

บทที่ 5

อภิปรายผล สรूप และข้อเสนอแนะ

สารกระตุ้นภูมิคุ้มกัน (immunostimulants) เป็นทางเลือกหนึ่งที่ถูกนำมาใช้อย่างกว้างขวางในอุตสาหกรรมการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำ เพื่อลดการใช้จ่ายวัคซีนและสารเคมีในการจัดการสุขภาพสัตว์น้ำ พบว่าสารกระตุ้นภูมิคุ้มกันหลายชนิด อาทิ glucan, chitin, lactoferrin, levamisole และสารสกัดจากพืชหลายชนิด สามารถกระตุ้นการเจริญเติบโต ความต้านทานโรค และระบบภูมิคุ้มกันของปลาได้อย่างมีประสิทธิภาพ ทั้งในรูปแบบการผสมอาหาร และการฉีด (Harikrishnan *et al.*, 2011) อย่างไรก็ตาม ประสิทธิภาพของสารกระตุ้นภูมิคุ้มกันแต่ละชนิดจะแตกต่างกันไปขึ้นอยู่กับปริมาณที่ใช้ ชนิดของสัตว์น้ำ และวิธีการให้สารกระตุ้นภูมิคุ้มกัน (application method) (Hai, 2015) งานวิจัยนี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาผลของการเสริม chitosan และ levamisole ในอาหารต่อการเจริญเติบโต ภูมิคุ้มกันแบบไม่จำเพาะ และความต้านทานโรคของปลานิล (*Oreochromis niloticus*) ที่เลี้ยงในกระชังในบ่อดิน

การศึกษาค้นคว้าผลของการเสริม chitosan และ levamisole ในอาหารต่อการเจริญเติบโต ผลการทดลองชี้ให้เห็นว่าปลานิลที่ได้รับอาหารผสม chitosan ที่ระดับ 1% และ levamisole ที่ระดับ 250 mg/kg อาหาร มีอัตราการเจริญเติบโต (specific growth rate; SGR) สูง และมีอัตราการแลกเนื้อ (FCR) ต่ำ เมื่อเปรียบเทียบกับปลาในกลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ แม้ว่าอัตราการเจริญเติบโต และอัตราการแลกเนื้อของปลาในกลุ่มที่ได้รับทั้ง chitosan และ levamisole (T4) จะไม่แตกต่างจากกลุ่มที่ได้รับ chitosan หรือ levamisole อย่างใดอย่างหนึ่ง ทั้งนี้มีความเป็นไปได้ว่าทั้ง chitosan และ levamisole ในอาหารสามารถกระตุ้นการหลั่งเอนไซม์ที่เกี่ยวข้องกับการย่อยอาหาร (digestive enzymes) ส่งผลต่อประสิทธิภาพการใช้อาหารของปลา และนำไปสู่อัตราการเจริญเติบโตที่ดีขึ้น สอดคล้องกับรายงานของ Radhakrishnan และคณะ (2014) ซึ่งพบว่ากุ้งก้ามกราม (*Macrobrachium rosenbergii*) ที่ได้รับอาหารผสมสารสกัดจากพืชสมุนไพร 3 ชนิด มีระดับของเอนไซม์ย่อยอาหาร (protease, amylase และ lipase) ประสิทธิภาพการใช้อาหาร และอัตราการเจริญเติบโตสูงขึ้น นอกจากนี้พบว่ากุ้งก้ามกรามยังมีระดับของวิตามินซี และวิตามินอีในตับ และระดับโซเดียม โพแทสเซียม และกลูตามีนเพิ่มขึ้นหลังจากได้รับอาหารผสมสารสกัดจากพืชสมุนไพร และจากการทดลองในปลา Olive flounder และปลา Parrot fish พบว่าปลาทดลองที่ได้รับอาหารผสมสารสกัดจากพืชมีอัตราการเจริญเติบโตสูง และมี FCR ต่ำ (Kim *et al.*, 2012) อย่างไรก็ตามในการทดลองครั้งนี้พบว่าปลานิลที่ได้รับอาหารผสม chitosan และ levamisole มีอัตราการรอด (Survival rate) ตลอดระยะเวลา 12 สัปดาห์ของการทดลองอยู่ระหว่าง 76.66 - 80.67 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งไม่แตกต่างจากกลุ่มควบคุม (75.33 เปอร์เซ็นต์)

องค์ประกอบสำคัญในกระบวนการตอบสนองทางภูมิคุ้มกันแบบไม่จำเพาะของปลา ประกอบด้วย Phagocytic cells ได้แก่ macrophages, monocytes, granulocytes และสารน้ำต่างๆ

(humoral elements) อาทิ lysozyme (Magnadottir, 2006) โดย Phagocytic cells จะเป็นกลุ่มเซลล์ที่มีบทบาทสำคัญในการทำลายสิ่งแปลกปลอม โดยมีการผลิต toxic oxygen forms ผ่านกระบวนการ respiratory burst และพบว่ากระบวนการทำลายสิ่งแปลกปลอม หรือ phagocytic activity ของปลาสามารถถูกกระตุ้นได้ด้วยสารประกอบ หรือสารสกัดจากพืช หรือจุลินทรีย์หลายๆ ชนิด ซึ่งมีคุณสมบัติเป็น Immunostimulants (Jeney *et al.*, 1997; Siwicki *et al.*, 1994) การศึกษาผลของการเสริม chitosan และ levamisole ในอาหารต่อภูมิคุ้มกันแบบไม่จำเพาะของปลานิลในงานวิจัยนี้ครอบคลุมทั้งส่วนของ phagocytic activity และ humoral elements ประกอบด้วยการวิเคราะห์ NBT reduction, lysozyme activity และ complement activity

NBT reduction เป็นการวัดความว่องไวของเซลล์เม็ดเลือดขาวชนิดนิวโทรฟิล (neutrophil activity) หรือความสามารถของ phagocytic cells ในการสลายสี โดยการผลิต oxygen radicals โดยทั่วไป oxygen radicals ในสัตว์จะมีบทบาทในการทำลายเซลล์แบคทีเรีย และความสามารถของเซลล์ macrophage ในการทำลายเซลล์สิ่งแปลกปลอมเป็นหนึ่งในกลไกสำคัญในการป้องกันการติดเชื้อก่อโรคในปลา (Maqsood *et al.*, 2009) อย่างไรก็ตามผลการทดลองนี้พบว่าทั้ง chitosan และ levamisole ไม่มีผลต่อการกระตุ้น neutrophil หรือ macrophage ของปลานิล ทั้งนี้สังเกตจากค่า NBT reduction ของปลานิลที่ได้รับอาหารผสม chitosan ที่ระดับ 1% และ levamisole ที่ระดับ 250 mg/kg อาหาร มีค่าไม่แตกต่างจากปลาในกลุ่มควบคุม แต่จากการทดลองของ Kumari and Sahoo (2006a) พบว่าปลาตุ๊กตาด่าน (*Clarias batrachus*) ที่ได้รับอาหารผสม levamisole มีค่า respiratory burst (NBT) activity สูงกว่ากลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญ หรือผลจากการฉีดสารสกัดจากกระเพรา (*Ocimum sanctum*) ปริมาณ 20 ไมโครกรัม พบว่าปลาหมอเทศ (*Tilapia mossambicus*) มีระดับของ neutrophil activity สูงขึ้น (Logambal *et al.*, 2000) นอกจากนี้จากการทดลองในปลาไน (*Cyprinus carpio*) พบว่า respiratory burst activity ของ phagocytic cells ซึ่งวัดจากการลดลงของ NBT (NBT reduction) โดย intracellular superoxide radicals ที่ผลิตจากเซลล์เม็ดเลือดขาวจะสัมพันธ์กับระดับของ levamisole ที่เพิ่มขึ้นในอาหาร และสูงสุดที่อาหารผสม levamisole ที่ระดับ 5% (Maqsood *et al.*, 2009)

Lysozyme เป็น hydrolytic enzyme และโปรตีนที่สำคัญในกระบวนการตอบสนองทางด้านภูมิคุ้มกันแบบไม่จำเพาะของปลา ซึ่งพบใน phagocytic cells เมือก และน้ำเลือดของปลา (Studnicka *et al.*, 1986) และทำหน้าที่เป็นสาร opsonin และกระตุ้น complement system (Grinde, 1989) lysozyme เป็น cation enzyme ที่ตัดพันธะ β -1,4 glycosidic bonds ระหว่าง N-acetylmuramic acid และ N-acetylglucosamine ในชั้น peptidoglycan ของผนังเซลล์แบคทีเรีย ร่วมกับโปรตีน complement (Alexander and Ingram, 1992) งานวิจัยนี้ชี้ให้เห็นว่าปลานิลที่ได้รับอาหารผสม chitosan ที่ระดับ 1% หรือ levamisole ที่ระดับ 250 mg/kg อาหาร เป็นเวลา 12 สัปดาห์ มีระดับของ lysozyme activity สูงขึ้นเมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม ซึ่งสัมพันธ์กับอัตราการรอดที่สูงขึ้นของปลานิลหลังจากถูกชักนำให้ติดเชื้อ *Streptococcus agalactiae* โดยวิธีการแช่ (อัตราการรอดอยู่ระหว่าง

95 – 97 เปอร์เซ็นต์) สอดคล้องกับรายงานผลการทดลองที่พบว่าความสามารถในการต้านทานต่อการติดเชื้อแบคทีเรียที่สูงขึ้นของปลาจะสัมพันธ์ระดับของ lysozyme ในน้ำเลือด phagocytic activity, bactericidal activity ของเม็ดเลือดขาวบริเวณไตส่วนหน้า (Robertson *et al.*, 1994) นอกจากนี้ Cha และคณะ (2008) ยังพบว่า lysozyme activity ในเมือกที่ผิวหนังของปลา Olive flounder ที่ได้รับอาหารเคลือบ chitosan ที่ระดับ 1% มีค่าสูงกว่าอย่างมีนัยสำคัญเมื่อเปรียบเทียบกับปลากลุ่มที่ไม่ได้รับอาหารเคลือบ chitosan และ chitosan ในอาหารยังส่งผลต่อการกระตุ้น respiratory burst activity, myeloperoxidase, lysozyme และค่าดัชนีอื่นๆ ในน้ำเลือดอีกด้วย โดยเฉพาะฮิโมโกลบิน, unsaturated fatty acid (HDL) และ saturated fatty acid (LDL) ซึ่งองค์ประกอบในเลือดเหล่านี้เป็นดัชนีบ่งชี้สุขภาพของปลาที่สำคัญ สอดคล้องกับการทดลองในปลานิล (*Oreochromis niloticus*) ในประเทศอียิปต์พบว่าปลานิลที่ได้รับอาหารผสม levamisole ที่ระดับ 225 mg/kg อาหาร เป็นเวลา 3 สัปดาห์ มีระดับความเข้มข้นของ lysozyme ในน้ำเลือด และอัตราการรอดจากการชักนำให้ติดเชื้อ *Aeromonas hydrophila* โดยวิธีการฉีดเข้าช่องท้องสูงขึ้นเมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม (Abdelkhalek *et al.*, 2008) และในทำนองเดียวกัน ปลาไน (*Cyprinus carpio*) ที่ได้รับอาหารผสม chitosan ที่ระดับ 1% และ levamisole ที่ระดับ 250 mg/kg อาหาร เป็นเวลา 45 และ 90 วัน จะมีอัตราการรอด (Relative percentage survival) จากการชักนำให้ติดเชื้อ *Aeromonas hydrophila* สูงขึ้น ซึ่งเป็นผลจากการกระตุ้นระบบภูมิคุ้มกันแบบไม่จำเพาะของปลาจาก chitosan และ levamisole (Gopalakannan and Arul, 2006) นอกเหนือจาก chitosan และ levamisole แล้วยังพบว่า glucan ก็สามารถกระตุ้นระบบภูมิคุ้มกันแบบไม่จำเพาะ และความต้านทานโรคของปลาหลายชนิดด้วย (Galeotti, 1998; Robertsen, 1999; Sakai, 1999)

Natural haemolytic complement activity เป็นการวิเคราะห์ระดับของโปรตีน complement ในน้ำเลือดในการย่อยสลายเซลล์เม็ดเลือดแดง (Alternative Complement Pathway Hemolytic Activity) (ACH50) จากผลการทดลองพบว่าค่ากิจกรรมของโปรตีน complement ในน้ำเลือดในการย่อยสลายเซลล์เม็ดเลือดแดงของปลาที่ได้รับ chitosan และ levamisole มีค่าสูงขึ้นอย่างมีนัยสำคัญเมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม บ่งชี้ถึงความสามารถของ chitosan และ levamisole ในการกระตุ้นการหลั่งสารน้ำของเซลล์เม็ดเลือดขาว โปรตีน complement ในน้ำเลือดปลาเป็นองค์ประกอบสำคัญในระบบภูมิคุ้มกันแบบไม่จำเพาะของปลา มีบทบาทในการทำลายเซลล์สิ่งแปลกปลอม และเป็นสาร opsonin ซึ่งจะไปจับกับเซลล์สิ่งแปลกปลอมก่อนที่จะถูกทำลายโดย phagocytic cells นอกจากนี้โปรตีน complement ยังเกี่ยวข้องกับการเกิดการอักเสบ (inflammation) อีกด้วย (Holland and Lambris, 2002) การเพิ่มขึ้นของค่า complement haemolytic activity ในน้ำเลือดปลาที่ได้รับอาหารผสม chitosan และ levamisole จึงสัมพันธ์กับอัตราการรอดของปลาทดลองหลังจากถูกชักนำให้ติดเชื้อ *Streptococcus agalactiae* ด้วย สอดคล้องกับรายงานการศึกษาในปลา clownfish ที่ได้รับอาหารผสมสารสกัดจากไบกงกวาง (*Rhizophora apiculata*) ที่ระดับ 5 และ 10 เปอร์เซ็นต์ จะมีค่า alternate complement activity และอัตราการรอดสูงขึ้นหลังจากถูกชักนำให้มีการติดเชื้อแบคทีเรีย *Vibrio alginolyticus* (Dhayanithi *et al.*, 2015)

Gopalakannan and Arul (2006) และ Baba และคณะ (1993) รายงานว่าปลาไน (*Cyprinus carpio*) ที่ได้รับอาหารผสม chitin, chitosan หรือ levamisole มีอัตราการรอดสูงขึ้นเมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม หลังจากการชักนำให้ติดเชื้อ *Aeromonas hydrophila* นอกจากนี้ยังพบว่า levamisole มีบทบาทในการกระตุ้นระบบภูมิคุ้มกันของปลาไน (Siwicki, 1987, 1989; Baba *et al.*, 1993) ปลา rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) (Kajita *et al.*, 1990) และปลา turbot (*Scophthalmus maximus*) (Alvarez-Pellitero *et al.*, 2006) ได้อย่างมีประสิทธิภาพ โดยหลังจากการทดลองให้อาหารผสม levamisole ทั้งปลาไน ปลา rainbow trout และปลา turbot มีค่าปัจจัยภูมิคุ้มกันแบบไม่จำเพาะสูงขึ้น และต้านทานต่อการติดเชื้อแบคทีเรีย โดยปลาทดลองกลุ่มที่ได้รับอาหารผสม levamisole มีอัตราการตายเพียง 31% ในขณะที่กลุ่มควบคุมมีอัตราการตายสูงถึง 88% หลังจากชักนำให้มีการติดเชื้อ *Vibrio anguillarum* และพบอัตราการรอดสูงถึง 100% ในปลาทดลองที่ได้รับอาหารผสม levamisole ที่ระดับ 0.5% (Dina Rairakhwada *et al.*, 2007)

อย่างไรก็ตามไม่พบการเสริมฤทธิ์กัน (synergistic effect) ระหว่าง chitosan และ levamisole ซึ่งจากผลการทดลองกลุ่มปลานิลที่ได้รับอาหารผสม chitosan ที่ระดับ 1% และ levamisole ที่ระดับ 250 mg/kg อาหาร มีอัตราการเจริญเติบโต และปัจจัยภูมิคุ้มกันแบบไม่จำเพาะ และความต้านทานโรคสูงกว่าปลาในกลุ่มควบคุม แต่ไม่แตกต่างจากกลุ่มที่ได้รับ chitosan หรือ levamisole อย่างใดอย่างหนึ่ง อย่างมีนัยสำคัญ ในขณะที่มีรายงานพบว่าปลา cobia ที่ได้รับอาหารผสมโปรไบโอติก (*Bacillus subtilis*) ที่ระดับ 1.0 กรัมต่อกิโลกรัมอาหาร ร่วมกับ chitosan ที่ระดับ 6.0 กรัมต่อกิโลกรัมอาหาร เป็นเวลา 8 สัปดาห์ จะมีอัตราการเจริญเติบโต ปัจจัยด้านภูมิคุ้มกันแบบไม่จำเพาะ โดยเฉพาะ phagocytic activity และ respiratory burst activity และอัตราการรอดจากการติดเชื้อ *Vibrio harveyi* เพิ่มสูงขึ้นเมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม และกลุ่มที่ได้รับ *Bacillus subtilis* หรือ chitosan อย่างใดอย่างหนึ่ง (Geng *et al.*, 2011) นอกจากนี้มีรายงานการเสริมฤทธิ์กันของสารกระตุ้นภูมิคุ้มกันสองชนิด ระหว่าง β -glucan ซึ่งเป็นสารสกัดจากยีสต์ และ lipopolysaccharide (LPS) จากผนังเซลล์แบคทีเรีย ซึ่งสามารถกระตุ้นให้เซลล์ macrophage ของปลา Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) ผลิต lysozyme ได้ดีกว่า β -glucan หรือ LPS อย่างใดอย่างหนึ่ง (Paulsen *et al.*, 2001) และมีความเป็นไปได้ว่าสารกระตุ้นภูมิคุ้มกัน โดยเฉพาะ levamisole ที่ระดับ 250 mg/kg อาหาร สามารถกระตุ้นการหลั่ง cytokine (cytokine secretion) หรือ macrophage-activating factor (MAF) จากเซลล์เม็ดเลือดขาวบริเวณไตส่วนหน้าของปลาได้ ซึ่ง MAF จะนำไปสู่การกระตุ้น phagocytic cells และสารอื่นๆ ในน้ำเลือด (serum activity) (Mulero *et al.*, 1998)

โดยสรุป ผลจากการทดลองบ่งชี้ว่า chitosan หรือ levamisole ที่ผสมในอาหารที่ระดับ 1% และ 250 mg/kg อาหาร ตามลำดับ สามารถกระตุ้นการเจริญเติบโต และระบบภูมิคุ้มกันแบบไม่จำเพาะของปลานิลที่เลี้ยงในกระชังได้ ทั้ง chitosan และ levamisole จึงเป็นสารกระตุ้นภูมิคุ้มกัน (immunostimulants) ที่มีประสิทธิภาพสูงทั้งในด้านการกระตุ้นปัจจัยทางด้านภูมิคุ้มกันแบบไม่จำเพาะ ซึ่งนำไปสู่การเพิ่มความต้านทานโรคของปลานิล และกระตุ้นการเจริญเติบโตด้วย ผลจากการวิจัยนี้จะเป็นข้อมูล

พื้นฐานสำคัญในการประยุกต์ใช้สารกระตุ้นภูมิคุ้มกันในการเลี้ยงปลานิลในกระชังอย่างเหมาะสม อันจะนำไปสู่การเพิ่มผลผลิตของการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำจืดที่ปลอดภัยต่อผู้บริโภค และลดการพึ่งพายาปฏิชีวนะและสารเคมีในการจัดการสุขภาพสัตว์น้ำ