมีผลทำให้ B cell เกิดการพัฒนาตัว จำแนกหน้าที่และผลิต Ig ออกมาในที่สุด Helper T cell จะสามารถจดจำต่อ Antigen ที่จำเพาะได้ จะต้องมียูบิควิตินซึ่งเป็นสารประกอบพวกโปรตีนที่เรียกว่า T cell receptor (TCR) ซึ่งจะจดจำอย่างจำเพาะเจาะจงกับ Antigen ชนิดใดชนิดหนึ่งโดยลำพังไม่ได้ TCR จะต้องจดจำโครงสร้างที่เป็น Complex ซึ่งเกิดจาก MHC class II ของ Antigen presenting cell ทั้งหลายกับ

Epitope โดยจะทำงานร่วมกันเป็นกลุ่มของเซลล์กลุ่มใดกลุ่มหนึ่งเท่านั้น ผลของการตอบสนองดังกล่าวยังทำให้ APC มีการหลั่งสารจำพวก Interleukin I ออกมา ซึ่งจะมีความสำคัญอย่างมากต่อการพัฒนาและความอยู่รอดของทั้ง B และ T cells (Klein and Horejsi, 1997)

2.2 การตอบสนองโดยผ่านเซลล์ (Cell-mediated immune response)

การตอบสนองประเภทนี้มีความสำคัญอย่างมากในกรณีที่มีการติดเชื้อภายในเซลล์ โดยเฉพาะอย่างยิ่งการติดเชื้อที่มีสาเหตุมาจากไวรัส โดยมี Cytotoxic T cell (T killer cell) และจะอาศัย MHC class I ซึ่งสามารถพบได้ในเซลล์ที่มีนิวเคลียสทุกชนิด เป็นตัวช่วยหรือสื่อกลางในการจดจำ โดยทั่วไปเมื่อเซลล์เกิดการติดเชื้อจากไวรัส ภายใน Cytoplasm ของเซลล์ที่ติดเชื้อ (Nakanishi *et al.*, 2002) นั้นจะมีกลไกในการตัดและตกแต่งอนุภาคของไวรัสให้อยู่ในรูปที่เป็น Epitope ที่เหมาะสมแล้วจะมี MHC class I มาจับอย่างจำเพาะเจาะจงเป็นรูป Complex แล้วจะนำ Epitope เหล่านั้นไปไว้บนผิวเซลล์ ของตัวเอง เพื่อบอกให้ Cytotoxic T cell ที่มี TCR ที่จำเพาะมาตรวจสอบ เมื่อได้รับการจดจำด้วย Cytotoxic T cell อย่างจำเพาะเจาะจงแล้ว Cytotoxic T cell จะหลั่งสารพิษออกมาเพื่อทำลายหรือฆ่าเซลล์ที่มี Epitope ของสิ่งแปลกปลอมหรือไวรัสอย่างจำเพาะเจาะจง ทำให้เซลล์ตายและมีผลต่อเนื่องให้ไวรัสที่อาศัยอยู่ในเซลล์ตายและไม่สามารถแพร่กระจายไปยังส่วนต่าง ๆ ของร่างกายได้ (Klein and Horejsi, 1997)

3. ภาวะที่ทำหน้าที่ในการตอบสนองทางภูมิคุ้มกันของปลา (Lymphoid tissue containing organ)

ในกลุ่มปลาโดยทั่วไปทั้งปลากระดูกแข็ง ปลากระดูกอ่อนและปลาปากกลม จัดเป็นกลุ่มสิ่งมีชีวิตที่มีกระดูกสันหลังที่ไม่มีไขกระดูก (Bone marrow) ซึ่งทำหน้าที่ในการผลิตเซลล์เม็ดเลือดอย่างเช่นในสัตว์ที่มีกระดูกสันหลังชั้นสูงอื่นๆ โดยกลุ่มของสิ่งมีชีวิตเหล่านี้จะมีการพัฒนาระบบการทำงานเพื่อใช้ในการตอบสนองทางระบบภูมิคุ้มกัน โดยอาศัยอวัยวะที่เรียกว่า Lymphoid tissue นี้ประกอบด้วย Reticular cell framework ที่ช่วยในกระบวนการที่เรียกว่า Migratory และ non-migratory cell population โดยเซลล์ที่อยู่ใน Lymphoid organ นี้จะประกอบไปด้วยกลุ่มเซลล์ที่ทำหน้าที่ในการตอบสนองทางภูมิคุ้มกันทั้งแบบจำเพาะ (Specific) และไม่จำเพาะเจาะจง (Non-specific) เซลล์ในกลุ่มนี้ที่สำคัญคือ Lymphocytes, monocytes, macrophages, granulocytes และ thrombocytes (Nakanishi, 1996) โดยอวัยวะหลักที่ทำหน้าที่เป็น Lymphoid organ ในปลาได้แก่

3.1 ไตส่วนหน้า (Head kidney)

ไตถือเป็นอวัยวะที่มีความสำคัญอย่างมากในกลุ่มของปลากระดูกแข็ง เนื่องจากเป็นอวัยวะที่มีความสำคัญในการตอบสนองทางภูมิคุ้มกัน โดยมีตำแหน่งอยู่ที่ผนังช่องท้อง (Body cavity) ติดกับกระดูกสันหลัง (Vertebra) ประกอบไปด้วย 2 ส่วนคือ ไตส่วนหน้า (Head kidney) และไตส่วนหลัง (Trunk kidney) โดยไตส่วนที่ทำหน้าที่โดยตรงในระบบภูมิคุ้มกันของปลา คือ ไตส่วนหน้าซึ่งจะมีรูปร่างลักษณะแตกต่างกันไปในปลาแต่ละชนิด เป็นอวัยวะที่มีความสำคัญในการผลิตเซลล์เม็ดเลือด (Haematopoietic organ) และมีหน้าที่คล้ายกับไขกระดูกในสัตว์มีกระดูกสันหลังชั้นสูง (Meseguer *et al.*, 1995) นอกจากนี้ยังเป็น Lymphoid organ ที่คล้ายคลึงกับ Lymph node ในสัตว์ชั้นสูงที่ใช้ในกระบวนการการตอบสนองทางภูมิคุ้มกัน (Kaattari and Irwin, 1985) และยังพบว่ามี Parenchyma cell แพร่กระจายอยู่ใน Sinusoids ที่พัฒนา และมีการเจริญของเซลล์ในกลุ่ม Stroma ที่เรียกว่า Reticulo-endothelial stroma ที่ประกอบด้วย Endothelial cell (lining the sinusoids), adventitial cells ที่ปกคลุม Abluminal surface ของ endothelial cells และ reticular cell ซึ่งทำหน้าที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการ Phagocytosis (Meseguer *et al.*, 1995) กลุ่มเซลล์ stroma มีบทบาทสำคัญในกระบวนการตอบสนองทางภูมิคุ้มกันแบบไม่จำเพาะเจาะจงและทำหน้าที่ในการกำจัดและการทำลายเศษซากของเซลล์ (Press and Evensen, 1999) นอกจากนี้ไตส่วนหน้ายังประกอบไปด้วย Sinusoidal macrophages และ endothelial cells ที่ช่วยในกระบวนการ Sinusoids participate โดยการจับกับเชื้อโรคและสิ่งแปลกปลอมในกระแสเลือด (Dannevig *et al.*, 1994) และ Renal portal ที่ทำหน้าที่เป็น Filtration bed สำหรับการเคลื่อนย้าย Blood-borne particle ดังนั้นไตส่วนหน้าจึงเป็นอวัยวะหลักที่ทำหน้าที่เป็นแหล่งสำหรับเซลล์ที่ทำหน้าที่ในการผลิต Antibody มาพัฒนาตัวเองและจะมี Melanomacrophage accumulation ซึ่งเป็นกลุ่มของเซลล์ Parenchyma ที่สามารถเก็บ Antigen ไว้ได้นาน จึงถือได้ว่าไตส่วนหน้าของปลาจัดเป็นอวัยวะที่สำคัญในการตอบสนองทางระบบภูมิคุ้มกันในสัตว์กลุ่มนี้ด้วย (Press and Evensen, 1999)

3.2 ม้าม (Spleen)

ม้ามจัดเป็นอวัยวะที่ทำหน้าที่ในการตอบสนองทางภูมิคุ้มกันในกลุ่มปลากระดูกแข็งอยู่ในบริเวณช่องท้องของปลามีลักษณะคล้ายกับเม็ดถั่วเขียวมีสีแดงหรือน้ำตาลเข้ม แบ่งออกเป็น 2 ส่วน คือ Red pulp ซึ่งเป็นบริเวณที่มีเม็ดเลือดแดงเป็นส่วนใหญ่ ประกอบไปด้วย Reticular cell network supporting blood-filled sinusoids นอกจากนี้ยังสามารถพบกลุ่มของเซลล์ Macrophage,

Lymphocytes และ Plasma cell และอีกส่วนหนึ่งคือ White pulp เป็นส่วนที่ถูกพัฒนาขึ้นแบบไม่สมบูรณ์ โดยแบ่งออกเป็นสองส่วนย่อย คือ Melanomacrophage accumulation และ ellipsoids ซึ่งเป็นที่อยู่ของกลุ่มเซลล์ Lymphocytes ต่าง ๆ โดยจะมี B lymphocytes อยู่รวมกันเป็นกระจุกเรียกว่า “Lymphoid follicles”

ที่ผ่านมาได้มีการศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาของม้ามในกลุ่มปลากระดูกแข็งหลายชนิดพบว่ามีความแตกต่างกันเล็กน้อย เช่น ในการศึกษาในปลากลุ่ม Non-salmonid พบว่ามีการรวมกันในส่วนที่เป็น Melanomacrophages ให้กลายเป็น Melanomacrophage center โดยจะถูกยึดจับด้วยเยื่อบาง ๆ ของ Argyrophilic capsule และล้อมรอบด้วย White pulp โดยเส้นเลือดขนาดเล็ก (Ellis *et al.*, 1989) ในขณะที่ปลาในกลุ่ม Salmon จะมีการสะสมของ Melanomacrophage อย่างชัดเจนแต่จะไม่มี Capsule และมีการรวมกันของเซลล์เม็ดเลือดและยังมีการรวมตัวกันของ Lymphocytes ชนิดต่าง ๆ อยู่ด้วย (Press and Evensen, 1999)

Melanomacrophage center ของม้ามเป็นศูนย์กลางหลักในการทำลายเซลล์เม็ดเลือดแดง (Erythrocyte) ที่เสื่อมสภาพหรือหมดอายุลงและเป็นศูนย์กลางของกระบวนการ Metabolic dumps นอกจากนี้ยังเป็นส่วนของอวัยวะในการตอบสนองทางระบบภูมิคุ้มกันที่มีต่อเชื้อโรคและสิ่งแปลกปลอมหรือ Germinal center คล้ายกับในสัตว์ชั้นสูง (Agius, 1980) นอกจากนี้ในส่วนของ Ellipsoids ยังทำหน้าที่ในกระบวนการ Plasma filtration และ trapping of blood-borne substance และเป็นศูนย์กลางของการตอบสนองทางภูมิคุ้มกันเช่นเดียวกัน (Espenes *et al.*, 1995) นอกจากนี้ม้ามยังถือได้ว่าเป็น Peripheral lymphoid organ ที่ใหญ่ที่สุด และสามารถกักเก็บ Antigen ที่ไหลเวียนเข้ามาทางกระแสเลือด ม้ามจึงเป็นอวัยวะสำคัญในการส่งเสริมการสร้าง Antibody และปล่อยออกสู่กระแสเลือดต่อไป (ฤทัย, 2539)

4. Cytokines and chemokines

จัดเป็นสารที่เกี่ยวข้องกับระบบภูมิคุ้มกันที่ถูกควบคุมโดยยีนในกลุ่ม Cytokines และ Chemokines ซึ่งสามารถจำแนกได้ทั้งสิ้น 6 ชนิด ได้แก่ CC chemokine 1, Ectodysplasin (Eda), Tumor necrosis factor ligand superfamily member 13B, Interleukin 1 β , Interleukin 8, Interleukin 16 และ Transforming growth factor β 1 ตามลำดับ (เอกพล, 2551) สารเหล่านี้ถือได้ว่าเป็นความสำคัญอย่างมากในการตอบสนองทางระบบภูมิคุ้มกันแบบ Innate และ Adaptive immunity

เนื่องจากถูกสร้างขึ้นและหลั่งโดยกลุ่มเซลล์ที่ทำหน้าที่เกี่ยวข้องกับภูมิคุ้มกันของร่างกาย เช่น Helper T cell, fibroblast, endothelial cell, keratinocyte และ macrophage เป็นต้น ซึ่งมีชื่อเรียกแตกต่างกันขึ้นอยู่กับเซลล์ที่ทำการผลิตขึ้น การออกฤทธิ์ของ Cytokines หรือ Chemokines นี้จะมีผลต่อเซลล์ข้างเคียงหรือเซลล์เดิมที่ผลิตขึ้นมา โดยมีความสำคัญต่อการพัฒนาตัว ความอยู่รอดและการทำงานร่วมกันของกลุ่มเซลล์เหล่านั้น (Secombes *et al.*, 1999) และยังสามารถกระตุ้นให้เซลล์เม็ดเลือดขาวเกิดการแบ่งตัวเพื่อตอบสนองได้อย่างมีประสิทธิภาพ นอกจากนี้ยังมีหน้าที่สำคัญในการควบคุมการเจริญเติบโต การเคลื่อนที่ การเปลี่ยนแปลงรูปร่างของเซลล์เม็ดเลือดขาวและเซลล์อื่น ๆ ที่เกี่ยวข้อง (Kaiser *et al.*, 2004)

Interleukin (IL) เป็น Cytokine กลุ่มหนึ่งที่มีการผลิตออกมาค่อนข้างมาก โดยพบจำนวนทั้งหมด 3 ชนิด คือ Interleukin 1 β (IL-1 β), interleukin 8 (IL-8) และ interleukin 16 (IL-16) ซึ่งมีหน้าที่หลักในการควบคุมการทำงานร่วมกันระหว่างเซลล์เม็ดเลือดขาวชนิดต่าง ๆ (Abbas *et al.*, 2000) โดย Interleukin 1 β ทำหน้าที่เป็น First line of defense ของการตอบสนองทางภูมิคุ้มกันแบบ Innate immunity และสามารถชักนำให้เกิดกระบวนการอักเสบ (Inflammation) และส่งเสริมให้มีการหลั่งสารที่เกี่ยวข้องในกระบวนการอักเสบเพิ่มมากขึ้น นอกจากนี้ยังเกี่ยวข้องกับกระบวนการตอบสนองทางภูมิคุ้มกันแบบเฉียบพลัน (Acute phase response) อีกด้วย โดยถูกสร้างจากเซลล์ในกลุ่ม Monocytes เป็นหลัก

Interleukin 8 มีบทบาทสำคัญในการกระตุ้นกลุ่มเซลล์ Neutrophils ให้เกิดการเคลื่อนที่มายังบริเวณที่มีการบุกรุกของเชื้อโรคและสิ่งแปลกปลอม รวมทั้งส่งเสริมกระบวนการ Chemotaxis, exocytosis และ respiratory burst (Baggiolini and Clark-Lewis, 1992) ซึ่ง IL-8 นี้ถูกผลิตขึ้นโดยเซลล์ในกลุ่มของ Monocytes/macrophages, fibroblast, keratinocytes และ endothelial cells เป็นต้น (Inoue *et al.*, 2003a) ปัจจุบันมีรายงานการศึกษาเกี่ยวกับ IL-8 กันอย่างกว้างขวาง ทั้งในสัตว์ชั้นสูงชนิดต่าง ๆ เช่น มนุษย์ รวมทั้งในกลุ่มของปลาโบราณ ชนิด Lamprey (*Lampetra fluviatilis*) (Najakshin *et al.*, 1999) ในปลากระดูกอ่อน ได้แก่ Silver chimera (*Chimaera phantasma*) (Inoue *et al.*, 2003a) และ Leopard shark (*Triakis scyllia*) (Inoue *et al.*, 2003b) และในกลุ่มของปลากระดูกแข็ง ได้แก่ Japanese flounder (*Paralichthys olivaceous*) (Lee *et al.*, 2001), Rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) (Laing *et al.*, 2002; Sangrador-Vegas *et al.*, 2002; Fujiki *et al.*, 2003) Channel catfish (*Ictalurus punctatus*) (Baoprasertkul *et al.*, 2004; Chen *et al.*, 2005) และ haddock (*Melanogrammus aeglefinus*) (Corripio-Miyar *et al.*, 2007)

Interleukin 16 (IL-16) มีความสำคัญในการกระตุ้นเซลล์เม็ดเลือดขาวชนิด Monocytes, dendritic cells และ fibroblasts (Mathy *et al.*, 2000) โดยเฉพาะอย่างยิ่งกระตุ้นให้ Helper T cell เกิดการเคลื่อนที่ ซึ่งเชื่อว่าเป็น T helper cell chemoattractant factor ที่สำคัญ (Gu *et al.*, 2008) ทั้งนี้เนื่องจากสามารถกระตุ้นการทำงานของกลุ่มเซลล์ T-cell, monocytes, macrophages และ dendritic cells ได้ (Center *et al.*, 1996) ข้อมูลการศึกษาเกี่ยวกับ IL-16 ในกลุ่มปลากระดูกแข็งนั้นมีน้อยมาก โดยพบรายงานในปลา Pufferfish (*Tetraodon nigroviridis*) (Wen *et al.*, 2006) และในปลานิล Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) (เอกพล, 2551) เท่านั้น

Transforming growth factor $\beta 1$ จัดเป็น Cytokine อีกชนิดที่มีบทบาทสำคัญต่อการเจริญเติบโตของเซลล์เม็ดเลือดขาวชนิด B cell โดย Cytokine ชนิดนี้พบว่าถูกสร้างขึ้นจากกลุ่มเซลล์ Platelets, activated macrophage และ T cell เป็นหลัก และมีรายงานว่า Cytokines ชนิดนี้ยังมีความสามารถในการยับยั้งการเจริญของ T cell และ B cell ได้อีกด้วย (Ichii *et al.*, 2008) นอกจากนี้ยังสามารถยับยั้งการแบ่งตัวของ B cell (Proliferation) เพื่อลดกระบวนการผลิต Immunoglobulin (Haddad *et al.*, 2008) ซึ่ง TGF $\beta 1$ นี้ยังสามารถยับยั้งกลุ่มของเซลล์ Macrophage ในการหลั่ง IL-1 รวมทั้งควบคุมการเจริญของเซลล์เนื้อเยื่อและกระบวนการตายแบบ Apoptosis อีกเช่นกัน (Filyak *et al.*, 2007)

Tumor necrosis factor จัดเป็น Cytokine อีกชนิดหนึ่งที่มีบทบาทสำคัญโดยจะมีส่วนในการทำให้เซลล์เกิดการแตกสลาย โดยเฉพาะอย่างยิ่ง Tumor cell นอกจากนี้ยังทำหน้าที่เป็นตัวกระตุ้นให้เกิดการตอบสนองทางภูมิคุ้มกันแบบ Acute inflammatory ต่อแบคทีเรียแกรมลบและการติดเชื้อโรคชนิดต่างๆ (Abbas *et al.*, 2000)

แมนแนนโอลิโกแซคคาไรด์

แมนแนนโอลิโกแซคคาไรด์เป็นองค์ประกอบในผนังเซลล์ยีสต์ชั้นนอก โดยพบในส่วน of แมนโนโปรตีน (Mannoprotein) ซึ่งทำหน้าที่ในการยึดเกาะองค์ประกอบต่าง ๆ ของผนังเซลล์ไว้คงอยู่ด้วยกัน ผนังเซลล์ยีสต์ประกอบด้วย เบต้า 1, 3 กลูแคน (β -1, 3 glucan) 50% เบต้า 1, 6 กลูแคน (β -1, 6 glucan) 10% แมนแนน (Mannan) 40% และ ไคติน (Chitin) 1-3% ซึ่งพบว่ากว่า 50-95% นั้นเป็นคาร์โบไฮเดรต (Lipke and Ovalle, 1998) ซึ่งเป็นพวกน้ำตาลแมนโนสเกาะเป็นกิ่งก้านอยู่ด้วยพันธะแอลฟา (α) โดยโครงสร้างหลักจะจับกันด้วยพันธะ α -1, 6 และจับกันด้วย

พันธะ α -1, 2 และ α -1, 3 เป็นแขนงยื่นออกไป (Walker, 1998) แมนแนนโอลิโกแซคคาไรด์มีชื่อทางการค้าหลายชื่อด้วยกัน เช่น Mycosob หรือ Bio-Mos ซึ่งสกัดได้จากผนังเซลล์ยีสต์ *Saccharomyces cerevisiae* ด้วยการนำเซลล์ยีสต์มาทำให้เกิดการแตกตัว (Lysed yeast culture) โดยวิธีการปั่นแยก (Sipring *et al.*, 2000) หรือโดยการใช้เอนไซม์ในการสกัด (Parodi, 1979) จากบางรายงานพบว่าใช้ α -mannosides ในการสกัด (Jones and Ballou, 1969) และในบางครั้งการสกัดกลูแคนจากยีสต์ก็ทำให้ได้แมนแนนโอลิโกแซคคาไรด์ออกมาพร้อมกันด้วย (Freimund *et al.*, 2003)

จากการศึกษาพบว่าแมนแนนโอลิโกแซคคาไรด์มีคุณสมบัติที่น่าสนใจต่อสิ่งมีชีวิตอยู่หลายประการ ดังการศึกษาในกลุ่มของสัตว์บกจากการอนุบาลลูกหมู (Miguel *et al.*, 2004) และลูกหมูที่เพิ่งหย่านม (White *et al.*, 2002) พบว่าการเสริมแมนแนนโอลิโกแซคคาไรด์ในอาหารส่งผลให้ลูกหมูมีน้ำหนักเพิ่มมากขึ้น และมีความแข็งแรงมากกว่าลูกหมูที่ไม่ได้รับการเสริมแมนแนนโอลิโกแซคคาไรด์ในอาหาร การศึกษาการเสริมแมนแนนโอลิโกแซคคาไรด์ในอาหารให้กับลูกวัว (Terre *et al.*, 2007) ไก่ (Vesna *et al.*, 2007) และไก่ทอง (Fritts and Waldroup, 2003) ก็ให้ผลการทดลองที่คล้ายกันกับการศึกษาในลูกหมู

นอกจากนี้แล้วยังพบว่าการเสริมแมนแนนโอลิโกแซคคาไรด์ในอาหารเลี้ยงเชื้อ *Bacillus licheniformis* ช่วยให้สร้างสารที่มีคุณสมบัติเป็นยาปฏิชีวนะ (Bacitracin) ได้มากขึ้น (Murphy *et al.*, 2007) รวมไปถึงช่วยลดระดับความเป็นพิษของสาร Aflatoxins (Baptista *et al.*, 2004) และมีความเกี่ยวข้องกับการควบคุมการตอบสนองทางระบบภูมิคุ้มกันอีกด้วย (Bland *et al.*, 2004)

บทบาทของแมนแนนโอลิโกแซคคาไรด์ต่อสัตว์น้ำ

Bogut *et al.* (2006) ได้ทดลองเสริมแมนแนนโอลิโกแซคคาไรด์ในอาหารปลา European sheatfish (*Silurus glanis*) พบว่าที่ระดับ 5 กรัม ต่ออาหาร 1 กิโลกรัม สามารถเพิ่มน้ำหนักและลดอัตราเปลี่ยนอาหารเป็นเนื้อ (FCR) รวมไปถึงลดอัตราการตายระหว่างการเลี้ยงได้

Torrecillas and Izquierdo (2006) รายงานว่าเมื่อเสริมแมนแนนโอลิโกแซคคาไรด์ที่ระดับ 6 กรัม ต่ออาหาร 1 กิโลกรัม สามารถช่วยเพิ่มอัตราการเจริญเติบโตของลูกปลา European seabass (*Dicentrarchus labrax*) ได้ 10% และมีการสะสมไขมันที่เซลล์ตับลดลง 5% เมื่อเปรียบเทียบกับ

ปลาชุดที่ไม่ได้รับอาหารที่เสริมแมนแนนโอลิโกแซคคาไรด์

Culjak *et al.* (2006) รายงานว่าการเสริมแมนแนนโอลิโกแซคคาไรด์ในอาหารที่ระดับความเข้มข้น 6 กรัม ต่ออาหาร 1 กิโลกรัมในลูกปลาไน (*Cyprinus carpio* L.) ส่งผลให้ลดอัตราการตายจาก 50% เหลือเพียง 16.7% และลดอัตราเปลี่ยนอาหารเป็นเนื้อจาก 2.06 เหลือ 1.60 อีกทั้งยังเพิ่มน้ำหนักได้ถึง 24%

Hossu *et al.* (2006) พบว่าการเสริมแมนแนนโอลิโกแซคคาไรด์ในอาหารปลากะรัง (*Sparus aurata*) ที่ระดับ 2 และ 4 กรัม ต่ออาหาร 1 กิโลกรัม สามารถช่วยเพิ่มน้ำหนัก และลดอัตราการตาย รวมไปถึงลดอัตราเปลี่ยนอาหารเป็นเนื้อลงได้

การศึกษาในปลาไน (*C. carpio* L.) และปลา Rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) ที่มีการเสริมแมนแนนโอลิโกแซคคาไรด์ที่ระดับความเข้มข้น 2 กรัม ต่ออาหาร 1 กิโลกรัม สามารถช่วยเพิ่มน้ำหนัก และลดอัตราการตาย รวมไปถึงลดอัตราเปลี่ยนอาหารเป็นเนื้อลงได้เช่นกัน (Staykov *et al.*, 2005a; 2005b; 2005c)

จากรายงานในปลาข้างเดียว (*Solea solea*) ที่ได้รับสารแมนแนนโอลิโกแซคคาไรด์ที่ระดับความเข้มข้น 4 กรัม ต่ออาหาร 1 กิโลกรัม พบว่ามีอัตราการตายลดลง 8% มีปริมาณของ Microvilli ที่ผนังลำไส้ส่วนต้นเพิ่มมากขึ้นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$) และมีสภาพค่อนข้างสมบูรณ์ไม่ฉีกขาด (Dimitroglou *et al.*, 2006) ซึ่งสอดคล้องกับการศึกษาของ AyÇe Gen *et al.* (2006) ในปลาดูกรัสเซีย (*Clarias gariepinus*) ซึ่งพบว่าการเสริมแมนแนนโอลิโกแซคคาไรด์ในอาหารสามารถปรับปรุงโครงสร้างของทางเดินอาหารบริเวณผนังลำไส้ ทำให้ Villi มีความแข็งแรงและมีพื้นที่ผิวในการดูดซึมอาหารเพิ่มมากขึ้น

Salze *et al.* (2008) ได้ศึกษาการเสริมแมนแนนโอลิโกแซคคาไรด์ในอาหารให้กับลูกปลา Cobia (*Rachycentron canadum*) พบว่าลูกปลาสามารถทนทานต่อการเปลี่ยนแปลงความเค็มได้ดี และมีปริมาณ Microvilli มากกว่าลูกปลาที่ไม่ได้รับการเสริมแมนแนนโอลิโกแซคคาไรด์ในอาหาร

รายงานถึงการศึกษาผลของการเสริมแมนแนนโอลิโกแซคคาไรด์ในอาหารปลาไน (*C. carpio* L.) และในปลาเทรา (O. mykiss) ต่อกิจกรรมการทำลายเชื้อแบคทีเรีย (Bactericidal activity)

ค่าแอนติบอดีไทเตอร์ (Antibody titres) ความเข้มข้นของไลโซไซม์ (Lysozyme concentration) (Lie, 1985), Alternative pathway of complement activity (Sotirov, 1986) และ Classical pathway of complement activation (Stelzar and Stein, 1971) พบว่ามีปริมาณสูงขึ้นเมื่อเทียบกับชุดการทดลองที่ไม่ได้มีการเสริมแมนแนนโอลิโกแซคคาไรด์ในอาหาร ซึ่งจากการศึกษาของ Staykov *et al.* (2007) ในปลา Rainbow trout ก็ให้ผลการทดลองในทำนองเดียวกัน

นอกจากนั้นแล้ว จากการศึกษาของ Torrecillas *et al.* (2007) ยังพบว่ากิจกรรมการจับกิน สิ่งแปลกปลอมของเซลล์เม็ดเลือดขาวบริเวณไตส่วนหน้าของปลากระรังที่ทดสอบกับเชื้อ *Vibrio alginolyticus* มีปริมาณสูงถึง 32.4% และ 26.9% เมื่อเลี้ยงด้วยอาหารเสริมแมนแนนโอลิโกแซคคาไรด์ที่ระดับความเข้มข้น 4 และ 2 กรัม ต่ออาหาร 1 กิโลกรัม ตามลำดับ เมื่อเปรียบเทียบกับชุดควบคุมที่มีเพียง 23.8% ซึ่งสอดคล้องกับระดับความเข้มข้นที่เหมาะสมต่อระบบภูมิคุ้มกันของปลา European seabass (*D. labrax*) คือที่ระดับ 2 และ 4 กรัม ต่ออาหาร 1 กิโลกรัม

Torrecillas *et al.* (2007) ให้เหตุผลบทบาทของแมนแนนโอลิโกแซคคาไรด์ต่อการเจริญเติบโตว่าอาจเกิดจากแมนแนนโอลิโกแซคคาไรด์ช่วยให้มีการดูดซึมกรดอะมิโนได้มากขึ้นซึ่งสอดคล้องกับการศึกษาในไก่ (Lji *et al.*, 2001) ว่าการเพิ่มปริมาณของแมนแนนโอลิโกแซคคาไรด์ในอาหารทำให้มีการดูดซึม L-tryptophan ได้มากขึ้นทั้งบริเวณลำไส้ส่วน Jejunal และ Ileal ซึ่ง L-tryptophan เป็นกรดอะมิโนที่เกี่ยวข้องกับการหลั่ง Serotonin ออกมาเพื่อทำให้ร่างกายรู้สึกผ่อนคลายหรือหลับไปในที่สุดทำให้มีการใช้พลังงานในร่างกายลดลง จากรายงานของ Torrecillas *et al.* (2010) พบว่าการเสริมแมนแนนโอลิโกแซคคาไรด์ในอาหารทำให้มีการสะสมไขมันที่ตับของปลา European sea bass ลดลงเนื่องจากทำให้การทำงานของเอนไซม์ acetyl-CoA carboxylase ที่ทำหน้าที่เร่งปฏิกิริยาในการเปลี่ยนกลูโคสให้เป็นกรดไขมันนั้นลดลง (Santoso *et al.*, 1995) ทำให้มีกลูโคสเป็นแหล่งพลังงานของกล้ามเนื้อและการนำสารอาหารไปใช้ในร่างกายเพื่อการเจริญเติบโตและการเสริมแมนแนนโอลิโกแซคคาไรด์ในอาหารช่วยเสริมให้ผนังลำไส้มีความสมบูรณ์จึงมีพื้นที่ในการดูดซึมอาหารได้มากขึ้น (Spring *et al.*, 2000; Shane, 2001)

อุปกรณ์และวิธีการ

อุปกรณ์

1. ลูกปลานิล (*Oreochromis niloticus*) ระยะเริ่มกินอาหาร (S 5) น้ำหนักประมาณ 0.013 กรัม จากสถานีวิจัยประมงกำแพงแสน มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์
2. ปลานิล (*O. niloticus*) น้ำหนักประมาณ 60-70 กรัม จากฟาร์มเอกชน
3. ตู้กระจกปริมาตร 100 ลิตร
4. โหลแก้วปริมาตร 10 ลิตร
5. เครื่องให้อากาศพร้อมอุปกรณ์
6. ตาชั่งมั่งฟ้า
7. อาหารกุ้งเบอร์ศูนย์
8. อาหารปลากินพืชเบอร์ 3
9. แม่นแนโนลิโกแซคคาไรด์ชนิดผง มีประสิทธิภาพในการออกฤทธิ์ 40%
10. น้ำมันปลาหมึก
11. อุปกรณ์การชั่ง-วัด (เครื่องชั่งทศนิยม 2 ตำแหน่ง, ไม้บรรทัด)
12. อุปกรณ์การผสมอาหาร (กระบอกลี้น้ำ, กระบอกตวง, กะละมัง, ถังมือ)
13. เครื่องผสมสาร (Vortex mixer)
14. อุปกรณ์ในการเชื่อมต่อเบคทีเรีย (ตะเกียงแอลกอฮอล์, Loop เชื้อเชื้อ, เข็มเชื้อเชื้อ และ แท่งแก้วสามเหลี่ยม)
15. เครื่องแก้วสำหรับการทดลอง (หลอดทดลอง, จานแก้ว, ปีกเกอร์, ขวดรูปชมพู่)
16. สารละลายโซเดียมคลอไรด์ 0.85% ที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว
17. อาหารเลี้ยงเชื้อ Brain Heart Infusion agar (BHIA)
18. อาหารเลี้ยงเชื้อ Brain Heart Infusion broth (BHIB)
19. อาหารเลี้ยงเชื้อ Tryptic soy agar (TSA)
20. อาหารเลี้ยงเชื้อ Tryptic soy broth (TSB)
21. อุปกรณ์ผ่าตัด
22. เครื่องนึ่งภายใต้ความดันสูง (Autoclave)
23. ตู้อบ (Oven)

24. ตู้บ่มเชื้อ (Incubator)
25. Water Bath Shaker ชนิดควบคุมอุณหภูมิ
26. เครื่องวัดการดูดกลืนคลื่นแสง (Spectrophotometer)
27. เครื่องปั่นเหวี่ยง (Centrifuge)
28. สไลด์
29. ชุดย้อมสีแกรม
30. กล้องจุลทรรศน์
31. เข็มฉีดยาเบอร์ 24G x 1.5 นิ้ว
32. กระบอกฉีดยาขนาด 1 ml
33. หลอดพลาสติกใส 15 ml (Cornicol tube)
34. Microtiter plate 96 well
35. Microcentrifuge tube
36. Automatic micropipette ขนาด 2, 10, 20, 200, 1000 ไมโครลิตร
37. Multi channel autopipette
38. Hemacytometer
39. เชื้อแบคทีเรีย *Streptococcus agalactiae* จากห้องปฏิบัติการสุขภาพสัตว์น้ำ
40. Heat-Killed yeast
41. เครื่อง Semi-automated microcell counter
42. อุปกรณ์และสารเคมีสำหรับเก็บตัวอย่างทำสไลด์เนื้อเยื่อ
 - ขวดเก็บตัวอย่าง
 - 10% Formalin
43. สารเคมีที่ใช้ในการเตรียมอาหารแปลงเพศสำหรับลูกปลานิล
 - 95% Ethanol
 - Hormone 17 α -methyltestosterone
44. สารเคมีที่ใช้ในการวิเคราะห์ค่า Antibody titer
 - Formalin-Killed vaccine

45. สารเคมีที่ใช้ในการศึกษากระบวนการจับกินสิ่งแปลกปลอม (Phagocytic activity) และ

Superoxide anion (O_2^-)

- Ethylene diamine tetraacetic acid, disodium salt dehydrate; EDTA
- RPMI Medium with HEPES + L-Glutamine
- Nitrotetrazolium blue chloride (NBT)
- Dimethyl sulfoxide (DMSO)
- Phosphate Buffered Saline (PBS)
- Lymphoprep
- 2N KOH
- Diff-Quick Staining
- 70% Methanol, 100% Methanol

46. อุปกรณ์และสารเคมีสำหรับงานทางด้านชีวโมเลกุล

- ตู้ -20 องศาเซลเซียส (Whirlpool)
- ตู้ -80 องศาเซลเซียส (Thermo Forma)
- ชุดเจลอิเล็กโตรโฟรีซิส (Bio-Rad)
- Power supply : Power PAC 3000 (Bio-Rad Laboratories, USA)
- White/UV transilluminator: UVP ImageStore 7500 (Mitsubishi Electric Corporation, Japan)
- Gel documentation
- Thermal cycle (Polymerase chain reaction; PCR) machine model TP600 (Takara Bio Inc.)
- เครื่องมือบดเนื้อเยื่อ (Ginder)
- ถังมือปลอดเชื้อ
- PCR tube
- Microwave oven (Sanyo Electric Co., Ltd.)
- Sodium chloride (NaCl) (Merck)
- ดีเอ็นเอมาตรฐาน 100 คู่เบส (Fermentas)
- Absolute ethanol (Merck)
- Ammonium persulfate (Bio basic Inc.)

- Chloroform (Fisher Scientific)
- Phenol (Merck)
- Tris (Tris-Borate EDTA) (Fisher Scientific)
- Ethidium bromide (Sigma)
- Diethyl pyrocarbonate; DEPC (Sigma)
- Formamide (BDH)
- Formaldehyde (BDH)
- 3-[N-morpholino] propane-sulfonic acid; MOPS (BIO BASIC INC.)
- Trizol reagent (Molecular Research Center) Isopropanol (Merck)
- RevertAid™ Firststrand cDNA synthesis kit (Fermentas)
- Loading dye (Fermentas)
- Gel star (Lonza)
- Agarose gel (Conda)

วิธีการ

การทดลองที่ 1 ศึกษาระดับที่เหมาะสมของแมนแนนโอลิโกแซคคาไรด์ต่อการเจริญเติบโต อัตรารอด และความต้านทานต่อเชื้อแบคทีเรีย *Streptococcus agalactiae* ของลูกปลานิล

1. การวางแผนการทดลอง

วางแผนการทดลองแบบสุ่มตลอด (Completely Randomized Design) โดยมี 4 ชุดการทดลอง (Treatment) ในแต่ละชุดการทดลองมี 3 ซ้ำ (Replication) ได้แก่

ชุดการทดลองที่ 1 ลูกปลานิลเลี้ยงด้วยอาหารกึ่งเบอร์ศูนย์ผสมฮอร์โมนเพศผู้ 17 α -methyltestosterone (17 α -MT) ในอัตรา 60 มิลลิกรัม ต่ออาหาร 1 กิโลกรัม

ชุดการทดลองที่ 2 ลูกปลานิลเลี้ยงด้วยอาหารกึ่งเบอร์ศูนย์ผสมฮอร์โมนเพศผู้ (17 α -MT) ในอัตรา 60 มิลลิกรัม ต่ออาหาร 1 กิโลกรัมและเมนแนน โอลิโกแซคคาไรด์ 2 กรัม ต่ออาหาร 1 กิโลกรัม

ชุดการทดลองที่ 3 ลูกปลานิลเลี้ยงด้วยอาหารกึ่งเบอร์ศูนย์ผสมฮอร์โมนเพศผู้ (17 α -MT) ในอัตรา 60 มิลลิกรัม ต่ออาหาร 1 กิโลกรัมและเมนแนน โอลิโกแซคคาไรด์ 4 กรัม ต่ออาหาร 1 กิโลกรัม

ชุดการทดลองที่ 4 ลูกปลานิลเลี้ยงด้วยอาหารกึ่งเบอร์ศูนย์ผสมฮอร์โมนเพศผู้ (17 α -MT) ในอัตรา 60 มิลลิกรัม ต่ออาหาร 1 กิโลกรัมและเมนแนน โอลิโกแซคคาไรด์ 6 กรัม ต่ออาหาร 1 กิโลกรัม

2. การเตรียมสัตว์ทดลอง

นำลูกปลานิลที่ถุงไข่แดงยุบแล้วโดยมีน้ำหนักเฉลี่ย 0.013 ± 0.001 กรัม (ระยะ S5) มาใส่ตู้ทดลองขนาด 100 ลิตร บรรจุน้ำจืดปริมาตร 80 ลิตร ปล่อยปลาในอัตราแตกต่างกัน 3 ระดับ ใช้ผ้าตาข่ายฟ้ายคลุมตู้เพื่อป้องกันสิ่งแปลกปลอมตกลงไปในตู้ระหว่างการทดลอง ให้อากาศอย่างเพียงพอตลอดการทดลอง ดูแลตะกอนและเปลี่ยนถ่ายน้ำทุกวัน ทำการทดลองแยกเป็น 3 ครั้ง โดยแต่ละครั้งใช้จำนวนลูกปลาในตู้ทดลองที่ 100, 200 และ 300 ตัว ตามลำดับ

3. อาหารและการให้อาหาร

ผสมฮอร์โมนเพศผู้ 17 α -methyl testosterone (17 α -MT) ในอัตรา 60 มิลลิกรัม ต่ออาหารกึ่งเบอร์ศูนย์ 1 กิโลกรัม ซึ่งเป็นระดับที่มีประสิทธิภาพในการแปลงเพศลูกปลานิลให้เป็นเพศผู้ได้ (ไพบุลย์ และณัฐพงษ์, 2547) โดยวิธีสเปรย์สารละลายฮอร์โมนลงบนอาหาร คลุกเคล้าให้เข้ากันแล้วนำไปผึ่งลมให้อาหารแห้ง จากนั้นจึงผสมเมนแนน โอลิโกแซคคาไรด์ในระดับความเข้มข้นที่ต่างกัน 3 ระดับ ตามระบุข้างต้น

บันทึกน้ำหนักอาหารเริ่มต้นของแต่ละชุดการทดลองเพื่อนำข้อมูลไปประกอบการศึกษาถึงผลของการเสริมเมนแนน โอลิโกแซคคาไรด์ในอาหารต่อการเจริญเติบโต เก็บอาหารในภาชนะ

พลาสติกปิดฝาให้สนิทในตู้เย็น ให้อาหารอนุบาลลูกปลาวันละ 5 มื้อ คือ 8.00 น. 10.00 น. 12.00 น. 14.00 น. และ 16.00 น. โดยในสัปดาห์แรกให้ในอัตรา 30% ของน้ำหนักตัว สัปดาห์ที่ 2 ให้ในอัตรา 20% ของน้ำหนักตัว และสัปดาห์ที่ 3 ให้ในอัตรา 15% ของน้ำหนักตัว เป็นระยะเวลาทั้งสิ้น 21 วัน

4. การศึกษาผลของการเสริมแมนแนน โอลิโกแซคคาไรด์ในอาหารต่อการเจริญเติบโตและอัตราการรอด

เมื่อครบกำหนดการอนุบาลเป็นระยะเวลา 21 วันแล้ว นับจำนวนปลาที่เหลือในทุก ๆ ชั่วโมงของทุกชุดการทดลองเพื่อคำนวณอัตราการรอด และสุ่มลูกปลาจากแต่ละชั่วโมงของทุกชุดการทดลองมาจำนวนชั่วโมงละ 30 ตัว ชั่งน้ำหนักและวัดความยาวและทำการประเมินอัตราการเจริญเติบโตต่อวัน (ADG) ชั่งน้ำหนักอาหารที่เหลือของแต่ละชุดการทดลองเพื่อนำไปคำนวณหาอัตราการเปลี่ยนอาหารเป็นเนื้อ (FCR) จากนั้นสุ่มลูกปลาจากแต่ละชุดการทดลองมาผ่าตัดเก็บอวัยวะภายในบริเวณลำไส้ส่วนต้นและตับ ใส่ขวดเก็บตัวอย่างที่มีสารละลาย 10% Formalin สำหรับการทำสไลด์เนื้อเยื่อถาวร เพื่อศึกษาถึงสภาพเนื้อเยื่อของลำไส้ส่วนต้นและตับของแต่ละชุดการทดลอง

5. การศึกษาผลของการเสริมแมนแนน โอลิโกแซคคาไรด์ในอาหารต่อความต้านทานโรค

5.1 เลี้ยงเชื้อ *Streptococcus agalactiae* ในอาหาร Brain Heart Infusion Broth ในหลอดทดลองปริมาตร 10 มิลลิลิตร เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นำเชื้อแบคทีเรียที่ได้มาปั่นล้างด้วยน้ำเกลือ 0.85% ที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว ที่ความเร็ว 2,000 รอบต่อนาที รอบละ 15 นาที ทั้งหมด 3 รอบ ทำการปรับความเข้มข้นของสารละลายแบคทีเรียให้มีปริมาณเซลล์แบคทีเรียประมาณ 10^9 เซลล์ต่อมิลลิลิตร โดยการวัดค่าการดูดกลืนคลื่นแสง (OD) เท่ากับ 0.3 ที่ช่วงความยาวคลื่น 560 นาโนเมตร นำสารละลายแบคทีเรียที่ได้ไปฉีดเข้าปลานิลขนาดประมาณ 30 กรัม ปริมาตร 0.2 มิลลิลิตร บริเวณช่องท้องเพื่อกระตุ้นความรุนแรงของเชื้อในการก่อโรค นำปลาที่ผ่านการฉีดเชื้อแบคทีเรียแล้วลงเลี้ยงในตู้ขนาด 100 ลิตร ให้อากาศตามปกติ สังเกตปลาที่เริ่มมีอาการของโรค และนำมาแยกเชื้อจากอวัยวะภายในบริเวณตับ ม้าม ไต และสมอง ด้วยวิธีปลอดเชื้อลงบนอาหาร Brain Heart Infusion Agar ปุ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นทำการแยกเชื้อให้บริสุทธิ์และทำการย้อมสีแกรมดูลักษณะ รูปร่างเซลล์ เพื่อยืนยันชนิดของแบคทีเรียที่ได้จากการแยก

5.2 เชื้อโคโลนีของเชื้อ *S. agalactiae* ที่แยกได้จากข้อ 5.1 ลงในอาหาร Brain Heart Infusion Broth ปริมาตร 200 มิลลิลิตร เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นำเชื้อแบคทีเรียที่ได้มาปั่นล้างด้วยน้ำเกลือ 0.85% ที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว ที่ความเร็ว 2,000 รอบต่อนาที รอบละ 15 นาที ทั้งหมด 3 รอบ และทำเป็นสารละลายแบคทีเรีย เพื่อทำการเลือกระดับความเข้มข้นของเชื้อ *S. agalactiae* ที่เหมาะสมสำหรับการทดลองจริง โดยเลือกระดับความเข้มข้นที่ทำให้ลูกปลานิลตายประมาณ 50% (LC_{50}) โดยวิธีการเข้ามาใช้ในการทดลอง

5.3 ทดสอบความสามารถในการต้านเชื้อโรคของลูกปลานิล เมื่อครบกำหนด 21 วันของการให้อาหารทดลอง นำลูกปลานิลจากแต่ละชุดการทดลองมาทดสอบความต้านทานเชื้อโรค โดยวิธีการแช่ลูกปลาจำนวน 30 ตัว ในน้ำปริมาตร 3 ลิตร ที่มีปริมาณความเข้มข้นของเชื้อ *S. agalactiae* ที่ได้ทำการทดสอบแล้วว่าเป็นระดับความเข้มข้นที่สามารถทำให้ลูกปลานิลตายถึง 50% จากข้อ 5.2 แช่ลูกปลานิลในน้ำที่มีเชื้อแบคทีเรียเป็นระยะเวลา 6 ชั่วโมง จากนั้นย้ายลูกปลาไปเลี้ยงในโหลแก้วที่มีน้ำอยู่ปริมาตร 8 ลิตร เป็นระยะเวลา 7 วัน เพื่อเปรียบเทียบอัตราการตายของปลาในแต่ละชุดการทดลอง

6. การวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ

วิเคราะห์ความแตกต่างระหว่างชุดการทดลองของข้อมูล น้ำหนัก ความยาว อัตรารอด อัตราการเปลี่ยนอาหารเป็นเนื้อ อัตราการเจริญเติบโตต่อวัน และอัตราการตายเมื่อสัมผัสเชื้อ โดยใช้วิธีวิเคราะห์ความแปรปรวน (Analysis of Variance) ตามแผนการทดลองแบบสุ่มตลอด (Completely Randomized Design) และเปรียบเทียบความแตกต่างของค่าเฉลี่ย โดยใช้วิธี Duncan's New Multiple Range Test (DMRT) (บุญอ้อม, 2550) ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์ ($\alpha=0.05$)

การทดลองที่ 2 ศึกษาในระดับที่เหมาะสมของแมนแนนโอลิโกแซคคาไรด์ต่อระบบภูมิคุ้มกันของปลานิล

การทดลองที่ 2.1 ศึกษาในระดับที่เหมาะสมของแมนแนนโอลิโกแซคคาไรด์ต่อระบบภูมิคุ้มกันแบบจำเพาะเจาะจงของปลานิล

1. การวางแผนการทดลอง

วางแผนการทดลองแบบสุ่มตลอด (Completely Randomized Design) โดยมี 4 ชุดการทดลอง (Treatment) ในแต่ละชุดการทดลองมี 3 ซ้ำ (Replication) ได้แก่

ชุดการทดลองที่ 1 ปลานิลเลี้ยงด้วยอาหารปลาอินพีช

ชุดการทดลองที่ 2 ปลานิลเลี้ยงด้วยอาหารปลาอินพีชผสมเมนแนน โอลิโกแซคคาไรด์ 2 กรัม ต่ออาหาร 1 กิโลกรัม

ชุดการทดลองที่ 3 ปลานิลเลี้ยงด้วยอาหารปลาอินพีชผสมเมนแนน โอลิโกแซคคาไรด์ 4 กรัม ต่ออาหาร 1 กิโลกรัม

ชุดการทดลองที่ 4 ปลานิลเลี้ยงด้วยอาหารปลาอินพีชผสมเมนแนน โอลิโกแซคคาไรด์ 6 กรัม ต่ออาหาร 1 กิโลกรัม

2. การเตรียมสัตว์ทดลอง

นำปลานิลน้ำหนักเฉลี่ยประมาณ 60-70 กรัม มาใส่ตู้ทดลองขนาด 100 ลิตร บรรจุน้ำจัดปริมาตร 80 ลิตร ตู้ละ 10 ตัว จำนวน 12 ตู้ ใช้ผ้าตาข่ายฟ้าคลุมตู้เพื่อป้องกันสิ่งแปลกปลอมตกลงไปในตู้ระหว่างการทดลอง ให้อากาศอย่างเพียงพอตลอดการทดลอง ดูแลตะกอนและเปลี่ยนถ่ายน้ำทุกวัน

3. อาหารและการให้อาหาร

ผสมเมนแนน โอลิโกแซคคาไรด์ในระดับความเข้มข้นที่ต่างกัน 3 ระดับ ตามระบุข้างต้นกับอาหารปลาอินพีช จากนั้นเคลือบด้วยน้ำมันปลาหมึก เมื่ออาหารแห้งดีแล้วจึงเก็บใส่ภาชนะที่ปิดมิดชิด บันทึกน้ำหนักอาหารเริ่มต้นของแต่ละชุดการทดลองเพื่อนำข้อมูลไปประกอบการศึกษาถึงผลของการเสริมเมนแนน โอลิโกแซคคาไรด์ในอาหารต่อการเจริญเติบโต ให้อาหารวันละ 2 มื้อ เช้า-เย็น ตลอดการทดลอง

4. การศึกษาค่า Antibody titer ของปลาไนล์

หลังจากให้อาหารผสมแมนแนน โอลิโกแซคคาไรด์เป็นเวลา 2 สัปดาห์ จะเริ่มทำการเก็บค่า Antibody titer ครั้งแรกก่อนการให้วัคซีน โดยขั้นตอนการเตรียมวัคซีนดังรายละเอียดในภาคผนวก เก็บค่า Antibody titer ทุกชุดการทดลอง ชุดการทดลองละ 10 ตัว จากนั้นทำการฉีดวัคซีนปริมาตร 0.3 มิลลิลิตร ให้กับปลาทุกตัวของชุดการทดลองที่ 1, 2, 3 และ 4 ซึ่งวิธีการคัดแปลงมาจากการศึกษาของภิรรัตน์ และคณะ (2550) จากนั้นจึงทำการเก็บค่า Antibody titer ต่อไปทุก ๆ สัปดาห์พร้อมกับชั่งน้ำหนักและวัดความยาว วิธีการตรวจวัดค่า Antibody titer คัดแปลงจากนิลอุบล และคณะ (2549) โดยวิธีการ Direct agglutination โดยการเจือจาง Serum แบบ Two-fold dilution ในสารละลายโซเดียมคลอไรด์ 0.85% ที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว โดยเจาะเลือดจากเส้นเลือดบริเวณใต้แนวกระดูกสันหลัง (Caudal vein) ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ใส่ Microcentrifuge tube แล้วนำไปปั่นที่ 2,500 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เพื่อให้เลือดแยกชั้น แล้วจึงดูด Serum ด้านบนมาใช้เติมสารละลายโซเดียมคลอไรด์ 0.85% ที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้วในหลุมที่ 2 ถึง 12 จำนวนหลุมละ 50 ไมโครลิตร จากนั้นนำ Serum ที่ได้มาเติมใน Microtiter plate 96 well โดยใส่ในหลุมที่ 1 และ 2 จำนวนหลุมละ 50 ไมโครลิตร ทำให้ในหลุมที่ 2 มีจำนวนปริมาตรรวม 100 ไมโครลิตร ผสมสารละลายในหลุมที่ 2 โดยใช้ Multi channel autopipette และทำการเจือจางสารละลายในหลุมที่ 2 โดยการดูดสารละลายจำนวนหลุมละ 50 ไมโครลิตร ไปใส่ในหลุมที่ 3 แล้วทำการดูดสารละลายในหลุมที่ 3 จำนวน 50 ไมโครลิตร ใส่ในหลุมที่ 4 ทำตามวิธีดังกล่าวนี้จนถึงหลุมสุดท้าย จึงดูดสารละลายในหลุมสุดท้ายทิ้งไป 50 ไมโครลิตร จากนั้นเติมสารละลาย Antigen ซึ่งในการทดลองคือ Formalin-killed vaccine ที่มีความเข้มข้น 10^9 CFU/ml ลงในทุก ๆ หลุม จำนวนหลุมละ 50 ไมโครลิตร ในการทดลองแต่ละครั้งปลา 1 ตัวจะตรวจหาค่า Antibody titer จำนวน 2 ซ้ำ โดย 1 ซ้ำเท่ากับ 1 แถวดังนั้นปลา 1 ตัว จะต้องใช้จำนวน Serum อย่างน้อย 200 ไมโครลิตร ปิดด้านบนของ Microtiter Plate ด้วย Parafilm เพื่อป้องกันการปนเปื้อนและการระเหยออกของสารละลาย บ่มในตู้บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เพื่อปล่อยให้เกิดการจับกันระหว่าง Antibody กับ Antigen เป็นเวลา 18 ชั่วโมง แล้วทำการอ่านผลเพื่อนำไปประกอบการวิเคราะห์ข้อมูล เมื่อค่า Antibody titer ของการให้วัคซีนครั้งแรกมีค่าลดลงจึงฉีดวัคซีนเพื่อกระตุ้นภูมิคุ้มกันอีกครั้งเป็นครั้งที่ 2 และทำการเก็บค่า Antibody titer ต่อไปตามวิธีข้างต้น

5. การวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ

วิเคราะห์ความแตกต่างของค่า Antibody titer ระหว่างชุดการทดลอง โดยใช้วิธีวิเคราะห์ความแปรปรวน (Analysis of Variance) ตามแผนการทดลองแบบสุ่มตลอด (Completely Randomized Design) และเปรียบเทียบความแตกต่างของค่าเฉลี่ย Antibody titer ในช่วงเวลาเดียวกัน โดยใช้วิธี Duncan's New Multiple Range Test (DMRT) (บุญอ้อม, 2550) ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซนต์ ($\alpha=0.05$)

การทดลองที่ 2.2 ศึกษาระดับที่เหมาะสมของแมนแนนโอลิโกแซคคาไรด์ต่อระบบภูมิคุ้มกันแบบไม่จำเพาะเจาะจงของปลานิล

1. การวางแผนการทดลอง

วางแผนการทดลองแบบสุ่มตลอด (Completely Randomized Design) โดยมี 4 ชุดการทดลอง (Treatment) ในแต่ละชุดการทดลองมี 3 ซ้ำ (Replication) ได้แก่

ชุดการทดลองที่ 1 ปลานิลเลี้ยงด้วยอาหารปลากินพืช

ชุดการทดลองที่ 2 ปลานิลเลี้ยงด้วยอาหารปลากินพืชผสมแมนแนนโอลิโกแซคคาไรด์ 2 กรัม ต่ออาหาร 1 กิโลกรัม

ชุดการทดลองที่ 3 ปลานิลเลี้ยงด้วยอาหารปลากินพืชผสมแมนแนนโอลิโกแซคคาไรด์ 4 กรัม ต่ออาหาร 1 กิโลกรัม

ชุดการทดลองที่ 4 ปลานิลเลี้ยงด้วยอาหารปลากินพืชผสมแมนแนนโอลิโกแซคคาไรด์ 6 กรัม ต่ออาหาร 1 กิโลกรัม

2. การเตรียมสัตว์ทดลอง

นำปลานิลน้ำหนักเฉลี่ยประมาณ 60-70 กรัม มาใส่ตู้ทดลองขนาด 100 ลิตร บรรจุน้ำจืด ปริมาตร 80 ลิตร ตู้ละ 10 ตัว จำนวน 12 ตู้ ใช้ผ้าตาข่ายฟากคลุมตู้เพื่อป้องกันสิ่งแปลกปลอมตกลงไปในตู้ระหว่างการทดลอง ให้อากาศอย่างเพียงพอตลอดการทดลอง ดูแลตะกอนและเปลี่ยนถ่ายน้ำทุกวัน

3. อาหารและการให้อาหาร

ผสมแมนแนนโอลิโกแซคคาไรด์ในระดับความเข้มข้นที่ต่างกัน 3 ระดับ ตามระบุข้างต้นกับอาหารปลากินพืช จากนั้นเคลือบด้วยน้ำมันปลาหมึก เมื่ออาหารแห้งดีแล้วจึงเก็บใส่ภาชนะที่มีดซิิด ให้อาหารวันละ 2 มื้อ เช้า-เย็น ตลอดการทดลองเป็นเวลา 50 วัน โดยให้อาหารทดลองนาน 30 วัน และให้อาหารปกติ 20 วัน

4. การศึกษาระบบภูมิคุ้มกันของปลานิล

ทำการสุ่มปลาทุก ๆ 10 วัน จนครบ 50 วัน จากแต่ละชุดการทดลอง ชุดละ 10 ตัว เจาะเลือดจาก Caudal vein ให้ได้ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ด้วยเข็มฉีดยาที่เคลือบด้วย EDTA เพื่อป้องกันการแข็งตัวของเลือด แบ่งเลือดที่เจาะได้ปริมาตร 0.1 มิลลิลิตร ใส่ Microcentrifuge tube เพื่อนำเลือดที่ได้ไปวิเคราะห์ค่าโลหิตวิทยา (Total red blood cells, Hematocrit, Hemoglobin และ Peripheral blood leukocytes) ด้วยเครื่อง Semi-automated microcell counter และใส่เลือดส่วนที่เหลือลงใน Cornicor tube ซึ่งภายในบรรจุอาหารเลี้ยงเซลล์เม็ดเลือด (RPMI Medium) (อัตราส่วนเลือดต่ออาหารเลี้ยงเซลล์เม็ดเลือดเท่ากับ 1:2) ผสมให้เข้ากันอย่างระมัดระวัง เพื่อนำเลือดไปศึกษากิจกรรมการจับกินสิ่งแปลกปลอมของเซลล์เม็ดเลือดขาว (Phagocytic activity) และ Superoxide anion (O_2^-) ตามขั้นตอน ดังนี้

4.1 การวิเคราะห์ค่าโลหิตวิทยา (Total red blood cells, Hematocrit, Hemoglobin และ Peripheral blood leukocytes)

นำเลือดใน Microcentrifuge tube มาตรวจวิเคราะห์ค่าโลหิตวิทยาโดยใช้เครื่อง

Semi-automated microcell counter ในการวิเคราะห์

4.2 การแยกเซลล์เม็ดเลือด

ผสมเลือดกับอาหารเลี้ยงเซลล์เม็ดเลือดที่อยู่ใน Cornicol tube ให้เข้ากันด้วยวิธีการเอียงหลอดเบา ๆ ใช้ Tip ปลายตัด คูดสารละลายเลือดทั้งหมด 3 มิลลิลิตร ใส่ใน Cornicol tube ที่มี Lymphoprep อยู่ 3 มิลลิลิตร (อัตราส่วนสารละลายเลือดกับ Lymphoprep เท่ากับ 1:1) อย่างระมัดระวังอย่าให้รวมชั้นกัน นำมาหมุนเหวี่ยงด้วยความเร็ว 3,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 20 นาที ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส คูดชั้นของเซลล์เม็ดเลือดขาวที่มีลักษณะขุ่นโดยใช้ Tip ปลายตัด ให้ได้ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ใส่ใน Cornicol tube ที่มีสารละลาย PBS อยู่ 1 มิลลิลิตร (อัตราส่วนเม็ดเลือดขาวกับสารละลาย PBS เท่ากับ 1:1) นำมาหมุนเหวี่ยงด้วยความเร็ว 1,500 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส คูดสารละลายส่วนบนทิ้งจากนั้นเติมสารละลาย PBS 1 มิลลิลิตร นำมาหมุนเหวี่ยงด้วยความเร็ว 1,500 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส ทำเช่นนี้ 2 รอบ เพื่อเป็นการทำความสะอาดเซลล์เม็ดเลือดขาว จากนั้นนำเซลล์เม็ดเลือดขาวที่ได้ไปนับด้วย Hemacytometer เพื่อคำนวณปริมาณเม็ดเลือดขาวเป็นจำนวนเซลล์ต่อมิลลิลิตร ดังรายละเอียดในภาคผนวก และปรับความเข้มข้นของเซลล์เม็ดเลือดให้มีความเข้มข้นเท่ากับ 10^6 เซลล์ต่อมิลลิลิตร เพื่อนำไปศึกษากิจกรรมการจับกินสิ่งแปลกปลอมของเซลล์เม็ดเลือดขาว (Phagocytic activity) ในข้อ 4.3 และ Superoxide anion (O_2^-) ในข้อ 4.4 ต่อไป

4.3 การศึกษากิจกรรมการจับกินสิ่งแปลกปลอมของเซลล์เม็ดเลือดขาว (Phagocytic activity)

การวิเคราะห์ดัดแปลงจากวิธีการของ Puangkaew *et al.* (2004) โดยแบ่งขั้นตอนดังนี้

4.3.1 หยดเซลล์เม็ดเลือดขาวที่ปรับความเข้มข้นแล้วปริมาตร 200 ไมโครลิตร ลงบน Cover slip ทิ้งไว้ 2 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เพื่อให้เซลล์เม็ดเลือดเกาะติดกับกระจกของ Cover slip

4.3.2 เตรียมสารละลายยีสต์ให้มีความเข้มข้นที่ 10^7 เซลล์ต่อมิลลิลิตร ด้วยการใส่สารละลายเซลล์ยีสต์ความเข้มข้นที่ 10^8 เซลล์ต่อมิลลิลิตร 70 ไมโครลิตรผสมกับ RPMI Medium

630 ไมโครลิตร (อัตราส่วนสารละลายเซลล์ยีสต์ความเข้มข้นที่ 10^8 เซลล์ต่อมิลลิลิตรกับ RPMI Medium เท่ากับ 1:9) ทิ้งไว้ 1 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส

4.3.3 เมื่อครบ 2 ชั่วโมงแล้ว ล้างเซลล์เม็ดเลือดขาวที่ไม่ยึดเกาะบนผิวของ Cover slip ด้วย RPMI Medium 3 ครั้ง จากนั้นเติมสารละลายยีสต์ที่เตรียมไว้ในข้อ 4.3.2 ลงไปบน Cover slip ที่มีเซลล์เม็ดเลือดขาวเกาะอยู่ 200 ไมโครลิตร ทิ้งไว้ 1 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส

4.3.4 เมื่อครบ 1 ชั่วโมงแล้ว ล้าง Cover slip ด้วย RPMI Medium 3 ครั้ง เพื่อขจัดเซลล์ที่ไม่ยึดเกาะและยีสต์ส่วนเกินออกไป แล้วย้อม Cover slip ด้วย Diff-Quick Staining ทิ้งให้แห้ง จากนั้นนำไปตรวจดูการจับกินสิ่งแปลกปลอมของเซลล์เม็ดเลือดขาวภายใต้กล้องจุลทรรศน์ โดยลุ่มนับเซลล์เม็ดเลือดขาวทั้งที่กินยีสต์และไม่กินยีสต์รวมทั้งหมด 200 เซลล์ ข้อมูลที่ได้นำไปคำนวณหาค่า Percent phagocytosis และ Phagocytic index โดยมีสูตรคำนวณ ดังนี้

$$\text{Phagocytosis (\%)} = \frac{\text{จำนวนเซลล์ที่จับกินยีสต์}}{\text{จำนวนเซลล์ที่นับทั้งหมด}} \times 100$$

$$\text{Phagocytic index} = \frac{\text{จำนวนเซลล์ที่จับกินยีสต์}}{\text{จำนวนเซลล์ที่นับทั้งหมด}} \times \frac{\text{จำนวนเซลล์ยีสต์ที่ถูกกินทั้งหมด}}{\text{จำนวนเซลล์ที่นับทั้งหมด}} \times 100$$

4.4 Superoxide anion (O_2^-)

การวิเคราะห์ตามวิธีการของ Christyapita *et al.* (2007) โดยหยดเซลล์เม็ดเลือดขาวที่ปรับความเข้มข้นแล้วจากข้อ 4.2 ปริมาตร 25 ไมโครลิตร ในหลุมของ Microtiter plate จากนั้นใส่ NBT 25 ไมโครลิตร ตามด้วย RPMI Medium 175 ไมโครลิตร ทิ้งไว้ 2 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส ดูดสารละลายส่วนบนทิ้งแล้วเติม 100% Methanol ทิ้งไว้ 5 นาที แล้วดูดออก ล้างหลุมด้วย 70% Methanol 125 ไมโครลิตร จำนวน 2 ครั้ง ดูดออกให้หมด จากนั้นปล่อยให้แห้ง แล้วเติม 2N KOH 125 ไมโครลิตร ตามด้วย DMSO 150 ไมโครลิตร นำไปวัดที่เครื่องวัดการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 650 นาโนเมตร โดยสารละลายมาตรฐานใช้สารเคมีเช่นเดียวกับตัวอย่างแต่แตกต่างตรงที่ไม่มีการเติมเซลล์เม็ดเลือดขาว จากนั้นนำค่าดูดกลืนแสงที่วัดได้ไปวิเคราะห์ทางสถิติต่อไป

5. การวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ

วิเคราะห์ความแตกต่างระหว่างชุดการทดลองของข้อมูล ค่าไลโปพeroxide (LPO) กิจกรรมการจับกินสิ่งแปลกปลอม (Phagocytosis และ Phagocytic index) และ Superoxide anion (O_2^-) (Reactive oxygen species (ROS) production) โดยใช้วิธีวิเคราะห์ความแปรปรวน (Analysis of Variance) ตามแผนการทดลองแบบสุ่มตลอด (Completely Randomized Design) และเปรียบเทียบความแตกต่างของค่าเฉลี่ย โดยใช้วิธี Duncan's New Multiple Range Test (DMRT) (บุญอ้อม, 2550) ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์ ($\alpha=0.05$)

การทดลองที่ 3 ศึกษาผลของแมนแนนโอลิโกแซคคาไรด์ต่อการแสดงออกของยีน Interleukin 1 β , Interleukin 8, Transforming growth factor β 1 และ Tumor necrosis factor α โดยใช้เทคนิค Semi-quantitative RT-PCR

1. การวางแผนการทดลอง

วางแผนการทดลองแบบสุ่มตลอด (Completely Randomized Design) โดยมี 4 ชุดการทดลอง (Treatment) ในแต่ละชุดการทดลองมี 3 ซ้ำ (Replication) ได้แก่

ชุดการทดลองที่ 1 ปลูกเลี้ยงด้วยอาหารปลาอินทรี

ชุดการทดลองที่ 2 ปลูกเลี้ยงด้วยอาหารปลาอินทรีผสมแมนแนนโอลิโกแซคคาไรด์ 2 กรัม ต่ออาหาร 1 กิโลกรัม

ชุดการทดลองที่ 3 ปลูกเลี้ยงด้วยอาหารปลาอินทรีผสมแมนแนนโอลิโกแซคคาไรด์ 4 กรัม ต่ออาหาร 1 กิโลกรัม

ชุดการทดลองที่ 4 ปลูกเลี้ยงด้วยอาหารปลาอินทรีผสมแมนแนนโอลิโกแซคคาไรด์ 6 กรัม ต่ออาหาร 1 กิโลกรัม

2. การเตรียมสัตว์ทดลอง

นำปลานิลน้ำหนักเฉลี่ยประมาณ 60-70 กรัม มาใส่ตู้ทดลองขนาด 100 ลิตร บรรจุน้ำจืด ปริมาตร 80 ลิตร ตู้ละ 10 ตัว จำนวน 12 ตู้ ใช้ผ้าตาข่ายฟากคลุมตู้เพื่อป้องกันสิ่งแปลกปลอมตกลงไปในตู้ระหว่างการทดลอง ให้อากาศอย่างเพียงพอตลอดการทดลอง ดูแลตะกอนและเปลี่ยนถ่ายน้ำทุกวัน

3. อาหารและการให้อาหาร

ผสมแมนแนน โอลิโกแซคคาไรด์ในระดับความเข้มข้นที่ต่างกัน 3 ระดับ ตามระบุข้างต้นกับอาหารปลากินพืช จากนั้นเคลือบทับด้วยน้ำมันปลาหมัก เมื่ออาหารแห้งดีแล้วจึงเก็บใส่ภาชนะที่มิดชิด ให้อาหารวันละ 2 มื้อ เช้า-เย็น ตลอดการทดลองเป็นเวลา 30 วัน

4. การเก็บตัวอย่างเนื้อเยื่อจากอวัยวะต่าง ๆ และการสกัด Total RNA

เมื่อปลานิลได้รับอาหารทดลองครบ 30 วัน ทำการสุ่มปลาจากทั้ง 4 ชุดการทดลอง ชุดการทดลองละ 4 ตัว เพื่อเก็บเนื้อเยื่อจากไตส่วนหน้าและม้าม อย่างละประมาณ 100 มิลลิกรัม จากนั้นทำการสกัด Total RNA โดยนำเนื้อเยื่อมาบดด้วย Trizol reagent (Molecular Research Center) ปริมาตร 1 มิลลิลิตร นำมาบ่มที่อุณหภูมิห้อง 5 นาที จากนั้นเติม Chloroform ปริมาตร 200 ไมโครลิตร บ่มที่อุณหภูมิห้อง 2-3 นาที และนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 12,000 xg ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที จากนั้นแยกส่วนใสซึ่งประกอบด้วย RNA ไปยังหลอด microcentrifuge tube ใหม่ จากนั้นเติม Isopropyl alcohol ปริมาตร 500 ไมโครลิตร เขย่าให้เข้ากัน ด้วยมือ บ่มที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 10 นาที นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 12,000 xg ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที จะเห็นตะกอนสีขาวของ RNA อยู่บริเวณก้นหลอด ล้างตะกอน RNA ด้วย 75% Ethanol ปริมาตร 1 มิลลิลิตรและเก็บที่อุณหภูมิ -80 องศาเซลเซียส จนกว่าจะนำมาใช้ การวัดคุณภาพของ RNA ทำได้โดยนำมาวัดค่าดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 260 นาโนเมตร และทำ Electrophoresis โดยใช้ 1% Formaldehyde-agarose gel

4.1 การวัดคุณภาพ Total RNA ด้วย Formaldehyde-agarose gel electrophoresis

เตรียมตัวอย่าง Total RNA ที่ได้จากอวัยวะต่าง ๆ โดยผสม Total RNA ปริมาตร 3.5 ไมโครลิตรจาก Total RNA ความเข้มข้น 10-20 ไมโครกรัมด้วย DEPC-treated water, 50% Formamide ปริมาตร 5 ไมโครลิตร, 2.2 M Formaldehyde ปริมาตร 2 ไมโครลิตร และ 10X MOPS ปริมาตร 1.5 ไมโครลิตร นำไปบ่มที่ 65 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 5 นาที จากนั้นนำไปแช่ในน้ำแข็งทันทีเป็นเวลา 10 นาที เติม 10X Formaldehyde gel loading buffer (50% Glycerol, 10 mM EDTA, pH 8.0, 0.25% (W/V) Bromophenol blue และ 0.25% (W/V) Xylene cyanol FF) ปริมาตร 3 ไมโครลิตร ลงไปในตัวอย่างแต่ละหลอด นำตัวอย่างไปแยก RNA บน 1% Formaldehyde-agarose gel ซึ่งอยู่ใน 1X MOPS (เจือจางด้วย 10X MOPS: 0.2 M MOP, pH 7.0, 20 mM Sodium acetate และ 10 mM EDTA) นำเจลที่ได้ไปย้อมด้วย Ethidium bromide (0.5 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร) เป็นเวลา 1 ชั่วโมงและนำมาส่องได้แสง UV ด้วยเครื่อง Gel documentation โดยสามารถพบแถบของ RNA 2 แถบอย่างชัดเจน คือ แถบของ 28S rRNA ซึ่งมีขนาดประมาณ 4.7 kb และ 18S rRNA ซึ่งมีขนาดประมาณ 1.9 kb และพบรอย Smear ด้านบนของแถบ RNA ซึ่งมีขนาดมากกว่า 10 kb แสดงว่า mRNA ที่สกัดได้มีคุณภาพดี ซึ่งเป็นสภาพที่เหมาะสมสำหรับการนำไปสังเคราะห์ First strand cDNA ต่อไป

4.2 การสังเคราะห์ First strand cDNA synthesis

นำ Total RNA ที่เก็บใน 75 % Ethanol มาทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเพื่อให้ละลาย จากนั้นนำไปเขย่าโดยใช้ Vortex mixture แล้วนำไปปั่นเหวี่ยงที่ 12,000 รอบต่อนาที จากนั้นดูด 75 % Ethanol ทิ้ง แล้วตากตะกอนที่อุณหภูมิห้องอย่างให้แห้งมาก เติม DEPC treated water ประมาณ 10 ไมโครลิตร ที่ละน้อยเพื่อให้ตะกอนละลายจนหมด ใช้ Automatic micropipette ดูด Total RNA มา 2 ไมโครลิตรผสมกับ DEPC treated water 68 ไมโครลิตรแล้วนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 260-280 นาโนเมตรซึ่งใช้ DEPC treated water เป็น Blank เมื่อได้ค่าความเข้มข้นของ Total RNA เป็นหน่วยไมโครกรัม/มิลลิลิตร จากนั้นใช้ Total RNA ที่สกัดได้จากแต่ละตัวอย่าง ความเข้มข้น 1 ไมโครกรัมมาสังเคราะห์ First strand cDNA โดยใช้ RevertAid™ Firststrand cDNA synthesis kit (Fermentas) เก็บไว้ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส จนกว่าจะนำไปใช้เพื่อเป็น DNA template ในการทำ RT-PCR ต่อไป

4.3 Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction (RT-PCR)

First strand cDNA ที่ได้จะใช้เป็น Template ในกระบวนการ PCR เพื่อหาปริมาณของ Magnesium chloride ($MgCl_2$) และจำนวนรอบ (Cycles) ของปฏิกิริยาที่เหมาะสมต่อการแสดงออกของยีนในไตส่วนหน้าและม้ามของปลาแต่ละชุดการทดลอง เพื่อนำไปใช้ในการทำ Semi-quantitative RT-PCR โดยใช้ Template ของปลาชุดควบคุมในการหาปฏิกิริยาที่เหมาะสม ซึ่งในการทำ PCR amplification ใช้ Gene-specific primers ของยีน Interleukin 1 β , Interleukin 8, Transforming growth factor β 1, Tumor necrosis factor α และ β actin โดยมีลำดับของนิวคลีโอไทด์ที่ใช้เป็น Gene-specific primers และขนาดของ PCR product ดังนี้

ตารางที่ 1 Gene specific primers เพื่อใช้ในการศึกษา RT-PCR

Gene name	Primer names	Sequences from 5' to 3'	PCR product size
Interleukin 1 β	IL-1b-F	5'- GTCAGTGACAGCCAAAAGAG -3'	339 bp
	IL-1b-R	5'- GACAGACATGAGAGTGCTGA -3'	
Interleukin 8	On-IL8 F	5'- CTGTCATGGTCTGCATCTC -3'	256 bp
	On-IL8 R	5'- GAGGAAGTGGTCTTCTGCT -3'	
Transforming growth factor β 1	TGF- β F	5'- CATAAGCCAACGGGTAC -3'	359 bp
	TGF- β R	5'- CCCCATGTCCACATTATC -3'	
Tumor necrosis factor α	TNF- α F	5'- CTGAGGCGAAGACTGTAGTT -3'	499 bp
	TNF- α R	5'- CTGCTTCCCATAGACTCTGA -3'	
β actin	BA-F1	5'- GGTCATCACCATTGGCAATG -3'	592 bp
	BA-R1	5'- ACTGAAGCCATGCCAATGAG -3'	

โดยมีปฏิกิริยาและสภาวะของปฏิกิริยาดังนี้

ตารางที่ 2 ส่วนผสมของปฏิกิริยา PCR เพื่อหาปริมาณของ Magnesium chloride ที่เหมาะสม

ส่วนผสมของปฏิกิริยา PCR	ปริมาณของ $MgCl_2$ (ไมโครลิตร)				
	1.0	1.5	2.0	3.0	4.0
DNA Template (ไมโครลิตร)	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5
10X <i>Taq</i> buffer (ไมโครลิตร)	2.5	2.5	2.5	2.5	2.5
2.5 mM dNTP (ไมโครลิตร)	2.0	2.0	2.0	2.0	2.0
10 μ M Forward primer (ไมโครลิตร)	2.5	2.5	2.5	2.5	2.5
10 μ M Reverse primer (ไมโครลิตร)	2.5	2.5	2.5	2.5	2.5
0.5 U/ μ l <i>Taq</i> DNA Polymerase (ไมโครลิตร)	0.3	0.3	0.3	0.3	0.3
25 mM $MgCl_2$ (ไมโครลิตร)	1.0	1.5	2.0	3.0	4.0
Distill water (ไมโครลิตร)	13.7	13.2	12.7	11.7	10.7
ปริมาตรรวม (ไมโครลิตร)	25	25	25	25	25

รอบของปฏิกิริยา

Pre-Denaturation	95°C	เป็นเวลา	5	นาที	} 25 รอบ
Denaturation	95°C	เป็นเวลา	30	วินาที	
Annealing	55 °C	เป็นเวลา	30	วินาที	
Extension	72 °C	เป็นเวลา	1	นาที	
Post-Extension	72 °C	เป็นเวลา	5	นาที	

จากนั้นนำ PCR product ทั้งหมดที่ได้มาตรวจสอบโดยวิธี Electrophoresis บน 1.5% Agarose gel ใน 1X TBE buffer ที่กำลังไฟฟ้า 100 โวลท์ ใช้ 100 bp DNA ladder เป็น DNA marker จากนั้นย้อมเจลด้วย Gel star (Lonza) และนำไปส่องไฟแสง UV ด้วยเครื่อง Gel documentation ใช้โปรแกรม SynGene Genetools version 3.08.01 ในการวิเคราะห์

นำปฏิกิริยาที่เลือก มาปรับจำนวนรอบในการทำปฏิกิริยาเพื่อหาจำนวนที่เหมาะสมในการทำกระบวนการ PCR ของแต่ละยีนในแต่ละอวัยวะ โดยจำนวนรอบที่ใช้ทดลองคือ 22, 25, 28, 32 และ 35 รอบ ตามลำดับ จากนั้นนำ PCR product ทั้งหมดที่ได้มาตรวจสอบโดยวิธี Electrophoresis บน 1.5% Agarose gel ใน 1X TBE buffer ที่กำลังไฟฟ้า 100 โวลท์ ใช้ 100 bp DNA ladder เป็น DNA marker จากนั้นย้อมเจลด้วย Gel star (Lonza) และนำไปส่องไฟแสง UV ด้วยเครื่อง Gel documentation ใช้โปรแกรม SynGene Genetools version 3.08.01 ในการวิเคราะห์ ได้ค่าที่เหมาะสมดังแสดงในตารางที่ 3

ตารางที่ 3 ปริมาตรของ $MgCl_2$ และจำนวนรอบในการทำ PCR ที่เหมาะสม

อวัยวะ	ยีน	ปริมาตรของ $MgCl_2$ (ไมโครลิตร)	รอบในการทำ PCR
ไตส่วนหน้า	Interleukin 1 β	1.0	25
	Interleukin 8	1.0	25
	Transforming growth factor β 1	1.5	25
	Tumor necrosis factor α	4.0	32
	β actin	2.0	25
ม้าม	Interleukin 1 β	4.0	22
	Interleukin 8	1.0	25
	Transforming growth factor β 1	2.0	25
	Tumor necrosis factor α	2.0	25
	β actin	1.5	25

4.4 Semi-quantitative RT-PCR

นำค่าของปฏิกิริยาที่เหมาะสมของแต่ละยีนในไตส่วนหน้าและม้ามที่ได้จากข้อ 4.2 มาทำกระบวนการ PCR โดยใช้ Template ของปลาจากทุกชุดการทดลองมาเปรียบเทียบกับชุดควบคุมชุดการทดลองละ 4 ซ้ำ จากนั้นนำ PCR product ทั้งหมดที่ได้มาตรวจสอบโดยวิธี Electrophoresis บน 1.5% Agarose gel ใน 1X TBE buffer ที่กำลังไฟฟ้า 100 โวลท์ ใช้ 100 bp DNA ladder เป็น DNA marker จากนั้นย้อมเจลด้วย Gel star (Lonza) และนำไปส่องไฟแสง UV ด้วยเครื่อง

Gel documentation ใช้โปรแกรม SynGene Genetools version 3.08.01 ในการวิเคราะห์ ทำการ Normalize ระดับการแสดงออกของยีนด้วยจำนวนของ β actin ค่าที่ได้ออกมาคือ relative fluorescence units/rfU (%) (Flach *et al.*, 1998) ดังสมการ

$$\text{relative fluorescence units (\%)} = \frac{\text{Raw volumn of target gene}}{\text{Raw volumn of } \beta \text{ actin}} \times 100$$

5. การวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ

ข้อมูลของการแสดงออกของยีน Interleukin 1 β , Interleukin 8, Transforming growth factor β 1, Tumor necrosis factor α จะแสดงในรูปของ Means $\pm$ standard deviation และความแตกต่างทางสถิติระหว่างกลุ่มจะวิเคราะห์ความแปรปรวนโดยใช้ One-way analysis of variance (ANOVA) และเปรียบเทียบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยโดยวิธี Duncan's New Multiple Range Test (DMRT) (บุญอ้อม, 2550) ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซนต์ ($\alpha=0.05$)

สถานที่และระยะเวลาทำการวิจัย

สถานที่ทำการวิจัย

ห้องปฏิบัติการสุขภาพสัตว์น้ำ ภาควิชาเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำ คณะประมง
มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตบางเขน

ระยะเวลาทำการวิจัย

เริ่มทำการทดลอง เดือนตุลาคม 2551 และ สิ้นสุดการทดลองในเดือนมกราคม 2553

ผลและวิจารณ์

ผลการทดลอง

การทดลองที่ 1 การศึกษาระดับที่เหมาะสมของแมนแนนโอลิโกแซคคาไรด์ต่อการเจริญเติบโต อัตรารอด และความต้านทานต่อเชื้อแบคทีเรีย *Streptococcus agalactiae* ของลูกปลานิล

เมื่อครบกำหนดการอนุบาลเป็นระยะเวลา 21 วันแล้ว นับจำนวนปลาที่เหลือในทุก ๆ ชั่วโมง ของทุกชุดการทดลองเพื่อคำนวณอัตรารอด และสุ่มลูกปลาจากแต่ละชั่วโมงของทุกชุดการทดลองมา จำนวนชั่วโมงละ 30 ตัว ชั่งน้ำหนักและวัดความยาว ประเมินอัตราการเจริญเติบโตต่อวัน (ADG) ชั่งน้ำหนักอาหารที่เหลือของแต่ละชุดการทดลองเพื่อนำไปคำนวณหาอัตราการเปลี่ยนอาหาร เป็นเนื้อ (FCR) จากนั้นสุ่มลูกปลาจากแต่ละชุดการทดลองมาผ่าตัดเก็บอวัยวะภายในบริเวณลำไส้ ส่วนต้นและตับ ใส่ขวดเก็บตัวอย่างที่มีสารละลาย 10% Formalin ส่งตัวอย่างนำไปทำสไลด์เนื้อเยื่อ ถาวร เพื่อศึกษาถึงสภาพเนื้อเยื่อของลำไส้ส่วนต้นและตับของแต่ละชุดการทดลอง ทดสอบ ความสามารถในการต้านเชื้อโรคของลูกปลานิล โดยวิธีการแช่ลูกปลาจำนวน 30 ตัว ในน้ำปริมาตร 3 ลิตร ที่มีปริมาณความเข้มข้นของเชื้อ *S. agalactiae* ที่ 10^8 CFU/ml เป็นระยะเวลา 6 ชั่วโมง จากนั้นย้ายลูกปลาไปเลี้ยงในโหลแก้วที่มีน้ำอยู่ปริมาตร 8 ลิตร เป็นระยะเวลา 7 วัน เพื่อ เปรียบเทียบอัตราการตายของปลาในแต่ละชุดการทดลอง ได้ผลดังนี้

1.1 อัตรารอด

หลังจากให้อาหารผสมแมนแนนโอลิโกแซคคาไรด์ในแต่ละชุดการทดลองเป็น ระยะเวลา 21 วัน พบว่าอัตรารอดเฉลี่ยของลูกปลานิลแปลงเพศที่ทุกอัตราการปล่อยไม่มีความ แตกต่างกันทางสถิติ ($P>0.05$) ระหว่างชุดควบคุมและชุดทดลอง ดังแสดงในตารางที่ 4 และ ภาพที่ 1

ตารางที่ 4 อัตรารอดของลูกปลานิลแปลงเพศหลังได้รับอาหารเสริมแมนแนนโอลิโกแซคคาไรด์เป็นเวลา 21 วัน ที่อัตราปล่อย 100, 200 และ 300 ตัว/ตู้

ชุดการทดลอง	อัตรารอดลูกปลานิลแปลงเพศของแต่ละอัตราปล่อย (เปอร์เซ็นต์)		
	100 (ตัว/ตู้)	200 (ตัว/ตู้)	300 (ตัว/ตู้)
ชุดการทดลองที่ 1	89.67±9.07	92.33±6.83	92.00±5.48
ชุดการทดลองที่ 2	94.00±10.39	94.00±6.26	92.56±2.45
ชุดการทดลองที่ 3	95.67±3.21	95.00±5.89	96.78±3.98
ชุดการทดลองที่ 4	96.33±6.35	95.33±8.08	98.22±2.80

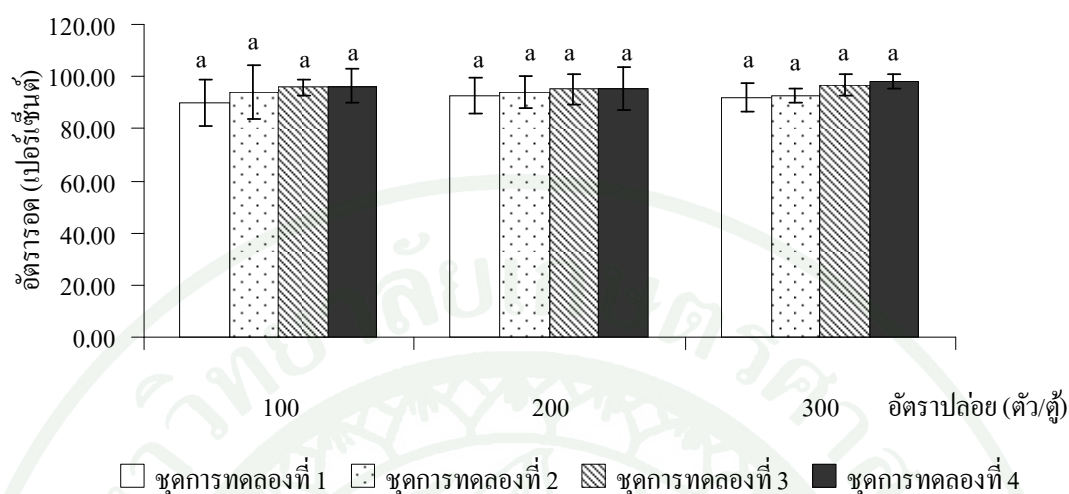
หมายเหตุ ไม่พบความแตกต่างทางสถิติ ($P>0.05$) ของค่าเฉลี่ยในแนวตั้ง

ชุดการทดลองที่ 1 ลูกปลานิลเลี้ยงด้วยอาหารกึ่งเบอร์ศูนย์ผสมฮอร์โมนเพศผู้ 17 α -methyltestosterone (17 α -MT) ในอัตรา 60 มิลลิกรัมต่ออาหาร 1 กิโลกรัม (ชุดควบคุม)

ชุดการทดลองที่ 2 ลูกปลานิลเลี้ยงด้วยอาหารกึ่งเบอร์ศูนย์ผสมฮอร์โมนเพศผู้ (17 α -MT) ในอัตรา 60 มิลลิกรัม ต่ออาหาร 1 กิโลกรัมผสมแมนแนนโอลิโกแซคคาไรด์ 2 กรัม ต่ออาหาร 1 กิโลกรัม

ชุดการทดลองที่ 3 ลูกปลานิลเลี้ยงด้วยอาหารกึ่งเบอร์ศูนย์ผสมฮอร์โมนเพศผู้ (17 α -MT) ในอัตรา 60 มิลลิกรัม ต่ออาหาร 1 กิโลกรัมผสมแมนแนนโอลิโกแซคคาไรด์ 4 กรัม ต่ออาหาร 1 กิโลกรัม

ชุดการทดลองที่ 4 ลูกปลานิลเลี้ยงด้วยอาหารกึ่งเบอร์ศูนย์ผสมฮอร์โมนเพศผู้ (17 α -MT) ในอัตรา 60 มิลลิกรัม ต่ออาหาร 1 กิโลกรัมผสมแมนแนนโอลิโกแซคคาไรด์ 6 กรัม ต่ออาหาร 1 กิโลกรัม



ภาพที่ 1 อัตรารอดเฉลี่ยของลูกปลานิลแปลงเพศหลังได้รับอาหารเสริมแมนแนน โอลิโกแซคคาไรด์เป็นระยะเวลา 21 วัน

1.2 น้ำหนัก

หลังจากให้อาหารผสมแมนแนน โอลิโกแซคคาไรด์ในแต่ละชุดการทดลองเป็นระยะเวลา 21 วัน พบว่าที่อัตรารอด 100 ตัว/ตู้ น้ำหนักเฉลี่ยของลูกปลานิลแปลงเพศชุดควบคุมกับชุดที่ได้รับการเสริมแมนแนน โอลิโกแซคคาไรด์ในอาหารที่ระดับ 2 กรัม ต่ออาหาร 1 กิโลกรัม ไม่แตกต่างกันทางสถิติ ($P > 0.05$) คือ 0.78 ± 0.16 และ 0.79 ± 0.19 กรัม ตามลำดับ ในขณะที่ชุดการทดลองที่ได้รับการเสริมแมนแนน โอลิโกแซคคาไรด์ในอาหารที่ระดับ 4 กรัม และ 6 กรัม ต่ออาหาร 1 กิโลกรัม มีผลทำให้ลูกปลานิลแปลงเพศมีน้ำหนักเฉลี่ยมากกว่าชุดควบคุมและชุดที่ได้รับการเสริมแมนแนน โอลิโกแซคคาไรด์ในอาหารที่ระดับ 2 กรัม ต่ออาหาร 1 กิโลกรัม อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$) คือ 0.85 ± 0.20 และ 0.90 ± 0.19 กรัม ตามลำดับ เมื่อพิจารณาน้ำหนักเฉลี่ยของลูกปลานิลแปลงเพศที่อัตรารอด 200 และ 300 ตัว/ตู้ พบว่าน้ำหนักเฉลี่ยของลูกปลานิลแปลงเพศชุดควบคุม กับชุดที่ได้รับการเสริมแมนแนน โอลิโกแซคคาไรด์ในอาหารที่ระดับ 2 กรัม ต่ออาหาร 1 กิโลกรัม ไม่แตกต่างกันทางสถิติ ($P > 0.05$) คือ 0.49 ± 0.10 , 0.50 ± 0.11 , 0.41 ± 0.11 และ 0.43 ± 0.18 กรัม ตามลำดับ สำหรับชุดการทดลองที่ได้รับการเสริมแมนแนน โอลิโกแซคคาไรด์ในอาหารที่ระดับ 4 กรัม และ 6 กรัม ต่ออาหาร 1 กิโลกรัม มีผลทำให้ลูกปลานิลแปลงเพศมีน้ำหนักเฉลี่ยมากกว่า

ชุดควบคุมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$) คือ 0.52 ± 0.10 , 0.53 ± 0.13 , 0.46 ± 0.15 และ 0.48 ± 0.13 กรัม ตามลำดับ แต่ไม่พบความแตกต่างทางสถิติ ($P > 0.05$) ระหว่างน้ำหนักเฉลี่ยของลูกปลานิลแปลงเพศที่ได้รับการเสริมเมนแนน โอลิโกแซคคาไรด์ในอาหารที่ระดับ 2, 4 และ 6 กรัม ต่ออาหาร 1 กิโลกรัม (ตารางที่ 5 และภาพที่ 2)

ตารางที่ 5 น้ำหนักเฉลี่ยของลูกปลานิลแปลงเพศหลังได้รับอาหารเสริมเมนแนน โอลิโกแซคคาไรด์เป็นเวลา 21 วัน ที่อัตราปล่อย 100, 200 และ 300 ตัว/ตู้

ชุดการทดลอง	น้ำหนักเฉลี่ยลูกปลานิลแปลงเพศของแต่ละอัตราปล่อย (กรัม)		
	100 (ตัว/ตู้)	200 (ตัว/ตู้)	300 (ตัว/ตู้)
ชุดการทดลองที่ 1	0.78 ± 0.16^a	0.49 ± 0.10^a	0.41 ± 0.11^a
ชุดการทดลองที่ 2	0.79 ± 0.19^a	0.50 ± 0.11^{ab}	0.43 ± 0.18^{ab}
ชุดการทดลองที่ 3	0.85 ± 0.20^b	0.52 ± 0.10^b	0.46 ± 0.15^b
ชุดการทดลองที่ 4	0.90 ± 0.19^b	0.53 ± 0.13^b	0.48 ± 0.13^b

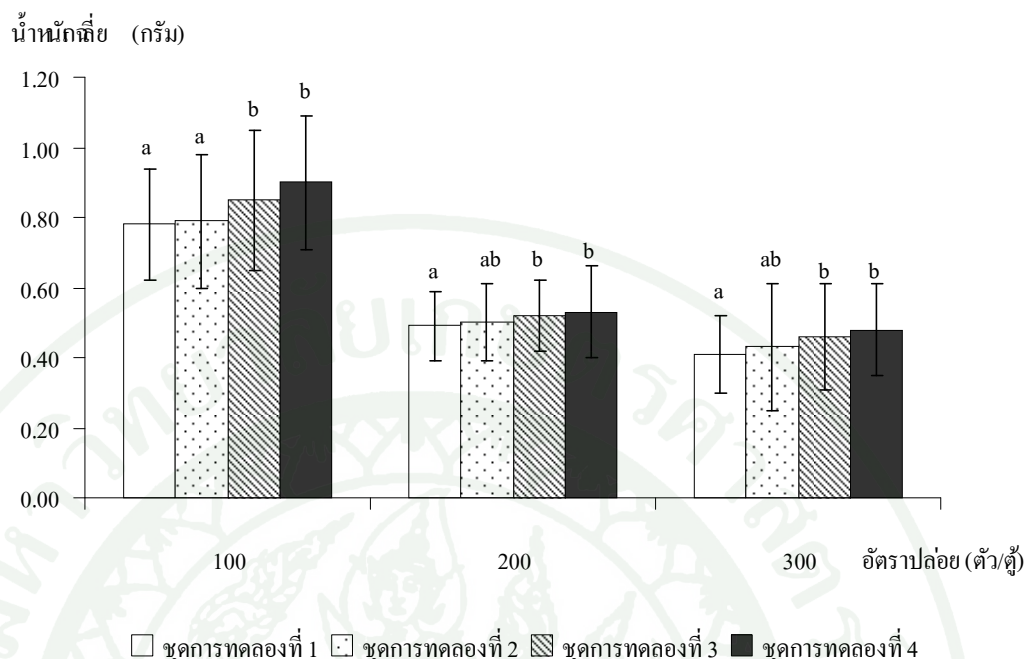
หมายเหตุ ค่าเฉลี่ยกำกับด้วยอักษรที่ต่างกันในแนวตั้ง มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$)

ชุดการทดลองที่ 1 ลูกปลานิลเลี้ยงด้วยอาหารกึ่งเบอร์ศูนย์ผสมฮอร์โมนเพศผู้ 17 α -methyltestosterone (17 α -MT) ในอัตรา 60 มิลลิกรัมต่ออาหาร 1 กิโลกรัม (ชุดควบคุม)

ชุดการทดลองที่ 2 ลูกปลานิลเลี้ยงด้วยอาหารกึ่งเบอร์ศูนย์ผสมฮอร์โมนเพศผู้ (17 α -MT) ในอัตรา 60 มิลลิกรัม ต่ออาหาร 1 กิโลกรัมผสมเมนแนน โอลิโกแซคคาไรด์ 2 กรัม ต่ออาหาร 1 กิโลกรัม

ชุดการทดลองที่ 3 ลูกปลานิลเลี้ยงด้วยอาหารกึ่งเบอร์ศูนย์ผสมฮอร์โมนเพศผู้ (17 α -MT) ในอัตรา 60 มิลลิกรัม ต่ออาหาร 1 กิโลกรัมผสมเมนแนน โอลิโกแซคคาไรด์ 4 กรัม ต่ออาหาร 1 กิโลกรัม

ชุดการทดลองที่ 4 ลูกปลานิลเลี้ยงด้วยอาหารกึ่งเบอร์ศูนย์ผสมฮอร์โมนเพศผู้ (17 α -MT) ในอัตรา 60 มิลลิกรัม ต่ออาหาร 1 กิโลกรัมผสมเมนแนน โอลิโกแซคคาไรด์ 6 กรัม ต่ออาหาร 1 กิโลกรัม



ภาพที่ 2 น้ำหนักเฉลี่ยของลูกปลานิลแปลงเพศหลังได้รับอาหารเสริมแมนแนนโอลิโกแซคคาไรด์ เป็นระยะเวลา 21 วัน

1.3 ความยาวมาตรฐาน

หลังจากให้อาหารผสมแมนแนนโอลิโกแซคคาไรด์ในแต่ละชุดการทดลองเป็นระยะเวลา 21 วัน พบว่าที่อัตราปล่อย 100 ตัว/ตู้ ความยาวมาตรฐานเฉลี่ยของลูกปลานิลแปลงเพศชุดควบคุมกับชุดที่ได้รับการเสริมแมนแนนโอลิโกแซคคาไรด์ในอาหารที่ระดับ 2 กรัม ต่ออาหาร 1 กิโลกรัม ไม่แตกต่างกันทางสถิติ ($P>0.05$) คือ 2.86 ± 0.24 และ 2.88 ± 0.20 เซนติเมตร ตามลำดับ ในขณะที่ชุดการทดลองที่ได้รับการเสริมแมนแนนโอลิโกแซคคาไรด์ในอาหารที่ระดับ 4 กรัม และ 6 กรัม ต่ออาหาร 1 กิโลกรัม มีผลทำให้ลูกปลานิลแปลงเพศมีความยาวมาตรฐานเฉลี่ยมากกว่าชุดควบคุมและชุดที่ได้รับการเสริมแมนแนนโอลิโกแซคคาไรด์ในอาหารที่ระดับ 2 กรัม ต่ออาหาร 1 กิโลกรัมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.05$) คือ 2.96 ± 0.25 และ 3.03 ± 0.22 เซนติเมตร ตามลำดับ เมื่อพิจารณาความยาวมาตรฐานเฉลี่ยของลูกปลานิลแปลงเพศที่อัตราปล่อย 200 และ 300 ตัว/ตู้ พบว่าความยาวมาตรฐานเฉลี่ยของลูกปลานิลแปลงเพศชุดควบคุมกับชุดการทดลองที่ได้รับการเสริม แมนแนน โอลิโกแซคคาไรด์ในอาหารที่ระดับ 2 กรัม ต่ออาหาร 1 กิโลกรัม ไม่แตกต่างกันทางสถิติ ($P>0.05$) คือ 2.44 ± 0.19 , 2.49 ± 0.23 , 2.24 ± 0.40 และ 2.32 ± 0.24 เซนติเมตร ตามลำดับ

สำหรับชุดการทดลองที่ได้รับการเสริมเมนแนนโอลิโกแซคคาไรด์ในอาหารที่ระดับ 4 กรัม และ 6 กรัม ต่ออาหาร 1 กิโลกรัม มีผลทำให้ลูกปลานิลแปลงเพศมีความยาวมาตรฐานเฉลี่ยมากกว่าชุดควบคุมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$) คือ 2.51 ± 0.19 , 2.53 ± 0.20 , 2.33 ± 0.27 และ 2.40 ± 0.23 เซนติเมตร ตามลำดับ แต่ไม่พบความแตกต่างทางสถิติ ($P > 0.05$) ระหว่างความยาวมาตรฐานเฉลี่ยของลูกปลานิลแปลงเพศที่ได้รับการเสริมเมนแนนโอลิโกแซคคาไรด์ในอาหารที่ระดับ 2, 4 และ 6 กรัม ต่ออาหาร 1 กิโลกรัม (ตารางที่ 6 และภาพที่ 3)

ตารางที่ 6 ความยาวมาตรฐานเฉลี่ยของลูกปลานิลแปลงเพศหลังได้รับอาหารเสริมเมนแนนโอลิโกแซคคาไรด์เป็นเวลา 21 วัน ที่อัตราปล่อย 100, 200 และ 300 ตัว/ตู้

ชุดการทดลอง	ความยาวมาตรฐานเฉลี่ยของลูกปลานิลแปลงเพศ ของแต่ละอัตราปล่อย (เซนติเมตร)		
	100 (ตัว/ตู้)	200 (ตัว/ตู้)	300 (ตัว/ตู้)
ชุดการทดลองที่ 1	2.86 ± 0.24^a	2.44 ± 0.19^a	2.24 ± 0.40^a
ชุดการทดลองที่ 2	2.88 ± 0.20^a	2.49 ± 0.23^{ab}	2.32 ± 0.24^{ab}
ชุดการทดลองที่ 3	2.96 ± 0.25^b	2.51 ± 0.19^b	2.33 ± 0.27^b
ชุดการทดลองที่ 4	3.03 ± 0.22^b	2.53 ± 0.20^b	2.40 ± 0.23^b

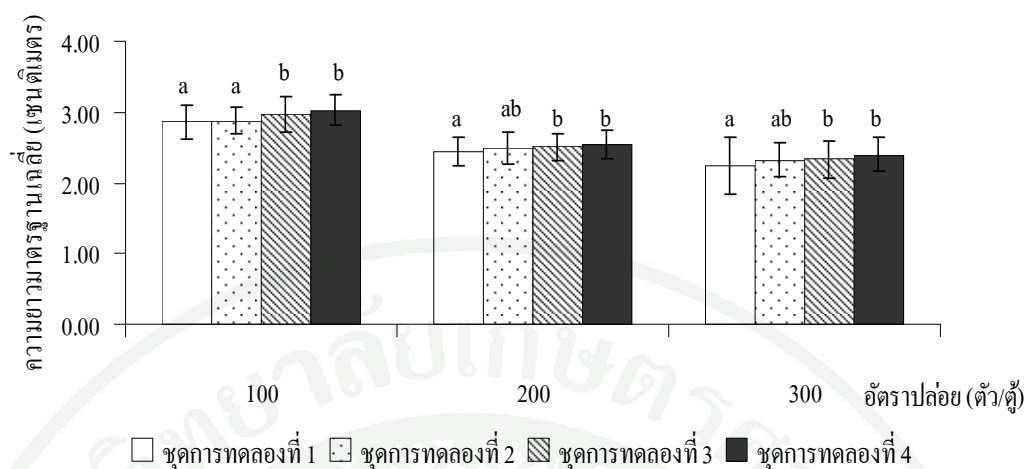
หมายเหตุ ค่าเฉลี่ยกำกับด้วยอักษรที่ต่างกันในแนวตั้ง มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$)

ชุดการทดลองที่ 1 ลูกปลานิลเลี้ยงด้วยอาหารกึ่งเบอร์ศูนย์ผสมฮอร์โมนเพศผู้ 17 α -methyltestosterone (17 α -MT) ในอัตรา 60 มิลลิกรัมต่ออาหาร 1 กิโลกรัม (ชุดควบคุม)

ชุดการทดลองที่ 2 ลูกปลานิลเลี้ยงด้วยอาหารกึ่งเบอร์ศูนย์ผสมฮอร์โมนเพศผู้ (17 α -MT) ในอัตรา 60 มิลลิกรัม ต่ออาหาร 1 กิโลกรัมผสมเมนแนนโอลิโกแซคคาไรด์ 2 กรัม ต่ออาหาร 1 กิโลกรัม

ชุดการทดลองที่ 3 ลูกปลานิลเลี้ยงด้วยอาหารกึ่งเบอร์ศูนย์ผสมฮอร์โมนเพศผู้ (17 α -MT) ในอัตรา 60 มิลลิกรัม ต่ออาหาร 1 กิโลกรัมผสมเมนแนนโอลิโกแซคคาไรด์ 4 กรัม ต่ออาหาร 1 กิโลกรัม

ชุดการทดลองที่ 4 ลูกปลานิลเลี้ยงด้วยอาหารกึ่งเบอร์ศูนย์ผสมฮอร์โมนเพศผู้ (17 α -MT) ในอัตรา 60 มิลลิกรัม ต่ออาหาร 1 กิโลกรัมผสมเมนแนนโอลิโกแซคคาไรด์ 6 กรัม ต่ออาหาร 1 กิโลกรัม



ภาพที่ 3 ความยาวมาตรฐานเฉลี่ยของลูกปลานิลแปลงเพศหลังได้รับอาหารเสริมแมนแนนโอลิโกแซคคาไรด์เป็นระยะเวลา 21 วัน

1.4 อัตราการเจริญเติบโตต่อวัน (Average daily growth/ADG)

หลังจากให้อาหารผสมแมนแนนโอลิโกแซคคาไรด์ในแต่ละชุดการทดลองเป็นระยะเวลา 21 วัน พบว่าที่อัตราปล่อย 100 ตัว/ตู้ อัตราการเจริญเติบโตต่อวันเฉลี่ยของลูกปลานิลแปลงเพศชุดควบคุมกับชุดที่ได้รับการเสริมแมนแนนโอลิโกแซคคาไรด์ในอาหารที่ระดับ 2 กรัม ต่ออาหาร 1 กิโลกรัม ไม่แตกต่างกันทางสถิติ ($P>0.05$) คือ 0.037 ± 0.007 และ 0.037 ± 0.009 กรัม/วัน ตามลำดับ ในขณะที่ชุดการทดลองที่ได้รับการเสริมแมนแนนโอลิโกแซคคาไรด์ในอาหารที่ระดับ 4 กรัม และ 6 กรัม ต่ออาหาร 1 กิโลกรัม มีผลทำให้ลูกปลานิลแปลงเพศมีอัตราการเจริญเติบโตต่อวันเฉลี่ยมากกว่าชุดควบคุมและชุดที่ได้รับการเสริมแมนแนนโอลิโกแซคคาไรด์ในอาหารที่ระดับ 2 กรัม ต่ออาหาร 1 กิโลกรัมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.05$) คือ 0.040 ± 0.010 และ 0.042 ± 0.009 กรัม/วัน ตามลำดับ เมื่อพิจารณาอัตราการเจริญเติบโตต่อวันเฉลี่ยของลูกปลานิลแปลงเพศที่อัตราปล่อย 200 และ 300 ตัว/ตู้ พบว่าอัตราการเจริญเติบโตต่อวันเฉลี่ยของลูกปลานิลแปลงเพศไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ ($P>0.05$) ระหว่างชุดควบคุมและชุดทดลอง คือ 0.022 ± 0.001 , 0.023 ± 0.003 , 0.024 ± 0.002 , 0.024 ± 0.002 , 0.019 ± 0.002 , 0.020 ± 0.002 , 0.021 ± 0.004 และ 0.022 ± 0.002 กรัม/วัน ตามลำดับ (ตารางที่ 7 และภาพที่ 4)

ตารางที่ 7 อัตราการเจริญเติบโตต่อวันเฉลี่ยของลูกปลานิลแปลงเพศหลังได้รับอาหารเสริม
เมนแนนโอลิโกแซคคาไรด์เป็นเวลา 21 วัน ที่อัตราปล่อย 100, 200 และ 300 ตัว/ตู้

ชุดการทดลอง	อัตราการเจริญเติบโตต่อวันเฉลี่ยลูกปลานิลแปลงเพศ ของแต่ละอัตราปล่อย (กรัม/วัน)		
	100 (ตัว/ตู้)	200 (ตัว/ตู้)	300 (ตัว/ตู้)
ชุดการทดลองที่ 1	0.037±0.007 ^a	0.022±0.001 ^a	0.019±0.002 ^a
ชุดการทดลองที่ 2	0.037±0.009 ^a	0.023±0.003 ^a	0.020±0.002 ^a
ชุดการทดลองที่ 3	0.040±0.010 ^b	0.024±0.002 ^a	0.021±0.004 ^a
ชุดการทดลองที่ 4	0.042±0.009 ^b	0.024±0.002 ^a	0.022±0.002 ^a

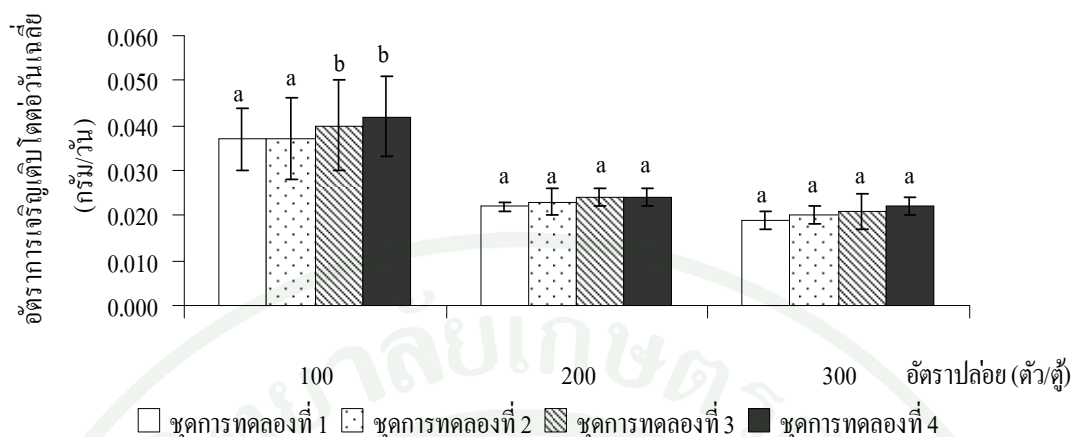
หมายเหตุ ค่าเฉลี่ยกำกับด้วยอักษรที่ต่างกันในแนวตั้ง มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$)

ชุดการทดลองที่ 1 ลูกปลานิลเลี้ยงด้วยอาหารกึ่งเบอร์ศูนย์ผสมฮอร์โมนเพศผู้ 17 α -methyltestosterone (17 α -MT) ในอัตรา 60 มิลลิกรัมต่ออาหาร 1 กิโลกรัม (ชุดควบคุม)

ชุดการทดลองที่ 2 ลูกปลานิลเลี้ยงด้วยอาหารกึ่งเบอร์ศูนย์ผสมฮอร์โมนเพศผู้ (17 α -MT) ในอัตรา 60 มิลลิกรัม ต่ออาหาร 1 กิโลกรัมผสมเมนแนนโอลิโกแซคคาไรด์ 2 กรัม ต่ออาหาร 1 กิโลกรัม

ชุดการทดลองที่ 3 ลูกปลานิลเลี้ยงด้วยอาหารกึ่งเบอร์ศูนย์ผสมฮอร์โมนเพศผู้ (17 α -MT) ในอัตรา 60 มิลลิกรัมต่ออาหาร 1 กิโลกรัมผสมเมนแนนโอลิโกแซคคาไรด์ 4 กรัม ต่ออาหาร 1 กิโลกรัม

ชุดการทดลองที่ 4 ลูกปลานิลเลี้ยงด้วยอาหารกึ่งเบอร์ศูนย์ผสมฮอร์โมนเพศผู้ (17 α -MT) ในอัตรา 60 มิลลิกรัมต่ออาหาร 1 กิโลกรัมผสมเมนแนนโอลิโกแซคคาไรด์ 6 กรัม ต่ออาหาร 1 กิโลกรัม



ภาพที่ 4 อัตราการเจริญเติบโตต่อวันเฉลี่ยของลูกปลานิลแปลงเพศหลังได้รับอาหารเสริมเมนแนน โอลิโกแซคคาไรด์เป็นระยะเวลา 21 วัน

1.5 อัตราการเปลี่ยนอาหารเป็นเนื้อ (Feed conversion rate [FCR])

หลังจากให้อาหารผสมเมนแนน โอลิโกแซคคาไรด์ในแต่ละชุดการทดลองเป็นระยะเวลา 21 วัน พบว่าที่อัตราปล่อย 100 ตัว/ตู้ อัตราการเปลี่ยนอาหารเป็นเนื้อเฉลี่ยของลูกปลานิลแปลงเพศไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ ($P > 0.05$) ระหว่างชุดควบคุมและชุดทดลอง คือ 1.42 ± 0.10 , 1.39 ± 0.25 , 1.28 ± 0.19 และ 1.12 ± 0.09 ตามลำดับ ส่วนชุดการทดลองที่มีอัตราปล่อย 200 ตัว/ตู้ พบว่าอัตราการเปลี่ยนอาหารเป็นเนื้อเฉลี่ยของลูกปลานิลแปลงเพศชุดควบคุมกับชุดที่ได้รับการเสริมเมนแนน โอลิโกแซคคาไรด์ในอาหารที่ระดับ 2 กรัม ต่ออาหาร 1 กิโลกรัม ไม่แตกต่างกันทางสถิติ ($P > 0.05$) คือ 1.59 ± 0.07 และ 1.47 ± 0.20 ตามลำดับ ในขณะที่ชุดการทดลองที่ได้รับการเสริมเมนแนน โอลิโกแซคคาไรด์ในอาหารที่ระดับ 4 กรัม และ 6 กรัม ต่ออาหาร 1 กิโลกรัม มีผลทำให้ลูกปลานิลแปลงเพศมีอัตราการเปลี่ยนอาหารเป็นเนื้อเฉลี่ยน้อยกว่าชุดควบคุมและชุดที่ได้รับการเสริมเมนแนน โอลิโกแซคคาไรด์ในอาหารที่ระดับ 2 กรัม ต่ออาหาร 1 กิโลกรัม อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$) คือ 1.32 ± 0.14 และ 1.30 ± 0.09 ตามลำดับ แต่ที่ชุดการทดลองที่มีอัตราปล่อย 300 ตัว/ตู้ พบว่าอัตราการเปลี่ยนอาหารเป็นเนื้อเฉลี่ยของลูกปลานิลแปลงเพศชุดควบคุมกับชุดที่ได้รับการเสริมเมนแนน โอลิโกแซคคาไรด์ในอาหารที่ระดับ 2 กรัม และ 4 กรัม ต่ออาหาร 1 กิโลกรัม ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ ($P > 0.05$) คือ 1.39 ± 0.09 , 1.27 ± 0.09 และ 1.18 ± 0.19 ตามลำดับ ในขณะที่ชุดการทดลองที่ได้รับการเสริมเมนแนน โอลิโกแซคคาไรด์ในอาหารที่ระดับ 6 กรัม ต่ออาหาร 1 กิโลกรัม มีผลทำให้ลูกปลานิลแปลงเพศมีอัตราการเปลี่ยนอาหารเป็นเนื้อเฉลี่ยน้อยกว่าชุดควบคุมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$) คือ 1.06 ± 0.09 และมีอัตราการเปลี่ยนอาหาร

เป็นเนื้อเฉลี่ยน้อยกว่าชุดที่ได้รับการเสริมแมนแนนโอลิโกแซคคาไรด์ในอาหารที่ระดับ 2 กรัมและ 4 กรัม ต่ออาหาร 1 กิโลกรัม แต่ไม่พบความแตกต่างทางสถิติ ($P>0.05$) (ตารางที่ 8 และ ภาพที่ 5)

ตารางที่ 8 อัตราการเปลี่ยนอาหารเป็นเนื้อเฉลี่ยของลูกปลานิลแปลงเพศหลังได้รับอาหารเสริม แมนแนนโอลิโกแซคคาไรด์เป็นเวลา 21 วัน ที่อัตราปล่อย 100, 200 และ 300 ตัว/ตู้

ชุดการทดลอง	อัตราการเปลี่ยนอาหารเป็นเนื้อเฉลี่ยของลูกปลานิลแปลงเพศของแต่ละอัตราปล่อย		
	100 (ตัว/ตู้)	200 (ตัว/ตู้)	300 (ตัว/ตู้)
ชุดการทดลองที่ 1	1.42±0.10 ^a	1.59±0.07 ^a	1.39±0.09 ^a
ชุดการทดลองที่ 2	1.39±0.25 ^a	1.47±0.20 ^{ab}	1.27±0.09 ^{ab}
ชุดการทดลองที่ 3	1.28±0.19 ^a	1.32±0.14 ^b	1.18±0.19 ^{ab}
ชุดการทดลองที่ 4	1.12±0.09 ^a	1.30±0.09 ^b	1.06±0.09 ^b

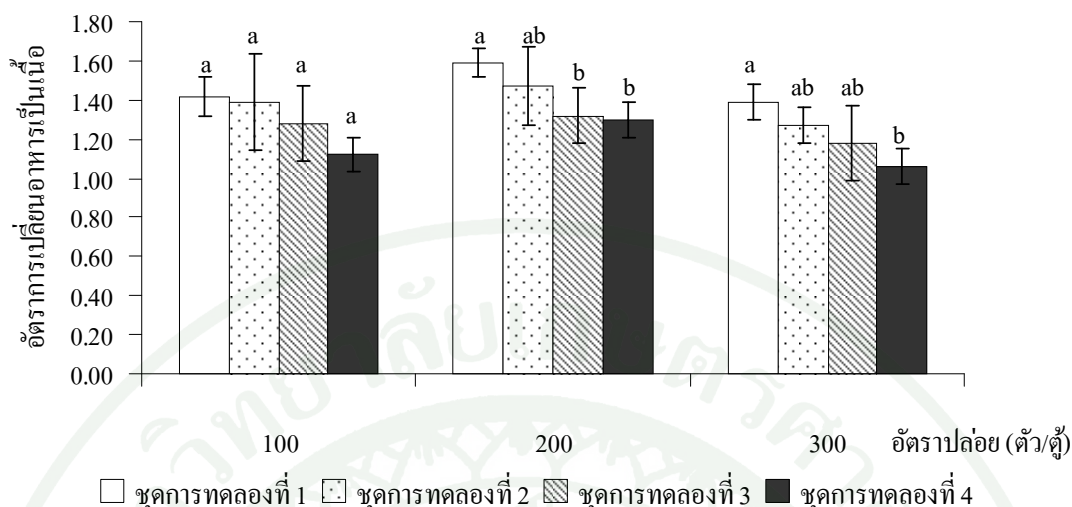
หมายเหตุ ค่าเฉลี่ยกำกับด้วยอักษรที่ต่างกันในแนวตั้ง มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.05$)

ชุดการทดลองที่ 1 ลูกปลานิลเลี้ยงด้วยอาหารกึ่งเบอร์ศูนย์ผสมฮอร์โมนเพศผู้ 17 α -methyltestosterone (17 α -MT) ในอัตรา 60 มิลลิกรัมต่ออาหาร 1 กิโลกรัม (ชุดควบคุม)

ชุดการทดลองที่ 2 ลูกปลานิลเลี้ยงด้วยอาหารกึ่งเบอร์ศูนย์ผสมฮอร์โมนเพศผู้ (17 α -MT) ในอัตรา 60 มิลลิกรัม ต่ออาหาร 1 กิโลกรัมผสมแมนแนนโอลิโกแซคคาไรด์ 2 กรัม ต่ออาหาร 1 กิโลกรัม

ชุดการทดลองที่ 3 ลูกปลานิลเลี้ยงด้วยอาหารกึ่งเบอร์ศูนย์ผสมฮอร์โมนเพศผู้ (17 α -MT) ในอัตรา 60 มิลลิกรัม ต่ออาหาร 1 กิโลกรัมผสมแมนแนนโอลิโกแซคคาไรด์ 4 กรัม ต่ออาหาร 1 กิโลกรัม

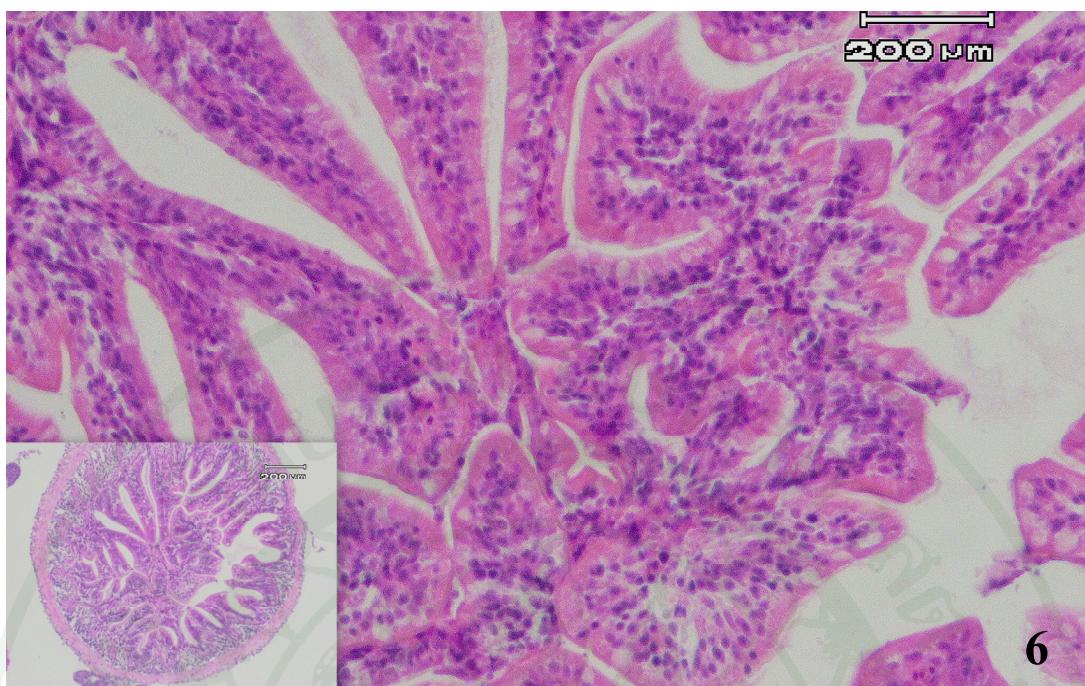
ชุดการทดลองที่ 4 ลูกปลานิลเลี้ยงด้วยอาหารกึ่งเบอร์ศูนย์ผสมฮอร์โมนเพศผู้ (17 α -MT) ในอัตรา 60 มิลลิกรัม ต่ออาหาร 1 กิโลกรัมผสมแมนแนนโอลิโกแซคคาไรด์ 6 กรัม ต่ออาหาร 1 กิโลกรัม



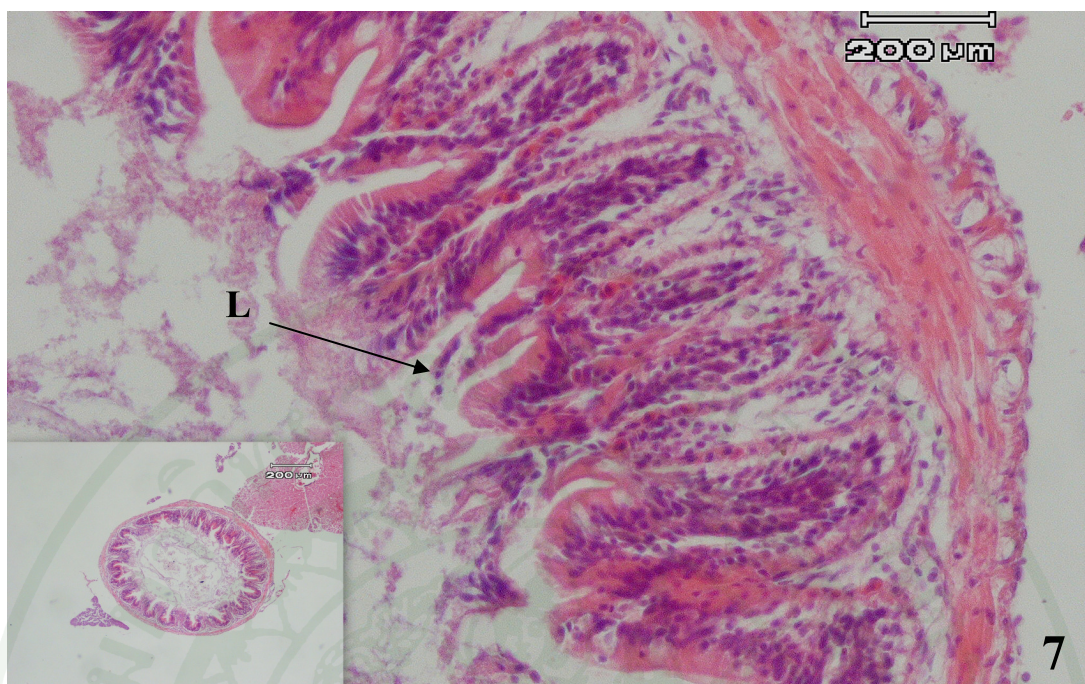
ภาพที่ 5 อัตราการผลิตอาหารเป็นเนื้อเฉลี่ยของลูกปลานิลแปลงเพศหลังได้รับอาหารเสริมแมนแนนโอลิโกแซคคาไรด์เป็นระยะเวลา 21 วัน

1.6 ลักษณะทางพยาธิสภาพของเนื้อเยื่อบริเวณลำไส้ส่วนต้นและตับ

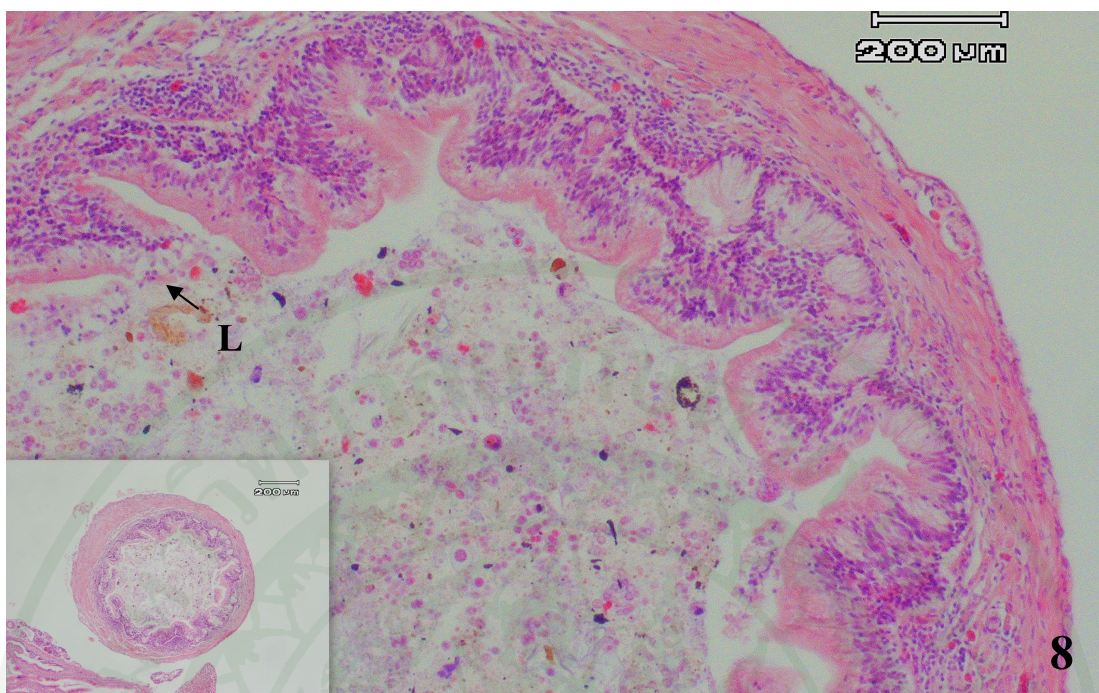
เมื่อครบกำหนดการอนุบาลเป็นระยะเวลา 21 วันแล้ว สุ่มลูกปลาจากแต่ละชุดการทดลองมาผ่าตัดเก็บอวัยวะภายในเพื่อศึกษาถึงสภาพเนื้อเยื่อของลำไส้ส่วนต้นและตับของแต่ละชุดการทดลอง พบว่าชุดการทดลองที่ได้รับการเสริมแมนแนนโอลิโกแซคคาไรด์ในอาหารที่ระดับ 6 กรัม ต่ออาหาร 1 กิโลกรัม มีพื้นที่ผิวของ microvilli ในลำไส้ส่วนต้นไม่ฉีกขาด มีสภาพค่อนข้างสมบูรณ์ และเพิ่มขึ้นอย่างเห็นได้ชัด (ภาพที่ 6) สำหรับชุดการทดลองที่ได้รับการเสริมแมนแนนโอลิโกแซคคาไรด์ในอาหารที่ระดับ 4 กรัม ต่อ อาหาร 1 กิโลกรัม มีพื้นที่ผิวของ microvilli เพิ่มมากขึ้นแต่ยังพบว่าการฉีกขาดอยู่บ้าง (ภาพที่ 7) เมื่อเปรียบเทียบกับชุดการทดลองที่ได้รับการเสริมแมนแนนโอลิโกแซคคาไรด์ในอาหารที่ระดับ 2 กรัม ต่อ อาหาร 1 กิโลกรัม (ภาพที่ 8) และชุดควบคุม (ภาพที่ 9) ที่มีพื้นที่ผิวของ microvilli ค่อนข้างน้อยและพบการฉีกขาดที่ผนังด้านนอกของ microvilli อยู่มาก สำหรับลักษณะทางพยาธิสภาพเนื้อเยื่อตับของชุดควบคุมและชุดทดลองที่ได้รับการเสริมแมนแนนโอลิโกแซคคาไรด์ในอาหาร พบว่ามีการสะสมไขมัน (Fat droplet) อยู่ในเซลล์ตับ (Hepatocyte) แต่ชุดการทดลองที่ได้รับการเสริมแมนแนนโอลิโกแซคคาไรด์ในอาหารที่ระดับ 4 กรัม และ 6 กรัม ต่อ อาหาร 1 กิโลกรัม มีการสะสมไขมันในเซลล์ตับมากกว่าชุดควบคุมและชุดการทดลองที่ได้รับการเสริมแมนแนน โอลิโกแซคคาไรด์ในอาหารที่ระดับ 2 กรัม ต่อ อาหาร 1 กิโลกรัม (ภาพที่ 10)



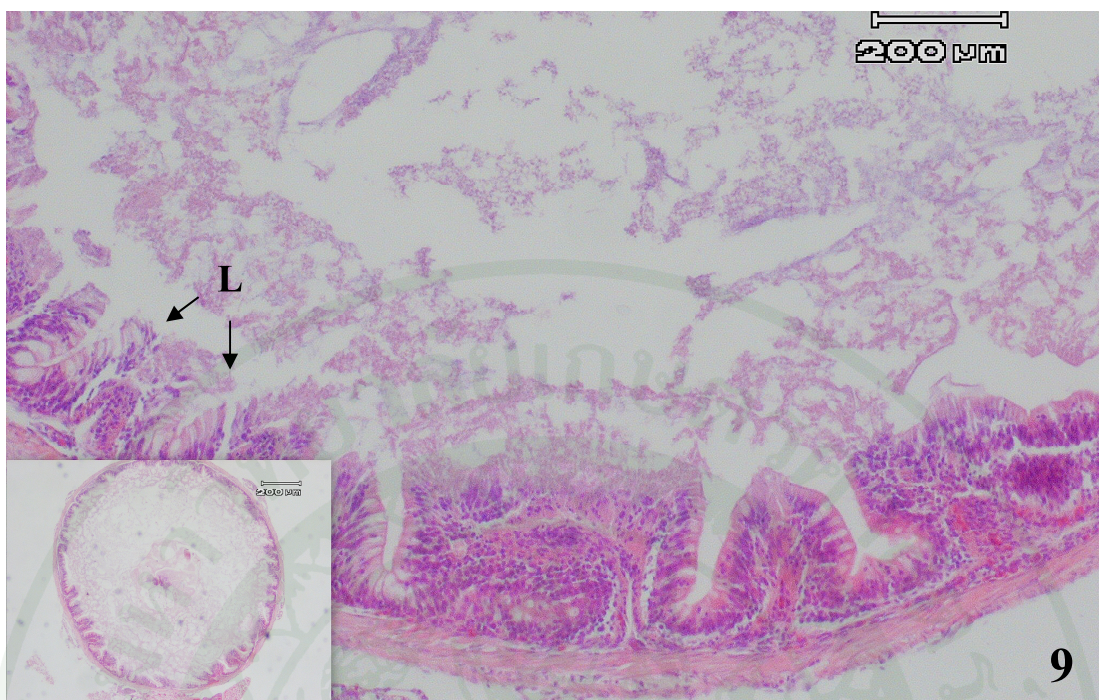
ภาพที่ 6 ลักษณะทางพยาธิสภาพบริเวณลำไส้ส่วนต้นของลูกปลานิลแปลงเพศหลังได้รับอาหารกึ่งเบอร์สุน์ผสมฮอร์โมนเพศผู้ 17 α -methyl testosterone (17 α -MT) ในอัตรา 60 มิลลิกรัม ต่ออาหาร 1 กิโลกรัม ผสมเมนแนนโอลิโกแซกคาไรด์ 6 กรัม ต่ออาหาร 1 กิโลกรัม



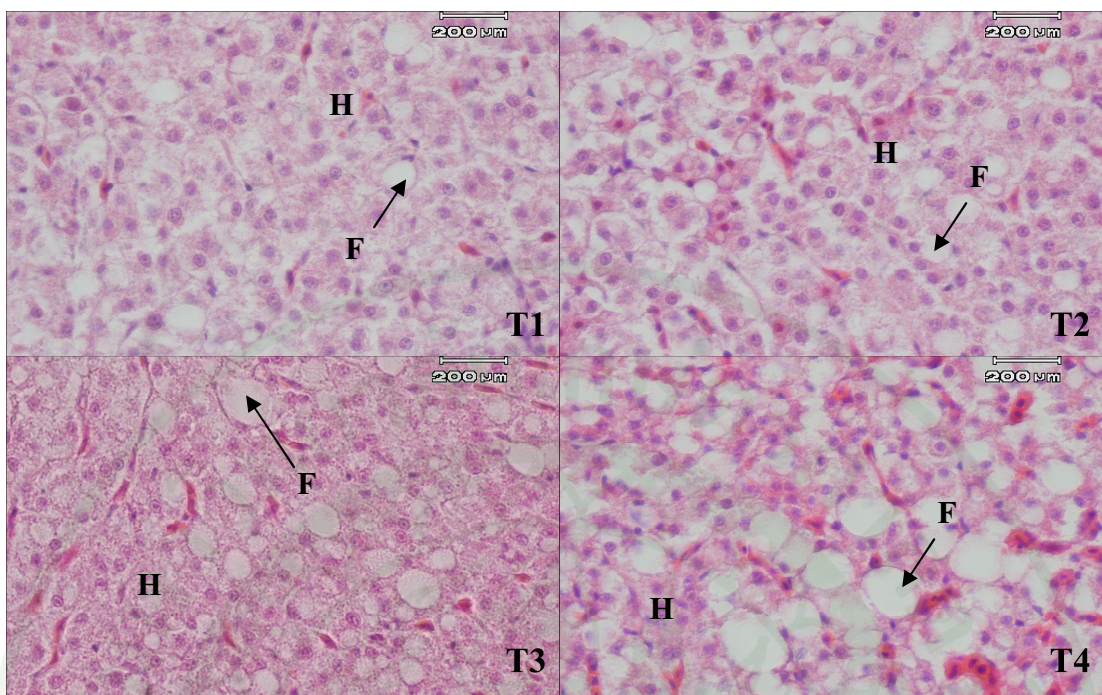
ภาพที่ 7 ลักษณะทางพยาธิสภาพบริเวณลำไส้ส่วนต้นของลูกปลานิลแปลงเพศหลังได้รับอาหารกึ่งเบอร์สุน์ผสมฮอร์โมนเพศผู้ 17 α -methyl testosterone (17 α -MT) ในอัตรา 60 มิลลิกรัม ต่ออาหาร 1 กิโลกรัม ผสมเมนแนนโอลิโกแซกคาไรด์ 4 กรัม ต่ออาหาร 1 กิโลกรัม พบการฉีกขาดของ microvilli (Laceration; L)



ภาพที่ 8 ลักษณะทางพยาธิสภาพบริเวณลำไส้ส่วนต้นของลูกปลานิลแปลงเพศหลังได้รับอาหารกึ่งเบอ์ศูนย์ผสมฮอร์โมนเพศผู้ 17 α -methyl testosterone (17 α -MT) ในอัตรา 60 มิลลิกรัม ต่ออาหาร 1 กิโลกรัม ผสมเมนแนน โอลิโกแซกคาไรด์ 2 กรัม ต่ออาหาร 1 กิโลกรัม พบการฉีกขาดของ microvilli (Laceration; L)



ภาพที่ 9 ลักษณะทางพยาธิสภาพบริเวณลำไส้ส่วนต้นของลูกปลานิลแปลงเพศหลังได้รับอาหารกึ่งเบอ์ศูนย์ผสมฮอร์โมนเพศผู้ 17 α -methyl testosterone (17 α -MT) ในอัตรา 60 มิลลิกรัม ต่ออาหาร 1 กิโลกรัม (ชุดควบคุม) พบการฉีกขาดของ microvilli (Laceration; L)



ภาพที่ 10 เซลล์ตับ (Hepatocyte; H) มีการสะสมของไขมัน (Fat droplet; F) อยู่ในเซลล์

หมายเหตุ T1 = เซลล์ตับของลูกปลานิลเลี้ยงด้วยอาหารกึ่งเบอ์ศูนย์ผสมฮอร์โมนเพศผู้

17 α -methyl testosterone (17 α -MT) ในอัตรา 60 มิลลิกรัม ต่ออาหาร 1 กิโลกรัม
(ชุดควบคุม)

T2 = เซลล์ตับของลูกปลานิลเลี้ยงด้วยอาหารกึ่งเบอ์ศูนย์ผสมฮอร์โมนเพศผู้
(17 α -MT) ในอัตรา 60 มิลลิกรัม ต่ออาหาร 1 กิโลกรัม

ผสมเมนแนนโอลิโกแซคคาไรด์ 2 กรัม ต่ออาหาร 1 กิโลกรัม

T3 = เซลล์ตับของลูกปลานิลเลี้ยงด้วยอาหารกึ่งเบอ์ศูนย์ผสมฮอร์โมนเพศผู้
(17 α -MT) ในอัตรา 60 มิลลิกรัม ต่ออาหาร 1 กิโลกรัม

ผสมเมนแนนโอลิโกแซคคาไรด์ 4 กรัม ต่ออาหาร 1 กิโลกรัม

T4 = เซลล์ตับของลูกปลานิลเลี้ยงด้วยอาหารกึ่งเบอ์ศูนย์ผสมฮอร์โมนเพศผู้
(17 α -MT) ในอัตรา 60 มิลลิกรัม ต่ออาหาร 1 กิโลกรัม

ผสมเมนแนนโอลิโกแซคคาไรด์ 6 กรัม ต่ออาหาร 1 กิโลกรัม

1.7 ผลของการเสริมแมนแนนโอลิโกแซคคาไรด์ในอาหารต่อความต้านทานเชื้อ

S. agalactiae ของลูกปลานิลแปลงเพศ

หลังทดสอบความสามารถในการต้านเชื้อโรคของลูกปลานิล โดยวิธีการแช่ด้วยเชื้อ *S. agalactiae* ที่ 10^8 CFU/ml พบว่าที่อัตราปล่อย 100 ตัว/ตู้ อัตราการตายเฉลี่ยของลูกปลานิลแปลงเพศของชุดควบคุม คือ 43.33 ± 20.82 เปอร์เซ็นต์ ในขณะที่ชุดทดลองที่ได้รับการเสริมแมนแนนโอลิโกแซคคาไรด์ในอาหารที่ระดับ 2 กรัม 4 กรัม และ 6 กรัม ต่ออาหาร 1 กิโลกรัม ส่งผลให้อัตราการตายลดลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$) คือ 3.33 ± 5.77 , 0.00 ± 0.00 และ 0.00 ± 0.00 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ ส่วนอัตราการตายเฉลี่ยของลูกปลานิลแปลงเพศที่อัตราปล่อย 200 และ 300 ตัว/ตู้ พบว่าลูกปลานิลแปลงเพศชุดควบคุมกับชุดที่ได้รับการเสริมแมนแนนโอลิโกแซคคาไรด์ในอาหารที่ระดับ 2 กรัม ต่ออาหาร 1 กิโลกรัม มีอัตราการตายเฉลี่ยไม่แตกต่างกันทางสถิติ ($P > 0.05$) คือ 63.33 ± 11.55 , 50.00 ± 17.32 , 46.67 ± 5.77 และ 43.33 ± 15.28 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ ในขณะที่ชุดทดลองที่ได้รับการเสริมแมนแนนโอลิโกแซคคาไรด์ในอาหารที่ระดับ 4 กรัม และ 6 กรัม ต่ออาหาร 1 กิโลกรัม มีผลทำให้ลูกปลานิลแปลงเพศมีอัตราการตายเฉลี่ยน้อยกว่าชุดควบคุมและชุดที่ได้รับการเสริมแมนแนนโอลิโกแซคคาไรด์ในอาหารที่ระดับ 2 กรัม ต่ออาหาร 1 กิโลกรัมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$) คือ 16.67 ± 5.77 , 3.33 ± 5.77 , 16.67 ± 5.77 และ 6.67 ± 5.77 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ (ตารางที่ 9 และภาพที่ 11)

นำลูกปลาที่ตายมาแยกเชื้อแบคทีเรียจากตับ ม้าม และไตส่วนหลัง และนำเชื้อแบคทีเรียที่ได้มาทดสอบคุณสมบัติทางกายภาพและทางชีวเคมีพบว่า เป็นเชื้อ *Streptococcus agalactiae*

ตารางที่ 9 อัตราการตายเฉลี่ยของลูกปลานิลแปลงเพศที่ได้รับอาหารเสริมแมนแนน โอลิโกแซคคาไรด์เป็นเวลา 21 วัน ที่อัตราปล่อย 100, 200 และ 300 ตัว/ตู้ หลังแช่ด้วยเชื้อ *S. agalactiae* ที่ 10^8 CFU/ml

ชุดการทดลอง	อัตราการตายเฉลี่ยของลูกปลานิลแปลงเพศของแต่ละอัตราปล่อย		
	100 (ตัว/ตู้)	200 (ตัว/ตู้)	300 (ตัว/ตู้)
ชุดการทดลองที่ 1	43.33±20.82 ^a	63.33±11.55 ^a	46.67±5.77 ^a
ชุดการทดลองที่ 2	3.33±5.77 ^b	50.00±17.32 ^a	43.33±15.28 ^a
ชุดการทดลองที่ 3	0.00±0.00 ^b	16.67±5.77 ^b	16.67±5.77 ^b
ชุดการทดลองที่ 4	0.00±0.00 ^b	3.33±5.77 ^b	6.67±5.77 ^b

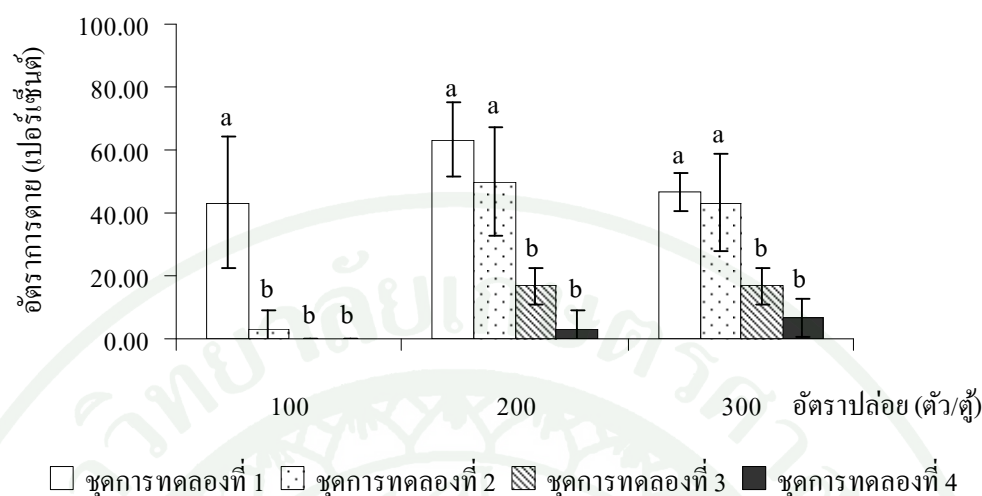
หมายเหตุ ค่าเฉลี่ยกำกับด้วยอักษรที่ต่างกันในแนวดิ่ง มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.05$)

ชุดการทดลองที่ 1 ลูกปลานิลเลี้ยงด้วยอาหารกึ่งเบอร์ศูนย์ผสมฮอร์โมนเพศผู้ 17 α -methyltestosterone (17 α -MT) ในอัตรา 60 มิลลิกรัมต่ออาหาร 1 กิโลกรัม (ชุดควบคุม)

ชุดการทดลองที่ 2 ลูกปลานิลเลี้ยงด้วยอาหารกึ่งเบอร์ศูนย์ผสมฮอร์โมนเพศผู้ (17 α -MT) ในอัตรา 60 มิลลิกรัม ต่ออาหาร 1 กิโลกรัมผสมแมนแนน โอลิโกแซคคาไรด์ 2 กรัม ต่ออาหาร 1 กิโลกรัม

ชุดการทดลองที่ 3 ลูกปลานิลเลี้ยงด้วยอาหารกึ่งเบอร์ศูนย์ผสมฮอร์โมนเพศผู้ (17 α -MT) ในอัตรา 60 มิลลิกรัม ต่ออาหาร 1 กิโลกรัมผสมแมนแนน โอลิโกแซคคาไรด์ 4 กรัม ต่ออาหาร 1 กิโลกรัม

ชุดการทดลองที่ 4 ลูกปลานิลเลี้ยงด้วยอาหารกึ่งเบอร์ศูนย์ผสมฮอร์โมนเพศผู้ (17 α -MT) ในอัตรา 60 มิลลิกรัม ต่ออาหาร 1 กิโลกรัมผสมแมนแนน โอลิโกแซคคาไรด์ 6 กรัม ต่ออาหาร 1 กิโลกรัม



ภาพที่ 11 อัตราการตายเฉลี่ยของลูกปลานิลแปลงเพศที่ได้รับอาหารเสริมแมนแนน โอลิโกแซคคาไรด์เป็นระยะเวลา 21 วัน หลังแช่ด้วยเชื้อ *S. agalactiae* ที่ 10^8 CFU/ml

การทดลองที่ 2 การศึกษาระดับที่เหมาะสมของแมนแนนโอลิโกแซคคาไรด์ต่อระบบภูมิคุ้มกันของปลานิล

การทดลองที่ 2.1 ระบบภูมิคุ้มกันแบบจำเพาะเจาะจงของปลานิลในเชิงการสร้าง Antibody หลังจากได้รับวัคซีน *S. agalactiae*

ผลการศึกษาค่า Antibody titer เฉลี่ยของปลานิลที่ได้รับอาหารเสริมแมนแนน โอลิโกแซคคาไรด์ที่ระดับแตกต่างกันในแต่ละสัปดาห์ พบว่าการเปลี่ยนแปลงของค่า Antibody titer เฉลี่ยของปลานิลในแต่ละชุดการทดลองหลังจากให้วัคซีนครั้งแรก มีค่าสูงขึ้นในสัปดาห์ที่ 1-2 โดยปลานิลจากชุดการทดลองที่ได้รับการเสริมแมนแนนโอลิโกแซคคาไรด์ในอาหารที่ระดับ 2 กรัม ต่ออาหาร 1 กิโลกรัม ในสัปดาห์ที่ 1 มีค่า Antibody titer เฉลี่ยสูงสุด คือ 8.00 ± 0.00 รองลงมาคือชุดควบคุม และชุดการทดลองที่ได้รับการเสริมแมนแนนโอลิโกแซคคาไรด์ในอาหารที่ระดับ 4 กรัม และ 6 กรัม ต่ออาหาร 1 กิโลกรัม ตามลำดับ คือ 6.40 ± 2.07 , 5.50 ± 2.80 และ 3.80 ± 0.63 สัปดาห์ที่ 2 ปลานิลจากชุดการทดลองที่ได้รับการเสริมแมนแนนโอลิโกแซคคาไรด์ในอาหารที่ระดับ 2 กรัม ต่ออาหาร 1 กิโลกรัม ยังคงมีค่าเฉลี่ยสูงสุด คือ 8.80 ± 6.20 รองลงมาคือชุดการทดลองที่ได้รับการเสริมแมนแนนโอลิโกแซคคาไรด์ในอาหารที่ระดับ 4 กรัม ต่ออาหาร 1 กิโลกรัม ชุดควบคุม และชุดการ

ทดลองที่ได้รับการเสริมแมนแนนโอลิโกแซคคาไรด์ในอาหารที่ระดับ 6 กรัม ต่ออาหาร 1 กิโลกรัม ตามลำดับ ซึ่งมีค่าใกล้เคียงกันคือ 4.00 ± 0.00 , 3.30 ± 2.58 และ 3.10 ± 1.20 ตามลำดับ เมื่อเข้าสู่สัปดาห์ที่ 3 ค่าเฉลี่ย Antibody titer ของทุกชุดการทดลองเริ่มมีค่าลดลง โดยชุดการทดลองที่ได้รับการเสริมแมนแนนโอลิโกแซคคาไรด์ในอาหารที่ระดับ 2 กรัม ต่ออาหาร 1 กิโลกรัม ยังคงมีค่าเฉลี่ยสูงสุดคือ 3.20 ± 1.03 รองลงมาคือชุดการทดลองที่ได้รับการเสริมแมนแนนโอลิโกแซคคาไรด์ในอาหารที่ระดับ 4 กรัม และ 6 กรัม ต่ออาหาร 1 กิโลกรัม และชุดควบคุม ตามลำดับ คือ 2.40 ± 2.17 , 1.40 ± 0.52 และ 1.20 ± 0.42 ตามลำดับ และทำการให้วัคซีนกระตุ้นเป็นครั้งที่สอง

สัปดาห์ที่ 4 (หนึ่งสัปดาห์หลังการฉีดวัคซีนครั้งที่ 2) พบว่าการตอบสนองต่อวัคซีนของทุกชุดการทดลองมีค่าสูงขึ้นกว่าการได้รับวัคซีนครั้งแรก โดยชุดการทดลองที่ได้รับการเสริมแมนแนนโอลิโกแซคคาไรด์ในอาหารที่ระดับ 6 กรัม ต่ออาหาร 1 กิโลกรัม มีค่าเฉลี่ยสูงสุดคือ 166.40 ± 61.83 รองลงมาคือชุดการทดลองที่ได้รับการเสริมแมนแนนโอลิโกแซคคาไรด์ในอาหารที่ระดับ 2 กรัม และ 4 กรัม ต่ออาหาร 1 กิโลกรัม ซึ่งมีค่าใกล้เคียงกันคือ 14.22 ± 3.53 และ 13.71 ± 3.90 และชุดควบคุม ซึ่งมีค่าเฉลี่ย Antibody titer ต่ำสุดคือ 6.67 ± 4.00 สัปดาห์ที่ 5 ค่าเฉลี่ย Antibody titer ของชุดการทดลองที่ได้รับการเสริมแมนแนนโอลิโกแซคคาไรด์ในอาหารที่ระดับ 6 กรัม ต่ออาหาร 1 กิโลกรัม ลดลงอย่างเห็นได้ชัด คือ 14.40 ± 3.37 สำหรับชุดควบคุมและชุดการทดลองที่ได้รับการเสริมแมนแนนโอลิโกแซคคาไรด์ในอาหารที่ระดับ 2 กรัม และ 4 กรัม ต่ออาหาร 1 กิโลกรัม นั้น ยังคงมีค่าเพิ่มขึ้น คือ 15.60 ± 9.70 , 15.20 ± 7.00 และ 22.40 ± 8.26 ตามลำดับ เมื่อเข้าสู่สัปดาห์ที่ 6 ค่าเฉลี่ย Antibody titer ของทุกชุดการทดลองเริ่มลดลง โดยค่าเฉลี่ย Antibody titer ของชุดการทดลองที่ได้รับการเสริมแมนแนนโอลิโกแซคคาไรด์ในอาหารที่ระดับ 6 กรัม ต่ออาหาร 1 กิโลกรัม ลดลงเป็น 7.60 ± 1.26 ซึ่งเท่ากับชุดควบคุม รองลงมาคือชุดการทดลองที่ได้รับการเสริมแมนแนนโอลิโกแซคคาไรด์ในอาหารที่ระดับ 4 กรัม และ 2 กรัม ต่ออาหาร 1 กิโลกรัม คือ 7.20 ± 1.69 และ 5.60 ± 2.07 สัปดาห์ที่ 7 ค่าเฉลี่ย Antibody titer ของทุกชุดการทดลองลดลงเกือบคงที่ โดยที่ชุดควบคุมและชุดการทดลองที่ได้รับการเสริมแมนแนนโอลิโกแซคคาไรด์ในอาหารที่ระดับ 2 กรัม ต่ออาหาร 1 กิโลกรัม มีค่าเท่ากับในสัปดาห์ที่ 6 คือ 7.60 ± 1.26 และ 5.60 ± 2.07 ตามลำดับ ส่วนชุดการทดลองที่ได้รับการเสริมแมนแนนโอลิโกแซคคาไรด์ในอาหารที่ระดับ 4 กรัม และ 6 กรัม ต่ออาหาร 1 กิโลกรัม ลดลงเล็กน้อย คือ 4.80 ± 3.49 และ 4.20 ± 1.48 ตามลำดับ (ตารางที่ 10 และ ภาพที่ 12)

ตารางที่ 10 ค่าเฉลี่ย Antibody titer เปรียบเทียบระหว่างชุดการทดลอง

สัปดาห์	ชุดการทดลอง			
	ชุดการทดลองที่ 1	ชุดการทดลองที่ 2	ชุดการทดลองที่ 3	ชุดการทดลองที่ 4
0	2.00±0.00 ^a	2.00±0.00 ^a	2.00±0.00 ^a	2.00±0.00 ^a
1	6.40±2.07 ^c	8.00±0.00 ^{bc}	5.50±2.80 ^b	3.80±0.63 ^a
2	3.30±2.58 ^a	8.80±6.20 ^b	4.00±0.00 ^a	3.10±1.20 ^a
3	1.20±0.42 ^a	3.20±1.03 ^c	2.40±2.17 ^{bc}	1.40±0.52 ^{ab}
4	6.67±4.00 ^a	14.22±3.53 ^a	13.71±3.90 ^a	166.40±61.83 ^b
5	15.60±9.70 ^a	15.20±7.00 ^a	22.40±8.26 ^b	14.40±3.37 ^a
6	7.60±1.26 ^b	5.60±2.07 ^a	7.20±1.69 ^b	7.60±1.26 ^b
7	7.60±1.26 ^b	5.60±2.07 ^a	4.80±3.49 ^a	4.20±1.48 ^a

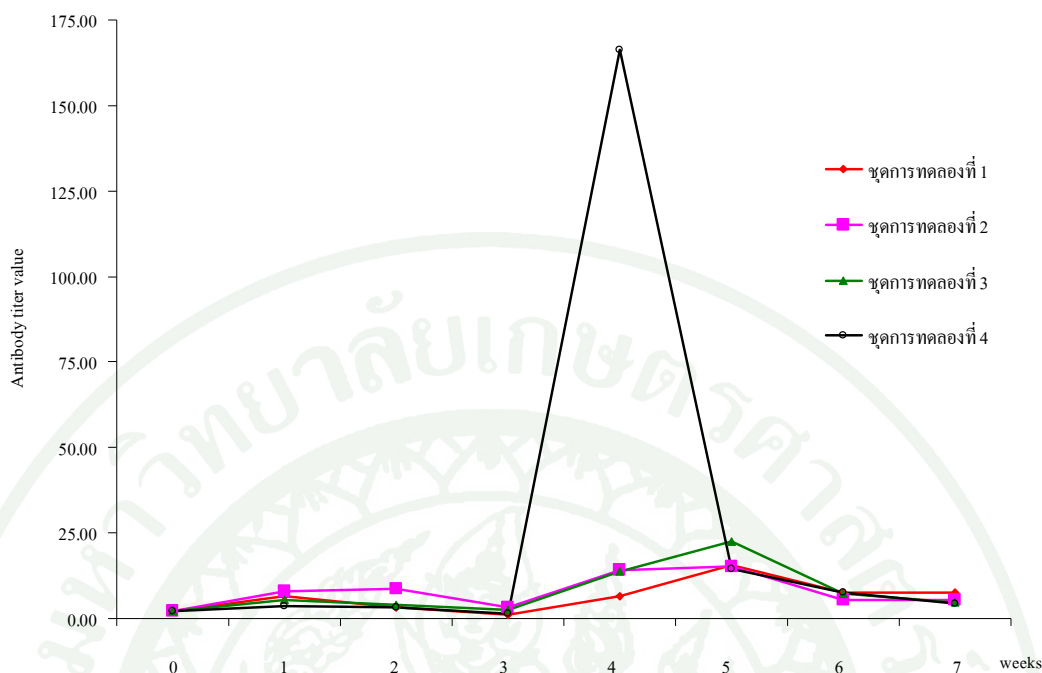
หมายเหตุ ค่าเฉลี่ยกำกับด้วยอักษรที่ต่างกันในแนวนอน มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$)

ชุดการทดลองที่ 1 ปลานิลเลี้ยงด้วยอาหารปลากินพืช (ชุดควบคุม)

ชุดการทดลองที่ 2 ปลานิลเลี้ยงด้วยอาหารปลากินพืชผสมแมนแนนโอลิโกแซกคาไรด์ 2 กรัม ต่ออาหาร 1 กิโลกรัม

ชุดการทดลองที่ 3 ปลานิลเลี้ยงด้วยอาหารปลากินพืชผสมแมนแนนโอลิโกแซกคาไรด์ 4 กรัม ต่ออาหาร 1 กิโลกรัม

ชุดการทดลองที่ 4 ปลานิลเลี้ยงด้วยอาหารปลากินพืชผสมแมนแนนโอลิโกแซกคาไรด์ 6 กรัม ต่ออาหาร 1 กิโลกรัม



ภาพที่ 12 ค่าเฉลี่ย Antibody titer เปรียบเทียบระหว่างชุดการทดลอง

ผลการตอบสนองของปลานิลที่ได้รับวัคซีน แบ่งออกเป็น การตอบสนองในช่วงการให้วัคซีนครั้งแรก (primary response) พบว่าค่าเฉลี่ย Antibody titer ของทุกชุดการทดลองอยู่ในช่วง 3.80 ± 0.63 - 8.80 ± 6.20 โดยชุดการทดลองที่ได้รับการเสริมแมนแนน โอลิโกแซคคาไรด์ในอาหารที่ระดับ 2 กรัม ต่อ อาหาร 1 กิโลกรัม มีการตอบสนองต่อวัคซีนครั้งแรกสูงที่สุด คือ 8.80 ± 6.20 ในสัปดาห์ที่ 2 หลังการให้วัคซีน และมีค่าสูงกว่าการตอบสนองต่อวัคซีนของชุดการทดลองที่ได้รับการเสริมแมนแนน โอลิโกแซคคาไรด์ในอาหารที่ระดับ 6 กรัม ต่อ อาหาร 1 กิโลกรัม อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$) คือ 3.80 ± 0.63 ซึ่งมีการตอบสนองสูงสุดในสัปดาห์แรกหลังการให้วัคซีน แต่ไม่พบความแตกต่างทางสถิติ ($P > 0.05$) กับชุดควบคุมและชุดการทดลองที่ได้รับการเสริมแมนแนน โอลิโกแซคคาไรด์ในอาหารที่ระดับ 4 กรัม ต่อ อาหาร 1 กิโลกรัม ที่มีค่า 6.40 ± 2.07 และ 5.50 ± 2.80 ตามลำดับ และมีการตอบสนองสูงสุดในสัปดาห์แรกหลังการให้วัคซีนเช่นเดียวกัน สำหรับการตอบสนองของปลานิลหลังการฉีดวัคซีนกระตุ้นครั้งที่ 2 (secondary response) มีค่าเฉลี่ย Antibody titer ของทุกชุดการทดลองอยู่ในช่วง 15.20 ± 7.00 - 166.40 ± 61.83 ซึ่งชุดการทดลองที่ได้รับการเสริมแมนแนน โอลิโกแซคคาไรด์ในอาหารที่ระดับ 6 กรัม ต่อ อาหาร 1 กิโลกรัม มีการตอบสนองต่อวัคซีนครั้งที่ 2 สูงที่สุด คือ 166.40 ± 61.83 ในสัปดาห์ที่ 1 หลังการให้วัคซีนครั้งที่ 2 (สัปดาห์ที่ 4) และมีค่าสูงกว่าชุดควบคุมและชุดการทดลองที่ได้รับการเสริมแมนแนน โอลิโกแซคคาไรด์ในอาหารที่ระดับ 2 กรัม และ 4 กรัม ต่อ อาหาร 1 กิโลกรัม ที่มีการตอบสนองในสัปดาห์ที่ 2

หลังจากการให้วัคซีน (สัปดาห์ที่ 5) อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P>0.05$) คือ 15.60 ± 9.70 , 15.20 ± 7.00 และ 22.40 ± 8.26 ดังแสดงในตารางที่ 11 และภาพที่ 13

ตารางที่ 11 ค่าเฉลี่ยสูงสุดของ Antibody titer เปรียบเทียบระหว่างชุดการทดลองหลังได้รับวัคซีน ทั้ง 2 ครั้ง

ชุดการทดลอง	ค่าเฉลี่ยสูงสุดของ Antibody titer			
	Primary response	Week	Secondary response	Week
ชุดการทดลองที่ 1	6.40 ± 2.07^{ab}	1	15.60 ± 9.70^a	5
ชุดการทดลองที่ 2	8.80 ± 6.20^b	2	15.20 ± 7.00^a	5
ชุดการทดลองที่ 3	5.50 ± 2.80^{ab}	1	22.40 ± 8.26^a	5
ชุดการทดลองที่ 4	3.80 ± 0.63^a	1	166.40 ± 61.83^b	4

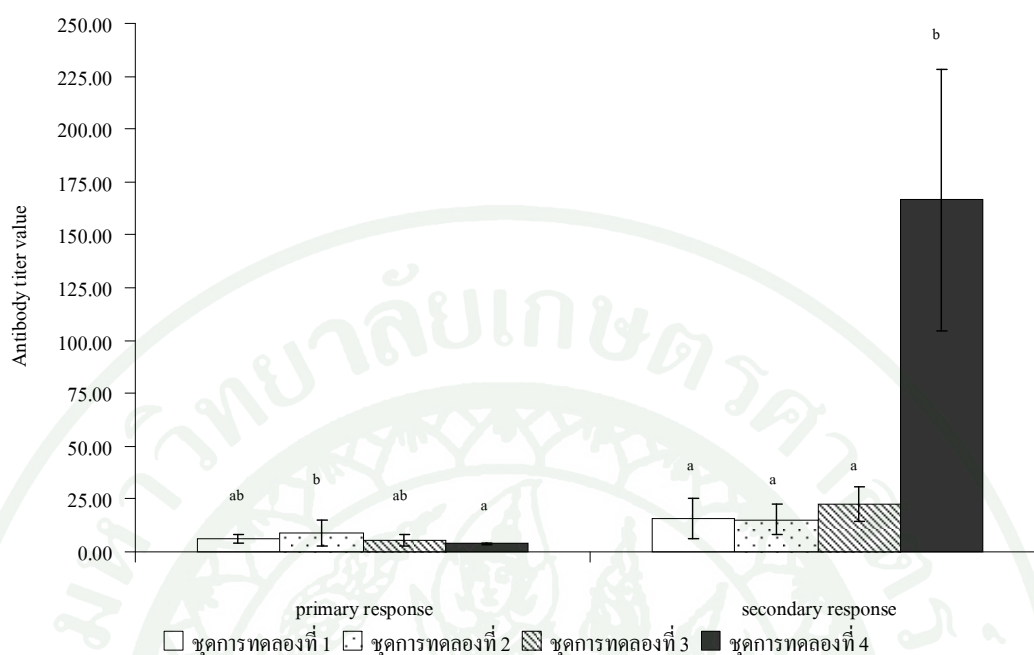
หมายเหตุ ค่าเฉลี่ยกำกับด้วยอักษรที่ต่างกันในตั้ง มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.05$)

ชุดการทดลองที่ 1 ปลานิลเลี้ยงด้วยอาหารปลากินพืช (ชุดควบคุม)

ชุดการทดลองที่ 2 ปลานิลเลี้ยงด้วยอาหารปลากินพืชผสมแมนแนนโอลิโกแซ็กคาไรด์ 2 กรัม ต่ออาหาร 1 กิโลกรัม

ชุดการทดลองที่ 3 ปลานิลเลี้ยงด้วยอาหารปลากินพืชผสมแมนแนนโอลิโกแซ็กคาไรด์ 4 กรัม ต่ออาหาร 1 กิโลกรัม

ชุดการทดลองที่ 4 ปลานิลเลี้ยงด้วยอาหารปลากินพืชผสมแมนแนนโอลิโกแซ็กคาไรด์ 6 กรัม ต่ออาหาร 1 กิโลกรัม



ภาพที่ 13 ค่าเฉลี่ยสูงสุดของ Antibody titer เปรียบเทียบระหว่างชุดการทดลองหลังได้รับวัคซีนทั้ง 2 ครั้ง

การทดลองที่ 2.2 ศึกษาระดับที่เหมาะสมของแมนแนนโพลิแซ็กคาไรด์ต่อระบบภูมิคุ้มกันแบบไม่จำเพาะเจาะจงของปลานิล

เมื่อเลี้ยงปลานิลด้วยอาหารเสริมแมนแนนโพลิแซ็กคาไรด์ที่ระดับความเข้มข้นที่กำหนดเมื่อครบ 30 วัน และเลี้ยงปลานิลต่อเป็นระยะเวลา 20 วัน โดยให้อาหารปกติทุกชุดการทดลอง เช่นเดียวกับชุดควบคุม ทำการสุ่มปลานิลทุก ๆ 10 วัน เพื่อศึกษาระดับภูมิคุ้มกันของปลานิลตลอดการทดลอง ผลการศึกษาระดับภูมิคุ้มกันมีดังนี้

2.2.1 ปริมาณเม็ดเลือดแดงรวม (Total red blood cells)

ค่าเฉลี่ยปริมาณเม็ดเลือดแดงรวมของปลานิลชุดการทดลองที่ได้รับการเสริมแมนแนนโพลิแซ็กคาไรด์ในอาหารที่ระดับ 4 กรัม ต่ออาหาร 1 กิโลกรัม เป็นระยะเวลา 10 วัน มีค่าสูงกว่าปลานิลในชุดควบคุมและชุดการทดลองอื่น ๆ คือ $27.10 \pm 16.81 \times 10^8$ cells/ml แต่ไม่แสดงความแตกต่างทางสถิติ ($P > 0.05$) ระหว่างชุดควบคุมและชุดทดลอง เมื่อพิจารณาในวันที่ 20 ของการ

ได้รับการเสริมแมนแนนโอลิโกแซคคาไรด์ในอาหาร พบว่าปลานิลชุดการทดลองที่ได้รับการเสริมแมนแนนโอลิโกแซคคาไรด์ในอาหารที่ระดับ 4 กรัมและ 6 กรัม ต่ออาหาร 1 กิโลกรัม มีค่าเฉลี่ยปริมาณเม็ดเลือดแดงรวมเป็น $23.67 \pm 6.79 \times 10^8$ cells/ml และ $24.33 \pm 4.37 \times 10^8$ cells/ml ตามลำดับ ซึ่งสูงกว่าชุดควบคุมที่มีค่าเฉลี่ยเท่ากับ $21.43 \pm 8.43 \times 10^8$ cells/ml แต่ไม่แสดงความแตกต่างทางสถิติ ($P > 0.05$) ในขณะที่ค่าเฉลี่ยปริมาณเม็ดเลือดแดงรวมของปลานิลชุดการทดลองที่ได้รับการเสริมแมนแนนโอลิโกแซคคาไรด์ในอาหารที่ระดับ 2 กรัม ต่ออาหาร 1 กิโลกรัม มีค่าน้อยที่สุด คือ $17.31 \pm 5.87 \times 10^8$ cells/ml และมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$) เมื่อเปรียบเทียบกับระดับอื่น ๆ แต่ไม่แสดงความแตกต่างทางสถิติ ($P > 0.05$) กับชุดควบคุม ส่วนค่าเฉลี่ยปริมาณเม็ดเลือดแดงรวมของปลานิลที่ 30 วัน พบว่าปลานิลชุดการทดลองที่ได้รับการเสริมแมนแนนโอลิโกแซคคาไรด์ในอาหารที่ระดับ 6 กรัม ต่ออาหาร 1 กิโลกรัม มีค่าสูงกว่าปลานิลในชุดควบคุมและชุดการทดลองอื่น ๆ คือ $27.75 \pm 4.91 \times 10^8$ cells/ml แต่ไม่แสดงความแตกต่างทางสถิติ ($P > 0.05$) ระหว่างชุดควบคุมและชุดทดลองอื่น หลังจากหยุดให้อาหารทดลองเป็นระยะเวลา 10 วัน พบว่าค่าเฉลี่ยปริมาณเม็ดเลือดแดงรวมของปลานิลชุดการทดลองที่ได้รับการเสริมแมนแนนโอลิโกแซคคาไรด์ในอาหารที่ระดับ 4 กรัม ต่ออาหาร 1 กิโลกรัม มีค่าต่ำกว่าปลานิลในชุดควบคุมและชุดการทดลองอื่น ๆ คือ $16.05 \pm 2.65 \times 10^8$ cells/ml โดยพบความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$) เมื่อเปรียบเทียบกับชุดการทดลองที่ได้รับการเสริมแมนแนนโอลิโกแซคคาไรด์ในอาหารที่ระดับ 2 กรัม ต่ออาหาร 1 กิโลกรัม ที่มีค่าเป็น $21.18 \pm 4.37 \times 10^8$ cells/ml ซึ่งเป็นชุดการทดลองที่มีค่าสูงสุดในช่วงเวลานั้น แต่ไม่พบความแตกต่างทางสถิติ ($P > 0.05$) เมื่อเปรียบเทียบกับชุดควบคุมและชุดการทดลองที่ได้รับการเสริมแมนแนนโอลิโกแซคคาไรด์ในอาหารที่ระดับ 6 กรัม ต่ออาหาร 1 กิโลกรัม ที่มีค่าเฉลี่ยเป็น $19.44 \pm 3.62 \times 10^8$ cells/ml และ $18.09 \pm 5.68 \times 10^8$ cells/ml ตามลำดับ แต่เมื่อพิจารณาในวันที่ 20 ของการหยุดให้อาหารทดลอง พบว่าปลานิลที่เคยได้รับการเสริมแมนแนนโอลิโกแซคคาไรด์ในอาหารทุกชุดการทดลองมีค่าเฉลี่ยของปริมาณเม็ดเลือดแดงรวมใกล้เคียงกัน และสูงกว่าชุดควบคุม แต่ไม่แสดงความแตกต่างทางสถิติ ($P > 0.05$) (ตารางที่ 12 และภาพที่ 14)

ตารางที่ 12 ค่าเฉลี่ยปริมาณเม็ดเลือดแดงรวม (Total red blood cells) ของปลานิลที่ได้รับอาหารเสริมเมนแนน โอลิโกแซคคาไรด์ตามระดับและระยะเวลาที่กำหนด ($\times 10^8$ cells/ml)

ระยะเวลา	ชุดการทดลอง			
	ชุดการทดลองที่ 1	ชุดการทดลองที่ 2	ชุดการทดลองที่ 3	ชุดการทดลองที่ 4
10 วัน	20.37±6.99 ^a	17.50±7.51 ^a	27.10±16.81 ^a	19.76±4.31 ^a
20 วัน	21.43±8.43 ^{ab}	17.31±5.87 ^a	23.67±6.79 ^b	24.33±4.37 ^b
30 วัน	21.13±7.64 ^a	23.00±7.93 ^a	22.40±3.88 ^a	27.75±4.91 ^a
หยุดให้ 10 วัน	19.44±3.62 ^{ab}	21.18±4.37 ^b	16.05±2.65 ^a	18.09±5.68 ^{ab}
หยุดให้ 20 วัน	18.41±2.46 ^a	19.45±5.27 ^a	19.83±4.29 ^a	20.00±2.62 ^a

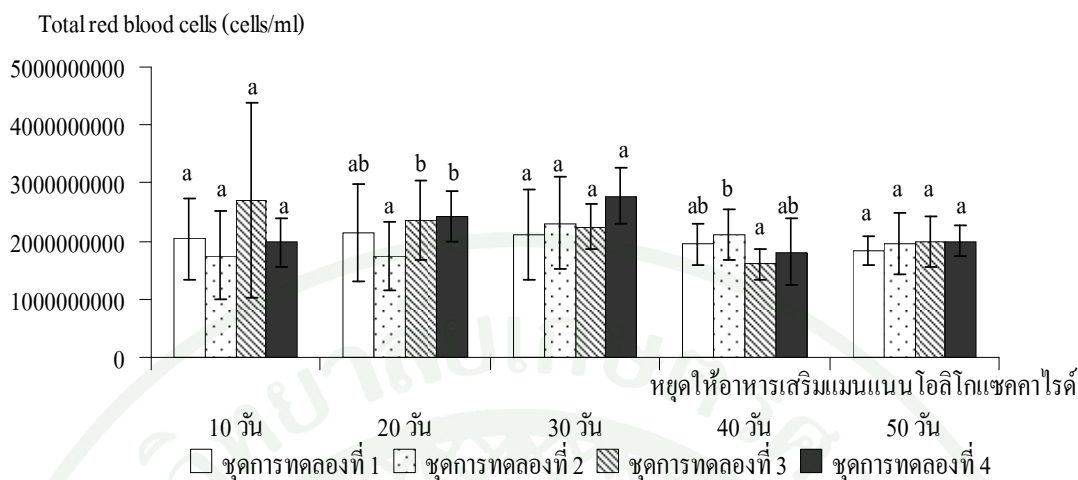
หมายเหตุ ค่าเฉลี่ยกำกับด้วยอักษรที่ต่างกันในแนวนอน มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$)

ชุดการทดลองที่ 1 ปลานิลเลี้ยงด้วยอาหารปลากินพืช (ชุดควบคุม)

ชุดการทดลองที่ 2 ปลานิลเลี้ยงด้วยอาหารปลากินพืชผสมเมนแนน โอลิโกแซคคาไรด์ 2 กรัม ต่ออาหาร 1 กิโลกรัม

ชุดการทดลองที่ 3 ปลานิลเลี้ยงด้วยอาหารปลากินพืชผสมเมนแนน โอลิโกแซคคาไรด์ 4 กรัม ต่ออาหาร 1 กิโลกรัม

ชุดการทดลองที่ 4 ปลานิลเลี้ยงด้วยอาหารปลากินพืชผสมเมนแนน โอลิโกแซคคาไรด์ 6 กรัม ต่ออาหาร 1 กิโลกรัม



ภาพที่ 14 ค่าเฉลี่ยปริมาณเม็ดเลือดแดงรวม (Total red blood cells) ของปลานิลที่ได้รับอาหารเสริมแมนแนน โอลิโกแซคคาไรด์ตามระดับและระยะเวลาที่กำหนด

2.2.2 ค่า Hematocrit

ค่า Hematocrit เฉลี่ยของปลานิลชุดการทดลองที่ได้รับการเสริมแมนแนน โอลิโกแซคคาไรด์ในอาหารที่ระดับ 4 กรัม ต่ออาหาร 1 กิโลกรัม ที่ระยะเวลา 10 และ 20 วัน มีค่าสูงกว่าปลานิลในชุดควบคุมและชุดการทดลองอื่น ๆ โดยมีค่า 19.500 ± 8.546 และ 22.080 ± 6.042 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับแต่ไม่แสดงความแตกต่างทางสถิติ ($P > 0.05$) เมื่อเปรียบเทียบกับชุดควบคุมและชุดทดลองอื่น ๆ ส่วนค่า Hematocrit เฉลี่ยของปลานิลที่ 30 วัน พบว่าปลานิลชุดการทดลองที่ได้รับการเสริมแมนแนน โอลิโกแซคคาไรด์ในอาหารที่ระดับ 6 กรัม ต่ออาหาร 1 กิโลกรัม มีค่าสูงกว่าปลานิลในชุดควบคุมและชุดการทดลองอื่น ๆ คือ 16.950 ± 5.710 เปอร์เซ็นต์ แต่ไม่แสดงความแตกต่างทางสถิติ ($P > 0.05$) เมื่อเปรียบเทียบกับชุดควบคุมและชุดทดลองอื่น ๆ หลังจากหยุดให้อาหารทดลองเป็นระยะเวลา 10 วัน พบว่าปลานิลชุดการทดลองที่ได้รับการเสริมแมนแนน โอลิโกแซคคาไรด์ในอาหารที่ระดับ 2 กรัม ต่ออาหาร 1 กิโลกรัม มีค่าเป็น 16.470 ± 4.679 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งสูงกว่าปลานิลในชุดควบคุมและชุดการทดลองที่ได้รับการเสริมแมนแนน โอลิโกแซคคาไรด์ในอาหารที่ระดับ 6 กรัม ต่ออาหาร 1 กิโลกรัม ที่มีค่าเป็น 15.030 ± 5.666 และ 12.900 ± 6.502 เปอร์เซ็นต์ แต่ไม่แสดงความแตกต่างทางสถิติ ($P > 0.05$) ในขณะที่แสดงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$) เมื่อเปรียบเทียบกับปลานิลชุดการทดลองที่ได้รับการเสริมแมนแนน โอลิโกแซคคาไรด์ในอาหารที่ระดับ 4 กรัม ต่ออาหาร 1 กิโลกรัม มีค่าเป็น 11.160 ± 3.472 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งน้อยกว่า

ปลานิลในชุดควบคุมและชุดการทดลองอื่น ๆ แต่เมื่อพิจารณาในวันที่ 20 ของการหยุดให้อาหารทดลอง พบว่าปลานิลที่เคยได้รับการเสริมเมนแนน โอลิโกแซคคาไรด์ในอาหารทุกชุดการทดลองมีค่า Hematocrit เฉลี่ยใกล้เคียงกันและสูงกว่าชุดควบคุม โดยปลานิลชุดการทดลองที่ได้รับการเสริมเมนแนน โอลิโกแซคคาไรด์ในอาหารที่ระดับ 6 กรัม ต่ออาหาร 1 กิโลกรัม มีค่าสูงสุด คือ 15.270 ± 5.251 เปอร์เซ็นต์ แต่ไม่พบความแตกต่างทางสถิติ ($P > 0.05$) เมื่อเปรียบเทียบกับชุดควบคุมและชุดทดลองอื่น ๆ (ตารางที่ 13 และภาพที่ 15)

ตารางที่ 13 ค่า Hematocrit เฉลี่ยของปลานิลที่ได้รับอาหารเสริมเมนแนน โอลิโกแซคคาไรด์ตามระดับและระยะเวลาที่กำหนด (เปอร์เซ็นต์)

ระยะเวลา	ชุดการทดลอง			
	ชุดการทดลองที่ 1	ชุดการทดลองที่ 2	ชุดการทดลองที่ 3	ชุดการทดลองที่ 4
10 วัน	14.633 ± 4.743^a	13.133 ± 5.817^a	19.500 ± 8.546^a	17.100 ± 6.380^a
20 วัน	19.200 ± 10.053^a	16.080 ± 7.447^a	22.080 ± 6.042^a	18.120 ± 5.248^a
30 วัน	15.330 ± 8.260^a	15.390 ± 8.610^a	15.650 ± 4.840^a	16.950 ± 5.710^a
หยุดให้ 10 วัน	15.030 ± 5.666^{ab}	16.470 ± 4.679^b	11.160 ± 3.472^a	12.900 ± 6.502^{ab}
หยุดให้ 20 วัน	13.013 ± 5.136^a	13.980 ± 5.896^a	14.400 ± 5.177^a	15.270 ± 5.251^a

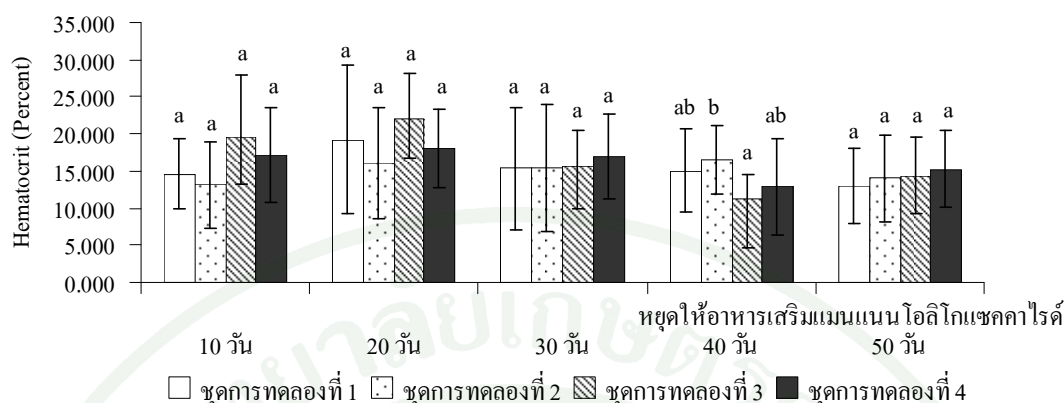
หมายเหตุ ค่าเฉลี่ยกำกับด้วยอักษรที่ต่างกันในแนวนอน มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$)

ชุดการทดลองที่ 1 ปลานิลเลี้ยงด้วยอาหารปลากินพืช (ชุดควบคุม)

ชุดการทดลองที่ 2 ปลานิลเลี้ยงด้วยอาหารปลากินพืชผสมเมนแนน โอลิโกแซคคาไรด์ 2 กรัม ต่ออาหาร 1 กิโลกรัม

ชุดการทดลองที่ 3 ปลานิลเลี้ยงด้วยอาหารปลากินพืชผสมเมนแนน โอลิโกแซคคาไรด์ 4 กรัม ต่ออาหาร 1 กิโลกรัม

ชุดการทดลองที่ 4 ปลานิลเลี้ยงด้วยอาหารปลากินพืชผสมเมนแนน โอลิโกแซคคาไรด์ 6 กรัม ต่ออาหาร 1 กิโลกรัม



ภาพที่ 15 ค่า Hematocrit เฉลี่ยของปลานิลที่ได้รับอาหารเสริมเมนแนน โอลิโกแซคคาไรด์ตามระดับและระยะเวลาที่กำหนด (เปอร์เซ็นต์)

2.2.3 ค่า Hemoglobin

ค่า Hemoglobin เฉลี่ยของปลานิลชุดการทดลองที่ได้รับการเสริมเมนแนน โอลิโกแซคคาไรด์ในอาหารที่ระดับ 2 กรัม ต่ออาหาร 1 กิโลกรัม ที่ระยะเวลา 10 วัน มีค่าสูงกว่าปลานิลในชุดควบคุมและชุดการทดลองอื่น ๆ เพียงเล็กน้อย คือ 6.267 ± 2.998 g/dL แต่ไม่แสดงความแตกต่างทางสถิติ ($P > 0.05$) เมื่อเปรียบเทียบกับชุดควบคุมและชุดทดลองอื่น ๆ ส่วนค่า Hemoglobin เฉลี่ยของปลานิลที่ 20 วัน และ 30 วัน พบว่าปลานิลชุดการทดลองที่ได้รับการเสริมเมนแนน โอลิโกแซคคาไรด์ในอาหารที่ระดับ 6 กรัม ต่ออาหาร 1 กิโลกรัม มีค่าสูงกว่าปลานิลในชุดควบคุมและชุดการทดลองอื่น ๆ คือ 8.490 ± 2.055 และ 8.610 ± 1.880 g/dL ตามลำดับ แต่ไม่แสดงความแตกต่างทางสถิติ ($P > 0.05$) เมื่อเปรียบเทียบกับชุดควบคุมและชุดทดลองอื่น ๆ และเมื่อพิจารณาในวันที่ 10 และ 20 ของการหุ้ให้อาหารทดลอง พบว่าปลานิลที่เคยได้รับการเสริมเมนแนน โอลิโกแซคคาไรด์ในอาหารมีค่า Hemoglobin เฉลี่ยลดลงเกือบทุกชุดการทดลองและใกล้เคียงกัน และไม่แสดงความแตกต่างทางสถิติ ($P > 0.05$) เมื่อเปรียบเทียบกับชุดควบคุมและชุดทดลองอื่น ๆ (ตารางที่ 14 และภาพที่ 16)

ตารางที่ 14 ค่า Hemoglobin เฉลี่ยของปลานิลที่ได้รับอาหารเสริมเมนแนนโอลิโกแซคคาไรด์ตามระดับและระยะเวลาที่กำหนด (g/dL)

ระยะเวลา	ชุดการทดลอง			
	ชุดการทดลองที่ 1	ชุดการทดลองที่ 2	ชุดการทดลองที่ 3	ชุดการทดลองที่ 4
10 วัน	6.267±2.875	6.267±2.998	6.000±1.885	6.257±1.753
20 วัน	7.200±3.575	6.060±2.399	7.560±2.087	8.490±2.055
30 วัน	6.230±2.330	6.360±3.170	6.540±2.420	8.610±1.880
หยุดให้ 10 วัน	6.000±1.241	6.510±1.371	5.100±1.327	6.030±2.211
หยุดให้ 20 วัน	5.138±0.870	5.200±1.324	5.610±0.917	5.730±1.253

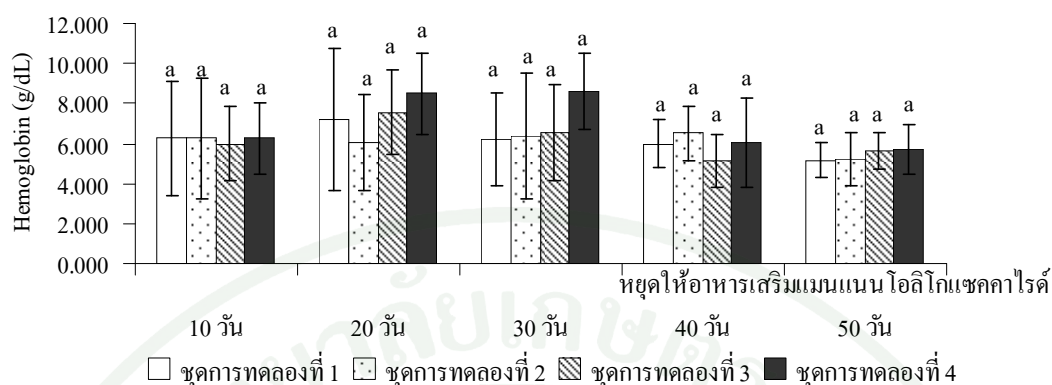
หมายเหตุ ไม่พบความแตกต่างทางสถิติ ($P>0.05$) ของค่าเฉลี่ยในแนวนอน

ชุดการทดลองที่ 1 ปลานิลเลี้ยงด้วยอาหารปลากินพืช (ชุดควบคุม)

ชุดการทดลองที่ 2 ปลานิลเลี้ยงด้วยอาหารปลากินพืชผสมเมนแนนโอลิโกแซคคาไรด์ 2 กรัม ต่ออาหาร 1 กิโลกรัม

ชุดการทดลองที่ 3 ปลานิลเลี้ยงด้วยอาหารปลากินพืชผสมเมนแนนโอลิโกแซคคาไรด์ 4 กรัม ต่ออาหาร 1 กิโลกรัม

ชุดการทดลองที่ 4 ปลานิลเลี้ยงด้วยอาหารปลากินพืชผสมเมนแนนโอลิโกแซคคาไรด์ 6 กรัม ต่ออาหาร 1 กิโลกรัม



ภาพที่ 16 ค่า Hemoglobin เฉลี่ยของปลานิลที่ได้รับอาหารเสริมแมนแนน โอลิโกแซคคาไรด์ตามระดับและระยะเวลาที่กำหนด (g/dL)

2.2.4 ปริมาณเม็ดเลือดขาวในกระแสเลือด (Peripheral blood leukocytes)

ค่าเฉลี่ยปริมาณเม็ดเลือดขาวในกระแสเลือดของปลานิลชุดควบคุม ที่ระยะเวลา 10 วัน มีค่าสูงกว่าปลานิลในชุดการทดลองอื่น ๆ คือ $30.13 \pm 12.22 \times 10^7$ cells/ml แต่ไม่แสดงความแตกต่างทางสถิติ ($P > 0.05$) กับทุกชุดทดลอง เมื่อพิจารณาในวันที่ 20 ของการได้รับการเสริมแมนแนน โอลิโกแซคคาไรด์ในอาหาร พบว่าปลานิลชุดการทดลองที่ได้รับการเสริมแมนแนน โอลิโกแซคคาไรด์ในอาหารที่ระดับ 6 กรัม ต่ออาหาร 1 กิโลกรัม มีค่าเฉลี่ยปริมาณเม็ดเลือดขาวในกระแสเลือดเป็น $33.76 \pm 8.30 \times 10^7$ cells/ml ซึ่งสูงกว่าชุดการทดลองอื่น และแสดงความแตกต่างทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญ ($P < 0.05$) เมื่อเปรียบเทียบกับชุดควบคุม และยังคงมีปริมาณสูงที่สุดเมื่อเข้าสู่วันที่ 30 ของการกินอาหารทดลอง โดยมีค่าเป็น $39.83 \pm 8.58 \times 10^7$ cells/ml แต่ไม่แสดงความแตกต่างทางสถิติ ($P > 0.05$) เมื่อเปรียบเทียบกับชุดควบคุมและชุดทดลองอื่น หลังจากหยุดให้อาหารทดลองเป็นระยะเวลา 10 วันและ 20 วัน พบว่าค่าเฉลี่ยปริมาณเม็ดเลือดขาวในกระแสเลือดของปลานิลชุดควบคุมและชุดการทดลองที่เคยได้รับการเสริมแมนแนน โอลิโกแซคคาไรด์ในอาหารทุกระดับ มีปริมาณเม็ดเลือดขาวในกระแสเลือดลดลง และไม่แสดงความแตกต่างทางสถิติ ($P > 0.05$) เมื่อเปรียบเทียบกับชุดควบคุมและชุดทดลองอื่น (ตารางที่ 15 และภาพที่ 17)

ตารางที่ 15 ค่าเฉลี่ยปริมาณเม็ดเลือดขาวในกระแสเลือด (Peripheral blood leukocytes) ของ
ปลานิลที่ได้รับอาหารเสริมเมนแนน โอลิโกแซคคาไรด์ตามระดับและระยะเวลาที่
กำหนด ($\times 10^7$ cells/ml)

ระยะเวลา	ชุดการทดลอง			
	ชุดการทดลองที่ 1	ชุดการทดลองที่ 2	ชุดการทดลองที่ 3	ชุดการทดลองที่ 4
10 วัน	30.13 $\pm$ 12.22 ^a	26.74 $\pm$ 13.05 ^a	26.40 $\pm$ 10.42 ^a	28.72 $\pm$ 9.22 ^a
20 วัน	22.42 $\pm$ 10.33 ^a	24.55 $\pm$ 10.27 ^{ab}	30.77 $\pm$ 11.29 ^{ab}	33.76 $\pm$ 8.30 ^b
30 วัน	31.87 $\pm$ 7.64 ^a	32.01 $\pm$ 12.52 ^a	33.41 $\pm$ 10.06 ^a	39.83 $\pm$ 8.58 ^a
หยุดให้ 10 วัน	25.72 $\pm$ 5.54 ^a	28.40 $\pm$ 7.08 ^a	23.51 $\pm$ 4.34 ^a	23.10 $\pm$ 9.25 ^a
หยุดให้ 20 วัน	24.60 $\pm$ 5.07 ^a	25.10 $\pm$ 8.70 ^a	24.61 $\pm$ 8.02 ^a	25.09 $\pm$ 6.33 ^a

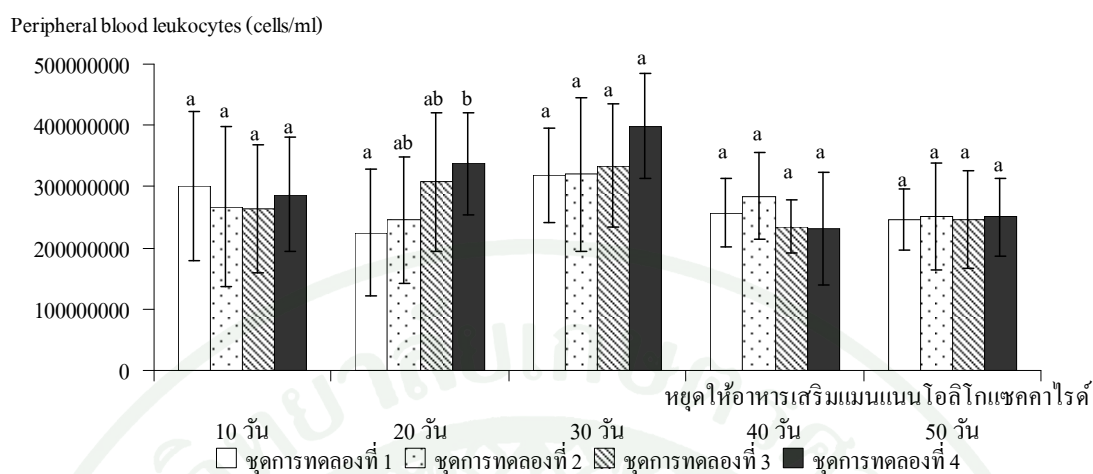
หมายเหตุ ค่าเฉลี่ยกำกับด้วยอักษรที่ต่างกันในแนวนอน มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$)

ชุดการทดลองที่ 1 ปลานิลเลี้ยงด้วยอาหารปลากินพืช (ชุดควบคุม)

ชุดการทดลองที่ 2 ปลานิลเลี้ยงด้วยอาหารปลากินพืชผสมเมนแนน โอลิโกแซคคาไรด์ 2 กรัม ต่ออาหาร 1 กิโลกรัม

ชุดการทดลองที่ 3 ปลานิลเลี้ยงด้วยอาหารปลากินพืชผสมเมนแนน โอลิโกแซคคาไรด์ 4 กรัม ต่ออาหาร 1 กิโลกรัม

ชุดการทดลองที่ 4 ปลานิลเลี้ยงด้วยอาหารปลากินพืชผสมเมนแนน โอลิโกแซคคาไรด์ 6 กรัม ต่ออาหาร 1 กิโลกรัม



ภาพที่ 17 ค่าเฉลี่ยปริมาณเม็ดเลือดขาวในกระแสเลือด (Peripheral blood leukocytes) ของปลานิลที่ได้รับอาหารเสริมแมนแนนโอลิโกแซคคาไรด์ตามระดับและระยะเวลาที่กำหนด ($\times 10^7$ cells/ml)

2.2.5 กิจกรรมการจับกินสิ่งแปลกปลอมของเซลล์เม็ดเลือดขาว (Phagocytic activity)

ค่าเฉลี่ย percent phagocytosis ของปลานิลที่ได้รับการเสริมแมนแนนโอลิโกแซคคาไรด์ในอาหารทุกหุคการทดลอง ที่ระยะเวลา 10, 20 และ 30 วัน มีค่าสูงกว่าหุคควบคุม โดยหุคการทดลองที่ได้รับการเสริมแมนแนนโอลิโกแซคคาไรด์ในอาหารที่ระดับ 6 กรัม ต่ออาหาร 1 กิโลกรัม มีค่าเฉลี่ย percent phagocytosis สูงที่สุดคือ 14.74 ± 16.26 , 18.54 ± 15.64 และ 37.40 ± 31.65 ตามลำดับ แต่ไม่แสดงความแตกต่างทางสถิติ ($P > 0.05$) เมื่อเปรียบเทียบกับหุคควบคุมและหุคทดลองอื่น หลังจากหุคให้อาหารทดลองเป็นระยะเวลา 10 วันและ 20 วัน พบว่าค่าเฉลี่ย percent phagocytosis มีค่าน้อยกว่าช่วงที่ได้รับอาหารทดลอง โดยที่หุคการทดลองที่เคยได้รับการเสริมแมนแนนโอลิโกแซคคาไรด์ในอาหารทุกหุคการทดลองมีค่าสูงกว่าหุคควบคุม โดยหุคการทดลองที่เคยได้รับการเสริมแมนแนนโอลิโกแซคคาไรด์ในอาหารที่ระดับ 6 กรัม ต่ออาหาร 1 กิโลกรัม มีค่าเฉลี่ย percent phagocytosis สูงที่สุดคือ 20.66 ± 13.36 และ 21.50 ± 13.40 ตามลำดับ แต่ไม่แสดงความแตกต่างทางสถิติ ($P > 0.05$) เมื่อเปรียบเทียบกับหุคควบคุมและหุคทดลองอื่น (ตารางที่ 16 และภาพที่ 18)

ตารางที่ 16 ค่าเฉลี่ย percent phagocytosis ของปลานิลที่ได้รับอาหารเสริมเมนแนนโอลิโกแซคคาไรด์ตามระดับและระยะเวลาที่กำหนด

ระยะเวลา	ชุดการทดลอง			
	ชุดการทดลองที่ 1	ชุดการทดลองที่ 2	ชุดการทดลองที่ 3	ชุดการทดลองที่ 4
10 วัน	9.62±11.87	13.92±9.11	11.07±15.30	14.74±16.26
20 วัน	14.92±11.97	17.44±9.48	16.39±13.71	18.54±15.64
30 วัน	33.55±28.90	34.90±20.10	36.70±20.60	37.40±31.65
หยุดให้ 10 วัน	17.35±2.98	19.90±7.26	20.21±17.39	20.66±13.36
หยุดให้ 20 วัน	14.90±3.35	18.45±7.26	18.20±14.35	21.50±13.40

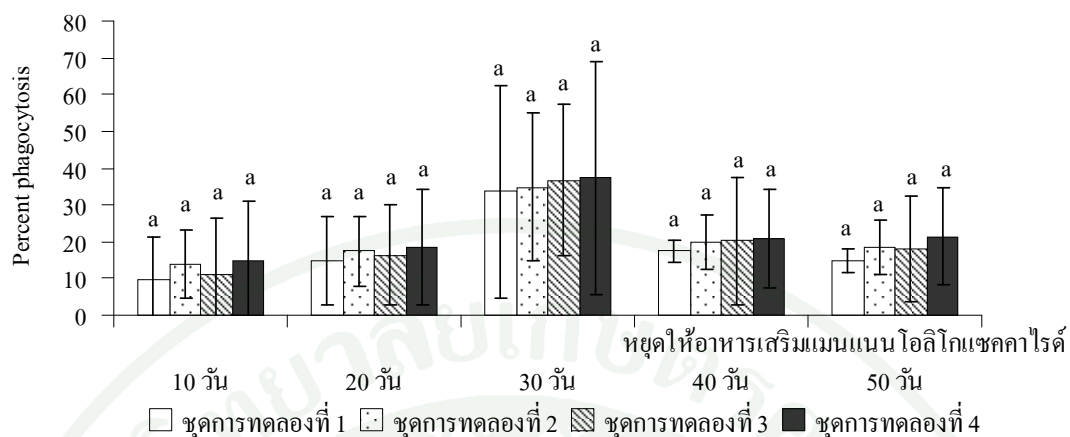
หมายเหตุ ไม่พบความแตกต่างทางสถิติ ($P>0.05$) ของค่าเฉลี่ยในแนวนอน

ชุดการทดลองที่ 1 ปลานิลเลี้ยงด้วยอาหารปลากินพืช (ชุดควบคุม)

ชุดการทดลองที่ 2 ปลานิลเลี้ยงด้วยอาหารปลากินพืชผสมเมนแนนโอลิโกแซคคาไรด์ 2 กรัม ต่ออาหาร 1 กิโลกรัม

ชุดการทดลองที่ 3 ปลานิลเลี้ยงด้วยอาหารปลากินพืชผสมเมนแนนโอลิโกแซคคาไรด์ 4 กรัม ต่ออาหาร 1 กิโลกรัม

ชุดการทดลองที่ 4 ปลานิลเลี้ยงด้วยอาหารปลากินพืชผสมเมนแนนโอลิโกแซคคาไรด์ 6 กรัม ต่ออาหาร 1 กิโลกรัม



ภาพที่ 18 ค่าเฉลี่ย percent phagocytosis ของปลานิลที่ได้รับอาหารเสริมแมลงเนน โอลิโกแซคคาไรด์ตามระดับและระยะเวลาที่กำหนด

2.2.6 ดัชนีกิจกรรมการจับกินสิ่งแปลกปลอมของเซลล์เม็ดเลือดขาว (Phagocytic index)

ค่าเฉลี่ย phagocytic index ของปลานิลที่ได้รับการเสริมแมลงเนน โอลิโกแซคคาไรด์ ในอาหารทุกชุดการทดลองที่ระยะเวลา 10, 20 และ 30 วัน มีค่าสูงกว่าชุดควบคุม โดยชุดการทดลองที่ได้รับการเสริมแมลงเนน โอลิโกแซคคาไรด์ในอาหารที่ระดับ 6 กรัม ต่ออาหาร 1 กิโลกรัม มีค่าเฉลี่ย phagocytic index สูงที่สุดคือ 4.83 ± 5.61 , 5.31 ± 4.61 และ 33.30 ± 28.49 ตามลำดับ แต่ไม่แสดงความแตกต่างทางสถิติ ($P > 0.05$) เมื่อเปรียบเทียบกับชุดควบคุมและชุดทดลองอื่น หลังจากหยุดให้อาหารทดลองเป็นระยะเวลา 10 วันและ 20 วัน พบว่าค่าเฉลี่ย phagocytic index มีค่าน้อยกว่าช่วงที่ได้รับอาหารทดลอง โดยที่ชุดการทดลองที่เคยได้รับการเสริมแมลงเนน โอลิโกแซคคาไรด์ในอาหารทุกชุดการทดลองมีค่าสูงกว่าชุดควบคุม โดยชุดการทดลองที่เคยได้รับการเสริมแมลงเนน โอลิโกแซคคาไรด์ในอาหารที่ระดับ 6 กรัม ต่ออาหาร 1 กิโลกรัม มีค่าเฉลี่ย phagocytic index สูงที่สุดคือ 6.00 ± 4.01 และ 7.46 ± 4.76 ตามลำดับ แต่ไม่แสดงความแตกต่างทางสถิติ ($P > 0.05$) เมื่อเปรียบเทียบกับชุดควบคุมและชุดทดลองอื่น (ตารางที่ 17 และภาพที่ 19)

ตารางที่ 17 ค่าเฉลี่ย phagocytic index ของปลานิลที่ได้รับอาหารเสริมเมนแนนโอลิโกแซคคาไรด์ตามระดับและระยะเวลาที่กำหนด

ระยะเวลา	ชุดการทดลอง			
	ชุดการทดลองที่ 1	ชุดการทดลองที่ 2	ชุดการทดลองที่ 3	ชุดการทดลองที่ 4
10 วัน	1.31±1.72	2.93±2.05	3.30±4.59	4.83±5.61
20 วัน	2.52±2.16	4.25±2.37	4.08±3.49	5.31±4.61
30 วัน	23.10±20.23	27.20±16.08	31.50±18.03	33.30±28.49
หยุดให้ 10 วัน	3.40±0.60	4.37±1.67	5.20±4.52	6.00±4.01
หยุดให้ 20 วัน	2.66±0.64	3.60±1.45	3.87±3.09	7.46±4.76

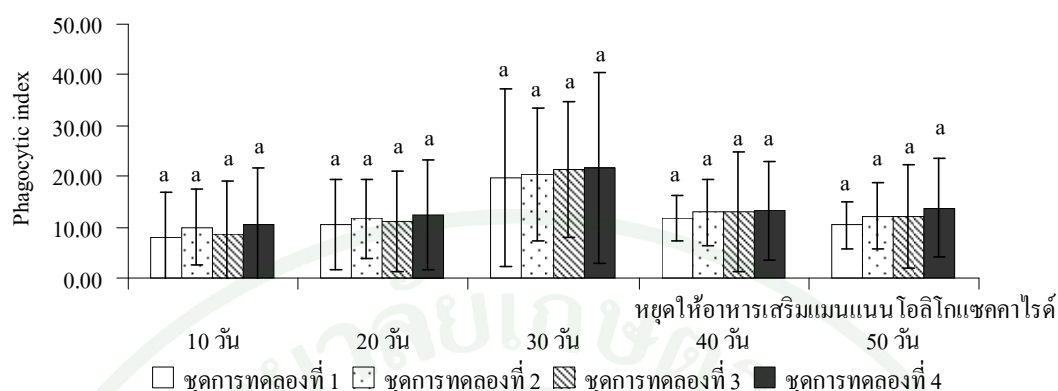
หมายเหตุ ไม่พบความแตกต่างทางสถิติ ($P>0.05$) ของค่าเฉลี่ยในแนวนอน

ชุดการทดลองที่ 1 ปลานิลเลี้ยงด้วยอาหารปลากินพืช (ชุดควบคุม)

ชุดการทดลองที่ 2 ปลานิลเลี้ยงด้วยอาหารปลากินพืชผสมเมนแนนโอลิโกแซคคาไรด์ 2 กรัม ต่ออาหาร 1 กิโลกรัม

ชุดการทดลองที่ 3 ปลานิลเลี้ยงด้วยอาหารปลากินพืชผสมเมนแนนโอลิโกแซคคาไรด์ 4 กรัม ต่ออาหาร 1 กิโลกรัม

ชุดการทดลองที่ 4 ปลานิลเลี้ยงด้วยอาหารปลากินพืชผสมเมนแนนโอลิโกแซคคาไรด์ 6 กรัม ต่ออาหาร 1 กิโลกรัม



ภาพที่ 19 ค่าเฉลี่ย phagocytic index ของปลานิลที่ได้รับอาหารเสริมเมนแนน โอลิโกแซคคาไรด์ตามระดับและระยะเวลาที่กำหนด

2.2.7 ปริมาณ Superoxide anion (O_2^-)

ค่าเฉลี่ย Superoxide anion (O.D.) ของปลานิลที่ได้รับการเสริมเมนแนน โอลิโกแซคคาไรด์ในอาหารทุกชุดการทดลอง ที่ระยะเวลา 10, 20 และ 30 วัน มีค่าสูงกว่าชุดควบคุม โดยชุดการทดลองที่ได้รับการเสริมเมนแนน โอลิโกแซคคาไรด์ในอาหารที่ระดับ 6 กรัม ต่ออาหาร 1 กิโลกรัม มีค่าเฉลี่ย superoxide anion สูงที่สุดคือ 0.295 ± 0.325 , 0.371 ± 0.313 และ 0.748 ± 0.633 ตามลำดับ แต่ไม่แสดงความแตกต่างทางสถิติ ($P > 0.05$) เมื่อเปรียบเทียบกับชุดควบคุมและชุดทดลองอื่น หลังจากหยุดให้อาหารทดลองเป็นระยะเวลา 10 วันและ 20 วัน พบว่าค่าเฉลี่ย superoxide anion มีค่าลดลง โดยที่ชุดการทดลองที่เคยได้รับการเสริมเมนแนน โอลิโกแซคคาไรด์ในอาหารทุกชุดการทดลองมีค่าสูงกว่าชุดควบคุม โดยชุดการทดลองที่เคยได้รับการเสริมเมนแนน โอลิโกแซคคาไรด์ในอาหารที่ระดับ 6 กรัม ต่ออาหาร 1 กิโลกรัม มีค่าเฉลี่ย superoxide anion สูงที่สุดคือ 0.413 ± 0.267 และ 0.430 ± 0.268 ตามลำดับ แต่ไม่แสดงความแตกต่างทางสถิติ ($P > 0.05$) เมื่อเปรียบเทียบกับชุดควบคุมและชุดทดลองอื่น (ตารางที่ 18 และภาพที่ 20)

ตารางที่ 18 ค่าเฉลี่ย superoxide anion ของปลานิลที่ได้รับอาหารเสริมเมนแนนโอลิโกแซคคาไรด์ตามระดับและระยะเวลาที่กำหนด (O.D.)

ระยะเวลา	ชุดการทดลอง			
	ชุดการทดลองที่ 1	ชุดการทดลองที่ 2	ชุดการทดลองที่ 3	ชุดการทดลองที่ 4
10 วัน	0.192±0.237	0.278±0.182	0.221±0.306	0.295±0.325
20 วัน	0.298±0.239	0.349±0.190	0.328±0.274	0.371±0.313
30 วัน	0.671±0.578	0.698±0.402	0.734±0.412	0.748±0.633
หยุดให้ 10 วัน	0.347±0.060	0.398±0.145	0.404±0.348	0.413±0.267
หยุดให้ 20 วัน	0.298±0.067	0.369±0.145	0.364±0.287	0.430±0.268

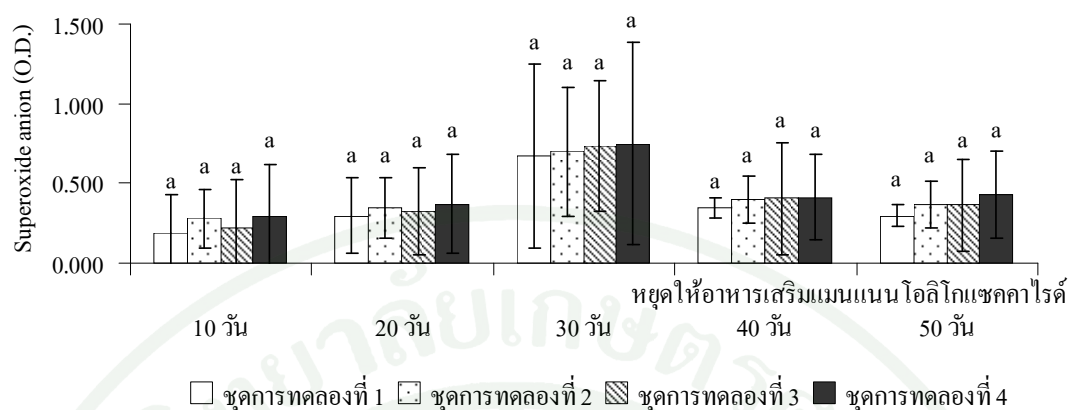
หมายเหตุ ไม่พบความแตกต่างทางสถิติ ($P>0.05$) ของค่าเฉลี่ยในแนวนอน

ชุดการทดลองที่ 1 ปลานิลเลี้ยงด้วยอาหารปลากินพืช (ชุดควบคุม)

ชุดการทดลองที่ 2 ปลานิลเลี้ยงด้วยอาหารปลากินพืชผสมเมนแนนโอลิโกแซคคาไรด์ 2 กรัม ต่ออาหาร 1 กิโลกรัม

ชุดการทดลองที่ 3 ปลานิลเลี้ยงด้วยอาหารปลากินพืชผสมเมนแนนโอลิโกแซคคาไรด์ 4 กรัม ต่ออาหาร 1 กิโลกรัม

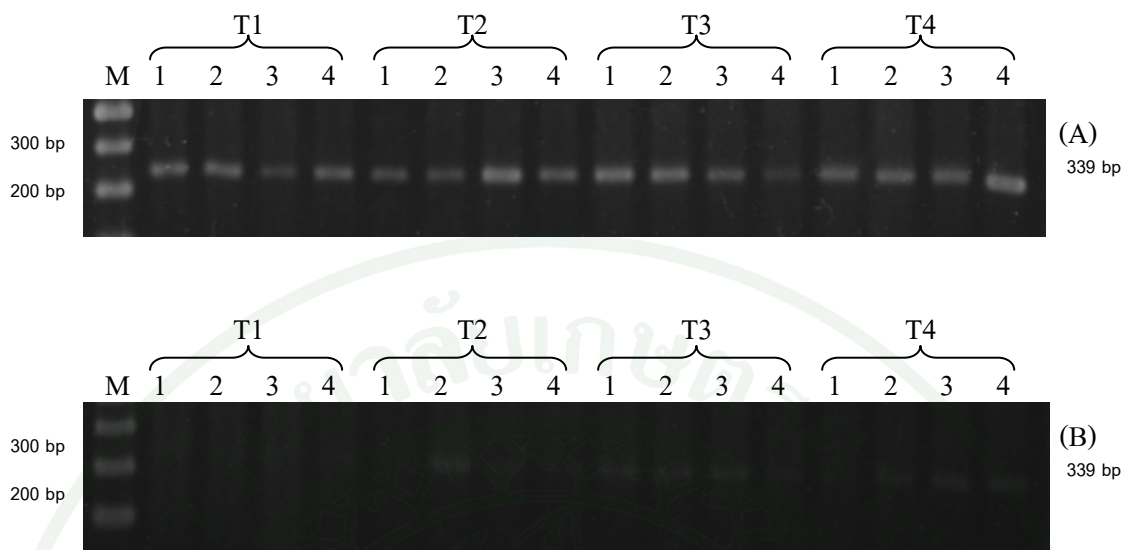
ชุดการทดลองที่ 4 ปลานิลเลี้ยงด้วยอาหารปลากินพืชผสมเมนแนนโอลิโกแซคคาไรด์ 6 กรัม ต่ออาหาร 1 กิโลกรัม



ภาพที่ 20 ค่าเฉลี่ย superoxide anion ของปลานิลที่ได้รับอาหารเสริมแมนแนน โอลิโกแซคคาไรด์ตามระดับและระยะเวลาที่กำหนด (O.D.)

การทดลองที่ 3 ศึกษาผลของแมนแนนโอลิโกแซคคาไรด์ต่อการแสดงออกของยีน Interleukin 1 β , Interleukin 8, Transforming growth factor β 1 และ Tumor necrosis factor α โดยใช้เทคนิค Semi-quantitative RT-PCR

จากการศึกษาการแสดงออกของยีน Interleukin 1 β , Interleukin 8, Transforming growth factor β 1 และ Tumor necrosis factor α จากไตส่วนหน้า (Head kidney) และม้าม (Spleen) ของปลานิลจากทุกชุดการทดลอง โดยใช้เทคนิค RT-PCR ซึ่งใช้ Gene specific primers ได้แก่ IL-1 β -F/IL-1 β -R, On-IL8 F/On-IL8 R, TGF- β F/TGF- β R และ TNF- α F/TNF- α R เป็น Forward และ Reverse primers ตามลำดับ (ตารางที่ 1) ผลปรากฏว่าเกิด Band ของ PCR product จากไตส่วนหน้าและม้าม ขนาด 339 bp เมื่อใช้ Primer คู่ที่ 1 (ภาพที่ 21A และ 21B) และ 256 bp เมื่อใช้ Primer คู่ที่ 2 (ภาพที่ 22A และ 22B) และ 359 bp เมื่อใช้ Primer คู่ที่ 3 (ภาพที่ 23A และ 23B) และ 499 bp เมื่อใช้ Primer คู่ที่ 4 (ภาพที่ 24A และ 24B) ตามลำดับ สำหรับยีน β -actin จากไตส่วนหน้าและม้าม ซึ่งเป็น House keeping gene ที่ใช้เป็น Internal control พบว่าเกิด Band ของ PCR product ขนาด 592 bp ดังแสดงในภาพที่ 25A และ 25B ตามลำดับ



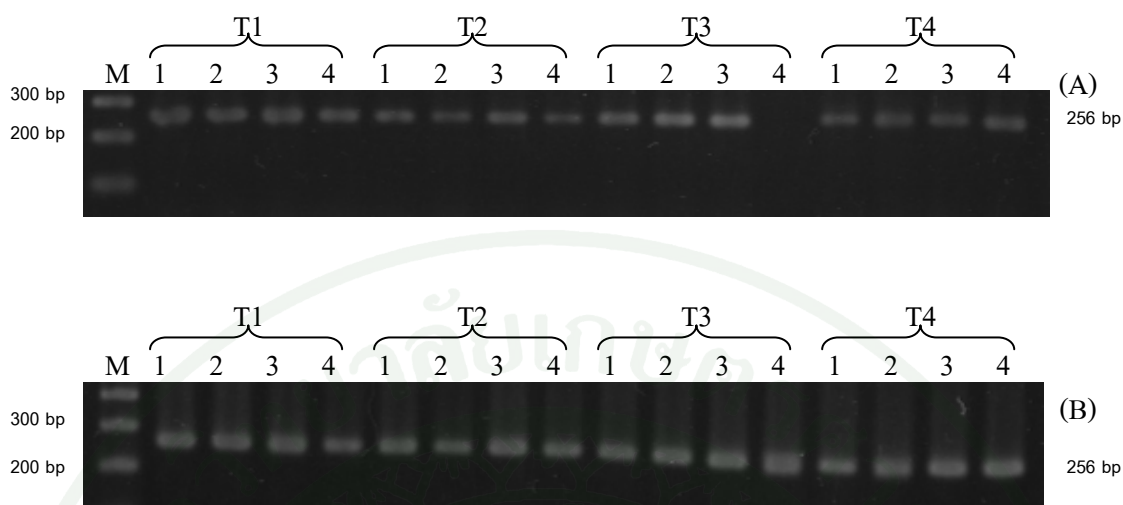
ภาพที่ 21 การแสดงออกของยีน Interleukin 1 β จากไตส่วนหน้าและม้ามของปลานิลจากทุกชุดการทดลอง ชุดการทดลองละ 4 ซ้ำ โดยใช้เทคนิค RT-PCR โดย A) และ B) คือ PCR product ขนาด 339 bp ของยีน Interleukin 1 β ของไตส่วนหน้าและม้าม ตามลำดับ (M; Marker)

T1 = ปลานิลเลี้ยงด้วยอาหารปลากินพืช (ชุดควบคุม)

T2 = ปลานิลเลี้ยงด้วยอาหารปลากินพืชผสมแมนแนนโอลิโกแซกคาไรด์ 2 กรัมต่ออาหาร 1 กิโลกรัม

T3 = ปลานิลเลี้ยงด้วยอาหารปลากินพืชผสมแมนแนนโอลิโกแซกคาไรด์ 4 กรัมต่ออาหาร 1 กิโลกรัม

T4 = ปลานิลเลี้ยงด้วยอาหารปลากินพืชผสมแมนแนนโอลิโกแซกคาไรด์ 6 กรัมต่ออาหาร 1 กิโลกรัม



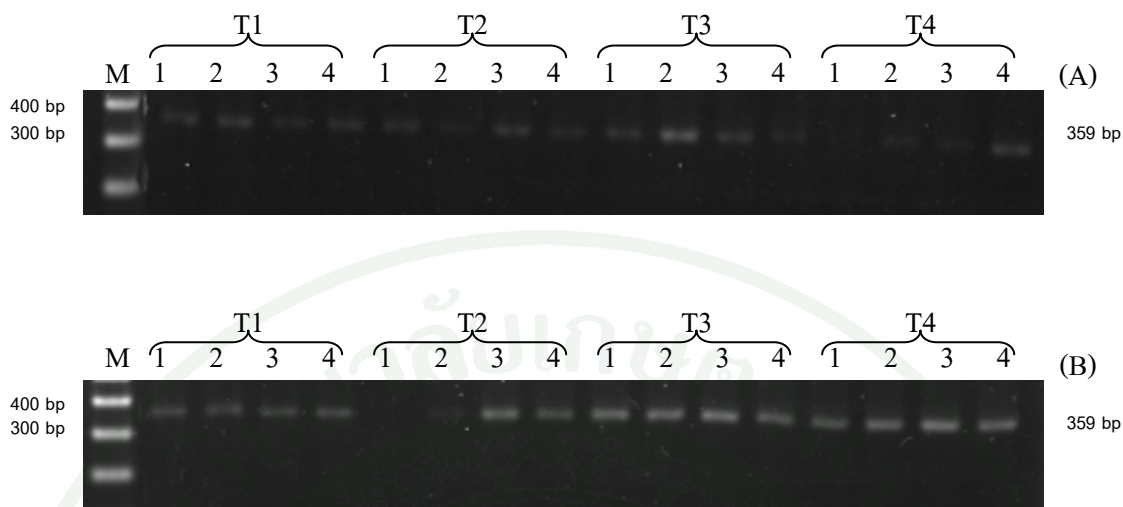
ภาพที่ 22 การแสดงออกของยีน Interleukin 8 จากไตส่วนหน้าและม้ามของปลานิลจาก
ทุกชุดการทดลอง ชุดการทดลองละ 4 ซ้ำ โดยใช้เทคนิค RT-PCR โดย A) และ B) คือ
PCR product ขนาด 256 bp ของยีน Interleukin 8 ของไตส่วนหน้าและม้าม ตามลำดับ
(M; Marker)

T1 = ปลานิลเลี้ยงด้วยอาหารปลากินพืช (ชุดควบคุม)

T2 = ปลานิลเลี้ยงด้วยอาหารปลากินพืชผสมแมนแนน โอลิโกแซคคาไรด์ 2 กรัม
ต่ออาหาร 1 กิโลกรัม

T3 = ปลานิลเลี้ยงด้วยอาหารปลากินพืชผสมแมนแนน โอลิโกแซคคาไรด์ 4 กรัม
ต่ออาหาร 1 กิโลกรัม

T4 = ปลานิลเลี้ยงด้วยอาหารปลากินพืชผสมแมนแนน โอลิโกแซคคาไรด์ 6 กรัม
ต่ออาหาร 1 กิโลกรัม



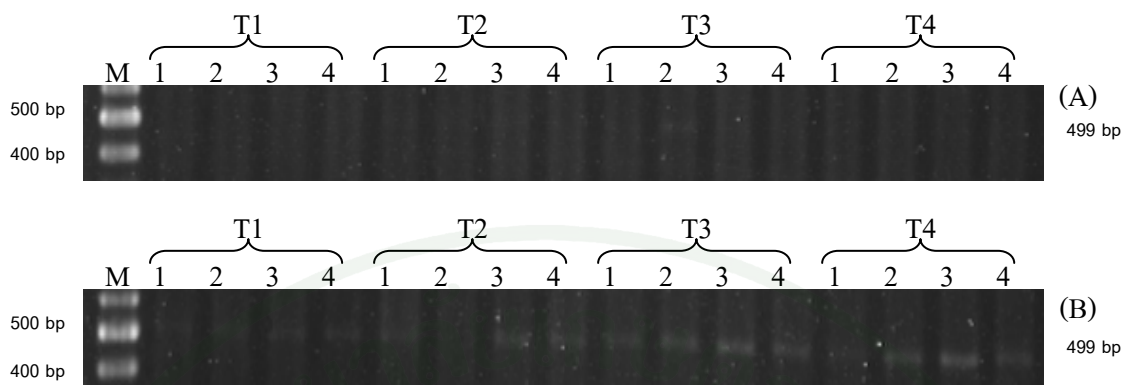
ภาพที่ 23 การแสดงออกของยีน Transforming growth factor β 1 จากไตส่วนหน้าและม้ามของ ปลานิลจากทุกชุดการทดลอง ชุดการทดลองละ 4 ซ้ำ โดยใช้เทคนิค RT-PCR โดย A) และ B) คือ PCR product ขนาด 359 bp ของยีน Transforming growth factor β 1 ของ ไตส่วนหน้าและม้าม ตามลำดับ (M; Marker)

T1 = ปลานิลเลี้ยงด้วยอาหารปลากินพืช (ชุดควบคุม)

T2 = ปลานิลเลี้ยงด้วยอาหารปลากินพืชผสมเมนแนนโอลิโกแซกคาไรด์ 2 กรัม
ต่ออาหาร 1 กิโลกรัม

T3 = ปลานิลเลี้ยงด้วยอาหารปลากินพืชผสมเมนแนนโอลิโกแซกคาไรด์ 4 กรัม
ต่ออาหาร 1 กิโลกรัม

T4 = ปลานิลเลี้ยงด้วยอาหารปลากินพืชผสมเมนแนนโอลิโกแซกคาไรด์ 6 กรัม
ต่ออาหาร 1 กิโลกรัม



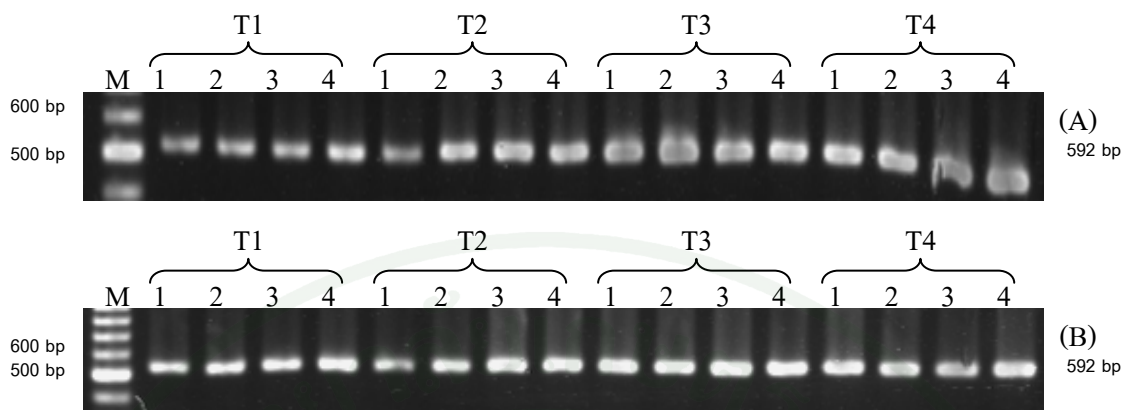
ภาพที่ 24 การแสดงออกของยีน Tumor necrosis factor α จากไตส่วนหน้าและม้ามของปลานิลจากทุกชุดการทดลอง ชุดการทดลองละ 4 ซ้ำ โดยใช้เทคนิค RT-PCR โดย A) และ B) คือ PCR product ขนาด 499 bp ของยีน Tumor necrosis factor α ของไตส่วนหน้าและม้ามตามลำดับ (M; Marker)

T1 = ปลานิลเลี้ยงด้วยอาหารปลากินพืช (ชุดควบคุม)

T2 = ปลานิลเลี้ยงด้วยอาหารปลากินพืชผสมแมนแนนโอลิโกแซกคาไรด์ 2 กรัมต่ออาหาร 1 กิโลกรัม

T3 = ปลานิลเลี้ยงด้วยอาหารปลากินพืชผสมแมนแนนโอลิโกแซกคาไรด์ 4 กรัมต่ออาหาร 1 กิโลกรัม

T4 = ปลานิลเลี้ยงด้วยอาหารปลากินพืชผสมแมนแนนโอลิโกแซกคาไรด์ 6 กรัมต่ออาหาร 1 กิโลกรัม



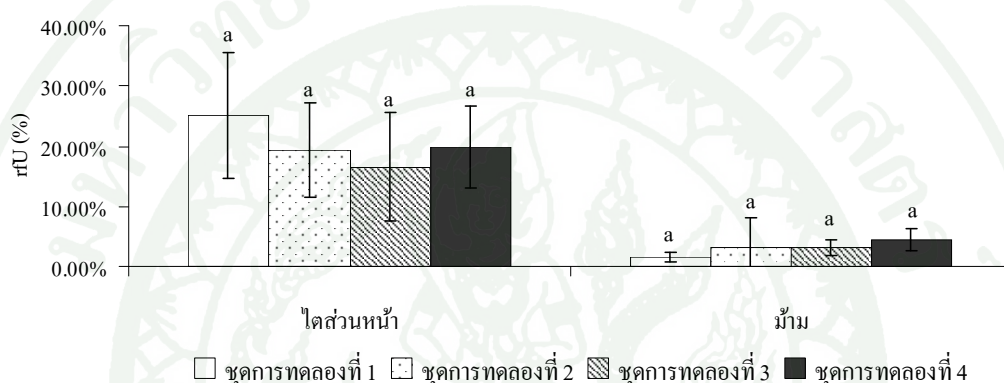
ภาพที่ 25 การแสดงออกของยีน β -actin จากไตส่วนหน้าและม้ามของปลานิลจาก
 ทุกชุดการทดลอง ชุดการทดลองละ 4 ซ้ำ โดยใช้เทคนิค RT-PCR โดย A) และ B) คือ
 PCR product ขนาด 592 bp ของยีน β -actin ของไตส่วนหน้าและม้าม ตามลำดับ
 ซึ่งใช้เป็น Internal control (M; Marker)
 T1 = ปลานิลเลี้ยงด้วยอาหารปลากินพืช (ชุดควบคุม)
 T2 = ปลานิลเลี้ยงด้วยอาหารปลากินพืชผสมแมนแนนโอลิโกแซคคาไรด์ 2 กรัม
 ต่ออาหาร 1 กิโลกรัม
 T3 = ปลานิลเลี้ยงด้วยอาหารปลากินพืชผสมแมนแนนโอลิโกแซคคาไรด์ 4 กรัม
 ต่ออาหาร 1 กิโลกรัม
 T4 = ปลานิลเลี้ยงด้วยอาหารปลากินพืชผสมแมนแนนโอลิโกแซคคาไรด์ 6 กรัม
 ต่ออาหาร 1 กิโลกรัม

จากนั้นนำข้อมูลที่ได้นำวิเคราะห์ระดับการแสดงออกตามวิธีของ (Flach *et al.*, 1998) โดยใช้โปรแกรม SynGene Genetools version 3.08.01 ในการวิเคราะห์ ทำการ Normalize ระดับการแสดงออกของยีนด้วยจำนวนของ β actin ค่าที่ได้ออกมาคือ relative fluorescence units/rfU (%) ดังนี้

1.1 Interleukin 1 β

การแสดงออกของยีน Interleukin 1 β ที่ไตส่วนหน้าของปลานิลชุดควบคุมมีการแสดงออกสูงสุดคือ 25.11 ± 10.56 เปอร์เซ็นต์ เมื่อเปรียบเทียบกับชุดการทดลองที่ได้รับการเสริมแมนแนนโอลิโกแซคคาไรด์ในอาหารที่ระดับ 2, 4 และ 6 กรัม ต่ออาหาร 1 กิโลกรัม ซึ่งมีค่าเป็น 19.45 ± 7.83 , 16.49 ± 9.01 และ 19.77 ± 6.77 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ แต่ไม่แสดงความแตกต่างทางสถิติ

($P>0.05$) ในขณะที่การแสดงออกของยีน Interleukin 1 β ที่ม้าม พบว่าชุดการทดลองที่ได้รับการเสริมแมนแนนโอลิโกแซคคาไรด์ในอาหารที่ระดับ 6 กรัม ต่ออาหาร 1 กิโลกรัม มีการแสดงออกสูงสุดคือ 4.40 ± 1.89 เปอร์เซ็นต์ รองลงมาคือชุดการทดลองที่ได้รับการเสริมแมนแนนโอลิโกแซคคาไรด์ในอาหารที่ระดับ 2 กรัม และ 4 กรัม ต่ออาหาร 1 กิโลกรัม ซึ่งมีค่าเป็น 3.26 ± 4.94 และ 3.21 ± 1.32 เปอร์เซ็นต์ และชุดควบคุมซึ่งมีค่าการแสดงออกต่ำที่สุด คือ 1.62 ± 0.77 เปอร์เซ็นต์ แต่ไม่พบว่ามีความแตกต่างทางสถิติ ($P>0.05$) ดังภาพที่ 26



ภาพที่ 26 ค่าเฉลี่ย relative fluorescence units ของยีน Interleukin 1 β ในปลานิลที่ได้รับอาหารเสริมแมนแนนโอลิโกแซคคาไรด์ที่ระดับแตกต่างกัน

หมายเหตุ ไม่พบความแตกต่างทางสถิติ ($P>0.05$) ของการแสดงออกของยีน Interleukin 1 β

ชุดการทดลองที่ 1 ปลานิลเลี้ยงด้วยอาหารปลาอินพีช (ชุดควบคุม)

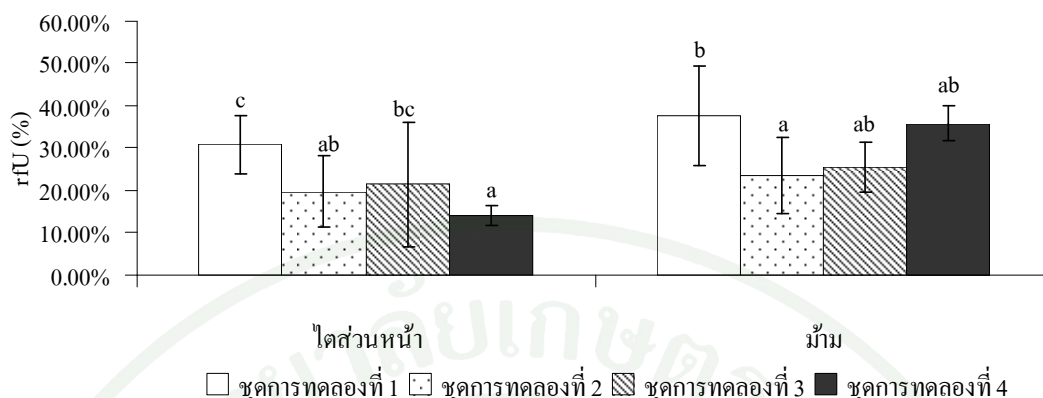
ชุดการทดลองที่ 2 ปลานิลเลี้ยงด้วยอาหารปลาอินพีชผสมแมนแนนโอลิโกแซคคาไรด์ 2 กรัม ต่ออาหาร 1 กิโลกรัม

ชุดการทดลองที่ 3 ปลานิลเลี้ยงด้วยอาหารปลาอินพีชผสมแมนแนนโอลิโกแซคคาไรด์ 4 กรัม ต่ออาหาร 1 กิโลกรัม

ชุดการทดลองที่ 4 ปลานิลเลี้ยงด้วยอาหารปลาอินพีชผสมแมนแนนโอลิโกแซคคาไรด์ 6 กรัม ต่ออาหาร 1 กิโลกรัม

1.2 Interleukin 8

การแสดงออกของยีน Interleukin 8 ที่ไตส่วนหน้าของปลานิลชุดควบคุมมีการแสดงออกสูงสุดคือ 30.84 ± 6.95 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งพบว่าการแสดงออกนั้นมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$) เมื่อเปรียบเทียบกับชุดการทดลองที่ได้รับการเสริมแมนแนนโอลิโกแซคคาไรด์ในอาหารที่ระดับ 2 กรัม และ 6 กรัม ต่ออาหาร 1 กิโลกรัม ซึ่งมีค่าเป็น 19.79 ± 8.49 และ 14.20 ± 2.46 เปอร์เซ็นต์ แต่ไม่พบความแตกต่างทางสถิติ ($P > 0.05$) เมื่อเปรียบเทียบกับชุดการทดลองที่ได้รับการเสริมแมนแนนโอลิโกแซคคาไรด์ในอาหารที่ระดับ 4 กรัม ต่ออาหาร 1 กิโลกรัม ซึ่งมีค่าเป็น 21.47 ± 14.62 เปอร์เซ็นต์ ในขณะที่การแสดงออกของยีน Interleukin 8 ที่ม้าม พบว่าชุดการทดลองที่ได้รับการเสริมแมนแนนโอลิโกแซคคาไรด์ในอาหารที่ระดับ 2 กรัม ต่ออาหาร 1 กิโลกรัม มีการแสดงออกน้อยที่สุด คือ 23.55 ± 8.91 เปอร์เซ็นต์ และมีความแตกต่างทางสถิติ ($P < 0.05$) เมื่อเปรียบเทียบกับชุดควบคุม ซึ่งมีการแสดงออกสูงสุดคือ 37.71 ± 11.88 เปอร์เซ็นต์ แต่ไม่พบความแตกต่างทางสถิติ ($P > 0.05$) เมื่อเปรียบเทียบกับชุดการทดลองที่ได้รับการเสริมแมนแนนโอลิโกแซคคาไรด์ในอาหารที่ระดับ 4 กรัม และ 6 กรัม ต่ออาหาร 1 กิโลกรัม ซึ่งมีค่าเป็น 25.47 ± 5.94 และ 35.74 ± 4.16 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ ดังภาพที่ 27



ภาพที่ 27 ค่าเฉลี่ย relative fluorescence units ของยีน Interleukin 8 ในปลานิลที่ได้รับอาหารเสริมแมนแนนโอลิโกแซคคาไรด์ที่ระดับแตกต่างกัน

หมายเหตุ ค่าเฉลี่ยที่มีอักษรกำกับต่างกันมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$)

ชุดการทดลองที่ 1 ปลานิลเลี้ยงด้วยอาหารปลากินพืช (ชุดควบคุม)

ชุดการทดลองที่ 2 ปลานิลเลี้ยงด้วยอาหารปลากินพืชผสมแมนแนนโอลิโกแซคคาไรด์ 2 กรัม ต่ออาหาร 1 กิโลกรัม

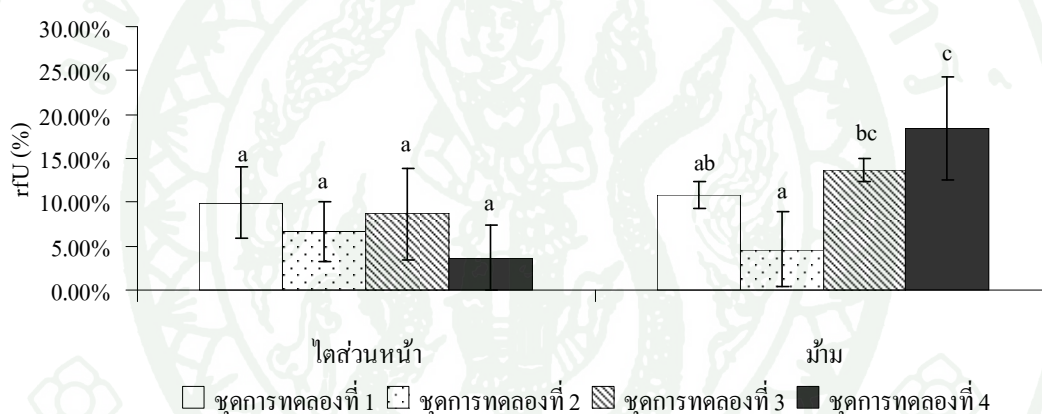
ชุดการทดลองที่ 3 ปลานิลเลี้ยงด้วยอาหารปลากินพืชผสมแมนแนนโอลิโกแซคคาไรด์ 4 กรัม ต่ออาหาร 1 กิโลกรัม

ชุดการทดลองที่ 4 ปลานิลเลี้ยงด้วยอาหารปลากินพืชผสมแมนแนนโอลิโกแซคคาไรด์ 6 กรัม ต่ออาหาร 1 กิโลกรัม

1.3 Transforming growth factor β 1

การแสดงออกของยีน Transforming growth factor β 1 ที่ใต้อาหารเสริมของปลานิลชุดควบคุมมีการแสดงออกสูงสุดคือ 9.91 ± 4.09 เปอร์เซ็นต์ เมื่อเปรียบเทียบกับชุดการทดลองที่ได้รับการเสริมแมนแนนโอลิโกแซคคาไรด์ในอาหารที่ระดับ 2, 4 และ 6 กรัม ต่ออาหาร 1 กิโลกรัม ซึ่งมีค่าเป็น 6.60 ± 3.41 , 8.65 ± 5.19 และ 3.69 ± 3.73 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ แต่ไม่แสดงความแตกต่างทางสถิติ ($P > 0.05$) ในขณะที่การแสดงออกของยีน Transforming growth factor β 1 ที่ไม่เสริม พบว่าชุดการทดลองที่ได้รับการเสริมแมนแนนโอลิโกแซคคาไรด์ในอาหารที่ระดับ 2 กรัม ต่ออาหาร 1 กิโลกรัม มีการแสดงออกน้อยที่สุดคือ 4.61 ± 4.24 เปอร์เซ็นต์ แต่ไม่พบความแตกต่างทางสถิติ

($P>0.05$) เมื่อเปรียบเทียบกับชุดควบคุม ซึ่งมีการแสดงออกเท่ากับ 10.89 ± 1.54 เปอร์เซ็นต์ สำหรับชุดการทดลองที่ได้รับการเสริมแมนแนน โอลิโกแซคคาไรด์ในอาหารที่ระดับ 4 กรัม ต่ออาหาร 1 กิโลกรัม มีการแสดงออกมากกว่าชุดควบคุม แต่ไม่พบความแตกต่างทางสถิติ ($P>0.05$) คือ 13.69 ± 1.27 เปอร์เซ็นต์ ในขณะที่ชุดการทดลองที่ได้รับการเสริมแมนแนน โอลิโกแซคคาไรด์ในอาหารที่ระดับ 6 กรัม ต่ออาหาร 1 กิโลกรัม มีการแสดงออกสูงที่สุด ($P<0.05$) คือ 18.45 ± 5.88 เปอร์เซ็นต์ และมีความแตกต่างทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบกับชุดควบคุมและชุดการทดลองที่ได้รับการเสริมแมนแนน โอลิโกแซคคาไรด์ในอาหารที่ระดับ 2 กรัม ต่ออาหาร 1 กิโลกรัม ($P<0.05$) แต่ไม่พบความแตกต่างทางสถิติ ($P>0.05$) เมื่อเปรียบเทียบกับชุดการทดลองที่ได้รับการเสริมแมนแนน โอลิโกแซคคาไรด์ในอาหารที่ระดับ 4 กรัม ต่ออาหาร 1 กิโลกรัม (ภาพที่ 28)



ภาพที่ 28 ค่าเฉลี่ย relative fluorescence units ของยีน Transforming growth factor β 1 ในปลานิลที่ได้รับอาหารเสริมแมนแนน โอลิโกแซคคาไรด์ที่ระดับแตกต่างกัน

หมายเหตุ ค่าเฉลี่ยที่มีอักษรกำกับต่างกันมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.05$)

ชุดการทดลองที่ 1 ปลานิลเลี้ยงด้วยอาหารปลาอินพีช (ชุดควบคุม)

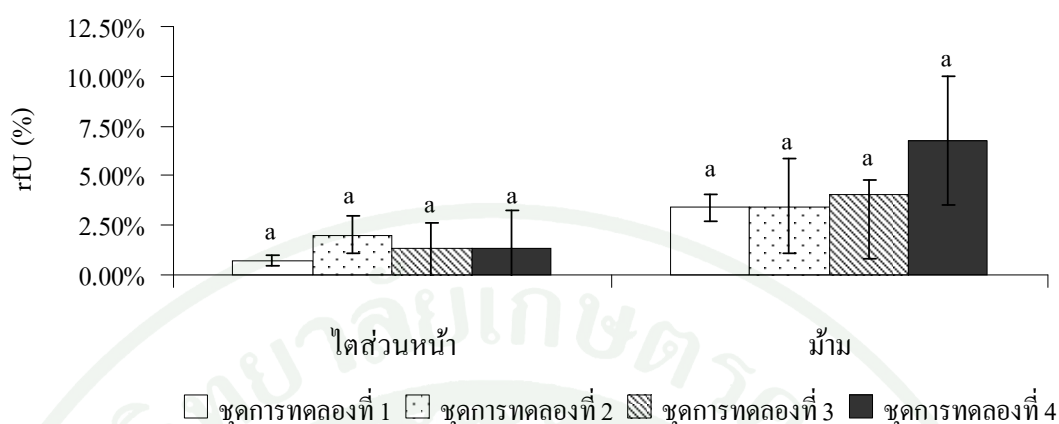
ชุดการทดลองที่ 2 ปลานิลเลี้ยงด้วยอาหารปลาอินพีชผสมแมนแนน โอลิโกแซคคาไรด์ 2 กรัม ต่ออาหาร 1 กิโลกรัม

ชุดการทดลองที่ 3 ปลานิลเลี้ยงด้วยอาหารปลาอินพีชผสมแมนแนน โอลิโกแซคคาไรด์ 4 กรัม ต่ออาหาร 1 กิโลกรัม

ชุดการทดลองที่ 4 ปลานิลเลี้ยงด้วยอาหารปลาอินพีชผสมแมนแนน โอลิโกแซคคาไรด์ 6 กรัม ต่ออาหาร 1 กิโลกรัม

1.4 Tumor necrosis factor α

การแสดงออกของยีน Tumor necrosis factor α ที่ไตส่วนหน้าของปลานิลชุดควบคุมมีการแสดงออกน้อยที่สุดคือ 0.75 ± 0.27 เปอร์เซ็นต์ เมื่อเปรียบเทียบกับชุดการทดลองที่ได้รับการเสริมเมนแนนโอลิโกแซคคาไรด์ในอาหารที่ระดับ 4 และ 6 กรัม ต่ออาหาร 1 กิโลกรัม ซึ่งมีค่าเป็น 1.36 ± 1.26 และ 1.31 ± 1.93 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ ในขณะที่ชุดการทดลองที่ได้รับการเสริมเมนแนนโอลิโกแซคคาไรด์ในอาหารที่ระดับ 2 กรัม ต่ออาหาร 1 กิโลกรัม มีการแสดงออกสูงที่สุด คือ 2.02 ± 0.94 เปอร์เซ็นต์ แต่ไม่แสดงความแตกต่างทางสถิติ ($P > 0.05$) ในขณะที่การแสดงออกของยีน Tumor necrosis factor α ที่ม้าม พบว่าชุดการทดลองที่ได้รับการเสริมเมนแนนโอลิโกแซคคาไรด์ในอาหารที่ระดับ 6 กรัม ต่ออาหาร 1 กิโลกรัม มีการแสดงออกสูงที่สุดคือ 6.77 ± 3.24 เปอร์เซ็นต์ รองลงมาคือชุดการทดลองที่ได้รับการเสริมเมนแนนโอลิโกแซคคาไรด์ในอาหารที่ระดับ 4 กรัม และ 2 กรัม ต่ออาหาร 1 กิโลกรัม ซึ่งมีค่าเป็น 4.07 ± 0.68 และ 3.44 ± 2.37 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ สำหรับชุดควบคุมพบว่ามีค่าการแสดงออกน้อยที่สุดคือ 3.38 ± 0.68 เปอร์เซ็นต์ แต่ไม่พบว่ามี ความแตกต่างทางสถิติ ($P > 0.05$) ดังภาพที่ 29



ภาพที่ 29 ค่าเฉลี่ย relative fluorescence units ของยีน Tumor necrosis factor α ในปลานิลที่ได้รับอาหารเสริมเมนแนนโอลิโกแซคคาไรด์ที่ระดับแตกต่างกัน

หมายเหตุ ไม่พบความแตกต่างทางสถิติ ($P > 0.05$) ของการแสดงออกของยีน Tumor necrosis factor α

ชุดการทดลองที่ 1 ปลานิลเลี้ยงด้วยอาหารปลากินพืช (ชุดควบคุม)

ชุดการทดลองที่ 2 ปลานิลเลี้ยงด้วยอาหารปลากินพืชผสมเมนแนนโอลิโกแซคคาไรด์ 2 กรัม ต่ออาหาร 1 กิโลกรัม

ชุดการทดลองที่ 3 ปลานิลเลี้ยงด้วยอาหารปลากินพืชผสมเมนแนนโอลิโกแซคคาไรด์ 4 กรัม ต่ออาหาร 1 กิโลกรัม

ชุดการทดลองที่ 4 ปลานิลเลี้ยงด้วยอาหารปลากินพืชผสมเมนแนนโอลิโกแซคคาไรด์ 6 กรัม ต่ออาหาร 1 กิโลกรัม

วิจารณ์ผลการศึกษา

การศึกษาระดับที่เหมาะสมของแมนแนนโอลิโกแซคคาไรด์ต่อการเจริญเติบโต อัตรารอด และความต้านทานต่อเชื้อแบคทีเรีย *Streptococcus agalactiae* ของลูกปลานิล

จากการศึกษาครั้งนี้พบว่า การให้อาหารเสริมแมนแนนโอลิโกแซคคาไรด์ที่ระดับ 4 กรัม และ 6 กรัม ต่ออาหาร 1 กิโลกรัม มีผลให้ลูกปลานิลแปลงเพศที่อัตราปล่อย 100, 200 และ 300 ตัว ต่อตู้มีค่าเฉลี่ยของน้ำหนักและความยาวมาตรฐานสูงกว่าชุดควบคุมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$) โดยที่อัตราปล่อย 100 ตัวต่อตู้ ลูกปลาที่ได้รับการเสริมแมนแนนโอลิโกแซคคาไรด์ที่ระดับ 2 กรัม ต่ออาหาร 1 กิโลกรัม มีค่าเฉลี่ยของน้ำหนักและความยาวมาตรฐานต่ำกว่าลูกปลาที่ได้รับการเสริมแมนแนนโอลิโกแซคคาไรด์ที่ระดับ 4 กรัม และ 6 กรัม ต่ออาหาร 1 กิโลกรัม อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$) ด้วยเช่นกัน ในขณะที่อัตราปล่อย 200 และ 300 ตัวต่อตู้ พบว่าการให้อาหารเสริมแมนแนนโอลิโกแซคคาไรด์ที่ระดับ 2 กรัม ต่ออาหาร 1 กิโลกรัม นั้นไม่มีความแตกต่างทางสถิติ ($P > 0.05$) กับชุดควบคุมและชุดการทดลองที่ได้รับการเสริมแมนแนนโอลิโกแซคคาไรด์ที่ระดับ 4 กรัม และ 6 กรัม ต่ออาหาร 1 กิโลกรัม เมื่อพิจารณาถึงอัตราการเจริญเติบโตต่อวันของลูกปลานิล พบว่าที่อัตราปล่อย 100 ตัวต่อตู้ การให้อาหารเสริมแมนแนนโอลิโกแซคคาไรด์ที่ระดับ 4 กรัม และ 6 กรัม ต่ออาหาร 1 กิโลกรัม มีผลให้ค่าเฉลี่ยของอัตราการเจริญเติบโตต่อวันของลูกปลานิลมีค่าสูงกว่าลูกปลานิลที่ได้รับการเสริมแมนแนนโอลิโกแซคคาไรด์ที่ระดับ 2 กรัม ต่ออาหาร 1 กิโลกรัม และชุดควบคุมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$) ในขณะที่อัตราปล่อย 200 และ 300 ตัวต่อตู้กลับไม่พบความแตกต่างทางสถิติ ($P > 0.05$) ระหว่างชุดควบคุมและชุดทดลอง สำหรับอัตราการเปลี่ยนอาหารเป็นเนื้อของลูกปลานิลจากชุดการทดลองที่มีอัตราปล่อย 100 ตัวต่อตู้ พบว่าการให้อาหารเสริมแมนแนนโอลิโกแซคคาไรด์ที่ระดับ 2, 4 และ 6 กรัม ต่ออาหาร 1 กิโลกรัม ส่งผลให้มีค่าเฉลี่ยต่ำกว่าชุดควบคุม ตามลำดับ แต่ไม่แสดงความแตกต่างทางสถิติ ($P > 0.05$) อาจเกิดจากมีอัตราการปล่อยที่เบาบางทำให้ลูกปลามีการเจริญเติบโตได้อย่างเต็มที่ และมีความแตกต่างระหว่างขนาดของลูกปลานิลค่อนข้างน้อยในแต่ละชุดการทดลองที่ได้รับแมนแนนโอลิโกแซคคาไรด์ในอาหารระดับที่แตกต่างกัน แต่ในชุดการทดลองที่มีอัตราการปล่อย 200 ตัวต่อตู้ ลูกปลานิลที่ได้รับการเสริมแมนแนนโอลิโกแซคคาไรด์ที่ระดับ 4 กรัม และ 6 กรัม ต่ออาหาร 1 กิโลกรัม มีค่าเฉลี่ยของอัตราการเปลี่ยนอาหารเป็นเนื้อต่ำกว่าชุดควบคุมและชุดที่ได้รับการเสริมแมนแนนโอลิโกแซคคาไรด์ที่ระดับ 2 กรัม ต่ออาหาร 1 กิโลกรัม อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$) สำหรับชุดการทดลองที่มีอัตราการปล่อย 300 ตัวต่อตู้ พบว่าลูกปลานิลที่ได้รับการเสริมแมนแนนโอลิโกแซคคา-

ไรด์ที่ระดับ 6 กรัม ต่ออาหาร 1 กิโลกรัม มีค่าเฉลี่ยของอัตราการเปลี่ยนอาหารเป็นเนื้อต่ำกว่าชุดควบคุม อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$) และมีความแตกต่างกันระหว่างขนาดของลูกปลานิลให้เห็นได้ในระหว่างทำการทดลอง จากการศึกษาครั้งนี้แสดงให้เห็นว่าการที่ปลาชุดการทดลองที่มีอัตราปล่อยหนาแน่นขึ้นต้องให้แมนแนน โอลิโกแซคคาไรด์ในปริมาณที่มากขึ้นถึงจะแสดงผลต่อการเจริญเติบโตและอัตราการเปลี่ยนอาหารเป็นเนื้อนั้น เกิดจากการที่อยู่กันอย่างหนาแน่นอาจส่งผลให้เกิดความเครียดทำให้มีอัตราการเจริญเติบโตได้ไม่ดีเท่าอัตราปล่อยที่น้อยกว่า จึงต้องเสริมแมนแนน โอลิโกแซคคาไรด์ในระดับที่สูงกว่าเพื่อช่วยให้มีความสามารถเสริมในเรื่องของการเจริญเติบโตของลูกปลานิลได้ และนอกจากประสิทธิภาพของอาหารแล้วอัตราปล่อยในการอนุบาลลูกปลานิลด้วยแปลงเพศ รวมไปถึงปัจจัยอื่นที่เกี่ยวข้อง เช่น อุณหภูมิ ขนาดของลูกปลา หรือวิธีการให้อาหาร ก็มีผลต่อการเจริญเติบโตของลูกปลานิลด้วยเช่นเดียวกัน (Dambo and Rana, 2008; Aksungur *et al.*, 2007)

จากผลการศึกษาครั้งนี้แสดงให้เห็นว่าการเสริมแมนแนน โอลิโกแซคคาไรด์ในอาหารที่ระดับ 4 กรัม และ 6 กรัม ต่ออาหาร 1 กิโลกรัม มีผลต่อการเจริญเติบโต และอัตราการเปลี่ยนอาหารเป็นเนื้อ ซึ่งสอดคล้องกับการศึกษาของ Rodriguez-Estrada *et al.* (2009) ในลูกปลา Rainbow trout ที่พบว่า การเสริมแมนแนน โอลิโกแซคคาไรด์ที่ระดับ 4 กรัม ต่ออาหาร 1 กิโลกรัม เป็นระยะเวลา 12 สัปดาห์ มีผลทำให้ลูกปลามีอัตราการเจริญเติบโตสูงกว่าลูกปลาที่ไม่ได้รับการเสริม จากการศึกษาในปลา Rainbow trout (Yilmaz *et al.*, 2007) และในปลานิลลูกผสม (Genc *et al.*, 2007a) พบว่าการเสริมแมนแนน โอลิโกแซคคาไรด์ที่ระดับ 4 กรัม ต่ออาหาร 1 กิโลกรัม นั้นสามารถเพิ่มระดับโปรตีนในร่างกายได้จึงทำให้มีน้ำหนักเพิ่มขึ้นและมีอัตราการเจริญเติบโตดีกว่าสัตว์ทดลองที่ไม่ได้รับการเสริมแมนแนน โอลิโกแซคคาไรด์ ในขณะที่การศึกษาของ Grisdale-Helland *et al.* (2008) พบว่าการเสริมแมนแนน โอลิโกแซคคาไรด์ที่ระดับ 1 กรัม ต่ออาหาร 1 กิโลกรัม เป็นเวลา 16 สัปดาห์ สามารถเพิ่มอัตราการเจริญเติบโตของปลา Salmon ได้ และการเสริมแมนแนน โอลิโกแซคคาไรด์ในอาหารที่ระดับ 2 กรัม ต่ออาหาร 1 กิโลกรัม ทำให้มีน้ำหนักเพิ่มขึ้น มีอัตราการตาย และอัตราการเปลี่ยนอาหารเป็นเนื้อลดลงเมื่อสิ้นสุดการทดลอง (Staykov *et al.*, 2007) และมีรายงานในปลากระพง (Torrecillas *et al.*, 2007) และกึ่งกุลาคำ (Genc *et al.*, 2007b) ที่ได้รับการเสริมแมนแนน โอลิโกแซคคาไรด์ที่ระดับ 3 กรัม ต่ออาหาร 1 กิโลกรัม พบว่ามีการเจริญเติบโตที่ดีขึ้น การที่แมนแนน โอลิโกแซคคาไรด์มีบทบาทช่วยเสริมการเจริญเติบโตนั้นอาจเป็นไปได้ว่า การเสริมแมนแนน โอลิโกแซคคาไรด์มีส่วนช่วยให้ผนังลำไส้ส่วนต้นมีความสมบูรณ์มากขึ้น ดังผลจากการศึกษาในครั้งนี้ซึ่งพบว่าลักษณะพยาธิสภาพของลำไส้ส่วนต้นของลูกปลานิลที่ได้รับแมนแนน-

โอลิโกแซคคาไรด์ในระดับสูงขึ้นทำให้พื้นที่ในการดูดซึมอาหารเพิ่มมากขึ้น สอดคล้องกับรายงานของ Spring *et al.* (2000) และ Shane (2001) ซึ่งพบว่าการเสริมแมนแนนโอลิโกแซคคาไรด์ในอาหารช่วยเสริมให้ผนังลำไส้มีความสมบูรณ์จึงมีพื้นที่ในการดูดซึมสารอาหาร เช่น กรดอะมิโนได้มากขึ้น (Torrecillas *et al.*, 2007) ดังรายงานการศึกษาในไก่ (Lji *et al.*, 2001) ที่พบว่าการเพิ่มปริมาณของแมนแนนโอลิโกแซคคาไรด์ในอาหารทำให้มีการดูดซึมกรดอะมิโน L-tryptophan ได้มากขึ้นทั้งบริเวณลำไส้ส่วน Jejunal และ Ileal ซึ่ง L-tryptophan เป็นกรดอะมิโนที่เกี่ยวข้องกับการหลั่ง Serotonin ออกมาเพื่อทำให้ร่างกายรู้สึกผ่อนคลายหรือหลับไปในที่สุด ทำให้มีการใช้พลังงานในร่างกายลดลง และจากรายงานของ Torrecillas *et al.* (2010) พบว่าการเสริมแมนแนนโอลิโกแซคคาไรด์ในอาหารทำให้มีการสะสมไขมันที่ตับของปลา European sea bass ลดลงเนื่องจากการทำงานของเอนไซม์ acetyl-CoA carboxylase ที่ทำหน้าที่เร่งปฏิกิริยาในการเปลี่ยนกลูโคสให้เป็นกรดไขมันนั้นลดลง (Santoso *et al.*, 1995) ทำให้มีกลูโคสเป็นแหล่งพลังงานของกล้ามเนื้อและการนำสารอาหารไปใช้ในร่างกายเพื่อการเจริญเติบโตได้ นอกจากนี้แมนแนนโอลิโกแซคคาไรด์ยังอาจมีส่วนเกี่ยวข้องกับการทำงานของระบบประสาทของต่อมได้สมองเกี่ยวกับความอยากอาหารซึ่งอาจส่งผลต่อปริมาณความต้องการอาหาร (Torrecillas *et al.*, 2010) แต่การศึกษาเกี่ยวกับเรื่องนี้ยังไม่สามารถอธิบายถึงกลไกได้ชัดเจนจึงจำเป็นต้องมีการศึกษาต่อไป ในขณะที่การศึกษาผลของการเสริมแมนแนนโอลิโกแซคคาไรด์ที่ระดับแตกต่างกันในอาหารนั้นไม่มีผลต่อการเจริญเติบโตในปลา Sturgeon (Pryor *et al.*, 2003) และในลูกปลาช่อนทะเล (Salze *et al.*, 2008) ซึ่งต้องใช้อาหารมีชีวิตในการทดลอง คือ อาร์ทีเมีย โดยให้แมนแนนโอลิโกแซคคาไรด์แก่อาร์ทีเมียก่อนที่จะนำไปให้อาหารลูกปลาอีกครั้ง จึงอาจเกิดการสูญเสียแมนแนนโอลิโกแซคคาไรด์ออกไปในขั้นตอนนี้ การศึกษาของ Dimitroglou *et al.* (2010) ในปลา Sea bream ที่ได้รับการเสริมแมนแนนโอลิโกแซคคาไรด์ที่ระดับ 2 กรัม และ 4 กรัม ต่ออาหาร 1 กิโลกรัม เป็นระยะเวลา 9 สัปดาห์ ก็ไม่พบความแตกต่างทางสถิติ ($P > 0.05$) ของอัตราการเจริญเติบโต การที่แมนแนนโอลิโกแซคคาไรด์ไม่แสดงผลสอดคล้องกับในสิ่งมีชีวิตบางชนิดนั้น อาจเกิดจากความแตกต่างกันของระดับที่เหมาะสมในการใช้แมนแนนโอลิโกแซคคาไรด์ในสิ่งมีชีวิตต่างชนิดกัน การออกแบบการทดลองที่แตกต่างกัน หรือลักษณะทางกายภาพของสิ่งมีชีวิตที่ต่างกัน เช่น ความยาวของลำไส้ เป็นต้น จึงทำให้มีผลต่อการตอบสนองต่อแมนแนนโอลิโกแซคคาไรด์แตกต่างกันออกไป

จากการศึกษาครั้งนี้พบว่าอัตราการรอดของลูกปลานิลจากชุดการทดลองที่ได้รับการเสริมแมนแนนโอลิโกแซคคาไรด์มีอัตราการรอดสูงกว่าชุดควบคุม โดยลูกปลานิลที่ได้รับการเสริมแมนแนนโอลิโกแซคคาไรด์ในอาหารมีอัตราการรอดสูงกว่า 92% ขึ้นไป แต่ไม่พบความแตกต่างทางสถิติ

($P > 0.05$) อาจเป็นเพราะการทดลองมีระยะเวลาสั้นและมีการควบคุมสภาพแวดล้อมให้ดีตลอดการทดลอง ประกอบกับการได้รับสารอาหารในปริมาณที่เพียงพอที่เกิดจากการเพิ่มพื้นที่ในการดูดซึมอาหารของลำไส้ทำให้มีพลังงานเหลือเก็บไว้ในรูปของไกลโคเจนที่ตับและกล้ามเนื้อซึ่งมีประโยชน์ต่อร่างกาย เมื่อพบกับสภาพแวดล้อมที่เปลี่ยนแปลงจะมีการดึงไกลโคเจนที่สะสมนี้ออกมาใช้เป็นพลังงานเพื่อให้ดำรงชีวิตต่อไปได้ (เมฆ, 2525) ในขณะที่การศึกษาในกึ่งน้ำจืด (Sang and Fotedar, 2010) ที่ได้รับการเสริมแมนแนนโอลิโกแซคคาไรด์ที่ระดับ 4 กรัม ต่ออาหาร 1 กิโลกรัม เป็นระยะเวลา 56 วัน พบว่ามีอัตราการรอดสูงกว่ากึ่งที่ไม่ได้รับการเสริมแมนแนนโอลิโกแซคคาไรด์ในอาหาร อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$) จึงแสดงให้เห็นว่าการที่สัตว์น้ำได้รับการเสริมแมนแนนโอลิโกแซคคาไรด์ในระดับเดียวกันแต่ในระยะเวลาที่แตกต่างกัน หรือในสัตว์น้ำต่างชนิดกันก็ส่งผลต่อการเจริญเติบโต และอัตราการรอดแตกต่างกันออกไป

ผลการศึกษาความต้านทานต่อเชื้อแบคทีเรีย *Streptococcus agalactiae* ของลูกปลานิล โดยพิจารณาจากอัตราการตายของลูกปลานิลหลังได้รับเชื้อ *S. agalactiae* ที่ความเข้มข้น 10^8 CFU/ml พบว่าที่อัตราปล่อย 100 ตัวต่อตู้ ลูกปลานิลที่ได้รับการเสริมแมนแนนโอลิโกแซคคาไรด์ที่ระดับ 2, 4 และ 6 กรัม ต่ออาหาร 1 กิโลกรัม มีอัตราการรอดสูงกว่าลูกปลานิลที่ไม่ได้รับการเสริมแมนแนนโอลิโกแซคคาไรด์ในอาหารอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$) ในขณะที่อัตราปล่อย 200 และ 300 ตัวต่อตู้ พบว่าลูกปลานิลที่ได้รับการเสริมแมนแนนโอลิโกแซคคาไรด์ที่ระดับ 4 กรัมและ 6 กรัม ต่ออาหาร 1 กิโลกรัม มีอัตราการรอดสูงกว่าลูกปลานิลที่ได้รับการเสริมแมนแนนโอลิโกแซคคาไรด์ที่ระดับ 2 กรัม ต่ออาหาร 1 กิโลกรัม และลูกปลานิลที่ไม่ได้รับการเสริมแมนแนนโอลิโกแซคคาไรด์ในอาหารอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$) การที่ต้องใช้แมนแนนโอลิโกแซคคาไรด์ในระดับสูงกับชุดการทดลองที่มีอัตราปล่อยหนาแน่นขึ้นเพื่อช่วยเสริมความต้านทานโรคนั้น อาจเกิดจากการได้รับปริมาณแมนแนนโอลิโกแซคคาไรด์ในอาหารไม่เพียงพอที่จะช่วยเพิ่มความต้านทานโรคและเกิดจากความเครียดเนื่องจากมีอัตราปล่อยที่หนาแน่น จึงทำให้ต้องเพิ่มระดับของแมนแนนโอลิโกแซคคาไรด์เพื่อให้เกิดความต้านทานต่อเชื้อแบคทีเรีย *S. agalactiae* ในลูกปลานิลที่มีอัตราปล่อยเพิ่มมากขึ้น การทดลองนี้ได้ทำการทดสอบความต้านทานต่อเชื้อ *S. agalactiae* โดยวิธีการแช่ ซึ่งเชื้อสามารถเข้าสู่ร่างกายทั้งในระบบทางเดินอาหารได้โดยตรงและระบบหมุนเวียนโลหิตผ่านทางเหงือก ซึ่งแมนแนนโอลิโกแซคคาไรด์อาจควบคุมปริมาณเชื้อในทางเดินอาหารได้โดยการไปจับกับ Mannose-specific lectins ที่ผนังเซลล์ของแบคทีเรียซึ่งเป็นส่วนที่ใช้ในการยึดเกาะกับผนังลำไส้ (Mirelman and Ofek, 1986) ตามรายงานในแบคทีเรียชนิด *Campylobacter jejuni* (McSweeney and Walker, 1986) และ *Aeromonas hydrophila* (Merino et al., 1996) ทำให้เชื้อแบคทีเรียไม่สามารถยึด

เกาะกับผนังลำไส้ได้ และถูกกำจัดโดยเซลล์ที่ทำหน้าในการกลืนกินสิ่งแปลกปลอมในร่างกายหรือทางระบบขับถ่าย (Perry and Ofek, 1984; Wright *et al.*, 1989) เช่นจากการศึกษาผลของการเสริมแมนแนนโอลิโกแซคคาไรด์ในอาหารต่อความต้านทานโรคในระบบทางเดินอาหารโดยวิธี oral inoculation ด้วยเชื้อ *Salmonella typhimurium* พบว่าลูกไก่ที่ได้รับการเสริมแมนแนนโอลิโกแซคคาไรด์ในอาหารมีปริมาณเชื้อ *S. typhimurium* ในลำไส้ส่วนต้นลดลง (Spring *et al.*, 2000) และจากการศึกษาของ Oyofe *et al.* (1989a) พบว่าแมนโนสซึ่งเป็นองค์ประกอบหลักในแมนแนนโอลิโกแซคคาไรด์นั้นสามารถลดการกระจายตัวของเชื้อ *S. typhimurium* ในลำไส้ของลูกไก่ได้ การศึกษาถึงผลของแมนแนนโอลิโกแซคคาไรด์เกี่ยวกับความต้านทานต่อเชื้อที่เข้าสู่ระบบหมุนเวียนโลหิตพบว่าแมนแนนโอลิโกแซคคาไรด์ไปกระตุ้นกระบวนการทำงานของระบบ complement ในรูปแบบของ lectin pathway โดยอาศัยโปรตีนชนิด Mannan binding lectin (MBL) ใน Serum ของสิ่งมีชีวิต โดย MBL จะจับกับบริเวณโครงสร้างที่เป็นน้ำตาล คือ mannose (Turner, 2003) และเกิดการกระตุ้นจนได้ Mannan-binding lectin association proteinase 1 และจะเปลี่ยนเป็น Mannan-binding lectin association proteinase 2 และจะกระตุ้นการทำงานต่อ ๆ ไปจนได้เอนไซม์ที่เรียกว่า C3 convertase และมีการทำงานต่อไปในลักษณะเดียวกันกับการกระตุ้นระบบ complement แบบ classical pathway และทำลายเซลล์สิ่งแปลกปลอมได้ในที่สุด (Turner, 1996) สอดคล้องกับการศึกษาในลูกไก่ (Elmusharaf *et al.*, 2007) ที่ได้รับการเสริมแมนแนนโอลิโกแซคคาไรด์ที่ระดับ 10 กรัม ต่ออาหาร 1 กิโลกรัม แล้วนำมาทดสอบความต้านทานต่อโปรโตซัวในกลุ่ม *Eimeria* spp. ที่เป็นสาเหตุทำให้เกิดโรคบิดในสัตว์ปีก พบว่าหลังจากที่ได้รับโปรโตซัวเข้าไปในร่างกาย ลูกไก่ที่ได้รับการเสริมแมนแนนโอลิโกแซคคาไรด์ในอาหารมีการกระจายตัวของไข่โปรโตซว้น้อยกว่าลูกไก่ชุดที่ไม่ได้รับการเสริมแมนแนนโอลิโกแซคคาไรด์ในอาหารอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$) และ Torrecillas *et al.* (2007) พบว่าไตส่วนหน้าของปลากระพงที่ได้รับการเสริมแมนแนนโอลิโกแซคคาไรด์ 4 % มีปริมาณเชื้อ *V. alginolyticus* ต่ำกว่า ปลากลุ่มที่ได้รับการเสริมแมนแนนโอลิโกแซคคาไรด์ที่ระดับ 2 % และปลาที่ไม่ได้รับการเสริมแมนแนนโอลิโกแซคคาไรด์อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$) จากการศึกษาข้างต้นสามารถอธิบายให้ทราบถึงการทำงานของแมนแนนโอลิโกแซคคาไรด์ต่อการต้านทานเชื้อแบคทีเรียได้

การศึกษากครั้งนี้พบว่าลักษณะทางพยาธิสภาพของลำไส้ส่วนต้นของลูกปลานิลที่ได้รับการเสริมแมนแนนโอลิโกแซคคาไรด์ที่ระดับ 4 กรัมและ 6 กรัม ต่ออาหาร 1 กิโลกรัม เป็นเวลา 21 วัน มีการพัฒนาพื้นที่ผิวในการดูดซึมอาหารและมี microvilli ที่ยาวและสมบูรณ์กว่าลูกปลาที่ได้รับการเสริมแมนแนนโอลิโกแซคคาไรด์ที่ระดับ 2 กรัม ต่ออาหาร 1 กิโลกรัมและชุดที่ไม่ได้รับการเสริมแมน-

แนนโอลิโกแซคคาไรด์ในอาหารอย่างชัดเจน แม้ว่าลูกปลานิลที่ได้รับแนนโอลิโกแซคคาไรด์ที่ระดับ 4 กรัม ต่ออาหาร 1 กิโลกรัม จะพบว่าการฉีกขาดของผนังลำไส้มีน้อยกว่าลูกปลาที่ได้รับการเสริมแนนโอลิโกแซคคาไรด์ที่ระดับ 2 กรัม ต่ออาหาร 1 กิโลกรัมและชุดที่ไม่ได้รับการเสริมแนนโอลิโกแซคคาไรด์ในอาหาร ในขณะที่ลูกปลานิลที่ได้รับแนนโอลิโกแซคคาไรด์ที่ระดับ 6 กรัม ต่ออาหาร 1 กิโลกรัม พบการฉีกขาดของผนังลำไส้มีน้อยกว่าจากรายงานของ Dimitroglou *et al.* (2008) ได้ทำการศึกษาลักษณะพยาธิสภาพของลำไส้ในปลา Rainbow trout ที่ได้รับการเสริมแนนโอลิโกแซคคาไรด์ 2 กรัม ต่ออาหาร 1 กิโลกรัม เป็นระยะเวลา 8 สัปดาห์ พบว่าการพัฒนาของ microvilli เพิ่มขึ้น และยาวกว่าปลาที่ไม่ได้รับการเสริม จึงอาจเป็นไปได้ว่าการเสริมแนนโอลิโกแซคคาไรด์ในระดับต่ำ ๆ ก็สามารถเสริมให้ผนังลำไส้มีความสมบูรณ์ได้เช่นเดียวกัน เพียงแต่ต้องใช้ระยะเวลาที่นานกว่า เช่นจากรายงานของ Torrecillas *et al.* (2010) ในปลา sea bass ที่ได้รับแนนโอลิโกแซคคาไรด์ในอาหารที่ระดับ 2, 4 และ 6 กรัม ต่ออาหาร 1 กิโลกรัม พบว่าที่ระยะเวลา 60 วัน ปลาที่ได้รับการเสริมแนนโอลิโกแซคคาไรด์ที่ระดับ 6 กรัม ต่ออาหาร 1 กิโลกรัม มีจำนวน mucus cell ที่อยู่บริเวณผนังเซลล์ชั้น mucosa ของลำไส้เพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$) เมื่อเปรียบเทียบกับชุดควบคุม และเมื่อทำการศึกษาก่อนที่ระยะเวลา 14 เดือนพบว่าการเสริมแนนโอลิโกแซคคาไรด์ที่ระดับ 2 กรัม และ 4 กรัม ต่ออาหาร 1 กิโลกรัม ก็เพียงพอต่อการช่วยให้ผนังลำไส้มีความสมบูรณ์และมีจำนวน mucus cell เพิ่มขึ้นเมื่อเปรียบเทียบกับชุดควบคุม ($P < 0.05$) การทำหน้าที่ของ mucus cell คือ การสร้างและปล่อย mucin ออกมาเคลือบผนังลำไส้เพื่อปกป้องผนังลำไส้จากการเกาะตัวของสิ่งแปลกปลอมต่าง ๆ ด้วย (Torrecillas *et al.*, 2010 Cited Sandberg *et al.*, 2000) โดยปกติแล้วการฉีกขาดหรือการผลัดเซลล์บริเวณผนังลำไส้สามารถพบได้ทั่วไปในสัตว์ และจะมีการสร้างเซลล์ใหม่ขึ้นมาทดแทน แต่การทำลายจากเชื้อที่ไม่เกิดประโยชน์หรือเชื้อก่อโรคที่เข้ามาในระบบทางเดินอาหารก็เป็นอีกปัจจัยหนึ่งของความไม่สมบูรณ์ภายในลำไส้ จากรายงานของ Swanson *et al.* (2002) พบว่าแนนโอลิโกแซคคาไรด์จะเข้าจับกับผนังเซลล์ของเชื้อแบคทีเรียตรงบริเวณที่เป็น Lectins โดยอาศัยหลักการ Carbohydrate binding protein จึงทำให้โอกาสที่แบคทีเรียจะจับกับผนังลำไส้ลดลง ซึ่งโดยปกติแบคทีเรียจะจับกับผนังลำไส้โดยจะจับกับโมเลกุลของน้ำตาลกลุ่มย่อยของ glycoconjugate receptor Type 1 (Oyofu *et al.*, 1989b) จากข้อมูลนี้สอดคล้องกับข้อมูลที่กล่าวถึงบทบาทของแนนโอลิโกแซคคาไรด์ในการจำกัดปริมาณเชื้อแบคทีเรียและผลต่อความต้านทานต่อเชื้อแบคทีเรียในสิ่งมีชีวิตดังกล่าวข้างต้น จึงเป็นเหตุผลหนึ่งที่สามารถอธิบายได้ถึงผลของการเสริมแนนโอลิโกแซคคาไรด์ว่ามีผลต่อการเจริญเติบโตของสิ่งมีชีวิตเนื่องจากมีพื้นที่ในการดูดซึมอาหารได้มากขึ้นนั่นเอง นอกจากนี้แล้วยังมีการศึกษาเกี่ยวกับคุณสมบัติของแนน-

แนนโอเลโทแซคคาไรด์ซึ่งไม่สามารถถูกย่อยได้ในระบบทางเดินอาหารเพราะมีการยึดเกาะกันด้วยพันธะที่หลากหลายจึงต้องใช้เอนไซม์จำเพาะในการย่อย (Jones and Ballou, 1969) และมีประโยชน์ต่อเจ้าบ้านโดยช่วยเสริมในเรื่องการเจริญเติบโตและหรือมีผลดีต่อเชื้อแบคทีเรียที่มีประโยชน์ต่อเจ้าบ้าน (Gibson and Roberfroid, 1995) จึงจัดให้เป็นสารในกลุ่มพรีไบโอติก (Merrifield *et al.*, 2010; Genc *et al.*, 2007a; Sang *et al.*, 2009)

สำหรับลักษณะทางพยาธิสภาพของตับที่ได้จากลูกปลานิลที่ในการศึกษาครั้งนี้พบว่ามีการสะสมของไขมัน (Fat droplet) ในเซลล์ตับ (Hepatocyte) เพิ่มขึ้นเมื่อได้รับการเสริมแมนแนน-โอเลโทแซคคาไรด์เพิ่มมากขึ้นเช่นเดียวกัน ทั้งนี้อาจเกิดจากการได้รับอาหารในปริมาณเกินความต้องการแล้วเกิดการสะสมในรูปของไขมันที่ตับ แต่จากบางรายงานพบว่าแมนแนนโอเลโทแซคคาไรด์มีผลทำให้การดูดซึมคอเลสเตอรอลในหนูขนาด 50-75 กรัมลดลง 20% (Gallaher *et al.*, 2000) และเพิ่มการหลั่งของน้ำดี (Jie and Shu-Sheng, 1997; Gallaher *et al.*, 1999) จึงทำให้มีการสะสมของไขมันในตับน้อยลง สอดคล้องกับผลของการเสริมแมนแนนโอเลโทแซคคาไรด์ในอาหารที่มีโปรตีน 51.50% พบว่าการเสริมแมนแนนโอเลโทแซคคาไรด์ที่ระดับ 4 กรัม ต่ออาหาร 1 กิโลกรัม ในปลากะพงขนาดประมาณ 30 กรัม มีการสะสมของไขมันในตับน้อยลงเมื่อเปรียบเทียบกับชุดควบคุม (Torrecillas *et al.*, 2007) และจากการศึกษาของ Torrecillas *et al.* (2010) ในปลา sea bass (*Dicentrarchus labrax*) ขนาดประมาณ 60 กรัม พบว่าการเสริมแมนแนนโอเลโทแซคคาไรด์ในอาหารที่มีปริมาณโปรตีน 48.71 กรัม ต่ออาหาร 1 กิโลกรัม เป็นเวลา 60 วัน ทำให้มีการสะสมไขมันที่ตับลดลงเมื่อมีปริมาณแมนแนนโอเลโทแซคคาไรด์ในอาหารเพิ่มขึ้น เนื่องจากทำให้การทำงานของเอนไซม์ acetyl-CoA carboxylase ที่ทำหน้าที่เร่งปฏิกิริยาในการเปลี่ยนกลูโคสให้เป็นกรดไขมันนั้นลดลง (Santoso *et al.*, 1995) จากการศึกษาของ Dimitroglou *et al.* (2010) ที่ 9 สัปดาห์ของการเสริมแมนแนนโอเลโทแซคคาไรด์ในอาหารที่มีโปรตีน 44% พบว่าปลา Gilthead sea bream ขนาด 24 กรัม ชุดการทดลองที่ได้รับแมนแนนโอเลโทแซคคาไรด์ในอาหารที่ระดับ 4 กรัม ต่ออาหาร 1 กิโลกรัม มีค่า Hepatosomatic index ลดลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$) การที่ผลการทดลองครั้งนี้แสดงความแตกต่างกับการศึกษาข้างต้นเป็นไปได้ว่าอาหารที่นำมาทำการทดลองมีโปรตีนสูงถึง 40% จึงทำให้ได้รับสารอาหารอย่างเต็มที่ประกอบกับลูกปลานิลที่ทำการทดลองนั้นเป็นปลาขนาดเล็กและมีอายุน้อยจึงจะนำสารอาหารไปใช้เป็นพลังงานในการเจริญเติบโตเป็นหลัก และมีบางส่วนที่เหลือและเกิดการสะสมในรูปไขมันบริเวณตับมากกว่าการศึกษาอื่น ๆ ที่สัตว์ทดลองอยู่ในช่วงอายุที่มากกว่า และเป็นวัยที่นอกจากจะนำสารอาหารไปใช้เป็นพลังงานในเรื่องของการเจริญเติบโตและซ่อมแซมส่วนที่สึกหรอแล้ว ยังต้องนำพลังงานมาใช้

ในเรื่องของระบบสืบพันธุ์อีกด้วย จึงทำให้จำเป็นต้องใช้ปริมาณสารอาหารสูงกว่าและเกิดการสะสมในรูปของไขมันหรือแป้งในคับน้อยกว่าปลาขนาดเล็ก

การศึกษาในระดับที่เหมาะสมของแมนแนนโอลิโกแซคคาไรด์ต่อระบบภูมิคุ้มกันแบบจำเพาะเจาะจงของปลานิล

ระบบภูมิคุ้มกันแบบจำเพาะเจาะจงในเชิงการสร้าง Antibody หลังจากได้รับวัคซีน

S. agalactiae

การตอบสนองของระบบภูมิคุ้มกันแบบจำเพาะในเชิงการสร้าง Antibody นั้นการตรวจวัดค่า Antibody titer ของการทดลองครั้งนี้พบว่าหลังจากให้วัคซีนครั้งแรกปลาชุดควบคุมและชุดการทดลองที่ได้รับการเสริมแมนแนนโอลิโกแซคคาไรด์ในอาหารที่ระดับ 4 กรัม และ 6 กรัม ต่ออาหาร 1 กิโลกรัม มีการตอบสนองต่อวัคซีนเกิดขึ้นเพียงเล็กน้อยและเริ่มลดลงในสัปดาห์ถัดไปในขณะที่ชุดการทดลองที่ได้รับการเสริมแมนแนนโอลิโกแซคคาไรด์ในอาหารที่ระดับ 2 กรัม ต่ออาหาร 1 กิโลกรัม ยังคงมีการตอบสนองเพิ่มขึ้นเล็กน้อยอยู่ที่ 8.80 ± 6.20 และลดลงเมื่อเข้าสู่สัปดาห์ที่ 3 เมื่อมีการให้วัคซีนครั้งที่ 2 ปลาชุดการทดลองที่ได้รับการเสริมแมนแนนโอลิโกแซคคาไรด์ในอาหารที่ระดับ 6 กรัม ต่ออาหาร 1 กิโลกรัม มีการตอบสนองอย่างรวดเร็วโดยเพียง 1 สัปดาห์หลังการให้วัคซีนครั้งที่ 2 (สัปดาห์ที่ 4 ตั้งแต่เริ่มทดลอง) และสูงที่สุดอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$) คือ 166.40 ± 61.83 ก่อนที่จะลดลงในสัปดาห์ต่อมาและมีค่าใกล้เคียงกับการตอบสนองต่อวัคซีนครั้งที่ 2 ของชุดการทดลองอื่นที่เริ่มมีการตอบสนองสูงขึ้นในสัปดาห์ที่ 5 (2 สัปดาห์หลังจากได้รับวัคซีนครั้งที่ 2) และการตอบสนองต่อวัคซีนของทุกชุดการทดลองจะลดลงเรื่อย ๆ ในสัปดาห์ถัดไป แสดงให้เห็นว่าการเสริมแมนแนนโอลิโกแซคคาไรด์ในอาหารที่ระดับ 6 กรัม ต่ออาหาร 1 กิโลกรัม มีผลต่อการตอบสนองทางภูมิคุ้มกันแบบจำเพาะเจาะจงในเชิงการสร้าง Antibody ในช่วง Secondary immune response ซึ่งน่าจะเกิดจากแมนแนนโอลิโกแซคคาไรด์มีผลต่อปริมาณของ B lymphocyte ซึ่งสามารถพัฒนาไปเป็น memory B cell ที่มีบทบาทสำคัญต่อการตอบสนองทางระบบภูมิคุ้มกันในช่วงนี้ โดยเกิดจากแมนแนนโอลิโกแซคคาไรด์สามารถคงสภาพเดิมได้ในระบบทางเดินอาหารเมื่อถูกดูดซึมเข้าสู่กระแสเลือดจะไปจับกับ mannose receptor ที่อยู่บนผนังเซลล์เม็ดเลือดขาว (Rodriguez *et al.*, 2003) โดยอาศัยคุณสมบัติของการจดจำโครงสร้างต่าง ๆ บนผิวสิ่งแปลกปลอมของเซลล์เม็ดเลือดขาว และเกิดกระบวนการ phagocytosis แล้วตกแต่งโครงสร้างโดยเลือกเอาเฉพาะส่วนที่มีคุณสมบัติที่สุดในการกระตุ้นระบบภูมิคุ้มกันที่เรียกว่า Antigenic determinant ไป

แสดงไว้ที่ผิวเซลล์ โดยอาศัย Major histocompatibility complex (MHC) class II เป็นสื่อกลางให้ T cell (Helper T cell) มาจดจำ ภายหลังจากที่ Helper T cell มาตรวจพบ Antigenic determinant ของ สิ่งแปลกปลอมแล้ว จะปล่อย Cytokines (Whyte, 2007) ออกมาเพื่อกระตุ้นให้กลุ่มของเซลล์เม็ด เลือดขาวมีการแบ่งเซลล์อย่างรวดเร็วและยังกระตุ้นให้เซลล์เม็ดเลือดขาวมีการตอบสนองได้อย่างมี ประสิทธิภาพมากยิ่งขึ้น ดังนั้นเมื่อปลานิลได้รับวัคซีนของเชื้อ *S. agalactiae* เข้าไปในร่างกาย จะมี การตอบสนองของเซลล์เม็ดเลือดขาวได้ไวเนื่องจากได้ถูกกระตุ้นให้มีปริมาณเพิ่มขึ้นแล้วจาก ขั้นตอนข้างต้น นำไปสู่การตอบสนองต่อระบบภูมิคุ้มกันแบบจำเพาะเจาะจงเมื่อได้รับวัคซีน ระบบ ภูมิคุ้มกันจะกระตุ้น lymphocyte ให้รับรู้และเพิ่มจำนวนพร้อมกับสร้าง Antibody ซึ่งจะอยู่ได้ระยะ หนึ่งแล้วค่อย ๆ ลดลง ในระหว่างนี้ B lymphocyte บางเซลล์จะพัฒนากลายเป็น memory B cell ที่ จดจำต่อ Antigen ชนิดนั้น ๆ ถ้าได้รับ Antigen ชนิดเดิมอีก ก็จะมีการตอบสนองได้มากและรวดเร็ว กว่าในครั้งแรก จากการศึกษาของ Swanson *et al.* (2002) ในสุนัขพบว่าการได้รับแมนแนนโอลิโก-แซคคาไรด์มีผลให้มีปริมาณของ IgA และเซลล์เม็ดเลือดขาวใน Serum มากขึ้นทำให้มี B lymphocyte มากขึ้น แต่ผลของการเสริมแมนแนนโอลิโกแซคคาไรด์ในอาหารต่อการตอบสนอง ของวัคซีนในช่วง primary immune response จากการศึกษาครั้งนี้ยังแสดงผลไม่ชัดเจน ในขณะที่ การเสริมแมนแนนโอลิโกแซคคาไรด์ในอาหารที่ระดับ 6 กรัม ต่ออาหาร 1 กิโลกรัม มีผลต่อการ ตอบสนองของวัคซีนในช่วง secondary immune response เท่านั้น

การศึกษาระดับที่เหมาะสมของแมนแนนโอลิโกแซคคาไรด์ต่อระบบภูมิคุ้มกันแบบไม่ จำเพาะเจาะจงของปลานิล

ในการศึกษาครั้งนี้พบว่าการเสริมแมนแนนโอลิโกแซคคาไรด์ในอาหารมีผลต่อระดับ ภูมิคุ้มกันแบบไม่จำเพาะเจาะจงของปลานิลเพียงเล็กน้อย โดยค่าปริมาณเม็ดเลือดแดงรวม ค่า Hematocrit ค่า Hemoglobin ในทุกชุดการทดลองที่ระยะเวลา 30 วันของการได้รับการเสริม แมนแนนโอลิโกแซคคาไรด์ในอาหารไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ และไม่พบความแตกต่างกัน ในทุกชุดการทดลองเมื่อหยุดการเสริมแมนแนนโอลิโกแซคคาไรด์ในอาหารที่เวลา 10 และ 20 วัน สำหรับปริมาณเม็ดเลือดขาวในกระแสเลือด ค่า percent phagocytosis ค่า phagocytic index และค่า superoxide anion ที่ระยะเวลา 30 วัน พบว่าปลานิลที่ได้รับการได้รับการเสริมแมนแนนโอลิโก-แซคคาไรด์ที่ระดับ 6 กรัม ต่ออาหาร 1 กิโลกรัม ส่งผลให้มีค่าดังกล่าวมากกว่าชุดการทดลองอื่น เพียงเล็กน้อย แต่ยังคงไม่พบความแตกต่างทางสถิติเช่นเดียวกัน การที่แมนแนนโอลิโกแซคคาไรด์ ที่ระดับ 6 กรัม ต่ออาหาร 1 กิโลกรัม มีส่วนช่วยให้ปริมาณเม็ดเลือดขาวในกระแสเลือด ค่า percent

phagocytosis ค่า phagocytic index และค่า superoxide anion มากกว่าชุดการทดลองอื่นนั้น อาจเกิดจากแมนแนนโอลิโกแซคคาไรด์ที่ซึมเข้าสู่กระแสเลือดไปมีส่วนร่วมในกระบวนการทำงานของระบบ complement ที่ถูกกระตุ้นโดย lectin pathway โดยอาศัยการทำงานของโปรตีนชนิด Mannan binding lectin (MBL) ที่อยู่ใน Serum ของสิ่งมีชีวิต และจะจับกับแมนแนนโอลิโกแซคคาไรด์ตรงโครงสร้างที่เป็นน้ำตาล mannose (Turner, 2003) และเกิดการกระตุ้นจนได้ Mannan-binding lectin association proteinase 1 และจะเปลี่ยนเป็น Mannan-binding lectin association proteinase 2 และจะกระตุ้นการทำงานต่อ ๆ ไปจนได้เอนไซม์ที่เรียกว่า C3 convertase และมีการทำงานต่อไปในลักษณะเดียวกันกับการกระตุ้นระบบ complement แบบ classical pathway และทำลายเซลล์ถึงแปลกล้อมได้ในที่สุด (Turner, 1996) และมีการส่งสัญญาณให้ monocyte หลั่งสาร Tumor necrosis factor α (TNF- α), Interleukin 1 β และ Interleukin 6 (Jack *et al.*, 2001) ซึ่ง Interleukin มีหน้าที่หลักในการควบคุมการทำงานร่วมกันระหว่างเซลล์เม็ดเลือดขาวชนิดต่าง ๆ (Abbas *et al.*, 2000) และ TNF- α ที่มีบทบาทในการส่งเสริมการเดินทางออกจากเส้นเลือดของเม็ดเลือดขาวในกระบวนการอักเสบ และส่งเสริมกิจกรรมการกลืนกินสิ่งแปลกล้อมของ polymorphonuclear cell และส่งเสริมการสร้าง hydrogen peroxide ใน macrophage (Secombes *et al.*, 2001) และการทำงานของ mannose receptor ที่อยู่บนผนังเซลล์เม็ดเลือดขาว (Rodriguez *et al.*, 2003) ทำให้มีจำนวนของเซลล์เม็ดเลือดขาวเพิ่มขึ้น การที่แมนแนนโอลิโกแซคคาไรด์ไม่มีผลต่อระบบภูมิคุ้มกันแบบไม่จำเพาะเจาะจงจากการทดลองครั้งนี้อาจเกิดจากระยะเวลาที่ให้แมนแนนโอลิโกแซคคาไรด์ในอาหารอาจน้อยเกินไป คือ 30 วัน ซึ่งในการทดลองของ Torrecillas *et al.* (2010) กับปลา sea bass ที่ได้รับการเสริมแมนแนนโอลิโกแซคคาไรด์ที่ระดับ 4 กรัม และ 6 กรัม ต่ออาหาร 1 กิโลกรัม และศึกษาค่า phagocytic activity ในวันที่ 30, 45 และ 60 วันของการได้รับอาหารเสริม พบว่าค่า phagocytic activity เพิ่มขึ้นเมื่อมีระยะเวลาของการกินอาหารเสริมมากขึ้น การที่มี phagocytic activity เพิ่มขึ้นเกิดจากการทำงานของ mannose receptor ที่อยู่บนผนังเซลล์เม็ดเลือดขาว (Rodriguez *et al.*, 2003) จับกับโครงสร้างที่เป็นน้ำตาลของแมนแนนโอลิโกแซคคาไรด์ และเกิดกระบวนการ phagocytosis ตามกลไกที่อธิบายไว้แล้วข้างต้น

นอกจากเหตุผลของระยะเวลาในการได้รับแมนแนนโอลิโกแซคคาไรด์มีน้อยเกินไปจึงทำให้ไม่แสดงผลต่อระบบภูมิคุ้มกันแบบไม่จำเพาะเจาะจงแล้วอาจเป็นเพราะระดับของแมนแนนโอลิโกแซคคาไรด์ที่ศึกษาอาจน้อยเกินไปสำหรับการศึกษาผลที่มีต่อระบบภูมิคุ้มกันภายใน 30 วัน จึงอาจจำเป็นต้องเพิ่มระดับของแมนแนนโอลิโกแซคคาไรด์ในอาหารให้มีปริมาณสูงขึ้น เช่นในการทดลองของ Yoshida *et al.* (1995) ที่ให้อาหารเสริมแมนแนนโอลิโกแซคคาไรด์ที่ระดับ 10 กรัม ต่อ

อาหาร 1 กิโลกรัม กับปลาอุกแอฟริกา (*Clarias gariepinus*) พบว่ามีปริมาณของ activated neutrophils เพิ่มขึ้นตั้งแต่ 2 สัปดาห์แรกของการได้รับอาหารเสริมแมนแนน โอลิโกแซคคาไรด์อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$) สอดคล้องกับการศึกษาในลูกไก่ (Elmusharaf *et al.*, 2007) ที่ได้รับการเสริมแมนแนน โอลิโกแซคคาไรด์ที่ระดับ 10 กรัม ต่ออาหาร 1 กิโลกรัม เป็นเวลา 19 วัน พร้อมกับทดสอบความต้านทานต่อโปรโตซัวในกลุ่ม *Eimeria* spp. ซึ่งเป็นสาเหตุทำให้เกิดโรคบิดในสัตว์ปีกในระหว่างที่ได้รับอาหารเสริม พบว่าในวันที่ 5 และวันที่ 12 ของการได้รับอาหารเสริม ลูกไก่ที่ได้รับการเสริมแมนแนน โอลิโกแซคคาไรด์ในอาหาร มีการกระจายตัวของไข่โปรโตซว้น้อยกว่าลูกไก่ชุดที่ไม่ได้รับการเสริมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$)

การศึกษานี้พบว่าการเสริมแมนแนน โอลิโกแซคคาไรด์ในอาหารเป็นเวลา 30 วัน ในปลานิลวัยรุ่นไม่ส่งผลที่ชัดเจนต่อระบบภูมิคุ้มกัน โดยพิจารณาจากปริมาณเม็ดเลือดแดงรวม ค่า Hematocrit ค่า Hemoglobin ปริมาณเม็ดเลือดขาวในกระแสเลือด ค่า percent phagocytosis ค่า phagocytic index และค่า superoxide anion แต่พบว่าการเสริมแมนแนน โอลิโกแซคคาไรด์ในอาหารเป็นเวลา 21 วัน มีผลต่อความต้านทานต่อเชื้อแบคทีเรีย *S. agalactiae* ในลูกปลานิล ดังนั้นจึงควรทำการศึกษากิจกรรมอื่น ๆ ของระบบภูมิคุ้มกัน เช่น Lysozyme activity และ Complement activity เพิ่มเติม เพื่อให้ทราบถึงผลของแมนแนน โอลิโกแซคคาไรด์ต่อระบบภูมิคุ้มกันได้ชัดเจนยิ่งขึ้น

การศึกษาผลของแมนแนน โอลิโกแซคคาไรด์ต่อการแสดงออกของยีน Interleukin 1 β , Interleukin 8, Transforming growth factor β 1 และ Tumor necrosis factor α โดยใช้เทคนิค Semi-quantitative RT-PCR

ในการศึกษานี้พบว่าการเสริมแมนแนน โอลิโกแซคคาไรด์ในอาหารไม่มีผลต่อการแสดงออกของยีนในกลุ่ม Cytokines คือ Interleukin 1 β , Interleukin 8, Transforming growth factor β 1 และ Tumor necrosis factor α โดยพบว่าการแสดงออกของยีนทั้ง 4 ชนิด ในไตส่วนหน้าและม้ามของปลานิลในทุกชุดการทดลองและมีปริมาณการแสดงออกที่ไม่สอดคล้องกับระดับของแมนแนน โอลิโกแซคคาไรด์ที่เพิ่มขึ้น ยกเว้นการแสดงออกของยีน Transforming growth factor β 1 ในม้ามที่พบว่ามีปริมาณการแสดงออกเพิ่มขึ้นเล็กน้อยตามระดับของการเสริมแมนแนน โอลิโกแซคคาไรด์ที่เพิ่มขึ้น แต่ไม่แสดงความแตกต่างทางสถิติ ($P > 0.05$) การศึกษานี้พบการแสดงออกของยีน Transforming growth factor β 1 แบบเบาบางมากในไตส่วนหน้า การแสดงออกของยีน

ในกลุ่ม Cytokines นี้เป็นยีนที่มีการแสดงออกเมื่อมีสิ่งแปลกปลอมเข้าไปในร่างกายหรือเมื่อเกิดการอักเสบ (เอกพล, 2551) โดยการแสดงออกนั้นจะมีระยะเวลาของการแสดงออกที่แตกต่างกันตามตำแหน่งที่และบทบาทของยีนนั้น ๆ (Secombes *et al.*, 2001) โดย Tumor necrosis factor α (TNF α) จะหลั่งออกมาก่อน Cytokines ชนิดอื่น ๆ จากนั้นจะไปกระตุ้นให้เซลล์เม็ดเลือดขาวสร้างและหลั่ง Interleukin-1 β (IL-1 β), Interleukin-6 (IL-6) และ Interleukin-8 (IL-8) ตามออกมา รวมถึงกระตุ้นให้เซลล์เม็ดเลือดขาวของตัวเองหรือข้างเคียงหลั่ง TNF α ออกมาเพิ่มด้วย จากการศึกษาการแสดงออกของ Cytokines ในปลาไนที่กระตุ้นด้วยปรีลิตพบว่า การแสดงออกของ Cytokines ชนิดอื่น ๆ จะค่อย ๆ สูงขึ้นและสูงที่สุดช่วงประมาณชั่วโมงที่ 3-4 หลังจากถูกกระตุ้น และลดลงภายใน 24 ชั่วโมง แต่จะมีเพียง TNF α ที่มีการแสดงออกขึ้น ๆ ลง ๆ (Gonzalez *et al.*, 2007) จึงอาจเป็นไปได้ว่า TNF α สามารถแสดงออกได้อีกหรือสามารถแสดงออกได้แม้จะไม่อยู่ในสถานะที่ถูกกระตุ้น โดย TNF α จะสามารถแสดงออกได้บ้างในปลาที่ไม่ได้รับการกระตุ้นจากสิ่งแปลกปลอม หรือสามารถหลั่งออกมาได้อีกเมื่อได้รับการกระตุ้นจากเซลล์เม็ดเลือดขาวที่จับกับ Lipopolysaccharide (LPS) หรือ Phorbol myristate acetate เป็นต้น นอกจากการกระตุ้นด้วย TNF α เพื่อให้มีการหลั่งของ IL-1 β แล้วนั้นยังพบว่าในสถานะที่มีอุณหภูมิต่ำ มีความเครียด หรือได้รับการกระตุ้นจาก LPS ก็ส่งผลให้มีการแสดงออกของยีน IL-1 β ได้เช่นกัน (Zou *et al.*, 2000) ซึ่งการแสดงออกของยีนในกลุ่ม Cytokines จากการทดลองครั้งนี้อาจเกิดขึ้นก่อนหรือหลังระยะเวลา 30 วันของการเก็บตัวอย่าง จึงทำให้ไม่เห็นผลที่ชัดเจนและบทบาทของแมนแนน โอลิโกแซคคาไรด์ที่จับกับ Mannan-binding lectin แล้วไปกระตุ้นให้มีการหลั่ง Cytokines (TNF α , IL-1 β และ IL-6) ออกมานั้นพบว่าไม่แสดงผลให้เห็นอย่างชัดเจนเช่นเดียวกัน อาจเป็นเพราะระดับของแมนแนน โอลิโกแซคคาไรด์ที่เสริมในอาหารนั้นยังไม่เพียงพอที่จะมีผลต่อการแสดงออกของยีนในกลุ่มนี้ภายใน 30 วัน ซึ่งการศึกษาของ Terova *et al.* (2009) ทดลองให้อาหารเสริมแมนแนน โอลิโกแซคคาไรด์ที่ระดับ 30 กรัม ต่ออาหาร 1 กิโลกรัม เป็นระยะเวลา 30 วัน พบว่ามีการแสดงออกของยีน Dicentracin ที่ไตส่วนหน้าเพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$) นอกจากเหตุผลที่ว่าระดับของแมนแนน โอลิโกแซคคาไรด์ที่เสริมในอาหารไม่เพียงพอที่จะมีผลต่อการแสดงออกของยีนในกลุ่ม Cytokines แล้ว สาเหตุอีกประการหนึ่งคือ ยีนในกลุ่มนี้จะมีการแสดงออกเมื่อได้รับกระตุ้นจากสิ่งแปลกปลอม แต่การศึกษานี้เป็นการศึกษาในปลาที่มีสุขภาพดีและไม่ถูกกระตุ้นด้วยสิ่งแปลกปลอม

จากผลการทดลองทั้งหมดของการศึกษานี้จึงมีข้อเสนอว่าควรใช้อาหารเสริมแมนแนน-โอลิโกแซคคาไรด์ที่ระดับ 4 กรัม ต่ออาหาร 1 กิโลกรัม ในช่วงการอนุบาลลูกปลานิลเพื่อยกระดับการเจริญเติบโต และความต้านทานต่อเชื้อ *S. agalactiae* และควรใช้อาหารเสริมแมนแนน โอลิโก-

แซคคาไรด์ที่ระดับ 6 กรัม ต่ออาหาร 1 กิโลกรัม เพื่อขจัดการทำงานของระบบภูมิคุ้มกันแบบ
จำเพาะเจาะจงของปลานิลวัยรุ่น



สรุปและข้อเสนอแนะ

สรุป

1. การให้อาหารเสริมแมนแนนโอลิโกแซคคาไรด์ที่ระดับ 4 และ 6 กรัม ต่ออาหาร 1 กิโลกรัม ระหว่างการอนุบาลและแปลงเพศลูกปลาเป็นเวลา 21 วัน ส่งผลให้มีน้ำหนักและความยาวมาตรฐานมากกว่าชุดควบคุมในทุกอัตราปล่อย อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$) การเสริมแมนแนนโอลิโกแซคคาไรด์ในอาหารที่ระดับ 4 และ 6 กรัม มีผลต่ออัตราการเจริญเติบโตต่อวันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$) ที่อัตราปล่อย 100 ตัวต่อตู้บรรจุน้ำ 80 ลิตรเท่านั้น ส่วนการเสริมแมนแนนโอลิโกแซคคาไรด์ในอาหารที่ 4 และ 6 กรัม ต่ออาหาร 1 กิโลกรัม กับปลา 200 ตัวต่อตู้ และที่ 6 กรัม ต่ออาหาร 1 กิโลกรัม กับปลา 300 ตัวต่อตู้ตามลำดับ มีผลต่ออัตราการเปลี่ยนอาหารเป็นเนื้ออย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$) ในขณะที่การเสริมแมนแนนโอลิโกแซคคาไรด์ในอาหารทุกความเข้มข้นไม่มีผลต่ออัตราการรอดของลูกปลานิลเมื่อสิ้นสุดการอนุบาล 21 วันในทุกอัตราปล่อย

2. การศึกษาทางพยาธิสภาพพบว่าการเสริมแมนแนนโอลิโกแซคคาไรด์ในอาหารที่ระดับ 4 และ 6 กรัม ต่ออาหาร 1 กิโลกรัม มีผลต่อการเพิ่มพื้นที่และความสมบูรณ์ในการพัฒนาของ microvilli ซึ่งมีส่วนสำคัญในการดูดซึมอาหารในลำไส้ และการเสริมแมนแนนโอลิโกแซคคาไรด์ในอาหารทุกระดับมีผลช่วยให้ลูกปลานิลที่อัตราปล่อย 100 ตัวต่อตู้มีความต้านทานต่อเชื้อ *Streptococcus agalactiae* ได้ดีกว่าชุดควบคุมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$) ส่วนที่อัตราปล่อย 200 และ 300 ตัวต่อตู้พบว่าเฉพาะที่ระดับ 4 และ 6 กรัม ต่ออาหาร 1 กิโลกรัมเท่านั้นที่มีความต้านทานต่อเชื้อ *S. agalactiae* ได้ดีกว่าชุดควบคุมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$)

3. การให้อาหารเสริมแมนแนนโอลิโกแซคคาไรด์ที่ระดับ 6 กรัม ต่ออาหาร 1 กิโลกรัม มีผลต่อการตอบสนองทางภูมิคุ้มกันในการสร้าง Antibody ตอบสนองในช่วง secondary immune response ต่อการให้วัคซีนเชื้อ *S. agalactiae* ได้เร็วและสูงที่สุดอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$) แต่การให้อาหารเสริมแมนแนนโอลิโกแซคคาไรด์เป็นระยะเวลา 30 วัน ไม่มีผลต่อปริมาณเม็ดเลือดแดงรวม ค่า Hematocrit ค่า Hemoglobin ปริมาณเม็ดเลือดขาวในกระแสเลือด ค่า percent phagocytosis ค่า phagocytic index และค่า superoxide anion ของปลานิลวัยรุ่น

4. การให้อาหารเสริมแมนแนนโอลิโกแซคคาไรด์เป็นระยะเวลา 30 วัน ไม่มีผลต่อการแสดงออกของยีนในกลุ่ม Cytokines ของปลานิลวัยรุ่น

ข้อเสนอแนะ

1. ควรมีการศึกษาผลของการเสริมแมนแนนโอลิโกแซคคาไรด์ในอาหารต่อค่า Lysozyme activity และ Complement activity เพิ่มเติม เพื่อให้ทราบถึงประสิทธิภาพของแมนแนนโอลิโกแซคคาไรด์ต่อระบบภูมิคุ้มกันแบบไม่จำเพาะเจาะจงอื่น ๆ มากขึ้น

2. การใช้แมนแนนโอลิโกแซคคาไรด์ร่วมกับโปรไบโอติกอาจเป็นอีกแนวทางหนึ่งที่สามารถเพิ่มประสิทธิภาพของการใช้แมนแนนโอลิโกแซคคาไรด์หรือโปรไบโอติกในการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำได้

3. ควรมีการศึกษาเกี่ยวกับกลไกการกระตุ้นภูมิคุ้มกันที่เกิดจากการได้รับแมนแนนโอลิโกแซคคาไรด์ในอาหารเพิ่มเติม เพื่อเป็นแนวทางในการอธิบายความสามารถในการกระตุ้นภูมิคุ้มกันของแมนแนนโอลิโกแซคคาไรด์ในปลาได้ดียิ่งขึ้น เนื่องจากปัจจุบันมีการศึกษาเกี่ยวกับกลไกดังกล่าวน้อยมาก

4. การศึกษาเกี่ยวกับผลของแมนแนนโอลิโกแซคคาไรด์ต่อการแสดงออกของยีนในกลุ่ม Cytokines ควรศึกษาในกลุ่มสัตว์ทดลองที่ได้รับสิ่งแปลกปลอมเข้าสู่ร่างกาย และระยะเวลาที่มีการแสดงออกตามแต่ละชนิดของยีน เพื่อให้ได้ผลการศึกษาที่ก่อให้เกิดประโยชน์ในการใช้แมนแนนโอลิโกแซคคาไรด์ในสิ่งมีชีวิตมากยิ่งขึ้น

5. ควรมีการศึกษาการเจริญเติบโตและการตอบสนองทางภูมิคุ้มกันระหว่างการเสริมเซลล์ยีสต์ทั้งเซลล์เปรียบเทียบกับ การเสริมแมนแนนโอลิโกแซคคาไรด์และเบต้ากลูแคนในอาหาร เพื่อทราบถึงประสิทธิภาพของสารและเป็นการลดต้นทุนในการผลิตผลผลิตสัตว์น้ำที่มีคุณภาพ

6. ควรมีการศึกษาเพิ่มเติมเพื่อให้ทราบถึงบทบาทของระดับแมนแนนโอลิโกแซคคาไรด์ในอาหารต่อลักษณะทางพยาธิสภาพของเซลล์ตับ และความสัมพันธ์ของการนำไขมันที่สะสมในตับไปใช้

เอกสารและสิ่งอ้างอิง

ศิริ กอนันตกุล. 2542. การเพาะเลี้ยงปลานิลแปลงเพศ. กองประมงน้ำจืด กรมประมง, กรุงเทพฯ.

ชาญชัย แสนศรีมหาชัย. 2522. การเพาะพันธุ์ปลานิล. สถาบันวิจัยประมงน้ำจืดแห่งชาติ
กองประมงน้ำจืด กรมประมง, กรุงเทพฯ.

คริธญา จันทวรรณ, นนทวิทย์ อารีรักษ์ และ ประพันธ์ศักดิ์ ศิริษะภูมิ. 2550. การศึกษาชนิดและความไวต่อยาปฏิชีวนะของเชื้อ *Streptococcus* spp. ที่แยกได้จากปลานิล, น. 204-211.
ใน การประชุมวิชาการของมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ครั้งที่ 44 (สาขาประมง).
มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ.

นิบล กิจอันเจริญ, ชุตินา หาญจวนิช และ นงนุช สุวรรณเพ็ง. 2549. ประสิทธิภาพของการให้
วัคซีนที่ผลิตจากเชื้อ *Streptococcus agalactiae* ในการป้องกันโรคสเตรปโตคอคโคซิสใน
ปลานิล. วารสารวิจัย มข. 11(1): 53-61.

บุญอ้อม โฉมทิ. 2550. หลักการวางแผนการทดลอง. ภาควิชาสถิติ, คณะวิทยาศาสตร์,
มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ.

ประพันธ์ศักดิ์ ศิริษะภูมิ. 2547. การวินิจฉัยและการป้องกันรักษาโรคในสัตว์น้ำ. ม.ป.ท.

ไพบุลย์ วรรณชัย และ ณัฐพงศ์ เพชรฤทธิ์. 2547. การเพาะพันธุ์ปลานิลแปลงเพศโดยใช้
ฮอร์โมนผสมอาหาร. วารสารประมง ปีที่ 57 (2): 163-167.

ภิรตน์ มั่นใจอาจค์, นนทวิทย์ อารีรักษ์, ประพันธ์ศักดิ์ ศิริษะภูมิ และ ส่องศรี มหาสวัสดิ์. 2550.
การทดลองใช้วัคซีนเพื่อป้องกันโรคที่เกิดจากเชื้อแบคทีเรีย *Streptococcus agalactiae* ใน
ปลานิล (*Oreochromis niloticus*), น. 174-182. ใน การประชุมวิชาการของมหาวิทยาลัย
เกษตรศาสตร์ ครั้งที่ 44 (สาขาประมง). มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ.

- ฤทัย สกุลแรมรุ่ง. 2539. วิทยานิพนธ์. ภาควิชาชีววิทยา คณะแพทยศาสตร์
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย, กรุงเทพฯ
- สุปราณี ชินบุตร. 2550. ปลานิลจิตรลดา--สายสัมพันธ์พระราชวงศ์ไทย-ญี่ปุ่น. กรมประมง.
กรุงเทพฯ.
- อุดม เรืองนพคุณ. 2549. การเพาะพันธุ์และการเลี้ยงปลานิล. อักษรสยามการพิมพ์, กรุงเทพฯ.
- เมฆ บุญพราหมณ์. 2525. อาหารที่ให้พลังงานและการเจริญเติบโต. สารานุกรมไทย
สำหรับเยาวชน เล่ม 7. แหล่งที่มา: <http://guru.sanook.com/encyclopedia/อาหารที่ให้พลังงานและการเจริญเติบโต>, 26 เมษายน 2553.
- เอกพล วังคะฮาด. 2551. การแสดงออกของยีนในไตส่วนหน้าและม้ามของปลานิล
(*Oreochromis niloticus*) ที่ถูกกระตุ้นด้วยเชื้อ *Streptococcus agalactiae* โดยใช้เทคนิค
Expressed Sequence Tags (ESTs). วิทยานิพนธ์ปริญญาโท. มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.
- Abbas, A. K., A. H. Lichtman and J. S. Pober. 2000. **Cellular and Molecular Immunology**.
4th ed. W.B. Saunders Company, Philadelphia, Pennsylvania.
- Agius, C. 1980. Phylogenetic development of melano-macrophage centres in fish. **J. Zool.**
(Lond.) 191: 11-31.
- Aksungurl, N., M. Aksungurl, B. Akbulutl and I. Kutlul. 2007. Effects of stocking density on
growth performance, survival and food conversion ratio of turbot (*Psetta maxima*) in the
net cages on the southeastern coast of the Black Sea. **Turk. J. Fish. Aquat. Sci.**
7: 147-152.
- Arason, G. J. 1996. Lectins as defence molecules in vertebrates and invertebrates.
Fish Shellfish Immunol. 6: 277-289.

- AyÇe Gen M., E. Yilmaz and E. GenÇ. 2006. Yeme Eklenen Mannan-Oligosakkarit'in Karabalikların (*Clarias gariepinus*, Burchell, 1822) Gelisimine, Barsak ve Karaciger Histolojisine Etkileri. **J. Fish. Aquat. Sci.** 23: 37-41.
- Baggiolini, M. and I. Clark-Lewis. 1992. Interleukin-8, a chemotactic and inflammatory cytokine. **FEBS Lett.** 307: 97-101.
- Baoprasertkul, P., E. Peatman, L. Chen, C. He, H. Kucuktas, P. Li and M. Simmons. 2004. Sequence analysis and expression of a CXC chemokine in resistant and susceptible catfish after infection of *Edwardsiella ictaluri*. **Dev. Comp. Immunol.** 28: 769-780.
- Baptista, A. S., J. Horii, M. A. C. Domingues, D. M. Gloria, J. M. Salgado and M. R. Vizioli. 2004. The capacity of manno-oligosaccharides, thermolysed yeast and active yeast to attenuate aflatoxicosis. **World J. Microbiol. Biotechnol.** 20: 475-481.
- Bland, E. J., T. Keshavarz and C. Bucke. 2004. The influence of small oligosaccharides on the immune system. **Carbohydr. Res.** 339: 1673-1678.
- Bogut, I., Z. Milakovic, J. Pavlicevic and D. Petrovic. 2006. Effect of Bio-Mos on performance and health of European catfish, *Sillirus glanis*, pp. 90. In Lyons, T. P., K. A. Jacques and J. M. Hower, eds. **Proceedings of Alltech's 22nd Annual Symposium April 23-26, 2006**, Abstracts of Posters Presented. Lexington, KY, USA.
- Bols, N. C., J. L. Brubacher, R. C. Ganassin and L. E. J. Lee. 2001. Ecotoxicology and innate immunity in fish. **Dev. Comp. Immunol.** 25: 853-873.
- Center, D. M., H. Kornfeld and W. W. Cruikshank. 1996. Interleukin 16 and its function as a CD4 ligand. **Immunol. Today** 17: 476-481.

- Chen, L., C. He, P. Baoprasertkul, P. Xu, P. Li, J. Serapion and G. Waldbieser 2005. Analysis of a catfish gene resembling interleukin-8: cDNA cloning, gene structure, and expression after infection with *Edwardsiella ictaluri*. **Dev. Comp. Immunol.** 29: 135-142.
- Chivers, D. P., B. D. Wisenden, C. J. Hindman, T. A. Michalak, R. C. Kusch, S. G. W. Kaminskyj, K. L. Jack, M. C. O. Ferrari, R. J. Pollock, C. F. Halbgewachs, M. S. Pollock, S. Alemadi, C. T. James, R. K. Savaloja, C. P. Goater, A. Corwin, R. S. Mirza, J. M. Kiesecker, G. E. Brown, J. C. Adrian, Jr., P. H. Krone, A. R. Blaustein and A. Mathis. 2007. Epidermal 'alarm substance' cells of fishes maintained by non-alarm functions: possible defence against pathogens, parasites and UVB radiation. **Proc. Biol. Sci.** 274: 2611-2619.
- Christyapita, D., M. Divyagnaneswari, R. D. Michael. 2007. Oral administration of *Eclipta alba* leaf aqueous extract enhances the non-specific immune responses and disease resistance of *Oreochromis mossambicus*. **Fish Shellfish Immunol.** 23: 840-852.
- Corripio-Miyar, Y., S. Bird, K. Tsamopoulos and C. J. Secombes. 2007. Cloning and expression analysis of two pro-inflammatory cytokines, IL-1 β and IL-8, in haddock (*Melanogrammus aeglefinus*). **Mol. Immunol.** 44: 1361-1373.
- Culjak, V., I. Bogut, E. Has-Schon, Z. Milakovic and K. Canecki. 2006. Effect of Bio-Mos on performance and health of juvenile carp, pp. 90. In Lyons, T. P., K. A. Jacques and J. M. Hower, eds. **Proceedings of Alltech's 22nd Annual Symposium April 23-26, 2006**. Abstracts of Posters Presented. Lexington, KY, USA.
- Dambo, W. B. and K. J. Rana. 2008. Effect of stocking density on growth and survival of *Oreochromis niloticus* (L.) fry in the hatchery. **Aquac. Res.** 24: 71-80.

Dannevig, B. H., A. Lauve, C. M. Press and T. Landsverk. 1994. Receptor-mediated endocytosis and phagocytosis by rainbow trout head kidney sinusoidal cells. **Fish Shellfish Immunol.** 4: 3-18.

Dimitroglou, A., S. Davies and J. Sweetman. 2008. The effect of dietary mannan oligosaccharides on the intestinal histology of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). **Comp. Biochem. Physiol.** 150: s56-s63.

_____, T. Janssens and S. Davies. 2006. Effect of Bio-Mos on sole, *Solea solea*, gut integrity (histological perspectives), pp. 94. In Lyons, T. P., K. A. Jacques and J. M. Hower, eds. **Proceedings of Alltech's 22nd Annual Symposium April 23-26, 2006**. Abstracts of Posters Presented. Lexington, KY, USA.

_____, D. L. Merrifield, P. Spring, J. Sweetman, R. Moate and S. J. Davies. 2010. Effects of mannan oligosaccharide (MOS) supplementation on growth performance, feed utilization, intestinal histology and gut microbiota of gilthead sea bream (*Sparus aurata*). **Aquaculture** 300: 182-188.

Dixon, B. and R. J. M. Stet. 2001. The relationship between major histocompatibility receptors and innate immunity in teleost fish. **Dev. Comp. Immunol.** 25: 683-699.

Ellis, A. E. 2001. Innate host defense mechanisms of fish against viruses and bacteria. **Dev. Comp. Immunol.** 25:827-839.

_____, R. J. Roberts and P. Tytler. 1989. **The Anatomy and Physiology of Teleost**. Bailliere Tindall., London.

Elmusharaf, M. A., H. W. Peek, L. Nollet and A. C. Beynen. 2007. The effect of an in-feed mannanoligosaccharide preparation (MOS) on a coccidiosis infection in broilers. **Anim. Feed Sci. Technol.** 134: 347-354.

- Espenes, A., C. M. Press, B. H. Dannevig and T. Landsverk. 1995. Immune-complex trapping in the splenic ellipsoids of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). **Cell Tissue Res.** 282: 41-48.
- Filyak, Y., O. Filyak and R. Stoika. 2007. Transforming growth factor β -1 enhances cytotoxic effect of doxorubicin in human lung adenocarcinoma cells of A549 line. **Cell Biol. Int.** 31: 851-855.
- Flach, R., N. Speidel, S. Flohe, J. Borgermann, I. G. Dresen, J. Erhard and F. U. Schade. 1998. Analysis of intragraft cytokine expression during early reperfusion after liver transplantation using semi-quantitative RT-PCR. **Cytokine** 10: 445-451.
- Freimund, S., M. Sauter, O. Kappeli and H. Dutler. 2003. A new non-degrading isolation process for 1,3- β -D-glucan of high purity from Baker's yeast *Saccharomyces cerevisiae*. **Carbohydr Polym.** 54: 159-171.
- Fritts, C. A. and P. W. Waldroup. 2003. Evaluation of Bio-Mos mannan-oligosaccharide as a replacement for growth promoting antibiotics in diet for turkeys. **Poult. Sci.** 2: 19-22.
- Fujiki, K., J. Gauley, N. C. Bols and B. Dixon. 2003. Genomic cloning of novel isoforms of the rainbow trout interleukin-8. **Immunogenetics** 55:126-131.
- Gallaher, C. M., J. Munion, R. Hesslink, J. Wise and D. D. Gallaher. 1999. Glucomannan and chitosan lower cholesterol by reducing cholesterol absorption. **FASEB J.** 13:A883
- _____. 2000. Cholesterol reduction by glucomannan and chitosan is mediated by changes in cholesterol absorption and bile acid and fat excretion. **J. Nutr.** 130:2753-2739.

- Genc, M. A., M. Aktas, E. Genc and E. Yilmaz. 2007a. Effects of dietary mannan oligosaccharide on growth, body composition and hepatopancreas histology of *Penaeus semisulcatus* (de Haan 1844). **Aquacult. Nutr.** 13: 156–161.
- _____, E. Yilmaz, E. Genc and M. Aktas. 2007b. Effects of dietary mannan oligosaccharides (MOS) on growth, body composition, and intestine and liver histology of the hybrid tilapia (*Oreochromis niloticus*×*O. aureus*). **Aquaculture** 59: 10–16.
- Gibson, G. R. and M. B. Roberfroid. 1995. Dietary modulation of the human colonic microbiota: introducing the concept of prebiotics. **J. Nutr.** 125: 1401–1412.
- Gonzaleza, S. F., M. O. Huisinc, R. Stakauskase, M. Forlenzac, B. M. L. Verburg-van Kemenadec, K. Buchmanna, M. E. Nielsena and G. F. Wiegertjesc. 2007. Real-time gene expression analysis in carp (*Cyprinus carpio* L.) skin: Inflammatory responses to injury mimicking infection with ectoparasites. **Dev. Comp. Immunol.** 31: 244–254.
- Grisdale-Helland, B., S. J. Helland and D. M. Gatlin III. 2008. The effects of dietary supplementation with mannanoligosaccharide, fructooligosaccharide or galactooligosaccharide on the growth and feed utilization of Atlantic salmon (*Salmo salar*). **Aquaculture** 283: 163–167.
- Gu, X. J., B. Cui, Z. F. Zhao, H. Y. Chen, X. Y. Li, S. Wang, G. Ning and Y. J. Zhao. 2008. Association of the interleukin (IL)-16 gene polymorphisms with Graves' disease. **Clin. Immunol.** 127: 298–302.
- Haddad, G., P. C. Hanington, E. C. Wilson, L. Grayfer and M. Belosevic. 2008. Molecular and functional characterization of goldfish (*Carassius auratus* L.) transforming growth factor β . **Dev. Comp. Immunol.** 32: 654–663.

- Hossu, B., S. Salnur and N. Gultepe. 2006. The effects of yeast derivatives (Bio-Mos) on growth of gilthead sea bream, *Sparus aurata*, pp. 93. In Lyons, T. P., K. A. Jacques and J. M. Hower, eds. **Proceedings of Alltech's 22nd Annual Symposium April 23-26, 2006**, Abstracts of Posters Presented. Lexington, KY, USA.
- Ichii, M., K. Oritani, T. Yokota, M. Nishida, I. Takahashi, T. Shirogane, S. Ezoe, N. Saitoh, R. Tanigawa, P. Kincade and Y. Kanakura. 2008. Regulation of human B lymphopoiesis by the transforming growth factor- β superfamily in a newly established coculture system using human mesenchymal stem cells as a supportive microenvironment. **Exp. Hematol.** 36(5): 587-597
- Inoue, Y., M. Endo, C. Haruta, T. Taniuchi, T. Moritomo and T. Nakanishi. 2003a. Molecular cloning and sequencing of the silver chimaera (*Chimaera phantasma*) interleukin-8 cDNA. **Fish Shellfish Immunol.** 15: 269-274.
- _____, C. Haruta, K. Usui, T. Moritomo and T. Nakanishi. 2003b. Molecular cloning and sequencing of the banded dogfish (*Triakis scyllia*) interleukin-8 cDNA. **Fish Shellfish Immunol.** 14: 275-281.
- Jack, D.L., R. C. Read, A. J. Tenner, M. Frosch, M. W. Turner and N. J. Klein. 2001. Mannose-binding lectin regulates the inflammatory response of human professional phagocytes to *Neisseria meningitidis* serogroup B. **J. Infect. Dis.** 184: 1152-1162.
- Jie, W. and P. Shu-Sheng. 1997. Comparison of hypolipidemic effect of refined Konjac meal with several common dietary fibers and their mechanisms of action. **Biomed. Environ. Sci.** 10: 27-37.
- Jones, G. H. and C. E. Ballou. 1969. Studies on the structure of yeast mannan. **J. Biol. Chem.** 244: 1043-1051.

- Jones, S. R. 2001. The occurrence and mechanisms of innate immunity against parasites in fish. **Dev. Comp. Immunol.** 25: 841-852.
- Kaattari, S. L. and M. J. Irwin. 1985. Salmonid spleen and anterior kidney harbor populations of lymphocytes with different B cell repertoires. **Dev. Comp. Immunol.** 9: 433-444.
- Kaiser, P., L. Rothwell, S. Avery and S. Balu. 2004. Evolution of the interleukins. **Dev. Comp. Immunol.** 28: 375-394.
- Klein, J., and V. Horejsi. 1997. **Immunology**. Blackwell Science Inc.
- Laing, K., J. Zou, T. Wang, N. Bols, I. Hirono, T. Aoki and C. Secombes. 2002. Identification and analysis of an interleukin 8-like molecule in rainbow trout *Oncorhynchus mykiss*. **Dev. Comp. Immunol.** 26: 433-444.
- Lee, E., H. Park, Y. Kim and T. J. Choi. 2001. Cloning and sequence analysis of the interleukin-8 gene from flounder (*Paralichthys olivaceous*). **Gene** 274: 237-243.
- Lie, O. 1985. Improved agar plate assays of bovine lysozyme and haemolytic complement activity, pp. 1-12. *In* **Markers of Resistance to Infection in Dairy Cattle**. Dissertation, Oslo, Norway, National Veterinary Institute. Vol. 5.
- Lipke, P. N. and R. Ovalle. 1998. Cell wall architecture in yeast. **J. Bacteriol.** 180: 3735-3740.
- Lji P. A., A. A. Saki and D. R. Tivey. 2001. Intestinal structure and function of broiler chickens on diets supplemented with a mannan oligosaccharide. **J. Sci. Food. Agric.** 81: 1186-1192.
- Magnadottir, B. 2006. Innate immunity of fish. **Fish Shellfish Immunol.** 20: 137-151.

- Magor, B. G. and K. E. Magor. 2001. Evolution of effectors and receptors of innate immunity. **Dev. Comp. Immunol.** 25: 651-682.
- Mathy, N. L., W. Scheuer, M. Lanzendorfer, K. Honold, D. Ambrosius, S. Norley and R. Kurth. 2000. Interleukin-16 stimulates the expression and production of pro-inflammatory cytokines by human monocytes. **Immunology** 100: 63-69.
- Merrifield, D. L., A. Dimitroglou, A. Foey, S. J. Davies, R. T. M. Baker, J. Bøgwald, M. Castex and E. Ringø. 2010. The current status and future focus of probiotic and prebiotic applications for salmonids. **Aquaculture** 302: 1-18.
- McSweegan, E. and R. I. Walker. 1986. Identification and characterization of two *Campylobacter jejuni* adhesins for cellular and mucous substrates. **Infect. Immun.** 53:141-148.
- Merino, S., X. Rubires, A. Aguilar and J. M. Tomas. 1996. The O:34-antigen lipopolysaccharide as an adhesin in *Aeromonas hydrophila*. **FEMS Microbiol. Lett.** 139: 97-101.
- Meseguer, J., A. Lopez-Ruiz and A. Garcia-Ayala. 1995. Reticulo-endothelial stroma of the head-kidney from the seawater teleost gilthead seabream (*Sparus aurata*): an ultrastructural and cytochemical study. **Anat. Rec.** 241: 303-309.
- Miguel, J. C., S. L. Rodriguez-Zas and J. E. Pettigrew. 2004. Efficacy of a mannan oligosaccharide (Bio-Mos) for improving nursery pig performance. **J. Swine Health Prod.** 12: 296-307.
- Miller, N. W. and L. W. Clem. 1984. Temperature-mediated processes in teleost immunity: differential effects of temperature on catfish *in vitro* antibody responses to thymus-dependent and thymus-independent antigens. **J. Immunol.** 133: 2356-2359.

Mirelman, D. and I. Ofek. 1986. Introduction to microbial lectins and agglutinin.

In Mirelman, D., eds. **Microbial lectins and agglutinins-properties and biological activity**. New York: John Wiley & Sons, Inc.

Murphy, T., I. Roy, A. Harrop, K. Doxon and T. Keshavarz. 2007. Effect of oligosaccharide elicitors on bacitracin A production and evidence of transcriptional level control. **J. Biotechnol.** 131: 397-403.

Najakshin, A., V. Mechetina, B. Alabyev and A. Taranin. 1999. Identification of an IL-8 homolog in lamprey (*Lampetra fluviatilis*): early evolutionary divergence of chemokines. **Eur. J. Immunol.** 29: 375-382.

Nakanishi, T. 1996. **The Fish Immune System Organism, Pathogen and Environment**. Academic Press., San Diego, California.

_____, U. Fischer, J. M. Dijkstra, S. Hasegawa, T. Somamoto, N. Okamoto and M. Ototake. 2002. Cytotoxic T cell function in fish. **Dev. Comp. Immunol.** 26: 131-139.

Ollila, J. and M. Vihinen. 2005. B cells. **Int. J. Biochem. Cell Biol.** 37: 518-523.

Oyofe, B. A., J. R. DeLoach, D. E. Corrier, J. O. Norman, R. L. Ziprin and H. H. Mollenhauer. 1989b. Prevention of *Salmonella typhimurium* colonization of broilers with D-mannose. **Poult. Sci.** 68: 1357-1360.

Oyofe, B. A., R. E. Droleskey, J. O. Norman, H. H. Mollenhauer, R. L. Ziprin, D. E. Corrier and J. R. DeLoach. 1989a. Inhibition by mannose of in vitro colonization of chicken small intestine by *Salmonella typhimurium*. **Poult. Sci.** 68: 1351-1356.

- Parodi, A. J. 1979. Biosynthesis of yeast glycoproteins. Processing of the oligosaccharides transferred from dolichol derivatives. **J. Biol. Chem.** 254: 10051–10060.
- Pasquier, L. D. 2001. The immune system of invertebrates and vertebrates. **Comp. Biochem. Physiol. B, Biochem. Mol. Biol.** 129:1-15.
- Perry, A. and I. Ofek. 1984. Inhibition of blood clearance and hepatic tissue binding of *Escherichia coli* by liver lectin-specific sugars and glycoproteins. **Infect. Immun.** 52:257-262.
- Press, C. M. and O. Evensen. 1999. The morphology of the immune system in teleost fishes. **Fish Shellfish Immunol.** 9: 309-318.
- Pryor, G.S., J. B. Royes, F. A. Chapman and R. D. Miles. 2003. Mannan oligosaccharides in fish nutrition: effects of dietary supplementation on growth and gastrointestinal villi structure in Gulf of Mexico sturgeon. **N. Am. J. Aquacult.** 65: 106–111.
- Puangkaew, J., V. Kiron, T. Somamoto, N. Okamoto, S. Satoh, T. Takeuchi and T. Watanabe. 2004. Non specific immune response of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss* Walbaum) in relation to different status of vitamin E and highly unsaturated fatty acids. **Fish Shellfish Immunol.** 16: 25-39.
- Raida, M. K. and K. Buchmann. 2008. Bath vaccination of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss* Walbaum) against *Yersinia ruckeri*: Effects of temperature on protection and gene expression. **Vaccine** 26: 1050-1062.
- Rodriguez, A., M. A. Esteban and J. Meseguer. 2003. A mannose-receptor is possibly involved in the phagocytosis of *Saccharomyces cerevisiae* by seabream (*Sparus aurata* L.) leucocytes. **Fish Shellfish Immunol.** 14: 375-388.

- Rodriguez-Estrada, U., S. Satoh, Y. Haga, H. Fushimi and J. Sweetman. 2009. Effects of single and combined supplementation of *Enterococcus faecalis*, mannan oligosaccharide and polyhydrobutyric acid on growth performance and immune response of rainbow trout *Oncorhynchus mykiss*. **Aquacult. Sci.** 57: 609–617.
- Salze, G., E. McLean, M. H. Schwarz and S. R. Craig. 2008. Dietary mannan oligosaccharide enhances salinity tolerance and gut development of larval coia. **Aquaculture** 274: 148-152.
- Sang, H. M. and R. Fotadar. 2010. Effects of mannan oligosaccharide dietary supplementation on performances of the tropical spiny lobsters juvenile (*Panulirus ornatus*, Fabricius 1798). **Fish Shellfish Immunol.** 28: 483-489.
- _____, L. T. Ky and R. Fotadar. 2009. Dietary supplementation of mannan oligosaccharide improves the immune responses and survival of marron, *Cherax tenuimanus* (Smith, 1912) when challenged with different stressors. **Fish Shellfish Immunol.** 27: 341-348.
- Sangrador-Vegas, A., J. B. Lenington and T. J. Smith. 2002. Molecular cloning of an IL-8-like CXC chemokine and tissue factor in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) by use of suppression subtractive hybridization. **Cytokine** 17: 66-70.
- Santoso, U., K. Tanaka and S. Ohtani. 1995. Effect of dried composition and *Bacillus subtilis* culture on growth, body hepatic lipogenic enzyme activity in female broiler chicks. **Br. J. Nutr.** 74: 523-529.
- Secombes, C. J., L. J. Hardie and G. Daniels. 1996. Cytokines in fish. **Fish Shellfish Immunol.** 6: 291-304.

- _____, T. Wang, S. Hong, S. Peddie, M. Crampe, K. J. Laing, C. Cunningham and J. Zou. 2001. Cytokine and innate immunity of fish. **Dev. Comp. Immunol.** 25: 713-723.
- _____, J. Zou, K. Laing, G. D. Daniels and C. Cunningham. 1999. Cytokine genes in fish. **Aquaculture** 172: 93-102.
- Shane, S. 2001. Mannan oligosaccharides in poultry nutrition: mechanisms and benefits, pp. 65-77. In Jacques K. A. and T. P. Lyons, eds. **Proceedings of Alltech's 17th Annual Symposium**. Biotechnology in the feed industry. Nottingham University, Nottingham, UK.
- Sipring, P., C. Wenk, K. A. Dawson and M. E. Newman. 2000. The effect of dietary mannan oligosaccharides on cecal parameters and the concentrations of enteric bacteria in cecal of *Salmonella* challenged broiler chick. **J. Poult. Sci.** 79: 205-211.
- Sotirov, L. K. 1986. Method for determination of the alternative pathway of complement activation in some animals and man, pp. 1-10. In **Fourth Scientific Conference of Agriculture**. Stara Zagora.
- Spring, P., C. Wenk, K. A. Dawson and K. E. Newman. 2000. The effects of dietary mannan oligosaccharides on cecal parameters and the concentrations of enteric bacteria in the ceca of *Salmonella*-challenged broiler chicks. **Poult. Sci.** 79: 205-211.
- Staykov, Y., S. Denev and P. Spring. 2005a. The effects of mannan oligosaccharide (Bio-Mos) on the growth rate and immune function of rainbow trout (*Salmo gairdneri* irideus G.) growth in net cages, pp. 427-428. In Howell, B. and R. Flos, eds. **Lessons from the past to optimise the future**. European Aquaculture Society, Special Publication No.35. June 2005.

- _____. 2005b. The effects of mannan oligosaccharide (Bio-Mos) on the growth rate and immune function of rainbow trout (*Salmo gairdneri* irideus G.) growth in raceways, pp. 429-430. In Howell, B. and R. Flos, eds. **Lessons from the past to optimise the future**. European Aquaculture Society, Special Publication No.35. June 2005.
- _____. 2005c. Influence of dietary mannan oligosaccharides (Bio-Mos) on growth rate and immune function of common carp (*Cyprinus carpio* L), pp. 431-432. In Howell, B. and R. Flos, eds. **Lessons from the past to optimise the future**. European Aquaculture Society, Special Publication No.35. June 2005.
- _____, P. Spring, S. Denev and J. Sweetman. 2007. Effects of mannan oligosaccharide on the growth performance and immune status of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). **Aquaculture** 15: 153-161.
- Stelzar, A. and G. Stein. 1971. Möglichkeiten zur hämolytischen Aktivitätsmessung von Gesamtkomplement Theoretische Grundlagen und methodische Hinweise. Wissenschaftliche Zeitschrift der Friedrich Schiller Universität Uena. Mathematisch Naturwissenschaftliche Reihe 20, Jg H6: 933-941.
- Swanson, K. S., C. M. Grieshop, E. A. Flickinger, L. L. Bauer, H. P. Healy, K. A. Dawson, N. R. Merchen and G. C. Fahey, Jr. 2002. Supplemental fructooligosaccharides and mannanoligosaccharides influence immune function, ileal and total tract nutrient digestibilities, microbial populations and concentrations of protein catabolites in the large bowel of dogs. **Nutrition** : 980-989
- Terre, M., M. A. Calvo and C. Adelantado. 2007. Effects of mannan oligosaccharides on performance and microorganism fecal counts of calves following an enhanced-growth feeding program. **Anim. Feed Sci. Technol.** 137: 115-125.

Terova, G., A. Forchino, S. Rimoldi, F. Brambilla, M. Antonini and M. Saroglia. 2009.

Bio-Mos®: An effective inducer of dicentracin gene expression in European sea bass (*Dicentrarchus labrax*). **Comp. Biochem. Physiol.** 153: 372-377.

Torrecillas, S. and M. S. Izquierdo. 2006. The effect of Bio-Mos on European sea

bass (*Dicentrarchus labrax*) juveniles: growth performance and feed utilization, pp. 91.

In Lyons, T. P., K. A. Jacques and J. M. Hower, eds. **Proceedings of Alltech's 22nd Annual Symposium April 23-26, 2006**. Abstracts of Posters Presented. Lexington, KY, USA.

_____, A. Makol, M. J. caballero, D. Montero and R. Gines. 2010. Improved feed utilization, intestinal mucus production and immune parameters in sea bass (*Dicentrarchus labrax*) fed mannan oligosaccharides (MOS). **Aquaculture Nutrition**. Blackwell Publishing Ltd.

_____, A. Makol, M. J. caballero, D. Montero and R. Gines. 2010. Improved feed utilization, intestinal mucus production and immune parameters in sea bass (*Dicentrarchus labrax*) fed mannan oligosaccharides (MOS). **Aquaculture Nutrition**. Blackwell Publishing Ltd. Cited Sandberg, T., M. Nestor, C. Pahlson, L. Shi and K. D. Caldwell. 2000. Mucin as surface protectant against bacterial adhesion. **Abstr. Pap. Am. Chem. Soc.** 220: 35.

_____, L. Robaina, F. Real, J. Sweetman, L. Tort and M.S. Izquierdo. 2007. Immune stimulation and improved infection resistance in European sea bass (*Dicentrarchus labrax*) fed mannan oligosaccharides. **Fish Shellfish Immunol.** 23: 969-981.

Turner, M. W. 1996. Mannose-binding lectin: the pluriopotent molecule of the innate immune system. **Immunol. Today.** 17: 532-540.

_____, 2003. The role of mannose-binding lectin in health and disease. **Mol. Immunol.** 40: 423-429.

Vesna, T., M. Lazarevic, Z. Sinovec and A. Tokic. 2007. The influence of different feed additives to performances and immune response in broiler chicken. **Acta Vet.** 57: 217-229.

Wallker, G. M. 1998. **Yeast Physiology and Biotechnology.** John Willey & Sons Ltd. Chichester, England.

Warr, G. W. 1995. The immunoglobulin gene of fish. **Dev. Comp. Immunol.** 19: 1-12.

Wen, Y., J. Z. Shao, L. X. Xiang and W. Fang. 2006. Cloning, characterization and expression analysis of two *Tetraodon nigroviridis* interleukin-16 isoform genes. **Comp. Biochem. Physiol. B, Biochem. Mol. Biol.** 144: 159-166.

White, L. A., M. C. Newman, G. L. Cromwell and M. D. Lindemann. 2002. Brewers dried yeast as a source of mannan oligosaccharides for weanling pigs. **J. Anim. Sci.** 80: 2619-2628.

Whyte, S. K. 2007. The innate immune response of finfish. **Fish Shellfish Immunol.** 23: 1127-1151.

Wright, S. D., S. M. Levine, M. C. T. Jong, Z. Chad and L. G. Kabbash. 1989. CR3 (CD11b}CD18) expresses one binding site for Arg-Gly-Asp-containing peptides and a second site for bacterial lipopolysaccharide. **J. Exp. Med.** 169: 175-183.

- Yilmaz, E., M. A. Genc and E. Genc, 2007. Effects of dietary mannan oligosaccharides on growth, body composition, and intestine and liver histology of rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*. **Aquaculture** 59: 182–188.
- Yoakim, E. G. and J. M. Grizzle. 2006. Ultrastructure of alarm substance cells in the epidermis of the channel catfish, *Ictalurus punctatus* (Rafinesque). **J. Fish. Biol.** 20: 213-221.
- Yoshida, T., R. Kruger and V. Inglis. 1995. Augmentation of nonspecific protection in African catfish, *Clarias gariepinus* (Burchell), by the long-term oral-administration of immunostimulants. **J. Fish Dis.** 18: 195–198.
- Zarkadis, I. K., D. Mastellos and J. D. Lambris. 2001. Phylogenetic aspects of the complement system. **Dev. Comp. Immunol.** 25: 745-762.
- Zou, J., J. Holland, O. Pleguezuelos, C. Cunningham and C. J. Secombes. 2000. Factors influencing the expression of interleukin-1 β in culture rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) leukocytes. **Dev. Comp. Immunol.** 24: 575-582.



การเตรียมสารในการวิเคราะห์ค่า Antibody titer

วัคซีน (Formalin-killed vaccine)

อุปกรณ์และสารเคมี

1. เซลล์ของแบคทีเรีย *Streptococcus agalactiae* ที่ผ่านการทดสอบแล้วว่าเป็นเชื้อที่ทำให้เกิดโรค
2. สารละลายฟอร์มาลิน (Formalin solution) 2 ความเข้มข้น คือ
 - ความเข้มข้น 0.1% (ใช้สำหรับเก็บรักษาวัคซีนที่เตรียมแล้ว)
 - ความเข้มข้น 1.0% (ใช้สำหรับฆ่าเชื้อแบคทีเรียให้ตาย)
3. เครื่องปั่นเหวี่ยง (Centrifuge)
4. Test tube และ Volumetric flasks
5. อาหารเลี้ยงเชื้อ (TSA และ TSB)
6. สารละลายโซเดียมคลอไรด์ 0.85% ที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว

วิธีการทดลอง

1. นำเชื้อ (*Streptococcus agalactiae*) ที่ตรวจยืนยันชนิดแล้วมาเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อ TSB เป็นเวลา 18-24 ชั่วโมง
2. หลังเชื้อเจริญแล้วจึงนำไปปั่นเหวี่ยง 2,500 รอบต่อนาที เป็นเวลา 15 นาที
3. เทส่วนใสออก แล้วล้างออกด้วยสารละลายโซเดียมคลอไรด์ 0.85% ที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว
4. นำไปปั่นเหวี่ยงอีกครั้ง ที่ 2,500 รอบต่อนาที เป็นเวลา 15 นาที
5. ทำในขั้นตอนที่ 3 และ 4 อีก 2 ครั้ง
6. ใส่สารละลายฟอร์มาลินความเข้มข้น 1.0% เพื่อเป็นการฆ่าเชื้อ
7. นำสารละลายเชื้อที่ถูกฆ่าแล้วนำไป Streak บน TSA เพื่อตรวจยืนยันว่าเชื้อตายสมบูรณ์แล้ว โดยระยะเวลาการตรวจบนอาหารเลี้ยงเชื้อใช้เวลา 1 คืน จึงเก็บสารละลายเชื้อไว้ที่ 4 องศาเซลเซียส ก่อน

8. ตรวจผลการเจริญบน TSA ถ้าไม่พบเชื้อเจริญแสดงว่าวัคซีนที่ได้เหมาะสมจะนำไปใช้ต่อ หากมีเชื้อเจริญ ต้องนำกลับไปฆ่าด้วยฟอร์มาลินอีกครั้ง

9. กรณีไม่มีเชื้อขึ้น ให้นำวัคซีนที่ได้ล้างด้วยสารละลายโซเดียมคลอไรด์ 0.85% ที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว นำไปปั่นที่ 2,500 รอบต่อนาที เป็นเวลา 15 นาที 2-3 ครั้ง จึงนำ Formalin-killed vaccine ที่ได้ไปใช้ หากวัคซีนที่ได้มีความเข้มข้นสูงเกินไปต้องปรับความเข้มข้น ให้มีระดับความเข้มข้น 10^9 CFU/ml ซึ่งเป็นความเข้มข้นที่จะใช้ในสัตว์ทดลองและสำหรับทำ Antibody titer และถ้าต้องการเก็บวัคซีนไว้นาน ๆ ให้เก็บโดยการเติม 0.1% Formalin ลงไปแต่ก่อนนำมาใช้ทุกครั้งต้องล้างด้วยสารละลายโซเดียมคลอไรด์ 0.85% ที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้วก่อน

การเตรียมสารเคมีในการวิเคราะห์กิจกรรมการจับกินสิ่งแปลกปลอมของเซลล์เม็ดเลือดขาว (Phagocytic activity)

1. Phosphate Buffered Saline (PBS) pH 7.4 ประกอบด้วย

- NaCl	8.0	กรัม
- KCl	0.2	กรัม
- $\text{Na}_2\text{H}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	1.44	กรัม
- KH_2PO_4	0.24	กรัม

นำส่วนผสมทั้งหมดละลายด้วยน้ำกลั่น ปรับปริมาตรให้ได้ 800 มิลลิลิตร จากนั้นนำไปปรับ pH ด้วย HCl หรือ NaOH เพื่อให้ได้ค่า pH=7.4 จากนั้นนำไปฆ่าเชื้อด้วยเครื่องนึ่งภายใต้ความดันสูง (Autoclave)

2. สารละลายยีสต์ (Heat-killed yeast)

Baker's yeast	0.5	กรัม
สารละลายโซเดียมคลอไรด์ 0.9% ที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว	250	มิลลิลิตร

เติมน้ำยีสต์ลงในสารละลายโซเดียมคลอไรด์ 0.9% ที่ผ่านการฆ่าเชื้อ คนให้เข้ากันแล้วนำไปต้มเป็นเวลานาน 1 ชั่วโมง จากนั้นนำไปปั่นล้างด้วยสารละลาย PBS ที่ความเร็ว 2,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที จำนวน 3 ครั้ง จากนั้นปรับความเข้มข้นของเซลล์ยีสต์ให้ได้เท่ากับ 10^8 เซลล์ต่อมิลลิลิตร

การเตรียมสารเคมีในการวิเคราะห์ Superoxide anion (O_2^-)

1. Nitrotetrazolium blue chloride (NBT)

ละลาย NBT 1 มิลลิกรัมด้วย PBS pH 7.4 ปริมาตร 1 มิลลิลิตร เก็บไว้ในที่มืด

2. 2N KOH

ละลาย KOH 112.22 กรัม ในน้ำกลั่นที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้วปริมาตร 1 ลิตร

3. 70% Ethanol

ผสม 100% Ethanol ปริมาตร 70 มิลลิลิตรกับน้ำกลั่นที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้วปริมาตร 30 มิลลิลิตร

การคำนวณปริมาณเม็ดเลือด (Total hemocytes count)

$$\begin{aligned}
 \text{ปริมาตรของ Hemacytometer} &= \text{กว้าง} \times \text{ยาว} \times \text{สูง} \\
 &= 1 \text{ มม.} \times 1 \text{ มม.} \times 0.1 \text{ มม.} \\
 &= 0.1 \text{ มม.}^3 \\
 \text{จำนวนเซลล์เม็ดเลือด/ มม.}^3 &= \text{เซลล์เม็ดเลือดที่นับได้} \\
 \text{จำนวนเซลล์เม็ดเลือด/ มล.}^3 &= \text{เซลล์เม็ดเลือดที่นับได้} \times 10^4 \times \text{ค่า dilution}
 \end{aligned}$$

การเตรียมสารเคมีที่ใช้สำหรับงานทางด้านอนุชีวโมเลกุล

1. 1.5% Agarose Gel

ชั่ง Agarose ใส่บัฟเฟอร์ TBE (1X) ให้ได้ความเข้มข้น 1.5% ต้มจนละลายเป็นเนื้อเดียวกัน ทิ้งให้เย็นจนอุณหภูมิประมาณ 60 องศาเซลเซียส จากนั้นนำไปเทลงบน Gel chamber ที่มี Comb อยู่แล้ว วางทิ้งไว้ประมาณ 1 ชั่วโมงจนกระทั่งเจลแข็งตัวจึงดึง Comb ออก

2. 10X MOP Buffer

200 mM [N-Morpholino] propanesulfonic acid

50 mM Sodium acetate

10 mM EDTA

ปรับ pH ให้ได้เท่ากับ 6.5-7.0 ด้วย NaOH

3. 5X TBE (Tris-Borate-EDTA) ปริมาตร 1000 มิลลิลิตร

Tris base 54.0 กรัม

Boric acid 27.5 กรัม

EDTA (pH 8.0) 20.0 กรัม

ปรับปริมาตรให้ได้ 1,000 มิลลิลิตร แล้วจึงนำไปฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งความดันไอน้ำที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลานาน 20 นาที

4. Marker 100 bp ปริมาตร 60 ไมโครลิตร

100 bp DNA Ladder plus (Fermentas) 10 ไมโครลิตร

6X Loading dye solution 10 ไมโครลิตร

Distilled water 40 ไมโครลิตร

5. 10X Loading dye

Ficol 400 7.5 กรัม

Bromphenol blue 0.125 กรัม

เติมน้ำกลั่นที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว 50.0 มิลลิลิตร

ประวัติการศึกษาและการทำงาน

ชื่อ	นางสาวจิณณพัต ตำรองพันธุ์
เกิดวันที่	13 กรกฎาคม 2527
สถานที่เกิด	อำเภอเมือง จังหวัดนครพนม
ประวัติการศึกษา	วท.บ. (ประมง) มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์
ตำแหน่งปัจจุบัน	-
สถานที่ทำงานปัจจุบัน	-
ผลงานดีเด่นและ/หรือรางวัลทางวิชาการ	-
ทุนการศึกษาที่ได้รับ	-