

ผลของการเสริมวิตามินซีร่วมกับวิตามินอีในอาหารปลาดุกอุกผสมต่อความ
ต้านทานความเครียดภายใต้สภาวะน้ำที่มีอุณหภูมิและ pH ต่ำ

นางสาวธาราทิพย์ พิทักษ์สงค์

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต
สาขาวิชาเทคโนโลยีการผลิตสัตว์
มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี
ปีการศึกษา 2554

**EFFECTS OF DIETS SUPPLEMENTED WITH
VITAMINS C AND E ON STRESS RESISTANCE
IN HYBRID CATFISH (*CLARIAS MACROCE
PHALUS X C. GARIEPINUS*) SUBJECTED
TO LOW TEMPERATURE
AND ACID STRESS**

Taratip Pitaksong

**A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements for the
Degree of Master of Science in Animal Production Technology**

Suranaree University of Technology

Academic Year 2011

ผลของการเสริมวิตามินซีร่วมกับวิตามินอีในอาหารปลาถูกทดสอบต่อความต้านทาน
ความเครียดภายใต้สภาวะน้ำที่มีอุณหภูมิและ pH ต่ำ

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี อนุมัติให้นับวิทยานิพนธ์ฉบับนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษา
ตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต

คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์

(ผศ. น. สพ. ดร.ภคินี คุปพิทยานันท์)

ประธานกรรมการ

(ผศ. ดร.สุรินทร์ บุญอนันตสาร)

กรรมการ (อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์)

(ผศ. น. สพ. ดร.บัญชา ลิขิตเดชาโรจน์)

กรรมการ

(อ. ดร.สมร พรชื่นชูวงศ์)

กรรมการ

(อ. ดร.อมรรัตน์ โมฬี)

กรรมการ

(ศ. ดร.ชูกิจ ลิมปิจำนงค์)

รองอธิการบดีฝ่ายวิชาการ

(ผศ. ดร.สุเวทย์ นิงสานนท์)

คณบดีสำนักวิชาเทคโนโลยีการเกษตร

ธาราทิพย์ พิทักษ์สงค์ : ผลของการเสริมวิตามินซีร่วมกับวิตามินอีในอาหารปลาคูกลุผสม ต่อความต้านทานความเครียดภายใต้สภาวะน้ำที่มีอุณหภูมิและ pH ต่ำ (EFFECTS OF DIETS SUPPLEMENTED WITH VITAMINS C AND E ON STRESS RESISTANCE IN HYBRID CATFISH (*CLARIAS MACROCEPHALUS* X *C. GARIEPINUS*) SUBJECTED TO LOW TEMPERATURE AND ACID STRESS) อาจารย์ที่ปรึกษา: ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.สุรินทร์ บุญอนันตสร, 105 หน้า.

งานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาผลของวิตามินซีร่วมกับวิตามินอีต่อการเจริญเติบโต ปริมาณการสะสมวิตามินทั้งสองชนิดในร่างกายปลาคูกลุผสม (*C. macrocephalus* x *C. gariepinus*) และศึกษาผลของการเสริมวิตามินซีร่วมกับวิตามินอีต่อค่าโลหิตวิทยา ค่าเคมีในเลือดชี้วัดความเครียด และค่าภูมิคุ้มกันแบบไม่จำเพาะในปลาที่ได้รับความเครียดจากสภาวะน้ำที่มีอุณหภูมิและ pH ต่ำ ใช้แผนการทดลองแบบ 3 x 3 แฟกทอเรียลในแผนการทดลองแบบสุ่มสมบูรณ์ จำนวน 5 ซ้ำ (ตู้ปลา) โดยมีการเสริมวิตามินซี 3 ระดับ (0, 500 และ 1000 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัมอาหาร) และวิตามินอี 3 ระดับ (0, 62.5 และ 125 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัมอาหาร) ทำการเลี้ยงปลาคูกลุผสมด้วยอาหาร 9 สูตรเป็นระยะเวลารวม 10 สัปดาห์ ตลอดระยะเวลาการทดลองพบว่าวิตามินซีไม่มีผลต่อการเจริญเติบโตในขณะที่วิตามินอีมีผลต่อการเจริญเติบโตอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$) อิทธิพลร่วมระหว่างวิตามินซีและวิตามินอีมีผลต่อการเจริญเติบโตของปลาคูกลุผสม

การวิเคราะห์การสะสมวิตามินซีและวิตามินอีได้ทำการศึกษาที่ระยะเวลา 3 และ 6 สัปดาห์ พบอิทธิพลร่วมของวิตามินซีและวิตามินอีต่อการสะสมวิตามินทั้งสองชนิดในพลาสมาและเนื้อเยื่อ เห็นได้จากการเสริมวิตามินซีมีผลต่อการเพิ่มปริมาณวิตามินอีและผลของการเสริมวิตามินอีที่มีต่อการสะสมปริมาณวิตามินซี

ผลของวิตามินซี วิตามินอี และอิทธิพลร่วมระหว่างทั้งสองปัจจัยต่อค่าโลหิตวิทยา กลูโคส ในพลาสมา (Glu) คลอไรด์ในซีรัม (Cl⁻) โปรตีนรวมในพลาสมา (TP) ค่าทางภูมิคุ้มกัน จำนวนเม็ดเลือดขาว (WBC) และสัดส่วนของชนิดเม็ดเลือดขาว ได้ทำการศึกษาในสัปดาห์ที่ 4 และ 8 พบว่าการเสริมวิตามินซีและวิตามินอีไม่มีผลต่อกลูโคสในพลาสมา และเม็ดเลือดขาวแต่ละชนิด แต่มีผลต่อค่าโลหิตวิทยา คลอไรด์ในซีรัมโปรตีนรวมในพลาสมา ค่าทางภูมิคุ้มกัน และจำนวนเม็ดเลือดขาว เพื่อศึกษาการลดต่ำของระบบทางสรีรวิทยาและภูมิคุ้มกัน ได้ทำการวิเคราะห์กลูโคสในพลาสมา (Glu) คลอไรด์ในซีรัม (Cl⁻) โปรตีนรวมในพลาสมา (TP) ค่าทางภูมิคุ้มกัน จำนวนเม็ดเลือดขาว (WBC) และสัดส่วนของชนิดเม็ดเลือดขาว หลังจากปลาคูกลุผสมอยู่ในสภาวะน้ำที่มีอุณหภูมิและ pH ต่ำ จากผลการศึกษาพบว่ายกเว้นการลดต่ำลงของคลอไรด์ในซีรัมแล้ว การเสริมวิตามินซีร่วมกับวิตามินอีเป็นระยะเวลา 4 สัปดาห์ที่ระดับ 1000 และ 62.5 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม

อาหาร และระยะเวลา 8 สัปดาห์ที่ระดับ 500 และ 62.5 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัมอาหารตามลำดับ สามารถบรรเทาความเครียดและภาวะลดต่ำของภูมิคุ้มกันได้ อย่างไรก็ตามการเสริมวิตามินซีและวิตามินอีไม่สามารถป้องกันการลดต่ำลงของภูมิคุ้มกันปลาคุกกุผสมที่ได้รับเชื้อ *Aeromonas hydrophila* ร่วมกับการได้รับความเครียดเนื่องจากสภาวะน้ำที่มีอุณหภูมิและ pH ต่ำได้



สาขาวิชาเทคโนโลยีการผลิตสัตว์
ปีการศึกษา 2554

ลายมือชื่อนักศึกษา _____
ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา _____
ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษาร่วม _____

TARATIP PITAKSONG : EFFECTS OF DIETS SUPPLEMENTED WITH
VITAMINS C AND E ON STRESS RESISTANCE IN HYBRID CATFISH
(*CLARIAS MACROCEPHALUS X C. GARIEPINUS*) SUBJECTED TO LOW
TEMPERATURE AND ACID STRESS. THESIS ADVISOR: ASST. PROF.
SURINTON BOONANUNTANASARN, Ph.D., 105 PP.

VITAMIN C/ VITAMIN E/ HYBRID CATFISH/ LOW TEMPERATURE/ ACID
STRESS/ HEMATOLOGY/ IMMUNE/ *Aeromonas hydrophila*.

The present study investigated the effects of the co-supplementation of vitamins C and E on growth performance and their accumulation in body of hybrid catfish (*Clarias macrocephalus x C. gariepinus*). In addition, the influences of dietary co- supplementation of vitamins C and E on hematological indices, blood stress indicator and immune parameters when they were subjected to combinations of thermal and acidic stresses were examined. A 3*3 factorial design in a randomized complete design with five replicates (aquaria) was employed with 3 levels of vitamin C (0, 500 and 1000 mg kg⁻¹) and 3 levels of vitamin E (0, 62.5 and 125 mg kg⁻¹). The hybrid catfish were fed to apparent satiation with nine experimental diets for 10 weeks. Throughout the experimental period, dietary vitamin C did not significantly influence the growth response whereas dietary vitamin E significantly did ($P<0.05$). The interaction effects of dietary vitamins C and E were observed in growth of hybrid catfish.

Determination of vitamins C and E in plasma, liver and kidney was conducted after 3 and 6 week feeding periods. The interaction of the effects of vitamins C and E on the accumulation of these vitamins on plasma and tissues was demonstrated, i.e.,

the sparing effect of vitamins C on E and the conditional effect of vitamin E on the vitamin C concentrations.

The effects of dietary vitamins C and E as well as their interactions on hematological indices, plasma glucose (Glu), serum chloride (Cl^-), plasma total protein (TP), immune parameters, white blood cells number (WBC) and white blood cells profiles were determined at weeks 4 and 8. While the supplementation of vitamins C and E did not affect Glu and white blood cell differential count, it influenced hematological indices, Cl^- , TP, immune parameters and WBC. In order to investigate the effects of dietary vitamins C and E on minimization of the modulation of physiological and immune systems, Glu, Cl^- , TP, immune parameters, WBC number and profiles were analyzed after hybrid catfish were subjected to the combination of thermal and acidic stressors. The results demonstrate that, except for the reduction of serum Cl^- , co-supplementation of these vitamins, i.e. for 4 weeks; vitamins C and E at 1000 and 62.5 mg kg⁻¹, respectively, for 8 weeks; vitamins C and E at 500 and 62.5 mg kg⁻¹, respectively, ameliorated stress and immunosuppressive responses. However, supplementation of vitamins C and E could not prevent the reduction of immune parameters of *Aeromonas hydrophila*-infected hybrid catfish when they were subjected to the combination of stressors.

School of Animal Production Technology Student's Signature _____

Academic Year 2011

Advisor's Signature _____

Co-advisor's Signature _____

กิตติกรรมประกาศ

วิทยานิพนธ์นี้สำเร็จลุล่วงด้วยดี เนื่องจากได้รับทุนสนับสนุนจาก “โครงการทุนวิจัย มหบัณฑิต สกว. สาขาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี ปี 2552 ร่วมกับมหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี เลขที่สัญญา MRG-WII525S065 ชื่อโครงการ ผลของการเสริมวิตามินซีร่วมกับวิตามินอีในอาหาร ปลาต่อค่าโลหิตวิทยาและภูมิคุ้มกันแบบไม่จำเพาะในปลาดุกลูกผสมภายใต้สภาวะความเครียด เนื่องจากอุณหภูมิต่ำ” และได้รับทุนการศึกษาจาก “โครงการทุนวิจัยจากแหล่งภายนอก ผู้ให้ทุนคือ กองทุนสนับสนุนการวิจัยและพัฒนา มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี” อีกทั้งยังได้รับความช่วยเหลืออย่างยิ่ง ทั้งด้านวิชาการและด้านการดำเนินงานวิจัย จากบุคคลและกลุ่มบุคคลต่าง ๆ ได้แก่

ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.สุรินทร์ บุญอนันตบุตร อาจารย์ประจำสาขาวิชาเทคโนโลยีการผลิตสัตว์ มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ ที่ให้โอกาสทางการศึกษา ให้คำแนะนำปรึกษาด้านวิชาการและถ่ายทอดประสบการณ์ที่ดีในการทำงานต่าง ๆ แก่ผู้วิจัยมาโดยตลอด รวมทั้งช่วยตรวจ และแก้ไขวิทยานิพนธ์เล่มนี้จนเสร็จสมบูรณ์

ผู้ช่วยศาสตราจารย์ นายสัตวแพทย์ ดร.บัญชา ลิขิตเดชาโรจน์ อาจารย์ ดร. สมร พรชื่นชูวงศ์ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ นายสัตวแพทย์ ดร. ภคินิจ คุปพิทยานันท์ อาจารย์ ดร.อมรรัตน์ โมฬี และอาจารย์ประจำสาขาวิชาเทคโนโลยีการผลิตสัตว์ มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารีทุกท่าน ที่กรุณาให้คำปรึกษาด้านวิชาการ ให้คำแนะนำเพิ่มเติมในการทำวิทยานิพนธ์ และให้กำลังใจมาโดยตลอด

ขอขอบคุณ คุณสุนัย พลายมี หัวหน้างานสัตว์น้ำ ฟาร์มมหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี และเจ้าหน้าที่ศูนย์เครื่องมือวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี ที่ช่วยอำนวยความสะดวกทางด้านเครื่องมือและอุปกรณ์ ขอขอบคุณพี่น้องบัณฑิตศึกษาทุกท่าน ที่ให้คำปรึกษาด้านวิชาการ และให้กำลังใจมาโดยตลอด

ขอขอบคุณ ร้อยเอกนพดล วันเปลี่ยนสี ที่อำนวยความสะดวกระหว่างการค้นคว้าข้อมูลเพื่อสรุปผลการทดลอง ให้ความช่วยเหลือในการจัดพิมพ์รูปเล่ม และให้กำลังใจมาโดยตลอด

สำหรับคุณงามความดีอันใดที่เกิดจากวิทยานิพนธ์เล่มนี้ ผู้วิจัยขอมอบให้กับบิดา มารดา ทุกคนในครอบครัว ซึ่งเป็นที่รัก และเคารพยิ่ง ตลอดจนครูอาจารย์ทุกท่าน ที่ได้ประสิทธิ์ประสาทวิชาความรู้ และถ่ายทอดประสบการณ์ที่ดีให้แก่ผู้วิจัยตลอดมา

ธราทิพย์ พิทักษ์สงค์

สารบัญ

หน้า

บทคัดย่อ (ภาษาไทย).....	ก
บทคัดย่อ (ภาษาอังกฤษ).....	ค
กิตติกรรมประกาศ.....	จ
สารบัญ.....	ฉ
สารบัญตาราง.....	ญ
สารบัญรูป.....	ฎ
บทที่	
1 บทนำ.....	1
1.1 ความสำคัญของปัญหา.....	1
1.2 วัตถุประสงค์ของการศึกษา.....	3
1.3 สมมติฐานของการศึกษา.....	4
1.4 ขอบเขตของการศึกษา.....	4
1.5 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ.....	5
1.6 คำอธิบายศัพท์.....	6
2 ปรัชญ่วรรณกรรมและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง.....	7
2.1 ปลาตุ๊กตาสวย.....	7
2.2 ความเครียดของปลา.....	10
2.2.1 การตอบสนองความเครียดของปลา.....	11
2.2.2 ผลของการเปลี่ยนแปลงอุณหภูมิในน้ำต่อสุขภาพของปลา.....	14
2.2.3 ผลของการเปลี่ยนแปลงค่า pH ในน้ำต่อสุขภาพของปลา.....	15
2.3 แนวทางการแก้ไขปัญหาภาวะภูมิคุ้มกันต่ำเนื่องจากความเครียดของปลา.....	16
2.3.1 บทบาทของสารต้านอนุมูลอิสระ.....	17
2.3.2 วิตามินซี.....	19
2.3.3 วิตามินอี.....	21
2.3.4 ผลการศึกษาการใช้วิตามินซีและวิตามินอีต่อค่าภูมิคุ้มกันของปลา.....	23

สารบัญ (ต่อ)

หน้า

2.4 การสังเคราะห์งานวิจัย.....	24
2.4.1 การเจริญเติบโตและปริมาณการสะสมวิตามิน.....	25
2.4.2 วิเคราะห์ค่าโลหิตวิทยา.....	25
2.4.3 การวิเคราะห์ค่าชี้วัดความเครียด.....	25
2.4.4 วิเคราะห์ภูมิคุ้มกันแบบไม่จำเพาะ.....	25
2.4.5 วิเคราะห์ภูมิคุ้มกันแบบไม่จำเพาะของปลาที่ได้รับเชื้อแบคทีเรีย <i>Aeromonas hydrophila</i> และได้รับความเครียดอันเนื่องมาจากสภาวะ น้ำอุณหภูมิและ pH ต่ำ.....	26
3 วิธีดำเนินการวิจัย.....	27
3.1 สถานที่ทำการทดลอง.....	27
3.2 อุปกรณ์และสารเคมี.....	27
3.3 วิธีการทดลอง.....	30
3.3.1 การวางแผนการทดลอง.....	30
3.3.2 การเตรียมอาหาร.....	31
3.3.3 สัตว์ทดลอง.....	32
3.3.4 การวิเคราะห์คุณภาพน้ำ.....	33
3.3.5 การเก็บข้อมูลวัดอัตราการเจริญเติบโตและอัตราการรอด.....	33
3.3.6 การเก็บตัวอย่าง.....	34
3.3.7 การทำให้ปลาเกิดความเครียดด้วยน้ำที่มีอุณหภูมิและ pH ต่ำ.....	35
3.3.8 การวิเคราะห์วิตามินซีและวิตามินอี.....	35
3.3.9 การวิเคราะห์ค่าโลหิตวิทยา.....	37
3.3.10 การวิเคราะห์ค่าชี้วัดความเครียด.....	39
3.3.11 การวิเคราะห์ค่าภูมิคุ้มกันแบบไม่จำเพาะ.....	39
3.3.12 การฉีดเชื้อ <i>Aeromonas hydrophila</i>	44
3.3.13 การวิเคราะห์ค่าทางสถิติ.....	45
4 ผลการวิเคราะห์ข้อมูลและการอภิปรายผล.....	46
4.1 ผลการวิเคราะห์.....	46

สารบัญ (ต่อ)

หน้า

4.1.1	ผลของการเสริมวิตามินซีร่วมกับวิตามินอีในอาหารปลาต่อการเจริญเติบโตของปลาดุกลูกผสม.....	46
4.1.2	ผลของการเสริมวิตามินซีร่วมกับวิตามินอีในอาหารปลาต่อการสะสมวิตามินซีและวิตามินอีในพลาสมา ตับ และไตของปลาดุกลูกผสม.....	47
4.1.3	ผลของการเสริมวิตามินซีร่วมกับวิตามินอีในอาหารปลาต่อการสะสมวิตามินซีและวิตามินอีในตับของปลาดุกลูกผสม.....	49
4.1.4	ผลของการเสริมวิตามินซีร่วมกับวิตามินอีในอาหารปลาต่อการสะสมวิตามินซีและวิตามินอีในไตของปลาดุกลูกผสม.....	51
4.1.5	ผลของการเสริมวิตามินซีร่วมกับวิตามินอีในอาหารปลาต่อค่าโลหิตวิทยาของปลาดุกลูกผสมที่ได้รับความเครียดจากสภาวะน้ำอุณหภูมิต่ำ.....	53
4.1.6	ผลของการเสริมวิตามินซีร่วมกับวิตามินอีในอาหารปลาต่อค่าชีวเคมีของปลาดุกลูกผสมที่ได้รับความเครียดจากสภาวะน้ำอุณหภูมิต่ำ และ pH ต่ำ.....	56
4.1.7	ผลของการเสริมวิตามินซีร่วมกับวิตามินอีในอาหารปลาต่อค่าภูมิคุ้มกันแบบไม่จำเพาะของปลาดุกลูกผสมที่ได้รับความเครียดจากสภาวะน้ำอุณหภูมิต่ำ และ pH ต่ำ.....	62
4.1.8	การศึกษาผลของการเสริมวิตามินซีร่วมกับวิตามินอีในอาหารปลาต่อความต้านทานของปลาดุกลูกผสมเมื่อได้รับเชื้อ <i>Aeromonas hydrophila</i> ร่วมกับการได้รับความเครียดจากสภาวะน้ำอุณหภูมิต่ำ และ pH ต่ำ.....	73
4.2	การอภิปรายผล.....	76
4.2.1	ผลการเจริญเติบโต.....	76
4.2.2	ผลการสะสมวิตามินซีและวิตามินอี.....	77
4.2.3	ค่าโลหิตวิทยา.....	77
4.2.4	ค่าชีวเคมี.....	78

สารบัญ (ต่อ)

หน้า

4.2.5	ค่าภูมิคุ้มกันแบบไม่จำเพาะ.....	80
4.2.6	ภูมิต้านทานต่อเชื้อ <i>Aeromonas hydrophila</i>	81
5	สรุป.....	82
5.1	สรุป.....	82
5.2	ข้อเสนอแนะ.....	85
รายการอ้างอิง.....		86
ภาคผนวก ก (ภาพประกอบการทดลอง).....		93
ภาคผนวก ข (รายละเอียดวิตามินที่ใช้ในการทดลอง).....		99
ประวัติผู้เขียน.....		105



สารบัญตาราง

ตารางที่	หน้า
3.1 การจัดกลุ่มการทดลองการเสริมวิตามินซีและวิตามินอีในอาหารปลา.....	30
3.2 ปริมาณวัตถุดิบที่ใช้ในการทำอาหารปลา และองค์ประกอบทางเคมีในอาหาร	31
3.3 องค์ประกอบทางเคมีในอาหารปลาที่ใช้ในการทดลอง	31
3.4 ปริมาณวิตามินซีและวิตามินอีในอาหารปลาแต่ละกลุ่มการทดลอง	32
3.5 คุณภาพน้ำระหว่างการทดลอง.....	33
4.1 ผลการเสริมวิตามินซีร่วมกับวิตามินอีในอาหารปลาต่อการเจริญเติบโตและ อัตราการรอดของปลาดุกลูกผสมที่ระยะเวลา 6 สัปดาห์.....	47
4.2 ผลของการเสริมวิตามินซีและวิตามินอีต่อค่าโลหิตวิทยาของปลาดุกลูกผสม ในสภาวะปกติเปรียบเทียบกับสภาวะความเครียดเนื่องจากน้ำที่มีอุณหภูมิ และ pH ต่ำ ที่ระยะเวลา 4 สัปดาห์	54
4.3 ผลของการเสริมวิตามินซีและวิตามินอีต่อค่าโลหิตวิทยาของปลาดุกลูกผสม ในสภาวะปกติเปรียบเทียบกับสภาวะความเครียดเนื่องจากน้ำที่มีอุณหภูมิ และ pH ต่ำ ที่ระยะเวลา 8 สัปดาห์	55
4.4 ผลของการเสริมวิตามินซีและวิตามินอีต่อจำนวนเม็ดเลือดขาวชนิด Lymphocyte, Neutrophil และ Monocyte ของปลาดุกลูกผสมในสภาวะปกติเปรียบเทียบกับ สภาวะที่ได้รับความเครียดเนื่องจากน้ำที่มีอุณหภูมิและ pH ต่ำ ที่ระยะเวลา 4 สัปดาห์	71
4.5 ผลของการเสริมวิตามินซีและวิตามินอีต่อจำนวนเม็ดเลือดขาวชนิด Lymphocyte, Neutrophil และ Monocyte ของปลาดุกลูกผสมในสภาวะปกติเปรียบเทียบกับ สภาวะที่ได้รับความเครียดเนื่องจากน้ำที่มีอุณหภูมิและ pH ต่ำ ที่ระยะเวลา 8 สัปดาห์	72
5.1 ผลของการเสริมวิตามินซี ร่วมกับวิตามินอีต่อความต้านทานของปลาดุกลูกผสม ภายใต้สภาวะความเครียดเนื่องจากน้ำที่มีอุณหภูมิและ pH ต่ำ.....	84

สารบัญรูป

รูปที่	หน้า
2.1 ปลาอุกค้ำ Clarias batrachus.....	7
2.2 ปลาอุกอุย Clarias macrocephalus.....	8
2.3 ปลาอุกแอฟริกา Clarias gariepinus.....	9
2.4 ปลาอุกลูกผสม (Clarias macrocephalus x C. gariepinus) หรือปลาบักอุย.....	10
2.5 ภาพอธิบายการเกิด Oxidative stress.....	12
2.6 ภาพอธิบาย การหลั่งฮอร์โมนความเครียด.....	13
2.7 กลไกการทำปฏิกิริยาของวิตามินอีกับอนุมูลอิสระที่สามารถกลับไปเป็นโครงสร้าง วิตามินอีแบบเดิมได้โดยวิตามินซี.....	19
2.8 โครงสร้างของ Ascorbic acid และ Dehydroascorbic acid.....	20
2.9 กลไกการช่วยดูดซึม และขนส่งธาตุเหล็กของวิตามินซี.....	20
2.10 โครงสร้างของวิตามินอี.....	21
2.11 กลไกความสำคัญของวิตามินอีต่อระบบภูมิคุ้มกัน.....	22
2.12 กลไกการต้านอนุมูลอิสระของวิตามินซีและวิตามินอี.....	22
3.1 ช่อง hemocytometer chamber ที่ใช้นับจำนวนเม็ดเลือดแดง.....	37
3.2 ปริมาตรเลือดทั้งหมด และปริมาตรเม็ดเลือดแดงอัดแน่นใน microhematocrit capillary tube ที่ผ่านการปั่นเหวี่ยงแล้ว.....	38
3.3 การเติมเชื้อ Micrococcus lysodeiketicus ด้วย Multi pipette 8 ช่อง ในการวิเคราะห์ lysozyme activity.....	40
3.4 ภาพ plate ในการวิเคราะห์ Alternative complement.....	42
3.5 ช่อง hemocytometer chamber ที่ใช้นับจำนวนเม็ดเลือดขาว.....	43
3.6 การหาความเข้มข้นของเชื้อ Aeromonas hydrophila ด้วย Pour plate technique.....	44
4.1 ผลการวิเคราะห์วิตามินซีและวิตามินอีในปลาสมที่เวลา 3 สัปดาห์.....	48
4.2 ผลการวิเคราะห์วิตามินซีและวิตามินอีในปลาสมที่เวลา 6 สัปดาห์.....	48
4.3 ผลการวิเคราะห์วิตามินซีและวิตามินอีในตับที่เวลา 3 สัปดาห์.....	49
4.4 ผลการวิเคราะห์วิตามินซีและวิตามินอีในตับที่เวลา 6 สัปดาห์.....	50

สารบัญรูป (ต่อ)

รูปที่	หน้า
4.5	ผลการวิเคราะห์วิตามินซีและวิตามินอีในไตที่เวลา 3 สัปดาห์..... 51
4.6	ผลการวิเคราะห์วิตามินซีและวิตามินอีในไตที่เวลา 6 สัปดาห์..... 52
4.7	ผลการวิเคราะห์ค่ากลูโคสในพลาสมา (Plasma glucose) ของปลาดุกลูกผสม ที่ได้รับการเสริมวิตามินซีและวิตามินอีเป็นเวลา 4 สัปดาห์ เปรียบเทียบระหว่าง ปลาปกติและปลาที่ได้รับความเครียดเนื่องจากน้ำที่มีอุณหภูมิและ pH ต่ำ..... 56
4.8	ผลการวิเคราะห์ค่ากลูโคสในพลาสมา (Plasma glucose) ของปลาดุกลูกผสมที่ ได้รับการเสริมวิตามินซีและวิตามินอีเป็นเวลา 8 สัปดาห์ เปรียบเทียบระหว่าง ปลาปกติและปลาที่ได้รับความเครียดเนื่องจากน้ำที่มีอุณหภูมิและ pH ต่ำ..... 57
4.9	ผลการวิเคราะห์ค่าคลอไรด์ในซีรัม (Serum chloride) ของปลาดุกลูกผสมที่ได้รับการ เสริมวิตามินซีและวิตามินอีเป็นเวลา 4 สัปดาห์ เปรียบเทียบระหว่างปลาปกติ และปลาที่ได้รับความเครียดเนื่องจากน้ำที่มีอุณหภูมิและ pH ต่ำ.....58
4.10	ผลการวิเคราะห์ค่าคลอไรด์ในซีรัม (Serum chloride) ของปลาดุกลูกผสมที่ได้รับการ เสริมวิตามินซีและวิตามินอีเป็นเวลา 8 สัปดาห์ เปรียบเทียบระหว่างปลาปกติ และปลาที่ได้รับความเครียดเนื่องจากน้ำที่มีอุณหภูมิและ pH ต่ำ..... 59
4.11	ผลการวิเคราะห์ค่าโปรตีนรวมในพลาสมา (Total plasma protein) ของปลาดุก ลูกผสมที่ได้รับการเสริมวิตามินซีและวิตามินอีเป็นเวลา 4 สัปดาห์ เปรียบเทียบ ระหว่างปลาปกติและปลาที่ได้รับความเครียดเนื่องจากน้ำที่มีอุณหภูมิและ pH ต่ำ.....60
4.12	ผลการวิเคราะห์ค่าโปรตีนรวมในพลาสมา (Total plasma protein) ของปลาดุก ลูกผสมที่ได้รับการเสริมวิตามินซีและวิตามินอีเป็นเวลา 8 สัปดาห์ เปรียบเทียบ ระหว่างปลาปกติและปลาที่ได้รับความเครียดเนื่องจากน้ำที่มีอุณหภูมิและ pH ต่ำ.....61
4.13	ผลการวิเคราะห์การทำงานของไลโซไซม์ (Lysozyme activity) ของปลาดุก ลูกผสมที่ได้รับการเสริมวิตามินซีและวิตามินอีเป็นเวลา 4 สัปดาห์ เปรียบเทียบ ระหว่างปลาปกติและปลาที่ได้รับความเครียดเนื่องจากน้ำที่มีอุณหภูมิและ pH ต่ำ.....62
4.14	ผลการวิเคราะห์การทำงานของไลโซไซม์ (Lysozyme activity) ของปลาดุก ลูกผสมที่ได้รับการเสริมวิตามินซีและวิตามินอีเป็นเวลา 8 สัปดาห์ เปรียบเทียบ ระหว่างปลาปกติและปลาที่ได้รับความเครียดเนื่องจากน้ำที่มีอุณหภูมิและ pH ต่ำ.....63

สารบัญรูป (ต่อ)

รูปที่	หน้า
4.15 ผลการวิเคราะห์อิมมูโนโกลบูลินรวม (Total immunoglobulin) ของปลาฉลามที่ ที่ได้รับการเสริมวิตามินซีและวิตามินอีเป็นเวลา 4 สัปดาห์ เปรียบเทียบระหว่าง ปลาปกติและปลาที่ได้รับความเครียดเนื่องจากน้ำที่มีอุณหภูมิและ pH ต่ำ.....	64
4.16 ผลการวิเคราะห์อิมมูโนโกลบูลินรวม (Total immunoglobulin) ของปลาฉลามที่ ที่ได้รับการเสริมวิตามินซีและวิตามินอีเป็นเวลา 8 สัปดาห์ เปรียบเทียบระหว่าง ปลาปกติและปลาที่ได้รับความเครียดเนื่องจากน้ำที่มีอุณหภูมิและ pH ต่ำ.....	65
4.17 ผลการวิเคราะห์ประสิทธิภาพการทำงานของคอมพลีเมนต์ (Alternative complement) ของปลาฉลามที่ได้รับการเสริมวิตามินซีและวิตามินอีเป็นเวลา 4 สัปดาห์ เปรียบเทียบ ระหว่างปลาปกติและปลาที่ได้รับความเครียดเนื่องจากน้ำที่มีอุณหภูมิและ pH ต่ำ.....	66
4.18 ผลการวิเคราะห์ประสิทธิภาพการทำงานของคอมพลีเมนต์ (Alternative complement) ของปลาฉลามที่ได้รับการเสริมวิตามินซีและวิตามินอีเป็นเวลา 8 สัปดาห์ เปรียบเทียบ ระหว่างปลาปกติและปลาที่ได้รับความเครียดเนื่องจากน้ำที่มีอุณหภูมิและ pH ต่ำ.....	67
4.19 ผลการวิเคราะห์จำนวนเม็ดเลือดขาว (WBC) ของปลาฉลามที่ได้รับการเสริม วิตามินซีและวิตามินอีเป็นเวลา 4 สัปดาห์ เปรียบเทียบระหว่างปลาปกติ และปลาที่ได้รับความเครียดเนื่องจากน้ำที่มีอุณหภูมิและ pH ต่ำ.....	68
4.20 ผลการวิเคราะห์จำนวนเม็ดเลือดขาว (WBC) ของปลาฉลามที่ได้รับการเสริม วิตามินซีและวิตามินอีเป็นเวลา 8 สัปดาห์ เปรียบเทียบระหว่างปลาปกติ และปลาที่ได้รับความเครียดเนื่องจากน้ำที่มีอุณหภูมิและ pH ต่ำ.....	69
4.21 ผลการวิเคราะห์การทำงานของไลโซไซม์ (Lysozyme activity) ของปลาฉลาม ที่ได้รับการเสริมวิตามินซีและวิตามินอี เปรียบเทียบระหว่างปลาปกติ และปลาที่ได้รับเชื้อ <i>Aeromonas hydrophila</i> ร่วมกับการได้รับความเครียดเนื่อง จากน้ำที่มีอุณหภูมิและ pH ต่ำ.....	73
4.22 ผลการวิเคราะห์อิมมูโนโกลบูลินรวม (Total immunoglobulin) ของปลาฉลาม ที่ได้รับการเสริมวิตามินซีและวิตามินอี เปรียบเทียบระหว่างปลาปกติ และปลาที่ได้รับเชื้อ <i>Aeromonas hydrophila</i> ร่วมกับการได้รับความเครียดเนื่อง จากน้ำที่มีอุณหภูมิและ pH ต่ำ.....	74

สารบัญรูป (ต่อ)

รูปที่

หน้า

4.23	ผลการวิเคราะห์ประสิทธิภาพการทำงานของคอมพลีเมนต์ (Alternative complement) ของปลาตุ๊กตาผสมที่ได้รับการเสริมวิตามินซีและวิตามินอี เปรียบเทียบระหว่าง ปลาปกติและปลาที่ได้รับเชื้อ <i>Aeromonas hydrophila</i> ร่วมกับการได้ความเครียด เนื่องจากน้ำที่มีอุณหภูมิและ pH ต่ำ.....	75
ก.1	ภาพเม็ดเลือดขาวชนิด Lymphocyte, Monocyte และเม็ดเลือดแดงหรือ Erythrocytes.....	94
ก.2	ภาพเม็ดเลือดขาวชนิด Lymphocyte และ เกล็ดเลือดหรือ Thrombocyte.....	94
ก.3	ภาพเม็ดเลือดขาวชนิด Neutrophil และ Lymphocyte.....	95
ก.4	ภาพเม็ดเลือดขาวชนิด Neutrophil และ Lymphocyte.....	95
ก.5	ภาพปลาตุ๊กตาที่ได้รับวิตามินอี 125 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัมอาหารที่ระยะเวลา 8 สัปดาห์.....	96
ก.6	ภาพตู้ปลาที่ใช้ในการทดลอง.....	96
ก.7	ภาพเครื่อง HPLC.....	97
ก.8	ภาพอุปกรณ์การนับจำนวนเม็ดเลือดแดงและเม็ดเลือดขาว.....	98

บทที่ 1

บทนำ

1.1 ความสำคัญของปัญหา

ปลาดุกเป็นปลาน้ำจืดชนิดหนึ่งที่มีความสำคัญทางเศรษฐกิจของประเทศไทย จากข้อมูลการรวบรวมผลผลิต และมูลค่าของสัตว์น้ำที่ได้จากการทำการประมงรวมการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำ พบว่าปลาดุกมีปริมาณการผลิต และมีมูลค่าการจำหน่ายเป็นอันดับสองรองจากปลานิลในปริมาณการเพาะเลี้ยงปลาน้ำจืด และมูลค่าสัตว์น้ำทั้งหมด (สถิติการประมง, 2551) ปลาดุกจัดเป็นอาหารโปรตีนที่สำคัญของคนไทยทั่วทุกภาค การเพาะเลี้ยงปลาดุกจึงเป็นที่นิยมเพาะเลี้ยงทั่วไปในประเทศไทย รูปแบบของการเพาะเลี้ยงมีทั้งการเพาะเลี้ยงในบ่อ นาข้าว ร่องสวน และในกระชัง ทั้งนี้เนื่องจากปลาดุกเป็นปลาที่สามารถเลี้ยงในสภาพความหนาแน่นสูง มีการเจริญเติบโตรวดเร็ว มีความทนทานต่อสภาพแวดล้อมได้ดี และให้ผลผลิตต่อพื้นที่สูง ทำให้มีผู้นิยมเลี้ยงปลาดุกกันอย่างแพร่หลายในประเทศไทย มีทั้งการเพาะเลี้ยงเชิงพาณิชย์ เป็นอาชีพหลัก และอาชีพเสริมของเกษตรกรทั่วไป นอกจากนี้ยังเป็นการเลี้ยงเพื่อเป็นอาหารในครัวเรือน ปลาดุกเป็นปลาที่รัฐบาลส่งเสริมในโครงการประมงโรงเรียน ประมงหมู่บ้าน จึงทำให้เกิดกิจกรรมที่เป็นประโยชน์และผลพลอยได้เป็นอาหารของชุมชน เพื่อสร้างสังคมในชุมชนชนบทให้เข้มแข็ง โดยปลาดุกที่เป็นที่นิยมเลี้ยงในปัจจุบันนี้ คือ ปลาดุกลูกผสม (Hybrid catfish) ซึ่งได้จากการนำปลาดุกยักษ์เพศผู้ (หรือปลาดุกเทศ หรือปลาดุกรัสเซีย) (*Clarias gariepinus*) มาผสมพันธุ์กับปลาดุกอุยเพศเมีย (*C. macrocephalus*) ได้ปลาลูกผสมที่เนื้อมีรสชาติคล้ายปลาดุกอุย มีการเจริญเติบโตรวดเร็ว และทนทานต่อโรคมากขึ้น ระยะเวลาการเลี้ยงโดยทั่วไปประมาณ 90 วันก็สามารถจับขายได้ ทำให้การเพาะเลี้ยงปลาดุกเชิงพาณิชย์สามารถทำได้อย่างน้อย 3 รุ่นต่อปี

แม้ว่าปลาดุกลูกผสมจะมีความต้านทานโรคสูงขึ้นและมีการเจริญเติบโตรวดเร็ว แต่ในปัจจุบันความแตกต่างของฤดูกาลที่ส่งผลต่อคุณภาพน้ำโดยเฉพาะอุณหภูมิ น้ำ และค่าความเป็นกรด-ด่างของน้ำ (pH) นับว่าเป็นข้อจำกัดอย่างหนึ่งในการเพาะเลี้ยงปลาดุก โดยเกษตรกรมักพบปัญหาการเลี้ยงปลาดุกลูกผสมในบางฤดูกาล การเพาะเลี้ยงปลาดุกลูกผสมในภาคเหนือและภาคตะวันออกเฉียงเหนือมักประสบปัญหาในช่วงฤดูหนาว เนื่องจากอุณหภูมิน้ำลดต่ำลง (โดยเฉพาะระหว่างเดือนพฤศจิกายน ถึง กุมภาพันธ์) นอกจากนี้ในช่วงฤดูฝนที่มีฝนตกติดต่อกัน ทำให้อุณหภูมิน้ำลดลง กอปรกับคุณภาพน้ำด้านอื่น ๆ เปลี่ยนแปลงอย่างรวดเร็วอันเนื่องมาจากน้ำฝนที่ตกลงในบ่อ โดยพบว่าช่วงฤดูกาลดังกล่าวนี้ ปลาจะมีการเจริญเติบโตช้า อัตราการกินอาหารน้อย ร่างกาย

อ่อนแอ ง่ายต่อการเกิดโรคทำให้เกิดโรคระบาดขึ้น ส่งผลให้ผลผลิตลดลง นอกจากนี้ยังพบว่า ภายหลังฝนตกมักพบปลาตายเป็นจำนวนมากทั้งนี้เนื่องมาจากการเปลี่ยนแปลงค่า pH ของน้ำอย่างรวดเร็วเนื่องจากฝนกรดซึ่งเกิดจากมลพิษทางอากาศ และการชะล้างสารเคมีทางการเกษตรจากดินลงสู่แหล่งน้ำ หากมีแนวทางที่จะสามารถทำให้ปลามีความต้านทานต่อผลของอุณหภูมิ และค่า pH ที่ลดลงได้ นับว่าจะเป็นประโยชน์ต่อการเพาะเลี้ยงปลาคูกลุกลผสมเป็นอย่างมาก

รายงานการศึกษาถึงการเปลี่ยนแปลงอุณหภูมิต่อภูมิคุ้มกันโรคของปลา พบว่าถ้าอุณหภูมิน้ำเปลี่ยนไปประมาณ 4 ถึง 8 องศาเซลเซียส ภายในระยะเวลา 12 ถึง 24 ชั่วโมง จะสามารถคาดเดาได้ว่าปลาจะมีภูมิคุ้มกันลดลง และเสี่ยงต่อการเกิดโรค (Chen *et al.*, 2004; Ndong, Chen, Lin, Vaseeharan, and Chen, 2007) นอกจากนี้ เขาวินิตย์ ดนยชล และ จิรนนท์ อุไรประสิทธิ์ (2544) ได้ศึกษาผลของการลดอุณหภูมิน้ำต่อการตอบสนองของระบบภูมิคุ้มกันโรคในปลากะรังและปลากะพงขาว พบว่าปลาทั้ง 2 ชนิดมีภูมิคุ้มกันโรคลดลงเมื่ออุณหภูมิน้ำต่ำลง

รายงานการศึกษาความเปลี่ยนแปลงค่า pH ของน้ำพบว่า ปลาที่อยู่ในน้ำที่มีค่า pH ต่ำกว่าปกติจะเกิดภาวะความผิดปกติของกลไกการแลกเปลี่ยนไอออนบริเวณเหงือก ส่งผลให้เกิดการเพิ่มขึ้นของไอออนในพลาสมา (McDonald and Wood, 1981) ทำให้เซลล์เม็ดเลือดแดงเกิดการบวม ค่า Hematocrit หรือปริมาณเม็ดเลือดแดงอัดแน่นเพิ่มสูงขึ้น ทำให้ความหนืดของเลือดสูง และพบว่าปลามีอาการการเดินของหัวใจเพิ่มสูงขึ้นอีกด้วย (Milligan and Wood, 1982) นอกจากนี้ ฐำนันตร์ ทัดตานนท์ (2539) ได้ศึกษาสภาพทางเนื้อเยื่อปลากะพงขาวพบว่า น้ำที่มี pH ต่ำ มีผลทำลายเซลล์ที่บริเวณเหงือกมากกว่าเซลล์บริเวณอื่น ซึ่งมีความสำคัญต่อการแลกเปลี่ยนออกซิเจนภายในร่างกายปลา

การเลี้ยงปลาในสภาพน้ำที่ไม่เหมาะสมทำให้ปลาเกิดโรคได้ง่าย เกษตรกรมักจะป้องกันและรักษาโรคโดยใช้ยาปฏิชีวนะผสมในอาหารเพื่อเลี้ยงปลา ส่งผลให้ต้นทุนการเลี้ยงสูงขึ้น นอกจากนี้การรักษาปลาที่เกิดโรคแล้วมักทำได้ยาก อีกทั้งในระหว่างการรักษาย่อมมีการสูญเสียปลาไปจำนวนหนึ่ง ผลกระทบที่เกี่ยวข้องกับผู้บริโภคคือการตกค้างของยาปฏิชีวนะ ดังนั้นการใช้ยาปฏิชีวนะต้องคำนึงถึงระยะเวลาการใช้และชนิดของยา เนื่องจากการใช้ยาในปริมาณที่ไม่เหมาะสมเป็นเวลานาน แบคทีเรียจะมีการพัฒนาสายพันธุ์ที่ดื้อยาทำให้การรักษาครั้งต่อไปไม่ได้ผล นอกจากนี้ Kruse and Sørum (1994) รายงานว่ายีนต้านยาปฏิชีวนะในแบคทีเรียอาจส่งผ่านไปยังแบคทีเรียที่ก่อโรคในมนุษย์ จึงอาจส่งผลให้การใช้ยาปฏิชีวนะในมนุษย์ไม่ได้ผลในอนาคตได้ ดังนั้นเกษตรกรและนักวิชาการจึงหันมาทดลองการเสริมสารอาหารที่มีบทบาทต่อการเพิ่มภูมิคุ้มกันโรคให้กับปลา เพื่อพัฒนาเป็นแนวทางหนึ่งในการป้องกันการเกิดโรคให้กับปลา ซึ่งวิตามินซีและวิตามินอี เป็นสารเสริมในอาหารที่น่าสนใจในการนำมาทดลองใช้ เนื่องจากโดยปกติวิตามินซีและวิตามินอีเป็นสารอาหารที่ปลาจำเป็นต้องได้รับ เพื่อใช้ในปฏิกิริยาชีวเคมีและ เมแท

บอลลีซึมภายในร่างกายปลาให้เป็นปกติ ในสภาพการเลี้ยงปลาที่ไม่หนาแน่นมาก ปลาจะได้รับวิตามินซีจากอาหารธรรมชาติ ได้แก่ แพลงก์ตอนพืช และพืชน้ำ แต่ในสภาพที่ปลาอยู่ในสภาวะสิ่งแวดล้อมที่ไม่เหมาะสม และในสภาพการเลี้ยงอย่างหนาแน่น ปริมาณอาหารธรรมชาติไม่เพียงพอ จำเป็นต้องเสริมวิตามินในอาหารปลา การเสริมวิตามินทั้งสองชนิดสูงขึ้น จะมีบทบาทต่อระบบภูมิคุ้มกัน เพราะวิตามินทั้งสองชนิดมีคุณสมบัติเป็นสารต้านอนุมูลอิสระ ซึ่งสามารถช่วยให้ปลาต้านทานต่อความเครียดได้ดีขึ้น

ถึงแม้ว่าจะมีการทดลองการใช้วิตามินซีและวิตามินอีในการเพิ่มภูมิต้านทานโรคของปลาที่ได้รับความเครียดเนื่องจากปัจจัยอื่น ๆ ในปลาหลายชนิดก็ตาม แต่การใช้วิตามินซีและวิตามินอีเพื่อเพิ่มภูมิต้านทานให้กับปลาเขตร้อนภายใต้สภาวะการเลี้ยงในน้ำที่มีอุณหภูมิและ ค่า pH ต่ำนั้นยังมีการศึกษาน้อยมาก สมมติฐานที่ว่าวิตามินซีมีความสำคัญต่อการสร้างเซลล์และเนื้อเยื่อต่าง ๆ ในร่างกายของปลา การที่ปลาได้รับวิตามินซีเพิ่มขึ้น ทำให้ปลามีการผลิตเซลล์ และภูมิคุ้มกันที่ใช้ในการทำลายเชื้อโรคเพิ่มขึ้น วิตามินอี เป็นสารต้านอนุมูลอิสระที่ช่วยปกป้องเซลล์ในร่างกายจากอนุมูลอิสระได้ดี เนื่องจากเป็นวิตามินที่ละลายในไขมัน ทำให้มีการสะสมอยู่บริเวณผนังเซลล์ และเนื้อเยื่อไขมันในร่างกายปลาได้มาก จึงป้องกันการเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชันของผนังเซลล์ในร่างกายและกรดไขมันไม่อิ่มตัวที่พบมากในปลาได้ดี แต่วิตามินอีที่สะสมอยู่ก็สามารถถูกทำลายหมดไปได้หากปลาเกิดความเครียด แต่เนื่องจากวิตามินซีมีคุณสมบัติเป็นสารต้านอนุมูลอิสระที่มีความไวต่อปฏิกิริยาออกซิเดชันมากกว่าวิตามินอี จึงสามารถรักษาปริมาณวิตามินอีในร่างกายปลาได้มากขึ้น การทำงานของวิตามิน 2 ชนิดนี้ร่วมกันน่าจะทำให้เกิดผลร่วมเสริมกัน (Synergistic effects) ต่อการทำให้ปลามีความแข็งแรง ทนทานต่อสภาพแวดล้อมโดยเฉพาะเมื่ออุณหภูมิ น้ำ และค่า pH ที่ไม่เหมาะสม การศึกษาวิจัยครั้งนี้จึงมีความสนใจที่จะนำวิตามินซีและวิตามินอีมาเสริมในอาหารปลา โดยคาดว่า ผลการเสริมวิตามินทั้งสองชนิดร่วมกันจะช่วยให้ปลาสามารถสะสมวิตามินทั้งสองชนิดได้มากขึ้น และสามารถต้านทานความเครียดเมื่ออยู่ในน้ำที่มีอุณหภูมิและ pH ต่ำได้

1.2 วัตถุประสงค์ของการศึกษา

1.2.1 เพื่อศึกษาปริมาณและระยะเวลาการเสริมวิตามินซีร่วมกับวิตามินอีในอาหารปลาดุก ลูกผสม ต่อการเจริญเติบโต การสะสมวิตามินซี และวิตามินอีในพลาสมา ตับ และไตของปลาดุก ลูกผสม

1.2.2 เพื่อศึกษาผลของการเสริมวิตามินซีร่วมกับวิตามินอีในอาหารปลา ต่อค่าโลหิตวิทยา ค่าเคมีในเลือดชี้วัดความเครียด และภูมิคุ้มกันแบบไม่จำเพาะของปลาดุกลูกผสมที่ได้รับความเครียดจากสภาวะน้ำอุณหภูมิ และ pH ต่ำ

1.2.3 เพื่อศึกษาผลของการเสริมวิตามินซีร่วมกับวิตามินอีในอาหารปลา ต่อค่าภูมิคุ้มกันแบบไม่จำเพาะของปลาฉลามจมูกเมื่อได้รับเชื้อ *A. hydrophila* ร่วมกับการได้รับความเครียดจากสภาวะน้ำอุณหภูมิต่ำและ pH ต่ำ

1.3 สมมติฐานของการศึกษา

1.3.1 ถ้าปลาฉลามจมูกที่ได้รับอาหารเสริมวิตามินซีและวิตามินอีแล้ว ปลาจะมีการเจริญเติบโตเพิ่มขึ้น และมีการสะสมวิตามินซีและวิตามินอีในพลาสมา ตับ และไต มากขึ้นตามความเข้มข้นและระยะเวลาการเสริม

1.3.2 ถ้าปลาฉลามจมูกที่ได้รับอาหารเสริมวิตามินซีและวิตามินอี ถูกทำให้เครียดด้วยสภาวะน้ำที่มีอุณหภูมิต่ำและ pH ต่ำแล้ว ปลาจะมี ค่าโลหิตวิทยา ค่าชี้วัดความเครียด และมีภูมิคุ้มกันแบบไม่จำเพาะไม่แตกต่างจากปลาที่อยู่ในสภาวะปกติ

1.3.3 ถ้าปลาฉลามจมูกที่ได้รับอาหารเสริมวิตามินซีและวิตามินอี ได้รับเชื้อ *A. hydrophila* ร่วมกับการทำให้เครียดด้วยสภาวะน้ำที่มีอุณหภูมิต่ำและ pH ต่ำแล้ว ปลาจะมีภูมิคุ้มกันแบบไม่จำเพาะไม่แตกต่างจากปลาที่อยู่ในสภาวะปกติ

1.4 ขอบเขตของการศึกษา

การวิจัยในครั้งนี้จะมุ่งเน้นศึกษาถึง ระดับ และระยะเวลาการเสริมวิตามินซีและวิตามินอี ต่อการเจริญเติบโตและปริมาณการสะสมวิตามินทั้งสองชนิดในพลาสมา ตับ และไตของปลา ศึกษาผลของการเสริมวิตามินซีและวิตามินอี ในอาหารปลา ต่อค่าโลหิตวิทยา ค่าเคมีในเลือดชี้วัดความเครียด และค่าภูมิคุ้มกันแบบไม่จำเพาะของปลาฉลามจมูก ที่ได้รับความเครียดจากสภาวะน้ำที่มีอุณหภูมิต่ำและ pH ต่ำ รวมถึงศึกษาความต้านทานต่อเชื้อ *A. hydrophila* ร่วมกับการทำให้เครียดด้วยสภาวะน้ำที่มีอุณหภูมิต่ำและ pH ต่ำด้วย โดยประชากรที่ใช้ในการทดลองครั้งนี้ คือปลาฉลามจมูกหรือ ปลาฉลามปากอู (*C. macrocephalus* x *C. gariepinus*) จากฟาร์มเพาะพันธุ์ปลาที่ส่งขายให้เกษตรกรทั่วไป โดยทำการเลี้ยงปลาด้วยอาหารที่ผสมวิตามินซีและวิตามินอีในระดับที่แตกต่างกันทั้งหมด 9 กลุ่ม การทดลอง ระยะเวลาการเลี้ยงรวม 10 สัปดาห์ โดยมีประเด็นที่ต้องการศึกษาดังนี้

1.4.1 การศึกษาผลของปริมาณการเสริมวิตามินซี วิตามินอี และระยะเวลาในการเลี้ยง ต่อการเจริญเติบโต และการสะสมปริมาณวิตามินทั้งสองชนิดในพลาสมา ตับ และไต เมื่อถึงระยะเวลาการเลี้ยง 3 และ 6 สัปดาห์ จะทำการชั่งน้ำหนักปลาเพื่อศึกษาการเจริญเติบโตและเก็บตัวอย่างเลือด ตับ และไตปลา เพื่อวิเคราะห์ปริมาณการสะสมวิตามินซีและวิตามินอี

1.4.2 การศึกษาผลของปริมาณการเสริมวิตามินซี วิตามินอี และระยะเวลาในการเลี้ยง ต่อค่าโลหิตวิทยา ค่าเคมีในเลือดชี้วัดความเครียด และภูมิคุ้มกันแบบไม่จำเพาะของปลาที่อยู่ในสภาวะ

น้ำปกติ เปรียบเทียบกับปลาที่ได้รับความเครียดจากอุณหภูมิและ pH ต่ำ เมื่อถึงระยะเวลาการเลี้ยงที่ 4 และ 8 สัปดาห์ จะทำการเก็บตัวอย่างเลือดปลาที่อยู่ในสภาวะปกติ (อุณหภูมิ น้ำ 28-32 องศาเซลเซียส ค่า pH 7-9) และปลาที่ทำให้เกิดความเครียดด้วยน้ำอุณหภูมิ 19 องศาเซลเซียส ค่า pH 5.5 เป็นเวลา 24 ชั่วโมงก่อนการเจาะเลือด นำไปวิเคราะห์ค่าโลหิตวิทยา ค่าเคมีในเลือดชี้วัดความเครียด และภูมิคุ้มกันแบบไม่จำเพาะ เพื่อเปรียบเทียบความแตกต่างระหว่างปลาปกติและปลาที่ได้รับความเครียดจากน้ำที่มีอุณหภูมิและค่า pH ต่ำ

1.4.3 การศึกษาผลของปริมาณการเสริมวิตามินซีร่วมกับวิตามินอี ต่อค่าภูมิคุ้มกันแบบไม่จำเพาะของปลาที่อยู่ในสภาวะน้ำปกติ เปรียบเทียบกับปลาที่ได้รับเชื้อ *A. hydrophila* ร่วมกับการได้รับความเครียดจากอุณหภูมิ และ pH ต่ำ เมื่อครบระยะเวลาการเลี้ยง 10 สัปดาห์ ทำการเก็บตัวอย่างเลือดปลาที่อยู่ในสภาวะปกติ และปลาที่ได้รับเชื้อ *A. hydrophila* เป็นเวลา 3 วัน จากนั้นทำให้เกิดความเครียดด้วยน้ำอุณหภูมิ 19 องศาเซลเซียส ค่า pH 5.5 เป็นเวลา 24 ชั่วโมงก่อนการเจาะเลือดนำไปวิเคราะห์ภูมิคุ้มกันแบบไม่จำเพาะ เพื่อเปรียบเทียบความแตกต่างระหว่างปลาปกติและปลาที่ได้รับเชื้อ *A. hydrophila* ร่วมกับการได้รับความเครียดจากน้ำที่มีอุณหภูมิและ pH ต่ำ

1.5 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

1.5.1 ทราบความสัมพันธ์ของระดับการเสริมวิตามินซีร่วมกับวิตามินอีในอาหาร และระยะเวลาของการได้รับอาหารต่อการเจริญเติบโตและความสามารถในการสะสมวิตามินทั้งสองชนิดในพลาสมาตับ และไต

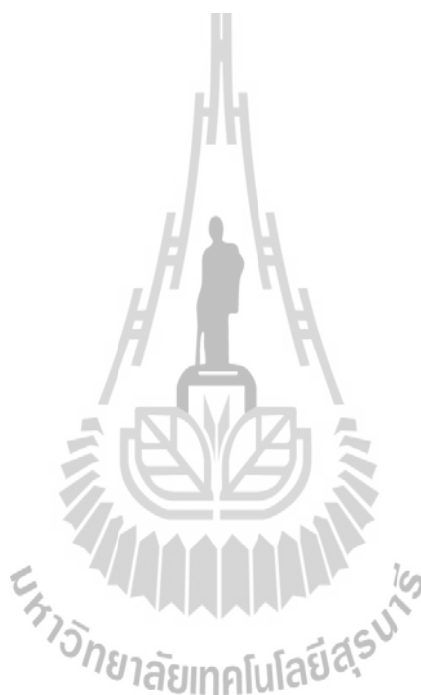
1.5.2 ทราบระดับการเสริมวิตามินซีและวิตามินอี ในอาหารปลาที่มีผลต่อการเสริมสุขภาพเมื่อปลาถูกเลี้ยงอยู่ในสภาวะน้ำที่มีอุณหภูมิและ pH ต่ำ

1.5.3 ทราบระดับการเสริมวิตามินซีและวิตามินอี ในอาหารปลาที่มีผลต่อการเสริมสุขภาพเมื่อปลาได้รับเชื้อ *A. hydrophila* และอยู่ในสภาวะน้ำที่มีอุณหภูมิและ pH ต่ำ

1.5.4 สามารถนำข้อมูลที่ได้จากโครงการวิจัยนี้ไปประยุกต์ใช้ในการเลี้ยงปลาเชิงพาณิชย์ ในช่วงฤดูกาลที่น้ำมีอุณหภูมิต่ำหรือป้องกันปัญหาการตายของปลาจากปัญหาน้ำมีค่า pH ต่ำลงอย่างรวดเร็วภายหลังฝนตก

1.6 คำอธิบายศัพท์

- 1.6.1 ปลาคุกลูกผสม หมายถึง ปลาที่มีชื่อเรียกโดยทั่วไปว่า ปลาคุกกบิกอูย ได้จากการนำปลาคุกยักษ์เพศผู้ (*C. gariepinus*) มาผสมพันธุ์กับปลาคุกอุยเพศเมีย (*C. macrocephalus*)
- 1.6.2 น้ำในสภาวะปกติ หมายถึง น้ำอุณหภูมิ 28-32 องศาเซลเซียส ค่า pH 7-9
- 1.6.3 น้ำอุณหภูมิต่ำ หมายถึง น้ำอุณหภูมิ 19 องศาเซลเซียส
- 1.6.4 น้ำที่มีค่า pH ต่ำ หมายถึง น้ำที่มีค่า pH 5.5



บทที่ 2

ปรีทัศน์วรรณกรรมและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

2.1 ปลาอุกอุกผสม

ปลาอุก (Walking Catfish) ใช้เรียกปลากลุ่มหนึ่งในสกุล *Clarias* วงศ์ Clariidae มีถิ่นอาศัยอยู่ทั่วโลก เป็นปลาไม่มีเกล็ด ลำตัวยาว มีหัวที่แบนและแข็ง มีหนวดยาวแปดเส้น สามารถหายใจบนบกได้ เนื่องจากมีอวัยวะช่วยหายใจ (dendritic organ)

ปลาอุกที่นิยมเลี้ยงในประเทศไทยช่วงแรกคือ ปลาอุกค้ำ (Clarias batrachus) (รูปที่ 2.1) ต่อมาช่วงปลายปี พ.ศ. 2529 เกษตรกรนิยมเลี้ยงปลาอุกอุย (*C. macrocephalus*) มากขึ้น แม้จะมีปัญหาการเจริญเติบโตช้า และไม่ทนทานต่อโรคก็ตาม แต่เนื่องจากเนื้อปลาอุกอุยมีรสชาติดีกว่า จึงมีราคาสูงกว่าปลาอุกชนิดอื่น จนกระทั่งปลายปี พ.ศ. 2530 มีเกษตรกรนำปลาอุกยักษ์ (*C. gariepinus*) (หรือปลาอุกเทศ หรือปลาอุกรัสเซีย) จากประเทศลาว มาผสมพันธุ์กับปลาอุกอุย ได้ปลาอุกผสมที่เนื้อมีรสชาติคล้ายปลาอุกอุย อัตราการเจริญเติบโตรวดเร็วและทนทานต่อโรค ทำให้เกษตรกรผู้เลี้ยงปลาอุกนิยมเลี้ยงปลาอุกผสม หรือที่เรียกกันว่า ปลาอุกบึกอุย (*C. macrocephalus* x *C. gariepinus*) (อุทัยรัตน์ ณ นคร, 2538)



รูปที่ 2.1 ปลาอุกค้ำ *Clarias batrachus*

ปลาคูก้าน มีชื่ออังกฤษว่า Walking catfish และ Batrachian walking catfish ชื่อวิทยาศาสตร์ *C. batrachus* เป็นปลาน้ำจืดในวงศ์ Clariidae มีรูปร่างค่อนข้างยาวเรียว ส่วนหางค่อนข้างแบน มีสีเทาปนดำ ส่วนท้องมีสีขาว (รูปที่ 2.2) สามารถเคลื่อนที่บนบกได้เป็นระยะทางสั้น ๆ โดยใช้ครีบ ขนาดเมื่อโตเต็มที่ประมาณ 50 เซนติเมตร พบได้ในพื้นที่ลุ่มน้ำโขง ลุ่มน้ำเจ้าพระยา คาบสมุทรมลายู เกาะสุมาตรา เกาะชวา เกาะบอร์เนียว ฟิลิปปินส์และมีรายงานว่าพบในศรีลังกา บังกลาเทศ อินเดียและพม่า ปลาคูก้านถือเป็นปลาน้ำจืดชนิดหนึ่งที่มีความสำคัญต่อเศรษฐกิจในประเทศไทย



รูปที่ 2.2 ปลาคูกอย *Clarias macrocephalus*

ปลาคูกอย มีชื่ออังกฤษว่า Broadhead catfish และ Günther's walking catfish ชื่อวิทยาศาสตร์ *C. macrocephalus* เป็นปลาน้ำจืดในวงศ์ Clariidae มีกระดูกท้ายทอยยื่นแหลมออกไปลักษณะคล้ายรูปสามเหลี่ยม ลำตัวสั้นป้อมกว่าปลาคูก้าน (*C. batrachus*) ซึ่งอยู่ในสกุลเดียวกัน ลำตัวมีสีดำปนเหลือง มีจุดขาวเล็ก ๆ เรียงเป็นแถวขวางลำตัวหลายแถว มีครีบหลังสูงกว่าปลาทั่วไปมาก สามารถเคลื่อนที่บนบกได้เป็นระยะทางสั้น ๆ โดยใช้ครีบช่วย พบได้ในพื้นที่แถบประเทศไทยไปจนถึงเวียดนามและมีการนำไปเลี้ยงในประเทศจีน มาเลเซียและฟิลิปปินส์ ปลาคูกอยเป็นที่นิยมของผู้บริโภคชาวไทยและชาวลาวมากกว่าปลาคูก้าน เนื่องจากเนื้อไม่มีรสชาติมัน อร่อย มีราคาที่สูงกว่าปลาคูก้าน จึงเป็นที่นิยมเพาะเลี้ยงในบ่อมากกว่าปลาคูก้าน



รูปที่ 2.3 ปลาดุกแอฟริกา *Clarias gariepinus*

ปลาดุกแอฟริกา หรือ ปลาดุกยักษ์ มีชื่ออังกฤษว่า African catfish ชื่อวิทยาศาสตร์ *C. gariepinus* ในวงศ์ Clariidae มีลักษณะทั่วไปคล้ายปลาดุกด้าน (*C. batrachus*) ซึ่งเป็นปลาในสกุลเดียวกัน แต่มีส่วนหัวยาวกว่าและแนวระหว่างจะงอยปากถึงท้ายทอยเว้าและโค้งลาด ด้านบนของศีรษะขรุขระกว่า เมื่อมองจากด้านบนจะเห็นเป็นรูปสามเหลี่ยม ท้ายทอยแหลมเป็นโค้ง 3 โค้ง โดยส่วนกลางยื่นยาวมากที่สุด ลำตัวยาว ครีบหลังและครีบกันยาว ลำตัวด้านบนมีสีน้ำตาลคล้ำอมเหลืองและมีลายแฉกแบบลายหินอ่อนบนลำตัว แก้มและท้องสีจาง ที่โคนครีบหางมีแถบตามแนวตั้งสีจาง ซึ่งเป็นลักษณะสำคัญของปลานชนิดนี้ ครีบบีสีเข้มกว่าลำตัวเล็กน้อย บางตัวอาจมีขอบครีบบีแดง นับเป็นปลาที่มีขนาดใหญ่ที่สุดในสกุล *Clarias* ขนาดเมื่อโตเต็มที่ยาวได้ถึง 1.70 เมตร (รูปที่ 2.3) เป็นปลาพื้นเมืองของทวีปแอฟริกา พบได้ในตอนเหนือและตอนตะวันออกของทวีป สำหรับในประเทศไทยได้ถูกนำเข้ามากในปี พ.ศ. 2528 โดยเอกชนบางรายในจังหวัดหนองคาย และอุบลราชธานี โดยนำเข้ามาจากประเทศลาวเพื่อเลี้ยงไว้ดูเล่น เนื่องจากมีขนาดลำตัวใหญ่กว่าปลาดุกทั่วไป ในปัจจุบัน สถานะของปลาดุกแอฟริกาในประเทศไทย จากบางส่วนได้หลุดรอดและถูกปล่อยลงสู่แหล่งน้ำธรรมชาติ ทำให้เป็นสิ่งมีชีวิตต่างถิ่น (alien species) ชนิดหนึ่งที่คุกคามการอยู่รอดสัตว์น้ำพื้นเมืองของไทย



รูปที่ 2.4 ปลาอุกอุกผสม (*Clarias macrocephalus* x *C. gariepinus*) หรือปลาบึกอุย

ปลาอุกอุกผสม หรือปลาบึกอุย (*C. macrocephalus* x *C. gariepinus*) (รูปที่ 2.4) เป็นปลาอุกผสม (Hybrid catfish) ที่ได้จากการผสมข้ามพันธุ์ระหว่างปลาอุกอุย (*C. macrocephalus*) และปลาอุกแอฟริกา (*C. gariepinus*) เนื่องจากคุณภาพเนื้อที่ดีของปลาอุกอุยเป็นที่นิยมของผู้บริโภค แต่มีข้อจำกัดในด้านระยะเวลาการเจริญเติบโต กรมประมงจึงได้มีการทดลองผสมข้ามพันธุ์กับปลาอุกแอฟริกาเนื่องจากปลาอุกแอฟริกามีความต้านทานโรคสูงและมีอัตราการเจริญเติบโตที่รวดเร็ว จากการทดลองผสมข้ามพันธุ์พบว่าการผสมระหว่างพ่อปลาอุกแอฟริกาและแม่ปลาอุกอุย ให้ลูกที่มีอัตราการรอดสูง มีการเจริญเติบโตเร็วและเนื้อมีรสชาติที่ดีขึ้น จึงส่งเสริมเผยแพร่วิธีการเพาะขยายพันธุ์และการเลี้ยงสู่เกษตรกรอย่างกว้างขวาง จนปัจจุบันนี้ กลายเป็นปลาเศรษฐกิจที่ได้รับความนิยมชนิดหนึ่งของไทยและเรียกชื่อปลาอุกผสมนี้ว่า "บึกอุย"

2.2 ความเครียดของปลา

แม้ว่าปลาอุกอุกผสมจะมีอัตราการเจริญเติบโตรวดเร็วและทนทานต่อโรค แต่ปัจจุบันยังคงพบปัญหาการเกิดโรคในบางฤดูกาล Fedoruk (1981) กล่าวถึงปัญหาการเลี้ยงปลาอุกในประเทศไทยว่าการเกิดโรคในปลาเกิดจากความเครียดอันเนื่องมาจากการจัดการทำให้ความต้านทานโรคของปลาลดลง ซึ่งปัจจัยที่ทำให้ปลาอุกที่มีการเลี้ยงในประเทศไทยได้รับความเครียด ได้แก่ การเปลี่ยนแปลงอุณหภูมิอย่างรวดเร็ว การได้รับอาหารไม่เพียงพอต่อความต้องการ การเกิดบาดแผลอัน

เนื่องจากปลาตัวอื่น นก งู หรือสัตว์อื่น ๆ การสัมผัสอันเนื่องมาจากการขนย้ายปลาไปยังบ่ออื่น การเกิดความเครียดเนื่องจากถูกรบกวนด้วยปรสิตร เช่น โปรโตซัว พยาธิ เป็นต้น การเลี้ยงอย่างหนาแน่น มลภาวะของน้ำอันเนื่องมาจาก ขาฆ่าแมลง หรือน้ำเสียจากโรงงานอุตสาหกรรม ของเสียที่สะสมในบ่อเลี้ยงปลาเนื่องจากการให้อาหารมากเกินไปและจากการขับถ่ายของปลาอันได้แก่ คาร์บอนไดออกไซด์ (CO_2) แอมโมเนีย (NH_3) และไฮโดรเจนซัลไฟด์ (H_2S)

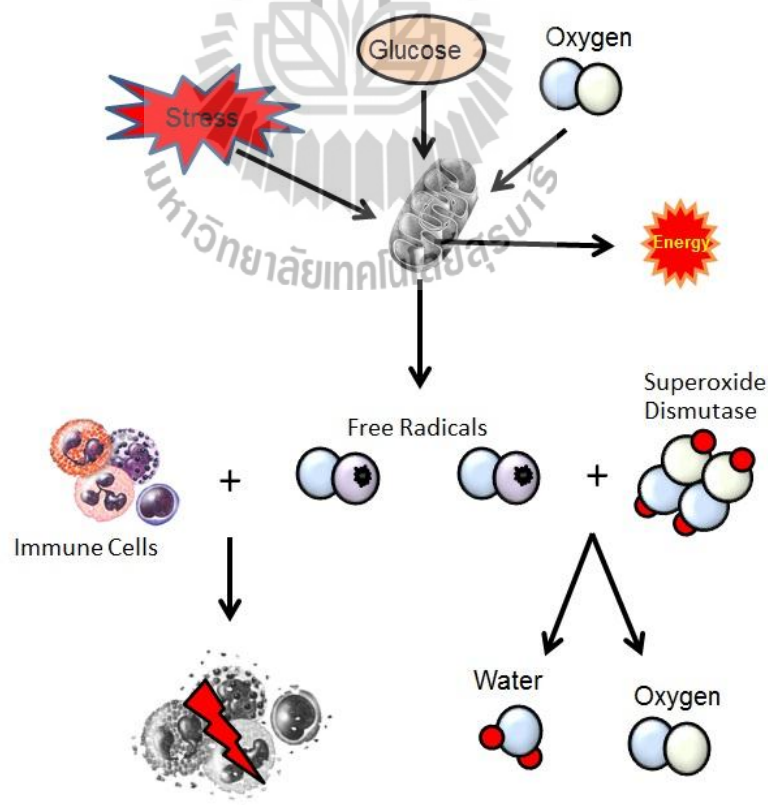
จากปัจจัยที่ทำให้ปลาเกิดความเครียดที่ได้กล่าวมา ส่วนใหญ่สามารถแก้ไข หรือบรรเทาความรุนแรงได้ด้วยการจัดการ แต่ปัจจัยอันเนื่องมาจากการเปลี่ยนแปลงอุณหภูมิอย่างรวดเร็ว นั้นถือเป็นปัจจัยที่ควบคุมได้ยาก เนื่องจากอุณหภูมิที่น้ำที่ใช้เลี้ยงปลาถูก ขึ้นอยู่กับอุณหภูมิอากาศตามฤดูกาล อุณหภูมิที่เป็นปัญหาต่อการเลี้ยงปลาในประเทศไทย คือ อุณหภูมิต่ำ เนื่องจากพบว่า อุณหภูมิทั่วไปที่เหมาะสมแก่การเลี้ยงปลาในประเทศไทย คือ อุณหภูมิประมาณ 27-32 องศาเซลเซียส (Fedoruk, 1981) และแม้อุณหภูมิจะสูงถึง 37 หรือ 38 องศาเซลเซียส ก็ไม่ส่งผลต่อประสิทธิภาพการผลิต แต่พบว่าอุณหภูมิ 19 องศาเซลเซียส เป็นอุณหภูมิที่ปลากลายไม่สามารถอยู่ได้ และอุณหภูมิ 24 องศาเซลเซียส เป็นช่วงอุณหภูมิที่ทำให้ปลามีการเจริญเติบโตช้า กองอนามัย สิ่งแวดล้อม สรุปรายงานไว้ว่าอุณหภูมิในประเทศไทยจะผันแปรอยู่ในช่วง 23.6 - 31.4 องศาเซลเซียส โดยมีค่าต่ำสุดในภาคเหนือและภาคตะวันออกเฉียงเหนือ สูงขึ้นในภาคกลางและสูงสุดในภาคใต้ โดยความผันแปรของอุณหภูมิจะแตกต่างกันไปในแต่ละฤดูกาล (สิทธิชัย ดันธนะสฤษฎี, 2549)

นอกจากปัญหาการเปลี่ยนแปลงอุณหภูมิอย่างรวดเร็วในฤดูหนาวส่งผลให้การเจริญเติบโตและภูมิคุ้มกันโรคของปลาลดต่ำลงจนทำให้ปลาเกิดโรคได้ง่ายแล้ว ยังพบปัญหาการตายอย่างรวดเร็วในช่วงฝนตกซึ่งเกิดจากการเปลี่ยนแปลงของอุณหภูมิน้ำและมีความเกี่ยวข้องกับถึงค่าความเป็นกรดของน้ำด้วย เนื่องจากพบว่าค่า pH ของแหล่งน้ำหลังฝนตกจะมีค่าต่ำลง เนื่องจากน้ำฝนชะล้างความเป็นกรดจากดินลงสู่แหล่งน้ำ โดยทั่วไปค่า pH ที่เหมาะสมต่อการเลี้ยงปลาคือควรมีค่าอยู่ระหว่าง 7 – 8.5 (อุทัยรัตน์ ณ นคร, 2538) ค่า pH ของน้ำที่จัดว่าเป็นฝนกรด คือ น้ำฝนที่มีค่า pH ต่ำกว่า 5.6 (ศูนย์สารสนเทศวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี, 2553)

2.2.1 การตอบสนองความเครียดของปลา

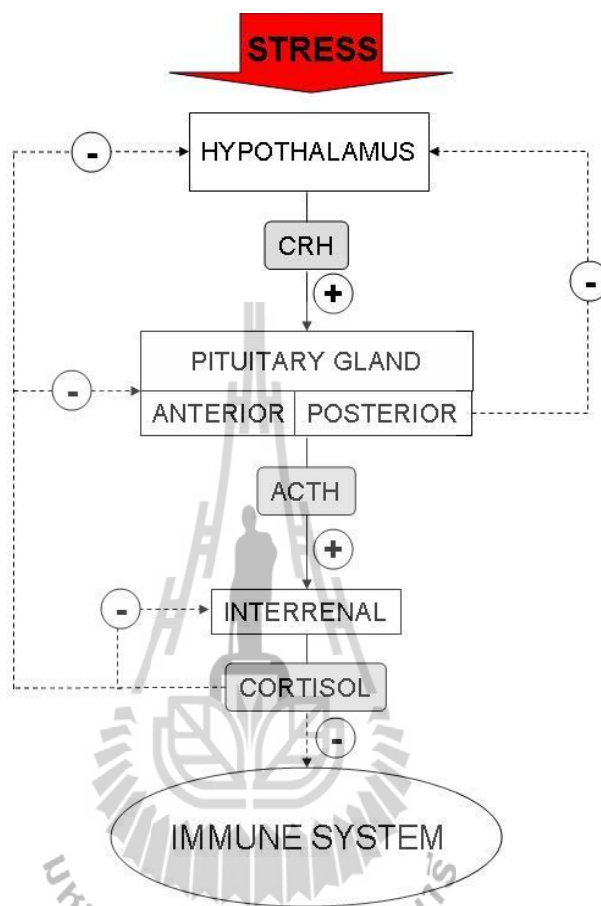
สภาวะเครียดของปลา สะท้อนถึงความไม่สมดุลระหว่างผลผลิตของปฏิกิริยาออกซิเดชันและตัวจัดปฏิกิริยาออกซิเดชัน (Winston, 1991) การที่สัตว์ได้รับสิ่งแวดล้อมที่เปลี่ยนแปลงไปหรือสภาวะที่ไม่ปกติทำให้เซลล์ในร่างกายเกิดการปรับตัวและทำงานหนักเพื่อให้ร่างกายสามารถอยู่ในสิ่งแวดล้อมนั้นได้อย่างปกติ กระบวนการเมแทบอลิซึมของสัตว์และการหายใจระดับเซลล์ก่อให้เกิดอนุมูลอิสระ (วรพล เองวานิช, 2550) ส่วนใหญ่อนุมูลอิสระจะเกิดขึ้นจากกระบวนการเมแทบอลิซึมภายในร่างกายและปัจจัยภายนอก เช่นการสัมผัสรังสี มลภาวะทาง

อากาศและสารเคมี ตัวอย่างของอนุมูลอิสระในกลุ่มออกซิเจน (reactive oxygen species, ROS) และอนุมูลอิสระในกลุ่มไนโตรเจน (reactive nitrogen species, RNS) อนุมูลอิสระเหล่านี้อยู่ในภาวะที่ไม่เสถียรจะมีความสามารถในการทำปฏิกิริยากับโมเลกุลหรืออะตอมอื่น โดยการดึงอิเล็กตรอนหรือใช้อิเล็กตรอนร่วมกับโมเลกุลหรืออะตอมอื่นใกล้เคียง เพื่อให้ตนเองอยู่ในภาวะเสถียร กระบวนการนี้ส่งผลเสียต่อปลา คือ ผนังเซลล์ต่าง ๆ ในร่างกายถูกทำลายโดยเฉพาะเซลล์ที่ทำหน้าที่เป็นภูมิคุ้มกันด่านแรก ได้แก่ เม็ดเลือดขาว และเซลล์ที่ทำหน้าที่จับกินสิ่งแปลกปลอม รวมไปถึงเซลล์ที่ทำหน้าที่สร้างสารน้ำในระบบภูมิคุ้มกัน องค์ประกอบของเซลล์ส่วนใหญ่ในปลาเป็นกรดไขมันไม่อิ่มตัวสูง เช่น กรดไขมัน โอเมก้า 3 เป็นกรดไขมันที่ง่ายแก่การเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชัน ดังนั้นเมื่อเกิดอนุมูลอิสระเพิ่มขึ้นจึงส่งผลต่อการถูกทำลายของเซลล์ต่าง ๆ ในร่างกายปลาเป็นอย่างมาก รูปที่ 2.5 แสดงถึงกลไกการเกิดภาวะเครียดออกซิเดชันที่ส่งผลต่อการถูกทำลายของเซลล์ภูมิคุ้มกัน ความไม่สมดุลระหว่างผลผลิตของปฏิกิริยาออกซิเดชันและตัวจับปฏิกิริยาออกซิเดชัน ทำให้เกิดภาวะเครียดออกซิเดชัน (oxidative stress) ภาวะดังกล่าวจะทำให้เกิดอนุมูลอิสระขึ้นส่งผลให้เกิด peroxidative damage กับสารชีวโมเลกุลต่างๆ ในร่างกาย โดยเฉพาะโมเลกุลของไขมันไม่อิ่มตัว (polyunsaturated fatty acid, PUFA) ซึ่งเป็นส่วนประกอบของเยื่อหุ้มเซลล์



รูปที่ 2.5 ภาพอธิบายการเกิด Oxidative stress

นอกจากการถูกทำลายอันเนื่องมาจากการเกิดภาวะเครียดออกซิเดชันแล้ว ระบบภูมิคุ้มกันยังสามารถถูกยับยั้งหรือลดการทำงานได้โดยฮอร์โมนความเครียดดังแสดงในรูปที่ 2.6



รูปที่ 2.6 ภาพอธิบาย การหลั่งฮอร์โมนความเครียด

ภูมิคุ้มกันของปลามีลักษณะทั่วไปคล้ายกับระบบภูมิคุ้มกันของสัตว์เลื้อยลูกด้วยนม (Sakai, 1999; Vadstein, 1997) แต่ส่วนใหญ่สุขภาพของปลาจะขึ้นอยู่กับภูมิคุ้มกันแบบไม่จำเพาะ (non-specific immunity) เนื่องจากเป็นภูมิคุ้มกันที่ไม่จำเป็นต้องได้รับแอนติเจนหรือเชื้อโรคก่อนที่จะเกิดการตอบสนอง ภูมิคุ้มกันแบบไม่จำเพาะถือเป็นด่านแรกในการป้องกันการเข้าทำลายของเชื้อโรคต่าง ๆ และมีการตอบสนองอย่างรวดเร็วเพื่อป้องกันการบุกรุกของเชื้อโรคหลายชนิด ภูมิคุ้มกันแบบไม่จำเพาะจึงเป็นภูมิคุ้มกันหลักในการป้องกันการระบาดของโรคที่เกิดจากเชื้อจุลินทรีย์ในปลา วัยอ่อน (Vadstein, 1997) โดยส่วนใหญ่หากภูมิคุ้มกันด่านแรกไม่สามารถป้องกันการรุกรานของเชื้อก่อโรคในปลาได้จะเกิดผลเสียต่อปลาอย่างมาก เนื่องจากปลาอยู่ในน้ำดังนั้นการแพร่กระจายของโรคจึงเกิดขึ้นได้ง่าย อีกทั้งการรักษาโรคด้วยยาปฏิชีวนะยังเป็นสิ่งที่ทำได้ยากโดยเฉพาะในระบบ

การเลี้ยงจำนวนหนาแน่น อย่างไรก็ตามภูมิคุ้มกันแบบจำเพาะก็ยังคงมีความสำคัญต่อการป้องกันโรคของปลาเนื่องจากจะมีความจำ (immunological memory) ทำให้ปลาสามารถตอบสนองต่อการกระตุ้นอย่างรวดเร็วและมีประสิทธิภาพสูงมาก หากได้สัมผัสกับแอนติเจนหรือเชื้อโรคเดียวกันนี้ในครั้งต่อไป ดังนั้นการทำงานของภูมิคุ้มกันทั้งสองแบบจึงต้องมีการทำงานร่วมกันจึงจะทำให้การป้องกันโรคมีประสิทธิภาพมากที่สุด

2.2.2 ผลของการเปลี่ยนแปลงอุณหภูมิน้ำต่อสุขภาพของปลา

ปลาเป็นสัตว์เลือดเย็น (poikilothermic animal) ไม่สามารถรักษาอุณหภูมิของร่างกายให้คงที่เหมือนสัตว์เลือดอุ่น ร่างกายของปลาจะเปลี่ยนแปลงไปตามอุณหภูมิของน้ำและสิ่งแวดล้อมที่อาศัยอยู่ แต่ต้องอยู่ในขอบเขตที่เหมาะสม เนื่องจากปลาแต่ละชนิดจะมีความทนทานต่อการเปลี่ยนแปลงของอุณหภูมิในช่วงที่จำกัด เมื่ออุณหภูมิสูงขึ้นกิจกรรมต่าง ๆ ในการดำรงชีวิตจะสูงขึ้นและเมื่ออุณหภูมิลดลงกิจกรรมต่าง ๆ เหล่านั้นก็จะลดลง ตามกฎของแวนฮอฟฟ์ (Van Hoff's Law) ซึ่งกล่าวว่า อัตราเมแทบอลิซึมของสิ่งมีชีวิตจะเพิ่มขึ้นเป็น 2-3 เท่าเมื่ออุณหภูมิเพิ่มขึ้น 10 องศาเซลเซียสและลดต่ำลงในการทำงานเดียวกันเมื่ออุณหภูมิลดต่ำลง (ประเทือง เชาววันกลาง, 2534) การเปลี่ยนแปลงของอุณหภูมิน้ำส่งผลต่อเมแทบอลิซึมของปลา ทำให้ปลาเกิดความเครียดเนื่องจากต้องปรับสภาพร่างกายให้อยู่ในสิ่งแวดล้อม หรืออุณหภูมิใหม่ที่เปลี่ยนแปลงไป ความเครียดที่เกิดขึ้นนี้ทำให้ภูมิคุ้มกันของปลาลดต่ำลง จากการศึกษาผลของการเปลี่ยนแปลงอุณหภูมิต่อระบบภูมิคุ้มกันของปลา พบว่าการที่ปลาอยู่ในอุณหภูมิที่แตกต่างไปจากเดิมทั้งกรณีที่อุณหภูมิต่ำและอุณหภูมิสูง จะส่งผลให้ภูมิคุ้มกันลดลง แต่หากปลาอยู่ในอุณหภูมินั้นเป็นระยะเวลานานขึ้นจนสามารถปรับตัวได้ ค่าภูมิคุ้มกันของปลาก็จะเพิ่มสูงขึ้นได้ จึงอาจกล่าวได้ว่าการเปลี่ยนแปลงอุณหภูมิอย่างรวดเร็วมีผลทำให้ภูมิคุ้มกันลดลง แต่การเปลี่ยนแปลงอุณหภูมิอย่างช้า ๆ หรือการที่ปลาอยู่ในอุณหภูมิคงที่เป็นระยะเวลานานไม่มีผลต่อการลดลงของภูมิคุ้มกันของปลาทั้งในกรณีอุณหภูมิของน้ำต่ำและสูง โดยสรุปได้ว่าอุณหภูมิของน้ำเปลี่ยนแปลงประมาณ 4 ถึง 8 องศาเซลเซียส ภายในระยะเวลา 12 หรือ 24 ชั่วโมง สามารถคาดเดาได้ว่าปลาจะมีภูมิคุ้มกันต่ำลงและเสี่ยงต่อการเกิดโรค การรวบรวมข้อมูลที่เกี่ยวข้องกับผลของอุณหภูมิต่อระบบภูมิคุ้มกันโรคของปลาพบว่ามีการศึกษาภูมิคุ้มกันแบบไม่จำเพาะเจาะจง (non-specific immunity หรือ innate immunity) เนื่องจากเป็นระบบภูมิคุ้มกันด่านแรกที่ทำหน้าที่ปกป้องปลาจากเชื้อโรคที่ไม่เคยได้รับมาก่อน (Magnadottir, 2006) ภูมิคุ้มกันแบบไม่จำเพาะ ส่วนใหญ่ที่มีการศึกษา สามารถแบ่งได้เป็น 2 แบบ คือ ภูมิคุ้มกันแบบสารน้ำ และภูมิคุ้มกันแบบเซลล์

การศึกษาผลของอุณหภูมิต่อค่าภูมิคุ้มกันแบบสารน้ำ ซึ่งได้แก่ lysozyme activity และ Alternative haemolytic complement (AHC50) พบว่าเมื่อปลาอยู่ในอุณหภูมิสูงขึ้น จะส่งผลให้ค่า lysozyme activity และ AHC50 สูงขึ้น (Ndong *et al.* , 2007; Tort, Padrous, Rotllant, and

Crespo, 1998) และเมื่ออยู่ในอุณหภูมิต่ำ ปลาจะมีค่า lysozyme activity และ AHC50 ลดลง (Ndong *et al.*, 2007; Tort *et al.*, 1998) แต่เมื่อปลาได้อยู่ในอุณหภูมิต่ำเป็นระยะเวลานาน พบว่า lysozyme activity และ AHC50 มีค่าเพิ่มสูงขึ้น (Ndong *et al.*, 2007) จากผลดังกล่าวสามารถอธิบายได้ว่า การทำงานของ Lysozyme และ Alternative complement ของปลาจะเพิ่มขึ้นเมื่ออุณหภูมิสูงขึ้นและลดลงเมื่ออุณหภูมิต่ำแต่ หากอยู่ในอุณหภูมิต่ำนานจนสามารถปรับตัวให้เข้ากับสิ่งแวดล้อมได้แล้ว ค่า Lysozyme activity และ Alternative complement ก็จะเพิ่มสูงขึ้น

ภูมิคุ้มกันแบบเซลล์ ได้แก่ การศึกษาผลของอุณหภูมิต่อจำนวนเม็ดเลือดขาวทั้งหมด จำนวนเม็ดเลือดขาวชนิด Lymphocyte ค่า Phagocytic activity และ Respiratory burst (NBT) จากรายงานของ Ndong *et al.* (2007) พบว่าจำนวนเม็ดเลือดขาวทั้งหมดของปลาจะลดลงเมื่อปลาอยู่ในอุณหภูมิต่ำและสูงกว่าอุณหภูมิในกลุ่มควบคุม (27 องศาเซลเซียส) การศึกษาจำนวนเม็ดเลือดขาวชนิด Lymphocyte พบว่าที่อุณหภูมิสูงและต่ำ ปลาที่มีจำนวนเม็ดเลือดขาวชนิด Lymphocyte ไม่แตกต่างจากกลุ่มควบคุม แต่พบว่าที่อุณหภูมิสูง ปลาที่มีจำนวนเม็ดเลือดขาวชนิด Lymphocyte มากกว่าที่อุณหภูมิต่ำ (Tort *et al.*, 1998)

การศึกษาผลของอุณหภูมิต่อค่า Phagocytic activity พบว่าปลามีค่า Phagocytic activity ลดลงเมื่ออยู่ในอุณหภูมิต่ำและสูงกว่าอุณหภูมิในกลุ่มควบคุม (Ndong *et al.*, 2007) แต่เมื่อปลาได้อยู่ในอุณหภูมิต่ำเป็นระยะเวลานาน (48 ชั่วโมง) พบว่า Phagocytic activity มีค่าเพิ่มสูงขึ้น ส่วนในอุณหภูมิสูงพบว่าไม่มีการเพิ่มขึ้นของค่า Phagocytic activity (Ndong *et al.*, 2007)

ปัญหาการเปลี่ยนแปลงอุณหภูมิในในประเทศไทย โดยเฉพาะฤดูหนาวมีการเปลี่ยนแปลงประมาณ 7-8 องศาเซลเซียส ในรอบวัน (Fedoruk, 1981) ถือว่าอยู่ในช่วงที่ทำให้ปลาเกิดความเครียดและมีภูมิคุ้มกันต่ำลงเสี่ยงต่อการเกิดโรค โดยทั่วไปเกษตรกรมักหลีกเลี่ยงการเลี้ยงปลาในฤดูหนาว (เดือนพฤศจิกายน ถึงกุมภาพันธ์) ซึ่งแม้เป็นเพียงระยะเวลานั้น ๆ ก็ทำให้ผู้เลี้ยงสูญเสียรายได้ไป เช่น กรณีที่เลี้ยงปลาดุกบักอู๋ ซึ่งใช้เวลาการเลี้ยงประมาณ 3 เดือนก็สามารถส่งขายได้ หากสามารถเลี้ยงปลาได้ตลอดทั้งปี ก็จะมีรายได้จากการขายปลาถึง 4 รุ่น ในขณะที่หากไม่มีการเลี้ยงปลาในฤดูหนาวก็จะมีรายได้จากการเลี้ยงปลาเพียงปีละ 3 รุ่น

2.2.3 ผลของการเปลี่ยนแปลงค่า pH ในน้ำต่อสุขภาพของปลา

การลดต่ำลงของค่า pH ในน้ำส่งผลต่อปลา คือ เม็ดเลือดแดงเกิดการบวมเนื่องจากการเพิ่มปริมาณไอออนในพลาสมา (McDonald and Wood, 1981) การบวมของเม็ดเลือดแดงนั้นส่งผลให้ค่า ฮีมาโตคริต หรือปริมาณเม็ดเลือดแดงอัดแน่น มีค่าสูงขึ้น การศึกษาของ Milligan และ Wood ในปี 1982 พบว่าปลา rainbow trout ที่ถูกนำไปอยู่ในน้ำที่มีค่า pH 4.0 - 4.5 เป็นเวลา 3 วัน มีค่าฮีมาโตคริต ฮีโมโกลบินและจำนวนเม็ดเลือดแดง เพิ่มขึ้น นอกจากนี้ยังพบว่าปริมาณโปรตีนในพลาสมา มีการเพิ่มสูงขึ้นเช่นเดียวกัน อย่างไรก็ตามการปรับเปลี่ยนสมดุลภายนอกและภายใน

เซลล์เม็ดเลือดแดงที่เกิดขึ้นไม่มีผลต่อระดับน้ำในตัวปลา ซึ่งทราบได้จากการที่ปลายังคงรักษาระดับของปริมาณน้ำทั้งหมดในร่างกาย (Total body water) ได้ไม่แตกต่างจากปลาในกลุ่มควบคุม

การที่ปลาอยู่ในน้ำที่มีค่า pH ต่ำกว่าสภาวะปกตินั้นส่งผลให้ปริมาณความเข้มข้นของโซเดียม และ แคลเซียมในพลาสมาเพิ่มสูงขึ้นอย่างชัดเจน เรียกว่าการเกิด blood acidosis (Spry, Wood, and Hodson, 1981) นอกจากนี้ยังมีรายงานการศึกษาผลของน้ำ pH ต่ำ ต่อความเข้มข้นของโซเดียม และแคลเซียมบริเวณเหงือกซึ่งมีหน้าที่แลกเปลี่ยนออกซิเจนระหว่างน้ำกับระบบไหลเวียนโลหิต พบว่าปลามีการสูญเสียโซเดียม และแคลเซียมบริเวณเหงือกอย่างมาก แสดงให้เห็นว่าภาวะนั้นน้ำ pH ต่ำ มีผลต่อการกลไกการควบคุมไอออนที่บริเวณเหงือก (McDonald *et al.*, 1980) นอกจากนี้ยังมีการศึกษาสภาพทางเนื้อเยื่อในร่างกายปลากะพง พบว่าน้ำที่มี pH ต่ำ มีผลทำลายเซลล์ที่บริเวณเหงือกปลามากกว่าเซลล์บริเวณอื่น ฐานันดร ทัศนันท (2539) ได้สรุปผลการศึกษาว่า เกษตรกรไม่ควรปล่อยให้ปลาที่เลี้ยงในกระชังสัมผัสกับน้ำ pH ต่ำกว่า 5.67 เพื่อจะช่วยให้ไม่เกิดความเสียหายต่อผลผลิตมากกว่า 5 % ในเวลา 6 ชั่วโมงหลังจากการสัมผัส ดังนั้นจากผลการรวบรวมเอกสารครั้งนี้ผู้วิจัยจึงเลือกใช้ค่า pH ของน้ำที่ใช้ในการทดสอบความต้านทานของปลาที่ pH 5.5 เนื่องจากเป็นค่าที่ต่ำกว่าคำแนะนำจากการศึกษาของ ฐานันดร ทัศนันท (2539) และเป็นค่าที่ต่ำกว่า pH 5.6 ซึ่งเป็นค่า pH ที่เป็นเกณฑ์กำหนดว่าน้ำฝนที่จัดเป็นฝนกรดคือน้ำฝนที่มี ค่า pH ต่ำกว่า 5.6 (ศูนย์สารสนเทศวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี, 2553)

การศึกษาผลของสภาวะน้ำ pH ต่ำต่อค่าภูมิคุ้มกันของปลาพบว่าปลาที่อยู่ในน้ำที่มีค่า pH ต่ำลง ปลาจะมีค่าอิมมูโนโกลบูลินเอ็มในพลาสมา (Plasma IgM) และ อัตราการจับกินสิ่งแปลกปลอมของเม็ดเลือดขาวลดลง ผลการศึกษาของ Galina (1996) พบว่าปลาที่อยู่ในแม่น้ำที่มีค่า pH ต่ำจะมีอัตราส่วนเม็ดเลือดแดงต่อเม็ดเลือดขาวชนิดโพลิมอร์โฟนิวเคลียสสูง ซึ่งอัตราส่วนดังกล่าวจะบ่งบอกถึงประสิทธิภาพการตอบสนองของภูมิคุ้มกัน แสดงให้เห็นว่าปลาที่อยู่ในสภาวะน้ำ pH ต่ำจะมีภูมิคุ้มกันต่ำลง

2.3 แนวทางการแก้ไขปัญหาลาหะภูมิคุ้มกันต่ำเนื่องจากความเครียดของปลา

จากสาเหตุอันเนื่องมาจากปัจจัยใด ๆ ก็ตามที่ทำให้ปลาเกิดโรคได้ง่าย เกษตรกรมักแก้ไขด้วยการนำยาปฏิชีวนะเข้ามาช่วยป้องกันและรักษาโรคของปลา ซึ่งสามารถแก้ปัญหาได้ในระดับหนึ่ง แต่การใช้ยาปฏิชีวนะไม่ใช่ทางแก้ไขในระยะยาว เนื่องจากผลของการใช้อาจส่งผลเสียต่อผู้บริโภคและสิ่งแวดล้อมได้ (ชนกันต์ จิตมนัส, 2545) เนื่องจากการใช้ยาปฏิชีวนะในปริมาณที่ไม่เหมาะสมเป็นเวลานาน แบคทีเรียจะมีการพัฒนาสายพันธุ์ที่ดื้อยาทำให้การรักษาครั้งต่อไปไม่ได้ผล นอกจากนี้ Kruse and Sorum (1994) รายงานว่ายีนต้านยาปฏิชีวนะในแบคทีเรียเหล่านี้อาจส่งผ่านไปยังแบคทีเรียที่ก่อโรคในมนุษย์ ทำให้การใช้ยาในมนุษย์ไม่ได้ผลในอนาคต รวมทั้งปัญหาสารเคมี

และยาปฏิชีวนะตกค้างในผลิตภัณฑ์สัตว์น้ำและสิ่งแวดล้อม ซึ่งเป็นปัญหาสำคัญที่กระทบต่อเศรษฐกิจของประเทศในขณะนี้

ปัญหาดังกล่าวนำไปสู่การคิดค้นหาแนวทางที่จะลดการใช้สารเคมีและยาปฏิชีวนะเพื่อให้เกิดการผลิตรายสัตว์น้ำของไทยเข้าสู่การเป็นผลิตภัณฑ์สัตว์น้ำอินทรีย์เพื่อให้เป็นที่ยอมรับในมาตรฐานสากล (ชนกันต์ จิตมนัส, 2545) และเป็นการแก้ไขปัญหายั่งยืนในอนาคต การใช้สารกระตุ้นภูมิคุ้มกันจึงเป็นแนวทางหนึ่งที่จะช่วยลดการใช้ยาปฏิชีวนะได้ เนื่องจากสารกระตุ้นภูมิคุ้มกันสามารถเพิ่มการทำงานของภูมิคุ้มกันของปลาได้ทำให้ปลาสามารถต้านทานโรคได้ดีขึ้น สารกระตุ้นภูมิคุ้มกันของปลามีหลายชนิด (Sakai, 1999) เช่น แบคทีเรียและส่วนประกอบของแบคทีเรีย (bacterial derivative) สารเสริมปฏิกิริยาการตอบสนองทางภูมิคุ้มกันหรือแอดจูแวนต์ (adjuvant) ไคตินและไคโตซาน (chitin and chitosan) กลูแคน (glucan) ฮอร์โมนเร่งการเจริญเติบโต (growth hormone) สารสังเคราะห์ทางเคมี และวิตามิน (vitamin) ซึ่งสารกระตุ้นภูมิคุ้มกันเหล่านี้ ส่วนแล้วแต่สามารถกระตุ้นภูมิคุ้มกันของปลาได้ แต่เนื่องจากคุณสมบัติหลายประการของวิตามิน ทำให้ผู้วิจัยสนใจว่าวิตามินเป็นสารกระตุ้นภูมิคุ้มกันที่น่าจะเป็นแนวทางในการแก้ปัญหาคความเครียดของปลาได้ เนื่องจากวิตามินส่วนใหญ่ที่มีการนำมาใช้เป็นสารกระตุ้นภูมิคุ้มกันปลา ได้แก่ วิตามินซี และวิตามินอี ซึ่งเป็นสารอาหารที่ปลาจำเป็นต้องได้รับ เพื่อใช้ในปฏิกิริยาและเมแทบอลิซึมภายในร่างกายให้เป็นปกติ นอกจากนี้วิตามินทั้งสองชนิดยังเป็นสารที่มีความสำคัญต่อระบบภูมิคุ้มกันและมีคุณสมบัติเป็นสารต้านอนุมูลอิสระ ซึ่งสามารถลดการถูกทำลายของเซลล์ต่าง ๆ ในร่างกายเมื่อปลาเกิดความเครียดได้

2.3.1 บทบาทของสารต้านอนุมูลอิสระ

ปัญหาการเปลี่ยนแปลงอุณหภูมิและค่า pH ของน้ำทำให้ปลาเกิดความเครียดส่งผลให้เกิดอนุมูลอิสระเพิ่มมากขึ้นในร่างกายปลา ซึ่งอนุมูลอิสระเหล่านี้สามารถทำให้เกิดปฏิกิริยาออกซิเดชันทำลายเซลล์ต่าง ๆ ในร่างกายปลารวมถึงเซลล์ที่เกี่ยวข้องกับระบบภูมิคุ้มกันของปลาคด้วย ผู้วิจัยจึงสนใจที่จะแก้ไขปัญหานี้ด้วยการใช้สารต้านอนุมูลอิสระ เนื่องจากคาดหวังว่าสารต้านอนุมูลอิสระจะช่วยลดการถูกทำลายของเซลล์ในระบบภูมิคุ้มกันของปลาได้ จึงได้ทำการศึกษาบทบาทสำคัญของสารต้านอนุมูลอิสระต่อการลดความเสียหายที่เกิดจากอนุมูลอิสระ

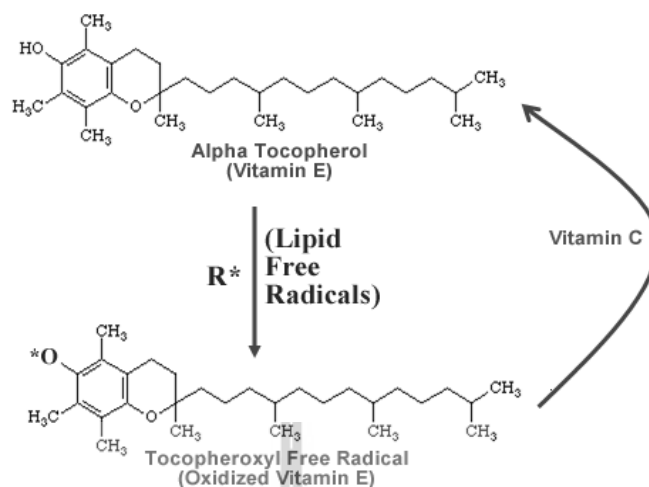
สารต้านอนุมูลอิสระ (Antioxidant) คือ สารประกอบที่สามารถป้องกันหรือชะลอกระบวนการเกิดออกซิเดชัน กระบวนการออกซิเดชันมีได้หลายรูปแบบ เช่น กระบวนการออกซิเดชันที่ทำให้เหล็กกลายเป็นสนิม หรือกระบวนการออกซิเดชันที่เกิดในร่างกาย เช่น การย่อยสลายโปรตีนและไขมันจากอาหารที่กินเข้าไป มลพิษทางอากาศ การหายใจ คาร์บอนหรี รังสียูวี ล้วนทำให้เกิดอนุมูลอิสระขึ้นในร่างกายและสร้างความเสียหายต่อร่างกายได้ ในความเป็นจริงไม่มีสารประกอบสารใดสารหนึ่งสามารถป้องกันการเกิดออกซิเดชันได้ทั้งหมด แต่ละกลไกอาจต้องใช้

สารต้านอนุมูลอิสระที่แตกต่างกันในการหยุดกระบวนการออกซิเดชันในอีกทางหนึ่ง กระบวนการออกซิเดชันเป็นกระบวนการที่สำคัญต่อร่างกาย เช่น การใช้ออกซิเจนจากอากาศที่หายใจเข้าไปเพื่อเผาผลาญอาหารที่ร่างกายได้รับให้เป็นพลังงานสำหรับการทำงานของเซลล์ต่าง ๆ แต่ก็ทำให้เกิดอนุมูลอิสระเป็นผลพลอยได้ อนุมูลอิสระต่าง ๆ ที่เกิดขึ้นจะทำปฏิกิริยากับโมเลกุลที่สำคัญในร่างกาย เช่น ไขมัน โปรตีน ดีเอ็นเอ ทำให้เกิดความเสียหายต่อโมเลกุลดังกล่าว (ศรีวัฒนา ทรงจิตสมบูรณ์, ปาจริย์ อับดุลลาฮาซิม และ สุรัตน์ โคมินทร์, 2548)

อนุมูลอิสระที่เกิดขึ้นในร่างกาย มีชื่อเรียกเป็นภาษาอังกฤษว่า Reactive oxygen species (ROS) อนุมูลอิสระที่สำคัญ ได้แก่ ซูเปอร์ออกไซด์ แอนไอออน (superoxide anion; $O_2^{\cdot -}$) ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ (hydrogen peroxide; H_2O_2) และ ไฮดรอกซิลแรดิคัล (hydroxyl radical; $^{\cdot}OH$)

สารต้านอนุมูลอิสระสามารถป้องกัน หรือกำจัดอนุมูลอิสระได้ เนื่องจากโดยปกติร่างกายจะสามารถกำจัดอนุมูลอิสระที่เกิดขึ้นได้ด้วยเอนไซม์ภายในร่างกาย แต่หากมีการสร้างอนุมูลอิสระที่รวดเร็ว หรือมากเกินไปร่างกายจะกำจัดทัน อนุมูลอิสระที่เกิดขึ้นจะสร้างความเสียหายต่อเซลล์และเนื้อเยื่อได้ (ศรีวัฒนา ทรงจิตสมบูรณ์ และคณะ, 2548) สารต้านอนุมูลอิสระสามารถลดความเสียหายที่เกิดจากอนุมูลอิสระได้ 2 ทาง คือ ลดการสร้างอนุมูลอิสระในร่างกายและลดอันตรายที่เกิดจากอนุมูลอิสระ จักรพงษ์ ไพบุญย์ (2542) กล่าวว่า เอนไซม์ที่ร่างกายสร้างขึ้นเพื่อขจัดสารอนุมูลอิสระมีอยู่จำกัด สารต้านอนุมูลอิสระภายนอกจึงมีบทบาทสำคัญที่จะลดอันตรายอันเกิดจากสารอนุมูลอิสระที่มีมากขึ้นได้ สารต้านอนุมูลอิสระที่สามารถเพิ่มเข้าสู่ร่างกายมีอยู่ในอาหารบางชนิดและเป็นสารที่สามารถสังเคราะห์ขึ้นได้ เช่น วิตามินอี เบต้า-แคโรทีน วิตามินซี และ flavonoids เป็นต้น

สารต้านอนุมูลอิสระที่ผู้วิจัยสนใจนำมาศึกษาได้แก่ วิตามินซี และวิตามินอี เนื่องจากวิตามินทั้งสองชนิดนี้มีประโยชน์ในการส่งเสริมการสร้างภูมิคุ้มกันและลดการถูกทำลายเซลล์ต่างๆ ได้คืออีกด้วย โดยวิตามินซีมีความสำคัญต่อการสร้างเซลล์และเนื้อเยื่อต่าง ๆ ในร่างกายของปลา การที่ปลาได้รับวิตามินซีเพิ่มขึ้น ทำให้ปลามีการผลิตเซลล์และภูมิคุ้มกันที่ใช้ในการทำลายเชื้อโรคเพิ่มขึ้น วิตามินอี เป็นสารต้านอนุมูลอิสระที่ช่วยปกป้องเซลล์ในร่างกายจากอนุมูลอิสระได้ดี เนื่องจากเป็นวิตามินที่ละลายในไขมัน ทำให้เกิดการสะสมอยู่บริเวณผนังเซลล์และเนื้อเยื่อไขมันในร่างกายปลาได้มาก จึงป้องกันการเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชันของผนังเซลล์ในร่างกายและกรดไขมันไม่อิ่มตัวที่พบมากในปลาได้ดี แต่วิตามินอีที่สะสมอยู่ก็สามารถถูกทำลายหมดไปได้หากปลาเกิดความเครียดแต่เนื่องจากวิตามินซีมีคุณสมบัติเป็นสารต้านอนุมูลอิสระที่มีความไวต่อปฏิกิริยาออกซิเดชันมากกว่าวิตามินอี จึงสามารถรักษาปริมาณวิตามินอีในร่างกายปลาได้มากขึ้น รูปที่ 2.7 อธิบายถึงกลไกที่วิตามินอีสามารถกลับสู่โครงสร้างเดิมได้โดยการเกิดปฏิกิริยาของวิตามินซี



รูปที่ 2.7 กลไกการทำปฏิกิริยาของวิตามินอีกับอนุมูลอิสระที่สามารถกลับไปเป็นโครงสร้างวิตามินอีแบบเดิมได้โดยวิตามินซี

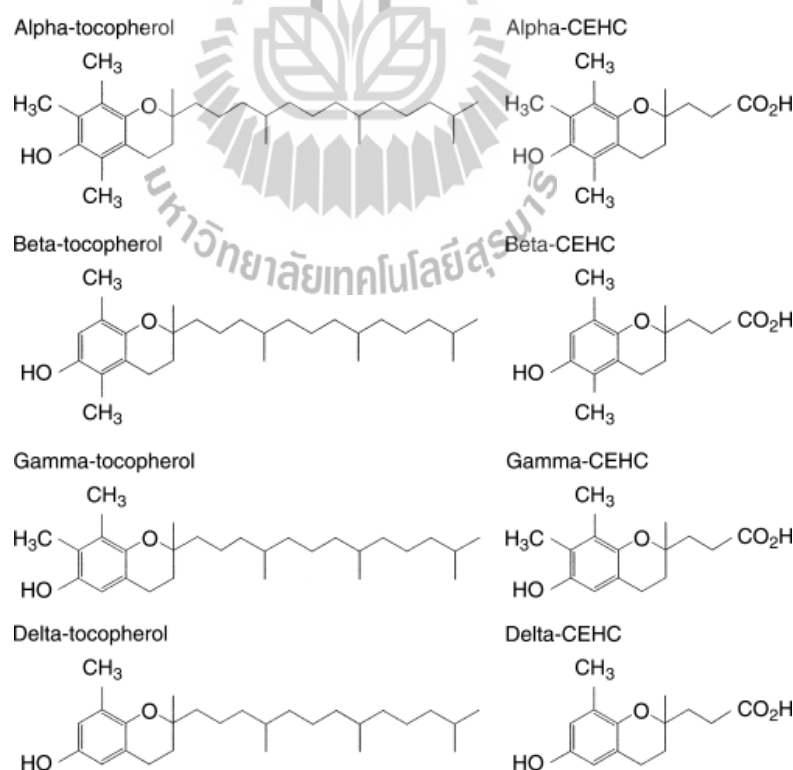
ที่มา: <http://www.topical-formulations.com/topical/200503/antioxidants.htm>

2.3.2 วิตามินซี

วิตามินซีในอาหารมี 2 รูปแบบซึ่งร่างกายสามารถนำไปใช้ได้ทั้ง 2 ชนิด คือ Ascorbic acid และ Dehydroascorbic acid มีโครงสร้างดังรูปที่ 2.8 วิตามินซี เป็นวิตามินที่จำเป็นต่อการทำงานของร่างกายปลา (Wilson and Poe, 1973; Lim and Lovell, 1978) เมื่อปลาได้รับวิตามินซีไม่เพียงพอจะส่งผลให้เกิดอาการกระดูกสันหลังผิดรูป การพัฒนาของคอลลาเจนบกพร่อง เกิดการตกเลือดและการเจริญเติบโตช้า (Halver, Ashley, and Smith, 1969; Gouillou-Coustans, Bergot, and Kaushik, 1998) ปลามีความต้องการวิตามิน 20-50 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัมอาหาร (Sakai, 1999) ซึ่งความต้องการวิตามินซีจะขึ้นอยู่กับชนิด ขนาด ปริมาณอาหาร และสุขภาพของปลา มีการรายงานผลการใช้ที่บ่งบอกถึงการใช้วิตามินซีเพื่อเพิ่มประสิทธิภาพการทำงานของภูมิคุ้มกันจะอยู่ระหว่าง 200-500 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัมอาหาร วิตามินซีเป็นสารต้านอนุมูลอิสระ (antioxidant) จึงมีบทบาทสำคัญในป้องกันเซลล์ในร่างกายถูกทำลายจากปฏิกิริยาออกซิเดชัน รวมถึงสารที่ phagocyte ผลิตออกมาขณะทำการ phagocytosis ด้วย วิตามินซี จึงมีความสามารถในการป้องกันการทำลายสภาพธรรมชาติ (denature) ของเซลล์ที่เกิดจากอนุมูลอิสระ วิตามินซีเป็นสารอาหารที่มีความเกี่ยวข้องกับภูมิคุ้มกันของปลา (Roberts, Davies, and Pulsford, 1995; Anbarasu and Chandran, 2001) นอกจากนี้วิตามินซียังมีประโยชน์ในด้านของการช่วยดูดซึมธาตุเหล็กซึ่งเป็นองค์ประกอบสำคัญของระบบเลือด และการสร้างเซลล์อื่น ๆ ในร่างกายปลาอีกด้วย (รูปที่ 2.8) การศึกษาผลของการใช้

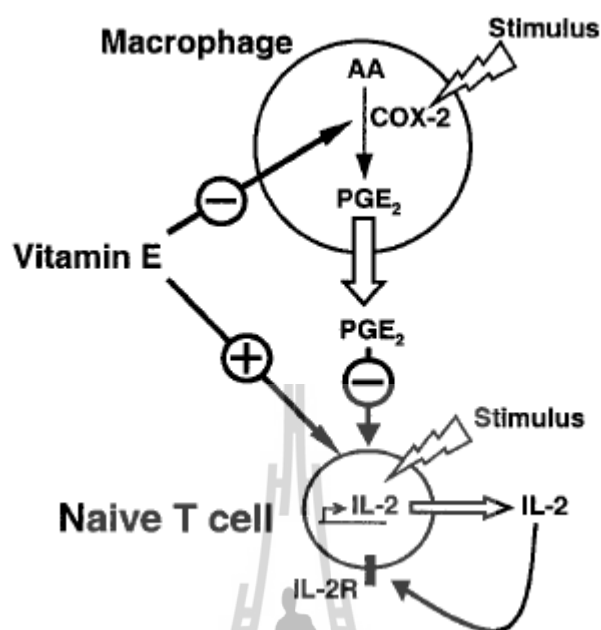
2.3.3 วิตามินอี

วิตามินอีเป็นสารต้านอนุมูลอิสระที่สำคัญในร่างกาย ร่างกายไม่สามารถสร้างขึ้นเองได้ มีชื่อทางเคมีว่า Tocopherol เป็นแอลกอฮอล์ไม่อิ่มตัว มีอยู่ในธรรมชาติ 7 ชนิด ได้แก่ alpha, beta, delta, epsilon, gamma และ zeta (รูปที่ 2.10) โดย Alpha - tocopherol เป็นตัวที่สำคัญที่สุดเนื่องจากมีความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระได้ดี มีการศึกษามากมายที่บ่งบอกถึงบทบาทสำคัญของวิตามินอีต่อระบบภูมิคุ้มกัน คือ สามารถลดกลไกยับยั้งการทำงานของ T-cell ดังรูปที่ 2.11 เพิ่มจำนวนของกระบวนการจับกินสิ่งแปลกปลอม เพิ่มจำนวนเซลล์เม็ดเลือดขาว และแอนติบอดี โดยจะเป็นตัวป้องกันการถูกทำลายของผนังเซลล์เม็ดเลือดและเซลล์กลืนกินทำให้การเคลื่อนที่ของเซลล์กลืนกินไปยังเชื้อโรคเป็นไปอย่างรวดเร็ว (Mulero, Esteban, and Meseguer, 1998) วิตามินอี เป็นสารต้านอนุมูลอิสระที่ละลายในไขมัน จึงช่วยปกป้องเซลล์ในร่างกายจากอนุมูลอิสระได้ดี โดยไปขัดขวางปฏิกิริยาออกซิเดชันของผนังเซลล์ในร่างกายและปกป้องกรดไขมันไม่อิ่มตัวจากปฏิกิริยาออกซิเดชัน เซลล์ภายในร่างกายของปลาประกอบด้วยกรดไขมันไม่อิ่มตัวสูง การได้รับวิตามินอีจึงเป็นสิ่งสำคัญสำหรับปลา รูปที่ 2.12 แสดงกลไกการต้านอนุมูลอิสระของวิตามินซีและวิตามินอีร่วมกับสารต้านอนุมูลอิสระอื่น ๆ ที่ร่างกายสร้างขึ้น



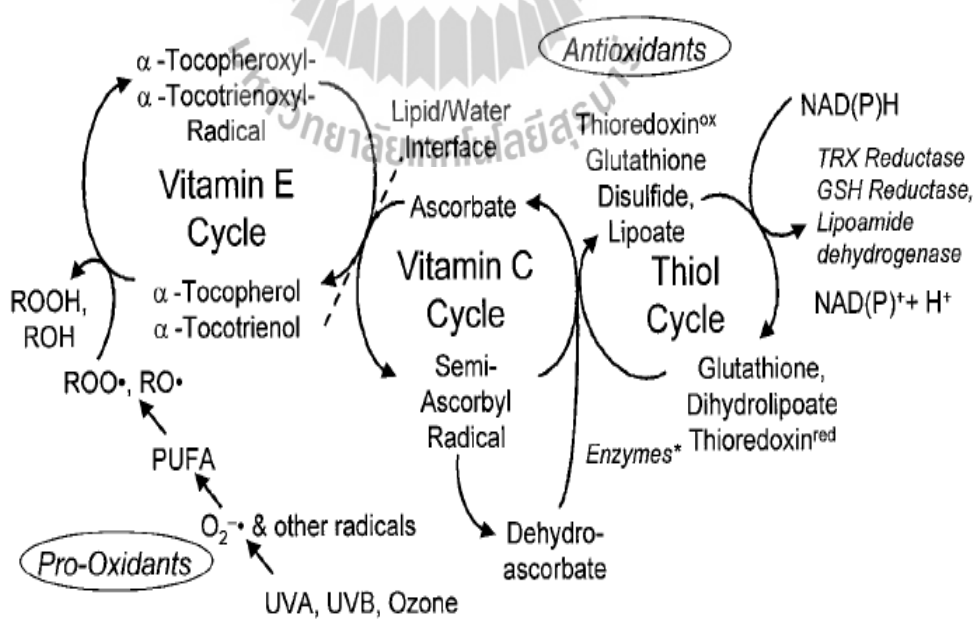
รูปที่ 2.10 โครงสร้างของวิตามินอี

ที่มา: http://www.nature.com/ki/journal/v64/n3/fig_tab/4493975f1.html



รูปที่ 2.11 กลไกความสำคัญของวิตามินอีต่อระบบภูมิคุ้มกัน

ที่มา : <http://www.jimmunol.org/content/167/7/3809.full.pdf>



รูปที่ 2.12 กลไกการต้านอนุมูลอิสระของวิตามินซีและวิตามินอี

ที่มา : <http://jn.nutrition.org/content/131/2/369S.long>

2.3.4 ผลการศึกษาการใช้วิตามินซีและวิตามินอีต่อค่าภูมิคุ้มกันของปลา

การใช้วิตามินซีและวิตามินอีเพื่อเพิ่มภูมิคุ้มกันของปลาในสภาวะน้ำอุณหภูมิและค่า pH ต่ำนั้นยังไม่พบว่ามีการศึกษาทดลอง อย่างไรก็ตามผลการใช้วิตามินซี และวิตามินอี เพื่อเพิ่มภูมิคุ้มกันในปลาที่ได้รับความเครียดจากปัจจัยอื่น ๆ นั้นพบว่ามีทดลองในปลาหลายชนิด จึงได้ทำการรวบรวมผลการใช้วิตามินทั้งสองชนิดในการทดลองที่เกี่ยวข้องกับค่าโลหิตวิทยาและภูมิคุ้มกันของปลาที่ได้รับความเครียดจากปัจจัยอื่น ๆ เพื่อหาปริมาณการใช้วิตามินซีและวิตามินอีในการเพิ่มค่าโลหิตวิทยาและภูมิคุ้มกันของปลาตุลุกผสมในการทดลองครั้งนี้

การทดลองของ Chen *et al.* (2004) ได้ทำการศึกษาผลของการใช้วิตามินซีและวิตามินอีต่อค่าโลหิตวิทยาและค่าภูมิคุ้มกันของปลา golden shiner (*Notemigonus crysoleucas*) ที่ได้รับความเครียดจากความร้อน พบว่าการเสริมวิตามินซี 98 และวิตามินอี 38 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัมอาหาร มีผลทำให้โลหิตวิทยาและค่าภูมิคุ้มกันของปลา golden shiner เพิ่มขึ้น

การทดลองของ Ortuño, Cuesta, Esteban, and Meseguer (2001) ได้ทำการศึกษาค่าภูมิคุ้มกันของปลา gilthead seabream (*Sparus aurata*) ที่ได้รับวิตามินซีและวิตามินอีอย่างใดอย่างหนึ่ง เพียงอย่างเดียวและเสริมวิตามินซีร่วมกับวิตามินอี โดยใช้ปริมาณวิตามินซี 3,000 และวิตามินอี 1,200 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัมอาหาร ที่ระยะเวลา 15, 30 และ 45 วัน พบว่าที่ระยะเวลา 15 วัน ค่าภูมิคุ้มกันของปลาทุกกลุ่มไม่แตกต่างกัน แต่ที่เวลา 30 และ 45 วันพบว่าภูมิคุ้มกันของปลาที่ได้รับการเสริมวิตามินซีและอีร่วมกัน มีค่ามากกว่าปลาที่ได้รับการเสริมวิตามินซี หรือวิตามินอีอย่างเดียวอย่างหนึ่งเพียงอย่างเดียว แสดงให้เห็นว่าระยะเวลาในการเสริมวิตามินมีผลต่อค่าภูมิคุ้มกันของปลา และการเสริมวิตามินซีและวิตามินอีร่วมกันทำให้ค่าภูมิคุ้มกันของปลาสูงกว่าการเสริมวิตามินซีหรืออีเพียงอย่างเดียว

การทดลองของ Garcia, Pilarski, Onaka, Moraes, and Martins (2007) เป็นการศึกษาค่าโลหิตวิทยาของปลา *Piaractus mesopotamicus* ที่ถูกฉีดด้วยเชื้อ *A. hydrophila* เข้าสู่ร่างกาย พบว่าวิตามินซี ช่วยเพิ่มจำนวน thrombocyte ของปลาได้และมีการสรุปปริมาณการเสริมวิตามินซีและอี ที่เหมาะสมต่อปลา *P. mesopotamicus* ว่าควรใช้ 500 และ 250 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัมอาหาร

การทดลองของ Montero, Marrero, Izquierdo, Robaina, Vergara, and Tort (1999) ได้ทำการศึกษาค่าภูมิคุ้มกันของปลา gilthead seabream (*S. aurata*) พบว่าเมื่อปลาได้รับความเครียดจากความหนาแน่นสูง ปลาจะมีค่าการทำงานของ Alternative complement pathway ลดลง แต่พบว่าปลาที่ได้รับการเสริมวิตามินอี 250 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัมอาหาร มีค่าการทำงานของ Alternative complement pathway ไม่แตกต่างจากปลาที่ไม่ได้รับความเครียดจากความหนาแน่นสูง

จากการรวบรวมผลการศึกษาการเสริมวิตามินซีและวิตามินอีต่อค่าโลหิตวิทยาและภูมิคุ้มกันของปลา พบว่าการเสริมวิตามินทั้งสองชนิดมีผลต่อการเพิ่มค่าโลหิตวิทยาและภูมิคุ้มกัน

บางค่าของปลา อย่างไรก็ตามปริมาณการเสริมที่จะนำมาใช้ในการทดลองครั้งนี้ยังคงไม่สามารถระบุได้ชัดเจน เนื่องจากยังไม่มีการศึกษาทดลองในปลาคุณลักษณะ แต่ก่อนการทดลองครั้งนี้ ผู้ทดลองได้ทำการทดลองเสริมวิตามินซีเพียงอย่างเดียวที่ระดับ 250, 500, 1000, 1500 และ 2000 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัมอาหาร พบว่าการเสริมวิตามินซีที่ระดับ 1000 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัมอาหาร มีผลทำให้ค่าโลหิตวิทยาของปลาเพิ่มสูงขึ้นและทำการทดลองเสริมวิตามินอีที่ระดับ 0, 125, 250 และ 500 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัมอาหาร พบว่าการเสริมวิตามินอีที่ระดับ 125 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัมอาหาร มีผลทำให้ค่าโลหิตวิทยาของปลาเพิ่มสูงขึ้น ดังนั้นในการทดลองครั้งนี้จึงกำหนดปริมาณการเสริมวิตามินซีที่ระดับ 0, 500 และ 1000 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัมอาหารและวิตามินอีที่ระดับ 0, 62.5 และ 125 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัมอาหาร

2.4 การสังเคราะห์งานวิจัย

จากการรวบรวมเอกสารงานวิจัยและทำการศึกษาทฤษฎีที่เกี่ยวข้องกับปัญหาเพื่อหาแนวทางการแก้ไขปัญหาสามารถสรุปได้ว่า ปัญหาการเกิดโรคและการตายอันเนื่องมาจากการเปลี่ยนแปลงอุณหภูมิของน้ำและสถานะน้ำเป็นกรดภายหลังฝนตก เกิดจากการที่ปลาเกิดความเครียดส่งผลให้ระบบภูมิคุ้มกันของร่างกายลดต่ำลง นอกจากนี้ยังส่งผลให้ระบบการทำงานต่าง ๆ ภายในร่างกายผิดปกติ เป็นเหตุให้ปลาเกิดโรคได้ง่าย หรืออาจตายหากไม่สามารถปรับตัวให้เข้ากับสถานะความเปลี่ยนแปลงของน้ำได้

สิ่งที่ผู้วิจัยสนใจนำมาศึกษาทดลองเพื่อหาแนวทางแก้ไขปัญหานี้ ได้แก่ การใช้สารต้านอนุมูลอิสระ เนื่องจากเมื่อปลาเกิดความเครียดระบบภูมิคุ้มกันจะถูกทำลายจากปฏิกิริยาออกซิเดชันของอนุมูลอิสระ สารต้านอนุมูลอิสระที่ใช้ในงานวิจัยครั้งนี้ คือ วิตามินซี และวิตามินอี เนื่องจากเป็นวิตามินที่ร่างกายปลาจำเป็นต้องได้รับจากอาหาร อีกทั้งยังเป็นวิตามินที่มีความสำคัญต่อการสร้างระบบภูมิคุ้มกันและมีคุณสมบัติเป็นสารต้านอนุมูลอิสระอีกด้วย เหตุที่ใช้วิตามินทั้งสองชนิดร่วมกันเนื่องจากคาดหวังว่าด้วยคุณสมบัติที่ไวต่อการเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชันของวิตามินซีจะช่วยรักษาระดับการสะสมวิตามินอีในร่างกายปลาให้เพิ่มขึ้นและช่วยลดการถูกทำลายของภูมิคุ้มกันเมื่อปลาเกิดความเครียดได้มากขึ้นเนื่องจากวิตามินอีเป็นวิตามินที่ละลายในไขมันซึ่งเป็นส่วนประกอบของเยื่อหุ้มเซลล์ต่างๆในร่างกายปลา

จากข้อมูลที่ทำการศึกษา ผู้วิจัยจึงได้กำหนดตัวชี้วัดผลการทำงานของวิตามินซีและวิตามินอีเพื่อแก้ไขปัญหการเกิดโรคและการตายของปลาจากความเครียดอันเนื่องมาจากสถานะน้ำและ pH ค่า ดังนี้

2.4.1 การเจริญเติบโตและปริมาณการสะสมวิตามิน

การเจริญเติบโตจะแสดงถึงประโยชน์ในด้านเสริมที่นอกเหนือผลในด้านภูมิคุ้มกันของการเสริมวิตามินซีและวิตามินอี การวิเคราะห์ปริมาณการสะสมวิตามินได้เลือกทำการวิเคราะห์การสะสมในพลาสมา ดับ และไต เหตุที่เลือกวิเคราะห์วิตามินซีและวิตามินอีในพลาสมาเนื่องจากต้องการทราบว่าวิตามินไหลเวียนภายในเลือดปลาสมาน้อยเพียงใด การวิเคราะห์วิตามินทั้งสองชนิดในระดับเนื่องจากดับเป็นแหล่งสะสมสารอาหารในร่างกายปลาและเหตุที่วิเคราะห์ในไตเนื่องจากไตมีความสำคัญต่อการสร้างเซลล์ในระบบภูมิคุ้มกัน โดยคาดหวังว่าการเสริมวิตามินซีเพิ่มขึ้นจะส่งผลให้ปลามีการสะสมวิตามินอีในร่างกายเพิ่มขึ้น

2.4.2 วิเคราะห์ค่าโลหิตวิทยา

ค่าโลหิตวิทยาที่ทำการวิเคราะห์ ได้แก่ จำนวนเม็ดเลือดแดง ปริมาณฮีโมโกลบิน (Hemoglobin) และปริมาตรเม็ดเลือดแดงอัดแน่น (packed cell volume) หรือ ฮีมาโตคริต (Hematocrit) เนื่องจากค่าโลหิตวิทยาเป็นค่าที่ใช้บ่งบอกความผิดปกติของร่างกายปลา โดยคาดว่าเมื่อปลาได้รับความเครียดจะมีค่าโลหิตวิทยาเปลี่ยนแปลงจากสภาวะปกติและเมื่อทำการเสริมวิตามินซีและวิตามินอีแล้วจะสามารถช่วยให้ปลามีค่าโลหิตวิทยาไม่แตกต่างจากปลาปกติเมื่อปลาเกิดความเครียด

2.4.3 วิเคราะห์ค่าเคมีในเลือดชี้วัดความเครียด

ค่าเคมีในเลือดชี้วัดความเครียด ได้แก่ กลูโคสในพลาสมา คลอไรด์ในซีรัม และโปรตีนรวมในพลาสมา เนื่องจากค่าเหล่านี้จะบ่งบอกถึงสภาวะความเครียดของปลา โดยคาดว่าเมื่อปลาได้รับความเครียดจะมีค่าชี้วัดความเครียดเปลี่ยนแปลงจากสภาวะปกติและเมื่อทำการเสริมวิตามินซีและวิตามินอีแล้วจะสามารถช่วยให้ปลามีค่าชี้วัดความเครียดไม่แตกต่างจากปลาปกติเมื่อปลาเกิดความเครียด ซึ่งจะแสดงให้เห็นว่าวิตามินทั้งสองชนิดสามารถช่วยป้องกันความเครียดของปลาได้หรือไม่

2.4.4 วิเคราะห์ภูมิคุ้มกันแบบไม่จำเพาะ

ภูมิคุ้มกันแบบไม่จำเพาะที่ทำการวิเคราะห์ ได้แก่ การทำงานของไลโซไซม์ (Lysozyme activity) อิมมูโนโกลบูลินรวม (Total immunoglobulin) ประสิทธิภาพการทำงานของคอมพลีเมนต์ (Alternative complement) การตรวจนับจำนวนเม็ดเลือดขาวทั้งหมด (Total white Blood Cell Count, WBC) และการนับแยกชนิดเม็ดเลือดขาว (White Blood Cell Differential) เพื่อให้ทราบว่าเมื่อปลาได้รับความเครียดปลาจะมีภูมิคุ้มกันแบบไม่จำเพาะลดลง คาดหวังว่าการเสริมวิตามินซีและวิตามินอีจะช่วยให้ปลาที่ได้รับมีความเครียดมีภูมิคุ้มกันที่ไม่แตกต่างจากปลาปกติ

2.4.5 วิเคราะห์ภูมิคุ้มกันแบบไม่จำเพาะของปลาที่ได้รับเชื้อแบคทีเรีย *Aeromonas hydrophila* และได้รับความเครียดอันเนื่องมาจากสภาวะน้ำอุณหภูมิและ pH ต่ำ

คาดหวังว่าหากทำการเสริมวิตามินซีและวิตามินอีแล้วจะช่วยให้ปลามีภูมิคุ้มกันเพิ่มขึ้นเมื่อปลาได้รับเชื้อร่วมกับได้รับความเครียดจากสภาวะน้ำที่มีอุณหภูมิและ pH ต่ำ

เมื่อเสร็จสิ้นงานวิจัยนี้ผู้วิจัยคาดหวังว่า จะทำให้ทราบว่าการเสริมวิตามินซีและวิตามินอีสามารถแก้ไขปัญหการเกิดโรคและการตายของปลาอันเนื่องมาจากสภาวะน้ำและ pH ต่ำได้หรือไม่และควรใช้ระดับใดจึงจะช่วยให้เกิดประโยชน์สูงสุด นอกจากนี้ผลการวิจัยครั้งนี้จะทำให้ทราบว่าเมื่อปลาได้รับความเครียดเนื่องจากสภาวะน้ำอุณหภูมิและ pH ต่ำจะเกิดผลกระทบอย่างไรต่อปลา เพื่อเป็นข้อมูลสำหรับผู้ที่เกี่ยวข้องไปเนื่องจากการศึกษาผลของอุณหภูมิและ pH ต่ำนั้นยังมีการศึกษาที่ไม่มากนัก แต่จะเป็นปัญหาที่มากขึ้นในอนาคต เนื่องจากสิ่งแวดล้อมและภูมิอากาศของโลกมีการเปลี่ยนแปลงมากขึ้น



บทที่ 3

วิธีดำเนินการวิจัย

3.1 สถานที่ทำการทดลอง

ฟาร์มมหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี (งานสัตว์น้ำ) อาคารเครื่องมือ 1, 3 และ 9 ศูนย์เครื่องมือวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

3.2 อุปกรณ์และสารเคมี

- 3.2.1 เครื่องชั่งขนาด 1, 7 และ 60 กิโลกรัม
- 3.2.2 เครื่องชั่งทศนิยม 2 และ 4 ตำแหน่ง
- 3.2.3 เครื่องบดอาหารสัตว์
- 3.2.4 เครื่องผสมอาหารสัตว์
- 3.2.5 เครื่องอัดเม็ดอาหารสัตว์
- 3.2.6 เครื่องอบอาหารสัตว์
- 3.2.7 ตู้ปลาขนาด 30 x 60 x 40 เซนติเมตร พร้อมชั้นวางตู้
- 3.2.8 หัวทรายและสายยางให้อากาศในตู้ปลา
- 3.2.9 เครื่องให้อากาศในตู้ปลา
- 3.2.10 เครื่องทำความเย็นสำหรับน้ำในตู้ปลา
- 3.2.11 สวิตช์ปลา
- 3.2.12 ถังน้ำ
- 3.2.13 ถุงชิบ
- 3.2.14 ถาดผ่าตัด
- 3.2.15 กระบอกฉีดขนาด 3 มิลลิลิตร
- 3.2.16 เข็มฉีดยาขนาด G21 ยาว 1 นิ้ว
- 3.2.17 กรรไกร
- 3.2.18 มีดผ่าตัด
- 3.2.19 ช้อนตักสาร
- 3.2.20 หลอดทดลองขนาด 1.5, 15 และ 50 มิลลิลิตร
- 3.2.21 ขวดวัดปริมาตรขนาด 10, 25, 100, 250 และ 1000 มิลลิลิตร

- 3.2.22 กระบอทดวง
- 3.2.23 Glass homogenizer
- 3.2.24 เครื่องปั่นเหวี่ยงแบบปรับอุณหภูมิ
- 3.2.25 ตู้ทำความเย็นอุณหภูมิ 4, -20 และ -80 องศาเซลเซียส
- 3.2.26 เครื่องแยกวิเคราะห์สารประสิทธิภาพสูงโดยตัวพาสารละลาย (High Performance Liquid Chromatography, HPLC)
- 3.2.27 หลอดทดลองสำหรับเก็บสารละลายเพื่อนำเข้าเครื่อง HPLC พร้อมฝาปิด
- 3.2.28 เครื่องวัด pH
- 3.2.29 Magnetic stirrer
- 3.2.30 Ultrasonic
- 3.2.31 Centrifuge
- 3.2.32 Disposable filter unit ขนาด 13 PVD, 0.45 μm
- 3.2.33 Tris-ascorbic acid- 2- phosphate
- 3.2.34 Acetonitrile (HPLC grade)
- 3.2.35 Ethanol (HPLC grade)
- 3.2.36 1, 5-Dimethylhexylamine
- 3.2.37 O - Phosphoric acid
- 3.2.38 Potassium dihydrogen phosphate
- 3.2.39 ตู้ดูดควัน
- 3.2.40 แก๊สไนโตรเจนบริสุทธิ์
- 3.2.41 หลอดทดลองแบบแก้ว
- 3.2.42 Ascorbic acid
- 3.2.43 Potassium hydroxide
- 3.2.44 Distilled water
- 3.2.45 Hexane
- 3.2.46 Absolute methanol (HPLC grade)
- 3.2.47 Alpha-tocopherol (HPLC grade)
- 3.2.48 Thoma diluting red cell pipette
- 3.2.49 Thoma dilute white cell pipette
- 3.2.50 Improved Neubauer chamber หรือ hemocytometer chamber และ cover glass
- 3.2.51 สายยางพร้อมกระบอกฉีดขนาด 1 ml

- 3.2.52 กลองจุลทรรศน์
- 3.2.53 สไลด์แก้ว
- 3.2.54 Microhematocrit Capillary Tubes
- 3.2.55 เครื่องปั่นหาเปอร์เซ็นต์เม็ดเลือดแดงอัดแน่น (Hematocrit Centrifuge)
- 3.2.56 ชุดสารเคมีวิเคราะห์ฮีโมโกลบิน
- 3.2.57 Citric acid
- 3.2.58 Na_2HPO_4
- 3.2.59 NaCl
- 3.2.60 น้ำ DI
- 3.2.61 เชื้อ *Micrococcus lysodeikiticus*
- 3.2.62 Lysozyme chicken egg white
- 3.2.63 Plate 96 well
- 3.2.64 Multi pipette 8 ช่อง สำหรับ plate 96 well, ปริมาตร 200 μl + Tip
- 3.2.65 Total Protein kit, Micro Lowry
- 3.2.66 Protein standard (Bovine serum albumin)
- 3.2.67 Polyethylene Glycol
- 3.2.68 Gelatin veronal buffer (GVB)
- 3.2.69 Formaldehyde
- 3.2.70 Trisodium citrate
- 3.2.71 Brilliant cresyl blue
- 3.2.72 Potassium phosphate buffer
- 3.2.73 Giemsa's stain powder
- 3.2.74 Wright's stain powder
- 3.2.75 Glycerol
- 3.2.76 Absolute methanol
- 3.2.77 Liquid glucose Kit
- 3.2.78 Chloride Set
- 3.2.79 เชื้อ *Aeromonas hydrophila*
- 3.2.80 0.85 % NaCl
- 3.2.81 Hydrochloric acid
- 3.2.82 Sodium sulfate

3.3 วิธีการทดลอง

3.3.1 การวางแผนการทดลอง

ทำการเลี้ยงปลาคุกกุผสมด้วยอาหารเสริมวิตามินซีและวิตามินอีระดับต่าง ๆ ทั้งหมด 9 สูตร ในแต่ละสูตรมีทั้งหมด 5 ซ้ำ โดยมีระดับการเสริมวิตามินดังตารางที่ 3.1 เลี้ยงปลาเป็นเวลาทั้งหมด 10 สัปดาห์ ที่ระยะเวลา 3 และ 6 สัปดาห์ ทำการเจาะเลือดปลาเก็บตัวอย่างตับและไต จากปลาจำนวน 5 ตัวในแต่ละซ้ำ ของทุกกลุ่มการทดลองนำไปวิเคราะห์ปริมาณวิตามินซีและวิตามินอี ที่ระยะเวลา 4 และ 8 สัปดาห์ ทำการเจาะเลือดปลาในสภาวะปกติและปลาที่ถูกทำให้เครียดด้วยน้ำที่มีอุณหภูมิและ pH ต่ำเป็นเวลา 24 ชั่วโมง นำไปวิเคราะห์ค่าโลหิตวิทยา ค่าชี้วัดความเครียด และค่าภูมิคุ้มกันแบบไม่จำเพาะ ที่ระยะเวลา 10 สัปดาห์ทำการเจาะเลือดปลาในสภาวะปกติและปลาที่ถูกฉีดเชื้อ *A. hydrophila* เป็นเวลา 3 วัน และทำให้เครียดด้วยน้ำที่มีอุณหภูมิและ pH ต่ำเป็นเวลา 24 ชั่วโมง นำไปวิเคราะห์ค่าภูมิคุ้มกันแบบไม่จำเพาะ

ตารางที่ 3.1 การจัดกลุ่มการทดลองการเสริมวิตามินซีและวิตามินอีในอาหารปลา

กลุ่มการทดลอง	วิตามินซี (mg/kg feed)	วิตามินอี (mg/kg feed)	จำนวนปลา (ตัว)
1	0	0	15 x 5
2	0	62.5	15 x 5
3	0	125	15 x 5
4	500	0	15 x 5
5	500	62.5	15 x 5
6	500	125	15 x 5
7	1000	0	15 x 5
8	1000	62.5	15 x 5
9	1000	125	15 x 5

3.3.2 การเตรียมอาหาร

อาหารที่ใช้ในการทดลองนี้คำนวณให้มีปริมาณโปรตีนไม่ต่ำกว่า 32 เปอร์เซ็นต์ ตามส่วนผสมในตารางที่ 3.2 และทำการวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมีดังตารางที่ 3.3 จากนั้นนำอาหารที่อัดเม็ดแล้ว มาทำการผสมวิตามินซีโดยชั่งวิตามินซีตามกลุ่มการทดลองต่าง ๆ ละลายนํ้าปริมาณ 5 เปอร์เซ็นต์ของน้ำหนักอาหารชนิดผง และผสมให้ทั่วแล้วผึ่งลมให้แห้ง จากนั้นเคลือบอาหารด้วยวิตามินอีที่ละลายในน้ำมันพืชปริมาณ 5 เปอร์เซ็นต์ของน้ำหนักอาหารชนิดผงบนอาหารและผสมให้ทั่ว ผึ่งลมให้แห้ง เก็บอาหารที่ผสมวิตามินแล้วในภาชนะที่บดแสงที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส โดยปริมาณวิตามินที่ผสมในอาหารดูจากการจัดกลุ่มการทดลองในตารางที่ 3.1 โดยผลการวิเคราะห์วิตามินซีและวิตามินอีในอาหารปลาแสดงในตารางที่ 3.4

ตารางที่ 3.2 ปริมาณวัตถุดิบที่ใช้ในการทำอาหารปลา และองค์ประกอบทางเคมีในอาหาร

วัตถุดิบ	ร้อยละของอาหารทั้งหมด
ปลาป่น	37
กากถั่วเหลือง	25
รำข้าว	12
ปลายข้าว	15
มันสำปะหลัง	10
น้ำมันพืช	1

ตารางที่ 3.3 องค์ประกอบทางเคมีในอาหารปลาที่ใช้ในการทดลอง

Chemical composition	(%)
Moisture	7.83
Crude protein	32.91
Ether extract	6.42
Crude fiber	4.51
Ash	9.10

ตารางที่ 3.4 ปริมาณวิตามินซีและวิตามินอีในอาหารปลาแต่ละกลุ่มการทดลอง

Diet	Expected level (mg/kg)		Detected level (mg/kg)			
			Vitamin C		Vitamin E	
	Vitamin C	Vitamin E	L-ascorbic Acid	2 – phospho ascorbic acid	α -tocopherol	α -tocopherol acetate
1	0	0	3.22	ND	2.62	ND
2	0	62.5	2.59	ND	3.77	56.41
3	0	125	3.41	ND	2.32	119.55
4	500	0	8.21	483.24	2.71	ND
5	500	62.5	9.04	493.72	3.24	56.06
6	500	125	8.17	481.38	2.76	120.89
7	1000	0	15.46	972.97	3.69	ND
8	1000	62.5	13.61	981.86	2.77	58.43
9	1000	125	17.07	962.91	3.19	124.52

หมายเหตุ: ND = Not detected

3.3.3 สัตว์ทดลอง

ปลาอุกอุกผสม (ปลาคูอุก x ปลาคูยักษ์) อายุประมาณ 1.5 เดือน (หลังจากฟักเป็นตัว) ความยาวประมาณ 4 - 5 นิ้ว เลี้ยงปรับสภาพในบ่อปูนเพื่อลดความเครียดจากการขนส่ง เป็นเวลา 3 สัปดาห์ จากนั้นลุ่มปลาลงในตู้ปลาขนาด 30 x 60 x 40 เซนติเมตร จำนวน 45 ตัว ตู้ละ 18 ตัว เลี้ยงปลาด้วยอาหารเสริมวิตามินซีและวิตามินอีระดับต่างๆ เป็นเวลา 10 สัปดาห์ มีกลุ่มการทดลองทั้งหมด 9 กลุ่ม โดยแต่ละกลุ่มการทดลองมี 5 ซ้ำ ทำการศึกษาอิทธิพลของการเสริมวิตามินซี 3 ระดับ ร่วมกับการเสริมวิตามินอี 3 ระดับ ให้อาหารปลาวัดละ 2 ครั้ง โดยมีการชั่งน้ำหนักอาหารปลาที่ใช้ไปในทุกสัปดาห์ของแต่ละตู้ เปลี่ยนถ่ายน้ำสัปดาห์ละ 3 ครั้ง เมื่อถึงระยะเวลา 3 และ 6 สัปดาห์ ทำการนับจำนวนและชั่งน้ำหนักปลาเพื่อเก็บข้อมูลการเจริญเติบโต จากนั้นเก็บตัวอย่างเลือด ตับ และไต เพื่อนำไปศึกษาการสะสมวิตามินซีและวิตามินอีในพลาสมา ตับ และไต เมื่อถึงสัปดาห์ที่ 4 และ 8 ทำการเก็บตัวอย่างเลือดปลาปกติและปลาที่ถูกทำให้เครียดด้วยน้ำที่มีอุณหภูมิและ pH ต่ำเป็นเวลา 24 ชั่วโมงเพื่อศึกษาค่าโลหิตวิทยา ค่าเคมีในเลือดชี้วัดความเครียดและภูมิคุ้มกันแบบไม่จำเพาะ เปรียบเทียบระหว่างปลาปกติและปลาที่ได้รับความเครียด เมื่อถึงสัปดาห์ที่ 10 เก็บตัวอย่างเลือดปลาในสภาวะปกติและปลาที่ถูกฉีดเชื้อ *A. hydrophila* เข้าที่บริเวณช่องท้องเป็นเวลา 3 วัน

แล้วถูกทำให้เครียดด้วยน้ำที่มีอุณหภูมิและ pH ต่ำเป็นเวลา 24 ชั่วโมงเพื่อเปรียบเทียบค่าภูมิคุ้มกันแบบไม่จำเพาะ

3.3.4 การวิเคราะห์คุณภาพน้ำ

ทำการวัดอุณหภูมิอากาศ และอุณหภูมิน้ำทุกวัน ตรวจวัดค่าการละลายออกซิเจนในน้ำ และ pH ของน้ำสัปดาห์ละ 1 ครั้ง จากการบันทึกผลสามารถแสดงค่าเฉลี่ยของค่าที่ทำการตรวจวัดดังตารางที่ 3.5

ตารางที่ 3.5 คุณภาพน้ำระหว่างการทดลอง

ข้อมูล	ค่าที่วัดได้	หน่วย
อุณหภูมิอากาศ	31.88 ± 1.88	$^{\circ}\text{C}$
อุณหภูมิน้ำ	29.91 ± 1.37	$^{\circ}\text{C}$
ค่าการละลายออกซิเจนในน้ำ	6.76 ± 0.40	mg/L
ค่า pH	8.14 ± 0.46	-

3.3.5 การเก็บข้อมูลวัดอัตราการเจริญเติบโต และอัตราการรอด

ก่อนการทดลองจะทำการชั่งน้ำหนักปลาเพื่อสุ่มลงตู้ เพื่อเก็บข้อมูลน้ำหนักปลาเริ่มต้น ตลอดระยะเวลาการเลี้ยง 6 สัปดาห์ ทำการชั่งอาหารปลาที่ใช้ไปในทุกสัปดาห์ เพื่อเก็บข้อมูลน้ำหนักอาหารที่ใช้ไป และบันทึกการตายของปลาเพื่อเก็บข้อมูลอัตราการรอด โดยค่าที่ใช้วัดอัตราการเจริญเติบโตในการทดลองนี้ได้แก่

$$\text{Relative weight gain, RWG (\%)} = \frac{(\text{น้ำหนักสุดท้าย} - \text{น้ำหนักเริ่มต้น}) \times 100}{\text{น้ำหนักเริ่มต้น}}$$

$$\text{Specific growth rate, SGR (\%/day)} = \frac{[(\text{Ln น้ำหนักสุดท้าย} - \text{Ln น้ำหนักเริ่มต้น})] \times 100}{\text{ระยะเวลาการเลี้ยง}}$$

$$\text{Feed conversion ratio, FCR} = \frac{\text{น้ำหนักอาหารที่ใช้ไป}}{\text{น้ำหนักปลาที่เพิ่มขึ้น}}$$

3.3.6 การเก็บตัวอย่าง

ที่ระยะเวลา 3 และ 6 สัปดาห์ทำการเก็บตัวอย่างเลือดปลาโดยดูดเลือดจาก เส้นเลือด caudal vein ด้วยเข็มขนาด 21G ความยาว 1 นิ้ว ใช้กระบอกฉีดยาขนาด 3 มิลลิลิตร ใส่เลือดลงในหลอดที่มีสารป้องกันการแข็งตัวของเลือด Ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA) วางบนน้ำแข็ง ก่อนนำไปปั่นเหวี่ยงเพื่อเก็บพลาสมาที่ความเร็ว 5000 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที ทำการเก็บพลาสมาไว้ที่อุณหภูมิ -80 องศาเซลเซียสจนกว่าจะนำไปวิเคราะห์ปริมาณวิตามินซีและวิตามินอีในพลาสมา เก็บตัวอย่างตับ และไตโดยการผ่าช่องท้องตัดตับ และไตมาวางบนน้ำแข็งแห้งทันที จากนั้นเก็บใส่หลอด 1.5 มิลลิลิตร ทำการเก็บตับ และไตไว้ที่อุณหภูมิ -80 องศาเซลเซียสจนกว่าจะนำไปวิเคราะห์ปริมาณวิตามินซีและวิตามินอี

ที่ระยะเวลา 4 และ 8 สัปดาห์ทำการเจาะเลือดปลาจากเส้นเลือด caudal vein เก็บเลือดในหลอดทดลองขนาด 1.5 มิลลิลิตร จำนวน 3 หลอด หลอดละ 0.3 มิลลิลิตร โดยหลอดที่ 1 และ 2 มีสารป้องกันการแข็งตัวของเลือด Ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA) หลอดที่ 1 นำไปวิเคราะห์ค่าโลหิตวิทยา หลอดที่ 2 นำไปปั่นเหวี่ยงเพื่อเก็บพลาสมาที่ความเร็ว 5000 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที ทำการเก็บพลาสมาไว้ที่อุณหภูมิ -80 องศาเซลเซียสจนกว่าจะนำไปวิเคราะห์ค่าภูมิคุ้มกันและค่าเคมีในเลือดชี้วัดความเครียด ส่วนหลอดที่ 3 เป็นหลอดที่ไม่มีสารป้องกันการแข็งตัวของเลือด ทำการเก็บซีรัมโดยปล่อยให้เลือดแข็งตัวที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 4 ชั่วโมง จากนั้นนำไปปั่นเหวี่ยง ความเร็ว 5000 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที เก็บซีรัมไว้ที่อุณหภูมิ -80 องศาเซลเซียสจนกว่าจะนำไปวิเคราะห์ค่าภูมิคุ้มกันและค่าเคมีในเลือดชี้วัดความเครียด

ที่ระยะเวลา 10 สัปดาห์ทำการเจาะเลือดปลาจากเส้นเลือด caudal vein เก็บเลือดในหลอดทดลองขนาด 1.5 มิลลิลิตร จำนวน 2 หลอด หลอดละ 0.5 มิลลิลิตร โดยหลอดที่ 1 มีสารป้องกันการแข็งตัวของเลือด Ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA) นำไปปั่นเหวี่ยงเพื่อเก็บพลาสมาที่ความเร็ว 5000 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที ทำการเก็บพลาสมาไว้ที่อุณหภูมิ -80 องศาเซลเซียสจนกว่าจะนำไปวิเคราะห์ค่าภูมิคุ้มกันแบบไม่จำเพาะ ส่วนหลอดที่ 2 เป็นหลอดที่ไม่มีสารป้องกันการแข็งตัวของเลือด ทำการเก็บซีรัมโดยปล่อยให้เลือดแข็งตัวที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 4 ชั่วโมง จากนั้นนำไปปั่นเหวี่ยง ความเร็ว 5000 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที เก็บซีรัมไว้ที่อุณหภูมิ -80 องศาเซลเซียสจนกว่าจะนำไปวิเคราะห์ค่าภูมิคุ้มกันแบบไม่จำเพาะ

3.3.7 การทำให้ปลาเกิดความเครียดด้วยน้ำที่มีอุณหภูมิและ pH ต่ำ

นำปลาไปอยู่ในน้ำที่ปรับค่า pH เป็น 5.5 ด้วยกรดไฮโดรคลอริก ในถังน้ำที่ต่อเข้าเครื่องทำความเย็นปรับอุณหภูมิ 19 องศาเซลเซียส มีอัตราการลดอุณหภูมิ 0.1 องศาเซลเซียสต่อนาที เป็นระยะเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นนำไปเก็บตัวอย่างเลือดเพื่อวิเคราะห์ค่าโลหิตวิทยา ค่าเคมีในเลือด ชีวเคมีความเครียด และภูมิคุ้มกันแบบไม่จำเพาะ

3.3.8 การวิเคราะห์วิตามินซีและวิตามินอี

การวิเคราะห์ปริมาณวิตามินซี

การสกัดวิตามินซีในอาหาร ซึ่งอาหารปลา 5 กรัม เติม 388 mM phosphate buffer, pH 3.0 ปริมาตร 50 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันโดยใช้ magnetic stirrer เป็นเวลา 30 นาที นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 5000 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 10 นาที ดูดส่วนใสมากรองด้วย Syringe filter ใส่ลงในหลอดแก้วสำหรับฉีดเข้าเครื่อง HPLC เก็บที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส จนกว่าจะนำไปฉีดเข้าเครื่องเพื่อทำการวิเคราะห์วิตามินซี

การสกัดวิตามินซีในพลาสมา ดูดพลาสมา 100 ไมโครลิตร ลงใน phosphate buffer 900 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันแล้วนำไปกรองด้วย Syringe filter ใส่ลงในหลอดแก้วสำหรับฉีดเข้าเครื่อง HPLC เก็บที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส จนกว่าจะนำไปฉีดเข้าเครื่องเพื่อทำการวิเคราะห์วิตามินซี

การสกัดวิตามินซีในเนื้อเยื่อตับ และไต ซึ่งน้ำหนักตับ หรือไต ประมาณ 0.3 กรัม ด้วยเครื่องชั่งที่ตำแหน่ง จดบันทึกน้ำหนักไว้ เติม phosphate buffer ปริมาตร 10 เท่าของน้ำหนักตับ บดให้ละเอียดด้วย glass homogenizer นำไปทำให้เซลล์แตกด้วยเครื่อง Ultrasonic แบบแท่งโดยหล่อด้วยน้ำแข็งนอกภาชนะตลอดเวลา จากนั้นนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 5000 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 10 นาที ดูดส่วนใสมากรองด้วย Syringe filter ใส่ลงในหลอดแก้วสำหรับฉีดเข้าเครื่อง HPLC เก็บที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส จนกว่าจะนำไปฉีดเข้าเครื่องเพื่อทำการวิเคราะห์วิตามินซี

การวิเคราะห์ปริมาณวิตามินซี ใช้เครื่อง HPLC แบบ reverse-phase รุ่น HP 1100 โดยใช้คอลัมน์ C18 (4.0 mm ID x 250 mm) Mobile phase คือ Eluent 1 ต่อ Eluent 2 อัตราส่วน 3 ต่อ 7 (Eluent 1: 78 mM potassium dihydrogen phosphate, 0.2 % 1,5-dimethylhexylamine, pH3; Eluent 2: 900 ml Eluent1, 98 ml Acetonitrile, 42 ml ethanol) flow rate 0.8 มิลลิลิตรต่อนาที ตรวจจับด้วย UV detector ความยาวคลื่น 254 นาโนเมตร

การวิเคราะห์ปริมาณวิตามินอี

การสกัดวิตามินอีในอาหาร ซึ่งอาหาร 2 กรัม ลงในหลอดทดลองพลาสติกฝาเกลียว เติม 0.01% BHT (ละลายใน methanol) 20 มิลลิลิตร เติม 0.1 mM EDTA 5 มิลลิลิตร และเติม

hexane 10 มิลลิลิตร เขย่าเป็นเวลา 5 นาที จะเกิดการแยกชั้น ย้ายชั้น hexane (ด้านบน) ใส่ลงในหลอดทดลองแบบแก้ว เดิม hexane ลงในหลอดทดลองพลาสติกฝาเกลียวอีก 5 มิลลิลิตร เขย่า 5 นาที แล้วย้ายชั้น hexane ใส่หลอดทดลองแบบแก้วหลอดเดิม นำไประเหย hexane ด้วยการเป่าแก๊สในโตรเจนบริสุทธิ์ในตู้ดูดควันจน hexane ระเหยหมดจะเหลือเฉพาะส่วนที่เป็นน้ำมัน จากนั้นละลายด้วย สารละลาย methanol/chloroform (อัตราส่วน 1:1 ปริมาตร: ปริมาตร) 1 มิลลิลิตร ใส่ในหลอดมีฝาปิดสนิทขนาดสำหรับฉีดเข้าเครื่อง HPLC เก็บที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส จนกว่าจะนำไปวิเคราะห์วิตามินอี

การสกัดวิตามินอีในพลาสมา คัดแปลงจากวิธีการของ Schweigert, Luppertz, and Stobo, (2002) ปิเปตพลาสมา 200 ไมโครลิตรลงในหลอดทดลอง เดิม absolute ethanol 200 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากัน เดิม 0.05 % BHT (BHT 0.05 กรัม ละลายใน Hexane 100 มิลลิลิตร) 1 มิลลิลิตร เป่าแก๊สในโตรเจนเพื่อไล่ออกซิเจนออกจากหลอดแล้วปิดฝาให้สนิทเขย่าให้เข้ากันจะเกิดการแยกชั้น ย้ายชั้น hexane (ด้านบน) ใส่ลงในหลอดทดลองแบบแก้วระเหย hexane ด้วยการเป่าแก๊สในโตรเจนบริสุทธิ์ในตู้ดูดควันจน hexane ระเหยหมดจะเหลือเฉพาะส่วนที่เป็นน้ำมัน จากนั้นละลายด้วย สารละลาย methanol/chloroform (อัตราส่วน 1:1, ปริมาตร: ปริมาตร) 200 ไมโครลิตร ใส่ในหลอดมีฝาปิดสนิทขนาดสำหรับฉีดเข้าเครื่อง HPLC เก็บที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส จนกว่าจะนำไปวิเคราะห์วิตามินอี

การสกัดวิตามินอีในเนื้อเยื่อตับ และไต วิตามินอีในตับ และไต คัดแปลงจากวิธีการของ Schweigert *et al.*, (2002) ชั่งตับ หรือไต ประมาณ 0.3 กรัม บดทึบน้ำหนักไว้ บดให้ละเอียดใน 0.05 % BHT 1 มิลลิลิตร โดยใช้ glass homogenizer เดิม 0.1 M NaCl 1 มิลลิลิตร เขย่าแล้วตั้งไว้ให้แยกชั้นเป็นเวลา 30 นาที ปิเปตชั้นบนใส่หลอดทดลอง แล้วนำไประเหย hexane ด้วยการเป่าแก๊สในโตรเจนบริสุทธิ์ในตู้ดูดควันจน hexane ระเหยหมดจะเหลือเฉพาะส่วนที่เป็นน้ำมัน จากนั้นละลายด้วย สารละลาย methanol/chloroform (อัตราส่วน 1:1, ปริมาตร: ปริมาตร) 1 มิลลิลิตร ใส่ในหลอดมีฝาปิดสนิทขนาดสำหรับฉีดเข้าเครื่อง HPLC เก็บที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส จนกว่าจะนำไปวิเคราะห์วิตามินอี

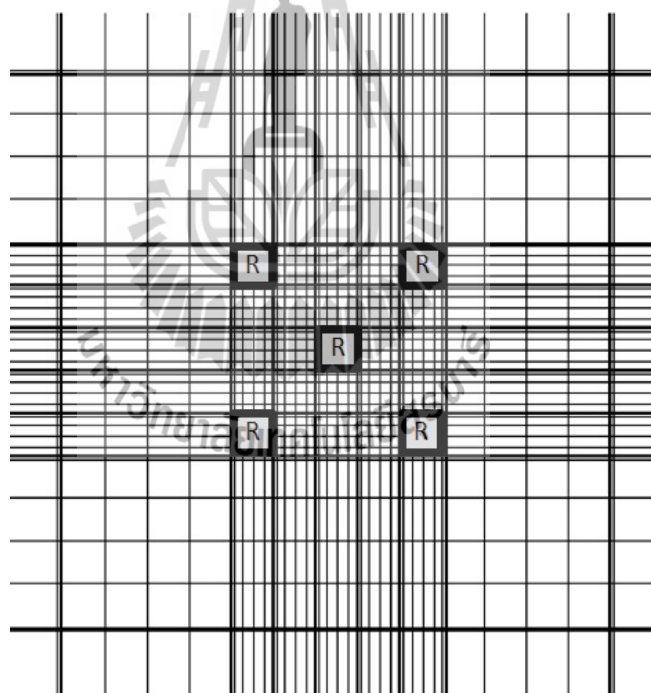
การวิเคราะห์ปริมาณวิตามินอี ใช้เครื่อง HPLC แบบ reverse-phase รุ่น HP 1100 โดยใช้คอลัมน์ C18 (4.0 mm ID x 250 mm) Mobile phase คือ methanol ต่อ น้ำ อัตราส่วน 98 ต่อ 2 ใช้ flow rate 1.5 มิลลิลิตรต่อนาที ตรวจจับด้วย Fluorescence detector ที่ excitation 292 นาโนเมตร และ emission 327 นาโนเมตร

3.3.9 การวิเคราะห์ค่าโลหิตวิทยา

การนับจำนวนเม็ดเลือดแดง เจือจางเลือดปลาที่มีสารป้องกันการแข็งตัวของเลือด ด้วยสารละลาย Gower's solution (Sodium sulfate 12.5 g, Glacial acetic acid 33.3 ml ปรับน้ำกลั่นให้ได้ 200 ml) โดยใช้ปิเปตสำหรับเจือจางเพื่อนับเม็ดเลือดแดง (Thoma diluting red cell pipette) ดูดเลือดถึงขีด 0.5 จากนั้นดูด Gower's solution ถึงขีด 101 จะได้อัตราส่วนเจือจาง 1:200 เขย่าให้เข้ากัน 2-3 นาที หยดสารละลายทิ้ง 3 หยด จากนั้นหยดลงบน hemocytometer chamber สองคู่ด้วยกล้องจุลทรรศน์ นับในช่องพื้นที่ใหญ่ตรงกลาง ซึ่งมีพื้นที่เล็ก 25 ช่อง นับเพียง 5 ช่อง ตรงมุมบน ถ่าง ซ้าย ขวา และตรงกลาง ดังตัวอักษร R ในรูปที่ 3.1

จำนวนเม็ดเลือดแดงต่อลูกบาศก์มิลลิเมตร

= จำนวนเม็ดเลือดแดงที่นับได้ทั้งหมดใน 5 ช่อง $\times 10 \times 5 \times 200$

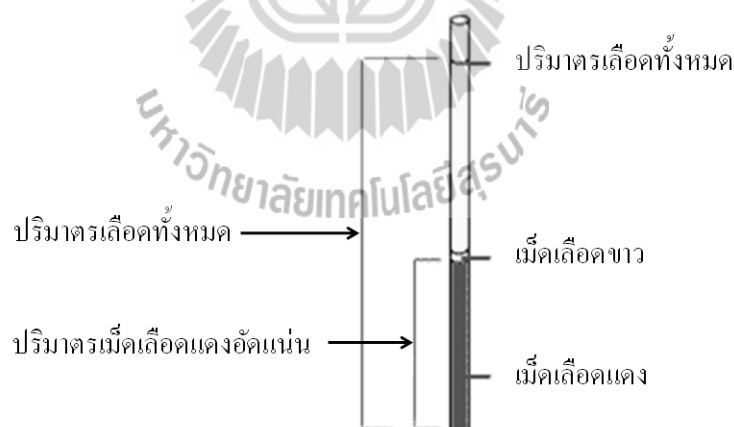


รูปที่ 3.1 ช่อง hemocytometer chamber ที่ใช้นับจำนวนเม็ดเลือดแดง

การวัดค่าฮีโมโกลบิน ใช้ชุด Hemoglobin set (Cyanmethemoglobin Method) เติม น้ำยา Drabkin Reagent ลงในหลอดแก้ว 5 มิลลิเมตร ใส่เลือดที่มีสารป้องกันการแข็งตัวของเลือด (EDTA) ลงในหลอด 20 ไมโครลิตร เขย่าให้เข้ากัน ตั้งที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 10 นาที นำไปวัดค่า ดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 540 นาโนเมตร โดยใช้ Drabkin Reagent เป็น Blank ปรับ 0 จากนั้นนำ ค่าดูดกลืนแสงไปคำนวณหาฮีโมโกลบินจากกราฟมาตรฐานซึ่งอยู่ในชุด Hemoglobin set

การวัดค่าเม็ดเลือดแดงอัดแน่น เขย่าหลอดเก็บเลือดที่มีสารป้องกันการแข็งตัวของ เลือดให้แน่ใจว่าเม็ดเลือดไม่ตกตะกอน จากนั้นนำปลายหลอด microhematocrit capillary tube จุ่ม ลงในหลอดเก็บเลือดให้เลือดไหลเข้ามาใน capillary tube ประมาณ 4 ใน 5 ของความยาว tube แล้ว อุดปลายด้วยดินน้ำมัน นำไปปั่นด้วยเครื่อง haematocrit centrifuge ที่ความเร็ว 10000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 นาที วัดความยาวของการอัดตัวเม็ดเลือดแดง และความยาวทั้งหมดของเม็ดเลือดแดง ดัง รูปที่ 3.2 แล้วคำนวณจากสูตร หรือ วัดจากเครื่องวัดที่ให้มาพร้อมกับเครื่อง

$$\% \text{ฮีมาโตคริต} = \frac{\text{ปริมาตรของเม็ดเลือดแดงอัดแน่น (เซนติเมตร)} \times 100}{\text{ปริมาตรเลือดทั้งหมด (เซนติเมตร)}}$$



รูปที่ 3.2 ปริมาตรเลือดทั้งหมด และปริมาตรเม็ดเลือดแดงอัดแน่นใน microhematocrit capillary tube ที่ผ่านการปั่นเหวี่ยงแล้ว

3.3.10 การวิเคราะห์ค่าชี้วัดความเครียด

การวิเคราะห์ Plasma glucose การวิเคราะห์กลูโคส ใช้ชุด Liquid-glucose (GOD-PAP Method) เติม Enzyme Reagent ลงในหลอดแก้ว 1 มิลลิลิตร นำไปวางที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ปิเปตพลาสมาลงในหลอด 10 ไมโครลิตร เขย่าให้เข้ากัน ตั้งที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที นำไปวัดค่าดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 500 นาโนเมตรโดยใช้ Enzyme Reagent เป็น Blank ปรับ 0 จากนั้นนำค่าดูดกลืนแสงไปคำนวณหาค่ากลูโคสจากกราฟมาตรฐาน

การวิเคราะห์ Serum chloride การวิเคราะห์คลอไรด์ ใช้ชุด Chloride Set (Thiocyanate Method) เติม Chloride Reagent ลงในหลอดแก้ว 1.5 มิลลิลิตร ปิเปตซีรัมลงในหลอด 10 ไมโครลิตร เขย่าให้เข้ากัน ตั้งที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 10 นาที นำไปวัดค่าดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 480 นาโนเมตรโดยใช้ Chloride Reagent เป็น Blank ปรับ 0 จากนั้นนำค่าดูดกลืนแสงไปคำนวณหาค่าคลอไรด์จากกราฟมาตรฐาน

การวิเคราะห์ Plasma total protein การวิเคราะห์โปรตีนรวมในพลาสมา ใช้ Total protein Kit (Micro Lowry, Peterson's Modification) เจือจางพลาสมาด้วยน้ำ DI ให้ได้ความเข้มข้นอยู่ในกราฟมาตรฐาน ปิเปตสารละลายพลาสมาที่เจือจางแล้ว 1 มิลลิลิตร เติม Lowry Reagent 1 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันตั้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง 20 นาที เติม Folin & Clocaiteu's Phenol Reagent 0.5 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันตั้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง 30 นาที นำไปวัดค่าดูดกลืนแสงในช่วง 500 – 800 นาโนเมตร แล้วคำนวณความเข้มข้นของโปรตีนจากกราฟมาตรฐาน โดยมี Bovine serum albumin (BSA) เป็นโปรตีนมาตรฐานซึ่งอยู่ในชุด Total protein Kit

3.3.11 การวิเคราะห์ค่าภูมิคุ้มกันแบบไม่จำเพาะ

การวิเคราะห์ Lysozyme activity

เตรียมสารละลาย 0.06 M Phosphate citrate buffer pH 6.0, 0.09% NaCl โดยชั่ง NaCl 0.225 g เติมสารละลาย 0.06 M Phosphate citrate buffer pH 6.0 (ประกอบด้วย 0.1 M Citric acid ปริมาตร 37.9 ml ผสมกับ 62.1 ml ของ 0.2 M Phosphate solution จะได้สารละลาย 0.06 M Phosphate citrate buffer pH 6.0 ปริมาตร 100 ml) ปริมาตร 92.5 ml แล้วปรับปริมาตรด้วยน้ำ DI ให้ได้ 250 ml จะได้สารละลาย 0.06 M Phosphate citrate buffer pH 6.0, 0.09% NaCl ปริมาตร 250 ml เก็บในตู้เย็นจนกว่าจะใช้

เจือจาง Standard lysozyme ให้ได้ความเข้มข้น 0, 2.5, 5, 10, 15, 20 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตรด้วยสารละลาย 0.06 M Phosphate citrate buffer pH 6.0, 0.09% NaCl จากนั้นใส่ Standard lysozyme ความเข้มข้นต่างๆ และตัวอย่าง Serum ที่ต้องการวิเคราะห์ ลงใน plate 96 หลุม หลุมละ 10 ไมโครลิตร เติมเชื้อ *Micrococcus lysodeikiticus* ความเข้มข้น 0.3 mg/ml (ชั่ง *M. lysodeikiticus* 0.012 g เติมสารละลาย 0.06 M Phosphate citrate buffer pH 6.0, 0.09% NaCl 40 ml แช่น้ำแข็ง

ตลอดการวิเคราะห์) หลุมละ 190 ไมโครลิตร ดังรูปที่ 3.3 นำไปเขย่าให้เข้ากันด้วยเครื่องเขย่าประมาณ 3 วินาที จากนั้นวัดค่าดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 450 nm นำออกมาเขย่าอีก 30 นาที แล้ววัดค่าดูดกลืนแสงอีกครั้ง

นำค่าดูดกลืนแสงครั้งแรกกลับกับค่าดูดกลืนแสงครั้งที่สอง แล้วนำค่าดูดกลืนแสงของ Standard lysozyme ความเข้มข้น 0, 2.5, 5, 10, 15, 20 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ไปสร้างกราฟเส้นตรงโดยให้ความเข้มข้นเป็นแกน x และให้ค่าดูดกลืนแสงเป็นแกน y จากนั้นหาสมการเส้นตรง แล้วนำค่าดูดกลืนแสงของตัวอย่างซีรัมที่ผ่านการลบกันแล้วมาแทนค่าในสมการเพื่อหาค่าความเข้มข้นของ lysozyme เมื่อเทียบกับ Standard lysozyme



รูปที่ 3.3 การเติมเชื้อ *Micrococcus lysodeikiticus* ด้วย Multi pipette 8 ช่องในการวิเคราะห์ lysozyme activity

การวิเคราะห์ Total immunoglobulin การวิเคราะห์อิมมูโนโกลบูลินรวมนั้นต้องทำการวิเคราะห์โปรตีนรวมในพลาสมา และโปรตีนของพลาสมาที่ผ่านการตกตะกอนโปรตีนชนิดโกลบูลินด้วย 12 % Polyethylene glycol จากนั้นนำความเข้มข้นของโปรตีนรวมในพลาสมาไปลบกับโปรตีนของพลาสมาที่ผ่านการตกตะกอนก็จะได้ โปรตีนที่เป็นอิมมูโนโกลบูลินทั้งหมด

การวิเคราะห์โปรตีนรวมในพลาสมา ใช้ Total protein Kit (Micro Lowry, Peterson's Modification) เจือจางพลาสมาด้วยน้ำ DI ให้ได้ความเข้มข้นอยู่ในกราฟมาตรฐาน ปีเปิดสารละลายพลาสมาที่เจือจางแล้ว 1 มิลลิลิตร เติม Lowry Reagent 1 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันตั้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง 20 นาที เติม Folin & Cloaiteu's Phenol Reagent 0.5 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันตั้งไว้ที่

อุณหภูมิห้อง 30 นาที นำไปวัดค่าดูดกลืนแสงในช่วง 500 – 800 นาโนเมตร แล้วคำนวณความเข้มข้นของโปรตีนจากกราฟมาตรฐาน โดยมี Bovine serum albumin (BSA) เป็นโปรตีนมาตรฐาน ซึ่งอยู่ในชุด Total protein Kit

โปรตีนของพลาสมาที่ผ่านการตกตะกอนโปรตีนชนิดโกลบูลินด้วย 12 % Polyethylene glycol วิธีการคือเจือจางพลาสมาด้วย Polyethylene glycol โดยใช้ DI เป็นตัวทำละลายให้ความเข้มข้นสุดท้ายมี Polyethylene glycol 12% ผสมให้เข้ากันตั้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง 30 นาที นำไปปั่นเหวี่ยงความเร็ว 12500 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที ดูดส่วนใส 1 มิลลิลิตรใส่หลอดใหม่ เติม deoxycholate 0.1 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันตั้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง 10 นาที เติม trichloroacetic acid 0.1 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันแล้วนำไปปั่นเหวี่ยงเป็นเวลา 10 นาที จากนั้นดูดส่วนใสทิ้งไปแล้วละลายตะกอนด้วย Lowry Reagent 1 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันเติมน้ำ DI 1 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันตั้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง 20 นาที เติม Folin & Clocateu's Phenol Reagent 0.5 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันตั้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง 30 นาที นำไปวัดค่าดูดกลืนแสงในช่วง 500 – 800 นาโนเมตร แล้วคำนวณความเข้มข้นของโปรตีนจากกราฟมาตรฐาน โดยโปรตีนมาตรฐานที่จะนำมาใช้เป็นกราฟมาตรฐานนั้นจะต้องมีขั้นตอนการเตรียมสารต่างๆเช่นเดียวกัน เมื่อได้ความเข้มข้นของโปรตีนที่ไม่ได้ถูกตกตะกอนด้วย 12% Polyethelene glycol แล้วจะสามารถหาค่าอิมมูโนโกลบูลินรวมได้จากสมการ

อิมมูโนโกลบูลินรวม = โปรตีนรวมในพลาสมา – โปรตีนที่ผ่านการตกตะกอนด้วย 12% Polyethelene glycol

การวิเคราะห์ Alternative complement การวิเคราะห์ ประสิทธิภาพการทำงานของคอมพลีเมนต์ ดัดแปลงจาก Sunyer and Tort (1995) ล้างเม็ดเลือดแดงแพะด้วย gelatin veronal buffer (GVB) ปรับความเข้มข้นเม็ดเลือดแดงให้ได้ 5×10^7 เซลล์ต่อมิลลิลิตร เจือจางซีรัมใน plate 96 หลุมแบบ round-bottom microtiter plates โดยปิเปต GVB 50 ไมโครลิตรลงในหลุมที่จะทำการเจือจาง ในหลุมแรกปิเปตซีรัม 50 ไมโครลิตรลงไปผสมให้เข้ากันแล้วปิเปตสารละลายจากหลุมที่ 1 50 ไมโครลิตรลงในหลุมที่ 2 ผสมให้เข้ากัน แล้วปิเปต 50 ไมโครลิตรไปยังหลุมที่ 3 เจือจางต่อไปเรื่อยๆจนครบ 8 หลุม จากนั้นเติม GVB อีกหลุมละ 200 ไมโครลิตร จะได้ความเข้มข้นของซีรัมทั้ง 8 หลุมเป็น 20, 10, 5, 2.5, 1.25, 0.625, 0.313 และ 0.157% เติมเม็ดเลือดแดงแพะ 50 ไมโครลิตร ลงในทุกหลุม โดยมี Positive control (100% lysis) เป็นหลุมที่ประกอบด้วย น้ำ DI 250 ไมโครลิตร และเม็ดเลือดแดงแพะ 50 ไมโครลิตร ส่วน Negative control (spontaneous lysis) คือ GVB 250 ไมโครลิตร และเม็ดเลือดแดงแพะ 50 ไมโครลิตร นำ plate ไปป่มที่อุณหภูมิ 22 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมงโดยใช้เครื่องเขย่าตลอดเวลา นำ plate ไปปั่นเหวี่ยงที่ 800g อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

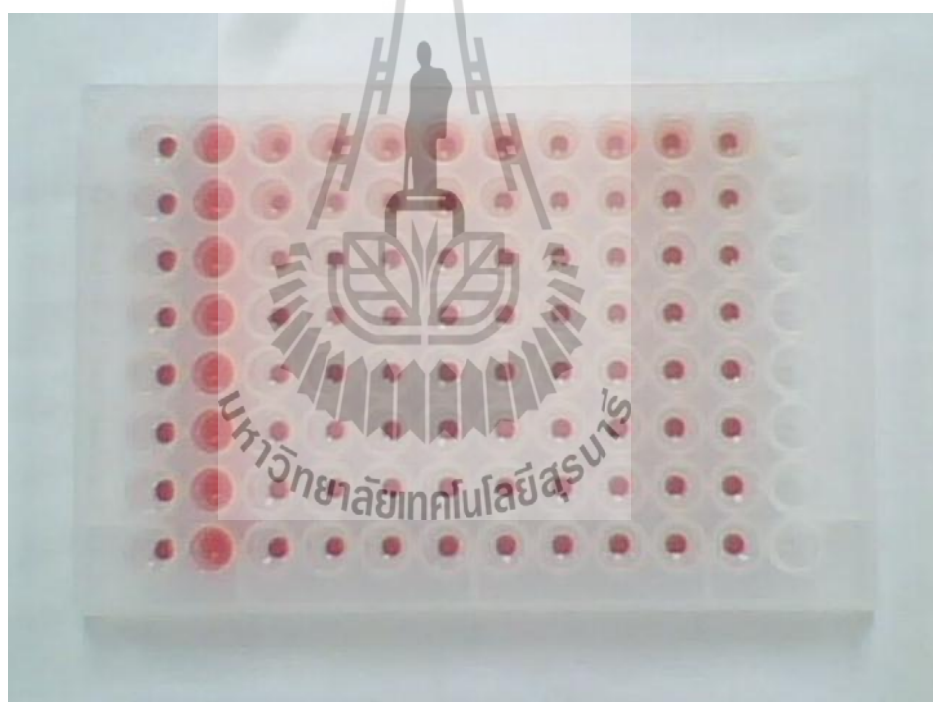
เป็นเวลา 10 นาทีเพื่อตกตะกอนเม็ดเลือดแดงแพะที่ไม่ถูกทำให้แตก จากนั้นดูดส่วนใส 250 ไมโครลิตร ลงใน plate 96 หลุมแบบ flat-bottom microtiter plate นำไปวัดค่าดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 415 นาโนเมตร ประสิทธิภาพการทำงานของคอมพลีเมนต์มีหน่วยเป็น unit/ml ประมาณการได้จากการพล็อตกราฟ $Y/(100 - Y)$ ต่อปริมาตรของซีรัม

$$Y = 100 [Abs (A) - Abs (B)] / [Abs(C) - Abs (B)]$$

หมายเหตุ: A = ส่วนใสของหลุมที่เจือจางซีรัม

B = ส่วนใสของ Negative control

C = ส่วนใสของ Positive control

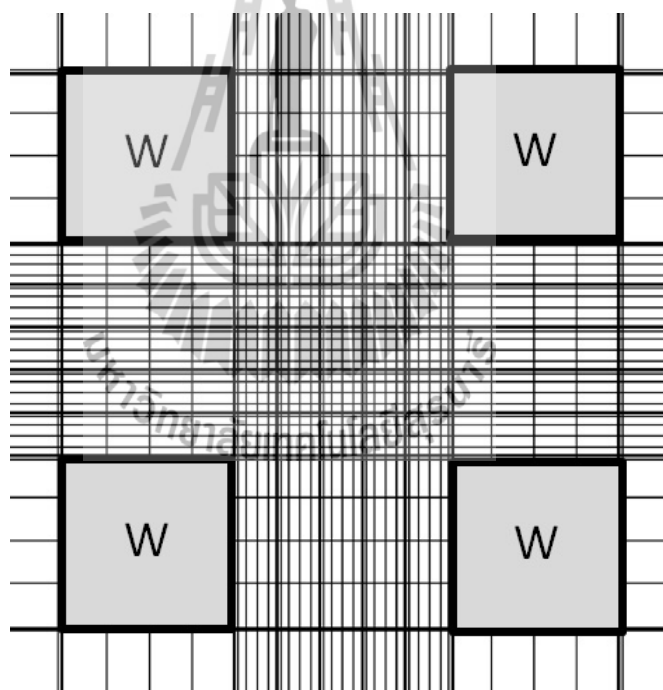


รูปที่ 3.4 ภาพ plate ในการวิเคราะห์ Alternative complement

การนับจำนวนเม็ดเลือดขาวทั้งหมด เจือจางเลือดปลาที่มีสารป้องกันการแข็งตัวของเลือด ด้วยสารละลาย Dacies fluid (Formaldehyde 10 ml, Trisodium citrate 31.3 g, Brilliant cresyl Blue 1.0 g และ น้ำ DI 1 ลิตร) โดยใช้ปิเปตสำหรับเจือจางเพื่อนับเม็ดเลือดขาว (Thoma diluting white cell pipette) คูดเลือดถึงขีด 0.1 จากนั้นคูด Dacies fluid ถึงขีด 11 จะได้อัตราส่วนเจือจาง 1:20 เขย่าให้เข้ากัน 2–3 นาที หยดสารละลายทิ้ง 3 หยด จากนั้นหยดลงบน hemocytometer chamber ตั้งไว้นาน 2–3 นาที นำไปนับด้วยกล้องจุลทรรศน์โดยใช้กำลังขยาย $\times 10$ นับในช่องพื้นที่ 4 ช่อง ตรงมุมบน ล่าง ซ้าย และ ขวา ดังตัวอักษร W ในรูปที่ 3.5 โดยนับเม็ดเลือดขาวทั้งสองด้านของ hemocytometer chamber นำมาหาค่าเฉลี่ย และคำนวณ

จำนวนเม็ดเลือดขาวต่อลูกบาศก์มิลลิเมตร

= จำนวนเม็ดเลือดขาวที่นับได้ทั้งหมดใน 4 ช่อง $\times 2.5 \times 20$

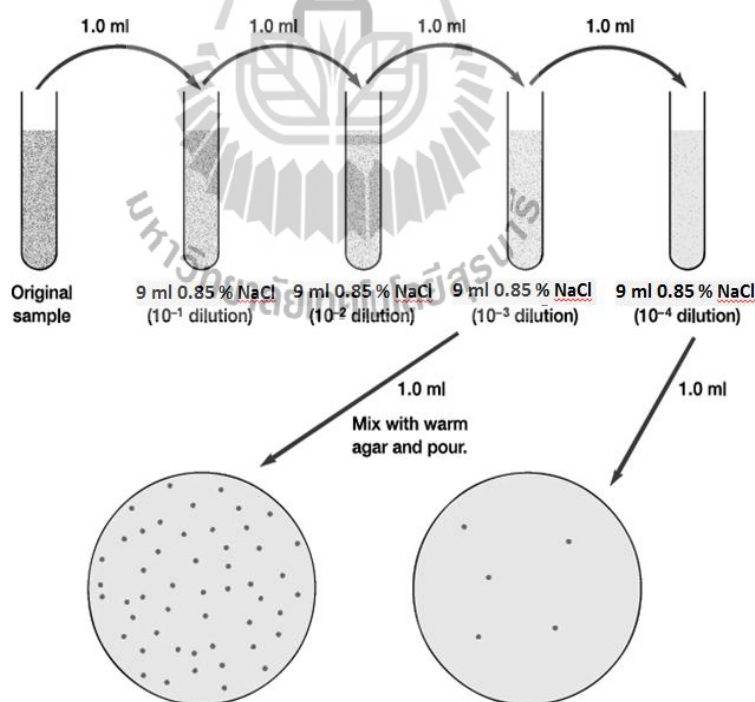


รูปที่ 3.5 ช่อง hemocytometer chamber ที่ใช้นับจำนวนเม็ดเลือดขาว

การย้อมสีและนับแยกชนิดเม็ดเลือดขาว เสมิยร์เลือดลงบนแผ่นสไลด์ ทิ้งไว้ให้แห้ง จากนั้นนำไปแช่ใน Absolute Methanol 15 นาที ผึ่งไว้ให้แห้งประมาณ 20 นาที หยดสี Wright-Giemsa (giemsa's stain powder 1.0 กรัม wright's stain powder 9.0 กรัม glycerol 90 มิลลิลิตร และ absolute methanol 2,910 มิลลิลิตร) ให้ท่วมสไลด์ทิ้งไว้ 3 นาที หยดน้ำกลั่น 1 – 2 หยด หยดสีให้ท่วมสไลด์อีกครั้ง ทิ้งไว้ 3 นาที นำสไลด์ไปล้างด้วยน้ำเพื่อล้างตะกอนออกให้หมด ผึ่งไว้ให้แห้ง นำสไลด์ไปส่องกล้องจุลทรรศน์เพื่อตรวจนับแยกชนิดเม็ดเลือดขาว

3.3.12 การฉีดเชื้อ *Aeromonas hydrophila*

เชื้อเชื้อ *A. hydrophila* ที่อยู่ใน plate เลี้ยงเชื้อลงใน Broth นำไปบ่ม 35 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 24 ชั่วโมง ปั่นเหวี่ยงเพื่อนำอาหารเลี้ยงเชื้อออก แล้วเจือจางเชื้อด้วย 0.85 % NaCl ที่ผ่านการฆ่าเชื้อ แล้วฉีดเข้าช่องท้องปลา การหาจำนวนเชื้อที่ฉีดเข้าตัวปลาทำได้โดย เจือจางเชื้อด้วย 0.85 % NaCl ที่ระดับต่างๆแล้วนำไปวัดค่า Optical Density (O.D.) ที่ความยาวคลื่น 540 นาโนเมตร นำมาหาจำนวนเซลล์แบคทีเรียใน 1 มิลลิเมตร โดยการเจือจางความเข้มข้นแต่ละระดับครั้งละ 10 เท่า แล้วดำเนินการตามวิธี Pour plate technique (Rodina, 1972)

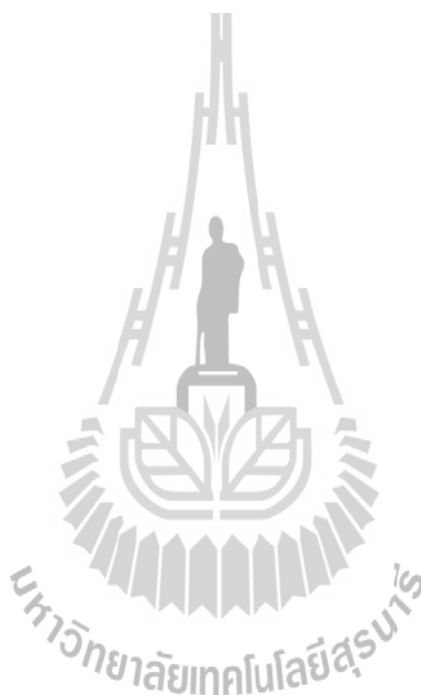


รูปที่ 3.6 การหาความเข้มข้นของเชื้อ *Aeromonas hydrophila* ด้วย Pour plate technique

3.3.13 การวิเคราะห์ค่าทางสถิติ

ความแตกต่างระหว่างกลุ่มการทดลองภายในสภาวะปลาปกติ วิเคราะห์หาความแปรปรวน (Analysis of Variances, ANOVA) และหาอิทธิพลร่วมระหว่างปัจจัยอื่นเนื่องมาจากการเสริมวิตามินซีและวิตามินอี ใช้การวิเคราะห์ตามแผนการทดลองแบบแฟกทอเรียลในการทดลองแบบสุ่มสมบูรณ์ (Factorial Experiment in CRD) โดยวิเคราะห์ค่าความแตกต่างระหว่างค่าเฉลี่ยในแต่ละกลุ่มการทดลองด้วยวิธี Duncan's new multiple range test ความเชื่อมั่น 95%

ความแตกต่างระหว่างปลาสภาวะปกติและปลาที่ถูกทำให้เครียดด้วยน้ำที่มีอุณหภูมิและ pH ต่ำ วิเคราะห์ค่าความแตกต่างระหว่างค่าเฉลี่ยโดยใช้ Pair Sample T-test



บทที่ 4

ผลการวิเคราะห์ข้อมูลและการอภิปรายผล

4.1 ผลการวิเคราะห์

4.1.1 ผลของการเสริมวิตามินซีร่วมกับวิตามินอีในอาหารปลาต่อการเจริญเติบโตของปลา ดุกลูกผสม

ผลการศึกษาการเสริมวิตามินซีร่วมกับวิตามินอีต่ออัตราการเจริญเติบโตแสดงในตารางที่ 4.1 โดยพบว่าอัตราการเพิ่มน้ำหนักตัว (RWG) และอัตราการเจริญเติบโตจำเพาะ (SGR) ของปลาที่ได้รับการเสริมวิตามินทั้งสองชนิดเพิ่มขึ้นจากกลุ่มที่ไม่ได้รับการเสริม และเมื่อทำการวิเคราะห์อิทธิพลร่วมระหว่างปัจจัยการเสริมวิตามินซีและวิตามินอีต่อการเจริญเติบโตพบว่าวิตามินซีและวิตามินอีมีอิทธิพลร่วมที่ส่งผลต่อค่า RWG และค่า SGR แต่กลับพบว่า การเสริมวิตามินซี หรือวิตามินอีไม่มีผลต่อค่า FCR และอัตราการรอดของปลาดุกลูกผสม

จากผลการศึกษาพบว่า การเสริมวิตามินซีเพียงอย่างเดียวที่ระดับ 500 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัมอาหาร (สูตร 4) มีค่า RWG และค่า SGR ไม่แตกต่างจากกลุ่มที่ไม่ได้รับการเสริม แต่การเสริมวิตามินซีเพียงอย่างเดียวที่ระดับ 1000 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัมอาหาร (สูตร 7) มีค่า RWG และค่า SGR สูงกว่ากลุ่มที่ไม่ได้รับการเสริมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ

การเสริมวิตามินอีเพียงอย่างเดียวมีผลให้ค่า RWG และค่า SGR เพิ่มขึ้นจากกลุ่มที่ไม่ได้รับการเสริม โดยพบว่า การเสริมวิตามินอีเพียงอย่างเดียวทั้งในระดับ 62.5 และ 125 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัมอาหาร (สูตร 2 และ 3) ส่งผลให้ปลามีค่า RWG และค่า SGR สูงกว่ากลุ่มที่ไม่ได้รับการเสริมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ

การเสริมวิตามินซีร่วมกับวิตามินอีมีผลให้ค่า RWG และค่า SGR เพิ่มขึ้นจากกลุ่มที่ไม่ได้รับการเสริม แต่การเสริมวิตามินซีและวิตามินอีที่ระดับ 1000 + 125 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัมอาหารมีค่า RWG และค่า SGR ไม่แตกต่างจากกลุ่มที่ไม่ได้รับการเสริม

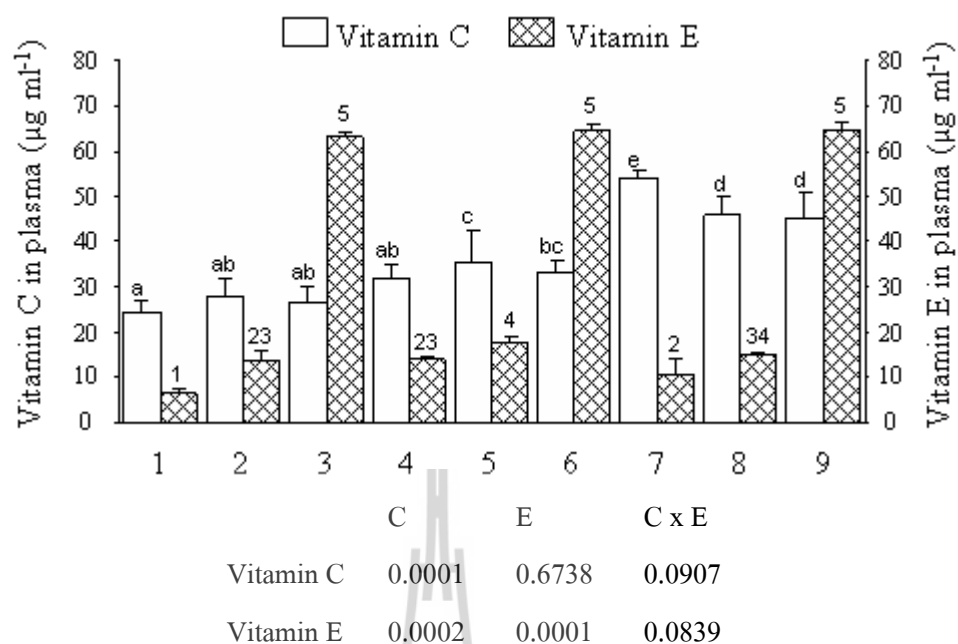
ตารางที่ 4.1 ผลการเสริมวิตามินซีร่วมกับวิตามินอีในอาหารปลาต่อการเจริญเติบโต และอัตราการรอดของปลาคูกลูกผสมที่ระยะเวลา 6 สัปดาห์

Diet	Initial weight (g)	RWG (%)	SGR (%)	FCR	Survival rate (%)
1	25.56 ± 1.76	267.39 ± 28.99 ^a	6.19 ± 0.37 ^a	1.04 ± 0.17	73.08 ± 11.20
2	25.96 ± 1.01	331.93 ± 33.63 ^{bcd}	6.96 ± 0.37 ^{bcd}	1.17 ± 0.25	75.74 ± 24.09
3	25.56 ± 1.62	383.93 ± 55.34 ^d	7.48 ± 0.57 ^d	1.06 ± 0.18	81.49 ± 17.51
4	23.89 ± 2.56	290.17 ± 35.26 ^{ab}	6.47 ± 0.43 ^{ab}	1.07 ± 0.25	81.69 ± 12.24
5	24.66 ± 2.41	346.77 ± 14.55 ^{bcd}	7.13 ± 0.16 ^{bcd}	0.97 ± 0.16	84.72 ± 15.05
6	24.69 ± 2.05	344.50 ± 60.16 ^{bcd}	7.07 ± 0.67 ^{bcd}	1.06 ± 0.22	84.56 ± 11.89
7	25.28 ± 1.01	331.32 ± 35.23 ^{bcd}	6.95 ± 0.39 ^{bcd}	1.02 ± 0.12	81.28 ± 10.06
8	25.19 ± 0.73	361.75 ± 34.58 ^{cd}	7.27 ± 0.36 ^{cd}	0.94 ± 0.19	85.03 ± 9.47
9	25.57 ± 1.45	304.12 ± 63.76 ^{abc}	6.60 ± 0.76 ^{abc}	1.07 ± 0.17	79.95 ± 9.97
Statistical analysis (<i>P</i> value)					
C		0.9353	0.9244	0.8952	0.3900
E		0.0037	0.0039	0.5155	0.7735
CxE		0.0106	0.0109	0.5749	0.9252

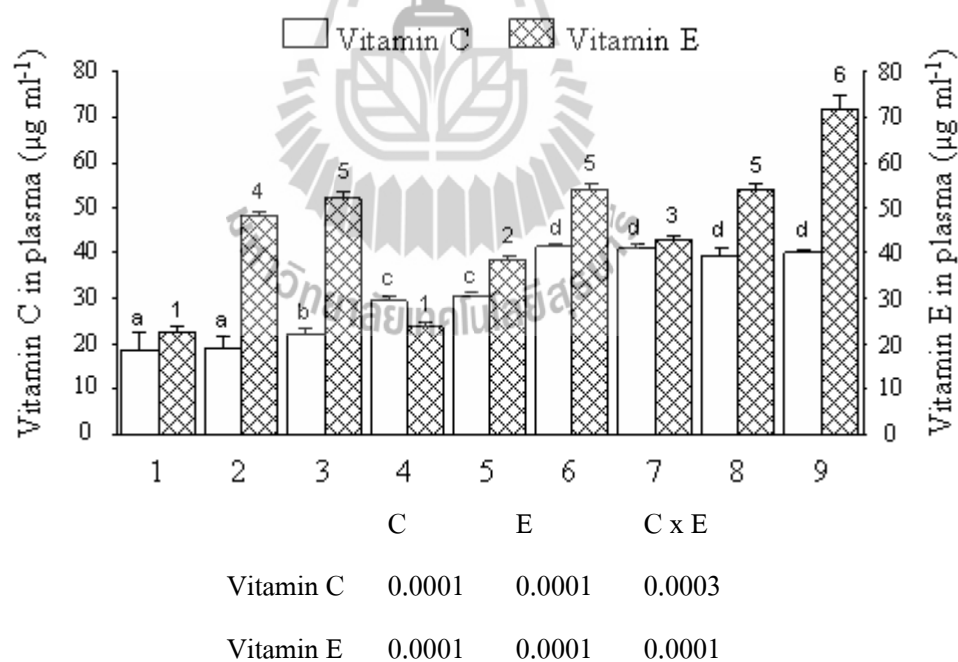
a, b, c, d ตัวอักษรที่แตกต่างกันมีความแตกต่างทางสถิติภายในแถวตั้ง ($P < 0.05$)

4.1.2 ผลของการเสริมวิตามินซีร่วมกับวิตามินอีในอาหารปลาต่อการสะสมวิตามินซีและวิตามินอีในพลาสมา ตับ และไตของปลาคูกลูกผสม

ผลการวิเคราะห์ปริมาณวิตามินซีและวิตามินอีที่ระยะเวลา 3 สัปดาห์ดังรูปที่ 4.1 พบว่าปริมาณวิตามินซีและวิตามินอีในพลาสมาเพิ่มขึ้นตามปริมาณการเสริม เมื่อทำการวิเคราะห์ปัจจัยร่วมพบว่าวิตามินซีและวิตามินอีไม่มีอิทธิพลร่วมต่อการสะสมปริมาณของวิตามินทั้งสองชนิดในพลาสมา การเพิ่มขึ้นของปริมาณวิตามินซีในอาหาร ไม่มีผลต่อการสะสมวิตามินอีในพลาสมา แต่พบว่าการเพิ่มขึ้นของวิตามินอีในอาหาร ส่งผลให้ปริมาณการสะสมวิตามินซีในพลาสมาลดลง



รูปที่ 4.1 ผลการวิเคราะห์ห้ววิตามินซีและวิตามินอีในพลาสมาที่เวลา 3 สัปดาห์



รูปที่ 4.2 ผลการวิเคราะห์ห้ววิตามินซีและวิตามินอีในพลาสมาที่เวลา 6 สัปดาห์

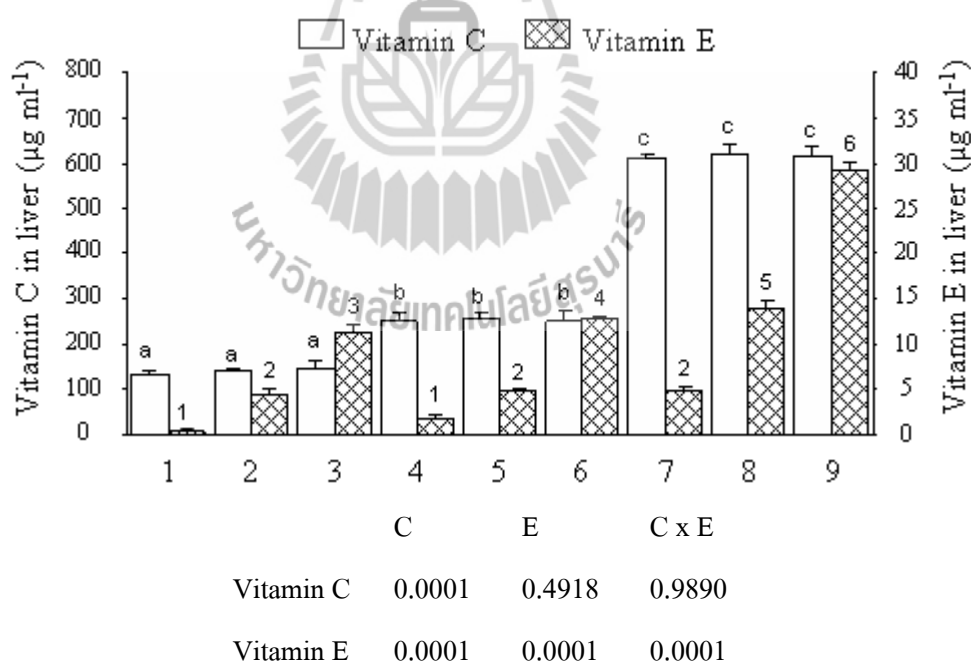
หมายเหตุ: ตัวอักษรที่แตกต่างกันแสดงความแตกต่างทางสถิติของปริมาณวิตามินซี ($P < 0.05$)

ตัวเลขที่แตกต่างกันแสดงความแตกต่างทางสถิติของปริมาณวิตามินอี ($P < 0.05$)

จากผลการวิเคราะห์ปริมาณวิตามินซีและวิตามินอีในพลาสมาที่ระยะเวลา 6 สัปดาห์ ดังรูปที่ 4.2 พบว่าปริมาณวิตามินทั้งสองชนิดในพลาสมาเพิ่มสูงขึ้นตามปริมาณการเสริม เช่นเดียวกันกับที่ระยะเวลา 3 สัปดาห์ นอกจากนี้ยังพบว่าวิตามินซีและวิตามินอีมีอิทธิพลร่วมกันต่อการสะสมปริมาณวิตามินทั้งสองชนิดในพลาสมา โดยพบว่าการเสริมวิตามินซีในระดับที่เพิ่มสูงขึ้นส่งผลให้การสะสมวิตามินอีในพลาสมาเพิ่มสูงขึ้น ในขณะที่เดียวกันการเสริมวิตามินอีในระดับที่สูงขึ้นก็มีผลต่อการเพิ่มปริมาณวิตามินซีในพลาสมาเช่นเดียวกัน

4.1.3 ผลของการเสริมวิตามินซีร่วมกับวิตามินอีในอาหารปลาต่อการสะสมวิตามินซีและวิตามินอีในตับของปลาดุกอุกผสม

ผลการวิเคราะห์ปริมาณวิตามินซีและวิตามินอีในตับที่ระยะเวลา 3 สัปดาห์ ดังรูปที่ 4.3 พบว่าการสะสมวิตามินทั้งสองชนิดมีการเพิ่มขึ้นตามปริมาณการเสริม การวิเคราะห์ปัจจัยร่วมพบว่าวิตามินซีและวิตามินอีมีอิทธิพลร่วมกันต่อการสะสมปริมาณวิตามินอีในตับ โดยพบว่าการเพิ่มขึ้นของปริมาณการเสริมวิตามินซีในอาหารส่งผลให้การสะสมวิตามินอีในตับเพิ่มมากขึ้น

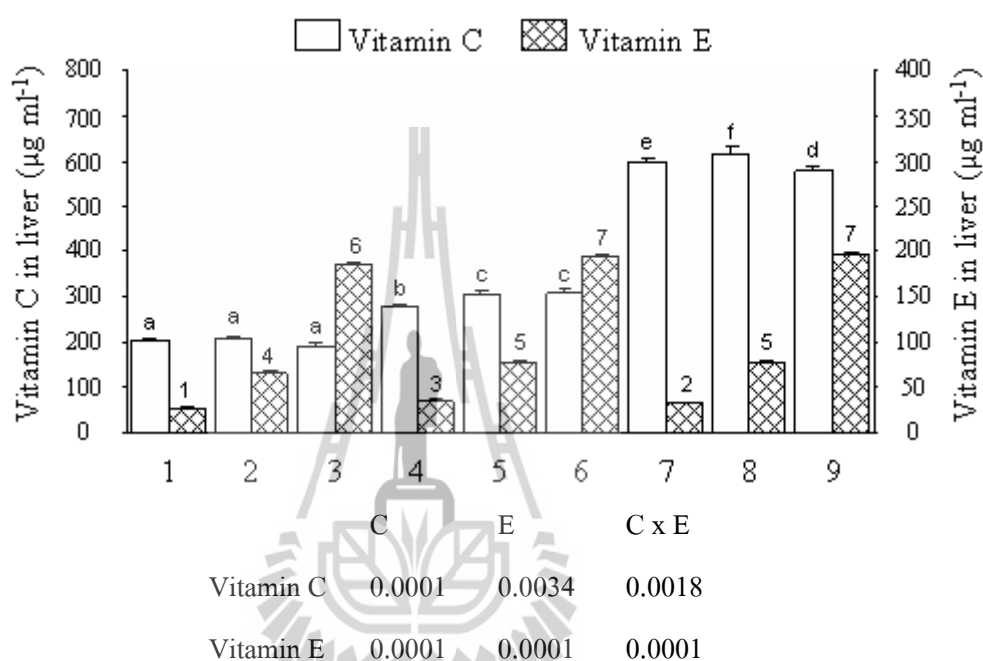


รูปที่ 4.3 ผลการวิเคราะห์วิตามินซีและวิตามินอีในตับที่เวลา 3 สัปดาห์

หมายเหตุ: ตัวอักษรที่ต่างกันแสดงความแตกต่างทางสถิติของปริมาณวิตามินซี ($P < 0.05$)

ตัวเลขที่ต่างกันแสดงความแตกต่างทางสถิติของปริมาณวิตามินอี ($P < 0.05$)

ผลการวิเคราะห์วิตามินซีและวิตามินอีในตับที่เวลา 6 สัปดาห์ ดังรูปที่ 4.4 พบว่าการสะสมวิตามินทั้งสองชนิดในตับมีการเพิ่มขึ้นตามปริมาณการเสริม การวิเคราะห์ปัจจัยร่วมพบว่าวิตามินซีและวิตามินอีมีอิทธิพลร่วมกันต่อการสะสมปริมาณวิตามินทั้งสองชนิดในตับ โดยพบว่าการเพิ่มปริมาณวิตามินซีในอาหารส่งผลให้ปลามีการสะสมวิตามินอีในตับเพิ่มสูงขึ้น ในขณะที่เดียวกันพบว่าการเพิ่มวิตามินอีในอาหารส่งผลให้การสะสมวิตามินซีในตับลดลง



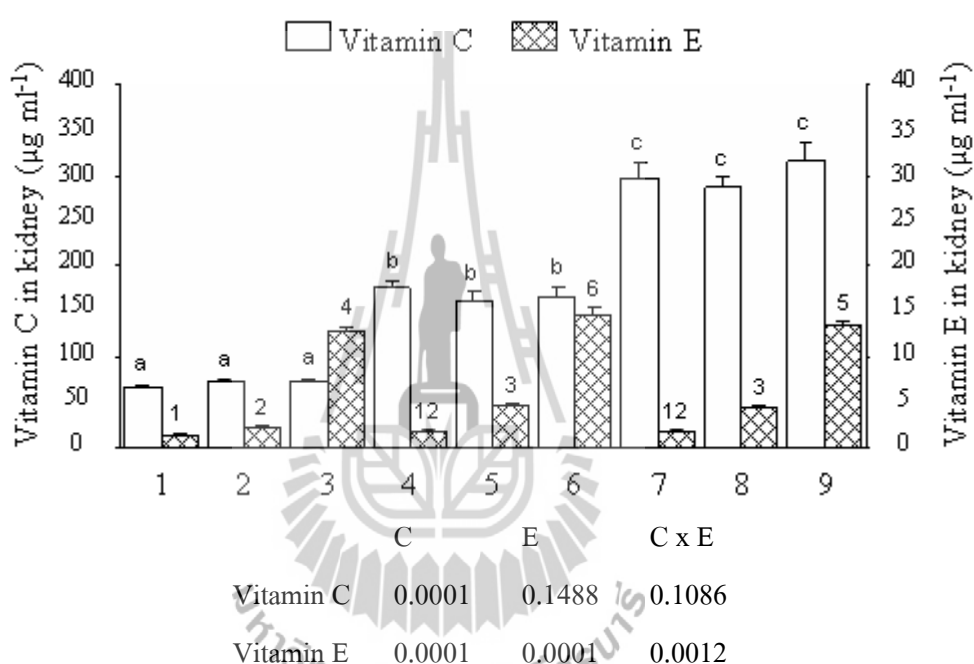
รูปที่ 4.4 ผลการวิเคราะห์วิตามินซีและวิตามินอีในตับที่เวลา 6 สัปดาห์

หมายเหตุ: ตัวอักษรที่แตกต่างกันแสดงความแตกต่างทางสถิติของปริมาณวิตามินซี ($P < 0.05$)

ตัวเลขที่แตกต่างกันแสดงความแตกต่างทางสถิติของปริมาณวิตามินอี ($P < 0.05$)

4.1.4 ผลของการเสริมวิตามินซีร่วมกับวิตามินอีในอาหารปลาต่อการสะสมวิตามินซีและวิตามินอีในไตของปลาดุกอุกผสม

ผลการวิเคราะห์ปริมาณวิตามินซีและวิตามินอีในไตที่ระยะเวลา 3 สัปดาห์ ดังรูปที่ 4.5 พบว่าปริมาณวิตามินทั้งสองชนิดในไตเพิ่มสูงขึ้นตามปริมาณการเสริมในอาหาร เมื่อทำการวิเคราะห์ปัจจัยร่วม พบว่าปริมาณการเสริมวิตามินซีและวิตามินอีมีอิทธิพลร่วมต่อการสะสมปริมาณวิตามินอีในไต โดยพบว่า การเสริมวิตามินซีเพิ่มขึ้นมีผลทำให้การสะสมวิตามินอีในไตลดลง

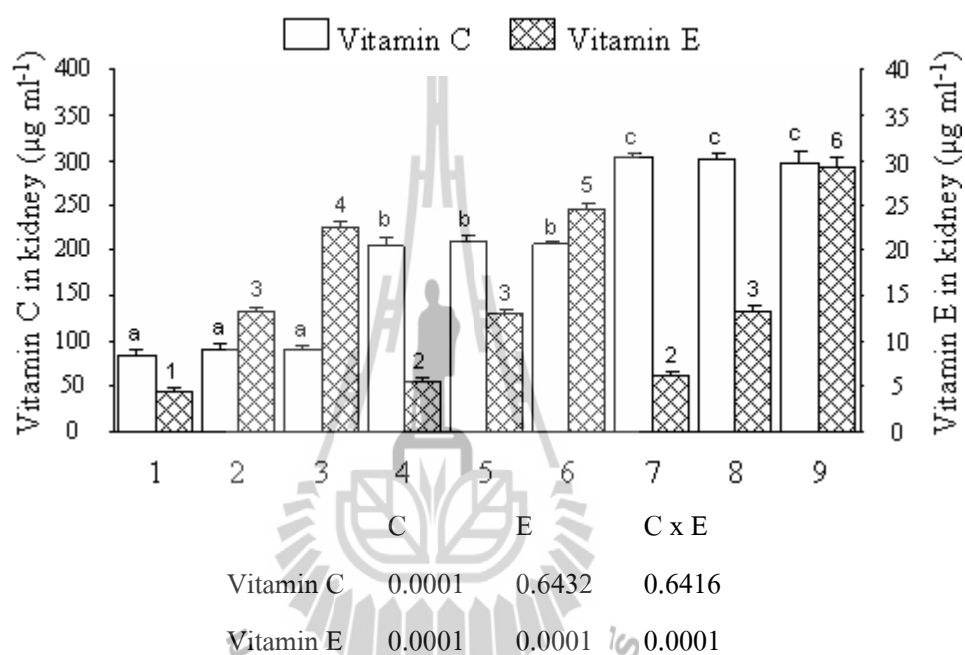


รูปที่ 4.5 ผลการวิเคราะห์วิตามินซีและวิตามินอีในไตที่เวลา 3 สัปดาห์

หมายเหตุ: ตัวอักษรที่ต่างกันแสดงความแตกต่างทางสถิติของปริมาณวิตามินซี ($P < 0.05$)

ตัวเลขที่ต่างกันแสดงความแตกต่างทางสถิติของปริมาณวิตามินอี ($P < 0.05$)

ผลการวิเคราะห์ปริมาณวิตามินซีและวิตามินอีในไตที่ระยะเวลา 6 สัปดาห์ ดังรูปที่ 4.6 พบว่าปริมาณวิตามินทั้งสองชนิดในไตเพิ่มสูงขึ้นตามปริมาณการเสริมในอาหาร เช่นเดียวกันกับที่ระยะเวลา 3 สัปดาห์ เมื่อทำการวิเคราะห์ปัจจัยร่วม พบว่าปริมาณการเสริมวิตามินซีและวิตามินอีมีอิทธิพลร่วมต่อการสะสมปริมาณวิตามินอีในไต โดยพบว่าการเสริมวิตามินซีที่ระดับสูงขึ้นมีผลให้การสะสมวิตามินอีในไตเพิ่มขึ้น ซึ่งพบในกลุ่มการทดลองที่เสริมวิตามินอีระดับ 125 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัมอาหาร (สูตร 3, 6 และ 9)



รูปที่ 4.6 ผลการวิเคราะห์วิตามินซีและวิตามินอีในไตที่เวลา 6 สัปดาห์

หมายเหตุ: ตัวอักษรที่ต่างกันแสดงความแตกต่างทางสถิติของปริมาณวิตามินซี ($P < 0.05$)

ตัวเลขที่ต่างกันแสดงความแตกต่างทางสถิติของปริมาณวิตามินอี ($P < 0.05$)

4.1.5 ผลของการเสริมวิตามินซีร่วมกับวิตามินอีในอาหารปลาต่อค่าโลหิตวิทยาของปลา ที่ถูกผสมที่ได้รับความเครียดจากสภาวะน้ำอุณหภูมิและ pH ต่ำ

ผลการวิเคราะห์ค่าโลหิตวิทยาของปลาที่ได้รับอาหารเสริมวิตามินซีและวิตามินอี เป็นระยะเวลา 4 และ 8 สัปดาห์ แสดงในตารางที่ 4.2 และ 4.3 ตามลำดับ พบว่าในสภาวะที่ไม่ได้รับความเครียดปลาที่มีจำนวนเม็ดเลือดแดง ฮีโมโกลบิน และปริมาตรเม็ดเลือดแดงอัดแน่น (Packed cell volume) หรือ ฮีมาโตคริต (Hematocrit) เพิ่มขึ้นตามปริมาณการเสริมวิตามินซีและวิตามินอี และเมื่อทำการวิเคราะห์ปัจจัยร่วมพบว่าวิตามินซีและวิตามินอีมีอิทธิพลร่วมกันต่อจำนวนเม็ดเลือดแดง และฮีโมโกลบินของปลาปกติที่ระยะเวลา 4 สัปดาห์ ส่วนที่ระยะเวลา 8 สัปดาห์นั้นพบว่าวิตามินซีและวิตามินอีมีอิทธิพลร่วมกันต่อจำนวนเม็ดเลือดแดง ฮีโมโกลบิน และฮีมาโตคริต

ผลการเปรียบเทียบค่าโลหิตวิทยาที่ระยะเวลา 4 สัปดาห์พบว่าเมื่อปลาได้รับความเครียดจากสภาวะน้ำที่มีอุณหภูมิและ pH ต่ำ จะมีจำนวนเม็ดเลือดแดงลดลง และมีปริมาณฮีโมโกลบิน (Hemoglobin) เพิ่มขึ้น เมื่อปลาได้รับการเสริมวิตามินซีและวิตามินอี พบว่าจำนวนเม็ดเลือดแดงมีการเปลี่ยนแปลงทั้งกรณีเพิ่มขึ้นและลดลงจากปกติ เช่นเดียวกันกับค่าฮีโมโกลบินและฮีมาโตคริต

ที่ระยะเวลาการเสริมวิตามิน 8 สัปดาห์ พบว่าปลาที่ได้รับความเครียดมีจำนวนเม็ดเลือดแดง ปริมาณฮีโมโกลบิน และฮีมาโตคริตเพิ่มสูงขึ้นจากปลาปกติ อย่างไรก็ตามเมื่อปลาได้รับการเสริมวิตามินซีและวิตามินอีมีผลทำให้ค่าโลหิตวิทยาของปลาที่ได้รับความเครียดมีทั้งเพิ่มขึ้นและลดลงเช่นเดียวกันกับในสัปดาห์ที่ 4

ตารางที่ 4.2 ผลของการเสริมวิตามินซีและวิตามินอีต่อค่าโลหิตวิทยาของปลาดุกลูกผสมในสภาวะปกติเปรียบเทียบกับสภาวะความเครียดเนื่องจากน้ำที่มีอุณหภูมิและ pH ต่ำ ที่ระยะเวลา 4 สัปดาห์

Diet	RBC (cell $\times 10^{12} \text{ L}^{-1}$)		Hemoglobin (g dl^{-1})		Hematocrit (%)	
	Normal	Stressed	Normal	Stressed	Normal	Stressed
1	2.12 ± 0.09^a	$1.71 \pm 0.13^*$	5.58 ± 0.37^a	$8.88 \pm 0.88^*$	30.00 ± 3.16^a	32.00 ± 9.22
2	2.20 ± 0.09^{ab}	$2.91 \pm 0.19^*$	5.94 ± 0.26^a	$8.88 \pm 0.33^*$	34.60 ± 3.21^b	$46.60 \pm 6.88^*$
3	2.25 ± 0.09^b	2.25 ± 0.14	6.12 ± 0.29^a	$10.32 \pm 1.61^*$	35.20 ± 2.86^b	$39.00 \pm 4.06^*$
4	2.21 ± 0.06^{ab}	$2.46 \pm 0.06^*$	6.10 ± 0.49^a	$8.22 \pm 0.11^*$	36.40 ± 2.07^{bc}	$46.20 \pm 2.17^*$
5	2.57 ± 0.05^c	$2.00 \pm 0.23^*$	7.64 ± 0.67^b	8.78 ± 0.98	37.20 ± 1.30^{bc}	$47.20 \pm 5.45^*$
6	2.56 ± 0.04^c	$2.30 \pm 0.11^*$	8.12 ± 0.43^{bc}	$10.66 \pm 2.02^*$	36.80 ± 1.30^{bc}	$43.40 \pm 2.41^*$
7	2.57 ± 0.06^c	$1.88 \pm 0.20^*$	8.20 ± 0.35^{bc}	7.88 ± 1.15	38.40 ± 1.52^c	$34.20 \pm 2.68^*$
8	2.55 ± 0.05^c	$1.58 \pm 0.10^*$	8.06 ± 0.42^{bc}	7.10 ± 0.89	42.80 ± 1.64^d	$31.00 \pm 4.18^*$
9	2.59 ± 0.07^c	$1.57 \pm 0.04^*$	8.26 ± 0.39^c	$6.32 \pm 0.37^*$	42.80 ± 1.92^d	24.60 ± 5.59
Statistical analysis (<i>P</i> value)						
C	0.0001	0.0001	0.0001	0.0020	0.0001	0.0001
E	0.0001	0.0343	0.0001	0.0001	0.0002	0.0029
CxE	0.0001	0.0097	0.0001	0.6678	0.1298	0.2214

a, b, c, d ตัวอักษรที่ต่างกันมีความแตกต่างทางสถิติภายในแถวตั้ง ($P < 0.05$)

* แสดงความแตกต่างระหว่างปลาปกติและปลาที่ได้รับความเครียด ($P < 0.05$)

ตารางที่ 4.3 ผลของการเสริมวิตามินซีและวิตามินอีต่อค่าโลหิตวิทยาของปลาคูกลูกผสมในสภาวะปกติเปรียบเทียบกับสภาวะความเครียดเนื่องจากน้ำที่มีอุณหภูมิและ pH ต่ำ ที่ระยะเวลา 8 สัปดาห์

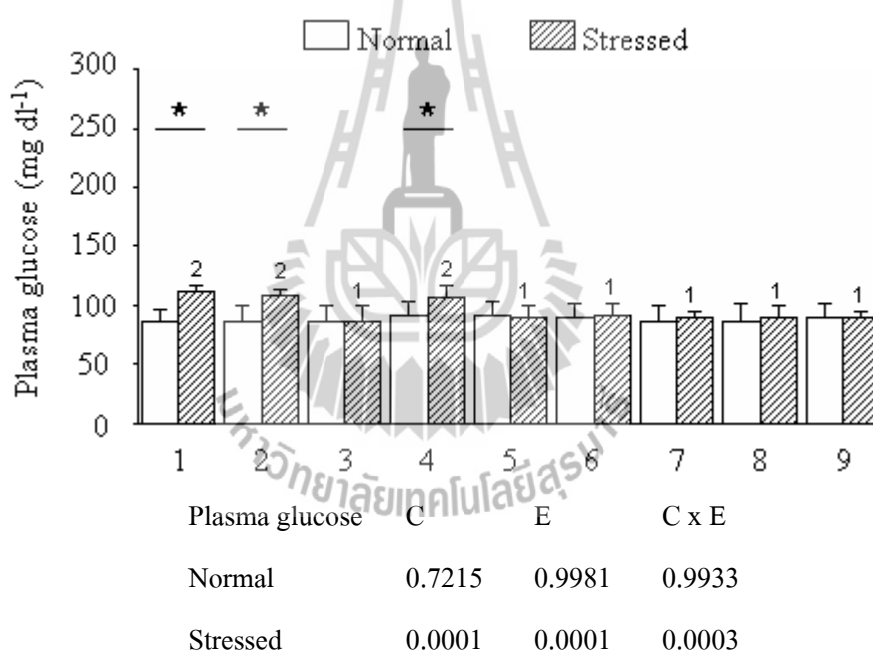
	Diet RBC (cell $\times 10^{12} \text{ L}^{-1}$)		Hemoglobin (g dl^{-1})		Hematocrit (%)	
	Normal	Stressed	Normal	Stressed	Normal	Stressed
1	2.18 ± 0.12^a	$2.9 \pm 0.19^*$	6.50 ± 0.22^a	$13.18 \pm 0.40^*$	31.20 ± 1.64^a	$65.20 \pm 6.83^*$
2	2.55 ± 0.04^b	$1.98 \pm 0.05^*$	8.02 ± 0.42^b	$6.68 \pm 0.30^*$	37.00 ± 2.35^b	37.40 ± 2.70
3	2.63 ± 0.05^b	$1.98 \pm 0.20^*$	8.34 ± 0.53^b	$6.84 \pm 0.78^*$	43.20 ± 1.30^c	48.20 ± 4.66
4	2.62 ± 0.08^b	$2.85 \pm 0.10^*$	8.38 ± 0.40^b	$11.96 \pm 0.34^*$	37.20 ± 2.59^b	38.60 ± 4.16
5	2.61 ± 0.09^b	2.65 ± 0.07	10.50 ± 1.00^c	$12.28 \pm 0.26^*$	42.80 ± 1.92^c	$60.00 \pm 2.92^*$
6	2.61 ± 0.07^b	2.65 ± 0.44	10.98 ± 0.97^c	11.00 ± 1.11	43.00 ± 1.41^c	$34.20 \pm 4.55^*$
7	2.92 ± 0.12^c	$2.58 \pm 0.03^*$	10.92 ± 0.71^c	$12.26 \pm 0.11^*$	43.60 ± 1.52^c	$32.20 \pm 2.17^*$
8	2.96 ± 0.14^c	$2.35 \pm 0.21^*$	11.04 ± 0.67^c	$12.30 \pm 0.25^*$	43.40 ± 2.19^c	39.60 ± 3.36
9	3.02 ± 0.13^c	3.08 ± 0.09	11.24 ± 0.97^c	11.80 ± 0.80	43.40 ± 1.67^c	$55.00 \pm 4.85^*$
Statistical analysis (<i>P</i> value)						
C	0.0001	0.0071	0.0001	0.0001	0.0001	0.0001
E	0.0001	0.1296	0.0001	0.0001	0.0001	0.9530
CxE	0.0001	0.1689	0.0084	0.0001	0.0001	0.0001

^{a, b, c} ตัวอักษรที่แตกต่างกันมีความแตกต่างทางสถิติภายในแนวตั้ง ($P < 0.05$)

* แสดงความแตกต่างระหว่างปลาปกติและปลาที่ได้รับความเครียด ($P < 0.05$)

4.1.6 ผลของการเสริมวิตามินซีร่วมกับวิตามินอีในอาหารปลา ต่อค่าชี้วัดความเครียดของ ปลาอุกอุกผสมที่ได้รับการความเครียดจากสภาวะน้ำอุณหภูมิต่ำและ pH ต่ำ

จากผลการวิเคราะห์ค่ากลูโคสในพลาสมาที่ระยะเวลา 4 สัปดาห์ ในรูปที่ 4.7 พบว่า ปลาที่ไม่ได้รับการเสริมวิตามินมีกลูโคสเพิ่มสูงขึ้นเมื่อได้รับความเครียดจากน้ำที่มีอุณหภูมิและ pH ต่ำ การเสริมวิตามินซีเพียงอย่างเดียวที่ระดับ 1000 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัมอาหาร (สูตร 7) สามารถช่วยให้ปริมาณกลูโคสไม่เพิ่มสูงขึ้นเมื่อได้รับความเครียด เช่นเดียวกันกับการเสริมวิตามินอีเพียงอย่างเดียวที่ระดับ 125 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัมอาหาร (สูตร 3) และพบว่า การเสริมวิตามินซีและวิตามินอีร่วมกันทุกระดับสามารถทำให้ปริมาณกลูโคสในพลาสมาปลาไม่เพิ่มสูงขึ้นเมื่อได้รับความเครียด ผลการวิเคราะห์ปัจจัยร่วมพบว่า วิตามินซีและวิตามินอีมีอิทธิพลร่วมกันต่อปริมาณกลูโคสของปลาที่ได้รับความเครียด

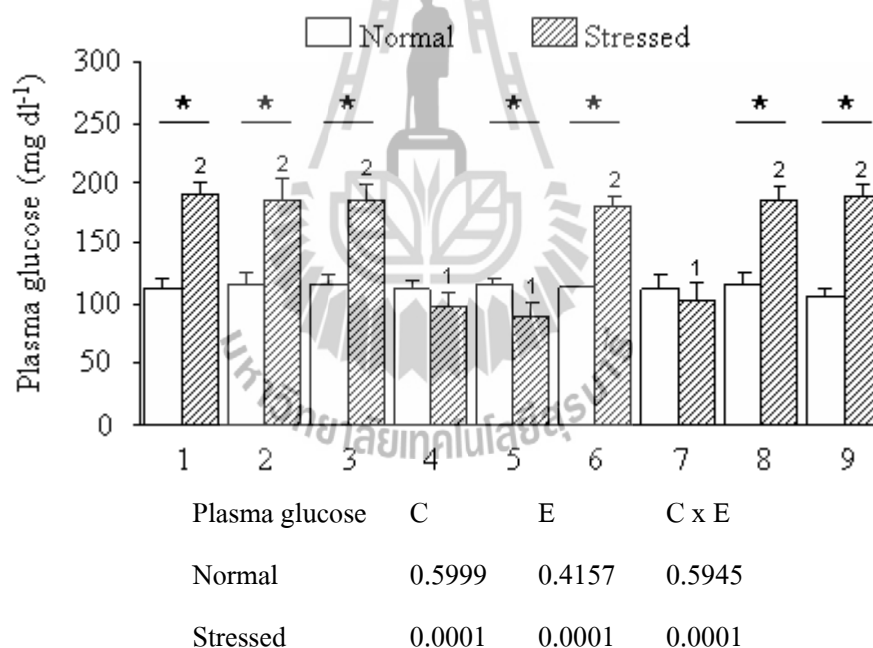


รูปที่ 4.7 ผลการวิเคราะห์ค่ากลูโคสในพลาสมา (Plasma glucose) ของปลาอุกอุกผสมที่ได้รับการเสริมวิตามินซีและวิตามินอีเป็นเวลา 4 สัปดาห์ เปรียบเทียบระหว่างปลาปกติและปลาที่ได้รับความเครียดเนื่องจากน้ำที่มีอุณหภูมิและ pH ต่ำ

หมายเหตุ: * แสดงความแตกต่างระหว่างปลาปกติและปลาที่ได้รับความเครียด ($P < 0.05$)

ตัวเลขที่แตกต่างกันแสดงถึงความแตกต่างทางสถิติของปริมาณวิตามินอี ($P < 0.05$)

ผลการวิเคราะห์ค่ากลูโคสในพลาสมา (Plasma glucose) ของปลาดุกลูกผสมที่ได้รับการเสริมวิตามินซีและวิตามินอีเป็นเวลา 8 สัปดาห์ในรูปที่ 4.8 พบว่าการเสริมวิตามินซีเพียงอย่างเดียวทั้งในระดับ 500 และ 1000 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัมอาหารสามารถช่วยให้ปริมาณกลูโคสในพลาสมาปลาไม่เพิ่มสูงขึ้นเมื่อปลาได้รับความเครียด แต่ในการเสริมวิตามินอีเพียงอย่างเดียวนั้น พบว่าการเสริมทั้งระดับ 62.5 และ 125 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัมอาหาร ไม่สามารถช่วยให้ปลาที่ได้รับความเครียด มีปริมาณกลูโคสเทียบเท่ากับปลาสภาวะปกติได้ ส่วนการเสริมวิตามินซีร่วมกับวิตามินอีนั้น พบว่าการเสริมที่ระดับ 500 + 62.5 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัมอาหาร ส่งผลให้ปลามีปริมาณกลูโคสไม่เพิ่มสูงขึ้นเมื่อได้รับความเครียด แต่การเสริมวิตามินซีและวิตามินอีที่ระดับ 500 + 125, 1000 + 62.5 และ 1000 + 125 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัมอาหาร พบว่าปลามีปริมาณกลูโคสเพิ่มสูงขึ้นเมื่อได้รับความเครียด ผลการวิเคราะห์ปัจจัยร่วมพบว่าวิตามินซีและวิตามินอีมีอิทธิพลร่วมกันต่อปริมาณกลูโคสของปลาที่ได้รับความเครียดเช่นเดียวกับที่ระยะเวลา 4 สัปดาห์



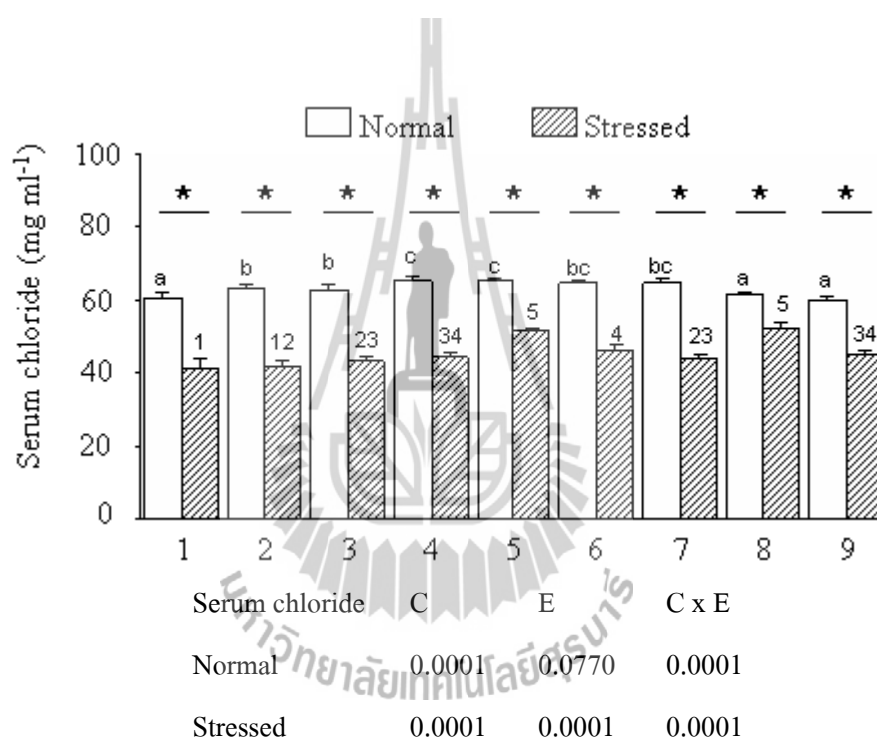
รูปที่ 4.8 ผลการวิเคราะห์ค่ากลูโคสในพลาสมา (Plasma glucose) ของปลาดุกลูกผสมที่ได้รับการเสริมวิตามินซีและวิตามินอีเป็นเวลา 8 สัปดาห์ เปรียบเทียบระหว่างปลาปกติและปลาที่ได้รับความเครียดเนื่องจากน้ำที่มีอุณหภูมิและ pH ต่ำ

หมายเหตุ: * แสดงความแตกต่างระหว่างปลาปกติและปลาที่ได้รับความเครียด ($P < 0.05$)

ตัวเลขที่แตกต่างกันแสดงความแตกต่างทางสถิติของปริมาณวิตามินอี ($P < 0.05$)

จากผลการวิเคราะห์ค่าคลอไรด์ในซีรัม พบว่าปลาที่ได้รับความเครียดจากน้ำที่มีอุณหภูมิและ pH ต่ำในทุกกลุ่มการทดลองมีปริมาณคลอไรด์ในซีรัมลดลงจากปลาภาวะปกติทั้งที่ระยะเวลาการเสริมวิตามิน 4 และ 8 สัปดาห์ ดังรูปที่ 4.9 และ 4.10 ตามลำดับ อย่างไรก็ตามพบว่า การเสริมวิตามินซีและวิตามินอีมีผลต่อการเพิ่มปริมาณคลอไรด์ในซีรัมของปลาในสภาวะปกติทั้งในระยะเวลา 4 และ 8 สัปดาห์

เมื่อทำการวิเคราะห์ปัจจัยร่วม พบว่าการเสริมวิตามินซีและวิตามินอีมีอิทธิพลร่วมกันต่อปริมาณคลอไรด์ในซีรัมของปลากลุ่มปกติและกลุ่มที่ได้รับความเครียดทั้งในระยะเวลา 4 และ 8 สัปดาห์

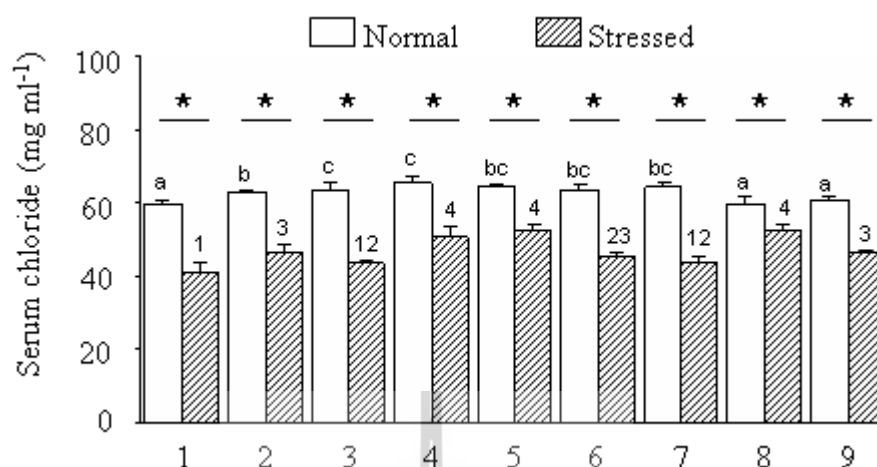


รูปที่ 4.9 ผลการวิเคราะห์ค่าคลอไรด์ในซีรัม (Serum chloride) ของปลาดุกลูกผสมที่ได้รับการเสริมวิตามินซีและวิตามินอีเป็นเวลา 4 สัปดาห์ เปรียบเทียบระหว่างปลาปกติและปลาที่ได้รับความเครียดเนื่องจากน้ำที่มีอุณหภูมิและ pH ต่ำ

หมายเหตุ: * แสดงความแตกต่างระหว่างปลาปกติและปลาที่ได้รับความเครียด ($P < 0.05$)

ตัวอักษรที่แตกต่างกันแสดงความแตกต่างทางสถิติของปริมาณวิตามินซี ($P < 0.05$)

ตัวเลขที่แตกต่างกันแสดงความแตกต่างทางสถิติของปริมาณวิตามินอี ($P < 0.05$)



Serum chloride	C	E	C x E
Normal	0.0001	0.3685	0.0001
Stressed	0.0001	0.0001	0.0001

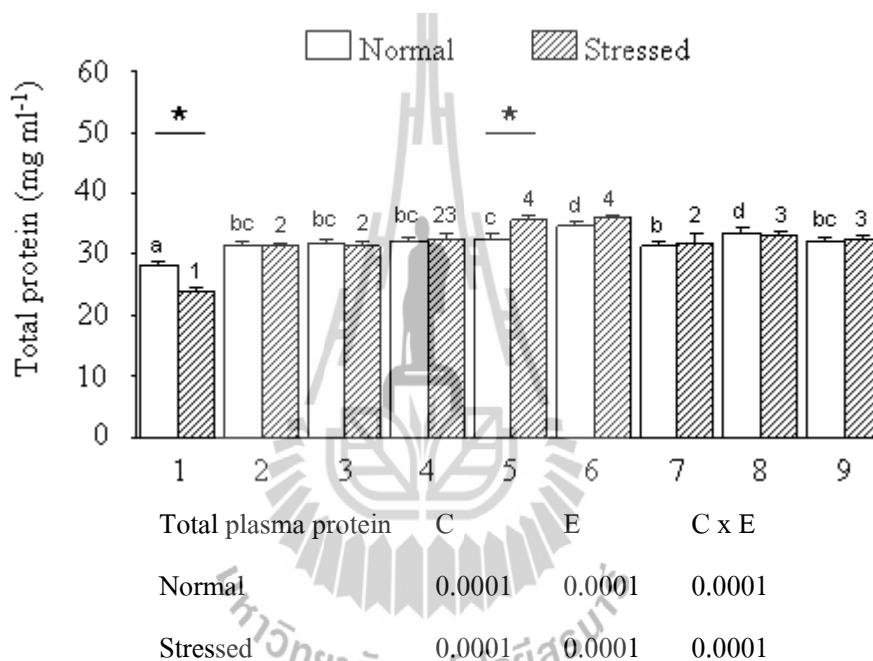
รูปที่ 4.10 ผลการวิเคราะห์ค่าคลอไรด์ในซีรัม (Serum chloride) ของปลาดุกลูกผสมที่ได้รับการเสริมวิตามินซีและวิตามินอีเป็นเวลา 8 สัปดาห์ เปรียบเทียบระหว่างปลาปกติและปลาที่ได้รับความเครียดเนื่องจากน้ำที่มีอุณหภูมิและ pH ต่ำ

หมายเหตุ: * แสดงความแตกต่างระหว่างปลาปกติและปลาที่ได้รับความเครียด ($P < 0.05$)

ตัวอักษรที่แตกต่างกันแสดงความแตกต่างทางสถิติของปริมาณวิตามินซี ($P < 0.05$)

ตัวเลขที่แตกต่างกันแสดงความแตกต่างทางสถิติของปริมาณวิตามินอี ($P < 0.05$)

จากผลการวิเคราะห์ค่าโปรตีนรวมในพลาสมา พบว่าปลาที่ไม่ได้รับวิตามินซีและวิตามินอี มีปริมาณโปรตีนรวมในพลาสมาลดลงเมื่อได้รับความเครียดจากสภาวะน้ำที่อุณหภูมิ และ pH ต่ำ รูปที่ 4.11 แสดงผลที่ระยะเวลาการเสริมวิตามินเป็นเวลา 4 สัปดาห์ พบว่าการเสริมวิตามินซีหรือวิตามินอีอย่างใดอย่างหนึ่งเพียงอย่างเดียว และเสริมทั้งสองชนิดร่วมกันมีผลทำให้ปลา มีปริมาณโปรตีนรวมในพลาสมาไม่ลดต่ำลงเมื่ออยู่ในสภาวะเครียดได้ นอกจากนี้ยังพบว่าโปรตีนรวมในพลาสมาของปลาที่ได้รับการเสริมวิตามินซีร่วมกับวิตามินอีที่ระดับ 500 และ 62.5 มิลลิกรัมต่อ กิโลกรัมอาหารมีค่าสูงขึ้นเมื่อได้รับความเครียด



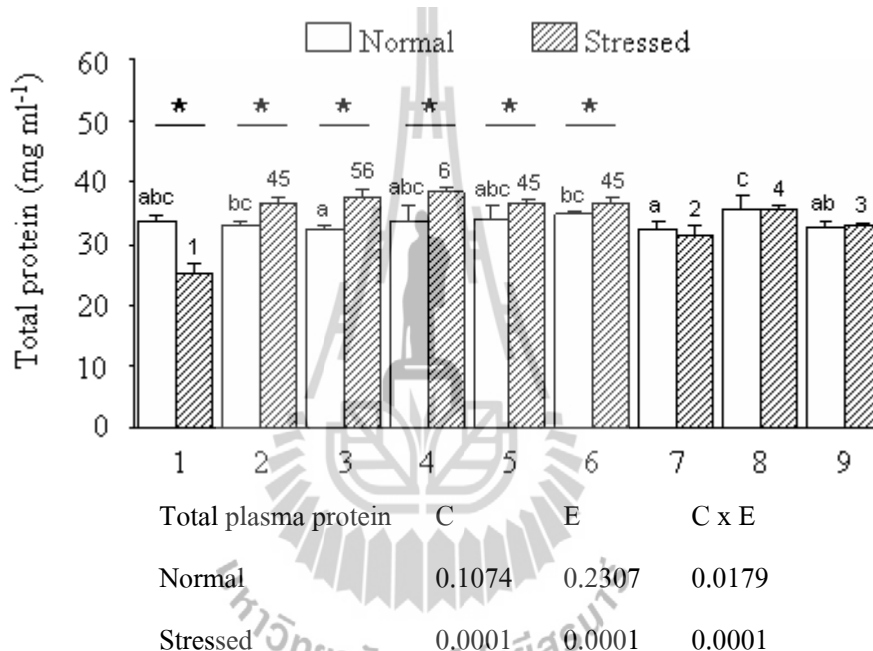
รูปที่ 4.11 ผลการวิเคราะห์ค่าโปรตีนรวมในพลาสมา (Total plasma protein) ของปลาดุกลูกผสมที่ได้รับการเสริมวิตามินซีและวิตามินอีเป็นเวลา 4 สัปดาห์ เปรียบเทียบระหว่างปลาปกติและปลาที่ได้รับความเครียดเนื่องจากน้ำที่มีอุณหภูมิและ pH ต่ำ

หมายเหตุ: * แสดงความแตกต่างระหว่างปลาปกติและปลาที่ได้รับความเครียด ($P < 0.05$)

ตัวอักษรที่แตกต่างกันแสดงความแตกต่างทางสถิติของปริมาณวิตามินซี ($P < 0.05$)

ตัวเลขที่แตกต่างกันแสดงความแตกต่างทางสถิติของปริมาณวิตามินอี ($P < 0.05$)

ผลการวิเคราะห์ค่าโปรตีนรวมในพลาสมา (Total plasma protein) ของปลาอุก ลูกผสมที่ ได้รับการเสริมวิตามินซีและวิตามินอีเป็นเวลา 8 สัปดาห์ แสดงในรูปที่ 4.12 พบว่าการเสริมวิตามินซี หรือวิตามินอีอย่างใดอย่างหนึ่งเพียงอย่างเดียว และเสริมทั้งสองชนิดร่วมกันมีผลทำให้ปลาที่มีปริมาณโปรตีนรวมในพลาสมาไม่ลดต่ำลงเมื่ออยู่ในสภาวะเครียดได้เช่นเดียวกับผลที่ระยะเวลา 4 สัปดาห์ และพบว่าการเสริมวิตามินซีและวิตามินอีทุกระดับขกเว้นการเสริมวิตามินซี 1000 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัมอาหารทั้งในกรณีเสริมอย่างเดียวและเสริมร่วมกับวิตามินอี มีปริมาณโปรตีนรวมในพลาสมาเพิ่มสูงขึ้นเมื่อได้รับความเครียด



รูปที่ 4.12 ผลการวิเคราะห์ค่าโปรตีนรวมในพลาสมา (Total plasma protein) ของปลาอุก ลูกผสมที่ ได้รับการเสริมวิตามินซีและวิตามินอีเป็นเวลา 8 สัปดาห์ เปรียบเทียบระหว่างปลาปกติ และปลาที่ได้รับความเครียดเนื่องจากน้ำที่มีอุณหภูมิและ pH ต่ำ

หมายเหตุ: * แสดงความแตกต่างระหว่างปลาปกติและปลาที่ได้รับความเครียด ($P < 0.05$)

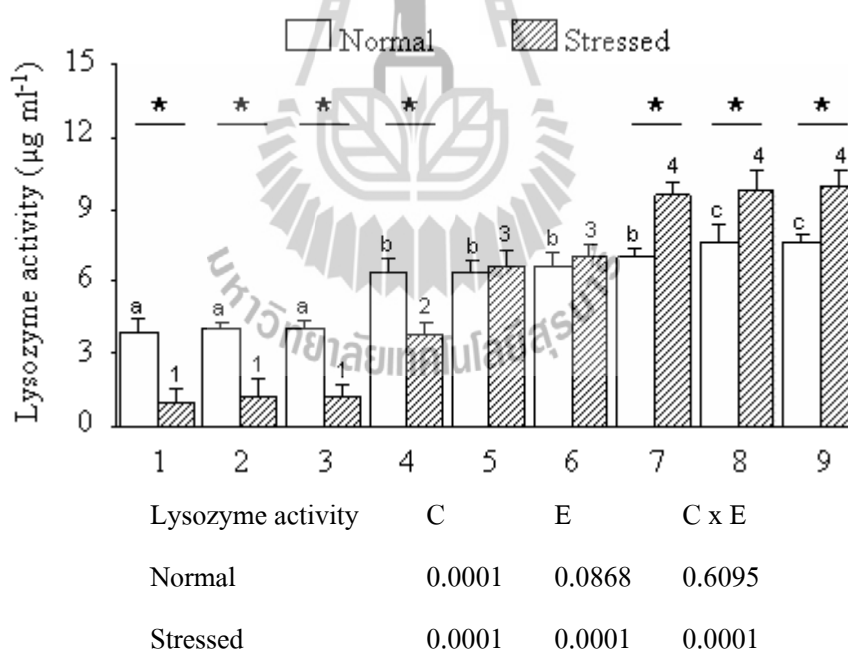
ตัวอักษรที่แตกต่างกันแสดงความแตกต่างทางสถิติของปริมาณวิตามินซี ($P < 0.05$)

ตัวเลขที่แตกต่างกันแสดงความแตกต่างทางสถิติของปริมาณวิตามินอี ($P < 0.05$)

เมื่อทำการวิเคราะห์ปัจจัยร่วม พบว่าการเสริมวิตามินซีและวิตามินอี มีอิทธิพลร่วมกันต่อปริมาณโปรตีนรวมในพลาสมาของปลากลุ่มปกติ และกลุ่มที่ได้รับความเครียด ทั้งในระยะเวลา 4 และ 8 สัปดาห์

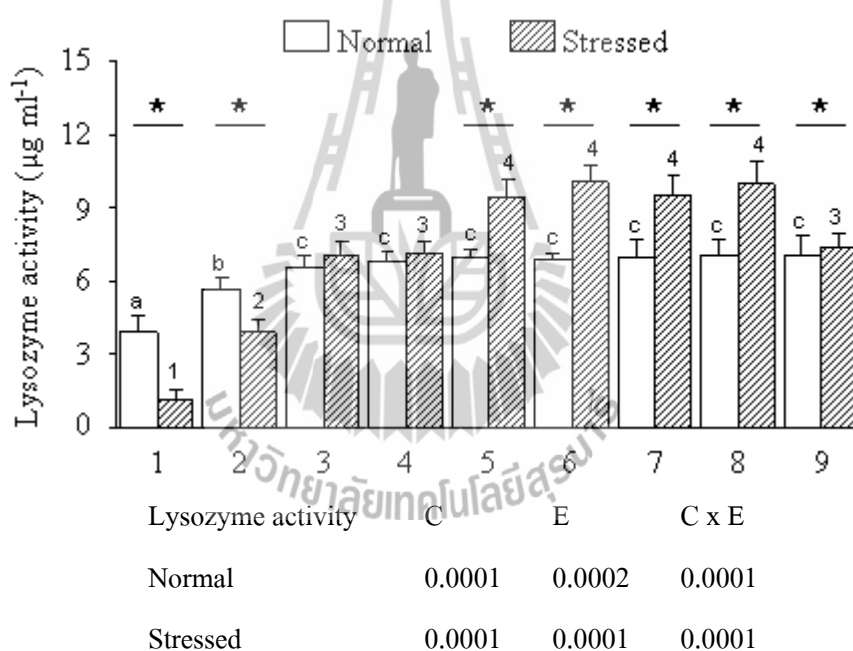
4.1.7 ผลของการเสริมวิตามินซีร่วมกับวิตามินอีในอาหารปลา ต่อค่าภูมิคุ้มกันแบบไม่จำเพาะของปลาดุกลูกผสมที่ได้รับความเครียดจากสภาวะน้ำอุณหภูมิ และ pH ต่ำ

ผลการวิเคราะห์การทำงานของไลโซไซม์ พบว่าปลาที่ไม่ได้รับวิตามินซีและวิตามินอีมีการทำงานของไลโซไซม์ลดลงเมื่อได้รับความเครียด ผลการวิเคราะห์การทำงานของไลโซไซม์ (Lysozyme activity) ของปลาดุกลูกผสมที่ได้รับการเสริมวิตามินซีและวิตามินอีเป็นเวลา 4 สัปดาห์แสดงในรูปที่ 4.13 พบว่าการเสริมวิตามินซีเพียงอย่างเดียวที่ระดับ 1000 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัมอาหารช่วยให้ปลาการทำงานของไลโซไซม์ไม่ลดลงเมื่อปลาได้รับความเครียด แต่การเสริมวิตามินอีเพียงอย่างเดียวไม่ช่วยให้ปลาการทำงานของไลโซไซม์ที่เทียบเท่ากับปลาปกติได้ อย่างไรก็ตามการเสริมวิตามินซีและวิตามินอีร่วมกันทุกระดับสามารถช่วยให้ปลาการทำงานของไลโซไซม์ไม่ลดต่ำลงเมื่อปลาอยู่ในสภาวะเครียดได้ นอกจากนี้ยังพบว่าการเสริมวิตามินซีที่ระดับ 1000 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัมอาหารเพียงอย่างเดียว และการเสริมร่วมกับวิตามินอีระดับ 62.5 และ 125 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัมมีผลให้การทำงานของไลโซไซม์ของปลาที่ได้รับความเครียดมีการเพิ่มสูงขึ้นกว่าปลาในสภาวะปกติ



รูปที่ 4.13 ผลการวิเคราะห์การทำงานของไลโซไซม์ (Lysozyme activity) ของปลาดุกลูกผสมที่ได้รับการเสริมวิตามินซีและวิตามินอีเป็นเวลา 4 สัปดาห์ เปรียบเทียบระหว่างปลาปกติและปลาที่ได้รับความเครียดเนื่องจากน้ำที่มีอุณหภูมิและ pH ต่ำ

ผลการวิเคราะห์การทำงานของไลโซไซม์ (Lysozyme activity) ของปลาฉลาม ปลาฉลามที่ได้รับวิตามินซีและวิตามินอีเป็นเวลา 8 สัปดาห์ ในรูปที่ 4.14 พบว่าการเสริมวิตามินซีเพียงอย่างเดียวทั้งในระดับ 500 และ 1000 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัมอาหารช่วยให้ปลาการทำงานของไลโซไซม์ไม่ลดลง เมื่อปลาได้รับความเครียดเช่นเดียวกับการเสริมวิตามินอีเพียงอย่างเดียวที่ระดับ 125 กรัมต่อมิลลิกรัมอาหาร สามารถช่วยให้ปลาการทำงานของไลโซไซม์ที่เทียบเท่ากับปลาปกติได้ นอกจากนี้ยังพบว่าวิตามินซีและวิตามินอีรวมกันทุกระดับสามารถช่วยให้ปลาการทำงานของไลโซไซม์ไม่ลดต่ำลงเมื่อปลาอยู่ในสภาวะเครียดได้ ยิ่งไปกว่านั้นยังพบว่าวิตามินซีที่ระดับ 1000 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัมอาหารเพียงอย่างเดียวและการเสริมวิตามินซีร่วมกับวิตามินอีทุกระดับมีผลให้การทำงานของไลโซไซม์ของปลาที่ได้รับความเครียดมีการเพิ่มขึ้นสูงกว่าปลาในสภาวะปกติอีกด้วย



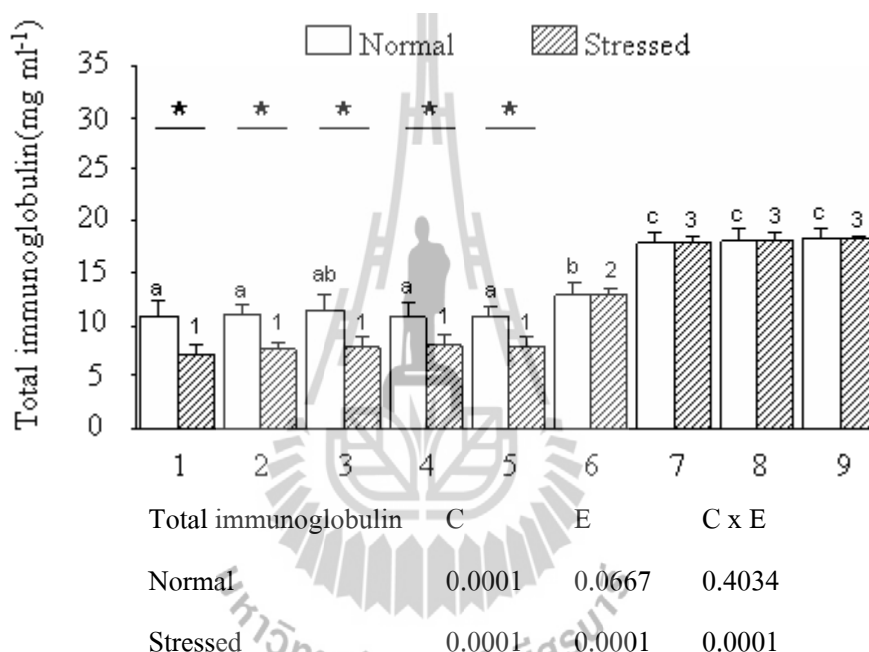
รูปที่ 4.14 ผลการวิเคราะห์การทำงานของไลโซไซม์ (Lysozyme activity) ของปลาฉลามที่ได้รับวิตามินซีและวิตามินอีเป็นเวลา 8 สัปดาห์ เปรียบเทียบระหว่างปลาปกติและปลาที่ได้รับความเครียดเนื่องจากน้ำที่มีอุณหภูมิและ pH ต่ำ

หมายเหตุ: * แสดงความแตกต่างระหว่างปลาปกติและปลาที่ได้รับความเครียด ($P < 0.05$)

ตัวอักษรที่แตกต่างกันแสดงความแตกต่างทางสถิติของปริมาณวิตามินซี ($P < 0.05$)

ตัวเลขที่แตกต่างกันแสดงความแตกต่างทางสถิติของปริมาณวิตามินอี ($P < 0.05$)

ผลการวิเคราะห์หีอิมมูโนโกลบูลินรวม(Total immunoglobulin) พบว่าปลาที่ได้รับ ความเครียดจะมีปริมาณอิมมูโนโกลบูลินรวมลดลงจากปลาปกติ เมื่อได้รับการเสริมวิตามินเป็น ระยะเวลา 4 สัปดาห์ พบว่าการเสริมวิตามินซีเพียงอย่างเดียวไม่สามารถทำให้ปลามีค่าอิมมูโนโกลบู ลินรวมเทียบเท่ากับปลาปกติได้เมื่อได้รับความเครียด ส่วนการเสริมวิตามินซีเพียงอย่างเดียว นั้น สามารถช่วยให้ปริมาณอิมมูโนโกลบูลินรวมของปลาที่ได้รับ ความเครียดมีค่าไม่ลดลงจากปลาปกติ เมื่อเสริมที่ระดับ 1000 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัมอาหาร การเสริมวิตามินซีร่วมกับวิตามินอีที่ระดับ 500 + 125, 1000 + 62.5 และ 1000 + 125 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัมอาหาร ดังรูปที่ 4.15



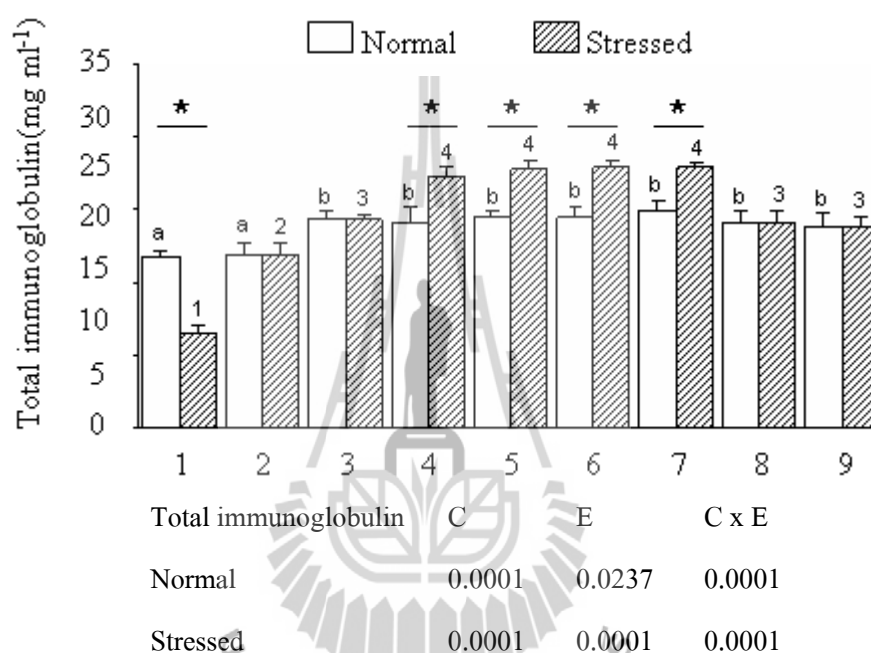
รูปที่ 4.15 ผลการวิเคราะห์หีอิมมูโนโกลบูลินรวม (Total immunoglobulin) ของปลาคูกลูกผสมที่ ได้รับการเสริมวิตามินซีและวิตามินอีเป็นเวลา 4 สัปดาห์ เปรียบเทียบระหว่างปลาปกติ และปลาที่ได้รับความเครียดเนื่องจากน้ำที่มีอุณหภูมิและ pH ต่ำ

หมายเหตุ: * แสดงความแตกต่างระหว่างปลาปกติและปลาที่ได้รับความเครียด ($P < 0.05$)

ตัวอักษรที่แตกต่างกันแสดงความแตกต่างทางสถิติของปริมาณวิตามินซี ($P < 0.05$)

ตัวเลขที่แตกต่างกันแสดงความแตกต่างทางสถิติของปริมาณวิตามินอี ($P < 0.05$)

ผลการวิเคราะห์ห่อิมมูโนโกลบูลินรวม (Total immunoglobulin) ของปลาดุกลูกผสมที่ได้รับการเสริมวิตามินซีและวิตามินอีเป็นเวลา 8 สัปดาห์ในรูปที่ 4.16 พบว่าการเสริมวิตามินซีและวิตามินอีทั้งในกรณีเสริมเพียงชนิดเดียว และเสริมร่วมกันมีผลให้ปลาที่ได้รับความเครียดมีค่าอิมมูโนโกลบูลินรวมไม่ลดลงเมื่อเทียบกับปลาปกติได้ นอกจากนี้ยังพบว่าการเสริมวิตามินซีเพียงอย่างเดียวและการเสริมวิตามินซีร่วมกับวิตามินอีที่ระดับ 500 + 62.5 และ 500 + 125 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัมอาหารมีผลให้ค่าอิมมูโนโกลบูลินรวมของปลาที่ได้รับความเครียดเพิ่มสูงขึ้นจากปลาปกติ



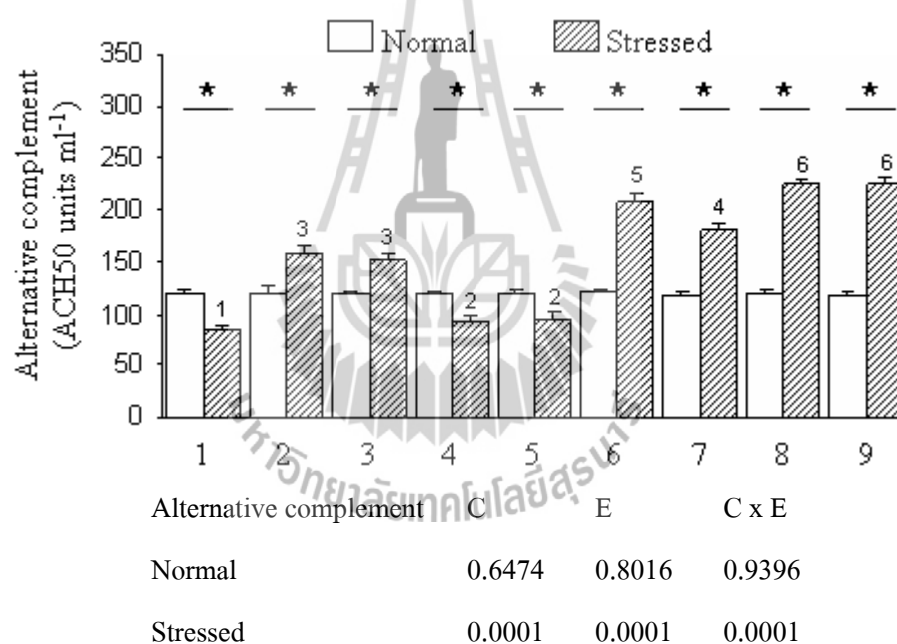
รูปที่ 4.16 ผลการวิเคราะห์ห่อิมมูโนโกลบูลินรวม (Total immunoglobulin) ของปลาดุกลูกผสมที่ได้รับการเสริมวิตามินซีและวิตามินอีเป็นเวลา 8 สัปดาห์ เปรียบเทียบระหว่างปลาปกติและปลาที่ได้รับความเครียดเนื่องจากน้ำที่มีอุณหภูมิและ pH ต่ำ

หมายเหตุ: * แสดงความแตกต่างระหว่างปลาปกติและปลาที่ได้รับความเครียด ($P < 0.05$)

ตัวอักษรที่ต่างกันแสดงความแตกต่างทางสถิติของปริมาณวิตามินซี ($P < 0.05$)

ตัวเลขที่ต่างกันแสดงความแตกต่างทางสถิติของปริมาณวิตามินอี ($P < 0.05$)

จากผลการวิเคราะห์ประสิทธิภาพการทำงานของคอมพลีเมนต์พบว่าปลาที่ไม่ได้รับการเสริมวิตามินซีและวิตามินอีมีประสิทธิภาพการทำงานของคอมพลีเมนต์ลดลงจากปลาปกติเมื่อได้รับความเครียด รูปที่ 4.17 แสดงผลการวิเคราะห์ประสิทธิภาพการทำงานของคอมพลีเมนต์ (Alternative complement) ของปลาคูกลูกผสมที่ได้รับการเสริมวิตามินซีและวิตามินอีเป็นเวลา 4 สัปดาห์ พบว่าการเสริมวิตามินซีเพียงอย่างเดียวที่ระดับ 1000 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัมอาหาร ทำให้ปลาที่ได้รับความเครียดมีประสิทธิภาพการทำงานของคอมพลีเมนต์ไม่ลดลงเมื่อเทียบกับปลาปกติ การเสริมวิตามินอีเพียงอย่างเดียวพบว่าทั้งระดับ 62.5 และ 125 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัมอาหารทำให้ปลาที่มีประสิทธิภาพการทำงานของคอมพลีเมนต์ไม่ลดลงเมื่อได้รับความเครียด เช่นเดียวกันกับการเสริมวิตามินซีและวิตามินอีร่วมกันที่ระดับ 500 + 125, 1000 + 62.5 และ 1000 + 125 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัมอาหาร

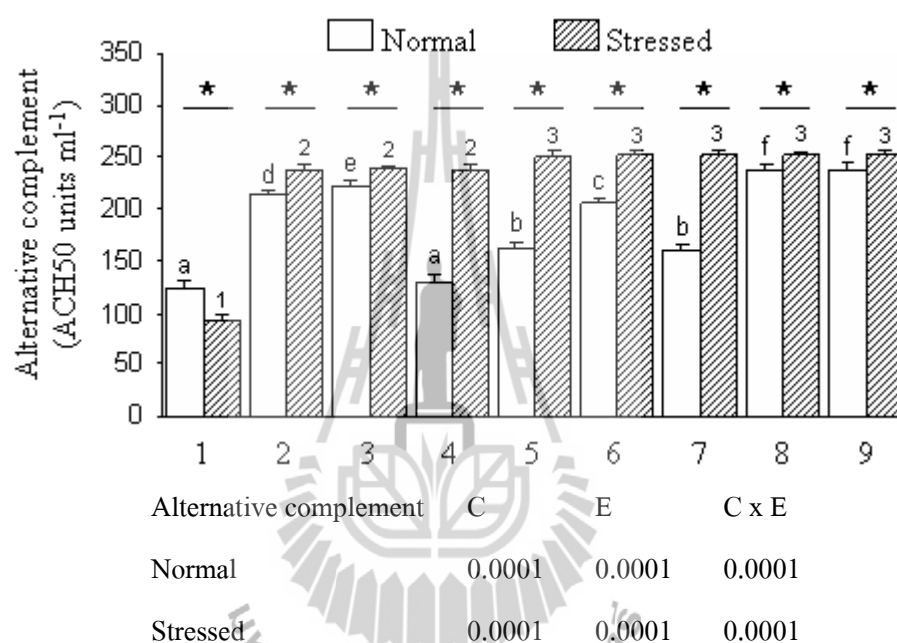


รูปที่ 4.17 ผลการวิเคราะห์ประสิทธิภาพการทำงานของคอมพลีเมนต์ (Alternative complement) ของปลาคูกลูกผสมที่ได้รับการเสริมวิตามินซีและวิตามินอีเป็นเวลา 4 สัปดาห์ เปรียบเทียบระหว่างปลาปกติและปลาที่ได้รับความเครียดเนื่องจากน้ำที่มีอุณหภูมิและ pH ต่ำ

หมายเหตุ: * แสดงความแตกต่างระหว่างปลาปกติและปลาที่ได้รับความเครียด ($P < 0.05$)

ตัวเลขที่แตกต่างกันแสดงถึงความแตกต่างทางสถิติของปริมาณวิตามินอี ($P < 0.05$)

ผลการวิเคราะห์ประสิทธิภาพการทำงานของคอมพลีเมนต์ (Alternative complement) ของปลาดุกลูกผสมที่ได้รับการเสริมวิตามินซีและวิตามินอีเป็นเวลา 8 สัปดาห์ แสดงในรูปที่ 4.18 พบว่าการเสริมวิตามินซีและวิตามินอีทั้งในกรณีเสริมเพียงชนิดเดียว และเสริมร่วมกัน มีผลให้ปลาที่ได้รับความเครียดมีประสิทธิภาพการทำงานของคอมพลีเมนต์ไม่ลดลงเมื่อเทียบกับปลาปกติได้ อีกทั้งยังพบว่าปลาที่มีประสิทธิภาพการทำงานของคอมพลีเมนต์เพิ่มสูงขึ้นจากปลาปกติอีกด้วย



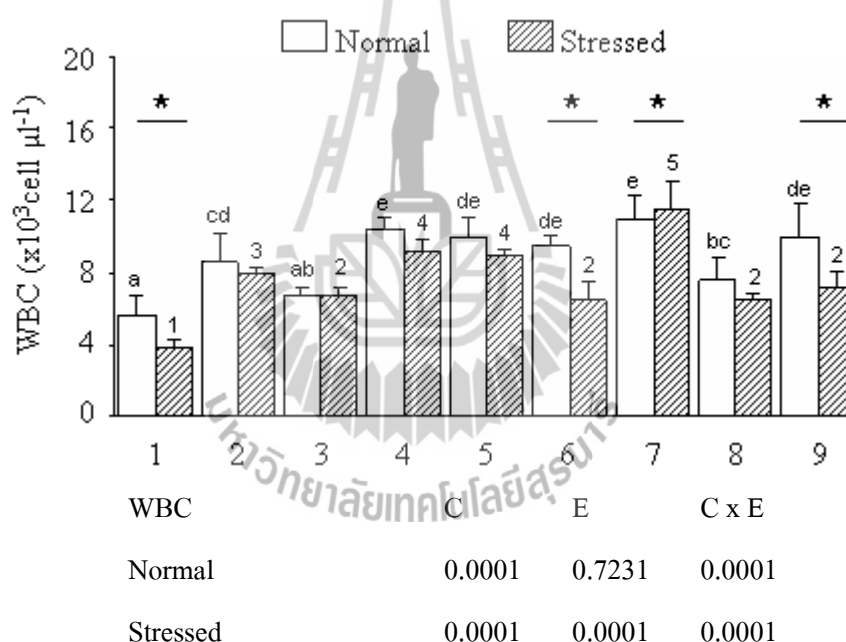
รูปที่ 4.18 ผลการวิเคราะห์ประสิทธิภาพการทำงานของคอมพลีเมนต์ (Alternative complement) ของปลาดุกลูกผสมที่ได้รับการเสริมวิตามินซีและวิตามินอีเป็นเวลา 8 สัปดาห์ เปรียบเทียบระหว่างปลาปกติและปลาที่ได้รับความเครียดเนื่องจากน้ำที่มีอุณหภูมิและ pH ต่ำ

หมายเหตุ: * แสดงความแตกต่างระหว่างปลาปกติและปลาที่ได้รับความเครียด ($P < 0.05$)

ตัวอักษรที่ต่างกันแสดงความแตกต่างทางสถิติของปริมาณวิตามินซี ($P < 0.05$)

ตัวเลขที่ต่างกันแสดงความแตกต่างทางสถิติของปริมาณวิตามินอี ($P < 0.05$)

จากผลการวิเคราะห์จำนวนเม็ดเลือดขาว (WBC) ของปลาที่ได้รับการเสริมวิตามินซีและวิตามินอีที่ระยะเวลา 4 สัปดาห์ ดังรูปที่ 4.19 พบว่าการเสริมวิตามินทั้งในกรณีเสริมเพียงชนิดเดียว และเสริมร่วมกันส่งผลให้ปลาในสภาวะปกติมีจำนวนเม็ดเลือดขาวเพิ่มขึ้นจากกลุ่มที่ไม่เสริม ยกเว้นการเสริมวิตามินอีเพียงอย่างเดียวที่ระดับ 125 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัมอาหารพบว่าปลามีจำนวนเม็ดเลือดขาวไม่แตกต่างจากปลาที่ไม่ได้รับการเสริมวิตามิน เมื่อวิเคราะห์ปัจจัยร่วม พบว่าวิตามินซีและวิตามินอีมีอิทธิพลร่วมกันต่อจำนวนเม็ดเลือดขาวของปลาในสภาวะปกติ เมื่อปลาได้รับความเครียดพบว่าปลามีจำนวนเม็ดเลือดขาวลดลงจากปลาปกติ การเสริมวิตามินซีและวิตามินอีมีผลทำให้ปลามีจำนวนเม็ดเลือดขาวไม่ลดลงเมื่อได้รับความเครียด แต่พบว่าการเสริมวิตามินซีร่วมกับวิตามินอีที่ระดับ 500 + 125 และ 1000 + 125 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัมอาหาร มีผลให้จำนวนเม็ดเลือดขาวลดลงเมื่อปลาได้รับความเครียด



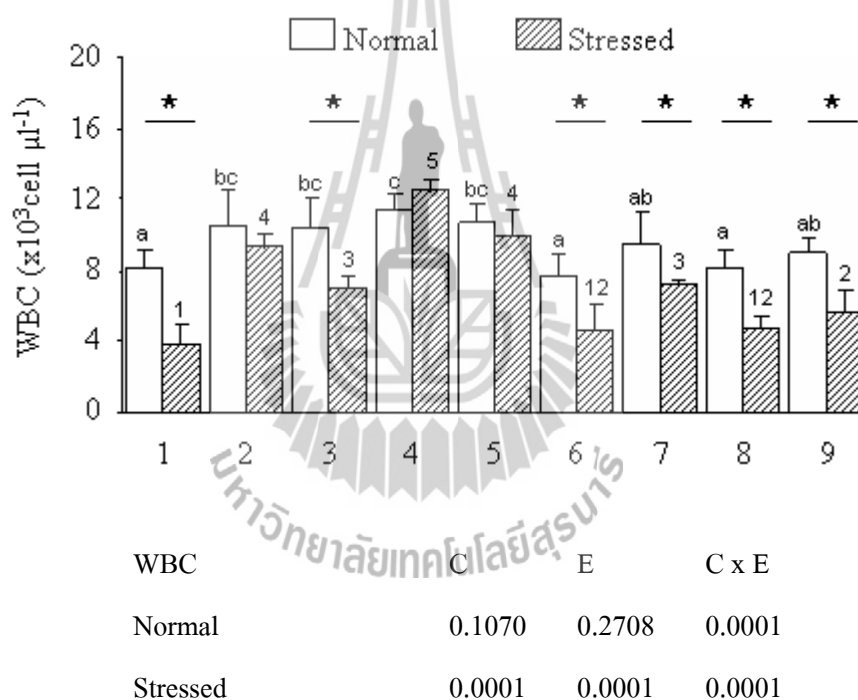
รูปที่ 4.19 ผลการวิเคราะห์จำนวนเม็ดเลือดขาว (WBC) ของปลาคูกลูกผสมที่ได้รับการเสริมวิตามินซีและวิตามินอีเป็นเวลา 4 สัปดาห์ เปรียบเทียบระหว่างปลาปกติและปลาที่ได้รับความเครียดเนื่องจากน้ำที่มีอุณหภูมิและ pH ต่ำ

หมายเหตุ: * แสดงความแตกต่างระหว่างปลาปกติและปลาที่ได้รับความเครียด ($P < 0.05$)

ตัวอักษรที่แตกต่างกันแสดงความแตกต่างทางสถิติของปริมาณวิตามินซี ($P < 0.05$)

ตัวเลขที่แตกต่างกันแสดงความแตกต่างทางสถิติของปริมาณวิตามินอี ($P < 0.05$)

ผลการวิเคราะห์จำนวนเม็ดเลือดขาว (WBC) ของปลาดุกลูกผสมที่ได้รับการเสริมวิตามินซีและวิตามินอีเป็นเวลา 8 สัปดาห์แสดงในรูปที่ 4.20 พบว่าการเสริมวิตามินซีเพียงอย่างเดียวที่ระดับ 500 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัมอาหารส่งผลให้จำนวนเม็ดเลือดขาวเพิ่มขึ้น แต่ในการเสริมวิตามินซีเพียงอย่างเดียวที่ระดับ 1000 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัมอาหาร พบว่าจำนวนเม็ดเลือดขาวไม่แตกต่างจากปลากลุ่มที่ไม่ได้รับการเสริม การเสริมวิตามินอีเพียงอย่างเดียว พบว่ามีผลให้จำนวนเม็ดเลือดขาวเพิ่มขึ้นทั้งในระดับ 62.5 และ 125 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัมอาหาร การเสริมวิตามินซีร่วมกับวิตามินอีที่ระดับ 500 + 62.5 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัมอาหาร มีผลให้จำนวนเม็ดเลือดขาวเพิ่มขึ้น แต่การเสริมวิตามินทั้งสองชนิดร่วมกันในระดับที่สูงขึ้น (500 + 125, 1000 + 62.5 และ 1000 + 125) มีจำนวนเม็ดเลือดขาวไม่แตกต่างจากกลุ่มที่ไม่ได้รับการเสริมวิตามิน



รูปที่ 4.20 ผลการวิเคราะห์จำนวนเม็ดเลือดขาว (WBC) ของปลาดุกลูกผสมที่ได้รับการเสริมวิตามินซีและวิตามินอีเป็นเวลา 8 สัปดาห์ เปรียบเทียบระหว่างปลาปกติและปลาที่ได้รับความเครียดเนื่องจากน้ำที่มีอุณหภูมิและ pH ต่ำ

หมายเหตุ: * แสดงความแตกต่างระหว่างปลาปกติและปลาที่ได้รับความเครียด ($P < 0.05$)

ตัวอักษรที่ต่างกันแสดงความแตกต่างทางสถิติของปริมาณวิตามินซี ($P < 0.05$)

ตัวเลขที่ต่างกันแสดงความแตกต่างทางสถิติของปริมาณวิตามินอี ($P < 0.05$)

ในสภาวะที่ปลาได้รับความเครียดส่งผลให้จำนวนเม็ดเลือดขาวลดต่ำลง การเสริมวิตามินซีที่ระดับ 500 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัมอาหารพบว่าปลาที่ได้รับความเครียดมีจำนวนเม็ดเลือดขาวไม่แตกต่างจากปลาสภาวะปกติ เช่นเดียวกันกับการเสริมวิตามินอีเพียงอย่างเดียวที่ระดับ 62.5 และการเสริมวิตามินซีร่วมกับวิตามินอีที่ระดับ $500 + 62.5$ มิลลิกรัมต่อกิโลกรัมอาหาร การเสริมวิตามินในระดับสูงทั้งในกรณีการเสริมเพียงชนิดเดียว (วิตามินซี 1000, วิตามินอี 125, วิตามินซีและวิตามินอี $500 + 125$, $1000 + 62.5$, $1000 + 125$ มิลลิกรัมต่อกิโลกรัมอาหาร) และการเสริมร่วมกันพบว่าจำนวนเม็ดเลือดขาวของปลาที่ได้รับความเครียดลดต่ำลงจากปลาสภาวะปกติ

จากผลการวิเคราะห์จำนวนเม็ดเลือดขาวแบบแยกชนิดของปลาที่ระยะเวลา 4 สัปดาห์ในตารางที่ 4.4 พบว่าเมื่อปลาได้รับความเครียดจะส่งผลให้จำนวนเม็ดเลือดขาวชนิด Lymphocyte ลดลง การเสริมวิตามินซีเพียงอย่างเดียวทั้งในระดับ 500 และ 1000 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัมอาหาร ทำให้จำนวนเม็ดเลือดขาวชนิด Lymphocyte ของปลาที่ได้รับความเครียดไม่ลดลงได้ นอกจากนี้ยังพบว่า การเสริมวิตามินซีที่ระดับ 1000 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัมอาหาร มีผลทำให้จำนวนเม็ดเลือดขาวชนิด Lymphocyte ของปลาที่ได้รับความเครียด เพิ่มขึ้นจากปลาปกติอีกด้วย ส่วนการเสริมวิตามินอีเพียงอย่างเดียวที่ระดับ 125 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัมอาหาร สามารถช่วยให้ปลามีจำนวนเม็ดเลือดขาวชนิด Lymphocyte ไม่ลดลงเมื่อได้รับความเครียด การเสริมวิตามินซีและวิตามินอีร่วมกันพบว่าทำให้ปลามีจำนวนเม็ดเลือดขาวชนิด Lymphocyte ไม่ลดลง แต่ในการเสริมวิตามินซีและวิตามินอีที่ระดับ $1000 + 125$ พบว่ามีผลให้ปลาที่ได้รับความเครียดมีจำนวนเม็ดเลือดขาวชนิด Lymphocyte ลดลงจากปลาปกติ

เมื่อปลาได้รับความเครียดมีผลให้จำนวนเม็ดเลือดขาวชนิด Neutrophil เพิ่มขึ้นจากปลาปกติ การเสริมวิตามินซีเพียงอย่างเดียวช่วยให้ปลามีจำนวนเม็ดเลือดขาวชนิด Neutrophil ไม่แตกต่างจากปลาปกติทั้งในระดับ 500 และ 1000 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัมอาหาร ส่วนในการเสริมวิตามินอีเพียงอย่างเดียวพบว่าที่ระดับ 125 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัมอาหารสามารถช่วยให้ปลามีจำนวนเม็ดเลือดขาวชนิด Neutrophil ของปลาที่ได้รับความเครียดไม่แตกต่างจากปลาปกติ ในการเสริมวิตามินทั้งสองชนิดร่วมกันพบว่าการเสริมทุกระดับมีผลให้ปลามีจำนวนเม็ดเลือดขาวชนิด Neutrophil ไม่เพิ่มขึ้นเมื่อได้รับความเครียด

ตารางที่ 4.4 ผลของการเสริมวิตามินซีและวิตามินอีต่อจำนวนเม็ดเลือดขาวชนิด Lymphocyte, Neutrophil และ Monocyte ของปลาดุกลูกผสมในสภาวะปกติเปรียบเทียบกับสภาวะที่ได้รับความเครียดเนื่องจากน้ำที่มีอุณหภูมิและ pH ต่ำ ที่ระยะเวลา 4 สัปดาห์

	Diet Lymphocyte		Neutrophil		Monocyte	
	Normal	Stressed	Normal	Stressed	Normal	Stressed
1	4.14 ± 1.10 ^a	2.20 ± 0.36 *	1.16 ± 0.25 ^a	1.58 ± 0.13 *	0.32 ± 0.17 ^a	0.12 ± 0.07 *
2	6.03 ± 1.47 ^{bcd}	4.70 ± 0.30 *	1.92 ± 0.29 ^{bc}	2.79 ± 0.48 *	0.57 ± 0.25 ^{abc}	0.46 ± 0.21
3	4.67 ± 0.28 ^{ab}	4.70 ± 0.37	1.66 ± 0.81 ^{ab}	1.70 ± 0.66	0.32 ± 0.20 ^a	0.27 ± 0.14
4	7.27 ± 0.73 ^d	6.90 ± 0.95	2.64 ± 0.48 ^c	1.74 ± 0.54	0.54 ± 0.18 ^{abc}	0.54 ± 0.26
5	7.39 ± 0.67 ^d	6.67 ± 0.45	1.77 ± 0.43 ^{ab}	1.57 ± 0.44	0.81 ± 0.19 ^{bcd}	0.73 ± 0.17
6	6.59 ± 0.70 ^{cd}	4.55 ± 0.80 *	2.24 ± 0.23 ^{bc}	1.47 ± 0.66 *	0.57 ± 0.14 ^{abc}	0.42 ± 0.17
7	7.45 ± 0.89 ^d	8.14 ± 0.82 *	2.57 ± 0.88 ^c	2.95 ± 0.73	0.88 ± 0.20 ^d	0.49 ± 0.19 *
8	5.47 ± 1.39 ^{abc}	4.41 ± 0.11	1.57 ± 0.37 ^{ab}	1.70 ± 0.21	0.50 ± 0.15 ^a	0.41 ± 0.12 *
9	6.98 ± 1.46 ^d	5.03 ± 0.64 *	2.17 ± 0.58 ^{bc}	1.90 ± 0.31	0.84 ± 0.35 ^{cd}	0.30 ± 0.14 *
Statistical analysis (<i>P</i> value)						
C	0.0001	0.0001	0.0050	0.0080	0.0004	0.0004
E	0.8089	0.0003	0.1549	0.0808	0.7681	0.0075
CxE	0.0027	0.0001	0.0060	0.0001	0.0033	0.0601

a, b, c ตัวอักษรที่แตกต่างกันมีความแตกต่างทางสถิติภายในแนวตั้ง (*P* < 0.05)

* แสดงความแตกต่างระหว่างปลาปกติและปลาที่ได้รับความเครียด (*P* < 0.05)

จากผลการวิเคราะห์จำนวนเม็ดเลือดขาวแบบแยกชนิดของปลาที่ระยะเวลา 8 สัปดาห์ดังแสดงในตารางที่ 4.5 พบว่า การเสริมวิตามินซีเพียงอย่างเดียวทั้งในระดับ 500 และ 1000 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัมอาหาร ทำให้จำนวนเม็ดเลือดขาวชนิด Lymphocyte ของปลาที่ได้รับความเครียดไม่ลดลงเมื่อเทียบกับปลาปกติ

การเสริมวิตามินอีเพียงอย่างเดียวพบว่าการเสริมที่ระดับ 62.5 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัมอาหาร สามารถช่วยให้ปลามีจำนวนเม็ดเลือดขาวชนิด Lymphocyte ไม่ลดลงเมื่อได้รับความเครียด และพบว่าการเสริมวิตามินอีที่ระดับ 125 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัมอาหาร มีผลให้จำนวนเม็ดเลือดขาวชนิด Lymphocyte ของปลาที่ได้รับความเครียดลดลงจากปลาปกติ

การเสริมวิตามินซีและวิตามินอีร่วมกันพบว่าที่ระดับ 500 + 62.5 และ 500 + 125 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัมอาหาร ทำให้ปลาที่มีจำนวนเม็ดเลือดขาวชนิด Lymphocyte ไม่ลดลง แต่ในการเสริมวิตามินซีและวิตามินอีที่ระดับ 1000 + 62.5 และ 1000 + 125 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัมอาหาร พบว่าปลาที่ได้รับความเครียดมีจำนวนเม็ดเลือดขาวชนิด Lymphocyte ลดลงจากปลาปกติ ผลการทดลองที่ระยะเวลา 8 สัปดาห์พบว่าจำนวนเม็ดเลือดขาวชนิด Neutrophil ของปลาที่ได้รับความเครียดความเครียดไม่แตกต่างจากปลาปกติ

ตารางที่ 4.5 ผลของการเสริมวิตามินซีและวิตามินอีต่อจำนวนเม็ดเลือดขาวชนิด Lymphocyte, Neutrophil และ Monocyte ของปลาคูกลูกผสมในสภาวะปกติเปรียบเทียบกับสภาวะที่ได้รับความเครียดเนื่องจากน้ำที่มีอุณหภูมิและ pH ต่ำ ที่ระยะเวลา 8 สัปดาห์

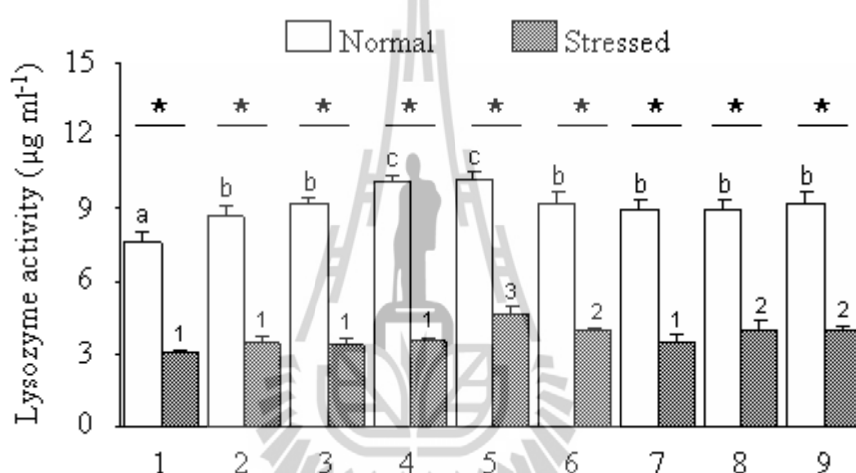
Diet	Lymphocyte		Neutrophil		Monocyte	
	Normal	Stressed	Normal	Stressed	Normal	Stressed
1	5.99 ± 1.03 ^a	2.50 ± 0.61 *	1.66 ± 0.49 ^{abc}	1.18 ± 0.35	0.43 ± 0.30	0.25 ± 0.10
2	7.82 ± 0.97 ^b	6.18 ± 1.50	2.31 ± 1.18 ^{bc}	2.64 ± 0.98	0.44 ± 0.23	0.46 ± 0.19
3	8.04 ± 1.44 ^b	5.10 ± 0.72 *	1.71 ± 0.52 ^{abc}	1.72 ± 0.27	0.60 ± 0.41	0.24 ± 0.14
4	8.28 ± 0.91 ^b	8.98 ± 0.33	2.40 ± 0.65 ^c	2.91 ± 0.49	0.69 ± 0.29	0.62 ± 0.37
5	7.76 ± 1.25 ^b	7.22 ± 1.21	2.28 ± 0.85 ^{abc}	2.10 ± 0.52	0.59 ± 0.26	0.63 ± 0.23
6	5.80 ± 0.79 ^a	3.50 ± 1.06 *	1.40 ± 0.55 ^{abc}	0.89 ± 0.44	0.49 ± 0.33	0.29 ± 0.13
7	7.68 ± 2.00 ^b	5.52 ± 0.38	1.29 ± 0.25 ^{abc}	1.33 ± 0.25	0.48 ± 0.15	0.35 ± 0.15
8	5.79 ± 0.22 ^a	2.73 ± 0.48 *	1.94 ± 0.59 ^{abc}	1.82 ± 0.41	0.44 ± 0.35	0.19 ± 0.11
9	6.98 ± 0.80 ^{ab}	3.59 ± 1.01 *	1.66 ± 0.39 ^{abc}	1.81 ± 0.45	0.44 ± 0.22	0.34 ± 0.19
Statistical analysis (<i>P</i> value)						
C	0.4454	0.0001	0.2516	0.2363	0.4014	0.0065
E	0.6682	0.0001	0.5720	0.0020	0.9246	0.1317
CxE	0.0002	0.0001	0.2156	0.0001	0.7160	0.0347

^{a, b, c} ตัวอักษรที่แตกต่างกันมีความแตกต่างทางสถิติภายในแนวตั้ง (*P* < 0.05)

* แสดงความแตกต่างระหว่างปลาปกติและปลาที่ได้รับความเครียด (*P* < 0.05)

4.1.8 การศึกษาผลของการเสริมวิตามินซีร่วมกับวิตามินอีในอาหารปลา ต่อความต้านทานของปลาดุกอุกผสมเมื่อได้รับเชื้อ *Aeromonas hydrophila* ร่วมกับการได้รับความเครียดจากสภาวะน้ำอุณหภูมิต่ำ และ pH ต่ำ

จากผลการวิเคราะห์การทำงานของไลโซไซม์ (Lysozyme activity) ในรูปที่ 4.21 พบว่าเมื่อปลาได้รับเชื้อ *A. hydrophila* ร่วมกับการได้รับความเครียดเนื่องจากน้ำที่มีอุณหภูมิและ pH ต่ำ ปลามีการทำงานของไลโซไซม์ลดลงในทุกกลุ่มการทดลอง อย่างไรก็ตามเมื่อเปรียบเทียบกับภายในปลาที่ได้รับความเครียดทั้งหมด พบว่าการเสริมวิตามินซีและวิตามินอีที่ระดับ 500 + 62.5 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัมอาหารมีการทำงานของไลโซไซม์สูงที่สุดเมื่อเทียบกับกลุ่มอื่นๆ



Lysozyme activity	C	E	C x E
Normal	0.0001	0.0282	0.0001
Challenged	0.0001	0.0001	0.0636

รูปที่ 4.21 ผลการวิเคราะห์การทำงานของไลโซไซม์ (Lysozyme activity) ของปลาดุกอุกผสมที่ได้รับการเสริมวิตามินซีและวิตามินอี เปรียบเทียบระหว่างปลาปกติและปลาที่ได้รับเชื้อ *Aeromonas hydrophila* ร่วมกับการได้รับความเครียดเนื่องจากน้ำที่มีอุณหภูมิและ pH ต่ำ

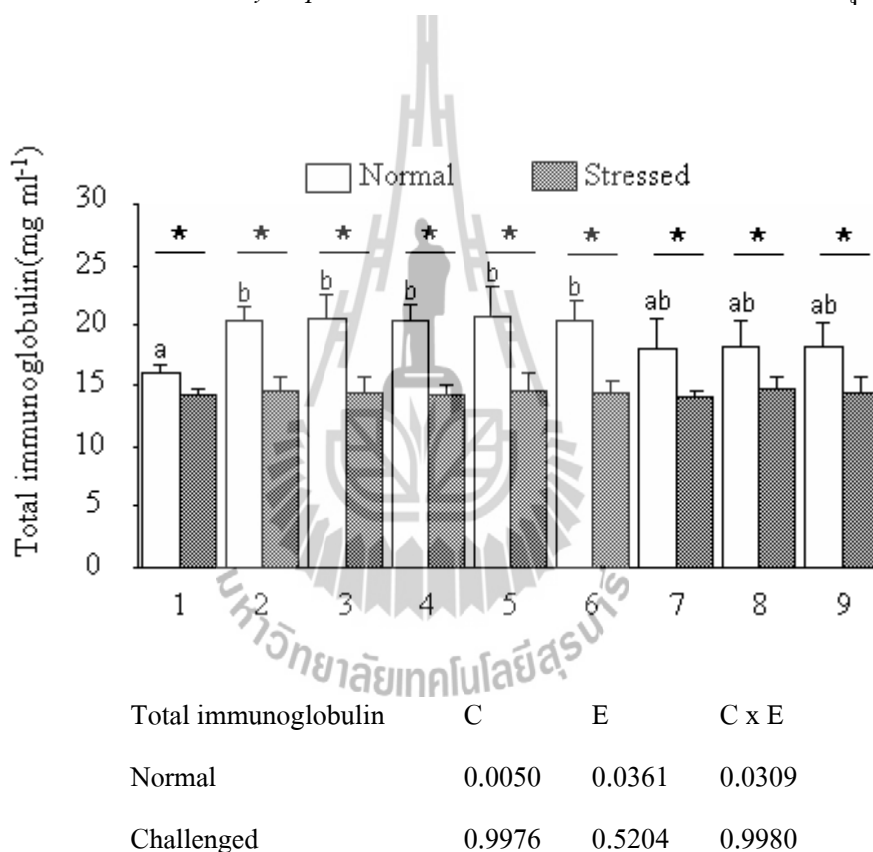
หมายเหตุ: * แสดงความแตกต่างระหว่างปลาปกติและปลาที่ได้รับความเครียด ($P < 0.05$)

ตัวอักษรที่ต่างกันแสดงถึงความแตกต่างทางสถิติของปริมาณวิตามินซี ($P < 0.05$)

ตัวเลขที่ต่างกันแสดงถึงความแตกต่างทางสถิติของปริมาณวิตามินอี ($P < 0.05$)

เมื่อทำการวิเคราะห์ปัจจัยร่วม พบว่าปริมาณการเสริมวิตามินซีและวิตามินอีมีอิทธิพลร่วมต่อค่าการทำงานของไลโซไซม์ของปลาปกติ แต่ไม่พบอิทธิพลร่วมในปลาที่ได้รับเชื้อ *A. hydrophila* ร่วมกับการได้ความเครียดเนื่องจากน้ำที่มีอุณหภูมิและ pH ต่ำ

ผลการวิเคราะห์อิมมูโนโกลบูลินรวม (Total immunoglobulin) แสดงในรูปที่ 4.22 พบว่าปลาที่ได้รับเชื้อ *A. hydrophila* ร่วมกับการได้ความเครียดเนื่องจากน้ำที่มีอุณหภูมิและ pH ต่ำ มีค่าอิมมูโนโกลบูลินรวมลดลงจากปลาปกติในทุกกลุ่มการทดลอง เมื่อทำการวิเคราะห์ปัจจัยร่วม พบว่าปริมาณการเสริมวิตามินซีและวิตามินอีไม่มีอิทธิพลร่วมต่อค่าอิมมูโนโกลบูลินรวมทั้งในปลาปกติและปลาที่ได้รับเชื้อ *A. hydrophila* ร่วมกับการได้ความเครียดเนื่องจากน้ำที่มีอุณหภูมิและ pH ต่ำ

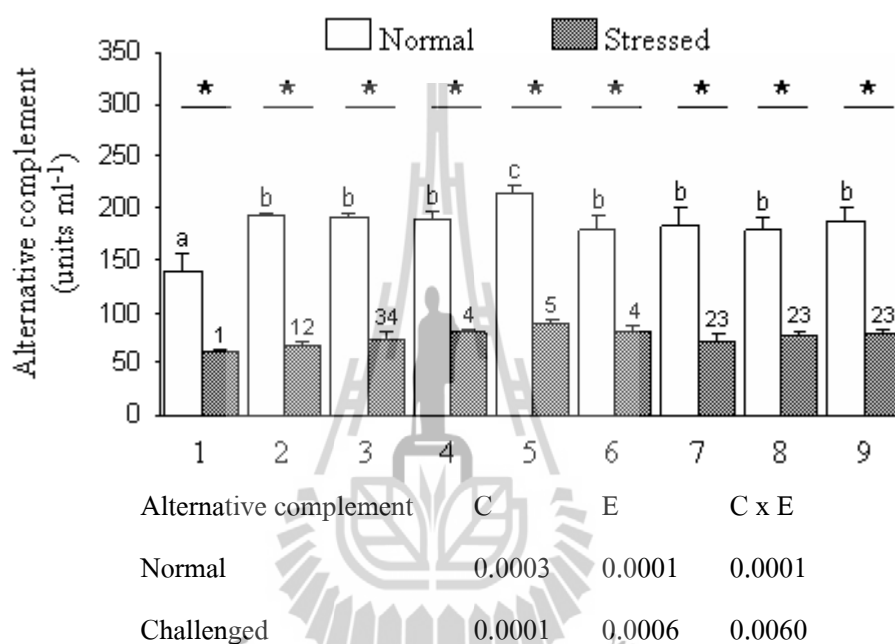


รูปที่ 4.22 ผลการวิเคราะห์อิมมูโนโกลบูลินรวม (Total immunoglobulin) ของปลาดุกลูกผสมที่ได้รับการเสริมวิตามินซีและวิตามินอี เปรียบเทียบระหว่างปลาปกติและปลาที่ได้รับเชื้อ *Aeromonas hydrophila* ร่วมกับการได้ความเครียดเนื่องจากน้ำที่มีอุณหภูมิและ pH ต่ำ

หมายเหตุ: * แสดงความแตกต่างระหว่างปลาปกติและปลาที่ได้รับความเครียด ($P < 0.05$)

ตัวอักษรที่แตกต่างกันแสดงความแตกต่างทางสถิติของปริมาณวิตามินซี ($P < 0.05$)

ผลการวิเคราะห์ประสิทธิภาพการทำงานของคอมพลีเมนต์ (Alternative complement) แสดงในรูปที่ 4.23 พบว่าปลาที่ได้รับเชื้อ *A. hydrophila* ร่วมกับการได้รับความเครียดเนื่องจากน้ำที่มีอุณหภูมิและ pH ต่ำ มีประสิทธิภาพการทำงานของคอมพลีเมนต์ลดลงในทุกกลุ่มการทดลอง อย่างไรก็ตามพบว่าปลาที่ได้รับการเสริมวิตามินซีและวิตามินอีที่ระดับ 500 + 62.5 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัมอาหารมีประสิทธิภาพการทำงานของคอมพลีเมนต์สูงที่สุดเมื่อเปรียบเทียบกับภายในปลาที่ได้รับความเครียดทั้งหมด



รูปที่ 4.23 ผลการวิเคราะห์ประสิทธิภาพการทำงานของคอมพลีเมนต์ (Alternative complement) ของปลาคูกลูกผสมที่ได้รับการเสริมวิตามินซีและวิตามินอี เปรียบเทียบระหว่างปลาปกติและปลาที่ได้รับเชื้อ *Aeromonas hydrophila* ร่วมกับการได้รับความเครียดเนื่องจากน้ำที่มีอุณหภูมิและ pH ต่ำ

หมายเหตุ: * แสดงความแตกต่างระหว่างปลาปกติและปลาที่ได้รับความเครียด ($P < 0.05$)

ตัวอักษรที่แตกต่างกันแสดงความแตกต่างทางสถิติของปริมาณวิตามินซี ($P < 0.05$)

ตัวเลขที่แตกต่างกันแสดงความแตกต่างทางสถิติของปริมาณวิตามินอี ($P < 0.05$)

ผลการวิเคราะห์ปัจจัยร่วม พบว่าปริมาณการเสริมวิตามินซีและวิตามินอีมีอิทธิพลร่วมต่อประสิทธิภาพการทำงานของคอมพลีเมนต์ ทั้งในปลาปกติและปลาที่ได้รับเชื้อ *Aeromonas hydrophila* ร่วมกับการได้รับความเครียดเนื่องจากน้ำที่มีอุณหภูมิและ pH ต่ำ

4.2 การอภิปรายผล

4.2.1 ผลการเจริญเติบโต

ผลการศึกษาครั้งนี้พบว่า การเสริมวิตามินซีและวิตามินอีไม่มีผลต่อค่า FCR ซึ่งสอดคล้องกับการทดลองในปลา golden shiner (Chen *et al.*, 2004) แต่ขัดแย้งกับการทดลองในปลา hybrid striped bass (Sealey and Gatlin, 2002) ปลา yellow perch (Lee and Dabrowski, 2003) และปลา hybrid tilapia (Shiau and Hsu, 2002) ซึ่งพบว่าการเสริมวิตามินซีและวิตามินอีมีผลต่อการเพิ่มการเจริญเติบโต โดยพบการทำงานร่วมกันของวิตามินซีและวิตามินอีในปลาชนิดอื่นๆ อีกด้วย (Sealey and Gatlin, 2002; Norouzitallab *et al.*, 2009) อย่างไรก็ตาม จากผลการทดลองพบว่า การเสริมวิตามินซีที่ระดับ 1000 และวิตามินอีทั้งในระดับ 62.5 และ 125 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัมอาหาร สามารถป้องกันการขาดวิตามินซีและวิตามินอีได้ เนื่องจากพบว่าการเพิ่ม RWG และ SGR สูงขึ้นจากปลาที่ไม่ได้รับการเสริมวิตามิน แสดงให้เห็นว่าการเสริมวิตามินซีหรือวิตามินอีเพียงอย่างเดียวก็เพียงพอต่อการรักษาระดับการเจริญเติบโตของปลาได้เช่นเดียวกับการเสริมวิตามินซีและวิตามินอีร่วมกัน สอดคล้องกับการทดลองของปลาชนิดอื่นๆ (de Menezes *et al.*, 2006; Sealey and Gatlin 2002; Lee and Dabrowski, 2003, 2004) อย่างไรก็ตาม การเสริมวิตามินซีและวิตามินอีไม่มีอิทธิพลร่วมกันต่อการเจริญเติบโตของปลา เช่นเดียวกับปลา piracucu (de Andrade *et al.*, 2007) จากผลการศึกษาพบว่า อัตราการรอดของปลาทุกกลุ่มไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ซึ่งต่างจากการทดลองในปลาชนิดอื่นๆ โดยพบว่าวิตามินซีและวิตามินอีสามารถเพิ่มอัตราการรอดในปลา Atlantic salmon (Hamre *et al.*, 1997), ปลา hybrid striped bass (Sealey and Gatlin, 2002), ปลา juvenile golden shiner (Chen *et al.*, 2004), ปลา yellow perch (Lee and Dabrowski, 2004) และปลา angelfish (Norouzitallab *et al.*, 2009) แสดงให้เห็นว่าผลของวิตามินซี วิตามินอี และอิทธิพลร่วมของวิตามินทั้งสองชนิดต่อการเจริญเติบโตขึ้นอยู่กับความแตกต่างของสายพันธุ์ ระยะการเจริญเติบโต ปริมาณการเสริม และสถานะการเลี้ยง

จากการทดลองนี้เห็นได้ว่าการเสริมวิตามินซีและวิตามินอีมีผลต่อการเพิ่ม RWG และ SGR แต่กลับไม่ส่งผลต่อค่า FCR เนื่องจากว่าปลามีการเจริญเติบโตเพิ่มขึ้นตามปริมาณการกินอาหาร ดังนั้นจากสูตรการคำนวณค่า FCR ซึ่งเป็นอัตราส่วนระหว่างน้ำหนักที่เพิ่มขึ้นต่อปริมาณอาหารที่ใช้ไป เมื่อปลามีน้ำหนักที่เพิ่มขึ้นพร้อมกับการกินอาหารที่มากขึ้น จึงเป็นเหตุให้ปลาที่ได้รับการเสริมวิตามินซีและวิตามินอีมีค่า FCR ไม่แตกต่างจากกลุ่มที่ไม่ได้รับการเสริม จากผลการศึกษาทำให้ทราบว่า การเสริมวิตามินซีและวิตามินอีส่งผลให้ปลามีการเจริญเติบโตเพิ่มขึ้น แต่ไม่มีผลต่อต้นทุนการผลิตในระยะเวลาที่เท่ากัน แต่จะเกิดผลดีในแง่ของการลดระยะเวลาการจับขาย เนื่องจากปลามีอัตราการเจริญเติบโตสูงขึ้น

4.2.2 ผลการสะสมวิตามินซีและวิตามินอี

การวิเคราะห์ปริมาณวิตามินที่เสริมลงในอาหารพบวิตามินซีในรูป L-ascorbic acid และ L-ascorbic -2- phosphate และวิตามินอีในรูป alpha – tocopherol acetate เช่นเดียวกันกับการศึกษาในปลา gilthead seabream และปลา yellow perch (Ortuño *et al.*, 2001; Lee and Dabrowski, 2003)

การศึกษากลับมาพบว่าการเสริมวิตามินซีเพิ่มขึ้นส่งผลให้มีการสะสมวิตามินอีในเนื้อเยื่อเพิ่มขึ้นเช่นเดียวกับปลาหลายชนิด (Wahli *et al.*, 1998; Sealey and Gatlin, 2002; Shiau and Hsu, 2002; Lee and Dabrowski, 2003; 2004) การเสริมวิตามินอีต่อการสะสมวิตามินซีขึ้นอยู่กับปริมาณการเสริมวิตามินซีในอาหารด้วย โดยที่ระดับการเสริมวิตามินซี 500 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัมอาหาร พบว่าการเพิ่มขึ้นของวิตามินอีในอาหารมีผลต่อการสะสมวิตามินซีในพลาสมา และตับ ที่ระยะเวลาการเสริม 6 สัปดาห์ แต่ไม่พบในระยะเวลา 3 สัปดาห์ การเพิ่มขึ้นของวิตามินซีเมื่อมีการเพิ่มปริมาณการเสริมวิตามินอีในอาหารเป็นผลที่สอดคล้องกับการทดลองในปลาชนิดอื่น (Sealey and Gatlin 2002; Shiau and Hsu 2002; Lee and Dabrowski 2003; 2004) นอกจากนี้ยังพบว่าเมื่อมีการเสริมวิตามินอีเพิ่มขึ้นจะส่งผลให้ปริมาณการสะสมวิตามินซีในร่างกายปลาลดลง จากผลการทดลองนี้สามารถอธิบายได้ว่า การเสริมวิตามินซีสามารถช่วยรักษาระดับการสะสมวิตามินอีในเนื้อเยื่อให้เพิ่มขึ้นได้ เนื่องจากวิตามินซีมีคุณสมบัติในการลดปฏิกิริยาออกซิเดชันของวิตามินอี เป็นเหตุให้เมื่อมีการเสริมวิตามินซีเพิ่มขึ้นจึงส่งผลให้มีการสะสมวิตามินอีในเนื้อเยื่อเพิ่มขึ้นเช่นเดียวกันในกรณีที่มีการเสริมวิตามินอีเพิ่มขึ้นทำให้วิตามินซีเข้าทำปฏิกิริยาด้านการเกิดออกซิเดชันของวิตามินอีส่งผลให้ปริมาณการสะสมวิตามินซีในร่างกายปลาลดลง

4.2.3 ค่าโลหิตวิทยา

ค่าโลหิตวิทยาเป็นค่าที่ใช้ตรวจสอบสุขภาพของปลาในด้านพยาธิสภาพ เนื่องจากการเป็นบ่งบอกถึงปฏิกิริยาของอนุมูลอิสระภายในระบบหมุนเวียนโลหิต หากมีปริมาณอนุมูลอิสระมากจะส่งผลให้เม็ดเลือดถูกทำลายมากขึ้น จากผลการศึกษาครั้งนี้แสดงให้เห็นว่าการเสริมวิตามินซีและวิตามินอีส่งผลให้ค่าโลหิตวิทยา (จำนวนเม็ดเลือดแดง, ปริมาณฮีโมโกลบิน และปริมาตรเม็ดเลือดแดงอัดแน่น หรือฮีมาโตคริต) เพิ่มขึ้นตามปริมาณการเสริม โดยเฉพาะการเสริมวิตามินซีมีการเพิ่มขึ้นที่ชัดเจนกว่าวิตามินอี นอกจากนี้ยังพบการทำงานร่วมกันของวิตามินทั้งสองชนิดต่อค่าโลหิตวิทยาอีกด้วย ผลการทดลองนี้สอดคล้องกับการทดลองในปลาชนิดอื่น (Shiau and Hsu 2002; Chen *et al.*, 2004; de Menezes *et al.*, 2006; de Andrade *et al.*, 2007; Garcia *et al.*, 2007; Yildirim-Aksoy *et al.*, 2008) ผลจากการเพิ่มขึ้นของค่าโลหิตวิทยานี้สามารถอธิบายได้ว่า วิตามินซีทำหน้าที่ทำลายอนุมูลอิสระในส่วนที่เป็นของเหลวเนื่องจากเป็นวิตามินที่ละลายในน้ำ ส่วนวิตามินอีทำหน้าที่ปกป้องการถูกทำลายของไขมันจากอนุมูลอิสระบริเวณเยื่อหุ้มเซลล์เนื่องจากเป็นวิตามินที่

ละลายในไขมัน (Barclay *et al.*, 1983; Frei and Ames, 1998) อีกเหตุผลหนึ่งที่น่าจะเป็นไปได้คือ วิตามินซีช่วยเพิ่มความสามารถการดูดซึมธาตุเหล็กในอาหารและเปลี่ยนธาตุเหล็กในรูป ferric iron ให้เป็น ferrous iron ซึ่งเป็นรูปที่เม็ดเลือดแดงขนส่งไปกับฮีโมโกลบิน (NRC, 1993; El-Alwary *et al.*, 1975)

ในสภาวะที่ปลาได้รับความเครียดนั้นส่งผลต่อค่าโลหิตวิทยาได้ในหลายด้านทำให้ ค่าโลหิตวิทยาของปลาที่ได้รับความเครียดในแต่ละกลุ่มมีการเพิ่มขึ้น และลดลงแตกต่างกัน ผู้วิจัยจึง ทำการอภิปรายผลเฉพาะกลุ่มควบคุม คือกลุ่มที่ไม่ได้รับการเสริมวิตามินซีและวิตามินอี (สูตร 1) เนื่องจากการปรับสภาพเพิ่มขึ้น และลดลงของค่าโลหิตวิทยาของปลากลุ่มที่ได้รับการเสริมวิตามินซี และวิตามินอียังไม่สามารถบ่งบอกได้ชัดเจนว่าอาหารสูตรใดดีต่อสุขภาพปลาที่สุดจึงต้องสรุปผล ร่วมกับตัวชี้วัดอื่นๆร่วมด้วย อย่างไรก็ตามจากผลการทดลองนี้ ทำให้ทราบถึงสภาวะค่าโลหิตวิทยา เมื่อปลาโดยทั่วไปได้รับความเครียดเนื่องจากน้ำที่มีอุณหภูมิและ pH ต่ำ โดยพบว่าที่ระยะเวลา 4 สัปดาห์ ปลาที่ได้รับความเครียดมีจำนวนเม็ดเลือดแดงลดลง ในขณะที่ปริมาณฮีโมโกลบินสูงขึ้น และค่าฮีมาโตคริตไม่เปลี่ยนแปลง แสดงให้เห็นว่าเม็ดเลือดแดงมีขนาดใหญ่ขึ้น เนื่องจากสภาวะ กรดทำให้ปลามีการเพิ่มปริมาณไอออนในพลาสมาส่งผลให้เม็ดเลือดแดงเกิดการบวม (McDonald and Wood, 1981) นอกจากนี้การลดลงของจำนวนเม็ดเลือดแดงอาจเกิดจากการถูกทำลายโดยอนุมูล อิสระเมื่อปลาเกิดความเครียด ผลการทดลองที่ระยะเวลา 8 สัปดาห์ พบว่าปลาที่ได้รับความเครียดมี จำนวนเม็ดเลือดแดง ค่าฮีโมโกลบิน และค่าฮีมาโตคริตเพิ่มขึ้นจากสภาวะปกติ สอดคล้องกับการ ทดลองในปลา rainbow trout ที่ถูกนำไปเลี้ยงในน้ำ pH 4.0 - 4.5 เป็นเวลา 3 วัน พบว่าปลามีค่าฮีมา โตคริต ฮีโมโกลบิน และจำนวนเม็ดเลือดแดง เพิ่มขึ้น (Milligan and Wood, 1982)

4.2.4 ค่าชี้วัดความเครียด

ในการตอบสนองขั้นแรกของความเครียดคือระบบประสาทจะมีการหลั่งฮอร์โมน ความเครียด ได้แก่ ฮอร์โมน คอร์ติซอล ซึ่งเป็นฮอร์โมนที่มีหน้าที่เพิ่มปริมาณกลูโคสในร่างกาย ปริมาณกลูโคสในเลือดจึงเป็นตัวชี้วัดหนึ่งที่จะสามารถบ่งบอกถึงความเครียดของปลาได้ การ เพิ่มขึ้นของฮอร์โมนคอร์ติซอลนี้จะส่งผลให้เกิดความเปลี่ยนแปลงในขั้นต่อมาคือกระบวนการทาง สรีรวิทยาซึ่งประกอบ ด้วยกระบวนการเผาผลาญ (metabolic) และความสมดุลของระบบการดูดซึม เกิดความผิดปกติ ภาวะโปแทสเซียมในเลือดสูงในกรณีนี้สัตว์เกิดความเครียดพบในปลากระดุกเงี้ยว หลายชนิด (Yin *et al.*, 1995; Hoffmayer and Parsons, 2001; Ortuño *et al.*, 2003; Urbinati *et al.*, 2004) จึงได้มีการทำการวิเคราะห์ปริมาณกลูโคสในพลาสมา นอกจากนี้ความเครียดเนื่องจากสภาวะ กรดยังส่งผลให้ปลาสูญเสียระบบการแลกเปลี่ยนไอออนบริเวณเหงือกเนื่องจาก chloride cell บริเวณเหงือกถูกทำลาย (Perry, 1997) ปริมาณคลอไรด์ถือเป็นค่าที่สามารถบ่งบอกถึงสภาวะ ความเครียดของปลาได้ (Yin *et al.*, 1995; Masson *et al.*, 2002; Ortuño *et al.*, 2003; Urbinati *et al.*,

2004) การเปลี่ยนแปลงของโปรตีนในเลือดเป็นค่าที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการทางสรีรวิทยาอันได้แก่ การสังเคราะห์โปรตีนภายในตับ กระบวนการ gluconeogenesis และการดูดซึมโปรตีนที่ได้จากการย่อยอาหาร ดังนั้นปริมาณโปรตีนในเลือดจึงเป็นค่าที่บ่งบอกถึงสถานะของสุขภาพได้ดี (Matthews and Laster 1965; Wise and Oliver, 1966; Demers and Bayne, 1997) ในสถานะที่ปลาเครียดพบว่าปลาจะมีปริมาณโปรตีนในพลาสมาลดลง (Yin *et al.*, 1995; Svobodova *et al.*, 2006)

จากผลการศึกษาครั้งนี้พบว่า การเสริมวิตามินซีและวิตามินอีในอาหารปลาไม่สามารถป้องกันการลดลงของกลูโคสในเลือดเมื่อปลาอยู่ในสภาวะความเครียดได้ การลดลงของโปรตีนในพลาสมาเมื่อปลาได้รับความเครียดเกิดขึ้นเพียงปลากลุ่มที่ไม่ได้รับการเสริมวิตามินเท่านั้น แสดงให้เห็นว่าการเสริมวิตามินซีและวิตามินอี ทั้งในกรณีเสริมเพียงชนิดเดียว และเสริมร่วมกันสามารถป้องกันการลดลงของโปรตีนในพลาสมาเมื่อปลาได้รับความเครียดจากน้ำที่มีอุณหภูมิและ pH ต่ำได้

ในสภาวะปกติปลาทุกกลุ่มมีปริมาณกลูโคสไม่แตกต่างกัน ชัดชัดกับการทดลองในปลา piracucu ซึ่งพบว่าวิตามินอีมีผลต่อค่ากลูโคสในเลือด (de Andrade *et al.*, 2007) นอกจากนี้ยังพบการทำงานเสริมกันระหว่างวิตามินซีและวิตามินอีต่อค่ากลูโคสในเลือดของปลา piracucu อีกด้วย (de Menezes *et al.*, 2006) ในสภาวะความเครียดผลการศึกษาปริมาณกลูโคสพบว่า การเสริมวิตามินซีและวิตามินอีสามารถป้องกันการเพิ่มขึ้นของปริมาณกลูโคสในเลือดเมื่อปลาเกิดความเครียดได้ทั้งระยะเวลา 4 สัปดาห์ อีกทั้งยังพบการทำงานเสริมกันของวิตามินทั้งสองชนิดที่ระยะเวลา 4 สัปดาห์ด้วย การศึกษานี้สอดคล้องกับการทดลองในปลา seabream (Ortuño *et al.*, 2003) เมื่อเพิ่มระยะเวลาการเสริมเป็น 8 สัปดาห์ พบว่าการเสริมวิตามินซีเพียงอย่างเดียวที่ระดับ 500 และ 1000 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัมอาหารสามารถป้องกันการเพิ่มปริมาณกลูโคสในเลือดเมื่อปลาเกิดความเครียดได้ แสดงให้เห็นว่าการเสริมวิตามินซีช่วยลดการตอบสนองต่อความเครียดของปลาได้ คำอธิบายผลของวิตามินซีต่อการตอบสนองของความเครียดอาจอธิบายได้โดยสมมติฐานที่ว่าวิตามินซีสามารถลดการสังเคราะห์ cortisol ได้ (Hodges and Hotston, 1971) อย่างไรก็ตามในบางการทดลอง พบว่าปริมาณฮอร์โมน cortisol เป็นอิสระต่อปริมาณวิตามินซีในอาหารปลา (Montero *et al.*, 1999; Ortuño *et al.*, 2003)

การศึกษาทดลองนี้พบอิทธิพลร่วมระหว่างปัจจัยของวิตามินซีและวิตามินอีต่อค่าโปรตีนรวมในพลาสมา การเสริมวิตามินซีและวิตามินอีส่งผลให้โปรตีนรวมในซีรัมของปลา piracucu และ ปลา channel catfish (de Menezes *et al.*, 2006; de Andrade *et al.*, 2007; Yildirim-Aksoy *et al.*, 2008) อย่างไรก็ตามในบางการทดลองพบว่าวิตามินซี วิตามินอี และอิทธิพลร่วมของวิตามินทั้งสองชนิดไม่มีผลต่อค่าโปรตีนรวมในเลือด (Sealey and Gatlin, 2002; Garcia *et al.*, 2007)

4.2.5 ค่าภูมิคุ้มกันแบบไม่จำเพาะ

การศึกษาผลของการเสริมวิตามินซีและวิตามินอีต่อค่าภูมิคุ้มกันแบบไม่จำเพาะเมื่อปลาได้รับความเครียด พบว่าภูมิคุ้มกันแบบสารน้ำที่ได้ทำการวิเคราะห์ ได้แก่ การทำงานของไลโซไซม์ (Lysozyme activity), อิมมูโนโกลบูลินรวม (Total immunoglobulin) และประสิทธิภาพการทำงานของคอมพลีเมนต์ (Alternative complement) ที่ระยะเวลา 4 สัปดาห์ การเสริมวิตามินซีมีผลต่อการเพิ่มการทำงานของไลโซไซม์ และปริมาณอิมมูโนโกลบูลินรวม ซึ่งสอดคล้องกับการทดลองในปลา yellow croaker และ ปลา Amazonian (Ai *et al.*, 2006; Affonso *et al.*, 2007) เมื่อทำการทดลองที่ระยะเวลานานขึ้นคือ 8 สัปดาห์พบว่าวิตามินซีและวิตามินอีมีอิทธิพลร่วมกันต่อค่าการทำงานของไลโซไซม์, ปริมาณอิมมูโนโกลบูลินรวม และประสิทธิภาพการทำงานของคอมพลีเมนต์ สอดคล้องกับการทดลองอื่น ๆ ที่พบว่ามีการทำงานเสริมร่วมกันระหว่างวิตามินซีและวิตามินอี (Chen *et al.*, 2004; Ortuño *et al.*, 2001) ในขณะที่มีบางการทดลองที่ไม่พบอิทธิพลร่วมระหว่างวิตามินซีและวิตามินอีต่อการทำงานของไลโซไซม์ และปริมาณอิมมูโนโกลบูลินรวมในปลา hybrid striped bass (Sealey and Gatlin, 2002) ผลการทดลองนี้แสดงถึงผลของวิตามินซีและวิตามินอีที่มีบทบาทสำคัญต่อการสร้างและลดการถูกทำลายของภูมิคุ้มกันที่ไม่จำเพาะแบบสารน้ำ อีกทั้งยังเป็นสารเสริมที่สามารถช่วยให้สัตว์ลดความผิดปกติของระบบหมุนเวียนเลือดอันเนื่องมาจากการได้รับความเครียดได้ ส่งผลให้ภูมิคุ้มกันแบบสารน้ำมีค่าสูงขึ้น (Montero *et al.*, 1999, 2001; Dabrowski *et al.*, 2004)

กลไกการทำงานของเซลล์ภูมิคุ้มกันที่ไม่จำเพาะจะมีความสำคัญต่อการป้องกันเชื้อโรคของปลาเป็นอย่างมากโดยเม็ดเลือดขาวถือเป็นเซลล์หลักที่มีหน้าที่สร้างภูมิคุ้มกันแบบไม่จำเพาะเจาะจง (Wedemeyer *et al.*, 1990) จากผลการศึกษาพบว่าที่ระยะเวลา 4 สัปดาห์ปลาที่ไม่ได้รับการเสริมวิตามินซีและวิตามินอีมีจำนวนเม็ดเลือดขาวน้อยที่สุด สอดคล้องกับการทดลองในปลา piracucu (de Menezes *et al.*, 2006; de Andrade *et al.*, 2007) เมื่อทำการเสริมที่ระยะเวลานานขึ้นพบว่าผลการทดลองเป็นไปในทางเดียวกันกับการศึกษาในปลา Channel catfish (Yildirim-Aksoy *et al.*, 2008) จากผลการวิเคราะห์ปัจจัยร่วมระหว่างวิตามินซีและวิตามินอี พบอิทธิพลร่วมระหว่างวิตามินทั้งสองชนิดทั้งในระยะเวลา 4 และ 8 สัปดาห์ เมื่อเปรียบเทียบระหว่างปลาในสภาวะปกติและปลาที่ได้รับความเครียด พบว่าที่ระยะเวลา 4 สัปดาห์ปลาในกลุ่มการทดลองที่ได้รับอาหารสูตรที่ 3, 4, 5, 7, 8 และ 9 มีจำนวนเม็ดเลือดขาวไม่ลดต่ำลงเมื่อได้รับความเครียดเช่นเดียวกับปลาที่ได้รับอาหารสูตรที่ 2, 4 และ 5 ที่ระยะเวลา 8 สัปดาห์ แสดงให้เห็นว่าการเสริมวิตามินซีและวิตามินอีในระดับสูงไม่สามารถช่วยป้องกันการลดต่ำลงของเม็ดเลือดขาวเมื่อปลาเกิดความเครียดได้

การวิเคราะห์จำนวนเม็ดเลือดขาวแยกชนิด เป็นการศึกษาถึงการเปลี่ยนแปลงของเม็ดเลือดขาวชนิดต่างๆ โดยพบว่าเมื่อปลาเกิดความเครียดสัดส่วนของเม็ดเลือดขาวชนิด Lymphocyte

จะลดลงและเม็ดเลือดขาวชนิด Neutrophil จะเพิ่มขึ้น จากการทดลองนี้พบว่าในกรณีที่ปลาอยู่ในสภาวะปกติสัดส่วนเม็ดเลือดขาวชนิด Lymphocyte ของปลาทุกกลุ่มการทดลองไม่แตกต่างกัน เช่นเดียวกันกับการทดลองในปลา pacu (*Piaractus mesopotamicus*) (Garcia *et al.*, 2007) เมื่อเปรียบเทียบระหว่างปลาปกติและปลาที่ถูกทำให้เครียด พบว่าที่ระยะเวลา 4 สัปดาห์ปลาในกลุ่มการทดลองที่ได้รับอาหารสูตรที่ 3, 4, 5, 6, 7, 8 และ 9 มีจำนวนเม็ดเลือดขาวชนิด Lymphocyte ไม่ลดต่ำลงเมื่อได้รับความเครียดเช่นเดียวกับปลาที่ได้รับอาหารสูตรที่ 2, 3, 4, 5, 6, และ 7 ที่ระยะเวลา 8 สัปดาห์ แต่กลับพบว่าสูตรที่ 8 และ 9 ในระยะเวลาการเสริมวิตามิน 8 สัปดาห์เม็ดเลือดขาวชนิด Lymphocyte มีจำนวนลดลงเมื่อปลาเกิดความเครียดเช่นเดียวกับปลาในสูตรอาหารที่ 1 ซึ่งไม่ได้รับการเสริมวิตามินซีและวิตามินอี แสดงให้เห็นว่าการเสริมวิตามินซีและวิตามินอีในระดับสูงเป็นระยะเวลานานไม่สามารถช่วยป้องกันการลดต่ำลงของจำนวนเม็ดเลือดขาวชนิด Lymphocyte เมื่อปลาเกิดความเครียดได้

4.2.6 ภูมิคุ้มกันต้านต่อเชื้อ *Aeromonas hydrophila*

จากผลการศึกษาความต้านทานต่อเชื้อ *A. hydrophila* พบว่าเมื่อนำปลาที่ได้รับเชื้อเป็นเวลา 3 วันไปทำให้เกิดความเครียดด้วยน้ำที่มีอุณหภูมิและ pH ต่ำแล้ว พบว่าค่าภูมิคุ้มกันของปลาไม่มีการเพิ่มขึ้น แสดงให้เห็นว่าวิตามินซีและวิตามินอีไม่สามารถป้องกันการลดต่ำลงของปลาที่ได้รับเชื้อร่วมกับการได้รับความเครียดอันเนื่องมาจากสภาวะน้ำที่มีอุณหภูมิและ pH ต่ำได้ อย่างไรก็ตามการทดลองนี้ยังมีข้อบกพร่องในอีกด้านหนึ่งคือ ควรมีการวัดค่าภูมิคุ้มกันของปลาที่ได้รับเชื้อ *A. hydrophila* เป็นเวลา 3 วันที่อยู่ในสภาวะน้ำปกติด้วย เพื่อเปรียบเทียบว่าภูมิคุ้มกันที่ต่ำลงมากน้อยเพียงใดก่อนที่จะได้รับความเครียด เนื่องจากโดยปกติแล้วเมื่อปลาได้รับเชื้อภูมิคุ้มกันควรมีการเพิ่มขึ้น แต่ในการทดลองนี้จะเห็นได้ว่าภูมิคุ้มกันลดต่ำลง ซึ่งเป็นสิ่งที่เกิดขึ้นได้เนื่องจากปลาได้รับความเครียดทำให้การสร้างภูมิคุ้มกันผิดปกติ หากมีการวัดค่าภูมิคุ้มกันสามระยะคือ ปลาปกติ ปลาได้รับเชื้อ 3 วัน และปลาที่ได้รับเชื้อ 3 วันร่วมกับได้รับความเครียด จะทำให้ทราบการเพิ่มขึ้นหรือลดลงของภูมิคุ้มกันได้ชัดเจนมากขึ้น

บทที่ 5

บทสรุป

5.1 สรุป

การศึกษาผลของการเสริมวิตามินซี ร่วมกับวิตามินอีในอาหารปลา ต่อความต้านทานของปลาที่ถูกผสมภายใต้สภาวะความเครียดเนื่องจากน้ำที่มีอุณหภูมิและ pH ต่ำ เป็นการศึกษาทดลองเพื่อหาแนวทางการแก้ปัญหาปลาเกิดโรคง่ายและตายอย่างเฉียบพลันเมื่อมีการเปลี่ยนแปลงอุณหภูมิและค่า pH ในช่วงฤดูหนาว และภายหลังฝนตก โดยผู้วิจัยมีความสนใจที่จะนำวิตามินซีและวิตามินอีมาเสริมในอาหารปลาเพื่อแก้ไขปัญหานี้ เนื่องจากวิตามินทั้งสองชนิดเป็นวิตามินที่มีความสำคัญต่อร่างกายปลาจำเป็นต้องได้รับจากอาหาร จึงเป็นสารเสริมที่ไม่ก่อให้เกิดการตกค้าง และเป็นอันตรายต่อผู้บริโภค อีกทั้งยังมีความสมบัติเป็นสารต้านอนุมูลอิสระซึ่งสามารถช่วยลดการถูกทำลายของเซลล์ต่างๆในร่างกายเมื่อปลาเกิดความเครียดได้ จากการรวบรวมผลการศึกษาที่เกี่ยวข้อง พบว่าวิตามินซีและวิตามินอีมีความสำคัญต่อการสร้างระบบภูมิคุ้มกันของร่างกาย อีกทั้งวิตามินอียังเป็นวิตามินที่ละลายในไขมัน และช่วยป้องกันการถูกทำลายของเยื่อหุ้มเซลล์เมื่อเกิดอนุมูลอิสระในร่างกายปลาได้ดี อย่างไรก็ตามวิตามินอีสามารถถูกทำลายไปได้ในสภาวะที่ปลาเกิดความเครียด ผู้วิจัยจึงสนใจที่จะนำวิตามินซีมาเสริมร่วมกับวิตามินอีเนื่องจากวิตามินซีสามารถป้องกันการถูกทำลายของวิตามินอีได้ อีกทั้งวิตามินซียังเป็นสารเสริมที่ได้รับความนิยมนำมาใช้ในการผลิตสัตว์น้ำอีกด้วย

การศึกษาดังกล่าวครั้งนี้คาดหวังว่าการเสริมวิตามินซี ร่วมกับวิตามินอี จะช่วยให้มีการสะสมวิตามินทั้งสองชนิดในร่างกายของปลาได้มากขึ้น เพื่อเตรียมความพร้อมให้กับร่างกายปลาก่อนที่จะได้รับความเครียดเนื่องจากความเปลี่ยนแปลงของอุณหภูมิและ pH ของน้ำ จึงได้ทำการวิเคราะห์ปริมาณวิตามินซีและวิตามินอีในปลาสมาด บับ และไต อีกทั้งยังได้มีการเก็บข้อมูลการเจริญเติบโตเพื่อทราบถึงผลของวิตามินซีและวิตามินอีต่อผลผลิตด้วย ผลการทดลองพบว่าการเสริมวิตามินซีหรือวิตามินอีอย่างใดอย่างหนึ่งเพียงอย่างเดียวสามารถป้องกันการขาดวิตามินได้ เนื่องจากพบว่าปลาที่ไม่ได้รับการเสริมวิตามินมีค่าการเจริญเติบโตบางค่าต่ำกว่าการเสริมวิตามินซี หรือวิตามินอี

จากผลการศึกษาทดลองสามารถสรุปผลตามสมมติฐานได้ดังต่อไปนี้

5.1.1 ถ้าปลาฉลามที่ได้รับอาหารเสริมวิตามินซีและวิตามินอีแล้ว ปลาจะมีการเจริญเติบโตเพิ่มขึ้น และมีการสะสมวิตามินซีและวิตามินอีในพลาสมา ตับ และไต มากขึ้นตามความเข้มข้น และระยะเวลาการเสริม

จากผลการทดลองพบว่าเป็นไปตามสมมติฐานคือการเสริมวิตามินซีและวิตามินอีส่งผลให้ปลามีการเจริญเติบโตเพิ่มขึ้น แต่การเจริญเติบโตที่เพิ่มขึ้นนั้นเพิ่มตามปริมาณการกินอาหารทำให้ปลาที่ได้รับการเสริมวิตามินมีอัตราการเปลี่ยนอาหารเป็นน้ำหนักตัวไม่แตกต่างจากปลาที่ไม่ได้รับการเสริม ส่วนการสะสมปริมาณวิตามินซีและวิตามินอีในร่างกายปลานั้นก็เป็นไปตามสมมติฐานเช่นกัน คือปลาที่มีการสะสมวิตามินทั้งสองชนิดเพิ่มขึ้นตามปริมาณการเสริม นอกจากนี้ยังพบความสัมพันธ์ของการเสริมวิตามินทั้งสองชนิดต่อการสะสมในร่างกายด้วย โดยพบว่า การเสริมวิตามินซีสูงขึ้นส่งผลให้ปริมาณการสะสมวิตามินอีในร่างกายเพิ่มขึ้น และการเสริมวิตามินอีเพิ่มขึ้นส่งผลให้ปลามีการสะสมปริมาณวิตามินซีในร่างกายลดลง ความสัมพันธ์นี้เกิดจากการที่วิตามินซีสามารถลดปริมาณการถูกทำลายของวิตามินอีได้จึงทำให้ปริมาณการสะสมวิตามินอีเพิ่มขึ้น โดยการลดปริมาณการถูกทำลายของวิตามินอีนี้เกิดจากการที่วิตามินซีเข้าทำปฏิกิริยาแทนจึงเป็นเหตุให้ปริมาณการสะสมวิตามินซีในร่างกายปลาลดลงเมื่อมีการเสริมวิตามินอีเพิ่มขึ้น

5.1.2 ถ้าปลาฉลามที่ได้รับอาหารเสริมวิตามินซีและวิตามินอี ถูกทำให้เครียดด้วยสถานะน้ำที่มีอุณหภูมิและ pH ต่ำแล้ว ปลาจะมี ค่าโลหิตวิทยา ค่าชี้วัดความเครียดและมีภูมิคุ้มกันแบบไม่จำเพาะไม่แตกต่างจากปลาที่อยู่ในสถานะปกติ

จากผลการทดลองสรุปได้ว่าเป็นไปตามสมมติฐานในบางค่าเนื่องจากปริมาณการเสริมแต่ละระดับมีผลต่อค่าที่ทำกรวิเคราะห์แตกต่างกัน อีกทั้งการเสริมวิตามินซีหรือวิตามินอียังไม่ใช่สารเสริมที่สามารถแก้ปัญหาค่าความเครียดของปลาได้ในทุกด้าน อย่างไรก็ตามผู้วิจัยได้ทำการสรุปภาพรวมของผลการทดลองไว้ในตารางที่ 5.1

5.1.3 ถ้าปลาฉลามที่ได้รับอาหารเสริมวิตามินซีและวิตามินอี ได้รับเชื้อ *A. hydrophila* ร่วมกับการทำให้เครียดด้วยสถานะน้ำที่มีอุณหภูมิและ pH ต่ำแล้ว ปลาจะมีภูมิคุ้มกันแบบไม่จำเพาะไม่แตกต่างจากปลาที่อยู่ในสถานะปกติ

จากผลการทดลองสรุปได้ว่าไม่เป็นไปตามสมมติฐาน โดยพบว่าเมื่อปลาฉลามที่ได้รับอาหารเสริมวิตามินซีและวิตามินอี ได้รับเชื้อ *A. hydrophila* ร่วมกับการทำให้เครียดด้วยสถานะน้ำที่มีอุณหภูมิและ pH ต่ำแล้ว ปลาจะมีภูมิคุ้มกันแบบไม่จำเพาะลดลงจากปลาที่อยู่ในสถานะปกติ

จากการทดลองนี้พบว่า การเสริมวิตามินในระดับ และระยะเวลาที่แตกต่างกัน สามารถช่วยให้ปลามีความต้านทานต่อความเครียดในหลายด้านแตกต่างกัน การสรุปผลว่าควรใช้วิตามินระดับใดที่จะเกิดผลดีที่สุดจึงต้องรวบรวมผลของแต่ละค่าที่ทำการวิเคราะห์มาพิจารณา ร่วมกัน ผู้วิจัยจึงสรุปภาพรวมของผลการทดลองดังตารางที่ 5.1

ตารางที่ 5.1 ผลของการเสริมวิตามินซึ่งร่วมกับวิตามินอีต่อความต้านทานของปลาดุกอุณหภูมิกายใต้สภาวะความเครียดเนื่องจากน้ำที่มีอุณหภูมิและ pH ต่ำ

ระยะเวลา	4 สัปดาห์									8 สัปดาห์								
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	1	2	3	4	5	6	7	8	9
RBC	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	+
Hemoglobin	-	-	-	-	+	-	+	+	-	-	-	-	-	-	+	-	-	+
Hematocrit	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	-	-	-	+	-
Glucose	-	-	+	-	+	+	+	+	+	-	-	-	+	+	-	+	-	-
Chloride	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Total protein	-	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+
Lysozyme	-	-	-	-	+	+	+	+	+	-	-	+	+	+	+	+	+	+
Total Ig	-	-	-	-	-	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+
ACH50	-	+	+	-	-	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+
WBC	-	+	+	+	+	-	+	+	-	-	+	-	+	+	-	-	-	-
Differential WBC	-	-	+	+	+	-	+	+	-	-	+	-	+	+	-	+	-	-
Lysozyme (<i>A. hydrophyla</i>)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Total Ig (<i>A. hydrophyla</i>)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
ACH50 (<i>A. hydrophyla</i>)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
รวม	0	3	6	3	6	5	8	8	5	0	6	5	8	8	6	6	5	6

หมายเหตุ: + หมายถึง สามารถต้านทานความเครียดได้

- หมายถึง ไม่สามารถต้านทานความเครียดได้

จากการสรุปรวมความต้านทานของปลาในแต่ละกลุ่มการทดลอง พบว่าการเสริมวิตามินทุกระดับไม่สามารถช่วยให้ปลามีค่าคลอไรด์เทียบเท่ากับสภาวะปกติได้ นอกจากนี้ยังพบว่าการ

เสริมวิตามินซีและวิตามินอีทุกระดับ ไม่สามารถต้านทานผลเสียจากการได้รับความเครียดร่วมกับการรับเชื้อ *Aeromonas hydrophila* ได้ อย่างไรก็ตามเมื่อรวมความต้านทานด้านอื่น ๆ แล้วสามารถสรุปได้ว่า ที่ระยะเวลา 4 สัปดาห์ การเสริมวิตามินซีเพียงอย่างเดียวที่ระดับ 1000 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัมอาหาร (สูตร 7), การเสริมวิตามินอีเพียงอย่างเดียวที่ระดับ 125 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัมอาหาร (สูตร 3) และการเสริมวิตามินซีร่วมกับวิตามินอีที่ระดับ 1000 + 62.5 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัมอาหาร (สูตร 8) สามารถช่วยให้ปลามีความต้านทานความเครียดเนื่องจากสภาวะน้ำที่มีอุณหภูมิและ pH ต่ำได้มากที่สุด ส่วนที่ระยะเวลา 8 สัปดาห์พบว่าการเสริมวิตามินซีเพียงอย่างเดียวที่ระดับ 500 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัมอาหาร (สูตร 4), การเสริมวิตามินอีเพียงอย่างเดียวที่ระดับ 62.5 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัมอาหาร (สูตร 2) และการเสริมวิตามินซีร่วมกับวิตามินอีที่ระดับ 500 + 62.5 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัมอาหาร (สูตร 5) สามารถช่วยให้ปลามีความต้านทานความเครียดเนื่องจากสภาวะน้ำที่มีอุณหภูมิและ pH ต่ำได้มากที่สุด

5.2 ข้อเสนอแนะ

จากการทำการวิจัยเรื่องนี้ ผู้วิจัยเห็นว่าสารต้านอนุมูลอิสระยังคงเป็นทางเลือกที่น่าสนใจในการนำมาใช้แก้ปัญหาความเครียดของปลา เนื่องจากการศึกษาค้นคว้าด้านความเครียดของปลาพบว่าสาเหตุที่ทำให้ปลาอ่อนแอเมื่อเกิดความเครียดคือการเกิดภาวะเครียดออกซิเดชัน (Oxidative stress) งานวิจัยที่ผู้วิจัยเห็นว่าควรศึกษาเพิ่มเติมคือการนำสารต้านอนุมูลอิสระชนิดอื่นมาศึกษาทดลอง โดยเฉพาะพืชสมุนไพรที่หาได้ง่ายและราคาไม่สูงเพื่อลดต้นทุนการผลิตอาหารปลา

จากผลที่พบว่าเมื่อปลาได้รับความเครียดเนื่องจากสภาวะน้ำที่มีอุณหภูมิและ pH ต่ำแล้ว ยังคงมีความผิดปกติในด้านค่าโลหิตวิทยาและปริมาณคลอไรด์ในซีรัมแม้ได้รับการเสริมวิตามินซีและวิตามินอีแล้วก็ตาม แสดงให้เห็นว่าวิตามินซีและวิตามินอียังไม่ใช่สารเสริมที่ดีที่สุดที่จะนำมาใช้แก้ปัญหาความเครียดดังกล่าว ผู้วิจัยเห็นว่าควรมีการศึกษากลไกความผิดปกติเพิ่มเติมจากภาวะเครียดออกซิเดชัน เช่น การศึกษากลไกความผิดปกติของปลาอันเนื่องมาจากการเปลี่ยนแปลง pH ของน้ำ ซึ่งเกี่ยวข้องกับกลไกการแลกเปลี่ยนไอออนของปลา เนื่องจากยังคงมีปัญหาการตายของปลาจำนวนมากเมื่อเกิดน้ำท่วม หากสามารถแก้ไขปัญหานี้ได้จะเกิดผลดีต่อเกษตรกรเป็นอย่างมาก

จากผลการทดลองครั้งนี้ผู้วิจัยขอแนะนำระดับการเสริมที่เกิดผลดีที่สุดในด้านต้นทุนค่าอาหารและระยะเวลาใช้คือ การเสริมวิตามินซีที่ระดับ 1000 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัมอาหารเป็นเวลา 4 สัปดาห์ เนื่องจากเป็นปริมาณการเสริมที่ให้ผลในการต้านทานความผิดปกติอันเนื่องมาจากความเครียดได้มากที่สุดและมีระยะเวลาการใช้น้อยเพียง 4 สัปดาห์ ทำให้ต้นทุนค่าอาหารต่ำกว่าการเสริมวิตามินในระดับอื่นๆที่ให้ผลเท่าเทียมกัน

รายการอ้างอิง

- จักรพงษ์ ไพบุลย์. (2542). สารต้านอนุมูลอิสระ Antioxidants [ออนไลน์]. ได้จาก: <http://www.thaiclinic.com>
- ฐานันดร ทัดตานนท์. 2539. พืชเย็บปล้นของความเป็นกรด - ต่างจากน้ำพรตต่อปลาพะพงขาว 3 ขนาด: 300, 430 และ 550 กรัม. เอกสารวิชาการ สถานีเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำชายฝั่งจังหวัด นราธิวาส กรมประมง. 31: 1-18.
- ประเทือง เขาวัววันกลาง. (2534). คุณภาพน้ำทางการประมง. แผนกประมง คณะวิทยาศาสตร์ สถาบันเทคโนโลยีราชมงคล วิทยาเขตลำปาง.
- เขาวินิตย์ ดนยดล และ จิรนนท์ อุไรประสิทธิ์. (2544). ผลการเปลี่ยนแปลงอุณหภูมิต่อการตอบสนองระบบภูมิคุ้มกันปลากระรังและปลาพะพงขาว. เอกสารวิชาการ สถาบันวิจัยการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำชายฝั่ง กรมประมง. 1: 1-7.
- วรพล เองวานิช. (2550). กลไกการสร้างและทำลายอนุมูลอิสระกลุ่มออกซิเจน. วารสารวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยมหาสารคาม. 26(3): 294-301.
- ศูนย์สารสนเทศวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี. (2553). แผนกรด. สำนักหอสมุดและศูนย์สารสนเทศ วิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี กรมวิทยาศาสตร์บริการ กระทรวงวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี.
- ศรีวัฒนา ทรงจิตสมบุญ, ปาจริย์ อับดุลลาหิม, และ สุรัตน์ โคมินทร์. (2548). สารต้านอนุมูลอิสระจำเป็นต่อร่างกายอย่างไร. นิตยสารหมอชาวบ้าน: 316.
- สถิติการประมง. (2551). ปริมาณสัตว์น้ำจับได้ทั้งหมด (รวมเพาะเลี้ยง) จำแนกเป็นรายชนิด ปี 2546 – 2551 [ออนไลน์]. ได้จาก: [http://www.fisheries.go.th/it-stat/data_2551/Yearbook2008\(2551\)/T1.10.pdf](http://www.fisheries.go.th/it-stat/data_2551/Yearbook2008(2551)/T1.10.pdf)
- สถิติการประมง. (2551). มูลค่าสัตว์น้ำจับได้ทั้งหมด (รวมเพาะเลี้ยง) จำแนกเป็นรายชนิด ปี 2546 – 2551 [ออนไลน์]. ได้จาก: [http://www.fisheries.go.th/it-stat/data_2551/Yearbook2008\(2551\)/T1.11.pdf](http://www.fisheries.go.th/it-stat/data_2551/Yearbook2008(2551)/T1.11.pdf)
- สิทธิชัย ดันชนะสฤณี. (2549). ความรู้เบื้องต้นเกี่ยวกับคุณภาพน้ำ. ภาควิชาอนุรักษวิทยา คณะวนศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.
- อุทัยรัตน์ ณ นคร. (2538). ปลาและการเพาะพันธุ์และการเลี้ยง. ภาควิชา เพาะเลี้ยงสัตว์น้ำคณะประมง มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

- Affonso, E.G., Silva, E.C., Tavares-Dias, M., Menezes, G.C., Carvalho, C.S.M., Nunes, E.S.S., Ituassu, D.R., Roubach, R., Ono, E.A., Fim, J.D.I. & Marcon, J.L. (2007) Effect of high levels of dietary vitamin C on the blood responses of matrinxa (*Brycon amazonicus*). **Comp. Biochem. Physiol.** 147: 383-388.
- Ai, Q., Mai, K., Tan, B., Xu, W., Zhang, W., Ma, H. & Liufu, Z. (2006) Effects of dietary vitamin C on survival, growth, and immunity of large yellow croaker, *Pseudosciaena crocea*. **Aquaculture**. 261: 327-336.
- Anbarasu, K., and Chandran, M.R. (2001). Effects of ascorbic acid on the immune response of the catfish, *Mystus gulio* (Hamilton), to different bacterins of *Aeromonas hydrophila*. **Fish Shellfish Immun.** 11: 347–355.
- Barclay, L. R. C., Locke, S. J. and MacNeil, M. J. (1983) The autoxidation of unsaturated lipid in micelles and synergism of inhibitors, vitamin C and E. **Can. J. Chem.** 61: 1288-1290.
- Chen, R., Lochmann, R., Goodwin, A., Praveen, K., Dabrowski, K., and Lee, K.J. (2004). Effects of dietary vitamins C and E on alternative complement activity, hematology, tissue composition, vitamin concentrations and response to heat stress in juvenile golden shiner (*Notemigonus crysoleucas*). **Aquaculture**. 242: 553-569.
- de Andrade, J.I.A., Ono, E.A., de Menezes, G.C., Brasil, E.M., Roubach, R., Urbinati, E.C., Tavares-Dias, M., Marcon, J.L. and Affonso, E.G. (2007) Influence of diets supplemented with vitamins C and E on piracucu (*Arapaima gigas*) blood parameters. **Comp. Biochem. Physiol.** 146: 576-580.
- de Menezes, G.C., Tavares-Dias, M., Ono, E.A., de Andrade, J.I.A., Brasil, E.M., Roubach, R., Urbinati, E.C., Marcon, J.C. and Affonso, E.G. (2006) The influence of dietary C and E supplementation on the physiological response of piracucu. *Arapaima gigas*, in net culture. **Comp. Biochem. Phys. A.** 145: 274-279.
- Demers, N. E. and Bayne, C. J. (1997) The immediate effects of stress on hormones and plasma lysozyme in rainbow trout. **Dev. Comp. Immunol.** 21: 363 – 373.
- EL-Alwary, M.F.S., EL-Shobaki, F.A. and Kholeif, T. (1975) The absorption of iron with or without supplements of single amino acids and of ascorbic acid, in healthy and Fe-deficient children. **Brit. J. Nutr.** 33: 351-355.

- Fedoruk, A.N. (1981). **A Management Perspective on Stress and Infectious Diseases in Clarias Farming**. National Inland Fisheries Institute. Bangkok, Thailand.
- Frei, B.B. and Ames, B.N. (1998) **Relative importance of vitamin E in antiperoxidative defense in human blood plasma and low-density lipoprotein (LDL)**. In Vitamin E in health and disease. (Packer, L. and Fuchs, J. eds.) pp. 132-149.
- Galina, M.S. 1997. The difference in brown trout (*Salmo trutta* L.) blood composition from acidic and limed sites of two rivers in western Norway. **Water, Air, and Soil Pollution**. 96: 203–210.
- Garcia, F., Pilarski, F., Onaka, E.M., Moraes, F.R. and Martins, M.L. (2007). Hematology of *Piaractus mesopotamicus* fed diets supplemented with vitamins C and E, challenged by *Aeromonas hydrophila*. **Aquaculture**. 271: 39–46.
- Gouillou-Coustans, M.F., Bergot, P., and Kaushik, S.J. (1998). Dietary ascorbic acid needs of common carp (*Cyprinus carpio*) larvae. **Aquaculture**. 161: 453–461.
- Halver, J.E., Ashley, L.M., and Smith, R.E. (1969). Ascorbic acid requirements of coho salmon and rainbow trout. **Transactions of the American Fisheries Society**. 98: 762–772.
- Hamre, K., Waagbø, R., Berge, R. K. and Lie, Ø. (1997) Vitamins C and E interact in juvenile Atlantic salmon (*Salmo salar*, L.). **Free Radical Bio. Med.** 22: 137-149.
- Hoffmayer, E. R. and Parsons, G. R. (2001) The physiological response to capture and handling stress in the Atlantic sharpnose shark, *Rhizoprionodon terraenovae*. **Fish Physiol. Biochem.** 25: 277-285.
- Kruse, H. and Sørum, H. (1994). Transfer of multiple drug resistance plasmids between bacteria of diverse origins in natural microenvironments. **Appl Environ Microbiol.** 60: 4015-4021.
- Lee, K. J. and Dabrowski, K. (2003) Interaction between vitamins C and E affects their tissue concentrations, growth, lipid oxidation, and deficiency symptoms in yellow perch (*Perca flavescens*). **Brit. J. Nutr.** 89: 589-596.
- Lee, K. J. and Dabrowski, K. (2004) Long-term effects and interactions of dietary vitamins C and E on growth and reproduction of yellow perch, *Perca flavescens*. **Aquaculture**. 230: 377-389.
- Li, Y. and Lovell, R.T. (1985). Elevated levels of dietary ascorbic acid increase immune responses in channel catfish. **Journal of Nutrition**. 115: 123-131.

- Lim, C., and Lovell, R.T. (1978). Pathology of the vitamin C deficiency syndrome in channel catfish (*Ictalurus punctatus*). **Journal of Nutrition**. 108: 1137– 1146.
- Magnadottir, B. (2006). Innate immunity of fish (overview). **Fish Shellfish Immun.** 20(2): 137-51.
- Masson, N., Guerold, F. and Dangles, O. (2002) Use of blood parameters in fish to assess acidic stress and chloride pollution in French running waters. **Chemosphere**. 47: 467-473.
- Matthews, D. M. and Laster, L. (1965) Absorption of protein digestion products: A review. **Gut**. 6: 41-426.
- Mcdonald, D. G. and Wood, C. M. (1981). Branchial and renal acid and ion fluxes in the rainbow trout, *Salmo gairdneri*, at low environmental pH. **J. Exp. Biol.** 93: 101-118.
- Milligan, C. L. and Wood, C. M. (1982). Disturbances in Haematology, Fluid Volume Distribution and Circulatory Function Associated with Low Environmental pH in the Rainbow Trout, *Salmo Gairdneri*. **J Exp Biol**. 99: 397-415.
- Montero, D., Marrero, D.M., Izquierdo, M.S., Robaina, L., Vergara, J.M., and Tort L. (1999). Effect of vitamin E and C dietary supplementation on some immune parameters of gilthead seabream (*Sparus aurata*) juveniles subjected to crowding stress. **Aquaculture**. 171: 269–278.
- Montero, D., Tort, L., Robaina, L., Vergara, J. M. & Izquierdo, M. S. (2001) Low vitamin E in diet reduces stress resistance of gilthead seabream (*Sparus aurata*) juveniles. **Fish Shellfish Immun.** 11: 473-490.
- Mulero, V., Esteban, M.A., and Meseguer, J. (1998). Effects of in vitro addition of exogenous vitamins C and E on gilthead seabream (*Sparus aurata* L.) phagocytes. **Vet Immunol Immunop.** 66: 185-199.
- Navarre, O., and Halver, J. (1989). Disease resistance and humoral antibody production in rainbow trout fed high levels of vitamin C. **Aquaculture**. 79: 207–221.
- Ndong, N., Chen, Y. Y., Lin, Y. H., Vaseeharan, B., and Chen, J. C. (2007). The immune response of tilapia *Oreochromis mossambicus* and its susceptibility to *Streptococcus iniae* under stress in low and high temperatures. **Fish Shellfish Immun.** 22: 686-694.
- Norouzitalab, P., Farhangi, M., Babapour, M., Rahimi, R., Sinha, A. K. and Baruah, K. (2009) Comparing the efficacy of dietary alpha-tocopherol with that of dl-alpha-tocopheryl

- acetate, both either alone or in combination with ascorbic acid, on growth and stress resistance of angelfish, *Pterophylum scalare*, juveniles. **Aquaculture**. 17: 207-216.
- NRC (National Research Council). (1993) **Nutrient Requirement of Fish**, National Academy Press, Washington, D.C. 116 p.
- Ortuño, J., Cuesta, A., Esteban, M.A. and Meseguer, J. (2001) Effect of oral administration of high vitamin C and E dosages on the gilthead seabream (*Sparus aurata* L.) innate immune system. **Vet Immunol Immunop.** 79: 167-180.
- Ortuño, J., Esteban, A., and Meseguer, J. (1999). Effects of high dietary intake of vitamin C on non-specific immune response of gilthead seabream (*Sparus aurata* L.). **Fish Shellfish Immun.** 9: 429– 443.
- Perry, S. F. (1997). THE CHLORIDE CELL: Structure and Function in the Gills of Freshwater Fishes. **Annu. Rev. Physiol.** 59: 325-347.
- Roberts, M.L., Davies, S.J., and Pulsford, A.L. (1995). The influence of ascorbic acid (vitamin C) on non-specific immunity in the turbot (*Scophthalmus maximus* L.). **Fish Shellfish Immun.** 5: 27– 38.
- Rodina, A. G. 1972. **Method in Aquatic Microbiology**. Univ. Park Press, Baltimore. 256 p.
- Sakai, M. (1999). Current research status of fish immunostimulants. **Aquaculture**. 172: 63-92.
- Schweigert, F. J., Luppertz, M. and Stobo, W. T. (2002) Fasting and lactation effect fat-soluble vitamin A and E levels in blood and their distribution in tissue of grey seals (*Halichoerus grypus*). **Comp. Biochem. Phys. A.** 131: 901-908.
- Sealey, W.M. and Gatlin III., D.M. (2002) Dietary vitamin C and vitamin E interact to influence growth and tissue composition of juvenile hybrid striped bass (*Morone chrysops* x *M. saxatilis*) but have limited effects on immune responses. **J. Nutr.** 132: 748-755.
- Shiau, S. Y. and Hsu, C. Y. (2002) Vitamin E sparing effect by dietary vitamin C in juvenile hybrid tilapia, *Oreochromis niloticus* x *O. aureus*. **Aquaculture**. 210: 335-342.
- Spry, D. J., Wood, C. M. and Hodson, P. V. (1981). The effects of environmental acid on freshwater fish with particular reference to the softwater lakes in Ontario and the modifying effects of heavy metals. A literature review. **Can. Tech. Rep. Fish. Aquat. Sci.** 999, 145 p.

- Sunyer, J. O. and L. Tort. (1995). Natural hemolytic and bactericidal activities of sea bream *Sparus aurata* serum are affected by the alternative complement pathway. **Vet Immunol Immunop.** 45:333–345.
- Svobodova, Z., Vykusova, B., Modra, H., Jarkovsky, J. & Smutna, M. (2006) Haematological and biochemical profile of harvest-size carp during harvest and post-harvest storage. **Aquac. Res.** 37: 959-965.
- Tort, L., Padrous, F., Rotllant, J., and Crespo, S. (1998). Winter syndrome in the gilthead sea bream *Sparus aurata*. Immunological and histopathological features. **Fish Shellfish Immun.** 8: 37–47.
- Urbinati, E. C., de Abreu, J.S., da Silva Camargo, A. C. and Parra, M. A. L. (2004) Loading and transport stress of juvenile matinxá (*Brycon cephalus*, Characidae) at various densities. **Aquaculture.** 229: 389-400.
- Vadstein. (1997). The use of immunostimulation in marine larviculture: possibilities and challenges. **Aquaculture.** 155: 401-417.
- Verlhac, V., Obach, A., Gabaudan, J., Schuep, W., and Hole, R. (1998). Immunomodulation by dietary vitamin C and glucan in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). **Fish Shellfish Immun.** 8: 409– 424.
- Wahli, T., Verhac, V., Gabaudan, J., Schüep, W. and Meier, W. (1998) Influence of combined vitamins C and E on non-specific immunity and disease resistance of rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum). **J. Fish Dis.** 21: 127-137.
- Wedemeyer, G.A., Barton, B.A. & McLeary, D.J. (1990) **Stress and acclimation. Methods for Fish Biology** (Schreck, C.B. & Moyle. P.B. eds) American Fisheries Society, Bethesda, MD. pp.451-89.
- Wedemeyer, G.A. (1996) **Physiology of fish in intensive culture systems**. New York: Chapman & Hall. New York. 237 p.
- Wilson, R.P., and Poe, W.E. (1973). Impaired collagen formation in the scorbutic channel catfish. **J. Nutr.** 103: 1359–1364.
- Winston, G.W. (1991). Oxidants and antioxidants in aquatic animals. **Comp Biochem Physiol.** 100: 173-176.
- Wise, R. W., Oliver, I. T. (1966) Sites of Synthesis of Plasma Proteins in the Foetal **Rat. Biochem. J.** 100: 330-333.

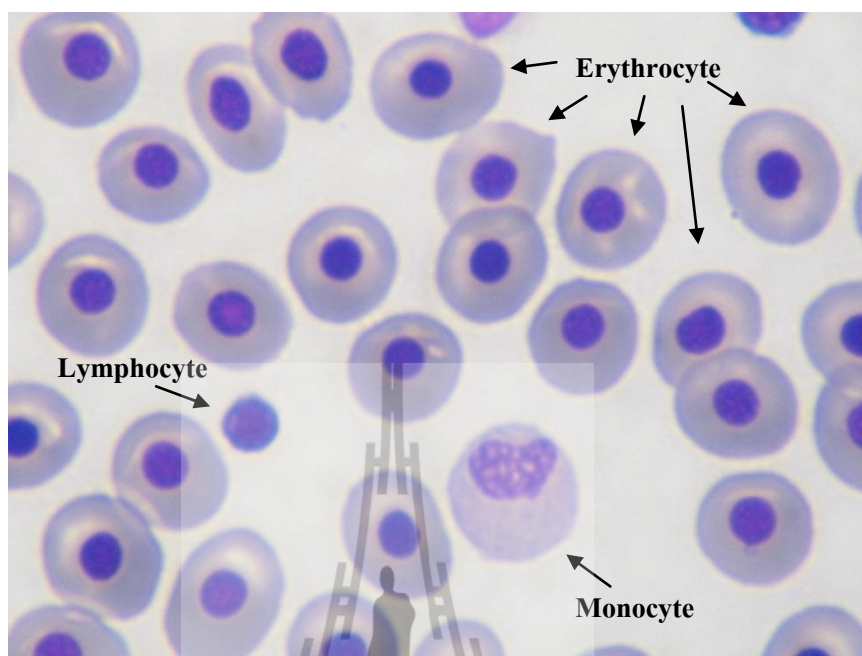
- Yildirim-Aksoy, M., Lim, C., Li, M. H., Klesius, P. H. (2008) Interaction between dietary levels of vitamins C and E on growth and immune responses in channel catfish, *Ictalurus punctatus* (Rafinesque). **Aquac. Res.** 39: 1198-1209.
- Yin, Z., Lam, T. J., Sin, Y. M. (1995) The effects of crowding stress on the non-specific immuneresponse in fancy carp (*Cyprinus carpio L.*). **Fish Shellfish Immun.** 5: 519-529.



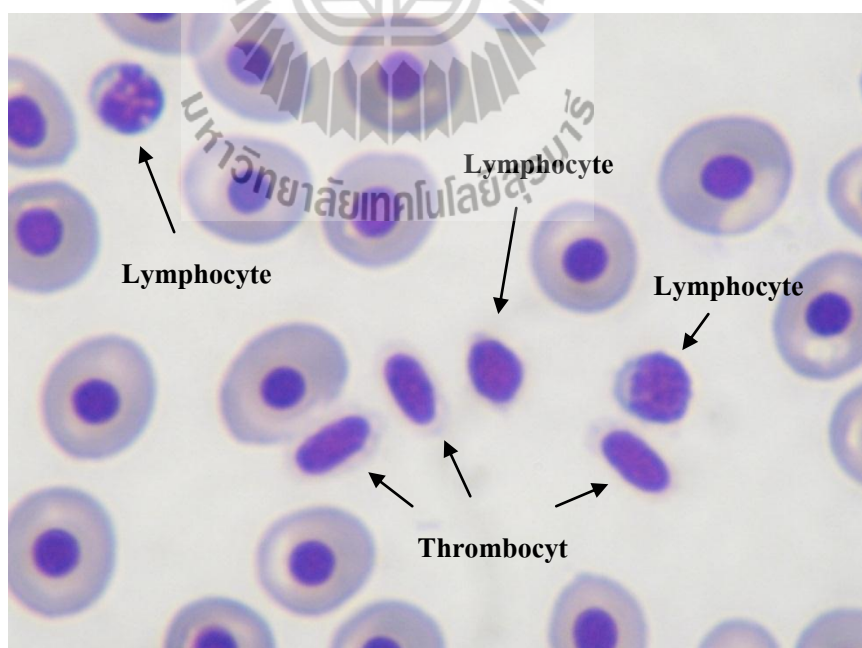


ภาคผนวก ก

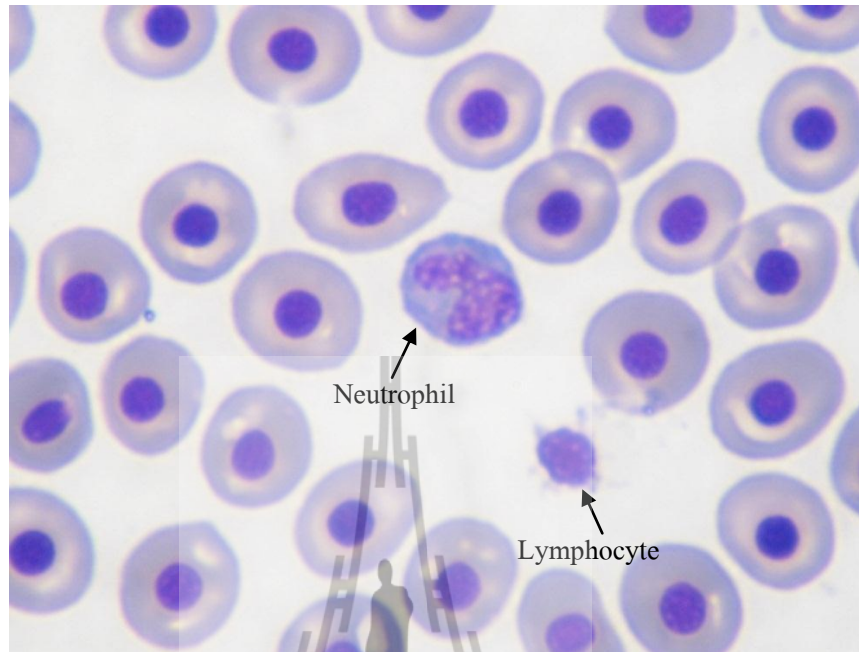
ภาพประกอบการทดลอง



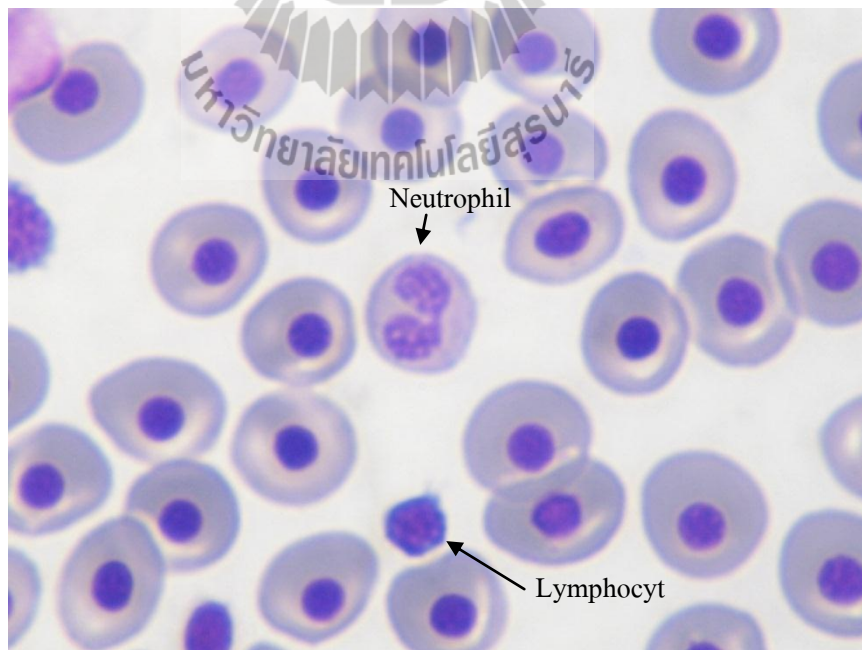
รูปที่ ก.1 ภาพเม็ดเลือดขาวชนิด Lymphocyte, Monocyte และเม็ดเลือดแดงหรือ Erythrocytes



รูปที่ ก.2 ภาพเม็ดเลือดขาวชนิด Lymphocyte และ เกล็ดเลือดหรือ Thrombocyte



รูปที่ ก.3 ภาพเม็ดเลือดขาวชนิด Neutrophil และ Lymphocyte



รูปที่ ก.4 ภาพเม็ดเลือดขาวชนิด Neutrophil และ Lymphocyte



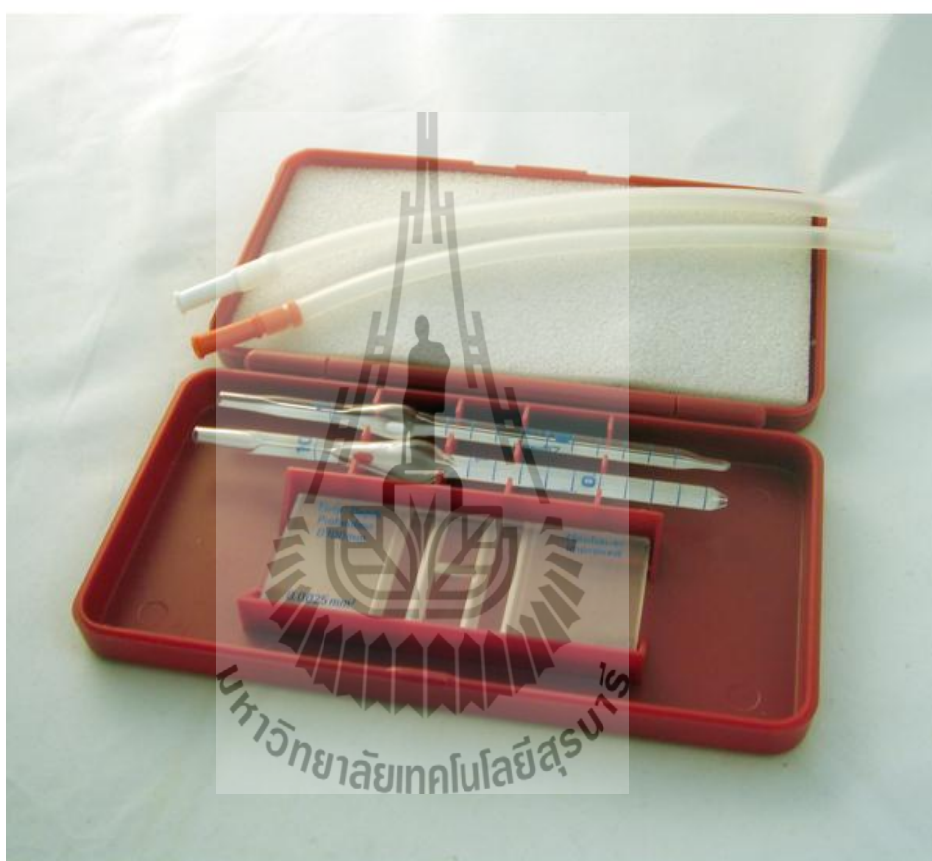
รูปที่ ก.5 ภาพปลาคูที่ได้รับวิตามินอี 125 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัมอาหารที่ระยะเวลา 8 สัปดาห์



รูปที่ ก.6 ภาพตู้ปลาที่ใช้ในการทดลอง



รูปที่ ก.7 ภาพเครื่อง HPLC



รูปที่ ก.8 ภาพอุปกรณ์การนับจำนวนเม็ดเลือดแดงและเม็ดเลือดขาว



DSM Nutritional Products



Product Data Sheet

ROVIMIX[®] STAY-C[®] 35

Description

ROVIMIX[®] STAY-C[®] 35 is a beige, spray-dried powder consisting of a stabilized (phosphorylated) Na/Ca salt of L-ascorbic acid. Esterification of ascorbic acid at position 2 protects vitamin C from destruction by oxidation. It contains primarily the monophosphate ester of L-ascorbic acid, with very small quantities of diphosphate ester and traces of triphosphate ester. The L-ascorbate molar activity of the phosphorylated esters of vitamin C is equivalent to L-ascorbic acid.

Product identification

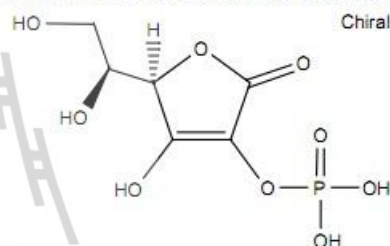
Product code: 04 8304 4

Chemical name: Sodium, calcium ascorbyl-2- phosphate

Synonyms: L-ascorbic acid phosphate; L-ascorbic acid monophosphate; vitamin C phosphate

Empirical formula: C₈H₉O₈P

Molecular mass: 256.11 g/mol



Specifications

Appearance: beige powder

Loss on drying: max. 7%

Total phosphorylated ascorbic acid activity: equivalent to min. 35%

Ascorbic acid activity from monophosphate ester: equivalent to min. 33%

Solubility

ROVIMIX[®] STAY-C[®] 35 is practically insoluble in water.

DSM Nutritional Products



Product Data Sheet

Stability and storage

ROVIMIX® STAY-C® 35 is specifically produced for use as a stabilized source of vitamin C in feed. It is fairly stable to air if protected from humidity and heat. The product may be stored for at least 18 months from the date of manufacture in the unopened original container and at a temperature below 25 °C. The 'best used before' date is printed on the label. Keep container tightly closed. Once opened, use contents quickly.

Uses

For animal nutrition in premixes and compound feeds where stability may be critical, e.g. in expanded, extruded or aggressively pelleted feeds.

Regulatory status

Generally approved for the intended use.

Safety

This product is safe for the intended use. Avoid ingestion, inhalation of dust or direct contact by applying suitable protective measures and personal hygiene.

For full safety information and necessary precautions, please refer to the respective DSM Material Safety Data Sheet.

Legal notice

The information given in this publication is based on our current knowledge and experience, and may be used at your discretion and risk. It does not relieve you from carrying out your own precautions and tests. We do not assume any liability in connection with your product or its use. You must comply with all applicable laws and regulations, and observe all third party rights.

USA

DSM Nutritional Products, Inc.
45 Waterview Blvd.
Parsippany, NJ 07054-1298
Tel. 800-526-0189
Fax 973-257-8615
Internet www.nutraaccess.com

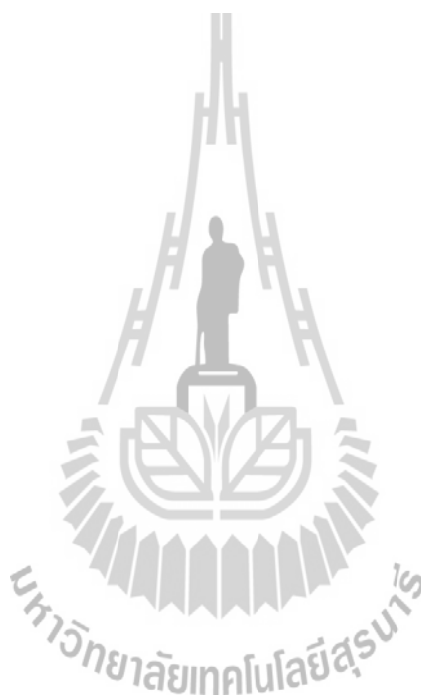
Canada

DSM Nutritional Products Canada Inc.
395 Waydon Drive
Ayr, Ontario, N0B 1E0
Tel. 519-624-2766, 800-565-1959
Fax 519-624-2795, 866-227-4803

DSM Nutritional Products
Product Data Sheet



Internet www.nutraaccess.com



PDS 04 8304 4 Version 01 ROVIMIX® STAY-C® 35
PDS_0483044.pdf

2004-03-01
Replaces PDS 0769 1998-02-13

3/3

DSM Nutritional Products
Product Data Sheet



ROVIMIX® E 50 SD

Description

ROVIMIX® E 50 SD is a free-flowing, brownish, spray-dried powder consisting of dl- α -tocopheryl acetate finely dispersed in a matrix of lignosulfonate, and coated with small amounts of silicon dioxide.

Product identification

Product code: 50 0257 5

Chemical names: 3,4-dihydro-2,5,7,8-tetramethyl-2-(4,8,12-trimethyltridecyl)-2H-1-benzopyran-6-yl acetate; 2,5,7,8-tetramethyl-2-(4,8,12-trimethyltridecyl)-6-chromanyl acetate

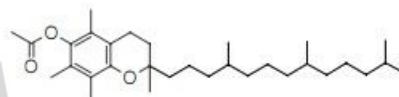
Synonyms: (2*RS*,4'*RS*,8'*RS*)- α -tocopheryl acetate; (*RS*,*RS*,*RS*)- α -tocopheryl acetate; (all-*rac*)- α -tocopheryl acetate; dl- α -tocopheryl acetate; vitamin E acetate; vitamin E

CAS No.: 7695-91-2

EINECS: 231-710-0

Empirical formula: C₃₁H₅₂O₃

Molecular mass: 472.73 g/mol



Specifications

Appearance: brownish powder

Loss on drying: max. 5%

Vitamin E content: min. 50% dl- α -tocopheryl acetate (as is)

Solubility

ROVIMIX® E 50 SD is dispersible in water.

Stability and storage

ROVIMIX® E 50 SD is fairly stable to air but somewhat sensitive to light and humidity. The product may be stored for at least 24 months from the date of manufacture in the unopened original container and at a temperature below 25 °C. The 'best used before' date is printed on the label. Keep container tightly closed. Once opened, use contents quickly.

Uses

For animal nutrition in milk replacers and liquid diets, and where stability may be critical, i.e. aggressive premixes (pH > 10) and canned pet food.

DSM Nutritional Products

Product Data Sheet



Regulatory status

Generally approved for the intended use.

Safety

This product is safe for the intended use. Avoid ingestion, inhalation of dust or direct contact by applying suitable protective measures and personal hygiene.

For full safety information and necessary precautions, please refer to the respective DSM Material Safety Data Sheet.

Legal notice

The information given in this publication is based on our current knowledge and experience, and may be used at your discretion and risk. It does not relieve you from carrying out your own precautions and tests. We do not assume any liability in connection with your product or its use. You must comply with all applicable laws and regulations, and observe all third party rights.

USA

DSM Nutritional Products, Inc.
45 Waterview Blvd.
Parsippany, NJ 07054-1298

Tel. 800-526-0189
Fax 973-257-8615

Internet www.nutraaccess.com

Canada

DSM Nutritional Products Canada Inc.
395 Waydon Drive
Ayr, Ontario, N0B 1E0

Tel. 519-624-2766, 800-565-1959
Fax 519-624-2795, 866-227-4803

Internet www.nutraaccess.com

ประวัติผู้เขียน

นางสาวธาราทิพย์ พิทักษ์สงค์ เกิดเมื่อวันที่ 2 มิถุนายน พ.ศ. 2527 เริ่มศึกษาชั้นประถมศึกษาปีที่ 1-6 ที่โรงเรียนบ้านแสงโตน ชั้นมัธยมศึกษาปีที่ 1-6 ที่โรงเรียนบุรีรัมย์พิทยาคม จังหวัดบุรีรัมย์ และสำเร็จการศึกษาระดับปริญญาตรี สาขาวิชาเทคโนโลยีการผลิตสัตว์ มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี จังหวัดนครราชสีมา เมื่อปี พ.ศ.2548 เริ่มทำงานที่มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี ตำแหน่งผู้ช่วยวิจัยสาขาวิชาเทคโนโลยีการผลิตสัตว์ สำนักวิชาเทคโนโลยีการเกษตร มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

ปี พ.ศ.2550 เข้าศึกษาต่อในระดับปริญญาโท สาขาวิชาเทคโนโลยีการผลิตสัตว์ มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

ผลงานวิจัย : ได้เสนอบทความเข้าร่วมในงานประชุมวิชาการนานาชาติ SAADC ครั้งที่ 3 เรื่อง Influence of diets supplemented with Vitamin C and E on innate immune system in hybrid catfish (*Clarias macrocephalus* x *C. gariepinus*)

