รหัสโครงการ SUT3-303-49-24-04

รายงานการวิจัย

ผลของการเพิ่มวิตามินซีและวิตามินอีในอาหารปลาดุกต่อการเพิ่มภูมิคุ้มกันโรคในสภาพการเลี้ยงที่อุณหภูมิน้ำต่ำลง

(Dietary vitamin C and vitamin E prophylaxis in catfish in low-water temperature culture condition)

ได้รับทุนอุดหนุนการวิจัยจาก

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

ผลงานวิจัยเป็นความรับผิดชอบของหัวหน้าโครงการวิจัยแต่เพียงผู้เดียว

รหัสโครงการ SUT3-303-49-24-04

รายงานการวิจัย

ผลของการเพิ่มวิตามินซีและวิตามินอีในอาหารปลาดุกต่อการเพิ่มภูมิคุ้มกันโรคในสภาพการเลี้ยงที่อุณหภูมิน้ำต่ำลง

(Dietary vitamin C and vitamin E prophylaxis in catfish in low-water temperature culture condition)

คณะผู้วิจัย

หัวหน้าโครงการ

ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. สุรินทร บุญอนันธนสาร

สาขาวิชาเทคโนโลยีการผลิตสัตว์

สำนักวิชาเทคโนโลยีการเกษตร

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

ผู้ร่วมวิจัย

ผู้ช่วยศาสตราจารย์ น.สพ. ดร. ภคนิจ คุปพิทยานันท์

ได้รับทุนอุดหนุนการวิจัยจากมหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี ปีงบประมาณ พ.ศ. 2549-2550

ผลงานวิจัยเป็นความรับผิดชอบของหัวหน้าโครงการวิจัยแต่เพียงผู้เดียว

สิงหาคม 2553

กิตติกรรมประกาศ

รายงานการวิจัยเรื่อง “ผลของการเพิ่มวิตามินซีและวิตามินอีในอาหารปลาดุกต่อการเพิ่มภูมิคุ้มกันโรคในสภาพการเลี้ยงที่อุณหภูมิน้ำต่ำลง” ได้รับทุนอุดหนุนการวิจัยจากมหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี ปีงบประมาณ 2549-2550 การทำวิจัยในครั้งนี้ได้รับการเอื้อเฟื้อให้ใช้ห้องปฏิบัติการ เครื่องมืออุปกรณ์วิทยาศาสตร์ และบุคลากร จากศูนย์เครื่องมือวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี (F3 และ F1) นอกจากนี้การวิจัยครั้งนี้ได้รับการเอื้อเฟือสถานที่ในการทดลองเลี้ยงปลาและผลิตอาหารปลาทดลอง จากฟาร์มมหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี แผนกสัตว์น้ำ

ผู้วิจัยขอขอบคุณ นายสุนัย พลายมี หัวหน้างานสัตว์น้ำ ฟาร์มมหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี รวมทั้งบุคลกรฝ่ายสนับสนุนทุกท่าน ที่ได้ให้การช่วยเหลือ ให้คำแนะนำต่าง ๆ จนทำให้งานวิจัยครั้งนี้สำเร็จได้ด้วยดี

ผู้วิจัยขอขอบคุณ นางสาวศิริวรรณ เพชรสมบัติ หัวหน้างานกลุ่มห้องปฏิบัติการเทคโนโลยีการผลิตสัตว์ และนายมานะ ชาญเวช พนักงานวิทยาศาสตร์ห้องปฏิบัติการเทคโนโลยีการผลิตสัตว์ ที่ได้ให้การช่วยเหลือ และคำแนะนำต่าง ๆ ในการทำงานวิจัยนี้

ผู้วิจัยขอขอบคุณหัวหน้าสถานวิจัย สำนักวิชาเทคโนโลยีการเกษตร (รองศาสตราจารย์ ดร. หนึ่ง เตียอำรุง) บุคลากรของสถานวิจัย (นางศุภกาญจน์ บุญอยู่ และนาง ปุญณภา สูบโคกสูง) ที่ได้ให้คำแนะนำ และการช่วยเหลือในส่วนของงานธุรการและการเงินในการวิจัยครั้งนี้

ท้ายนี้ผู้วิจัยขอขอบคุณคณาจารย์ บุคลากรและนักศึกษา ของสาขาวิชาเทคโนโลยีการผลิตสัตว์ที่ได้ให้การช่วยเหลือ คำแนะนำ และการสนับสนุนในด้านต่าง ๆ สำหรับงานวิจัยนี้

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

บทคัดย่อ

การเปลี่ยนแปลงอุณหภูมิน้ำแบบเฉียบพลันก่อให้เกิดความเครียดต่อสัตว์น้ำ ซึ่งส่งผลเสียต่อกระบวนการทางสรีรวิทยาและสุขภาพปลา ในงานวิจัยนี้ได้แบ่งการทดลองออกเป็น 3 การทดลอง ได้แก่ การศึกษาถึงผลของอุณหภูมิน้ำต่อค่าทางโลหิตวิทยาและภาวะ oxidative stress ในปลาดุกลูกผสม (การทดลองที่ 1) การทดลองที่ 2 และ 3 เป็นการศึกษาเพื่อให้ทราบถึงระดับและระยะเวลาการเสริมวิตามินซี และวิตามินอีในอาหารต่อการเสริมสุขภาพปลาให้แข็งแรงภายใต้ความเครียดอันเนื่องมาจากน้ำอุณหภูมิต่ำของปลาดุกลูกผสม โดยพิจารณาจากค่าทางโลหิตวิทยาและค่าภูมิคุ้มกันแบบไม่จำเพาะ

การทดลองที่ 1 เป็นการศึกษาถึงผลของอุณหภูมิน้ำต่ำ-สูง (26 และ 34 องศาเซลเซียส) ต่อค่าทางโลหิตวิทยา และค่า malondialdehyde (MDA) ในไตและตับ ซึ่งใช้เป็นค่าบ่งชี้ oxidative stress โดยเปรียบเทียบกับปลาดุกลูกผสมที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส (กลุ่มควบคุม) โดยทำการศึกษาที่ระยะเวลา 3, 6, 12 และ 24 ชั่วโมง ผลการวิจัยพบว่า ในช่วงต้นและช่วงท้ายของการทดสอบอุณหภูมิน้ำ ค่าทางโลหิตวิทยามีการเปลี่ยนแปลงอย่างมีนัยสำคัญในปลาดุกลูกผสมที่อยู่ในน้ำอุณหภูมิ 26 และ 34 องศาเซลเซียสเมื่อเปรียบเทียบกับปลาดุกลูกผสมในกลุ่มควบคุม ค่า superoxide anion ในเลือดของปลาดุกลูกผสมที่อุณหภูมิ 26 องศาเซลเซียสมีค่าสูงที่สุด ชี้ให้เห็นว่าอุณหภูมิน้ำต่ำส่งผลเสียต่อปลาดุกลูกผสมมากกว่า ค่า MDA ของตับและไตของปลาดุกที่อุณหภูมิน้ำสูงมีค่าสูง อย่างไรก็ตามไม่พบความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ

การทดลองที่ 2 เป็นการทดลองเสริมวิตามินซีในอาหารปลาดุกลูกผสมของแต่ละกลุ่มทดลอง ที่ระดับ 250, 500, 1,000, 1,500 และ 2,000 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม เป็นระยะเวลา 8 สัปดาห์ ผลการทดลองพบว่าการสะสมของวิตามินซีที่ตับอยู่ในระดับคงที่ตลอดระยะเวลาการทดลองที่ทำการวัด อัตราการรอดและอัตราการเปลี่ยนอาหารเป็นเนื้อมีค่าใกล้เคียงกันในทุกกลุ่มทดลอง ดังนั้นระดับการเสริมวิตามินซี 250 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม เป็นระดับที่เพียงพอต่อการเจริญเติบโตเป็นปกติ พบว่าการเพิ่มระดับการเสริมวิตามินซีมีความสัมพันธ์กับการเพิ่มค่าอัตราการเจริญเติบโตจำเพาะและเปอร์เซ็นต์น้ำหนักเพิ่มของปลาดุกลูกผสมในเชิงเส้นตรง (P<0.05) ที่สัปดาห์ 1-4 ของการทดลอง อย่างไรก็ตามผลความสัมพันธ์ดังกล่าวนี้ไม่ต่อเนื่องเมื่อทำการวัดที่สัปดาห์ที่ 5-8 จึงสรุปได้ว่าการเสริมวิตามินซีที่ระดับ 1,000-1,500 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัมในอาหารปลาดุกลูกผสมที่ระยะ juvenile จะทำให้ปลาดุกลูกผสมมีอัตราการเจริญเติบโตสูง การทดสอบผลของอุณหภูมิน้ำต่ำทำได้โดยนำปลาดุกลูกผสมของแต่ละกลุ่มทดลองไปแช่ในน้ำที่มีการลดอุณหภูมิลงไปที่ 19 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 24 ชั่วโมง พบว่า ภายใต้สภาวะทดสอบอุณหภูมิน้ำครั้งแรก การเพิ่มปริมาณการเสริมวิตามินซีที่เพิ่มขึ้นส่งผลให้ปลาดุกลูกผสมมีค่าฮีโมโกลบินและค่าจำนวนเม็ดเลือดแดงสูงขึ้นในเชิงความสัมพันธ์แบบควอดราติกและเชิงเส้นตรง (P<0.05) ตามลำดับ แต่ค่าเม็ดเลือดแดงอัดแน่นไม่แตกต่างกันระหว่างกลุ่มทดลอง ในการทดสอบอุณหภูมิน้ำต่ำครั้งที่สองพบว่าระดับการเสริมวิตามินซีที่เพิ่มขึ้นไม่มีผลต่อการเปลี่ยนแปลงของค่าฮีโมโกลบินและค่าเม็ดเลือดแดงอัดแน่น แต่ยังคงมีผล

ต่อการเพิ่มขึ้นของเม็ดเลือดแดง และการเพิ่มขึ้นยังเป็นความสัมพันธ์ในเชิงเส้นตรง (P<0.05) พบว่าค่าสัดส่วนเม็ดเลือดขาว Neutrophil ต่อ Lymphocyte (N:L ratio) ต่ำที่สุดในปลาดุกลูกผสมกลุ่มที่ได้รับวิตามินซี 1,000 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม ดังนั้นการเสริมวิตามินซีในอาหารที่ระดับ 1,000-1,500 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม เป็นเวลา 4 สัปดาห์มีผลต่อการรักษาสุขภาพไม่ให้เปลี่ยนแปลงภายใต้สภาวะความเครียดจากน้ำอุณหภูมิต่ำในการทดสอบอุณหภูมิน้ำต่ำครั้งที่สอง พบว่าการเพิ่มระดับการเสริมวิตามินซีในอาหารมีผลต่อการเพิ่มขึ้นของค่าโปรตีนและค่าอิมมูโนโกลบูลินรวมในเชิงควอดราติก และมีผลต่อการเพิ่มไลโซไซม์ในเชิงเส้นตรง และการเพิ่มระดับวิตามินซีในอาหารมีผลต่อการเพิ่มค่าคอมพลีเมนต์ในปลาดุกลูกผสม แต่การเพิ่มขึ้นนี้ไม่แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ จึงสรุปได้ว่าการเสริมวิตามินซี 1,000-1,500 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม ในอาหารเป็นระยะเวลา 8 สัปดาห์มีผลต่อการเพิ่มค่าทางภูมิต้านทานโรคในสภาวะน้ำอุณหภูมิต่ำ

การทดลองที่ 3 เป็นการเสริมวิตามิอีที่ระดับ 0, 125, 250, และ 500 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัมในอาหารทดลอง เป็นเวลา 8 สัปดาห์ พบว่าการเพิ่มขึ้นของระดับวิตามินอีในอาหารไม่มีผลต่ออัตราการรอดและสมรรถนะการเจริญเติบโตอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ระดับวิตามินอีในอาหารไม่มีผลต่อค่าทางโลหิตวิทยา ไลโซไซม์ และค่าโปรตีนในเลือด อย่างไรก็ตามพบว่าระดับการเสริมวิตามินอีในอาหารมีผลต่อการลดลงของค่า N:L ratio (P<0.05) และการเพิ่มขึ้นของค่าอิมมูโนโกลบูลิน (P<0.05) ได้ทำการศึกษาผลของวิตามินอีต่อปลาดุกลูกผสมภายใต้การทดสอบอุณหภูมิน้ำต่ำ (19 องศาเซลเซียส) 2 ครั้ง คือ หลังจาก 4 สัปดาห์ และ 8 สัปดาห์ของการทดลอง โดยก่อนการทดสอบอุณหภูมิน้ำจะทำการสุ่มปลาสำหรับทำการวิเคราะห์ค่าเพื่อใช้เปรียบเทียบ ผลการทดลองพบว่า การทดสอบอุณหภูมิน้ำทั้งสองครั้งไม่มีผลต่อการเปลี่ยนแปลงของค่าโปรตีนในเลือด แต่พบ สภาวะ hemoconcentration ในปลาดุกลูกผสมกลุ่มที่ได้รับวิตามินในอาหารสูงสุด (500 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม) ที่ถูกทดสอบอุณหภูมิน้ำ ซึ่งชี้ให้เห็นว่าการเสริมวิตามินอีที่ระดับนี้ก่อให้เกิดผลเสียต่อปลาดุกลูกผสม การเพิ่มการเสริมวิตามินอีในอาหารมีผลต่อการลดลงของค่า N:L ratio เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มที่ไม่ได้รับการเสริมวิตามินอีในอาหาร (P<0.05) พบว่าภายใต้สภาวะทดสอบอุณหภูมิน้ำ การเปลี่ยนแปลงของค่าไลโซไซม์และค่าอิมมูโนโกลบูลินในปลาดุกลูกผสมทุกกลุ่มทดลองที่ได้รับการเสริมวิตามินในอาหารจะมีค่าต่ำกว่าเมื่อเปรียบเทียบกับปลาดุกลูกผสมที่ไม่ได้รับการเสริมวิตามินอี ดังนี้การทดลองครั้งนี้จึงสรุปได้ว่าการเสริมวิตามินอีในอาหารปลาดุกลูกผสมเป็นสิ่งที่จำเป็นและระดับการเสริมที่ต่ำที่สุด 125 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัมก็เพียงพอต่อการรักษาสภาพภูมิคุ้มกันในปลาดุกลูกผสมภายใต้สภาวะความเครียดจากน้ำอุณหภูมิต่ำ

Abstract

A sudden temperature change could create thermal stress and result in adverse effects on the physiological process and health of fish. The present study investigated the hematological status of, and oxidative stress in, hybrid catfish (*Clarias macrocephalus* x *C. gariepinus*) that have been exposed to various temperatures (Experiment I). In addition, we determined the effects of a high level of supplementary vitamin C or vitamin E provided to hybrid catfish to minimize the thermal stress represented by hematological parameters and non-specific immunity (Experiment II and III).

In the experiment I, hematological parameters were investigated in hybrid catfish that were exposed to low (26 ^{o}C) or high (34 ^{o}C) temperatures comparing to the control group (30 ^{o}C). In addition, Malondialdehyde (MDA), which was the oxidative stress marker, was analysed in the kidneys and livers of hybrid catfish. During 24 hours of exposing time, hematological indices and oxidative stress marker were analyzed at 3, 6, 12, and 24 hours. At the beginning and the end of exposing time, when hybrid catfish were exposed to the low or the high temperature, several hematological parameters were changed comparing to the hybrid catfish of control groups. The production of superoxide anion (O^{2-}) in the blood increased when the fish was challenged by a low temperature, demonstrating that the ability of catfish to tolerate a cool temperature is limited. Although, hepatic and renal MDA were high with higher temperature, no significant differences were found.

In the experiment II, dietary vitamin C was fed to hybrid catfish at 250, 500, 1,000, 1,500, and 2,000 mg/kg for an 8-week experimental period. The hepatic vitamin C concentration in the fish was similar to that of all tested feeds used throughout this experiment. The survival rate (SR) and feed conversion ratios (FCR) were similar in all groups. Therefore, dietary vitamin C at a concentration of 250 mg/kg was adequate for normal growth. During the first four weeks, the increased dietary vitamin C significantly enhanced the specific growth rate (SGR) and weight gain (WG) of hybrid catfish in the linear response ($P<0.05$), suggesting that elevated level of vitamin C during this growth period resulted in maximum growth responses. However, these significant effects did not extend through the final four weeks of the experimental period. Thus, an increase in dietary vitamin C (1,000-1,500 mg/kg) would be essential for juvenile fish to achieve a maximum growth rate. To assess the thermal stress, the hybrid catfish were transferred to water having a temperature of 19 ºC for 24 h during week 4 (the first thermal stress) and week 8 (the second thermal stress). At the first thermal stress, the hemoglobin content (Hb) and red blood cell number (RBC) increased with the increment of dietary vitamin C in quadratic and

linear fashion, respectively (P<0.05). The hematocrit (Ht) value was similar in all groups. At the second (cooling) stress, the increase in dietary vitamin C did not affect Ht and Hb, but increased RBC linearly. Additionally, the lowest Neutrophil:Lymphocyte ratio (N:L ratio) was observed in hybrid catfish of dietary vitamin C at 1,000 mg/kg. Thus, a high level vitamin C supplementation (1,000-1,500 mg/kg) for a short time (four weeks) was necessary to sustain the health status of the thermal stress fish. The increment of vitamin C also quadratically increased the total protein (TP) and total immunoglobulin (Ig) (P<0.05) at the second thermal stress. Under this stress, increase in dietary vitamin C linearly increased lysozyme activity (Lz) (P<0.05). The alternative complement activity was slightly higher with the higher vitamin C level. Long term supplementation of high vitamin C level (1000-15000 mg/kg) would be beneficial to the immunocompetence of hybrid catfish.

In the experiment III, dietary vitamin E was fed to hybrid catfish at 0, 125, 250, and 500 mg/kg for an 8-week experimental period. Survival rate and growth performance were similar in all groups. Dietary vitamin E did not affect hematological parameters, Lz and TP. However, the increase in dietary vitamin E decreased N:L ratio significantly. Further, Ig showed posistive responses due to increase dietary vitamin E. To conduct the effects of vitamin E on the health status under the thermal stress, the hybrid catfish were transferred to water having a temperature of 19 ºC for 24 h during week 4 (the first thermal stress) and week 8 (the second thermal stress). Before assessing the thermal stress, hybrid catfish were sampling to refer as the normal group. In the present study, thermal stress had no effect on TP. Hemoconcentration represented by significant increase in Ht was found in hybrid catfish fed with highest level of vitamin E (500 mg/kg) (P<0.05), demonstrating that high vitamin E level had adverse effect on the response of thermal stress in hybrid catfish. Increase in supplemental of vitamin E significant decreased N:L ratios comparing with that of hybrid catfish fed on the non-supplementary vitamin E diet (P<0.05). Decrease in the reduction of Lz and Ig during thermal stress was observed in hybrid catfish obtain dietary vitamin E at each and every level. Therefore, supplementary vitamin E was necessary to minimize the adverse effects causing by thermal stress. Minimal level (125 mg/kg) of vitamin E would be adequate for a proper dietary prophylaxis to maintain immuncompetence in hybrid catfish.

สารบัญ

หน้า

กิตติกรรมประกาศ ..... ก
บทคัดย่อ ..... ข
Abstract ..... ง
สารบัญ ..... ฉ
สารบัญตาราง ..... ช
สารบัญภาพ ..... ซ
บทที่ 1 บทนำ
ความสำคัญและที่มาของปัญหาการวิจัย 1
วัตถุประสงค์ของการวิจัย 12
ขอบเขตของการวิจัย 12
ประโยชน์ที่ได้รับจากการวิจัย 13
บทที่ 2 วิธีดำเนินการวิจัย
การทดลองที่ 1 ผลของอุณหภูมิน้ำต่อค่าทางโลหิตวิทยาและค่า lipid peroxidation ที่ตับและไต 14
การทดลองที่ 2 ผลของการเสริมวิตามินซีต่อค่าทางโลหิตวิทยาและภูมิต้านทานโรคแบบไม่จำเพาะเจาะจงในสภาวะน้ำอุณหภูมิต่ำ 17
การทดลองที่ 3 ผลของการเสริมวิตามินอีต่อค่าทางโลหิตวิทยาและภูมิต้านทานโรคแบบไม่จำเพาะเจาะจงในสภาวะน้ำอุณหภูมิต่ำ 24
บทที่ 3 ผลการวิจัย
ผลการทดลองที่ 1 29
ผลการทดลองที่ 2 34
ผลการทดลองที่ 3 44
อภิปรายผลการทดลองที่ 1 51
อภิปรายผลผลการทดลองที่ 2 52
อภิปรายผลการทดลองที่ 3 58
บทที่ 4 บทสรุป
สรุปผลการวิจัย 62
ข้อเสนอแนะ 63
บรรณานุกรม 64

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

ประวัติผู้วิจัย 73

สารบัญตาราง

หน้า

ตารางที่ 2.1 สัดส่วนของวัตถุดิบในอาหารปลาดุกลูกผสมและองค์ประกอบทางเคมี 18
ตารางที่ 2.2 ระดับการเสริมอนุพันธ์วิตามินซี L-ascorbyl-2-monophosphate และ
ปริมาณที่วิเคราะห์ได้ในอาหารปลาดุกลูกผสมของแต่ละกลุ่มทดลอง 19
ตารางที่ 2.3 องค์ประกอบทางเคมีของอาหารทดลอง 25
ตารางที่ 2.4 ระดับการเสริมอนุพันธ์วิตามินอี (tocopheryl acetate) และปริมาณ
ที่วิเคราะห์ได้ในอาหารปลาดุกลูกผสมของแต่ละกลุ่มทดลอง 26
ตารางที่ 3.1 ค่าทางโลหิตวิทยาของปลาดุกลูกผสมที่ถูกนำไปทดสอบ
อุณหภูมิน้ำต่าง ๆ ภายใน 24 ชั่วโมง 32
ตารางที่ 3.2 ผลของการเปลี่ยนแปลงอุณหภูมิน้ำต่อค่า Nitrobluetetrazolium assay
(NBT) ในเลือดและค่า malondealdehyde (MDA) ในไตและตับของ
ปลาดุกลูกผสมภายในระยะเวลาทดสอบ 24 ชั่วโมง 33
ตารางที่ 3.3 สมรรถนะการเจริญเติบโตและอัตราการรอดของปลาดุกลูกผสมที่
ได้รับอนุพันธ์วิตามินซีที่ระดับต่าง ๆ (ค่าเฉลี่ย ± ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน) 36
ตารางที่ 3.4 ค่าโลหิตวิทยาของปลาดุกลูกผสมที่ได้รับอาหารเสริมอนุพันธ์วิตามินซี
ภายใต้สภาวะที่ถูกทดสอบด้วยน้ำอุณหภูมิต่ำ
(ค่าเฉลี่ย ± ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน)..... 39
ตารางที่ 3.5 การนับจำแนกชนิดเม็ดเลือดขาวในปลาดุกลูกผสมที่ไดรับอาหารเสริม
อนุพันธ์วิตามินซีภายใต้สภาวะที่ถูกทดสอบด้วยน้ำอุณหภูมิต่ำ
(ค่าเฉลี่ย ± ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน)..... 40
ตารางที่ 3.6 ผลวิเคราะห์ปริมาณวิตามินอีและอนุพันธ์วิตามินอีที่เสริมในอาหารทดลอง
และสมรรถนะการเจริญเติบโตของปลาดุกลูกผสมของแต่ละกลุ่มทดลอง 45
ตารางที่ 3.7 ผลของการเสริมอนุพันธ์วิตามินอีในอาหารและการทดสอบอุณหภูมิน้ำ
ต่อค่าโลหิตวิทยาของปลาดุกลูกผสมหลังจากการเลี้ยงด้วยอาหารทดลอง
4 สัปดาห์ 46
ตารางที่ 3.8 ผลของการเสริมอนุพันธ์วิตามินอีในอาหารและการทดสอบอุณหภูมิน้ำ
ต่อค่าชนิดและจำนวนเม็ดเลือดขาว ของปลาดุกลูกผสม 49
ตารางที่ 3.9 ผลของการเสริมอนุพันธ์วิตามินอีในอาหารและการทดสอบอุณหภูมิน้ำ
ต่อค่าไลโซไซม์ โปรตีนในเลือด และค่าอิมมูโนโกลบูลิน ของปลาดุกลูกผสม 50

สารบัญภาพ

หน้า

ภาพที่ 1.1 ผลผลิตและมูลค่าของสัตว์น้ำที่ได้จากการทำการประมงรวม
การเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำ..... 2
ภาพที่ 1.2 อุณหภูมิน้ำของแม่น้ำเจ้าพระยา และแม่น้ำสาขา ที่บันทึกทุก ๆ
30 นาที โดยบันทึกที่ระดับความลึกต่ำจากผิวน้ำ 1 เมตร 3
ภาพที่ 1.3 โครงสร้างของวิตามินซี (L-ascorbic acid) และอนุพันธ์วิตามินซี
(L-ascorbyl-2-monophosphate) 8
ภาพที่ 1.4 โครงสร้างของวิตามินอี (tocopherol) และสารอนุพันธ์วิตามินอี
(Alpha-tocopheryl acetate)..... 10
ภาพที่ 3.1 ปริมาณอนุพันธ์วิตามินซีที่วิเคราะห์ได้ในตับของปลาดุกลูกผสม
ในแต่ละกลุ่มทดลอง 35
ภาพที่ 3.2 ผลของการเสริมอนุพันธ์วิตามินซีในอาหารต่อค่า Nitoblueterazolium (NBT)
(ค่าเฉลี่ย ± ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน) ของปลาดุกลูกผสมภายใต้สภาวะทดสอบ
อุณหภูมิน้ำครั้งที่ 1 (หลังจากสัปดาห์ที่ 4 ของการทดลอง) และครั้งที่ 2
(หลังจากสัปดาห์ที่ 8 ของการทดลอง) 41
ภาพที่ 3.3 ผลของการเสริมอนุพันธ์วิตามินซีในอาหารต่อค่าโปรตีนในเลือด
(ค่าเฉลี่ย ± ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน) ของปลาดุกลูกผสมภายใต้สภาวะทดสอบ
อุณหภูมิน้ำครั้งที่ 1 (หลังจากสัปดาห์ที่ 4 ของการทดลอง) และครั้งที่ 2
(หลังจากสัปดาห์ที่ 8 ของการทดลอง) 41
ภาพที่ 3.4 ผลของการเสริมอนุพันธ์วิตามินซีในอาหารต่อค่าอิมมูโนโกลบูลินในเลือด
(ค่าเฉลี่ย ± ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน) ของปลาดุกลูกผสมภายใต้สภาวะทดสอบ
อุณหภูมิน้ำครั้งที่ 1 (หลังจากสัปดาห์ที่ 4 ของการทดลอง) และครั้งที่ 2
(หลังจากสัปดาห์ที่ 8 ของการทดลอง) 42
ภาพที่ 3.5 ผลของการเสริมอนุพันธ์วิตามินซีในอาหารต่อค่าไลโซไซม์ในซีรัม
(ค่าเฉลี่ย ± ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน) ของปลาดุกลูกผสมภายใต้สภาวะทดสอบ
อุณหภูมิน้ำครั้งที่ 1 (หลังจากสัปดาห์ที่ 4 ของการทดลอง) และครั้งที่ 2
(หลังจากสัปดาห์ที่ 8 ของการทดลอง) 42
ภาพที่ 3.6 ผลของการเสริมอนุพันธ์วิตามินซีในอาหารต่อค่าคอมพลีเมนต์ (ACH_{50})
(ค่าเฉลี่ย ± ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน) ของปลาดุกลูกผสมภายใต้สภาวะทดสอบ

อุณหภูมิน้ำครั้งที่ 1 (หลังจากสัปดาห์ที่ 4 ของการทดลอง) และครั้งที่ 2
(หลังจากสัปดาห์ที่ 8 ของการทดลอง) 43

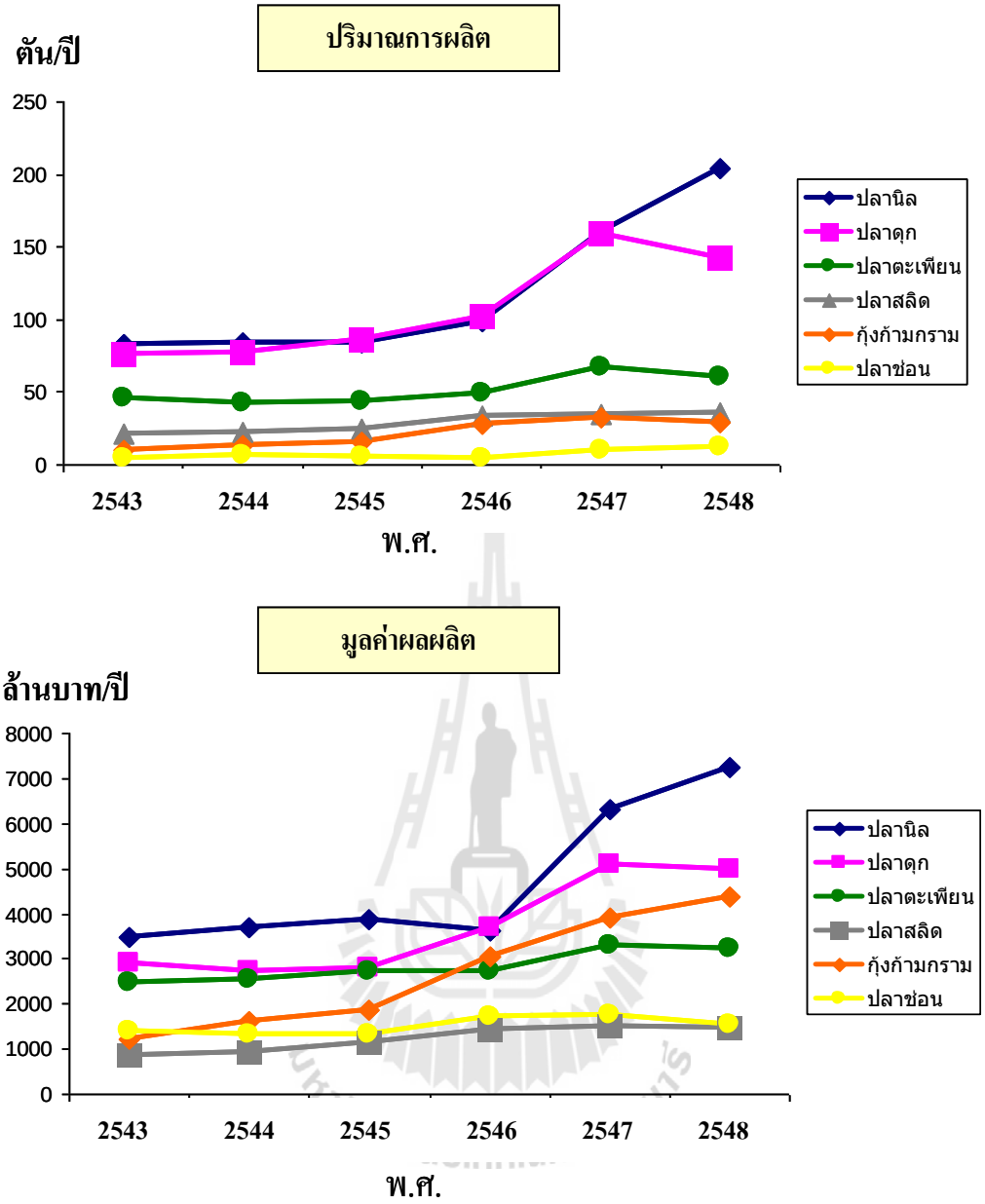
บทที่ 1
บทนำ

ความสำคัญและที่มาของปัญหาการวิจัย

ปลาดุกเป็นปลาน้ำจืดชนิดหนึ่งที่มีความสำคัญทางเศรษฐกิจของประเทศไทย จากข้อมูลการรวบรวมผลผลิตและมูลค่าของสัตว์น้ำที่ได้จากการทำการประมงและการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำจืด พบว่าผลผลิตปลาดุกมีปริมาณการผลิตเป็นอันดับสองรองจากปลานิล (ภาพที่ 1.1) และมีมูลค่าของการจำหน่ายเป็นอันดับที่สองของมูลค่าสัตว์น้ำจืดทั้งหมด (ภาพที่ 1.1) การเพาะเลี้ยงปลานิลมีความสำคัญต่อการส่งออกและบริโภคภายในประเทศ แต่การเพาะเลี้ยงปลาดุกนั้นสำหรับเพื่อการบริโภคภายในประเทศเป็นส่วนใหญ่ ปลาดุกจัดเป็นอาหารโปรตีนที่สำคัญของคนไทยทั่วทุกภาค การเพาะเลี้ยงปลาดุกสามารถทำได้ทั่วทุกภาคในประเทศไทย รูปแบบของการเพาะเลี้ยงปลาดุกมีทั้งการเพาะเลี้ยงในบ่อดิน นาข้าว ร่องสวน บ่อซีเมนต์และในกระชัง ทั้งนี้เพราะว่าปลาดุกเป็นปลาที่สามารถเลี้ยงในสภาพความหนาแน่นสูง มีการเจริญเติบโตรวดเร็ว มีความทนทานต่อสภาพแวดล้อมได้ดี และให้ผลผลิตต่อพื้นที่สูง ทำให้มีผู้นิยมเลี้ยงปลาดุกกันอย่างแพร่หลายในประเทศไทย ขนาดของฟาร์มเพาะเลี้ยงปลาดุกมีตั้งแต่ขนาดเล็กจนถึงขนาดใหญ่ เป็นทั้งการเพาะเลี้ยงเชิงพาณิชย์ซึ่งเป็นอาชีพหลักและอาชีพเสริมของเกษตรกรทั่วไป นอกจากนี้ยังเป็นการเลี้ยงเพื่อเป็นอาหารในครัวเรือน ปลาดุกยังเป็นปลาที่รัฐบาลส่งเสริมในโครงการประมงโรงเรียน ประมงหมู่บ้าน จึงทำให้เกิดกิจกรรมที่เป็นประโยชน์และได้ผลพลอยได้เป็นอาหารของชุมชน เพื่อสร้างสังคมในชุมชนชนบทให้เข้มแข็ง

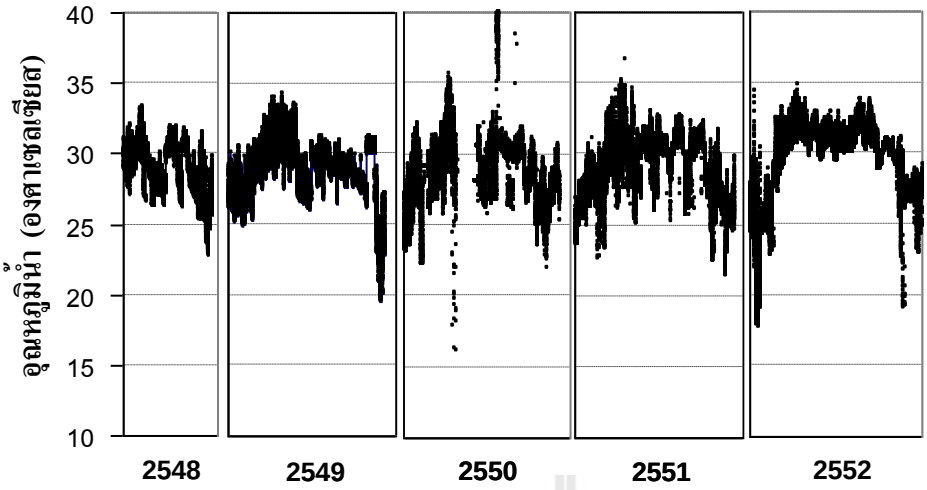
ความแตกต่างของฤดูกาลที่ส่งผลต่อคุณภาพน้ำโดยเฉพาะอุณหภูมิน้ำ เป็นข้อจำกัดในการเพาะเลี้ยงปลาดุก เกษตรกรมักพบปัญหาการเลี้ยงปลาดุกลูกผสมในบางฤดูกาล การเพาะเลี้ยงปลาดุกในภาคเหนือและภาคตะวันออกเฉียงเหนือมักประสบปัญหาในช่วงฤดูหนาว เนื่องจากอุณหภูมิน้ำลดต่ำลง (โดยเฉพาะระหว่างเดือนพฤศจิกายน ถึง กุมภาพันธ์) นอกจากนี้ในช่วงฤดูฝนที่มีฝนตกติดต่อกัน ทำให้อุณหภูมิน้ำลดลง กอปรกับคุณภาพน้ำด้านอื่น ๆ เปลี่ยนแปลงอย่างรวดเร็วอันเนื่องมาจากน้ำฝนที่ตกลงในบ่อ โดยพบว่าช่วงฤดูกาลดังกล่าวนี้ ปลาจะมีการเจริญเติบโตช้า การกินอาหารน้อย ร่างกายอ่อนแอ ง่ายต่อการเกิดโรค ทำให้เกิดโรคระบาดขึ้นในการเลี้ยงปลาดุกมากในช่วงนี้ ส่งผลให้ผลผลิตปลาดุกลดลง

นอกจากนี้สภาวะการเปลี่ยนแปลงภูมิอากาศของโลกยังส่งผลต่อการเปลี่ยนแปลงอุณหภูมิน้ำในรอบปี คณะผู้วิจัยได้ทำการรวบรวมข้อมูลอุณหภูมิน้ำในแม่น้ำเจ้าพระยาที่ได้มีการบันทึกไว้ โดยกรมควบคุมมลพิษ กระทรวงทรัพยากรธรรมชาติและสิ่งแวดล้อม และได้สร้างเป็นแผนภูมิ แสดงดังภาพที่ 1.2 จะเห็นได้ว่าแนวโน้มของอุณหภูมิน้ำมีแนวโน้มที่จะมีการเปลี่ยนแปลงมากขึ้น เช่น บางช่วงฤดูกาลพบว่าน้ำมีอุณหภูมิต่ำมาก และในบางช่วงฤดูกาลน้ำมีอุณหภูมิสูงมาก



ภาพที่ 1.1 ผลผลิตและมูลค่าของสัตว์น้ำที่ได้จากการทำการประมงรวมการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำ

ที่มา: กลุ่มวิเคราะห์การค้าสินค้าประมงระหว่างประเทศ กองประมงต่างประเทศ กรมประมง (รวบรวมข้อมูลจากกรมศุลกากร)



ภาพที่ 1.2 อุณหภูมิน้ำของแม่น้ำเจ้าพระยา และแม่น้ำสาขา ที่บันทึกทุก ๆ 30 นาที โดยบันทึกที่ระดับความลึกต่ำจากผิวน้ำ 1 เมตร [http://www.wqmonline.com]

ในการเลี้ยงปลาดุกนั้น ระบบการเลี้ยงมักเป็นระบบเปิด คือเลี้ยงอยู่กลางแจ้ง ไม่ได้เลี้ยงในโรงเรือนหรือในระบบปิดที่มีการควบคุมอุณหภูมิ แม้ว่าเทคโนโลยีการสร้างระบบปิดหรือระบบควบคุมอุณหภูมิน้ำในการเลี้ยงสัตว์น้ำจะมีการพัฒนาอย่างต่อเนื่อง แต่ระบบดังกล่าวก็ต้องการการลงทุนที่สูง และค่าใช้จ่ายสำหรับแหล่งพลังงานในการเดินระบบ การดูแลรักษาค่อนข้างสูง ซึ่งไม่เหมาะสมกับการเพาะเลี้ยงปลาในประเทศไทย ซึ่งต้องการให้การเลี้ยงปลาเป็นระบบต้นทุนต่ำ เพื่อผลิตอาหารโปรตีนคุณภาพดีให้แก่ประชากรส่วนใหญ่ของประเทศ แนวทางการพัฒนาอันหนึ่งสำหรับการเลี้ยงปลาดุกให้เหมาะสมกับสภาวะการเปลี่ยนแปลภูมิอากาศตามฤดูกาล และสภาวะภูมิอากาศของโลกก็คือ การทำให้ปลาดุกที่เลี้ยงมีความแข็งแรง สามารถทนทานต่อความเครียดอันเนื่องมาจากอุณหภูมิน้ำที่เปลี่ยนไปได้ดีขึ้น วิธีการหนึ่งที่ได้มีการรายงานคือการใช้สารเสริมในอาหารเพื่อให้ปลาดุกมีสภาพร่างกายที่แข็งแรง สารเสริมมีหลายชนิดที่มีผลต่อการสร้างร่างกายปลาให้แข็งแรง ในการศึกษาเบื้องต้นนี้ผู้วิจัยจึงได้ทำการทดสอบสารเสริมประเภทวิตามินที่จำเป็นในร่างกาย ได้แก่ วิตามินซีและวิตามินอี เพราะการเสริมวิตามินทั้งสองให้กับปลาในอาหารเป็นสิ่งที่เกษตรกรโดยทั่วไปได้ทำอยู่แล้วในการเตรียมอาหารให้กับปลาดุก ผู้วิจัยจึงทำการศึกษาเพื่อหาระดับหรือปริมาณและระยะเวลาในเสริมวิตามินซีและวิตามินอีที่มีผลต่อสุขภาพและภูมิคุ้มกันในตัวปลาเพื่อที่เกษตรกรจะสามารถนำไปใช้ได้จริง

การตรวจเอกสารวิชาการ

ปลาดุกที่เป็นที่นิยมเลี้ยงในปัจจุบันนี้ คือ ปลาดุกลูกผสม (Hybrid catfish) ซึ่งเป็นพันธุ์ที่เป็นการผสมข้ามพันธุ์ระหว่างปลาดุกยักษ์เพศผู้ (หรือปลาดุกเทศ หรือปลาดุกรัสเซีย) *(Clarias*

gariepinus) กับปลาดุกอุยเพศเมีย *(C. macrocephalus)* ได้ปลาดุกลูกผสมที่เนื้อมีรสชาติคล้ายปลาดุกอุย และมีการเจริญเติบโตเร็ว และทนทานต่อโรคมากขึ้น การเพาะเลี้ยงปลาดุกลูกผสมในปัจจุบันนี้เป็นการเพาะเลี้ยงแบบครบวงจร เกษตรกรสามารถเลี้ยงพ่อแม่พันธุ์ภายในฟาร์ม แล้วนำพ่อพันธุ์ปลาดุกยักษ์เพศผู้และปลาดุกอุยเพศเมียที่มีความสมบูรณ์เพศมาเพาะลูกพันธุ์ปลาดุกลูกผสมโดยการฉีดฮอร์โมนสังเคราะห์ (Luteinizing Hormone Releasing Hormone analogue; LHRHa) ร่วมกับวิธีการผสมเทียม (Artificial fertilization) การอนุบาลลูกปลาดุกทำได้ทั้งในบ่อซีเมนต์ และบ่อดิน และการเลี้ยงปลาขนาดตลาดก็ทำได้ทั้งในบ่อดินและบ่อซีเมนต์เช่นเดียวกัน ความหนาแน่นของปลาที่นิยมปล่อยเลี้ยงในบ่อซีเมนต์ คือ 50-70 ตัวต่อตารางเมตร (ขนาดลูกปลา 2-3 เซนติเมตร) และในบ่อดิน เท่ากับ 40-100 ตัวต่อตารางเมตร อาหารที่ใช้ในการเลี้ยงสามารถใช้ได้ทั้งอาหารสำเร็จรูป และอาหารที่เกษตรกรเตรียมเองจากผลพลอยได้ของการปศุสัตว์อื่น ๆ ระยะเวลาการเลี้ยงโดยทั่วไปประมาณ 90 วันก็สามารถจับขายได้ ทำให้การเพาะเลี้ยงปลาดุกเชิงพาณิชย์สามารถทำได้อย่างน้อยถึง 3 รุ่นต่อปี

จากการศึกษาของโครงการอันเนื่องมาจากพระราชดำริและกิจกรรมพิเศษ ของสมเด็จพระเทพรัตนราชสุดาฯ สยามบรมราชกุมารี เป็นการทดลองเปรียบเทียบการเจริญเติบโตของปลาดุกลูกผสมภายใต้สภาพการเลี้ยงในพื้นที่สูงช่วงฤดูหนาว ที่ศูนย์ศึกษาชาวไทยภูเขา “แม่ฟ้าหลวง” อำเภอท่าสองยาง จังหวัดตาก โดยเปรียบเทียบสภาพการเลี้ยงที่ควบคุมอุณหภูมิ (green house) และสภาพการเลี้ยงอุณหภูมิปกติของฤดูหนาว พบว่า ในสภาพการเลี้ยงที่น้ำมีอุณหภูมิต่ำ (19.5-27.4 ^{0}C) ปลาดุกลูกผสมมีน้ำหนักและความยาวลำตัวต่ำกว่าปลาดุกลูกผสมที่เลี้ยงในสภาพที่ควบคุมอุณหภูมิ (25.4-30.2 ^{0}C) อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (α=0.05) ซึ่งสภาพการเลี้ยงที่ควบคุมอุณหภูมิ (green house) ในการทดลองนี้ ทำโดยการจัดทำคอกล้อมบ่อเลี้ยงปลาพลาสติก บุด้วยพลาสติกหนา 0.2 มิลลิเมตร ผลการทดลองดังกล่าวนี้เป็นประโยชน์ต่อการนำไปใช้สำหรับการเลี้ยงปลาเพื่อให้ประชาชนในเขตพื้นที่สูงให้มีปลาบริโภคตลอดทุกฤดูกาล และเป็นการสนองต่อโครงการตามพระราชดำริที่จะเสริมสร้างชุมชนชนบทให้แข็งแข็ง (ถาวร ทันใจ, 2551) อย่างไรก็ตามการทำคอกเลี้ยงแบบควบคุมอุณหภูมิ (green house) จะเป็นข้อจำกัดในการเลี้ยงในบ่อขนาดใหญ่ และการเลี้ยงในเชิงพาณิชย์ เพราะเกษตรกรต้องลงทุนสูงขึ้น

ปลาเป็นสัตว์เลือดเย็น (poikilotherm) ซึ่งอุณหภูมิในร่างกายจะเปลี่ยนแปลงไปตามอุณหภูมิของสิ่งแวดล้อม ทำให้ปลาแต่ละชนิดมีช่วงอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการดำรงชีวิตเฉพาะแตกต่างกันขึ้นกับชนิดปลา การที่ปลาเป็นสัตว์เลือดเย็นที่อุณหภูมิร่างกายเปลี่ยนตามอุณหภูมิสิ่งแวดล้อมนั้น อุณหภูมิสิ่งแวดล้อมจึงมีผลโดยตรงต่อกระบวนการทางชีวเคมีตามกฎของแวนฮอฟ (Van Hoff’s Law) โดยการเพิ่มของอุณหภูมิขึ้น 10 ^{0}C จะทำให้กระบวนการทางชีวเคมีเพิ่มขึ้นเป็น 2 เท่า และลดต่ำลงในทำนองเดียวกันเมื่ออุณหภูมิต่ำลง (Boyd and Tucker, 1998)

ปลาดุกเป็นปลาในเขตร้อน อุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการดำรงชีวิตจะอยู่ในช่วง 27-32 องศาเซลเซียส (Fedoruk, 1981) ถ้าอุณหภูมิน้ำต่ำลงหรือสูงกว่าอุณหภูมิที่เหมาะสม จะทำให้ปลามีการเจริญเติบโตลดลง ภูมิคุ้มกันโรคต่ำลง และอาจตายได้ถ้าอาศัยอยู่ในช่วงอุณหภูมิที่ไม่เหมาะสมเป็นระยะเวลานาน เนื่องจากปลาดุกเป็นปลาในเขตร้อน พบว่าอุณหภูมิน้ำที่ต่ำถึง 19 องศาเซลเซียส เป็นอุณหภูมิที่ลูกปลาไม่สามารถอยู่ได้ และอุณหภูมิน้ำ 19-24 องศาเซลเซียส เป็นช่วงอุณหภูมิที่ทำให้ปลาดุกขนาดใหญ่มีการเจริญเติบโตช้า กองอนามัยสิ่งแวดล้อมได้สรุปรายงานอุณหภูมิน้ำในประเทศไทยว่า อุณหภูมิน้ำจะผันแปรอยู่ในช่วง 23.6-31.4 องศาเซลเซียส โดยแหล่งน้ำในภาคเหนือและภาคตะวันออกเฉียงเหนือจะมีอุณหภูมิน้ำที่มีค่าต่ำสุด อุณหภูมิน้ำในแหล่งน้ำภาคกลางจะสูงขึ้นและสูงสุดในภาคใต้ โดยความผันแปรของอุณหภูมิจะแตกต่างกันไปในแต่ละฤดูกาล (สิทธิชัย ตันธนะสฤษดิ์, 2549)

การเปลี่ยนแปลงของอุณหภูมิน้ำส่งผลโดยตรงต่อเมตาบอลิซึมของปลา ก่อให้เกิดความเครียดอันเนื่องมาจากการเปลี่ยนแปลงอุณหภูมิ เพราะปลาจะต้องพยายามปรับสภาพร่างกายให้อยู่ในสิ่งแวดล้อมที่เปลี่ยนแปลงไป ได้มีรายงานการศึกษาถึงผลของฤดูกาลและการเปลี่ยนแปลงอุณหภูมิน้ำต่อระบบภูมิคุ้มกันของปลาและค่าทางโลหิตวิทยารวมทั้งค่าสารชีวเคมีในเลือด (Kumari et al., 2006; Langston et al., 2002; Dominguez et al., 2005; De Pedro et al., 2005) และพบว่าการเปลี่ยนแปลงอุณหภูมิน้ำอย่างรวดเร็วมีผลทำให้ปลามีภูมิคุ้มกันโรคลดลง แต่การเปลี่ยนแปลงอุณหภูมิอย่างช้า ๆ ไม่ส่งผลต่อภูมิคุ้มกันของปลาอย่างมีนัยสำคัญ ซึ่งได้มีการประเมินว่าถ้าอุณหภูมิน้ำเปลี่ยนไปประมาณ 4 ถึง 8 องศาเศลเซียส ภายในระยะเวลา 12 ถึง 24 ชั่วโมง ปลาจะมีภูมิคุ้มกันลดลง และเสี่ยงต่อการเกิดโรค (Chen et al., 2004; Ndong et al., 2007) ปัญหาการเปลี่ยนแปลงอุณหภูมิน้ำในประเทศไทย โดยเฉพาะฤดูหนาวมีการเปลี่ยนแปลงประมาณ 7-8 องศาเซลเซียสในรอบวัน (Fedoruk, 1981) นอกจากนี้เยาวนิตย์ ดนยดลและจีรนันท์ อุไรประสิทธิ์(2544) ได้ศึกษาผลของการลดอุณหภูมิน้ำต่อการตอบสนองของระบบภูมิคุ้มกันโรคในปลากะรังและปลากระพงขาว พบว่าปลาทั้ง 2 ชนิดมีภูมิคุ้มกันโรคลดลงเมื่ออุณหภูมิน้ำต่ำลง ในสภาพฤดูกาลบางช่วงของประเทศไทย ที่น้ำมีอุณหภูมิต่ำกว่าอุณหภูมิที่เหมาะสมสำหรับการดำรงชีวิตของปลาดุก จะทำให้ปลาดุกมีภูมิคุ้มกันโรคลดลง

การเลี้ยงปลาดุกลูกผสมมักนิยมเลี้ยงในสภาพความหนาแน่นสูง เพื่อให้ได้ผลผลิตต่อหน่วยพื้นที่สูง สภาพการเลี้ยงที่หนาแน่นส่งผลต่อความเครียดของปลาอีกทางหนึ่ง และสภาพที่มีการเปลี่ยนแปลงคุณภาพน้ำในด้านอื่น ๆ ร่วมด้วย เช่น ค่าความเป็นกรด-ด่าง ค่าออกซิเจนละลายน้ำ ฯลฯ จะร่วมกันส่งผลกระทบต่อการเกิดโรคในปลาดุกในฤดูหนาวและฤดูฝนได้ ได้มีรายงานการศึกษาว่าอุณหภูมิน้ำที่ไม่เหมาะสมก่อให้เกิดความเครียดกับปลาเพิ่มมากขึ้นเมื่อปลาอยู่ในสภาวะ

ที่มีความเครียดจากการปนเปื้อนของโลหะหนักในน้ำ และสารเคมีในน้ำ (Prophete et al., 2006;Patra et al., 2007)

การศึกษาทางด้านระบบภูมิคุ้มกันในปลาจะให้ความสำคัญกับค่าบ่งบอกถึงภูมิคุ้มกันแบบไม่จำเพาะเจาะจง (non-specific immunity หรือ innate immunity) เพราะเป็นระบบภูมิคุ้มกันที่ทำหน้าที่หลักในการปกป้องปลาจากเชื้อโรค เนื่องจากเป็นด่านแรกที่จะทำลายเชื้อโรคที่เข้าสู่ร่างกายปลา โดยจะทำหน้าที่หลักในการทำลายเชื้อโรคที่ปลาได้รับเป็นครั้งแรก (Magnadottir, 2006) ค่าบ่งบอกภูมิคุ้มกันแบบไม่จำเพาะเจาะจง สามารถแบ่งออกเป็น 2 ประเภทใหญ่ คือ ภูมิคุ้มกันแบบสารน้ำและภูมิคุ้มกันแบบเซลล์ ผลการศึกษาส่วนใหญ่แสดงให้เห็นว่า เมื่ออุณหภูมิน้ำลดลงจะส่งผลให้ค่าภูมิคุ้มกันแบบสารน้ำลดลง ได้แก่ lysozyme activity และ alternative haemolytic completment (ACH 50) ลดลง (Ndong et al., 2007; Tort et al., 1998) อุณหภูมิน้ำที่ต่ำลงส่งผลต่อค่าภูมิคุ้มกันแบบเซลล์ในปลาด้วยเช่นเดียวกัน โดยพบว่าจำนวนเม็ดเลือดขาวทั้งหมดจะลดลงเมื่อปลาอยู่ในอุณหภูมิน้ำที่ต่ำลง (Ndong et al., 2007) และยังส่งผลทำให้ค่า phagocytic activity ซึ่งเป็นการบ่งบอกถึงความสามารถในการจับกินสิ่งแปลกปลอมต่ำลง (Ndong et al., 2007) นอกจากนี้อุณหภูมิน้ำที่ต่ำลงทำให้อัตราการทำงานของเซลล์ที่ทำหน้าที่จับกินสิ่งแปลกปลอม ซึ่งวัดโดยการวัดค่า respiratory burst activity ลดลง (Chen et al., 2004; Ndong et al., 2007; Tort et al., 1998) ผลการศึกษาดังกล่าวเหล่านี้เป็นข้อมูลที่อธิบายถึงผลของอุณหภูมิน้ำที่ต่ำลงต่อการลดลงของภูมิคุ้นกันในตัวปลา และการอ่อนแอต่อโรคของปลาในการเลี้ยงปลาในฤดูหนาวหรือฤดูกาลที่น้ำมีการเปลี่ยนแปลงอุณหภูมิ

สัตว์น้ำมีกลไกการตอบสนองต่อสภาวะความเครียด โดยในขั้นแรกสัตว์น้ำจะมีการตอบสนองต่อความเครียดที่เกิดขึ้นผ่านทางระบบประสาทร่วมกับการหลั่งฮอร์โมน โดยการทำให้เกิดการหลั่งฮอร์โมนที่เกี่ยวข้องกับความเครียด จากนั้นฮอร์โมนที่เกี่ยวข้องกับความเครียดนี้จะส่งผลให้เกิดการเปลี่ยนแปลงทางด้านสรีรวิทยาในร่างกายของสัตว์น้ำ และเมื่อสัตว์น้ำยังอยู่ในสภาวะความเครียดอยู่ การเปลี่ยนแปลงทางสรีรวิทยาจะส่งผลกระทบต่อการเจริญเติบโต ภูมิคุ้มกันโรค และการสืบพันธุ์ (Wedemeyer, 1996)

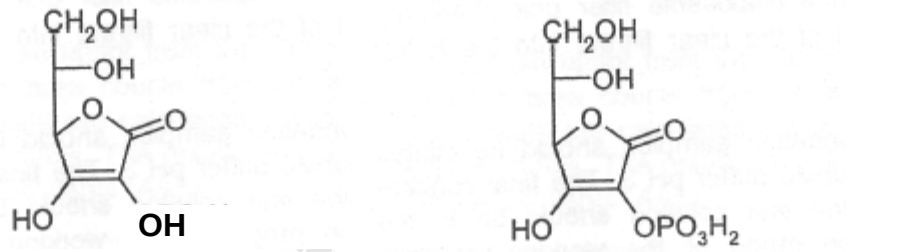
โดยปกติสัตว์ที่ใช้ออกซิเจนในกระบวนการหายใจจะมีกระบวนการต่าง ๆ ภายในร่างกายทำให้เกิด reactive oxygen species (ROS) ซึ่งได้แก่ superoxide anion radical ($O_2^{\bullet-}$) , hydrogen peroxide (H_2O_2) และ hydroxyl radical ($^{\bullet}OH$) ในขณะเดียวกันก็จะมีกระบวนการในการกำจัด ROS เพื่อทำให้อยู่ในสภาวะสมดุล กลไกในการกำจัด ROS เกิดขึ้นได้ทั้งกระบวนการที่ใช้เอ็นไซม์ (superoxide dismutase, catalase, glutathione peroxidase, glutathione reductase) และกระบวนการที่ไม่ได้ใช้เอ็นไซม์ ซึ่งได้แก่การใช้สารต้านอนุมูลอิสระ (Close and Hagerman, 2006) ถ้าหากร่างกายเกิดความสมดุลของกระบวนเกิดและการกำจัด ROS เซลล์ก็จะไม่ได้รับอันตรายจาก

ROS ที่ผลิตขึ้น แต่ถ้าหากร่างกายเกิดการเสียสมดุลของกระบวนการผลิตและการกำจัดก็จะเกิดภาวะ oxidative stress

สัตว์น้ำมีการตอบสนองต่อสิ่งที่ก่อให้เกิดความเครียด (stressor) อย่างรวดเร็ว กลไกการตอบสนองอันหนึ่งที่เกิดขึ้นอย่างรวดเร็วเมื่ออยู่ในสภาวะแวดล้อมที่ไม่เหมาะสม คือ การเกิดภาวะ oxidative stress หรือเกิดภาวะที่เกิดอนุมูลอิสระมากจนทำให้สมดุล และทำให้เซลล์ถูกทำลายด้วยอนุมูลอิสระ (Heise et al., 2006) ดังนั้นจึงได้มีการใช้การศึกษาภาวะ oxidative stress ในสัตว์น้ำเพื่อนำมาประยุกต์ใช้เป็น biomarker สำหรับตรวจวัดสภาวะแวดล้อมทางน้ำ ได้แก่ การใช้ภาวะ oxidative stress ในสัตว์น้ำสำหรับการตรวจวัดสารพิษในน้ำ (Jos et al., 2005; Farombi et al., 2008) วิธีการที่นำมาใช้ในการวัดค่า oxidative stress มีหลายวิธีการ เช่น การวัดกระบวนการต้านอนุมูลอิสระด้วยการวัดระดับเอ็นไซม์ที่เกี่ยวข้อง การวัดสภาวะที่เซลล์ถูกทำลายด้วยอนุมูลอิสระโดยการวัดโปรตีนและ/หรือดีเอ็นเอที่ถูกทำลาย หรือการวัดค่า lipid peroxidation โดยการวิเคราะห์ค่า Malodialdehyde (Kohen and Nyska, 2002)

การเลี้ยงปลาในสภาพที่อุณหภูมิน้ำต่ำลงนี้ ทำให้เกษตรกรมักจะป้องกันและรักษาโรคโดยการใช้ยาปฏิชีวนะผสมในอาหารเพื่อเลี้ยงปลา ส่งผลให้เกษตรกรต้องมีต้นทุนการเลี้ยงสูงขึ้นอันเนื่องมาจากการใช้ยาปฏิชีวนะเพื่อการรักษาและป้องกันโรค แต่ปัญหาที่หนักยิ่งไปกว่านั้นก็คือปัญหาการตกค้างของยาปฏิชีวนะในเนื้อปลาที่บริโภค นอกจากนี้การรักษาปลาที่เกิดโรคแล้วมักทำได้ยาก อีกทั้งในระหว่างการรักษาย่อมมีการสูญเสียปลาไปจำนวนหนึ่ง และการใช้ยาปฏิชีวนะจะต้องระมัดระวังเรื่องระยะเวลาการใช้และชนิดของยาซึ่งจะเป็นปัญหาของการดื้อยา เนื่องจากการใช้ยาปฏิชีวนะในปริมาณที่ไม่เหมาะสมเป็นเวลานาน แบคทีเรียจะมีการพัฒนาสายพันธุ์ที่ดื้อยาทำให้การรักษาครั้งต่อไปไม่ได้ผล นอกจากนี้ Kruse and Sorum (1994) รายงานว่ายีนต้านยาปฏิชีวนะในแบคทีเรียอาจส่งผ่านไปยังแบคทีเรียที่ก่อโรคในมนุษย์ อาจส่งผลให้การใช้ยาปฏิชีวนะในมนุษย์ไม่ได้ผลในอนาคตได้ ปัจจุบันนักวิชาการและเกษตรกรส่วนใหญ่หันมาให้ความสำคัญของการทำให้ปลาดุกลูกผสมที่เลี้ยงมีสุขภาพดี แข็งแรง มีการสร้างภูมิคุ้มกันโรคได้ตามปกติในสภาพแวดล้อมที่เปลี่ยนไป เพื่อให้ปลามีความสามารถในการทนทานโรคในสภาพแวดล้อมต่าง ๆ ได้ดีขึ้น โดยเฉพาะอย่างยิ่งในสภาพที่น้ำมีอุณหภูมิต่ำ การป้องกันโรคในระหว่างการเลี้ยงปลานอกจากจะทำโดยการจัดการการเลี้ยงให้เหมาะสมกับปลาแล้ว การเสริมสารอาหารที่มีบทบาทต่อการเพิ่มภูมิคุ้มกันโรค ก็เป็นอีกแนวทางหนึ่งในการป้องกันการเกิดโรคให้กับปลาได้ วิตามินซี และวิตามินอี เป็นสารอาหารที่ปลาจำเป็นต้องได้รับ เพื่อใช้ในปฏิกิริยาชีวะเคมีและเมตาบอลิซึมภายในร่างกายปลาให้เป็นปกติ นอกจากนี้วิตามินทั้งสองชนิดยังเป็นสารที่มีความสำคัญต่อระบบภูมิคุ้มกัน และมีคุณสมบัติเป็นสารต้านอนุมูลอิสระ ซึ่งสามารถต้านความเครียดได้ ดังนั้นในสภาวะที่ปลาเกิดความเครียด ปลาอาจมีความจำเป็นต้องได้รับวิตามินทั้ง 2 ชนิดสูงขึ้นเพื่อนำไปช่วยในระบบภูมิคุ้มกันโรคให้ทำงานได้ดีขึ้น

วิตามินซี (ascorbic acid) ($C_6H_8O_6$, MW =176.13)(ภาพที่ 1.3) ในอาหารมี 2 รูปแบบ ซึ่งร่างกายสามารถนำไปใช้ได้ทั้ง 2 ชนิด คือ ascorbic acid และ dehydroascorbic acid วิตามินซีเป็นสารที่มีความสำคัญต่อกลไกทางชีวภาพในสัตว์ ได้แก่ วิตามินซีเป็นโคแฟกเตอร์ในปฏิกิริยา hydroxylation ที่เปลี่ยนไลซีนและโปรลีนไปเป็นไฮดรอกซีไลซีนและไฮดรอกซีโปรลีนตามลำดับ ซึ่งเป็นไฮดรอกซีไลซีนและไฮดรอกซีโปรลีนเป็นสารที่สำคัญต่อกระบวนการสร้างคอลลาเจน คอลลาเจนที่แข็งแรงจะเป็น basement membrane ที่จำเป็นต่อความแข็งแรงของผนังหลอดเลือด กระดูก ฟัน และเนื้อเยื่อเกี่ยวพัน วิตามินซีเป็นสารที่สำคัญต่อการดูดซึมธาตุเหล็กในระบบทางเดินอาหาร โดยวิตามินซีจะช่วยทำให้แร่ธาตุเหล็กอยู่ในรูป ferrous ion (Fe^{++}) ซึ่งจะถูกดูดซึมผ่านผนังลำไส้ได้ วิตามินซีเป็นสารที่ช่วยป้องกันปฏิกิริยาออกซิเดชันในตัวกลางที่เป็นน้ำ เป็นสารต้านอนุมูลอิสระ และทำงานร่วมกับวิตามินอีในการเป็นสารต้านอนุมูลอิสระในตัวกลางที่เป็นน้ำมัน วิตามินซีมีผลต่อการเพิ่มระบบภูมิคุ้มกัน พบวิตามินซีสะสมในเม็ดเลือดขาว และวิตามินซีมีหน้าที่ช่วยในการผลิต C1q ที่เป็นสารประกอบของคอมพลีเมนต์ ดังนั้นวิตามินซีจึงมีบทบาทสำคัญสำหรับการเจริญเติบโต และภูมิคุ้มกันโรค (Gabaudan and Verlhac, 2001)



L-ascorbic acid **L-ascorbyl -2-monophosphate**

ภาพที่ 1.3 โครงสร้างของวิตามินซี (L-ascorbic acid) และอนุพันธ์วิตามินซี (L-ascorbyl-2-monophosphate)

วิตามินซีเป็นสารที่จำเป็นต่อร่างกายปลา ปลาต้องได้รับเพื่อให้การเจริญเติบโต การสืบพันธุ์ และเพื่อให้กลไกทางชีวภาพ ดำเนินได้อย่างปกติ ปลาส่วนใหญ่ไม่สามารถสังเคราะห์วิตามินซีได้ภายในร่างกาย หรือสังเคราะห์ได้ในปริมาณที่ไม่เพียงพอ ปลาจำเป็นต้องได้รับวิตามินซีจากอาหาร ในสภาพการเลี้ยงปลาที่ไม่หนาแน่นมาก ปลาจะได้รับวิตามินซีจากอาหารธรรมชาติ ได้แก่พวกแพลงก์ตอนพืช และพืชน้ำ ในสภาพการเลี้ยงปลาอย่างหนาแน่น ปริมาณอาหารธรรมชาติไม่เพียงพอ จำเป็นต้องเสริมวิตามินซีในอาหารปลา ได้มีข้อมูลการศึกษาในสัตว์น้ำหลายชนิดรายงานว่าวิตามินซีมีผลในการเพิ่มค่าภูมิคุ้มกันโรคในปลาได้ โดยมีบทบาทในการป้องกันเซลล์ในร่างกาย

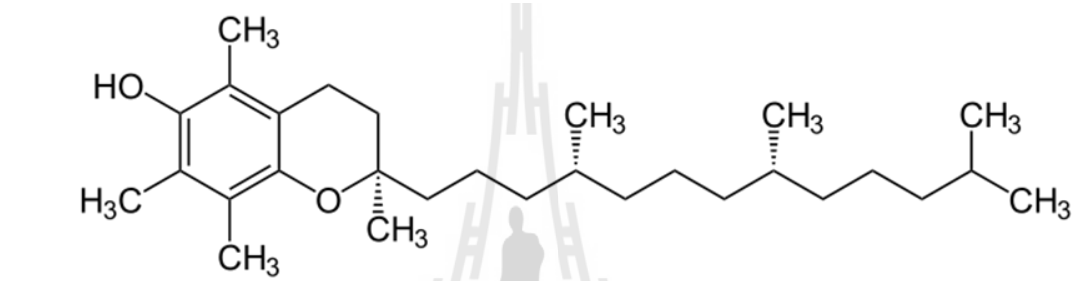
ถูกทำลายจากปฏิกิริยาออกซิเดชัน ซึ่งส่งผลให้ประสิทธิภาพการทำงานของคอมพลีเมนต์ (complement activity) การทำงานของเอนไซม์ไลโซไซม์ ประสิทธิภาพของการทำงานแบบฟาโกไซโตซีส (phagocytosis activity) สูงขึ้น (Li and Lovell, 1985; Navarre and Halver, 1989; Verlahc et al., 1998; Ortuno et al., 1999, 2001; Anbarasu and Chandran, 2001)

ในปลาพบว่าวิตามินซี จัดเป็นสารอาหารที่สำคัญ การขาดวิตามินซี จะส่งผลเสียต่อหลายระบบสรีระหลายระบบในร่างกายปลา เช่น ปลาที่เลี้ยงจะมีอัตราการเจริญเติบโตลดลง รูปร่างปลาอาจผิดปกติได้ เช่น มีกระดูกโค้งงอ (scoliosis and lordosis) ถ้าปลามีบาดแผลจะหายช้า ความต้านทานต่อเชื้อโรคลดลง ความอดทนต่อการเปลี่ยนแปลงของคุณภาพน้ำที่อาศัยอยู่ลดลง ความทนทานต่อความเครียดที่เกิดขึ้นเนื่องจากสารพิษต่าง ๆ ในน้ำได้ลดลง (NRC, 1993) ดังจะเห็นได้จากการทดลองของ Cuesta et al. (2002) เมื่อแยกเซลล์เม็ดเลือดขาวจากไตตอนต้นของปลา seabream มาเลี้ยงในสารอาหารที่ผสมวิตามินซี แล้ว พบว่าเซลล์ดังกล่าวมีระดับวิตามินซี ในเซลล์เพิ่มมากขึ้น และที่สำคัญพบว่าเซลล์ดังกล่าวมี natural cytotoxic activity เพิ่มสูงขึ้น การทดลองอีกการทดลองหนึ่งของ Sealey และ Gatlin (2002a) ก็พบว่าวิตามินซี มีผลต่อการช่วยเพิ่มภูมิคุ้มกันโรคของปลา โดยเมื่อเลี้ยงปลา striped bass ในอาหารที่มีวิตามินซี ในปริมาณต่ำสุดที่ปลาต้องการ แล้วทำการแยกเซลล์ที่ไตส่วนต้น พบว่าเซลล์ดังกล่าวสามารถทำหน้าที่ในการกำจัดเชื้อโรค (Phagocyte function) ได้มากขึ้น

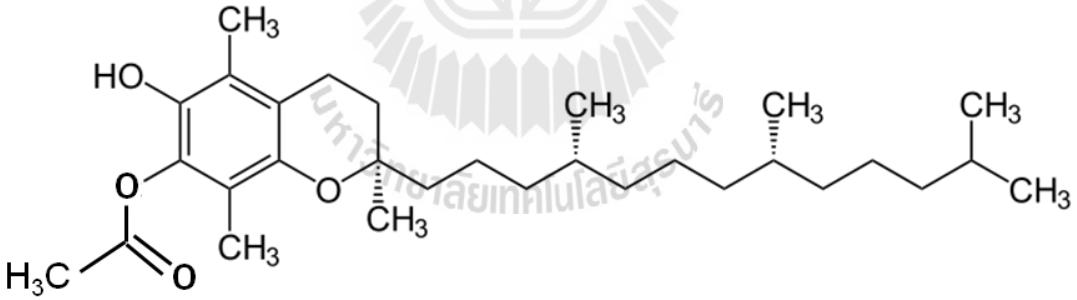
วิตามินอี (Tocopherol) เป็นแอลกอฮอล์ที่ไม่อิ่มตัว ในธรรมชาติพบวิตามินอี 4 ชนิด ได้แก่ α, β, γ, และ δ tocopherol โดย alpha-tocopherol (ภาพที่ 1.4) เป็นตัวที่มีบทบาทสำคัญที่สุด เนื่องจากมีความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระได้ดี โดยวิตามินอีเป็นสารต้านอนุมูลอิสระที่ละลายอยู่ในไขมัน จึงช่วยปกป้องเซลล์ในร่างกายจากสารอนุมูลอิสระ โดยไปขัดขวางปฏิกิริยาออกซิเดชันของผนังเซลล์ และปกป้องกรดไขมันไม่อิ่มตัวจากปฏิกิริยาออกซิเดชัน โดยเฉพาะกรดไขมันในร่างกายปลาจะมีองค์ประกอบของกรดไขมันไม่อิ่มตัวสูงมาก วิตามินอีช่วยในการกำจัด ROS ที่เกิดขึ้นทำให้ ROS ไม่มีผลต่อปฏิกิริยาลูกโซ่ในการออกซิไดซ์กรดไขมันไม่อิ่มตัวสูงต่อไป (Frei and Ames, 1998) และได้มีการรายงานว่ามีความสำคัญต่อการทำงานของระบบสืบพันธุ์ให้เป็นปกติ (Azzi and Stocker, 2000)

ข้อมูลวิชาการบ่งบอกถึงความสำคัญของวิตามินอีต่อระบบภูมิคุ้มกันในปลา โดยวิตามินอีมีผลต่อการเพิ่มประสิทธิภาพการทำงานของคอมพลีเมนต์ (complement activity) การทำงานของเอนไซม์ไลโซไซม์ ประสิทธิภาพของการทำงานแบบฟาโกไซโตซีส (phagocytosis activity) สูงขึ้น (Ortuno et al., 2001; Chen et al., 2004) ในปลา striped bass พบว่า วิตามินอี มีบทบาทต่อหน้าที่การจับกินเชื้อโรคของเซลล์ (phagocyte function) ที่บริเวณไตตอนต้น (Sealey and Gatlin, 2002b) การทดลองของ George et al. (2000) พบว่าเมื่อเลี้ยง epithelioma papulosum cyprinid

cell line ในสารอาหารที่ขาดวิตามินอี เซลล์ดังกล่าวมีความทนทานต่อสารพิษต่าง ๆ ต่ำ และเซลล์มีความทนทานต่อสารพิษต่าง ๆ เพิ่มขึ้นอย่างเห็นได้ชัดเมื่อมีการเติมวิตามินอี ลงในสารอาหาร การทดลองในปลา seabream (*Sparus aurata* L.) ก็พบว่าวิตามินช่วยเพิ่มความทนทานต่อสารพิษในเซลล์เม็ดเลือดขาว (Cuesta et al. 2001) นอกจากนี้การทดลองของ Puangkaew et al. (2004) ที่ทดลองเลี้ยงปลาเรนโบว์เทร้าด้วยอาหารที่มีกรดไขมันไม่อิ่มตัวสูง (Polyunsaturate fatty acid' PUFA) ในปริมาณสูง พบว่าเมื่อเพิ่มวิตามินอี ในอาหารที่มี PUFA สูงมากกว่าระดับที่ต้องการเพื่อการเจริญเติบโตเป็นปกติ จะทำให้ระบบภูมิคุ้มกันโรคของปลาเรนโบว์เทร้า (*Onchorhynchus mykiss*) ดีขึ้นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ



Alpha-tocopherol



Alpha-tocopheryl acetate

ภาพที่ 1.4 โครงสร้างของวิตามินอี (Alpha-tocopherol) และสารอนุพันธ์วิตามินอี (Alpha-tocopheryl acetate)

วิตามินซีและวิตามินอีมักจะถูกออกซิไดซ์ได้ง่าย ในทางการใช้เป็นสารเสริมในอาหารสัตว์ จึงได้มีการผลิตในรูปของสารอนุพันธ์วิตามินซีและวิตามินอี เพื่อให้มีความคงตัวในอุณหภูมิปกติได้นาน และสามารถออกฤทธิ์ในร่างกายสัตว์ได้ ได้มีการผลิตอนุพันธ์ของวิตามินซีหลายชนิดได้แก่ แต่ชนิดที่นิยมในการใช้เป็นสารเสริมในอาหารสัตว์น้ำมักจะมีสองรูปด้วยกันคือ L-

ascorbyl-2-sulfate และ L-ascorbyl-2-phosphate (ภาพที่ 1.3) ได้มีรายงานการศึกษาในปลา channel catfish พบว่าการเสริมอนุพันธ์วิตามินซี L-ascorbyl-2-phosphate ให้ผลดีกว่าการใช้วิตามินซีในรูปของ L-ascorbyl-2-sulfate (El Naggar and Lovell, 1991) L-ascorbyl-2-phosphate ถูกสังเคราะห์โดยมีการแทนหมู่ไฮดรอกซิลที่ตำแหน่งที่ 2 ด้วยหมู่ฟอสเฟต ทำให้เพื่อความคงทนได้ และได้ถูกนำมาศึกษาถึงผลการเสริมในอาหารปลาหลายชนิด (Wang et al., 2003; Chen et al., 2007) กลไกในย่อยและการดูดซึม L-ascorbyl-2-phosphate นั้นสามารถอธิบายได้ว่า L-ascorbyl-2-phosphate ถูกย่อยด้วยเอ็นไซม์ฟอสฟาเตสที่ลำไส้เล็ก และถูกดูดซึมเข้าสู่ผนังลำไส้เล็กด้วยกระบวนการ sodium-ascorbate cotransport ผ่าน enterocyte ของลำไส้เล็ก (Matusiewicz and Dabrowski, 1995; Wilson, 2005) และวิตามินอีที่นิยมใช้เป็นสารเสริมในอาหารสัตว์น้ำจะอยู่ในรูปของสารอนุพันธ์ tocopheryl acetate (ภาพที่ 1.4) วิตามินอีถูกดูดซึมผ่านผนังทางเดินอาหารที่ลำไส้เล็กเช่นเดียวกับกลไกการดูดซึมไขมัน ซึ่งเกี่ยวข้องกับ การเกิด emulsification หรือเกิดโครงสร้างไมเซลล์ผสม (mixed micelle) โดยการอาศัยน้ำดี เมื่อผ่านผนังลำไส้เล็กจะรวมตัวกับโปรตีนเป็นchylomicron ซึ่งจะถูกปล่อยเข้าสู่ระบบน้ำเหลือง (lymphatic system) และผ่านเข้าสู่กระแสโลหิตเพื่อลำเลียงไปยังเนื้อเยื่อต่าง ๆ (Traber et al., 1993)

แม้ว่าวิตามินซีไม่ได้จัดเป็นสารอาหารที่มีหน้าที่หลักต่อการเร่งเจริญเติบโตในปลา แต่ก็มีรายงานการศึกษาในปลาดุกอัฟริกัน พบว่าการเสริมวิตามินซีที่ระดับ 50 mg/kgเพียงพอต่อการเจริญเติบโตแบบปกติ และไม่พบว่าปลาดุกอัฟริกันแสดงอาการขาดเมื่อได้รับการเสริมวิตามินซีที่ระดับดังกล่าว แต่พบว่า การเสริมวิตามินซีที่ระดับเพิ่มขึ้น 1500 mg/kgมีผลต่อการเพิ่มสมรรถนะการเจริญเติบโตของปลาดุกอัฟริกัน (Adewolu and Aro, 2009) นอกจากนี้มีรายการศึกษาเกี่ยวกับบทบาทของวิตามินอีต่อสมรรถนะการเจริญเติบโต พบว่าเมื่อเพิ่มระดับการเสริมวิตามินอีในอาหารมีผลต่อการเพิ่มสมรรถนะการเจริญเติบโตในปลา seabream, ปลาเรนโบว์เทร้า, ปลา piracucu และปลา rohu (Tocher et al., 2002; Pearce et al., 2003; Sau et al., 2004)

ถึงแม้ว่าจะมีการทดลองการใช้วิตามินซีและวิตามินอีในการเพิ่มภูมิคุ้มกันโรคในปลาที่ได้รับความเครียดเนื่องจากปัจจัยอื่น ๆ ในปลาหลายชนิดก็ตาม แต่การใช้วิตามินซีและวิตามินอีเพื่อเพิ่มภูมิภูมิคุ้มกันให้กับปลาในสภาวะการเลี้ยงที่อุณหภูมิน้ำต่ำยังมีการศึกษาน้อยมาก และมีการศึกษาน้อยมากในปลาเขตร้อน การเสริมวิตามินสองชนิดในอาหารปลาดุกลูกผสมน่าจะส่งผลทำให้ปลามีความแข็งแรง ทนทานต่อสภาพแวดล้อม โดยเฉพาะเมื่ออุณหภูมิน้ำที่ไม่เหมาะสม ซึ่งการจัดการและการควบคุมอุณหภูมิน้ำในการเลี้ยงปลา ในด้านการจัดการด้านอื่น ๆ นั้นทำได้ยาก ไม่คุ้มค่าต่อการลงทุนในการเลี้ยงปลาเชิงพาณิชย์ ดังนั้นในโครงการวิจัยนี้จึงมีวัตถุประสงค์ที่จะพัฒนาสูตรอาหารเพื่อหาความเหมาะสมของระดับการเสริมวิตามินเพื่อเพิ่มภูมิคุ้มกันโรคให้กับปลาดุกโดยเฉพาะในสภาพการเลี้ยงที่อุณหภูมิน้ำเย็นลงซึ่งเป็นสภาวะที่ปลาดุกจะมีความเครียดมากกว่า

สภาพปกติ ผลการศึกษานี้อาจทำให้เกิดข้อมูลทางวิชาการที่เป็นประโยชน์ต่อเกษตรกรที่จะนำไปใช้ในการเลี้ยงปลานอกฤดูกาล

วัตถุประสงค์

1. เพื่อศึกษาถึงผลของอุณหภูมิน้ำต่อค่าทางโลหิตวิทยาและค่า lipid peroxidation ของปลาดุกลูกผสม
2. เพื่อทำให้ทราบระดับของการเสริมวิตามินซีในอาหารและระยะเวลาการเสริมวิตามินซีที่เหมาะสมต่อสมรรถนะการเจริญเติบโต สภาวะทางโลหิตวิทยา และค่าทางภูมิคุ้มกันแบบไม่จำเพาะ ในปลาดุกลูกผสมภายใต้สภาวะการทดสอบอุณหภูมิน้ำต่ำ
3. เพื่อทำให้ทราบระดับของการเสริมวิตามินอีในอาหารและระยะเวลาการเสริมวิตามินอีที่เหมาะสมต่อสมรรถนะการเจริญเติบโต สภาวะทางโลหิตวิทยา และค่าทางภูมิคุ้มกันแบบไม่จำเพาะ ในปลาดุกลูกผสมภายใต้สภาวะการทดสอบอุณหภูมิน้ำต่ำ

ขอบเขตของการวิจัย

การศึกษาครั้งนี้มุ่งเน้นที่จะศึกษาถึงผลของการเสริมวิตามินซีและวิตามินอีในอาหารต่อปลาดุกลูกผสมที่ถูกทดสอบด้วยน้ำอุณหภูมิต่ำ เพื่อทำให้ทราบค่าระดับการเสริมของวิตามินทั้งสองต่อการเสริมสุขภาพของปลาดุกลูกผสมภายใต้สภาวะความเครียดจากอุณหภูมิน้ำ ในการศึกษาครั้งนี้จะใช้สารอนุพันธ์วิตามินซีและวิตามินอี ซึ่งได้แก่ L-ascorbyl-2-monophosphate และ tocopheryl actate ตามลำดับ เสริมในอาหารปลาดุกลูกผสม ที่ระดับความเข้มข้นต่าง ๆ แล้วนำมาเลี้ยงปลาดุกลูกผสมเป็นระยะเวลา 2 เดือน ในระหว่างการเลี้ยงจะนำปลาดุกลูกผสมไปทดสอบการเปลี่ยนอุณหภูมิน้ำอย่างฉับพลัน (19 องศาเซลเซียส) เป็นเวลา 24 ชั่วโมง โดยจะทำการทดสอบอุณหภูมิน้ำ 2 ครั้งได้แก่ ครั้งแรกที่ 4 สัปดาห์หลังจากเลี้ยงปลาดุกทดลองเป็นระยะเวลา 4 สัปดาห์ และครั้งที่ 2 ก็คือหลังจากเลี้ยงปลาดุกลูกผสมเป็นระยะเวลา 8 สัปดาห์ จากนั้นทำการเก็บตัวอย่างเลือดปลาเพื่อวิเคราะห์ค่าทาโลหิตวิทยา และค่าภูมิคุ้มกันแบบไม่จำเพาะ ได้แก่ ปริมาณเอ็นไซม์ไลโซไซม์ ปริมาณอิมมูโนโกลบูลิน ค่าคอมพลีเมนต์

การวิจัยครั้งนี้ยังได้ทำการศึกษาถึงผลของอุณหภูมิน้ำต่ำ-สูง ในธรรมชาติที่มักจะวัดได้ในประเทศไทย ต่อค่าทางโลหิตวิทยาและ lipid peroxidation ในตับและไตปลา ซึ่งเป็นอวัยวะที่สำคัญต่อกระบวนการเมตาโบลิซึม และภูมิคุ้มกันในปลา

นอกจากนี้ในระหว่างการทดลองจะทำการศึกษาถึงผลของการเสริมวิตามินซีและวิตามินอีในอาหารต่อการสะสมของอนุพันธ์วิตามินดังกล่าวในตับปลา ตลอดจากทำการเก็บข้อมูลสมรรถนะการเจริญเติบโต และอัตราการรอด

ประโยชน์ที่ได้รับจากการวิจัย

1. ทำให้ทราบระดับการเสริมอนุพันธ์วิตามินซี และระยะเวลาการเสริมอนุพันธ์วิตามินซีในอาหารสำหรับเลี้ยงปลาดุกลูกผสม เพื่อรักษาสุขภาพปลาหรือบรรเทาอันตรายที่จะเกิดขึ้นกับปลาดุกลูกผสมเพื่อประสบภาวะความเครียดจากน้ำอุณหภูมิต่ำ

2. ทำให้ทราบระดับการเสริมอนุพันธ์วิตามินอี และระยะเวลาการเสริมอนุพันธ์วิตามินอีในอาหารสำหรับเลี้ยงปลาดุกลูกผสม เพื่อรักษาสุขภาพปลาหรือบรรเทาอันตรายที่จะเกิดขึ้นกับปลาดุกลูกผสมเพื่อประสบภาวะความเครียดจากน้ำอุณหภูมิต่ำ

3. เพื่อให้ทราบถึงผลและระดับของการเสริมอนุพันธ์วิตามินทั้งสองต่อสมรรถนะการเจริญเติบโต และอัตราการรอดของปลาดุกลูกผสม

4. เพื่อให้ทราบถึงข้อมูลทางวิชาการถึงผลของอุณหภูมิน้ำระหว่าง 26-34 องศาเซลเซียส ต่อค่า lipid peroxidation และค่าทางโลหิตวิทยา

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

บทที่ 2
วิธีการดำเนินการวิจัย

การวิจัยครั้งนี้แบ่งออกเป็น 3 การทดลอง การทดลองที่ 1 เป็นการศึกษาผลของอุณหภูมิน้ำต่อค่าทางโลหิตวิทยา และ lipid peroxidation ที่ตับ และ ไต เพื่อเป็นการศึกษาผลของการเปลี่ยนแปลงอุณหภูมิน้ำต่อการเปลี่ยนแปลงทางโลหิตวิทยาและการเกิดอนุมูลอิสระในอวัยวะที่สำคัญต่อเมตาบอลิซึมและภูมิคุ้มโรค การทดลองที่ 2 เป็นการศึกษาผลของการเสริมวิตามินซีต่อปลาดุกลูกผสมในสภาวะน้ำที่อุณหภูมิต่ำ โดยเลือกการทดสอบอุณหภูมิน้ำต่ำที่มักจะเกิดขึ้นในฤดูหนาวในบางพื้นที่ เช่น ภาคตะวันออกเฉียงเหนือ และการทดลองที่ 3 เป็นการศึกษาผลของการเสริมวิตามินอีต่อปลาดุกลูกผสมในสภาวะน้ำอุณหภูมิต่ำ ทั้งสามการทดลองดำเนินการที่ฟาร์มมหาวิทยาลัย แผนกสัตว์น้ำ (ฟาร์ม มทส.) และ อาคารศูนย์เครื่องมือ 1 และ 3

การทดลองที่ 1 ผลของอุณหภูมิน้ำต่อค่าทางโลหิตวิทยา และ ค่า Lipid peroxidation ที่ตับและไต

1. แผนการทดลอง

การศึกษาครั้งนี้เป็นการเปรียบเทียบค่าทางโลหิตวิทยา และ ค่า Lipid peroxidation ของปลาดุกลูกผสมที่อุณหภูมิน้ำที่แตกต่างกัน 3 ระดับ คือ 26, 30 และ 34 องศาเซลเซียส ในช่วงเวลา 24 ชั่วโมง ใช้แผนการทดลองแบบสุ่มสมบูรณ์ (Completely randomized design) ซึ่งประกอบด้วยกลุ่มทดลอง 3 กลุ่มทดลองที่อุณหภูมิน้ำแตกต่างกัน 3 ระดับ ดังนี้

กลุ่มทดลอง	อุณหภูมิน้ำ (°C)
1	26
2	30
3	34

2. ปลาทดลอง และการทดสอบอุณหภูมิน้ำ

ปลาดุกที่ใช้ในการทดลองครั้งนี้เป็นปลาดุกลูกผสม (*Clarias macrocephalus* x *C. gariepinus*) ได้จากฟาร์ม มทส. ขนาดประมาณ 50-60 กรัม เริ่มการทดลองโดยทำการเลี้ยงปลาในตู้ทดลอง เพื่อปรับสภาพ จำนวนตู้ละ 18 ตัว ตู้ทดลองที่ใช้ในครั้งนี้มีขนาด 60 * 30 * 45 ลูกบาศก์เซนติเมตร (กว้าง * ยาว * สูง) เลี้ยงปลาดุกลูกผสมแบบให้อากาศในน้ำตลอดเวลา เป็นระยะเวลา 1

เดือน ให้อาหารวันละ 2 ครั้งแบบ ให้กินแบบเต็มที่ ทำการเปลี่ยนถ่ายน้ำในตู้ปลาทุก ๆ 3 วัน ทำการบันทึกอุณหภูมิน้ำในระหว่างที่ทำการให้อาหาร อุณหภูมิน้ำตลอดการเลี้ยงอยู่ในช่วง 28-30 องศาเซลเซียส

หลังจากปรับสภาพการเลี้ยง นำปลามาทดสอบอุณหภูมิน้ำ ที่ 24, 30 หรือ 34 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 24 ชั่วโมง และเก็บตัวอย่างเลือดและอวัยวะเพื่อวิเคราะห์ค่าทางโลหิตวิทยาและค่า lipid peroxidation ที่เวลา 3, 6, 12 และ 24 ชั่วโมง

3. การเก็บตัวอย่างเลือด และอวัยวะ

หลังจากที่ปลาของแต่ละกลุ่มทดลองผ่านการทดสอบอุณหภูมิน้ำ แล้วทำการสลบปลาด้วยการนำปลาไปแช่ในน้ำที่มี phenoxy ethanol ที่ระดับความเข้มข้น 300 mg/L ทำการเก็บตัวอย่างเลือดปลา โดยใช้เข็มขนาด 21 g เจาะเลือดที่เส้นเลือด dorsal aorta ใส่ในหลอดที่มี 15 % Na_2EDTA ในปริมาตร 2.0 % ของปริมาณเลือดเพื่อใช้ในการวิเคราะห์ค่าทางโลหิตวิทยา จากนั้นทำการผ่าช่องท้องปลาเพื่อเก็บตับและไต

4. การวิเคราะห์ค่าทางโลหิตวิทยา

การวิเคราะห์ค่าทางโลหิตวิทยาทำในตัวอย่างเลือดที่มี EDTA

4.1 การนับจำนวนเม็ดเลือดแดงทั้งหมด (Total red blood cell count)

ทำการเจือจางเลือดแดงให้ได้สัดส่วน 1:200 แล้วหยดสารละลายเลือดลงใน Hemocytometer แล้วทิ้งไว้สักครู่หนึ่งจนสารละลายเซลล์เม็ดเลือดหยุดนิ่ง ทำการนับจำนวนเม็ดเลือดแดง ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ที่กำลังขยาย 400 เท่า โดยนับจากสี่เหลี่ยมจัตุรัส 5 ช่อง (medium-sized square) คำนวณจำนวนเม็ดเลือดแดงต่อ 1 ไมโครลิตรของเลือด (mm^3) ได้เท่ากับ จำนวนเม็ดเลือดแดงที่นับได้ x 10,000

4.2 การวิเคราะห์ค่าฮีโมโกลบิน (Hemoglobin concentration; Hb)

วิเคราะห์ค่าฮีโมโกลบินในเลือดโดยใช้เครื่องวิเคราะห์ Advia® 60 hematology system (Bayer Healthcare, NY)

4.3 การวิเคราะห์ค่าเม็ดเลือดแดงอัดแน่น (Pack cell volume)

ใช้หลอด microcapillary tube ดูดเลือดตัวอย่าง แล้วนำไปปั่นที่ความเร็วรอบ 12,000 รอบต่อนาที นาน 5 นาที แล้วอ่านค่าเม็ดเลือดแดงอัดแน่น (%) ด้วย microhematocrit reader

4.4 การคำนวณค่าดัชนีของเม็ดเลือดแดง

ด้วยสูตรการคำนวณที่รายงานใน (Rodak et al., 2007) ดังนี้

ค่าดัชนีเม็ดเลือด	หน่วย	การคำนวณ
Mean corpuscular volume (MCV)	femtoliters (fL)	ค่าเม็ดเลือดแดงอัดแน่น (%) x (10/จำนวนเม็ดเลือดแดง ($x10^{12}$/L))
Mean corpuscular hemoglobin (MCH)	Picogram (pg)	ฮีโมโกลบิน (g/dL) x (10/จำนวนเม็ดเลือดแดง($x10^{12}$/L))
Mean corpuscular hemoglobin concentration (MCHC)	g/dL	ฮีโมโกลบิน (g/dL) x (100/ค่าเม็ดเลือดแดงอัดแน่น (%))

5. การวิเคราะห์ Nitroblue tetrazolium (NBT)

เป็นการวิเคราะห์ superoxide anion (O_2^-) ที่เกิดขึ้นจากกิจกรรม Respiratory burst ของเม็ดเลือดขาว ตามวิธีของ Taoka et al. (2006) การวัดจะเป็นการวัดค่าการลดลงของ nitroblue tetrazolium:NBT ซึ่งถูกเปลี่ยนเป็น formazan โดย superoxide anion (O_2^-) ที่เกิดขึ้น

ผสมเลือดตัวอย่าง 100 ไมโครลิตรกับสารละลาย 0.2 % NBT 100 ไมโครลิตร ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องนาน 30 นาที แล้วดูดสารลายผสมของเลือดและ NBT 100 ไมโครลิตรใส่ในหลอดแก้วที่มี dimethyl formamide (DMF) 2.0 มิลลิลิตร แล้วนำไปปั่นที่ความเร็วรอบ 5000 รอบต่อนาที 10 นาที ที่อุณหภูมิห้อง แล้วอ่านการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 540 นาโนเมตร โดยใช้ DMF เป็น blank

6. การวิเคราะห์ค่า Lipid peroxidation ในตับและไต ของปลาดุกลูกผสม

ชั่งตัวอย่างเนื้อเยื่อตับหรือไต แล้วเติมบัฟเฟอร์ 20 mM PBS pH 7.4 ที่แช่เย็นลงในตัวอย่างตับหรือไต ในอัตราส่วน 10 มิลลิลิตรต่อเนื้อเยื่อตัวอย่าง 1 กรัม แล้วเติม 0.5 M BHT ในอัตราส่วน 10 ไมโครลิตรต่อ1 มิลลิลิตรของบัฟเฟอร์ที่ผสมกับเนื้อเยื่อ เพื่อป้องกันการเกิดออกซิเดชันทำการบดตัวอย่างเนื้อเยื่อในน้ำแข็ง

จากนั้นนำสารสกัดไปปั่นเพื่อแยกตะกอนเนื้อเยื่อ แยกเอาส่วนใสของสารสกัดมาวัดค่าความเข้มข้นของโปรตีนโดยใช้ชุดทดสอบ Colorimetric Lowry micro-method (Sigma) เก็บตัวอย่างไว้ที่อุณหภูมิ -70 องศาเซลเซียส จนกว่าจะนำมาวิเคราะห์ค่า lipid peroxidation

การศึกษาครั้งนี้ใช้การวิเคราะห์ค่า lipid peroxidation โดยการวิเคราะห์ malondialdehyde (MDA) และ 4-hydroxyalkenals (HAE) โดยการใช้ชุดทดสอบ Lipid Peroxidiation Microplate Assay Kit (Oxford Biomedical Research) ค่าที่ได้แสดงในรูปของ (nmol/mg protein)

7. การวิเคราะห์ผลการทดลองทางสถิติ

การวิเคราะห์ผลการทดลองทางสถิติในครั้งนี้ใช้โปรแกรมสำเร็จรูป SPSS for windows, version 10 (SPSS Inc, Chicago, IL) วิเคราะห์ความแตกต่างของค่าเฉลี่ยด้วยการวิเคราะห์ความแปรปรวน (Analysis of Variance) และทดสอบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยของแต่ละกลุ่มทดลองโดยวิธี Duncan 's multiple range test และยอมรับผลความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ $P<0.05$

การทดลองที่ 2 ผลของการเสริมวิตามินซีต่อค่าทางโลหิตวิทยาและภูมิต้านทานโรคแบบไม่จำเพาะเจาะจงในสภาวะน้ำอุณหภูมิต่ำ

1. แผนการทดลอง

การศึกษาครั้งนี้ใช้แผนการทดลองแบบสุ่มสมบูรณ์ (Completely randomized design) ซึ่งประกอบด้วยกลุ่มทดลอง 5 กลุ่มทดลองที่เลี้ยงด้วยอาหารที่เสริมวิตามินซีที่แตกต่างกัน 5 ระดับ แต่ละกลุ่มทดลองประกอบด้วยจำนวนซ้ำ 3 ซ้ำ โดยมีการจัดกลุ่มทดลองตามระดับวิตามินซี ดังนี้

กลุ่มทดลอง	ระดับวิตามินซีที่เสริมในอาหาร (mg/kg)
1	250
2	500
3	1000
4	1500
5	2000

2. อาหารทดลอง

อาหารทดลองในครั้งนี้ผลิตที่ฟาร์มมหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี แผนกสัตว์น้ำ (ฟาร์ม มทส.) วัตถุดิบที่ใช้ในการทำผลิตอาหาร แสดงดังตารางที่ 2.1 โดยจัดซื้อจากแหล่งจำหน่ายวัตถุดิบอาหาร ในจังหวัดนครราชสีมา ทำการชั่งวัตถุดิบอาหารตามสัดส่วนที่แสดงในตารางที่ 2.1

แล้วนำมาบด ด้วยเครื่องบดวัตถุดิบแบบแห้ง นำเข้าเครื่องผสมให้เข้ากัน แล้วจึงนำเข้าเครื่องอัดเม็ดอาหารแบบลอยน้ำ ตรวจสอบการลอยน้ำของเม็ดอาหาร จากนั้นนำอาหารเม็ดเข้าอบแห้งที่อุณหภูมิ 80 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 ชั่วโมง ทำการตรวจสอบองค์ประกอบทางเคมีในอาหาร

ตารางที่ 2.1 สัดส่วนของวัตถุดิบในอาหารปลาดุกลูกผสม และองค์ประกอบทางเคมี

วัตถุดิบอาหาร	เปอร์เซ็นต์
ปลาป่น	36.0
กากถั่วเหลือง	25.0
ปลายข้าว	14.5
รำข้าว	12.0
มันเส้น	10.0
น้ำมันถั่วเหลือง	2.5
<u>องค์ประกอบทางเคมี</u>	
วัตถุแห้ง	91.85
โปรตีน	28.29
ไขมัน	8.41
เถ้า	10.37
ไฟเบอร์	3.55
Nitrogen free extract[ก]	31.23
พลังงานรวม[ข] (kcal/kg)	4241.69

[ก]Nitrogen free extract (NFE) (%) =

100 - (ความชื้น (%) + โปรตีน (%) +ไขมัน (%) + เถ้า (%) +ไฟเบอร์ (%))

[ข]พลังงานรวม (kcal/kg) (NRC, 1993) =

10 x (โปรตีน x 5.65 (kcal/g)) + (ไขมัน x 9.45 (kcal/g)) + (NFE x 4.11 (kcal/g))

นำอาหารเม็ดที่ใช้ในการทดลองมาเสริมวิตามินตามระดับที่ได้กำหนดไว้ โดยวิตามินซีที่ใช้ในการทดลองครั้งนี้ จะอยู่ในรูปของ L-ascorbyl-2-monophosphate (Stay C-35, Hofmann-La Roche, Basel, Switzerland) โดยการละลาย L-ascorbyl-2-monophosphate ตามระดับที่กำหนดในน้ำกลั่นในอัตราส่วน 60 มิลลิลิตรต่ออาหารปลา 1 กิโลกรัม ผสมคลุกเคล้าให้ทั่ว แล้วนำมาเคลือบเม็ดอาหารด้วยน้ำมันพืช (น้ำมันถั่วเหลือง) ในอัตรา 2.5 เปอร์เซ็นต์ จากนั้นทำการตรวจสอบระดับ

วิตามินซีในอาหาร ผลการวิเคราะห์แสดงดังตารางที่ 2.2 โดยการวิเคราะห์ด้วยเครื่อง HPLC อาหารที่ใช้ในการทดลองครั้งนี้จะเก็บที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

ตารางที่ 2.2 ระดับการเสริมอนุพันธ์วิตามินซี L-ascorbyl-2-monophosphate และปริมาณที่วิเคราะห์ได้ในอาหารปลาดุกลูกผสมของแต่ละกลุ่มทดลอง

กลุ่มทดลอง	ระดับวิตามินซีที่เสริมในอาหาร (mg/kg)	ปริมาณที่วิเคราะห์ได้ในอาหาร (mg/kg)
1	250	276.50
2	500	574.57
3	1000	1191.60
4	1500	1492.51
5	2000	2014.54

3. ปลาทดลอง ระบบการเลี้ยงปลา และการให้อาหารในระหว่างการทดลอง

ปลาดุกที่ใช้ในการทดลองครั้งนี้เป็นปลาดุกลูกผสม (*Clarias macrocephalus* x *C. gariepinus*) ได้จากฟาร์ม มทส. ขนาดประมาณ 14-16 กรัม เริ่มการทดลองโดยทำการสุ่มปลาทดลองลงในตู้ทดลอง จำนวนตู้ละ 18 ตัว ตู้ทดลองที่ใช้ในครั้งนี้มีขนาด 60 * 30 * 45 ลูกบาศก์เซนติเมตร (กว้าง * ยาว * สูง) เลี้ยงปลาดุกลูกผสมแบบให้อากาศในน้ำตลอดเวลา

ทำการเลี้ยงปลาเพื่อปรับสภาพเป็นเวลา 1 สัปดาห์ ด้วยอาหารพื้นฐานที่ไม่ได้เสริมวิตามินซี แล้วจึงเริ่มเลี้ยงปลาด้วยอาหารตามสูตรที่กำหนด โดยให้อาหารวันละ 2 ครั้งแบบ ให้กินแบบเต็มที่ ทำการเปลี่ยนถ่ายน้ำในตู้ปลาทุก 3 วัน ทำการบันทึกอุณหภูมิน้ำในระหว่างที่ทำการให้อาหาร อุณหภูมิน้ำตลอดการเลี้ยงอยู่ในช่วง 28-30 องศาเซลเซียส ระยะเวลาในการเลี้ยงปลาทดลอง 8 สัปดาห์ โดยทำการบันทึกน้ำหนักปลา และน้ำหนักอาหารที่ปลาได้รับเมื่อสิ้นสุดสัปดาห์ที่ 4 และสัปดาห์ที่ 8 ตลอดระยะเวลาการทดลอง ถ้าพบปลาตายนำออกและทำการบันทึกข้อมูล

4. การวิเคราะห์วิตามินซี

การศึกษาครั้งนี้ได้ทำการวิเคราะห์ปริมาณวิตามินในอาหารปลาทดลองและในตับของตัวอย่างปลาที่ได้รับอาหารทดลอง

4.1 การสกัดวิตามินซีจากอาหารปลาทดลอง

การสกัดวิตามินซีในอาหารได้ทำตามวิธีการวิเคราะห์ที่ได้รายงานโดยบริษัทผู้ผลิต Stay C-35 (Roche) โดยมีการดัดแปลงให้เหมาะสมกับห้องปฏิบัติการดังรายละเอียดต่อไปนี้ นำอาหารที่ต้องการวิเคราะห์มาประมาณ 5 กรัม ชั่งให้ได้น้ำหนักแน่นอน บดให้ละเอียดแล้วนำไปสกัดด้วยสารละลายบัฟเฟอร์ (388 mM phosphate buffer pH 3.0) ปริมาตร 50 มิลลิลิตร 15 นาที ที่อุณหภูมิห้อง จากนั้นนำสารสกัดไปปั่นที่ความเร็วรอบ 8,500 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส 10 นาที นำสารละลายส่วนใสมากรองผ่าน syringe filter (0.45 μm) ก่อนนำไปวิเคราะห์ปริมาณวิตามินซีด้วยเครื่อง HPLC

4.2 การสกัดวิตามินซีจากตัวอย่างตัวปลา

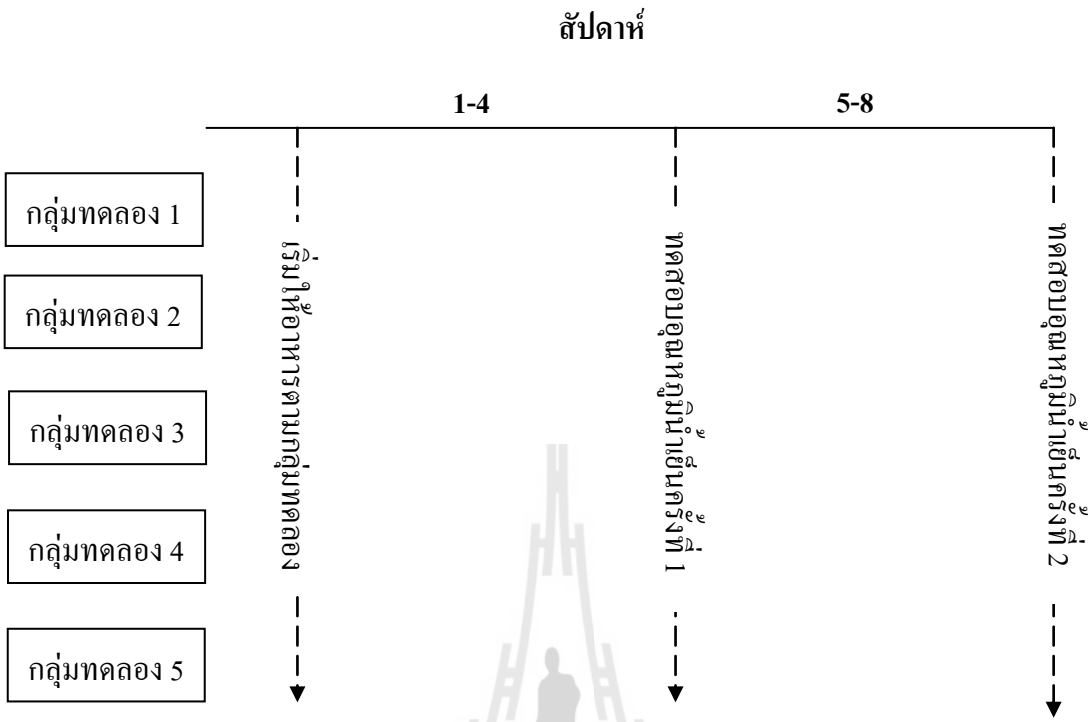
ทำการเก็บตัวอย่างตับปลาสำหรับวิเคราะห์วิตามินซี หลังจากปลาทดลองได้รับอาหารของแต่ละกลุ่มทดลองเป็นเวลา 20, 40 และ 60 วัน โดยทำการสุ่มปลาครั้งละ 3 ตัวต่อซ้ำของกลุ่มทดลอง นำตับปลาออกมาจากตัวอย่างปลาที่สุ่ม ชั่งน้ำหนัก แล้วบดตับตัวอย่างในบัฟเฟอร์ (388 mM phosphate buffer pH 3.0) ปริมาตร 20 มิลลิลิตรต่อตับปลา 1 กรัม ในน้ำแข็ง แล้วนำไป sonication 3 นาที ในน้ำแข็ง จากนั้นนำสารสกัดไปปั่นที่ความเร็วรอบ 8,500 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส 10 นาที นำสารละลายส่วนใสมากรองผ่าน syringe filter (0.45 μm) ก่อนนำไปวิเคราะห์ปริมาณวิตามินซีด้วยเครื่อง HPLC

4.3 การวิเคราะห์ปริมาณวิตามินซีด้วยเครื่อง HPLC

การวิเคราะห์ปริมาณวิตามินซี ทำโดยใช้ reverse phase HPLC (HP 1100) C18 column (4.6 mm ID x 250 mm) วิเคราะห์ด้วย UV-detector (ความยาวคลื่น 254 นาโนเมตร) mobile phase ได้แก่ สารละลายผสมของ Eluent1/Eluent2 ในอัตราส่วน 3:7 (Eluent 1 : 79 mM potassium dihydrogen phosphate, 0.2 % 1,5-dimethylhexylamine, pH3; Eluent 2: 98 ml Acetonitrile, 42 ml ethanol)

5. การทดสอบปลาดุกในสภาวะที่น้ำอุณหภูมิต่ำ

ในการศึกษาครั้งนี้ได้ศึกษาผลของการเสริมวิตามินซีในอาหารต่อปลาดุกเมื่ออยู่ในสภาพที่อุณหภูมิน้ำ 19 องศาเซลเซียส โดยสุ่มปลาดุกลูกผสมจากแต่ละตู้ทดลอง (ซ้ำ) จำนวน 3 ตัวต่อตู้ทดลอง แล้วนำปลาดุกลูกผสมมาทดสอบในน้ำอุณหภูมิ 19 องศาเซลเซียส ซึ่งเป็นการนำปลาดุกลูกผสมมาผ่านการลดอุณหภูมิน้ำอย่างรวดเร็ว (อัตราการเปลี่ยนอุณหภูมิ 0.1 องศาเซลเซียสต่อนาที) การศึกษาครั้งนี้ทำการทดสอบ 2 ครั้ง ได้แก่หลังจากเลี้ยงด้วยอาหารของแต่ละกลุ่มทดลองเป็นเวลา 4 และ 8 สัปดาห์ ดังแผนภาพดังนี้



6. การเก็บตัวอย่างเลือด

หลังจากที่ปลาของแต่ละกลุ่มทดลองผ่านการทดสอบอุณหภูมิน้ำ แล้วทำการสลบปลาด้วยการนำปลาไปแช่ในน้ำที่มี phenoxy ethanol ที่ระดับความเข้มข้น 300 mg/kg ทำการเก็บตัวอย่างเลือดปลา โดยใช้เข็มขนาด 21 g เจาะเลือดที่เส้นเลือด dorsal aorta แล้วแบ่งเลือดเป็นสองส่วน ส่วนที่หนึ่งใส่ในหลอดที่มี 15 % Na_2EDTA ปริมาตร 2.0 % ของปริมาณเลือดเพื่อใช้ในการวิเคราะห์ค่าทางโลหิตวิทยาและเก็บตัวอย่างพลาสมา อีกส่วนหนึ่งใส่ในหลอดทดลองสำหรับเก็บซีรัมเพื่อให้เลือดแข็งตัว เก็บตัวอย่างพลาสมาโดยการปั่นที่ความเร็วรอบ 5000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส 10 นาที และเก็บตัวอย่างซีรัมโดยการปั่นที่ความเร็วรอบ 5000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิห้อง10 นาที ตัวอย่างพลาสมาและซีรัมจะเก็บที่อุณหภูมิ -80 องศาเซลเซียส จนกว่าจะนำมาใช้ในการวิเคราะห์ตัวอย่าง

7. การวิเคราะห์ค่าทางโลหิตวิทยา

ทำการวิเคราะห์ จำนวนเม็ดเลือดแดงทั้งหมด ปริมาณฮีโมโกลบิน ค่าเม็ดเลือดแดงอัดแน่น และคำนวณค่าดัชนีของเม็ดเลือดแดง เช่นเดียวกับวิธีการที่อธิบายไว้ในข้อ 4 ของการทดลองที่ 1

7.5 การนับแยกชนิดเม็ดเลือดขาว

นำตัวอย่างเลือดมาสเมียร์บนแผ่นสไลด์ แล้วย้อมด้วยสี Wright's Giemsa stain ทำการนับเม็ดเลือดขาวแบบแยกแยะชนิดเม็ดเลือดขาว (Monocyte, Neutrophil, Lymphocyte) จำนวน 100 เซลล์ ภายใต้กล้องจุลทรรศน์กำลังขยาย 1000 เท่า

8. การวิเคราะห์ค่าทางภูมิคุ้มกัน

8.1 การวิเคราะห์ปริมาณโปรตีนในเลือด และ total immunoglobulin

การวิเคราะห์ปริมาณโปรตีนในพลาสมาทำโดยใช้ชุดทดสอบ colorimetric Lowry micro-method (Sigma) การวัดค่าปริมาณ total immunoglobulin ทำตามวิธีการที่ได้รายงานไว้ใน Siwicki et al. (1994) โดยการวิเคราะห์ทำโดยการตกตะกอนของ total immunoglobulin ด้วยสารละลาย 12 % polyethylene glycol แล้ววัดปริมาณโปรตีนของสารละลายหลังตกตะกอน ปริมาณ total immunoglobulin หาได้จากค่าความแตกต่างระหว่างปริมาณโปรตีนก่อนตกตะกอนและปริมาณโปรตีนหลังตกตะกอน

8.2 การวิเคราะห์ค่าการทำงานของไลโซไซม์

การวิเคราะห์ค่าการทำงานเอ็นไซม์ไลโซไซม์ตามวิธีการของ Kumari และ Sahoo (2006) ซึ่งเป็นการเปรียบเทียบค่าการย่อยเซลล์แบคทีเรียแกรมบวก *Micrococcus lysodeikticus* โดยตัวอย่างซีรัม กับการย่อยแบคทีเรีย *M. lysodeikticus* ด้วยสารละลายมาตรฐานไลโซไซม์ (hen egg white lysozyme (Sigma, St Louis, MO) ที่รู้ค่าความเข้มข้น ดังนี้

เตรียมสารละลายไลโซไซม์มาตรฐานในบัฟเฟอร์ 0.1 M phosphate citrate buffer (pH 5.8) ให้มีความเข้มข้น เท่ากับ 0, 2.5, 5, 7.5, 10.0, 12.5, และ 15 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร และเตรียมสารละลายเชื้อแบคทีเรีย *M. lysodeikticus* ให้มีความเข้มข้น 75 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตรในบัฟเฟอร์ 0.1 M phosphate citrate buffer (pH 5.8)

การสร้างกราฟมาตรฐานของระดับเอ็นไซม์ ทำได้โดยดูดสารละลายมาตรฐานไลไซไซม์ตามความเข้มข้นที่เตรียมไว้ 25 ไมโครลิตรลงในไมโครเพลท หรือหยดซีรัมตัวอย่าง 25 ไมโครลิตรลงในไมโครเพลทแต่ละช่อง จากนั้นหยดสารละลายเชื้อแบคทีเรีย *M. lysodeikticus* 175 ไมโครลิตร ลงไปผสมกับสารละลายมาตรฐานหรือ ซีรัม จากนั้นทำการวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 450 นาโนเมตร ทุก ๆ 15 นาที แล้วเปรียบเทียบระดับไลโซไซม์ในซีรัมกับค่าการทำงานของสารละลายมาตรฐานไลโซไซม์

8.3 การวิเคราะห์ค่า alternative complement pathway

การวิเคราะห์ค่า alternative complement pathway ทำตามวิธีการของ Montero et al. (1998) ดังนี้ นำเม็ดเลือดแดงกระต่ายมาล้างด้วยสารละลาย GVB-EGTA (Gelatin Veranol Buffer; 10 mM batbital, 145 mM NaCl, 0.1 % gelatin, 0.5 mM $MgCl_2$, 10 mM EGTA, pH 7.3-7.4) 3 ครั้ง แล้วปรับความเข้มข้นของเม็ดเลือดแดงให้เท่ากับ 2 x 10^8 เซลล์ต่อมิลลิลิตร ในบัฟเฟอร์เดิม

ทำการเจือจางซีรัมของปลาดุกลูกผสมด้วย GVB-EGTA ให้ได้ปริมาตรเท่ากับ 250 ไมโครลิตร ที่ระดับ 10 %, 5 %, 2.5 %, 1.25 % และ 0.625 % ใช้ GVB-EGTA ในหลอดที่จัดเป็นกลุ่ม spontaneous lysis และใช้น้ำกลั่นเป็นหลอดที่มีการ haemolysis 100 %

เติมสารละลายเม็ดเลือดแดงที่ปรับความเข้มข้นแล้ว 100 ไมโครลิตร ในหลอดที่มีซีรัม หลอดที่มีบัฟเฟอร์อย่างเดียว และหลอดที่มีน้ำกลั่นอย่างเดียว ตั้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง 90 นาที แล้วเติมสารละลาย NaCl 0.9 % ลงไปทุกหลอด หลอดละ 1 มิลลิลิตร นำไปปั่นที่ความเร็ว 5000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 นาที นำสารละลายข้างบนมาวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 540 นาโนเมตร

การคำนวณ hemolytic titer ดังนี้

OD'_{540} ของซีรัมที่แต่ละระดับการเจือจาง = ค่า OD_{540} ของซีรัม - ค่า OD_{540} ของ “spontaneous lysis”

OD'_{540} ของ “100 % hemolysis ” = ค่า OD_{540} ของ “100 % hemolysis” - ค่า OD_{540} ของ “spontaneous

คำนวณ Percent lysis (y) ของแต่ละปฏิกิริยา

$$y = \frac{OD'_{540} \text{ของแต่ละปฏิกิริยา}}{OD'_{540} \text{ของ “100 \% hemolysis”}}$$

คำนวณ y/ (1-y) ของแต่ละปฏิกิริยา

- สร้างกราฟความสัมพันธ์ระหว่างค่า y/(1-y) และ ปริมาตรของซีรัม
- หาค่า 1 CH_{50} คือค่าของปริมาตรของซีรัมที่ทำให้ได้ 50 % lysis (หรือ y/(1-y) = 1)

8.4 การวิเคราะห์ Nitroblue tetrazolium (NBT)

เป็นการวิเคราะห์ superoxide anion (O_2^-) ที่เกิดขึ้นจากกิจกรรม Respiratory burst ของเม็ดเลือดขาว ตามวิธีของ Taoka et al. (2006) การวัดจะเป็นการวัดค่าการลดลงของ nitroblue tetrazolium:NBT ซึ่งถูกเปลี่ยนเป็น formazan โดย superoxide anion (O_2^-) ที่เกิดขึ้น

ผสมเลือดตัวอย่าง 100 ไมโครลิตรกับสารละลาย 0.2 % NBT 100 ไมโครลิตร ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 30 นาที แล้วดูดสารลายผสมของเลือดและ NBT 100 ไมโครลิตรใส่ในหลอดแก้วที่มี dimethyl formamide (DMF) 2.0 มิลลิลิตร แล้วนำไปปั่นที่ความเร็วรอบ 5000 รอบต่อนาที 10 นาที ที่อุณหภูมิห้อง แล้วอ่านการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 540 นาโนเมตร โดยใช้ DMF เป็น blank

9. การวิเคราะห์ผลการทดลองทางสถิติ

การวิเคราะห์ผลการทดลองทางสถิติในครั้งนี้ใช้โปรแกรมสำเร็จรูป SPSS for windows, version 10 (SPSS Inc, Chicago, IL) วิเคราะห์ความแตกต่างของค่าเฉลี่ยจากทุกกลุ่มทดลองโดยรวมด้วยการวิเคราะห์ความแปรปรวน (Analysis of Variance) และทดสอบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยของแต่ละกลุ่มทดลองโดยวิธี Duncan 's multiple range test ใช้การวิเคราะห์ทางสถิติแบบ polynomial regression ในการวิเคราะห์แนวโน้มของปริมาณวิตามินซีต่อค่าทดสอบต่าง ๆ ในแบบเชิงเส้นตรง linear และ quadratic และยอมรับผลความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ $P<0.05$

การทดลองที่ 3 ผลของการเสริมวิตามินอีในอาหารต่อค่าทางโลหิตวิทยาและภูมิคุ้มกันโรคแบบไม่จำเพาะเจาะจงในปลาดุกลูกผสมที่ถูกทดสอบด้วยสภาวะน้ำอุณหภูมิต่ำ

1. แผนการทดลอง

การศึกษาครั้งนี้ใช้แผนการทดลองแบบ split plot ในการจัดสิ่งทดลองแบบสุ่มสมบูรณ์ (Split Plot in Completely randomized design) โดย whole plot คือ ระดับวิตามินอีที่เสริมในอาหารที่แตกต่างกัน 4 ระดับ และมี subplot เป็นปลาดุกลูกผสมที่เลี้ยงอยู่ที่อุณหภูมิปกติ และปลาดุกลูกผสมที่ถูกทดสอบด้วยสภาวะน้ำอุณหภูมิต่ำ แต่ละกลุ่มทดลองประกอบด้วยจำนวนซ้ำ 3 ซ้ำ โดยมีแผนภาพแผนการทดลอง ดังนี้

Whole plot (ระดับวิตามินอี)	**0 mg/kg**		**125 mg/kg**		**250 mg/kg**		**500 mg/kg**	
Subplot อุณหภูมิน้ำ	อุณหภูมิปกติ	อุณหภูมิต่ำ	อุณหภูมิปกติ	อุณหภูมิต่ำ	อุณหภูมิปกติ	อุณหภูมิต่ำ	อุณหภูมิปกติ	อุณหภูมิต่ำ

2. อาหารทดลอง

อาหารทดลองในครั้งนี้ผลิตที่ ฟาร์มมหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี แผนกสัตว์น้ำ (ฟาร์ม มทส.) วัตถุดิบที่ใช้ในการทำผลิตอาหาร แสดงดังตารางที่ 2.1 โดยจัดซื้อจากแหล่งจำหน่ายวัตถุดิบอาหาร ในจังหวัดนครราชสีมา และผลิตอาหารดังรายละเอียดในข้อ 2 ของการทดลองที่ 1 ตรวจสอบองค์ประกอบทางเคมีของอาหารทดลอง แสดงดังตารางที่ 2.3

ตารางที่ 2.3 องค์ประกอบทางเคมีของอาหารทดลอง

องค์ประกอบทางเคมี	เปอร์เซนต์
วัตถุแห้ง	92.02
โปรตีน	39.78
ไขมัน	8.70
เถ้า	10.61
ไฟเบอร์	3.61
Nitrogen free extract[ก]	29.32
พลังงานรวม[ข] (kcal/kg)	4274.77

[ก]Nitrogen free extract (NFE) (%) =

100 - (ความชื้น (%) + โปรตีน (%) + ไขมัน (%) + เถ้า (%) + ไฟเบอร์ (%))

[ข]พลังงานรวม (kcal/kg) (NRC, 1993) =

10 x (โปรตีน x 5.65 (kcal/g)) + (ไขมัน x 9.45 (kcal/g)) + (NFE x 4.11 (kcal/g))

นำอาหารเม็ดที่ใช้ในการทดลองมาเสริมวิตามินอีตามระดับที่ได้กำหนดไว้ โดยวิตามินอีที่ใช้ในการทดลองครั้งนี้ จะอยู่ในรูปของ tocopheryl acetate (Rovimix E 50, Hofmann-La Roche, Basel, Switzerland) โดยการละลาย tocopheryl acetate ตามระดับที่กำหนดในน้ำกลั่นในอัตราส่วน 60 มิลลิลิตรต่ออาหารปลา 1 กิโลกรัม ผสมคลุกเคล้าให้ทั่ว แล้วนำมาเคลือบเม็ดอาหารด้วยน้ำมันพืช (น้ำมันถั่วเหลือง) ในอัตรา 2.5 เปอร์เซ็นต์ จากนั้นทำการตรวจสอบระดับวิตามินอีในอาหารโดยการวิเคราะห์ด้วยเครื่อง HPLC อาหารที่ใช้ในการทดลองครั้งนี้จะเก็บที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

3. การวิเคราะห์วิตามินอีในอาหารทดลอง

3.1 การสกัดวิตามินอีจากอาหารปลาทดลอง

การสกัดวิตามินอีในอาหารได้ทำตามวิธีการวิเคราะห์ที่ได้รายงานไว้ใน Ruperez et al. (1999) โดยมีการดัดแปลงให้เหมาะสมกับห้องปฏิบัติการดังรายละเอียดต่อไปนี้ นำอาหารที่

ต้องการวิเคราะห์มาประมาณ 2 กรัม ชั่งให้ได้น้ำหนักแน่นอน บดให้ละเอียด เติม 0.1 % BHT in ethanol (Butylated hydroxytoluene) 20 มิลลิลิตร และเติม Hexane 10 มิลลิลิตร ผสมสารสกัดให้เข้ากัน 5 นาที แล้วเติม 0.01 mM EDTA 5 มิลลิลิตร ผสมสารสกัดให้เข้ากัน 5 นาที จากนั้นดูดชั้นของ Hexane ไปยังหลอดใหม่ แล้วเติม Hexane ลงไปสารสกัดอีก 5 มิลลิลิตร ผสมสารสกัดให้เข้ากัน 5 นาที จากนั้นดูดชั้นของ Hexane ไปรวมกับหลอดที่มี Hexane ที่ย้ายไป ทำการระเหย Hexane ภายใต้แก๊สไนโตรเจน แล้วทำการละลายน้ำมันหลังจากระเหยด้วยสารผสม methanol : Chloroform (1:1) เพื่อจะนำไปวิเคราะห์ปริมาณวิตามินซี ด้วยเครื่อง HPLC

3.2 การวิเคราะห์ปริมาณวิตามินอีด้วยเครื่อง HPLC

การวิเคราะห์ปริมาณวิตามินอี ทำโดยใช้ reverse phase HPLC (HP 1100) C18 column Hypersil ODS 5 μm (4.0 x 250 mm) วิเคราะห์ด้วย fluorescence detector (excited 295 nm, emission 327 nm) mobile phase ได้แก่ สารละลายผสมของ methanol/water ในอัตราส่วน 98:2 ปริมาณ tocopheryl acetate ในอาหารทดลองแสดงดังตารางที่ 2.4

ตารางที่ 2.4 ระดับการเสริมอนุพันธ์วิตามินอี (tocopheryl acetate) และปริมาณที่วิเคราะห์ได้ในอาหารปลาดุกลูกผสมของแต่ละกลุ่มทดลอง

กลุ่มทดลอง	ระดับอนุพันธ์วิตามินอีที่เสริมในอาหาร (mg/kg)	ปริมาณ tocopherol ที่วิเคราะห์ (mg/kg)	ปริมาณ tocopheryl acetate ที่วิเคราะห์ (mg/kg)
1	0	9.20	0.00
2	125	8.42	122.67
3	250	8.92	214.89
4	500	10.22	483.78

4. ปลาทดลอง ระบบการเลี้ยงปลา และการให้อาหารในระหว่างการทดลอง

ปลาดุกที่ใช้ในการทดลองครั้งนี้เป็นปลาดุกลูกผสม (*Clarias macrocephalus* x *C. gariepinus*) ได้จากฟาร์ม มทส. เริ่มการทดลองโดยทำการสุ่มปลาทดลองจำนวน 20 ตัว ลงในตู้ทดลอง ตู้ทดลองที่ใช้ในครั้งนี้มีขนาด 60 * 30 * 45 ลูกบาศก์เซนติเมตร (กว้าง * ยาว * สูง) เลี้ยงปลาดุกลูกผสมแบบให้อากาศในน้ำตลอดเวลา

ทำการเลี้ยงปลาเพื่อปรับสภาพเป็นเวลา 1 สัปดาห์ ด้วยอาหารพื้นฐานที่ไม่ได้เสริมวิตามินอี แล้วจึงเริ่มเลี้ยงปลาด้วยอาหารตามสูตรที่กำหนด โดยให้อาหารวันละ 2 ครั้งแบบ ให้กินแบบเต็มที่ ทำการเปลี่ยนถ่ายน้ำในตู้ปลาทุก 3 วัน ทำการบันทึกอุณหภูมิน้ำในระหว่างที่ทำการให้

อาหาร อุณหภูมิน้ำตลอดการเลี้ยงอยู่ในช่วง 28-30 องศาเซลเซียส ระยะเวลาในการเลี้ยงปลาทดลอง 8 สัปดาห์ โดยทำการบันทึกน้ำหนักปลา และน้ำหนักอาหารที่ปลาได้รับเมื่อสิ้นสุดสัปดาห์ที่ 4 และสัปดาห์ที่ 8 ตลอดระยะเวลาการทดลอง ถ้าพบปลาตายนำออกและทำการบันทึกข้อมูล

5. การทดสอบปลาดุกลูกผสมในสภาวะที่น้ำอุณหภูมิต่ำ

ในการศึกษาครั้งนี้ได้ศึกษาผลของการเสริมวิตามินอีในอาหารต่อปลาดุกเมื่ออยู่ในสภาพที่อุณหภูมิน้ำ 19 องศาเซลเซียส เปรียบเทียบปลาดุกลูกผสมที่เลี้ยงด้วยอาหารสูตรเดียวกันที่อุณหภูมิปกติ การศึกษาครั้งนี้ทำการทดสอบเพื่อเปรียบเทียบ 2 ครั้ง ได้แก่หลังจากเลี้ยงด้วยอาหารของแต่ละกลุ่มทดลองเป็นเวลา 4 และ 8 สัปดาห์

เมื่อเลี้ยงปลาได้ 4 สัปดาห์ และ 8 สัปดาห์ ทำการสุ่มปลาดุกลูกผสมจากแต่ละตู้ทดลอง (ซ้ำ) จำนวน 3 ตัว เพื่อเก็บตัวอย่างเลือด ด้วยวิธีการที่ได้อธิบายไว้ในการทดลองที่ 2 ข้อที่ 6 แล้วจึงนำปลาดุกลูกผสมมาทดสอบในน้ำอุณหภูมิ 19 องศาเซลเซียส ซึ่งเป็นการนำปลาดุกลูกผสมมาผ่านการลดอุณหภูมิน้ำอย่างรวดเร็ว (อัตราการเปลี่ยนอุณหภูมิ 0.1 องศาเซลเซียสต่อนาที) แล้วทำการเก็บตัวอย่างเลือดหลังจากผ่านการทดลองสอบอุณหภูมิน้ำ เป็นระยะเวลา 24 ชั่วโมง

6. การวิเคราะห์ค่าทางโลหิตวิทยา

การวิเคราะห์ค่าทางโลหิตวิทยาทำในตัวอย่างเลือดที่มี EDTA ทำตามวิธีการที่ได้อธิบายไว้ในการทดลองที่ 2 ข้อ 4

7. การวิเคราะห์ค่าทางภูมิคุ้มกัน

7.1 การวิเคราะห์ปริมาณโปรตีนในเลือด และ total immunoglobulin

การวิเคราะห์ปริมาณโปรตีนในพลาสมาทำโดยใช้ชุดทดสอบ colorimetric Lowry micro-method (Sigma) การวัดค่าปริมาณ total immunoglobulin ทำตามวิธีการที่ได้อธิบายไว้ในการทดลองที่ 2 ข้อ 8.1

7.2 การวิเคราะห์ค่าการทำงานของไลโซไซม์

การวิเคราะห์ค่าการทำงานเอ็นไซม์ไลโซไซม์ตามรายละเอียดวิธีการที่ได้อธิบายไว้ในข้อที่ 8.2 ของการทดลองที่ 2

7.3 การวิเคราะห์ Nitroblue tetrazolium (NBT)

เป็นการวิเคราะห์ superoxide anion (O_2^-) ที่เกิดขึ้นจากกิจกรรม Respiratory burst ของเม็ดเลือดขาว ตามวิธีของ Taoka et al. (2006) การวัดจะเป็นการวัดค่าการลดลงของ nitroblue tetrazolium:NBT ซึ่งถูกเปลี่ยนเป็น formazan โดย superoxide anion (O_2^-) ที่เกิดขึ้น ดังรายละเอียดวิธีการที่ได้รายงานไว้ในข้อ 8.4 ของการทดลองที่ 2

8. การวิเคราะห์ผลการทดลองทางสถิติ

การวิเคราะห์ผลการทดลองทางสถิติในครั้งนี้ใช้โปรแกรมสำเร็จรูป SPSS for windows, version 10 (SPSS Inc, Chicago, IL) วิเคราะห์ความแตกต่างของค่าเฉลี่ยจากทุกกลุ่มทดลอง โดยรวมด้วยการวิเคราะห์ความแปรปรวน (Analysis of Variance; ANOVA) ในแผนการทดลองแบบ split plot in completely randomized design และทดสอบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยที่เป็นผลเนื่องมาจากระดับวิตามินอีในอาหารด้วย ANOVA ตามด้วยการเปรียบเทียบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยโดยวิธี Duncan 's multiple range test ทดสอบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยที่เป็นผลเนื่องจากการทดสอบด้วยอุณหภูมิน้ำ ด้วย Student 's t-test ยอมรับผลความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ $P<0.05$

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

บทที่ 3
ผลการวิจัย

3.1 ผลการศึกษา

การทดลองที่ 1 ผลของอุณหภูมิน้ำต่อค่าทางโลหิตวิทยา และ ค่า Lipid peroxidation ที่ตับและไต

1. ค่าทางโลหิตวิทยา

การศึกษาครั้งนี้ได้ทำการทดสอบผลของอุณหภูมิน้ำต่อค่าทางโลหิตวิทยา โดยเป็นการวัดค่าเม็ดเลือดแดงอัดแน่น ฮีโมโกลบิน จำนวนเม็ดเลือดแดงทั้งหมด และค่าดัชนีเม็ดเลือดแดงจากการคำนวณ (MCV, MCH, MCHC) ของปลาดุกลูกผสมที่อุณหภูมิน้ำใกล้เคียงกับอุณหภูมิน้ำที่เลี้ยงอยู่เป็นกลุ่มควบคุม และปลาดุกลูกผสมที่ถูกทำให้เปลี่ยนอุณหภูมิน้ำอย่างฉับพลัน ที่ 26 และ 34 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 24 ชั่วโมง โดยทำการวิเคราะห์ค่าดังกล่าวที่ช่วงเวลา 3, 6, 12, และ 24 ชั่วโมง ผลแสดงดังตารางที่ 3.1

ค่าจำนวนเม็ดเลือดแดงทั้งหมดของปลาดุกลูกผสมในกลุ่มควบคุมและในกลุ่มที่ถูกทดสอบด้วยอุณหภูมิ 34 องศาเซลเซียส มีค่าไม่แตกต่างกันตลอด 24 ชั่วโมงที่ทำการทดสอบ ค่าจำนวนเม็ดเลือดแดงของปลาดุกลูกผสมที่ถูกทดสอบที่อุณหภูมิน้ำ 26 องศาเซลเซียสมีค่าต่ำที่สุดที่การตรวจวิเคราะห์ที่เวลา 3 ชั่วโมง หลังจากนั้นพบว่ามีค่าเพิ่มขึ้นเมื่อเวลาทดสอบอุณหภูมิยาวนานขึ้น ค่าเม็ดเลือดแดงอัดแน่นมีค่าใกล้เคียงกันในทุกกลุ่มทดลองที่เวลาทดสอบ 3 และ 6 ชั่วโมง แต่ในช่วงเวลา 12 และ 24 ชั่วโมงของการทดสอบพบว่าค่าเม็ดเลือดแดงอัดแน่นมีค่าต่ำสุดในปลาดุกลูกผสมที่ทดสอบที่อุณหภูมิน้ำ 34 องศาเซลเซียส อย่างไรก็ตามค่าต่ำสุดนี้ไม่แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ที่เวลาทดสอบ 3 ชั่วโมงพบว่าค่าฮีโมโกลบินมีค่าสูงในปลาที่อยู่ในอุณหภูมิน้ำสูงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (P<0.05) ค่าฮีโมโกลบินของปลาดุกลูกผสมที่อุณหภูมิน้ำ 30 และ 26 องศาเซลเซียสมีค่าสูงขึ้นในขณะที่ค่าฮีโมโกลบินของปลาดุกลูกผสมที่อุณหภูมิน้ำ 34 องศาเซลเซียส มีค่าต่ำลงที่เวลาทดสอบ 6 ชั่วโมง แต่ที่เวลาทดสอบ 12 และ 24 ชั่วโมง พบว่าค่าฮีโมโกลบินของปลาดุกลูกผสมในทุกกลุ่มอุณหภูมิมีค่าใกล้เคียงกัน นอกจากนี้เมื่อทำการพิจารณา ค่า MCV และ MCH ที่เวลา 3, 6 และ 12 ชั่วโมง พบว่าค่า MCV และ MCH ของปลาดุกลูกผสมในทุกกลุ่มอุณหภูมิทดลองมีค่าใกล้เคียง แต่พบว่า ค่า MCV และ MCH มีค่าแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่เวลา 24 ชั่วโมง โดยที่ค่า MCV ของปลาดุกลูกผสมที่ทำการทดสอบที่อุณหภูมิ 26 และ 34 องศาเซลเซียสมีค่าต่ำกว่าค่า MCV ของปลาดุกลูกผสมที่อุณหภูมิน้ำ 30 องศาเซลเซียสอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (P<0.05) และพบว่าค่า MCH ของปลาดุกลูกผสมที่ถูกทดสอบที่อุณหภูมิน้ำ 26 องศาเซลเซียส มีค่าต่ำกว่าค่า MCH

ของปลาดุกลูกผสมในกลุ่มอื่น ๆ อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (P<0.05) สำหรับค่า MCHC นั้นที่เวลาทดสอบ 3 ชั่วโมง ค่า MCHC ของปลาดุกลูกผสมที่อุณหภูมิน้ำ 34 องศาเซลเซียสมีค่าสูงที่สุดเมื่อเปรียบเทียบกับค่า MCHC ของปลาดุกลูกผสมที่กลุ่มอุณหภูมิอื่น ๆ อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ค่า MCHC ที่เวลาทดสอบอื่น ๆ (6, 12 และ 24 ชั่วโมง) นั้นพบว่าไม่แตกต่างกันระหว่างกลุ่มทดลองอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ

2. ค่า Lipid peroxidation

การศึกษาครั้งนี้ได้ทำการทดสอบผลของอุณหภูมิน้ำต่อค่า lipid peroxidation ของปลาดุกลูกผสม โดยเป็นการวัดค่า malondialdehyde (MDA) และ 4-hydroxyalkenals (HAE) ที่เกิดขึ้นในตับและไตของปลาดุกลูกผสมที่อุณหภูมิน้ำใกล้เคียงกับอุณหภูมิน้ำที่เลี้ยงอยู่เป็นกลุ่มควบคุม (อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส) และปลาดุกลูกผสมที่ถูกทำให้เปลี่ยนอุณหภูมิน้ำอย่างฉับพลัน ที่ 26 และ 34 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 24 ชั่วโมง แล้วทำการวิเคราะห์ค่า Lipid peroxidation ที่ช่วงเวลา 3, 6, 12, และ 24 ชั่วโมง

ผลการศึกษาผลของอุณหภูมิน้ำต่อค่า MDA ที่ไตแสดงดังตารางที่ 3.2 ที่เวลา 3 ชั่วโมง ค่า MDA ของไตปลาดุกลูกผสมที่อุณหภูมิ 26 และ 34 องศาเซลเซียสมีค่าสูงกว่า ค่า MDA ของไตปลาดุกลูกผสมที่กลุ่มควบคุม ต่อมาที่เวลา 6 ชั่วโมง ค่า MDA ของไตปลาดุกลูกผสมมีค่าใกล้เคียงในทุกกลุ่มทดลอง หลังจากนั้นที่เวลา 12 และ 24 ชั่วโมง พบว่าค่า MDA ของไตปลาดุกลูกผสมในกลุ่มทดลองที่อยู่ในอุณหภูมิสูงคือ 30 และ 34 องศาเซลเซียส จะสูงกว่าค่า ค่า MDA ของไตปลาดุกลูกผสมในกลุ่มทดลองที่อยู่ในอุณหภูมิ 26 องศาเซลเซียส อย่างไรก็ตามไม่พบความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ

ผลการศึกษาผลของอุณหภูมิน้ำต่อค่า MDA ที่ตับแสดงดังตารางที่ 3.2 ที่เวลา 3 ชั่วโมง ค่า MDA ของตับปลาดุกลูกผสมที่ถูกทดสอบที่น้ำอุณหภูมิ 26 องศาเซลเซียส มีค่าต่ำที่สุดเมื่อเปรียบเทียบกับค่า MDA ของตับปลาดุกลูกผสมที่อุณหภูมิ 30 และ 34 องศาเซลเซียส แต่หลังจากนั้นที่เวลา 6, 12 และ 24 ชั่วโมง พบว่าค่า MDA ในตับของปลาดุกลูกผสมทั้ง 3 กลุ่มทดลอง มีค่าใกล้เคียงกัน

3. ค่า NBT

ผลของอุณหภูมิน้ำต่อค่า NBT-spectrophotometric activity (NBT-activity) แสดงดังตารางที่ 3.2 ที่เวลาทดสอบที่ 3 และ 6 ชั่วโมง ค่า NBT-activity ของปลาดุกลูกผสมมีค่าใกล้เคียงกันในทุกกลุ่มทดลอง แต่ที่เวลาทดสอบ 12 และ 24 ชั่วโมง ค่า NBT-activity ของปลาดุกลูกผสมที่อุณหภูมิ 34 องศาเซลเซียสมีค่าสูงกว่าค่า NBT-activity ของปลาดุกลูกผสมที่อุณหภูมิ 30 องศา

เซลเซียส (กลุ่มควบคุม) และค่า NBT-activity ของปลาดุกลูกผสมที่อุณหภูมิ 26 องศาเซลเซียสมีค่าสูงที่สุด

ตารางที่ 3.1 ค่าทางโลหิตวิทยาของปลาดุกลูกผสมที่ถูกนำไปทดสอบการเปลี่ยนแปลงอุณหภูมิน้ำ ที่ระยะเวลาต่าง ๆ

เวลา (ชั่วโมง)	อุณหภูมิน้ำ (องศาเซลเซียส)	ค่าเม็ดเลือดแดงอัดแน่น (%)	ฮีโมโกลบิน (g/dl)	เม็ดเลือดแดง (*10^6/mm^3)	MCV (fL)	MCH (pg/cell)	MCHC (g/dl)
3	26	35.17 ± 5.24	7.18 ± 0.61^{a}	1.81 ± 0.11^{a}	192.45 ± 19.34	39.58 ± 1.37	20.88 ± 1.55^{a}
	30	41.50 ± 1.26	8.62 ± 0.27^{ab}	2.34 ± 0.14^{ab}	178.85 ± 11.64	37.01 ± 1.17	20.81 ± 1.04^{a}
	34	38.67 ± 2.46	9.62 ± 0.^{77b}	2.60 ± 0.32^{b}	152.08 ± 14.66	37.76 ± 3.73	24.82 ± 0.41^{b}
6	26	46.00 ± 4.73	8.60 ± 0.14^{a}	2.42 ± 0.16	193.10 ± 26.86	35.99 ± 3.16	19.08 ± 1.86
	30	39.83 ± 1.59	9.52 ± 0.39^{b}	2.85 ± 0.13	142.92 ± 16.56	33.96 ± 3.02	24.04 ± 1.93
	34	41.67 ± 5.45	8.40 ± 0.15^{a}	2.28 ± 0.13	182.38 ± 20.09	36.94 ± 1.41	20.81 ± 2.55
12	26	41.67 ± 1.33	8.68 ± 0.03	2.78 ± 0.04	149.73 ± 3.34	31.22 ± 0.31	20.88 ± 0.65
	30	42.67 ± 1.20	8.52 ± 0.29	3.08 ± 0.20	139.96 ± 12.65	29.59 ± 2.86	19.95 ± 0.16
	34	30.83 ± 6.98	8.20 ± 0.03	2.74 ± 0.15	126.98 ± 13.94	30.14 ± 1.77	23.00 ± 3.31
24	26	43.67 ± 1.86	8.38 ± 0.57	3.54 ± 0.27^{b}	124.02 ± 4.80^{a}	23.87 ± 1.92^{a}	19.25 ± 1.35
	30	43.83 ± 2.32	8.93 ± 0.52	2.36 ± 0.08^{a}	185.41 ± 6.45^{b}	37.74 ± 0.93^{b}	20.39 ± 0.67
	34	35.83 + 4.63	8.62 ± 0.41	2.52 ± 0.22^{a}	141.19 ± 6.57^{a}	34.47 ± 1.59^{b}	24.61 ± 2.18

ค่าที่แสดงในตารางคือค่าเฉลี่ย ± ค่าความคลาดเคลื่อน

ตัวอักษรภาษาอังกฤษกำกับค่าเฉลี่ยที่แตกต่างกันแสดงความแตกต่างของค่าเฉลี่ยอันเนื่องมากจากผลของอุณหภูมิน้ำในแต่ละช่วงเวลาอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (P<0.05)

ตารางที่ 3.2 ผลของการเปลี่ยนแปลงอุณหภูมิน้ำต่อค่า Nitroblutetrazolium assay (NBT) ในเลือด และค่า malondialdehyde (MDA) ในไตและตับของปลาดุกลูกผสม ภายในระยะเวลาทดสอบ 24 ชั่วโมง

เวลา (ชั่วโมง)	อุณหภูมิน้ำ (องศาเซลเซียส)	NBT (OD_{540})	MDA (นาโนโมล/มิลลิกรัมโปรตีน)	
			ไต	ตับ
3	26	0.19 ± 0.01	5.92 ± 0.85	2.30 ± 0.46
	30	0.20 ± 0.01	4.77 ± 1.08	3.85 ± 0.87
	34	0.19 ± 0.01	6.54 ± 0.96	3.93 ± 0.50
6	26	0.23 ± 0.02	7.74 ± 0.85	4.03 ± 0.71
	30	0.22 ± 0.00	7.89 ± 1.37	3.87 ± 0.67
	34	0.19 ± 0.02	7.54 ± 1.10	3.67 ± 0.29
12	26	0.25 ± 0.01	4.56 ± 0.51	3.11 ± 0.45
	30	0.13 ± 0.00	7.32 ± 1.08	3.49 ± 0.34
	34	0.18 ± 0.01	6.55 ± 0.14	3.37 ± 0.15
24	26	0.28 ± 0.01	6.56 ± 1.38	3.75 ± 0.49
	30	0.12 ± 0.01	7.26 ± 1.33	4.26 ± 0.33
	34	0.21 ± 0.01	10.00 ± 2.11	3.50 ± 0.20

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

การทดลองที่ 2 ผลของการเสริมอนุพันธ์วิตามินซีต่อค่าทางโลหิตวิทยาและภูมิต้านทานโรคแบบไม่จำเพาะเจาะจงในสภาวะน้ำอุณหภูมิต่ำ

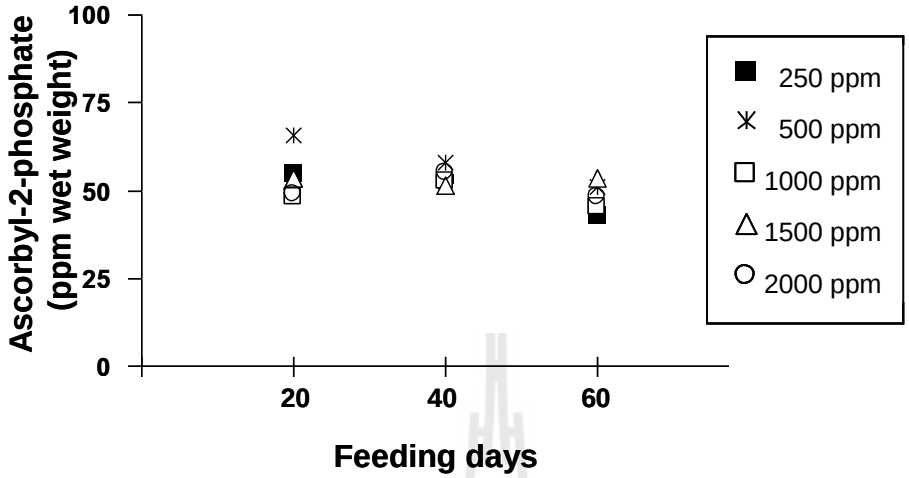
1. ปริมาณอนุพันธ์วิตามินซีในตับ

ระดับอนุพันธ์วิตามินซีที่วิเคราะห์ได้ในอาหาร (ตารางที่ 2.2) มีค่าสัมพันธ์กับปริมาณอนุพันธ์วิตามินซีที่เสริมในอาหารของแต่ละกลุ่มทดลอง ในขณะที่ระดับอนุพันธ์วิตามินซีที่วิเคราะห์ได้ในตับของปลาทดลองมีค่าใกล้เคียงกันในทุกกลุ่มทดลอง (ภาพที่ 3.1) แม้ว่าปลาจะได้รับอนุพันธ์วิตามินซีที่เสริมในอาหารแตกต่างกันก็ตาม ดังนั้นผลการศึกษาครั้งนี้แสดงถึง การเพิ่มปริมาณอนุพันธ์วิตามินซีที่เสริมในอาหารไม่มีผลต่อการเพิ่มการสะสมอนุพันธ์วิตามินซีในตับของปลาดุกลูกผสม

2. ค่าการเจริญเติบโตของปลา

ผลของการเสริมอนุพันธ์วิตามินซีในอาหารต่อค่าสมรรถนะการเจริญเติบโตของปลาดุกลูกผสมที่ศึกษาครั้งนี้ แสดงดังตารางที่ 3.3 ได้แก่ค่าอัตราการเจริญเติบโตจำเพาะ (specific growth rate) เปอร์เซ็นต์น้ำหนักเพิ่ม (percent weight gain) อัตราการเปลี่ยนอาหารเป็นเนื้อ (Feed conversion ratio; FCR) จะเห็นได้ว่า ในช่วงการเลี้ยงที่ 4 สัปดาห์แรก การเพิ่มระดับการเสริมอนุพันธ์วิตามินซีในอาหารมีผลต่อการเพิ่มเปอร์เซ็นต์การเพิ่มของน้ำหนักตัว ($P = 0.0003$) และอัตราการเจริญเติบโตจำเพาะ ($P = 0.0002$) โดยมีความสัมพันธ์กันแบบเชิงเส้น ($P<0.05$) ระดับอนุพันธ์วิตามินซีที่เสริมในอาหารปลาดุกลูกผสมที่ให้ผลต่อเปอร์เซ็นต์น้ำหนักเพิ่มและค่าอัตราการเจริญเติบโตจำเพาะสูงที่สุดของการทดลองครั้งนี้ มีค่าเท่ากับ 1,000-1,500 mg/kg

อย่างไรก็ตาม ผลของการเพิ่มระดับวิตามินซีในอาหารปลาดุกลูกผสมต่อค่าสมรรถนะการเจริญเติบโตไม่ต่อเนื่องเมื่อทำการวิเคราะห์ผลในช่วงสัปดาห์ที่ 5-8 ดังนั้นผลของระดับการเสริมวิตามินซีในอาหารปลาดุกลูกผสมต่อสมรรถนะการเจริญเติบโตในปลาดุกลูกผสมตลอดช่วงเวลาการทดลอง (8 สัปดาห์) จึงเป็นความสัมพันธ์แบบ quadratic ระดับของวิตามินซีที่เสริมในอาหารไม่มีผลต่อความแตกต่างของค่า FCR ตลอดระยะเวลาของการทดลอง (8 สัปดาห์) อัตรารอดของปลาดุกลูกผสมในแต่ละกลุ่มทดลองไม่แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P=0.232$)



ภาพที่ 3.1 ปริมาณอนุพันธ์ที่วิเคราะห์ได้ในตับของปลาดุกลูกผสมในแต่ละกลุ่มทดลอง

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

ตารางที่ 3.3 สมรรถนะการเจริญเติบโตและอัตรารอดของปลาดุกลูกผสมของกลุ่มทดลองที่ได้รับอนุพันธ์วิตามินซีที่ระดับต่างๆ (ค่าเฉลี่ย ± ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน)

	กลุ่มทดลองที่ได้รับอาหารเสริมอนุพันธ์วิตามินซีที่ระดับต่าง (mg/kg)					ANOVA Pr>F	Polynomial contrast (Pr>F)	
	250	500	1000	1500	2000		Linear	quadratic
น้ำหนักเริ่มต้น (กรัม)	15.39 ± 0.58	15.37 ± 0.25	15.32 ± 0.11	15.78 ± 0.70	15.56 ± 0.63	0.787	-	-
สัปดาห์ที่ 1-4								
น้ำหนักเพิ่ม (%)	189.74 ± 32.47^{a}	212.88 ± 17.17^{ab}	240.44 ± 15.98^{bc}	288.83 ± 8.01^{c}	277.03 ± 41.74^{c}	0.004	0.0003	Ns
อัตราการเจริญเติบโตจำเพาะ (% ต่อวัน)	3.78 ± 0.39^{a}	4.07 ± 0.19^{ab}	4.37 ± 0.17^{bc}	4.85 ± 0.08^{c}	1.73 ± 0.40^{c}	0.004	0.0002	Ns
อัตราการเปลี่ยนอาหารเป็นเนื้อ	1.20 ± 0.05	1.18 ± 0.09	1.27 ± 0.04	1.20 ± 0.08	1.22 ± 0.02	0.477	-	-
สัปดาห์ที่ 5-8								
น้ำหนักเพิ่ม (%)	44.38 ± 4.93	49.95 ± 14.44	49.93 ± 7.21	39.53 ± 9.48	30.15 ± 4.09	0.098	-	-
อัตราการเจริญเติบโตจำเพาะ (% ต่อวัน)	1.31 ± 0.12	1.44 ± 0.35	1.44 ± 0.17	1.18 ± 0.24	0.94 ± 0.11	0.084	-	-
อัตราการเปลี่ยนอาหารเป็นเนื้อ	2.11 ± 0.11	1.87 ± 0.39	1.83 ± 0.32	1.77 ± 0.28	2.03 ± 0.46	0.710	-	-
สัปดาห์ที่ 1-8								
น้ำหนักเพิ่ม (%)	317.38 ± 38.47^{a}	367.79 ± 27.09^{ab}	410.01 ± 24.38^{bc}	442.90 ± 45.52^{c}	390.28 ± 49.82^{c}	0.024	0.0315	0.0029
อัตราการเจริญเติบโตจำเพาะ (% ต่อวัน)	2.55 ± 0.17^{a}	2.75 ± 0.10^{ab}	2.91 ± 0.09^{b}	3.02 ± 0.15^{b}	2.83 ± 0.19^{b}	0.022	0.0316	0.0025
อัตราการเปลี่ยนอาหารเป็นเนื้อ	1.57 ± 0.10	1.45 ± 0.09	1.49 ± 0.12	1.38 ± 0.02	1.46 ± 0.15	0.324	-	-
อัตราการรอด (%)	86.11 ± 11.11	87.04 ± 8.48	92.59 ± 3.20	77.78 ± 5.56	88.89 ± 5.56	0.232	-	-

หมายเหตุ ตัวอักษรกำกับที่แตกต่างกันแสดงความแตกต่างเมื่อเปรียบเทียบในแถวเดียวอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมัน $P<0.05$

ns = ไม่แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (non-significant)

3. ค่าทางโลหิตวิทยา

การศึกษาผลของระดับการเสริมอนุพันธ์วิตามินซีในอาหารปลาดุกลูกผสมต่อค่าทางโลหิตวิทยาในปลาดุกลูกผสมภายใต้สภาวะการทดสอบในน้ำอุณหภูมิต่ำ (19 องศาเซลเซียส) จะทำการทดสอบ 2 ครั้ง คือ หลังจากเลี้ยงปลาเป็นระยะเวลา 4 และ 8 สัปดาห์

ค่าโลหิตวิทยาของปลาดุกลูกผสมที่ถูกทดสอบน้ำที่อุณหภูมิต่ำครั้งแรก (หลังจากการเลี้ยงด้วยอาหารทดลองเป็นระยะเวลา 4 สัปดาห์) แสดงดังตารางที่ 3.4 พบว่าระดับค่าเม็ดเลือดแดงอัดแน่น (hematocrit) ไม่แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติระหว่างกลุ่มทดลอง แต่ค่าปริมาณฮีโมโกลบินและจำนวนเม็ดเลือดแดงทั้งหมดมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติระหว่างกลุ่มทดลอง โดยพบว่าการเพิ่มระดับการเสริมอนุพันธ์วิตามินซีในอาหารมีผลต่อการเพิ่มปริมาณฮีโมโกลบินแบบ quadratic (P<0.05) โดยพบปริมาณฮีโมโกลบินสูงที่สุดในปลาดุกลูกผสมที่เลี้ยงด้วยอาหารที่เสริมอนุพันธ์วิตามินซีที่ระดับ 1000 mg/kg นอกจากนี้การเพิ่มปริมาณการเสริมอนุพันธ์วิตามินซีในอาหารมีผลต่อการเพิ่มจำนวนเม็ดเลือดแดงในความสัมพันธ์เชิงเส้นตรง (P<0.05) ค่า mean corpuscular volume (MCV) มีความสัมพันธ์กับปริมาณอนุพันธ์วิตามินซีที่เสริมในอาหารแบบ quadratic เชิงผกผัน (P<0.05) พบปริมาตรเม็ดเลือดแดงที่มีค่าต่ำสุดเมื่อปลาได้รับอาหารที่มีระดับ 1,500 mg/kg นอกจากนี้พบว่าค่า mean corpuscular hemoglobin (MCH) และค่า mean corpuscular hemoglobin concentration (MCHC) มีค่าสูงสุดในกลุ่มทดลองที่ปลาดุกลูกผสมได้รับการเสริมอนุพันธ์วิตามินซีที่ระดับ 1,000 mg/kgในอาหาร

ค่าโลหิตวิทยาของปลาดุกลูกผสมที่ถูกทดสอบน้ำที่อุณหภูมิต่ำครั้งที่ 2 (หลังจากการเลี้ยงด้วยอาหารทดลองเป็นระยะเวลา 8 สัปดาห์) แสดงดังตารางที่ 3.4 พบว่าค่าเม็ดเลือดแดงอัดแน่นและปริมาณฮีโมโกลบินไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติในแต่ละกลุ่มปลาทดลองที่ได้รับอาหารที่เสริมอนุพันธ์วิตามินซีแตกต่างกัน อย่างไรก็ตามจำนวนเม็ดเลือดแดงทั้งหมดยังคงเพิ่มขึ้นเมื่อปลาดุกลูกผสมได้รับอาหารที่เสริมอนุพันธ์วิตามินซีที่เพิ่มขึ้นในเชิงเส้นตรงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (P<0.05) นอกจากนี้ยังพบว่าค่า MCV และ MCHC ไม่แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติในปลาดุกลูกผสมของแต่ละกลุ่มทดลอง แต่ค่า MCH ลดลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเพิ่มระดับอนุพันธ์วิตามินซีในอาหารของปลากลุ่มทดลอง (P<0.05)

4. การนับแยกชนิดเม็ดเลือดขาว

ผลของอนุพันธ์วิตามินซีต่อชนิดของเม็ดเลือดขาวแสดงดังตารางที่ 3.5 ในการทดลองทดสอบอุณหภูมิน้ำเย็นของปลาดุกลูกผสมครั้งที่ 1 พบว่าในขณะที่เปอร์เซ็นต์ของเม็ดเลือดขาว lymphocyte เพิ่มขึ้นตามระดับการเสริมอนุพันธ์วิตามินซีที่เพิ่มขึ้น แต่เปอร์เซ็นต์ของเม็ดเลือดขาว neutrophil กลับมีค่าลดลงตามการเพิ่มขึ้นของระดับอนุพันธ์วิตามินซี และพบว่าเปอร์เซ็นต์ของเม็ด

เลือดขาว monocyte ลดลงเมื่อระดับอนุพันธ์วิตามินซีเพิ่มขึ้นด้วยความสัมพันธ์ในเชิง quadratic โดยพบว่าเปอร์เซ็นต์ของเม็ดเลือดขาว monocyte สูงที่สุดในกลุ่มทดลองที่ปลาได้รับอาหารที่เสริมอนุพันธ์วิตามินซีที่ระดับ 500 mg/kg นอกจากนี้ค่า neutrophil:lymphocyte ratio (N:L ratio) มีค่าลดลงเมื่อระดับการเสริมอนุพันธ์วิตามินซีในอาหารสูงขึ้นในเชิง quadratic โดยพบว่าค่า N:L ratio มีค่าต่ำสุดเมื่อปลาดุกลูกผสมได้รับอาหารที่มีการเสริมอนุพันธ์วิตามินซีที่ระดับ 1000 mg/kg

ในการทดลองทดสอบอุณหภูมิน้ำเย็นของปลาดุกลูกผสมครั้งที่ 2 พบว่าชนิดของเม็ดเลือดขาวได้แก่ neutrophil, lymphocyte, monocyte และ N:L ratio ไม่แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ในแต่ละกลุ่มทดลองของปลาดุกลูกผสม

5. ค่าภูมิคุ้มกันแบบไม่จำเพาะเจาะจง

ในการศึกษาครั้งนี้ได้ทำการวัดค่าภูมิต้านทานแบบไม่จำเพาะเจาะจงที่สำคัญในปลาดุกลูกผสม ได้แก่ ค่า Nitroblue tetrazolium activity (NBT) (ภาพที่ 3.2), ปริมาณโปรตีนในพลาสมา (Total protein; TP) (ภาพที่ 3.3), ปริมาณอิมมูโนโกลบูลินรวม (Total immunoglobulin; IgG) (ภาพที่ 3.4) , ค่าการทำงานของเอ็นไซม์ไลโซไซม์ (lysozyme) (ภาพที่ 3.5) และ ค่า alternative complement pathway (ACH_{50}) (ภาพที่ 3.6) ในปลาดุกลูกผสมของแต่ละกลุ่มทดลองที่ได้ถูกทดสอบอุณหภูมิน้ำเย็น ทั้ง 2 ครั้ง

ในการทดสอบอุณหภูมิน้ำครั้งแรกนั้น ค่า NBT สูงขึ้นเมื่อปลาได้รับอนุพันธ์วิตามินซีสูงขึ้น ในความสัมพันธ์เชิง quadratic โดยพบค่า NBT สูงที่สุดในปลาดุกลูกผสมที่เลี้ยงด้วยอาหารที่มีอนุพันธ์วิตามินซี 1,500-2,000 mg/kg แต่ทว่าค่า TP, IgG, และ lysozyme ไม่แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญในปลาดุกลูกผสมของแต่ละกลุ่มทดลอง ค่า ACH_{50} มีแนวโน้มสูงขึ้นเมื่อปลาได้รับอนุพันธ์วิตามินซีในอาหารเพิ่มมากขึ้น แต่อย่างไรก็ตามการเพิ่มขึ้นนี้ไม่มีนัยสำคัญทางสถิติ

ในการทดสอบอุณหภูมิน้ำครั้งที่ 2 พบว่า ค่า NBT สูงขึ้นเพียงเล็กน้อยและไม่มีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อปลาได้รับอนุพันธ์วิตามินซีสูงขึ้น ค่า TP และ IgG เพิ่มขึ้นตามระดับอนุพันธ์วิตามินซีที่สูงขึ้นในเชิง quadratic โดพบว่าค่า TP และ IgG มีค่าสูงสุดในปลาดุกลูกผสมที่ไดรับอนุพันธ์วิตามินซีที่ระดับ 1,000-1,500 mg/kg นอกจากนี้ค่า lysozyme สูงขึ้นเมื่อระดับอนุพันธ์วิตามินซีที่เสริมในอาหารสูงขึ้นและมีความสัมพันธ์กันในเชิงเส้นตรงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ค่า ACH_{50} มีแนวโน้มสูงขึ้นเมื่อปลาได้รับอนุพันธ์วิตามินซีในอาหารเพิ่มมากขึ้น แต่อย่างไรก็ตามการเพิ่มขึ้นนี้ไม่มีนัยสำคัญทางสถิติเช่นเดียวกับผลที่พบในการทดสอบอุณหภูมิน้ำครั้งแรก

ตารางที่ 3.4 ค่าโลหิตวิทยาของปลาดุกลูกผสมที่ได้รับอาหารเสริมอนุพันธ์ของวิตามินซีภายใต้สภาวะที่ถูกทดสอบด้วยน้ำอุณหภูมิต่ำ (ค่าเฉลี่ย ± ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน)

ระดับวิตะมินซีที่เสริม อาหารกลุ่มทดลอง (mg/kg)	ค่าเม็ดเลือดแดงอัดแน่น (%)	ฮีโมโกลบิน (g/dl)	จำนวนเม็ดเลือดแดง (10^6/mm^3)	MCV (fL)	MCH (pg/cell)	MCHC (g/dL)
การทดสอบอุณหภูมิน้ำ ครั้งที่ 1						
250	43.63 ± 1.10	8.33 ± 0.31^{a}	2.75 ± 0.10^{a}	162.10 ± 10.20^{c}	30.63 ± 1.31^{a}	19.26 ± 1.15^{a}
500	44.03 ± 3.61	7.87 ± 1.35^{a}	2.89 ± 0.08^{a}	155.83 ± 17.78^{bc}	27.83 ± 5.22^{a}	18.34 ± 3.02^{a}
1,000	37.30 ± 1.00	13.67 ± 0.35^{c}	2.93 ± 0.05^{a}	128.01 ± 1.78^{a}	47.21 ± 1.66^{b}	37.02 ± 1.89^{d}
1,500	37.17 ± 7.30	10.37 ± 1.46^{b}	3.32 ± 0.16^{b}	114.48 ± 19.06^{a}	31.84 ± 3.67^{a}	28.24 ± 1.69^{c}
2,000	47.17 ± 7.53	11.17 ± 1.21^{b}	3.61 ± 0.39^{b}	132.08 ± 8.35^{ab}	31.32 ± 0.40^{a}	24.00 ± 1.21^{b}
ANOVA: Pr>F	0.123	0.000	0.002	0.006	0.000	0.000
Polynomial regression: Linear	-	ns	0.0001	0.0059	ns	ns
Quadratic	-	0.0247	ns	0.0009	ns	0.0021
การทดสอบอุณหภูมิน้ำ ครั้งที่ 2						
250	41.17 ± 1.66	11.10 ± 0.98	2.83 ± 0.25^{a}	148.40 ± 17.92	39.99 ± 4.20^{c}	27.15 ± 2.42
500	42.93 ± 3.56	11.90 ± 0.69	3.97 ± 0.28^{bc}	111.34 ± 17.92	30.73 ± 4.47^{ab}	27.93 ± 1.32
1,000	39.47 ± 1.58	11.23 ± 0.25	3.40 ± 0.06^{ab}	116.44 ± 3.14	33.38 ± 1.19^{bc}	28.91 ± 0.93
1,500	45.27 ± 4.96	10.83 ± 0.76	3.90 ± 0.76^{bc}	121.87 ± 19.06	28.97 ± 4.87^{ab}	24.71 ± 1.40
2,000	44.23 ± 8.13	10.83 ± 1.02	4.35 ± 0.05^{c}	102.33 ± 19.35	25.20 ± 2.34^{a}	25.17 ± 2.65
ANOVA: Pr>F	0.579	0.491	0.006	0.059	0.007	0.087
Polynomial regression: Linear	-	-	0.0087	-	0.0019	-
Quadratic	-	-	ns	-	ns	-

หมายเหตุ ตัวอักษรกำกับที่แตกต่างกันแสดงความแตกต่างเมื่อเปรียบเทียบในคอลัมน์เดียวอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมัน $P<0.05$

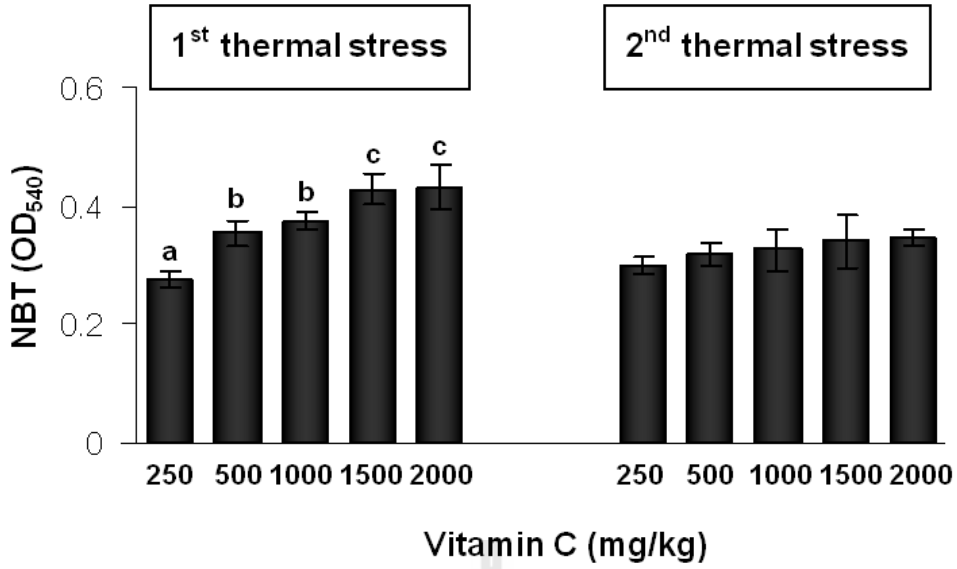
ns = ไม่แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (non-significant)

ตารางที่ 3.5 การนับจำแนกชนิดเม็ดเลือดขาวในปลาดุกลูกผสมที่ได้รับอาหารเสริมอนุพันธ์ของวิตามินซีภายใต้สภาวะที่ถูกทดสอบด้วยน้ำอุณหภูมิต่ำ (ค่าเฉลี่ย ± ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน)

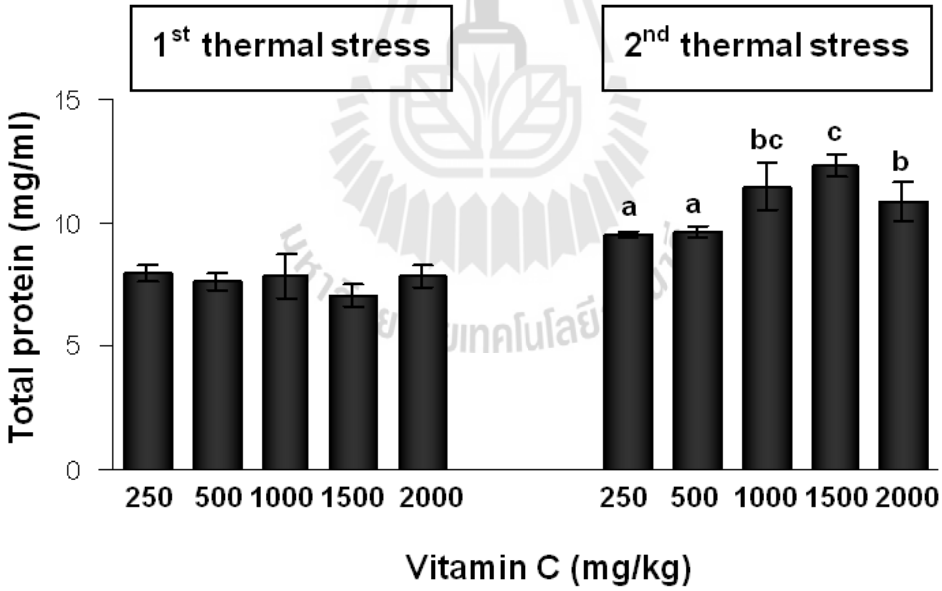
ระดับวิตะมินซีที่เสริมอาหารกลุ่มทดลอง (mg/kg)	N:L ratio	Neutrophil (%)	Lymphocyte (%)	Monocyte (%)
การทดสอบอุณหภูมิน้ำ ครั้งที่ 1				
250	0.93 ± 0.13^{c}	41.67 ± 1.68^{d}	50.40 ± 2.55^{a}	7.93 ± 1.17^{cd}
500	0.88 ± 0.06^{c}	39.11 ± 0.62^{cd}	51.58 ± 1.20^{a}	9.31 ± 0.63^{d}
1,000	0.26 ± 0.07^{a}	19.87 ± 2.42^{a}	75.80 ± 3.33^{d}	4.33 ± 0.92^{a}
1,500	0.53 ± 0.09^{b}	26.27 ± 2.44^{b}	67.82 ± 2.31^{c}	5.91 ± 0.68^{ab}
2,000	0.78 ± 0.19^{c}	34.56 ± 4.07^{c}	58.76 ± 2.96^{b}	6.69 ± 1.22^{bc}
ANOVA: Pr>F	0.000	0.000	0.000	0.001
Polynomial regression: Linear	ns	ns	ns	ns
Quadratic	0.0007	0.0001	0.0001	0.0249
การทดสอบอุณหภูมิน้ำ ครั้งที่ 2				
250	0.34 ± 0.04	23.09 ± 2.07	70.20 ± 0.53	6.69 ± 1.90
500	0.32 ± 0.11	23.29 ± 2.77	68.67 ± 1.75	8.04 ± 1.52
1,000	0.24 ± 0.06	17.89 ± 2.99	73.42 ± 3.62	8.02 ± 1.65
1,500	0.29 ± 0.03	19.71 ± 0.77	72.47 ± 2.20	7.82 ± 1.52
2,000	0.26 ± 0.09	19.73 ± 2.12	72.62 ± 1.60	7.64 ± 1.40
ANOVA: Pr>F	0.414	0.061	0.113	0.830
Polynomial regression: Linear	-	-	-	-
Quadratic	-	-	-	-

หมายเหตุ ตัวอักษรกำกับที่แตกต่างกันแสดงความแตกต่างเมื่อเปรียบเทียบในคอลัมน์เดียวอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมัน $P<0.05$

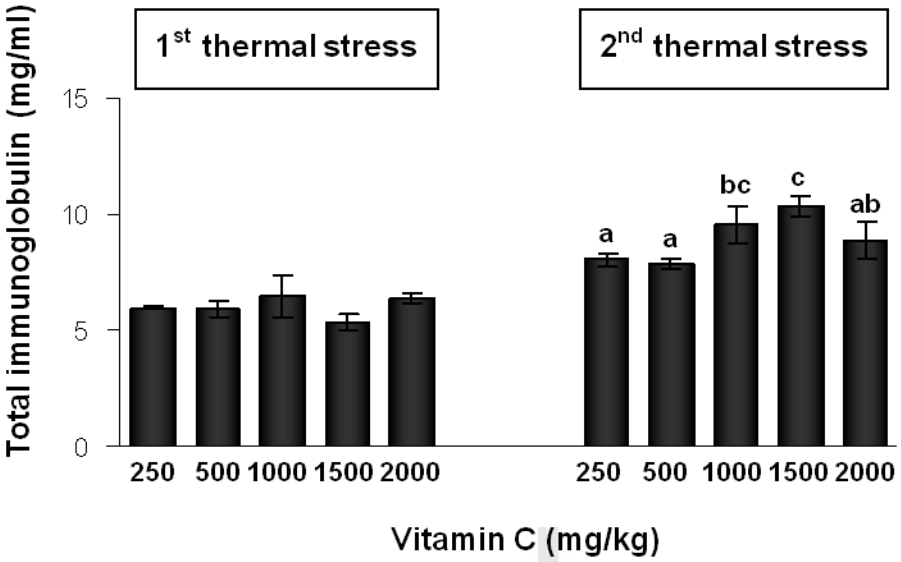
ns = ไม่แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (non-significant)



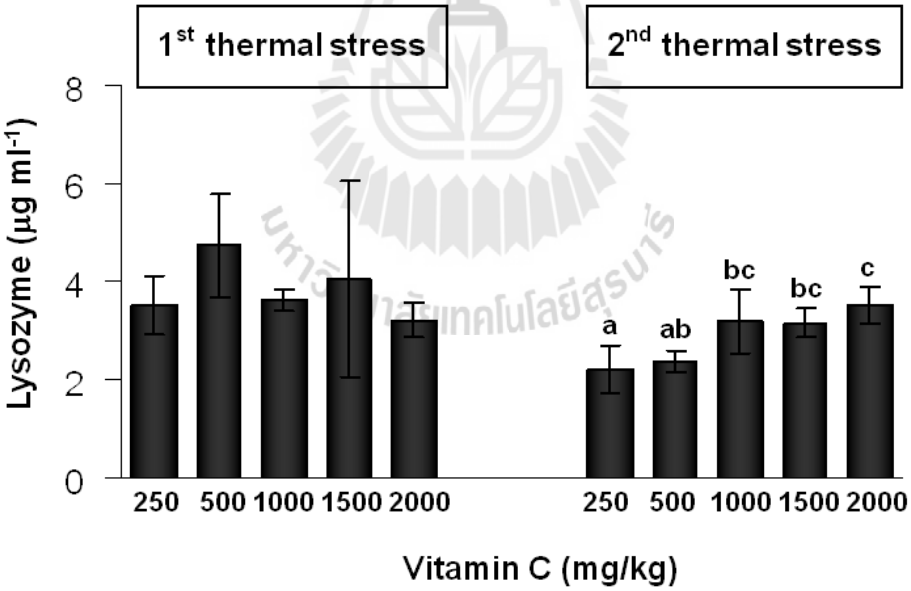
ภาพที่ 3.2 ผลของการเสริมอนุพันธ์วิตามินซีในอาหารต่อค่า Nitroblue tetrazolium (NBT) (ค่าเฉลี่ย $\pm$ ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน) ของปลาดุกลูกผสมภายใต้สภาวะทดสอบอุณหภูมิน้ำครั้งที่ 1 (หลังจากสัปดาห์ที่ 4 ของการทดลอง) และครั้งที่ 2 (หลังจากสัปดาห์ที่ 8 ของการทดลอง)



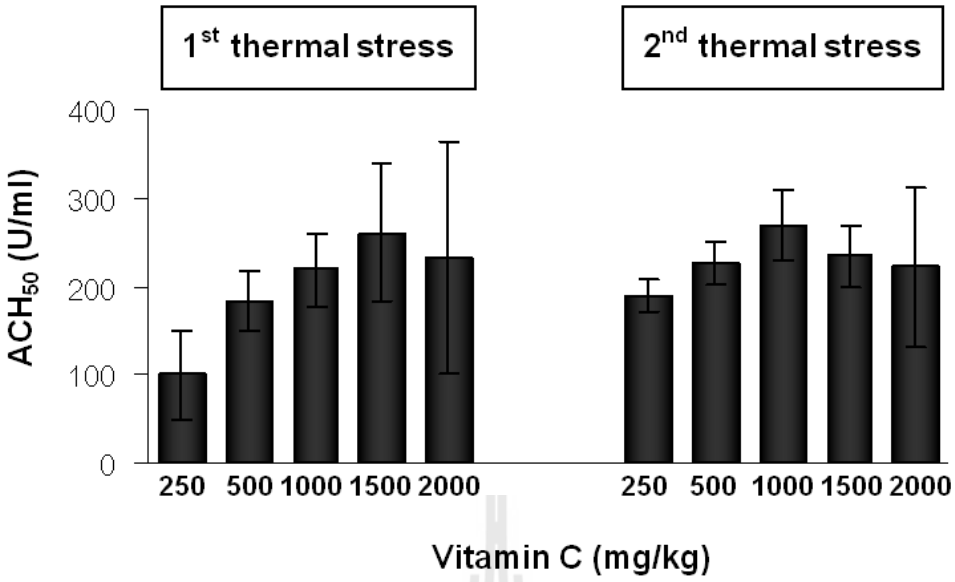
ภาพที่ 3.3 ผลของการเสริมอนุพันธ์วิตามินซีในอาหารต่อโปรตีนในเลือด (ค่าเฉลี่ย $\pm$ ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน) ของปลาดุกลูกผสมภายใต้สภาวะทดสอบอุณหภูมิน้ำครั้งที่ 1 (หลังจากสัปดาห์ที่ 4 ของการทดลอง) และครั้งที่ 2 (หลังจากสัปดาห์ที่ 8 ของการทดลอง)



ภาพที่ 3.4 ผลของการเสริมอนุพันธ์วิตามินซีในอาหารต่ออิมมูโนโกลบูลินในเลือด (ค่าเฉลี่ย ± ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน) ของปลาดุกลูกผสมภายใต้สภาวะทดสอบอุณหภูมิน้ำครั้งที่ 1 (หลังจากสัปดาห์ที่ 4 ของการทดลอง) และครั้งที่ 2 (หลังจากสัปดาห์ที่ 8 ของการทดลอง)



ภาพที่ 3.5 ผลของการเสริมอนุพันธ์วิตามินซีในอาหารต่อไลโซไซม์ในซีรัม (ค่าเฉลี่ย ± ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน) ของปลาดุกลูกผสมภายใต้สภาวะทดสอบอุณหภูมิน้ำครั้งที่ 1 (หลังจากสัปดาห์ที่ 4 ของการทดลอง) และครั้งที่ 2 (หลังจากสัปดาห์ที่ 8 ของการทดลอง)



ภาพที่ 3.6 ผลของการเสริมอนุพันธ์วิตามินซีในอาหารต่อค่าคอมพลีเมนต์ (ACH_{50}) (ค่าเฉลี่ย $\pm$ ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน) ของปลาดุกลูกผสมภายใต้สภาวะทดสอบอุณหภูมิน้ำครั้งที่ 1 (หลังจากสัปดาห์ที่ 4 ของการทดลอง) และครั้งที่ 2 (หลังจากสัปดาห์ที่ 8 ของการทดลอง)

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

การทดลองที่ 3 ผลของการเสริมอนุพันธ์วิตามินอีในอาหารต่อค่าทางโลหิตวิทยาและภูมิต้านทานโรคแบบไม่จำเพาะเจาะจงในปลาดุกลูกผสมที่ถูกทดสอบด้วยสภาวะน้ำอุณหภูมิต่ำ

การทดลองเป็นการเสริมอนุพันธ์วิตามินอีที่ระดับ 0, 125, 250 และ 500 mg/kgในอาหารปลาดุกลูกผสม และทำการทดลองเลี้ยงปลาเป็นระยะเวลา 8 สัปดาห์ ผลการวิเคราะห์ปริมาณอนุพันธ์วิตามินอีในอาหารทดลอง (ตารางที่ 3.6) พบว่าในอาหารที่ไม่ได้ทำการเสริมอนุพันธ์วิตามินอีมี tocopherol อยู่ที่ระดับ 9.20 mg/kg แต่ไม่พบ tocopheryl actate สำหรับอาหารทดลองที่เสริมอนุพันธ์วิตามินอี พบทั้งวิตามินอีที่อยู่ในรูป tocopherol (8.42-10.22 mg/kg) และ tocopheryl actate โดยที่ปริมาณ tocopheryl actate ที่ตรวจวิเคราะห์ได้สัมพันธ์กับปริมาณที่กำหนดที่เสริมในอาหาร

1. ค่าการเจริญเติบโตของปลา

ผลของการเสริมอนุพันธ์วิตามินอีในอาหารต่อค่าสมรรถนะการเจริญเติบโตของปลาดุกลูกผสมที่ศึกษาครั้งนี้ได้แก่ค่าอัตราการเจริญเติบโตจำเพาะ (specific growth rate) เปอร์เซ็นต์น้ำหนักเพิ่ม (percent weight gain) อัตราการเปลี่ยนอาหารเป็นเนื้อ (Feed conversion ratio; FCR) ซึ่งแสดงในตารางที่ 3.6 จะเห็นได้ว่า เมื่อระดับอนุพันธ์วิตามินอีที่เสริมในอาหารสูงขึ้น อัตราการเจริญเติบโตจำเพาะ (specific growth rate) เปอร์เซ็นต์น้ำหนักเพิ่ม (percent weight gain) เพิ่มขึ้นเพียงเล็กน้อยและไม่แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติตลอดระยะเวลาการทดลอง 8 สัปดาห์ นอกจากนี้ค่า FCR ก็ไม่แตกต่างกันระหว่างกลุ่มทดลองต่าง ๆ อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ

2. ค่าทางโลหิตวิทยา

การทดลองครั้งนี้ได้นำปลาดุกลูกผสมไปทำการทดสอบอุณหภูมิน้ำต่ำ ที่ 19 องศาเซลเซียส หลังสัปดาห์ที่ 4 ของการเลี้ยงด้วยอาหารของแต่ละกลุ่มทดลอง ซึ่งก่อนนำปลาดุกลูกผสมไปทดสอบอุณหภูมิน้ำ ได้ทำการสุ่มตัวอย่างปลาดุกลูกผสมไปทำการวิเคราะห์ค่าทางโลหิตวิทยา และเมื่อนำปลาดุกลูกผสมไปทดสอบอุณหภูมิน้ำ เป็นเวลา 24 ชั่วโมงก็จะทำการวิเคราะห์ค่าทางโลหิตวิทยา เพื่อเปรียบเทียบกัน ผลการทดลองแสดงดังตารางที่ 3.7 พบว่าระดับการเสริมอนุพันธ์วิตามินอีในอาหารไม่มีผลต่อค่าทางโลหิตวิทยาได้แก่ ค่าเม็ดเลือดแดงอัดแน่น, ฮีโมโกลบิน, จำนวนเม็ดเลือดแดงทั้งหมด และค่า MCV, MCH, MCHC แต่พบว่าการทดสอบอุณหภูมิน้ำเย็นมีผลต่อการเปลี่ยนแปลงค่าเม็ดเลือดแดงอัดแน่นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ โดยจะทำให้ค่าเม็ดเลือดแดงอัดแน่นมีค่าสูงขึ้น โดยเฉพาะอย่างยิ่งในกลุ่มปลาดุกลูกผสมที่ได้รับอาหารที่มีอนุพันธ์วิตามินอี 500 mg/kgเมื่อนำไปทดสอบอุณหภูมิน้ำต่ำจะมีค่าเม็ดแดงอัดแน่นสูงกว่ากลุ่มควบคุมที่อุณหภูมิน้ำปกติ

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.05$) อย่างไรก็ตามไม่พบว่าการเปลี่ยนแปลงอุณหภูมิน้ำจะมีผลที่มีนัยสำคัญต่อค่าทางโลหิตวิทยาอื่น ๆ อันได้แก่ค่า ฮีโมโกลบิน, จำนวนเม็ดเลือดแดงทั้งหมด และค่า MCV, MCH, และ MCHC

ตารางที่ 3.6 ผลการวิเคราะห์ปริมาณอนุพันธ์วิตามินอีและอนุพันธ์วิตามินอีที่เสริมในอาหารทดลอง และสมรรถนะการเจริญเติบโตของปลาดุกลูกผสมของแต่ละกลุ่มทดลอง

	กลุ่มทดลองที่ได้รับอาหารเสริมอนุพันธ์วิตามินอี (mg/kg)			
	0	125	250	500
ปริมาณวิตามินอี				
tocopheryl acetate (mg/kg)	0.00	122.67	214.89	483.78
tocopherol (mg/kg)	9.20	8.42	8.92	10.22
สัปดาห์ 1-4				
น้ำหนักเพิ่ม (%)	104.30 ± 13.87	97.75 ± 8.27	107.34 ± 7.16	111.98 ± 15.32
อัตราการเจริญเติบโตจำเพาะ (% /วัน)	2.53 ± 0.24	2.43 ± 0.15	2.60 ± 0.13	2.66 ± 0.27
อัตราการเปลี่ยนอาหารเป็นเนื้อ	1.87 ± 0.10	2.12 ± 0.17	1.90 ± 0.08	1.99 ± 0.17
สัปดาห์ 1-4				
น้ำหนักเพิ่ม (%)	52.00 ± 3.70	43.05 ± 8.35	48.34 ± 3.20	58.27 ± 6.72
อัตราการเจริญเติบโตจำเพาะ (% /วัน)	1.49 ± 0.09	1.27 ± 0.20	1.41 ± 0.08	1.63 ± 0.15
อัตราการเปลี่ยนอาหารเป็นเนื้อ	1.70 ± 0.10	2.09 ± 0.33	1.86 ± 0.09	1.68 ± 0.10

ค่าที่แสดงในตารางคือค่าเฉลี่ย ± ค่าความคลาดเคลื่อน

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

ตารางที่ 3.7 ผลของการเสริมอนุพันธ์วิตามินอีในอาหารและการทดสอบอุณหภูมิน้ำต่อค่าโลหิตวิทยาของปลาดุกลูกผสม หลังจากการเลี้ยงด้วยอาหารทดลอง 4 สัปดาห์

ระดับอนุพันธ์วิตามินอีที่เสริมอาหาร (mg/kg)	ค่าเม็ดเลือดแดงอัดแน่น (%)		ฮีโมกโกลบิน (g/dl)		เม็ดเลือดแดง (*10^6/mm^3)	
	กลุ่มควบคุม	กลุ่มทดสอบอุณหภูมิน้ำ	กลุ่มควบคุม	กลุ่มทดสอบอุณหภูมิน้ำ	กลุ่มควบคุม	กลุ่มทดสอบอุณหภูมิน้ำ
0	43.11 ± 2.98	41.94 ± 3.45	10.06 ± 0.42	8.88 ± 0.31	1.95 ± 0.37	1.95 ± 0.20
125	37.78 ± 6.66	45.33 ± 7.00	9.02 ± 0.57	9.89 ± 0.77	1.86 ± 0.29	2.00 ± 0.27
250	41.11 ± 1.22	46.33 ± 3.61	9.36 ± 0.26	9.92 ± 1.20	2.10 ± 0.34	2.26 ± 0.30
500	41.33 ± 4.35^B	53.11 ± 3.86^A	8.86 ± 1.26	9.87 ± 0.29	2.13 ± 0.28	2.18 ± 0.26

ค่าที่แสดงในตารางคือค่าเฉลี่ย ± ค่าความคลาดเคลื่อน

ตัวอักษรภาษาอังกฤษใหญ่กำกับที่แตกต่างกันแสดงความแตกต่างระหว่างกลุ่มควบคุมและกลุ่มทดสอบอุณหภูมิน้ำอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (P<0.05)

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

3. การนับแยกชนิดเม็ดเลือดขาว

ผลของการเสริมอนุพันธ์วิตามินอีต่อสัดส่วนชนิดของเม็ดเลือดขาวของปลาดุกลูกผสม ที่ได้ทำการวิเคราะห์ที่เวลา 4 สัปดาห์ของการทดลอง แสดงดังตารางที่ 3.8 ในสภาวะปกติ พบว่าระดับการเสริมอนุพันธ์วิตามินอีมีผลต่อ N:L ratio อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (P<0.05) ค่า N:L ratio ลดลงในกลุ่มปลาดุกลูกผสมที่ได้รับอาหารที่เสริมอนุพันธ์วิตามินอีเปรียบเทียบกับปลาดุกลูกผสมที่เลี้ยงด้วยอาหารที่ไม่ได้เสริมอนุพันธ์วิตามินอี นอกจากนี้ยังพบว่าสภาวะน้ำที่อุณหภูมิลดต่ำลงมีผลต่อการเปลี่ยนแปลงของเม็ดเลือดขาวในกลุ่มของปลาดุกลูกผสมที่เลี้ยงด้วยอาหารที่ไม่ได้เสริมอนุพันธ์วิตามินอีอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (P<0.05) ในกลุ่มของปลาดุกที่ไม่ได้รับการเสริมอนุพันธ์วิตามินอีในอาหารนี้ สภาวะการเปลี่ยนแปลงอุณหภูมิน้ำ มีผลทำให้ neutrophil ลดลง และ lymphocyte เพิ่มขึ้น ส่งผลทำให้ค่า N:L ratio สูงขึ้นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (P<0.05) พบการเปลี่ยนแปลงของเปอร์เซ็นต์ monocyte อันเป็นผลเนื่องมากจากระดับวิตามินที่เสริมในอาหารและการเปลี่ยนแปลงอุณหภูมิน้ำอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (P<0.05)

ผลของการเสริมอนุพันธ์วิตามินอีต่อสัดส่วนชนิดของเม็ดเลือดขาวของปลาดุกลูกผสม ที่ได้ทำการวิเคราะห์ที่เวลา 8 สัปดาห์ของการทดลอง แสดงดังตารางที่ 3.8 ไม่พบการเปลี่ยนแปลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติของสัดส่วนชนิดเม็ดเลือดขาวอันเป็นผลเนื่องมาจากระดับอนุพันธ์วิตามินอีที่เสริมในอาหารและ/หรือสภาวะการเปลี่ยนแปลงอุณหภูมิน้ำในการตรวจวิเคราะห์ในช่วงเวลาดังกล่าวนี้

4. ค่าภูมิคุ้มกันแบบไม่จำเพาะเจาะจง

การศึกษาผลของระดับอนุพันธ์วิตามินอีในอาหารและการทดสอบอุณหภูมิน้ำต่ำ ที่ 19 องศาเซลเซียส ต่อค่าภูมิคุ้มกัน ซึ่งได้แก่ค่าการทำงานของไลโซไซม์ (lysozyme; lz), ปริมาณโปรตีนในเลือด (Total protein; TP) และปริมาณอิมมูโนโกลบูลินทั้งหมด (total immunoglobulin; Ig) ซึ่งได้ทำการตรวจวิเคราะห์ 2 ครั้ง ได้แก่ หลังสัปดาห์ที่ 4 และสัปดาห์ที่ 8 ของการทดลอง ซึ่งในแต่ละครั้งที่ทำการทดสอบอุณหภูมิน้ำ จะทำการตรวจวิเคราะห์ก่อนและหลังการนำปลาดุกลูกผสมไปทดสอบอุณหภูมิน้ำ เพื่อเปรียบเทียบกัน

ผลของการเสริมอนุพันธ์วิตามินอีต่อต่อค่าภูมิคุ้มกันในปลาดุกลูกผสมที่ได้ตรวจวิเคราะห์ แสดงดังตารางที่ 3.9 ไม่พบความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติอันเป็นผลเนื่องมาจากระดับการเสริมอนุพันธ์วิตามินอีในอาหารต่อค่า lz, TP และ Ig เมื่อทำการศึกษาในปลาดุกลูกผสมที่อยู่ในสภาวะปกติ ทั้ง 2 ครั้ง (4 สัปดาห์ และ 8 สัปดาห์ของการทดลอง)

ในสภาวะที่ปลาดุกลูกผสมถูกทดสอบด้วยน้ำอุณหภูมิต่ำครั้งแรก พบว่ากลุ่มปลาดุกลูกผสมที่เลี้ยงด้วยอาหารที่ไม่ได้เสริมอนุพันธ์วิตามินอี มีการลดลงอย่างมีนัยสำคัญ (P<0.05) ของค่า lz เมื่อถูกทดสอบด้วยอุณหภูมิน้ำ แต่ไม่พบความแตกต่างอันเป็นผลจากการทดสอบอุณหภูมิน้ำต่อค่า lz ในปลาดุกลูกผสมที่ได้รับการเสริมอนุพันธ์วิตามินอีในอาหาร ในการทดสอบอุณหภูมิน้ำครั้งที่ 2 พบว่าการทดสอบอุณหภูมิน้ำไม่มีผลต่อการเปลี่ยนแปลงของค่า lz ในปลาดุกลูกผสมทุกกลุ่มทดลอง

การเสริมอนุพันธ์วิตามินอีไม่มีผลต่อค่าโปรตีนในเลือดอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ทั้ง 2 ครั้งของการทดลอง นอกจากนี้ไม่พบผลของการทดสอบอุณหภูมิน้ำต่อการเปลี่ยนแปลงของค่าโปรตีนในเลือดอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ทั้ง 2 ครั้งของการทดสอบอุณหภูมิน้ำ (ตารางที่ 3.9)

ในสภาวะที่ทดสอบอุณหภูมิต่ำทั้ง 2 ครั้งนั้น พบว่าค่า Ig มีค่าต่ำลงในกลุ่มปลาดุกลูกผสมที่ได้รับอนุพันธ์วิตามินอีที่ระดับต่ำ (P<0.05) โดยมีค่าต่ำที่สุดในกลุ่มปลาดุกลูกผสมที่เลี้ยงด้วยอาหารที่ไม่ได้เสริมอนุพันธ์วิตามินอี นอกจากนี้เมื่อเปรียบเทียบค่า Ig ที่วัดในตัวอย่างพลาสมาที่ได้จากการเก็บตัวอย่างก่อนและหลังการทดสอบอุณหภูมิน้ำของปลาดุกลูกผสมในแต่ละกลุ่มทดลอง พบว่าการทดสอบอุณหภูมิน้ำมีผลต่อการลดลงของค่า Ig อย่างมีนัยสำคัญ (P<0.05) เมื่อเปรียบภายในกลุ่มทดลองที่ได้รับอาหารเสริมอนุพันธ์วิตามินอีระดับเดียวกัน (ตารางที่ 3.9)

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

ตารางที่ 3.8 ผลของการเสริมอนุพันธ์วิตามินอีในอาหารและการทดสอบอุณหภูมิน้ำต่อชนิดและจำนวนเม็ดเลือดขาวของปลาดุกลูกผสม

ระดับวิตามินอีที่เสริมอาหาร (mg/kg)	Neutrophil (%)		Lymphocyte (%)		Monocyte (%)		N:L ratio	
	กลุ่มควบคุม	กลุ่มทดสอบอุณหภูมิน้ำ	กลุ่มควบคุม	กลุ่มทดสอบอุณหภูมิน้ำ	กลุ่มควบคุม	กลุ่มทดสอบอุณหภูมิน้ำ	กลุ่มควบคุม	กลุ่มทดสอบอุณหภูมิน้ำ
การทดสอบอุณหภูมิน้ำครั้งที่ 1								
0	53.56 ± 1.45^{B}	61.56 ± 0.80^{aA}	41.44 ± 1.44^{A}	30.33 ± 0.51^{bB}	5.00 ± 0.51^{bB}	8.11 ± 0.73^{aA}	1.30 ± 0.08^{aB}	2.03 ± 0.05^{aA}
125	42.89 ± 2.48	36.00 ± 5.61^{b}	51.00 ± 1.00	60.89 ± 5.84^{a}	6.11 ± 1.90^{a}	3.11 ± 0.40^{b}	0.84 ± 0.06^{b}	0.82 ± 0.16^{b}
250	46.89 ± 4.45	38.11 ± 4.77^{b}	48.78 ± 4.87	58.89 ± 4.47^{a}	4.33 ± 0.84^{c}	3.00 ± 0.39^{b}	1.00 ± 0.17^{ab}	0.67 ± 0.12^{b}
500	42.33 ± 1.53	37.78 ± 1.66^{b}	50.33 ± 1.53	58.78 ± 2.75^{a}	7.33 ± 0.00^{aA}	3.44 ± 1.10^{bB}	0.84 ± 0.05^{b}	0.65 ± 0.06^{b}
การทดสอบอุณหภูมิน้ำครั้งที่ 2								
0	50.67 ± 0.39	41.56 ± 4.98	44.33 ± 1.65	54.33 ± 4.79	5.00 ± 1.53	4.11 ± 0.78	1.15 ± 0.05	0.79 ± 0.17
125	44.78 ± 4.82	39.67 ± 4.95	51.56 ± 4.98	58.11 ± 5.10	3.67 ± 1.84	2.22 ± 0.22	0.90 ± 0.17	0.71 ± 0.14
250	45.67 ± 3.98	38.67 ± 0.58	50.78 ± 3.70	55.89 ± 1.82	3.56 ± 0.48	5.44 ± 1.79	0.92 ± 0.14	0.69 ± 0.03
500	51.89 ± 6.25	50.56 ± 3.14	45.44 ± 5.40	44.78 ± 2.78	2.67 ± 0.88	4.67 ± 0.51	0.22 ± 0.32	1.15 ± 0.13

ค่าที่แสดงในตารางคือค่าเฉลี่ย $\pm$ ค่าความคลาดเคลื่อน

ตัวอักษรภาษาอังกฤษใหญ่กำกับที่แตกต่างกันแสดงความแตกต่างระหว่างกลุ่มควบคุมและกลุ่มทดสอบอุณหภูมิน้ำอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.05$)

ตัวอักษรภาษาอังกฤษเล็กกำกับที่แตกต่างกันแสดงความแตกต่างอันเนื่องมาจากระดับอนุพันธ์วิตามินอีที่เสริมในอาหารอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.05$)

ตารางที่ 3.9 ผลของการเสริมอนุพันธ์วิตามินอีในอาหารและการทดสอบอุณหภูมิน้ำต่อไลโซไซม์ โปรตีนในน้ำเลือดและค่าอิมมูโนโกลบูลินของปลาดุกลูกผสม

ระดับวิตามินอีที่เสริมอาหาร (mg/kg)	ไลโซไซม์ (μg ml^{-1})		โปรตีนในเลือด (mg ml^{-1})		อิมมูโนโกลบูลิน (mg ml^{-1})	
	กลุ่มควบคุม	กลุ่มทดสอบอุณหภูมิน้ำ	กลุ่มควบคุม	กลุ่มทดสอบอุณหภูมิน้ำ	กลุ่มควบคุม	กลุ่มทดสอบอุณหภูมิน้ำ
การทดสอบอุณหภูมิน้ำครั้งที่ 1						
0	3.15 $\pm$ 0.33^{B}	1.45 $\pm$ 0.18^{A}	37.66 $\pm$ 1.64	42.39 $\pm$ 0.61	20.85 $\pm$ 2.70^{B}	10.54 $\pm$ 0.36^{aA}
125	3.47 $\pm$ 0.63	2.40 $\pm$ 0.57	38.80 $\pm$ 0.09	40.97 $\pm$ 1.01	24.60 $\pm$ 0.13	17.89 $\pm$ 3.53^{ab}
250	3.53 $\pm$ 0.61	2.28 $\pm$ 0.42	41.58 $\pm$ 0.63	40.92 $\pm$ 1.18	22.79 $\pm$ 1.52	16.03 $\pm$ 2.08^{ab}
500	2.73 $\pm$ 0.61	2.39 $\pm$ 0.67	40.44 $\pm$ 0.52	40.43 $\pm$ 0.41	25.22 $\pm$ 0.71	21.03 $\pm$ 0.58^{b}
การทดสอบอุณหภูมิน้ำครั้งที่ 2						
0	3.46 $\pm$ 0.70	2.42 $\pm$ 0.13	36.11 $\pm$ 1.62	35.82 $\pm$ 0.48	23.52$\pm$ 1.59^{B}	14.13 $\pm$ 1.27^{aA}
125	2.80 $\pm$ 1.06	2.63 $\pm$ 0.69	34.96 $\pm$ 0.27	33.80 $\pm$ 2.00	21.03 $\pm$ 0.63	18.75 $\pm$ 1.23^{b}
250	4.02 $\pm$ 1.29	1.97 $\pm$ 0.41	40.44 $\pm$ 0.64	33.85 $\pm$ 1.75	22.85 $\pm$ 1.23	25.65 $\pm$ 1.99^{b}
500	4.07 $\pm$ 1.49	2.39 $\pm$ 0.71	34.73 $\pm$ 3.21	33.65 $\pm$ 2.63	21.47 $\pm$ 0.71	25.91 $\pm$ 0.58^{b}

ค่าที่แสดงในตารางคือค่าเฉลี่ย $\pm$ ค่าความคลาดเคลื่อน

ตัวอักษรภาษาอังกฤษใหญ่กำกับที่แตกต่างกันแสดงความแตกต่างระหว่างกลุ่มควบคุมและกลุ่มทดสอบอุณหภูมิน้ำอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (P<0.05)

ตัวอักษรภาษาอังกฤษเล็กกำกับที่แตกต่างกันแสดงความแตกต่างอันเนื่องมาจากระดับอนุพันธ์วิตามินอีที่เสริมในอาหารอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (P<0.05)

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

3.2 อภิปรายผลการศึกษา

การทดลองที่ 1 ผลของอุณหภูมิน้ำต่อค่าทางโลหิตวิทยา และ ค่า Lipid peroxidation ที่ตับและไต

การเปลี่ยนแปลงอุณหภูมิน้ำสามารถก่อให้เกิดเป็นความเครียดในปลาซึ่งเป็นสัตว์เลือดเย็นและส่งผลให้เกิดภาวะ oxidative stress ในการศึกษาครั้งนี้พบว่า malondialdehyde (MDA) มีค่าต่ำในปลาดุกลูกผสมที่อยู่ในอุณหภูมิต่ำ หรือกล่าวอีกนัยหนึ่งว่าปลาดุกลูกผสมที่อยู่ในสภาวะที่มีอุณหภูมิน้ำสูงมีค่า lipid peroxidation สูง ซึ่งผลการศึกษาครั้งนี้เป็นไปในทางเดียวกับผลการศึกษาที่ได้เสนอว่าอุณหภูมิน้ำที่สูงขึ้นส่งผลให้ค่า oxidative stress สูงขึ้น เช่นในการศึกษาในปลา Channa puntatus (Kaur et al., 2005), ปลาทอง (Laushchak and Bagnyukova, 2006) และปลา catfish (Heteropneustes fossilis (Parihar and Dubey, 1995) ซึ่งสาเหตุของสภาวะ oxidative stress ที่สูงขึ้นเมื่อปลาอยู่ในอุณหภูมิน้ำที่สูงขึ้นอาจจะอธิบายได้ว่า ปลาใช้ออกซิเจนมากขึ้นเมื่อปลาอยู่ในน้ำที่มีอุณหภูมิสูงขึ้น การใช้ออกซิเจนที่มากขึ้นส่งผลให้เกิดการผลิต reactive oxygen species (ROS) ในอัตราที่สูงกว่าอัตราการทำลาย (ROS) นอกจากนี้การเกิด lipid peroxidation ยังมีค่าขึ้นลงในระหว่างระยะเวลาที่ทำการทดลอง ซึ่งสอดคล้องกับรายงานของ Lushcahk และ Bangnyukova (2006) อย่างไรก็ตามแม้ว่าค่า MDA จะมีการเปลี่ยนแปลงขึ้นกับอุณหภูมิน้ำและระยะเวลาที่การศึกษา แต่ค่าการเปลี่ยนแปลงยังไม่มากพอที่จะพบความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ที่เป็นเช่นนี้เนื่องมาจากอุณหภูมิน้ำต่ำ-สูงที่ใช้ในการทดสอบปลาดุกลูกผสมในการศึกษาครั้งนี้เป็นอุณหภูมิน้ำที่ยังอยู่ในช่วงที่ปลาดุกลูกผสมสามารถดำรงชีวิตได้ และระยะเวลาการทดสอบ (24 ชั่วโมง) อาจไม่มากพอที่จะพบการเปลี่ยนแปลงของค่า MDA อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ

การวิเคราะห์ค่า NBT เป็นวิธีการหนึ่งที่ใช้วิเคราะห์การเกิด superoxide anion ซึ่งมักจะถูกใช้ในการวัดการเกิด superoxide anion อันเนื่องมาจากกระบวนการ phagocytosis ของเม็ดเลือดขาวในทางอ้อม ในการศึกษาครั้งนี้พบว่าปลาดุกลูกผสมที่อยู่ในอุณหภูมิต่ำมีค่า NBT สูง ผลการศึกษาที่พบในการศึกษาครั้งนี้สอดคล้องกับรายงานการศึกษาที่ได้มีผู้ศึกษาไว้ ซึ่งได้รายงานว่าอุณหภูมิน้ำต่ำมีผลต่อการเพิ่มค่า respiratory burst acitivity และกระบวนการ phagocytosis ในปลา Tinca tinca, channel catfish และปลาไน (Dexiang and Anisworth, 1991; Collazos et al., 1994; Le Morvan et al., 1997)

ในการศึกษาครั้งนี้พบการเปลี่ยนแปลงของค่าทางโลหิตวิทยาอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติในช่วงแรกของการเปลี่ยนแปลงอุณหภูมิน้ำ ที่เป็นเช่นนี้อาจอธิบายได้ว่าปลาดุกลูกผสมเกิดภาวะช็อกจากอุณหภูมิน้ำอย่างเฉียบพลัน (Acute thermal shock) หลังจากนั้นค่าการเปลี่ยนแปลงทางโลหิตวิทยามีการเปลี่ยนแปลงน้อยลงในเวลาการทดสอบต่อมา และพบค่าการเปลี่ยนแปลงทาง

โลหิตวิทยาอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติอีกครั้งในช่วงเวลาสุดท้ายของการเปลี่ยนแปลงอุณหภูมิ ที่เป็นเช่นนี้อาจเนื่องมาจากหลังจากปลาดุกลูกผสมเกิดภาวะช็อกอุณหภูมิน้ำอย่างเฉียบพลัน ปลาดุกลูกผสมได้มีกลไกการปรับสภาวะร่างกายให้เข้ากับสภาวะการเปลี่ยนแปลงอุณหภูมิดังกล่าว แต่เนื่องจากปลาดุกลูกผสมไม่สามารถปรับสภาพร่างกายให้เข้ากับค่าการเปลี่ยนแปลงดังกล่าวได้ จึงพบค่าการเปลี่ยนแปลงของโลหิตวิทยาอีกครั้งหนึ่ง ซึ่งเกิดเนื่องจากปลาดุกเริ่มเข้าสู่ภาวะ chronic stress อันเนื่องมาจากการเปลี่ยนแปลงอุณหภูมิน้ำ ซึ่งสอดคล้องกับบทความปริทรรศน์ที่เขียนโดย Matineez-Porchas et al. (2009) ได้รายงานว่าเมื่อสัตว์ประสบกับภาวะความเครียด จะพบความแตกต่างของสารเคมีในเลือดในช่วงแรก หลังจากนั้นค่าการเปลี่ยนแปลงสารเคมีในเลือดจะกลับเข้าสู่ภาวะปกติอันเนื่องมาจากสัตว์มีการปรับตัวให้เข้ากับภาวะสิ่งแวดล้อมที่ไม่เหมาะสมนั้น แต่ค่าการเปลี่ยนแปลงของสารเคมีในเลือดจะเกิดขึ้นอีกครั้งถ้าหากสัตว์ไม่สามารถปรับตัวได้ อย่างไรก็ตามการศึกษาครั้งนี้ไม่พบความผิดปกติภายนอกของปลาดุกลูกผสม ทั้งอาจเนื่องมาจากการทดสอบอุณหภูมิน้ำเกิดขึ้นในระยะเวลาสั้น เวลา 24 ชั่วโมงไม่ยาวนานพอที่จะก่อเกิดความผิดปกติภายนอกที่สามารถสังเกตได้

การทดลองที่ 2 ผลของการเสริมอนุพันธ์วิตามินซีต่อค่าทางโลหิตวิทยาและภูมิต้านทานโรคแบบไม่จำเพาะเจาะจงในสภาวะน้ำอุณหภูมิต่ำ

เป็นที่ทราบกันดีว่าวิตามินซี L-ascorbic acid มักจะไม่คงทน และถูกออกซิไดส์ได้ง่าย ปัจจุบันนี้วิตามินซีที่ใช้ในอาหารสัตว์น้ำได้มีการปรับแปลงโครงสร้างโมเลกุลของวิตามินซีสร้างเป็นสารอนุพันธ์วิตามินซี เพื่อให้มีความคงทน เหมาะสมในการใช้เป็นสารเสริมในอาหารสัตว์น้ำมากยิ่งขึ้น รูปแบบของอนุพันธ์วิตามินซีที่เป็นที่นิยมใช้เป็นสารเสริมในอาหารสัตว์น้ำ มีอยู่ 2 ชนิด ได้แก่ L-ascorbyl-2-sulfate และ L-ascorbyl-2-phosphate ได้มีการศึกษาเปรียบเทียบการใช้อนุพันธ์วิตามินซี 2 รูปนี้เสริมในอาหารปลา Channel catfish พบว่าปลา Channel catfish สามารถใช้ประโยชน์จากอนุพันธ์วิตามินซีในรูปของ L-ascorbyl-2-phosphate ได้ดีกว่าอนุพันธ์วิตามินซีในรูปของ L-ascorbyl-2-sulfate (EL Naggar and Lovell, 1991) ในการศึกษาครั้งนี้ได้ใช้อนุพันธ์วิตามินซีในรูปของ L-ascorbyl-2-phosphate เสริมในอาหารทดลอง ผลการตรวจสอบปริมาณอนุพันธ์วิตามินซีในอาหารทดลองที่สอดคล้องกับปริมาณอนุพันธ์วิตามินซีที่ทำการเสริมในอาหารแสดงให้เห็นถึงความคงทนของอนุพันธ์วิตามินซีที่ใช้ศึกษาในครั้งนี้ ซึ่งสอดคล้องกับรายงานการศึกษาที่แสดงให้เห็นถึงความคงทนและการใช้ประโยชน์จากของอนุพันธ์วิตามินซีในรูป L-ascorbyl-2-phosphate (Wang et al., 2003; Chen et al., 2007) ในอาหารปลา อนุพันธ์วิตามินซีในรูปของ L-ascorbyl-2-phosphate ได้จากการเปลี่ยนหมู่ไฮดรอกซิลที่ตำแหน่งที่ 2 ของอะตอม

คาร์บอนในวงแหวนเป็นหมู่ฟอสเฟต ถึงแม้ว่าจะไม่ได้มีการพิสูจน์ถึงการทำงานของเอ็นไซม์ฟอสฟาเตสในลำไส้ของปลาดุกลูกผสม แต่คาดว่าเมื่อปลาดุกลูกผสมได้รับอาหารที่เสริม L-ascorbyl-2-phosphate เมื่ออาหารผ่านไปที่ลำไส้เล็ก L-ascorbyl-2-phosphate จะถูก hydrolyse ด้วยเอ็นไซม์ฟอสฟาเตสเป็น ascorbic acid แล้วจึงถูกดูดซึมไปใช้ประโยชน์ในร่างกาย ซึ่งน่าจะมีกลไกที่คล้ายคลึงกับกลไกที่อธิบายไว้ในรายงานการศึกษาของ Matusiewicz and Dabrowski (1995)

วิตามินซีถูกดูดซึมที่ลำไส้เล็ก ด้วยกระบวนการ active transport ซึ่งเป็นแบบ sodium-ascorbate cotransport ผ่านเมมเบรนของ enterocyte (Wilson, 2005) หลังจากถูกดูดซึมวิตามินซีจะผ่านเข้าไปในตับและสะสมในตับและอวัยวะต่าง ๆ ซึ่งความคงทนของวิตามินซี และปริมาณการสะสมของวิตามินซีในอวัยวะต่าง ๆ จะแตกต่างกันขึ้นกับชนิดของปลา ในการศึกษาครั้งนี้ได้ทำการวิเคราะห์ปริมาณของอนุพันธ์วิตามินซีที่สะสมในตับของปลาดุกลูกผสมเมื่อได้รับอาหารทดลองที่มีการเสริมอนุพันธ์วิตามินซีที่ระดับแตกต่างกัน พบว่าปริมาณอนุพันธ์วิตามินซีที่ตรวจพบในตับมีระดับใกล้เคียงกันในทุกกลุ่มทดลองที่ได้รับอาหารที่มีการเสริมอนุพันธ์วิตามินซีที่ระดับแตกต่างกัน ซึ่งผลการศึกษาครั้งนี้สอดคล้องกับรายงานการศึกษาของ Fournier et al. (2000) ที่รายงานว่าปลามีการสะสมวิตามินซีในตับแบบคงที่ แม้ว่าจะได้รับอาหารที่มีระดับวิตามินซีสูงขึ้น (Plateau effect) แต่อย่างไรก็ตามก็มีการรายงานว่าปลามีการสะสมวิตามินซีในตับเพิ่มขึ้นเมื่อได้รับวิตามินซีในอาหารที่ระดับสูงขึ้น ซึ่งพบใน parrot fish (Wang et al., 2003), Mediterranean sea bream (*Sparus aurata*) (Amerio et al., 2000) และในปลา Oscar (Fracalossi et al., 1998)

การรายงานถึงการประเมินระดับที่เหมาะสมของวิตามินซีในอาหารที่ปลา (Optimum level) ควรได้รับเพื่อให้ปลาดำรงชีวิตเป็นปกติ โดยการสร้างกราฟความสัมพันธ์ระหว่างระดับวิตามินซีที่ได้รับในอาหารและระดับวิตามินซีที่สะสมในตับ เพื่อประเมินปริมาณวิตามินที่เหมาะสมในอาหาร (Optimum level) ซึ่งก็คือปริมาณวิตามินซีในอาหารที่ต่ำที่สุดที่ปลาได้รับแล้วมีการสะสมวิตามินซีที่ตับที่สูงที่สูด ในการศึกษาครั้งนี้นอกจากปริมาณการสะสมวิตามินซีในปลาดุกลูกผสมจะมีค่าคงที่ในทุกกลุ่มทดลองแล้ว ในระหว่างการทดลองผู้วิจัยไม่พบอาการของการขาดวิตามินซี (สังเกตจากกระดูกสันหลังโค้งงอ) ในกลุ่มทดลองที่ปลาได้รับวิตามินซีที่ระดับ 250 mg/kg และอัตราการรอดของปลาแต่ละกลุ่มทดลองไม่แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ นอกจากนี้ค่าอัตราการเปลี่ยนอาหารเป็นเนื้อ (feed conversion ration) ยังมีค่าไม่แตกต่างกันในอาหารแต่ละกลุ่มทดลอง จึงน่าจะสรุปได้ว่า การเสริมอนุพันธ์วิตามินซี L-ascorbyl-2-phosphate ที่ 250 mg/kg น่าจะเป็นระดับที่เหมาะสมของการเสริมอนุพันธ์วิตามินซีในอาหารปลา (Optimum level) ซึ่งระดับดังกล่าวนี้สอดคล้องกับการแนะนำของบริษัทผู้ผลิต

แม้ว่าระดับการเสริมวิตาอนุพันธ์มินซีในอาหารที่ระดับ 250 mg/kg จะเป็นระดับที่เหมาะสมที่เสริมในอาหารแล้วส่งผลให้ปลาดุกลูกผสมไม่แสดงอาการอันเนื่องมาจากการได้รับ

วิตามินซีในอาหารไม่เพียงพอ แต่พบว่าที่ระยะเวลาการทดลอง 1 เดือน เมื่อเพิ่มปริมาณการเสริมอนุพันธ์วิตามินซีในอาหาร สามารถเพิ่มสมรรถนะการเจริญเติบโตของปลาดุกลูกผสมได้อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ จากการวิเคราะห์ trend analysis พบว่าผลการเพิ่มปริมาณอนุพันธ์วิตามินซีในอาหารต่อสมรรถนะการเจริญเติบโตซึ่งแสดงด้วยค่าอัตราการเจริญเติบโตจำเพาะและเปอร์เซ็นต์น้ำหนักเพิ่มซึ่งมีความสัมพันธ์กันในเชิงเส้นตรงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ และพบว่าการเสริมอนุพันธ์วิตามินซีที่ระดับ 1,000-1,500 mg/kg น่าจะเป็นระดับต่ำที่สุดที่ส่งผลให้ปลาดุกลูกผสมมีเปอร์เซนต์น้ำหนักเพิ่มและค่าอัตราการเจริญเติบโตจำเพาะสูงที่สุด เนื่องจากการเสริมอนุพันธ์วิตามินซีที่ระดับสูงกว่านี้ (2000 mg/kg)ไม่ได้ทำให้ผลของสมรรถนะการเจริญเติบโตดังกล่าวดีขึ้นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ผลการศึกษาครั้งนี้สอดคล้องกับรายงานการศึกษาในปลาดุกอัฟริกันที่พบว่าเมื่อเลี้ยงปลาด้วยอาหารที่เสริมวิตามินซีที่ระดับ 50 mg/kg น่าจะเป็นปริมาณที่เพียงพอที่ปลาจะไม่แสดงอาการขาดวิตามินซี และพบว่าถ้าเพิ่มปริมาณวิตามินซีที่เสริมในอาหารเป็น 1,500 mg/kg ปลาดุกอัฟริกันจะมีค่าสมรรถนะการเจริญเติบโตและการใช้ประโยชน์จากอาหารได้สูงที่สุด (Adewolu and Aro, 2009)

เมื่อทำการเก็บข้อมูลสมรรถนะการเจริญเติบโตของปลาดุกลูกผสมในเวลาต่อมา (สัปดาห์ที่ 5-8) พบว่าการเสริมอนุพันธ์วิตามินซีที่ระดับ 250 mg/kgน่าจะเป็นระดับที่เพียงพอต่อสมรรถนะการเจริญเติบโตที่สูงที่สุด เนื่องจากเมื่อปลาดุกลูกผสมได้รับอาหารที่มีการเสริมอนุพันธ์วิตามินซีที่ระดับสูงขึ้น สมรรถนะการเจริญเติบโตไม่ได้มีค่าเพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ที่เป็นเช่นนี้อาจจะอธิบายได้ว่า ความต้องการวิตามินซีของปลาจะแตกต่างกันขึ้นกับชนิดปลาและระยะการเจริญเติบโตของปลา (Merchie et al., 1996) อาจเป็นไปได้ว่าการเสริมอนุพันธ์วิตามินซีที่ระดับ 250 mg/kgเป็นระยะเวลานานทำให้เกิดการสะสมวิตามินซีอย่างต่อเนื่อง การเสริมที่ระดับนี้ระยะยาวจึงเพียงพอที่จะส่งผลให้ปลามีสมรรถนะการเจริญเติบโตสูงที่สุด

การศึกษาค่าทางโลหิตวิทยาเป็นอีกวิธีหนึ่งที่นิยมใช้ในการประเมินสุขภาพของปลา (Adhikari et al., 2004; Silveira-Coffigny et al., 2004; De Andrade et al., 2007) ในการวิจัยครั้งนี้พบว่าการเสริมอนุพันธ์วิตามินซีในอาหารมีผลต่อค่าทางโลหิตวิทยาของปลาดุกลูกผสมภายใต้สภาวะความเครียดอันเนื่องมาจากน้ำอุณหภูมิต่ำ ซึ่งพบว่าค่าฮีโมโกลบินมีค่าสูงขึ้นในปลาดุกลูกผสมที่ได้รับอาหารที่มีการเสริมอนุพันธ์วิตามินซีที่ระดับสูง โดยมีความสัมพันธ์แบบ quadratic และพบว่าค่าจำนวนเม็ดเลือดแดงมีค่าสูงขึ้นในปลาดุกลูกผสมที่ได้รับอาหารที่เสริมอนุพันธ์วิตามินสูงขึ้น และมีความสัมพันธ์กันในเชิงเส้นตรง ซึ่งผลของวิตามินซีต่อการเพิ่มขึ้นของฮีโมโกลบินและจำนวนเม็ดเลือดแดงนี้สอดคล้องกับการศึกษาในปลา piracucu (Arapaima gigas) ที่รายงานว่าวิตามินซีมีผลต่อการเพิ่มขึ้นของค่าฮีโมโกลบินและจำนวนเม็ดเลือดแดง (De Andrade et al., 2007) ผลดังกล่าวนี้อาจใช้รายงานการศึกษาของกลไกการดูดซึมธาตุเหล็กที่ได้มีการศึกษาในมนุษย์มา

อธิบายได้ว่า วิตามินซีเปลี่ยน ferric iron เป็น ferrous iron ซึ่งอยู่ในรูปแบบที่ละลายและดูดซึมผ่านผนังลำไส้เล็กได้ดี ทำให้ร่างกายสัตว์ดูดซึมธาตุเหล็กได้มากขึ้น ธาตุเหล็กเป็นสารที่สำคัญต่อการสร้างเม็ดเลือดแดงจึงทำให้จำนวนเม็ดเลือดแดงสูงขึ้น แม้ว่าจะไม่ได้มีการศึกษาถึงกลไกดังกล่าวในปลา แต่ก็มีรายงานถึงผลของการเสริมวิตามินซีร่วมกับธาตุเหล็กต่อการเพิ่มขึ้นของจำนวนเม็ดเลือดแดง ค่าเม็ดเลือดแดงอัดแน่น และค่าฮีโมโกลบินใน channel catfish (Lim et al., 2000) ผลของอนุพันธ์วิตามินซีต่อการเพิ่มขึ้นของเม็ดเลือดแดงน่าจะเป็นปัจจัยที่ช่วยปรับสมดุลของสุขภาพปลาเมื่อปลาอยู่ภายใต้สภาวะความเครียด เนื่องจากได้มีรายงานการศึกษาว่าเมื่อปลาอยู่ในสภาวะความเครียดหรือสภาวะที่สิ่งแวดล้อมทางน้ำไม่เหมาะสม มักจะมีอาการของโลหิตจาง เช่น ค่าเม็ดเลือดแดงและฮีโมโกลบินในปลาไนต่ำลงเมื่อปลาไนอยู่ในน้ำที่มีไนไตรต์สูง (Svobodova et al., 2005) และ Adhikari et al. (2004) พบว่าการปนเปื้อนของยาฆ่าแมลงในน้ำส่งผลทำให้ปลายี่สก (Labeo rohita) มีค่าเม็ดเลือดแดงและฮีโมโกลบินต่ำลง นอกจากนี้ยังมีรายงานวิจัยว่าปลานิลที่ได้ติดเชื้อแบคทีเรียมีค่าเม็ดเลือดแดง ค่าเม็ดเลือดแดงอัดแน่น และค่าฮีโมโกลบินต่ำลง โดยสภาพการเลี้ยงปลาในธรรมชาติแล้ว ปลามักจะพบกับสภาวะที่ก่อให้เกิดความเครียดได้พร้อมกัน ๆ ดังนั้นการเสริมวิตามินซีจึงน่าจะเป็นตัวช่วยรักษาสภาวะทางค่าโลหิตวิทยาไม่ให้แย่ลงเมื่อปลาเผชิญกับความเครียดหลายอย่างเกิดขึ้นพร้อมกันได้

ผลการศึกษาครั้งนี้ชี้ให้เห็นว่าผลของการเสริมอนุพันธ์วิตามินซีที่ระดับสูงในเวลาที่ยาวนานขึ้นไม่มีผลต่อค่าทางโลหิตวิทยา ดังนั้นจึงสามารถสรุปได้ว่าการเสริมอนุพันธ์วิตามินซีต่อการลดอันตรายจากสภาวะความเครียดในปลาดุกลูกผสม ในระยะสั้น (4 สัปดาห์) ควรใช้ปริมาณการเสริมที่สูง (1,500 mg/kg) และระยะยาวใช้ปริมาณการเสริมอนุพันธ์วิตามินซีที่ระดับต่ำสุด (250 mg/kg)

การทำงานของเซลล์ระบบภูมิคุ้มกันแบบไม่จำเพาะเจาะจง (cellular non-specific defense) เป็นระบบภูมิคุ้มกันที่มีความสำคัญในปลาซึ่งเกี่ยวข้องกับการทำลายเชื้อโรคและสิ่งแปลกปลอม การทำงานของเซลล์ระบบภูมิคุ้มกันที่สำคัญ ได้แก่การทำงานของเซลล์เม็ดเลือดขาว เม็ดเลือดขาวชนิด monocyte/macrophages มีบทบาทต่อการทำลายเชื้อโรคและสิ่งแปลกปลอม (Wedemeyer et al., 1996) แต่ถึงกระนั้นก็ยังพบว่าการลดลงของจำนวนเม็ดเลือด monocyte ในปลานิลที่ติดเชื้อ Enterococcus (Martins et al., 2009) ในการศึกษาครั้งนี้พบว่าการเปลี่ยนแปลงของจำนวนเม็ดเลือดขาว monocyte ในปลาดุกลูกผสมแต่ละกลุ่มทดลองภายใต้สภาวะน้ำอุณหภูมิต่ำ โดยพบว่าจำนวนเม็ดเลือดขาวชนิด monocyte ลดลงในกลุ่มปลาดุกลูกผสมที่ได้เลี้ยงด้วยอาหารที่เสริมอนุพันธ์วิตามินในระดับสูง ผลของวิตามินซีต่อเม็ดเลือดขาว monocyte มีการรายงานแตกต่างกัน เช่น รายงานการศึกษาในปลา Amazonian native fish (Brycon amazonicus) ซึ่งพบว่าการเสริมวิตามินซีในอาหารที่เพิ่มขึ้นไม่มีผลต่อการเพิ่มเม็ดเลือดขาว monocyte และยังพบว่าการเสริมสา

รกลูแคนซึ่งเป็นสารกระตุ้นภูมิคุ้มกันในปลาเรนโบว์เทร้าไม่มีผลต่อการเพิ่มจำนวนของเม็ดเลือดขาว monocyte ภายใต้สภาวะความเครียดอันเนื่องมาจากการขนส่ง (Volpatti et al., 1998)

เม็ดเลือดขาว lymphocytes มีบทบาทเกี่ยวข้องกับทั้งระบบภูมิคุ้มกันแบบไม่จำเพาะและระบบภูมิคุ้มกันแบบจำเพาะซึ่งทำหน้าที่เกี่ยวกับการสร้างแอนติบอดี และการลดลงของจำนวน lymphocytes มีผลต่อการลดลงของระบบภูมิคุ้มกัน (Wedemeyer et al., 1990; Martins et al., 2009) เม็ดเลือดขาว neutrophils เป็นเม็ดเลือดขาวชนิดที่มีแกรนูล และมีบทบาทสำคัญต่อระบบภูมิคุ้มกันแบบไม่จำเพาะ โดย neutrophils จะเคลื่อนที่ไปบริเวณที่ติดเชื้อและทำหน้าที่เป็น phagocyte เพื่อกำจัดเชื้อโรค (Wedemeyer et al., 1990) ในการทดสอบที่ 4 สัปดาห์ของการทดลอง ภายใต้สภาวะการลดต่ำลงของอุณหภูมิน้ำ การเพิ่มขึ้นของปริมาณการเสริมอนุพันธ์วิตามินซีในอาหารมีผลต่อการเพิ่มจำนวนเม็ดเลือดขาว lymphocytes ในเชิงความสัมพันธ์แบบ quadratic แต่การเพิ่มขึ้นของอนุพันธ์วิตามินซีมีผลต่อการลดลงของเม็ดเลือดขาว Neutrophil ซึ่งแตกต่างจากรายงานการศึกษาของในปลา Amazonian ซึ่งพบว่าการเสริมวิตามินซีในอาหารไม่มีผลต่อจำนวนเม็ดเลือดขาว Neutrophil (Affonso et al., 2007)

สัดส่วนจำนวนเม็ดเลือดขาว neutrophil ต่อ lymphocyte สามารถใช้เป็นดัชนีบ่งบอกถึงการตอบสนองต่อความเครียด ยกตัวอย่างเช่น รายงานการศึกษาพบว่าฮอร์โมนที่เกี่ยวข้องกับความเครียดส่งผลต่อการเพิ่มขึ้นของจำนวนเม็ดเลือดขาว neutrophil ในปลาไน (Balabanova et al., 2009) นอกจากนี้ยังมีรายงานการศึกษาของ Davis et al. (2008) อธิบายถึงจำนวนเม็ดเลือดขาวสามารถใช้เป็นตัวบ่งชี้สภาวะความเครียดในสัตว์มีกระดูกสันหลัง ความเครียดและระดับฮอร์โมน glucocorticoid มีผลต่อการเพิ่มขึ้นของ neutrophil และการลดลงของ lymphocyte ในกระแสเลือด (N:L ratio) หรือกล่าวอีกนัยหนึ่งว่าความเครียดส่งผลต่อค่า N:L ratio สูงขึ้น ผลการศึกษาครั้งนี้พบว่าที่ระยะเวลาการทดลอง 4 สัปดาห์ หรือภายใต้สภาวะความเครียดจากอุณหภูมิน้ำต่ำลงครั้งแรก การเพิ่มปริมาณการเสริมอนุพันธ์วิตามินซีมีผลต่อการลดลงของค่า N:L ratio ซึ่งอาจกล่าวได้ว่าการเสริมอนุพันธ์วิตามินซีที่ปริมาณสูงในอาหารสามารถบรรเทาสภาวะความเครียดในการเลี้ยงปลาดุกลูกผสมได้

ในระหว่างการเกิดกระบวนการ phagocytosis หรือเกิดการกระตุ้นกระบวนการ phagocytosis เม็ดเลือดขาว neutrophil และ monocyte จะผลิต superoxide anion และ hydrogen peroxide เพื่อทำลายเชื้อโรคหรือสิ่งแปลกปลอมที่เข้าสู่ร่างกาย การวัดค่า NBT spectrophotometer เป็นค่าหนึ่งที่แสดงถึงปริมาณอนุมูลอิสระที่เกิดขึ้นจากกิจกรรม respiratory burst activity และใช้การแสดงค่าทางอ้อมถึงกระบวนการ phagocytosis ได้มีรายงานการศึกษาพบว่าโปรไบโอติค levamisole และ กลูแคน มีผลต่อการเพิ่มขึ้นของค่า NBT ในปลานิล (Taoka et al., 2006) ปลาเรนโบว์เทร้า (Ispir and Yonar, 2007) และ ปลาดุกด้าน (C. batrachus) (Kumari and Sahoo, 2006)

ตามลำดับ ในการศึกษาครั้งนี้พบว่าภายใต้การทดสอบน้ำอุณหภูมิต่ำครั้งแรก การเพิ่มปริมาณการเสริมอนุพันธ์วิตามินซีในอาหารมีผลต่อการเพิ่มขึ้นของค่า NBT spectrophotometer อย่างมีนัยสำคัญ และยังพบผลของการเพิ่มปริมาณอนุพันธ์วิตามินซีต่อค่า NBT spectrophotometer ในการทดสอบอุณหภูมิน้ำครั้งที่ 2 เพียงเล็กน้อย ซึ่งผลการศึกษาครั้งนี้แสดงให้เห็นถึงศักยภาพของอนุพันธ์วิตามินซีต่อการเพิ่มขึ้นของกระบวนการทำลายเชื้อโรคในปลาดุกลูกผสมภายใต้สภาวะความเครียดอันเนื่องมากจากอุณหภูมิน้ำต่ำ

ในการศึกษาครั้งนี้พบว่าค่าปริมาณโปรตีนในเลือดมีค่าสูงสุดในปลาดุกลูกผสมที่เลี้ยงด้วยอาหารที่มีการเสริมอนุพันธ์วิตามินซีที่ระดับ 1000-1500 mg/kg ในปลาดุกลูกผสมที่ถูกทดสอบด้วยน้ำอุณหภูมิต่ำครั้งที่สอง ในการศึกษาอื่น ๆ ที่ผ่านมา ได้มีการรายงานผลของวิตามินซีต่อการเพิ่มขึ้นของปริมาณโปรตีนในเลือดในปลา piracucu (De Andrade et al., 2007) การเพิ่มขึ้นของปริมาณโปรตีนในเลือดอาจมาจากปริมาณสารน้ำที่เกี่ยวข้องกับระบบภูมิคุ้มกัน (humoral non-specific defense) ซึ่งได้แก่ ปริมาณของเอ็นไซม์ไลโซไซม์ คอมคลีเมนต์ และอิมมูโนโกลบูลิน ซึ่งสารโปรตีนในน้ำเลือดเหล่านี้มีบทบาทต่อการทำลายเชื้อโรคในกระแสเลือด ในการศึกษาครั้งนี้พบว่า ในสภาวะที่ปลาดุกลูกผสมถูกทดสอบอุณหภูมิน้ำเย็นครั้งที่สอง ปลาดุกลูกผสมที่ได้รับอาหารที่เสริมวิตามินซีที่ปริมาณสูงจะมีค่าไลโซไซม์สูงขึ้นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ และยังพบว่าค่าคอมพลีเมนต์ก็สูงขึ้นแม้ว่าจะไม่แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติก็ตาม ซึ่งสอดคล้องกับรายงานการศึกษาที่เคยไม้มีผู้แสดงให้เห็นว่าวิตามินซี (500 mg/kg) มีผลต่อการเพิ่มการทำงานของเอ็นไซม์ไลโซไซม์และคอมพลีเมนต์ในปลา yellow croaker (Ai et al., 2006) แม้กระทั่งรายงานการศึกษาในปลา sturgeon (Acipenser baerii) ซึ่งเป็นปลาที่มีความสามารถในการสร้างวิตามินซี ก็ยังพบว่าการเสริมวิตามินซีในอาหารส่งผลต่อการเพิ่มค่าการทำงานของเอ็นไซม์ไลโซไซม์ (Xie et al., 2006) นอกจากนี้ยังได้มีผู้รายงานว่าวิตามินซีมีผลต่อการเพิ่มการทำงานของคอมพลีเมนต์ (Chen et al., 2007; Ortuno et al., 2003) อย่างไรก็ตามก็มีรายงานการศึกษาที่ขัดแย้งกัน เช่น การศึกษาในปลา hybrid striped bass พบว่าการเพิ่มปริมาณการเสริมวิตามินซีในอาหารไม่มีผลต่อการเพิ่มการทำงานของเอ็นไซม์ไลโซไซม์ (Sealey and Gatlin, 2002a)

ภายใต้สภาวะการทดสอบอุณหภูมิน้ำต่ำครั้งที่สองนี้ ปลาดุกลูกผสมมีค่าปริมาณอิมมูโนโกลบูลินสูงขึ้นในกลุ่มทดลองที่ได้รับการเสริมอนุพันธ์วิตามินซีในระดับที่สูงขึ้น ผลครั้งนี้สอดคล้องกับรายงานของปลา matrinxa (B. amazonicus) (Affonso et al., 2007) อย่างไรก็ตามขัดแย้งกับรายงานการศึกษาของ Sealey และ Gatlin (2002a) ซึ่งไม่พบผลของเพิ่มปริมาณวิตามินซีในอาหารต่อการเพิ่มค่าอิมมูโนโกลบูลินในเลือด การเพิ่มขึ้นของปริมาณอิมมูโนโกลบูลินในการศึกษาครั้งสามารถอธิบายได้ว่า น่าจะเป็นผลมาจากการเพิ่มขึ้นของปริมาณเม็ดเลือดขาว lymphocyte ซึ่งเป็นเม็ดเลือดขาวที่เกี่ยวข้องกับการสร้างอิมมูโนโกลบูลิน

นอกจากนี้ยังมีการรายงานถึงผลของความเครียดจากอุณหภูมิน้ำต่อการลดลงของค่าไลโซไซม์และคอมพลีเมนต์ในปลานิล (Ndong et al., 2007) ความเครียดมีผลต่อฮอร์โมนคอร์ติซอลซึ่งน่าจะส่งผลต่อกระบวนการ gluconeogenesis ทำให้ค่าโปรตีนในน้ำเลือดลดลง (Demers and Bayne, 1997; Svobodova et al., 2006) ดังนั้นการเสริมวิตามินซีในอาหารที่ส่งผลต่อการเพิ่มค่าไลโซไซม์และคอมพลีเมนต์จึงน่าจะเป็นการช่วยเพิ่มภูมิต้านทานโรคให้กับปลาดุกลูกผสม โดยเฉพาะเมื่ออยู่ภายใต้สภาวะความเครียดของอุณหภูมิน้ำ

การทดลองที่ 3 ผลของการเสริมอนุพันธ์วิตามินอีในอาหารต่อค่าทางโลหิตวิทยาและภูมิต้านทานโรคแบบไม่จำเพาะเจาะจงในปลาดุกลูกผสมที่ถูกทดสอบด้วยสภาวะน้ำอุณหภูมิต่ำ

ในการศึกษาครั้งนี้พบว่าการเสริมอนุพันธ์วิตามินในอาหารไม่มีผลต่อการเพิ่มค่าอัตราการรอดของปลาดุกลูกผสมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ผลของการอนุพันธ์วิตามินอีต่อการเพิ่มค่าอัตราการรอดของปลาได้มีการรายงานไว้แตกต่างกัน ได้มีรายงานการวิจัยจำนวนหนึ่งแสดงว่าวิตามินอีไม่ให้ผลที่เด่นชัดต่อการเพิ่มอัตราการรอดของปลา piracucu ที่ทดลองในสภาวะการเลี้ยงในกระชัง (de Menezes et al., 2006) ปลา turbot และ Halibut (Tocher et al., 2002) ปลา gilthead seabream (Montero et al., 2001) และปลา rohu (Sau et al., 2004) อย่างไรก็ตามมีการรายงานว่าการเพิ่มการเสริมวิตามินมีผลต่อการเพิ่มอัตราการรอดของปลาเรนโบว์เทร้า (Pearce et al., 2003) ปลา sea bream (Tocher et al., 2002) และปลา gilthead seabream ในสภาวะความเครียด (Montero et al., 2001)

ในการศึกษานี้พบว่าการเสริมอนุพันธ์วิตามินอีในอาหารไม่มีผลต่อการเพิ่มสมรรถนะการเจริญเติบโตอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ผลการศึกษาครั้งนี้เป็นในทางเดียวกับที่ได้มีการรายงานไว้ในผลการวิจัยในปลา ของ turbot และ Halibut (Tocher et al., 2002) และปลา gilthead seabream (Montero et al., 2001) ในทางตรงกันข้ามได้มีรายงานการวิจัยที่แสดงให้เห็นว่าวิตามินอีมีผลต่อการเพิ่มสมรรถนะการเจริญเติบโตใน ปลาเรนโบว์เทร้า, sea bream, piracucu และ rohu (Tocher et al., 2002; Pearce et al., 2003; Sau et al., 2004; de Menezes et al., 2006) นอกจากนี้การศึกษาครั้งนี้พบว่าการเพิ่มการเสริมอนุพันธ์วิตามินอีในอาหารทดลองไม่มีผลต่อค่าอัตราการเปลี่ยนอาหารเป็นเนื้อ (FCR) แต่การศึกษาในปลา rohu พบว่าวิตามินอีมีผลต่อการลดค่า FCR (Sau et al., 2004)

จากผลการศึกษาครั้งนี้และจากผลการศึกษาที่ได้มีผู้อื่นรายงานไว้นั้น จะเห็นได้ว่าการเสริมวิตามินอีในอาหารทดลองมีผลต่ออัตราการรอด สมรรถนะการเจริญเติบโต และอัตราการเปลี่ยนอาหารเป็นเนื้อนั้นมีความหลากหลาย ความแตกต่างของผลของการเสริมวิตามินอีในปลา

ชนิดต่าง ๆ อาจเนื่องมาจากชนิดปลาที่ทดลอง ระยะการเจริญเติบโตของปลาที่ใช้ทดลอง และสภาวะการเลี้ยงที่ใช้ทดลอง

ในการศึกษาผลของวิตามินอีต่อค่าทางโลหิตวิทยาครั้งนี้ไม่พบความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติอันเป็นผลเนื่องมาจากระดับวิตามินอี ซึ่งสอดคล้องกับรายงานการวิจัยในปลา gilthead seabream (Montero et al., 2001) แต่ได้มีการรายงานถึงผลของวิตามินอีต่อการเปลี่ยนแปลงของค่าทางโลหิตวิทยาในปลา piracucu ปลา hybrid striped bass และ ปลา Piaractus mesopotamicus (de Menezes et al., 2006; Andrade et al., 2007; Garcia et al., 2007; Sealey et al., 2002a)

ค่าทางโลหิตวิทยาสามารถเป็นนำมาใช้ในการบ่งชี้ต่อการตอบสนองต่อความเครียดของสัตว์ ในการศึกษาครั้งนี้พบว่า ภายใต้สภาวะที่ปลาดุกลูกผสมถูกทดสอบด้วยน้ำอุณหภูมิต่ำนั้น ปลาดุกลูกผสมที่ได้รับวิตามินอีปริมาณสูงมีค่าเม็ดเลือดแดงอัดแน่นสูงขึ้น แสดงถึงภาวะ hemoconcentration ซึ่งได้มีการรายงานถึงสภาวะ hemoconcentration ในปลา gilthead seabream ที่เลี้ยงด้วยอาหารที่ไม่มีการเสริมวิตามินอี และถูกทดสอบด้วยสภาวะความเครียด (Montero et al., 2001) นอกจากนี้ยังมีรายงานการศึกษาว่าสภาวะความเครียดทำให้ค่าเม็ดเลือดแดงอัดแน่นของปลาบางชนิดสูงขึ้น เช่นการศึกษาในปลา Brycon cephalus (Urbinati et al., 2004) และปลา sunshine bass (Davis, 2004) และได้มีการวิจัยพบว่าสภาพน้ำอุณหภูมิต่ำทำให้ค่าเม็ดเลือดแดงอัดแน่นสูงขึ้นในปลา B. amazonicus (Inoue et al., 2008) และปลา Brook char (Diouf et al., 2000) แม้ว่าสภาวะความเครียดที่ส่งผลต่อค่าโลหิตวิทยาจะยังมีการอธิบายไว้มากนักในปลา แต่ได้มีรายงานการศึกษาถึงผลของความเครียดต่อค่าทางโลหิตวิทยาในคน (Allen and Patterson, 1995) สภาวะความเครียดทำให้เกิด hemoconcentration การเกิด hemoconcentration อาจเกิดได้จากหลายสาเหตุ เช่น hemoconcentration อาจเกิดจากการที่ของเหลวจากพลาสมาเคลื่อนที่เข้าสู่เม็ดเลือดแดง ทำให้เม็ดเลือดแดงเพิ่มปริมาตรสูงขึ้น และ hemoconcentration เกิดจากจำนวนเม็ดเลือดแดงที่เพิ่มขึ้นเนื่องมากจากอวัยวะที่สร้างเม็ดเลือดแดงมีการผลิตเม็ดแดงมากขึ้น นอกจากนี้ยังได้มีรายงานการศึกษาว่าฮอร์โมนที่เกี่ยวข้องกับความเครียดมีผลต่อการเพิ่มขนาดของเม็ดเลือดแดง (Niminma and Huestis, 1984) ในการศึกษาครั้งนี้การเพิ่มขึ้นของค่าเม็ดเลือดแดงอัดแน่นแต่ค่าฮีโมโกลบินไม่เปลี่ยนแปลงนั้นน่าจะเป็นผลมาจากการเพิ่มขนาดของเม็ดเลือดแดง ซึ่งภาวะ hemoconcentration พบในกลุ่มทดลองที่ได้รับอนุพันธ์วิตามินอีในอาหารสูง แสดงให้เห็นว่าการเสริมอนุพันธ์วิตามินอีที่ปริมาณสูงส่งผลเสียต่อปลาดุกลูกผสม โดยเฉพาะอย่างยิ่งในปลาดุกลูกผสมที่อยู่ใต้สภาวะความเครียดจากน้ำอุณหภูมิต่ำ

เม็ดเลือดขาวเป็นเซลล์ที่ทำหน้าที่สำคัญต่อกระบวนการภูมิคุ้มกันปลา ในการศึกษาครั้งนี้พบผลของการเสริมอนุพันธ์วิตามินอีในอาหารต่อการเปลี่ยนแปลงของสัดส่วนเม็ดเลือดขาว

เมื่อเปรียบเทียบกับปลาดุกลูกผสมกลุ่มที่ไม่ได้รับอนุพันธ์วิตามินอีในอาหาร ได้มีการรายงานการศึกษาถึงผลของวิตามินอีต่อการเปลี่ยนแปลงสัดส่วนของเม็ดเลือดขาว เช่น การศึกษาในปลา gilthead seabream และ P. mesopotamicus พบว่าวิตามินอีไม่มีผลต่อการเปลี่ยนแปลงของสัดส่วนเม็ดเลือดขาว neutrophil และ monocyte (Montero et al., 2001; Garcia et al., 2007) แต่มีการรายงานว่าวิตามินอีมีผลต่อการลดจำนวนเม็ดเลือดขาว lymphocyte ในปลา piracucu (de Menezes et al., 2006)

ได้มีรายงานการวิจัยพบว่าอุณหภูมิน้ำมีผลต่อการเปลี่ยนแปลงชนิดและปริมาณของกรดไขมันใน lymphocyte plasma membrane (Bly et al., 1986; 1990) ในการศึกษาครั้งนี้พบว่าการทดสอบอุณหภูมิน้ำมีผลต่อการเปลี่ยนแปลงจำนวนเม็ดเลือดขาวโดยเฉพาะปลาดุกลูกผสมที่เลี้ยงด้วยอาหารที่ไม่ได้มีการเสริมอนุพันธ์วิตามินอี พบการลดลงของจำนวนเม็ดเลือดขาว lymphocyte และการเพิ่มขึ้นของเม็ดเลือด neutrophil และ monocyte ได้มีการรายงานถึงผลของวิตามินอีต่อการเปลี่ยนแปลงของเม็ดเลือดขาวในปลา P. mesopotamicus ในสภาวะที่ติดเชื้อ ถึงแม้ว่าสภาพการเปลี่ยนแปลงจะแตกต่างกับผลการศึกษาที่พบในครั้งนี้ (Garcia et al., 2007)

นอกจากการศึกษาการเปลี่ยนแปลงเม็ดเลือดขาวจะใช้เป็นตัวบ่งชี้ถึงสภาวะภูมิคุ้มกันในปลาแล้ว สัดส่วนของเม็ดเลือดขาว neutrophil ต่อ lymphocyte (N:L ratio) ยังได้นำมาใช้ในการแสดงถึงการตอบสนองต่อสภาวะความเครียดและฮอร์โมนกลูโคคอร์ติตอยด์ของสัตว์มีกระดูกสันหลัง (Davis et al., 2008) ในการศึกษาครั้งนี้ภายใต้สภาวะที่ปลาดุกลูกผสมถูกทดสอบด้วยอุณหภูมิน้ำต่ำนั้น พบว่าปลาดุกลูกผสมที่ได้รับการเสริมอนุพันธ์วิตามินอีจะมีค่า N:L ratio ลดลงเมื่อเปรียบเทียบกับปลาดุกลูกผสมที่ไม่ได้รับการเสริมอนุพันธ์วิตามินอีในอาหาร ดังนั้นผลการศึกษานี้สามารถสรุปได้ว่าการเสริมอนุพันธ์วิตามินอีในอาหารปลาดุกลูกผสมเป็นสิ่งที่จำเป็นแต่การเสริมในปริมาณต่ำ (125 mg/kg) ก็น่าจะเพียงพอต่อการรักษาสุขภาพปลาภายใต้สภาวะความเครียด

ในการทดลองครั้งนี้ไม่พบผลของการเสริมอนุพันธ์วิตามินอีต่อค่ากิจกรรมของเอ็นไซม์ไลโซไซม์อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ซึ่งผลการศึกษาครั้งนี้สอดคล้องกับรายงานการศึกษาในปลา hybrid striped bass (Sealey and Gatlin, 2002a) นอกจากนี้ได้มีรายงานการศึกษาถึงผลของอุณหภูมิน้ำต่อค่าไลโซไซม์ในซีรัมปลา เช่น มีการรายงานว่าปลานิลที่ถูกทดสอบด้วยน้ำเย็นมีค่าไลโซไซม์ต่ำลง ในทางตรงกันข้ามเมื่อปลานิลถูกทดสอบด้วยอุณหภูมิน้ำสูงขึ้นจะมีค่าไลโซไซม์สูงขึ้น (Ndong et al., 2007) ในการทดลองนี้พบว่าอุณหภูมิน้ำที่ต่ำลงมีผลต่อการเปลี่ยนแปลงของค่าไลโซไซม์เช่นเดียวกัน โดยเฉพาะอย่างยิ่งในกลุ่มปลาดุกลูกผสมที่ไม่ได้รับอนุพันธ์วิตามินอี และพบว่าการเสริมอนุพันธ์วิตามินอีทุกระดับมีผลต่อการลดการเปลี่ยนแปลงของไลโซไซม์ในปลาดุกลูกผสมที่ถูกทดสอบด้วยอุณหภูมิน้ำเย็น หรือกล่าวอีกนัยหนึ่งว่าการเสริมอนุพันธ์วิตามินอีที่

ระดับต่ำสุดก็สามารถเพิ่มระดับไลโซไซม์ในสภาวะที่ปลาดุกลูกผสมเกิดความเครียดจากน้ำอุณหภูมิต่ำ อย่างไรก็ตามได้มีรายงานที่ขัดแย้งกับการศึกษาครั้งนี้ในปลา gilthead seabream โดยพบว่าวิตามินอีไม่มีผลต่อการเพิ่มค่าไลโซไซม์ในสภาวะที่ปลาอยู่ในความเครียดอันเนื่องมาจากความหนาแน่นสูง

ในการศึกษาครั้งนี้พบว่าการเสริมอนุพันธ์วิตามินไม่มีผลต่อความแตกต่างของโปรตีนในเลือดอย่างมีนัยสำคัญ รายงานการวิจัยถึงผลของวิตามินอีต่อค่าโปรตีนในเลือดมีความหลากหลายขึ้นกับสภาวะการทดลอง เช่น การทดลองในปลา piracucu พบว่าการเสริมวิตามินอีในอาหารมีผลต่อการเพิ่มค่าโปรตีนในเลือดในสภาวะการเลี้ยงในบ่อ แต่ไม่มีผลต่อการเพิ่มของโปรตีนในเลือดในการทดลองในกระชัง (de Menezes et al., 2006; de Andrade et al., 2007) และได้มีรายงานวิจัยในปลา hybrid striped bass และ gilthead seabream พบว่าการเสริมวิตามินอีไม่มีผลต่อค่าโปรตีนในเลือด (Montero et al., 2001; Sealey and Gatlin, 2002a) สำหรับผลของความเครียดต่อค่าโปรตีนในเลือดนั้น มีการศึกษาไม่มากนัก และผลก็ไม่เป็นไปในทางเดียวกัน เช่น การรายงานว่าความเครียดมีผลทำให้ค่าโปรตีนในเลือดสูงขึ้น (Montero et al., 2001) และต่ำลง (Svobodova et al., 2006) สำหรับในการศึกษาครั้งนี้ก็ไม่พบผลของการทดสอบอุณหภูมิน้ำต่อค่าโปรตีนในน้ำเลือดในทุกกลุ่มทดลองของปลาดุกลูกผสม

รายงานการศึกษาอื่น ๆ ที่ผ่านมาพบว่าวิตามินอีไม่มีผลต่อค่าอิมมูโนโกลบูลิน นอกจากนี้ยังไม่พบผลของสภาวะความเครียดอันเนื่องมากจากความหนาแน่นสูงต่อค่าอิมมูโนโกลบูลิน (Montero et al., 1999; Sealey and Gatlin, 2002a) อย่างไรก็ตามผลการวิจัยครั้งนี้พบว่าการสริมอนุพันธ์วิตามินอีมีผลต่อการเพิ่มค่าอิมมูโนโกลบูลินของปลาดุกลูกผสมภายใต้สภาวะความเครียดจากอุณหภูมิน้ำต่ำ ดังนั้นจึงสามารถสรุปได้ว่าการเสริมอนุพันธ์วิตามินอีที่ระดับต่ำที่สุด (125 mg/kg) เพียงพอต่อการเพิ่มภูมิต้านทานโรคของปลาดุกลูกผสมภายใต้สภาวะความเครียด

บทที่ 4
บทสรุป

สรุปผลการวิจัย

1. การเปลี่ยนแปลงอุณหภูมิน้ำมีผลต่อการเปลี่ยนแปลงของค่าทางโลหิตวิทยาอย่างมีนัยสำคัญในช่วงแรกและช่วงท้ายของการเปลี่ยนแปลงอุณหภูมิน้ำ
2. การเปลี่ยนแปลงอุณหภูมิน้ำมีผลต่อค่า lipid peroxidation ที่ตับและไตของปลาดุกลูกผสม ซึ่งพบว่าถ้าอุณหภูมิน้ำสูงขึ้นปลาดุกลูกผสมจะมีค่า lipid peroxidation ที่ตับและไตสูงขึ้น
3. การเพิ่มปริมาณอนุพันธ์วิตามินซีที่เสริมในอาหารไม่มีผลต่อการเพิ่มการสะสมอนุพันธ์วิตามินที่ตับของปลาดุกลูกผสม หรือกล่าวได้ว่า มีการสะสมอนุพันธ์วิตามินซีที่ตับคงที่ในปลาดุกลูกผสมทุกกลุ่มทดลอง
4. การเสริมอนุพันธ์วิตามินซีในอาหารที่ระดับ 250 mg/kgในอาหารเป็นระดับที่เพียงพอต่อการเจริญเติบโตที่เป็นปกติของปลาดุกลูกผสม
5. การเลี้ยงปลาดุกลูกผสมที่ระยะประมาณ 15 กรัม การเสริมอนุพันธ์วิตามินซีในอาหารในระดับที่สูงขึ้นส่งผลต่อการเจริญเติบโตของปลาดุกลูกผสมที่เพิ่มขึ้น โดยมีความสัมพันธ์กันในเชิงเส้นตรง และการเสริมอนุพันธ์วิตามินซีที่ระดับ 1,000-1,500 mg/kg เป็นระยะเวลา 1 เดือนทำให้ปลาดุกลูกผสมมีอัตราการเจริญเติบโตสูงที่สุด
6. การเพิ่มการเสริมอนุพันธ์วิตามินซีในอาหาร ในระดับที่สูงขึ้นไม่มีผลต่อการเร่งอัตราการเจริญเติบโตของปลาดุกลูกผสม ในระยะการเลี้ยงเดือนที่ 2 ดังนั้นในระยะการเลี้ยงเดือนที่ 2 การเสริมอนุพันธ์วิตามินซีที่ระดับ 250 mg/kgเพียงพอต่อการเร่งการเจริญเติบโตของปลาดุกลูกผสม
7. อัตราการเปลี่ยนอาหารเนื้อและอัตราการรอดไม่แตกต่างกันในแต่ละกลุ่มทดลองของปลาดุกลูกผสมที่ได้รับการการเสริมอนุพันธ์วิตามินซีที่แตกต่างกันในสูตรอาหาร
8. การเสริมอนุพันธ์วิตามินซีที่ระดับ 1,000-1,500 mg/kgในอาหารมีผลต่อการรักษาสุขภาพช่วยเพิ่มภูมิคุ้มกันโรคให้กับปลาดุกลูกผสมในสภาวะความเครียดอันเนื่องมาจากน้ำอุณหภูมิต่ำ
9. การเสริมอนุพันธ์วิตามินอีในอาหารไม่ส่งผลต่อการเพิ่มสมรรถนะการเจริญเติบโต ประสิทธิภาพการใช้อาหารและอัตราการรอดในปลาดุกลูกผสม
10. การเสริมอนุพันธ์วิตามินอีที่ระดับต่ำสุด 125 mg/kg ในอาหารก็เพียงพอต่อการรักษาสุขภาพและช่วยเพิ่มภูมิคุ้มกันโรคให้กับปลาดุกลูกผสมในสภาวะความเครียดอัน

เนื่องมาจากน้ำอุณหภูมิต่ำ แต่การเสริมอนุพันธ์วิตามินอีที่ระดับสูง (500 mg/kg) ส่งผลเสียต่อค่าทางโลหิตวิทยาของปลาดุกลูกผสม

ข้อเสนอแนะ

จากผลการศึกษาครั้งนี้จะเห็นว่าการเสริมวิตามินซีที่ระดับ 1,000-1,500 mg/kgหรือการเสริมอนุพันธ์วิตามินอีที่ระดับ 125 mg/kg ในอาหารส่งผลดีต่อปลาดุกลูกผสมในสภาวะความเครียดอันเนื่องมาจากอุณหภูมิน้ำต่ำ อย่างไรก็ตามการศึกษาครั้งนี้เป็นการศึกษาในตู้ทดลองซึ่งเป็นสภาพการเลี้ยงที่ปลาดุกลูกผสมได้รับวิตามินจากอาหารทดลองเท่านั้น เพราะในตู้เลี้ยงปลาไม่มีอาหารธรรมชาติ ในการเลี้ยงในบ่อดินซึ่งมีอาหารธรรมชาติที่สมบูรณ์ ระดับการเสริมอนุพันธ์วิตามินซีหรือวิตามินอีในอาหารอาจจะลดลงกว่าระดับที่รายงานไว้ในการศึกษาครั้งนี้ เพราะปลาดุกลูกผสมที่เลี้ยงในบ่อที่มีอาหารธรรมชาติจะได้รับวิตามินจากอาหารธรรมชาติด้วย ซึ่งควรมีการศึกษาเพิ่มเติมในบ่อดินต่อไป

เนื่องจากวิตามินซีและวิตามินอีมีผลต่อการบรรเทาความเครียดในปลา ดังนั้นควรมีการศึกษาถึงระดับการเสริมร่วมกันของวิตามินซีและวิตามินอี เพราะการทำงานร่วมกันของวิตามินทั้งสองชนิดอาจส่งผลดีต่อสุขภาพของปลาดุกลูกผสมยิ่งขึ้น

เนื่องจากในสภาพการเลี้ยงจริงในธรรมชาติ ปลาดุกลูกผสมมักจะประสบกับสภาวะความเครียด หรือการเปลี่ยนแปลงของคุณภาพน้ำหลายปัจจัยร่วมกัน จึงควรมีการศึกษาถึงการทดสอบสภาวะความเครียดอื่น ๆ ร่วมกับการทดสอบสภาวะความเครียดอันเนื่องมาจากอุณหภูมิน้ำอย่างเดียว โดยเฉพาะอย่างยิ่งสภาวะความเครียดอันเนื่องมาจากน้ำอุณหภูมิต่ำร่วมกับพีเอชที่ต่ำ เพราะมักจะเกิดร่วมกันในสภาวะที่ฝนตกติดต่อกัน

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

บรรณานุกรม

กลุ่มวิเคราะห์การค้าสินค้าประมงระหว่างประเทศ กองประมงต่างประเทศ กรมประมง. ได้จาก http://www.fisheries.go.th/it-stat/

ถาวร ทันใจ. (2551). การเจริญเติบโตของปลาดุกลูกผสมภายใต้สภาพการควบคุมอุณหภูมิและการเลี้ยงในสภาพแวดล้อมปกติ. การประชุมวิชาการประมง. 40-53

เยาวนิตย์ ดนยดล และ จีรนันท์ อุไรประสิทธิ์. (2544). ผลการเปลี่ยนแปลงอุณหภูมิต่อการตอบสนองระบบภูมิคุ้มกันปลากะรังและปลากระพงขาว. เอกสารวิชาการฉบับที่ 1/2544. สถาบันวิจัยการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำชายฝั่ง, กรมประมง.

สิทธิชัย ตันธนะสฤษดิ์. (2549). ความรู้เบื้องต้นเกี่ยวกับคุณภาพน้ำ. ภาควิชาอนุรักษ์วิทยา คณะวนศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

Adewolu, M.A., Aro, O.O. (2009). Growth, feed utilization and haematology of Clarias gariepinus (Burchell, 1822) fingerlings fed diets containing different levels if vitamin C. American Journal of Applied Sciences 6:1675-1681.

Adhikari, S., Sarkar, B., Chatterjee, A., Mahapatra, C.T., Ayyappan, S. (2004). Effects of cypermethrin and carbofuran on certain hematological parameters and prediction of their recovery in a freshwater teleost, Labeo rohita (Hamilton). Ecotoxicol. Environm. Safety 58:220-226.

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. 147:383-8.

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 261:327-36.

Allen, M.T., Patterson, S.M. (1995). Hemoconcentration and stress: a review of physiological mechanisms and relevance for cardiovascular disease risk. Biol. Psychol. 41:1-27.

Amerio, M., Vignali, C., Italia, A., Gabaudan, J. (2000). Blood and liver concentration of ascorbic acid in Sparus aurata fed Rovimix Stay C-25. J. Appl. Ichthyol. 16:273-275.

Anbarasu, K., Chandran, M.R. (2001). Effects of ascorbic acid on the immune response of the catfish, Mystus gulio (Hamilton), to different bacterins of Ameromonas hydrophila. Fish and Shellfish Immunology. 11: 347–355.

AOAC. Official method of analysis 16 th ed, Association of Offiicial Analytical Chemists, Maryland; 1997.

Azzi A., Stocker A. (2000). Vitamin E: non-oxidant roles. Progress in Lipid Research 39: 231-255.

Balabanova, L.V., Mikryakov, D.V., Mikryakov, V.R. (2009). Response of common carp (Cyprinus carpio L.) leucocytes to hormone-induced stress. Inland Water Biol. 2: 86-88.

Ball, G.F.M. (1994). Water-solutble vitamin assays in human nutrition. Chapman&Hall. pp. 10-98.

Boyd, C.E., Tucker, C.S. (1998). Pond Aquaculture Water Quality Management. Kluwes Academic Publishers, Boston. pp. 90-93.

Bly, J.E., Buttke, T.M., Meydrech, E.F., Clem, L.W. (1986). The effects of in vivo ac climation temperature on the fatty acid composition of channel catfish (Ictalurus punctatus) peripheral blood cells. Comp. Biochem. Physiol. 83:791-795.

Bly, J.E., Buttke, T.M., Clem, L.W. (1990) Differential effects of temperature and exogenous fatty acids on mitogen-induced proliferation in channel catfish T and B lymphocytes. Comp. Biochem. Physiol. 95: 417-424.

Chen, R., Lochmann, R., Goodwin, A., Praveen, K., Dabrowski, K., 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.

Chen, W-H., Sun, L-T., Tsai, C-L., Song, Y-L., Chang, C-F. (2002). Cold-stress induced the modulation of catecholamines, cortisol, immunoglobulin M, and leukocyte phagocytosis in tilapia. Gen. Comp. Endocr. 126: 90-100.

Chen, R., Lochmann, R., Goodwin, A., Praveen, K., Dabrowski, K., Lee, K-J. (2003). Alternative complement activity and resistance to heat stess in golden shiners (Notemigonus crysoleucas) are increased by dietary vitamin C levels in excess of requirements for prevention of deficiency signs. J. Nutr. 2281-2286.

Chen R., Lochmann R., Goodwin A., Praveen K., Dabrowski K., Lee K. (2007). Alternative complement activity and resistance to heat stress in golden shiners (Notemigonus crysoleucas) are increased by dietary vitamin C levels in excess of requirements for prevention of deficiency signs. J Nutr 2281-6.

Close, D.C., Hagerman, A.E. (2006). Chemistry of reactive oxygen species and antioxidants, Chapter 1 pp1-8 In: Oxidative Stress, Exercise and Aging (HE Alessio and AE Hagerman Eds), Imperial College Press, London.

Collazos, M.E., Ortega, E. and Barriga, C. 1994. Effect of temperature on the immune system of a cyprinid fish (Tinca tinca, L.). Blood phagocyte function at low temperature. Fish Shellfish Immunol. 4 :231–238.

Cuesta A., Esteban M.A., Ortuno J., Meseguer J. (2001). Vitamin E increases natural cytotoxic activity in seabream (Sparus aurata L.). Fish Shellfish Immunol. 11:293-302.

Cuesta A, Esteban M.A.,Meseguer J. (2002). Natural cytotoxic activity in seabream (Sparus aurata L.) and its modulation by vitamin C. Fish Shellfish Immunol. 13: 97-109.

Das, T., Pal, A.K., Chakraborty, S.K., Manush, S.M., Sahu, N.P., Mukherjee, S.C. (2005). Thermal tolerance, growth and oxygen consumption of Labeo rohita fry (Hamilton, 1822) acclimated to four temperatures. J. Therm. Biol. 30: 378-383.

Davis, K.B. (2004). Temperature affects physiological stress responses to acute confinement in sunshine bass (Morone chrysops x Morone saxatilis). Comp. Biochem. Physiol. 139: 433-440.

Davis, A.K., Maney, D.L., Maerz, J.C. (2008). The use of leukocyte profiles to measure stress in vertebrates: a review for ecologists. Functional Ecol. 22: 760-772.

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., 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 Pedro, N., Guijarro, A.I., Lopez-Patino, M.A., Martinez-Alvarez, R., Delgado, M.J. (2005). Daily and seasonal variations in haematological and blood biochemical parameters in the tench, Tinca tinca Linnaeus, 1758. Aquaculture Res. 36: 1185-1196.

Demers, N.E., Bayne, C.J. (1997). The immediate effects fo stress on hormone and plasma lysozyme in rainbow trout. Dev. Comp. Immunol. 21: 363-373.

Dexiang, C., Ainsworth, J. 1991. Effect of temperature on the immune system of channel catfish (Ictalurus punctatus)—II. Adaptation of anterior kidney phagocytes to 10°C. Comp. Biochem. Physiol. 100A:913–918.

Diouf, B., Rioux, P., Blier, P.U., Rajotte, D. (2000). Use of Brook Char (Salvelinus fontinalis) physiological responses to stress as a teaching exercise. Adv. Physiol. Ed. 23: 18-23.

Dominguez, M., Takemura, A., Tsuchiya, M. (2005). Effects of changes in environmental factors in the non-specific immune response of Nile tilapia, Oreochromis niloticus L. Aquaculture Res. 36: 391-397.

EL-Alwary, M.F.S., EL-Shobaki, F.A., 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. Br. J. Nutr. 33: 351-355.

EL Naggar, G.O., Lovell, R.T. (1991). L-ascorbyl-2-monophosphate has equal antiscorbutic activity as L-ascorbic acid but L-ascorbyl-2-sulfate is inferior to L-ascorbic acid for channel catfish. J. Nutr. 1622-1626.

Farombi, E.O., Ajimoko, Y.R., Adelowo, O.A. (2008). Effect of Butachlor on Antioxidant Enzyme Status and Lipid Peroxidation in Fresh Water African Catfish, (Clarias gariepinus). Int. J. Environ. Res. Public Health. 5:423-427.

Fedoruk, A.N. (1981). A management perspective on stress and infectious diseases in Clarias farming. National Inland Fisheries Institute (THA/75/012/WP10), Thailand. 10 pp.

Fournier, V., Gouillou-Coustans, M.F., Kaushik, S.J. (2000). Hepatic ascorbic acid saturation is the most stringent response criterion for determining the vitamin C requirement of juvenile European sea bass (Dicentrarchus labrax). J. Nutr. 617-620.

Fracalossi, D.M., Allen, M.E., Nichols, D.K., Oftedal, O.T. (1998). Oscars, Astronotus ocellatus, Have a dietary requirement for vitamin C. J. Nutr. 1745-1751.

Frei, B.B., 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., Fuchs, J. eds. 132-149.

George S, Riley C, McEvoy J and Wright J. (2000). Development of a fish in vitro cell culture model to investigate oxidative stress and its modulation by dietary vitamin E. Mar. Environ. Res. 50:541-544.

Heise, K., Puntarulo, S., Nikinmaa, M., Abele, D., Portner, H-O. (2006). Oxidative stress during stressful heat exposure and recovery in the North sea eelpout Zoarces viviparous L. The Journal of Experimental Biology 209:353-363.

Holland, M.C.H., Lambris, J.D. (2002). The complement system in teleosts. Fish Shellfish Immunol. 12, 399-420.

Inoue, L.A.K.A., Moraes, G., Iwama, G.K., Affonso, L.O.B. (2008). Physiological stress responses in the warm-water fish matrinxa (Brycon amazonicus) subjected to a sudden cold shock. Acta. Amazonica 38: 603-610.

Ispir U., Yonar M.E. (2007). Effects of levamisole on phagocytic activity of rainbow trout (Oncorhynchus mykiss W.) ACTA Vet Brno 76:493-7.

Jos, A., Pichardo, S.,Prieto, A.I., Repetto, G., Vázquez, C.M., Moreno, M., Cameán, A.M. 2005. Toxic cyanobacterial cells containing microcystins induce oxidative stress in exposed tilapia fish (Oreochromis sp.) under laboratory conditions, Aquat. Toxicol. 72:261–271.

Kaur, M., Atif, F., Ali, M., Rehman, H., Raisuddin, S. (2005). Heat stress-induced alterations of antioxidants in the freshwater fish Channa punctata Bloch. J. Fish. Biol. 67: 1653-1665.

Kohen, R., Nyska, A. (2002). Oxidation of Biological Systems: Oxidative Stress Phenomena, Antioxidants, Redox Reactions, and Methods for Their Quantification. Toxicol. Pathol. 30:620-650.

Kruse, H., Sorum, H. (1994). Transfer of multiple drug resistance plasmids between bacteria of diverse origins in natural microenvironments. Applied Environmental Microbiology. 60: 4015-4021.

Kumari, J., Sahoo, P.K. (2006). Dietary β-1,3 glucan potentiates innate immunity and disease resistance of Asian catfish, Clarias batrachus (L.). J. Fish Dis. 29:95-101.

Kumari, J., Sahoo, P.K., Swain, T., Sahoo, S.K., Sahu, A.K., Mohanty, B.R. (2006). Seasonal variation in the innate immune parameters of the Asian catfish Clarias batrachus. Aquaculture 252:121-127.

Langston, A.L., Hoare, R., Stefansson, M., Fitzgerald, R., Wergeland, H., Mulcahy, M. (2002). The effect of temperature on non-specific defense parameters of three strains of

juvenile Atlantic halibut (Hippoglossus hippoglossus L.). Fish Shellfish Immunol. 12:61-76.

Le Morvan, C., Clerton, P., Deschaux, P., Troutaud, D. 1997. Effect of environmental temperature on macrophage activities in carp. Fish Shellfish Immunol. 7:209–212.

Li, Y., Lovell, R.T. (1985). Elevated levels of dietary ascorbic acid increase immune responses in channel catfish. Journal of Nutrition. 115: 123-131.

Lim C., Klesius P.H., Li M.H., Robinson E.H. (2000). Interaction between dietary levels of iron and vitamin C on growth, hematology, immune response and resistance of channel catfish (Ictalurus punctatus) to Edwardsiella ictaluri challenge. Aquaculture 185:313-27.

Liposchitz, D.A., Bothwell, H., Seftel, H.C., Wapnick, A.A., Charlton, R.W., 1971. The role of ascorbic acid in the metabolism of storage iron. Brit. J. Haem. 20:155-165.

Lushchak, V.I., Bagnyukova, T.V. (2006). Temperature increase results in oxidative stress in goldfish tissues. 1. Indices of oxidative stress. Comp. Biochem. Physiol. 143: 30-35.

Magnadottir, B. (2006). Innate immunity of fish (overview). Fish and Shellfish Immunology. 20: 137-51.

Martinez-Porchas, M., Martinez-Cordova, L.R., Ramos-Enriquez, R. (2009). Cortisol and glucose: reliable indicators of fish stress?. Pan-American H. of Aquatic Sci. 4:158-178.

Martins, M.L., Vieira, F.N., Jeronimo, G.T., Mourino, J.L.P., Dotta, G., Speck, G.M., Bezerra, A.J.M., Pedrotti, F.S., Buglione-Neto, C.C., Pereira, Jr. G. (2009). Leukocyte response and phagocytic activity in Nile tilapia experimentally infected with Enterococcus sp. Fish Physiol. Biochem. 35: 219-222.

Matusiewicz, M., Dabrowski, K. (1995). Characterization of ascorbyl esters hydrolysis in fish. Comp. Biochem. Physiol. 110B: 739-745.

Merchie, G., Lavens, P., Storch, V., Ubel, U., Nelis, H., De, Leenheer, A., Sorgeloos, P. (1996). Influence of dietary vitamin C dosage on turbot (Scophtalmus maximus) and european sea bass (Dicentrarchus labrax) nursery stages. Comp. Biochem. Physiol. 114: 123-133.

Montero, D., Tort, L., Izquierdo, M.S., Robaina, L., Vergara, J.M. (1998). Depletion of serum alternative complement pathway activity in gilthead seabream caused by α-tocopherol and n-3 HUFA dietary deficiencies. Fish Physiol. Biochem 18: 399-407.

Navarre, O., Halver, J. (1989). Disease resistance and humoral antibody production in rainbow trout fed high levels of vitamin C. Aquaculture 79: 207–221.

Ndong, D., Chen, Y-Y., Lin, Y-H., Vaseeharan, B., 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 Immunol. 22: 686-694.

Nikinmaa, M., Huestis, W.H. (1984). Adrenergic swelling of nucleated erythrocytes: cellular mechanisms in a bird, domestic goose, and two teleosts, striped bass and rainbow trout. J. Ewp. Biol. 113:215-224.

NRC (National Research Council), Nutrient Requirement of Fish, National Academy Press, Washington, DC, 1993.

Ortuno, J., Esteban, A., Meseguer, J. (1999). Effects of high dietary intake of vitamin C on non-specific immune response of gilthead seabream (Sparus aurata L.). Fish and Shellfish Immunology. 9: 429– 443.

Ortuno, J., Cuesta, A., Esteban, A., Meseguer, J. (2001). Effect of oral administration of high vitamin C and E dosages on the gilthead seabream (Sparus aurata L.) innate immune system. Veterinary immunology and immunopathology. 79: 167–180.

Ortuno, J., Esteban, M.A., Meseguer, J. (2003). The effect of dietary intake of vitamins C and E on the stress response of gilthead seabream (Sparus aurata L.). Fish Shellfish Immunol. 14: 145-156.

Parihar M.S., Dubey, A.K. (1995). Lipid peroxidation and ascorbic acid status in respiratory organs of male and female freshwater catfish Heteropneustes fossilis exposed to temperature increase. Comp. Biochem. Physiol. 112C: 309–313.

Patra, RW., Chapman, J.C., Lim, R.P., Gehrke, P.C., (2007). The effects of three organic chemicals on the upper thermal tolerances of four freshwater fishes. Environ. Toxicol. Chem. 26: 1454-1459.

Pearce, J., Harris, J.E., Davies, S.J. (2003). The effect of vitamin E on the serum complement activity of the rainbow trout, Oncorhynchus mykiss (Walbaum). Aquaculture Nutr. 9:337-340.

Prophete, C., Carlson, E.A., Li, Y., Duffy, J., Steinetz, B., Lasano. S., Zelikoff, J.T. (2006). Effects of elevated temperature and nickel pollution on the immune status of Japanese medaka. Fish Shellfish Immunol. 21: 325-334.

Puangkaew J., Kiron V., Somamoto T., Okamoto N., Satoh S., Takeuchi T.,Watanabe T. (2004). Nonspecific immune response of rainbow trout (Onchorhynchus mykis Walbaum) in relation to different status of vitamin E and highly unsaturated fatty acids. Fish shellfishImmunol 16: 25-39.

Pulgar, J., Bozinovic, F., Ojeda, F.P. (1999). Behavioral thermoregulation in the intertidal fish, Girella laevifrons (Kyphosidae): the effect of starvation. Mar. Freshw. Behav. Phy. 32: 27-38.

Rodak, B.F., Fritsma, G.A., Doig, K. (2007). Hematology: Clinical principles and applications. 3rd edition. Saunders Elsevier. Pp. 160-174.

Rupérez, F. J., Barbas, C., Castro, M., Herrera, E. (1999). Determination of α-tocopherol and α-tocopherol acetate in diets of experimental animals. Study of stability in the diets. J. Chromatogr. A 839:93–99.

Sau, S.K., Paul, B.N., Mohanta, K.N., Mohanty, S.N. (2004). Dietary vitamin E requirement, fish performance and carcass composition of rohu (Labeo rohita) fry. Aquaculture 240:359-368.

Saurabh, S., Sahoo, P.K. (2008). Lysozyme: an important defence molecule of fish innate immune system. Aquaculture Res. 39: 223-239.

Sealey, W.M., Gatin III, D.M. (2002a). 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. 748-755.

Sealey W.M., Gatin D.M. (2002b). In vitro manipulations of vitamin C and vitamin E concentrations alter intracellular O2-production of hybrid striped bass (Morone chrysops x Morone saxatilis) head-kidney cells. Fish Shellfish Immunol. 12:131-140.

Silveira-Coffigny, R., Prieto-Trujillo, A., Ascencio-Valle, F. (2004). Effects of different stressors in haematological variables in cultured Oreochromis aureus S. Comp. Biochem. Physiol. 139: 245-250.

Siwicki, A.K., Anderson, D.P., Rumsey, G.L. (1994). Dietary intake of immunostimulants by rainbow trout affect non-specific immunity and protection against furunculosis. Vet. Immunol. Immunopathol. 41: 125-139.

Svobodova, Z., Machova, J., Drastichova, J., Groch, L., Luskova, V., Poleszczuk, G., Velisek, J., Kroupova, H. (2005). Haematological and biochemical profiles of carp blood following nitrite exposure at different concentrations of chloride. Aquaculture Res. 36: 1177-1184.

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. Aquaculture Res. 959-965.

Taoka Y., Maeda H., Jo J-Y., Kim S-M., Park S-I., Yoshikawa T., Sakata T. (2006). Use of live and dead probiotic cells in tilapia Oreochromis niloticus. Fisheries Sci. 72:755-66.

Tocher, D.R., Mourente, G., Eecken, A.V.D., Evjemo, J.O., Diaz, E., Bell, J.G., Geurden, I., Lavens, P., Olsen, Y. (2002). Effects of dietary vitamin E on antioxidant defence mechanisms of juvenile turbot (Scophthalmus maximus L.), halibut (Hippoglossus hippoglossus L.) and sea bream (Sparus aurata L.) Aquaculture Nutri. 8:195-207.

Tort, L., Padrous, F., Rotllant, J., Crespo, S. (1998). Winter syndrome in the gilthead sea bream Sparus aurata. Immunological and histopathological features. Fish and Shellfish Immunology. 8: 37–47.

Urbinati, E. C., de Abreu, J.S., Camargo, A.C.d.C., Parra, M.A.L. (2004). Loading and transport stress of juvenile matinxa (Brycon cephalus, Characidae) at various densities. Aquaculture 229: 389-400.

Verlhac, V., Obach, A., Gabaudan, J., Schuep, W., Hole, R. (1998). Immunomodulation by dietary vitamin C and glucan in rainbow trout (Oncorhynchus mykiss). Fish and Shellfish Immunology. 8: 409– 424.

Volpatti B.D., Angelo L.D., Jeney G., Heney Z., Anderson D.P., Galeotti M. (1998). Nonspecific immune response in fish fed glucan diets prior to induced transportation stress. J Appl. Ichthyol. 14:201-6.

Wang, X., Kim, K-W., Bai, S.C., Huh, M-D., Cho, B-Y., 2003. Effects of the different levels of dietary vitamin C on growth and tissue ascorbic acid changes in parrot fish (Oplegnathus fasciatus). Aquaculture 215: 203-11.

Wedemeyer, G.A., Barton, B.A., McLeary, D.J. (1990). Stress and acclimation. Methods for Fish Biology (eds CB Schreck, PB Moyle) American Fisheries Society, Bethesda, MD. pp.451-89.

Wedemeyer, G.A., 1996. Physiology of fish in intensive culture systems. New York: Chapman $ Hall.

Whiteley, N.M., Christiansen, J.S., Egginton, S. (2006). Polar cod, Boreogadus saida (Gadidae), show an intermediate stress response between Antartic and temperate fishes. Comp. Biochem. Physiol. 145: 493-501.

Wilson, J.X. (2005). Regulation of vitamin C transport. Annu. Rev. Nutr. 25: 105–125.

Xie, Z., Niu, C., Zhang, Z., Bao, L. (2006). Dietary ascorbic acid may be necessary for enhancing the immune response in Siberian sturgeon (Acipenser baerii), a species capable of ascorbic acid biosynthesis. Comp. Biochem. Physiol. 145: 152-157.

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

ประวัติผู้วิจัย

หัวหน้าโครงการ

1. ชื่อ (ภาษาไทย) นางสาว สุรินทร บุญอนันธนสาร

(ภาษาอังกฤษ) Ms. Surintorn Boonanuntanasarn

2. เลขหมายประจำตัวประชาชน 3 2097 00017 95 1

3. ตำแหน่งปัจจุบัน อาจารย์

4. หน่วยงานที่อยู่ที่ติดต่อ

สาขาเทคโนโลยีการผลิตสัตว์

สำนักวิชาเทคโนโลยีการเกษตร มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

อ. เมือง จ.นครราชสีมา 30000

โทรศัพท์ 044-224371, 224378

โทรสาร 044-224150

Email : surinton@ccs.sut.ac.th

5. ประวัติการศึกษา

ระดับการศึกษา	ชื่อปริญญา	สาขาวิชา	สถาบันการศึกษา
ปริญญาตรี	วิทยาศาสตรบัณฑิต	วาริชศาสตร์	มหาวิทยาลัยบูรพา
ปริญญาโท	วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต	เทคโนโลยีชีวภาพ	จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
ปริญญาเอก	Ph.D. Doctor of Philosophy	Aquatic Biosciences	Tokyo University of Fisheries

6. ผลงานตีพิมพ์

Boonanuntanasarn, S., Yoshizaki,G., Takeuchi, Y., Morita, T. and Takeuchi T. 2002. Gene knock-down in rainbow trout embryos using antisense morpholino phosphorodiamidate oligonucleotides. *Mar. Biotechnol.* 4: 256-266

Boonanuntanasarn, S., Yoshizaki,G. and Takeuchi T. 2003. Specific gene silencing using small interfering RNAs in fish embryos. *Biochem. Biophys. Res. Com.* 310: 1089-1095

Boonanuntanasarn, S., Yoshizaki,G., Iwai, K. and Takeuchi T. 2004. Molecular cloning, expression in albino mutants, and gene knockdown studies of two types of tyrosinase mRNA in rainbow trout embryos. *Pigment Cell Res.* 17: 413-421

Boonanuntanasarn, S., Takeuchi, T., Yoshizaki, G. 2005. High-efficiency gene knockdown using chimeric ribozymes in fish embryos. *Biochem. Biophys. Res. Com.* 336: 438.443

Boonanuntanasarn, S. 2008. Gene knockdown: a powerful tool for gene function study in fish. *J. World Aquac. Soc.* 39: 311-323.

Boonanuntanasarn, S., Panyim, S., Yoshizaki, G. 2008. Characterization and organization of the U6 snRNA gene in zebrafish and usage of their promoters to express short hairpin RNA. *Marine Genomics*, doi:10.1016/j.margen.2008.10.001 (available online)

Boonanuntanasarn, B., Panyim, S., Yoshizaki, G. 2009. Usage of putative zebrafish U6 promoters to express shRNA in Nile tilapia and shrimp cell extracts. *Transgenic Res.* In press

Jangprai, A., Boonanuntanasarn, S., Yoshizaki, G. 2011. Characterization of melanocortin 4 receptor in snakeskin gourami and its expression in relation to daily feed intake and short-term fasting. Gen. Comp. Endocrinol. 173:27-37.

Vechklang, K., Boonanuntanasarn, S., Ponchunchoovong, S., Pirarat, N., and Wanapu, C. 2011. The potential for rice wine residual as an alternative protein source in a practical diet for Nile tilapia (Oreochromis niloticus) at the juvenile stage. Aquac Nutri. In press.

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

ผู้ร่วมโครงการ

1. ชื่อ นาย ภคนิจ คุปพิทยานันท์

Mr. Pakanit Kupittayanant

2. เลขหมายประจำตัวประชาชน 3 3099 01175 08 1

3. ตำแหน่งปัจจุบัน ผู้ช่วยศาสตราจารย์

4. หน่วยงานที่สังกัด และที่อยู่

สาขาวิชาเทคโนโลยีการผลิตสัตว์ สำนักวิชาเทคโนโลยีการเกษตร
มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี
111 ถนนมหาวิทยาลัย 1 ต. สุรนารี อ. เมือง จ. นครราชสีมา 30000
โทรศัพท์ (044) 224375 โทรสาร (044) 224150
e-mail: pakanit@ccs.sut.ac.th

5. ประวัติการศึกษา

ปีที่จบการศึกษา	ระดับปริญญา	อักษรย่อปริญญา	สาขาวิชา	ชื่อสถาบันศึกษา	ประเทศ
2538	ตรี	สพ.บ.	สัตวแพทยศาสตร์	มหาวิทยาลัยขอนแก่น	ไทย
2543	โท	M.Res.	Physiology and Biotechnology	University of Manchester	England
2546	เอก	Ph.D.	Physiology	University of Manchester	England

6. สาขาวิชาการที่มีความชำนาญพิเศษ (แตกต่างจากวุฒิการศึกษา) ระบุสาขาวิชาการ

-

7. ประสบการณ์ที่เกี่ยวข้องกับการบริหารงานวิจัยและงานวิจัยทั้งภายในและภายนอกประเทศ

7.1 ผู้อำนวยการแผนงานวิจัย : -

7.2 หัวหน้าโครงการวิจัย :

7.2.1 ผลของการเสริม conjugated linoleic acids (CLA) ต่อการเพิ่มประสิทธิภาพของระบบภูมิคุ้มกันต่อการให้วัคซีนโรคนิวคลาสเซิลในไก่เนื้อ

7.2.2 ผลของการเสริม conjugated linoleic acid (CLA) ต่อค่าโลหิตวิทยาและชีวเคมีของโลหิตในไก่เนื้อ

7.3 งานวิจัยที่ทำเสร็จแล้ว : ชื่อผลงานวิจัย ปีที่พิมพ์ การเผยแพร่ และแหล่งทุน (อาจมากกว่า 1 เรื่อง)

7.3.1 ผลงานการวิจัยที่ตีพิมพ์ (Full Papers & Abstracts)

7.3.1.1 Kupittayanant P (2000). The difference in angiotensin II AT_1 receptor density and/or affinity in the proximal tubule of spontaneously hypertensive and normotensive rats. GSS University of Manchester, Manchester, UK

7.3.1.2 Kupittayanant P, Trafford AW, Diaz ME, O'Neill SC and Eisner DA (2002). Effects of membrane potential on steady-state cardiac $[Ca^{2+}]_i$ in the absence of Na-Ca exchange. European Journal of Physiology. 433 (*Suppl.*), S346.

7.3.1.3 Kupittayanant P, Trafford AW, Diaz ME and Eisner DA. A mechanism distinct from the L-type current or Na-Ca exchange contributes to Ca entry in rat ventricular myocytes. Journal of Physiology (*In Press*)

7.3.1.4 Emerson M, Cartwright E., Shuh k., Prehar s., Zi M., Kupittayanant P., Williams J., Armesilla A., Oceandy D., Eisner D., Trafford A. and Neyses L. The Sarcolemmal calcium pump regulates cardiac function by modifying signal transduction pathway in the heart. *Journal of Physiology* (*In Press*)

7.3.1.5 Kupittayanant P, Chasombat J, Suksombat W, Kupittayanant S (2005). Effects of bypass fat supplementation on the oestrous cycle duration of early lactating cows. In: Proceeding of AHAT BSAS International Conference. Sofitel Raja Orchid Hotel, Khon Kaen, Thailand (*In Press*)

7.3.1.6 วันวิสาข์ ลิจ้วน กีรณา อยู่หัตถ์ กุณฑลี ร่างน้อย ภคนิจ คุปพิทยานันท์ และ ศจีรา คุปพิทยานันท์ (2548). การศึกษาเปรียบเทียบผลของการเสริมกระชายดำในอาหารและการฉีดฮอร์โมนเทสโทสเทอโรนต่อลักษณะเพศผู้ในไก่เนื้อ. สมุนไพรไทย: โอกาสและทางเลือกใหม่ของอุตสาหกรรมการผลิตสัตว์ ครั้งที่ 3, โรงพิมพ์เท็กซ์ แอนด์ เจอร์นัล พับลิเคชั่น จำกัด กรุงเทพมหานคร p. 85-90