ผลของซีลีโนเมทไธโอนีน, โซเดียมซีลีไนท์ และวิตามินอีต่อการเจริญเติบโต ระบบภูมิคุ้มกัน และความต้านทานโรคในปลากะพงขาว

Effect of Selenomethionine, Sodium Selenite and Vitamin E on Growth Performance, Immune System and Disease Resistance in Seabass (*Lates calcarifer* Bloch and Schneider, 1801)

จุไลวรรณ รุ่งกำเนิดวงศ์

Juliwan Roongkamnertwongsa

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต
สาขาวิชาวาริชศาสตร์
มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์

A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements for the Degree of Master of Science in Aquatic Science
Prince of Songkla University
2551

ลิขสิทธิ์ของมหาวิทยาลัย สงขลานครินทร์

วิทยานิพนธ์ ผลของซีลีโนเมทไธโอนีน, โซเดียมซีลีไนท์ และวิตามินอีต่อการเจริญเติบโต ระบบภูมิคุ้มกัน และความต้านทานโรคในปลากะพงขาว

ผู้เขียน นางจุไลวรรณ รุ่งกำเนิดวงศ์

สาขาวิชา วาริชศาสตร์

อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก

…….

(รองศาสตราจารย์ ดร.กิจการ ศุภมาตย์)

อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม

……

(ดร.จำเริญศรี พวงแก้ว)

คณะกรรมการสอบ

……..ประธานกรรมการ

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.จารุณี เชี่ยววารีสัจจะ)

…….กรรมการ

(รองศาสตราจารย์ ดร.กิจการ ศุภมาตย์)

…….กรรมการ

(ดร.จำเริญศรี พวงแก้ว)

…….กรรมการ

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.สถาพร ดิเรกบุษราคม)

บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ อนุมัติให้นับวิทยานิพนธ์ฉบับนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษา ตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาวาริชศาสตร์

……..

(รองศาสตราจารย์ ดร.เกริกชัย ทองหนู)

คณบดีบัณฑิตวิทยาลัย

วิทยานิพนธ์ ผลของซีลีโนเมทไธโอนีน, โซเดียมซีลีไนท์ และวิตามินอีต่อการเจริญเติบโต ระบบภูมิคุ้มกัน และความต้านทานโรคในปลากะพงขาว

ผู้เขียน นางจุไลวรรณ รุ่งกำเนิดวงศ์

สาขาวิชา วาริชศาสตร์

ปีการศึกษา 2551

บทคัดย่อ

ศึกษาผลการเสริมซีลีเนียมในรูปซีลีโนเมทไธโอนีน (Selenomethionine, SM) โซเดียมซีลีไนท์ (Sodium selenite, NS) และวิตามินอี (Vitamin E) ในอาหารทดลอง (experimental feed) ต่อการเจริญเติบโต การตอบสนองของภูมิคุ้มกัน และความต้านทานเชื้อแบคทีเรีย *(Streptococcus* sp.) ในปลากะพงขาว (*Lates calcarifer* Bloch and Schneider, 1801) โดยเลี้ยงปลากะพงขาวน้ำหนักเริ่มต้นเฉลี่ย 18.88±0.02 กรัม ด้วยอาหารทดลอง 7 สูตร ๆ ละ 3 ซ้ำ ติดต่อกันนาน 8 สัปดาห์ สูตรที่ 1 ไม่เสริมวิตามินอีและซีลีเนียม (-E-Se) สูตรที่ 2 ไม่เสริมวิตามินอีแต่เสริมซีลีโนเมทไธโอนีนและโซเดียมซีลีไนท์ อย่างละ 0.5 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัมอาหาร (-E+hSMhNS) สูตรที่ 3-7 เสริมวิตามินอี 50 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัมอาหารร่วมกับซีลีเนียม โดยสูตรที่ 3 ไม่เสริมซีลีเนียม (+E-Se) สูตรที่ 4 เสริมซีลีโนเมทไธโอนีน 1.0 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัมอาหาร (+ESM1) สูตรที่ 5 เสริมซีลีโนเมทไธโอนีน 2.0 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัมอาหาร (+ESM2) สูตรที่ 6 เสริมโซเดียมซีลีไนท์ 1.0 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัมอาหาร (+ENS1) และสูตรที่ 7 เสริมโซเดียมซีลีไนท์ 2.0 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัมอาหาร (+ENS2) ผลการทดลองพบว่าการเจริญเติบโต การตอบสนองของภูมิคุ้มกันแบบไม่จำเพาะและความต้านทานต่อเชื้อแบคทีเรีย *Streptococcus* sp. ในปลาที่ได้รับอาหารเสริมซีลีโนเมทไธโอนีน (สูตร +ESM1 และ +ESM2) สูงกว่าปลาที่ได้รับอาหารเสริมโซเดียมซีลีไนท์ (สูตร +ESN1 และ +ESN2) แสดงให้เห็นว่ารูปแบบของซีลีเนียมที่เสริมในอาหารมีผลต่อการเจริญเติบโต การทำงานของระบบภูมิคุ้มกันและความต้านทานโรคในปลากะพงขาว โดยพบว่าปลาที่ได้รับอาหารเสริมซีลีโนเมทไธโอนีน 1 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัมอาหาร (สูตร +ESM1, ปริมาณซีลีเนียมจากการวิเคราะห์ในอาหารทดลอง 3.28 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัมอาหาร) มีการเจริญเติบโตสูงสุด การทำงานของระบบภูมิคุ้มกันแบบไม่จำเพาะ ได้แก่ไลโซไซม์ คอมพลีเม้นท์ อิมมูโนโกลบูลิน ซุปเปอร์ออกไซด์แอนไอออน และการจับกินสิ่งแปลกปลอม รวมทั้งค่าแอนติบอดีของปลาหลังได้รับเชื้อ *Streptococcus* sp. และอัตรารอดตายหลังการฉีดเชื้อสูงกว่าปลาที่ได้รับอาหารไม่เสริมซีลีเนียม

(+E-Se และ -E-Se) อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.05$) ดังนั้นการเสริมซีลีโนเมทไธโอนีน 1 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัมอาหาร (สูตร +ESM1, ปริมาณซีลีเนียมจากการวิเคราะห์ในอาหารทดลอง 3.28 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัมอาหาร) สามารถเพิ่มการเจริญเติบโต เสริมการทำงานของระบบภูมิคุ้มกัน และเพิ่มความต้านทานโรคในปลากะพงขาว

Thesis Title	Effect of selenomethionine, sodium selenite and vitamin E on growth performance, immune system and disease resistance in seabass (*Lates calcarifer* Bloch and Schneider, 1801)
Author	Mrs. Juliwan Roongkamnertwongsa
Major Program	Aquatic Science
Academic	2008

ABSTRACT

The effects of selenomethionine (SM), sodium selenite (NS) and vitamin E supplementation in pellet diet on growth, immune function and bacterial disease *(Streptococcus* sp.) resistance of Asian seabass (*Lates calcarifer* Bloch and Schneider, 1801) were studied by feeding the experimental fish of 18.88±0.02 g initial mean weight with seven experimental diets in triplicate for 8 weeks. Diet 1 was the basal diet without vitamin E and selenium (-E-Se), diet 2 without vitamin E added but supplemented with selenomethionine and sodium selenite at 0.5 mg/kg diet each (-E+hSMhNS), diet 3-7 supplemented with 50 mg vitamin E /kg diet in combination with different selenium, diet 3 no selenium supplementation (+E-Se), diet 4 supplemented with selenomethionine 1 mg/kg diet (+ESM1), diet 5 supplemented with selenomethionine 2 mg/kg diet (+ESM2), diet 6 supplemented with sodium selenite 1 mg/kg diet (+ENS1), and diet 7 supplemented with sodium selenite 2 mg/kg diet (+ENS2). Weight gain, feed efficiency, immune responses, antibody titer and survival rate after *Streptococcus* sp. injection of fish fed selenomethionine supplemented diet (diet +ESM1 and +ESM2) were greater than fish fed sodium selenite (diet +ESN1 and +ESN2) at the same concentration indicating a significant effect of selenium sources on growth, immune responses and bacterial disease resistance of Asian seabass. Considering the concentration of selenium, fish fed +ESM1 diet showed the highest growth performance, immune responses (lysozyme activity, complement activity, total immunoglobulin concentration, superoxide anion and phagocytic index), antibody titer and survival post *Streptococcus* sp. challenged. Thus supplementation of selenium from selenomethionine source at 1 mg /kg diet (actual value 3.28 mg/kg) diet is recommended

for enhancement of growth, immunity and survival of *L. calcarifer*. selenomethionine source at 1 mg /kg diet (actual value 3.28 mg/kg) diet is recommended for enhancement of growth, immunity and survival of *L. calcarifer*.

กิตติกรรมประกาศ

ผู้เขียนขอขอบพระคุณ รองศาสตราจารย์ ดร. กิจการ ศุภมาตย์ ประธานกรรมการที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ ที่กรุณาให้คำปรึกษา ช่วยเหลือ และสนับสนุนในการค้นคว้าวิจัย รวมทั้งกรุณาแก้ไขข้อบกพร่องต่าง ๆ จนกระทั่งวิทยานิพนธ์ฉบับนี้สำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยดี

ขอขอบคุณ ดร. จำเริญศรี พวงแก้ว กรรมการที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ ที่กรุณาให้คำปรึกษาแนะนำ ช่วยเหลือ สนับสนุนในการค้นคว้า และทำการวิจัย ตลอดจนแนวทางปฏิบัติในการทำวิทยานิพนธ์ รวมทั้งให้ความอนุเคราะห์ในทุกเรื่อง จนกระทั่งวิทยานิพนธ์ฉบับนี้สำเร็จ

ขอขอบพระคุณ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. จารุณี เชี่ยววารีสัจจะ ประธานการสอบวิทยานิพนธ์ และผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. สถาพร ดิเรกบุศราคม กรรมการการสอบวิทยานิพนธ์ ที่กรุณาให้คำแนะนำเพิ่มเติม ตลอดจนแก้ไขข้อบกพร่องต่างๆ แก่วิทยานิพนธ์ฉบับนี้ให้มีความสมบูรณ์ยิ่งขึ้น ขอขอบพระคุณ ดร. จูอะดี พงษ์มณีรัตน์ ผู้เชี่ยวชาญด้านผลิตภัณฑ์สัตว์น้ำและตรวจสอบคุณภาพผลิตภัณฑ์สัตว์น้ำ ในการให้คำแนะนำและช่วยเหลือในการทำงานวิจัย ขอขอบคุณ บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์และคณะทรัพยากรธรรมชาติ ที่ให้ทุนอุดหนุนในการทำวิจัย ขอขอบคุณน้องๆจากคลินิกสุขภาพสัตว์น้ำที่ช่วยติดต่อ ช่วยเหลือ ส่งข้อมูล ข่าวสารในทุกๆ ด้าน

ขอขอบพระคุณ ดร. จิราพร เกษรจันทร์ ผู้อำนวยการสถาบันวิจัยสุขภาพสัตว์น้ำ ที่เปิดโอกาส และสนับสนุนให้การศึกษาครั้งนี้ประสบผลสำเร็จ ขอขอบคุณ คุณเจนจิตต์ คงกำเนิด และเจ้าหน้าที่สถาบันวิจัยสุขภาพสัตว์น้ำชายฝั่ง โดยเฉพาะเจ้าหน้าที่กลุ่มงานวิจัยภูมิคุ้มกันโรคสัตว์น้ำทุกท่าน ที่ให้ความร่วมมือ และช่วยเหลือในการทำงานวิจัยครั้งนี้ รวมทั้งเพื่อนนักศึกษาปริญญาโททุกท่านที่คอยให้ความช่วยเหลือ และกำลังใจที่ดีเสมอ

สุดท้ายนี้ขอกราบขอบพระคุณ คุณพ่อสำราญ และคุณแม่จำนรรจ์ ถิ่นธารา ผู้ให้กำเนิดชีวิต การศึกษา และบ่มเพาะในทุกๆ ด้านจนลูกมีวันนี้ และขอขอบคุณนายสมพร รุ่งกำเนิดวงศ์ ด. ช จิรโชติ รุ่งกำเนิดวงศ์ และ ด.ช พัฒนพิชญ์ รุ่งกำเนิดวงศ์ ที่คอยช่วยเหลือ สนับสนุนและให้กำลังใจ จนทำให้ผู้เขียนมีความมุมานะ พยายาม จนประสบความสำเร็จในการศึกษาในครั้งนี้

จุไลวรรณ รุ่งกำเนิดวงศ์

สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อ	(3)
Abstract	(5)
กิตติกรรมประกาศ	(7)
สารบัญ	(8)
รายการตาราง	(12)
รายการตารางภาคผนวก	(13)
รายการภาพประกอบ	(14)
บทที่	
1. บทนำ	1
บทนำต้นเรื่อง	1
วัตถุประสงค์	3
ตรวจเอกสาร	4
1. ปลากะพงขาว	4
1.1 ลักษณะทั่วไป	4
1.2 การสืบพันธุ์วางไข่	5
1.3 การแพร่กระจาย	5
1.4 อุปนิสัย	6
1.5 การกินอาหาร	6
1.6 ความสำคัญ	6
2. ซีลีเนียม	7
2.1 ลักษณะทั่วไป	7
2.2 แหล่งที่พบซีลีเนียม	8
2.3 เมตาบอลิซึมของซีลีเนียม	10
2.4 ความสำคัญของซีลีเนียม	11
3. ระบบภูมิคุ้มกันในปลา	13
3.1 ระบบภูมิคุ้มกันแบบไม่จำเพาะ (Non-specific immunity)	13

สารบัญ (ต่อ)

	หน้า
3.2 ระบบภูมิคุ้มกันแบบจำเพาะ (Specific immunity)	19
4. ปัจจัยที่มีผลต่อการตอบสนองของระบบภูมิคุ้มกัน	21
5. วิธีการตรวจวัดการตอบสนองของระบบภูมิคุ้มกันในปลา	22
6. ความสัมพันธ์ของซีลีเนียมกับวิตามินอี	24
7. บทบาทของซีลีเนียมต่อการทำงานของระบบภูมิคุ้มกันในปลา	27
7.1 ซีลีเนียมในปริมาณที่ไม่เพียงพอ (Deficiency)	27
7.2 ซีลีเนียมในปริมาณที่เหมาะสม (Optimum)	28
7.3 ซีลีเนียมในปริมาณที่มากเกินไป (Excessive)	30
8. การตอบสนองของระบบภูมิคุ้มกันในปลากะพงขาว	30
2. วัสดุ อุปกรณ์ และวิธีการทดลอง	34
วัสดุ	34
1. พันธุ์ปลา	34
2. สารเคมี	34
อุปกรณ์	34
1. อุปกรณ์เลี้ยงปลาทดลอง	34
2. อุปกรณ์วิเคราะห์คุณภาพน้ำ	34
3. อุปกรณ์เตรียมอาหารทดลอง	35
4. อุปกรณ์วิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมีของอาหารทดลอง	35
5. อุปกรณ์วิเคราะห์ซีลีเนียม	36
6. อุปกรณ์วิเคราะห์วิตามินอี	36
7. อุปกรณ์สำหรับตรวจสอบการเจริญเติบโต	37
8. อุปกรณ์วิเคราะห์เอนไซม์กลูทาไธโอนเปอร์ออกซิเดส	37
9. อุปกรณ์วิเคราะห์องค์ประกอบเลือด	37
10. อุปกรณ์วิเคราะห์ภูมิคุ้มกันแบบไม่จำเพาะ	37
11. อุปกรณ์วิเคราะห์ภูมิคุ้มกันแบบจำเพาะ	38
12. อุปกรณ์สำหรับเลี้ยงเชื้อแบคทีเรีย	38

สารบัญ (ต่อ)

	หน้า
วิธีการทดลอง	38
1. การเตรียมการทดลอง	38
1.1 การเตรียมอุปกรณ์การทดลอง	38
1.2 การเตรียมปลาทดลอง	38
1.3 การเตรียมอาหารทดลอง	39
1.4 การเตรียมเชื้อแบคทีเรีย	41
1.5 การทดลองเลี้ยงปลากะพงขาวด้วยอาหารทดลอง	41
2. การเก็บรวบรวมข้อมูล	42
2.1 การศึกษาการเจริญเติบโต	42
2.2 การศึกษาการทำงานของเอนไซม์กลูทาไธโอนเปอร์ออกซิเดส	42
2.3 การศึกษาองค์ประกอบเลือดและระบบภูมิคุ้มกันแบบไม่จำเพาะ	42
2.4 การศึกษาระบบภูมิคุ้มกันแบบจำเพาะ	43
2.5 การศึกษาความต้านทานโรค	43
2.6 การวิเคราะห์ผล	44
3. ผลการทดลอง	45
1. ผลของซีลีเนียมต่อการเจริญเติบโตในปลากะพงขาว	45
1.1 น้ำหนักเฉลี่ยต่อตัว	45
1.2 น้ำหนักที่เพิ่มขึ้น ประสิทธิภาพการกินอาหาร และอัตราการรอด	46
2. ผลของซีลีเนียมต่อเอนไซม์กลูทาไธโอนเปอร์ออกซิเดสในปลากะพงขาว	47
3. ผลของซีลีเนียมต่อองค์ประกอบเลือดและระบบภูมิคุ้มกันแบบไม่จำเพาะ	47
3.1 ผลของซีลีเนียมต่อองค์ประกอบเลือดในปลากะพงขาว	47
3.2 ผลของซีลีเนียมต่อระบบภูมิคุ้มกันแบบไม่จำเพาะในปลากะพงขาว	49
4. ผลของซีลีเนียมต่อระบบภูมิคุ้มกันแบบจำเพาะในปลากะพงขาว	52
5. ผลของซีลีเนียมต่อความต้านทานโรคในปลากะพงขาว	54
4. วิจารณ์ผลการทดลอง	56
5. สรุปผลการทดลอง	62

สารบัญ (ต่อ)

	หน้า
6. เอกสารอ้างอิง	65
ภาคผนวก ก	76
ภาคผนวก ก. 1	76
ภาคผนวก ก. 2	81
ภาคผนวก ก. 3	86
ภาคผนวก ก. 4	90
ภาคผนวก ข	103
ภาคผนวก ค	106
ประวัติผู้เขียน	107

รายการตาราง

ตารางที่		หน้า
1	จำนวนฟาร์ม เนื้อที่เลี้ยงปลา ปริมาณผลผลิต และมูลค่าจากการเพาะเลี้ยงปลากะพงขาว ปี 2528-2546	7
2	ปริมาณซีลีเนียมที่สะสมในอาหารชนิดต่างๆของประเทศไทย	9
3	วิธีการตรวจวัดการตอบสนองของระบบภูมิคุ้มกัน	22
4	ค่าองค์ประกอบเลือดในปลาป่วยจากการติดเชื้อ iridovirus และในปลาปกติ	31
5	ผลการเพิ่มอุณหภูมิจาก 26 เป็น 29 องศาเซลเซียส และการลดอุณหภูมิจาก 26 เป็น 20 องศาเซลเซียส ต่อเปอร์เซ็นต์ phagocytosis และ phagocytic index ในปลากะพงขาว	32
6	ส่วนประกอบของอาหารทดลองทั้ง 7 สูตร สำหรับเลี้ยงปลากะพงขาว	39
7	น้ำหนักเฉลี่ยต่อตัวของปลากะพงขาวที่ได้รับอาหารทดลอง 7 สูตร เป็นเวลา 8 สัปดาห์	44
8	น้ำหนักที่เพิ่มขึ้น ประสิทธิภาพการกินอาหาร และอัตรารอดของปลากะพงขาวที่ได้รับอาหารทดลอง 7 สูตร เป็นเวลา 8 สัปดาห์	45
9	การทำงานของเอนไซม์กลูทาไธโอนเปอร์ออกซิเดสในปลากะพงขาวที่ได้รับอาหารทดลอง 7 สูตร เป็นเวลา 8 สัปดาห์	46
10	ปริมาณเม็ดเลือดแดง เม็ดเลือดขาว และเม็ดเลือดแดงอัดแน่นในปลากะพงขาวที่ได้รับอาหารทดลอง 7 สูตร เป็นเวลา 8 สัปดาห์	47

รายการตารางภาคผนวก

ตารางผนวกที่		หน้า
ข. 1	องค์ประกอบทางเคมีของอาหารทดลอง 7 สูตร (บนฐานน้ำหนักแห้ง)	100
ข. 2	ปริมาณซีลีเนียมและวิตามินอีในอาหารทดลอง 7 สูตร (บนฐานน้ำหนักแห้ง)	100
ข. 3	ซีลีเนียมในปลากะพงขาวหลังจากได้รับอาหารทดลอง 7 สูตร เป็นเวลา 8 สัปดาห์	101
ข. 4	ชนิดและปริมาณซีลีเนียมที่เสริมในอาหารทดลอง 7 สูตร	102
ค. 1	คุณภาพน้ำในถังทดลองเลี้ยงปลากะพงขาวด้วยอาหารทดลอง 7 สูตร เป็นเวลา 8 สัปดาห์	103

รายการภาพประกอบ

ภาพประกอบที่		หน้า
1	ปลากะพงขาว	4
2	เมตาบอลิซึมของซีลีเนียม	10
3	กลไกการทำงานของเอนไซม์กลูทาไธโอนเปอร์ออกซิเดส	12
4	การทำงานของระบบคอมพลีเม้นท์ของระบบภูมิคุ้มกันแบบไม่จำเพาะ	16
5	กระบวนการฟาโกซัยโตซีสในการกำจัดเชื้อแบคทีเรีย	17
6	โครงสร้างพื้นฐานของอิมมูโนโกลบูลิน	20
7	ความสัมพันธ์ของสารแอนตี้ออกซิแดนท์ระหว่างซีลีเนียมและวิตามินอี	23
8	ไลโซไซม์ของปลากะพงขาวที่ได้รับอาหารทดลอง 7 สูตร เป็นเวลา 8 สัปดาห์	48
9	คอมพลีเม้นท์ของปลากะพงขาวที่ได้รับอาหารทดลอง 7 สูตร เป็นเวลา 8 สัปดาห์	49
10	อิมมูโนโกลบูลินของปลากะพงขาวที่ได้รับอาหารทดลอง 7 สูตร เป็นเวลา 8 สัปดาห์	49
11	การจับกินสิ่งแปลกปลอมของปลากะพงขาวที่ได้รับอาหารทดลอง 7 สูตร เป็นเวลา 8 สัปดาห์	50
12	ซุปเปอร์ออกไซด์แอนไอออนของปลากะพงขาวที่ได้รับอาหารทดลอง 7 สูตร เป็นเวลา 8 สัปดาห์	51
13	แอนติบอดีไตเตอร์ของปลากะพงขาวในสัปดาห์ที่ 1, 2 และ 3 หลังจากได้รับอาหารทดลอง 7 สูตร เป็นเวลา 8 สัปดาห์	52
14	อัตรารอดตาย (%) หลังฉีดเชื้อ *Streptococcus* sp. ของปลากะพงขาว หลังจากได้รับอาหารทดลอง 7 สูตร เป็นเวลา 8 สัปดาห์	53
15	ความสัมพันธ์ของเปอร์เซ็นต์การรอดตาย (RPS) หลังฉีดเชื้อ *Streptococcus* sp. ของปลากะพงขาวหลังจากได้รับอาหารทดลอง 7 สูตร เป็นเวลา 8 สัปดาห์	54

บทที่ 1

บทนำ

บทนำต้นเรื่อง

ปัจจุบันอุตสาหกรรมการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำมีความสำคัญอย่างยิ่ง เนื่องจากจำนวนประชากรโลกที่เพิ่มมากขึ้น ทำให้ปริมาณความต้องการบริโภคอาหารเพิ่มมากขึ้นด้วย ในขณะที่ปริมาณสัตว์น้ำในธรรมชาติลดลง การเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำจึงมีบทบาทสำคัญในการผลิตอาหารให้เพียงพอกับความต้องการที่เพิ่มขึ้น สำหรับประเทศไทยปลาทะเลเป็นสินค้าสัตว์น้ำที่มีความสำคัญทางเศรษฐกิจเป็นอันดับสองรองจากกุ้งทะเล FAO (1999) รายงานว่าในปี 1997 การเพาะเลี้ยงปลาทะเลในภูมิภาคเอเชียมีผลผลิตหลักมาจากปลา 3 ชนิดคือ ปลากะพงขาว (Seabass; *Lates calcalifer*) ปลากะพงแดง (Red snapper; *Lutjanus* sp.) และปลากะรัง (Grouper; *Epinephelus* sp.) โดยมีผลผลิตรวมจำนวน 17,222 เมตริกตัน

ปลากะพงขาว (Asian seabass) เป็นปลาที่มีการเลี้ยงกันมากชนิดหนึ่งในประเทศไทย เนื่องจากเป็นปลาที่เลี้ยงง่าย โตเร็ว สามารถปรับตัวอยู่ได้ทั้งในแหล่งน้ำกร่อย น้ำจืดและน้ำเค็ม สามารถหาพันธุ์ปลาได้ง่ายทั้งจากธรรมชาติและจากการเพาะพันธุ์จากหน่วยงานของรัฐและเอกชน เนื้อมีรสชาติดี ราคาแพง เป็นที่นิยมของผู้บริโภคทั้งภายในและต่างประเทศ โดยเฉพาะในประเทศแถบอาเซียน โดยพบว่ามีแนวโน้มการเลี้ยงและบริโภคมากขึ้น รูปแบบที่นิยมเลี้ยงกันมากคือกระชังและบ่อดิน โดยผลผลิตปลากะพงขาวส่วนใหญ่ร้อยละ 86 ได้จากการเลี้ยงในกระชัง ส่วนที่เหลือร้อยละ 14 ได้จากการเลี้ยงในบ่อดิน ในปี พ.ศ 2542 ผลผลิตมีปริมาณ 6,200 ตันและเพิ่มขึ้นเรื่อยๆ ทุกปีจนถึง 12,400 ตัน ในปี พ.ศ. 2546 (กรมประมง, 2548ข) แหล่งที่มีการเลี้ยงปลากะพงขาวจะอยู่ในแถบจังหวัดชายฝั่งทะเลทางภาคใต้เช่น จังหวัดสงขลา ปัตตานี นราธิวาส สตูล กระบี่ สุราษฎร์ธานี ระนอง เป็นต้น ส่วนภาคอื่นๆ เช่น จังหวัดฉะเชิงเทรา สมุทรสงคราม ตราด สมุทรปราการ เป็นต้น (กรมประมง, 2548ก)

การเลี้ยงปลากะพงขาวในปัจจุบันส่วนใหญ่เป็นการเลี้ยงแบบหนาแน่น (intensive culture) โอกาสที่ปลาเผชิญความเครียดและอ่อนแอเพิ่มขึ้น ส่งผลให้ปลาติดเชื้อและเกิดโรคได้ง่าย โรคส่วนใหญ่มีสาเหตุมาจากเชื้อโปรโตซัว แบคทีเรีย และไวรัส เกษตรกรแก้ปัญหาโดยการใช้ยาปฏิชีวนะและสารเคมีซึ่งสามารถแก้ปัญหาได้ระดับหนึ่ง แต่ปัญหาที่ตามมาคือ การปนเปื้อนหรือ

การตกค้างของยาปฏิชีวนะในตัวปลา ซึ่งเป็นอันตรายต่อผู้บริโภค แนวทางที่จะช่วยลดปัญหาดังกล่าวได้คือ การกระตุ้นให้ปลามีภูมิคุ้มกันที่มีประสิทธิภาพมากขึ้นเพื่อต่อสู้กับเชื้อก่อโรค

สารอาหาร (Nutrients) เป็นปัจจัยที่มีความสำคัญต่อสิ่งมีชีวิตทุกชนิดรวมทั้งสัตว์น้ำ ในการเสริมสร้างการเจริญเติบโต และการทำงานของระบบต่างๆ ในร่างกายให้สมบูรณ์ รวมทั้งระบบภูมิคุ้มกัน (immunological system) ซึ่งเป็นกลไกสำคัญในการต่อสู้กับเชื้อโรคหรือสิ่งแปลกปลอมอื่นๆ สารอาหารมีความสัมพันธ์ใกล้ชิดกับการเกิดโรค หากร่างกายขาดสารอาหารที่จำเป็นสามารถส่งผลทำให้การทำงานของระบบภูมิคุ้มกันมีการเปลี่ยนแปลง (McKenzie *et al*., 1998) เป็นผลให้ร่างกายอ่อนแอและติดเชื้อโรคได้ง่าย จากการศึกษาเอกสารพบว่า ไขมัน วิตามินซีและวิตามินอีเป็นสารอาหารที่สามารถเสริมสร้างการทำงานของระบบภูมิคุ้มกันโรคในปลาหลายๆ ชนิดได้ (Hardie *et al.,* 1990, 1991; Ortuno *et al.,* 2000, 2001; Lin and Shiau, 2003a, 2003b, 2005a)

แร่ธาตุ (Mineral) เป็นสารอาหารอีกประเภทหนึ่งที่จำเป็นสำหรับสัตว์น้ำ โดยเฉพาะซีลีเนียม (Selenium) ซึ่งจัดเป็นแร่ธาตุและสารอาหารรอง (Micro nutrient) ที่มีความจำเป็น สำคัญต่อการเจริญเติบโต และการทำงานของระบบภูมิคุ้มกันด้านเซลล์และสารน้ำในปลาหลายๆ ชนิด ความต้องการซีลีเนียมเพื่อการเจริญเติบโตของปลาแต่ละชนิดแตกต่างกันทั้งชนิดและปริมาณ จากการศึกษาของ Abdulah และคณะ (2005) พบว่าในร่างกายสัตว์ทุกชนิดจะมีซีลีเนียมเป็นองค์ประกอบที่อยู่ในรูปซีลีโนโปรตีนที่เปลี่ยนรูปมาจากซีลีโนเมทไธโอนีน โดยซีลีโนเมทไธโอนีนจะเปลี่ยนรูปไปเป็นไฮโดรเจนซีลีไนท์โดยขบวนการ trans-sulfuration จากนั้นไฮโดรเจนซีลีไนท์เปลี่ยนรูปเป็นซีลีโนฟอสเฟตเพื่อสังเคราะห์ซีลีโนโปรตีนพี และดับเบิ้ลยู ซึ่งทำหน้าที่เกี่ยวกับการขนส่งโปรตีนในน้ำเลือด และเมตาบอลิซึมของกล้ามเนื้อ ขณะเดียวกันร่างกายอาจจะได้รับซีลีเนียมในรูปของซีลีไนท์หรือซีลีเนท เมื่อทำปฏิกิริยากับกลูทาไธโอนผลสุดท้ายก็จะได้ไฮโดรเจนซีลีไนท์เช่นเดียวกัน อย่างไรก็ตามถึงแม้ว่าปลาจะต้องการซีลีเนียมในการเจริญเติบโต แต่ปริมาณความต้องการน้อยเมื่อเทียบกับสัตว์น้ำชนิดอื่น ทั้งนี้เนื่องจากปลาสามารถรับซีลีเนียมได้จากน้ำ ซึ่งปริมาณซีลีเนียมในน้ำจืดมีประมาณ 0.2-10 ไมโครกรัมต่อลิตร ขณะที่น้ำทะเลมีซีลีเนียมประมาณ 0.09 ไมโครกรัมต่อลิตร (National Research Council, 1976) ประกอบกับ Cappon และ Smith (1982) พบว่าในสัตว์น้ำจืดมีการสะสมซีลีเนียมในรูปซีลีเนทประมาณ 36 เปอร์เซ็นต์ และสัตว์น้ำเค็มมีการสะสมซีลีเนียมในรูปซีลีเนทเพียง 24 เปอร์เซ็นต์เท่านั้น ดังนั้นความต้องการซีลีเนียมเพื่อการเจริญเติบโตของปลาแต่ละชนิดจึงแตกต่างกัน ในปลาเทร้าท์ต้องการ 0.15-0.38 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัมอาหาร (Hilton *et al.,* 1980) ปลาแซลมอน 0.10 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัมอาหาร (Poston *et al.,* 1976) ปลาดุกอเมริกัน 0.25 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัมอาหาร (Gatlin and Wilson, 1984) และปลากะรัง 0.79 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัมอาหาร (Lin and Shiau, 2005b) แต่อย่างไรก็ตาม Bell และคณะ (1987)

พบว่าในปลาแซลมอนที่ได้รับอาหารมีปริมาณซีลีเนียมต่ำกว่า 0.017 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัมอาหาร เป็นเวลา 28 สัปดาห์ มีการเจริญเติบโตช้า ปริมาณเม็ดเลือดแดง และเอนไซม์กลูทาไธโอนเปอร์ออกซิเดสลดลง แต่เมื่อได้รับซีลีเนียมปริมาณ 0.944 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัมอาหาร ทำให้อาการดังกล่าวหมดไป ขณะที่ Wise และคณะ (1993) พบว่าเมื่อปลาดุกอเมริกันได้รับซีลีเนียมปริมาณ 0.80 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัมอาหาร ร่วมกับวิตามินอี 240 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัมอาหาร ทำให้ปริมาณการผลิตซุปเปอร์ออกไซด์จากเซลล์มาโครฟาจเพิ่มขึ้นเป็น 4 เท่า และมีอัตราการตายลดลง นอกจากนี้ Lin และ Shiau (2006) ยังพบว่าหากเพิ่มปริมาณซีลีโนเมทไธโอนีนเป็น 1.6 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัมอาหาร จากที่ปลากะรังต้องการ สามารถลดการเกิด Oxidative stress เพิ่มการเจริญเติบโต และการทำงานของระบบภูมิคุ้มกัน โดยมีค่า Respiratory burst activity, Total immunoglobulin และ Lyzoyme activity เพิ่มสูงขึ้น นอกจากนี้ Felton และคณะ (1996) อ้างตาม Santose (2002) พบว่าปลา coho salmon ต้องการซีลีเนียมสูงถึง 5-7 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัมอาหาร

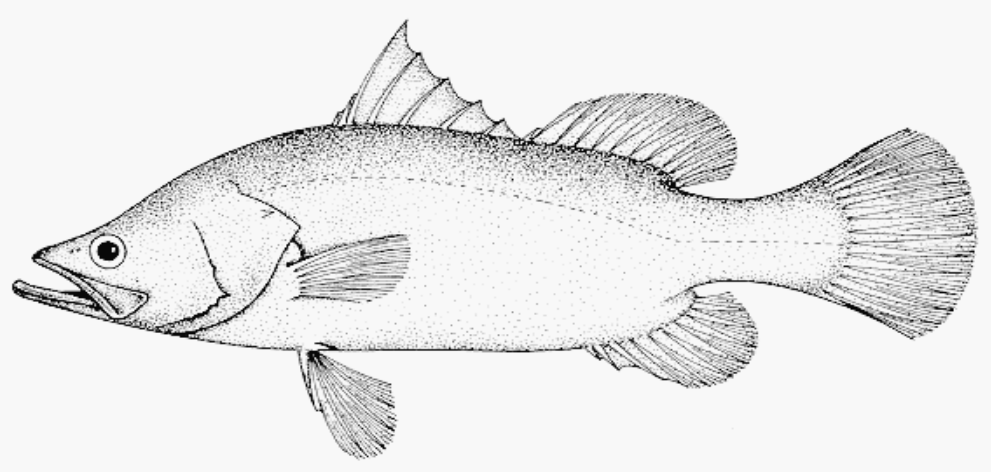
จากข้อมูลการศึกษาข้างต้นพบว่าปริมาณความต้องการซีลีเนียมในปลาแต่ละชนิดแตกต่างกันขึ้นกับชนิดของสัตว์น้ำ รูปแบบของซีลีเนียมที่ใช้ ดังนั้นการศึกษาครั้งนี้จึงมีวัตถุประสงค์ เพื่อศึกษาผลของการเสริมซีลีเนียมในรูปซีลีโนเมทไธโอนีน และโซเดียมซีลีไนท์ในปริมาณต่างกันในอาหารสำหรับเลี้ยงปลากะพงขาว (*L. calcarifer*) ต่อการเจริญเติบโต และการทำงานของระบบภูมิคุ้มกัน เพื่อเป็นแนวทางในการเพิ่มผลผลิตและเพิ่มอัตรารอดของปลากะพงขาวให้สูงขึ้น ซึ่งเป็นการเพิ่มศักยภาพในการผลิตปลากะพงขาวให้แข่งขันได้ในตลาดโลกต่อไป

วัตถุประสงค์

1. เพื่อศึกษาชนิดและปริมาณของซีลีเนียมต่อการเจริญเติบโตในปลากะพงขาว
2. เพื่อศึกษาชนิดและปริมาณของซีลีเนียมร่วมกับวิตามินอีต่อระบบภูมิคุ้มกัน และความต้านทานโรคในปลากะพงขาว

ตรวจเอกสาร

1. ปลากะพงขาว



ภาพที่ 1 ปลากะพงขาว

ที่มา : De Bruin และคณะ (1995)

อนุกรมวิธานของปลากะพงขาว

Phylum Chordata

Class Pisces

Subclass Teleostomi

Order Perciformes

Suborder Percoidei

Family Centropomidae

Genus *Lates*

Species: *calcarifer*

ชื่อสามัญ: seabass, white seabass, silver seabass, giant perch, plamer, cock-up, barramundi, two finned seabass (Rabanal and Soesanto, 1992) และ giant seaperch (กรมประมง, 2531)

ชื่อวิทยาศาสตร์: *Lates calcarifer* (Bloch and Schneider, 1801)

1.1 ลักษณะทั่วไป

ปลากะพงขาวมีลักษณะลำตัวยาว (elongate) และหนา แบนข้างเล็กน้อย บริเวณลำตัวส่วนบนโค้งมนปากกว้าง ริมกระดูกแก้มหยัก กระดูกริมฝีปากบนยาวเลยตา บริเวณส่วนปากยืดหดได้เล็กน้อย ช่องปากเฉียงลงด้านล่าง มีฟันเล็กละเอียด ครีบหลังมี 2 อัน แยกกันเห็นได้ชัด ก้านครีบ

แข็งอันที่ 3 จะยาวที่สุด ซึ่งจะยาวกว่าอันที่ 2 มาก มีตาขนาดกลางไม่มีเยื่อไขมันหุ้ม แผ่นปิดเหงือกมีขนาดใหญ่ที่ขอบหลังเป็นหนามแหลม 4 ซี่ เกล็ดบริเวณลำตัวค่อนข้างใหญ่ ที่บริเวณฐานครีบหลังและครีบก้นมีเกร็ดเล็กๆปกคลุม สีในตัวเต็มวัยเป็นสีเทา หลังมีสีเทาหรือสีเทาปนเขียว ส่วนท้องมีสีน้ำเงินแกมเหลือง (บรรจง, 2517) บริเวณด้านข้างของลำตัวมีสีเงิน ครีบก้นครีบหางมีสีเทาปนดำบางๆ ครีบหลังมี 2 ตอน ตอนแรกอยู่ตรงตำแหน่งของครีบท้อง มีก้านครีบแข็งแหลมคมขนาดใหญ่ 7-8 ก้าน เชื่อมต่อกันเป็นเยื่อบางๆ ครีบหลังตอนที่ 2 แยกจากตอนแรกชัดเจน มีก้านครีบแข็ง 1 ก้าน ก้านครีบอ่อนมีปลายแตกแขนง 10-11 ก้าน ครีบอกและครีบหูยาวไม่ถึงรูก้น ข้อหางสั้น เส้นข้างลำตัวโค้งไปตามแนวสันหลัง มีเกล็ดบนเส้นข้างลำตัว 52-61 เกล็ด (กรมประมง, 2531)

1.2 การสืบพันธุ์วางไข่

ในธรรมชาติปลากะพงขาวจะวางไข่ในช่วงเดือนมีนาคมถึงเดือนมิถุนายน ในพื้นที่ชายฝั่งทะเลอ่าวไทยและในเดือนกรกฎาคมถึงเดือนตุลาคมในพื้นที่ภาคใต้ฝั่งมหาสมุทรอินเดีย ความแตกต่างที่เกิดขึ้นเป็นเพราะได้รับอิทธิพลมรสุมทั้งสองครั้งในรอบปี ฤดูผสมพันธุ์จะเริ่มขึ้นกลางฤดูร้อน โดยปลาที่อยู่ในวัยเจริญพันธุ์เดินทางจากแหล่งน้ำจืดสู่แหล่งน้ำกร่อยและจะไปอาศัยอยู่ในทะเลจนถึงฤดูวางไข่จะอพยพกลับเข้ามายังปากแม่น้ำหรือปากทะเลสาบ ปลาเพศผู้จะมีลำตัวเรียวยาวกว่าปลาเพศเมียแต่มีน้ำหนักน้อยกว่าปลาเพศเมีย จากนั้นจะผสมพันธุ์กันบริเวณปากแม่น้ำซึ่งติดต่อกับทะเล ความเค็มของน้ำประมาณ 25-32 ส่วนในพันส่วน ลูกปลาจะลอยตัวที่ผิวน้ำและล่องลอยตามกระแสน้ำเข้าไปอาศัยบริเวณแอ่งน้ำตามชายฝั่งรวมทั้งบริเวณป่าชายเลนที่น้ำทะเลท่วมถึง (สุจินต์และคณะ, 2524) ขณะที่พ่อแม่พันธุ์ปลากะพงขาวซึ่งนำมาเพาะพันธุ์สามารถวางไข่ในบ่อเพาะพันธุ์ได้เช่นเดียวกับการวางไข่ในธรรมชาติ ขนาดพ่อแม่พันธุ์ของปลากะพงขาวจะต้องมีอายุ 3 ปีขึ้นไป มีขนาดน้ำหนักตั้งแต่ 3.5 กิโลกรัม การผสมพันธุ์จะเริ่มตั้งแต่เดือนเมษายน-ตุลาคม ใกล้เคียงกับปลาในธรรมชาติ พ่อแม่พันธุ์ปลาจะผสมพันธุ์ระหว่างแรม 3 ค่ำ ถึงแรม 5 ค่ำ เวลา 18.00 ถึง 23.00 น. ไข่ที่ถูกผสมจะลอยขึ้นสู่ผิวน้ำ ส่วนไข่ที่ไม่ได้รับการผสมจะจมลงสู่ก้นบ่อ ไข่จะฟักเป็นตัวภายในเวลา 12-17 ชั่วโมง ทั้งนี้ขึ้นอยู่กับอุณหภูมิของน้ำ ลูกปลาที่ฟักออกเป็นตัว จะมีขนาดความยาวประมาณ 1.5 มิลลิเมตร มีถุงอาหารรูปไข่ขนาดใหญ่ ภายในมีหยดน้ำมันอยู่ส่วนหน้าสุด เมื่ออยู่ในน้ำนิ่ง ลำตัวยาวแบนข้างและมีเม็ดสีกระจายไม่เป็นระเบียบ (สุพจน์, 2528)

1.3 การแพร่กระจาย

ในประเทศไทยพบปลากะพงขาวแพร่กระจายอยู่ทุกจังหวัดชายทะเล ทั้งในอ่าวไทยและฝั่งทะเลอันดามัน มักอาศัยอยู่ในแหล่งน้ำที่ไม่ห่างไกลจากฝั่งมากนัก มีชุกชุมบริเวณปากแม่น้ำลำคลองและปากทะเลสาบ ปลากะพงขาวสามารถอพยพเคลื่อนย้ายไปมาระหว่างแหล่งน้ำจืดและแหล่งน้ำเค็มจัดเป็นปลาประเภทสองน้ำ เป็นปลาเขตร้อนพบกระจายตามชายฝั่งทะเลและหมู่เกาะ

ของประเทศในภูมิภาคอินโดแปซิฟิก และภูมิภาคอินโดออสเตรเลีย หรือระหว่างละติจูดที่ 50-165 องศาใต้ และยังแพร่กระจายขึ้นไปถึงตอนใต้ของประเทศจีน ตลอดจนถึงฝั่งทะเลตอนเหนือของทวีปออสเตรเลีย ซึ่งปัจจัยที่จำกัดการแพร่กระจายตามแถบต่างๆ ของโลก ได้แก่ ความเค็มของน้ำทะเล อุณหภูมิของน้ำซึ่งมีผลต่อการฟักตัวของไข่ และการมีชีวิตรอดของลูกปลาวัยอ่อน (สวัสดิ์และสุจินต์, 2517)

1.4 อุปนิสัย

เป็นปลาที่มีนิสัยก้าวร้าว ว่ายน้ำเร็ว บางครั้งจะกระโดดลอยพ้นน้ำ ปกติจะว่ายน้ำช้า แต่เมื่อตกใจหรือล่าเหยื่อจะว่ายน้ำได้เร็วมาก ส่วนใหญ่จะหลบซ่อนตัวอยู่ตามแนวหินหรือตอไม้ ตอนเล็กๆ จะอยู่รวมเป็นฝูงใหญ่ในเขตน้ำกร่อย แต่เมื่อโตจะอพยพไปอยู่ในทะเล ชอบออกหากินในช่วงที่มีกระแสน้ำไหลเอื่อยๆ (สุรศักดิ์, 2543) ปลาขนาดใหญ่มักไม่รวมฝูง นอกจากในฤดูผสมพันธุ์วางไข่จึงจะรวมเป็นกลุ่มเล็กๆ (กรมประมง, 2536)

1.5 การกินอาหาร

ปลากะพงขาวเป็นปลากินเนื้อ (Carnivorous) โดยธรรมชาติชอบกินสัตว์น้ำขนาดเล็กกว่าเป็นอาหาร เช่นปลา กุ้ง หมึก เป็นต้น (สุรศักดิ์, 2543) ถ้าเป็นอาหารที่ไม่มีชีวิตจะชอบอาหารที่นุ่มมากกว่าแข็งและเนื่องจากเป็นปลาที่ตื่นตกใจง่าย จึงไม่ชอบขึ้นมากินอาหารตามผิวน้ำแต่จะกินอาหารที่กำลังเคลื่อนจมลง ไม่ชอบกินอาหารที่ตกถึงพื้นบ่อ อาหารที่ให้ได้แก่ ปลาเป็ดสด เช่นปลาหลังเขียวสับเป็นชิ้นเล็กๆ อาหารผสมแบบเปียกและอาหารเม็ดแบบแห้ง เวลาให้อาหารจึงต้องให้อย่างช้าๆและให้เป็นเวลานานประมาณ 15 นาที (กรมประมง, 2536)

1.6 ความสำคัญ

เป็นปลาที่เลี้ยงง่าย โตเร็ว เนื้อมีรสชาติดี ราคาดี หาพันธุ์ปลาได้ง่ายทั้งจากธรรมชาติและการเพาะพันธุ์ มีการเพาะเลี้ยงกันมาก นิยมเลี้ยงในกระชังและบ่อดิน ซึ่งผลผลิตปลากะพงขาวส่วนใหญ่ร้อยละ 86 ได้จากการเลี้ยงในกระชัง ส่วนที่เหลือร้อยละ 14 ได้จากการเลี้ยงในบ่อดิน โดยผลผลิตจากปี พ.ศ 2542 มีปริมาณ 6,200 ตันและเพิ่มขึ้นเรื่อยๆ ทุกปีจนถึงปี พ.ศ. 2546 มีประมาณ 12,400 ตัน (ตารางที่ 1) (กรมประมง, 2548ก) แหล่งเลี้ยงปลากะพงขาวมีมากแถบภาคใต้จังหวัดสงขลา ปัตตานี นราธิวาส สตูล กระบี่ สุราษฎร์ธานี ระนอง เป็นต้น และภาคอื่นจังหวัด ฉะเชิงเทรา สมุทรสงคราม ตราด สมุทรปราการ (กรมประมง, 2548ข)

ตารางที่ 1 จำนวนฟาร์ม เนื้อที่เลี้ยงปลา ปริมาณผลผลิตและมูลค่าจากการเพาะเลี้ยงปลากะพงขาว ปี 2528 – 2546

ปี	จำนวนฟาร์ม (ฟาร์ม)	เนื้อที่การเลี้ยง (ไร่)	ปริมาณผลผลิต (ตัน)	มูลค่าผลผลิต (1,000 บาท)
2528	599	325.07	512.06	36,196.21
2529	867	353.00	763.75	56,353.15
2530	961	404.49	1,157.91	80,098.10
2531	1,203	585.37	1,034.43	70,928.73
2532	1,205	525.85	1,290.23	94,323.00
2533	1.190	451.19	1,214.00	90,273.00
2534	1,149	351.57	1,650.00	131,723.00
2535	1,828	1,399.78	2,591.00	186,286.00
2536	1,627	1,735.31	2,747.00	177,962.00
2537	1,616	1,428.68	2,503.00	238.411.00
2538	1,659	1,400.55	3,882.00	416,287.00
2539	1,803	1,916.65	4,067.00	450,145.00
2540	2,021	1,701.13	4,090.00	402,063.00
2541	2,458	1,396.41	6,813.00	682,665.00
2542	2,774	2,977.09	6,056.08	617,122.35
2543	3,183	2,988.74	7,752.14	753,966.53
2544	3,482	3,884.11	8,003.53	755,748.65
2545	4,570	3,877.88	11,032.06	1,054,912.02
2546	5,610	5,468.37	12,229.55	1,163,310.61

ที่มา: กรมประมง (2548ก)

2. ซีลีเนียม

2.1 ลักษณะทั่วไป

ซีลีเนียม (Selenium) ถูกค้นพบในปี ค.ศ 1817 โดย Jons Jacob Berzelius เป็นแร่ธาตุชนิดหนึ่งมีสัญลักษณ์ทางเคมีว่า Se ในตารางธาตุอยู่ในหมู่ที่ 16 คาบที่ 4 มีเลขอะตอมเท่ากับ 34 และมวลอะตอม 78.96 กรัมต่อโมล เป็นธาตุที่อยู่ระหว่างธาตุเทลลูเรียมและโปโลเนียม และระหว่างธาตุแท้ที่ไม่ใช่โลหะคือ ออกซิเจนและซัลเฟอร์ สามารถพบซีลีเนียมในรูปรีดิวซ์ -2 ซีลีไนด์ (selenide) หรือถูกออกซิไดซ์ไปเป็น +4 ซีลีไนท์ (selenite) หรือ +6 ซีลีเนท (selenate) โดย

ซีลีเนียมเป็นธาตุที่มีสีเทาหรือสีเทาผสมดำ ไม่มีกลิ่น มีจุดหลอมเหลวที่ 220.5 องศาเซลเซียส และมีจุดเดือดเท่ากับ 684.9 องศาเซลเซียส (McDowell, 1992; Brown and Arthur, 2001)

คุณสมบัติทางเคมีของซีลีเนียมจะคล้ายกับซัลเฟอร์ โดยซีลีเนียมในรูปสารประกอบอินทรีย์ ได้แก่ ซีลีโนเมทไธโอนีน (selenomethionine) ซีลีโนซิสทีน (selenocysteine) และซีลีโนยีสต์ (selenoyeast) มีความใกล้เคียงกับอนุพันธ์ของซัลเฟอร์คือ ซิสเตอีน (cysteine) และเมทไธโอนีน (methionine) ขณะที่ซีลีเนียมในรูปสารประกอบอนินทรีย์ ได้แก่ โซเดียมซีลีไนท์ (sodium selenite) โซเดียมซีลีเนท (sodium selenate) ซีลีเนียมซัลไฟด์ (selenium sulfide) และซีลีเนียมซัลเฟต (selenium sulfate) มีความใกล้เคียงกับอนุพันธ์ของซัลเฟอร์คือ ไฮโดรเจนซัลไฟด์ ซัลไฟด์ และซัลเฟต (Andreotti, 2003; Dodig and Cepelak, 2004)

2.2 แหล่งที่พบซีลีเนียม

2.2.1 ดินและหิน สามารถพบซีลีเนียมได้ในดินและหิน เช่น ดินทราย หินปูน และแผ่นหิน พบว่ามีการสะสมของซีลีเนียมอยู่ระหว่าง 0.1-2 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม และมีปริมาณสูง 1,200 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม (Andreotti, 2003) แต่ละพื้นที่มีการสะสมซีลีเนียมในปริมาณที่แตกต่างกัน เช่นประเทศจีนมีซีลีเนียมสะสมในดินเฉลี่ย 0.112 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม และพบสูงสุดเพียง 7.865 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม (Sun *et al*., 1985)

2.2.2 อากาศ ซีลีเนียมสะสมอยู่ในอากาศทั้งจากการหายใจของสิ่งมีชีวิตและจากมลภาวะ โดยทั่วไปพบว่ามีในปริมาณต่ำกว่า 10 นาโนกรัมต่อลูกบาศก์เมตร (National Research Council, 1976) และจากการศึกษาของ Hashimoto และ Winchester (1967) พบว่าซีลีเนียมที่ล่องลอยในอากาศบริเวณเขตตัวเมืองมีอยู่ประมาณ 0.3-1.6 นาโนกรัมต่อลูกบาศก์เมตร ซึ่งเป็นปริมาณที่สูงกว่าในเขตพื้นที่อุตสาหกรรม ซีลีเนียมที่ก่อให้เกิดมลภาวะทางอากาศ คือ ก๊าซไฮโดรเจนซีลีไนท์ (Hydrogen selenite) ซึ่งเป็นก๊าซไม่มีสี (Ermakov and Kovalskij, 1974)

2.2.3 อาหารและน้ำ ซีลีเนียมพบในอาหารสำหรับบริโภคได้แก่ อาหารทะเล เนื้อสัตว์ ไข่ ผัก และผลไม้ รวมทั้งหัวหอมและกระเทียม ซึ่งปริมาณซีลีเนียมในเนื้อสัตว์ ผักและผลไม้ชนิดต่าง ๆ ในแต่ละพื้นที่ของแต่ละประเทศไม่เท่ากัน ขึ้นอยู่กับปริมาณซีลีเนียมที่มีอยู่ในพื้นดินที่ใช้ปลูกพืช การกินกันตามลำดับห่วงโซ่อาหารของผู้บริโภครวมทั้งการกินของสัตว์ใหญ่กินสัตว์เล็กด้วย ดังนั้นปริมาณซีลีเนียมที่มีอยู่ในพืชและสัตว์แต่ละชนิดจึงแตกต่างกัน (Dodig and Cepelak, 2004; Sirichakwal *et al*., 2005) สำหรับในประเทศไทย Sirichakwal และคณะ (2005) ได้ศึกษาปริมาณซีลีเนียมที่พบในอาหารไทยทั้งพืชผัก ผลไม้และเนื้อสัตว์พวกวัว สุกร ไก่ ฯลฯ รวมทั้งสัตว์ทะเลพวกหมึก กุ้ง ปูและหอย เป็นต้น ดังตารางที่ 2 นอกจากนี้พบว่าอาหารที่มีโปรตีนสูงจะมีปริมาณซีลีเนียมสะสมอยู่มากกว่าอาหารที่มีโปรตีนต่ำ

ตารางที่ 2 ปริมาณซีลีเนียมที่สะสมในอาหารชนิดต่าง ๆ ของประเทศไทย

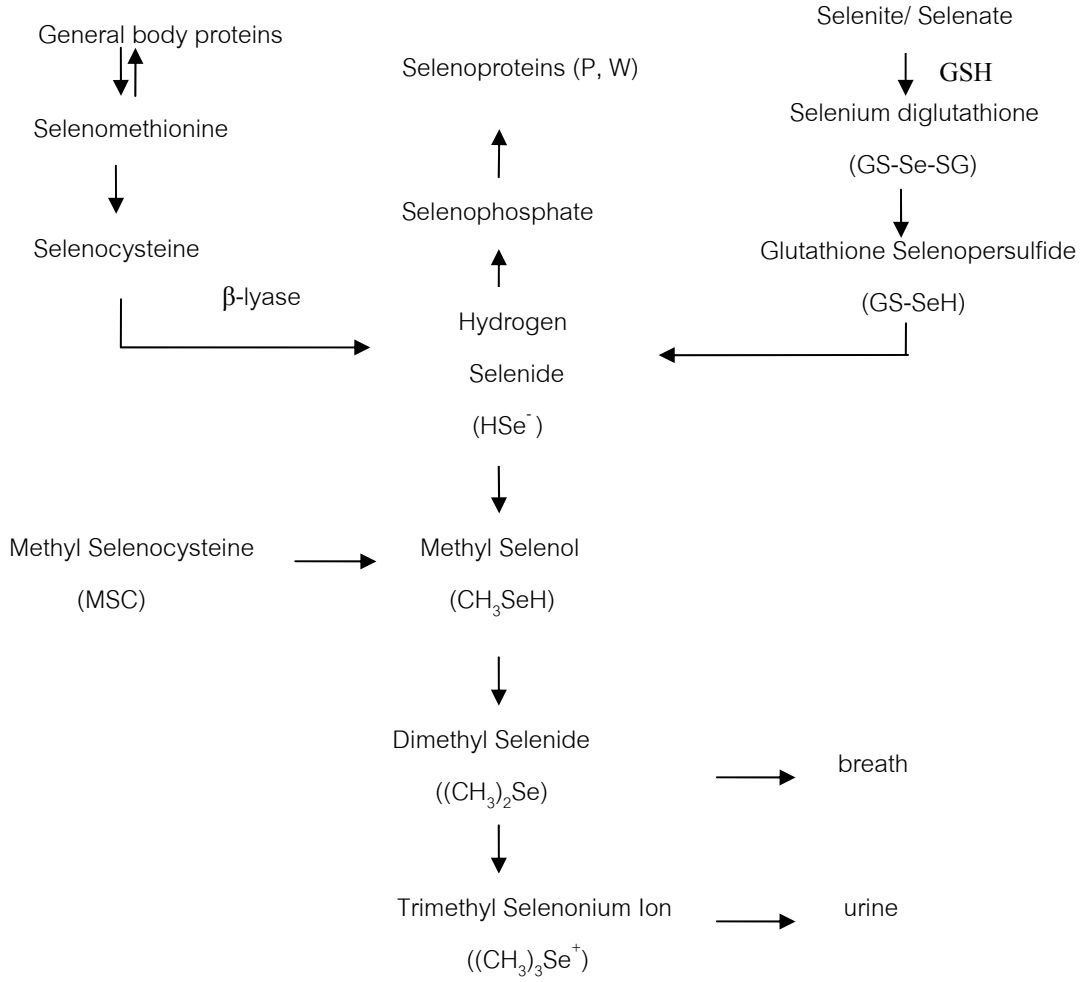
ชนิดอาหาร	ปริมาณซีลีเนียมในอาหาร (µg/100 g)	ชนิดอาหาร	ปริมาณซีลีเนียมในอาหาร (µg/100 g)
ข้าว	5.0	มะเขือเทศ	1.2
เนื้อวัว	15.4	แครอท	3.9
เนื้อหมู	18.0	ฟักทอง	0.9
เนื้อไก่	22.3	มันฝรั่ง	1.2
ไข่ไก่	74.4	ผักกาดหอม	1.1
ไข่เป็ด	70.4	เห็ด	1.2
กุ้ง	35.5	พริกไทย	0.1
หมึก	41.0	หัวหอม	0.6
ปูดำ	46.1	กระเทียม	3.4
หอยแมลงภู่	42.6	กล้วยน้ำหว้า	0.3
หอยนางรม	29.3	กล้วยไข่	0.6
ปลาช่อน	33.5	มะละกอสุก	1.2
ปลาดุก	47.3	มะม่วงอกร่อง	1.0
ปลาแมคคาเรล	88.1	ส้ม	1.2
ชะอม	12.7	กล้วย	0.3
หน่อไม้ฝรั่ง	3.5	สับปะรด	0.2
กะหล่ำดอก	0.7	นมสด	2.8
กะหล่ำปลี	0.2	ถั่วลิสง	11.1
แตงกวา	0.4	ถั่วเหลือง	12.7

ที่มา : ดัดแปลงจาก Sirichakwal และคณะ (2005)

ส่วนซีลีเนียมที่พบในแหล่งน้ำอยู่ในรูปเกลือซีลีเนียมอนินทรีย์ (inorganic selenium salt) ประมาณ 2-3 ไมโครกรัมต่อลิตร (Ermakov and Kovalskij, 1974) จากการศึกษาของ Cappon และ Smith (1982) พบว่าในสัตว์น้ำจืดมีการสะสมของซีลีเนียมในรูปซีลีเนทประมาณ 36 เปอร์เซ็นต์ ส่วนสัตว์น้ำเค็มมีการสะสมซีลีเนียมในรูปซีลีเนทเพียง 24 เปอร์เซ็นต์ เท่านั้น

2.2.4 การเกษตรและอุตสาหกรรม ในด้านเกษตรกรรมพบซีลีเนียมในส่วนผสมของยากำจัดศัตรูพืชและยาฆ่าเชื้อรา ด้านอุตสาหกรรมการผลิต ได้แก่ โรงงานทำเหมืองแร่ โรงงานถลุงแร่ และโรงงานสกัดโลหะหนัก ส่วนอุตสาหกรรมการบริโภค ได้แก่ การทำแก้ว การฟอกสี อุปกรณ์อิเล็กโทรนิค หมึกพิมพ์ และสีย้อม (National Research Council, 1976) เป็นต้น

2.3. เมตาบอลิซึมของซีลีเนียม



ภาพที่ 2 เมตาบอลิซึมของซีลีเนียม

ที่มา : ดัดแปลงจาก Abdulah และคณะ (2005) และ Suzuki (2005)

ในร่างกายสัตว์ทุกชนิดมีซีลีเนียมเป็นองค์ประกอบอยู่ในรูปซีลีโนโปรตีน (selenoprotein) ชนิดต่างๆ เช่นซีลีโนโปรตีนพี (selenoprotein P) ซีลีโนโปรตีนดับเบิ้ลยู (selenoprotein W) เป็นต้น ซีลีโนโปรตีนทั้งสองชนิดได้จากการเปลี่ยนรูปของซีลีโนเมทไธโอนีน (selenomethionine) ซีลีโนซิสทีน (selenocysteine) ซีลีไนท์ (selenite) และซีลีเนท (selenate) เป็นต้น ดังภาพที่ 2 ซึ่งซีลีโนโปรตีนแต่ละชนิดมีหน้าที่ทางชีววิทยาที่แตกต่างกัน (Arther, 1997) การรวมตัวของซีลีเนียมกับกรดอะมิโนซิสทีน (cysteine) ในสายโปรตีน เรียกว่า ซีลีโนซิสทีน และเมื่อซีลีเนียมรวมตัวกับกรดอะมิโนเมทไธโอนีน (methionine) ในสายโปรตีนก็เรียกว่า ซีลีโนเมทไธโอนีน ซึ่งซีลีโนเมทไธโอนีนเป็นซีลีโนโปรตีนชนิดแรกที่พบในร่างกาย จากนั้นจะเปลี่ยนรูปไป

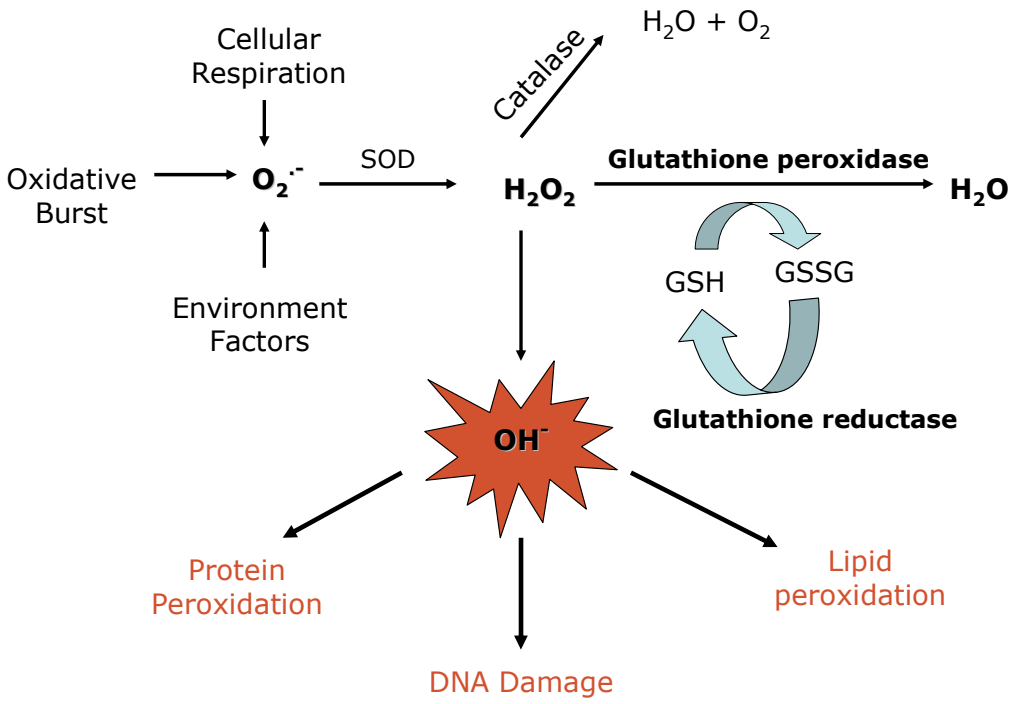
เป็นซีลีโนซิสทีนโดยผ่านกระบวนการ *trans*-sulfuration และเปลี่ยนไปอยู่ในรูปของไฮโดรเจนซีลีไนด์ (hydrogen selenide; HSe^-) โดยอาศัยเอนไซม์ β-lyase ขณะเดียวกันหากร่างกายได้รับซีลีเนียมในรูปของซีลีไนท์ (selenite) ซึ่งอยู่ในรูปไอออนสามารถทำปฏิกิริยากับกลูทาไธโอน (glutathione; GSH) เปลี่ยนเป็นซีลีโนไดกลูทาไธโอน (selenodiglutathione; GS-Se-SG) และกลูทาไธโอนซีลีโนเปอร์ซัลไฟด์ (glutathione selenopersulfide; GS-SeH) ตามลำดับ จากนั้นก็จะเปลี่ยนไปเป็นไฮโดรเจนซีลีไนด์เช่นเดียวกัน ไฮโดรเจนซีลีไนด์อยู่ในรูป Active form สามารถเปลี่ยนไปเป็นซีลีโนฟอสเฟต (selenophosphate) เพื่อสังเคราะห์ซีลีโนโปรตีนพีและซีลีโนโปรตีนดับเบิ้ลยู ซึ่งเป็นซีลีโนโปรตีนที่มีบทบาทสำคัญเกี่ยวกับการขนส่งโปรตีนในน้ำเลือดและเมตาบอลิซึมของกล้ามเนื้อตามลำดับ และเมื่อไฮโดรเจนซีลีไนด์ได้รับกลุ่มเมทิล (methylation) จาก S-adenosylmethionine (SAM) จะเปลี่ยนเป็นเมทิลซีลีนอล (CH_3SeH), ไดเมทิลซีลีไนด์ ($(CH_3)_2Se$) และไตรเมทิลซีลีโนเนียมไอออน ($(CH_3)_3Se^+$) ตามลำดับ นอกจากนี้ยังพบว่าเมทิลซีลีโนซีสทีน (methylselenocystein; MSC) เป็นซีลีโนโปรตีนชนิดหนึ่งที่พบมากในกระเทียมและหอม ซึ่งสามารถเปลี่ยนไปเป็นเมทิลซีลีนอลได้เช่นเดียวกัน เมทิลซีลีนอลมีผลในการฆ่าเซลล์มะเร็งโดยการเกิด Apoptosis และยับยั้งไม่ให้เซลล์มะเร็งพัฒนากลายไปเป็นเนื้องอก ซีลีเนียมจะถูกขับออกจากร่างกายอย่างรวดเร็วทางการหายใจออกในรูปของไดเมทิลซีลีไนด์ และทางปัสสาวะ (Urine) ในรูปของไตรเมทิลซีลีโนเนียมไอออน (Abdulah *et al*., 2005)

2.4 ความสำคัญของซีลีเนียม

2.4.1 เป็นองค์ประกอบของเอนไซม์กลูทาไธโอนเปอร์ออกซิเดส (Glutathione peroxidase; GSHPx)

จากรายงานของ National Research Council (1989) พบว่าซีลีเนียมเป็นธาตุที่จำเป็น (essential trace element) และสำคัญสำหรับสิ่งมีชีวิต เนื่องจากมีผลต่อระบบเมตาบอลิซึมของร่างกาย และยังเป็นองค์ประกอบของเอนไซม์กลูทาไธโอนเปอร์ออกซิเดส (GSHPx) ทำหน้าที่ในการเปลี่ยนไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ (hydrogen peroxide; H_2O_2) และลิปิดไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ (lipid hydroperoxides) ซึ่งเป็นผลิตผลที่ได้จากกลไกการทำงานของร่างกายให้เปลี่ยนไปเป็นน้ำและลิปิดแอลกอฮอล์ ตามลำดับ (Rutruck *et al*., 1973) เอนไซม์ชนิดนี้ยังช่วยในการกำจัดอนุมูลอิสระ (O_2^- free radical) ป้องกันเซลล์จากการทำลายของสารเปอร์ออกไซด์ (Little *et al*., 1970) ได้อีกด้วย กลไกการทำงานของเอนไซม์กลูทาไธโอนเปอร์ออกซิเดส ดังภาพที่ 3 ผลิตผลที่เกิดจากขบวนการเมตาบอลิซึม ซึ่งใช้ออกซิเจนของร่างกายทำให้เกิดออกไซด์ที่สำคัญคือ ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ และอนุมูลอิสระ (Free radical) ได้แก่ ซุปเปอร์ออกไซด์ (superoxide, O_2^-) และอนุมูล

ไฮดรอกซิล (hydroxyl radical; OH^-) ซึ่งซุปเปอร์ออกไซด์ที่เกิดขึ้นสามารถเปลี่ยนไปเป็นไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์โดยอาศัยเอนไซม์ superoxide dismutase (SOD) เป็นตัวเร่งปฏิกิริยา ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ที่เกิดขึ้นเป็นอันตรายต่อร่างกาย และหากเปลี่ยนไปเป็นอนุมูลไฮดรอกซิล จะทำปฏิกิริยากับโปรตีนเกิด Protein peroxidation เมื่อทำปฏิกิริยากับไขมันเกิด Lipid peroxidation และสามารถทำลายดีเอ็นเอ (DNA) ทำให้เกิดความผิดปกติต่อร่างกายได้



ภาพที่ 3 กลไกการทำงานของเอนไซม์กลูทาไธโอนเปอร์ออกซิเดส

ที่มา : Spallholz และคณะ (2004)

ร่างกายมีกลไกการป้องกันตนเองจากไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ที่เกิดขึ้น โดยมีเอนไซม์กลูทาไธโอนเปอร์ออกซิเดสเป็นตัวทำลายไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ไม่ให้เปลี่ยนไปเป็นอนุมูลไฮดรอกซิลแต่เปลี่ยนเป็นน้ำแทน โดยกลูทาไธโอนในสภาพรีดิวส์ (reduced glutathione, GSH) จับกับไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ ซึ่งอาศัยการทำงานร่วมกับเอนไซม์กลูทาไธโอนเปอร์ออกซิเดสเปลี่ยนเป็นน้ำและกลูทาไธโอนในสภาพออกซิไดส์ (oxidized glutathione, GSSG) จากนั้น GSSG เปลี่ยนกลับมาเป็น GSH ได้ โดยอาศัยเอนไซม์กลูทาไธโอนรีดักเตส (glutathione reductase) ร่วมกับ NADPH ซึ่งเป็นโคเอ็นไซม์ ช่วยในการกำจัดไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ ดังสมการ

$$2GSH + H_2O_2 \xrightarrow{\text{glutathione peroxidase}} GSSG + 2H_2O$$

$$GSSG + NADPH + H^+ \xrightarrow{\text{glutathione reductase}} 2GSH + NADP^+$$

2.4.2 เพิ่มประสิทธิภาพการทำงานของระบบภูมิคุ้มกัน

จากการศึกษาพบว่าซีลีเนียมมีผลต่อระบบภูมิคุ้มกันในสัตว์ ทั้งนี้อาจเนื่องมาจากการสะสมของซีลีเนียมในสัตว์บกและสัตว์น้ำ ส่วนใหญ่อยู่บริเวณ ม้าม ตับ ไตและต่อมน้ำเหลือง (McKenzie *et al*., 1998) ซึ่งเป็นเนื้อเยื่อที่เกี่ยวข้องกับระบบภูมิคุ้มกัน (กิจการและคณะ, 2539) ทำให้ซีลีเนียมมีผลต่อการทำงานของภูมิคุ้มกันโรคทั้งแบบไม่จำเพาะ (non-specific immunity) และแบบจำเพาะ (specific immunity) Arthur และคณะ (2003) พบว่าซีลีเนียมมีผลต่อระบบภูมิคุ้มกันแบบไม่จำเพาะ โดยการเพิ่มหรือลดการทำงานของเซลล์เม็ดเลือดขาวชนิดแมคโครฟาจ (macrophage) ในการจับกินสิ่งแปลกปลอม สำหรับภูมิคุ้มกันแบบจำเพาะนั้น มีผลต่อการทำงานของเม็ดเลือดขาว T-lymphocyte และ B-lymphocyte Combs และ Combs (1986) พบว่าการขาดซีลีเนียมทำให้ปริมาณแอนติบอดีลดลง เนื่องจากเซลล์เม็ดเลือดขาวชนิด B-lymphocyte ซึ่งทำหน้าที่ในการสร้างสารแอนติบอดี ถูกทำลายจากสารเปอร์ออกไซด์ และพบว่าซีลีเนียมเป็นสารต้านอนุมูลอิสระ (antioxidant) ที่ดี เช่นเดียวกับวิตามินอีในการทำลายโมเลกุลของออกซิเจนไม่ให้เปลี่ยนไปเป็นสารประกอบเปอร์ออกไซด์ซึ่งมีผลทำลายผนังเซลล์

3. ระบบภูมิคุ้มกันในปลา

ระบบภูมิคุ้มกัน (Immunological system) เป็นกลไกของร่างกายในการป้องกันตัวจากเชื้อโรค ซึ่งสามารถแบ่งออกเป็น 2 ระบบ คือระบบภูมิคุ้มกันแบบไม่จำเพาะ (non-specific immunity) และระบบภูมิคุ้มกันแบบจำเพาะ (specific immunity) แต่ละระบบจะประกอบด้วยการทำงานร่วมกันของภูมิคุ้มกันแบบเซลล์และภูมิคุ้มกันแบบสารน้ำ ในการกำจัดสิ่งแปลกปลอม

3.1 ระบบภูมิคุ้มกันแบบไม่จำเพาะ (Non-specific immunity)

เป็นระบบภูมิคุ้มกันที่สามารถต่อต้านสิ่งแปลกปลอมแบบไม่จำเพาะเจาะจง ส่วนใหญ่มีมาแต่กำเนิด มีกลไกการทำงานโดยช่วยไม่ให้เชื้อลุกลามหรือเพิ่มจำนวนออกไป ก่อนที่ร่างกายจะสร้างภูมิคุ้มกันแบบจำเพาะขึ้นมา ในปลาการทำงานของระบบภูมิคุ้มกันแบบไม่จำเพาะมีความสำคัญมากในการป้องกันการเกิดโรค (กิจการและคณะ, 2539) สามารถแบ่งระบบภูมิคุ้มกันแบบไม่จำเพาะได้ดังนี้

3.1.1 กลไกส่วนพื้นผิวของร่างกาย (Surface barriers) เป็นส่วนแรกของร่างกายที่ทำหน้าที่ต่อต้านสิ่งแปลกปลอมต่างๆที่จะเข้าสู่ร่างกาย ได้แก่ เยื่อเมือก เกล็ด ผิวหนัง เหงือกและระบบทางเดินอาหาร

ก. เยื่อเมือก (mucus)

ทำหน้าที่ในการดักจับจุลชีพไม่ให้เคลื่อนที่เข้าสู่เนื้อเยื่อ การผลิตเมือกของปลาจะเพิ่มขึ้น เมื่อมีการตอบสนองต่อการติดเชื้อโรคหรือการเปลี่ยนแปลงทางกายภาพ พบเยื่อเมือกปกคลุมบริเวณเยื่อบุผิวหนัง เหงือกและทางเดินอาหาร

ข. ผิวหนัง (skin)

ผิวหนังของปลาจะทำหน้าที่เกี่ยวกับการควบคุมสมดุลของของเหลวภายในและภายนอกร่างกาย เมื่อมีจุลชีพเข้ามารบกวนจะมีการตอบสนองโดยการสร้างผิวหนังชั้นนอกให้มีลักษณะหนา หรือเกิดภาวะเนื้อเยื่อมีจำนวนของ mulpiglian เซลล์เพิ่มขึ้นมากผิดปกติ (hyperplasia) เพื่อป้องกันผิวหนังจากการรบกวนให้เกิดขึ้นน้อยที่สุด

ค. เหงือก (gill)

เหงือกประกอบด้วยพื้นที่ผิวขนาดใหญ่ของเยื่อบุผิวที่อ่อนบาง เป็นทางผ่านเข้าออกของจุลชีพ โดยเหงือกจะมีเมือกบุผิวและเกิดภาวะที่เนื้อเยื่อมีจำนวนเซลล์เพิ่มขึ้นมากผิดปกติ (hyperplasia) ตอบสนองต่อการรบกวนเช่นเดียวกับผิวหนัง นอกจากนี้เหงือกยังมีเซลล์ฟาโกซัยท์ (phagocyte) ในบริเวณ branchial capillaries เพื่อกำจัดสิ่งแปลกปลอมหรือจุลชีพเมื่อมีการติดเชื้อก่อโรค

ง. ทางเดินอาหาร (gastrointestinal tract)

บริเวณทางเดินอาหารจะมีเยื่อบุเมือกและพีเอชต่ำเนื่องจากมีการหลั่งน้ำย่อยและน้ำดีออกมา ทำให้เกิดภาวะไม่เหมาะสมต่อการเจริญเติบโตของเชื้อก่อโรค

2.1.2 กลไกด้านสารน้ำ (Humoral mechanism) เป็นระบบภูมิคุ้มกันสารน้ำ ซึ่งเป็นของเหลวในร่างกาย รวมถึงสารคัดหลั่งต่างๆ ซึ่งส่วนใหญ่เป็นสารประเภทโปรตีน ทำหน้าที่ป้องกันร่างกาย สารน้ำแต่ละประเภทมีหน้าที่ยับยั้งการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์ และย่อยสลายเซลล์เชื้อโรคโดยการใช้เอนไซม์ที่แตกต่างกันดังนี้

ก. สารยับยั้งการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์ (Inhibitors substance) เป็นสารที่ทำให้จุลินทรีย์ไม่ได้รับสารอาหารที่จำเป็นต่อร่างกาย รบกวนกระบวนการเมตาบอลิซึมของจุลินทรีย์ แบ่งออกเป็น

- **ทรานสเฟอร์ริน (Transferrin)** เป็นโปรตีนที่มีความสามารถในการจับกับเหล็ก (iron) ซึ่งเหล็กเป็นสารที่จำเป็นในการเจริญเติบโตของสิ่งมีชีวิตทุกชนิดรวมทั้ง

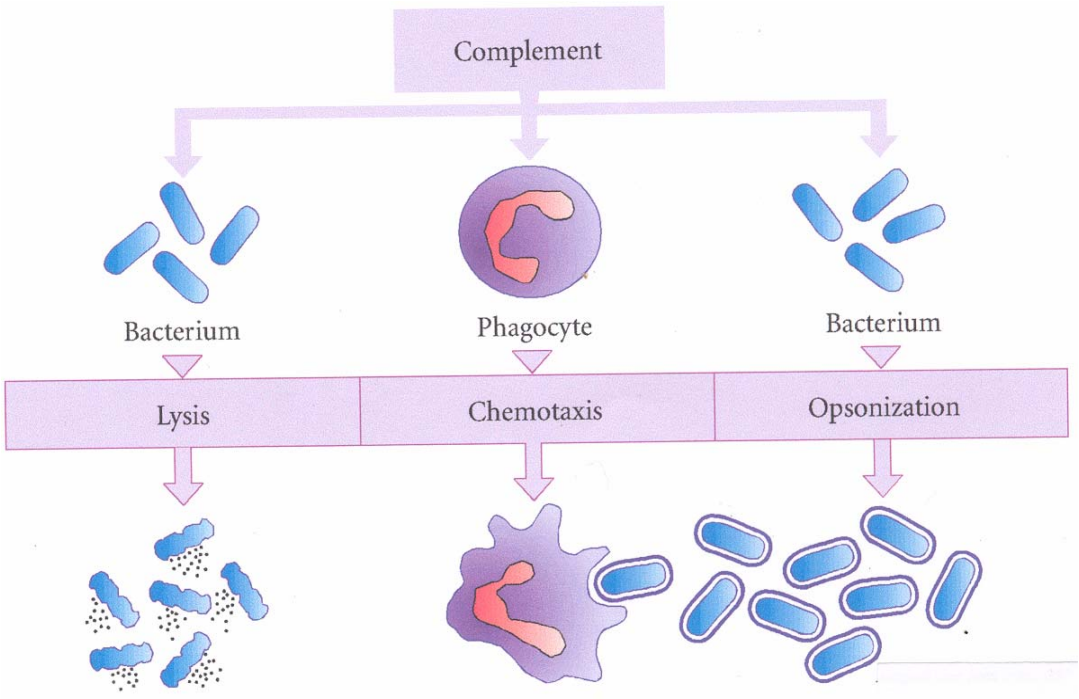
จุลชีพ ดังนั้นเมื่อทรานสเฟอร์รินขัดขวางไม่ให้จุลชีพได้รับเหล็ก จุลชีพก็จะไม่เจริญเติบโตและตายในที่สุด ดังรายงานของกิจการและคณะ (2539) ว่าทรานสเฟอร์รินสามารถยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียและเชื้อรา

- **อินเตอร์ฟีรอน (Interferon)** เป็นสารชนิดหนึ่ง ซึ่งหลั่งโดยเซลล์ที่ติดเชื้อไวรัส ส่งไปยังเซลล์ข้างเคียงหรือเซลล์อื่นๆ ทำให้เซลล์ดังกล่าวไม่ติดเชื้อไวรัสและสามารถต้านทานเชื้อไวรัสได้ (โพยม, 2532)
- **แอนตี้โปรติเอส (Antiprotease)** เป็นสารที่ต่อต้านเอนไซม์ของเชื้อโรค เมื่อเชื้อโรคเข้าสู่ร่างกายเชื้อโรคจะปล่อยเอนไซม์ออกมาย่อยสลายเซลล์ร่างกายเพื่อนำสารอาหารไปใช้ ในปลาแซลมอนพบว่าแอลฟามาโครโกลบูลิน (alpha-macroglobulin) สามารถยับยั้งเอนไซม์โปรติเอสจากเชื้อ *Aeromonas salmonicida* ได้ (Alexander, 1985 อ้างตามกิจการ และคณะ, 2539)
- **เลคติน (Lectins)** เป็นสารโปรตีนหรือไกลโคโปรตีนที่สามารถเชื่อมต่อกับคาร์โบไฮเดรตและโครงสร้างที่มีความซับซ้อนของเซลล์ผิวหนังของเชื้อโรคชนิดต่างๆได้ (สุทธิพันธ์ และคณะ, 2543) เมื่อเลคตินจับกับเชื้อโรคจะเกิดการรวมกลุ่ม (agglutination) ทำให้เชื้อโรคหมดประสิทธิภาพในการทำงาน

2. เอนไซม์ที่ทำหน้าที่ในการย่อยสลาย (Lysins)

2.1 คอมพลีเม้นท์ (Complement)

เป็นกลไกป้องกันตัวเองที่สำคัญเพราะมีหน้าที่หลายอย่างในการกำจัดเซลล์แปลกปลอม ต่อต้านเชื้อโรค โดยทำให้เกิดการอักเสบ มีการชักนำเม็ดเลือดขาวและกระตุ้นให้เซลล์ฟาโกซัยท์จับกินสิ่งแปลกปลอม คอมพลีเม้นท์เป็นกลุ่มโปรตีนในน้ำเหลือง ในสภาพปกติจะไม่ว่องไวไม่สามารถปฏิบัติหน้าที่ได้ ต้องการการกระตุ้นก่อนจึงจะทำงาน การทำงานจะต้องอาศัยคอมพลีเม้นท์หลายชนิดทำงานเชื่อมโยงกันเป็นลูกโซ่ ในปลาพบคอมพลีเม้นท์ในน้ำเลือด สารคัดหลั่งและเมือก การทำงานของคอมพลีเม้นท์มี 2 แบบ คือแบบทางตรง (classical pathway) จะทำงานเมื่อเกิดปฏิกิริยาการรวมตัวของแอนติบอดีกับแอนติเจน มักเกิดในระบบภูมิคุ้มกันแบบจำเพาะ และแบบทางลัด (alternative pathway) เป็นแนวทางที่ร่างกายใช้กำจัดเชื้อโรคในระยะที่ได้รับเชื้อใหม่ๆ ยังไม่มีแอนติบอดีเกิดขึ้น จุลชีพหลายชนิดเช่น ปรสิต ไวรัส เชื้อรา แบคทีเรีย พยาธิ เป็นต้น สามารถกระตุ้นการเกิดคอมพลีเม้นท์ได้โดยตรง ผลจากการกระตุ้นคอมพลีเม้นท์จะช่วยทำให้เชื้อจุลชีพถูกทำลายได้ง่ายขึ้น ดังภาพที่ 4



ภาพที่ 4 การทำงานของระบบคอมพลีเม้นท์ของระบบภูมิคุ้มกันแบบไม่จำเพาะ

ที่มา : ดัดแปลงจาก Rotti (1991)

ซึ่งการทำงานของคอมพลีเม้นท์ทำให้เกิดเหตุการณ์ดังนี้

เกิดการ Lysis หมายถึง จากการกระตุ้นคอมพลีเม้นท์จะทำให้เชื้อแบคทีเรียหรือเชื้อไวรัสบางชนิดแตกได้

เกิด Chemotaxis หมายถึง สารประกอบบางชนิดเกิดจากการกระตุ้นคอมพลีเม้นท์ สามารถชักนำให้เกิดการชุมนุมของเม็ดเลือดขาวในบริเวณที่มีการติดเชื้อ ให้มาจับกินจุลชีพเพิ่มมากขึ้น

เกิด Opsonization หมายถึง จากการกระตุ้นคอมพลีเม้นท์จะได้สาร opsonin ซึ่งจะไปจับกับจุลชีพเช่น แบคทีเรีย แล้วทำให้เซลล์ฟาโกซัยท์สามารถจับและกลืนจุลชีพเกิด phagocytosis ดีขึ้น (สุทธิพันธ์ และคณะ, 2543)

2.2 ไลโซไซม์ (Lysozyme)

เป็นเอนไซม์ซึ่งสามารถทำลายสาร mucopolysaccharide ที่ผนังเซลล์แบคทีเรียแกรมบวกทำให้เซลล์แบคทีเรียแตก ส่วนใหญ่ผนังเซลล์ด้านนอกของแบคทีเรียจะถูกรบกวนโดยคอมพลีเม้นท์ก่อน จากนั้นไลโซไซม์จะเข้ามาทำหน้าที่ต่อเพื่อทำการย่อยสลายเซลล์ของเชื้อโรค ในปลาพบไลโซไซม์ในน้ำเลือด และเมือกบุผิว มีฤทธิ์ต้านเชื้อแบคทีเรีย

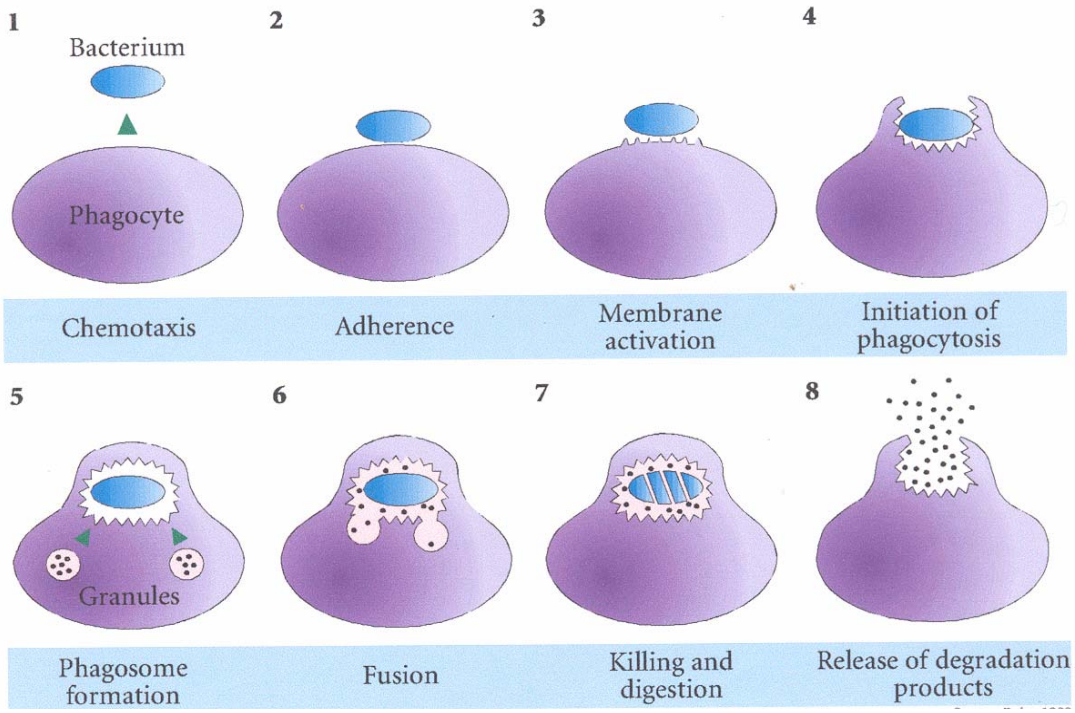
2.3 C-reactive protein (CRP)

เป็นโปรตีนในน้ำเลือดซึ่งจะมีปริมาณเพิ่มมากขึ้นเมื่อร่างกายเกิดการอักเสบหรือเนื้อเยื่อถูกทำลาย (acutephase protein) (วันเพ็ญ, 2525) CRP ทำหน้าที่เป็นสารชักนำหรือเชื่อมโยงให้เกิด opsonization มีผลต่อกระบวนการฟาโกซัยโตซีส หรือกระตุ้นการทำงานของคอมพลีเม้นท์แบบ classical pathway

3.1.3 กลไกด้านเซลล์ (Cellular mechanism) เป็นระบบภูมิคุ้มกันซึ่งอาศัยเซลล์ชนิดต่างๆ ในการป้องกันการติดเชื้อ ดังนี้

ก. ฟาโกซัยท์ (Phagocytes) หรือ (phagocytic cells) ได้แก่แมคโครฟาจ (macrophage) และนิวโทรฟิล (neutrophil) (ชนกันต์, 2545) เป็นเซลล์เม็ดเลือดที่ทำหน้าที่จับกินและทำลายสิ่งแปลกปลอมโดยอาศัยกระบวนการฟาโกซัยโตซีส (phagocytosis) ซึ่งเซลล์ฟาโกซัยท์ ประกอบด้วย

- **แมคโครฟาจ (macrophage)** พบมากในเนื้อเยื่อของปลากระดูกแข็งรวมถึงบริเวณเหงือกและบริเวณเยื่อบุช่องท้อง (peritoneum) แต่พบมากสุดบริเวณไต ม้าม และบริเวณหัวใจห้อง atrium ในปลาบางชนิดไม่พบบริเวณตับเหมือนสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม
- **โมโนซัยท์ (monocyte)** พบได้ในบริเวณไตและพบจำนวนเล็กน้อยในกระแสโลหิตสามารถเคลื่อนย้ายในกระแสโลหิตไปยังบริเวณที่เกิดการอักเสบเพื่อเพิ่มจำนวนแมคโครฟาจ ทั้งโมโนซัยท์และแมคโครฟาจสามารถจับกินสิ่งแปลกปลอมหลายๆ ชนิดได้ เช่น แบคทีเรีย อนุภาคคาร์บอน และยีสต์
- **อีโอซิโนฟิล (eosinophil)** และเบโซฟิล (basophil) ในสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม เซลล์ดังกล่าวจะมีหน้าที่เกี่ยวข้องกับการเกิดการอักเสบ การป้องกันตัวอื่นๆ แต่ในปลาบทบาทและหน้าที่ไม่แน่ชัด
- **นิวโทรฟิล (nutrophil)** ในปลาเป็นเซลล์ที่ทำหน้าที่ในการจับกินสิ่งแปลกปลอมมีความคล้ายคลึงกับสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม พบนิวโทรฟิลในไต ม้าม กระแสโลหิต และบริเวณบาดแผลที่เกิดการอักเสบ การเกิดฟาโกซัยโตซีสส่วนใหญ่มักเกิดในนิวโทรฟิล ดังภาพที่ 5



ภาพที่ 5 กระบวนการฟาโกซัยโตซีสในการกำจัดเชื้อแบคทีเรีย
ที่มา : สุทธิพันธ์ และคณะ (2543)

ขั้นตอนการเกิด phagocytosis มีดังนี้

1. Adherence (attachment) คือการที่จุลชีพและฟาโกซัยท์เข้ามาประชิดกัน เป็นขั้นตอนแรกก่อนที่จุลชีพจะถูกกลืนเข้าสู่ซัยโตพลาสซึมของเซลล์ฟาโกซัยท์และถูกทำลายต่อไป

2. Ingestion เมื่อเซลล์ฟาโกซัยท์สัมผัสกับจุลชีพจะเกิด pseudopod ยื่นออกไปเพื่อโอบล้อมจุลชีพ ปลาย pseudopod 2 ข้างที่ยื่นออกไปจะประสานกัน เกิดเป็นถุงที่ภายในมีจุลชีพอยู่ ถุงนี้เรียกว่า phagosome

3. Degranulation เมื่อมี phagosome เกิดขึ้นในซัยโตพลาสซึม (cytoplasm) แล้ว lysosome หรือ granule ของฟาโกซัยท์จะเคลื่อนที่มาอยู่รอบๆ phagosome แล้วมีการเชื่อมต่อกันระหว่าง phagosome และ lysosome กลายเป็น phagolysosome

4. Intra cellular killing จุลชีพหรือสิ่งแปลกปลอมที่อยู่ภายใน phagosome และ phago-lysosome ถูกทำลายด้วยกรด และเอนไซม์หลายชนิด

ข. Natural cytotoxic cell (NCC) จะมีลักษณะคล้ายกับ Natural Killer cell (NK-cell) ในสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม และมักเกิดในเซลล์ที่ติดเชื้อไวรัสและเนื้องอก เมื่อเซลล์ NCC ได้รับการ

กระตุ้นจากการติดเชื้อไวรัส จะปล่อยสารภายใน granule ออกมาทำลายเยื่อหุ้มเซลล์ไวรัสและยับยั้งการเพิ่มจำนวนของไวรัส

3.2 ระบบภูมิคุ้มกันแบบจำเพาะ (Specific immunity)

เป็นระบบภูมิคุ้มกันที่เกิดขึ้นเมื่อร่างกายไม่สามารถกำจัดสิ่งแปลกปลอมโดยภูมิคุ้มกันแบบไม่จำเพาะได้ ภูมิคุ้มกันแบบจำเพาะเกิดขึ้นเมื่อถูกกระตุ้นด้วยจุลชีพหนึ่ง และมีความจำเพาะต่อจุลชีพนั้นเท่านั้น ในการกำจัดจุลชีพมีการใช้สารน้ำ (humoral immunity) และเซลล์ (cellular immunity) ทำงานร่วมกัน เซลล์ที่สำคัญในการทำงานของภูมิคุ้มกันแบบจำเพาะได้แก่ ลิมโฟซัยท์ (lymphocytes) ซึ่งพบลิมโฟซัยท์ในระบบหมุนเวียนเลือดและลิมฟอยด์ออร์แกน (lymphoid organ) ได้แก่ ไธมัส ไต ม้าม และเนื้อเยื่อบุผิวของปลา (ผิวหนัง เหงือกและทางเดินอาหาร) ลิมโฟซัยท์แบ่งออกได้เป็น 2 กลุ่มคือ T-lymphocyte และ B-lymphocyte โดย T-lymphocyte ตอบสนองภูมิคุ้มกันแบบเซลล์ (CMIR) และยังช่วย B-lymphocyte ในการสร้างแอนติบอดีด้วย ส่วน B-lymphocyte ตอบสนองภูมิคุ้มกันแบบสารน้ำ (HIR) นอกจากนี้ทั้ง T-lymphocyte และ B-lymphocyte เป็นเซลล์ที่มีบทบาทต่อการสร้างเซลล์เก็บความจำ (memory cells) ให้เกิดขึ้นในปลา การตอบสนองของระบบภูมิคุ้มกันแบบจำเพาะ แบ่งเป็น 2 หลักใหญ่ๆ ดังนี้

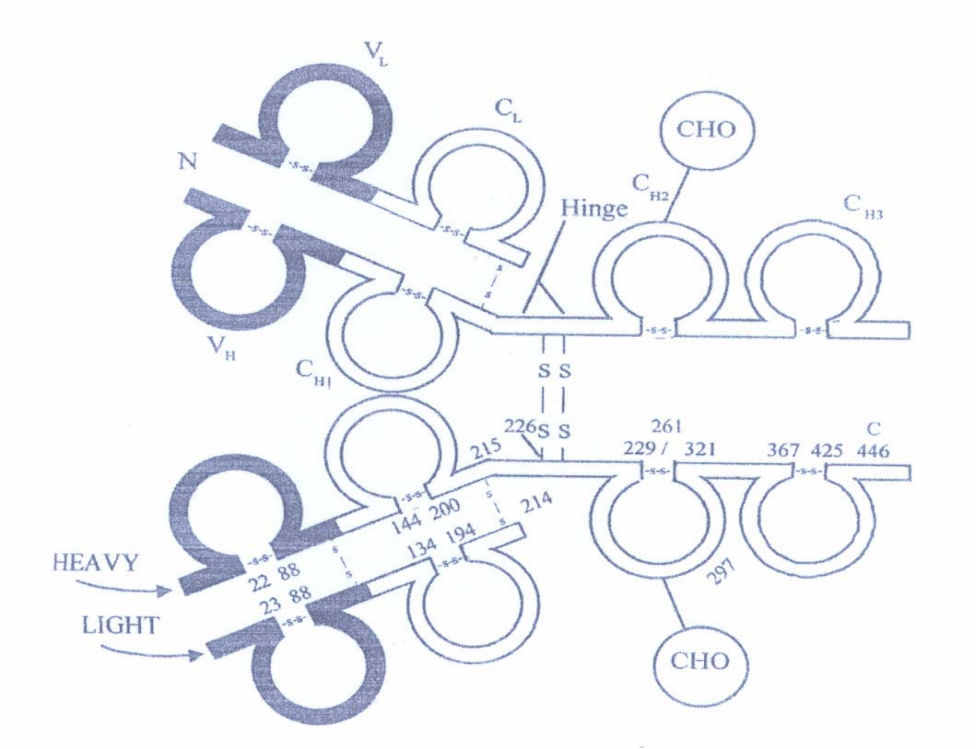
3.2.1 Cell-Mediated Immune Response (CMIR) เป็นการตอบสนองของระบบภูมิคุ้มกันด้านเซลล์ที่กระทำโดย T-lymphocyte ซึ่งไม่มีการสร้างแอนติบอดี มีความสำคัญในการต่อต้านโรคติดเชื้อที่เกิดจากเชื้อไวรัส โรคติดเชื้อจากปรสิตและโรคติดเชื้อรา โดยเมื่อ T-lymphocyte ถูกกระตุ้นด้วยแอนติเจน เกิดการเปลี่ยนแปลงของ T-lymphocyte เปลี่ยนเป็น cytotoxic T cell หรือ killer T cell ที่จำเพาะต่อแอนติเจนที่เป็นเซลล์จากการติดเชื้อไวรัส ปรสิต และเซลล์เนื้องอก ซึ่ง T-lymphocyte ส่วนหนึ่งจะหลั่งลิมโฟไคเนส (lymphokinase) หลายๆ ชนิด ออกมาโดยทำหน้าที่ต่างๆ กันดังนี้

- Macrophage activated factor (MAF) มีคุณสมบัติทำให้แมคโครฟาจมาชุมนุมกันอยู่ในบริเวณที่มีการหลั่งสารและกระตุ้นให้แมคโครฟาจทำหน้าที่ฟาโกซัยโตซีสได้ดีขึ้น
- Lymphocyte mitogenic factor มีหน้าที่กระตุ้นลิมโฟซัยท์ปกติที่ไม่มีการตอบสนองต่อแอนติเจนให้มีการแบ่งตัวเพิ่มจำนวน ช่วยลิมโฟซัยท์ที่ถูกกระตุ้นด้วยแอนติเจนทำงาน
- Lymphotoxin เป็นสารที่เมื่อสัมผัสกับเซลล์ของแอนติเจนแล้วสามารถทำลายได้

จากการทำงานของ T-lymphocyte ทำให้แมคโครฟาจถูกกระตุ้น (activated macrophage) มีความสามารถสูงขึ้นในการกำจัดแอนติเจน

3.2.2 Humoral Immune Response (HIR) มีการสร้างแอนติบอดีจากปฏิกิริยาของระบบภูมิคุ้มกันต่อแอนติเจน โดย B-lymphocyte เมื่อถูกกระตุ้นด้วยแอนติเจนก็จะกลายเป็น blast cell แบ่งตัวเพิ่มจำนวนแล้วแยกออกเป็น 2 ทางคือ ทางหนึ่งกลายเป็นเซลล์เก็บความจำ อีกทางหนึ่งจะกลายเป็น plasma cell เพื่อสร้างแอนติบอดีให้กับร่างกายซึ่งแอนติบอดีที่สร้างขึ้นเป็นโกลบูลินทำหน้าที่เกี่ยวกับภูมิคุ้มกันในร่างกายจึงเรียกว่า อิมมูโนโกลบูลิน (Immunoglobulins) หรือ Ig โครงสร้างทั่วไปของอิมมูโนโกลบูลิน 1 โมเลกุล ประกอบด้วยสาย polypeptide 4 สาย คือ heavy chain (H) 2 สายที่เหมือนกัน ซึ่งเป็นแนวยาวเชื่อมต่อกันด้วย disulfide bond และอีก 2 สายสั้นที่เหมือนกัน เรียกว่า light chain (L) ดังภาพที่ 6 ในสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนมจะมีอิมมูโนโกลบูลิน อยู่ 5 ชนิด แต่ในปลามีเพียงชนิดเดียวคือ IgM ในปลาฉลามพบ IgM แบบ tetramer (กิจการ และคณะ, 2539) สามารถพบอิมมูโนโกลบูลิน ในสารคัดหลั่งเมือกของผิวหนัง ทางเดินอาหาร ท่อน้ำดี และในไข่ของปลาบางชนิด เช่น ปลาคาร์พ

อิมมูโนโกลบูลินมีหน้าที่กำจัดไวรัส เชื้อปรสิตและยังทำหน้าที่กระตุ้นการทำงานระบบคอมพลีเม้นท์ได้ดียิ่งขึ้น เนื่องจากปลาสร้าง IgM โดยไม่มี IgG เป็นองค์ประกอบคู่กันเหมือนในสัตว์ชั้นสูง (ชลอ, 2528) ดังนั้นเมื่อแอนติเจน เช่นไวรัส เข้าสู่ตัวปลา เซลล์ที่สร้าง IgM มีความสามารถในการจำแอนติเจนได้ไม่ดีนัก ทำให้ปลาขาดภูมิคุ้มกันที่ถาวร (โพยม, 2532) นอกจากนี้ T-lymphocyte ยังช่วย B-lymphocyte สร้างแอนติบอดีตอบสนองต่อแอนติเจนพวกโปรตีนและคาร์โบไฮเดรตอีกด้วย ในการสร้างแอนติบอดี เบญจะ (2525) รายงานว่าหากแยกเอาแมคโครฟาจออกไป การสร้างแอนติบอดีจะลดลง แสดงว่าแมคโครฟาจมีผลต่อการสร้างแอนติบอดี เมื่อแอนติบอดีจับกับแอนติเจนเกิดเป็นแอนติเจน-แอนติบอดีคอมเพล็กกระตุ้นคอมพลีเม้นท์ให้ทำลายเซลล์ติดเชื้อ



ภาพที่ 6 โครงสร้างพื้นฐานของอิมมูโนโกลบูลิน
ที่มา : สุทธิพันธ์ และคณะ (2543)

4. ปัจจัยที่มีผลต่อการตอบสนองของระบบภูมิคุ้มกัน

ในการตอบสนองของระบบภูมิคุ้มกันของสิ่งมีชีวิตไม่ว่าจะเป็นในสัตว์บกหรือสัตว์น้ำ จะมีการเปลี่ยนแปลงแตกต่างกันออกไป ขึ้นอยู่กับสิ่งเร้าหรือมีปัจจัยต่างๆที่เข้ามาเกี่ยวข้อง ซึ่งปัจจัยที่มีผลต่อการตอบสนองของภูมิคุ้มกันในปลามีดังนี้

1. ความเครียด ความเครียดส่งผลกระทบต่อระบบสรีระและพฤติกรรมที่แสดงออกของปลา สามารถสังเกตได้จากลักษณะภายนอก เช่น การเปลี่ยนสีผิวของปลา โดยสีผิวของปลาจะคล้ำขึ้น เมื่อมีการปรับเปลี่ยนสถานที่หรือสิ่งแวดล้อมใหม่ หากความเครียดมีความรุนแรงและเกิดขึ้นในระยะเวลานาน อาจทำให้ระบบภูมิคุ้มกันและระบบการทำงานอื่นๆ ในร่างกายลดลงเช่น ผลจากความเครียดทำให้ปลาแซลมอนเพศผู้หลั่งฮอร์โมนคอร์ติโคสเตอร์รอยด์ (corticosteroids) ออกมาทำให้ประสิทธิภาพของระบบภูมิคุ้มกันในปลาลดลง หรือความเครียดจากการจัดการเลี้ยงไม่เหมาะสม เช่น คุณภาพน้ำมีการเปลี่ยนแปลงในรอบวันแตกต่างกัน การลำเลียงและการขนย้ายปลา เป็นต้น

2. สิ่งแวดล้อม สิ่งแวดล้อมรอบๆ ตัวปลามีความสำคัญมากเช่น อุณหภูมิและฤดูกาลรวมถึงช่วงระยะเวลาในการได้รับแสง ต่างมีผลต่อการตอบสนองของภูมิคุ้มกันในปลาทั้งแบบจำเพาะและไม่จำเพาะ เนื่องจากอุณหภูมิมีความสัมพันธ์กับฤดูกาล ในช่วงฤดูร้อนอุณหภูมิเพิ่มสูงขึ้นแต่ในช่วงฤดูหนาวอุณหภูมิลดต่ำลง ส่วนความแตกต่างระหว่างระยะเวลากลางวัน และกลางคืนในแต่ละฤดูกาล มีผลทำให้ระบบภูมิคุ้มกันในปลามีการเปลี่ยนแปลงเช่นเดียวกัน (กิจการ และคณะ, 2539)

3. สารอาหาร เป็นปัจจัยสำคัญต่อการดำรงชีวิตของปลา สารอาหารแบ่งออกเป็น 2 ประเภท คือ สารอาหารหลัก (macronutrient) เช่น โปรตีน คาร์โบไฮเดรต และไขมัน และสารอาหารรอง (micronutrient) เช่น วิตามินและเกลือแร่ หากร่างกายได้รับสารอาหารทั้งสองประเภทในปริมาณเพียงพอและเหมาะสมนอกจากจะทำให้การเจริญเติบโตดีแล้วยังสามารถส่งเสริมให้ระบบการทำงานของร่างกาย รวมทั้งระบบภูมิคุ้มกันมีประสิทธิภาพเช่นเดียวกัน (วุฒิพร, 2541)

5. วิธีการตรวจวัดการตอบสนองของระบบภูมิคุ้มกันในปลา

ในการตอบสนองของภูมิคุ้มกันโดยทั่วไป เกิดขึ้น 2 แบบ คือ การตอบสนองต่อแอนติเจนที่เข้าสู่ร่างกายครั้งแรกเรียกว่า primary immune response และการตอบสนองต่อแอนติเจนชนิดเดิมในครั้งต่อไปเรียกว่า secondary immune response ซึ่งการตอบสนองทั้งสองแบบมีบทบาทในการกำหนดการเกิดและไม่เกิดโรค ภูมิคุ้มกันของร่างกายเกิดการตอบสนองต่อแอนติเจนที่เข้าสู่ร่างกายครั้งแรกช้าและเกิดในปริมาณต่ำ หากเชื้อโรคมีปริมาณมากเกินกว่าภูมิคุ้มกันของร่างกายจะต้านทานได้ก็จะทำให้เกิดโรค ภูมิคุ้มกันภายในร่างกายจะเกิดการตอบสนองต่อแอนติเจนชนิดเดิมในครั้งต่อไปอย่างรวดเร็วและมีปริมาณสูง เชื้อโรคชนิดเดิมที่เข้าสู่ร่างกายในครั้งหลังจึงมักจะถูกกำจัดทำให้ไม่เกิดโรค (สุทธิพันธ์ และคณะ, 2543)

การตอบสนองของภูมิคุ้มกันในปลาส่วนใหญ่เกิดขึ้นในระดับโมเลกุลและเซลล์ วิธีการตรวจสอบหรือวัดการตอบสนองของภูมิคุ้มกันแบบไม่จำเพาะเจาะจงและแบบจำเพาะเจาะจงที่เกิดขึ้นจึงมีหลายวิธีการ ทั้งนี้ขึ้นอยู่กับวัตถุประสงค์ของการตรวจสอบ ความไวและความแม่นยำของแต่ละวิธี เช่น การตรวจวัดการตอบสนองของภูมิคุ้มกันแบบสารน้ำ เช่น คอมพลีเม้นท์และไลโซไซม์ เป็นต้น การตรวจวัดการทำงานของคอมพลีเม้นท์ทำได้ โดยการตรวจวัดปริมาณคอมพลีเม้นท์ที่มีอยู่ในน้ำเลือด (serum) หรือในพลาสมา (plasma) ที่สามารถทำให้เม็ดเลือดแดงกระต่ายซึ่งรู้ปริมาณแตก 50 เปอร์เซ็นต์ (haemolytic complement (ACH_{50})) มีหน่วยเป็นจำนวนหน่วย (units) ACH_{50} ต่อหนึ่งมิลลิลิตรของซีรัม โดยการใช้เครื่องสเปกโตรโฟโตมิเตอร์ (spectrophotometer) เป็นเครื่องมือในการตรวจวัดปฏิกิริยาจากการเปลี่ยนแปลงค่าการดูดกลืนแสง หรืออาจใช้เครื่อง ELISA ก็ได้ สำหรับภูมิคุ้มกันแบบเซลล์ส่วนใหญ่จะวัดพารามิเตอร์ที่เกิดขึ้นจาก

กระบวนการเกิดฟาโกซัยโตซีส เช่น การกลืนกินสิ่งแปลกปลอมของเซลล์ฟาโกซัยท์ด้วยการใช้ fluorescence bead เป็นสิ่งแปลกปลอม จำเป็นต้องดูการจับกินเม็ด fluorescence bead ของเซลล์ฟาโกซัยท์ด้วยกล้องจุลทรรศน์แบบ fluorescence หรือสามารถใช้เครื่องมือ flowcytometry ในการตรวจวัดชนิดของเซลล์ฟาโกซัยท์ในขณะเกิดฟาโกซัยโตซีส การตรวจสอบการตอบสนองภูมิคุ้มกันพารามิเตอร์อื่นๆ ดังในตารางที่ 3

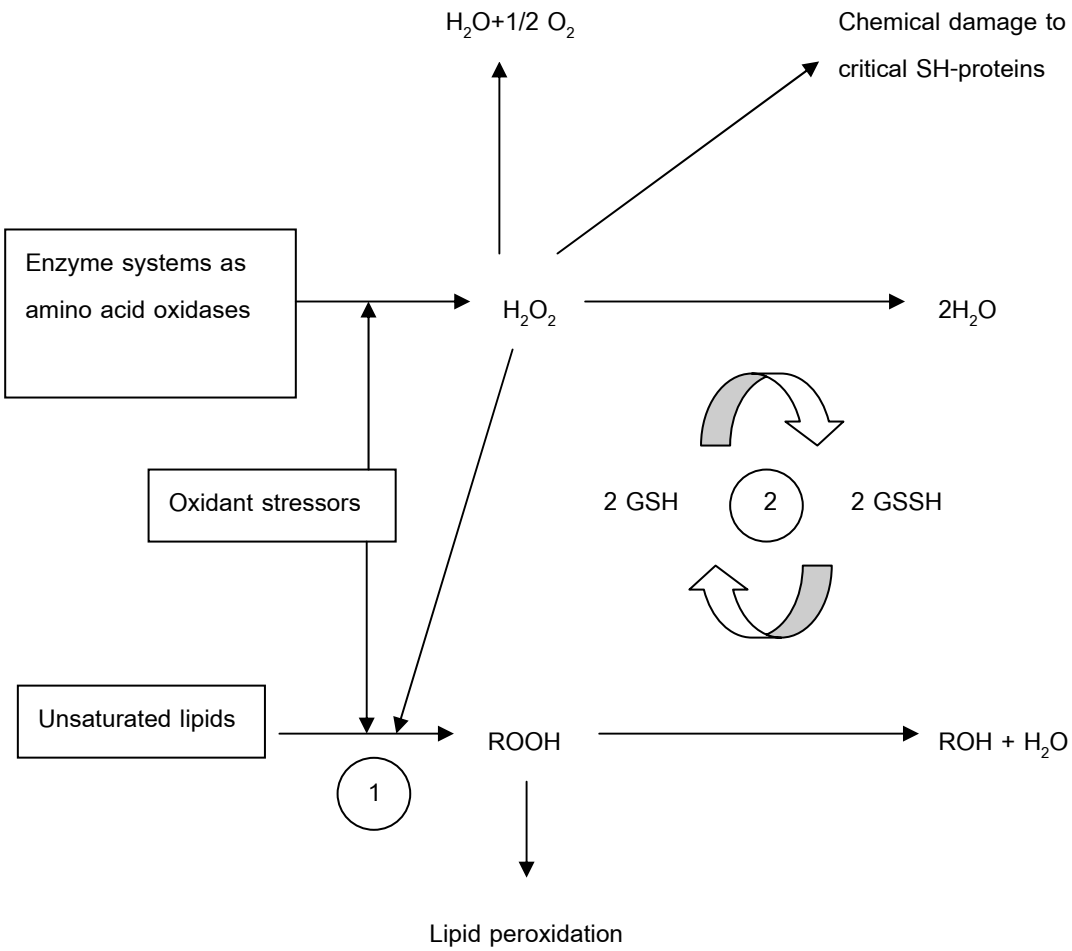
ตารางที่ 3 วิธีการตรวจวัดการตอบสนองของระบบภูมิคุ้มกัน

Parameters	Methodology	Determination
Chemotaxis	Migration test in specific chambers and macroscopic observation	Migration index
Phagocytosis - ingestion of yeasts - ingestion of latex beads	- Staining and microscopic observation - Flow cytometry - Fluorescence	Phagocytic activity/index
Oxidative burst - intra cellular - extra cellular - Total	- Flow cytometry - Chemiluminescence with luminal or colorimetric assay	Reactive oxygen species and free radical production
Lymphocyte proliferation induced by mitogen or antigen-specific	Uptake of tritiated thymidine Flow cytometry Tetrazolium salts	Stimulation index
Non specific cytoxicity (NCC)	Chromium release assay Flow cytometry LDH assay	Percentage lysis of target cells
Lysozyme	Turbidimetry Fluorimetry	Units: decrease in optical density (plasma, tissue, mucus)
Complement	Spectrophotometry	ACH_{50} units determined using a 50% hemolytic assay
Specific antibody	ELISA Passive hemolytic assay	Antibody levels or titers Plaque counts
Total immunoglobulin	Spectrophotometry	Molecular weight based precipitation

ที่มา : ดัดแปลงจาก Verlhac และ Kiron (2004)

6. ความสัมพันธ์ของซีลีเนียมกับวิตามินอี

ซีลีเนียมและวิตามินอีมีความสัมพันธ์กันในการป้องกันการทำลายเนื้อเยื่อ อันเกิดจากกระบวนการ peroxidation ซึ่งเกิดจากสารประกอบ peroxides และ hydrogen peroxides ผลจากการที่เนื้อเยื่อถูกทำลายทำให้ง่ายต่อการเกิดโรค (สุนีย์รัตน์, 2541) ทั้งซีลีเนียมและวิตามินอีส่งเสริมการทำงานซึ่งกันและกัน (Combs and Combs, 1986; Thorarinsson *et al.,* 1994)



ภาพที่ 7 ความสัมพันธ์ของสารแอนตี้ออกซิแดนท์ระหว่างซีลีเนียมและวิตามินอี

ที่มา : ดัดแปลงจาก Hoekstra และคณะ (1974)

จากรายงานของ Hoekstra และคณะ (1974) พบว่าวิตามินอีทำหน้าที่เป็นสารต้านอนุมูลอิสระ (antioxidant) ภายในเซลล์ชั้นใน ป้องกันการเกิดออกซิเดชั่นของสารเปอร์ออกไซด์กับกรดไขมันไม่อิ่มตัวบริเวณผนังเซลล์ ขณะที่ซีลีเนียมเป็นองค์ประกอบของเอนไซม์กลูทาไธโอนเปอร์ออกซิเดส ป้องกันการเกิดออกซิเดชั่นโดยเปลี่ยนไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์และลิปิดไฮโดรเปอร์ออกไซด์เป็นน้ำและแอลกอฮอล์ตามลำดับ ซีลีเนียมและวิตามินอีทำงานต่างกันแต่มีความสัมพันธ์กันในการป้องกันเซลล์จากการทำลายจากปฏิกิริยาออกซิเดชั่น ภาพที่ 7

จากการทดลองของ Poston และคณะ (1976) เกี่ยวกับความสัมพันธ์ของวิตามินอีและซีลีเนียมในปลาแซลมอน (*Salmo salar*) พบว่า การเสริมซีลีเนียม 0.1 μg/g ร่วมกับวิตามินอี 0.5 IU/g อาหาร ช่วยลดอัตราการตายของปลาแซลมอนน้ำหนักเริ่มต้น 0.1 กรัม และสามารถป้องกันโรคกล้ามเนื้อพิการ (muscular dystrophy) ในปลาที่มีน้ำหนักเริ่มต้น 0.9 กรัมได้ นอกจากนี้ยังพบว่าเมื่อปลาแซลมอนได้รับอาหารที่ขาดทั้งวิตามินอี และซีลีเนียมทำให้เกิดภาวะเลือดจาง เม็ดเลือดแดงเปราะบางแตกง่ายกว่าปกติ เหงือกซีด ผิวหนังซีด และการทำงานของเอนไซม์กลูทาไธโอนเปอร์ออกซิเดสลดลง ทำให้อัตราการตายของปลาเพิ่มสูงขึ้น ปลาแซลมอนเกิดอาการกล้ามเนื้อพิการ (muscular dystrophy) ขณะที่ในปลาเทร้าท์เกิดการบวมน้ำ มีของเหลวใต้ผิวหนัง (exudative diathesis) (Bell *et al*., 1986) ดังนั้นจึงจำเป็นต้องได้รับการเสริมวิตามินอีและซีลีเนียมในอาหารเพื่อป้องกันการเกิดโรค ทิพย์วรรณ (2542) กล่าวว่าการทำหน้าที่ในการป้องกันเซลล์ของวิตามินอีและซีลีเนียมมีความสัมพันธ์กัน อาการขาดวิตามินอีจะรุนแรงเพิ่มมากขึ้น เมื่อขาดซีลีเนียมร่วมด้วย แต่อย่างไรก็ตามถึงแม้สารอาหารทั้งสองชนิดจะทดแทนกันได้ในบางส่วน แต่การเพิ่มวิตามินอีในปริมาณมากขึ้น ไม่ได้ช่วยลดภาวะการขาดซีลีเนียมได้

จากการศึกษาของ Bell และคณะ (1985) เกี่ยวกับผลของวิตามินอีและซีลีเนียมต่อการทำงานของเอนไซม์กลูทาไธโอนเปอร์ออกซิเดส และการเกิดเปอร์ออกซิเดชั่นในเนื้อเยื่อของปลาเทร้าท์ โดย พบว่าน้ำหนักปลาที่ได้รับอาหารเสริมวิตามินอีและซีลีเนียมในปริมาณน้อย (วิตามินอี 1.96 และซีลีเนียม 0.060 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัมอาหาร) มีน้ำหนักตัวและปริมาณเม็ดเลือดแดงอัดแน่นต่ำกว่าชุดการทดลองอื่นๆอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.05$) และพบว่าปลาแสดงอาการของโรค exudative diathesis คือตัวเหลืองซีดและท้องบวมเนื่องจากมีน้ำในช่องท้อง นอกจากนี้ปริมาณวิตามินอีมีผลต่อปริมาณซีลีเนียมในพลาสมา นั่นคือปริมาณซีลีเนียมในพลาสมามีค่าสูงในปลาที่ได้รับวิตามินอีสูง ขณะเดียวกันการทำงานของเอนไซม์กลูทาไธโอนเปอร์ออกซิเดสในตับและพลาสมาขึ้นกับปริมาณซีลีเนียมที่เพิ่มขึ้นในอาหาร ส่วน Plasma pyruvate kinase มีค่าสูงสุดในเมื่อได้รับซีลีเนียมและวิตามินอีน้อย ส่งผลให้มีการรั่วซึมของเอนไซม์ออกนอกเซลล์

และจากการศึกษาของ Zhu และคณะ (1992) เกี่ยวกับผลของวิตามินอีและซีลีเนียมต่อการทำหน้าที่เป็นสารต้านอนุมูลอิสระในหนูแตกต่างกันดังนี้

1. วิตามินอีทำหน้าที่บนผนังเซลล์มีชีวิต ขณะที่ซีลีเนียมเป็นองค์ประกอบของเอนไซม์กลูทาไธโอนเปอร์ออกซิเดสทำหน้าที่ในไซโตพลาสซึม

2. วิตามินอีป้องกันการเกิดลิปิดเปอร์ออกซิเดชั่นได้มีประสิทธิภาพมากกว่าซีลีเนียม ขณะเดียวกันซีลีเนียมป้องกันการเกิดอนุมูลอิสระได้มีประสิทธิภาพมากกว่าวิตามินอี

3. วิตามินอีป้องกันไขมันบริเวณผนังเซลล์ไม่ให้มีการออกซิแดนท์ส่วนซีลีเนียมป้องกันกลุ่มซัลเฟอร์ของโปรตีนบริเวณผนังเซลล์ไม่ให้มีการออกซิแดนท์

จากการศึกษาของ Wise และคณะ (1993) เกี่ยวกับผลของซีลีเนียมและวิตามินอีต่อการแตกของเซลล์เม็ดเลือดแดง การทำงานของเอนไซม์กลูทาไธโอนเปอร์ออกซิเดส และการผลิตซุปเปอร์ออกไซด์ของเซลล์แมคโครฟาจในปลาดุกอเมริกัน พบว่าปลาที่ได้รับอาหารขาดวิตามินอีเกิดการแตกของเซลล์เม็ดเลือดแดงมากกว่าชุดการทดลองที่ได้รับอาหารเสริมวิตามินอี อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.05$) ส่วนการทำงานของเอนไซม์กลูทาไธโอนเปอร์ออกซิเดสมีค่าสูงในปลาที่ได้รับอาหารเสริมซีลีเนียม และพบว่าเมื่อปริมาณซีลีเนียมสูงขึ้นปริมาณเอนไซม์กลูทาไธโอนเปอร์ออกซิเดสก็เพิ่มขึ้นตามไปด้วย สำหรับปริมาณซุปเปอร์ออกไซด์ที่ผลิตจากเซลล์แมคโครฟาจมีค่าสูงสุดในปลาที่ได้รับอาหารเสริมที่มีปริมาณวิตามินอีและซีลีเนียมสูง (วิตามินอี 240 และซีลีเนียม 0.8 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัมอาหาร)

จากการศึกษาของ Thorarinsson และคณะ (1994) เกี่ยวกับผลของวิตามินอีและซีลีเนียมต่อการเจริญเติบโตและอัตรารอดในปลา Chinook salmon (*Oncorhynchus tshawytscha*) พบว่าเมื่อปริมาณวิตามินอีสูงมีผลต่อการเจริญเติบโตสูง ซึ่งความสัมพันธ์ทางสถิติระหว่างวิตามินอีและซีลีเนียมอยู่ที่ $P=0.061$ ชี้ให้เห็นว่าวิตามินอีในปริมาณสูงอย่างเดียวมีผลต่อการเจริญเติบโตมากกว่ามีทั้งวิตามินอีและซีลีเนียมในปริมาณสูง ในส่วนของอัตรารอดพบว่าวิตามินอีและซีลีเนียมในปริมาณสูงมีผลทำให้ปลามีอัตรารอด 100 เปอร์เซ็นต์ ขณะที่เมื่อปลาได้รับอาหารเสริมวิตามินอีอย่างเดียวมีอัตรารอดเพียง 71 เปอร์เซ็นต์ และพบว่าวิตามินอีมีผลต่อปริมาณเม็ดเลือดแดงอัดแน่น ส่วนซีลีเนียมไม่มีผลต่อปริมาณเม็ดเลือดแดงอัดแน่น แต่มีผลต่อการทำงานของเอนไซม์กลูทาไธโอนเปอร์ออกซิเดส ขณะที่วิตามินอีไม่มีผล อย่างไรก็ตามผลของวิตามินอีและซีลีเนียมต่อการเกิดโรค *Renibacterium salmoninarum* ยังไม่ชัดเจน

ขณะที่ Sheffy และ Schultz (1979) พบว่าซีลีเนียมมีบทบาทสำคัญต่อกลไกการทำงานของระบบภูมิคุ้มกันด้านเซลล์และสารน้ำ การเสริมซีลีเนียมและวิตามินอีในปริมาณที่มากกว่าปริมาณที่ปลาต้องการเพื่อการเจริญเติบโต มีผลในการกระตุ้นภูมิคุ้มกัน เช่นเดียวกับ Oh และคณะ

(1982) พบว่าการเสริมซีลีเนียมและวิตามินอีในอาหารให้หนูกินทำให้อัตรารอดของเซลล์ฟาโกซัยท์เพิ่มขึ้น เพราะสารอาหารทั้งสองร่วมกันป้องกันเซลล์ฟาโกซัยท์จากเปอร์ออกไซด์ขณะจับกินสิ่งแปลกปลอม (phagocytosis)

7. บทบาทของซีลีเนียมต่อการทำงานของระบบภูมิคุ้มกันในปลา

ปลาเป็นสัตว์น้ำที่ต้องการซีลีเนียมในการเจริญเติบโต แต่ต้องการในปริมาณน้อยมากเมื่อเทียบกับสัตว์บก ปลาสามารถรับซีลีเนียมผ่านทางน้ำได้ (Hodson *et a*l., 1980 อ้างตาม Santosh, 2002) National Research Council (1976) รายงานปริมาณซีลีเนียมในแหล่งน้ำจืดมีประมาณ 0.2-10.0 ไมโครกรัมต่อลิตร ในแหล่งน้ำทะเลมีซีลีเนียมประมาณ 0.09 ไมโครกรัมต่อลิตร จากการศึกษาของ Hodson และคณะ (1980) อ้างตาม Santosh (2002) พบว่าปลาแซลมอนได้รับซีลีเนียมจากน้ำในรูปของซีลีไนท์ผ่านทางเหงือก สำหรับซีลีเนียมส่วนเกินจะถูกขับออกทางเหงือก และขับถ่ายออกจากร่างกายในรูปของยูรีน (urine)

ปลาได้รับซีลีเนียมทั้งจากอาหารและแหล่งน้ำที่อาศัยอยู่ ปริมาณซีลีเนียมที่เหมาะสมในปลาแต่ละชนิดแตกต่างกันขึ้นอยู่กับรูปแบบของซีลีเนียม ปริมาณวิตามินอีที่มีอยู่ในอาหาร และปริมาณซีลีเนียมที่มีในน้ำ (Santosh, 2002) ปริมาณซีลีเนียมที่ปลาแต่ละชนิดได้รับมีผลต่อการดำรงชีวิต ดังนี้

7.1 ซีลีเนียมในปริมาณที่ไม่เพียงพอ (Deficiency)

บทบาทของสารอาหารมีความสำคัญและสัมพันธ์ต่อการเกิดโรค ในสภาวะที่ร่างกายขาดสารอาหารหรือได้รับในปริมาณน้อยเกินไปไม่เพียงพอกับความต้องการของร่างกายจะทำให้ปลาง่ายต่อการเกิดโรค เนื่องจากการตอบสนองของภูมิคุ้มกันภายในร่างกายมีการเปลี่ยนแปลงเกิดขึ้น (McKenzie *et al*,. 1998) ซึ่ง Beck และคณะ (2003) พบว่าหากร่างกายได้รับซีลีเนียมในปริมาณที่ไม่เพียงพอต่อความต้องการจะทำให้ปลาไม่โต ไม่แข็งแรง การทำหน้าที่ของระบบภูมิคุ้มกันในการป้องกันการเกิดโรค รวมทั้งองค์ประกอบต่างๆ ของระบบภูมิคุ้มกันล้มเหลว ไม่สามารถทำหน้าที่ได้ตามปกติ ซึ่งในแต่ละพื้นที่ของแต่ละประเทศจะมีปริมาณซีลีเนียมที่แตกต่างกัน หากพื้นที่ใดมีปริมาณซีลีเนียมในดินและน้ำน้อยจะทำให้พืชและสัตว์ในบริเวณดังกล่าวได้รับซีลีเนียมน้อยไม่เพียงพอกับความต้องการ ส่งผลให้สัตว์ที่เลี้ยงในบริเวณดังกล่าวเป็นโรคที่เกิดจากการขาดซีลีเนียมได้ ดังนั้นจึงจำเป็นต้องมีการนำซีลีเนียมมาเสริมในอาหารสัตว์แต่ละชนิดเพื่อเพิ่มภูมิต้านทานโรคให้กับสัตว์เหล่านี้

ปลาได้รับซีลีเนียมผ่านทางเหงือก ผิวหนังและลำไส้ มีการสะสมและส่งผ่านซีลีเนียมตามลำดับห่วงโซ่อาหาร (Hodson *et a*l., 1980 อ้างตาม Santosh, 2002) การได้รับซีลีเนียมในปริมาณไม่เพียงพอกับความต้องการเป็นสาเหตุให้การเจริญเติบโตของปลาหลายชนิดลดลง เช่น ปลาเทร้าท์ (Hilton *et al*., 1980) ปลาคาร์พ (Satoh *et al*., 1983b อ้างตาม Santosh, 2002) และปลาดุกอเมริกัน (Gatlin and Wilson, 1984)

Bell และคณะ (1987) พบว่าหากปลาแซลมอนได้รับอาหารที่มีซีลีเนียมต่ำกว่า 0.017 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัมอาหาร เป็นวลา 28 สัปดาห์ จะทำให้การเจริญเติบโตช้า ปริมาณเม็ดเลือดแดงและปริมาณซีลีเนียมในเนื้อเยื่อและการทำงานของเอนไซม์กลูทาไธโอนเปอร์ออกซิเดสลดลง และอาการจะดีขึ้นเมื่อได้รับซีลีเนียม 0.944 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัมอาหาร

Lovell และ Wang (1987) ได้ศึกษาผลของซีลีเนียมต่อความต้านทานโรค Enteric-Septicaemia of Catfish (ESC) ในปลาดุกอเมริกัน โดยพบว่าปลาที่ขาดซีลีเนียมจะมีอัตราการตายสูงถึง 92 เปอร์เซ็นต์ เมื่อได้รับเชื้อโรค ESC เนื่องจากการสร้างแอนติบอดีจะลดลง ซึ่ง Spallholz (1990) ศึกษาพบว่าการทำงานของเอนไซม์กลูทาไธโอนเปอร์ออกซิเดสลดลงเมื่อขาดซีลีเนียมและส่งผลต่อการผลิตแอนติบอดีจาก B-cell ลดลง

Wise และคณะ (1993) พบว่าหากปลาดุกอเมริกันได้รับอาหารที่ขาดซีลีเนียม จะทำให้ประสิทธิภาพในการทำลายเชื้อโรคของแมคโครฟาจลดลง แต่เมื่อได้รับซีลีเนียม 0.80 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัมอาหาร และวิตามินอี 240 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัมอาหาร ปริมาณการผลิต superoxide จากแมคโครฟาจเพิ่มสูงขึ้น ทำให้อัตราการตายลดลง

Gatlin และ Wilson (1984) กล่าวว่าเพื่อป้องกันการขาดซีลีเนียมจึงจำเป็นต้องได้รับการเสริมซีลีเนียมในปริมาณที่ปลาต้องการ 0.25 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัมอาหาร หากขาดซีลีเนียมหรือได้รับไม่เพียงพอจะส่งผลต่อการทำงานของตับ (Hepatic) ทำให้การกินอาหาร ประสิทธิภาพในการใช้อาหารและการเจริญเติบโตลดลง เนื่องจากการทำงานของเอ็นไซม์กลูทาไธโอนเปอร์ออกซิเดสในพลาสมาและตับลดลง ส่งผลให้การทำหน้าที่ของภูมิคุ้มกันลดลง

7.2 ซีลีเนียมในปริมาณที่เหมาะสม (Optimum)

การที่ซีลีเนียมจะสามารถเพิ่มภูมิคุ้มกันให้เกิดขึ้นภายในร่างกายได้นั้นขึ้นอยู่กับปริมาณซีลีเนียมที่เป็นองค์ประกอบของเอนไซม์กลูทาไธโอนเปอร์ออกซิเดสเป็นสำคัญ ดังรายงานของ Combs และ Scott (1974) กล่าวว่าการทำงานของเอนไซม์กลูทาไธโอนเปอร์ออกซิเดสมีความสำคัญในการทำหน้าที่ของกระบวนการเมตาบอลิซึมที่เกิดขึ้นภายในร่างกาย และจากรายงานของ Santosh (2002) พบว่าปริมาณความต้องการซีลีเนียมที่เหมาะสมต่อการเจริญเติบโตส่งผลให้

การทำงานของเอนไซม์กลูทาไธโอนเปอร์ออกซิเดสในพลาสมามากที่สุด การทำงานของระบบภูมิคุ้มกันจะดำเนินไปได้ดีมีประสิทธิภาพต้องอยู่ภายในร่างกายที่มีการเจริญเติบโตที่สมบูรณ์แข็งแรง (McKenzie *et al*,. 1998) ดังนั้นจึงจำเป็นต้องศึกษาชนิดและปริมาณซีลีเนียมที่เหมาะสมต่อการเจริญเติบโตในปลาแต่ละชนิด เมื่อปลาโตดี แข็งแรง ย่อมส่งผลให้ภูมิคุ้มกันทำงานได้ดีเช่นเดียวกัน

จากการศึกษาในปลาเทร้าท์พบว่าปริมาณซีลีเนียมที่ปลาเทร้าท์ต้องการในการเจริญเติบโต เท่ากับ 0.15-0.38 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัมอาหาร (Hilton *et al*., 1980) ปลาดุกอเมริกันต้องการซีลีเนียมปริมาณ 0.25 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัมอาหาร (Gatlin and Wilson, 1984) ปลาแซลมอนต้องการซีลีเนียมปริมาณ 0.1 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัมอาหาร (Poston *et al*., 1976) และปลากะรังต้องการปริมาณ 0.79 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัมอาหาร (Lin and Shiau, 2005b) ขณะที่ปลา Coho salmon ต้องการซีลีเนียมสูงประมาณ 5-7 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัมอาหาร (Felton *et al*., 1996 อ้างตาม Santosh, 2002) จากการศึกษาของ Combs และ Combs (1986) พบว่าปริมาณซีลีเนียมที่เหมาะสมกับความต้องการในสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนมมีผลต่อการทำงานของเอนไซม์กลูทาไธโอนเปอร์ออกซิเดสในการป้องกัน B-cell จากการทำลายของไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ ซึ่งเกิดขึ้นจากกระบวนการกลืนกินสิ่งแปลกปลอม (Phagocytosis) ของเซลล์ได้

Dodig และ Cepelak (2004) กล่าวว่าปริมาณซีลีเนียมเพิ่มขึ้นจากปริมาณที่เหมาะสมต่อการเจริญเติบโตมีผลเพิ่มการทำงานของระบบภูมิคุ้มกันในสัตว์ได้ ซึ่งสอดคล้องกับรายงานของ Finch และ Turner (1996) ที่พบว่าการได้รับซีลีเนียมร่วมกับวิตามินอีในปริมาณที่มากกว่าปริมาณที่ต้องการเพื่อการเจริญเติบโต มีผลเพิ่มการทำงานของเอนไซม์กลูทาไธโอนเปอร์ออกซิเดส รวมทั้งการตอบสนองของภูมิคุ้มกันให้เพิ่มขึ้นได้ดังนี้

Liang และคณะ (2006) พบว่าการเพิ่มกลูทาไธโอน 50 มิลลิกรัมต่อลิตร ในหลอดทดลองซึ่งมีอาหารเลี้ยงเซลล์แมคโครฟาจของปลานิล มีผลทำให้การตอบสนองของเซลล์แมคโครฟาจเพิ่มขึ้น โดยมีค่า Respiratory burst activity สูงสุด 90 เปอร์เซ็นต์

Wise และคณะ (1993) พบว่าการเสริมซีลีเนียมและวิตามินอีสูงกว่าที่ปลาดุกอเมริกันต้องการเพื่อการเจริญเติบโต 4 เท่า (0.8 mg Se/kg, 240 mg tocopherol acetate/kg) หรือเพิ่มอย่างใดอย่างหนึ่งมีผลเพิ่มการทำงานของเซลล์แมคโครฟาจ

Lin และ Shiau (2006) พบว่าหากเพิ่มปริมาณซีลีโนเมทไธโอนีน 2 เท่า (1.6 mg Se/kg) จากที่ปลากะรังต้องการสามารถลดการเกิด Oxidative stress เพิ่มการเจริญเติบโตและภูมิคุ้มกันในปลา โดยมีค่า Respiratory burst activity Total immunoglobulin และ Lysozyme activity เพิ่มสูงขึ้น

7.3 ซีลีเนียมในปริมาณที่มากเกินไป (Excessive)

ปลาสามารถขับซีลีเนียมส่วนเกินจากที่ร่างกายต้องการผ่านทางเหงือกและการขับถ่ายในรูป urine (Hodson *et al*.,1980; อ้างตาม Santosh, 2002) แต่หากได้รับอย่างต่อเนื่องจะเกิดการสะสมซีลีเนียมมากขึ้นส่งผลให้เกิดความเป็นพิษของซีลีเนียม (selenium toxicity) ขึ้นได้

จากการทดลองของ Gatlin และ Wilson (1984) ในปลาดุกอเมริกันพบว่าหากปลาดุกได้รับซีลีเนียมในรูปของโซเดียมซีลีไนท์ 15 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัมอาหาร จะทำให้ปลามีอัตราการเจริญเติบโตและประสิทธิภาพการใช้อาหารลดลง ก่อนตาย 12-24 ชั่วโมงจะว่ายน้ำควงสว่านไม่สัมพันธ์กัน และมีอัตราการตายสูงเช่นเดียวกับปลาเทร้าท์ที่ได้รับโซเดียมซีลีไนท์ 13 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัมอาหาร (Hilton *et al*., 1980) และ 10 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัมอาหาร (Goettl and Davies, 1978) ซึ่ง Hilton และคณะ (1980) กล่าวไว้ว่าปลาเทร้าท์เมื่อได้รับซีลีเนียมมากเกินไปในระยะเวลาสั้นๆ ปลาจะมีการปรับเปลี่ยนพฤติกรรมและสรีระวิทยาของร่างกายเพื่อลดซีลีเนียมในร่างกายได้โดยการปัสสาวะ ขับถ่าย และการหายใจผ่านเหงือก

และจากการศึกษาของ Lemly (1997) พบว่าเมื่อลูกปลาหางนกยูงได้รับซีลีเนียมมากกว่า 3 ไมโครกรัมต่อกรัมอาหาร มีผลให้กล้ามเนื้อส่วนครีบ หัว และปากผิดปกติ เพราะโครงสร้างโมเลกุลโปรตีนถูกบล็อก เกิดการแทนที่ซัลเฟอร์ด้วยซีลีเนียมในตำแหน่งที่ไม่เหมาะสม ทำให้เนื้อเยื่อบางส่วนไม่เจริญเติบโต เกิดความผิดปกติหรือพิการ (teratogenesis)

ในประเทศสหรัฐอเมริกาพบการปนเปื้อนของซีลีเนียมในทะเลสาบ Belews โดยมีปริมาณซีลีเนียมสูงถึง 20 ไมโครกรัมต่อลิตร ทำให้ลูกปลาที่อาศัยอยู่ในทะเลสาบมีอาการตาโปน การพัฒนาการเป็นตัวอ่อนผิดปกติ กระดูกสันหลัง และกระดูกด้านข้างโค้งงอ ระบบการสืบพันธุ์ล้มเหลวไม่มีการฟอร์มไข่ ส่งผลให้ปลาหลายชนิดในทะเลสาบมีปริมาณลดน้อยลง และบางชนิดสูญพันธุ์ไป นอกจากนี้ยังพบว่าอาการเริ่มแรกที่ปลาตอบสนองเมื่อได้รับซีลีเนียมในปริมาณสูงคือซี่เหงือกมีการบวม และโป่งพองจากการคั่งของเม็ดเลือดแดง ปริมาณเม็ดเลือดแดงลดลงจาก 39 เปอร์เซ็นต์ เป็น 33 เปอร์เซ็นต์ เช่นเดียวกับปริมาณ Hemoblasts ลดลง ขณะที่ปริมาณเม็ดเลือดขาวเพิ่มมากขึ้น (Lemly, 2002)

8. การตอบสนองของระบบภูมิคุ้มกันในปลากะพงขาว

Obach และคณะ (1993) พบว่าวิตามินอีมีผลต่อระบบภูมิคุ้มกันในปลากะพงขาวสายพันธุ์ที่เลี้ยงในยุโรป *(Dicentrarchus labrax)* ซึ่งในปลาทดลองที่ได้รับวิตามินอีในปริมาณ 40 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัมอาหาร มีการแตกของเม็ดเลือดแดงสูงกว่ากลุ่มที่ได้รับวิตามินอีในปริมาณ 300 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัมอาหาร และเมื่อทดสอบความสามารถในการต้านทานโรคต่อเชื้อ *Vibrio*

anguillarum พบว่าปลาที่ได้รับวิตามินอี 300 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัมอาหารสามารถต้านทานเชื้อได้สูงกว่าปลาที่ได้รับวิตามินอีในปริมาณ 40 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัมอาหาร และมีการตอบสนองของภูมิคุ้มกันของสารน้ำได้แก่ complement activity สูงกว่า แต่ไม่พบความแตกต่างในการสร้างแอนติบอดีทุกกลุ่มทดลอง

Sitja-Bobadilla และ Perez-Sanchez (1999) พบว่าเมื่อมีการเพิ่มเปอร์เซ็นต์ไขมันและโปรตีนในอาหารเม็ดเลี้ยงปลากะพงขาว (*Dicentrarchus labrax*) จากเดิมเป็นอาหารเม็ดที่มีเปอร์เซ็นต์ไขมัน และโปรตีน 9 และ 46 เปอร์เซ็นต์ เป็น 17 และ 55 เปอร์เซ็นต์ ทำให้การตอบสนองของภูมิคุ้มกันของสารน้ำได้แก่ lysozyme activity ลดลง จาก 2,581.30±161.3 ยูนิตต่อมิลลิลิตร เป็น 1,210.53±100.1 ยูนิตต่อมิลลิลิตร ขณะที่การผลิตซุปเปอร์ออกไซด์แอนไอออนของเซลล์เม็ดเลือดขาวจากการกลืนกิน lipopolysaccharide (LPS) ซึ่งสกัดจากผนังเซลล์ *Salmonella typhimurium* มีค่าสูงกว่าปลาที่ได้รับอาหารที่มีเปอร์เซ็นต์ไขมัน 17 โปรตีน 55 เปอร์เซ็นต์

นอกจากนี้จากการศึกษาของ Bagni และคณะ (2005) ในการเสริมเบต้ากลูแคนซึ่งสกัดจากยีสต์ *Saccaromyces cerevisiae* และกรดอัลจินิค (alginic acid) ซึ่งได้จากการสกัดสาหร่าย *Laminaria digitata* 99 เปอร์เซ็นต์ ร่วมกับ *Ascofillum nodosum* 1 เปอร์เซ็นต์ ในอาหารสำเร็จรูปเลี้ยงปลากะพงขาว (*D. labrax*) ที่มีน้ำหนักเฉลี่ย 80±12 กรัม เป็นเวลา 15 วัน จากนั้นให้กินอาหารปกติเลี้ยงต่อไปจนครบ 60 วัน พบว่าหลังให้กินอาหารทดลองทั้งสองสูตรเป็นเวลา 15 วัน ปลามีปริมาณ complement activity และ lysozyme activity เพิ่มขึ้นที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์ ($p<0.05$) เมื่อเทียบกับชุดควบคุม เมื่อเลี้ยงครบ 30 วัน ปลาที่ได้รับอาหารเสริมกรดอัลจินิคเท่านั้นที่มีปริมาณ complement activity เพิ่มขึ้น หลังจากเลี้ยงครบ 45 วัน ปริมาณ complement activity และ lysozyme activity ไม่แตกต่างกันระหว่างแต่ละชุดการทดลอง นอกจากนี้พบว่าการลดลงของปริมาณ complement activity และ lysozyme activity มีความสัมพันธ์กับการเปลี่ยนแปลงอุณหภูมิน้ำที่ระดับความเชื่อมั่น 99 เปอร์เซ็นต์ แสดงว่าการเปลี่ยนแปลงอุณหภูมิมีผลให้การทำงานของระบบภูมิคุ้มกันในปลากะพงขาวเปลี่ยนแปลง

Salati และคณะ (2005) พบว่าวัคซีน crude lipopolysaccharide จากเชื้อ *Tenacibaculum maritimum* สามารถเพิ่มปริมาณแอนติบอดีไตเตอร์ ในปลากะพงขาว หลังจากได้รับวัคซีนครั้งที่ 1 ส่วนค่า phagocytosis เพิ่มขึ้นหลังจากได้รับวัคซีนครั้งที่ 2 เมื่อเทียบกับชุดควบคุม

เยาวนิตย์และจารุรัตน์ (2527) ศึกษาการเปลี่ยนแปลงระบบเลือดในปลากะพงขาว (*Lates calcarifer*) ที่เป็นโรคไต (kidney disease) เปรียบเทียบกับปลาปกติ พบว่าปลาที่เป็นโรคทุกตัว มีค่าเปอร์เซ็นต์เม็ดเลือดแดงอัดแน่น (haematocrit) เฉลี่ย 9.3 เปอร์เซ็นต์ ต่ำกว่าปลาปกติเฉลี่ย 40.39

เปอร์เซ็นต์ ส่วนค่าปริมาณโปรตีนรวม (total protein) ลดต่ำลงในปลาบางตัวเท่านั้น ขณะที่ปลาบางตัวยังปกติ

เยาวนิตย์และคณะ (2530) พบว่าการแช่ปลากะพงขาว (*L. calcarifer*) ในมาลาไคท์กรีนเข้มข้น 0.1 ส่วนในล้านส่วน เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ให้ค่าเปอร์เซ็นต์เม็ดเลือดแดงอัดแน่นสูงขึ้น ขณะที่ปริมาณเม็ดเลือดขาวลดลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.05$) และกลับสู่สภาพปกติภายใน 24 ชั่วโมง สำหรับปริมาณฮีโมโกลบิน (haemoglobin) โปรตีนรวม เม็ดเลือดแดง และเปอร์เซ็นต์เม็ดเลือดขาวแต่ละชนิด (differential leukocyte count) ไม่มีการเปลี่ยนแปลง ส่วนปลาที่แช่ในมาลาไคท์กรีนที่มีความเข้มข้นต่ำ จะเกิดอาการเครียด ความต้านทานลดลงเพียงเล็กน้อย เพราะค่าองค์ประกอบเลือดสามารถเปลี่ยนกลับคืนสู่สภาพปกติภายใน 24 ชั่วโมง

เยาวนิตย์ (2540) ศึกษาองค์ประกอบเลือดของปลากะพงขาว (*L .calcarifer*) จากการติดเชื้อ iridovirus เปรียบเทียบกับปลาปกติพบว่า ปริมาณเม็ดเลือดแดง และเปอร์เซ็นต์เม็ดเลือดแดงอัดแน่นในปลาป่วยลดลงมาก ขณะที่ปริมาณเม็ดเลือดขาวใกล้เคียงกัน ส่วนเปอร์เซ็นต์นิวโทรฟิล (neutrophil) ในปลาป่วยสูงกว่าปลาปกติถึง 4 เท่า แต่เปอร์เซ็นต์ของลิมโฟซัยท์ (lymphocyte) และโมโนซัยท์ (monocyte) ลดลงเมื่อเทียบกับปลาปกติ ดังตารางที่ 4 นอกจากนี้ในปลาป่วยมีความผิดปกติของเซลล์แมคโครฟาจ คือมีขนาดใหญ่ขึ้นเมื่อเทียบกับปลาปกติ และมีจำนวนเม็ดเลือดขาวตาย (necrosis) สูงมากกว่าในปลาปกติ ดังนั้นจึงมีความเป็นไปได้ที่จะนำลักษณะของเซลล์แมคโครฟาจขนาดใหญ่และปริมาณเซลล์เม็ดเลือดขาวที่ตายมาใช้ในการตรวจวินิจฉัยโรคที่มีสาเหตุจากการติดเชื้อ iridovirus

ตารางที่ 4 ค่าองค์ประกอบเลือดในปลาป่วยจากการติดเชื้อ iridovirus และในปลาปกติ

องค์ประกอบเลือด	ปลาป่วย (ค่าเฉลี่ย)	ปลาปกติ (ค่าเฉลี่ย)
RBC (x 10^6 cell/mm^3)	2.0±0.8	4.9±0.7
WBC (x 10^6 cell/mm^3)	2.9±2.3	2.4±1.0
Hct (%)	13.5±4.8	29.6±7.9
Differential leukocyte count		
- lymphocyte (%)	80.6±9.3	91.9±3.8
- monocyte (%)	1.0±0.8	2.9±2.0
- neutrophil (%)	18.4±9.9	5.2±3.5

ค่าเฉลี่ยที่ไม่มีอักษรกำกับตัวเดียวกันแสดงว่ามีความแตกต่างอย่างนัยสำคัญที่ $p<0.05$

ที่มา : ดัดแปลงจากเยาวนิตย์ (2540)

และจากการศึกษาของอรัญญา (2538) เกี่ยวกับผลของเมทิลพาราไธออนซึ่งเป็นสารเคมีในยากำจัดแมลงแล้วมีการปนเปื้อนลงในแหล่งน้ำอาจเป็นสาเหตุให้เกิดความเป็นพิษต่อสัตว์น้ำ โดยได้ทำการศึกษาถึงผลของเมทิลพาราไธออนความเข้มข้นต่างๆ ต่อระบบภูมิคุ้มกันชนิดเซลล์คือ การวัดเปอร์เซ็นต์ phagocytosis ของเซลล์ฟาโกซัยท์จากไตส่วนต้นของปลากะพงขาว (*L.calcarifer*) พบว่า ปลาในกลุ่มที่มีความเข้มข้นของเมทิลพาราไธออนตั้งแต่ 0.6 มิลลิกรัมต่อลิตรขึ้นไป มีเปอร์เซ็นต์ phagocytosis ลดลง โดยปลาในกลุ่มที่มีเมทิลพาราไธออนเข้มข้น 2.4 มิลลิกรัมต่อลิตร มีเปอร์เซ็นต์ phagocytosis ลดลงมากที่สุด 20.12±11.37 แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.05$) กับชุดควบคุมซึ่งไม่มีการปนเปื้อนของสารเคมี โดยมีเปอร์เซ็นต์ phagocytosis อยู่ที่ 52.25±11.14 และพบว่าปลาที่สัมผัสสารดังกล่าวแสดงอาการผิดปกติ โดยลอยตัวนิ่งไม่ตอบสนองต่อสิ่งกระตุ้น นอนตะแคง ก่อนตายแสดงอาการกล้ามเนื้อเกร็ง อ้าปากและแผ่นปิดเหงือกกางออกจนสุด

เยาวนิตย์และจีรนันท์ (2544) ศึกษาผลการเปลี่ยนแปลงอุณหภูมิต่อระบบภูมิคุ้มกันในปลากะพงขาว (*L. calcarifer*) พบว่า การลดและเพิ่มอุณหภูมิทำให้ระบบภูมิคุ้มกันในปลาต่ำจากภาวะปกติ โดยพบว่าค่าเปอร์เซ็นต์ phagocytosis และ phagocytic index ในปลาชุดการทดลองทั้งลดและเพิ่มอุณหภูมิมีค่าต่ำกว่าปลาในชุดควบคุมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.05$) ผลจากการลดอุณหภูมิทำให้ภูมิคุ้มกันลดลงมากกว่าการเพิ่มอุณหภูมิ ดังตารางที่ 5

ตารางที่ 5 ผลการเพิ่มอุณหภูมิจาก 26 เป็น 29 องศาเซลเซียส และการลดอุณหภูมิ จาก 26 เป็น 20 องศาเซลเซียส ต่อเปอร์เซ็นต์ phagocytosis และ phagocytic index ในปลากะพงขาว

ชุดการทดลอง	**การตอบสนองระบบภูมิคุ้มกันของเม็ดเลือดขาว**	
	% phagocytosis (n=8)	**phagocytic index (n=8)**
ชุดควบคุมไม่มีการเปลี่ยนแปลงอุณหภูมิ	43.06±40.36 [a]	35.36±17.90 [a]
ชุดลดอุณหภูมิจาก 26 °C เป็น 20 °C	25.78±10.01 [b]	11.87±8.20 [b]
ชุดเพิ่มอุณหภูมิจาก 26 °C เป็น 29 °C	31.81±5.12 [b]	17.72±5.37 [b]

ค่าเฉลี่ยที่ไม่มีอักษรกำกับตัวเดียวกันแสดงว่ามีความแตกต่างอย่างนัยสำคัญที่ $p<0.05$

ที่มา : ดัดแปลงจากเยาวนิตย์ และจีรนันท์ (2544)

บทที่ 2

วัสดุ อุปกรณ์ และวิธีการทดลอง

วัสดุ

1. พันธุ์ปลา

ปลากะพงขาว น้ำหนักเฉลี่ยตัวละ 17-19 กรัม จำนวน 600 ตัว จากฟาร์มเพาะเลี้ยงปลากะพงขาวเอกชน ต. ปากน้ำ อ. ละงู จ. สตูล

2. สารเคมี

2.1 สารเคมีสำหรับวิเคราะห์องค์ประกอบทางโภชนาการของอาหาร (ภาคผนวก ก. 1)

2.2 สารเคมีสำหรับวิเคราะห์คุณภาพน้ำ (ภาคผนวก ก. 2)

2.3 สารเคมีสำหรับวิเคราะห์ซีลีเนียม (ภาคผนวก ก. 3)

2.4 สารเคมีสำหรับวิเคราะห์วิตามินอี (ภาคผนวก ก. 3)

2.5 สารเคมีสำหรับวิเคราะห์เอนไซม์กลูทาไธโอนเปอร์ออกซิเดส (ภาคผนวก ก. 3)

2.6 สารเคมีสำหรับวิเคราะห์องค์ประกอบเลือด (ภาคผนวก ก. 4)

2.7 สารเคมีสำหรับวิเคราะห์ภูมิคุ้มกันแบบไม่จำเพาะ (ภาคผนวก ก. 4)

2.8 สารเคมีสำหรับวิเคราะห์ภูมิคุ้มกันแบบจำเพาะ (ภาคผนวก ก. 4)

อุปกรณ์

1. อุปกรณ์เลี้ยงปลาทดลอง

1.1 ถังไฟเบอร์กลาสกลม ความจุน้ำ 200 ลิตร จำนวน 21 ถัง

1.2 อุปกรณ์ให้อากาศ ได้แก่ เครื่องให้อากาศ ท่อลม สายยาง และหัวทราย

1.3 อุปกรณ์เปลี่ยนถ่ายน้ำ ได้แก่ สายยางดูดตะกอน และปั๊มน้ำชนิดจุ่ม

1.4 อุปกรณ์ขนย้ายปลา ได้แก่ สวิง และถังพลาสติก

2. อุปกรณ์วิเคราะห์คุณภาพน้ำ

2.1 อุปกรณ์วัดอุณหภูมิน้ำ ได้แก่ เทอร์โมมิเตอร์ (thermometer)

2.2 อุปกรณ์วัดความเค็ม ได้แก่ เครื่องวัดความเค็ม Refractosalinometer ของ ATAGO รุ่น S-10E

2.3 อุปกรณ์วัดค่าความเป็นกรด-ด่าง (pH) ได้แก่ เครื่องพีเอชมิเตอร์ (pH-meter) ของ Denver Instrument รุ่นModel 50

2.4 อุปกรณ์วิเคราะห์ค่าความเป็นด่าง (alkalinity) ได้แก่ ขวดรูปชมพู่ บีกเกอร์ ปิเปต กระบอกตวง ลูกยาง ขวดเก็บตัวอย่างน้ำ บิวเรต และชุดจับบิวเรต

2.5 อุปกรณ์วัดปริมาณออกซิเจนที่ละลายน้ำ (dissolved oxygen, DO) ด้วย DO meter ของ YSI รุ่น 550 DO

2.6 อุปกรณ์วิเคราะห์ปริมาณแอมโมเนีย (ammonia) ได้แก่ หลอดแก้วฝาเกลียวขนาด 50 มิลลิลิตร ปิเปต ลูกยาง หลอดหยด ขวดเก็บตัวอย่างน้ำ และเครื่องวัดค่าการดูดกลืนแสง (spectrophotometer) ของ Shimadzu รุ่น UV 1201 V

2.7 อุปกรณ์วิเคราะห์ปริมาณไนไตรท์ (nitrite) ได้แก่ กระบอกแก้วแยกไนเตรท (reduction column) หลอดแก้วฝาเกลียวขนาด 50 มิลลิลิตร ปิเปต ลูกยาง หลอดหยด ขวดเก็บตัวอย่างน้ำ และเครื่องวัดค่าการดูดกลืนแสง (spectrophotometer) ของ Shimadzu รุ่น UV 1201 V

3. อุปกรณ์เตรียมอาหารทดลอง

3.1 เครื่องเตรียมอาหารทดลองของ Hobart Model A 200 ประกอบด้วยชุดผสมอาหารแบบมีใบพัด และชุดเครื่องอัดเม็ดอาหาร

3.2 อุปกรณ์ชั่งตวงวัสดุอาหาร ได้แก่ เครื่องชั่งไฟฟ้าทศนิยม 2 ตำแหน่งของ Satorius รุ่น Basic เครื่องชั่งไฟฟ้าทศนิยม 4 ตำแหน่ง ของ Satorius รุ่น Research กระบอกตวง บีกเกอร์ มีดตัดอาหาร

3.3 ถาดเตรียมอาหารและตู้อบอาหาร

3.4 ตู้แช่แข็งอุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส ของ SR songsern รุ่น HF 201 ใช้สำหรับเก็บอาหารทดลอง

4. อุปกรณ์วิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมีของอาหารทดลอง

4.1 อุปกรณ์วิเคราะห์ความชื้น ได้แก่ ขวดชั่ง (weighing bottle) ตู้อบ (hot air oven) ของ Memmert โถดูดความชื้น (desiccators) เครื่องชั่งไฟฟ้าทศนิยม 4 ตำแหน่ง ของ Satorius รุ่น Research

4.2 อุปกรณ์วิเคราะห์โปรตีน ได้แก่ เครื่องย่อย (digestion apparatus) ของ Gerhardt

รุ่น Kjeldatherm เครื่องกลั่น (distillation apparatus) ของ Gerhardt รุ่น Vapodest I หลอดย่อยโปรตีน (digestion tube) กระบอกตวง บีกเกอร์ บิวเรต และขวดรูปชมพู่

4.3 อุปกรณ์วิเคราะห์ไขมัน ได้แก่ ชุดเครื่องมือวิเคราะห์ไขมัน รุ่น Soxtec System HT6 ไส้กรองสาร ถ้วยสกัดสาร ตู้อบ โถอบแห้ง โถดูดความชื้น และเครื่องชั่งไฟฟ้าทศนิยม 4 ตำแหน่ง ของ Satorius รุ่น Research

4.4 อุปกรณ์วิเคราะห์เถ้า ได้แก่ ถ้วยกระเบื้องเคลือบ (crucible) เตาเผา (muffle furnace) ของ Gallenkamp โถดูดความชื้น (desiccator) และเครื่องชั่งไฟฟ้าทศนิยม 4 ตำแหน่ง ของ Satorius รุ่น Research

5. อุปกรณ์วิเคราะห์ซีลีเนียม

5.1 เครื่องชั่งทศนิยม 4 ตำแหน่ง ของ Satorius รุ่น Research

5.2 เตาทำความร้อน (hot plate) ของ Ikamag รุ่น Rec-G

5.3 บีกเกอร์

5.4 ขวดรูปชมพู่

5.5 กระดาษกรองสารและกรวยกรองแก้ว

5.6 ขวดปรับปริมาตรขนาด 10 มิลลิลิตร

5.7 เครื่องอิมิสชันสเปกโตรมิเตอร์ (ICP-OES) ของ Perkin Elmer Instruments รุ่น Optical Emission Spectrometer (Optima 4300 DV)

6. อุปกรณ์วิเคราะห์วิตามินอี

6.1 เครื่อง HPLC (High Performance Liquid Chromatograph) ของ Agilent รุ่น 1100

6.2 คอลัมน์ Lichrospher 100 RP-18

6.3 เครื่องชั่งทศนิยม 4 ตำแหน่ง ของ Satorius รุ่น Research

6.4 เครื่องผสมสารเคมี (mixer) ของ Vortex รุ่น Genie

6.5 เตาทำความร้อน (hot plate) ของ Ikamag รุ่น Rec-G

6.6 หลอดแก้วฝาเกลียวขนาด 5 และ 10 มิลลิลิตร

6.7 เครื่องหมุนเหวี่ยงควบคุมอุณหภูมิ (centrifuge) ของ sigma รุ่น 2K15

6.8 ช้อนตักสาร หลอดหยด และบิกเกอร์

6.9 ไมโครปิเปต และทิป

7. อุปกรณ์สำหรับตรวจสอบการเจริญเติบโต

ประกอบด้วยเครื่องชั่งไฟฟ้า 2 ตำแหน่ง ของ Mettle รุ่น AB 204 สวิงช้อนปลา และถังพลาสติกขนาด 10 ลิตร

8. อุปกรณ์วิเคราะห์เอนไซม์กลูทาไธโอนเปอร์ออกซิเดส

ประกอบด้วยชุดทดสอบไมโครเพลทขนาด 96 หลุมก้นหลุม ไมโครปิเปต ทิป และเครื่องอ่านไมโครเพลท ขนาด 96 หลุม (microplate reader) ของ Biotech รุ่น ELX 800

9. อุปกรณ์วิเคราะห์องค์ประกอบเลือด

9.1 อุปกรณ์เก็บเลือด ได้แก่ เข็มขนาด 25G ยาว 1 นิ้ว และกระบอกฉีดยาพลาสติกขนาด 1 มิลลิลิตร หลอดพลาสติก (micro tube) ขนาด 1.5 มิลลิลิตร

9.2 เครื่องสำหรับแยกซีรัม ได้แก่ เครื่องหมุนเหวี่ยงควบคุมอุณหภูมิ ของ Sigma รุ่น 2K15 และเครื่องสเปคโตโฟโตมิเตอร์ (spectrophotometer) ของ Shimadzu รุ่น UV 1201 V

9.3 อุปกรณ์สำหรับนับเม็ดเลือด ได้แก่ ฮีมาไซโตมิเตอร์ (haemacytometer) กล้องจุลทรรศน์ ของ Zeiss รุ่น Exioskop 2plus

9.4 อุปกรณ์สำหรับเจือจางเลือด ได้แก่ หลอดพลาสติกขนาด 1.5 มิลลิลิตร ไมโครปิเปต ทิป เครื่องผสมสารเคมี (mixer) ของ Vortex รุ่น Genie

9.5 อุปกรณ์สำหรับปริมาณเม็ดเลือดแดงอัดแน่น ได้แก่ หลอดฮีมาโตคริต (haematocrit tube) แผ่นอ่านค่าฮีมาโตคริต (heamatocrit reader) ฮีมาโตคริตเซนติฟิวส์ (haematocrit centrifuge) ของ Kokusan รุ่น H-25 FI

10. อุปกรณ์วิเคราะห์ภูมิคุ้มกันแบบไม่จำเพาะ

10.1 เข็มขนาด 25G ยาว 1 นิ้ว และกระบอกฉีดยาพลาสติกขนาด 1 มิลลิลิตร

10.2 หลอดพลาสติก (micro tube) ขนาด 1.5 มิลลิลิตร

10.3 เครื่องหมุนเหวี่ยงควบคุมอุณหภูมิ (centrifuge) ของ sigma รุ่น 2K 15

10.4 ไมโครปิเปต ทิป สไลด์ และแผ่นปิดสไลด์

10.5 เครื่องสเปคโตโฟโตมิเตอร์ (spectrophotometer) ของ Shimadzu รุ่น UV 1201 V

10.6 เครื่องอ่านไมโครเพลท ขนาด 96 หลุม (microplate reader) ของ Biotech รุ่น ELX 800

10.7 หลอดแก้วฝาเกลียวขนาด 10 มิลลิลิตร

10.8 เครื่องผสมสารเคมี (mixer) ของ Vortex รุ่น Genie

11. อุปกรณ์วิเคราะห์ภูมิคุ้มกันแบบแบบจำเพาะ

11.1 เครื่องสเปคโตโฟโตมิเตอร์ (spectrophotometer) ของ Shimadzu รุ่น UV 1201 V

11.2 ไมโครเพลทขนาด 96 หลุมก้นหลุม

11.3 ไมโครปิเปต และทิป

11.4 หลอดพลาสติก (micro tube) ขนาด 1.5 มิลลิลิตร

11.5 เครื่องหมุนเหวี่ยงควบคุมอุณหภูมิ (centrifuge) ของ sigma รุ่น 2K 15

11.6 ขวดแก้วขนาด 100 มิลลิลิตร

11.7 หลอดแก้วฝาเกลียวขนาด 10 มิลลิลิตร

11.8 เครื่องผสมสารเคมี (mixer) ของ Vortex รุ่น Genie

12. อุปกรณ์สำหรับเลี้ยงเชื้อแบคทีเรีย

12.1 จานเพาะเชื้อ (plate)

12.2 ลูปเขี่ยเชื้อ

12.3 ตะเกียงแอลกอฮอล์

12.4 ตู้บ่มเชื้อ (incubator) ของ Mitamura riken kooyo รุ่น MRK -14-82-2

12.5 เครื่องสเปคโตโฟโตมิเตอร์ (spectrophotometer) ของ Shimadzu รุ่น UV 1201 V

12.6 บีกเกอร์

12.7 เครื่องผสมสารเคมี (mixer) ของ Vortex รุ่น Genie

วิธีการทดลอง

1. การเตรียมการทดลอง

1.1 การเตรียมอุปกรณ์การทดลอง

ใช้ถังไฟเบอร์กลาสกลม ความจุน้ำ 200 ลิตร (ต่อหน่วยทดลอง) ทำความสะอาด และติดตั้งอุปกรณ์ให้อากาศให้พร้อมสมบูรณ์แล้ว เติมน้ำทะเลที่มีความเค็มประมาณ 27-29 ส่วนในพันส่วน ให้ได้ปริมาตร 170 ลิตร น้ำทะเลที่ใช้มาจากบ่อพักน้ำที่สูบจากทะเลสาบสงขลา ระบบน้ำที่ใช้เป็นระบบน้ำใช้แล้วทิ้ง

1.2 การเตรียมปลาทดลอง

ใช้ปลากะพงขาว *(Lates calcarifer)* ขนาดน้ำหนักประมาณ 17-19 กรัม ที่ผ่านการฝึกให้กินอาหารอัดเม็ดสำเร็จรูปมาแล้ว มีสุขภาพแข็งแรง ปลอดโรค จำนวน 600 ตัว อนุบาลในบ่อ

คอนกรีตขนาดความจุ 5,000 ลูกบาศก์เมตร จำนวน 2 บ่อ ที่ระดับความเค็มของน้ำ 27-29 ส่วนในพันส่วน ให้กินอาหารเม็ดสำเร็จรูป วันละ 2 ครั้ง คือเช้าเวลา 9.00 น. และเย็นเวลา 16.00 น เป็นเวลา 2 สัปดาห์ หลังจากนั้นฝึกให้ปลาทดลองกินอาหารทดลองสูตร 3 ผสมวิตามินอีไม่ผสมซีลีเนียม (+E-Se) เป็นเวลา 7 วัน หลังจากปลาคุ้นเคยกับสภาพถังและอาหารทดลองแล้ว ทำการชั่งน้ำหนักปลาทดลอง คัดปลาที่มีน้ำหนักใกล้เคียงไว้สำหรับการทดลอง

1.3 การเตรียมอาหารทดลอง

อาหารทดลองสำหรับเลี้ยงปลากะพงขาวมีทั้งหมด 7 สูตร โดยส่วนประกอบของอาหารทดลองทั้ง 7 สูตร ดัดแปลงสูตรอาหารที่เหมาะสมต่อการเจริญเติบโตจากจูอะดี และมะลิ (2538) ดังตารางที่ 6 ซึ่งแต่ละสูตรอาหารแตกต่างกันตาม ชนิด และปริมาณซีลีเนียมที่เสริมในรูปของสารละลาย (ภาคผนวก ข) การเสริม และไม่เสริมวิตามินอี ดังนี้ สูตรที่ 1 ไม่เสริมวิตามินอีและซีลีเนียม (-E-Se) สูตรที่ 2 ไม่เสริมวิตามินอี แต่เสริมซีลีโนเมทไธโอนีน และโซเดียมซีลีไนท์ อย่างละ 0.5 พีพีเอ็ม (-E+hSMhNS) สูตรที่ 3-7 เสริมวิตามินอี 50 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัมอาหารร่วมกับซีลีเนียม โดยสูตรที่ 3 ไม่เสริมซีลีเนียม (+E-Se) สูตรที่ 4 เสริมซีลีโนเมทไธโอนีน 1.0 พีพีเอ็ม (+ESM 1) สูตรที่ 5 เสริมซีลีโนเมทไธโอนีน 2.0 พีพีเอ็ม (+ESM 2) สูตรที่ 6 เสริมโซเดียมซีลีไนท์ 1.0 พีพีเอ็ม (+ENS 1) และสูตรที่ 7 เสริมโซเดียมซีลีไนท์ 2.0 พีพีเอ็ม (+ENS 2) ซึ่งอาหารทดลองทั้ง 7 สูตรเป็นอาหารเม็ดแบบแห้ง เตรียมเองในห้องปฏิบัติการ โดยชั่งวัตถุดิบอาหารดังแสดงไว้ในตารางที่ 6 ชั่งแยกใส่ถุงไว้สำหรับอาหารทดลองแต่ละสูตร จากนั้นนำส่วนผสมทั้งหมดยกเว้นน้ำมัน ผสมรวมกันและคลุกเคล้าให้เข้ากันด้วยเครื่องผสมอาหาร จนเป็นเนื้อเดียวกันจึงเติมน้ำมันลงไป เมื่อส่วนผสมเข้ากันดี เติมน้ำกลั่นซึ่งมีซีลีเนียมแต่ละความเข้มข้นละลายอยู่ (ภาคผนวก ข) ผสมลงในอาหารแต่ละสูตร 35 เปอร์เซ็นต์ นำวัตถุดิบอาหารที่ผสมกันดีแล้วเข้าเครื่องอัดเม็ดอาหารผ่านหน้าแว่นขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 3 มิลลิเมตร โดยตัดเม็ดอาหารให้มีขนาดใกล้เคียงกัน อบอาหารที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส นาน 24 ชั่วโมง ผึ่งอาหารที่เตรียมเสร็จแล้วให้แห้งในที่ร่ม แล้วบรรจุใส่ถุงพลาสติก เก็บรักษาไว้ในตู้เย็นที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส (วุฒิพร , 2541) นำอาหารทดลองแต่ละสูตรที่ได้วิเคราะห์องค์ประกอบทางโภชนาการ ได้แก่ โปรตีน ไขมัน ความชื้นและเถ้าตามวิธีการของ AOAC (1990) (ภาคผนวก ก. 1) วิเคราะห์ปริมาณซีลีเนียมในอาหารทดลอง เนื้อปลากะพงขาว ดัดแปลงวิธีการจาก AOAC (1993) (ภาคผนวก ก. 3) และปริมาณวิตามินอี ตามวิธีของ Buttriss และ Diplock (1984) (ภาคผนวก ก. 3)

ตารางที่ 6 ส่วนประกอบของอาหารทดลองทั้ง 7 สูตร สำหรับเลี้ยงปลากะพงขาว ดัดแปลงจากสูตรอาหารของจูอะดี และมะลิ (2538)

วัสดุอาหาร (เปอร์เซ็นต์)	สูตรอาหาร						
	1	2	3	4	5	6	7
ปลาป่น	42.0	42.0	42.0	42.0	42.0	42.0	42.0
กากถั่วเหลือง	17.0	17.0	17.0	17.0	17.0	17.0	17.0
หัวกุ้งป่น	10.0	10.0	10.0	10.0	10.0	10.0	10.0
แอลฟ่าสตาช	8.0	8.0	8.0	8.0	8.0	8.0	8.0
แป้งสาลี	7.5	7.5	7.5	7.5	7.5	7.5	7.5
น้ำมันปลา	5.0	5.0	5.0	5.0	5.0	5.0	5.0
น้ำมันถั่วเหลือง	3.0	3.0	3.0	3.0	3.0	3.0	3.0
วิตามินรวม[1]	2.0	2.0	2.0	2.0	2.0	2.0	2.0
วิตามินซี	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5
แร่ธาตุรวม[2]	4.0	4.0	4.0	4.0	4.0	4.0	4.0
วิตามินอี	-	-	0.005	0.005	0.005	0.005	0.005
เซลลูโลส	1.000	1.000	0.995	0.995	0.995	0.995	0.995
รวม	100	100	100	100	100	100	100
ซีลีโนเมทไธ-โอนีน*[3](มก./กก.)	-	0.5	-	1.0	2.0	-	-
โซเดียมซีลีไนท์*[4] (มก./กก.)	-	0.5	-	-	-	1.0	2.0

[1] วิตามินรวม (กรัม/ 100 กรัมส่วนผสมวิตามินรวม) ประกอบด้วย Thiamine hydrochloride 0.025 ก.; Riboflavin 0.10 ก.; Calcium pantothenate 0.25 ก.; Nicotinic acid 0.375 ก.; Pyridoxine hydrochloride 0.025 ก.; Folic acid 0.0075 ก.; Inositol 1.0 ก.; Choline chloride 50.0 ก.; Menadione 0.02 ก.; Biotin 0.0025 ก.; Vitamin B_{12} 0.0001 ก. Vitamin A 0.015 ก.; Vitamin D_3 0.0003 ก.; cellulose 95.6797 ก.

[2] แร่ธาตุรวม (กรัม/ 100 กรัมส่วนผสมแร่ธาตุรวม) ประกอบด้วย Calcium lactate 32.525 ก.; KH_2PO_4 23.850 ก.; $CaH_2PO_4.2H_2O$ 13.50 ก.; $MgSO_4.7H_2O$ 13.625 ก.; $NaH_2PO_4.2H_2O$ 8.675 ก.; NaCl 4.363 ก.; Ferric citrate 2.950 ก.; $ZnSO_4$ 0.2985 ก.; $CoCl_2$ 0.0995 ก.; $MnSO_4$ 0.0796 ก.; KI 0.0149 ก.; $AlCl_3$ 0.0099 ก.; $CuCl_2$0.0099 ก.

[3] เสริมซีลีโนเมทไธโอนีนในรูปสารละลาย ตามตารางภาคผนวก ข. 4

[4] เสริมโซเดียมซีลีไนท์ในรูปสารละลาย ตามตารางภาคผนวก ข. 4

1.4 การเตรียมเชื้อแบคทีเรีย

นำเชื้อแบคทีเรีย *Streptococcus* sp. บริสุทธิ์ เก็บอยู่ในอาหารเลี้ยงเชื้อ tryptic soy agar (TSA) นำเชื้อมาทดสอบ pathogenicity โดยนำเชื้อมาเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อ tryptic soy broth (TSB)ให้อากาศโดยการเขย่าในอ่างควบคุมอุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส นาน 20-24 ชั่วโมง จนเชื้อเจริญเพิ่มจำนวน จากนั้นนำไปหมุนเหวี่ยงที่ความเร็ว 10,000 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส นาน 10 นาที แล้วละลายตะกอนเชื้อแบคทีเรียในน้ำเกลือ 0.85 เปอร์เซ็นต์ ให้มีความเข้มข้นของเชื้อประมาณ 1×10^{8} เซลล์/มิลลิลิตร (O.D.=0.1) ฉีดเชื้อแบคทีเรียเข้าช่องท้องปลากะพงขาวปริมาตร 0.2 มิลลิลิตรต่อปลา 1 ตัว เก็บตัวอย่างปลาที่ติดเชื้อและเพิ่งตาย นำมาเขี่ยเชื้อ 2 บริเวณ คือ แผล และไตส่วนหลัง ในอาหารเลี้ยงเชื้อ TSA บ่มที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส 24 ชั่วโมง เลือกโคโลนีเชื้อจากจานเพาะเชื้อที่มีลักษณะโคโลนีเดี่ยว มีสีขาวขุ่น และขนาดเล็ก มาเลี้ยงบนอาหารเลี้ยงเชื้อใหม่หลายๆครั้ง (subculture) และนำมาทดสอบคุณสมบัติทางชีวเคมีด้วยชุดทดสอบแบบ API 20 STREP (bioMerieux, France) แล้วนำมาเลี้ยงในอาหาร TSA เก็บไว้ในการทดลองต่อไป

1.5 การทดลองเลี้ยงปลากะพงขาวด้วยอาหารทดลอง

การทดลองแบ่งออกเป็น 7 ชุดการทดลอง ๆ ละ 3 ซ้ำ (replication) ซ้ำละ 20 ตัว ดังนี้

ชุดการทดลองที่ 1 เลี้ยงปลากะพงขาวด้วยอาหารสูตร 1 (-E-Se)

ชุดการทดลองที่ 2 เลี้ยงปลากะพงขาวด้วยอาหารสูตร 2 (-E+hSMhNS)

ชุดการทดลองที่ 3 เลี้ยงปลากะพงขาวด้วยอาหารสูตร 3 (+E-Se)

ชุดการทดลองที่ 4 เลี้ยงปลากะพงขาวด้วยอาหารสูตร 4 (+ESM1)

ชุดการทดลองที่ 5 เลี้ยงปลากะพงขาวด้วยอาหารสูตร 5 (+ESM2)

ชุดการทดลองที่ 6 เลี้ยงปลากะพงขาวด้วยอาหารสูตร 6 (+ENS1)

ชุดการทดลองที่ 7 เลี้ยงปลากะพงขาวด้วยอาหารสูตร 7 (+ENS2)

โดยแต่ละชุดการทดลองใช้ปลากะพงขาวที่เตรียมไว้ในข้อ 1.2 แบ่งปลาใส่ถังไฟเบอร์กลาสกลม ขนาด 200 ลิตร จำนวน 21 ถัง ซึ่งได้จัดเตรียมระบบการให้อากาศไว้พร้อมแล้วตามข้อ 1.1 วางแผนการทดลองแบบสุ่มตลอด (CRD, Completely Randomized Desige) โดยชุดการทดลองละ 3 ถังๆ ละ 20 ตัว ให้อาหารทดลองแต่ละสูตรวันละ 2 ครั้ง คือ เช้าเวลา 9.00 น. และเย็นเวลา 16.00 น. หลังจากปลากินอาหารอิ่มประมาณ 1 ชั่วโมง 30 นาที ดูดอาหารที่เหลือออก บันทึกน้ำหนักอาหารที่ให้ทุกสัปดาห์ตลอดการทดลอง ก่อนให้อาหารเย็นจะดูดตะกอนทำความสะอาดถังปลา โดยเปลี่ยนถ่ายน้ำวันละ 50 เปอร์เซ็นต์ทุกวัน และเปลี่ยนถ่ายน้ำประมาณ 90 เปอร์เซ็นต์ ทุกๆ 2 สัปดาห์ ระยะเวลาทดลอง 8 สัปดาห์

2. การเก็บรวบรวมข้อมูล

2.1 การศึกษาการเจริญเติบโต

ระหว่างทดลองจะทำการชั่งน้ำหนักปลาทดลองทุก 2 สัปดาห์ ทุกชุดการทดลองโดยการชั่งน้ำหนักปลาทดลองทุกตัวด้วยเครื่องชั่งไฟฟ้าทศนิยม 2 ตำแหน่ง (งดให้อาหาร 1 มื้อก่อนวันที่ชั่งน้ำหนักปลา) พร้อมจดบันทึก น้ำหนักปลา จำนวนปลา อัตราการรอดตาย และน้ำหนักอาหารทดลอง ของปลาทุกชุดการทดลอง รวมทั้งสังเกตลักษณะอาการของปลาตลอดการทดลอง จนสิ้นสุดการทดลอง 8 สัปดาห์ นำข้อมูลที่ได้มาคำนวณหาอัตราการรอด (Survival Rate) ตามวิธีของ Nankervis และคณะ (2000) ประสิทธิภาพการกินอาหาร (Feed Efficiency, FE) และน้ำหนักที่เพิ่มขึ้น (% Weight Gain) (De Silva and Anderson, 1995) ดังนี้

$$\text{อัตราการรอด (\%)} = \frac{\text{จำนวนปลาเมื่อสิ้นสุดการทดลอง}}{\text{จำนวนปลาเมื่อเริ่มต้นทดลอง}} \times 100$$

$$\text{ประสิทธิภาพการกินอาหาร (\%)} = \frac{\text{น้ำหนักปลาที่เพิ่มขึ้น}}{\text{น้ำหนักอาหารที่ปลากิน}} \times 100$$

$$\text{น้ำหนักที่เพิ่มขึ้น (\%)} = \frac{(\text{น้ำหนักปลาสิ้นสุดการทดลอง} - \text{น้ำหนักปลาเริ่มต้นการทดลอง})}{\text{น้ำหนักปลาเริ่มต้นการทดลอง}} \times 100$$

2.2 การศึกษาการทำงานของเอนไซม์กลูทาไธโอนเปอร์ออกซิเดส

เมื่อสิ้นสุดการทดลองในสัปดาห์ที่ 8 นำพลาสมาของปลากะพงขาวที่ได้จากข้อ 2.3 จากแต่ละชุดการทดลองมาวิเคราะห์การทำงานของเอนไซม์กลูทาไธโอนเปอร์ออกซิเดส (GSHPx) โดยใช้ชุดทดสอบ Glutathione Peroxidase Assay Kit No. 70312, Cayman, USA. (ภาคผนวก ก. 3)

2.3 การศึกษาองค์ประกอบเลือด และระบบภูมิคุ้มกันแบบไม่จำเพาะ

เมื่อสิ้นสุดการทดลองในสัปดาห์ที่ 8 สุ่มตัวอย่างปลากะพงขาวจำนวน 15 ตัวต่อชุดการทดลอง โดยสลบปลาทดลองด้วย MS 222 เข้มข้น 150 พีพีเอ็ม เจาะเลือดจากบริเวณส่วนหาง (caudal peduncle) ปริมาตร 0.5 มิลลิลิตร จำนวน 2 ครั้ง ด้วยหลอดฉีดยาขนาด 1 มิลลิลิตรใช้เข็มฉีดยาขนาด 25G

ครั้งที่ 1 ใช้หลอดฉีดยาที่ไม่เคลือบสารกันการแข็งตัวของเลือด (Heparin 150 Unit) สำหรับแยกน้ำเลือดส่วนที่เรียกว่าซีรัม (Serum) ไปใช้วิเคราะห์หาปริมาณไลโซไซม์ (Lysozyme activity) ตาม

วิธีการของ Demers และ Bayne (1997) ปริมาณคอมพลีเม้นท์ (Alternative complement activity (ACH_{50})) ตามวิธีของ Yano (1992) (ภาคผนวก ก. 4)

ครั้งที่ 2 ใช้หลอดฉีดยาเคลือบสารกันการแข็งตัวของเลือด สำหรับนำเลือดไปหาปริมาณเม็ดเลือดแดง (Red Blood Cell Count, RBC) เม็ดเลือดขาว (White Blood Cell Count, WBC) ปริมาณเม็ดเลือดแดงอัดแน่น (% Hematocrit, Hct) ตามวิธีการของ Blaxhall และ Daisley (1973) และแยกน้ำเลือดส่วนพลาสมา (Plasma) ไปวิเคราะห์ปริมาณกลูทาไธโอนเปอร์ออกซิเดส (GSHPx) โดยใช้ชุดทดสอบ Glutathione Peroxidase Assay Kit No. 70312, Cayman, USA. และปริมาณอิมมูโนโกลบูลิน (Total Immunoglubulin) ตามวิธีการของ Siwicki และคณะ (1994) (ภาคผนวก ก. 4)

หลังจากเก็บเลือดแล้ว ตัดเอาไตส่วนหน้า (Head kidney) ของปลาแต่ละตัวในแต่ละชุดการทดลองเพื่อแยกเซลล์เม็ดเลือดขาวสำหรับตรวจวัดภูมิคุ้มกันด้านเซลล์ คือปริมาณการจับกินสิ่งแปลกปลอม (Phagocytic index) ตามวิธีการของ Thuvander และคณะ (1987) และซุปเปอร์ออกไซด์ แอนไอออน (Respiratory burst activity) ตามวิธีการของ Siwicki และคณะ (1994) (ภาคผนวก ก. 4)

2.4 การศึกษาระบบภูมิคุ้มกันแบบจำเพาะ

เมื่อสิ้นสุดการทดลองในสัปดาห์ที่ 8 สุ่มตัวอย่างปลากะพงขาวจำนวน 12 ตัวต่อชุดการทดลอง มาฉีดวัคซีนที่เตรียมจากเชื้อแบคทีเรีย *Streptococcus* sp. ความเข้มข้นเท่ากับ 10^8 CFUต่อมิลลิลิตร ในสารละลายน้ำเกลือ 0.85 เปอร์เซ็นต์ และเติมฟอร์มาลิน 0.1 เปอร์เซ็นต์ โดยการฉีดเข้าช่องท้อง 0.1 มิลลิลิตรต่อตัว เก็บซีรัมปลาทดลองทุกสัปดาห์ โดยสุ่มปลากะพงขาวจำนวน 3 ตัวต่อชุดการทดลอง เพื่อนำไปหาปริมาณแอนติบอดีโดยวิธี passive haemagglutination ตามวิธีการของอภิญญา (2545) (ภาคผนวก ก. 4)

2.5 การศึกษาความต้านทานโรค

เมื่อสิ้นสุดการทดลองในสัปดาห์ที่ 8 นำปลากะพงขาวจำนวน 30 ตัวต่อชุดการทดลองฉีดเชื้อแบคทีเรีย *Streptococcus* sp. ระดับความเข้มข้นของเชื้อประมาณ 1 x 10^6 CFUต่อมิลลิลิตร (LD_{50} ที่ 14 วัน) เข้าบริเวณช่องท้องตัวละ 0.1 มิลลิลิตร แล้วนำไปเลี้ยงต่อในถังไฟเบอร์กลาสกลมขนาด 200 ลิตร สังเกตและบันทึกอัตราการตายหลังฉีดเชื้อ เป็นเวลา 14 วัน นำเปอร์เซ็นต์การตายเฉลี่ยของปลาในแต่ละชุดการทดลองไปหาค่า Relative Percent Survival (RPS) (Ellis, 1988)

$$RPS\ (\%) = \frac{1 - \text{อัตราการตายของกลุ่มที่ได้รับเชื้อ}}{\text{อัตราการตายของกลุ่มควบคุม}} \times 100$$

2.6 การวิเคราะห์ผล

นำข้อมูลที่ได้จากแต่ละชุดการทดลองมาวิเคราะห์ความแปรปรวน ANOVA แบบ CRD เปรียบเทียบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยด้วยวิธี Duncan's Multiple Range Test (DMRT) (Steel and Torrie, 1980) โดยใช้โปรแกรม Statistical Analysis System (SAS) version 6.0 (SAS Institute.,1990)

2.7 การวิเคราะห์คุณภาพน้ำ

ดำเนินการตรวจวัดคุณภาพน้ำภายในถังเลี้ยงปลาแต่ละชุดการทดลอง จำนวน 2 ครั้งต่อสัปดาห์ (จันทร์ พฤหัสบดี) เวลา 8.45 น. ก่อนให้อาหารมื้อเช้า โดยตรวจวัดอุณหภูมิน้ำด้วยเทอร์โมมิเตอร์แบบปรอท ออกซิเจนที่ละลายน้ำด้วย D.O. meter ยี่ห้อ YSI รุ่น 550 DO ความเค็มด้วย Refractosalinometer ยี่ห้อ ATAGO รุ่น S-10E ความเป็นกรดเป็นด่างของน้ำ (pH) ด้วย pH meter ยี่ห้อ Denver Instrument รุ่น Model 50 ความเป็นด่างของน้ำ (Total alkaline) โดยวิธีไตรเตรชัน ด้วยเครื่องจ่ายอัตโนมัติยี่ห้อ BRAND ตามวิธี American Public Health Association (1980) ปริมาณไนไตรท์ และแอมโมเนียรวม ตามวิธีของ Strickland และ Parsons (1972) (ภาคผนวก ก. 2)

บทที่ 3

ผลการทดลอง

1. ผลของซีลีเนียมต่อการเจริญเติบโตในปลากะพงขาว

1.1 น้ำหนักเฉลี่ยต่อตัว

เมื่อเริ่มต้นทดลองน้ำหนักเฉลี่ยของปลากะพงขาวอยู่ในช่วง 18.86-18.89 กรัม (ตารางที่ 7) น้ำหนักเฉลี่ยของปลาที่ได้รับอาหารทดลองทั้ง 7 สูตร เพิ่มขึ้นตามระยะเวลาการเลี้ยง และเริ่มมีความแตกต่างทางสถิติตั้งแต่สัปดาห์ที่ 4 ($p<0.05$) โดยปลาที่ได้รับอาหารสูตร -E+hSMhNS, +E-Se, +ESM1, +ESM2, +ENS1 และ +ENS2 มีน้ำหนักเฉลี่ยต่อตัวมากกว่าสูตร -E-Se อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.05$) ส่วนในสัปดาห์ที่ 6 พบว่าปลากะพงขาวที่ได้รับอาหารสูตร +ESM1 และ +ESM2 มีน้ำหนักเฉลี่ยต่อตัวมากกว่าสูตร -E-Se, -E+hSMhNS, +E-Se, +ENS1 และ +ENS2 ในสัปดาห์ที่ 8 น้ำหนักเฉลี่ยของปลากะพงขาวที่ได้รับอาหารทุกสูตรเพิ่มขึ้นแตกต่างกันทางสถิติ ($p<0.05$) โดยน้ำหนักเฉลี่ยต่อตัวของปลาที่ได้รับอาหารสูตร +ESM1 มีค่าสูงสุดคือ 80.71±0.21 กรัม รองลงมาคือสูตร +ESM2, +ENS2, +ENS1, -E+hSMhNS, +E-Se และ -E-Se ซึ่งมีน้ำหนักเฉลี่ยต่อตัว 78.95±0.57, 76.51±0.06, 71.40±0.47, 70.27±0.33, 68.20±0.83 และ 64.41±0.38 กรัม ตามลำดับ

ตารางที่ 7 น้ำหนักเฉลี่ยต่อตัวของปลากะพงขาวที่ได้รับอาหารทดลอง 7 สูตร เป็นเวลา 8 สัปดาห์

สูตรอาหาร	สัปดาห์				
	0	2	4	6	8
-E-Se	18.89±0.02	29.34±1.46^{a}	36.32±1.10^{a}	55.11±0.08^{a}	64.41±0.38^{a}
-E+hSMhNS	18.88±0.03	29.58±1.66^{a}	36.91±1.43^{bc}	55.83±1.13^{ab}	70.27±0.33^{c}
+E-Se	18.88±0.02	29.68±0.84^{a}	38.00±0.27^{cd}	56.77±0.75^{b}	68.19±0.83^{b}
+ESM 1	18.88±0.02	30.06±0.82^{a}	39.45±1.08^{d}	68.97±0.87^{e}	80.72±0.21^{g}
+ESM 2	18.86±0.02	29.39±0.64^{a}	39.06±0.15^{d}	67.92±0.18^{e}	78.95±0.57^{f}
+ENS 1	18.86±0.01	28.80±0.47^{a}	38.05±0.68^{cd}	58.39±0.18^{c}	71.40±0.47^{d}
+ENS 2	18.88±0.03	29.20±0.55^{a}	38.86±0.78^{d}	59.85±0.49^{d}	76.51±0.06^{e}

*ตัวเลขที่นำเสนอเป็นค่าเฉลี่ย±ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน (จากข้อมูล 3 ซ้ำ)

ค่าเฉลี่ยในสดมภ์ที่มีตัวอักษรต่างกัน มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.05$)

1.2 น้ำหนักที่เพิ่มขึ้น ประสิทธิภาพการกินอาหาร และอัตราการรอด

เมื่อสิ้นสุดการทดลองพบว่าปลากะพงขาวที่ได้รับอาหารสูตร +ESM1 มีน้ำหนักเพิ่มขึ้นสูงสุดคือ 327.43±1.05 เปอร์เซ็นต์ รองลงมาคือปลาที่ได้รับอาหารสูตร +ESM2, +ENS2, +ENS1, -E+hSMhNS, +E-Se และ -E-Se ซึ่งน้ำหนักที่เพิ่มขึ้น 318.67±3.35, 305.37±0.62, 278.49±2.67, 272.12±1.26, 261.13±4.61 และ 240.97±2.11 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ โดยน้ำหนักที่เพิ่มขึ้นของปลาทุกชุดการทดลอง แตกต่างกันทางสถิติ ($p<0.05$) ดังแสดงในตารางที่ 8

ประสิทธิภาพการกินอาหารของปลากะพงขาวที่ได้รับอาหารสูตร +ESM1 มีค่าสูงสุดคือ0.55±0.010 เปอร์เซ็นต์ รองลงมาคือปลาที่ได้รับอาหารสูตร +ENS1, +ESM2, +ENS2, +E-Se, -E+hSMhNS และ -E-Se ซึ่งมีประสิทธิภาพการกินอาหาร 0.53±0.009, 0.52±0.005, 0.51±0.010, 0.51±0.006, 0.50±0.005 และ 0.48±0.006 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ ส่วนปลาที่ได้รับอาหารสูตร +E-Se, +ESM2 และ +ENS2 มีประสิทธิภาพการกินอาหารไม่แตกต่างกันทางสถิติ ($p>0.05$) ขณะที่ปลาที่ได้รับอาหารสูตร +ESM1 มีประสิทธิภาพการกินอาหารดีกว่าปลาที่ได้รับอาหารสูตร -E-Se, -E+hSMhNS, +E-Se, +ESM2, +ENS1 และ +ENS2 อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.05$ (ตารางที่ 8)

อัตราการรอดตายของปลากะพงขาวทุกชุดการทดลองไม่แตกต่างกันทางสถิติ ($p<0.05$) โดยมีอัตรารอดตายอยู่ในช่วง 93.33 - 96.67 เปอร์เซ็นต์ (ตารางที่ 8)

ตารางที่ 8 น้ำหนักที่เพิ่มขึ้น ประสิทธิภาพการกินอาหาร และอัตราการรอดของปลากะพงขาวที่ได้รับอาหารทดลอง 7 สูตร เป็นเวลา 8 สัปดาห์

สูตรอาหาร	น้ำหนักที่เพิ่มขึ้น (%)	ประสิทธิภาพการกินอาหาร (%)	อัตราการรอด (%)
-E-Se	240.97±2.11 [a]	0.48±0.006 [a]	93.33±2.89 [a]
-E+hSMhNS	272.12±1.26 [c]	0.50±0.005 [b]	96.67±2.89 [a]
+E-Se	261.13±4.61 [b]	0.51±0.006 [c]	95.00±0.01 [a]
+ESM 1	327.43±1.05 [g]	0.55±0.010 [e]	96.67±2.89 [a]
+ESM 2	318.67±3.35 [f]	0.52±0.005 [cd]	95.00±5.00 [a]
+ENS 1	278.49±2.67 [d]	0.53±0.009 [d]	96.67±2.89 [a]
+ENS 2	305.37±0.62 [e]	0.51±0.010 [c]	96.67±2.89 [a]

*ตัวเลขที่นำเสนอเป็นค่าเฉลี่ย±ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน (จากข้อมูล 3 ซ้ำ)

ค่าเฉลี่ยในสดมภ์ที่มีตัวอักษรต่างกัน มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.05$)

2. ผลของซีลีเนียมต่อเอนไซม์กลูทาไธโอนเปอร์ออกซิเดสในปลากะพงขาว

เมื่อสิ้นสุดการทดลองพบว่าการทำงานของเอนไซน์กลูทาไธโอนเปอร์ออกซิเดสของปลากะพงขาวที่ได้รับอาหารสูตร +ESM2 มีค่าสูงสุดคือ 592.16±78.40 นาโนโมลต่อนาทีต่อมิลลิลิตร รองลงมาคือปลาที่ได้รับอาหารสูตร +ESM1, +ENS2, -E+hSMhNS, +ENS1, +E-Se และ -E-Se ซึ่งมีการทำงานของเอนไซน์กลูทาไธโอนเปอร์ออกซิเดส 577.30±83.96, 558.20±49.27, 545.46±39.80, 511.51±85.77, 490.28±88.50 และ 469.06±32.63 นาโนโมลต่อนาทีต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ โดยการทำงานของเอนไซน์กลูทาไธโอนเปอร์ออกซิเดสในปลาที่ได้รับอาหารสูตร -E-Se, -E+hSMhNS, +E-Se, +ENS1 และ +ENS2 ไม่แตกต่างกันทางสถิติ ($p>0.05$) ส่วนการทำงานของเอนไซน์กลูทาไธโอนเปอร์ออกซิเดสในปลาที่ได้รับอาหารสูตร +ESM1 และ +ESM2 สูงกว่าปลาที่ได้รับอาหารสูตร -E-Se และ +E-Se อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.05$) ดังแสดงในตารางที่ 9

ตารางที่ 9 การทำงานของเอนไซม์กลูทาไธโอนเปอร์ออกซิเดสในปลากะพงขาวที่ได้รับอาหารทดลอง 7 สูตร เป็นเวลา 8 สัปดาห์

สูตรอาหาร	การทำงานของเอนไซม์กลูทาไธโอนเปอร์ออกซิเดส (นาโนโมลต่อนาทีต่อมิลลิลิตร)
-E-Se	469.06±32.63[a]
-E+hSMhNS	545.46±39.80[abc]
+E-Se	490.28±88.50[ab]
+ESM 1	577.30±83.96[bc]
+ESM 2	592.16±78.40[c]
+ENS 1	511.51±85.77[abc]
+ENS 2	558.20±49.27[abc]

*ตัวเลขที่นำเสนอเป็นค่าเฉลี่ย±ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน (จากข้อมูล 3 ซ้ำ)
ค่าเฉลี่ยในสดมภ์ที่มีตัวอักษรต่างกัน มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.05$)

3. ผลของซีลีเนียมต่อองค์ประกอบเลือดและระบบภูมิคุ้มกันแบบไม่จำเพาะ

3.1 ผลของซีลีเนียมต่อองค์ประกอบเลือดในปลากะพงขาว

3.1.1 ปริมาณเม็ดเลือดแดงและปริมาณเม็ดเลือดขาว

ปริมาณเม็ดเลือดแดงของปลากะพงขาวที่ได้รับอาหารสูตร +ESM1 มีค่าสูงสุดคือ 26.01 ±4.98 x 10^7 เซลล์ต่อมิลลิลิตร รองลงมาคือปลาที่ได้รับอาหารสูตร +ESM2, +ENS1, -E+hSMhNS, +ENS2, +E-Se และ -E-Se ซึ่งมีปริมาณเม็ดเลือดแดง 24.29±4.08, 24.17±3.44, 24.16±3.34,

23.99±4.28, 23.95±4.65 และ 20.13±4.28 x 10^7 เซลล์ต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ โดยปริมาณเม็ดเลือดแดงของปลาที่ได้รับอาหารสูตร -E-Se มีค่าต่ำกว่าปลาที่ได้รับอาหารสูตร -E+hSMhNS, +E-Se, +ESM1, +ESM2, +ENS1 และ +ENS2 อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.05$) ดังแสดงในตารางที่ 10

ปริมาณเม็ดเลือดขาวในปลากะพงขาวทุกชุดการทดลองไม่แตกต่างกันทางสถิติ ($p>0.05$) โดยปริมาณเม็ดเลือดขาวอยู่ในช่วง 3.57 - 4.29 x 10^7 เซลล์ต่อมิลลิลิตร (ตารางที่ 10)

3.1.2 ปริมาณเม็ดเลือดแดงอัดแน่น

ปริมาณเม็ดเลือดแดงอัดแน่นของปลากะพงขาวที่ได้รับอาหารสูตร +ESM1 มีค่าสูงสุดคือ 28.73±1.68 เปอร์เซ็นต์ รองลงมาคือปลาที่ได้รับอาหารสูตร -E+hSMhNS, +E-Se, +ESM2, +ENS2, +ENS1 และ -E-Se ซึ่งมีปริมาณเม็ดเลือดแดงอัดแน่น 28.25±2.29, 27.85±1.72, 27.53±2.67, 26.85±1.14, 26.46±2.38 และ 25.30±2.87 x 10^7 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ โดยปริมาณเม็ดเลือดแดงอัดแน่นในปลาที่ได้รับอาหารสูตร -E+hSMhNS, +E-Se, +ESM1 และ +ESM2 ไม่แตกต่างกันทางสถิติ ($p>0.05$) ส่วนปริมาณเม็ดเลือดแดงอัดแน่นในปลาที่ได้รับอาหารสูตร +ESM1 มีค่าสูงกว่าสูตรอาหาร -E-Se, +ENS1 และ +ENS2 อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.05$) ดังแสดงในตารางที่ 10

ตารางที่ 10 ปริมาณเม็ดเลือดแดง เม็ดเลือดขาว และเม็ดเลือดแดงอัดแน่นของปลากะพงขาวที่ได้รับอาหารทดลอง 7 สูตร เป็นเวลา 8 สัปดาห์

สูตรอาหาร	เม็ดเลือดแดง (x 10^7 cells/ml)	เม็ดเลือดขาว (x 10^7 cells/ml)	เม็ดเลือดแดงอัดแน่น (%)
-E-Se	20.13±4.28 [a]	3.57±1.06 [a]	25.30±2.87 [a]
-E+hSMhNS	24.16±3.34 [b]	3.60±0.74 [a]	28.25±2.29 [cd]
+E-Se	23.95±4.65 [b]	4.13±0.91 [a]	27.85±1.72 [cd]
+ESM 1	26.01±4.98 [b]	4.29±0.96 [a]	28.73±1.68 [d]
+ESM 2	24.29±4.08 [b]	3.63±0.94 [a]	27.53±2.67 [bcd]
+ENS 1	24.17±3.44 [b]	4.07±1.02 [a]	26.46±2.38 [bc]
+ENS 2	23.99 ±4.28 [b]	4.11±1.07 [a]	26.85±1.14 [bc]

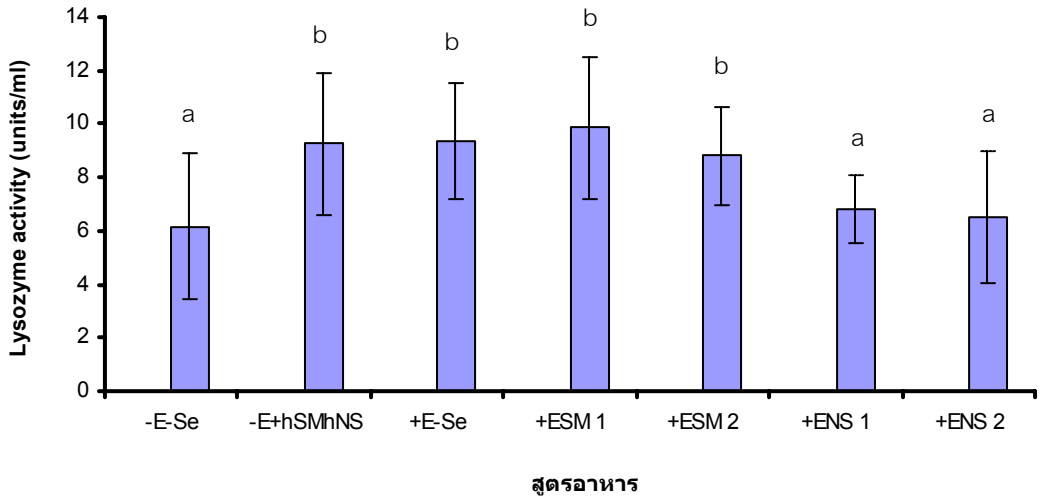
*ตัวเลขที่นำเสนอเป็นค่าเฉลี่ย±และค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน (จากข้อมูล 3 ซ้ำ)

ค่าเฉลี่ยในสดมภ์ที่มีตัวอักษรต่างกัน มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.05$)

3.2 ผลของซีลีเนียมต่อระบบภูมิคุ้มกันแบบไม่จำเพาะในปลากะพงขาว

3.2.1 ปริมาณไลโซไซม์ แอคติวิตี้

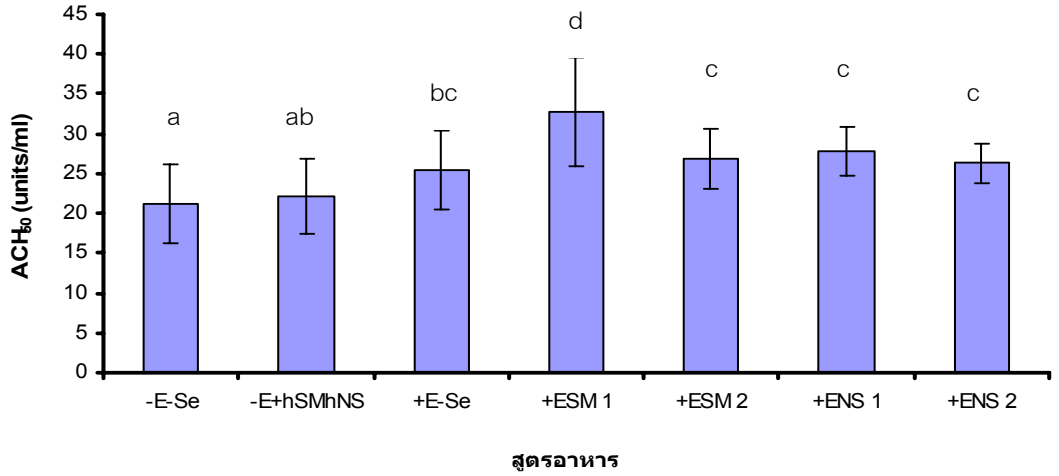
ปลากะพงขาวที่ได้รับอาหารสูตร +ESM1 มีปริมาณไลโซไซม์สูงสุดคือ 9.87±2.66 units/ml. รองลงมาคือปลาที่ได้รับอาหารสูตร +E-Se, -E+hSMhNS, +ESM2, +ENS1, +ENS2 และ -E-Se ซึ่งมีปริมาณไลโซไซม์ 9.36±2.15, 9.25±2.67, 8.80±1.81, 6.79±1.26, 6.54±2.46 และ 6.15±2.73 units/ml. ตามลำดับ โดยปริมาณไลโซไซม์ในปลาที่ได้รับอาหารสูตร -E-Se, +ENS1 และ +ENS2 ต่ำกว่าสูตรอาหาร -E+hSMhNS, +E-Se, +ESM1 และ +ESM2 อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.05$) ดังแสดงในภาพที่ 8



ภาพที่ 8 ไลโซไซม์ของปลากะพงขาวที่ได้รับอาหารทดลอง 7 สูตร เป็นเวลา 8 สัปดาห์

3.2.2 ปริมาณคอมพลีเม้นท์ แอคติวิตี้ (ACH_{50})

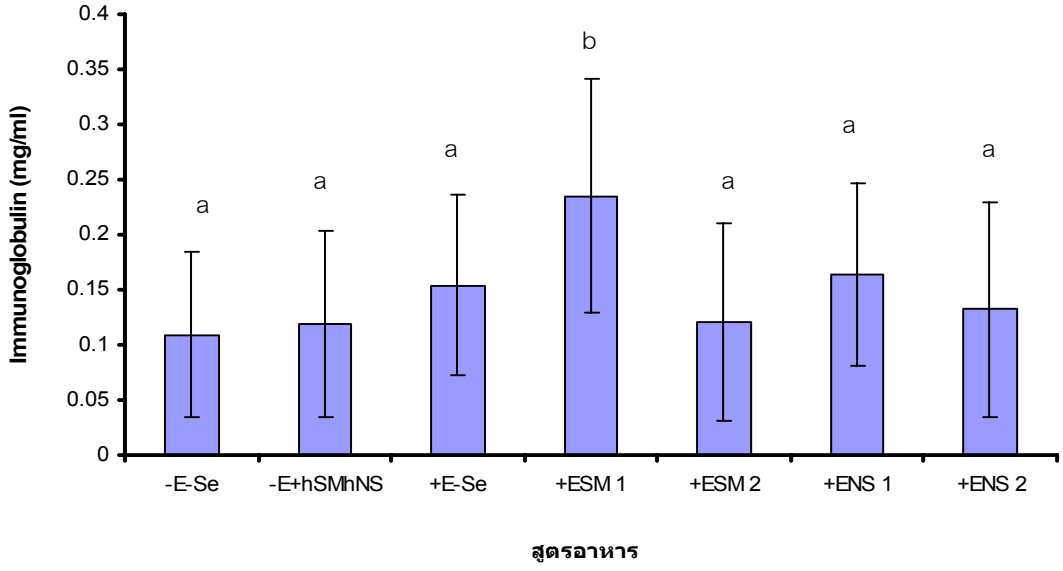
ปลากะพงขาวที่ได้รับอาหารสูตร +ESM1 มีปริมาณคอมพลีเม้นท์สูงสุดคือ 32.64±6.83 units/ml. รองลงมาคือปลาที่ได้รับอาหารสูตร +ENS1, +ESM2, +ENS2, +E-Se, -E+hSMhNS และ -E-Se ซึ่งมีปริมาณคอมพลีเม้นท์ 27.81±2.97, 26.86±3.88, 26.30±2.41, 25.48±4.89, 22.09±4.74 และ 21.21±4.87 units/ml. ตามลำดับ โดยปริมาณคอมพลีเม้นท์ในสูตรอาหาร +E-Se, +ESM2, +ENS1 และ +ENS2 ไม่แตกต่างกันทางสถิติ ($p>0.05$) ขณะที่ปริมาณคอมพลีเม้นท์ในปลาที่ได้รับอาหารสูตร +ESM1 สูงกว่าปลาที่ได้รับอาหารสูตร -E-Se, -E+hSMhNS, +E-Se, +ESM2, +ENS1 และ +ENS2 อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.05$) ดังแสดงในภาพที่ 9



ภาพที่ 9 คอมพลีเม้นท์ของปลากะพงขาวที่ได้รับอาหารทดลอง 7 สูตร เป็นเวลา 8 สัปดาห์

3.2.3 ปริมาณอิมมูโนโกลบูลิน

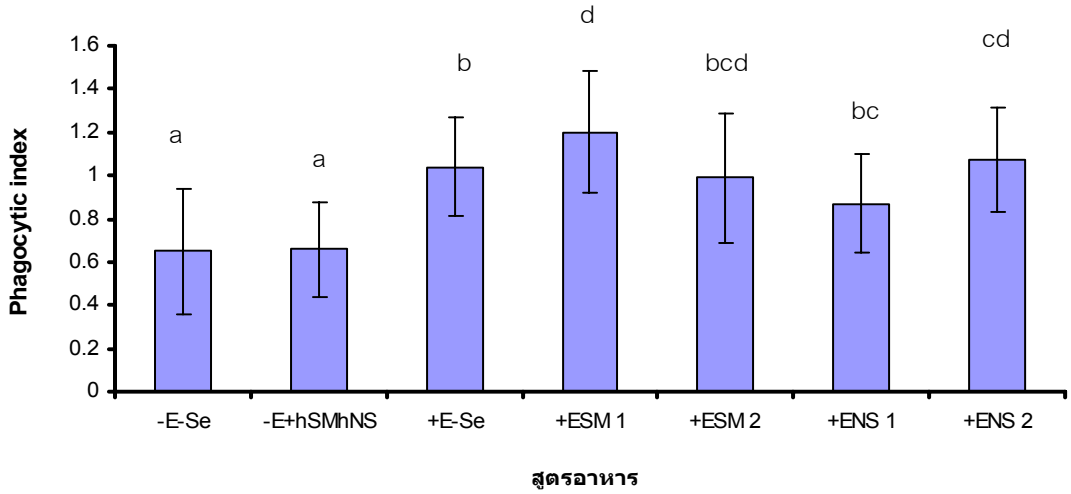
ปลากะพงขาวที่ได้รับอาหารสูตร +ESM1 มีปริมาณอิมมูโนโกลบูลินสูงสุดคือ 0.235±0.11 mg/ml. รองลงมาคือปลาที่ได้รับอาหารสูตร +ENS1, +E-Se, +ENS2, +ESM2, -E+hSMhNS และ -E-Se ซึ่งมีปริมาณอิมมูโนโกลบูลิน 0.164±0.08, 0.154±0.08, 0.132±0.10, 0.121±0.09, 0.119±0.08 และ 0.109±0.08 mg/ml. ตามลำดับ โดยปริมาณอิมมูโนโกลบูลินในปลาที่ได้รับอาหารสูตร +ESM1 สูงกว่าปลาที่ได้รับอาหารสูตร -E-Se, -E+hSMhNS, +E-Se, +ESM2, +ENS1 และ +ENS2 อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.05$) ดังแสดงในภาพที่ 10



ภาพที่ 10 อิมมูโนโกลบูลินของปลากะพงขาวที่ได้รับอาหารทดลอง 7 สูตร เป็นเวลา 8 สัปดาห์

3.2.4 ปริมาณการจับกินสิ่งแปลกปลอม

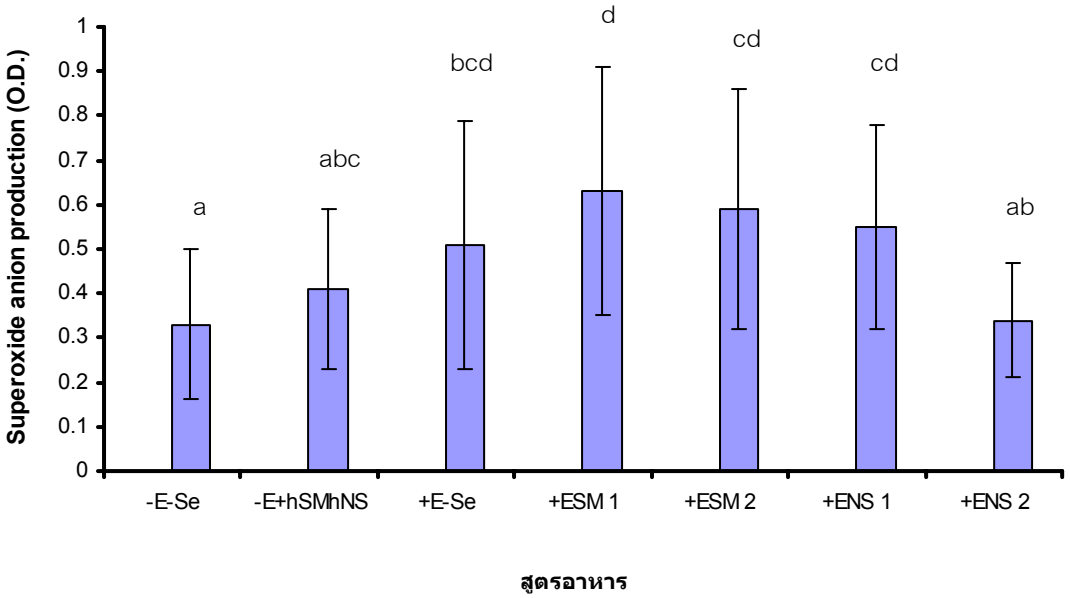
ปลากะพงขาวที่ได้รับอาหารสูตร +ESM1 มีปริมาณการจับกินสิ่งแปลกปลอมสูงสุดคือ 1.20±0.28 รองลงมาคือปลาที่ได้รับอาหารสูตร +ENS2, +ESM2, +ENS1, +E-Se, -E+hSMhSN และ -E-Se ซึ่งมีปริมาณการจับกินสิ่งแปลกปลอม 1.07±0.24, 1.04±0.23, 0.99±0.30, 0.87±0.23, 0.66±0.22 และ 0.65±0.29 ตามลำดับ โดยปริมาณการจับกินสิ่งแปลกปลอมในสูตรอาหาร +E-Se, +ESM2 และ +ENS1 ไม่แตกต่างกันทางสถิติ ($p>0.05$) ขณะที่ปริมาณการจับกินสิ่งแปลกปลอมในปลาที่ได้รับอาหารสูตร +ESM1 สูงกว่าปลาที่ได้รับอาหารสูตร -E-Se, -E+hSMhSN, +E-Se และ +ENS1 อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.05$) ดังแสดงในภาพที่ 11



ภาพที่ 11 การจับกินสิ่งแปลกปลอมของปลากะพงขาวที่ได้รับอาหารทดลอง 7 สูตร เป็นเวลา 8 สัปดาห์

3.2.5 ปริมาณซุปเปอร์ออกไซด์แอนไอออน

ปลากะพงขาวที่ได้รับอาหารสูตร +ESM1 ผลิตซุปเปอร์ออกไซด์แอนไอออนจากเม็ดเลือดขาวได้สูงสุดคือ 0.63±0.28 OD รองลงมาคือปลาที่ได้รับอาหารสูตร +ESM2, +ENS1, +E-Se, -E+hSMhSN, ENS2 และ -E-Se ซึ่งมีปริมาณซุปเปอร์ออกไซด์แอนไอออน 0.59±0.27, 0.55±0.23, 0.51±0.28, 0.41±0.18, 0.34±0.13 และ 0.33±0.17 OD ตามลำดับ โดยปริมาณซุปเปอร์ออกไซด์แอนไอออนที่ผลิตจากเม็ดเลือดขาวของปลาที่ได้รับอาหารสูตร -E+hSMhSN, +E-Se, +ESM1 และ +ESM2 ไม่แตกต่างกันทางสถิติ ($p>0.05$) ขณะที่ปริมาณซุปเปอร์ออกไซด์แอนไอออนที่ผลิตจากเม็ดเลือดปลาที่ได้รับอาหารสูตร +ESM1 สูงกว่าปลาที่ได้รับอาหารสูตร -E-Se, +ENS1 และ +ENS2 อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.05$) ดังแสดงในภาพที่ 12



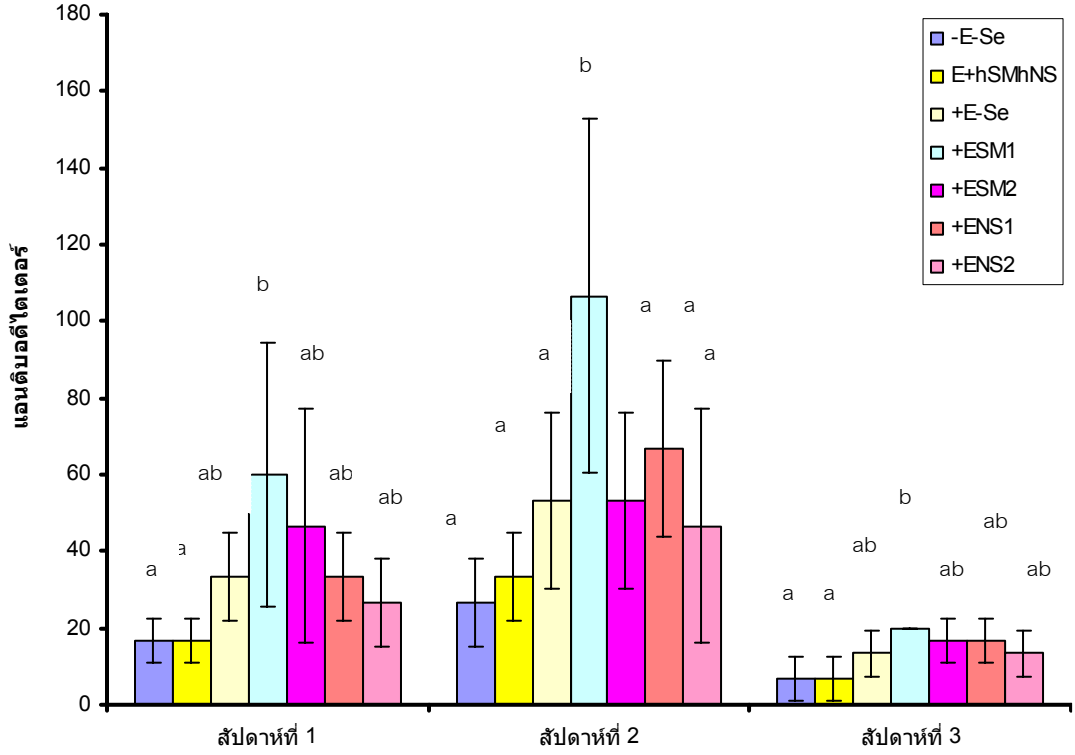
ภาพที่ 12 ซุปเปอร์ออกไซด์แอนไอออนของปลากะพงขาวที่ได้รับอาหารทดลอง 7 สูตร เป็นเวลา 8 สัปดาห์

4. ผลของซีลีเนียมต่อระบบภูมิคุ้มกันแบบจำเพาะในปลากะพงขาว

หลังจากฉีดวัคซีนจากเชื้อสเตร็บโตคอคคัสให้ปลากะพงขาว 1 สัปดาห์ พบว่าปลากะพงขาวที่ได้รับอาหารสูตร +ESM1 มีปริมาณแอนติบอดีไตเตอร์สูงสุดคือ 60.00±34.6 รองลงมาคือปลาที่ได้รับอาหารสูตร +ESM2, +E-Se, +ENS1, +ENS2, -E+hSMhSN และ -E-Se ซึ่งมีปริมาณแอนติบอดีไตเตอร์ 46.67±30.60, 33.33±11.50, 33.33±11.50, 26.67±11.50, 16.67±5.77 และ 16.67±5.77 ตามลำดับ โดยปริมาณแอนติบอดีไตเตอร์ ในปลาที่ได้รับอาหารสูตร +E-Se, +ESM1, +ESM2, +ENS1 และ +ENS2 ไม่แตกต่างกันทางสถิติ ($p>0.05$) ขณะที่ปริมาณแอนติบอดีไตเตอร์ในปลาที่ได้รับอาหารสูตร +ESM1 สูงกว่าปลาที่ได้รับอาหารสูตร -E-Se และ -E+hSMhSN อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.05$) ดังแสดงในภาพที่ 13

ในสัปดาห์ที่ 2 หลังการฉีดวัคซีน ปริมาณแอนติบอดีไตเตอร์ของปลากะพงขาวทุกชุดการทดลองเพิ่มขึ้นจากสัปดาห์แรก โดยปลากะพงขาวที่ได้รับอาหารสูตร +ESM1 มีปริมาณแอนติบอดีไตเตอร์เพิ่มขึ้นสูงสุดคือ 106.70±46.91 รองลงมาคือปลาที่ได้รับอาหารสูตร +ENS1, +ESM2, +E-Se, +ENS2, -E+hSMhSN และ -E-Se ซึ่งมีปริมาณแอนติบอดีไตเตอร์ 66.67±23.09, 53.33±23.09, 53.33±23.09, 46.67±30.55, 33.33±11.55 และ 26.67±11.55 ตามลำดับ โดยปริมาณแอนติบอดีไตเตอร์ในปลาที่ได้รับอาหารสูตร -E-Se, -E+hSMhSN, +E-Se, +ESM2, +ENS1 และ +ENS2 ไม่

แตกต่างกันทางสถิติ ($p>0.05$) ขณะที่ปริมาณแอนติบอดีไตเตอร์ในปลาที่ได้รับอาหารสูตร +ESM1 สูงกว่าสูตรอาหาร -E-Se, -E+hSMhSN, +E-Se, +ESM2, +ENS1 และ +ENS2 อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.05$) ดังแสดงในภาพที่ 13

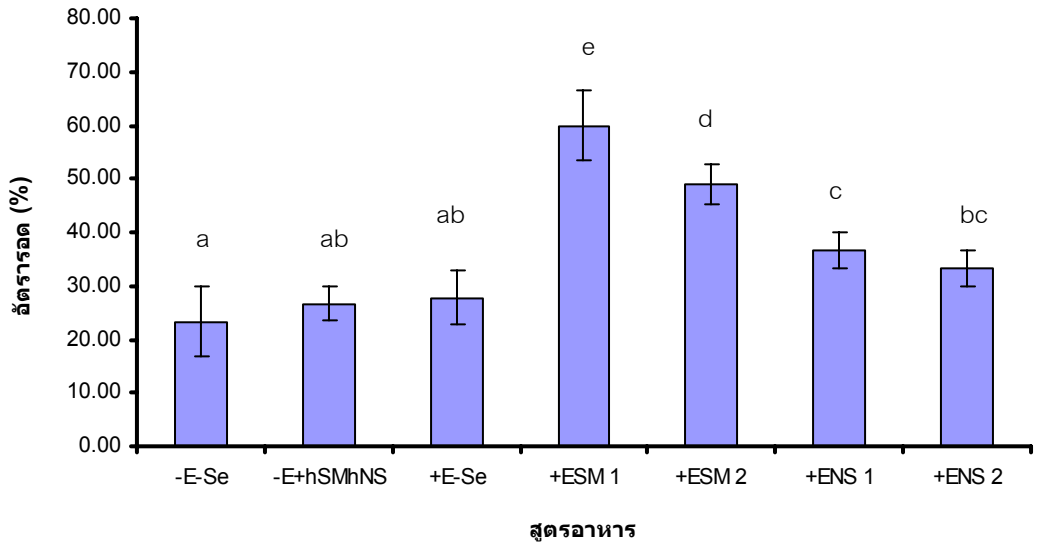


ภาพที่ 13 แอนติบอดีไตเตอร์ของปลากะพงขาวในสัปดาห์ที่ 1, 2 และ 3 หลังจากได้รับอาหารทดลอง 7 สูตร เป็นเวลา 8 สัปดาห์

ในสัปดาห์ที่ 3 หลังการฉีดวัคซีน ปริมาณแอนติบอดีไตเตอร์ของปลากะพงขาวที่ได้รับอาหารสูตร +ESM1 สูงสุดคือ 20.00±0.00 รองลงมาคือปลาที่ได้รับอาหารสูตร +ESM2, +ENS1, +E-Se, +ENS2, -E+hSMhSN และ -E-Se ซึ่งมีปริมาณแอนติบอดีไตเตอร์ 16.70±5.77, 16.70±5.77, 13.33±5.77, 13.33±5.77, 6.77±5.77 และ 6.77±5.77 ตามลำดับ โดยปริมาณแอนติบอดีไตเตอร์ ในสูตรอาหาร +E-Se, +ESM2, +ENS1 และ +ENS2 ไม่แตกต่างกันทางสถิติ ($p>0.05$) ขณะที่ปริมาณแอนติบอดีไตเตอร์ในปลาที่ได้รับอาหารสูตร +ESM1 สูงกว่าสูตรอาหาร -E-Se และ -E+hSMhSN อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.05$) ดังแสดงในภาพที่ 13

5. ผลของซีลีเนียมต่อความต้านทานโรคในปลากะพงขาว

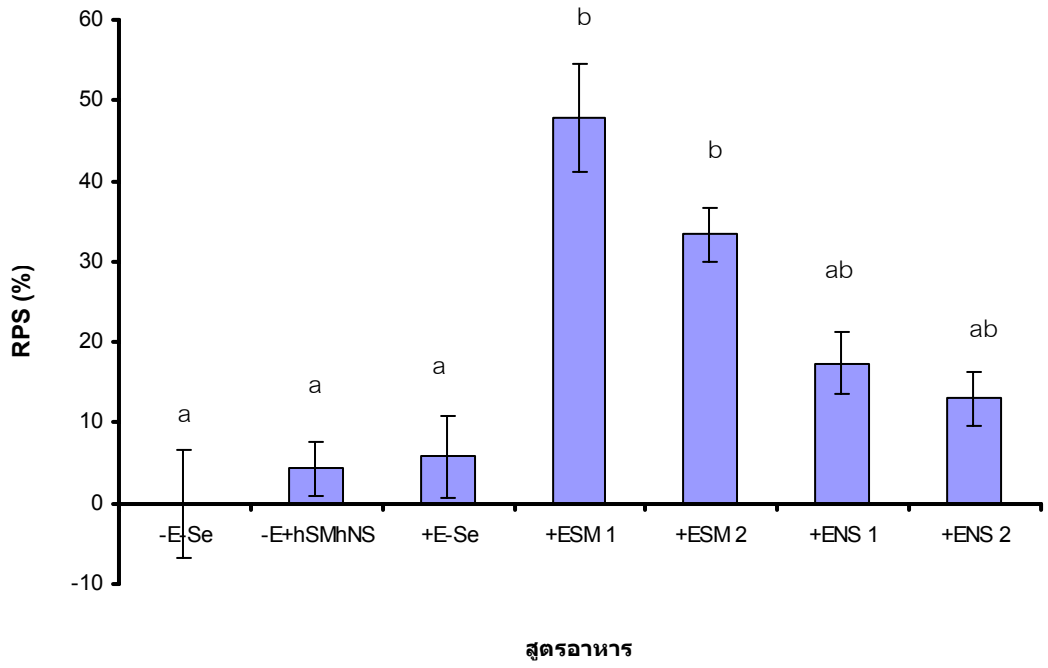
ผลการทดสอบความต้านทานต่อเชื้อ *Streptococcus* sp. ของปลากะพงขาวหลังเลี้ยงด้วยอาหารทดลองเป็นเวลา 8 สัปดาห์ พบว่าอัตรารอดตายของปลาที่ได้รับอาหารสูตร +ESM1 สูงสุด คิดเป็น 60.00±6.67 เปอร์เซ็นต์ รองลงมาคือปลาที่ได้รับอาหารสูตร +ESM2, +ENS1, +ENS2, +E-Se, -E+hSMhSN และ -E-Se ซึ่งมีอัตรารอดตาย 48.89±3.85, 36.67±3.33, 33.33±3.33, 27.78±5.09, 26.67±3.33 และ 23.33±6.67 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ โดยอัตรารอดตายของปลาที่ได้รับอาหารสูตร -E-Se, -E+hSMhSN และ +E-Se ไม่ แตกต่างกันทางสถิติ ($p>0.05$) ขณะที่อัตรารอดตายของปลาที่ได้รับอาหารสูตร +ESM1 มีค่าสูงกว่าปลาที่ได้รับอาหารสูตร -E-Se, - E+hSMhSN, +E-Se, +ESM2, +ENS1 และ +ENS2 อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.05$) ดังแสดงในภาพที่ 14



ภาพที่ 14 อัตรารอดตาย (%) หลังฉีดเชื้อ *Streptococcus* sp. ของปลากะพงขาวหลังจากได้รับอาหารทดลอง 7 สูตร เป็นเวลา 8 สัปดาห์

และเมื่อนำมาหาความสัมพันธ์ของเปอร์เซ็นต์การรอดตาย (RPS) พบว่าปลากะพงขาวที่ได้รับอาหารสูตร +ESM1 มีค่าความสัมพันธ์ของการรอดตายสูงสุด 47.83±6.70 เปอร์เซ็นต์ รองลงมาคือปลาที่ได้รับอาหารสูตร +ESM2, +ENS1, +ENS2, +E-Se, -E+hSMhSN และ -E-Se ซึ่งมีความสัมพันธ์ของการรอดตาย 33.35±3.81, 17.39±3.35, 13.04±3.35, 5.78±5.08, 4.35±3.35 และ 0 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ โดยความสัมพันธ์ของเปอร์เซ็นต์การรอดตายของปลาที่ได้รับอาหารสูตร +ESM1 และ +ESM2 ไม่แตกต่างกันทางสถิติ ($p>0.05$) ขณะที่ความสัมพันธ์ของเปอร์เซ็นต์การรอด

ตายของปลาที่ได้รับอาหารสูตร -E-Se, - E+hSMhSN และ +E-Se ไม่แตกต่างกันทางสถิติ ($p>0.05$) ดังแสดงในภาพที่ 15



ภาพที่ 15 ความสัมพันธ์ของเปอร์เซ็นต์การรอดตาย (RPS) หลังฉีดเชื้อ *Streptococcus* sp. ของปลากะพงขาวหลังจากได้รับอาหารทดลอง 7 สูตร เป็นเวลา 8 สัปดาห์

บทที่ 4

วิจารณ์ผลการทดลอง

1. ผลของซีลีเนียมต่อการเจริญเติบโต

จากการทดลองพบว่าการเสริมซีลีโนเมทไธโอนีนในอาหารทดลอง (สูตร +ESM1 และ +ESM2) สำหรับเลี้ยงปลากะพงขาว เป็นเวลา 8 สัปดาห์ ส่งผลให้ปลามีการเจริญเติบโตสูงกว่าการเสริมโซเดียมซีลีไนท์ (สูตร +ESN1 และ +ESN2) อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.05$) โดยเฉพาะปริมาณการเสริมซีลีโนเมทไธโอนีน 1 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัมอาหาร (+ESM1, ปริมาณซีลีเนียมจากการวิเคราะห์ในอาหาร 3.28 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัมอาหาร) มีผลทำให้ปลามีการเจริญเติบโตสูงสุด โดยมีน้ำหนักเฉลี่ยต่อตัว เปอร์เซ็นต์น้ำหนักที่เพิ่มขึ้น และประสิทธิภาพการกินอาหารสูงกว่าปลาที่ได้รับอาหารสูตรอื่นๆ อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.05$) ขณะที่อัตรารอดของปลาทุกสูตรอาหารทดลองไม่แตกต่างกันทางสถิติ ($p>0.05$) แสดงให้เห็นว่าการเสริมซีลีเนียมในอาหารเลี้ยงปลากะพงขาวในรูปของซีลีเนียมอินทรีย์ (Organic selenium) คือซีลีโนเมทไธโอนีนทำให้ปลาเจริญเติบโตดีกว่าการเสริมโซเดียมซีลีไนท์ ซึ่งเป็นซีลีเนียมอนินทรีย์ (Inorganic selenium) เช่นเดียวกับการศึกษาในปลาแซลมอน ปลาดุกอเมริกัน และปลาคาร์พ (Lorentzen *et al*., 1994; Wang and Lovell, 1997; Wang *et al*., 2007) จากการทดลองพบว่าปลากะพงขาวมีการเจริญเติบโตดีที่สุดเมื่อได้รับอาหารเสริมซีลีโนเมทไธโอนีน 1 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัมอาหาร สอดคล้องกับการทดลองของ Lin และ Shiau (2005b) ซึ่งพบว่าปลากะรังได้รับอาหารเสริมซีลีโนเมทไธโอนีน 0.79 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัมอาหาร มีผลทำให้น้ำหนักตัวและประสิทธิภาพการกินอาหารเพิ่มขึ้น เช่นเดียวกับปลาแซลมอนที่ต้องการซีลีโนเมทไธโอนีน 0.1 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัมอาหารเพื่อใช้ในการเจริญเติบโต (Poston *et al*., 1976) ขณะที่ปลาเรนโบว์เทร้าต้องการโซเดียมซีลีไนท์ 0.15-0.38 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัมอาหาร (Hilton *et al*., 1980) ปลาดุกอเมริกันต้องการโซเดียมซีลีไนท์ 0.25 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัมอาหาร (Gatlin and Wilson, 1984) และปลาโคโฮแซลมอนต้องการโซเดียมซีลีไนท์ในการเจริญเติบโตสูงถึง 5-7 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัมอาหาร (Felton *et al*., 1996 อ้างตาม Santosh, 2002) จากการศึกษาข้างต้นสรุปได้ว่าปลาแต่ละชนิดต้องการซีลีเนียมที่เหมาะสมสำหรับการเจริญเติบโตแตกต่างกัน ขึ้นอยู่กับปริมาณ และรูปแบบของซีลีเนียมที่ใช้ อายุปลา ระยะเวลาการได้รับซีลีเนียม และสภาพแวดล้อมในการเลี้ยงปลาขณะทำการทดลอง (Paripatananont and Lovell, 1997) และปลากะพงขาวที่ได้รับซีลีโนเมทไธโอนีนมีการเจริญเติบโตดีกว่าโซเดียมซีลีไนท์ ทั้งนี้เนื่องจากเมทไธโอนีนเป็นกรดอะมิโนที่จำเป็นต่อการเจริญเติบโตของปลา โดยความต้องการเมท

ไธโอนีนในปลาทะเลเท่ากับ 1.4 เปอร์เซ็นต์อาหาร (National Research Council, 1989) นอกจากนี้เนื่องจากซีลีโนเมทไธโอนีนมีความจำเพาะกับเมทไธโอนีนที่มีอยู่ในโปรตีน (Schrauzer, 2000) จึงสามารถเข้าแทนที่เมทไธโอนีนซึ่งเป็นกรดอะมิโนที่ใช้ในการสังเคราะห์โปรตีนได้ดี จึงสะสมในเนื้อเยื่อได้ดีกว่า (Jacques, 2001)

จากการศึกษาครั้งนี้ตลอดการทดลอง 8 สัปดาห์ ปลากะพงขาวไม่แสดงอาการผิดปกติหรือเป็นพิษจากการได้รับซีลีเนียมเกินความต้องการของร่างกาย ซึ่งปริมาณซีลีเนียมสูงสุดจากการทดลองคือ 4.50 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัมอาหาร เป็นปริมาณที่ไม่เป็นพิษต่อปลากะพงขาว ขณะที่ในปลากะรังเมื่อได้รับอาหารผสมซีลีโนเมทไธโอนีน 4.00 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัมอาหาร เป็นเวลา 8 สัปดาห์ มีผลให้น้ำหนักตัว และประสิทธิภาพการกินอาหารของปลาลดลง (Lin and Shiau, 2005b) ปลาดุกอเมริกันได้รับอาหารเสริมโซเดียมซีลีไนท์ 15 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัมอาหาร ทำให้ปลามีอัตราการเจริญเติบโต และประสิทธิภาพการใช้อาหารลดลง และก่อนตาย 12-24 ชั่วโมง ปลาจะว่ายน้ำควงสว่าน ทำให้มีอัตราการตายสูง ซึ่งลักษณะอาการดังกล่าวพบในปลาเทร้าท์ที่ได้รับโซเดียมซีลีไนท์ 13 และ 10 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัมอาหารด้วยเช่นกัน (Gatlin and Wilson, 1984; Hilton *et al*., 1980; Goettl and Davies, 1978) โดยปกติปลาสามารถขับซีลีเนียมส่วนเกินออกจากร่างกายผ่านทางเหงือกและการขับถ่าย แต่หากได้รับติดต่อกันเป็นเวลานานจะเกิดการสะสมและส่งผลให้เกิดความเป็นพิษของซีลีเนียมได้ (Hodson *et al*.,1980 อ้างตาม Santosh, 2002)

วิตามินอีและซีลีเนียมมีความสัมพันธ์กันในการทำหน้าที่เป็นสารต้านอนุมูลอิสระป้องกันเซลล์จากการทำลายของปฏิกิริยาออกซิเดชั่น (Gatlin *et al*., 1986; Hoekstra *et al*., 1974) จึงมีการเสริมวิตามินอีและซีลีเนียมในอาหารเพื่อป้องกันการเกิดโรคในปลาหลายๆ ชนิด เช่นการทดลองของ Thorarinsson และคณะ (1994) ซึ่งพบว่าการเสริมวิตามินอีร่วมกับซีลีเนียมทำให้ปลา Chinook salmon มีการเจริญเติบโตดีกว่าการเสริมวิตามินอีและซีลีเนียมในปริมาณน้อย เช่นเดียวกับที่รายงานในปลาเทร้า (Bell *et al.,* 1986) จากการทดลองครั้งนี้ที่พบว่าการเสริมวิตามินอี (50 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัมอาหาร) ร่วมกับซีลีเนียมในอาหารสูตร +ESM1, +ESM2, +ENS1 และ +ENS2 มีผลให้ปลากะพงขาวมีการเจริญเติบโตดีกว่าปลาที่ไม่ได้รับการเสริมวิตามินอีในสูตรอาหาร (-E-Se และ -E+hSMhNS) แสดงว่าการเสริมวิตามินอีช่วยเสริมสร้างการเจริญเติบโตของปลากะพงขาวได้

2. ผลของซีลีเนียมต่อเอนไซน์กลูทาไธโอนเปอร์ออกซิเดส

การทำงานของเอนไซน์กลูทาไธโอนเปอร์ออกซิเดสเป็นพื้นฐานสำคัญของเซลล์ในการลดปริมาณไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ในการป้องกันเซลล์จากการเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชัน (Rutruck *et*

al., 1973) ซึ่งเอนไซน์กลูทาไธโอนเปอร์ออกซิเดสมีซีลีเนียมเป็นองค์ประกอบ ปริมาณซีลีเนียมในอาหารที่แตกต่างกันจึงมีผลต่อการทำงานของเอนไซน์กลูทาไธโอนเปอร์ออกซิเดส จากการทดลองครั้งนี้พบว่าการเสริมซีลีโนเมทไธโอนีนและโซเดียมซีลีไนท์ 2 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัมอาหาร (+ESM2, +ENS2) ส่งผลให้การทำงานของเอนไซม์กลูทาไธโอนเปอร์ออกซิเดสสูงกว่า 1 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัมอาหาร (+ESM1, +ENS1 และ-E+hSMhNS) แสดงว่าการทำงานของเอนไซม์กลูทาไธโอนเปอร์ออกซิเดสเพิ่มขึ้นตามปริมาณซีลีเนียมที่เพิ่มขึ้นในอาหาร ซึ่งสอดคล้องกับการศึกษาของ Omaye และ Tapple (1974) ที่พบว่าการทำงานของเอนไซน์กลูทาไธโอนเปอร์ออกซิเดสมีความสัมพันธ์กับปริมาณซีลีเนียมในอาหาร หากปริมาณซีลีเนียมในอาหารมากการทำงานของเอนไซน์กลูทาไธโอนเปอร์ออกซิเดสก็จะเพิ่มสูงขึ้น เช่นเดียวกับการศึกษาของ Lin และ Shiau (2005b) ที่พบว่าในเนื้อเยื่อส่วนต่างๆ ของปลากะรังมีการทำงานของเอนไซน์กลูทาไธโอนเปอร์ออกซิเดสเพิ่มขึ้นตามปริมาณซีลีเนียมที่เพิ่มขึ้นในอาหาร

เมื่อพิจารณาผลของวิตามินอีต่อการทำงานของเอนไซม์กลูทาไธโอนเปอร์ออกซิเดสพบว่า การทำงานของเอนไซน์กลูทาไธโอนเปอร์ออกซิเดสในอาหารสูตร -E-Se และ +E-Se ไม่แตกต่างกันทางสถิติ ($p>0.05$) แสดงว่าวิตามินอีไม่มีผลต่อการทำงานของเอนไซน์กลูทาไธโอนเปอร์ออกซิเดส เช่นเดียวกับการศึกษาของ Wise และคณะ (1993) พบว่าการเสริมเฉพาะซีลีเนียมในอาหารปลาดุกอเมริกัน มีผลเพิ่มปริมาณเอนไซน์กลูทาไธโอนเปอร์ออกซิเดสได้มากกว่าการเสริมเฉพาะวิตามินอีและการไม่ได้เสริมซีลีเนียมและวิตามินอีในอาหารอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.05$) สอดคล้องกับการศึกษาของ Bell และคณะ (1985) พบว่าปลาเทร้าที่ได้รับอาหารเสริมซีลีเนียมในปริมาณน้อยและเพิ่มปริมาณวิตามินอีให้สูงขึ้นการทำงานของเอนไซน์กลูทาไธโอนเปอร์ออกซิเดสน้อยกว่าปลาที่ได้รับอาหารเสริมวิตามินอีปริมาณน้อยแต่เพิ่มปริมาณซีลีเนียมสูงขึ้น เช่นเดียวกับการทดลองครั้งนี้ที่พบว่าการเสริมซีลีเนียมเพิ่มขึ้นในสูตรอาหาร +ENS1, +ENS2, +ESM1 และ +ESM2 มีผลให้การทำงานของเอนไซน์กลูทาไธโอนเปอร์ออกซิเดสเพิ่มขึ้นตามปริมาณการเสริมซีลีเนียมในอาหาร ดังนั้นหากสัตว์น้ำได้รับการเสริมซีลีเนียมร่วมกับวิตามินอีในปริมาณที่เหมาะสมสามารถเพิ่มการทำงานของเอนไซน์กลูทาไธโอนเปอร์ออกซิเดสได้ (Thorarinsson *et al*., 1994)

3. ผลของซีลีเนียมต่อองค์ประกอบเลือดและภูมิคุ้มกันแบบไม่จำเพาะ

จากการศึกษาครั้งนี้พบว่าองค์ประกอบเลือดได้แก่ ปริมาณเม็ดเลือดแดง เม็ดเลือดขาว และปริมาณเม็ดเลือดแดงอัดแน่น ของปลากะพงขาวที่ได้รับอาหารเสริมซีลีโนเมทไธโอนีน และเสริมโซเดียมซีลีไนท์ไม่แตกต่างกันทางสถิติ ($p>0.05$) ส่วนปลาที่ได้รับอาหารสูตร -E-Se มีปริมาณ

เม็ดเลือดแดงและเม็ดเลือดแดงอัดแน่นต่ำกว่าปลาที่ได้รับการเสริมวิตามินอีทุกสูตรอาหาร แสดงว่าวิตามินอีมีผลต่อปริมาณเม็ดเลือดแดงและเม็ดเลือดแดงอัดแน่น ขณะที่การเสริมหรือไม่เสริมซีลีเนียมในอาหารไม่มีผลต่อปริมาณเม็ดเลือดแดงและเม็ดเลือดแดงอัดแน่น เพราะวิตามินอีทำหน้าที่ป้องกันผนังเซลล์ไม่ให้เกิดลิปิดออกซิเดชั่น ขณะที่ซีลีเนียมเป็นองค์ประกอบของเอนไซม์กลูทาไธโอนเปอร์ออกซิเดส ป้องกันการเกิดอนุมูลอิสระได้ดีกว่า (Zhu *et al*., 1992) สอดคล้องกับการศึกษาของ Bell และคณะ (1985) พบว่าเมื่อปลาเทร้าได้รับวิตามินอีและซีลีเนียมในปริมาณน้อยมีผลให้กล้ามเนื้อถูกทำลาย เกิดการรั่วซึมของเอนไซม์ ซึ่งจากการทดลองพบว่าการเสริมหรือไม่เสริมวิตามินอีในอาหารให้ผลเกี่ยวกับค่าองค์ประกอบเลือดไม่แตกต่างกันทางสถิติ ($p>0.05$) เนื่องจากในวัตถุดิบการทำอาหาร เช่น น้ำมันถั่วเหลือง น้ำมันปลาหมึก ปลาป่น มีปริมาณวิตามินอีค่อนข้างสูง (ปริมาณวิตามินอีจากการวิเคราะห์ในอาหารทดลอง 30-35 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัมอาหาร) ไม่แตกต่างจากการเสริมวิตามินอีในอาหาร (ปริมาณวิตามินอีจากการวิเคราะห์ในอาหารทดลอง 40-49 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัมอาหาร) เช่นเดียวกับการศึกษาของสุนีย์รัตน์ (2541) ซึ่งพบว่าปริมาณวิตามินอีในอาหารทดลองที่เสริมวิตามินอีสังเคราะห์ในรูป α-tocopherol acetate มีค่าน้อยกว่าปริมาณวิตามินอีในอาหารสูตรพื้นฐานที่ไม่มีการเสริมวิตามินอี

จากการทดลองพบว่า ปลากะพงขาวที่ได้รับการเสริมซีลีโนเมทไธโอนีนในอาหารสามารถเพิ่มการทำงานของระบบภูมิคุ้มกันแบบไม่จำเพาะได้ดีกว่าการเสริมโซเดียมซีลีไนท์ โดยเฉพาะการเสริมซีลีโนเมทไธโอนีน 1 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัมอาหาร ทำให้ปลากะพงขาวมีปริมาณไลโซไซม์ คอมพลีเม้นท์ อิมมูโนโกลบูลิน ซุปเปอร์ออกไซด์แอนไอออน และการจับกินสิ่งแปลกปลอม สูงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.05$) เช่นเดียวกับการศึกษาของ Lin และ Shiau (2006) ในปลากะรังพบว่าการเสริมซีลีโนเมทไธโอนีนในอาหาร 1.6 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัมอาหาร มีผลทำให้ปริมาณ Respiratory burst activity อิมมูโนโกลบูลิน และไลโซไซม์เพิ่มสูงขึ้นเมื่อเทียบกับชุดควบคุมที่ไม่มีการเสริมซีลีโนเมทไธโอนีน การเสริมซีลีโนเมทไธโอนีนร่วมกับกลูแคนสามารถเพิ่มปริมาณไลโซไซม์ในปลา Hybrid Striped Bass ได้เช่นกัน (Jaramillo and Gatlin, 2004) เช่นเดียวกับการศึกษาของ Liang และคณะ (2006) พบว่าการเพิ่มกลูทาไธโอน 50 มิลลิกรัมต่อลิตรในหลอดทดลองซึ่งมีอาหารเลี้ยงเซลล์แมคโครฟาจของปลานิล มีผลทำให้การตอบสนองของเซลล์แมคโครฟาจเพิ่มขึ้น โดยมีค่า Respiratory burst activity สูงสุด 90 เปอร์เซ็นต์ และการศึกษาของ Wise และคณะ (1993) พบว่าการเสริมซีลีไนท์ 0.8 ร่วมกับวิตามินอี 240 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัมอาหาร ทำให้การทำงานของเซลล์แมคโครฟาจในปลาดุกอเมริกันเพิ่มขึ้น

จากการทดลองพบว่า ปลากะพงขาวได้รับอาหารที่ไม่มีการเสริมซีลีเนียมและวิตามินอี (-E-Se) มีปริมาณไลโซไซม์ คอมพลีเม้นท์ อิมมูโนโกลบูลิน ซุปเปอร์ออกไซด์แอนไอออน และ

การจับกินสิ่งแปลกปลอมต่ำอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.05$) ซึ่ง Wise และคณะ (1993) กล่าวว่า การได้รับวิตามินอีและซีลีเนียมในปริมาณน้อย อาจเป็นสาเหตุให้การผลิตซุปเปอร์ออกไซด์ของเซลล์แมคโครฟาจลดลงในปลาดุกอเมริกัน เพราะเซลล์เมมเบรนของเซลล์แมคโครฟาจถูกทำลาย การผลิตเอนไซม์กลูทาไธโอนเปอร์ออกซิเดสลดลง (Spallholz *et al*., 1990) การทำงานของภูมิคุ้มกันด้านเซลล์และสารน้ำของปลาเรนท์โบว์เทร้ามีประสิทธิภาพลดลง (Blazer and Wolke, 1984) ปริมาณเอนไซม์กลูทาไธโอนเปอร์ออกซิเดสในพลาสมา และตับลดลง ส่งผลให้การทำหน้าที่ของภูมิคุ้มกันลดลง (Gatlin and Wilson,1984)

4. ผลของซีลีเนียมต่อระบบภูมิคุ้มกันแบบจำเพาะ และความต้านทานโรค

เมื่อพิจารณาผลของการเสริมซีลีเนียมและวิตามินอีในอาหารสำหรับเลี้ยงปลากะพงขาวต่อการตอบสนองของภูมิคุ้มกันแบบจำเพาะ โดยการวัดแอนติบอดีไตเตอร์หลังจากปลาได้วัคซีนเชื้อ *Streptococcus* sp. ที่ฆ่าด้วยฟอร์มาลีน พบว่าในสัปดาห์ที่หนึ่งหลังได้รับวัคซีน ตรวจพบปริมาณแอนติบอดีไตเตอร์สูงสุดในปลากะพงขาวที่ได้รับอาหารเสริมวิตามินอีและซีลีโนเมทไธโอนีน 1 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัมอาหาร (+ESM1) โดยมีแนวโน้มสูงกว่าปลาที่ได้รับอาหารเสริมวิตามินอีและซีลีเนียมสูตรอื่นๆ (+E-Se, +ESM2, +ENS1, +ENS2) และสูงกว่าปลาที่ได้รับอาหารที่ไม่เสริมวิตามินอี (-E-Se, -E+hSMhNS) อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.05$) แสดงว่าวิตามินอีมีผลในการเพิ่มปริมาณแอนติบอดีในปลากะพงขาวได้ดีระดับหนึ่ง เช่นเดียวกับการทดลองของ Ndoye และคณะ (1989) ในปลาเรนโบว์เทร้าพบว่า ปลาจะสร้างแอนติบอดีเพิ่มขึ้นตามปริมาณวิตามินอีที่ได้รับสูงขึ้น จากการทดลองปริมาณแอนติบอดีในสัปดาห์ที่สองเพิ่มสูงขึ้นจากสัปดาห์แรก โดยพบว่าปลาที่ได้รับอาหารเสริมวิตามินอี และซีลีโนเมทไธโอนีน 1 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัมอาหาร (+ESM1) มีปริมาณแอนติบอดีสูงกว่าปลาที่ได้รับอาหารสูตรอื่นๆ อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.05$) อาจเนื่องจากซีลีเนียมช่วยป้องกันเม็ดเลือดขาวชนิด B lymphocyte ไม่ให้ถูกทำลายจากเปอร์ออกไซด์ที่เกิดขึ้นในระหว่างขบวนการจับกินสิ่งแปลกปลอม (Phagocytosis) จึงทำให้ B lymphocyte มีการผลิตแอนติบอดีเพิ่มขึ้น (Combs and Combs, 1986) ซึ่งสอดคล้องกับปริมาณเม็ดเลือดขาวที่มีปริมาณสูงสุดในปลาที่ได้รับอาหารชุดเดียวกัน (ตารางที่ 10) อย่างไรก็ตามปริมาณแอนติบอดีในสัปดาห์ที่สามลดลงจากปริมาณแอนติบอดีในสัปดาห์ที่สองและสัปดาห์ที่หนึ่ง ทั้งนี้อาจเนื่องจากระยะเวลาการตอบสนองของภูมิคุ้มกันแบบจำเพาะต่อแอนติเจนชนิดใดชนิดหนึ่งแตกต่างกัน ซึ่งในระยะ lag phase หรือ latent phase เป็นระยะที่ B lymphocyte รับรู้ว่าแอนติเจนเป็นสิ่งแปลกปลอม จึงแบ่งตัวเพิ่มจำนวนและเปลี่ยนแปลงรูปร่าง จนสามารถตรวจพบแอนติบอดี

ได้ ซึ่งใช้เวลาตั้งแต่ 1-30 วัน ขึ้นกับปริมาณแอนติเจน และแนวทางที่แอนติเจนเข้าสู่ร่างกาย (สุทธิพันธ์ และคณะ, 2543)

การศึกษาความต้านทานโรคโดยการนำปลากะพงขาวที่เลี้ยงด้วยอาหารทดลองทั้ง 7 สูตร เป็นเวลา 8 สัปดาห์ มาฉีดเชื้อ *Streptococcus* sp. และตรวจวัดอัตรารอดตายเป็นเวลา 14 วัน พบว่า อัตรารอดของปลาที่ได้รับอาหารเสริมซีลีโนเมทไธโอนีนสูงกว่าปลาที่ได้รับอาหารเสริมโซเดียมซีลีไนท์อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.05$) โดยเฉพาะปลาที่ได้รับซีลีโนเมทไธโอนีน 1 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัมอาหารมีอัตรารอดสูงสุด 60 เปอร์เซ็นต์ มีค่า RPS 47.83 เปอร์เซ็นต์ สอดคล้องกับปริมาณแอนติบอดีที่ตรวจพบสูงสุดในปลาที่เลี้ยงด้วยอาหารสูตรดังกล่าว ขณะที่ปลาซึ่งได้รับอาหารไม่เสริมวิตามินอีและซีลีเนียม (-E-Se) มีอัตรารอดตายต่ำสุด สอดคล้องกับการทดลองในปลา Chinook salmon ที่ได้รับอาหารที่ขาดซีลีเนียมมีอัตราการตายสูงหลังได้รับเชื้อ *Renibacterium salmoninarum* เมื่อเปรียบเทียบกับปลาที่ได้รับอาหารเสริมซีลีเนียม (Thorarinsson *et al*., 1994) เช่นเดียวกับปลาดุกอเมริกันที่มีความต้านทานต่อการติดเชื้อ *E. ictaluri* ต่ำ โดยมีอัตราการตายถึง 90 เปอร์เซ็นต์ เมื่อได้รับอาหารเสริมที่ขาดซีลีเนียม (Wang *et al*., 1997)

นอกจากนี้ในการทดลองครั้งนี้ยังพบว่า ปลากะพงขาวที่ได้รับอาหารเสริมซีลีโนเมทไธโอนีน และโซเดียมซีลีไนท์ 2 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัมอาหาร (+ESM2 และ +ENS2) มีปริมาณไลโซไซม์ คอมพลีเม้นท์ อิมมูโนโกลบูลิน ซุปเปอร์ออกไซด์แอนไอออน แอนติบอดี อัตราการรอด และค่า RPS ต่ำกว่าปลาที่ได้รับอาหารเสริมซีลีโนเมทไธโอนีน และโซเดียมซีลีไนท์ 1 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัมอาหาร (+ESM1 และ +ENS1) แสดงว่าการได้รับซีลีเนียมในปริมาณสูงนอกจากไม่สามารถเพิ่มการทำงานของระบบภูมิคุ้มกัน และความต้านทานโรคในปลากะพงขาว ยังทำให้ระบบภูมิคุม้กันลดลงด้วย ซึ่งแตกต่างจากการศึกษาของ Lin และ Shuai (2006) ที่พบว่าการทำงานของระบบภูมิคุ้มกันของปลากะรังเพิ่มขึ้น เมื่อเพิ่มปริมาณซีลีเนียมขึ้นเป็นสองเท่า เช่นเดียวกับการศึกษาของ Wise และคณะ (1993) ที่พบว่าการทำงานของเซลล์แมคโครฟาจในปลาดุกอเมริกันเพิ่มขึ้น เมื่อเพิ่มปริมาณซีลีเนียมเป็น 4 เท่า

บทที่ 5

สรุปผลการทดลอง

จากการศึกษาผลของซีลีเนียมต่อการเจริญเติบโตและระบบภูมิคุ้มกันโรคในปลากะพงขาว สามารถสรุปได้ดังนี้

1. การเสริมซีลีเนียมในอาหารทดลองสำหรับเลี้ยงปลากะพงขาว ในรูปซีลีเนียมอินทรีย์ (Organic form) ได้แก่ซีลีโนเมทไธโอนีน (สูตร +ESM1 และ +ESM2) ส่งผลให้ปลามีการเจริญเติบโตดีกว่าการเสริมในรูปโซเดียมซีลีไนท์ (สูตร +ESN1 และ +ESN2) ซึ่งเป็นซีลีเนียมอนินทรีย์ (Inorganic form) อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.05$)

2. ปลาที่ได้รับอาหารเสริมซีลีโนเมทไธโอนีน 1 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัมอาหาร (+ESM1, ซีลีเนียมจากการวิเคราะห์ 3.28 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัมอาหาร) มีการเจริญเติบโตสูงสุด โดยมีน้ำหนักเฉลี่ยต่อตัว เปอร์เซ็นต์น้ำหนักที่เพิ่มขึ้น และประสิทธิภาพการกินอาหารสูงกว่าปลาที่ได้รับอาหารสูตรอื่นๆ อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.05$) ขณะที่อัตรารอดของปลาทุกสูตรอาหารทดลองไม่แตกต่างกันทางสถิติ ($p>0.05$)

3. ปริมาณซีลีเนียมสะสมในเนื้อปลากะพงขาวที่ได้รับอาหารเสริมซีลีโนเมทไธโอนีน (สูตร +ESM1 และ +ESM2) มากกว่าปลาที่ได้รับอาหารเสริมโซเดียมซีลีไนท์ (สูตร +ESN1 และ +ESN2)

4. การเสริมวิตามินอี (50 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัมอาหาร) ร่วมกับซีลีเนียมในอาหาร (สูตร +ESM1, +ESM2, +ENS1 และ +ENS2) ส่งผลให้ปลากะพงขาวมีการเจริญเติบโตดีกว่าปลาที่ได้รับอาหารที่ไม่เสริมวิตามินอี (สูตรอาหาร -E-Se และ -E+hSMhNS) อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.05$)

5. รูปแบบของซีลีเนียมที่ใช้ไม่มีผลต่อการทำงานของเอนไซน์กลูทาไธโอนเปอร์ออกซิเดสในพลาสมาของปลากะพงขาว เนื่องจากปลาที่ได้รับอาหารเสริมซีลีโนเมทไธโอนีนและโซเดียมซีลีไนท์ มีการทำงานของปริมาณเอนไซน์กลูทาไธโอนเปอร์ออกซิเดสไม่แตกต่างกัน ขณะที่แนวโน้มกการทำงานของเอนไซม์กลูทาไธโอนเปอร์ออกซิเดสเพิ่มขึ้น ตามปริมาณซีลีเนียมที่เพิ่มขึ้นในอาหาร โดยพบว่าการเสริมซีลีโนเมทไธโอนีนและโซเดียมซีลีไนท์ 2 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัมอาหาร (+ESM2, +ENS2) มีการทำงานของเอนไซม์กลูทาไธโอนเปอร์ออกซิเดสในพลาสมาสูงกว่า 1 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัมอาหาร (+ESM1, +ENS1) นอกจากนี้พบว่าวิตามินอีไม่มีผลต่อการทำงานของเอนไซน์กลูทาไธโอนเปอร์ออกซิเดส เนื่องจากการทำงานของเอนไซน์กลูทาไธโอนเปอร์ออกซิเดสในอาหารสูตร -E-Se และ +E-Se ไม่แตกต่างกันทางสถิติ ($p>0.05$)

6. จำนวนเม็ดเลือดแดง เม็ดเลือดขาว และปริมาณเม็ดเลือดแดงอัดแน่นของปลากะพงขาวที่ได้รับอาหารเสริมซีลีโนเมทไธโอนีน และเสริมโซเดียมซีลีไนท์ไม่แตกต่างกันทางสถิติ ($p>0.05$) ส่วนปลาที่ได้รับอาหารสูตร -E-Se มีปริมาณเม็ดเลือดแดงและเม็ดเลือดแดงอัดแน่นต่ำกว่าปลาที่ได้รับอาหารเสริมวิตามินอีทุกสูตรอาหาร แสดงว่าวิตามินอีมีผลต่อปริมาณเม็ดเลือดแดงและเม็ดเลือดแดงอัดแน่น ขณะที่การเสริมหรือไม่เสริมซีลีเนียมในอาหารไม่มีผลต่อปริมาณเม็ดเลือดแดงและเม็ดเลือดแดงอัดแน่น

7. การเสริมซีลีโนเมทไธโอนีนในอาหารสามารถเพิ่มการทำงานของระบบภูมิคุ้มกันแบบไม่จำเพาะได้ดีกว่าการเสริมโซเดียมซีลีไนท์ โดยเฉพาะการเสริมซีลีโนเมทไธโอนีน 1 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัมอาหาร ทำให้ปลากะพงขาวมีการตอบสนองของภูมิคุ้มกัน ได้แก่ไลโซไซม์ คอมพลีเม้นท์ อิมมูโนโกลบูลิน ซุปเปอร์ออกไซด์แอนไอออน และการจับกินสิ่งแปลกปลอม สูงกว่าชุดการทดลองอื่นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.05$) ขณะที่อาหารซึ่งไม่มีการเสริมซีลีเนียมและวิตามินอี (สูตร -E-Se) ทำให้ปลามีการตอบสนองของไลโซไซม์ คอมพลีเม้นท์ อิมมูโนโกลบูลิน ซุปเปอร์ออกไซด์แอนไอออน และการจับกินกินสิ่งแปลกปลอมต่ำอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.05$)

8. ปริมาณแอนติบอดีไตเตอร์สูงสุดในปลากะพงขาวที่ได้รับอาหารเสริมวิตามินอีและซีลีโนเมทไธโอนีน 1 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัมอาหาร (+ESM1) โดยมีแนวโน้มสูงกว่าปลาที่ได้รับอาหารเสริมวิตามินอีและซีลีเนียมสูตรอื่นๆ (+E-Se, +ESM2, +ENS1, +ENS2) และสูงกว่าปลาที่ได้รับอาหารที่ไม่เสริมวิตามินอี (-E-Se, -E+hSMhNS) อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.05$) แสดงว่าวิตามินอีมีผลในการเพิ่มปริมาณแอนติบอดีในปลากะพงขาว

9. อัตรารอดของปลาทดลองหลังฉีดเชื้อ *Streptococcus* sp. ต่ำสุดในปลาที่ได้รับอาหารที่ไม่เสริมวิตามินอีและซีลีเนียม (-E-Se) ส่วนอัตรารอดของปลาที่ได้รับอาหารเสริมซีลีโนเมทไธโอนีนสูงกว่าปลาที่ได้รับอาหารเสริมโซเดียมซีลีไนท์อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.05$) โดยเฉพาะปลาที่ได้รับอาหารเสริมซีลีโนเมทไธโอนีน 1 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัมอาหาร มีอัตรารอดสูงสุดคือ 60 เปอร์เซ็นต์ ขณะที่ความสัมพันธ์ของเปอร์เซ็นต์การรอดตายเท่ากับ 47 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งสอดคล้องกับปริมาณแอนติบอดีสูงสุดที่วัดได้ในปลาที่เลี้ยงด้วยอาหารสูตรดังกล่าว

10. ปลากะพงขาวที่ได้รับอาหารเสริมซีลีโนเมทไธโอนีน และโซเดียมซีลีไนท์ 2 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัมอาหาร (+ESM2 และ +ENS2) มีปริมาณไลโซไซม์ คอมพลีเม้นท์ อิมมูโนโกลบูลิน ซุปเปอร์ออกไซด์แอนไอออน แอนติบอดี อัตราการรอดและค่า RPS ต่ำกว่าปลาที่ได้รับอาหารเสริมซีลีโนเมทไธโอนีน และโซเดียมซีลีไนท์ 1 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัมอาหาร (+ESM1 และ +ENS1) แสดงว่าการได้รับซีลีเนียมในปริมาณสูงนอกจากไม่สามารถเพิ่มการทำงานของระบบภูมิคุ้มกัน และความต้านทานโรคในปลากะพงขาว ยังทำให้ระบบภูมิคุ้มกันลดลงด้วย

11. จากการทดลองในครั้งนี้พบว่าการเสริมซีลีเนียมในอาหารปลากะพงขาวในรูปซีลีโนเมทไธโอนีน ที่ระดับความเข้มข้น 1 มิลลิกรัม ร่วมกับการเสริมวิตามินอี 50 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัมอาหาร ช่วยเสริมสร้างการเจริญเติบโต เพิ่มประสิทธิภาพการทำงานของภูมิคุ้มกันและความต้านทานต่อเชื้อแบคทีเรีย *Streptoccocus* sp.

ข้อเสนอแนะ

1. จากการศึกษาครั้งนี้พบปริมาณซีลีเนียมในอาหารสูงสุดถึง 4.50 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัมอาหาร ควรใช้ระยะเวลาทดลองมากกว่านี้ เพื่อศึกษาความเป็นพิษที่อาจจะเกิดขึ้นกับปลากะพงขาว และควรศึกษาการเปลี่ยนแปลงทางพยาธิสภาพทางเนื้อเยื่อร่วมด้วย

2. การศึกษาเกี่ยวกับสารอาหารปริมาณน้อยโดยเฉพาะซีลีเนียมต่อระบบภูมิคุ้มกันและความต้านทานโรคในสัตว์น้ำของประเทศไทยมีน้อยมาก โดยเฉพาะปลาทะเลซึ่งเป็นปลาเศรษฐกิจ

บทที่ 6

เอกสารอ้างอิง

กรมประมง. 2531. การเลี้ยงปลากะพงขาว. ฝ่ายประมงสารนิเทศ กองส่งเสริมประมง กระทรวง-เกษตรและสหกรณ์. 62 หน้า.

กรมประมง. 2536. การเลี้ยงปลาน้ำกร่อย. สำนักพัฒนาและถ่ายทอดเทคโนโลยีการประมง กองเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำชายฝั่ง กระทรวงเกษตรและสหกรณ์. 43 หน้า.

กรมประมง. 2548ก. สถิติการประมงแห่งประเทศไทย พ.ศ 2546. เอกสารฉบับที่ 6/2548 ศูนย์สารสนเทศ กระทรวงเกษตรและสหกรณ์. 91 หน้า.

กรมประมง. 2548ข. สถิติฟาร์มเลี้ยงปลาน้ำกร่อย ประจำปี 2546. เอกสารฉบับที่ 9/2548 ศูนย์สาร-สนเทศ กลุ่มวิจัยและวิเคราะห์สถิติการประมง กระทรวงเกษตรและสหกรณ์. 26 หน้า.

กิจการ ศุภมาตย์, สาวิตรี ศิลาเกษ, วุฒิพร พรหมขุนทอง และสิทธิ บุณยรัตผลิน. 2539. โรคและพยาธิปลา. คณะทรัพยากรธรรมชาติ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ สงขลา. 212 หน้า.

จูอะดี พงศ์มณีรัตน์ และมะลิ บุณยรัตผลิน. 2538. การใช้แหล่งโปรตีนพืชบางชนิดในอาหารสำหรับปลากะพงขาว. เอกสารวิชาการฉบับที่ 14/2538 สถาบันวิจัยการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำชายฝั่ง. 12หน้า.

ชนกันต์ จิตมนัส. 2545. สารกระตุ้นภูมิคุ้มกันปลา. วารสารสงขลานครินทร์ (วทท) 24 : 739-744.

ชลอ ลิ้มสุวรรณ. 2528. โรคปลา. คณะประมง มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ กรุงเทพฯ. 227 หน้า.

ทิพย์วรรณ ปริพัฒนานนท์. 2542. ธาตุเซเลเนียมกับภูมิต้านทานในสัตว์น้ำ. สัตว์น้ำ 10 : 7-10.

บรรจง เทียนส่งรัศมี. 2517. หลักการทำฟาร์มในทะเล. คณะประมง มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ กรุงเทพฯ. 65 หน้า.

เบญจะ เพชรคล้าย. 2525. ความรู้พื้นฐานและการทดสอบทางอิมมูโนวิทยา. คณะแพทยศาสตร์ โรงพยาบาลศิริราช กรุงเทพฯ. 300 หน้า.

โพยม เบญญากุล. 2532. ชีวสาร. คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ สงขลา. 298 หน้า.

เยาวนิตย์ ดนยดล. 2540. ความเป็นไปได้ในการนำองค์ประกอบเลือดบางประการมาใช้วินิจฉัยโรคติดเชื้อ iridovirus ในปลากะพงขาวอย่างรวดเร็ว. เอกสารวิชาการฉบับที่ 16/2540 สถาบันวิจัยการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำชายฝั่ง. 10 หน้า.

เยาวนิตย์ ดนยดล และจารุรัตน์ บูรณะพาณิชย์กิจ. 2527. การศึกษาการเปลี่ยนแปลงทางระบบเลือดในปลากะพงขาวที่เป็นโรคไต. เอกสารวิชาการฉบับที่ 15/2527 สถาบันเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำชายฝั่ง จังหวัดสงขลา. 8 หน้า.

เยาวนิตย์ ดนยดล และจีรนันท์ อุไรประสิทธิ์. 2544. ผลการเปลี่ยนแปลงอุณหภูมิต่อการตอบสนองระบบภูมิคุ้มกันในปลากะรังและปลากะพงขาว. เอกสารวิชาการฉบับที่ 1/2544 สถาบันวิจัยการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำชายฝั่ง. 7 หน้า.

เยาวนิตย์ ดนยดล, สถาพร ดิเรกบุษราคม, เยาวดี ตันสกุล และสุวิทย์ คชสิงห์. 2530. ผลของมาลาไคท์กรีนต่อการเปลี่ยนแปลงขององค์ประกอบเลือดบางประการในปลากะพงขาว (*Lates calcarifer*). เอกสารวิชาการฉบับที่ 8/2530 สถาบันเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำชายฝั่ง จังหวัดสงขลา. 12 หน้า.

วันเพ็ญ ชัยคำภา. 2525. อิมมูนวิทยาเพื่อวินิจฉัยโรค. คณะเวชศาสตร์เขตร้อน มหาวิทยาลัยมหิดล. กรุงเทพฯ. 200 หน้า.

วุฒิพร พรหมขุนทอง. 2541. โภชนาศาสตร์สัตว์น้ำ. คณะทรัพยากรธรรมชาติ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ สงขลา. 189 หน้า.

สวัสดิ์ วงศ์สมนึก และสุจินต์ มณีวงศ์, 2517. การทดลองเลี้ยงปลากะพงขาว (*Lates calcarifer*, Bloch) ด้วยอาหารสำเร็จรูป. รายงานผลการปฏิบัติงานทางวิชาการ ประจำปี 2516-2517. สถานีประมงทะเลสงขลา, กรมประมง. หน้า 29-30.

สุจินต์ มณีวงศ์, นิเวศน์ เรืองพาณิช, ธิดา เพชรมณี และฐานันดร์ ทัตตานนท์. 2524. การเพาะพันธุ์ปลากะพงขาว. สถาบันเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำชายฝั่ง จังหวัดสงขลา. 64 หน้า.

สุทธิพันธ์ สาระสมบัติ, วิบูลย์ศรี พิมลพันธุ์, นภาธร บานชื่น, ทัศนีย์ สุโกศล, ธารารัชต์ ธารากุล, ศันสนีย์ เสนะวงษ์ และสิริฤกษ์ ทรงศิวิไล. 2543. อิมมูโนวิทยา. คณะแพทยศาสตร์ศิริราชพยาบาล มหาวิทยาลัยมหิดล กรุงเทพฯ. 414 หน้า.

สุนีย์รัตน์ ชื่นสระน้อย. 2541. ผลของวิตามินอีต่อความต้านทานโรคและการตอบสนองทางภูมิคุ้มกันแบบจำเพาะของปลาดุกลูกผสม. วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ กรุงเทพฯ. 93 หน้า

สุพจน์ จึงแย้มปิ่น. 2528. การศึกษาผลผลิตของลูกปลากะพงขาวที่อนุบาลในบ่อดิน. เอกสารวิชาการฉบับที่ 16/2528 สถาบันเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำชายฝั่ง จังหวัดสงขลา. 11 หน้า.

สุรศักดิ์ วงศ์กิตติเวช. 2543. สารานุกรมปลาไทย. กรุงเทพฯ : เอมซัพพลาย. 200 หน้า.

อภิญญา ส่งประดิษฐ์. 2545. การผลิตวัคซีนและโพลีโคลนอลแอนติบอดีต่อเชื้อ *Trypanosoma* spp. ในปลาดุกบิ๊กอุย. วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาจุลชีววิทยา มหาวิทยาลัย-สงขลานครินทร์ สงขลา. 93 หน้า.

อรัญญา พลพรพิสิฐ. 2538. ผลของเมทิลพาราไธออนต่อกระบวนการกลืนทำลายของฟาโกไซท์ในปลากะพงขาว. วารสารวาริชศาสตร์ 1 : 167-176.

Abdulah, R., Miyazaki, K., Nakazawa, M. and Koyama, H. 2005. Chemical forms of selenium for cancer prevention. Journal Trace Elements in Medicine and Biology 19 : 151-160.

American Public Health Association, American Water Works Association and Water Pollution Control Federation (APHA, AWWA and WPCF). 1980. Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater, 15th ed. Washington, D.C : American Public Health Association. 1134 p.

Andreotti, G. 2003. Selenium. Environment and Occupational Toxicology 242 : 123-126.

AOAC. 1990. Official Methods of Analysis, 15th ed. Virginia : Association of Official Analytical Chemists, Inc. 1360 p.

AOAC. 1993. Guidelines for Single-Laboratory Validation of Analytical Methods for Trace-Level Concentration of Organic Chemicals : Association of Official Analytical Chemists, Inc. 80 p.

Arther, J. R. 1997. No glutathione peroxidase function of selenium. *In* Biotechnology in the Feed Industry. (eds. Lyons, T. P. and Jackques, K. A.), pp. 143-154. United Kingdom : Nottingham University Press.

Arther, J. R., McKenzie, R. C. and Beckett, G. J. 2003. Selenium in immune system. American Society for Nutritional Science 133 : 1457-1459.

Bagni, M., Romano, N., Finoia, M. G., Abelli, L., Scapigliati, G., Tiscar, P. G., Sarti, M. and Marino, G. 2005. Short and long-term effects of a dietary yeast β-glucan (Macrogard) and alginic acid (Ergosan) preparation on immune response in Seabass (*Dicentrarchus labrax*). Fish & Shellfish Immunology 18 : 311-325.

Beck, M. A., Levander, O. A. and Handy, J. 2003. Selenium deficiency and viral infection. Journal of Nutrition 133 : 1463-1467.

Bell, J. G., Cowey, C. B. and Adron, J. W. 1985. Some effects vitamin E and selenium deprivation on tissue enzyme levels and indices of tissue peroxidation in rainbow trout (*Salmo gairdneri*). British Journal of Nutrition 53 : 149-157.

Bell, J. G., Cowey, C. B., Adron, J. W. and Pirie, B. J. S. 1987. Some effects of selenium deficiency on enzyme activities and indices of tissue peroxidation in Atlantic salmon Parr (*Salmo salar*). Journal of Nutrition 65 : 43-54.

Bell, J. G., Pirie, B. J. S., Adron, J. W. and Cowey, C. B. 1986. Some effects of selenium deficiency on glutathione peroxidase (EC1.11.19) activity and tissue pathology in rainbow trout (*Salmo gairdneri*). Journal of Nutrition 55 : 305-311.

Blaxhall, P. C. and Daisley, K. W. 1973. Routine hematological methods for use with fish blood. Journal of Fish Biology 5 : 771-781.

Blazer, V.S and Wolke, R. E. 1984. The effects of α-tocopherol on the immune response and non-specific resistance factors of rainbow trout (*Salmo gairdneri* Richardson). Aquaculture 37 : 1-9.

Boyd, C. E. and Tucker, C. S. 1992. Water Quality and Pond Soil Analysis for Aquaculture. Alabama : Auburn University. 477 p.

Brown, K. M. and Arthur, J. R. 2001. Selenium, selenoprotiens and human health. A Review Public Health Nutrition 4 : 593-599.

Buttriss, J. L. and Diplock, A. T. 1984. High performance liquid chromatography methods for vitamin E in tissues. Methods Enzymology 105 : 131-138.

Cappon, C. J. and Smith, J. C. 1982. Chemical form and distribution of selenium in edible seafood. Journal of Analytical Toxicology 6 : 10-21.

Chung, S. and Secombes, C. J. 1988. Analysis of event occurring with in teleost macrophages during the respirayory burst. Comparative Biochemical Physiology 89B : 539-544.

Combs, G. F. and Combs, S. B. 1986. Biochemical functions of selenium. Toronto : Academic Press. 265 p.

Combs, G. F. and Scott, M. L. 1974. Dietary requirements for vitamin E and selenium measured at the cellular level in the chick. Journal of Nutrition 104 : 1292-1296.

De Bruin, G. H. P., Russell, B. C. and Bogusch, A. 1995. FAO Species Identification Field Guide for Fishery Purposes. Rome : The Marine Fishery Resources of Sri Lanka. 400 p.

Demers, N. E. Bayne, C. J. 1997. The immediate effects of stress on hormones and plasma lysozyme in rainbow trout. Development Comparative Immunology 21 : 363-373.

De Silva, S. S. and Anderson, T. A. 1995. Fish Nutrition in Aquaculture. London: Chapman and Hall.

Dodig, S. and Cepelak, I. 2004. The facts and controversies about selenium. Acta Pharmaceutica 54 : 241-276.

Ellis, A. E. 1988. Difference between the immune mechanism of fish and higher vertebrate. *In* Microbial Diseases of fish. (eds. Roberts, R. J.), pp 1-30. London: Academic Press.

Ermakov, V. V. and Kovalskij, V. V. 1974. The Biological Importance of Selenium. Moscow : Nauka Publishing House. 298 p.

FAO. 1999. The state of world fisheries and culture 1998. Rome : Food & Agriculture Organization of the United Nations. 144 p.

Finch, J. M. and Turner, R. J. 1996. Effects of selenium and vitamin E on the immune responses of domestic animals. Research in Veterinary Science 60 : 97-106.

Gatlin III, D. M. and Wilson, R. P. 1984. Dietary selenium requirement of fingerling channel catfish. Journal of Nutrition 114 : 627-633.

Gatlin III, D. M., Poe, W. E. and Wilson, R. P. 1986. Effect of singular and combined dietary deficiencies of selenium and vitamin E on fingerling channel catfish. Journal of Nutrition 116 : 1061-1067.

Goettl, J. P., JR. and Davies, P. H. 1978. Water Pollution Studies. Colorado : Boulder., CO. 248 p.

Hardie, L. J., Fletcher, T. C. and Secombes, C. J. 1990. The effect of vitamin E in the immune response of the Atlantic salmon (*Salmo sala*r L.). Aquaculture 87 : 1-13.

Hardie, L. J., Fletcher, T. C. and Secombes, C. J. 1991. The effect of dietary vitamin C on the immune response of the Atlantic salmon (*Salmo sala*r L.). Aquaculture 95 : 201-214.

Hashimoto, Y. and Winchester, J. W. 1967. Selenium in the atmosphere. Environmental Science & Technology 1 : 338-340.

Hilton, J. W., Hodson, P. V. and Slinger, S. J. 1980. The requirement and toxicity of selenium in rainbow trout (*Salmo gairdneri*). Journal of Nutrition 110 : 2527-2535.

Hoekstra, W. G., Hafeman, O. OH. S. H., Sunder, R. A. and Ganther, H. E. 1974. Effect of dietary selenium on liver and erythrocyte glutathione peroxidase in the rat. Journal of Nutrition 104 : 580-587.

Jacques, K. 2001. Selenium metabolism in animals: the relationship between dietary selenium form and physiological response. *In* Science and Technology in the Feed Industry: Proceedings of Alltech's 17th Annual Symposium. (eds. Lyon, T. and Jacques, K.), Nottingham University Press, Nottingham, United Kingdom. 318-348

Jaramillo, F. and Gatlin III, D. M. 2004. Comparison of purified and practical diets supplemented with or without b-glucan and selenium on resistance of hybrid striped bass *Morone chrysops* x *M. saxatilis* to *Streptococcus iniae* infection. Journal of the World Aquaculture Society 35 : 245-252.

Lemly, A. D. 1997. A teratogenic deformity index for evaluating impacts of selenium on fish populations. Ecotoxicology and Environmental Safety 37 (3) : 259-266.

Lemly, A. D. 2002. Symptoms and implications of selenium toxicity in fish : the Belews Lake case example. Aquatic Toxicology 57 : 39-49.

Liang, C. M., Pan, Q., Wang, X. D., He. and Bi, Y. Z. 2006. Effects of glutathione on macrophage responses of tilapia (*O. reochromis* X *O. aureus*) *in vitro*. Proceedings of the International Symposium on Fish Nutrition and Feeding XII. Biarritz, France, 28 May – 1 June 2006, pp. 150-155.

Lin, Y. H. and Shiau, S. Y. 2003a. Dietary L-ascorbic acid affects growth, nonspecific immune responses and disease resistance in juvenile grouper, *Epinephelus malabaricus*. Aquaculture 244 : 215-221.

Lin, Y. H. and Shiau, S. Y. 2003b. Dietary lipid requirement of grouper, *Epinephelus malabaricus* and effects on immune responses. Aquaculture 225 : 243-250.

Lin, Y. H. and Shiau, S. Y. 2005a. Dietary vitamin E requirement of grouper, *Epinephelus malabaricus* at two lipid levels and their effects on immune responses. Aquaculture 248 : 235-244.

Lin, Y. H. and Shiau, S. Y. 2005b. Dietary selenium requirements of juvenile grouper, *Epinephelus malabaricus*. Aquaculture 250 : 356-363.

Lin, Y. H. and Shiau, S. Y. 2006. Effects of supplementary selenium on oxidative stress of grouper, *Epinephelus malabaricus* with high supplementary copper. Proceedings of the International Symposium on Fish Nutrition and Feeding XII. Biarritz, France, 28 May – 1 June 2006, pp. 130-136.

Little, C., Olinescu, R., Reid, K. G. and Brien, O. P. J. 1970. Properties and regulation of glutathione peroxidase. Journal Biological Chemistry 245 : 3632-3636.

Lorentzen, M., Maage, A. and Julshamn, K. 1994. Effects of dietary selenite or selenomethionine on tissue selenium levels of Atlantic salmon (*Salmo salar*). Aquaculture 121: 359-367.

Lovell, R. T. and Wang, C. 1987. Effect of alpha-tocopherol and selenium on the gilthead seabream, *Sparus aurata* L.. Proceedings of Alltech Thirteenth Annual Symposium. Nottingham, United Kingdom, 15-22 May 1987. pp. 165-179.

McDowell, L. R. 1992. Minerals in Animal and Human Nutrition. California : Academic Prees. 524 p.

McKenzie, R. C., Rafferty, T. S. and Beckett, G. J. 1998. Selenium : an essential element for immune function. Immunology Today 19 : 342-345.

Nankervis, L., Matthews, S. J. and Appleford, P. 2000. Effect of dietary non-protein energy source on growth, nutrient and circulating insulin-like growth factor I and triiodothyronine levels in juvenile barramundi, *Lates calcarifer*. Aquaculture 191 : 323-335.

National Research Council. 1976. Effects of Environmental Pollutants Selenium. Washington, D. C : National Academy Press. 50 p.

National Research Council. 1989. Food and Nutrition Board Recommended Dietary Allowances. Washington, D. C : National Academy Press. 72 p.

Nationnal Research Council. 1993. Nutrient Requirements of fish. Washington, DC : Nationnal Academy Press. 144 p.

Ndoye, A., Ghanmi, Z., Koening, J. and Deschaux, P. 1989. Vitamin E and immunity: Effect of vitamin E on the production of anti *Yersinia ruckeri* antibodies in rainbow trout (*Salmo gairdneri*). Ichtyophysiological ACTH 13 : 17-23.

Obach, A., Quentel, C. and Laurencin, F. B. 1993. Effect of alpha-tocopherol and dietary oxidized fish oil on the immune response of seabass (*Dicentrarchus labrax)*. Disease of Aquatic Organisms 15 : 175-185.

Oh, S. H., Lee, M.H. and Chung, C. J. 1982. Protection of phagocytic macrophages from peroxidative damage by selenium and vitamin E. Journal Yonsei Medicine 23 : 101-109.

Omaye, S. T. and Tapple, A. L. 1974. Effect of dietary selenium on glutathione peroxidase in the chick. Journal of Nutrition 104 : 747-753.

Ortuno, J., Esteban, M. A. and Mereguer, J. 2000. High dietary intake of α-tocopherol acetate enhances the non-specific immune response of gilthead seabream (*Sparus aurata* L.). Fish & Shellfish Immunology 10 : 293-307.

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

Paripatananont, T. and Lovell, R. 1997. Comparative net absorption of chelated and inorganic trace minerals in channel catfish *Ictalurus punctatus* diets. Journal of the World Aquaculture Society 28 : 62-67.

Poston, H. A., Combs, G. F. and Leibovitz, L. 1976. Vitamin E and selenium interrelations in the diet of Atlantic salmon (*Salmo salar*): gross, histological and biochemical deficiency signs. Journal of Nutrition 106 : 892-904.

Rabanal, H. R. and Soesanto, V. 1992. Introduction to the taxonomy, biology and fishery of the giant seaperch or seabass (*Lates calcarifer*). Proceedings of South China Sea Fisheries Development and Coordination Programe Report of Training Course on Seabass Spawning and Larval Rearing, Songkhla, Thailand, 1-20 June 1982. pp. 2-8.

Rotti, I. M. 1991. Essential Immunology. London : Blackwell Science Press. 356 p.

Rutruck, J. T., Pope, A. L., Ganther, H. E., Swanson, A. B., Hafeman, D. and Hockstra, W. G. 1973. Selenium : biochemical role as a component of GSH-Px. Science 179 : 588-590.

Sakai, M., Atsuta, S. and Kobayashi, M. 1989. Protective immune response in rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*, vaccinated with beta-hemolytic Streptococcal bacterin. Fish Pathology 24 : 169-173.

Salati, F., Cubadda, C., Viale, I. and Rusuda, R. 2005. Immune response of seabass (*Dicentrarchus labrax*) to *Tenacibaculum maritimum* antigens. Fisheries Science 71 : 563-567.

Santosh, P. L. 2002. The Minerals. *In* Fish Nutrition, 3rd. (eds. Halver, J. E and Hardy, R. W), pp. 259-308. London : Academic Press.

SAS Institute. 1990. SAS/STAT User's guide, volume 2 GLM-VAR COMP. 4thed. Cary Nc, USA. 1686 p.

Schrauzer, G. N. 2000. Selenomethionine: A Review of its Nutrition Significance, Metabolism and Toxicity. Journal of Nutrition 130 : 1653-1656.

Sheffy, B. E. and Schultz, R. D. 1979. Influence of vitamin E and selenium on the immune response mechanisms. Federal Civil Procedure 28 : 2139-2143.

Sirichakwal, P. P., Puwastien, P., Polngam, J. and Kongkachuichi, R. 2005. Selenium content of Thai foods. Journal of Food Composition and Analysis 18 : 47-59.

Sitja-Bobadilla, A. and Perez-Sanchez, J. 1999. Diet related changes in non-specific immune response of European seabass (*Dicentrarchus labrax* L.). Fish & Shellfish Immunology 9 : 637-640.

Siwicki, A. K., Anderson, D. P., Rumsey, G. L. 1994. Dietary intake of immunostimulants by rainbow trout affects non specific immunity and protection against furunculosis. Veterinary Immunology and Immunopathology 41 : 125-139.

Spallholz, J. E. 1990. Advance in understanding selenium in the immune system. Annals of the New York Academy of Sciences 589 : 123-139.

Spallholz, J. E., Boylan, L. M. and Larsen, H. S. 1990. Advamces in understanding selenium's role in the immune system. Annals of the New York Academy of Sciences 587 : 123-139.

Spallholz, J. E., Palace, V. P. and Reid, T. W. 2004. Methioninase and selenomethionine but not se-methylselenocysteine generate methylselenol and superoxide in an *in vitro* chemiluminasecent assay : implications for the nutritional carcinostatic activity of selenoamino acids. Biochemical Pharmacology 67 : 547-554.

Steel, R. G. D. and Torrie, J. H. 1980. Principle and Procedures of Statistics. 2nd edition. New York: McGraw Hill. 633 p.

Strickland, J. D. H. and Parsons, T. R. 1972. A practical handbook of seawater analysis. Fisheries Research Board of Canada Bulletin 167 : 310-450.

Sun, S., Zhai, F., Zhou, L. and Yang, G. 1985. The bioavailability of soil selenium in Keshan disease and high selenium areas. Chinese Journal End-Stage Renal Disease 4 : 21-28.

Suzuki, K. T. 2005. Metabolomics of selenium : Se metabolites based on speciation studies. Journal of Health Science 51 : 107-114.

Thorarinsson, R., Landolt, M. L., Elliott, D. G., Pascho, R. J. and Hardy, R. W. 1994. Effect of dietary vitamin E and selenium on growth, survival and the prevalence of *Renibacterium salmoninarum* infection in chinook salmon (*Oncorhynchus tshawytscha*). Aquaculture 121 : 343-358.

Thuvander, A., Norrgren, L. and Fossum, C. 1987. Phagocytic cells in blood from rainbow trout, *Salmo gairdneri* (Richardson), characterized by flow cytometry and electron microscopy. Journal Fish Biology 31 : 197-208.

Verlhac, V. and Kiron, V. 2004. Nutrition and immune modulation in aquatic animals. Feeds Formulation & Beyond 1 : 5-9.

Wang, Y., Han, J., Li, W. and Xu, Z. 2007. Effect of different selenium source on growth performance, muscle, glutathione peroxidase activity, muscle composition and selenium concentration of allogynogenetic crucian carp (*Carassius auratus gibelio*). Animal Feed Science Technology 134 : 243-251.

Wang, C. and Lovell, R. T. 1997. Organic selenium sources, selenomethionine and selenoyeast, have higher bioavailability than an inorganic selenium source, sodium selenite, in diets for channel catfish (*Ictalurus punctatus*). Aquaculture 152 : 223-234.

Wang, C., Lovell, R. and Klesius, P. 1997. Response to *Edwardsiella ictaluri* challenge by channel catfish fed organic and inorganic sources of selenium. Journal of Aquatic Annimal Health 9 : 172-179.

Wise, D. J., Tomasso, J. R., Gatlin, D. M., Bai, S. C. and Blazer, V. S. 1993. Effects of dietary selenium and vitamin E on red blood cell, peroxidation, glutathione peroxidase activity, and macrophage superoxide anion production in channel catfish. Journal of Aquatic Animal Health 5 : 177-182.

Yano, T. 1992. Assays of hemolytic complement activity. *In* Techniques in Fish Immunology. (eds. Stolen, J. S., Fletcher, T. C., Anderson, D. P., Kaattari, S. L. and Rowley, A. F.), pp. 131-141. Fair Haven : SOS Publications.

Zhu, L. Z., He, Y. P., Piao, J. H., Cai, Q. Y., Sun, C. P., Chang, J. Zh., Wu, K. and Cong, J. P. 1992. Difference of antioxidative effect between vitamin E and selenium. *In* Biochemistry and Clinical Applications. (eds. Ong, A. S. H. and Packer, L.), pp. 92-104. Basel : Birkhauser Verlag.

ภาคผนวก ก

ภาคผนวก ก. 1

1. การวิเคราะห์คุณค่าทางโภชนาการของอาหารทดลอง (ตามวิธีการของ AOAC, 1990)

1. 1 การวิเคราะห์ความชื้น

1. อบถ้วยกระเบื้องเคลือบในตู้อบไฟฟ้าที่อุณหภูมิ 105 องศาเซลเซียส นาน 2-3 ชั่วโมง นำออกจากตู้อบใส่ในโถดูดความชื้น จนกระทั่งอุณหภูมิของถ้วยกระเบื้องเคลือบลดลงจนถึงอุณหภูมิห้องแล้วชั่งน้ำหนัก

2. กระทำเช่นเดียวกับข้อ 1 ซ้ำ จนได้ผลต่างของน้ำหนักที่ชั่งทั้งสองครั้งติดต่อกันไม่เกิน 1-3 มิลลิกรัม

3. ชั่งตัวอย่างให้ได้น้ำหนักที่แน่นอน 1-2 กรัม ใส่ลงในภาชนะหาความชื้นซึ่งทราบน้ำหนักที่แน่นอนแล้ว

4. นำไปอบในตู้อบไฟฟ้าที่อุณหภูมิ 105 องศาเซลเซียส นาน 5-6 ชั่วโมง

5. นำออกจากตู้อบใส่ในภาชนะโถดูดความชื้น ตั้งทิ้งไว้ให้เย็นแล้วชั่งน้ำหนัก

6. อบซ้ำอีกครั้งประมาณ 30 นาที และกระทำเช่นเดิม จนได้ผลต่างของน้ำหนักที่ชั่งทั้งสองครั้งติดต่อกันไม่เกิน 1-3 มิลลิกรัม

7. คำนวณหาปริมาณความชื้นจากสูตร

การคำนวณ

$$\text{ปริมาณความชื้น (เปอร์เซ็นต์)} = \frac{(a-b)}{w} \times 100$$

เมื่อ a = น้ำหนักของตัวอย่างก่อนอบแห้ง

b = น้ำหนักของตัวอย่างหลังอบแห้ง

w = น้ำหนักของตัวอย่างก่อนอบ

1.2 การวิเคราะห์ปริมาณเถ้า

1. เผาถ้วยกระเบื้องเคลือบในเตาเผาที่อุณหภูมิ 600 องศาเซลเซียส เป็นเวลาประมาณ 3 ชั่วโมง ปิดสวิตซ์เตาเผารอประมาณ 30-45 นาที เพื่อให้อุณหภูมิเตาเผาลดลงก่อน แล้วนำออกจากเตาเผาใส่ในโถดูดความชื้น ปล่อยให้เย็นจนถึงอุณหภูมิห้องแล้วชั่งน้ำหนัก

2. เผาซ้ำอีก ครั้งละประมาณ 30 นาที และกระทำเช่นข้อ 1 จนได้ผลต่างของน้ำหนักทั้ง

สองครั้งติดต่อกันไม่เกิน 1-3 มิลลิกรัม

3. ชั่งน้ำหนักให้ได้น้ำหนักแน่นอน (ประมาณ 3 กรัม) ใส่ในถ้วยกระเบื้องซึ่งทราบน้ำหนักแน่นอนแล้ว นำไปเผาในตู้ควันจนหมดควันแล้วจึงเข้าเตาเผาอุณหภูมิ 600 องศาเซลเซียส และกระทำเช่นเดียวกับข้อ 1-2

การคำนวณ

$$\text{ปริมาณเถ้า (เปอร์เซ็นต์)} = \frac{(b - a)\ X\ 100}{w}$$

เมื่อ a = น้ำหนักของถ้วยกระเบื้องเคลือบ

b = น้ำหนักของถ้วยกระเบื้องเคลือบกับน้ำหนักของตัวอย่างหลังเผา

w = น้ำหนักของตัวอย่างก่อนเผา

1.3 การวิเคราะห์หาโปรตีน

สารเคมี

1. กรดซัลฟิวริกเข้มข้น (sulfuric acid , H_2SO_4) 93-98 เปอร์เซ็นต์

2. สารเร่งรวม (catalyst mixture): เตรียมโดยชั่งคอปเปอร์ซัลเฟต (copper sulfate, $CuSO_4$) 7.0 กรัม กับโปแทสเซียมซัลเฟต (potassium sulfate, K_2SO_4) 100.0 กรัม ผสมให้เข้ากัน

3. สารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ (sodium hydroxide, NaOH) 45 เปอร์เซ็นต์: เตรียมโดยละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ ชนิดเกล็ด 450.0 กรัม ในน้ำกลั่น ปรับปริมาตรให้ได้ 1 ลิตร

4. สารละลายกรดเกลือ (Hydrochloric acid, HCl) 0.1 นอร์มอล: เตรียมโดยละลายกรดเกลือ 9 มิลลิลิตร ลงในน้ำกลั่น ปรับปริมาตรให้ได้ 1 ลิตร

5. สารละลายกรดบอริค (boric acid, H_3BO_3) 4 เปอร์เซ็นต์: เตรียมโดยต้มน้ำกลั่น 50 มิลลิลิตร ให้ร้อนแล้วใส่กรดบอริคลงไป 4.0 กรัม คนจนละลายหมด เมื่อสารละลายเย็นลงแล้ว จึงเติมน้ำกลั่นปรับปริมาตรให้ได้ 100 มิลลิลิตร

6. อินดิเคเตอร์รวม (mixed indicator): เตรียมโดยละลายเมทิลเรด (methyl red) 0.2 กรัม ในแอลกอฮอร์ 95 เปอร์เซ็นต์ ปรับปริมาตรจนครบ 100 มิลลิลิตร และละลายเมทิลินบลู (methyllene blue) 0.2 กรัม ในแอลกอฮอร์ 95 เปอร์เซ็นต์ ปรับปริมาตรจนครบ 100 มิลลิลิตร นำสารละลายเมทิลเรด 2 ส่วน ผสมกับสารละลายเมทิลินบลู 1 ส่วน เขย่าให้เข้ากัน

7. สารละลายโซเดียมคาร์บอเนต (sodium carbonate, Na_2CO_3) 0.1 นอร์มอล: เตรียมโดยอบโซเดียมคาร์บอเนตที่อุณหภูมิ 260-270 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที ชั่งสารที่อบแล้ว 1.325 กรัม เติมน้ำกลั่น ปรับปริมาตรให้ได้ 250 มิลลิลิตร

8. เมทิลออเรนจ์ อินดิเคเตอร์ (methyl orange indicator): เตรียมโดยละลายเมทิลออเรนจ์ 0.1 กรัม ในน้ำกลั่น ปรับปริมาตรให้ได้ 100 มิลลิลิตร

การหาความเข้มข้นของสารละลายกรดเกลือมาตรฐาน

ดูดสารละลายโซเดียมคาร์บอเนต 40 มิลลิลิตร ใส่ในขวดรูปชมพู่ขนาด 250 มิลลิลิตร เติมน้ำกลั่น 20 มิลลิลิตร เติมเมทิลออเรนจ์ อินดิเคเตอร์ 2-3 หยด ทำการไตเตรท ด้วยสารละลายกรดเกลือ 0.1 นอร์มอล คำนวณความเข้มข้นของสารละลายกรดเกลือโดยใช้สูตร

$$N_1V_1 = N_2V_2$$

เมื่อ N_1 = ความเข้มข้นของสารละลายที่จะปรับค่า

N_2 = ความเข้มข้นของสารละลายที่ต้องการ

V_1 = ปริมาตรของสารละลายที่จะปรับค่า

V_2 = ปริมาตรของสารละลายที่ต้องการ

วิธีการ

ก. ขั้นตอนการย่อย (digestion)

1. ชั่งตัวอย่างด้วยกระดาษชั่งสารที่ปราศจากไนโตรเจน ให้ได้น้ำหนักประมาณ 0.5-1.0 กรัม (ตัวอย่างของเหลวใช้ปริมาตร 10-15 มิลลิลิตร) ใส่ในหลอดย่อยโปรตีนและทำแบลงค์ด้วย บันทึกน้ำหนักโดยละเอียด

2. เติมสารเร่งรวม 3 กรัม เพื่อเป็นตัวช่วยเร่งปฏิกิริยาการย่อย

3. เติมกรดกำมะถันซัลฟูริกเข้มข้น 15 มิลลิลิตร

4. นำไปให้ความร้อนด้วยชุดเครื่องย่อยโปรตีน วางหลอดย่อยในเตาเผาย่อย ที่อุณหภูมิ 375 องศาเซลเซียส เวลา 90-120 นาที (สามารถเพิ่มเวลาในการย่อยได้จนได้สารละลายใส) เมื่อย่อยจนใสหรือได้สารละลายสีฟ้าหรือสีเขียวอมฟ้า ทิ้งไว้ให้เย็น

ข. ขั้นตอนการกลั่น (distillation)

1. เมื่อสารละลายเย็นลง เติมน้ำกลั่นปริมาตร 20 มิลลิลิตร ลงในขวดวิเคราะห์

2. ใส่ลูกแก้ว 2 ลูก เพื่อป้องกันการกระแทกของสารละลายต่อหลอดแก้ววิเคราะห์โปรตีนเข้ากับชุดเครื่องกลั่นที่มีขวดรูปชมพู่บรรจุกรดบอริก 40 มิลลิลิตร โดยให้ปลายของท่อยางที่ต่อจากกระบอกแก้วควบแน่นจุ่มอยู่ในกรดบอริก เติมโซเดียมไฮดรอกไซด์ลงในหลอดแก้ววิเคราะห์ช้าๆ จนกระทั่งสารละลายมีสีดำ

3. หยดอินดิเคเตอร์รวมลงในกรดบอริก 2-3 หยด

4. ทำการกลั่นจนกระทั่งไม่มีก๊าซแอมโมเนียออกมา เมื่อกรดบอริกเปลี่ยนเป็นสีเขียวแล้วจึงทำการกลั่นต่อไปอีก 10 นาที จากนั้นจึงนำขวดรูปชมพู่ออกจากเครื่องกลั่น

ค. ขั้นตอนการไตเตรท (titration)

1. นำไปไตเตรทด้วยสารละลายกรดเกลือมาตรฐานที่ทราบความเข้มข้น (0.1 นอร์มอล) จนกระทั่งกรดบอริกเปลี่ยนเป็นสีน้ำเงินอ่อน

2. บันทึกปริมาตรของกรดเกลือมาตรฐานที่ใช้เพื่อการคำนวณต่อไป

การคำนวณ

$$\text{โปรตีน (เปอร์เซ็นต์)} = \frac{1.4 \times (V_1 - V_2) \times N \times 6.25}{W}$$

เมื่อ V_1 = ปริมาตรของกรดเกลือมาตรฐานที่ใช้ในการไตเตรทกับตัวอย่าง

V_2 = ปริมาตรของกรดเกลือมาตรฐานที่ใช้ไตเตรทตัวอย่างที่ใช้ตรวจสอบ

N = ความเข้มข้นของกรดเกลือ (นอร์มอล)

W = น้ำหนักตัวอย่าง

1.4 การวิเคราะห์ปริมาณไขมัน

สารเคมี

1. สารละลายคลอโรฟอร์ม (chloroform)
2. เมทธานอล (methanol)

วิธีการ

1. อบถ้วยสกัดไขมัน (cup) ที่มีลูกแก้ว 2-3 เม็ด ในตู้อบที่อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส ประมาณ 8 ชั่วโมง ทิ้งไว้ให้เย็นในโถดูดความชื้น

2. อบตัวอย่างที่จะวิเคราะห์ที่อุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 คืน ทิ้งไว้ให้เย็นในโถดูดความชื้น

3. ชั่งน้ำหนักถ้วยสกัดไขมันพร้อมลูกแก้วให้ได้น้ำหนักคงที่ (W_1)

4. ชั่งตัวอย่างที่ต้องการวิเคราะห์ใส่กระดาษกรอง ประมาณ 1.0-2.0 กรัม (W_2) ห่อให้มิดชิดใส่ลงในไส้กรอง (thimble) ที่เตรียมไว้นำไปใส่เข้าเครื่องสกัดไขมัน

4. นำถ้วยสกัดไขมันพร้อมลูกแก้วที่ชั่งไว้แล้วมาเติมสารละลายคลอโรฟอร์ม : เมทธานอลในอัตราส่วน 2:1 ปริมาตร 25 มิลลิลิตร แล้วใส่เข้าเครื่องสกัดไขมัน

6. เปิดเครื่องสกัดไขมัน ปรับอุณหภูมิไปที่ 160 องศาเซลเซียส เปิดน้ำเข้าเครื่อง เปิดวาล์วเลื่อนปุ่มไปที่ boiling ต้มให้เดือด 30 นาที

7. จากนั้นเลื่อนปุ่มไปที่ rinsing เพื่อล้างตัวอย่าง 20 นาที

8. ปิดวาล์ว เปิดสวิทซ์อากาศ เลื่อนปุ่มไปที่ evaporation เพื่อให้สารระเหยออกไป 5 นาที

9. ปิดสวิทซ์อากาศและเครื่องทำความเย็น เลื่อนปุ่มไปที่ evaporation กลับตำแหน่งเดิม นำถ้วยสกัดไขมันออกจากเครื่อง จากนั้นวางทิ้งไว้ให้เย็นแล้วนำไปอบที่อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส จนแห้ง หรือ 135 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 ชั่วโมง

10. นำถ้วยสกัดไขมันออกมาใส่ในโถดูดความชื้นทิ้งไว้ให้เย็นแล้วนำมาชั่งน้ำหนัก (W_3)

การคำนวณ

$$\text{ไขมัน (เปอร์เซ็นต์)} = \frac{(W_3 - W_1)}{W_2}$$

เมื่อ W_1 = น้ำหนักถ้วยสกัดไขมันพร้อมลูกแก้ว

W_2 = น้ำหนักตัวอย่าง

W_3 = น้ำหนักถ้วยสกัดไขมันพร้อมลูกแก้วและตัวอย่างหลังการอบ

ภาคผนวก ก. 2

1. การวิเคราะห์คุณภาพน้ำ (ตามวิธีการของ Boyd and Tucker, 1992)

1.1 การวิเคราะห์ความเป็นด่างของน้ำ

สารเคมี

1. ฟีนอล์ฟทาลีน อินดิเคเตอร์: เตรียมโดยละลายฟีนอล์ฟทาลีน 0.5 กรัม ในเอทิลแอลกอฮอล์ 95 เปอร์เซ็นต์ จนได้ปริมาตร 100 มิลลิลิตร

2. เมทิลเรด อินดิเคเตอร์: เตรียมโดยละลายเมทิลเรด 0.5 กรัม ในน้ำกลั่น ปรับปริมาตรให้ได้ 100 มิลลิลิตร

3. เมทิลออเรนจ์ อินดิเคเตอร์: เตรียมโดยละลายเมทิลออเรนจ์ 0.5 กรัม ในน้ำกลั่น ปรับปริมาตรให้ได้ 100 มิลลิลิตร

4. สารละลายมาตรฐานโซเดียมคาร์บอเนต 0.2 นอร์มอล: เตรียมโดยชั่งโซเดียมคาร์บอเนต ซึ่งอบแห้งจำนวน 10.6 กรัม โดยอบที่อุณหภูมิ 130 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 90 นาที ทำให้เย็นในโถอบแห้ง จากนั้นละลายในน้ำกลั่นที่ต้มเดือดใหม่ๆ วางให้เย็นปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นจนครบ 1 ลิตร

5. สารละลายมาตรฐานกรดซัลฟูริก 0.2 นอร์มอล: เตรียมโดยค่อยๆเทกรดซัลฟูริกเข้มข้น 6 มิลลิลิตร ลงในน้ำกลั่น (ที่ต้มเดือดใหม่ๆ ทิ้งให้เย็น) ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นจนครบ 1 ลิตร

การตรวจหาความเข้มข้นของสารละลาย

1. ดูดสารละลายโซเดียมคาร์บอเนต 0.2 นอร์มอล ปริมาตร 25 มิลลิลิตร ใส่ลงในขวดรูปชมพู่ขนาด 250 มิลลิลิตร

2. หยดเมทิลเรด อินดิเคเตอร์ 5 หยด เขย่าให้เข้ากันจะได้สารละลายสีเหลือง

3. ไตเตรทด้วยสารละลายมาตรฐานกรดซัลฟูริก จนสารละลายเป็นสีชมพู

4. นำส่วนผสมทั้งหมดไปต้มจนเดือดเป็นเวลาประมาณ 3-5 นาที เพื่อไล่ก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ให้หมด สารละลายจะเปลี่ยนเป็นสีเหลืองอีกครั้ง

5. ไตเตรทด้วยสารละลายมาตรฐานกรดซัลฟูริกต่อไป จนกระทั่งสารละลายเปลี่ยนเป็นสีชมพูอีกครั้งหนึ่ง

6. บันทึกปริมาตรของสารละลายมาตรฐานกรดซัลฟูริกทั้งหมดที่ใช้ไป

การคำนวณความเข้มข้นของสารละลายมาตรฐานกรดซัลฟูริก โดยใช้สูตร

$$\text{ความเข้มข้น (นอร์มอล)} = \frac{0.2 \times 5}{\text{ปริมาตร (มิลลิลิตร) ของสารละลายมาตรฐานกรดซัลฟูริกที่ใช้}}$$

หลังจากนั้นทำการปรับความเข้มข้นของสารละลายมาตรฐานกรดซัลฟูริกให้มีความเข้มข้นเท่ากับ 0.02 นอร์มอล โดยใช้สูตร

$$N_1V_1 = N_2V_2$$

เมื่อ N_1 = ความเข้มข้นของสารละลายที่จะปรับค่า

N_2 = ความเข้มข้นของสารละลายที่ต้องการ

V_1 = ปริมาตรของสารละลายที่จะปรับค่า

V_1 = ปริมาตรของสารละลายที่ต้องการ

วิธีการ

1. นำตัวอย่างน้ำ 100 มิลลิลิตร ใส่ลงในขวดรูปชมพู่ขนาด 250 มิลลิลิตร
2. หยดฟีนอล์ฟทาลีน อินดิเคเตอร์ 10 หยด เขย่าให้เข้ากัน

ก. ถ้าสารละลายใส ให้ทำข้อ 3 ต่อไป

ข. ถ้าสารละลายสีชมพู จะต้องไตเตรทด้วยสารละลายมาตรฐานกรดซัลฟูริก จนกระทั่งสารละลายสีชมพูหายไป บันทึกปริมาตรที่ใช้ไป (นำไปรวมกับปริมาตรของสารละลายมาตรฐานกรดซัลฟูริกที่ใช้ไปในข้อ 4) ทำต่อไปในข้อ 3

3. หยดเมทิลออเรนจ์ 2-3 หยด เขย่าให้เข้ากัน จะได้สารละลายสีเหลือง
4. ไตเตรทด้วยสารละลายมาตรฐานกรดซัลฟูริก 0.02 นอร์มอล จนกระทั่งสารละลายเปลี่ยนเป็นสีส้ม จดปริมาตรของสารละลายกรดซัลฟูริกที่ใช้ไปทั้งหมด

การคำนวณค่าความเป็นด่างของน้ำ โดยใช้สูตร

ค่าความเป็นด่างของน้ำ (มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร)

$$= \frac{\text{ปริมาตรของกรดซัลฟูริกที่ใช้} \times \text{นอร์มอลิตี้ของกรดซัลฟูริก} \times 50 \times 1{,}000}{\text{ปริมาตรของน้ำตัวอย่าง}}$$

1.2 การวิเคราะห์ปริมาณแอมโมเนียในน้ำ

สารเคมี

1. สารละลายออกซิไดซิ่ง: ผสมน้ำยาซักผ้าขาว (มีคลอรีน 5%) 20 มิลลิลิตร กับน้ำกลั่น 80 มิลลิลิตร แล้วปรับค่าความเป็นกรดด่าง ให้อยู่ในช่วง 6.5-7 โดยใช้สารละลายกรดเกลือ (กรด 1 ส่วนต่อน้ำกลั่น 3 ส่วน) ควรเตรียมสารละลายออกซิไดซิ่งใหม่ ทุก 4-5 วัน

2. สารละลายฟีนอล: สารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ 2.5 กรัม และฟีนอล 10.0 กรัม ในน้ำกลั่น 100 มิลลิลิตร

3. สารละลายเกลือโรเชล: ละลายเกลือโรเชล ($KnaC_4H_4O_6.4H_2O$) 50.0 กรัม ในน้ำกลั่น 100 มิลลิลิตร แล้วต้มให้เดือดเพื่อไล่แอมโมเนียที่อาจปนเปื้อนในเกลือ จนปริมาตรสารละลายเหลือประมาณ 70 มิลลิลิตร จึงทำให้เย็น จากนั้นเติมแมงกานีสซัลเฟต ($MnSO_4.H_2O$) 50 มิลลิกรัม แล้วเติมน้ำกลั่นจนได้ปริมาตร 100 มิลลิลิตร

4. สารละลายมาตรฐานแอมโมเนีย-ไนโตรเจน 0.3 มิลลิลิตร: ขั้นแรกเตรียมสารละลายมาตรฐานแอมโมเนีย-ไนโตรเจนทั้งหมด (total ammonia-nitrogen หรือ Tan) เข้มข้น 1,000 มิลลิกรัมต่อลิตร โดยสารละลายแอมโมเนียมคลอไรด์ (NH_4Cl) 1.079 กรัม ในน้ำกลั่น แล้วปรับปริมาตรให้ครบ 500 มิลลิลิตร จากนั้นเจือจาง 5.0 มิลลิลิตร ของสารละลายมาตรฐาน TAN 1,000 มิลลิกรัมต่อลิตร ด้วยน้ำกลั่นจนได้ปริมาตรครบ 500 มิลลิลิตร ซึ่งจะได้สารละลายมาตรฐาน TAN 10 มิลลิลิตร ขั้นสุดท้ายเจือจาง 15 มิลลิลิตรของสารละลายมาตรฐาน TAN 10 มิลลิลิตร ด้วยน้ำกลั่นจนได้ปริมาตรครบ 500 มิลลิลิตร จะได้สารละลายมาตรฐาน TAN 0.3 มิลลิกรัมต่อลิตร

วิธีการ

1. กรองน้ำตัวอย่างด้วยกระดาษกรอง GF/C ใช้ปิเปตดูดน้ำตัวอย่างที่ผ่านการกรอง หรือสารละลายมาตรฐาน TAN 0.3 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร น้ำกลั่นมา 10 มิลลิลิตร ในหลอดแก้วฝาเกลียว

2. เติมสารละลายเกลือโรเชล 1 หยด เขย่าให้สารละลายเข้ากัน เติมสารละลายออกซิไดซิ่ง 0.5 มิลลิลิตร เขย่าให้สารละลายเข้ากัน จากนั้นเติมสารละลายฟีนอล 0.6 มิลลิลิตร เขย่าให้สารละลายเข้ากัน วางทิ้งไว้ประมาณ 15 นาที เพื่อให้เกิดสี

3. นำสารละลายมาตรฐานและน้ำตัวอย่างไปวัดค่าการดูดกลืนแสง ด้วยเครื่องวัดการดูดกลืนแสง ที่ความยาวคลื่น 630 นาโนเมตร

หาความเข้มข้นของแอมโมเนียในน้ำตัวอย่าง ตามสูตร

การคำนวณ

$$Csp = \frac{Asp \times Csd}{Asd}$$

เมื่อ Csp = ความเข้มข้นของ TAN ในน้ำตัวอย่าง

Csd = ความเข้มข้นของ TAN ในสารละลายมาตรฐาน

Asp = ค่าการดูดกลืนแสงในน้ำตัวอย่าง

Asd = ค่าการดูดกลืนแสงในสารละลายมาตรฐาน

1.3 การวิเคราะห์ปริมาณไนไตรท์

สารเคมี

1. Copper-cadmium granules: ล้างเม็ดแคดเมี่ยมน้ำหนัก 25.0 กรัม ด้วยสารละลายกรดไฮโดรคลอริก 6 นอร์มอล แล้วล้างด้วยน้ำกลั่น จากนั้นเติมสารละลายแคดเมี่ยมเปอร์ซัลเฟต 2 เปอร์เซ็นต์ ปริมาตร 100 มิลลิลิตร แกว่งเม็ดแคดเมี่ยมจนสีฟ้าของสารละลายคอปเปอร์ซัลเฟตจางลง รินสารละลายทิ้งแล้วเติมใหม่ ทำซ้ำจนกระทั่งเกิดตะกอนสีน้ำตาล จากนั้นจึงค่อยๆ ใช้น้ำกลั่นล้างเอาตะกอนออกไป นำแคดเมี่ยมนี้ไปเติมใน reduction colum

2. สารก่อสี (color reagent): เติม 85 เปอร์เซ็นต์ ฟอสฟอริก แอสิด ปริมาตร 100 มิลลิลิตร ลงในน้ำกลั่น 800 มิลลิลิตร แล้วเติมซัลฟานิลาไมด์ 10.0 กรัม เมื่อซัลฟานิลาไมด์ละลายหมดแล้วจึงเติม N-(1-naphthyl)-ethylenediamine dihydrochloride 1.0 กรัม ละลายให้เข้ากัน แล้วเติมน้ำกลั่นจนปริมาตรครบ 1 ลิตร เก็บสารละลายในขวดทึบแสง เก็บไว้นานประมาณ 1 เดือน

3. สารละลาย NH_4Cl-EDTA: ละลาย NH_4Cl ปริมาณ 13.0 กรัม Na_2EDTA 1.7 กรัม ในน้ำกลั่น 900 มิลลิลิตร ปรับพีเอชของสารละลายนี้ด้วย NH_4OH เข้มข้น จนได้พีเอช 8.5 จึงปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นให้ครบ 1 ลิตร

4. สารละลายเจือจาง NH_4Cl-EDTA: เจือจางสารละลาย NH_4Cl-EDTA (ข้อ 3) 300 มิลลิลิตร ด้วยน้ำกลั่นจนได้ปริมาตรครบ 500 มิลลิลิตร

5. สารละลายกรด HCl 6 นอร์มอล: โดยเจือจางกรด HCl เข้มข้นกับน้ำกลั่นในปริมาตรที่เท่ากัน

6. สารละลาย $CuSO_4$ 2 เปอร์เซ็นต์: ละลาย $CuSO_4.5H_2O$ ปริมาณ 20.0 กรัม ในน้ำกลั่น 500 มิลลิลิตร แล้วปรับปริมาตรให้ครบ 1 ลิตร

7. สารละลายมาตรฐานไนไตรท์: นำ $NaNO_2$ 1.232 กรัม ละลายน้ำกลั่นแล้วปรับปริมาตรให้ครบ 1 ลิตร จนได้สารละลายมาตรฐานไนไตรท์เข้มข้น 250 มิลลิกรัม NO_2-N/ลิตร นำสารละลายมาตรฐานนี้ไปเจือจางด้วยน้ำกลั่น จนได้สารละลายมาตรฐานเข้มข้น 50 มิลลิกรัม NO_2-N/ลิตร จากนั้นนำสารละลายมาตรฐานไนไตรท์: สารละลายมาตรฐานไนไตรท์ที่เตรียมได้ครั้งหลังนี้ไปเตรียมสารละลายมาตรฐานไนไตรท์ให้มีความเข้มข้นอย่างน้อย 6 ระดับ อยู่ในช่วง 0.00-0.50 มิลลิกรัม NO_2-N/ลิตร

วิธีการ

1. กรองน้ำตัวอย่างผ่านชุดกรองสูญญากาศ
2. ปรับพีเอชของน้ำที่กรองแล้ว ให้อยู่ในช่วงพีเอช 7-9 ด้วยกรด HCl หรือด่าง NaOH

ที่เจือจาง

3. ผสมน้ำตัวอย่าง 25 มิลลิลิตร กับสารละลาย NH_4Cl-EDTA 75 มิลลิลิตร แล้วเทให้ไหลผ่านคอลัมน์แคดเมี่ยมในอัตรา 7-10 มิลลิลิตรต่อนาที ทิ้งน้ำตัวอย่างที่ผ่านคอลัมน์ 25 มิลลิลิตรแรก เก็บตัวอย่างที่ผ่านคอลัมน์ส่วนที่เหลือไปวัดความเข้มข้นของไนไตรท์ ภายใน 15 นาทีหลังจากผ่านคอลัมน์

4. นำน้ำตัวอย่างที่ต้องการวัดความเข้มข้นของไนไตรท์ ทั้งน้ำตัวอย่างที่ผ่านการกรองและน้ำตัวอย่างที่ผ่านคอลัมน์แล้ว) ปริมาตร 50 มิลลิลิตร ผสมสารก่อสี 2 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากัน

5. ภายหลังเติมสารก่อสีอย่างน้อย 10 นาที แต่ไม่เกิน 2 ชั่วโมง นำสารละลายไปวัดการดูดกลืนแสงด้วยเครื่องสเปกโตรโฟโตมิเตอร์ ที่ความยาวคลื่น 543 นาโนเมตร

6. เขียนกราฟมาตรฐานแสดงความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของสารละลายมาตรฐานกับค่าการดูดกลืนแสง แล้วนำค่าการดูดกลืนแสงที่อ่านได้จากน้ำตัวอย่างไปเปรียบเทียบกับกราฟมาตรฐาน จะทราบความเข้มข้นของไนไตรท์ในน้ำตัวอย่าง

ภาคผนวก ก. 3

1. การวิเคราะห์หาปริมาณซีลีเนียม ดัดแปลงวิธีการจาก AOAC (1993)

สารเคมี

1. กรดไนตริกเข้มข้น 65 เปอร์เซ็นต์ (conc. H_2NO_3)
2. น้ำกลั่นปราศจากไอออน (deionized water)

วิธีการ

1.1 ขั้นตอนการเตรียมตัวอย่าง

วิเคราะห์ซีลีเนียมในอาหารทดลองแต่ละชุดการทดลองและในปลากะพงขาวทดลองทั้งก่อนและหลังการทดลอง สำหรับตัวอย่างปลากะพงขาว แล่เอาแต่กล้ามเนื้อของปลาจากแต่ละชุดการทดลอง ให้ได้น้ำหนักประมาณ 200.0-300.0 กรัม นำไปผ่านการอบตัวอย่างที่อุณหภูมิ 75 องศาเซลเซียส ชั่งน้ำหนักตัวอย่างปลาที่อบทุกวันจนกว่าจะได้น้ำหนักคงที่ และนำตัวอย่างไปบดให้ละเอียดด้วยโกร่งบดยา เช่นเดียวกับอาหารทดลอง

1.2 ขั้นตอนการย่อย

การย่อยแบบเปียกเป็นการย่อยตัวอย่างด้วยกรด (wet acid digestion) ดังนี้

1. ชั่งตัวอย่างที่ผ่านการอบและบดละเอียด ปริมาณ 1.0 กรัม ด้วยเครื่องชั่งทศนิยม 4 ตำแหน่ง ใส่ในบีกเกอร์ขนาด 100 มิลลิลิตร
2. เติมกรดไนตริกเข้มข้น 65 เปอร์เซ็นต์ ปริมาตร 10 มิลลิลิตร เพื่อย่อยตัวอย่าง
3. นำตัวอย่างไปย่อยบนเตาร้อน (hot plate) ค่อย ๆ ปรับความร้อนให้ได้ 100 องศาเซลเซียส เมื่อสารละลายตัวอย่างเดือดจะเกิดฟองและควันสีน้ำตาลออกมา ซึ่งเกิดจากการทำปฏิกิริยาของกรดไนตริกกับอินทรีย์คาร์บอน เมื่อควันสีน้ำตาลหายปรับอุณหภูมิเป็น 190 องศาเซลเซียส
4. เมื่อสารละลายตัวอย่างระเหยจนเกือบแห้งให้ยกออกจากเตา ควรระวังอย่าให้ตัวอย่างที่ย่อยเกิดเป็นสีดำ (charring) ขึ้นในระหว่างย่อย อาจทำให้มีการสูญเสียสารตัวอย่างได้
5. เติมกรดไนตริกเข้มข้น 65 เปอร์เซ็นต์ ปริมาตร 10 มิลลิลิตร เพื่อทำการย่อยอีกครั้ง
6. ย่อยตัวอย่างจนได้สารละลายสีใส (สีเหลืองอ่อน) และปล่อยควันสีขาวออกมา เมื่อสารละลายตัวอย่างระเหยจนเกือบแห้งยกออกจากเตา (หากสียังไม่ใสให้ทำตามข้อ 5. อีกครั้ง)
7. จะได้สารละลายตัวอย่างมีสีใส (สีเหลืองอ่อน) และตะกอนสีขาว เติมน้ำกลั่น

ปราศจากไอออน ปริมาตร 10 มิลลิลิตร ย่อยตัวอย่างอีกครั้งหนึ่ง จนสารละลายตัวอย่างเกือบแห้ง แล้วยกลงจากเตา

8. เติมน้ำกลั่นปราศจากไอออนปริมาตร 5 มิลลิลิตร และกรองสารละลายตัวอย่างด้วยกระดาษกรองหมายเลข 1 ในขวดปรับปริมาตร ขนาด 10 มิลลิลิตร สารละลายมีลักษณะสีเหลืองใส

9. ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นปราศจากไอออนให้ครบ 10 มิลลิลิตร นำตัวอย่างไปวิเคราะห์ปริมาณซีลีเนียมด้วยวิธี ICP-OES โดยวัดการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 196.026 นาโนเมตร เปรียบเทียบกับความยาวคลื่นของซีลีเนียมมาตรฐาน

2. การวิเคราะห์หาปริมาณวิตามินอี ตามวิธีการของ Buttriss และ Diplock (1984)

สารเคมี

1. วิตามินอีเข้มข้น 50 เปอร์เซ็นต์ (alpha-tocopherol acetate)

2. สารละลายไพโรแกลรอน (pyrogallol) 1 เปอร์เซ็นต์ ในเอทิลแอลกอฮอล์: ละลายไพโร-แกลรอน 0.1 กรัม ในเอทิลแอลกอฮอล์ 20 มิลลิลิตร

3. โปแทสเซียมไฮดรอกไซด์ 50 เปอร์เซ็นต์: โปแทสเซียมไฮดรอกไซด์เข้มข้น 50 มิลลิลิตร ผสมกับน้ำกลั่น 100 มิลลิลิตร

4. เมทธานอล 30 เปอร์เซ็นต์: นำเมทธานอลเข้มข้นมา 30 มิลลิลิตร ผสมกับน้ำกลั่น 100 มิลลิลิตร

5. เฮกเซนเข้มข้น (n-hexane)

6. อะซิโตไนไตรท์ 70 เปอร์เซ็นต์: นำอะซิโตไนไตรท์เข้มข้นมา 70 มิลลิลิตร ผสมกับน้ำกลั่น 100 มิลลิลิตร

วิธีการ

1. ชั่งอาหารที่บดละเอียดแล้ว 0.25 กรัม ใส่หลอดแก้วฝาเกลียวขนาด 10 มิลลิลิตร เติมไพโรแกลรอน (pyrogallol) 1 เปอร์เซ็นต์ ในเอทิลแอลกอฮอล์ 2 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน จากนั้นนำไปต้มในน้ำอุณหภูมิ 70 องศาเซลเซียส นาน 2 นาที

2. เติมโปแทสเซียมไฮดรอกไซด์ 50 เปอร์เซ็นต์ 300 ไมโครลิตร และต้มต่อในน้ำอุณหภูมิ 70 องศาเซลเซียส นาน 30 นาที วางทิ้งให้เย็นที่อุณหภูมิห้อง

3. เติมน้ำกลั่น 1 มิลลิลิตร และเฮกเซนเข้มข้น 4 มิลลิลิตร ลงในหลอด ผสมให้เข้ากัน จากนั้นนำไปเหวี่ยงที่ความเร็ว 1,500 รอบ นาน 5 นาที อุณหภูมิห้อง

4. ดูดสารละลายชั้นบนใส่หลอดแก้วใหม่ขนาด 5.0 มิลลิลิตร ส่วนชั้นล่างนำไปเติมเฮกเซนเข้มข้น 2.0 มิลลิลิตร เพื่อสกัดวิตามินอีครั้งที่สอง และครั้งที่สาม

5. นำหลอดแก้วที่ใส่สารละลายชั้นบน มาระเหยเอาเฮกเซนออกด้วยก๊าซไนโตรเจน

6. เติมเมทธานอลเข้มข้น 1,000 ไมโครลิตร ฉีดเข้าเครื่อง HPLC ปริมาตร 20 ไมโครลิตร ความยาวคลื่น 292 นาโนเมตร ใช้โมบายเฟส (mobile phase) ระหว่างอะซิโตไนไตรท์ 70 เปอร์เซ็นต์ ต่อเมทธานอล 30 เปอร์เซ็นต์ อัตราการไหลผ่านคอลัมน์ (flow rate) 1 มิลลิลิตรต่อนาที อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส เปรียบเทียบพื้นที่กราฟของตัวอย่างกับพื้นที่กราฟของวิตามินอีมาตรฐานซึ่งทราบความเข้มข้นแล้ว ก็จะทราบความเข้มข้นของวิตามินอีในตัวอย่าง

3. ปริมาณเอนไซม์กลูธาไธโอนเปอร์ออกซิเดส (Activity of selenium dependent GSHPx) ในพลาสมา ใช้ชุดทดสอบ Glutathione Peroxidase Assay Kit, No. 70312, cayman, USA.

สารเคมี

1. สารละลาย Assay Buffer: นำ Assay Buffer เข้มข้นปริมาตร 2 มิลลิลิตร เจือจางด้วยน้ำกลั่นปราศจากไอออน 18 มิลลิลิตร เก็บอุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส **ใช้งาน ณ อุณหภูมิห้อง

2. สารละลาย Sample assay: นำ Sample assay เข้มข้นปริมาตร 2 มิลลิลิตร เจือจางด้วยน้ำกลั่นปราศจากไอออน 18 มิลลิลิตร เก็บอุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส **ใช้งาน ณ อุณหภูมิห้อง

3. สารละลาย Glutathion Peroxidase: นำ Glutathion Peroxidase เข้มข้น มาปริมาตร 10 ไมโครลิตร เจือจางด้วยสารละลาย Sample assay 490 ไมโครลิตร เก็บอุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

4. สารละลาย Co-Substrate mixture: นำสารละลาย Co-Substrate มา 1 หลอด เติมน้ำกลั่นกลั่นปราศจากไอออน 2 มิลลิลิตร เก็บอุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

5. สารละลาย Cumene hydroperoxide เก็บอุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส

วิธีการ

โดยวัดการลดปริมาณ NADPH ในการเปลี่ยนไปเป็นกลูทาไธโอนในสภาพรีดิวส์ (GSH) ซึ่ง GSH จะจับกับไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ (H_2O_2) ไม่ให้เปลี่ยนเป็นอนุมูลไฮดรอกซิล (OH^-) ที่ความยาวคลื่นที่ 340 นาโนเมตร ซึ่งทำในเพลท 96 หลุมก้นแบน ดังนี้

1. หลุมที่ 1 และ 2 เติมสารละลาย Assay Buffer หลุมละ 120 ไมโครลิตร จากนั้นเติมสารละลาย Co-Substrate mixture ปริมาตร 50 ไมโครลิตร (Negative control)

หลุมที่ 3 และ 4 เติมสารละลาย Assay Buffer หลุมละ 100 ไมโครลิตร จากนั้นเติมสารละลาย Co-Substrate mixture ปริมาตร 50 ไมโครลิตร แล้วเติมสารละลาย Glutathion Peroxidase (เป็น positive control)

หลุมที่ 5 และ 6 เติมสารละลาย Assay Buffer หลุมละ 100 ไมโครลิตร จากนั้นเติมสารละลาย Co-Substrate mixture ปริมาตร 50 ไมโครลิตร เติมพลาสมา 20 ไมโครลิตรต่อตัวอย่าง โดย 1 ตัวอย่างวิเคราะห์ 2 หลุม

2. เติมสารละลาย Cumene hydroperoxide ลงในหลุมทุกหลุม หลุมละ 20 ไมโครลิตร เขย่าเพลทประมาณ 3 วินาที

3. จากนั้นนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 450 นาโนเมตร ด้วยเครื่อง Kinetic mode โดยวัดทุกๆ 1 นาที เป็นเวลา 6 นาที จากนั้นนำค่าการดูดกลืนแสงที่วัดได้ไปเปรียบเทียบกับกราฟมาตรฐาน activity of bovine erythrocyte GPx ที่ใช้กับชุดทดสอบ รายงานผล GPx activity เป็นนาโนโมลต่อนาทีต่อมิลลิลิตร

ภาคผนวก ก. 4

1. การวิเคราะห์องค์ประกอบเลือด

1.1 ปริมาณเม็ดเลือดแดง (Red blood cell) และเม็ดเลือดขาว (White blood cell) ตามวิธีของ Braxhall และ Daisley (1973)

สารเคมี

1. Yokoyama's solution

1.1 สารละลาย A: โดยชั่งโซเดียมคลอไรด์ 4.0 กรัม ละลายในน้ำกลั่นปราศจากไอออน 200 มิลลิลิตร เติมเด็กโตส 1.25 มิลลิกรัม เติมโปแทสเซียมคลอไรด์ 200 มิลลิลิตร เติมโซเดียมไฮโดรเจนคาร์บอเนต ($NaHCO_3$) 250 มิลลิกรัม จากนั้นเติมฟอร์มาลิน (Formalin 40 เปอร์เซ็นต์) 50 มิลลิลิตร เก็บที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

1.2 สารละลาย B: โดยละลายเมทธิลไวโอเลท 75.0 มิลลิกรัม ในน้ำกลั่นปราศจากไอออน 250 มิลลิลิตร จากนั้นเติมไพโรนิน บี 75.0 มิลลิกรัม คนจนสารละลายเข้ากันดี เก็บอุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

1.3 จากนั้นผสมสารละลาย A และสารละลาย B ในอัตราส่วน 1:1 นำมาผ่านกระดาษกรองหมายเลข 1 ก่อนนำไปใช้เป็น working solution

วิธีการ

1. ใช้ปิเปตสำหรับเจือจางเลือด (RBC diluting pipette) ดูดเลือดที่เจาะใหม่ๆ ให้ถึงขีด 0.5 ถ้าเกิน 0.5 ให้ปรับโดยใช้กระดาษทิชชูค่อยๆซับออก แล้วเช็ดปลายปิเปตให้สะอาด

2. ใช้ปิเปตอันเดิมดูด working solution ด้วยสายยาง เพื่อเจือจางเลือด จนกระทั่งถึงขีด 101 ตรงปลายปิเปต

3. ใช้นิ้วชี้ปิดปลายปิเปตแล้วถอดสายยางออก จากนั้นใช้นิ้วหัวแม่มือกับนิ้วชี้ปิดปลายปิเปตทั้งสองข้างเขย่าไปมาในแนวนอน 2-3 นาที

4. หยดของเหลวในปลายปิเปต 3-4 หยดทิ้ง เพราะของเหลวส่วนนี้อยู่ในก้านไม่ได้ถูกนำไปผสมกับเลือดในกะเปาะของปิเปต

5. หยดของเหลวต่อไปลงบนสไลด์นับเม็ดเลือด (Hematocytometer) ที่มีแผ่นปิดสไลด์ (cover glass) ปิดอยู่ หากมีฟองอากาศหรือของเหลวล้นขอบสไลด์นับเม็ดเลือด ให้ทำความสะอาดแล้วหยดตัวอย่างเลือดใหม่

6. นับจำนวนเม็ดเลือดแดงและเม็ดเลือดขาวภายใต้กล้องจุลทรรศน์กำลังขยาย 40X

1.2. ปริมาณเม็ดเลือดแดงอัดแน่น โดยวิธีดัดแปลงจาก Braxhall และ Daisley (1973)

วิธีการ

1. นำเลือดที่เจาะได้ใหม่ๆ ใส่ในหลอดเล็กๆ สำหรับหาค่าฮีมาโตคริต (haematocrit tube) จนปริมาตรถึงขีดแดง อุดปลายด้านหนึ่งของหลอดด้วยดินน้ำมัน จำนวน 2 หลอดต่อตัวอย่าง

2. นำหลอดมาปั่นด้วยฮีมาโตคริตเซนติฟิวส์ (haematocrit centrifuge) ที่แรงเหวี่ยง 10,000-15,000 รอบต่อนาที นานประมาณ 5 นาที

3. วัดหาอัตราส่วนของปริมาตรเม็ดเลือดกับปริมาตรเลือดทั้งหมดนำมาคำนวณหาเปอร์เซ็นต์ฮีมาโตคริตหรือปริมาณเม็ดเลือดแดงอัดแน่น จากสูตร

$$\text{ปริมาณเม็ดเลือดแดงอัดแน่น (เปอร์เซ็นต์)} = \frac{\text{ปริมาตรของเม็ดเลือดแดงอัดแน่น (มิลลิเมตร)} \times 100}{\text{ปริมาตรเลือดทั้งหมด (มิลลิเมตร)}}$$

2. การวิเคราะห์ภูมิคุ้มกันแบบไม่จำเพาะ

2.1 ปริมาณไลโซไซม์ (Lysozyme activity) ตามวิธีการของ Demers และ Bayne (1997)

สารเคมี

1. สารละลาย 0.1 โมล Phosphate/citrate buffer solution (PBS), พีเอช 5.8: ประกอบด้วย

(a) ชั่งไดโซเดียมไฮโดรเจนฟอสเฟต (Na_2HPO_4) 7.098 กรัม ละลายในน้ำกลั่นปราศจากไอออน ปรับปริมาตรเป็น 500 มิลลิลิตร

(b) ชั่งกรดซิตริค แอสิค (Citric acid) 10.507 กรัม ละลายในน้ำกลั่นปราศจากไอออน ปรับปริมาตรเป็น 500 มิลลิลิตร

(c) ผสมสารละลาย (a) และ (b) ในอัตราส่วน 1:1 ผสมให้เข้ากัน นำไปวัดพีเอชให้ได้ 5.8 หากค่าพีเอชต่ำกว่า 5.8 ใช้สารละลาย (a) ปรับพีเอช และหากค่าพีเอชสูงกว่า 5.8 ใช้สารละลาย (b) ปรับพีเอช

2. สับเสตทเชื้อแบคทีเรีย (*Micrococcus lysodeikticus*) 0.075 เปอร์เซ็นต์: เตรียมโดยชั่งผงเชื้อแบคทีเรีย *Micrococcus lysodeikticus* มา 37.5 มิลลิกรัม ละลายในฟอสเฟตบัฟเฟอร์ 0.1 โมล พีเอช 5.8 ปริมาตร 40 มิลลิลิตร จากนั้นปรับปริมาตรเป็น 50 มิลลิลิตร # เตรียมก่อนใช้

วิธีการ

ปิเปตซีรัมมาตัวอย่างละ 25 ไมโครลิตร ใส่ในเพลท 96 หลุมก้นแบน โดยใส่ตัวอย่างละ 3 หลุม จากนั้นเติมสับสเตทเชื้อแบคทีเรีย 0.075 เปอร์เซ็นต์ 175 ไมโครลิตร หลังจากนั้น 1 นาที

นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 450 นาโนเมตร ด้วยเครื่อง Kinetic mode โดยวัดทุกๆ 30 วินาที เป็นเวลา 5 นาที จากนั้นนำค่าการดูดกลืนแสงที่วัดได้ไปเทียบกับไลโซไซม์มาตรฐาน (hen egg white lysozyme) ที่ทราบความเข้มข้น รายงานผลเป็นยูนิต (unit) ต่อมิลลิกรัมโปรตีน โดยหนึ่งยูนิตไลโซไซม์เท่ากับปริมาณซีรัมที่ทำให้ค่าการดูดกลืนแสงลดลง 0.001 ต่อนาที

การเตรียมกราฟมาตรฐาน (standard curve) ของไลโซไซม์

1. การเตรียมสารละลายมาตรฐานไลโซไซม์ (Hen egg white lysozyme) เข้มข้น 1,000 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร: โดยชั่ง Hen egg white lysozyme มา 10.0 มิลลิกรัม ละลายในสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ 0.1 โมล พีเอช 5.8 ปริมาตร 10 มิลลิลิตร แบ่งใส่หลอดเล็กๆ เก็บไว้ที่อุณหภูมิ -80 องศาเซลเซียส จนกว่าจะนำมาใช้ จากนั้นดูดสารละลายมาตรฐานความเข้มข้น 1,000 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ใส่หลอดทดลองหลอดละ 2, 4, 6, 8, 10, 12 และ 14 ไมโครลิตร ตามลำดับ

2. เติมสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ 0.1 โมล พีเอช 5.8 ลงในหลอดๆละ 988, 996, 994, 992, 990, 988 และ 986 ไมโครลิตร ตามลำดับ โดยแต่ละหลอดมีความเข้มข้นเท่ากับ 2, 4, 6, 8, 10, 12 และ 14 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ

3. นำแต่ละหลอดมาทำตามขั้นตอนการหาปริมาณไลโซไซม์เช่นเดียวกับกับหาปริมาณไลโซไซม์ในซีรัมตัวอย่างดังที่ได้กล่าวแล้วข้างต้น

4. นำความยาวคลื่นที่มีการเปลี่ยนแปลงในหนึ่งนาที และความเข้มข้นของไลโซไซม์ ที่ได้มาเขียนกราฟมาตรฐาน โดยให้ความเข้มข้นของไลโซไซม์อยู่ในแกน X และค่าการดูดกลืนแสงที่เปลี่ยนแปลงในหนึ่งนาทีอยู่ในแกน Y หาสมการสหสัมพันธ์เชิงเส้นตรง (linear regression) เพื่อใช้คำนวณความเข้มข้นของไลโซไซม์ในซีรัม จากค่าการดูดกลืนแสง

2.2 ปริมาณคอมพลีเม้นท์ (Complement activity) ตามวิธีของ Yano (1992)

สารเคมี

1. สารละลายบัฟเฟอร์ HBSS: เตรียมโดยชั่งโซเดียมคลอไรด์ 11.103 กรัม โปแทสเซียมคลอไรด์ 0.3995 กรัม กลูโคส 0.9980 กรัม โปแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต (KH_2PO_4) 0.0598 กรัมและไดโซเดียมไฮโดรเจนฟอสเฟต (Na_2HPO_4) 0.0795 กรัม ละลายในน้ำกลั่นปราศจากไอออน 600 มิลลิลิตร ปรับพีเอชให้ได้ 7.6 จากนั้นปรับปริมาตรให้ครบ 1,000 มิลลิลิตร นำไปกรองผ่านตัวกรอง 0.45 ไมครอน เก็บที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

2. สารละลายเอทธิลีนไกลคอลเตตราอะซิตริค แอสิค แมกนีเซียม (EGTA-Mg, ethylene

glycol tetraacetic acid-magnesium) 0.1 โมล: ชั่งโซเดียมไฮดรอกไซด์ 1.596 กรัม เอทธิลีนไกลคอล เตตราอะซิตริค แอสิค 3.8 กรัม และแมกนีเซียมคลอไรด์ ($MgCl_2.6H_2O$) 10.15 กรัม ละลายในน้ำกลั่นปราศจากไอออน 60 มิลลิลิตร เติมน้ำกลั่นปรับ พีเอชให้ได้ 7.5 ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นปราศจากไอออนให้ครบ 100 มิลลิลิตร เก็บที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

3. สารละลาย EGTA-Mg-GHBSS 0.01 โมล: ชั่งเจลลาทิน 0.1 กรัม ในน้ำกลั่นปราศจากไอออน 100 มิลลิลิตร โดยให้ความร้อนอ่อนๆ เมื่อละลายหมดหยุดให้ความร้อน เติมสารละลาย HBSS 100 มิลลิลิตรและเอทธิลีนไกลคอลเตตราอะซิตริค แอสิค แมกนีเซียม 0.1 โมล ปริมาตร 50 มิลลิลิตร เติมน้ำกลั่นปราศจากไอออน ปรับพีเอชให้ได้ 7.5 ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นปราศจากไอออนให้ครบ 500 มิลลิลิตร เก็บที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส # ควรใช้ภายใน 1 สัปดาห์

4. โซเดียมคลอไรด์ 0.85 เปอร์เซ็นต์ : ชั่งโซเดียมคลอไรด์ 0.85 กรัม ละลายน้ำกลั่นปราศจากไอออน 100 มิลลิลิตร

5. เตรียมเม็ดเลือดแดงกระต่าย: ล้างเม็ดเลือดแดงกระต่ายใน EGTA-Mg-GHBSS 0.01 โมล จำนวน 3 ครั้ง ที่แรงเหวี่ยงความเร็ว 700xg เป็นเวลา 5 นาที อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส จากนั้นนับจำนวนเม็ดเลือดแดงกระต่ายด้วยกล้องจุลทรรศน์ให้ได้ปริมาณเซลล์ 2×10^8 เซลล์ต่อมิลลิลิตร เก็บที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

วิธีการ

1. เจือจางซีรัมในแต่ละตัวอย่าง 20 เท่า โดยนำซีรัมมา 20 ไมโครลิตรเจือจางด้วย EGTA-Mg 0.1 โมล ปริมาตร 380 ไมโครลิตร ในหลอดทดลองขนาด 1.5 มิลลิลิตร เป็นตัวแทนของซีรัมที่ใช้ในการวิเคราะห์

2. นำหลอดทดลองขนาด 1.5 มิลลิลิตร มา 6 หลอดต่อซีรัมหนึ่งตัวอย่าง โดยนำซีรัมจากข้อ 1. มาเจือจาง ดังนี้

หลอดที่ 1 ใส่ซีรัม 100 ไมโครลิตร

หลอดที่ 2 ใส่ซีรัม 80 ไมโครลิตร เจือจางด้วย EGTA-Mg-GHBSS 0.01 โมล 20 ไมโครลิตร

หลอดที่ 3 ใส่ซีรัม 64 ไมโครลิตร เจือจางด้วย EGTA-Mg-GHBSS 0.01 โมล 36 ไมโครลิตร

หลอดที่ 4 ใส่ซีรัม 50 ไมโครลิตร เจือจางด้วย EGTA-Mg-GHBSS 0.01 โมล 50 ไมโครลิตร

หลอดที่ 5 ใส่ซีรัม 40 ไมโครลิตร เจือจางด้วย EGTA-Mg-GHBSS 0.01 โมล 60 ไมโครลิตร

หลอดที่ 6 ใส่ EGTA-Mg-GHBSS 0.01 โมล 100 ไมโครลิตร

หลอดที่ 7 หลอดควบคุมใส่น้ำกลั่น 1.36 มิลลิลิตร

3. จากนั้นเติมเม็ดเลือดแดงกระต่าย 40 ไมโครลิตร บ่มที่อุณหภูมิห้อง นาน 90 นาที พร้อมทั้งเขย่าเป็นระยะๆ

4. ครบกำหนดเติมน้ำเกลือ 0.85 เปอร์เซ็นต์ ปริมาตร 1.26 มิลลิลิตร จากนั้นนำไปเหวี่ยงที่ความเร็ว 1,600xg นาน 5 นาที อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

5. นำส่วนใสจากแต่ละหลอดใส่ในเพลท 96 หลุมแบบก้นแบน (96 well plate) หลุมละ 20 ไมโครลิตร จำนวน 3 หลุมต่อหลอด จากนั้นนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 405 นาโนเมตร ด้วยเครื่อง microplate reader

6. นำค่าการดูดกลืนแสงที่ได้มาคำนวณหาปริมาณคอมพลีเมนท์ จากค่าการดูดกลืนแสงของน้ำเกลือ 0.85 เปอร์เซ็นต์ น้ำกลั่นปราศจากไอออน และการแตกของเม็ดเลือดกระต่าย 100 เปอร์เซ็นต์

การคำนวณ

ACH_{50} (ยูนิตต่อมิลลิลิตร) = $1/K \times$ จำนวนเท่าของการเจือจางซีรัม $\times 0.5$

เมื่อ K = ปริมาณซีรัมที่ทำให้เม็ดเลือดแดงแกะแตก 50 เปอร์เซ็นต์

0.5 = ค่าคงที่

2.3 ปริมาณอิมมูโนโกลบูลิน (Total immunoglobulin) ตามวิธีการของ Siwicki และคณะ (1994)

สารเคมี

1. สารมาตรฐาน Bovine serum albumin (BSA)

2. สารละลาย folin reagent: เจือจางสาร folin:น้ำกลั่นปราศจากไอออน ในอัตราส่วน 1:10

3. สารละลาย alkaline copper ประกอบด้วย

(a) สารละลายคอปเปอร์ซัลเฟต ($CuSO_4.5H_2O$) 0.5 เปอร์เซ็นต์: ชั่งคอปเปอร์ซัลเฟต 0.015 กรัม ละลายในน้ำกลั่นปราศจากไอออน 3 มิลลิลิตร

(b) สารละลายโซเดียมโพแทสเซียมตาเตรท 1 เปอร์เซ็นต์: ชั่งโซเดียมโพแทสเซียมตาเตรท 0.03 กรัม ละลายในน้ำกลั่นปราศจากไอออน 3 มิลลิลิตร

(c) สารละลายโซเดียมคาร์บอเนต (Na_2CO_3) 1 เปอร์เซ็นต์: ต้มน้ำกลั่นปราศจากไอออน 100 มิลลิลิตร วางทิ้งไว้ให้เย็น เติมโซเดียมไฮดรอกไซด์ 2 กรัม จากนั้นเติมโซเดียมคาร์บอเนต 1 กรัม คนจนสารละลายเข้ากันดี

นำสารละลายในข้อ (a) (b) และ (c) ผสมกันในอัตราส่วน 1:1:50 เพื่อนำไปใช้งาน

4. สารละลายโพลีเอทธิลีนไกลคอล (PEG) 12 เปอร์เซ็นต์: ชั่งสารโพลีเอทธิลีนไกลคอล 12 กรัม ละลายในน้ำกลั่นปราศจากไอออน 100 มิลลิลิตร

วิธีการ

1. การหาปริมาณโปรตีน

1.1 นำพลาสมามา 10 ไมโครลิตร ผสมกับน้ำกลั่นปราศจากไอออน 990 ไมโครลิตร จากนั้นเติมสารละลาย alkaline copper 2 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากัน วางทิ้งไว้ 10 นาที

1.2 เติมลารละลาย folin reagent 1:10 ปริมาตร 3 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากัน วางทิ้งไว้ 10 นาที หลังจากนั้นนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 640 นาโนเมตร โดยใช้น้ำกลั่นปราศจากไอออนเป็นแบลงค์ นำค่าการดูดกลืนแสงที่ได้เปรียบเทียบกับกราฟของสารละลายมาตรฐานซึ่งทราบความเข้มข้นของโปรตีนแล้ว ก็จะหาปริมาณโปรตีนในตัวอย่างได้

2. การหาปริมาณโปรตีนที่ไม่ใช่อิมมูโนโกลบูลิน

2.1 นำพลาสมา 100 ไมโครลิตร ผสมกับ 12 เปอร์เซ็นต์โพลีเอทธิลีนไกลคอล 100 ไมโครลิตร วางที่อุณหภูมิห้อง 2 ชั่วโมง นำไปหมุนเหวี่ยงที่ความเร็ว 5,000 xg อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส นาน 15 นาที

2.2 นำส่วนใสมา 20 ไมโครลิตร เจือจางด้วยน้ำกลั่นปราศจากไอออน 980 ไมโครลิตร เติมสารละลาย alkaline copper ปริมาตร 2 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากัน วางไว้ 10 นาที

2.3 เติมสารละลาย folin reagent 1:10 ปริมาตร 3 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากัน วางทิ้งไว้ 10 นาที หลังจากนั้นนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 640 นาโนเมตร โดยใช้น้ำกลั่นเป็นแบลงค์ นำค่าการดูดกลืนแสงที่ได้เปรียบเทียบกับกราฟของสารละลายมาตรฐานซึ่งทราบความเข้มข้นของโปรตีนแล้ว ก็จะหาปริมาณโปรตีนในตัวอย่างได้

3. การเตรียมกราฟมาตรฐานโปรตีน

3.1 เตรียมสารละลายมาตรฐานอัลบูมิน เข้มข้น 1,000 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร: ละลายอัลบูมิน 0.01 กรัม ในน้ำกลั่นปราศจากไอออน 10 มิลลิลิตร

3.2 ปิเปตสารละลายมาตรฐานอัลบูมิน เข้มข้น 1,000 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร มา 0, 20, 40, 80 และ 100 ไมโครกรัม เจือจางด้วยน้ำกลั่นปราศจากไอออน 1,000, 980, 960, 920 และ 900 ไมโครลิตร จะได้สารละลายมาตรฐานอัลบูมิน เข้มข้น 0, 20, 40, 80 และ 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ

3.3 นำสารละลายมาตรฐานอัลบูมินแต่ละความเข้มข้นหาปริมาณโปรตีน ตามวิธีการในข้อ 1 นำค่าการดูดกลืนแสงที่วัดได้มาเขียนกราฟของสารละลายมาตรฐานอัลบูมิน

การคำนวณ

ปริมาณอิมมูโนโกลบูลิน = ปริมาณโปรตีนทั้งหมด-ปริมาณโปรตีนที่ไม่ใช่อิมมูโนโกลบูลิน

2.4 ปริมาณซุปเปอร์ออกไซด์ แอนไอออน (Respiratory burst activity) และการจับกินสิ่งแปลกปลอม (Phagocytotic index)

2.4.1 เตรียมเม็ดเลือดขาวจากไตส่วนหน้า (Head kidney) ปลากะพงขาว ตามวิธีของ Chung และ Secombes (1988)

สารเคมี

1. Fetal Calf Serum: ก่อนใช้ต้องนำไปวางที่อุณหภูมิ 56 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที และกรองผ่านตัวกรอง 0.2 ไมครอน เก็บอุณหภูมิ -80 องศาเซลเซียส

2. สารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ (PBS) พีเอช 7.2: เตรียมโดยชั่งโซเดียมคลอไรด์ 8.5 กรัม ไดโซเดียมไฮโดรเจนฟอสเฟต 1.07 กรัม และโซเดียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต 0.39 กรัม ละลายในน้ำกลั่นปราศจากไอออน 900 มิลลิลิตร ปรับพีเอช 7.2 แล้วปรับปริมาตรให้ครบ 1,000 มิลลิลิตร เก็บที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

3. เฮพาริน 1,000 ยูนิต: ชั่งเฮพารินแบบผงความเข้มข้น 140 U/mg มา 0.1429 กรัม ละลายในสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ 7.2 ปริมาตร 20 มิลลิลิตร จากนั้นกรองสารละลายผ่านตัวกรอง 0.2 ไมครอน เก็บที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

4. อาหารเลี้ยงเซลล์ L-15: ละลายผง L-15 ปริมาณ 1 ซองในน้ำกลั่นปราศจากไอออน 850 มิลลิลิตร ปรับพีเอชให้ได้ 7.4 ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นปราศจากไอออนให้ครบ 1 ลิตร จากนั้นกรองผ่านตัวกรอง 0.2 ไมครอน เก็บที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

5. อาหารเลี้ยงเซลล์ L-15 I: โดยนำอาหารเลี้ยงเซลล์ L-15 จากข้อ 1. มา 99 มิลลิลิตร ผสมกับยาปฏิชีวนะเพนนิซิลลิน 1 มิลลิลิตร

6. อาหารเลี้ยงเซลล์ L-15 II: นำอาหารเลี้ยงเซลล์ L-15 จากข้อ 1. มา 96 มิลลิลิตร ผสมกับเฮพาริน (1,000 unit) ปริมาตร 1 มิลลิลิตร และยาปฏิชีวนะเพนนิซิลลิน 1 มิลลิลิตร และ Fetal Calf Serum 2 มิลลิลิตร

7. อาหารเลี้ยงเซลล์ L-15 II**I:** นำอาหารเลี้ยงเซลล์ L-15 จากข้อ 1. มา 94 มิลลิลิตรผสมกับยาปฏิชีวนะเพนนิซิลลิน 1 มิลลิลิตร และ Fetal Calf Serum 5 มิลลิลิตร

8. อาหารเลี้ยงเซลล์ L-15 I**V:** นำอาหารเลี้ยงเซลล์ L-15 จากข้อ 1. มา 98.9 มิลลิลิตร ผสมกับยาปฏิชีวนะเพนนิซิลลิน 1 มิลลิลิตร และ Fetal Calf Serum 0.1 มิลลิลิตร

9. สารแยกเม็ดเลือด (Percall Gradients) 34/51 เปอร์เซ็นต์ ประกอบด้วย

(a) Percall 90 เปอร์เซ็นต์ ในโซเดียมคลอไรด์ 1.5 โมล: เตรียมโซเดียมคลอไรด์ 1.5 โมลก่อน โดยชั่งโซเดียมคลอไรด์ 8.77 กรัม ละลายในน้ำกลั่นปราศจากไอออน 100 มิลลิลิตร จากนั้นนำสารละลาย โซเดียมคลอไรด์ 1.5 โมล ปริมาตร 10 มิลลิลิตร ผสมกับสาร Percall 90 มิลลิลิตร

(b) โซเดียมคลอไรด์ 0.15 โมล: โดยโซเดียมคลอไรด์ 1.5 โมลในข้อ (a) 10 มิลลิลิตรผสมกับน้ำกลั่นปราศจากไอออน 90 มิลลิลิตร

(c) Percall 34 เปอร์เซ็นต์ ในโซเดียมคลอไรด์ 0.15 โมล: นำสารละลาย Percall 90 เปอร์เซ็นต์ ในโซเดียมคลอไรด์ 1.5 โมล ปริมาตร 37.8 มิลลิลิตร ผสมกับโซเดียมคลอไรด์ 0.15 โมล ปริมาตร 62.2 มิลลิลิตร เก็บที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

(d) Percall 51 เปอร์เซ็นต์ ในโซเดียมคลอไรด์ 0.15 โมล: นำสารละลาย Percall 90 เปอร์เซ็นต์ ในโซเดียมคลอไรด์ 0.15 โมล ปริมาตร 56.7 มิลลิลิตร ผสมกับโซเดียมคลอไรด์ 0.15 โมล ปริมาตร 43.3 มิลลิลิตร เก็บที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

ปิเปตสารละลายในข้อ (c) ปริมาตร 2 มิลลิลิตรใส่ในหลอดแก้ว จากนั้นโหลดสารละลายในข้อ (d) ปริมาตร 2 มิลลิลิตร ก็จะได้ Percall Gradients 34/51 เปอร์เซ็นต์ เก็บที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

10. ทริปแพนบลู 0.2 เปอร์เซ็นต์: ชั่งทริปแพนบลู 0.2 กรัม ละลายในน้ำกลั่นปราศจากไอออน 100 มิลลิลิตร โดยปั่นทิ้งไว้ข้ามคืน จากนั้นกรองผ่านกระดาษกรองหมายเลข 1 เก็บอุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ก่อนใช้ให้ผสมทริปแพนบลู 0.2 เปอร์เซ็นต์ กับโซเดียมคลอไรด์ 4.25 เปอร์เซ็นต์ (ชั่งโซเดียมคลอไรด์ 4.25 กรัม ละลายในน้ำกลั่น 100 มิลลิลิตร) ในอัตราส่วน 4:1

วิธีการ

1. หลังจากปลาสลบ ตัดไตส่วนหน้าใส่ในหลอดทดลอง 1.5 มิลลิลิตร ซึ่งมีอาหารเลี้ยงเซลล์ L-15 II ปริมาตร 500 มิลลิลิตร จากนั้นใช้แท่งแก้วบดเบาๆ

2. ดูดสารละลายซึ่งกรองผ่านผ้ากรองไนลอนขนาดตา 100 ไมโครเมตร ลงในหลอดแก้วขนาด 10 มิลลิลิตร เติมอาหารเลี้ยงเซลล์ L-15 II ให้ได้ปริมาตรรวม 4 มิลลิลิตร นำไปเหวี่ยงด้วยความเร็ว 3,000 รอบต่อนาที นาน 5 นาที อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

3. ทิ้งสารละลายส่วนใส ล้างตะกอนเซลล์ด้วย L-15 II ปริมาตร 4 มิลลิลิตร จำนวน 2 ครั้ง นำสารละลายเซลล์ไปโหลดบน Percall Gradients 34/51 เปอร์เซ็นต์ จากนั้นนำไปเหวี่ยงที่ความเร็ว 400xg นาน 30 นาที อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

4. แยกเม็ดเลือดขาวบริเวณรอยต่อระหว่าง Percoll 34 และ 51 เปอร์เซ็นต์ ใส่ในหลอด 10 มิลลิลิตร และเติม L-15 II ปริมาตร 4 มิลลิลิตร ล้างเซลล์เม็ดเลือดขาวที่ความเร็ว 400xg นาน 30 นาที อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส จำนวน 3 ครั้ง

5. นำตะกอนเซลล์เม็ดเลือดขาวที่ได้ละลายใน L-15 IV 1 มิลลิลิตร จากนั้นนำเซลล์เม็ดเลือดขาวใน L-15 IV มา 20 ไมโครลิตรย้อมด้วยสารละลายทริปแพนบลู 20 ไมโครลิตร เพื่อนับจำนวนเซลล์เม็ดเลือดขาวมีชีวิตไม่ควรต่ำกว่า 98% ภายใต้กล้องจุลทรรศน์

6. ปรับจำนวนเซลล์เม็ดเลือดขาวด้วย L-15 IV ให้ได้เซลล์ประมาณ 2×10^6 เซลล์ต่อมิลลิลิตร สำหรับวิเคราะห์ Phagocytotic activity

7. ปรับจำนวนเซลล์เม็ดเลือดขาวด้วย L-15 III ให้ได้เซลล์และประมาณ 1×10^7 เซลล์ต่อมิลลิลิตร สำหรับวิเคราะห์ Respiratory burst activity

2.4.2 ปริมาณซุปเปอร์ออกไซด์แอนไอออน (Respiratory burst activity) ตามวิธีของ Siwicki และคณะ (1994)

สารเคมี

1. สารละลายไนโตรบลูเตตระโซเลียม (Nitroblue tetrazolium, NBT) 0.5 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร: ละลายสารไนโตรบลูเตตระโซเลียม 2.0 มิลลิกรัม ในน้ำกลั่นปราศจากไอออน 1 มิลลิลิตร เติม อาหารเลี้ยงเซลล์ L-15 III ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ปริมาตรรวมทั้งหมด 2 มิลลิลิตรต่อตัวอย่าง 3 ตัวอย่าง # เตรียมก่อนใช้

2. สารละลายไซโมแซน (Zymozan) ในสารละลายไนโตรบลูเตตระโซเลียม 1.0 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร: ละลายสารไซโมแซน 2.0 มิลลิกรัม ในสารละลายไนโตรบลูเตตระโซเลียมในข้อ 1 ปริมาตร 1 มิลลิลิตร สำหรับวิเคราะห์ 3 ตัวอย่าง # เตรียมก่อนใช้

3. ไดเมทธิลซัลออกไซด์ (DMSO)

4. สารละลายโปแทสเซียมออกไซด์ 2 โมล (KOH): ละลายโปแทสเซียมออกไซด์ 56.11 กรัม ในน้ำกลั่นปราศจากไอออน 500 มิลลิลิตร เก็บที่อุณหภูมิห้อง

วิธีการ

1. นำเซลล์เม็ดเลือดขาว 1×10^7 เซลล์ต่อมิลลิลิตร ปริมาตร 100 ไมโครลิตร ใส่ในเพลท 96 หลุมก้นแบน จำนวน 9 หลุมต่อตัวอย่าง นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง

2. ล้างเซลล์ด้วยอาหารเลี้ยงเซลล์ L-15 I ปริมาตร 100 ไมโครลิตรต่อหลุม จำนวน 3 ครั้ง จากนั้นเติมอาหารเลี้ยงเซลล์ L-15 I ปริมาตร 100 ไมโครลิตรต่อหลุม แล้วเติมอาหารเลี้ยงเซลล์ L-15 III 100 ไมโครลิตร ใน 3 หลุมแรก ส่วนหลุมที่ 4-6 เติมสารละลายไนโตรบลูเตตระโซเลียม 100 ไมโครลิตร หลุมที่ 7-9 เติมสารละลายไซโมแซนในสารละลายไนโตรบลูเตตระโซเลียม

3. นำไปบ่มในที่มืดอุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส นาน 1 ชั่วโมง ดูดสารละลายทิ้งครึ่งหนึ่ง เติมเมทธานอลเข้มข้น ปริมาตร 100 ไมโครลิตรต่อหลุม วางทิ้งไว้ 3 นาที แล้วดูดสารละลายทิ้งไป

4. เติมเมทธานอล 70 เปอร์เซ็นต์ ปริมาตร 100 ไมโครลิตร เพื่อล้างเซลล์ จำนวน 3 ครั้ง แล้ววางทิ้งให้แห้ง

5. เติมโปแทสเซียมคลอไรด์ 120 ไมโครลิตร และเติม DMSO 140 ไมโครลิตร ต่อหลุม วางทิ้งไว้ 5 นาที จากนั้นวัดการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 620 นาโนเมตร ด้วยเครื่อง microplate reader นำค่าการดูดกลืนแสงที่ได้คำนวณหาปริมาณซุปเปอร์ออกไซด์

การคำนวณ

ปริมาณซุปเปอร์ออกไซด์แอนไอออน = A-B

เมื่อ A = ค่าการดูดกลืนแสงไซโมแซนในไนโตรบลูเตตระโซเลียม

B = ค่าการดูดกลืนแสงอาหารเลี้ยงเซลล์ L-15 III

2.4.3 ปริมาณการจับกินสิ่งแปลกปลอม (Phagocytotic index)

ตามวิธีของ Thuvander และคณะ (1987)

สารเคมี

1. กลูตาราลดีไฮด์ 0.125 เปอร์เซ็นต์: เติมกลูตาลราดีไฮด์ ปริมาตร 0.125 มิลลิลิตร ในอาหารเลี้ยงเซลล์ L-15 I ปริมาตร 100 ไมโครลิตร เก็บอุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

2. ลาเท็กบีท เส้นผ่านศูนย์กลาง 2.0 ไมโครเมตร ปริมาณ 2×10^8 เซลล์ต่อมิลลิลิตร

3. สารย้อม Diff Quick

วิธีการ

1. นำเซลล์เม็ดเลือดขาว 2×10^6 เซลล์ต่อมิลลิลิตร ปริมาตร 400 ไมโครลิตร จากนั้นเติมลาเท็กบีท ปริมาตร 100 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากัน จากนั้นนำเซลล์เม็ดเลือดขาวผสมกับลาเท็กบีทมา 200 ไมโครลิตร หยดบนแผ่นปิดสไลด์แบบกลม (Circular cover slip) ซึ่งยึดติดกับสไลด์ด้วยสารเปอร์เม้าท์ (permount) จำนวน 2 แผ่นต่อหนึ่งสไลด์หนึ่งตัวอย่างบนแผ่นปิดสไลด์แบบกลม (Circular cover slip) ซึ่งยึดติดกับสไลด์ บ่มที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 ชั่วโมง

2. ดูดสารละลายออก แล้วเติมกลูตาราลดีไฮด์ 0.125 เปอร์เซนต์ 200 ไมโครลิตร วางทิ้งไว้ 5 นาที แล้วดูดสารทิ้ง ล้างเซลล์ด้วยอาหารเลี้ยงเซลล์ L-15 I ปริมาตร 200 ไมโครลิตร จำนวน 3 ครั้ง นำแผ่นสไลด์ย้อมด้วยสารย้อม Diff Quick จากนั้นวางสไลด์ทิ้งไว้ให้แห้ง นับจำนวนเซลล์เม็ดเลือดขาวประมาณ 100-200 เซลล์ต่อหนึ่งแผ่นปิดสไลด์แบบกลม ด้วยกล้องจุลทรรศน์ขนาด 100X

การคำนวณ

$$\text{Phagocytotic index} = \frac{\text{จำนวนลาเท็กบีทที่เซลล์เม็ดเลือดขาวกิน}}{\text{จำนวนเซลล์เม็ดเลือดขาวที่กินลาเท็กบีท}}$$

3. การวิเคราะห์ภูมิคุ้มกันแบบจำเพาะ

ทดสอบหาค่าแอนติบอดี โดยวิธี Passive haemagglutination ตามวิธีของอภิญญา (2545)

สารเคมี

1. เม็ดเลือดแดงแกะ (SRBC)
2. น้ำเกลือ 0.85 เปอร์เซ็นต์: ละลายโซเดียมคลอไรด์ 0.85 กรัม ในน้ำกลั่นปราศจากไอออน 100 มิลลิลิตร
3. เม็ดเลือดแดงแกะ 10 เปอร์เซ็นต์ในฟอสเฟตบัฟเฟอร์ พีเอช 7.2
4. กลูตาราลดีไฮด์
5. โซเดียมเอไซด์ (NaN_3) 0.1 เปอร์เซ็นต์
6. สารละลาย Bovine serum albumin (BSA) 0.5 เปอร์เซ็นต์

วิธีการ

1. การเตรียมเม็ดเลือดแดงแกะ

1.1 นำเม็ดเลือดแดงแกะ (SRBC) ในสารละลาย Alsever's มาล้างในน้ำเกลือ 0.85 เปอร์เซ็นต์ จำนวน 3 ครั้ง ที่ความเร็ว 3,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 นาที นำตะกอนเม็ดเลือดแดงที่ได้เจือจางเป็น 10 เปอร์เซ็นต์ โดยใช้เม็ดเลือดแดงแกะ 0.1 มิลลิลิตร ผสมกับฟอสเฟตบัฟเฟอร์ พีเอช 7.2 ปริมาตร 1 มิลลิลิตร

1.2 เติมกลูตาราลดีไฮด์ลงใน 10 เปอร์เซ็นต์ เม็ดเลือดแดงแกะให้มีความเข้มข้นของกลูตาราลดีไฮด์ 2.5 เปอร์เซ็นต์ ปริมาตร 0.25 มิลลิลิตร โดยค่อยๆเติมทีละนิดพร้อมทั้งเขย่าบนเครื่องเขย่า (rotate) ที่อุณหภูมิห้องนาน 2 ชั่วโมง

1.3 หลังจากนั้นปั่นล้างด้วยน้ำเกลือ 0.85 เปอร์เซ็นต์ จำนวน 3 ครั้ง เก็บเม็ดเลือดแดง

แกะในฟอสเฟตบัฟเฟอร์ พีเอช 7.2 ที่มีโซเดียมเอไซด์ (NaN_3) 0.1 เปอร์เซ็นต์ เรียกว่า 10 เปอร์เซ็นต์เม็ดเลือดแดงแกะ (fixed cell) เก็บที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

2. การเตรียมแอนติเจน

แอนติเจนที่ใช้ในการทดสอบเป็นแอนติเจนซึ่งเตรียมจากเชื้อ *Streptococcus* sp ที่ฆ่าโดยใช้ฟอร์มาลิน (Formalin killed) โดยปรับความเข้มข้นให้มีค่าการดูดกลืนแสง (OD_{640}) เท่ากับ 0.01 ตามวิธีของ Sakai และคณะ (1989)

3. การเตรียมแอนติเจนสำหรับเคลือบเม็ดเลือดแดงแกะ

3.1 นำแอนติเจนที่เตรียมไว้มาปั่นล้างด้วยฟอสเฟตบัฟเฟอร์ พีเอช 7.2 จำนวน 1 ครั้ง ตามด้วยฟอสเฟตบัฟเฟอร์ พีเอช 6.4 จำนวน 3 ครั้ง

3.2 เติมฟอสเฟตบัฟเฟอร์ พีเอช 6.4 ในปริมาตรที่เท่ากันกับแอนติเจนในอัตราส่วน 1:1 ทำให้เซลล์แอนติเจนแตกโดยใช้เครื่องโซนิเคเตอร์ (sonicator) โดยปรับ duty cycle 20 out put control 60 เป็นเวลา 20 นาที จากนั้นเจือจาง 1 เท่าด้วยฟอสเฟตบัฟเฟอร์ พีเอช 6.4

3.3 นำ 10 เปอร์เซ็นต์ เม็ดเลือดแดงแกะ (fixed cell) เก็บในกลูตาราลดีไฮด์ ผสมกับกรดแทนนิค (ความเข้มข้น 1: 20,000 ในฟอสเฟตบัฟเฟอร์ พีเอช 7.2) ในปริมาตรที่เท่ากัน ผสมให้เข้ากัน หลังจากนั้นนำไปบ่มในอ่างควบคุมอุณหภูมิ (water bath shaking) 37 องศาเซลเซียส นาน 30 นาที โดยเขย่าตลอดเวลา เมื่อครบเวลานำไปล้างในฟอสเฟตบัฟเฟอร์ พีเอช 6.4 จำนวน 2 ครั้ง แล้วปรับให้เป็น 10 เปอร์เซ็นต์เม็ดเลือดแดงแกะในฟอสเฟตบัฟเฟอร์ พีเอช 6.4

4. การเคลือบเม็ดเลือดแดงแกะด้วยแอนติเจน

4.1 นำ 10 เปอร์เซ็นต์เม็ดเลือดแดงแกะ (fixed cell) ที่ผ่านกรดแทนนิคแล้วในข้อ 3.3 มาเติมแอนติเจนที่โซนิเคดแล้วในข้อ 3.2 ในปริมาตร 1 ใน 4 ของปริมาตร 10 เปอร์เซ็นต์เม็ดเลือดแดงแกะผสมให้เข้ากันนำไปบ่มในอ่างควบคุมอุณหภูมิ (water bath shaking) 37 องศาเซลเซียส นาน 30 นาที โดยเขย่าตลอดเวลา

4.2 ปั่นล้างในฟอสเฟตบัฟเฟอร์ พีเอช 7.2 จำนวน 1 ครั้ง จากนั้นปรับเม็ดเลือดแดงแกะที่เคลือบด้วยแอนติเจนที่โซนิเคดแล้ว ให้เป็น 1 เปอร์เซ็นต์ในฟอสเฟตบัฟเฟอร์ พีเอช 7.2 ที่มี BSA 0.5 เปอร์เซ็นต์ และโซเดียมเอไซด์ 0.1 เปอร์เซ็นต์ พร้อมทั้งเตรียม 1 เปอร์เซ็นต์ เม็ดเลือดแดงแกะที่ไม่เคลือบแอนติเจนด้วย เพื่อเป็นตัวควบคุม

5. การตรวจหาปริมาณแอนติบอดีต่อเชื้อ *Streptococcus* sp.

โดยเจือจางซีรัมที่ได้เป็นอนุกรมสองเท่าในอัตราส่วน 1:20, 1:40, 1:80, 1:160,……. (serial two fold dilution) แล้วนำมาทำปฏิกิริยากับเม็ดเลือดแดงแกะที่เตรียมไว้ในข้อ 4 ในอัตราส่วน 1:1 (50 ไมโครลิตร:50 ไมโครลิตร บ่มที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 1 คืน จากนั้นตรวจ

ปฏิกิริยาการจับกลุ่ม (agglutination) แล้วบันทึกเป็นค่าไตเตอร์ของแอนติบอดี (ความเจือจางของซีรัมสูงสุดที่ทำให้เกิดปฏิกิริยาการจับกลุ่ม) ที่ได้จากปลาแต่ละชุดการทดลอง

ภาคผนวก ข

1. ข้อมูลองค์ประกอบทางโภชนาการของอาหารทดลอง

ตารางผนวก ข. 1 องค์ประกอบทางเคมีของอาหารทดลอง 7 สูตร (บนฐานน้ำหนักแห้ง)

สูตรอาหาร	โปรตีน (%)	ไขมัน (%)	เถ้า (%)	ความชื้น (%)
-E-Se	31.70±0.63	8.50±0.40	6.55±0.02	4.31±0.05
-E+hSMhNS	31.28±0.07	9.35±0.36	6.66±0.14	5.61±0.03
+E-Se	31.63±0.08	9.79±0.86	6.41±0.03	6.32±0.04
+ESM 1	31.69±0.74	10.43±0.16	6.14±0.31	7.73±0.07
+ESM 2	32.10±0.49	10.55±0.34	6.41±0.03	5.67±0.01
+ENS 1	31.63±0.22	9.64±0.29	6.46±0.03	5.25±0.02
+ENS 2	31.79±0.89	9.52±0.86	6.36±0.07	5.63±0.03

ตัวเลขที่นำเสนอเป็นค่าเฉลี่ย ± ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน จากข้อมูล 3 ซ้ำ

2. ข้อมูลปริมาณซีลีเนียมและวิตามินในอาหารทดลอง

ตารางผนวก ข. 2 ปริมาณซีลีเนียมและวิตามินอีในอาหารทดลอง 7 สูตร (บนฐานน้ำหนักแห้ง)

สูตรอาหาร	ปริมาณสารในสูตรอาหาร		ปริมาณสารจากการวิเคราะห์	
	วิตามิน อี (mg/kg)	ซีลีเนียม (mg/kg)	วิตามิน อี (mg/kg)	ซีลีเนียม (mg/kg)
-E-Se	0	0	33±0.01	2.82±0.11
-E+hSMhNS	0	1.0	35±0.01	3.31±0.09
+E-Se	50	0	40±0.02	2.78±0.17
+ESM 1	50	1.0	47±0.02	3.23±0.12
+ESM 2	50	2.0	49±0.02	4.39±0.20
+ENS 1	50	1.0	44±0.01	3.17±0.21
+ENS 2	50	2.0	42±0.01	4.50±0.13

ตัวเลขที่นำเสนอเป็นค่าเฉลี่ย ± ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน จากข้อมูล 3 ซ้ำ

3. ข้อมูลปริมาณซีลีเนียมในเนื้อปลากะพงขาว

ตารางผนวก ข. 3 ปริมาณซีลีเนียมในปลากะพงขาวหลังจากได้รับอาหารทดลอง 7 สูตร เป็นเวลา 8 สัปดาห์

สูตรอาหาร	ซีลีเนียมในอาหารทดลอง (mg/kg)	ซีลีเนียมในปลาก่อนทดลอง (mg/kg)	ซีลีเนียมในปลาหลังทดลอง (mg/kg)	ซีลีเนียมที่เพิ่มขึ้น (mg/kg)
-E-Se	2.82±0.11	1.45±0.08	2.54±0.11	1.09
-E+hSMhNS	3.31±0.09	1.45±0.08	2.71±0.08	1.26
+E-Se	2.78±0.17	1.45±0.08	2.41±0.13	0.96
+ESM 1	3.23±0.12	1.45±0.08	2.39±0.14	1.12
+ESM 2	4.39±0.20	1.45±0.08	2.91±0.06	1.54
+ENS 1	3.17±0.21	1.45±0.08	2.57±0.03	0.94
+ENS 2	4.50±0.13	1.45±0.08	2.99±0.28	1.46

ตัวเลขที่นำเสนอเป็นค่าเฉลี่ย ± ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน จากข้อมูล 3 ซ้ำ

4. การคำนวณปริมาณซีลีเนียมที่ใส่ในอาหารทดลอง

4.1 การเตรียมซีลีเนียมในรูปซีลีโนเมทไธโอนีนเข้มข้น 10 พีพีเอ็ม: ชั่งสารซีลีโนเมทไธโอนีนบริสุทธิ์ 100 เปอร์เซ็นต์ 0.01 กรัม ละลายในน้ำกลั่นปราศจากไอออนอุ่นๆ จากนั้นปรับปริมาตรให้ได้1,000 มิลลิลิตร ในขวดวัดปริมาตร เป็นสารละลายมาตรฐานตั้งต้นเพื่อเตรียมอาหารเสริมซีลีโนเมทไธโอนีนที่ความเข้มข้น 0.5, 1.0 และ 2.0 พีพีเอ็ม ดังตาราง

การเตรียมซีลีเนียมในรูปโซเดียมซีลีไนท์เข้มข้น 100 พีพีเอ็ม: ชั่งสารโซเดียมซีลีไนท์บริสุทธิ์ 100 เปอร์เซ็นต์ 0.10 กรัม ละลายในน้ำกลั่นปราศจากไอออนอุ่นๆ จากนั้นปรับปริมาตรให้ได้ 1,000 มิลลิลิตร ในขวดวัดปริมาตร เป็นสารละลายมาตรฐานตั้งต้นเพื่อเตรียมอาหารเสริมโซเดียมซีลีไนท์ที่ความเข้มข้น 0.5, 1.0 และ 2.0 พีพีเอ็ม ดังตาราง

ตารางผนวก ข. 4 ชนิดและปริมาณซีลีเนียมที่เสริมในอาหารทดลอง 7 สูตร

สูตรอาหาร	ชนิดซีลีเนียม	ปริมาณซีลีเนียม (mg/kg)	ซีลีเนียมมาตรฐาน (มล./อาหาร 5 กก.)	ปริมาตรน้ำที่ใช้ผสม (มล./อาหาร 5 กก.)
-E-Se	ตามวัตถุดิบอาหาร	0	0	1750
-E+hSMhNS	ซีลีโนเมทไธโอนีน	1.0	88	787
	โซเดียมซีลีไนท์	1.0	9	866
-E+Se	ตามวัตถุดิบอาหาร	0	0	1750
+ESM1	ซีลีโนเมทไธโอนีน	1.0	175	1575
+ESM2	ซีลีโนเมทไธโอนีน	2.0	350	1400
+ENS1	โซเดียมซีลีไนท์	1.0	18	1732
+ENS2	โซเดียมซีลีไนท์	2.0	35	1715

ภาคผนวก ค

ตารางภาคผนวก ค. 1 คุณภาพน้ำในถังทดลองเลี้ยงปลากะพงขาวด้วยอาหารทดลอง 7 สูตร เป็นเวลา 8 สัปดาห์

วันที่	อุณหภูมิ (C^o)	ความเค็ม (ppt.)	ความเป็นกรด-ด่าง	ออกซิเจนละลายน้ำ (mg/l)	ความเป็นด่าง (mg/l)	แอมโมเนีย (mg/l)	ไนไตรท์ (mg/l)
09 เม.ย. 50	29	28	7.70±0.06	7.32±0.20	90.07±0.94	0.01±0.01	0.02±0.02
16 เม.ย. 50	28	29	7.60±0.10	6.67±0.34	99.39±7.07	0.11±0.08	0.03±0.02
23 เม.ย. 50	29	27	7.66±0.30	6.06±0.08	92.56±5.56	0.16±0.10	0.07±0.02
30 เม.ย. 50	29	29	7.79±0.10	6.04±0.10	94.00±5.30	0.20±0.09	0.56±0.30
07 พ.ค. 50	28	28	7.49±0.34	5.90±0.13	91.11±5.49	0.16±0.07	0.55±0.29
14 พ.ค. 50	28	26	7.73±0.14	5.99±0.14	93.82±8.73	0.34±0.15	0.57±0.21
21 พ.ค. 50	28	25	7.65±0.15	6.06±0.79	96.86±6.36	0.37±0.20	0.56±0.30
28 พ.ค. 50	29	25	7.59±0.22	6.17±0.60	85.43±6.75	0.39±0.26	0.32±0.20
04 มิ.ย. 50	28	25	7.62±0.23	6.42±0.23	81.25±8.43	0.37±0.21	0.52±0.36

หมายเหตุ : เก็บตัวอย่างน้ำวิเคราะห์ สัปดาห์ละ 2 ครั้ง (จันทร์และศุกร์)

*ตัวเลขที่นำเสนอเป็นค่าเฉลี่ย±ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน (จากข้อมูล 3 ซ้ำ)

ประวัติผู้เขียน

ชื่อ สกุล นางจุไลวรรณ รุ่งกำเนิดวงศ์

รหัสประจำตัวนักศึกษา 4820079

วุฒิการศึกษา

วุฒิ	ชื่อสถาบัน	ปีที่สำเร็จการศึกษา
วิทยาศาสตรบัณฑิต (ชีววิทยา)	มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์	2538

ตำแหน่งและสถานที่ทำงาน

นักวิชาการประมง 6ว สถาบันวิจัยสุขภาพสัตว์น้ำชายฝั่ง ต. พะวง อ. เมือง จ. สงขลา 90100