



ผลของชีวภัณฑ์กรด 5-อะมิโนลิวูลินิกต่อการเจริญเติบโต และการตอบสนองของ
ภูมิคุ้มกันในปลาสวายปรับปรุงสายพันธุ์ (*Pangasianodon gigas* x
Pangasianodon hypophthalmus)

**Effects of Bioproduct 5-Aminolevulinic Acid on Growth Performance and
Immune Responses in Hybrid Striped Catfish (*Pangasianodon gigas* x
Pangasianodon hypophthalmus)**

วิรุพห้ศักดี ทองสุภา

Wiroonsak Thongsupa

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญา

วิทยาศาสตร์มหาบัณฑิต สาขาวิชาสัตวศาสตร์

มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์

**A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements for the Degree of
Master of Science in Aquatic Science**

Prince of Songkla University

2563

ลิขสิทธิ์ของมหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์



ผลของชีวภัณฑ์กรด 5-อะมิโนลิวูลินิกต่อการเจริญเติบโต และการตอบสนองของ
ภูมิคุ้มกันในปลาสายปรับปรุงสายพันธุ์ (*Pangasianodon gigas* x
Pangasianodon hypophthalmus)

**Effects of Bioproduct 5-Aminolevulinic Acid on Growth Performance and
Immune Responses in Hybrid Striped Catfish (*Pangasianodon gigas* x
Pangasianodon hypophthalmus)**

วิรุพห้ศักดิ์ ทองสุภา

Wiroonsak Thongsupa

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญา
วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวาริชศาสตร์
มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์

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

2563

ลิขสิทธิ์ของมหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์

ชื่อวิทยานิพนธ์ ผลของชีวภัณฑ์กรด 5-อะมิโนลิควิดต่อการเจริญเติบโต และการตอบสนองของ
ภูมิคุ้มกันในปลาชวาปรับปรุงสายพันธุ์ (*Pangasianodon gigas* x *Pangasianodon*
hypophthalmus)

ผู้เขียน นายวิรุฬห์ศักดิ์ ทองสุภา

สาขาวิชา วาริชศาสตร์

อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก

คณะกรรมการสอบ

.....
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. นเรศ ช้วนยุค)

.....ประธานกรรมการ
(รองศาสตราจารย์ ดร. วุฒิพร พรหมขุนทอง)

.....กรรมการ
(ดร. จำเริญศรี ถาวรสุวรรณ)

อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม

.....
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. อังคณา ไสเกื้อ)

.....กรรมการ
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. อังคณา ไสเกื้อ)

.....กรรมการ
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. นเรศ ช้วนยุค)

บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ อนุมัติให้บัณฑิตวิทยาลัยฉบับนี้เป็นส่วน
หนึ่งของการศึกษา ตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาวาริชศาสตร์

.....
(ศาสตราจารย์ ดร.ดำรงศักดิ์ ฟ้ารุ่งแสง)

คณบดีบัณฑิตวิทยาลัย

ขอรับรองว่า ผลงานวิจัยนี้มาจากการศึกษาวิจัยของนักศึกษาเอง และได้แสดงความขอบคุณบุคคลที่มีส่วนช่วยเหลือแล้ว

ลงชื่อ

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. นเรศ ช้วนยุค)

อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก

ลงชื่อ

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. อังคณา ไสเกื้อ)

อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม

ลงชื่อ

(นายวิรุฬห์ศักดิ์ ทองสุภา)

นักศึกษา

(4)

ข้าพเจ้าขอรับรองว่า ผลงานวิจัยนี้ไม่เคยเป็นส่วนหนึ่งในการอนุมัติปริญญาในระดับใดมาก่อน และ
ไม่ได้ถูกใช้ในการยื่นขออนุมัติปริญญาในขณะนี้

ลงชื่อ

(นายวิรุฬห์ศักดิ์ ทองสุภา)

นักศึกษา

ชื่อวิทยานิพนธ์ ผลของชีวภัณฑ์กรด 5-อะมิโนลิวูลินิกต่อการเจริญเติบโต และการตอบสนองของ
 ภูมิคุ้มกันในปลาสาวยปรับปรุงสายพันธุ์ (*Pangasianodon gigas* x *Pangasianodon*
hypophthalmus)

ผู้เขียน วิรุฬห์ศักดิ์ ทองสุภา

สาขาวิชา วาริชศาสตร์

ปีการศึกษา 2562

บทคัดย่อ

จากการศึกษาผลของชีวภัณฑ์กรด 5-อะมิโนลิวูลินิก (ALA) ที่ผลิตจากแบคทีเรียสังเคราะห์
 แสง *Rhodospseudomonas palustris* JP225 ต่อการเจริญเติบโตและการตอบสนองของภูมิคุ้มกันใน
 ปลาสาวยปรับปรุงสายพันธุ์ (*Pangasianodon gigas* x *P. hypophthalmus*) โดยเลี้ยงปลาที่มีน้ำหนัก
 ตั้งต้นเฉลี่ย 7.71 – 7.78 กรัม ด้วยอาหารทดลองเสริมด้วย ALA ที่ระดับความเข้มข้น 0 (ชุดควบคุม),
 2.5, 5.0, 7.5 และ 10.0 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม พบว่าในช่วง 4 สัปดาห์แรก ปลาที่เลี้ยงด้วยอาหารเสริม
 ALA ที่ระดับความเข้มข้น 2.5 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม มีน้ำหนักสุดท้าย น้ำหนักที่เพิ่มขึ้น และอัตรา
 การเจริญเติบโตจำเพาะสูงที่สุด และมีอัตราการเปลี่ยนอาหารเป็นเนื้อดีที่สุดอย่างมีนัยสำคัญทาง
 สถิติ ($p < 0.05$) เมื่อเปรียบเทียบกับปลาที่เลี้ยงด้วยอาหารสูตรอื่นๆ นอกจากนี้ยังพบว่า ALA ที่ระดับ
 ความเข้มข้น 2.5 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม สามารถเพิ่มปริมาณเม็ดเลือดแดง เม็ดเลือดขาว ฮีโมโกลบิน
 รวม ฮีมาโตคริต กิจกรรมการจับกินสิ่งแปลกปลอม ดัชนีการจับกินสิ่งแปลกปลอม และค่าเฉลี่ยเม็ด
 ปิตที่ถูกเม็ดเลือดขาวจับกินให้มีความสูงที่สุดอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) เมื่อเปรียบเทียบกับ
 ปลาที่เลี้ยงด้วยอาหารควบคุม เมื่อเลี้ยงปลาเป็นเวลานาน 8 สัปดาห์ พบว่าปลาที่ได้รับอาหารผสม
 ALA ทุกระดับความเข้มข้นมีการเจริญเติบโตไม่แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p > 0.05$)
 นอกจากนี้ยังพบว่าปลาที่ได้รับอาหารผสม ALA ที่ระดับความเข้มข้น 10 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม มี
 การตอบสนองของภูมิคุ้มกัน ได้แก่ ฮีโมโกลบินรวม ฮีมาโตคริต และโปรตีนในซีรัมลดลง แต่มี
 ค่าเฉลี่ยการลดลงของไนโตรบลูเตตราโซเลียม และดัชนีการจับกินสิ่งแปลกปลอมสูงที่สุดอย่างมี
 นัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) เมื่อเปรียบเทียบกับปลาที่เลี้ยงด้วยอาหารควบคุม การศึกษาการ
 เปลี่ยนแปลงทางพยาธิสภาพของเนื้อเยื่อ ตับ ไต ลำไส้ และกระเพาะอาหารของปลาสาวยปรับปรุง
 สายพันธุ์หลังได้รับอาหารทดลองเสริมด้วย ALA ที่ระดับความเข้มข้น 0 (ชุดควบคุม), 2.5, 5.0, 7.5
 และ 10.0 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม เป็นระยะเวลา 4 และ 8 สัปดาห์ พบว่า ALA ที่เสริมลงใน
 อาหารทดลองทุกระดับความเข้มข้นไม่ส่งผลทำให้เนื้อเยื่อ ตับ ไต ลำไส้ และกระเพาะอาหาร แสดง

ความผิดปกติในระดับเนื้อเยื่อ งานวิจัยนี้แสดงให้เห็นว่าการเสริมชีวภัณฑ์ ALA ที่ผลิตจากแบคทีเรีย *R. palustris* JP225 ที่ระดับความเข้มข้น 2.5 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม ในอาหารปลาเป็นเวลานาน 4 สัปดาห์ สามารถส่งเสริมการเจริญเติบโตและภูมิคุ้มกันในปลาทรายปรับปรุงสายพันธุ์ได้

The Title	Effects of bioproduct 5-aminolevulinic acid on growth performance and immune responses in hybrid striped catfish (<i>Pangasianodon gigas</i> x <i>Pangasianodon hypophthalmus</i>)
Author	Mr.Wiroonsak Thongsupa
Major Program	Aquatic Science
Academic Year	2019

Abstract

The present study the effects of bioproduct ALA from *R. palustris* JP225 on growth performance and immune responses in hybrid striped catfish (*Pangasianodon gigas* x *P. hypophthalmus*). Hybrid striped catfish with an initial weight of 7.71 – 7.78 g were fed with commercial diet supplemented with ALA at concentrations of 0 (control), 2.5, 5.0, 7.5 and 10.0 mg/kg. After 4 weeks of feeding, the fish received diet containing 2.5 mg/kg ALA exhibited significantly highest final weight, weight gain and specific growth rate with the best feed conversion ratio in comparison with fish fed with other diets including control ($p < 0.05$). Furthermore, fish fed with 2.5 mg/kg ALA showed significantly higher red and white blood cells, haematocrit, serum protein, total haemoglobin, phagocytosis, phagocytic index and average bead per cell than those of the control group ($p < 0.05$). After 8 weeks of feeding, no significantly difference was observed among treatments for growth performance ($p > 0.05$). Moreover, haemato-immunological study revealed significantly decreased total haemoglobin, haematocrit and serum protein but significantly increased Nitrobluetetrazolium reduction and phagocytic index observed in fish fed the diet supplemented with 10 mg/kg ALA compared to the control group ($p < 0.05$). Histopathological alteration were studied in liver, kidney, stomach and intestines collected from the fish fed diets supplemented with ALA. The result showed that ALA at concentrations of 0 (control), 2.5, 5.0, 7.5 and 10.0 mg/kg had no effect on fish tissue. These findings indicated that supplementation of bioproduct ALA from *R. palustris* JP225 at concentration of 2.5 mg/kg diet for 4 weeks enhanced growth performance and immunity of hybrid striped catfish.

กิตติกรรมประกาศ

วิทยานิพนธ์ฉบับนี้ประสบความสำเร็จได้ด้วยความอนุเคราะห์จากบุคคลที่เกี่ยวข้องผู้เขียน
จึงขอกล่าวถึงด้วยความรู้สึกขอบคุณและยกย่อง

ขอขอบพระคุณผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. นเรศ ช้วนยุค ประธานที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ และ
ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. อังคณา ไสเกื้อ อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วมที่ได้มอบโอกาสให้
ทำการศึกษาวิจัย และคอยช่วยแก้ไข ให้คำแนะนำ และเป็นกำลังใจให้ข้าพเจ้าเสมอมา ทำให้
วิทยานิพนธ์เล่มนี้สำเร็จลุล่วงได้ รวมถึงหลักในการทำงาน เพื่อนำไปต่อยอดสู่การใช้ประโยชน์ใน
การดำรงชีวิตและการทำงานในอนาคต

ขอขอบพระคุณรองศาสตราจารย์ ดร. วุฒิพร พรหมขุนทอง และ ดร.จำเริญศรี ถาวร
สุวรรณที่ให้คำแนะนำในการแก้ไขวิทยานิพนธ์ฉบับนี้ ขอขอบพระคุณคณาจารย์ ภาควิชาวาริช
ศาสตร์ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ทุกท่าน ที่ให้ความกรุณาสั่งสอนให้ความรู้แก่ข้าพเจ้า ตลอด
ระยะเวลาที่ข้าพเจ้าได้ศึกษา ณ ที่นี่ และขอขอบคุณเจ้าหน้าที่ประจำศูนย์วิจัยสุขภาพสัตว์น้ำกิจการ
ศุภมาตย์ ที่ให้คำปรึกษาเอาใจใส่ และเป็นเสมือนครอบครัวเดียวกัน

ขอขอบพระคุณบัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ที่ให้การสนับสนุนเงินทุน
วิจัย ข้าพเจ้าคงไม่สามารถดำเนินงานวิจัยชิ้นนี้ให้สำเร็จลุล่วงได้ด้วยตัวคนเดียว ขอขอบคุณพี่ๆ
และเพื่อนๆ นักศึกษาปริญญาเอกและปริญญาโททุกท่าน ทั้งที่สำเร็จการศึกษาไปแล้วและยังศึกษา
อยู่ ซึ่งคอยให้ความช่วยเหลือทั้งทางด้านกำลังใจและกำลังใจด้วยดีตลอดมา ตลอดจนให้คำปรึกษา
และแนะนำในทุกๆ ด้านทั้งเรื่องงานและเรื่องส่วนตัว ข้าพเจ้าต้องขออภัยมา ณ ที่นี้ที่ไม่สามารถ
ระบุชื่อได้ทั้งหมด แต่ข้าพเจ้าจะจดจำในสิ่งดีๆ ที่ข้าพเจ้าได้รับจากทุกท่านตลอดไป

สุดท้ายนี้ขอกราบขอบพระคุณคุณพ่อพรชนิด ทองสุภา และคุณแม่เสาวคนธ์ ทองสุภา บิดา
มารดาผู้ให้กำเนิดชีวิต การศึกษา คอยสนับสนุนและให้กำลังใจ จนลูกมีวันนี้

วิรุฬห์ศักดิ์ ทองสุภา

สารบัญ

หน้า

บทคัดย่อ.....	(5)
ABSTRACT.....	(7)
กิตติกรรมประกาศ.....	(8)
สารบัญ.....	(9)
สารบัญตาราง.....	(12)
สารบัญภาพ.....	(13)
บทที่ 1 บทนำ.....	1
บทนำต้นเรื่อง.....	1
วัตถุประสงค์.....	2
บทที่ 2	3
ตรวจเอกสาร.....	3
2.1 ปลาบึก.....	3
2.2 ปลาสาวย.....	4
2.3 ปลาสาวยปรับปรุงสายพันธุ์.....	5
2.4 รูปแบบการเลี้ยง.....	7
2.5 ระบบภูมิคุ้มกันในปลา.....	8
2.6 กรด 5 อะมีโนลิวูลินิก (ALA).....	19
2.7 ปัจจัยสำคัญในการควบคุมการผลิตกรด 5-อะมีโนลิวูลินิก.....	21
บทที่ 3	24
3.1 วัสดุอุปกรณ์.....	24
3.2 วิธีการทดลอง.....	26
3.3 การเก็บรวบรวมข้อมูล.....	28
3.4 การวิเคราะห์ข้อมูล.....	34

สารบัญ (ต่อ)

หน้า

บทที่ 4.....		35
4.1 ผลการศึกษาหาอัตราการเจริญเติบโต.....		35
4.1.1 น้ำหนักเฉลี่ยต่อตัว.....		35
4.1.2 น้ำหนักที่เพิ่มขึ้น.....		35
4.1.3 อัตราการเจริญเติบโตจำเพาะ.....		36
4.1.4 อัตราการเปลี่ยนอาหารเป็นเนื้อ.....		36
4.1.5 อัตราการรอดตาย.....		39
4.2 ผลของชีวภัณฑ์กรด 5 อะมิโนลิวูลินิกต่อองค์ประกอบเลือดของปลาสาวยปรับปรุงสายพันธุ์.....		39
4.2.1 ปริมาณเม็ดเลือดแดง.....		39
4.2.2 ปริมาณเม็ดเลือดขาว.....		40
4.2.3 ฮีมาโตคริต.....		42
4.2.4 ปริมาณฮีโมโกลบินรวม.....		43
4.2.5 กิจกรรมเอนไซม์ไลโซไซม์.....		44
4.2.6 ปริมาณโปรตีนในซีรัม.....		45
4.2.7 การลดลงของไนโตรบลูเตตราไซเลียม.....		47
4.2.8 กิจกรรมการจับกินสิ่งแปลกปลอม.....		48
4.3 ผลการศึกษาการเปลี่ยนแปลงทางพยาธิสภาพของปลาสาวยปรับปรุงสายพันธุ์ที่เลี้ยงด้วยอาหารทดลองเสริมด้วย ALA.....		52
4.4 วิจารณ์ผลการทดลอง.....		62

สารบัญ (ต่อ)

	หน้า
บทที่ 5.....	67
สรุปผลการทดลองและข้อเสนอแนะ.....	67
5.1 สรุปผลการศึกษา.....	67
5.2 ข้อเสนอแนะ.....	68
เอกสารอ้างอิง.....	69
ภาคผนวก.....	81
ประวัติผู้เขียน.....	100

สารบัญตาราง

หน้า

ตารางที่ 1. เปรียบเทียบความแตกต่างบางประการระหว่างปลาบึก ปลาสวาย และปลาสวายปรับปรุงสายพันธุ์รุ่นที่ 1	6
ตารางที่ 2 คุณค่าทางโภชนาการของปลาเกล็ดและปลาหนัง.....	7
ตารางที่ 3 แสดงการผลิต ALA โดยจุลินทรีย์กลุ่มต่างๆ.....	17
ตารางที่ 4 คุณสมบัติของเอนไซม์ glutamyl-tRNA reductaseบริสุทธิ์.....	27
ตารางที่ 5 น้ำหนักเริ่มต้น น้ำหนักสุดท้าย น้ำหนักที่เพิ่มขึ้น อัตราการเจริญเติบโตจำเพาะ และอัตราการเปลี่ยนอาหารเป็นเนื้อ ของปลาสวายปรับปรุงสายพันธุ์ที่เลี้ยงด้วยอาหารทดลองเสริม ALA ที่ระดับความเข้มข้นต่างๆ เป็นระยะเวลา 4 และ 8 สัปดาห์.....	38
ตารางที่ 6 แสดงอัตราการรอดตายของปลาสวายปรับปรุงสายพันธุ์ที่เลี้ยงด้วยอาหารทดลองทั้ง 5 สูตรเป็นระยะเวลา 4 และ 8 สัปดาห์.....	39
ตารางภาคผนวกที่ 1 ปริมาณเม็ดเลือดแดงและเม็ดเลือดขาว ฮีโมโกลบิน ฮีมาโตคริต โปรตีนในซีรัม กิจกรรมของเอนไซม์ไลโซไซม์ การลดลงของไนโตรบลูเตตริ้าโซเลียม และกิจกรรมการจับกินสิ่งแปลกปลอม ของปลาสวายปรับปรุงสายพันธุ์ที่เลี้ยงด้วยอาหารทดลองผสม ALA ที่ระดับความเข้มข้นต่างๆ เป็นระยะเวลา 4 สัปดาห์.....	98
ตารางภาคผนวกที่ 2 ปริมาณเม็ดเลือดแดงและเม็ดเลือดขาว ฮีโมโกลบิน ฮีมาโตคริต โปรตีนในซีรัม กิจกรรมของเอนไซม์ไลโซไซม์ การลดลงของไนโตรบลูเตตริ้าโซเลียม และกิจกรรมการจับกินสิ่งแปลกปลอม ของปลาสวายปรับปรุงสายพันธุ์ที่เลี้ยงด้วยอาหารทดลองเสริม ALA ที่ระดับความเข้มข้นต่างๆ เป็นระยะเวลา 8 สัปดาห์.....	99

สารบัญภาพ

หน้า

ภาพที่ 1 โครงสร้างของกรด 5 อะมิโนลิวูลินิกและการเปลี่ยนโครงสร้างไปเป็นสารประกอบ เตตระไฮโรล.....	15
ภาพที่ 2 กลไกของการเปลี่ยน glutamate I-semialdehyde เป็น ALA ผ่านทางวิถี C ₅	20
ภาพที่ 3 กระบวนการสังเคราะห์ ALA ผ่านทางวิถี C ₄ และ C ₅	20
ภาพที่ 4 แสดงปริมาณเม็คเลือดแดงของปลาสาวยปรับปรุงสายพันธุ์ที่เลี้ยงด้วยอาหารทดลอง ทั้ง 5 สูตรเป็นระยะเวลา 4 และ 8 สัปดาห์.....	41
ภาพที่ 5 แสดงปริมาณเม็คเลือดขาวของปลาสาวยปรับปรุงสายพันธุ์ที่เลี้ยงด้วยอาหารทดลอง ทั้ง 5 สูตรเป็นระยะเวลา 4 และ 8 สัปดาห์.....	41
ภาพที่ 6 แสดงปริมาณเม็คเลือดขาวของปลาสาวยปรับปรุงสายพันธุ์ที่เลี้ยงด้วยอาหารทดลอง ทั้ง 5 สูตรเป็นระยะเวลา 4 และ 8 สัปดาห์.....	43
ภาพที่ 7 แสดงปริมาณฮีโมโกลบินรวมของปลาสาวยปรับปรุงสายพันธุ์ที่เลี้ยงด้วยอาหารทดลอง ทั้ง 5 สูตรเป็นระยะเวลา 4 และ 8 สัปดาห์.....	44
ภาพที่ 8 แสดงกิจกรรมของเอนไซม์ไลโซไซม์ ของปลาสาวยปรับปรุงสายพันธุ์ที่เลี้ยงด้วย อาหารทดลองทั้ง 5 สูตรเป็นระยะเวลา 4 และ 8 สัปดาห์.....	45
ภาพที่ 9 แสดงปริมาณ โปรตีนในซีรัมของปลาสาวยปรับปรุงสายพันธุ์ที่เลี้ยงด้วยอาหารทดลอง ทั้ง 5 สูตรเป็นระยะเวลา 4 และ 8 สัปดาห์.....	46
ภาพที่ 10 แสดงการลดลงของไนโตรบลูเตตต้าโซเลียมของปลาสาวยปรับปรุงสายพันธุ์ที่เลี้ยง ด้วยอาหารทดลองทั้ง 5 สูตรเป็นระยะเวลา 4 และ 8 สัปดาห์.....	48
ภาพที่ 11 แสดงกิจกรรมการจับกินสิ่งแปลกปลอมของปลาสาวยปรับปรุงสายพันธุ์ที่เลี้ยงด้วย อาหารทดลองทั้ง 5 สูตรเป็นระยะเวลา 4 และ 8 สัปดาห์	49
ภาพที่ 12 แสดงค่าดัชนีการจับกินสิ่งแปลกปลอมของปลาสาวยปรับปรุงสายพันธุ์ที่เลี้ยงด้วย อาหารทดลองทั้ง 5 สูตรเป็นระยะเวลา 4 และ 8 สัปดาห์.....	50

สารบัญภาพ (ต่อ)

หน้า

ภาพที่ 13 แสดงค่าเฉลี่ยเมล็ดพืชที่ถูกเมล็ดเลื้อยคาวจับกินของปลาทรายปรับปรุงสายพันธุ์ที่เลี้ยงด้วยอาหารทดลองทั้ง 5 สูตรเป็นระยะเวลา 4 และ 8 สัปดาห์.....	51
ภาพที่ 14 เนื้อเยื่อตับปลาทรายปรับปรุงสายพันธุ์ที่เลี้ยงด้วยอาหารชุดควบคุม (14A) เสริม ALA 2.5 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม (14B) 5.0 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม (14C) 7.5 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม (14D) และ 10 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม (14E) เป็นเวลา 4 สัปดาห์.....	53
ภาพที่ 15 เนื้อเยื่อไตปลาทรายปรับปรุงสายพันธุ์ที่เลี้ยงด้วยอาหารชุดควบคุม (15A) เสริม ALA 2.5 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม (15B) 5.0 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม (15C) 7.5 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม (15D) และ 10 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม (15E) เป็นเวลา 4 สัปดาห์.....	54
ภาพที่ 16 เนื้อเยื่อกระเพาะอาหารปลาทรายปรับปรุงสายพันธุ์ที่เลี้ยงด้วยอาหารชุดควบคุม (16A) เสริม ALA 2.5 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม (16B) 5.0 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม (16C) 7.5 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม (16D) และ 10 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม (16E) เป็นเวลา 4 สัปดาห์.....	55
ภาพที่ 17 เนื้อเยื่อลำไส้ปลาทรายปรับปรุงสายพันธุ์ที่เลี้ยงด้วยอาหารชุดควบคุม (17A) เสริม ALA 2.5 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม (17B) 5.0 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม (17C) 7.5 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม (17D) และ 10 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม (17E) เป็นเวลา 4 สัปดาห์.....	56
ภาพที่ 18 เนื้อเยื่อตับปลาทรายปรับปรุงสายพันธุ์ที่เลี้ยงด้วยอาหารชุดควบคุม (18A) เสริม ALA 2.5 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม (18B) 5.0 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม (18C) 7.5 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม (18D) และ 10 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม (18E) เป็นเวลา 8 สัปดาห์.....	58
ภาพที่ 19 เนื้อเยื่อไตปลาทรายปรับปรุงสายพันธุ์ที่เลี้ยงด้วยอาหารชุดควบคุม (19A) เสริม ALA 2.5 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม (19B) 5.0 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม (19C) 7.5 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม (19D) และ 10 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม (19E) เป็นเวลา 8 สัปดาห์.....	59
ภาพที่ 20 เนื้อเยื่อกระเพาะอาหารปลาทรายปรับปรุงสายพันธุ์ที่เลี้ยงด้วยอาหารชุดควบคุม (20A) เสริม ALA 2.5 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม (20B) 5.0 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม (20C) 7.5 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม (20D) และ 10 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม (20E) เป็นเวลา 8 สัปดาห์.....	60

สารบัญภาพ (ต่อ)

หน้า

ภาพที่ 21 เนื้อเยื่อลำไส้ปลาทรายปรับปรุงสายพันธุ์ที่เลี้ยงด้วยอาหารชุดควบคุม (21A) เสริม ALA 2.5 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม (21B) 5.0 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม (21C) 7.5 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม (21D) และ 10 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม (21E) เป็นเวลา 8 สัปดาห์.....61

บทที่ 1

บทนำคั้นเรื่อง

บทนำ

ประเทศไทยเป็นประเทศเกษตรกรรมซึ่งประชากรมากกว่าร้อยละ 70 ประกอบอาชีพเกษตรกรรมเพื่อการเลี้ยงคนส่วนใหญ่ในประเทศ รวมทั้งเป็นสินค้าส่งออกไปจำหน่ายยังต่างประเทศโดยการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำทำรายได้ให้กับประเทศไทยปีละหลายล้านบาทเนื่องจากประเทศไทยมีสภาพภูมิประเทศ ภูมิอากาศและสาหร่ายรูปโกลที่มีควมอุดมสมบูรณ์และมีความพร้อมต่อการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำ แต่ปัจจุบันการเลี้ยงสัตว์น้ำแบบหนาแน่นมีโอกาสทำให้ปลาป่วยเป็นโรคได้ง่าย สร้างความเสียหายต่อผลผลิตและเพิ่มต้นทุนการเลี้ยง แม้ว่าจะมีการใช้ยาปฏิชีวนะและสารเคมีเพื่อป้องกันและรักษาโรคที่เกิดขึ้นก็ตาม แต่การเลือกใช้ยาและสารเคมีในชนิดและปริมาณที่ไม่เหมาะสมมีโอกาสทำให้เกิดปัญหาการดื้อยาทั้งในปลาและผู้บริโภคได้ (Anderson, 1992) นอกจากนี้ปัญหาสารตกค้างในผลิตภัณฑ์สัตว์น้ำและสิ่งแวดล้อมยังสร้างปัญหาสำคัญที่มีผลกระทบต่อเศรษฐกิจของชาติ การใช้สารกระตุ้นภูมิคุ้มกัน (Immunostimulant) ที่ผลิตจากสารชีวภาพและไม่เป็นอันตรายต่อมนุษย์ และสิ่งแวดล้อม เพื่อเพิ่มความต้านทานโรคจึงเป็นอีกทางเลือกหนึ่งในการจัดการด้านปัญหาสุขภาพสัตว์น้ำ ปัจจุบันปลาหนังเนื้อขาวเป็นที่นิยมของผู้บริโภคเนื่องจากเป็นอาหารสุขภาพมีคุณค่าทางโภชนาการที่มีความสำคัญต่อการเจริญเติบโตและการพัฒนาของสมองโดยพบว่ากลุ่มปลาหนังให้ปริมาณไขมันที่ดีโดยเฉพาะอย่างยิ่งไขมันในกลุ่มโอเมก้า 3 ในตลาดต่างประเทศมีความต้องการบริโภคปลาหนังเนื้อขาว เช่น ปลาซิวและปลาลูกผสมระหว่างพ่อปลาบิกกับแม่ปลาซิว (เกรียงศักดิ์, 2554) ดังนั้นหากมีการส่งเสริมการเพาะเลี้ยงปลาหนังลูกผสมให้กับกลุ่มเกษตรกรจึงน่าจะเป็นทางเลือกที่ดีให้กับอาชีพที่มั่นคงเนื่องจากเป็นปลาที่มีคุณภาพเนื้อดีเป็นที่ต้องการของตลาด โตเร็ว เลี้ยงง่าย ทนโรค ได้ผลผลิตดี และยังส่งผลทางอ้อมในการช่วยลดการนำเข้าปลาหนังจากต่างประเทศอีกด้วย (เกรียงศักดิ์และคณะ, 2555)

กรด 5-อะมิโนลิวูลินิก (5-aminolevulinic acid; ALA) เป็นสารชีวภาพที่ไม่เป็นอันตรายต่อมนุษย์และสัตว์ สารชีวภาพชนิดนี้พบได้ในแบคทีเรียสังเคราะห์แสง เช่น *Rhodospseudomonas palustris*

(Saikour *et al.*, 2009) และ *Rhodobacter sphaeroides* (Liu *et al.*, 2016) สาหร่าย เช่น *Scenedesmus obliquus* (Klein *et al.*, 1980) และ *Chlorella* sp. (Sasaki *et al.*, 1995) และแบคทีเรีย เช่น *Propionibacterium acidipropionici* (Kiatpapan *et al.*, 2011) และ *Escherichia coli* (Zhang *et al.*, 2015) เป็นต้น สารชนิดนี้สามารถกระตุ้นการเจริญเติบโตของพืชหลายชนิด (Tanaka *et al.*, 1992) นอกจากนี้ยังมีรายงานการใช้ ALA กระตุ้นภูมิคุ้มกันของสัตว์ เช่น สุกร โดยพบว่า ALA สามารถเพิ่มปริมาณฮีโมโกลบิน ธาตุเหล็ก เม็ดเลือดแดง เม็ดเลือดขาว และฮีมาโตคริตของสุกรให้สูงขึ้น (Chen *et al.*, 2008; Wang *et al.*, 2011a) อย่างไรก็ตามการศึกษาผลของ ALA ต่อการเจริญเติบโตและภูมิคุ้มกันในสัตว์น้ำยังมีไม่มากนัก มีเพียงการศึกษาในกุ้งกุลาดำ (*Penaeus monodon*) โดยอมรรัตน์ (2549) พบว่า ALA สามารถกระตุ้นระบบภูมิคุ้มกันของกุ้งกุลาดำ ได้แก่ การเพิ่มจำนวนของเม็ดเลือดรวม กิจกรรมของเอนไซม์ฟีนอลออกซิเดส และอัตราการรอดตายจากการติดเชื้อไวรัสตัวแดงดวงขาวได้ และยังไม่มีการศึกษาผลของ ALA ในปลา ดังนั้นการวิจัยครั้งนี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาผลของชีวภัณฑ์ ALA ที่ผลิตจากแบคทีเรียสังเคราะห์แสงต่อการเจริญเติบโตและการกระตุ้นภูมิคุ้มกันในปลาสวายปรับปรุงสายพันธุ์ ข้อมูลที่ได้จากการศึกษาครั้งนี้จะเป็นประโยชน์ต่อการเพิ่มผลผลิตเชิงพาณิชย์และเพิ่มศักยภาพในการแข่งขันในระดับนานาชาติต่อไป

วัตถุประสงค์

1.1 เพื่อศึกษาระดับความเข้มข้นของกรด 5-อะมิโนลิวูลินิก ที่เหมาะสมต่อการเจริญเติบโตและการเปลี่ยนแปลงทางพยาธิสภาพของปลาสวายปรับปรุงสายพันธุ์

1.2 เพื่อศึกษาระดับความเข้มข้นของกรด 5-อะมิโนลิวูลินิก ที่เหมาะสมต่อการกระตุ้นภูมิคุ้มกันของปลาสวายปรับปรุงสายพันธุ์

บทที่ 2

ตรวจเอกสาร

2.1 ปลาบึก

ปลาบึกชื่อสามัญ Makong giant catfish ชื่อวิทยาศาสตร์ *Pangasianodon gigas* เป็นปลาน้ำจืดไม่มีเกล็ดที่มีขนาดใหญ่ที่สุดในโลก (เสนห์และภาณุ, 2540) ปลาขนาดเล็กมีสีคล้ำ เหลือบเหลืองข้างลำตัวมีแถบสีคล้ำตามยาว 1-2 แถบ ส่วนปลาขนาดใหญ่ด้านหลังของลำตัวมีสีเทาอมน้ำตาลแดง ด้านข้างมีสีเทาปนน้ำเงิน ด้านท้องมีสีขาว (เสนห์, 2527) มีหัวขนาดใหญ่ความยาว 37.1 เปอร์เซ็นต์ของความยาวมาตรฐาน ปากอยู่สุดของจะงอยปาก ปากกว้างกว่า 12 เปอร์เซ็นต์ของความยาวมาตรฐาน ตาตั้งอยู่ต่ำกว่ามุมปาก ไม่มีฟันบนขากรรไกร และเพดานปาก ริมฝีปากล่างปิดเลยริมฝีปากบนออกมา จมูกมี 2 คู่ ตั้งอยู่บริเวณริมฝีปากบนก่อนไปทางด้านข้างของส่วนหัว จมูกคู่หน้าอยู่ชิดกันมากกว่าคู่หลัง เหงือกจะลดรูปหายไป ปลาขนาดใหญ่ที่มีความยาวมาตรฐานมากกว่า 30 เซนติเมตร ปลายครีบแข็ง ปลาขนาดใหญ่ จะมีปลายครีบมนและมีหนังหุ้ม (ชวลิต และ สมศักดิ์, 2536) หนวดที่ขากรรไกรบน (maxillary barbel) เป็นเส้นแบนขนาดเล็กและสั้นมาก มีความยาวไม่เกินครึ่งหนึ่งของเส้นผ่านศูนย์กลางตา ส่วนหนวดที่ขากรรไกรล่าง (mandibular barbel) มีสีขาวและสั้นกว่าหนวดบริเวณขากรรไกรบน ลำตัวเรียวยาวไม่เกิน 80 เปอร์เซ็นต์ของความยาวมาตรฐาน ครีบท้องตั้งอยู่ในแนวท้ายของครีบหลัง สีลำตัวทางด้านหลังมีสีเทาปนน้ำตาลอ่อนหรือชมพู ด้านข้างมีสีเทาปนเงิน ด้านท้องขาว ครีบหลัง ครีบอก ครีบไขมันมีสีเทาปนดำ (วันเพ็ญ, 2527)

ถิ่นอาศัย : ปลาบึกตามธรรมชาติจะพบเฉพาะแม่น้ำโขง และแม่น้ำสาขา เช่น แม่น้ำสงคราม แม่น้ำจิม โดยพบแพร่กระจายตั้งแต่ประเทศสาธารณรัฐประชาชนจีน จนถึงสาธารณรัฐสังคมนิยมเวียดนาม โดยที่ผ่านมามีการจับปลาบึกได้ในแม่น้ำโขง จังหวัดเชียงราย ซึ่งพบว่าปลาบึกที่จับได้มีจำนวนลดลงจากที่จับได้สูงสุด 65 ตัวในปี พ.ศ. 2540 ลดลงเหลือ 5 ตัวในปี พ.ศ. 2542 (Pholprasith and Tavarutmaneegul, 1998) ต่อมาในปี พ.ศ. 2546-2551 มีการจับได้เพียง 1 ถึง 2 ตัวหรือจับไม่ได้เลย (Meng-umphan and Saengkrachang, 2008) จึงทำให้

ปลาบึกมีชื่ออยู่ใน Conversation on International Trade in Endangered of Species of Wide Flora and Fauna (CITES) จัดเป็นสัตว์ที่อยู่ในสถานะที่เสี่ยงต่อการสูญพันธุ์สูง (Hogan, 2011)

อาหาร : ปลาบึกวัยอ่อนมีฟันและกินเนื้อเป็นอาหารแต่เมื่อโตขึ้นฟันจะหายไปและเปลี่ยนพฤติกรรมการกินเนื้อมาเป็นกินพืช

การเพาะพันธุ์ : ปลาบึกเพศผู้และเพศเมียที่เลี้ยงในบ่อดินสามารถนำมาผสมเทียมได้ด้วยฮอร์โมนแต่ต้องมีอายุมากกว่า 10 ปี และควรมีน้ำหนักไม่น้อยกว่า 15 กิโลกรัม ต้องอยู่ในช่วงฤดูวางไข่ตั้งแต่เดือนมิถุนายนถึงสิงหาคมของทุกปีจะเป็นช่วงเวลาที่เหมาะสมในการเพาะพันธุ์

ประโยชน์ : เนื้อปลาบึกมีคุณค่าทางโภชนาการสูงโดยประกอบไปด้วย โปรตีน คาร์โบไฮเดรต วิตามิน และกรดไขมันหลายชนิดที่เป็นประโยชน์ต่อร่างกาย ได้แก่ กรดไขมันชนิดโอเมก้า 3 เช่น docosahexaennoic (DHA) และ omega-6 (เกรียงศักดิ์และคณะ, 2553)

2.2 ปลาสาวย

ปลาสาวยชื่อสามัญ Pangasius catfish ชื่อวิทยาศาสตร์ *Pangasianodon hypophthalmus* ปลาสาวยจัดเป็นปลาน้ำจืด ไม่มีเกล็ด ที่มีความสำคัญทางเศรษฐกิจชนิดหนึ่ง มีรูปร่างเรียวยาว หัวค่อนข้างกว้าง แต่ไม่แบนมาก ปากอยู่ต่ำ มีลักษณะกว้างและทู่ มีตาขนาดเล็กอยู่บนเส้นขอบปาก มีหนวด 2 คู่ คือ บริเวณขากรรไกรบน 1 คู่ และขากรรไกรล่าง 1 คู่ ซึ่งหนวดบริเวณขากรรไกรบนมีความยาวมากกว่าขากรรไกรล่าง เส้นข้างลำตัวมีลักษณะเป็นเส้นสมบูรณ์ สดส่วนของลำตัวที่สำคัญคือความยาวสุดของลำตัวประมาณ 4 เท่าครึ่งของความยาวส่วนหัว ส่วนความยาวมาตรฐานของลำตัวยาวประมาณ 4 เท่าครึ่งของความกว้างลำตัว ครีบหลังมีก้านแข็ง 1 ก้าน มีก้านแขนง 6 ก้าน ครีบไขมันมีขนาดเล็กอยู่บริเวณครีบหลังและครีบหางครีบกันมีก้านแข็ง 4 ก้าน และก้านแขนง 30-32 ก้าน ครีบหูมีก้านแข็ง 1 ก้าน และก้านแขนง 6 ก้าน ลักษณะภายในที่สำคัญคือ มีซี่เหงือก 20 ซี่ ฟันมีลักษณะเป็นฟันเลื่อยเล็กๆ เรียงเป็นแถวบนขากรรไกรบนทั้ง 2 คู่มีฟันบนเพดานเรียงเป็นสองแถวครีบหางเว้าแคบมีลักษณะบาง ลำตัว เรียวยาวกว่าปลาบึก (เกรียงศักดิ์และคณะ, 2555)

ถิ่นอาศัย: ปลาสวายมีแหล่งกำเนิดในประเทศอินเดียและพม่า ต่อมาได้เข้ามาแพร่ขยายในประเทศอินโดนีเซียและประเทศไทย สำหรับในประเทศไทยแหล่งที่พบปลาสวายชุกชุมมากที่สุดอยู่ในบริเวณลุ่มแม่น้ำเจ้าพระยาตั้งแต่จังหวัดพระนครศรีอยุธยาตลอดจนถึงจังหวัดนครสวรรค์ พบว่าปลาสวายชอบอาศัยอยู่บริเวณที่เป็นอ่าวมักว่ายรวมตัวกันเป็นฝูง อยู่ในน้ำลึก ซึ่งมีกระแสน้ำถ่ายเทได้ดี ชอบพักรวมกลุ่มอยู่บริเวณที่ร่มใกล้พรรณไม้น้ำและผักตบชวา

อาหาร: ปลาสวายวัยอ่อนกินแพลงก์ตอนสัตว์ ปลาตัวอ่อนและโตเต็มวัยกินได้ทั้งพืชและสัตว์ (เวียง, 2543)

การเพาะพันธุ์: พ่อแม่พันธุ์ปลาสวายที่นำมาเพาะควรมีอายุระหว่าง 2-5 ปี มีน้ำหนักประมาณ 4 ถึง 8 กิโลกรัม ปลาสวายวัยอ่อนจะสังเกตความแตกต่างระหว่างปลาสวายเพศผู้และปลาสวายเพศเมียได้ยาก แต่จะสังเกตความแตกต่างได้อย่างชัดเจนในช่วงฤดูผสมพันธุ์และวางไข่ โดยปลาเพศเมียมีลักษณะภายนอกที่เด่นชัด คือ ส่วนท้องจะเป่งกลมมน เมื่อสัมผัสจะนิ่มมาก ลักษณะช่องเพศเป็นรูปรังรีกว้างและใหญ่กว่าปลาเพศผู้ ช่องเพศเป่งและมีแดงเข้มแสดงว่ามีไข่สุกเต็มที่พร้อมที่จะวางไข่ ลำตัวมีสี ขาวเงิน ส่วนปลาเพศผู้ที่ท้องจะเรียบและไม่มนเหมือนปลาเพศเมีย ฟันท้องแข็งแรงกว่า ช่องเพศมีลักษณะเป็นรูปเช่นเดียวกันแต่จะแคบและเล็กกว่า มีสีแดงอ่อนและมีส่วนอวัยวะเพศยื่นยาวออกมา ปลาตัวผู้ที่มีน้ำเชื้อสมบูรณ์และแก่เต็มที่เมื่อใช้มือบีบบริเวณช่องเพศเบาๆ จะเห็นน้ำเชื้อสีขาวออกมาเห็นได้ชัดเจน (เกรียงศักดิ์และคณะ, 2555)

ประโยชน์: จากข้อมูลทางสถิติของผลผลิตปลาสวายคิดเป็น 15 เปอร์เซ็นต์ ของปลาน้ำจืดทั้งหมดในประเทศไทย ปลาสวายเป็นปลาที่มีความสำคัญต่ออุตสาหกรรมแปรรูปผลิตภัณฑ์เนื้อปลา โดยแปรรูปอยู่ในรูปแบบเนื้อแช่แข็ง ซึ่งเป็นผลิตภัณฑ์ที่มีมูลค่าเป็นสินค้าส่งออกที่มีความต้องการของประเทศแถบยุโรปและสหรัฐอเมริกา (FAO, 2012)

2.3 ปลาสวายปรับปรุงสายพันธุ์ (ปลาบึกหวาย)

ปลาหนังลูกผสมบึกสวายเป็นปลาที่ได้รับการผสมจากพ่อพันธุ์ปลาบึก กับแม่พันธุ์ปลาสวาย หรือที่เรียกว่าปลาบึกหวาย เป็นปลาหนังลูกผสมที่มีลักษณะหลังสีขาว ท้องมีสีเหลืองและแถบสีขาวน้ำเงินข้างลำตัว รูปร่างเรียวยาว หัวค่อนข้างกลม เส้นผ่านศูนย์กลางลูกตาอยู่สูงกว่ามุมปาก มีหนวด มีฟันล่างเล็กน้อย ฟันบนไม่มี หางมีลักษณะแฉกแคบยาว มีการเจริญพันธุ์และการ

เจริญเติบโตดี เนื้อมีสีขาวเหลือง (เมธีศ, 2557) ความแตกต่างบางประการระหว่าง ปลาบึก ปลา
 สวายและปลาสวายปรับปรุงสายพันธุ์แสดงในตารางที่ 1

ตารางที่ 1. เปรียบเทียบความแตกต่างบางประการระหว่างปลาบึก ปลาสวาย และปลาสวาย
 ปรับปรุงสายพันธุ์รุ่นที่ 1

สายพันธุ์	%เนื้อ	สีเนื้อ	จำนวนไข่	ปริมาณน้ำเชื้อ	อัตราการรอดตาย
			(egg/g)	(mg/kg)	(%)
ปลาบึก (<i>P. gigas</i>)	35	แดง-เหลือง	1,028	3.10	6.30
ปลาสวาย (<i>P. hypopthalmas</i>)	30	เหลือง	1,594	7.20	7.40
ปลาลูกผสมรุ่นที่ 1 (<i>P. gigas</i> × <i>P. hypopthalmas</i>)	40	ขาว-เหลือง	1,541	9.16	29.00

ที่มา : ดัดแปลงจาก Mengumphan และคณะ (2011)

ปลาหนังเนื้อขาวกำลังเป็นที่นิยมของผู้บริโภคเนื่องจากเป็นอาหารสุขภาพมีคุณค่าทางโภชนาการ ที่มีความสำคัญต่อการเจริญเติบโตและการพัฒนาของสมอง โดยพบว่ากลุ่มปลาหนังให้ปริมาณไขมันที่มากกว่าปลาเกล็ด (ตารางที่ 2) ในปี พ.ศ. 2553 ประเทศไทยมีอัตราการบริโภคปลาน้ำจืดเพิ่มขึ้นเป็น 14 กิโลกรัมต่อคนต่อปี ทำให้อัตราการเพาะเลี้ยงปลาน้ำจืดเพิ่มขึ้นประมาณ 10 เปอร์เซ็นต์ต่อปี (กรมประมง, 2554) ในตลาดต่างประเทศมีความต้องการบริโภคปลาหนังเนื้อขาว เช่น ปลาสวายเนื้อขาว ปลาลูกผสมระหว่างพ่อปลาบึกกับแม่ปลาสวาย และปลาลูกผสมระหว่างพ่อปลาเผา กับแม่ปลาสวาย เป็นต้น ประมาณ 1-2 ล้านตันต่อปี จากสถิติการนำเข้าและส่งออก ปี 2553 ประเทศไทยมีการส่งออกปลาแล่นเนื้อแช่แข็ง คิดเป็นมูลค่า 4,700 ล้านบาท และมีการนำเข้าปลาหนังกลุ่มปลาสวาย ในชื่อการค้าปลาดอลลี (dolly) จากประเทศเวียดนามประมาณ 12,000 ตันต่อปี (FAO, 2012) ดังนั้นหากมีการส่งเสริมการเพาะเลี้ยงปลาหนังลูกผสมให้กับกลุ่ม

เกษตรกรรายเล็ก ที่มีอาชีพเลี้ยงปลาอยู่แล้ว จึงน่าจะเป็นทางเลือกที่ดีให้กับอาชีพที่มั่นคง เนื่องจากเป็นปลาที่มีคุณภาพเนื้อเป็นที่ต้องการของตลาด สายพันธุ์โตเร็ว เลี้ยงง่าย และได้ผลผลิตดี และยังสามารถส่งผลทางอ้อม ในการช่วยลดการนำเข้าปลาหนังจากต่างประเทศอีกด้วย (เกรียงศักดิ์และคณะ, 2555)

ตารางที่ 2 คุณค่าทางโภชนาการของปลาเกล็ดและปลาหนัง

ชนิดปลา	โปรตีน (%)	ไขมัน (%)	เถ้า (%)	ความชื้น (%)
ปลาเกล็ด	18.7-19.4	0.5-0.15	1.0-1.2	78.0-78.9
ปลาหนัง	14.0-18.9	5.5-5.9	1.1-1.2	77.5-80.1

ที่มา : นิวุฒิ (2551)

2.4 รูปแบบการเลี้ยงและการเจริญเติบโตของปลาสายปรับปรุงสายพันธุ์

รูปแบบการเลี้ยงปลาสายปรับปรุงสายพันธุ์มีลักษณะเช่นเดียวกับปลาสาย โดย การเลี้ยงปลาสายในเชิงพาณิชย์มีทั้งระบบการเลี้ยงแบบหนาแน่นสูงมาก (super intensive) ไปจนถึงการเลี้ยงแบบดั้งเดิม (extensive) ทั้งในบ่อและในกระชัง (FAO, 2012) โดยนำลูกพันธุ์ปลา สายที่มีขนาดประมาณ 1.5 ถึง 18 เซนติเมตร มาเพาะเลี้ยงที่ความหนาแน่น 5 ถึง 31 ตัวต่อลูกบาศก์ เมตร ฆ่าเชื้อโดยใช้เกลือหรือยาปฏิชีวนะ (antibiotics) ก่อนปล่อยลงบ่อ (Phan *et al.*, 2009) ใช้เวลา เลี้ยง 3-4 เดือนจึงจะได้ขนาดที่บริโภค และมีขนาด 3 กิโลกรัมจากการเลี้ยงในบ่อดินระยะเวลา 2 ปี (Ahmed *et al.*, 2013)

ดวงพรและคณะ (2557) ศึกษาการเจริญเติบโตของปลาหนังลูกผสมโดยการเสริม สหาร่ายไคในอาหารเม็ดที่ระดับ 0, 2.5, 5 และ 10 เปอร์เซ็นต์ เลี้ยงในกระชังเป็นระยะเวลา 7 เดือน พบว่าปลาหนังลูกผสมในชุดการทดลองที่เลี้ยงด้วยอาหารเสริมสหาร่ายไคระดับ 5 และ 10 เปอร์เซ็นต์ มีน้ำหนักตัวเพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$) โดยการเจริญเติบโตของปลา หนังลูกผสมที่เสริมสหาร่ายไคในอาหารทั้ง 2 ระดับนี้ไม่มีความแตกต่างกัน ส่วนการเพิ่มขึ้นของ น้ำหนักและการเจริญเติบโตต่อวันมีค่าสูงสุดในเดือนที่ 7 ในชุดการทดลองที่เสริมสหาร่ายไคใน อาหารที่ระดับ 10 เปอร์เซ็นต์ และยังมีค่าการเปลี่ยนอาหารเป็นเนื้อน้อยที่สุดอีกด้วย ส่วนการ

ประเมินผลต่อภาวะเครียดพบว่า ปลาหนังลูกผสมที่ได้รับอาหารเสริมสาหร่ายไโคระดับ 5 และ 10 เปอร์เซ็นต์ สามารถลดการเกิดลิพิดเปอร์ออกซิเดชันในเลือดอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติในเดือนที่ 5 และเดือนที่ 7 ซึ่งสอดคล้องกับการเพิ่มขึ้นของน้ำหนักและอัตราการเจริญเติบโตต่อวัน และยังพบว่าการเสริมด้วยสาหร่ายไโค ไม่มีผลต่อระดับกลูตาไธโอนในเลือด

2.5 ระบบภูมิคุ้มกันในปลา

ระบบภูมิคุ้มกัน (Immunological system) มีวิวัฒนาการตั้งแต่สัตว์ชั้นต่ำจนถึงสัตว์ชั้นสูง โดยระบบภูมิคุ้มกันในสัตว์ชั้นต่ำมีเพียงขบวนการจับกิน (phagocytosis) และการอักเสบ (inflammation) เมื่อมีการวิวัฒนาการเพิ่มมากขึ้นจนเป็นสัตว์ชั้นสูง จะมีการพัฒนาระบบภูมิคุ้มกันเพิ่มขึ้น คือมีระบบ ภูมิคุ้มกันแบบจำเพาะ (specific immunity) และระบบคอมพลีเมนต์ (complement) สำหรับในปลาแฮกฟิช (hagfish) ซึ่งเป็นปลาที่มีกระดูกสันหลังชั้นต่ำสุดจะมีเพียงระบบน้ำเหลือง ส่วนในปลาแลมเพร (lamprey, *Petromyzon marinus*) ซึ่งเป็นปลาที่มีกระดูกสันหลังชั้นสูงขึ้นมา มีต่อมธัยมัส โดยมีการสร้างลิมโฟไซต์ (lymphocytes) กราโนลโลไซต์ (granulocytes) และแมคโครฟาจ ซึ่งเป็นระบบภูมิคุ้มกัน ทางด้านเซลล์ (cell – mediated immunity: CM1) (สุทธิพันธ์ และคณะ, 2543)

ระบบภูมิคุ้มกัน เป็นกลไกของร่างกายในการป้องกันตัวจากเชื้อโรคซึ่งสามารถแบ่งออกเป็น 2 ระบบ คือระบบภูมิคุ้มกันแบบไม่จำเพาะ (non-specific immunity) และระบบภูมิคุ้มกันแบบจำเพาะ (specific immunity) แต่ละระบบจะประกอบด้วยการทำงานร่วมกันของภูมิคุ้มกันแบบเซลล์และภูมิคุ้มกันแบบสารน้ำในการกำจัดสิ่งแปลกปลอม

2.5.1 ระบบภูมิคุ้มกันแบบไม่จำเพาะ (non-specific immunity)

เป็นระบบภูมิคุ้มกันที่สามารถต่อต้านสิ่งแปลกปลอมแบบไม่จำเพาะเจาะจง ส่วนใหญ่มีมาแต่กำเนิด มีกลไกการทำงานโดยช่วยไม่ให้เชื้อลุกลามหรือเพิ่มจำนวนออกไป ก่อนที่ร่างกายจะสร้างภูมิคุ้มกันแบบจำเพาะขึ้นมา ในปลาการทำงานของระบบภูมิคุ้มกันแบบไม่จำเพาะมีความสำคัญมากในการป้องกันการเกิดโรค (กิจการและคณะ, 2539) สามารถแบ่งระบบภูมิคุ้มกันแบบไม่จำเพาะได้ดังนี้

1) กลไกส่วนพื้นผิวของร่างกาย (surface barriers) เป็นส่วนแรกของร่างกายที่ทำหน้าที่ต่อต้านสิ่งแปลกปลอมต่างๆที่จะเข้าสู่ร่างกาย ได้แก่ เยื่อเคล็ด ผิวหนัง เหงือก และระบบทางเดินอาหาร

ก. เยื่อเมือก (mucus)

ทำหน้าที่ในการดักจับจุลชีพไม่ให้เคลื่อนที่เข้าสู่เซลล์ การผลิตเมือกของปลาจะเพิ่มขึ้นเมื่อมีการติดเชื้อโรคที่เกิดจากแบคทีเรีย ไวรัส และปรสิต โดยมีการเปลี่ยนแปลงทางกายภาพ พบเยื่อเมือกปกคลุมบริเวณเยื่อหู ผิวหนัง เหงือก และทางเดินอาหาร

ข. ผิวหนัง (skin)

ผิวหนังของปลาทำหน้าที่ควบคุมสมดุลของของเหลวภายในและภายนอกของปลา เมื่อมีจุลชีพเข้ามาบริเวณจะมีการตอบสนองโดยการสร้างผิวหนังชั้นนอก ให้มีลักษณะหนาหรือเกิดภาวะเนื้อเยื่อมีจำนวนของเซลล์ mulpiglian เพิ่มขึ้นมากผิดปกติ (hyperplasia) เพื่อป้องกันผิวหนังจากการรบกวนให้เกิดขึ้น

ค. เหงือก (gill)

เหงือกประกอบด้วยพื้นที่ผิวขนาดใหญ่ มีเยื่อเมือกที่อ่อนบางเป็นทางผ่านเข้าออกของจุลชีพ โดยเหงือกจะมีเยื่อเมือกและเกิดภาวะที่เนื้อเยื่อมีจำนวนเซลล์เพิ่มขึ้นมากผิดปกติ เพื่อตอบสนองต่อการรบกวนเช่นเดียวกับผิวหนัง นอกจากนี้เหงือกยังมีเซลล์ฟาโกไซท์ (phagocytes) ในบริเวณ branchial capillaries เพื่อกำจัดสิ่งแปลกปลอมหรือจุลชีพเมื่อมีการติดเชื้อก่อโรค

ง. ทางเดินอาหาร (gastrointestinal Tract)

บริเวณทางเดินอาหารจะมีเยื่อเมือกและ pH ต่ำเนื่องจากมีการหลั่งน้ำย่อยและน้ำดีออกมา ทำให้จุลชีพที่เป็นเชื้อก่อโรคไม่สามารถเจริญเติบโตได้

2) กลไกด้านสารน้ำ (humeral mechanism) เป็นระบบภูมิคุ้มกันสารน้ำ ซึ่งเป็นของเหลวในร่างกายรวมถึงสารคัดหลั่งต่างๆ ซึ่งส่วนใหญ่เป็นสารประเภทโปรตีนทำหน้าที่ป้องกันร่างกาย สารน้ำแต่ละประเภทมีหน้าที่ยับยั้งการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์ และย่อยสลายเซลล์เชื้อโรคโดยการใช้น้ำที่ทำหน้าที่แตกต่างกันดังนี้

ก. สารยับยั้งการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์ (inhibitors substance) เป็นสารที่ทำให้จุลินทรีย์ไม่ได้รับสารอาหารที่จำเป็นต่อร่างกาย รวมทั้งรบกวนกระบวนการเมตาบอลิซึมของจุลินทรีย์ สามารถแบ่งสารยับยั้งการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์ออกเป็น

ทรานเฟอร์ริน (transferrin) เป็นโปรตีนที่มีความสามารถในการจับกับเหล็ก (iron) ซึ่งเหล็กเป็นธาตุที่จำเป็นในการเจริญเติบโตของสิ่งมีชีวิตทุกชนิดรวมถึงจุลชีพ ดังนั้นเมื่อทรานเฟอร์รินขาดจะทำให้จุลชีพได้รับธาตุเหล็ก จุลชีพก็จะไม่เจริญเติบโตได้และตายในที่สุด

อินเทอร์เฟอรอน (interferon) เป็นสารชนิดหนึ่งซึ่งหลั่งโดยเซลล์ที่ติดเชื่อไวรัสส่งไปยังเซลล์อื่นๆ ทำให้เซลล์ดังกล่าวไม่ติดเชื่อไวรัสและสามารถต้านทานเชื่อไวรัสได้ (โพยม, 2532)

แอนตีโปรติเอส (Antiprotease) เป็นสารที่ต่อต้านเอนไซม์ของเชื่อโรค เมื่อเชื่อโรคเข้าสู่ร่างกายจะปล่อยเอนไซม์ออกมาย่อยสลายเซลล์ร่างกายเพื่อนำสารอาหารไปใช้ ในปลาแซลมอนพบว่าแอลฟาไมโครโกลบูลิน (alpha macroglobulin) สามารถยับยั้งเอนไซม์โปรติเอสจากเชื่อ *Aeromonas salmonicida* ได้ (กิจการ และคณะ, 2539)

เลคติน (Lectins) เป็นสารโปรตีนหรือไกลโคโปรตีนที่สามารถเชื่อมต่อกับคาร์โบไฮเดรตและโครงสร้างที่มีความซับซ้อนของเซลล์ผิวหนังของเชื่อโรคชนิดต่างๆ ได้ (สุทธิพันธ์ และคณะ, 2543) เมื่อเลคตินจับกับเชื่อโรคจะเกิดการรวมกลุ่ม (agglutination) ทำให้เชื่อโรคหมดประสิทธิภาพในการทำงาน

ข. เอนไซม์ที่ทำหน้าที่ในการย่อยสลาย

คอมพลีเมนต์ (complement)

เป็นกลไกป้องกันตัวเองที่สำคัญเพราะมีหน้าที่ในการกำจัดเซลล์แปลกปลอม ต่อต้านเชื่อโรค โดยทำให้เกิดการอักเสบ มีการชักนำเซลล์เม็ดเลือดขาว และกระตุ้นให้เซลล์ฟาโกไซต์ให้เกิดกระบวนการจับกินสิ่งแปลกปลอม คอมพลีเมนต์เป็นกลุ่มโปรตีนในน้ำเหลือง ในสภาพปกติจะไม่ว่องไว ไม่สามารถทำงานได้ ต้องอาศัยการกระตุ้นก่อน การทำงานจะต้องอาศัยการเชื่อมโยงกันเป็นระบบลูกโซ่ของโปรตีนหลายชนิด ในปลาพบ

คอมพลิเมนต์ในน้ำเลือด สารคัดหลั่ง และเมือก การทำงานของคอมพลิเมนต์มี 2 แบบคือ แบบทางตรง (classical pathway) จะทำงานเมื่อเกิดปฏิกิริยาการรวมตัวของแอนติบอดีกับแอนติเจนมักเกิดในระบบภูมิคุ้มกันแบบจำเพาะและแบบทางอ้อม (alternative pathway) เป็นแนวทางที่ร่างกายจะใช้กำจัดเชื้อโรคในระยะที่ได้รับเชื้อใหม่ๆ ร่างกายยังไม่มีแอนติบอดีเกิดขึ้น จุลชีพหลายชนิด เช่น ไวรัส เชื้อรา แบคทีเรีย และพยาธิเป็นต้น สามารถกระตุ้นการเกิดคอมพลิเมนต์ได้โดยตรง ผลจากการกระตุ้นด้วยคอมพลิเมนต์จะช่วยทำให้เชื้อจุลชีพถูกทำลายได้ง่ายขึ้น ซึ่งการทำงานของคอมพลิเมนต์ทำให้เกิดเหตุการณ์ดังต่อไปนี้

เกิดการ Lysis หมายถึงการกระตุ้นคอมพลิเมนต์จะทำให้เชื้อแบคทีเรียหรือเชื้อไวรัสบางชนิดแตกได้

เกิด Chemotaxis หมายถึง สารประกอบบางชนิดเกิดจากการกระตุ้นคอมพลิเมนต์ สามารถชักนำให้เกิดการชุมนุมของเซลล์เม็ดเลือดขาวในบริเวณที่มีการติดเชื้อให้เกิดกระบวนการจับกินสิ่งแปลกปลอมเพิ่มมากขึ้น

เกิด Opsonization หมายถึงจากการกระตุ้นคอมพลิเมนต์จะได้สาร opsonin ซึ่งจะไปจับกับจุลชีพ เช่นแบคทีเรีย แล้วทำให้เซลล์ฟาโกไซตสามารถจับกินและกลืนจุลชีพ เกิดกระบวนการ phagocytosis ได้ดีขึ้น (สุทธิพันธ์และคณะ, 2543)

ไลโซไซม์ (Lysozyme)

เป็น เอนไซม์ ซึ่งสามารถทำลายสาร mucopolysaccharide ที่ผนังเซลล์แบคทีเรียแกรมบวกทำให้เซลล์แบคทีเรียแตก ส่วนใหญ่ผนังเซลล์ด้านนอกของแบคทีเรียจะถูกรบกวนโดยคอมพลิเมนต์ก่อน จากนั้นไลโซไซม์ จะเข้ามาทำหน้าที่ต่อเพื่อทำลายหรือย่อยสลายเซลล์ของเชื้อโรค ในปลาพบไลโซไซม์ในน้ำเลือด เมือกและเยื่อหู

C-reactive protein (CRP)

เป็นโปรตีนในน้ำเลือดซึ่งจะมีปริมาณเพิ่มมากขึ้นเมื่อร่างกายเกิดการอักเสบหรือเซลล์เนื้อเยื่อถูกทำลาย (วันเพ็ญ, 2525) CRP ทำหน้าที่เป็นสารชักนำหรือเชื่อมโยงให้เกิดกระบวนการ Opsonization มีผลต่อกระบวนการ phagocytosis หรือกระบวนการทำงานของระบบคอมพลิเมนต์แบบ classical pathway

3) กลไกด้านเซลล์ (Cellular mechanism) เป็นระบบภูมิคุ้มกันซึ่งอาศัยเซลล์ชนิดต่างๆในการป้องกันการติดเชื้อดังนี้

ก ฟาโกไซต์ (phagocytes) หรือ (phagocytic cell) ได้แก่ แมคโครฟาจ (macrophage) และนิวโทรฟิล (neutrophil) (ชนกันต์, 2545) เป็นเซลล์เม็ดเลือดที่ทำหน้าที่จับกินและทำลายสิ่งแปลกปลอมที่เข้าสู่ร่างกายโดยอาศัยกระบวนการฟาโกไซโทซิส (phagocytosis) ซึ่งเซลล์ฟาโกไซต์ประกอบด้วย

แมคโครฟาจ (macrophage) พบมากในเนื้อเยื่อของปลาทะเลน้ำจืดรวมทั้งบริเวณเหงือกและบริเวณเยื่อช่องท้อง (peritoneum) แต่พบมากที่สุดที่บริเวณไต ม้าม และบริเวณหัวใจห้อง atrium ในปลาบางชนิดไม่พบบริเวณตับเหมือนสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม

โมนอไซต์ (monocyte) พบได้ในบริเวณเนื้อเยื่อไต และพบปริมาณเล็กน้อยในกระแสเลือด โมนอไซต์สามารถเคลื่อนย้ายในกระแสเลือดไปยังบริเวณที่เกิดการอักเสบเพื่อเพิ่มจำนวนแมคโครฟาจ ทั้งโมนอไซต์และแมคโครฟาจสามารถจับกินสิ่งแปลกปลอมหลายๆ ชนิดได้ เช่น แบคทีเรีย อนุภาคคาร์บอน และยีสต์

อีโอซิโนฟิล (eosinophil) และเบโซฟิล (basophil) ในสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนมจะมีหน้าที่เกี่ยวข้องกับการเกิดกระบวนการอักเสบ แต่ในปลาแทบทุกชนิดและหน้าที่ไม่แน่ชัด

นิวโทรฟิล (neutrophil) ในปลานิวโทรฟิลเป็นเซลล์ที่ทำหน้าที่ในการจับกินสิ่งแปลกปลอม มีความคล้ายคลึงกับสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม พบนิวโทรฟิลในไต ม้าม กระแสโลหิตและบริเวณที่เกิดบาดแผลอันเนื่องจากการอักเสบ การเกิดฟาโกไซโทซิสส่วนใหญ่เกิดในนิวโทรฟิล

ขั้นตอนการเกิดกระบวนการ phagocytosis มีดังนี้

1. Attachment คือการที่จุลชีพและฟาโกไซต์เข้ามาประชิดติดกัน เป็นขั้นตอนแรกก่อนที่จุลชีพจะถูกกลืน เข้าสู่ไซโทพลาซึมของเซลล์ฟาโกไซต์และถูกทำลายต่อไป

2 Ingestion เมื่อเซลล์ฟาโกไซท์สัมผัสกับจุลชีพจะเกิด pseudopod ยื่นออกไปเพื่อโอบรอบจุลชีพ ปลาย pseudopod 2 ข้างที่ยื่นออกไป จะประสานกันเกิดเป็นถุงที่ภายในมีจุลชีพอยู่ ถุงนี้เรียกว่า phagosome

3 Degranulation เมื่อมีถุง phagosome เกิดขึ้นในไซโตพลาสซึมแล้ว ไลโซโซมหรือ granule ของฟาโกไซท์จะเคลื่อนที่มาบริเวณรอบๆ phagosome และมีการเชื่อมต่อระหว่าง phagosome และ lysosome กลายเป็น phagolysosome

4. Intra cellular killing จุลชีพหรือสิ่งแปลกปลอมที่อยู่ภายใน phagosome และ phagolysosome จะถูกทำลายด้วยกรดและเอนไซม์หลายชนิด

ข. Natural cytotoxic cell (NCC) จะมีลักษณะคล้ายกับ Natural Killer Cell (NK Cell) ในสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนมและมักเกิดในเซลล์ที่ติดเชื้อไวรัสและเกิดเนื้องอกเมื่อเซลล์ NCC ได้รับการกระตุ้นจากการติดเชื้อจะปล่อยสารภายใน granule ออกมาเพื่อทำลายเชื้อหุ้มเซลล์ของไวรัสและยับยั้งการเพิ่มจำนวนของไวรัส

2.5.2 ระบบภูมิคุ้มกันแบบจำเพาะ (Specific immunity)

เป็นระบบภูมิคุ้มกันที่เกิดขึ้นเมื่อร่างกายไม่สามารถกำจัดสิ่งแปลกปลอมโดยภูมิคุ้มกันแบบไม่จำเพาะได้ ภูมิคุ้มกันแบบจำเพาะเกิดขึ้นเมื่อถูกกระตุ้นด้วยจุลชีพชนิดหนึ่ง และมีความจำเพาะต่อจุลชีพชนิดนั้นเท่านั้น ในการกำจัดจุลชีพมีการใช้สารน้ำ (humoral immunity) และเซลล์ (cellular immunity) ทำงานร่วมกัน โดยเซลล์ที่สำคัญในการทำงานของภูมิคุ้มกันแบบจำเพาะได้แก่ lymphocyte ซึ่งพบในโพไซต์ในระบบหมุนเวียนเลือดและลิมโฟออร์แกน (lymphoid organ) ได้แก่ ไขม้าม ต่อมม้ามและเนื้อเยื่อของปลา (ผิวหนัง เหงือกและทางเดินอาหาร) ลิมโฟไซท์แบ่งออกเป็น 2 กลุ่มคือ T-lymphocyte และ B-lymphocyte โดย T-lymphocyte ตอบสนองภูมิคุ้มกันแบบเซลล์ (CMIR) และช่วย B-lymphocyte ในการสร้างแอนติบอดีด้วย ส่วน B-lymphocyte ตอบสนองภูมิคุ้มกันแบบสารน้ำ (HIR) นอกจากนี้ T-lymphocyte และ B-lymphocyte เป็นเซลล์ที่มีบทบาทต่อการสร้างเซลล์เก็บความจำ (memory cells) ให้เกิดขึ้น ในปลา การตอบสนองของระบบภูมิคุ้มกันแบบจำเพาะแบ่งเป็น 2 หัวข้อดังนี้

1) Cell-mediated immune Response (CMIR) เป็นการตอบสนองของระบบภูมิคุ้มกันด้านเซลล์ที่ทำโดย T-lymphocyte ซึ่งไม่มีการสร้างแอนติบอดี มีความสำคัญในการ

ต่อต้านโรคติดเชื้อที่เกิดจากเชื้อไวรัส โรคติดเชื้อจากปรสิต และโรคติดเชื้อรา โดยเมื่อ T-lymphocyte ถูกกระตุ้นด้วยแอนติเจน จะเปลี่ยนเป็น cytotoxic T cell หรือ Killer T Cell ที่จำเพาะต่อแอนติเจนเป็นเซลล์ที่เกิดจากการติดเชื้อไวรัส ปรสิตและเซลล์เนื้องอกซึ่ง T-lymphocyte ส่วนหนึ่งจะหลั่ง ลิมโฟไคน์ (lymphokines) หลายนานิดออกมาโดยทำหน้าที่ต่างกัันดังนี้

Macrophage activated factor (MAF) มีคุณสมบัติทำให้แมคโครฟาจมาชุมนุมกันอยู่บริเวณที่มีการหลั่งสารและกระตุ้นให้แมคโครฟาจทำหน้าที่ฟาโกไซโทซิสได้ดีขึ้น

Lymphocyte mitogenic factor มีหน้าที่กระตุ้นลิมโฟไซต์ที่ปกติที่ไม่มีการตอบสนองต่อแอนติเจนให้มีการแบ่งตัวเพิ่มจำนวนขึ้น ช่วยการทำงานลิมโฟไซต์ที่ถูกกระตุ้นด้วยแอนติเจน

Lymphotoxin เป็นสารที่เมื่อสัมผัสกับเซลล์ของแอนติเจนแล้วสามารถทำลายได้ จากการทำงานของ T-lymphocyte ทำให้แมคโครฟาจถูกกระตุ้น (activated macrophage) มีความสามารถสูงขึ้นในการกำจัดแอนติเจน

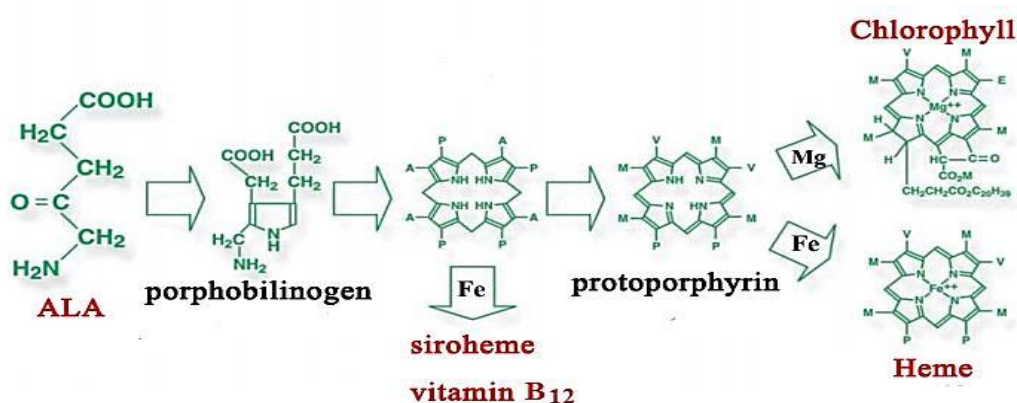
2) Humoral immune response (HIR) มีการสร้างแอนติบอดีจากปฏิกิริยาของระบบภูมิคุ้มกันต่อแอนติเจนโดยบีลิมโฟไซต์เมื่อถูกกระตุ้นด้วยแอนติเจนก็จะกลายเป็น blast cell แบ่งตัวเพิ่มจำนวนแล้วแยกออกเป็น 2 ทางคือ ทางหนึ่งกลายเป็นเซลล์เก็บความจำ อีกทางหนึ่งจะกลายเป็น plasma cell เพื่อสร้างแอนติบอดีให้กับร่างกาย ซึ่งแอนติบอดีที่สร้างขึ้นทำหน้าที่เกี่ยวกับภูมิคุ้มกันในร่างกายจึงเรียกว่า อิมมูโนโกลบูลิน (Immunoglobulin) หรือ Ig โครงสร้างทั่วไปของอิมมูโนโกลบูลิน 1 โมเลกุล ประกอบด้วยสายโพลีเปปไทด์ 4 สายคือ heavy chain (H) 2 สายที่เหมือนกัน ซึ่งเป็นแนวยาวเชื่อมต่อกันด้วย disulfide bound และอีก 2 สายสั้นที่เหมือนกันเรียกว่า light chain (L) ในสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนมจะมีอิมมูโนโกลบูลินอยู่ 5 ชนิดแต่ในปลา มีเพียงชนิดเดียวคือ IgM ในปลาฉลาม พบ IgM แบบ tetramer (กิจการ และคณะ, 2539) สามารถพบอิมมูโนโกลบูลิน ในสารคัดหลั่งเมือกของผิวหนัง ทางเดินอาหาร ท่อน้ำดี และในไขของปลาบางชนิด เช่น ปลาการ์ฟ เป็นต้น

อิมมูโนโกลบูลิน มีหน้าที่กำจัดสิ่งแปลกปลอม เช่น ไวรัส ปรสิต และยังทำหน้าที่กระตุ้นการทำงานของระบบคอมพลีเมนต์ได้ดียิ่งขึ้น เนื่องจากปลาสร้าง IgM โดยไม่มี

IgG เป็นองค์ประกอบคู่เหมือนกันในสัตว์ชั้นสูง (ชโล, 2528) ดังนั้นเมื่อแอนติเจน เช่น ไวรัสเข้าสู่ตัวปลาเซลล์ที่สร้าง IgM มีความสามารถในการจำแอนติเจนได้ไม่ดึก ทำให้ปลาขาดภูมิคุ้มกันที่ถาวร (โพยม, 2532) นอกจากนี้ T-lymphocyte ยังช่วย B-lymphocyte ในการสร้างแอนติบอดีตอบสนองต่อแอนติเจนพวกโปรตีนและคาร์โบไฮเดรตอีกด้วย เมื่อแอนติบอดีจับกับแอนติเจนเกิดเป็นแอนติเจน-แอนติบอดีคอมเพล็กซ์กระตุ้นคอมพลีเมนต์ทำให้สามารถทำลายเซลล์ที่ติดเชื้อ

2.6 กรด 5 อะมิโนลิวลินิก (ALA)

กรด 5 อะมิโนลิวลินิก (ALA) หรือกรดเคลต้า-อะมิโนลิวลินิก หรือกรดเคลต้า-อะมิโนลิวลินิก หรือกรด 5-อะมิโน-4-ออกโซเพนทาโนอิก เป็นกรดอะมิโนคีโต (aminoketo acid) มีคาร์บอนจำนวน 5 อะตอม (ภาพที่ 1) มีน้ำหนักโมเลกุลเท่ากับ 167.6 กรัมต่อโมล และมีสูตรทางเคมีคือ $H_2NCH_2COCH_2COOH$ มีค่าคงที่ของการแตกตัว $pK_{a1} = 3.90$ และค่า $pK_{a2} = 8.05$ (Fukada *et al.*, 2005) มีรายงานว่า ALA จะไม่คงตัวและสูญหายไปในพืชที่มีความแตกต่างกัน การเก็บตัวอย่างของน้ำเลี้ยงเซลล์พืชเท่ากับ 5 ที่อุณหภูมิต่ำ (4 องศาเซลเซียส) จะเหลือสาร ALA มากที่สุดโดยสูญหายไปร้อยละ 28.74 ในขณะที่การเก็บน้ำเลี้ยงเซลล์พืชเท่ากับ 8 ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส จะทำให้สาร ALA สูญหายไปถึงร้อยละ 75.43 (พิชิต, 2550)



ภาพที่ 1 โครงสร้างของกรด 5 อะมิโนลิวลินิกและการเปลี่ยนโครงสร้างไปเป็นสารประกอบเตตระไพโรล

ที่มา : Fukada และคณะ (2005)

ในธรรมชาติ ALA เป็นสารประกอบที่ใช้ในกระบวนการสังเคราะห์แสงมี ประสิทธิภาพในการกำจัดวัชพืชและยาฆ่าแมลงที่สามารถย่อยสลายได้ง่าย (Sasikala *et al.*, 1994) รวมทั้งมีผลต่อการเจริญเติบโตและการสังเคราะห์แสงของทั้งพืชและผัก ALA เป็นสารตั้งต้นใน กระบวนการสังเคราะห์สารประกอบเตตระไพโรลหลายชนิด รวมทั้งพอร์ไฟรินที่พืชนำไปใช้ในการสังเคราะห์คลอโรฟิลล์ (Stobart and Ameen-Bukhari, 1984) และ ALA ยังเป็นสารตั้งต้นที่ใช้ใน การสังเคราะห์ฮีโมโกลบินโดยเอนไซม์ฮีม ออกซิจีเนส-1 (Heme oxygenase; HO-1) เป็นตัวกระตุ้นให้ลด อัตราการเกิดออกซิเดชันของฮีโมโกลบินให้เป็นไอออนอิสระเพื่อให้เกิดกลายเป็นบิลิเวอรัดิน (biliverdin) และ คาร์บอนมอนอกไซด์ โดยสารเมตาบอไลต์เหล่านี้ช่วยในการป้องกันการตายของเซลล์ ด้านทาน การอักเสบ และป้องกันเซลล์ถูกทำลายโดยอนุมูลอิสระ โดยเซลล์เม็ดเลือดขาวชนิดโมโนไซต์ และ แมคโครฟาจทำหน้าที่ป้องกันการอักเสบจากการติดเชื้อ จากการทดสอบฤทธิ์ด้านการอักเสบของ ALA และ โขเดียมเฟอรัลไซเตรท (SFC) โดยทดสอบ ในเซลล์ไลน์เม็ดเลือดขาวชนิดแมคโครฟาจ (RAW264 cells) พบว่าเอนไซม์ HO-1 ที่ถูกกระตุ้น โดย ALA ร่วมกับ โขเดียมเฟอรัลไซเตรทจะถูก เอนไซม์ Mitogen-activated protein kinases (MEK)/Extracellular signal-related kinase (ERK) และ p38 mitogen-activated protein kinases ยับยั้งไปบางส่วน จากนั้นเอนไซม์ NF-E2-related factor2 (Nrf2) จะถูกกระตุ้นและย้ายจากไซโตซอลไปยังนิวเคลียสเพื่อตอบสนองต่อ ALA และ โขเดียม เฟอรัลไซเตรท จึงทำให้ระดับของฮีโมโกลบินในเซลล์เพิ่มขึ้น (Nishio *et al.*, 2014) ALA สังเคราะห์ที่ ผลิตโดยใช้สารเคมี ต้องใช้ปฏิกิริยาทางเคมีที่ซับซ้อนหลายปฏิกิริยาซึ่งมีค่าใช้จ่ายสูง จึงทำให้สาร สังเคราะห์มีราคาแพง อย่างไรก็ตามสารชีวภาพชนิดนี้พบได้ในสิ่งมีชีวิตหลายชนิด เช่น แบคทีเรีย สังเคราะห์แสง สาหร่าย และแบคทีเรีย (ตารางที่ 3) อย่างไรก็ตามแบคทีเรียสังเคราะห์แสงกลุ่มที่ไม่ ใช้ออกซิเจน สามารถผลิต และจับ ALA ออกนอกเซลล์ได้ในปริมาณสูงจึงเหมาะในการประยุกต์ใช้ งานในเชิงพาณิชย์ (Sasikala *et al.*, 1994)

ตารางที่ 3 แสดงการผลิต ALA โดยจุลินทรีย์กลุ่มต่างๆ

Microorganisms	Carbon and nitrogen source	LA	ALA (μ M)	References
Phototrophs				
Algae				
<i>Scenedesmus obliquus</i>	Glutamate	+	0.38	Klein <i>et al.</i> (1980)
<i>Cyanidium caldarium</i>	Glutamate	+	0.019	Avisser <i>et al.</i> (1983)
Bacteria, anoxygenic				
<i>Rhodobactor sphaeroides</i>	Succinate and glycine	+	0.75	Anderson <i>et al.</i> (1983)
<i>R. sphaeroides</i>	Succinate and glycine	+	4.00	Sasaki <i>et al.</i> (1991)
<i>R. sphaeroides</i>	Succinate and glycine	+	160.0	Ishii <i>et al.</i> (1990)
<i>R. sphaeroides</i>	Swine waste (VFA)	+	4200	Sasaki <i>et al.</i> (1990)
<i>R. sphaeroides</i>	Mandarin orange peel (modern synthetic wast water)	+	1600	Sasaki <i>et al.</i> (1993)
<i>R. sphaeroides</i>	Sewage sludge	+	9300	Tanaka <i>et al.</i> (1983)
<i>Chlorobium limicola</i>	Glutamate	+	3950	Anderson <i>et al.</i> (1983)
Chemotrophic bacteria				
Aerobe				
<i>Pseudomonas riboflavina</i>	L-alanine	+	0.2	Rhee <i>et al.</i> (1987)
<i>Propionicbaterium</i>	Succinate and glycine	+	0.04	Menon and Shemin (1967)
Anaerobes				
<i>Clostridium thermoacetium</i>	Glucose and L-lysine	+	155	Sjoji <i>et al.</i> (1989)
<i>Methanosarcina barkeri</i>	Methanol, 2-	+	0.4	Lin <i>et al.</i> (1989)
<i>Methanobacterium</i>	H ₂ +CO ₂	+	0.2	Lin <i>et al.</i> (1989)

VFA : Volatile Fatty Acid ; LA : Levulinic acid ; +: Addition

ที่มา: Sasikala และคณะ (1994)

2.6.1 กระบวนการสังเคราะห์ ALA ทางชีวภาพ

การสังเคราะห์ ALA สามารถเกิดขึ้นได้ผ่านทางวิถีเมแทบอลิซึมที่แตกต่างกัน 2 ทาง ดังนี้

1) วิถี C₄ (C₄ pathway)

เกิดขึ้นภายในเซลล์สัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม ยีสต์ เชื้อรา โดยส่วนใหญ่พบมากในแบคทีเรียสังเคราะห์แสงสีม่วงกลุ่มที่ไม่สะสมกำมะถัน (purple non-sulfur photosynthetic bacteria) และเคโมโทรฟิคแบคทีเรีย (Sasaki *et al.*, 1990) เริ่มต้นจากสารตัวกลางของวัฏจักรเครบคือ succinyl Co A ทำปฏิกิริยากับไกลซีนได้ α amino β keto adipic acid จากนั้นเปลี่ยนเป็น กรด 5 อะมิโนลิวูลินิก (ALA) โดยในวิถี C₄ จะใช้เอนไซม์ ALA synthetase (EC 2.3.1.37) ทำหน้าที่เป็นตัวเร่งปฏิกิริยาการควบแน่นของ succinyl-CoA และ glycine ร่วมกับ cofactor pyridoxal phosphate ในสภาวะใช้แสง (Gibson *et al.*, 1958) จากนั้น ALA จะถูกเปลี่ยนเป็น prothobilinogen (PBG) โดยใช้เอนไซม์ ALA dehydratase โดยมีการสูญเสียน้ำไป 2 โมเลกุล จากนั้น เอนไซม์ Urogen I Synthetase และ Urogen III cosynthetase จะทำหน้าที่เปลี่ยน PBG เป็น Urogen II โดยสาร Urogen III เป็นสาร tetrapyrrole ที่ประกอบด้วย 4 acetic และ 4 propionic side chain จากนั้นจะเกิดกระบวนการ decarboxylation ของ Urogen I โดยใช้เอนไซม์ Urogen III decarboxylase จึงจะเปลี่ยน acetic acid side chains ทั้งหมดให้เป็นก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ ทำให้เกิดสารใหม่คือ Coprogen II ในสภาวะมีอากาศเอนไซม์ Coprogen I oxidative decarboxylase จะเปลี่ยน Coprogen II ไปเป็น Protoporphyrin IX แล้ว Protoporphyrin IX จะเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชันต่อไปเป็น Protoporphyrin IX เอนไซม์ที่ทำให้โมเลกุลของ Mg เข้าไปเกาะกับโมเลกุลของ Protoporphyrin IX คือเอนไซม์ Mg-chelatase โดยเอนไซม์ดังกล่าวทำให้ Mg protoporphyrin IX เปลี่ยนเป็น Mg protoporphyrin IX monomethylester โดยที่หมู่-OH ของ propionic side chain ถูกแทนที่โดยหมู่เมทิล การเปลี่ยนของ methyl propionic side chain ทำให้เกิดสารใหม่คือ Protochlorophyllide ในสภาวะมีแสง protochlorophyllide จะถูกรีดิวซ์เป็น protochlorophyllide a จากนั้นเอนไซม์ Chlorophyllase จะทำหน้าที่เปลี่ยนเป็นคลอโรฟิลล์ เอ สามารถเก็บเกี่ยวผลผลิต ALA ได้ในช่วงที่แบคทีเรียมีการ

เจริญเติบโตสูงสุด (Sato *et al.*, 1985) ซึ่งสภาวะการเพาะเลี้ยงมีอิทธิพลต่อการสังเคราะห์เอนไซม์ ALA synthetase โดยการเปลี่ยนสภาวะการเพาะเลี้ยงจาก สภาวะเติมอากาศแบบปกติไปเป็นสภาวะเติมอากาศ 3-5 เปอร์เซ็นต์ สามารถเพิ่มกิจกรรมเอนไซม์ ALA synthetase ได้สองถึงสี่เท่า (Sandy *et al.*, 1985) และในทางตรงกันข้ามการสังเคราะห์เอนไซม์ ALA synthetase ในสภาวะที่ใช้แสงสามารถถูกยับยั้งได้โดยออกซิเจน (Viale *et al.*, 1983)

2) วิธี C₅ (C₅ pathway)

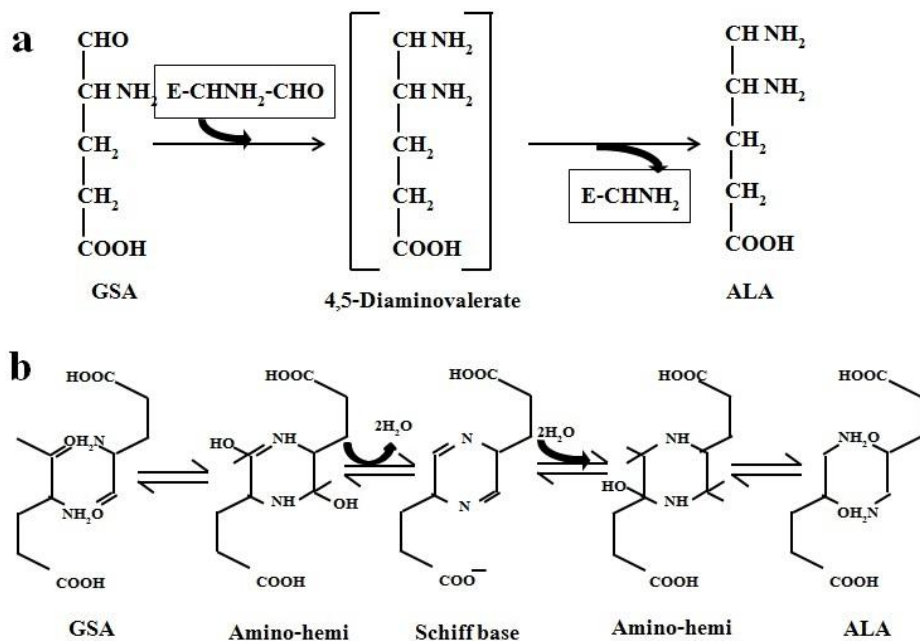
ในวิธี C₅ นั้นสามารถพบได้ในพืช สหรัย และแบคทีเรียหลายชนิด (Kajiwara *et al.*, 1994) โดยส่วนใหญ่พบได้ในแบคทีเรียสังเคราะห์แสงสีม่วงและสีเขียวกลุ่มที่สะสมกำมะถัน ในวิธี C₅ ALA เกิดขึ้นจากกลูตามัทหรือแอลฟาคีโตกลูตาเรท (α -ketoglutarate) ผ่านวิถีที่ไม่เกี่ยวข้องกับปฏิกิริยาของเอนไซม์ ALA synthetase จากการทำปฏิกิริยาของเอนไซม์ในวิธี C₅ พบว่า กลูตามัทสามารถถูกรีดิวซ์เปลี่ยนเป็น ALA ได้ใน 3 ขั้นตอนคือ

1) การเชื่อมต่อนของ t-RNA ด้วยกลูตามัท โดยใช้เอนไซม์ glutamyl-t-RNA synthetase เป็นตัวเร่งปฏิกิริยา

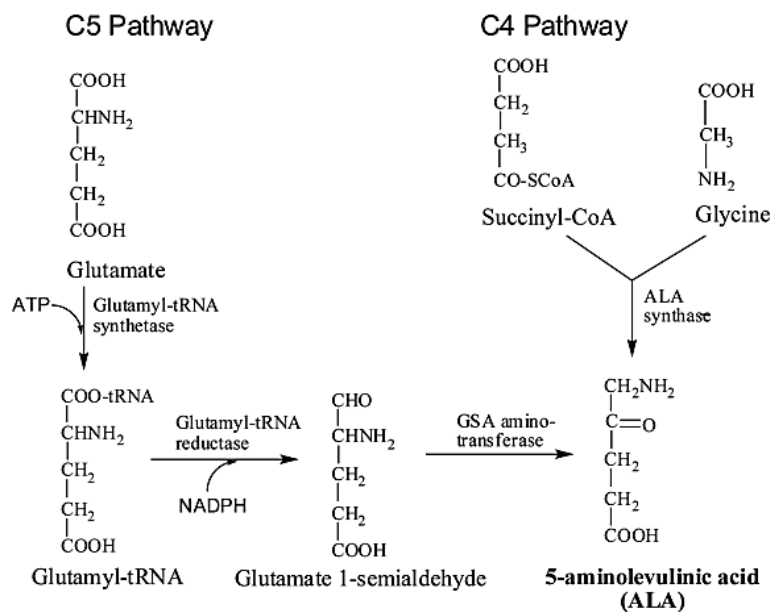
2) การเกิดปฏิกิริยารีดักชันของ glutamyl-t-RNA เพื่อใช้ในการสร้าง glutamate-1-semialdehyde (GSA) โดยมี glutamyl-t-RNA reductase (EC 6.1.1.17) ทำหน้าที่เป็นตัวเร่งปฏิกิริยา

3) การทรานส์อะมีเนชัน (transamination) คือกระบวนการที่ถ่ายโอนหมู่อะมิโน (amino group) ไปยังโมเลกุลของ GSA เพื่อสร้างเป็นกรดอะมิโนชนิดใหม่ คือ ALA โดยใช้ GSA aminotransferase (GSA-AT, EC 5.4.3.8) เป็นตัวเร่งปฏิกิริยา

กลไกในการเร่งปฏิกิริยาทั้ง 2 รูปแบบ (ภาพที่ 2) ใช้เพื่อเปลี่ยนแปลง GSA ไปเป็น ALA (Grimm *et al.*, 1991) ALA เกิดขึ้นได้จากการรับและปล่อยกลุ่มอะมิโนในตำแหน่งที่ 5 และ 4 ของ GSA ตามลำดับ (ภาพที่ 2a) หรือเกิดขึ้นได้จาก GSA 2 โมเลกุลเข้าคู่กันแล้วเกิดการเปลี่ยนหมู่อะมิโนโมเลกุลคู่ ซึ่งการเปลี่ยนหมู่อะมิโนแล้วมีการจัดเรียงตัวใหม่สามารถทำให้เกิด ALA ขึ้น 2 โมเลกุล (ภาพที่ 2b) (Sasikala *et al.*, 1994)



ภาพที่ 2 กลไกของการเปลี่ยน glutamate I-semialdehyde เป็น ALA ผ่านทางวิถี C₅
 ที่มา: Grimm และคณะ (1991)



ภาพที่ 3 กระบวนการสังเคราะห์ ALA ผ่านทางวิถี C₄ และ C₅
 ที่มา: Shin และคณะ (2007)

อมรรัตน์ (2549) ได้ทำการคัดแยกแบคทีเรียสังเคราะห์แสงจากตัวอย่างน้ำและตะกอนเลนน้ำเค็มจากชายฝั่งในภาคใต้ และภาคตะวันออกของประเทศไทยที่สามารถผลิตกรด 5-อะมิโนลิวูลินิกได้ พบว่าแบคทีเรียสังเคราะห์แสงที่แยกได้มีจำนวน 23 สายพันธุ์ เมื่อศึกษาความสามารถของเชื้อที่แยกได้ในการผลิตกรดอะมิโนลิวูลินิก (5-aminolevulinic acid, ALA) ในอาหารเลี้ยงเชื้อกลูตามาเลต (GM) พบว่า ภายใต้สภาวะให้อากาศ-ไร้แสง เชื้อมีการสะสม ALA ภายในเซลล์ได้สูงกว่าการเลี้ยงภายใต้สภาวะให้อากาศ-ให้แสง (3,000 ลักซ์) และมีการสะสม ALA ภายในเซลล์สูงสุด 0.45 ไมโครกรัมต่อกรัม น้ำหนักเซลล์แห้ง ที่ชั่วโมงที่ 24 ของการเลี้ยงเชื้อ จากการเทียบเคียงชนิดของสายพันธุ์ SM ด้วยวิธีการหาลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน 16s rRNA สามารถจำแนกชนิดแบคทีเรียเป็น *Rhodobacter sphaeroides* เมื่อทำการปรับปรุงสายพันธุ์โดยวิธีการก่อให้เกิดการกลายพันธุ์โดยใช้แสงอัลตราไวโอเล็ต (UV) และสาร NTC พบว่า ได้สายพันธุ์กลายจำนวน 5 สายพันธุ์ที่สามารถผลิต ALA ภายในเซลล์ได้สูงขึ้น แต่มีการสะสม ALA ภายในเซลล์ไม่แตกต่างจากสายพันธุ์เดิม

เมื่อทำการศึกษาการเพิ่มการสะสม ALA ภายในเซลล์ของ *R. sphaeroides* SH5 โดยการปรับปรุงสูตรอาหารเลี้ยงเชื้อ GM ซึ่งเติมกลูโคส 50 มิลลิโมลาร์ เป็นแหล่งคาร์บอนแทนมาเลต และมีการเติมเหล็กในรูปเฟอร์รัสแอมโนเนียมซัลเฟต 30 ไมโครโมลาร์ เป็นสูตรอาหารที่เหมาะสม จากการเลี้ยงเชื้อ ภายใต้สภาวะให้อากาศ-ไร้แสง และเติมกรดลิวูลินิก 10 มิลลิโมลาร์ ที่ 24 ชั่วโมง พบว่าเชื้อมีการสะสม ALA ภายในเซลล์ได้สูงสุดที่ชั่วโมงที่ 30 เท่ากับ 226 ไมโครกรัมต่อกรัมน้ำหนักเซลล์แห้ง ซึ่งเพิ่มขึ้น 502 เท่า

2.7 การประยุกต์ใช้กรด 5-อะมิโนลิวูลินิก

ปัจจุบันมีการศึกษาการประยุกต์ใช้ ALA ในสัตว์น้ำไม่มากนักมีเพียงการศึกษาของอมรรัตน์ (2549) ศึกษาผลของกรด 5-อะมิโนลิวูลินิกในการกระตุ้นภูมิคุ้มกันของกุ้งกุลาดำ (*Penaeus monodon*) พบว่าปริมาณ ALA ที่ทำให้กุ้งตายร้อยละ 50 (LD₅₀) ภายในระยะเวลา 7 วัน มีค่าเท่ากับ 113 ส่วนในล้าน เมื่อฉีดสารละลาย ALA เกรดวิเคราะห์เข้าไปในกุ้งที่ความเข้มข้นต่ำคือ 66 ส่วนในพันล้าน เป็นเวลา 3 วัน พบว่ามีผลกระตุ้นระบบภูมิคุ้มกันของกุ้งกุลาดำโดยพิจารณาจากการเพิ่มจำนวนของเม็ดเลือดรวมทั้งหมดเท่ากับ 4.64×10^7 เซลล์ต่อมิลลิลิตร กิจกรรมของ

เอนไซม์ฟีนอลออกซิเดสมีค่าเท่ากับ 400 ยูนิตต่อนาที่ต่อมิลลิกรัมโปรตีน และอัตราการรอดตายจากการติดเชื้อไวรัสตัวแดงดวงขาวร้อยละ 70 เมื่อศึกษาในหลอดทดลองโดยการเติม ALA เกรดวิเคราะห์ที่ระดับความเข้มข้น 10-10,000 ส่วนในล้าน ลงใน อาหาร K-199 ที่ใช้เลี้ยงเซลล์เม็ดเลือดกึ่งบนสไลด์ พบว่าสามารถกระตุ้นให้เม็ดเลือดเกิดกระบวนการคิแกรนูเลชันชนิด semi-granular cell ได้ร้อยละ 29.5±11 แต่ไม่สามารถกระตุ้นกิจกรรมของเอนไซม์ฟีนอลออกซิเดสได้ เมื่อศึกษาผลของ ALA ที่ผลิตจากเชื้อแบคทีเรีย *R. sphaeroides* SH5 ต่อการกระตุ้นภูมิคุ้มกันของกึ่ง โดยวิธีการผสมในอาหารกึ่งเลี้ยงเป็นเวลา 8 สัปดาห์ พบว่าอาหารที่ผสม ALA ที่ผลิตจากเชื้อแบคทีเรีย *R. sphaeroides* SH5 ไม่มีผลกระตุ้นการเจริญเติบโต อัตราการรอดตาย และอัตราการแลกเปลี่ยนรวมทั้งบางกิจกรรมของเอนไซม์ฟีนอลออกซิเดส และความต้านทานต่อการติดเชื้อไวรัสตัวแดงดวงขาว แต่ในอาหารที่ผสมแบคทีเรียซึ่งมี ALA อยู่ภายในเซลล์ปริมาณ 70.59 ไมโครกรัมต่อกรัม น้ำหนักแห้งพบว่ามีการเพิ่มจำนวนของเม็ดเลือดที่ไม่มีแกรนูล เท่ากับ $2.88 - 3.90 \times 10^7$ เซลล์ต่อมิลลิลิตร และกิจกรรมของเอนไซม์ซูเปอร์ออกไซด์ดิสมิวเตส (SOD activity) มีค่าเท่ากับ 13.26 - 14.07 หน่วยต่อนาที่ต่อมิลลิกรัมโปรตีนซึ่งสูงกว่ากึ่งที่ได้รับอาหารชุดควบคุมอย่างมีนัยสำคัญ

Chen และคณะ (2008) ศึกษาผลของกรด 5-อะมิโนลิซีนต่อการเจริญเติบโต ประสิทธิภาพการใช้อาหาร องค์ประกอบเลือดในการตอบสนองต่อระบบภูมิคุ้มกันภายหลังได้รับลิโปโพลีแซ็กคาไรด์ (LPS) จากเชื้อ *E. coli* ในลูกสุกรพบว่า อัตราการเจริญเติบโตของสุกรทั้งหมดไม่มีความแตกต่างกัน แต่เมื่อทำการวิเคราะห์ประสิทธิภาพการย่อยอาหาร พบว่าสุกรกลุ่มที่ได้รับ ALA ระดับความเข้มข้น 15 มิลลิกรัมต่ออาหาร 1 กิโลกรัม ในวันที่ 35 มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ระดับปริมาณฮีโมโกลบินซีรั่มและธาตุเหล็กมีค่าเพิ่มมากขึ้นซึ่งมีค่าสูงสุดในสุกรกลุ่มที่ได้รับ ALA ระดับความเข้มข้น 15 มิลลิกรัมต่ออาหาร 1 กิโลกรัม ส่วนปริมาณเม็ดเลือดแดง และเม็ดเลือดขาว มีค่าสูงสุดในสุกรกลุ่มที่ได้รับ ALA ระดับความเข้มข้น 10 และ 15 มิลลิกรัมต่ออาหาร 1 กิโลกรัม ในวันที่ 35 หลังจากฉีด LPS พบว่าความเข้มข้นของคอร์ติซอลในพลาสมาเพิ่มขึ้นในระยะเวลา 2 ชั่วโมง โดยมีสารกระตุ้นการเจริญเติบโตที่มีโครงสร้างคล้ายอินซูลิน (Insulin-like growth factor-I) เพิ่มขึ้นและมีส่วนช่วยในการเพิ่มปริมาณ plasma tumor necrosis factor-G (TNF-C) เพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญ และ LPS ยังส่งผลต่อปริมาณเม็ดเลือดขาวโดยทำให้เม็ดเลือดขาวลดลงที่ระยะเวลา 2 และ 4 ชั่วโมง และที่ระยะเวลา 12 ชั่วโมง LPS ส่งผลต่อปริมาณเม็ด

เลือดแดง เม็ดเลือดขาว และเม็ดเลือดขาวชนิดลิมโฟไซต์ ส่วน ALA ส่งผลกระทบเฉพาะปริมาณเม็ดเลือดขาว

Wang และคณะ (2011b) ศึกษาผลของ ALA และวิตามินซีต่อการเจริญเติบโต น้ำหนักของอวัยวะที่ส่งผลกระทบต่อระบบภูมิคุ้มกัน (ตับ ม้าม และต่อมไทมัส) และปริมาณธาตุเหล็กในเม็ดเลือดแดงของลูกไก่เนื้อพบว่า ALA และวิตามินซีไม่มีผลต่อการเจริญเติบโต แต่ ALA ที่ระดับความเข้มข้น 10 มิลลิกรัมต่ออาหาร 1 กิโลกรัม มีความสัมพันธ์ร่วมกันกับวิตามินซี โดยส่งผลกระทบต่อความเข้มข้นของฮีโมโกลบิน ปริมาณเม็ดเลือดแดง และปริมาณซีรั่มในตับและในเนื้อส่วนหน้าอกเพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญ

บทที่ 3

วัสดุ อุปกรณ์และวิธีการทดลอง

3.1 วัสดุอุปกรณ์

วัสดุ

1. แบคทีเรีย

1.1 เชื้อแบคทีเรียสังเคราะห์แสง *R. palustris* JP 255 ได้รับการอนุเคราะห์จากห้องปฏิบัติการจุลชีววิทยาการเกษตร คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลศรีวิชัย วิทยาเขตนครศรีธรรมราช

2. สารเคมีสำหรับเตรียมเชื้อแบคทีเรีย

สารเคมีสำหรับเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อแบคทีเรียสังเคราะห์แสง *R. palustris* JP225 เพื่อผลิตสาร ALA ประกอบด้วย L-glutamic acid 3.8 g/l DL-malic acid 2.7 g/l yeast extract 2.0 กรัม/ลิตร $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ (0.8 g/l) KH_2HPO_4 (0.5 g/l) K_2HPO_4 (0.5 g/l) $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (0.2 g/l) $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 0.053 g/l $\text{MnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 1.2×10^{-3} g/l Thiamine-HCl 1.0×10^{-3} g/l Nicotinic acid 1.0×10^{-3} g/l และ Biotin 1.0×10^{-5} g/l

3. พันธุ์ปลาสายปรับปรุงสายพันธุ์

ลูกปลาสายปรับปรุงสายพันธุ์น้ำหนักเฉลี่ย 5 – 7 กรัม

4. อาหารสำหรับลูกปลาสายปรับปรุงสายพันธุ์

อาหารสำหรับอนุบาลลูกปลาสายปรับปรุงสายพันธุ์ก่อนเริ่มทำการทดลองใช้อาหารลอยน้ำ 9920 D ซีพี มีคุณค่าทางอาหาร ได้แก่ โปรตีนไม่ต่ำกว่า 25 เปอร์เซ็นต์ ไขมันไม่ต่ำกว่า 3 เปอร์เซ็นต์ ความชื้นไม่ต่ำกว่า 12 เปอร์เซ็นต์ และกากไม่ต่ำกว่า 8 เปอร์เซ็นต์

อุปกรณ์

1. อุปกรณ์สำหรับเตรียมเชื้อแบคทีเรีย

อุปกรณ์สำหรับเตรียมเชื้อแบคทีเรีย ได้แก่ เครื่องชั่งไฟฟ้า ยี่ห้อ OHAUS รุ่น HAUS PA 214 Digital balance หม้อนิ่งความดันไอน้ำ ยี่ห้อ Hirayama รุ่น HG-50 เครื่องหมุนเหวี่ยง (Centrifuge) รุ่น Universal 32 เครื่องระเหิดแบบสุญญากาศ ยี่ห้อ EYELA รุ่น FDU2100

ขวดรูปชมพู่ขนาด 150 มิลลิลิตร หลอดไฟ หลูป้ายเชื้อ ตะเกียงแอลกอฮอล์ งานเพาะเชื้อ หลอดทดลอง

2. อุปกรณ์เตรียมอาหารทดลอง

2.1 อุปกรณ์สำหรับผสมกรด 5-อะมิโนลิวูลินิก (ALA) ลงในอาหาร ได้แก่ เครื่องชั่งทศนิยม 2 ตำแหน่ง ขวดสเปรย์ขนาด 200 มิลลิลิตร กระจกตวง ปีกเกอร์ ถาดเตรียมอาหาร

2.2 ตู้อบอาหาร

2.3 ตู้แช่แข็งสำหรับเก็บอาหารทดลอง

3. อุปกรณ์ที่ใช้เลี้ยงปลาทดลอง

3.1 ถังไฟเบอร์กลาสขนาด 3 ตัน

3.2 ตู้กระจกทดลองขนาด 45x90x45 นิ้ว ปิดด้านข้าง 3 ด้านด้วยพลาสติกสีดำ เพื่อป้องกันการรบกวนจากภายนอก

3.3 อุปกรณ์ระบบให้อากาศ ได้แก่ เครื่องให้อากาศ สายยาง หัวทราย

3.4 อุปกรณ์ถ่ายน้ำ ได้แก่ สายยาง เครื่องปั้มน้ำ

3.5 อุปกรณ์ย้ายปลา ได้แก่ สวิงช้อนปลา ถังพลาสติก

4. อุปกรณ์สำหรับการตรวจสอบการเจริญเติบโตของปลาสายปรับปรุงสายพันธุ์ ประกอบด้วยเครื่องชั่งไฟฟ้าทศนิยม 2 ตำแหน่ง ยี่ห้อ Mettler รุ่น AB 204 ถังน้ำขนาดความจุ 20 ลิตร ชั้นพลาสติก และสวิงช้อนปลา

5. อุปกรณ์วิเคราะห์องค์ประกอบเลือดปลา

5.1 อุปกรณ์เก็บตัวอย่างเลือดปลา ได้แก่ เข็มฉีดยา ขนาด 1 มิลลิลิตร หัวเข็มขนาด 25 G หลอดพลาสติก ขนาด 1.5 มิลลิลิตร และถุงมือยาง

5.2 อุปกรณ์นับปริมาณเม็ดเลือดแดงและเม็ดเลือดขาว ได้แก่ ไคคูติงปิเปต (RBC diluting pipette) สไลด์นับเม็ดเลือด (haemocytometer) และกล้องจุลทรรศน์

5.3 อุปกรณ์วิเคราะห์ค่าฮีมาโตคริต ได้แก่ เครื่องฮีมาโตคริตเซนตริฟิวจ์ (hematocrit centrifuge) ยี่ห้อ Biozen รุ่น TTE 4203 หลอดแคปิลลารี (capillary tube) และดินน้ำมัน

5.4 อุปกรณ์การวิเคราะห์ค่าสีโมโกลบีน ได้แก่ หลอดทดลอง ไมโครปิเปต และเครื่องสเปกโตรโฟโตมิเตอร์

5.5 อุปกรณ์วิเคราะห์ค่าพลาสมาโปรตีน ได้แก่ หลอดทดลอง ไมโครปิเปต เครื่องสเปกโตรโฟโตมิเตอร์ และเครื่องเขย่าตะกอน (vortex mixer)

5.6 อุปกรณ์สำหรับการวิเคราะห์กิจกรรมเอนไซม์ไลโซไซม์ ได้แก่ ไมโครปิเปต เพลท 96 หลุม ก้นแบน และเครื่อง Microplate Reader [(Microplate) BIOTEK PowerWaveX]

5.7 อุปกรณ์สำหรับการวิเคราะห์การจับกินสิ่งแปลกปลอม ได้แก่ หลอดเซนตริฟิวจ์ (centrifuge tube) ขนาด 10 มิลลิลิตร หลอดพลาสติก ขนาด 1.5 มิลลิลิตร จานเพาะเชื้อแท่งบด ตะแกรงกรอง กรรไกรผ่าตัด ปากคีบ สไลด์ และเครื่องหมุนเหวี่ยงควบคุมอุณหภูมิ (centrifuge) ยี่ห้อ Beckman Avanti รุ่น TM 30 centrifuge

6. อุปกรณ์สำหรับการศึกษาการเปลี่ยนแปลงทางพยาธิวิทยา ประกอบด้วยเครื่องเตรียมเนื้อเยื่ออัตโนมัติ (automatic tissue processor, Leica TP 1020) เครื่องตัดเนื้อเยื่อ (microtome, Leica RM 2125 RTS) อ่างน้ำร้อน ชุดย้อมเนื้อเยื่อ สไลด์ และกล้องจุลทรรศน์ (Olympus AX70) และอุปกรณ์ถ่ายภาพ (Cooled CCD; Olympus DP71)

3.2 วิธีการทดลอง

3.2.1. แบคทีเรียสังเคราะห์แสง

เลี้ยงเซลล์แบคทีเรียสังเคราะห์แสง *R. palustris* JP225 ที่แยกได้จากดินเปรี้ยวในอำเภออุพาทกรณ์ จังหวัดนครศรีธรรมราช โดยนำมาเลี้ยงในอาหารเหลว GM บ่มในสภาวะแบบมีออกซิเจนน้อย มีแสง ที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส เก็บเกี่ยวเชื้อในช่วงเวลาที่ผลิต ALA ได้สูงสุด และแยก ALA ตามวิธีการของ Mauzerall และ Granick (1956) โดยนำสารละลายแบคทีเรียที่เลี้ยงในอาหารเหลว GM คัดแปลงที่เติมไกลซีน 5 มิลลิโมลาร์ ซัคซิเนต 10 มิลลิโมลาร์ กรดโพธิโอนิก 1 มิลลิโมลาร์ และ $MgCl_2 \cdot 6H_2O$ 20 มิลลิโมลาร์ (Saikour *et al.*, 2013) มาหมุนเหวี่ยงที่ความเร็ว 10,000 รอบต่อนาที นาน 10 นาที แล้วนำส่วนใสไปทำแห้งด้วยเครื่องระเหิดแบบสุญญากาศ เก็บผง ALA (มีสารออกฤทธิ์ 0.025 เปอร์เซ็นต์; ภาคผนวกที่ 1) ที่ได้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส จนกว่าจะใช้งานต่อไป

3.2.2 การศึกษาผลของกรด 5-อะมิโนลิวูลินิกต่อการเจริญเติบโต การตอบสนองของภูมิคุ้มกันในปลาชเวตปรับปรุงสายพันธุ์

1) การเตรียมอุปกรณ์การทดลอง

ใช้ตู้กระจกทดลองขนาด 45x90x45 เซนติเมตร ความจุน้ำ 120 ลิตร ปิดด้านข้าง 3 ด้าน ด้วยพลาสติกสีดำเพื่อป้องกันการรบกวนจากภายนอกจำนวน 30 ตู้ ทำความสะอาดโดยการแช่คลอรีนเพื่อฆ่าเชื้อต่างๆ ที่ติดอยู่ในตู้ ติดตั้งอุปกรณ์ต่างๆ เช่น ท่อเดินอากาศ สายยาง หัวทราย มีการเตรียมน้ำในบ่อพักน้ำ (ถังไฟเบอร์กลาส ขนาดความจุ 3,000 ลิตร) จากนั้นใช้ปั้มน้ำดูดน้ำประปาที่ปราศจากคลอรีนเติมลงในตู้ทดลองให้ได้ปริมาตร 120 ลิตร ก่อนปล่อยปลาทดลอง

2) การเตรียมปลาทดลอง

ปลาชเวตปรับปรุงสายพันธุ์น้ำหนักประมาณ 2-3 กรัม ที่ผ่านการฝึกให้กินอาหารเม็ดสำเร็จรูปมาแล้ว มีสุขภาพแข็งแรง ปลอดโรค จำนวน 500 ตัว นำมาอนุบาลในถังไฟเบอร์ขนาดความจุ 3,000 ลิตร ให้กินอาหารเม็ดสำเร็จรูปวันละ 2 ครั้ง คือช่วงเช้าเวลา 9.00 น. และเย็นเวลา 16.00 น. เป็นเวลา 2 สัปดาห์ จากนั้นคัดปลาที่มีน้ำหนักใกล้เคียงกันใส่ตู้กระจกทดลองจำนวน 30 ตู้ ละ 20 ตัว ทำการเลี้ยงปลาเป็นเวลานาน 2 สัปดาห์ เพื่อปรับสภาพปลาให้ชินกับตู้ทดลอง ก่อนเริ่มทดลองทำการชั่งน้ำหนักปลาอีกครั้ง โดยคัดเลือกปลาที่มีน้ำหนักใกล้เคียงกันจำนวน 15 ตัวต่อตู้ การศึกษาครั้งนี้ได้ผ่านการพิจารณาและเห็นชอบจากคณะกรรมการกำกับดูแลการเลี้ยงและใช้สัตว์ทดลองของสถาบันมหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ เลขที่ใบอนุญาตที่ Ref. 56/2018

3) การเตรียมอาหารทดลอง

ใช้อาหารทดลองพื้นฐาน คืออาหารลอยน้ำ 9920 D ซีพี มีคุณค่าทางอาหารได้แก่ โปรตีนไม่ต่ำกว่า 25 เปอร์เซ็นต์ ไขมันไม่ต่ำกว่า 3 เปอร์เซ็นต์ ความชื้นไม่ต่ำกว่า 12 เปอร์เซ็นต์ และกากไม่ต่ำกว่า 8 เปอร์เซ็นต์ มาทำการสเปรย์ด้วย ALA ดังนี้ สูตรที่ 1 สเปรย์ด้วยน้ำมันปลา (ชุดควบคุม) สูตรที่ 2 สเปรย์ด้วย ALA ในระดับความเข้มข้น 2.5 มิลลิกรัมต่ออาหาร 1 กิโลกรัม สูตรที่ 3 สเปรย์ด้วย ALA ในระดับความเข้มข้น 5 มิลลิกรัมต่ออาหาร 1 กิโลกรัม สูตรที่ 4 สเปรย์ด้วย ALA ในระดับความเข้มข้น 7.5 มิลลิกรัมต่ออาหาร 1 กิโลกรัม สูตรที่ 5 สเปรย์ ALA ในระดับความเข้มข้น 10 มิลลิกรัมต่ออาหาร 1 กิโลกรัม จากนั้นทำการเคลือบผิวหน้าอาหารด้วยน้ำมัน

ปลา แล้วนำมาฝังลมเป็นเวลา 4 ชั่วโมง แล้วบรรจุลงในถุงพลาสติกเก็บรักษาไว้ในตู้เย็นที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส

4) การทดลองเลี้ยงปลาสายปรับปรุงสายพันธุ์ด้วยอาหารทดลอง

วางแผนการทดลองแบบสุ่มตลอด (Completely Randomized Design, CRD) โดยแบ่งการทดลองออกเป็น 2 ช่วงเวลา ได้แก่ ช่วงที่ 1 ใช้เวลาในการเลี้ยงนาน 4 สัปดาห์ และช่วงที่ 2 ใช้เวลาในการเลี้ยงนาน 8 สัปดาห์ แต่ละช่วงการทดลองประกอบด้วย 5 ชุดการทดลองๆ ละ 3 ซ้ำๆ ละ 15 ตัว ดังนี้

ชุดการทดลองที่ 1 เลี้ยงปลาด้วยอาหารสูตรที่ 1 (ชุดควบคุม)

ชุดการทดลองที่ 2 เลี้ยงปลาด้วยอาหารสูตรที่ 2 (ALA 2.5 มิลลิกรัม/กิโลกรัม)

ชุดการทดลองที่ 3 เลี้ยงปลาด้วยอาหารสูตรที่ 3 (ALA 5.0 มิลลิกรัม/กิโลกรัม)

ชุดการทดลองที่ 4 เลี้ยงปลาด้วยอาหารสูตรที่ 4 (ALA 7.5 มิลลิกรัม/กิโลกรัม)

ชุดการทดลองที่ 5 เลี้ยงปลาด้วยอาหารสูตรที่ 5 (ALA 10.0 มิลลิกรัม/กิโลกรัม)

ให้อาหารทดลองแต่ละสูตรวันละ 2 ครั้ง คือเช้าเวลา 9.00 น. และเย็นเวลา 16.00 น. หลังจากปลากินอิ่มประมาณ 1 ชั่วโมง ตักอาหารที่เหลือออก จดบันทึกอาหารที่ให้ทุกวัน เปลี่ยนถ่ายน้ำ 90 เปอร์เซ็นต์ ทุกๆ 2 วัน ใช้ระยะเวลาการทดลองทั้งหมดนาน 8 สัปดาห์

3.3 การเก็บรวบรวมข้อมูล

3.3.1 ศึกษาอัตราการเจริญเติบโต

ระหว่างทำการทดลองจะดำเนินการชั่งน้ำหนักปลาทดลองโดยงดให้อาหาร 1 มื้อ ก่อนวันที่ทำการชั่งน้ำหนักปลา พร้อมจดบันทึกน้ำหนักปลา จำนวนปลา อัตราการรอดตาย และ น้ำหนักอาหารทดลอง จนถึงสิ้นสุดการทดลองเป็นระยะเวลา 8 สัปดาห์ นำข้อมูลที่ได้มาคำนวณหา อัตราการรอด (Survival Rate) ตามวิธีการของ Nankervis และคณะ (2000) น้ำหนักปลาที่เพิ่มขึ้น (% Weight Gain) ตามวิธีของ De Silva และ Anderson, (1995) อัตราการเจริญเติบโตจำเพาะ (Specific growth rate, SGR) และอัตราการเปลี่ยนอาหารเป็นเนื้อ (Feed conversion rate, FCR) ตามวิธีของ Dupree และ Sneed (1996) ดังนี้

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

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

อัตราการเจริญเติบโตจำเพาะ (%/วัน) =

$$\frac{\ln \text{น้ำหนักปลาสิ้นสุดการทดลอง (กรัม)} - \ln \text{น้ำหนักปลาเริ่มต้นการทดลอง (กรัม)}}{\text{ระยะเวลา (วัน)}} \times 100$$

$$\text{อัตราการเปลี่ยนอาหารเป็นเนื้อ} = \frac{\text{น้ำหนักอาหารที่ปลากินทั้งหมด (กรัม)}}{\text{น้ำหนักปลาที่เพิ่มขึ้นตลอดการทดลอง}} \times 100$$

3.3.2 ศึกษาองค์ประกอบเลือดของปลาสาวยปรับปรุงสายพันธุ์หลังได้รับอาหาร

ทดลอง

หลังจากเสร็จสิ้นการทดลองเป็นระยะเวลา 4 และ 8 สัปดาห์ ทำการสุ่มตัวอย่างปลา จากแต่ละชุดการทดลองๆ ละ 9 ตัว (ซ้ำละ 3 ตัว) โดยนำปลามาสดด้วยน้ำมันกานพลู แล้วเจาะเลือดบริเวณ โคนหางโดยใช้เข็มฉีดยาขนาด 1 มิลลิลิตร หัวเข็มขนาด 25G แล้วนำไปวิเคราะห์องค์ประกอบเลือด ดังต่อไปนี้

1) จำนวนเม็ดเลือดแดงและเม็ดเลือดขาว (Total red and white blood cell count)

วิเคราะห์ปริมาณเม็ดเลือดแดงและเม็ดเลือดขาว ตามวิธีการของ Suwannasang และคณะ (2014) โดยทำการเจือจางเม็ดเลือดแดงให้ได้อัตราส่วน 1:200 โดยดูดเลือดที่เจาะได้ด้วย RBC diluting pipette นำมาผสมกับสีย้อมเม็ดเลือด Yokoyama's solution เขย่าให้เข้ากัน จากนั้นหยดลงบน Hemocytometer ที่มีแผ่นปิดสไลด์ (cover glass) ทำการสุ่มนับเม็ดเลือดแดงและเม็ดเลือดขาวภายใต้ กล้องจุลทรรศน์ที่กำลังขยาย 400 เท่า รายงานผลในหน่วยเซลล์ต่อมิลลิลิตร

2) ฮีมาโตคริต

วิเคราะห์ฮีมาโตคริตตามวิธีการที่ดัดแปลงจากวิธีการของ Blaxhall และ Daisley (1973) โดยนำเลือดที่เจาะใหม่ใส่หลอดทดลองขนาด 1.5 มิลลิลิตร จากนั้นดูดเลือดโดยใช้หลอดแคปิลลารี (Capillaries tube) จำนวน 2 หลอดให้ได้ปริมาณ 3 ใน 4 ของหลอด อุดปลายด้วยดินน้ำมัน นำหลอดแคปิลลารีมาปั่นด้วยเครื่องฮีมาโตคริตเซนตริฟิวจ์ (Haematocrit centrifuge) ที่ความเร็ว 10,000 รอบต่อนาที นาน 5 นาที วัดอัตราส่วนของปริมาตรเม็ดเลือดกับปริมาตรเลือดทั้งหมด จากนั้นนำมาคำนวณหาเปอร์เซ็นต์ฮีมาโตคริตหรือฮีมาโตคริตจากสูตร

$$\text{ฮีมาโตคริต (\%)} = \frac{\text{ปริมาตรเม็ดเลือดแดงอัดแน่น (มิลลิเมตร)} \times 100}{\text{ปริมาตรเลือดตัวอย่างทั้งหมด (มิลลิเมตร)}}$$

3) ปริมาณฮีโมโกลบินรวม (Total haemoglobin)

วิเคราะห์ปริมาณฮีโมโกลบินรวมตามวิธีการของ Larsen และ Sneizsko (1961) โดยบีบเลือดที่ผ่านการเจาะใหม่ปริมาตร 20 ไมโครลิตร ผสมกับสาร Drabkin's solution ปริมาตร 5 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากัน ทิ้งไว้อย่างน้อย 20 นาที แล้วนำไปหมუნเหวียงเพื่อกำจัดเศษเซลล์เม็ดเลือดที่ไม่สมบูรณ์และไฟบริน จากนั้นนำส่วนใสไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 540 นาโนเมตร ด้วยเครื่องสเปกโตรโฟโตมิเตอร์ นำค่าที่ได้มาเปรียบเทียบกับค่าฮีโมโกลบินมาตรฐานที่ทราบความเข้มข้นโดยใช้สาร Drabkin's solution เป็น blank

4) กิจกรรมเอนไซม์ไลโซไซม์ (Lysozyme activity)

นำเลือดปลาที่เจาะได้มาวางให้เลือดแข็งตัวที่อุณหภูมิห้อง จากนั้นนำไปหมუნเหวียงที่ความเร็ว 2,500 รอบต่อนาที นาน 5 นาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เก็บส่วนใสหรือซีรัมที่ อุณหภูมิ -80 องศาเซลเซียส เพื่อนำไปวิเคราะห์กิจกรรมของเอนไซม์ไลโซไซม์ตามวิธีการของ Demer และ Bayne (1997) โดยบีบซีรัม 25 ไมโครลิตร ลงในไมโครเพลทแบบ 96 หลุม ตัวอย่างละ 3 หลุม เติม สารละลายเชื้อ *Micrococcus lysodeikticus* ความเข้มข้น 0.075 เปอร์เซ็นต์ ที่ละลายในสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ ความเข้มข้น 0.1 โมลาร์ pH 5.8 ปริมาตร 175 ไมโครลิตร

วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 450 นาโนเมตรด้วยเครื่อง Microplate reader ทุก 30 วินาที เป็นเวลา 5 นาที จากนั้นคำนวณอัตราการเปลี่ยนแปลงค่า การดูดกลืนแสง (optical density, OD) โดยเทียบกับกราฟสารละลายมาตรฐาน Hen white egg lysozyme รายงานผลในหน่วยไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

5) โปรตีนในซีรัม (Serum protein)

วิเคราะห์โปรตีนในซีรัมตามวิธีการของ Suwannasang และคณะ (2014) โดยปีเปตซีรัมปริมาตร 10 ไมโครลิตร ผสมน้ำกลั่นปราศจากไอออนที่ฆ่าเชื้อปริมาตร 990 ไมโครลิตร จากนั้นเติมสารละลาย alkaline copper ปริมาตร 2 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากัน วางทิ้งไว้ 10 นาที เติมสารละลาย folin reagent (อัตราส่วน 1:10) ปริมาตร 3 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากัน วางทิ้งไว้ 10 นาที แล้วนำไปวัดค่าดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 640 นาโนเมตร ด้วยเครื่องสเปกโตรโฟโตมิเตอร์ นำค่าที่ได้เปรียบเทียบกับกราฟมาตรฐาน (standard curve) ที่ใช้ Bovine serum albumin เป็นสารละลายมาตรฐาน รายงานผลการวิเคราะห์ปริมาณโปรตีนในซีรัมในหน่วยมิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร

6) การลดลงของไนโตรบลูเตตราโซเลียม (Reduction of nitroblue tetrazolium)

วิเคราะห์การลดลงของไนโตรบลูเตตราโซเลียมตามวิธีการของ Stasiak และ Baumann (1996) โดยปีเปตตัวอย่างเลือดปริมาตร 50 ไมโครลิตร ลงในไมโครเพลทแบบ 96 หลุม เติม ACD ปริมาตร 30 ไมโครลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง จากนั้นดูดสารละลายส่วนในสีที่ล้างตะกอนเซลล์ด้วย PBS pH 7.2 ปริมาตร 100 ไมโครลิตรจำนวน 3 ครั้ง เติมไนโตรบลูเตตราโซเลียม (NBT) ความเข้มข้น 0.2 เปอร์เซ็นต์ ในน้ำเกลือ 0.85 เปอร์เซ็นต์ ปริมาตร 50 ไมโครลิตร แล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 1 ชั่วโมง จากนั้นตรึงเซลล์ด้วยเมทิลแอลกอฮอล์ความเข้มข้น 100 เปอร์เซ็นต์ ปริมาตร 50 ไมโครลิตร เป็นเวลา 2-3 นาที แล้วล้างด้วยเมทิลแอลกอฮอล์ความเข้มข้น 70 เปอร์เซ็นต์ จำนวน 3 ครั้งๆ ละ 50 ไมโครลิตร ผึ่งไมโครเพลทให้แห้ง เติมสารละลายโพแทสเซียมไฮดรอกไซด์ความเข้มข้น 2 นอร์มอล ปริมาตร 60 ไมโครลิตร และสารละลายไคเมธิลซัลฟอกไซด์ ปริมาตร 70 ไมโครลิตร แล้วนำไปวัดค่าดูดกลืน

แสงที่ความยาวคลื่น 630 นาโนเมตร ด้วยเครื่อง Microplate Reader โดยใช้สารละลายไดเมทิลซัลโฟลไซด์เป็นสารละลายมาตรฐาน

7) วิเคราะห์กิจกรรมการจับกินสิ่งแปลกปลอม (Phagocytic activity)

วิเคราะห์กิจกรรมการจับกินสิ่งแปลกปลอมตามวิธีการของ Chung และ Secombes (1988) โดยทำการสลับปลาด้วยน้ำมันกานพลูแล้วทำการตัดไตส่วนหน้าใส่หลอดทดลองขนาด 1.5 มิลลิลิตร ที่มีอาหารเลี้ยงเซลล์ L-15 II ปริมาตร 500 มิลลิลิตร จากนั้นใช้แท่งแก้วบิดเบาๆ คูดสารละลายกรองผ่านตะแกรงขนาด 100 ไมครอน นำมาใส่ในหลอดแก้วขนาด 10 มิลลิลิตร เติมอาหารเลี้ยงเซลล์ L-15 I ให้ได้ปริมาตรรวม 4 มิลลิลิตร นำไปหมუნเหวี่ยงที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ความเร็ว 3,000 รอบต่อนาที นาน 5 นาที ทิ้งสารละลายส่วนใส ล้างตะกอนเซลล์ด้วย L-15 II ปริมาตร 4 มิลลิลิตร จำนวน 2 ครั้ง นำ สารละลายเซลล์มาไหลบน Percoll Gradient 34/51 เปอร์เซ็นต์ นำไปหมუნเหวี่ยงที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ความเร็ว 4,000 รอบต่อนาที นาน 30 นาที แยกเม็ดเลือดขาวที่อยู่ระหว่างรอยต่อของ Percoll 34 และ 51 เปอร์เซ็นต์ ใส่หลอดขนาด 10 มิลลิลิตร ล้างเซลล์เม็ดเลือดขาวโดยใช้อาหารเลี้ยงเซลล์ L-15 I ปริมาตร 4 มิลลิลิตร หมุนเหวี่ยงที่ความเร็ว 4,000 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส นาน 30 นาที จำนวน 3 ครั้ง นำเม็ดเลือดขาวที่ได้จากไตตอนต้นละลายใน L-15 IV ปริมาตร 1 มิลลิลิตร จากนั้นบีบเม็ดเลือดขาว ที่ละลายใน L-15 IV ปริมาตร 20 ไมโครลิตร ย้อมด้วยสารละลายไตรแพนบลู 20 ไมโครลิตร ปรับจำนวนเซลล์เม็ดเลือดขาวให้ได้ความหนาแน่น 2×10^6 เซลล์ต่อมิลลิลิตร ปริมาตร 400 ไมโครลิตร ผสมกับลาเทกบีด ในสารละลาย L-15 ความหนาแน่น 2×10^8 เม็ดต่อมิลลิลิตร ปริมาตร 100 ไมโครลิตร จากนั้นนำเซลล์เม็ดเลือดขาวที่ผสมลาเทกบีดปริมาตร 200 ไมโครลิตร หยดลงบนแผ่นปิดสไลด์แบบกลม (Circular cover slip) บ่มที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส นาน 2 ชั่วโมง จากนั้นย้อมสี Diff Quick แล้วเตรียมเป็นสไลด์ถาวรด้วย สารละลายเปอร์เมาทับ นับจำนวนเซลล์ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ที่กำลังขยาย 40x นำค่าที่ได้มาคำนวณตามสูตรของ Rengpipat และคณะ (2000) ดังต่อไปนี้

$$\text{Phagocytosis (\%)} = \frac{\text{จำนวนเม็ดเลือดขาวที่จับกินลาเทกบีด}}{\text{จำนวนเม็ดเลือดขาวทั้งหมด}} \times 100$$

จำนวนเม็ดเลือดขาวทั้งหมด

$$\text{Phagocytic index (\%)} = \frac{\text{จำนวนเม็ดเลือดขาวที่จับกินลาเท็กบีค} \times \text{จำนวนลาเท็กบีคที่ถูกจับกิน}}{\text{จำนวนเม็ดเลือดขาวทั้งหมด} \times \text{จำนวนเม็ดเลือดขาวทั้งหมด}} \times 100$$

$$\text{Average number of the bead ingested per cell (\%)} = \frac{\text{จำนวนลาเท็กบีคที่ถูกจับกิน}}{\text{จำนวนเม็ดเลือดขาวที่จับกินลาเท็กบีค}} \times 100$$

3.3.3 ศึกษาการเปลี่ยนแปลงทางพยาธิสภาพของปลาสวายปรับปรุงสายพันธุ์ หลังได้รับอาหารทดลอง

เก็บตัวอย่างปลาสวายปรับปรุงสายพันธุ์หลังได้รับอาหารทดลองเพื่อศึกษาการเปลี่ยนแปลงทางพยาธิสภาพ ตามวิธีการของ Humason (1979) โดยการสุ่มตัวอย่างปลาทุกชุดการทดลองหลังจากเสร็จสิ้นการทดลองเป็นระยะเวลา 4 และ 8 สัปดาห์ โดยสุ่มเก็บตัวอย่างปลาซ้ำละ 2 ตัว สลบล้างด้วยน้ำมันกานพลู แล้วผ่าเปิดช่องท้องและสมอง และเก็บอวัยวะต่างๆ คือ ตับ ไต ม้าม หัวใจ สมอง ลำไส้ มาดองในสารละลายฟอร์มาลินเข้มข้น 10 เปอร์เซ็นต์ นาน 3 วัน และเปลี่ยนเป็นเอธิลแอลกอฮอล์ ความเข้มข้น 50 เปอร์เซ็นต์ นาน 3 วัน แล้วเปลี่ยนเป็นเอธิลแอลกอฮอล์ความเข้มข้น 70 เปอร์เซ็นต์ เพื่อรักษาสภาพของเนื้อเยื่อจนกว่าจะทำการศึกษา จากนั้นนำเนื้อเยื่อทั้งหมดผ่านขั้นตอนการทำเนื้อเยื่อโดยใช้ เครื่อง Automatic Tissue Processor แล้วฝังในพาราฟิน ตัดเนื้อเยื่อด้วยเครื่องมือไมโครโทม (rotary nmicrotome) หนา 3 ไมโครเมตร ย้อมด้วยสีฮีมาทอกไซลินและอีโอซิน เพื่อทำเป็นสไลด์ถาวรและตรวจสอบการเปลี่ยนแปลงของเนื้อเยื่อ โดยใช้กล้องจุลทรรศน์ (Olympus, AX70)

3.4 การวิเคราะห์ข้อมูล

การวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติโดยใช้การวิเคราะห์ความแปรปรวน ANOVA แบบจำแนกทางเดียว (One Way Analysis of Variances) ตามแผนการทดลองแบบสุ่มตลอด (Completely Randomized Design) และเปรียบเทียบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยโดยวิธี Duncan's

multiple range test (Duncan, 1995) ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์ ด้วยโปรแกรมสำเร็จรูป SPSS (version 19.0)

บทที่ 4

ผลการทดลอง

4.1 ผลการศึกษาหาอัตราการเจริญเติบโต

4.1.1 น้ำหนักเฉลี่ยต่อตัว

เมื่อเริ่มต้นการทดลองน้ำหนักปลาสายปรับปรุงสายพันธุ์อยู่ในช่วง 7.73-7.74 กรัม น้ำหนักเฉลี่ยของปลาที่ได้รับอาหารทั้ง 5 สูตร มีการเพิ่มขึ้นตามระยะเวลาการเลี้ยง โดยใน 4 สัปดาห์แรก ปลาที่เลี้ยงด้วยอาหารเสริม ALA ที่ระดับความเข้มข้น 2.5 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม มีน้ำหนักเฉลี่ยสูงสุดเท่ากับ 13.38 ± 0.26 กรัม รองลงมาคือปลาที่เลี้ยงด้วยอาหารสูตรที่ 1, 5, 4 และ 3 โดยมีน้ำหนักเฉลี่ยต่อตัวเท่ากับ 11.58 ± 0.13 , 11.15 ± 0.63 , 11.03 ± 0.20 และ 10.80 ± 0.42 กรัม ตามลำดับ โดยปลาสายปรับปรุงสายพันธุ์ที่เลี้ยงด้วยอาหารสูตรที่ 2 มีน้ำหนักเฉลี่ยแตกต่างกับปลาที่เลี้ยงด้วยอาหารสูตรที่ 1, 3, 4 และ 5 อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) ส่วนในช่วง 8 สัปดาห์ น้ำหนักเฉลี่ยของปลาที่เลี้ยงด้วยอาหารทดลองทั้ง 5 สูตร ไม่มีมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p > 0.05$) โดยปลาที่เลี้ยงด้วยอาหารชุดควบคุม มีน้ำหนักเฉลี่ยสูงสุดที่ 16.92 ± 1.19 กรัม รองลงมาคือปลาที่เลี้ยงด้วยอาหารผสม ALA ที่ระดับความเข้มข้น 10.0, 7.5, 5.0 และ 2.5 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม โดยมีน้ำหนักเฉลี่ยเท่ากับ 16.89 ± 0.62 , 15.82 ± 0.31 , 15.53 ± 3.78 และ 15.18 ± 1.15 กรัม ตามลำดับ (ตารางที่ 5)

4.1.2 น้ำหนักที่เพิ่มขึ้น

น้ำหนักที่เพิ่มขึ้นของปลาสายปรับปรุงสายพันธุ์ในช่วง 4 สัปดาห์แรกมีค่าสูงสุดในปลาที่เลี้ยงด้วยอาหารทดลองสูตรที่ 2 คือเสริมด้วย ALA ที่ระดับความเข้มข้น 2.5 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม มีน้ำหนักเพิ่มขึ้นสูงสุดเท่ากับ 72.96 ± 3.34 เปอร์เซ็นต์ รองลงมาคือปลาที่เลี้ยงด้วยอาหารทดลองสูตรที่ 1 (ชุดควบคุม), 5, 4 และ 3 มีน้ำหนักที่เพิ่มขึ้นเท่ากับ 49.37 ± 1.48 , 44.12 ± 8.15 , 42.58 ± 2.63 และ 39.16 ± 5.45 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ โดยน้ำหนักที่เพิ่มขึ้นของปลาสายปรับปรุงสายพันธุ์ในช่วง 4 สัปดาห์แรกที่เลี้ยงด้วยอาหารทดลองสูตรที่ 2 มีค่าสูงกว่าปลาที่เลี้ยงด้วย

อาหารทดลองสูตรที่ 1, 3, 4 และ 5 อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) ในช่วงสัปดาห์ที่ 8 น้ำหนักที่เพิ่มขึ้นของปลาสายปรับปรุงสายพันธุ์ที่เลี้ยงด้วยอาหารทดลองทั้ง 5 สูตร ไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p > 0.05$) โดยน้ำหนักที่เพิ่มขึ้นมีค่าสูงสุดในปลาที่เลี้ยงด้วยอาหารทดลองสูตรที่ 5 คือเสริมด้วย ALA ที่ระดับความเข้มข้น 10 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม มีค่าเท่ากับ 54.14 ± 1.67 เปอร์เซ็นต์ รองลงมาคือปลาที่เลี้ยงด้วยอาหารสูตรที่ 1, 4, 3 และ 2 มีค่าเท่ากับ 53.93 ± 5.24 , 49.27 ± 3.36 , 48.04 ± 3.37 และ 46.83 ± 3.74 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ (ตารางที่ 5)

4.1.3 อัตราการเจริญเติบโตจำเพาะ

ในระยะเวลาช่วง 4 สัปดาห์แรกของการทดลอง ปลาสายปรับปรุงสายพันธุ์ที่เลี้ยงด้วยอาหารทดลองสูตรที่ 2 คือเสริมด้วย ALA ที่ระดับความเข้มข้น 2.5 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม มีอัตราการเจริญเติบโตจำเพาะสูงสุดเท่ากับ 1.83 ± 0.06 เปอร์เซ็นต์ต่อวัน รองลงมาคือปลาที่เลี้ยงด้วยอาหารทดลองสูตรที่ 1 (ชุดควบคุม), 5, 4 และ 3 มีอัตราการเจริญเติบโตจำเพาะเท่ากับ 1.35 ± 0.03 , 1.21 ± 0.19 , 1.18 ± 0.06 , และ 1.11 ± 0.13 เปอร์เซ็นต์ต่อวันตามลำดับ โดยปลาสายปรับปรุงสายพันธุ์ที่เลี้ยงด้วยอาหารทดลองสูตรที่ 1, 3, 4 และ 5 มีอัตราการเจริญเติบโตจำเพาะน้อยกว่าปลาที่เลี้ยงด้วยอาหารทดลองสูตรที่ 2 อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) และปลาที่เลี้ยงด้วยอาหารทดลองสูตรที่ 3, 4 และ 5 มีอัตราการเจริญเติบโตจำเพาะไม่แตกต่างกัน ($p > 0.05$) ส่วนในช่วงสัปดาห์ที่ 8 ปลาที่เลี้ยงด้วยอาหารทดลองสูตรที่ 1 มีอัตราการเจริญเติบโตจำเพาะสูงสุดเท่ากับ 2.61 ± 0.12 เปอร์เซ็นต์ต่อวัน รองลงมาคือปลาที่เลี้ยงด้วยอาหารทดลองสูตรที่ 1, 4, 3 และ 2 มีอัตราการเจริญเติบโตจำเพาะอยู่ที่ 2.60 ± 0.39 , 2.40 ± 0.07 , 2.25 ± 0.24 และ 2.24 ± 0.26 เปอร์เซ็นต์ต่อวันตามลำดับ โดยปลาสายปรับปรุงสายพันธุ์ที่เลี้ยงด้วยอาหารทดลองทั้ง 5 สูตรมีอัตราการเจริญเติบโตจำเพาะไม่แตกต่างกันทางสถิติ ($p > 0.05$) (ตารางที่ 5)

4.1.4 อัตราการเปลี่ยนอาหารเป็นเนื้อ

ในช่วง 4 สัปดาห์แรกของการทดลองปลาสายปรับปรุงสายพันธุ์ที่เลี้ยงด้วยอาหารทดลองสูตรที่ 2 คือเสริมด้วย ALA ที่ระดับความเข้มข้น 2.5 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม มีอัตราการเปลี่ยนอาหารเป็นเนื้อที่มีค่าต่ำสุดมีค่าเท่ากับ 1.00 ± 0.08 รองลงมาคือปลาที่เลี้ยงด้วยอาหารทดลองสูตรที่ 1 (ชุดควบคุม), 4, 5 และ 3 มีอัตราการเปลี่ยนอาหารเป็นเนื้อเท่ากับ 1.44 ± 0.17 ,

1.55±0.23, 1.72±0.21 และ 1.73±0.23 ตามลำดับ โดยปลาที่เลี้ยงด้วยอาหารทดลองสูตรที่ 2 มีอัตราการเปลี่ยนอาหารเป็นเนื้อต่ำสุด แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) กับปลาที่เลี้ยงด้วยอาหารทดลองสูตรที่ 1, 3, 4 และ 5 ส่วนในช่วงสัปดาห์ที่ 8 อัตราการเปลี่ยนอาหารเป็นเนื้อที่มีค่าต่ำสุดในปลาที่เลี้ยงด้วยอาหารทดลองสูตรที่ 5 คือเสริมด้วย ALA ที่ระดับความเข้มข้น 10 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม มีค่าเท่ากับ 1.02±0.10 รองลงมาคือปลาที่เลี้ยงด้วยอาหารเสริม ALA ที่ระดับความเข้มข้น 7.5, 0 (ชุดควบคุม), 5.0 และ 2.5 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม มีอัตราการเปลี่ยนอาหารเป็นเนื้อเท่ากับ 1.08±0.09, 1.13±0.11, 1.18±0.22 และ 1.19±0.09 ตามลำดับ โดยอัตราการเปลี่ยนอาหารเป็นเนื้อของปลาสายปรับปรุงสายพันธุ์ที่เลี้ยงด้วยอาหารทดลอง 5 สูตร ในช่วงระยะเวลา 8 สัปดาห์ ไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p > 0.05$) (ตารางที่ 5)

ตารางที่ 5. น้ำหนักเริ่มต้น น้ำหนักสุดท้าย น้ำหนักที่เพิ่มขึ้น (WG) อัตราการเจริญเติบโตจำเพาะ (SGR) และอัตราการเปลี่ยนอาหารเป็นเนื้อ (FCR) ของปลา สวายปรับปรุงสายพันธุ์ที่เลี้ยงด้วยอาหารทดลองผสม ALA ที่ระดับความเข้มข้นต่างๆ เป็นระยะเวลา 4 และ 8 สัปดาห์

ชุดการทดลอง	4 สัปดาห์					8 สัปดาห์			
	น้ำหนักเริ่ม	น้ำหนักสุดท้าย	WG	SGR	FCR	น้ำหนักสุดท้าย	WG	SGR	FCR
	(กรัม)	(กรัม)	(เปอร์เซ็นต์)	(เปอร์เซ็นต์/วัน)		(กรัม)	(เปอร์เซ็นต์)	(เปอร์เซ็นต์/วัน)	
1 : 0 mg/kg	7.74±0.02 ^{ns}	11.58±0.13 ^b	49.37±1.48 ^b	1.35±0.03 ^b	1.44±0.17 ^b	16.92±1.19 ^{ns}	53.93±5.24 ^{ns}	2.60±0.39 ^{ns}	1.13±0.11 ^{ns}
2 : 2.5 mg/kg	7.73±0.00 ^{ns}	13.38±0.26 ^c	72.96±3.34 ^c	1.83±0.06 ^c	1.00±0.08 ^a	15.18±1.15 ^{ns}	46.83±3.74 ^{ns}	2.24±0.26 ^{ns}	1.19±0.09 ^{ns}
3 : 5 mg/kg	7.74±0.00 ^{ns}	10.80±0.42 ^a	39.61±5.45 ^a	1.11±0.13 ^a	1.73±0.23 ^c	15.53±3.78 ^{ns}	48.04±3.37 ^{ns}	2.25±0.24 ^{ns}	1.18±0.22 ^{ns}
4 : 7.5 mg/kg	7.73±0.00 ^{ns}	11.03±0.20 ^a	42.58±2.63 ^a	1.18±0.06 ^a	1.55±0.23 ^{bc}	15.82±0.31 ^{ns}	49.27±3.36 ^{ns}	2.40±0.07 ^{ns}	1.08±0.09 ^{ns}
5 : 10 mg/kg	7.74±0.00 ^{ns}	11.15±0.63 ^{ab}	44.12±8.15 ^{ab}	1.21±0.19 ^a	1.72±0.21 ^c	16.89±0.62 ^{ns}	54.14±1.67 ^{ns}	2.61±0.12 ^{ns}	1.02±0.10 ^{ns}

หมายเหตุ: - ค่าเฉลี่ย ± ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานจำนวน 3 ซ้ำ, ค่าเฉลี่ยที่กำกับด้วยตัวอักษรต่างกัน ในสมมติเดียวกัน มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์ (p<0.05)

- ns ไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (p>0.05)

4.1.5 อัตราการรอดตาย

หลังการเลี้ยงปลาด้วยอาหารทดลองทั้ง 5 สูตรนาน 4 และ 8 สัปดาห์ พบว่าปลาสายปรับปรุงสายพันธุ์ทุกชุดการทดลองมีอัตราการรอดตายไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p>0.05$) คือ 100 ± 0.00 เปอร์เซ็นต์ (ตารางที่ 6)

ตารางที่ 6 แสดงอัตราการรอดตายของปลาสายปรับปรุงสายพันธุ์ที่เลี้ยงด้วยอาหารทดลองทั้ง 5 สูตรเป็นระยะเวลา 4 และ 8 สัปดาห์

ชุดการทดลอง	4 สัปดาห์	8 สัปดาห์
	อัตราการรอดตาย (%)	อัตราการรอดตาย (%)
1: 0 mg/kg	100 ± 0.00^{ns}	100 ± 0.00^{ns}
2: 2.5 mg/kg	100 ± 0.00^{ns}	100 ± 0.00^{ns}
3: 5 mg/kg	100 ± 0.00^{ns}	100 ± 0.00^{ns}
4: 7.5 mg/kg	100 ± 0.00^{ns}	100 ± 0.00^{ns}
5: 10 mg/kg	100 ± 0.00^{ns}	100 ± 0.00^{ns}

หมายเหตุ: - ค่าเฉลี่ย \pm ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานจำนวน 3 ซ้ำ, ค่าเฉลี่ยที่กำกับด้วยตัวอักษรเดียวกันในสคริปต์เดียวกัน ไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์ ($p<0.05$)

- ns ไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p>0.05$)

4.2 ผลของกรด 5 อะมิโนลิวูลินิกต่อองค์ประกอบเลือดของปลาสายปรับปรุงสายพันธุ์

4.2.1 ปริมาณเม็ดเลือดแดง

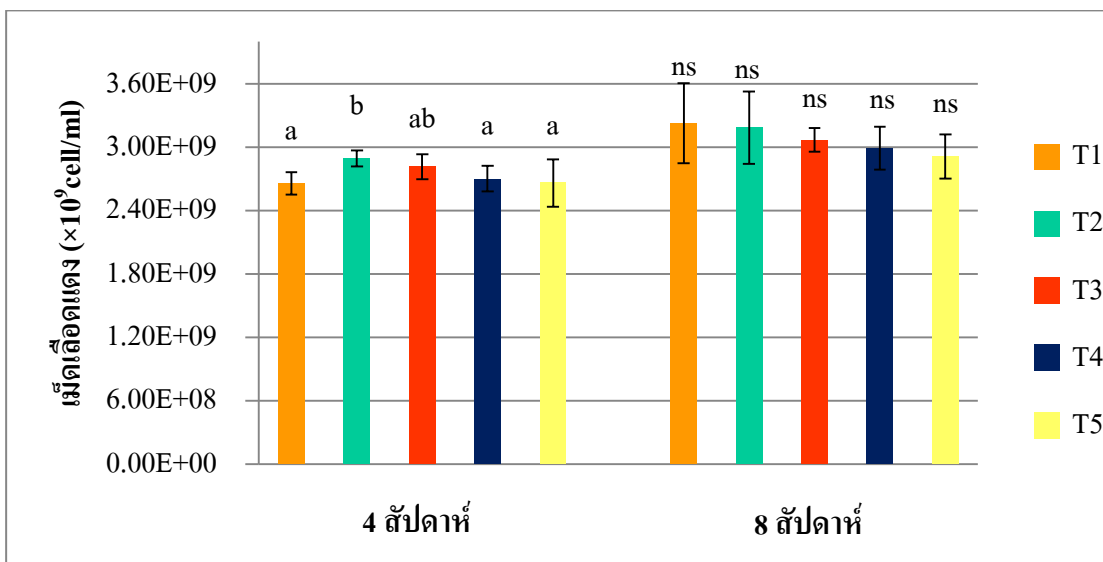
การศึกษาปริมาณเม็ดเลือดแดงของปลาสายปรับปรุงสายพันธุ์หลังจากได้รับอาหารทดลองทั้ง 5 สูตรเป็นระยะเวลา 4 และ 8 สัปดาห์ พบว่าปลาสายปรับปรุงสายพันธุ์ที่เลี้ยงด้วยอาหารสูตรที่ 2 คือเสริมด้วย ALA ระดับความเข้มข้น 2.5 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม เป็นระยะเวลา 4 สัปดาห์ มีจำนวนเม็ดเลือดแดงสูงที่สุดมีค่าเท่ากับ $2.90\pm 0.07\times 10^9$ เซลล์ต่อมิลลิลิตร รองลงมาคือจำนวนเม็ดเลือดแดงของปลาที่เลี้ยงด้วยอาหารทดลองสูตรที่ 3, 4, 5 และ 1 โดยมีจำนวนเม็ดเลือดแดงเท่ากับ 2.82 ± 0.12 , 2.70 ± 0.12 , 2.66 ± 0.22 และ $2.65\pm 0.11\times 10^9$ เซลล์ต่อ

มิลลิลิตร ตามลำดับ (ภาพที่ 4 และตารางภาคผนวกที่ 1) โดยปลาที่เลี้ยงด้วยอาหารเสริม ALA ที่ระดับความเข้มข้น 2.5 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัมมีจำนวนเม็ดเลือดแดงสูงสุดแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) กับปลาที่เลี้ยงด้วยอาหารทดลองสูตรที่ 1 (ชุดควบคุม), 4 และ 5 แต่จำนวนเม็ดเลือดแดงของปลาที่เลี้ยงด้วยอาหารทดลองสูตรที่ 2 ไม่มีความแตกต่างทางสถิติ ($p > 0.05$) กับปลาที่เลี้ยงด้วยอาหารทดลองสูตรที่ 3 (ภาพที่ 4 และตารางภาคผนวกที่ 1) การทดลองในช่วงระยะเวลา 8 สัปดาห์ พบว่าจำนวนเม็ดเลือดแดงของปลาสายปรับปรุงสายพันธุ์ที่เลี้ยงด้วยอาหารทดลองทั้ง 5 สูตร ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ ($p > 0.05$) โดยปลาที่ได้รับอาหารทดลองสูตรที่ 1 (ชุดควบคุม) มีจำนวนเม็ดเลือดแดงสูงสุดที่ระดับ $3.23 \pm 0.38 \times 10^9$ เซลล์ต่อมิลลิลิตร รองลงมาคือจำนวนเม็ดเลือดแดงของปลาที่ได้รับอาหารทดลองสูตรที่ 2, 3, 4 และ 5 มีจำนวนเม็ดเลือดแดงเท่ากับ 3.19 ± 0.34 , 3.07 ± 0.11 , 2.99 ± 0.20 และ $2.91 \pm 0.21 \times 10^9$ เซลล์ต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ ดังแสดงในภาพที่ 4 และตารางภาคผนวกที่ 2

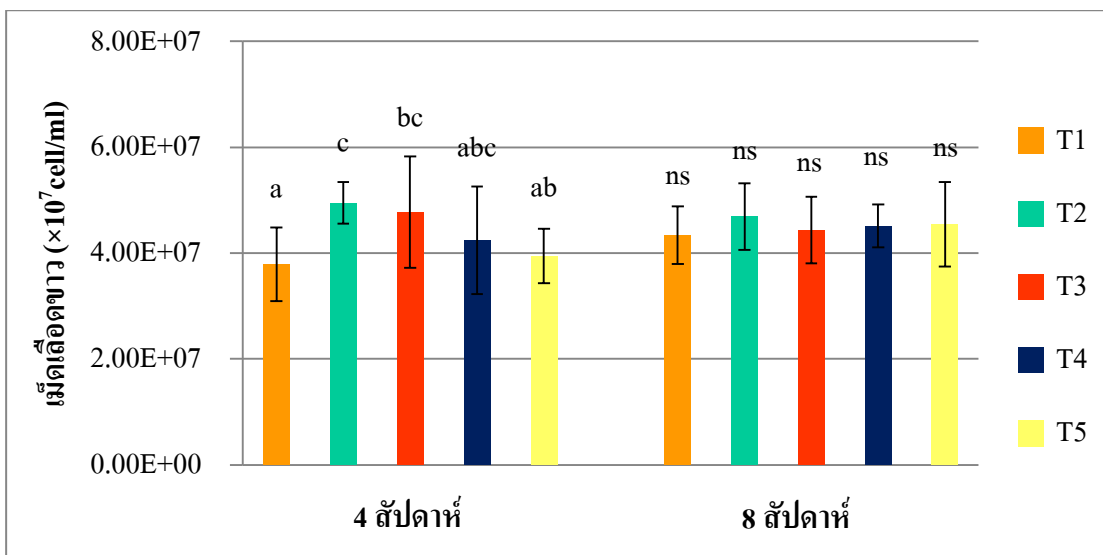
4.2.2 ปริมาณเม็ดเลือดขาว

การศึกษาจำนวนเม็ดเลือดขาวของปลาสายปรับปรุงสายพันธุ์หลังจากเลี้ยงด้วยอาหารทดลองทั้ง 5 สูตรเป็นระยะเวลา 4 สัปดาห์ พบว่าปลาสายปรับปรุงสายพันธุ์ที่เลี้ยงด้วยอาหารสูตรที่ 2 คือเสริมด้วย ALA ที่ระดับความเข้มข้น 2.5 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัมมีปริมาณเม็ดเลือดขาวสูงสุดเท่ากับ $4.95 \pm 0.39 \times 10^7$ เซลล์ต่อมิลลิลิตร รองลงมาคือปลาที่เลี้ยงด้วยอาหารทดลองเสริมด้วย ALA ที่ระดับความเข้มข้น 5.0, 7.5, 10.0 และ 0 (ชุดควบคุม) มีจำนวนเม็ดเลือดขาวเท่ากับ 4.77 ± 0.11 , 4.24 ± 0.10 , 3.95 ± 0.51 และ $3.79 \pm 0.70 \times 10^7$ เซลล์ต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ โดยปริมาณเม็ดเลือดขาวของปลาที่เลี้ยงด้วยอาหารทดลองสูตรที่ 2, 3 และ 4 ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ ($p > 0.05$) (ภาพที่ 5 และตารางภาคผนวกที่ 1) แต่ปลาที่เลี้ยงด้วยอาหารทดลองชุดที่ 2 มีจำนวนเม็ดเลือดขาวแตกต่างจากปลาที่เลี้ยงด้วยอาหารทดลองสูตรที่ 1 และ 5 อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) ส่วนในช่วง 8 สัปดาห์ ปลาสายปรับปรุงสายพันธุ์ที่เลี้ยงด้วยอาหารทดลองสูตรที่ 2 มีจำนวนเม็ดเลือดขาวสูงสุดเท่ากับ $4.69 \pm 0.63 \times 10^7$ เซลล์ต่อมิลลิลิตร ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ ($p > 0.05$) กับปลาที่เลี้ยงด้วยอาหารทดลองสูตรที่ 1, 3, 4 และ 5 โดยมีปริมาณเม็ดเลือดขาวเท่ากับ

4.33±0.55, 4.43±0.63, 4.51±0.40 และ 4.54±0.80×10⁷ เซลล์ต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ (ภาพที่ 5 และ ตารางภาคผนวกที่ 2)



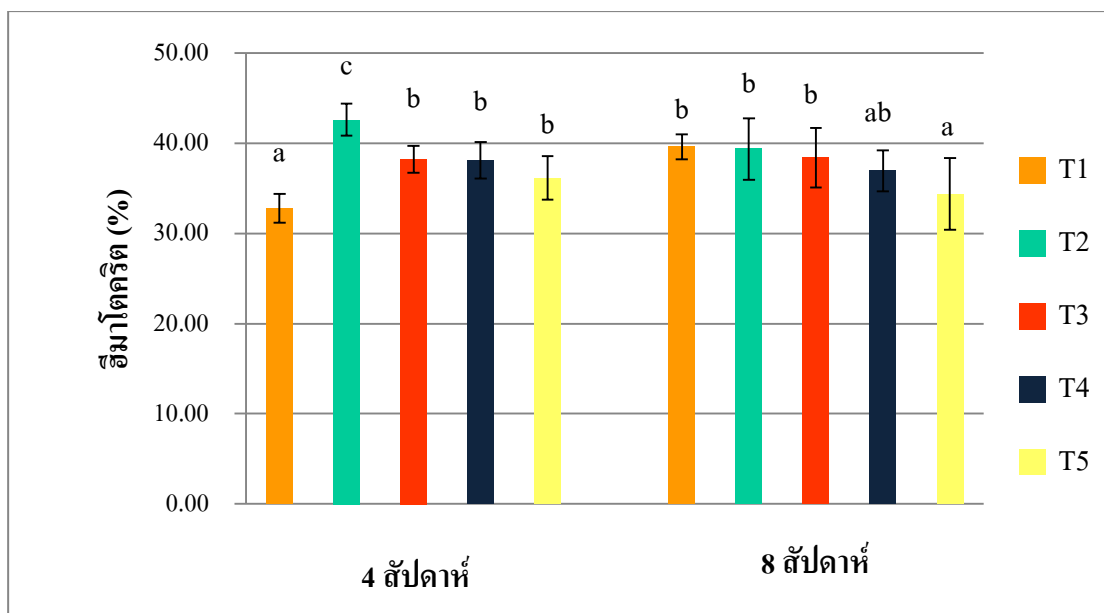
ภาพที่ 4 แสดงปริมาณเม็ดเลือดแดงของปลาสาวยปรับปรุงสายพันธุ์ที่เลี้ยงด้วยอาหารทดลองทั้ง 5 สูตรเป็นระยะเวลา 4 และ 8 สัปดาห์



ภาพที่ 5 แสดงปริมาณเม็ดเลือดขาวของปลาสาวยปรับปรุงสายพันธุ์ที่เลี้ยงด้วยอาหารทดลองทั้ง 5 สูตรเป็นระยะเวลา 4 และ 8 สัปดาห์

4.2.3 ฮีมาโตคริต (haematocrit)

การศึกษาฮีมาโตคริตของปลาสวายปรับปรุงสายพันธุ์ที่เลี้ยงด้วยอาหารทดลองทั้ง 5 สูตรเป็นระยะเวลา 4 และ 8 สัปดาห์ พบว่าปลาที่เลี้ยงด้วยอาหารทดลองสูตรที่ 2 คือเสริมด้วย ALA ที่ระดับความเข้มข้น 2.5 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม มีฮีมาโตคริตสูงสุดอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) มีค่าเท่ากับ 42.61 ± 1.79 เปอร์เซ็นต์ รองลงมาคือปลาที่เลี้ยงด้วยอาหารเสริมด้วย ALA ที่ระดับความเข้มข้น 5.0, 7.5, 10.0 และ 0 (ชุดควบคุม) มีฮีมาโตคริตเท่ากับ 38.23 ± 1.51 , 38.12 ± 2.02 , 36.16 ± 2.39 และ 32.78 ± 1.59 เปอร์เซ็นต์ตามลำดับ (ภาพที่ 6 และตารางภาคผนวกที่ 1) โดยชุดการทดลองที่เสริมด้วย ALA ระดับความเข้มข้น 5, 7.5 และ 10 มีฮีมาโตคริตไม่แตกต่างกันทางสถิติ ($p > 0.05$) แต่ปลาในชุดการทดลองที่เสริมด้วย ALA ระดับความเข้มข้น 2.5 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม มีค่าฮีมาโตคริตแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบกับปลาที่เลี้ยงด้วยอาหารชุดควบคุมและปลาที่ได้รับอาหารเสริมด้วย ALA ระดับความเข้มข้น 5, 7.5 และ 10 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม ($p < 0.05$) แสดงในภาพที่ 6 และตารางภาคผนวกที่ 1 ส่วนในสัปดาห์ที่ 8 ปลาสวายปรับปรุงสายพันธุ์ที่เลี้ยงด้วยอาหารทดลองสูตรที่ 1 (ชุดควบคุม) มีฮีมาโตคริตสูงสุดที่ 39.58 ± 1.38 เปอร์เซ็นต์ รองลงมาคือปลาที่เลี้ยงด้วยอาหารทดลองสูตรที่ 2, 3, 4 และ 5 มีค่าฮีมาโตคริตเท่ากับ 39.36 ± 3.40 , 38.38 ± 3.31 , 36.97 ± 2.27 และ 34.35 ± 3.98 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ (ตารางที่ 8) โดยปลาที่ได้รับอาหารทดลองสูตรที่ 1 (ชุดควบคุม), 2, 3 และ 4 มีค่าฮีมาโตคริตไม่แตกต่างกันทางสถิติ ($p > 0.05$) แต่แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) กับปลาที่เลี้ยงด้วยอาหารทดลองสูตรที่ 5 คือเสริมด้วย ALA ที่ระดับความเข้มข้น 10 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม (ภาพที่ 6 และตารางภาคผนวกที่ 2)

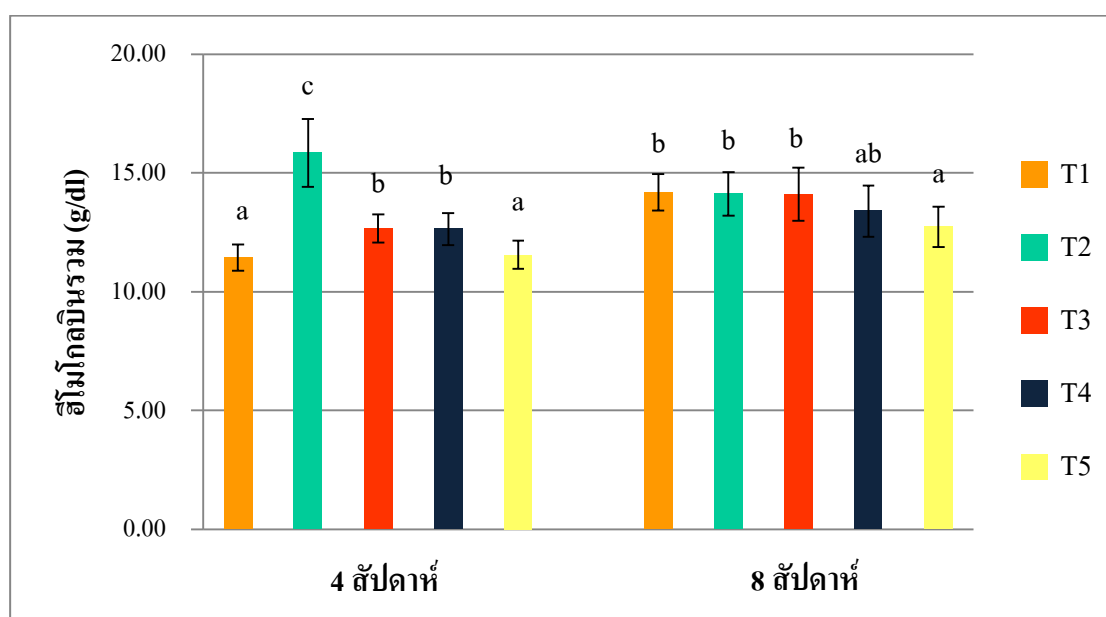


ภาพที่ 6 แสดงค่าฮีมาโตคริตของปลาสาวยปรับปรุงสายพันธุ์ที่เลี้ยงด้วยอาหารทดลองทั้ง 5 สูตร เป็นระยะเวลา 4 และ 8 สัปดาห์

4.2.4 ปริมาณฮีโมโกลบินรวม (Total hemoglobin)

การศึกษาปริมาณฮีโมโกลบินรวมในปลาสาวยปรับปรุงสายพันธุ์ที่เลี้ยงด้วยอาหารทดลองทั้ง 5 สูตรเป็นเวลา 4 และ 8 สัปดาห์ พบว่าในช่วง 4 สัปดาห์แรก ปลาสาวยปรับปรุงสายพันธุ์ที่ได้รับอาหารสูตรที่ 2 คือเสริมด้วย ALA ที่ระดับความเข้มข้น 2.5 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม มีปริมาณฮีโมโกลบินรวมสูงสุดอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) เท่ากับ 15.85 ± 1.43 กรัมต่อเดซิลิตร รองลงมาคือปลาที่เลี้ยงด้วยอาหารทดลองสูตรที่ 3, 4, 5 และ 1 โดยมีปริมาณฮีโมโกลบินเท่ากับ 12.66 ± 0.60 , 12.64 ± 0.68 , 11.55 ± 0.59 และ 11.44 ± 0.55 กรัมต่อเดซิลิตร ตามลำดับ (ตารางภาคผนวกที่ 1) โดยปลาที่เลี้ยงด้วยอาหารทดลองสูตรที่ 2, 3 และ 4 มีปริมาณฮีโมโกลบินสูงกว่าอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) กับปลาที่เลี้ยงด้วยอาหารทดลองสูตรที่ 1 (ชุดควบคุม) และสูตรที่ 5 (ภาพที่ 7 และตารางภาคผนวกที่ 1) ส่วนการศึกษาปริมาณฮีโมโกลบินรวมในปลาสาวยปรับปรุงสายพันธุ์ที่เลี้ยงด้วยอาหารทั้ง 5 สูตรเป็นเวลา 8 สัปดาห์ พบว่าปลาที่เลี้ยงด้วยอาหารทดลองสูตรที่ 1 (ชุดควบคุม) มีปริมาณฮีโมโกลบินรวมสูงสุดเท่ากับ 14.18 ± 0.77 กรัมต่อ

เดซิลิตร ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ ($p>0.05$) กับปลาที่เลี้ยงด้วยอาหารทดลองสูตรที่ 2, 3 และ 4 ซึ่งมีระดับปริมาณฮีโมโกลบินรวมเท่ากับ 14.12 ± 0.92 , 14.11 ± 1.12 และ 13.39 ± 1.07 กรัมต่อเดซิลิตรตามลำดับ (ตารางภาคผนวกที่ 2) แต่แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.05$) กับปลาที่เลี้ยงด้วยอาหารทดลองสูตรที่ 5 คือเสริมด้วย ALA ที่ระดับความเข้มข้น 10 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม ซึ่งมีปริมาณฮีโมโกลบินรวมเท่ากับ 12.73 ± 0.84 กรัมต่อเดซิลิตร (ภาพที่ 7 ตารางภาคผนวกที่ 2)

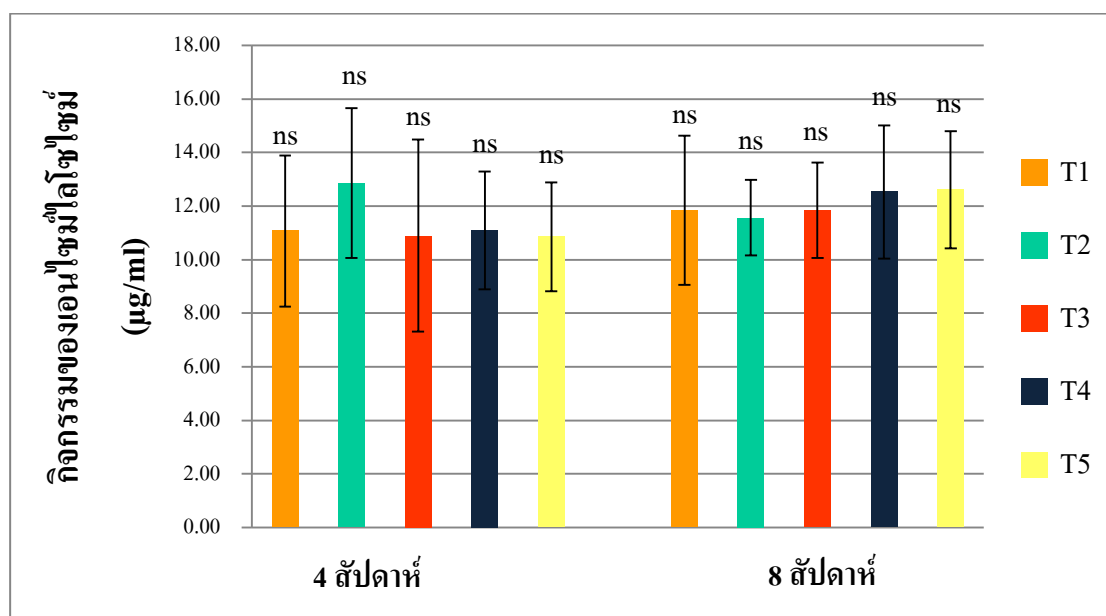


ภาพที่ 7 แสดงปริมาณฮีโมโกลบินรวมของปลาสาวยปรับปรุงสายพันธุ์ที่เลี้ยงด้วยอาหารทดลองทั้ง 5 สูตรเป็นระยะเวลา 4 และ 8 สัปดาห์

4.2.5 กิจกรรมเอนไซม์ไลโซไซม์ (lysozyme activity)

การศึกษากิจกรรมเอนไซม์ไลโซไซม์ของปลาสาวยปรับปรุงสายพันธุ์ที่เลี้ยงด้วยอาหารทดลองทั้ง 5 สูตร เป็นระยะเวลา 4 และ 8 สัปดาห์ พบว่าในช่วง 4 สัปดาห์แรก กิจกรรมเอนไซม์ไลโซไซม์มีค่าสูงสุดในปลาสาวยปรับปรุงสายพันธุ์ที่ได้รับอาหารทดลองสูตรที่ 2 โดยมีกิจกรรมเอนไซม์ไลโซไซม์เท่ากับ 12.85 ± 2.80 ไมโครกรัมต่อมิลลิตร รองลงมาคือปลาที่เลี้ยงด้วยอาหารทดลองสูตรที่ 1, 4, 3 และ 5 ที่มีค่าเฉลี่ยกิจกรรมเอนไซม์ไลโซไซม์เท่ากับ 11.08 ± 2.82 ,

11.09±2.19, 10.90±3.58 และ 10.85±2.04 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ (ภาพที่ 8 ตารางภาคผนวกที่ 1) ส่วนในช่วง 8 สัปดาห์กิจกรรมเอนไซม์ไลโซไซม์ของปลาที่เลี้ยงด้วยอาหารทดลองทั้ง 5 สูตร มีค่าสูงสุดในปลาที่เลี้ยงด้วยอาหารทดลองสูตรที่ 5 โดยมีค่าเฉลี่ยกิจกรรมเอนไซม์ไลโซไซม์เท่ากับ 12.61±2.02 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร รองลงมาคือปลาที่เลี้ยงด้วยอาหารทดลองสูตรที่ 4, 3, 1 (ชุดควบคุม) และ 2 โดยมีค่าเฉลี่ยกิจกรรมเอนไซม์ไลโซไซม์เท่ากับ 12.53±2.49, 11.85±1.78, 11.84±2.78 และ 11.56±1.41 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร การศึกษาในครั้งนี้ไม่พบความแตกต่างทางสถิติ ($p>0.05$) ของกิจกรรมเอนไซม์ไลโซไซม์ในปลาสายพันธุ์ที่เลี้ยงด้วยอาหารทดลองทั้ง 5 สูตรเป็นระยะเวลาทั้ง 4 และ 8 สัปดาห์ (ภาพที่ 8 ตารางภาคผนวกที่ 2)

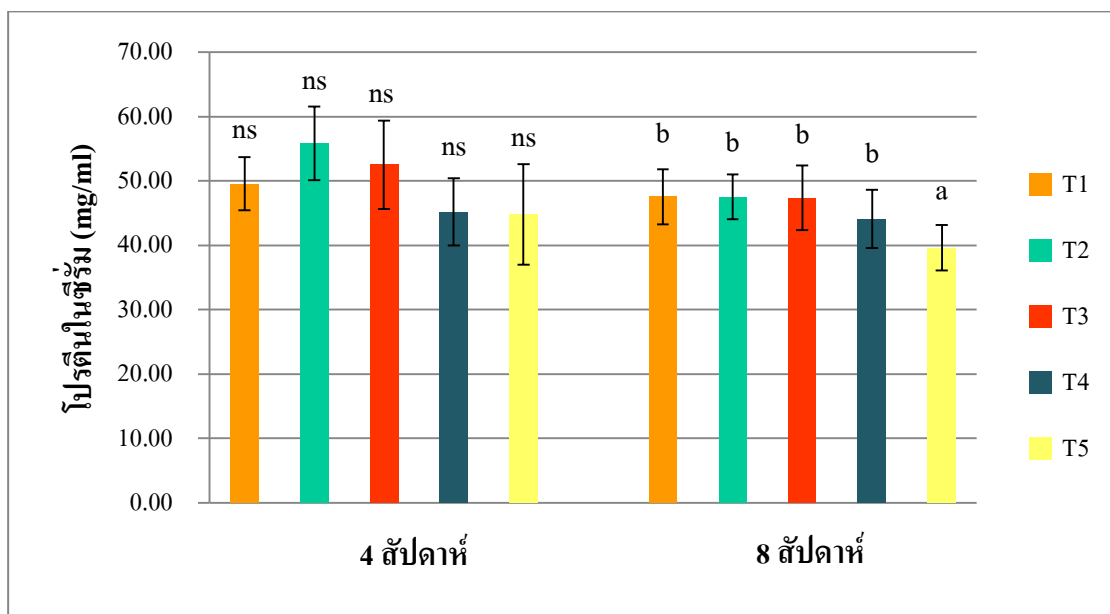


ภาพที่ 8 แสดงกิจกรรมของเอนไซม์ไลโซไซม์ของปลาสายพันธุ์ที่เลี้ยงด้วยอาหารทดลองทั้ง 5 สูตรเป็นระยะเวลา 4 และ 8 สัปดาห์

4.2.6 ปริมาณโปรตีนในซีรัม (serum protein)

การศึกษาปริมาณโปรตีนในซีรัมของปลาสายพันธุ์ที่เลี้ยงด้วยอาหารทดลองทั้ง 5 สูตรเป็นระยะเวลา 4 และ 8 สัปดาห์ พบว่าในช่วง 4 สัปดาห์แรกปลาที่เลี้ยง

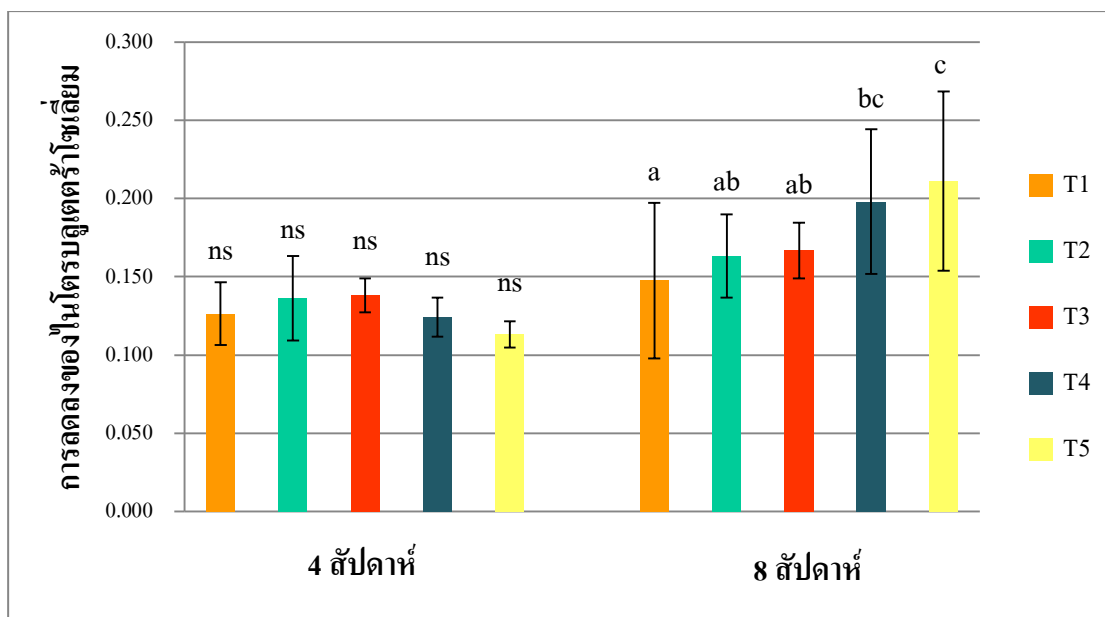
ด้วยอาหารทดลองสูตรที่ 2 คือเสริมด้วย ALA ที่ระดับความเข้มข้น 2.5 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม มีระดับปริมาณโปรตีนในซีรัมสูงสุดเท่ากับ 55.82 ± 5.74 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร แต่ไม่มีความแตกต่างทางสถิติ ($p > 0.05$) กับปลาที่เลี้ยงด้วยอาหารเสริม ALA ที่ระดับความเข้มข้น 0 (ชุดควบคุม), 5.0, 7.5 และ 10.0 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร โดยมีค่าเฉลี่ยปริมาณโปรตีนในซีรัมเท่ากับ 49.60 ± 4.11 , 52.53 ± 6.90 , 45.19 ± 5.20 และ 44.81 ± 7.78 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ (ภาพที่ 9 ตารางภาคผนวกที่ 1) เมื่อเลี้ยงเป็นระยะเวลา 8 สัปดาห์ พบว่าปลาที่เลี้ยงด้วยอาหารทดลองสูตรที่ 1 (ชุดควบคุม) มีปริมาณโปรตีนในซีรัมสูงสุดเท่ากับ 47.56 ± 4.25 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร รองลงมาคือปลาที่เลี้ยงด้วยอาหารเสริม ALA ที่ระดับความเข้มข้น 2.5, 5.0, 7.5 และ 10 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัมโดยมีค่าเฉลี่ยปริมาณโปรตีนในซีรัมเท่ากับ 47.51 ± 3.49 , 47.38 ± 4.99 , 44.10 ± 4.52 และ 39.62 ± 3.57 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ (ตารางที่ 8) โดยปลาที่เลี้ยงด้วยอาหารทดลองเสริม ALA ที่ระดับความเข้มข้น 0, 2.5, 5 และ 7.5 มีปริมาณโปรตีนในซีรัมไม่แตกต่างกันทางสถิติ ($p > 0.05$) แต่ปลาที่เลี้ยงด้วยอาหารสูตรที่ 5 มีปริมาณโปรตีนในซีรัมน้อยกว่าปลาที่เลี้ยงด้วยอาหารทดลองสูตรอื่นๆ อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) (ภาพที่ 9 ตารางภาคผนวกที่ 2)



ภาพที่ 9 แสดงปริมาณ โปรตีนในซีรัมของปลาสายปรับปรุงสายพันธุ์ที่เลี้ยงด้วยอาหารทดลอง ทั้ง 5 สูตรเป็นระยะเวลา 4 และ 8 สัปดาห์

4.2.7 การลดลงของไนโตรบลูเตตราโซเลียม (nitroblue tetrazolium)

การศึกษาการลดลงของไนโตรบลูเตตราโซเลียมในปลาชวาปรับปรุงสายพันธุ์ที่เลี้ยงด้วยอาหารทดลองทั้ง 5 สูตรเป็นระยะเวลา 4 และ 8 สัปดาห์ พบว่าการลดลงของไนโตรบลูเตตราโซเลียมในปลาชวาปรับปรุงสายพันธุ์ในช่วง 4 สัปดาห์แรกมีค่าเฉลี่ยสูงสุดในปลาที่เลี้ยงด้วยอาหารทดลองสูตรที่ 3 คือเสริมด้วย ALA ที่ระดับความเข้มข้น 5.0 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัมมีค่าเฉลี่ยสูงสุดเท่ากับ 0.138 ± 0.011 รองลงมาคือปลาที่เลี้ยงด้วยอาหารสูตรที่ 2, 1, 4 และ 5 โดยมีค่าเฉลี่ยการลดลงของไนโตรบลูเตตราโซเลียมเท่ากับ 0.136 ± 0.027 , 0.126 ± 0.020 , 0.124 ± 0.013 และ 0.113 ± 0.008 ตามลำดับ ไม่พบความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p > 0.05$) ของค่าเฉลี่ยการลดลงของไนโตรบลูเตตราโซเลียมในปลาที่เลี้ยงด้วยอาหารทดลองทั้ง 5 สูตร ในช่วง 4 สัปดาห์แรก (ภาพที่ 10 ตารางภาคผนวกที่ 1) ส่วนในช่วงสัปดาห์ที่ 8 ปลาชวาปรับปรุงสายพันธุ์ที่เลี้ยงด้วยอาหารสูตรที่ 5 คือเสริมด้วย ALA ที่ระดับความเข้มข้น 10.0 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัมมีค่าเฉลี่ยการลดลงของไนโตรบลูเตตราโซเลียมสูงสุดเท่ากับ 0.211 ± 0.057 รองลงมาคือปลาที่เลี้ยงด้วยอาหารทดลองสูตรที่ 4, 3, 2 และ 1 มีค่าเฉลี่ยการลดลงของไนโตรบลูเตตราโซเลียมเท่ากับ 0.197 ± 0.046 , 0.167 ± 0.018 , 0.163 ± 0.027 และ 0.148 ± 0.05 ตามลำดับ โดยปลาที่เลี้ยงด้วยอาหารทดลองสูตรที่ 5 มีการลดลงของไนโตรบลูเตตราโซเลียมไม่แตกต่างกันทางสถิติ ($p > 0.05$) กับปลาที่เลี้ยงด้วยอาหารทดลองสูตรที่ 4 แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) กับปลาที่เลี้ยงด้วยอาหารทดลองสูตรที่ 1 (ชุดควบคุม), 2 และ 3 (ภาพที่ 10 ตารางภาคผนวกที่ 2)

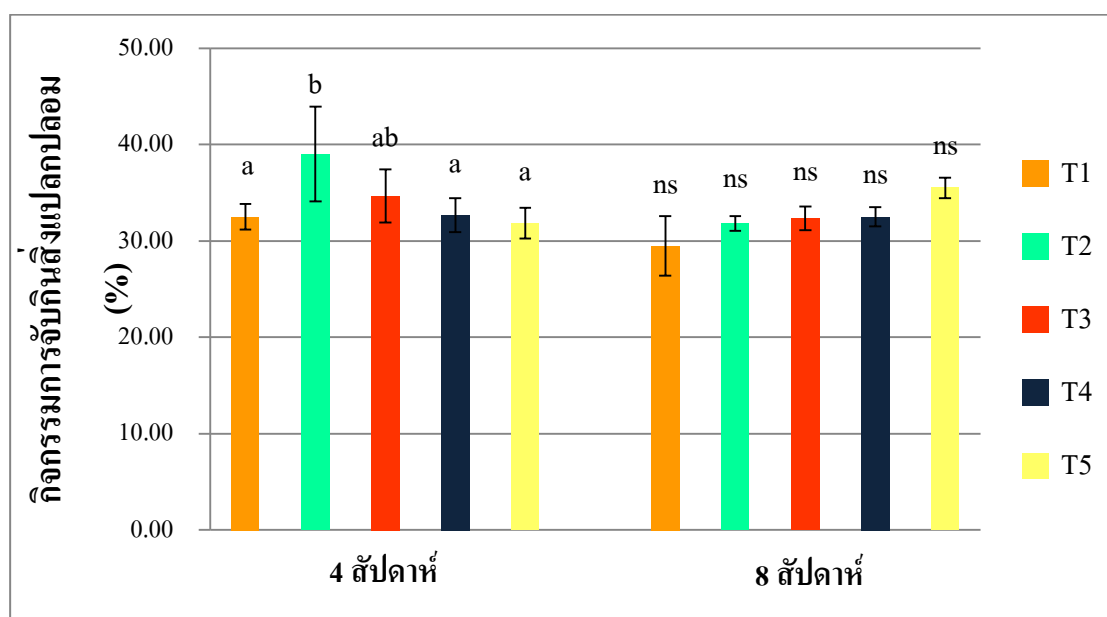


ภาพที่ 10 แสดงการลดลงของไนโตรบเลตเตร่าโซเลียมของปลาสวยปรับปรุงสายพันธุ์ที่เลี้ยงด้วยอาหารทดลองทั้ง 5 สูตรเป็นระยะเวลา 4 และ 8 สัปดาห์

4.2.8 กิจกรรมการจับกินสิ่งแปลกปลอม

การศึกษากิจกรรมการจับกินสิ่งแปลกปลอมในปลาสวยปรับปรุงสายพันธุ์ที่เลี้ยงด้วยอาหารทดลองทั้ง 5 สูตรเป็นระยะเวลา 4 และ 8 สัปดาห์ พบว่าในช่วง 4 สัปดาห์แรกปลาที่เลี้ยงด้วยอาหารทดลองสูตรที่ 2 คือเสริมด้วย ALA ที่ระดับความเข้มข้น 2.5 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม มีกิจกรรมการจับกินสิ่งแปลกปลอมสูงสุดเท่ากับ 39.00 ± 4.92 เปอร์เซ็นต์ รองลงมาคือปลาที่เลี้ยงด้วยอาหารทดลองสูตรที่ 3, 4, 1 และ 5 มีค่าเฉลี่ยกิจกรรมการจับกินแปลกปลอมเท่ากับ 34.67 ± 2.75 , 32.67 ± 1.76 , 32.50 ± 1.32 และ 31.83 ± 1.61 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ โดยปลาที่เลี้ยงด้วยอาหารทดลองสูตรที่ 2 และ 3 มีกิจกรรมการจับกินสิ่งแปลกปลอมไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p > 0.05$) แต่ปลาที่เลี้ยงด้วยอาหารทดลองสูตรที่ 2 มีกิจกรรมการจับกินสิ่งแปลกปลอมต่างจากปลาที่เลี้ยงด้วยอาหารทดลองสูตรที่ 1, 4 และ 5 อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) (ภาพที่ 11 ตารางภาคผนวกที่ 1) ส่วนกิจกรรมการจับกินสิ่งแปลกปลอมในช่วง 8 สัปดาห์ พบว่าปลาที่เลี้ยงด้วยอาหารทดลองสูตรที่ 5 คือเสริมด้วย ALA ที่ระดับความเข้มข้น 10.0 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัมมีกิจกรรม

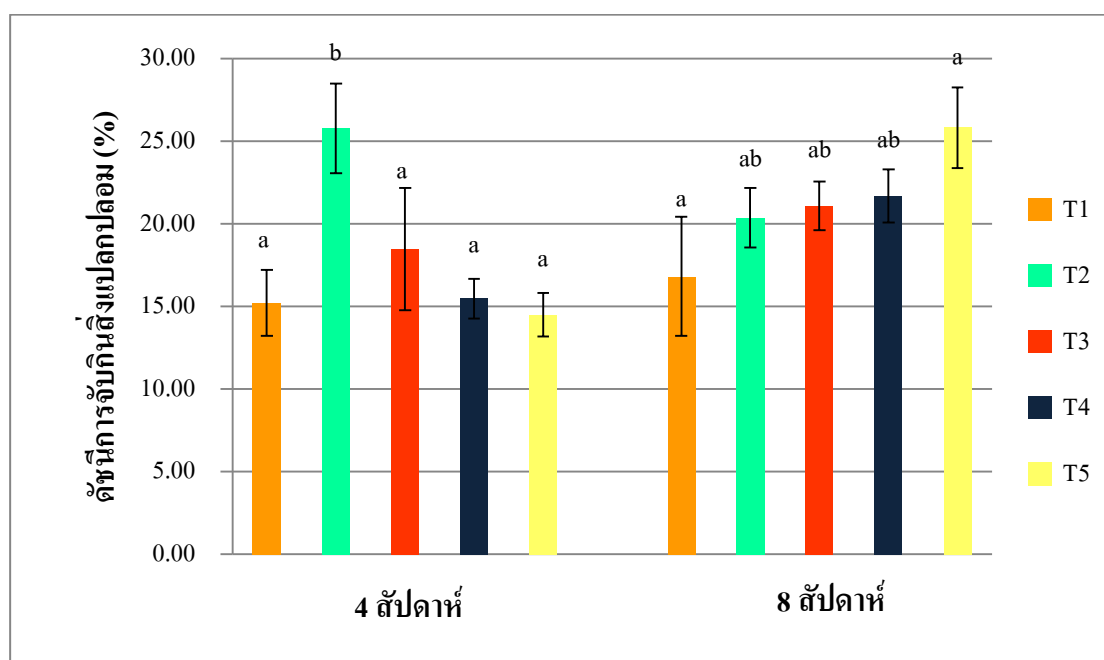
การจับกินสิ่งแปลกปลอมสูงสุดเท่ากับ 35.50 ± 1.05 เปอร์เซ็นต์ แต่ไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p > 0.05$) กับปลาที่เลี้ยงด้วยอาหารทดลองสูตรที่ 4, 3, 2 และ 1 โดยมีกิจกรรมการจับกินสิ่งแปลกปลอมเท่ากับ 32.50 ± 1.00 , 32.33 ± 1.26 , 31.83 ± 0.76 และ 29.50 ± 3.08 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ (ภาพที่ 11 ตารางภาคผนวกที่ 2)



ภาพที่ 11 แสดงกิจกรรมการจับกินสิ่งแปลกปลอมของปลาสาวยปรับปรุงสายพันธุ์ที่เลี้ยงด้วยอาหารทดลองทั้ง 5 สูตรเป็นระยะเวลา 4 และ 8 สัปดาห์

ดัชนีการจับกินสิ่งแปลกปลอมของปลาสาวยปรับปรุงสายพันธุ์ในช่วง 4 สัปดาห์แรกที่เลี้ยงด้วยอาหารทดลองสูตรที่ 2 คือเสริมด้วย ALA ที่ระดับความเข้มข้น 2.5 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม มีค่าสูงสุดเท่ากับ 25.77 ± 7.72 เปอร์เซ็นต์ แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) กับปลาที่เลี้ยงด้วยอาหารทดลองสูตรที่ 1, 3, 4 และ 5 ซึ่งมีค่าเฉลี่ยดัชนีการจับกินสิ่งแปลกปลอมเท่ากับ 15.20 ± 1.99 , 18.47 ± 3.69 , 15.47 ± 1.19 , และ 14.49 ± 1.32 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ (ภาพที่ 12 ตารางภาคผนวกที่ 1) ส่วนในช่วง 8 สัปดาห์ ค่าดัชนีการจับกินสิ่งแปลกปลอมของปลาสาวยปรับปรุงสายพันธุ์มีค่าสูงสุดในปลาที่เลี้ยงด้วยอาหารทดลองสูตรที่ 5 คือเสริมด้วย ALA ที่ระดับความเข้มข้น 10 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม โดยมีค่าเฉลี่ยเท่ากับ 25.81 ± 2.45 เปอร์เซ็นต์ รองลงมาคือปลาที่เลี้ยงด้วย

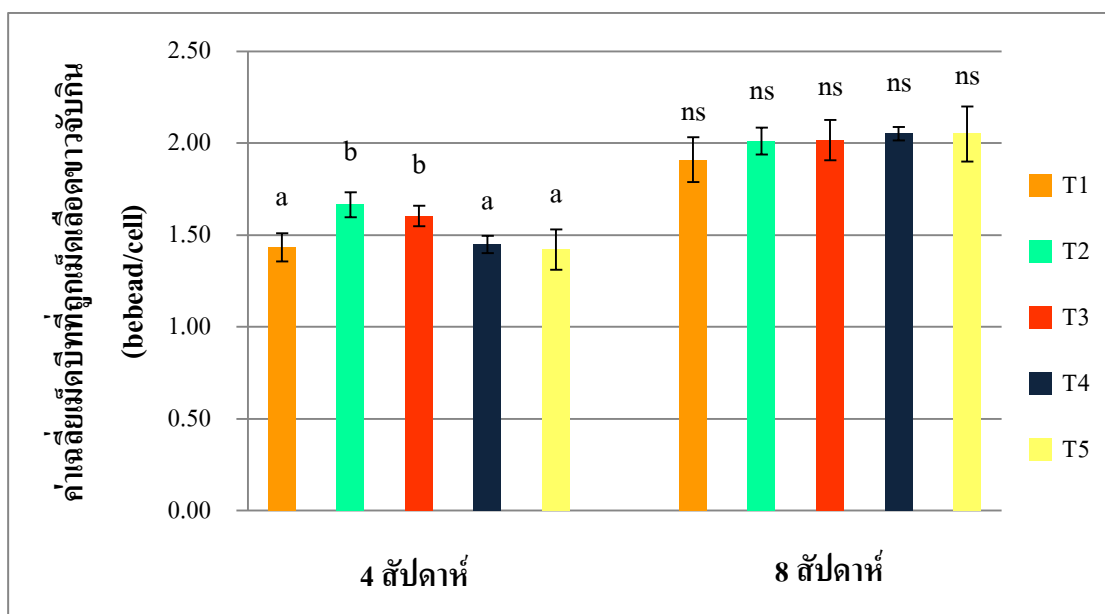
อาหารทดลองสูตรที่ 4, 3, 2 และ 1 มีค่าเฉลี่ยดัชนีการจับกินสิ่งแปลกปลอมเท่ากับ 21.69 ± 1.60 , 21.09 ± 1.48 , 20.37 ± 1.79 และ 16.81 ± 3.60 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ โดยปลาที่เลี้ยงด้วยอาหารทดลองสูตรที่ 5 มีค่าดัชนีการจับกินสิ่งแปลกปลอมสูงสุดแตกต่างจากปลาที่ได้รับอาหารชุดควบคุมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) (ภาพที่ 12 ตารางภาคผนวกที่ 2)



ภาพที่ 12 แสดงค่าดัชนีการจับกินสิ่งแปลกปลอมของปลาสายปรับปรุงสายพันธุ์ที่เลี้ยงด้วยอาหารทดลองทั้ง 5 สูตรเป็นระยะเวลา 4 และ 8 สัปดาห์

ในช่วง 4 สัปดาห์แรกค่าเฉลี่ยเม็ดบีดที่ถูกเม็ดเลือดขาวจับกินของปลาสายปรับปรุงสายพันธุ์ที่ได้รับอาหารทดลองสูตรที่ 2 คือเสริม ALA ที่ระดับความเข้มข้น 2.5 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัมมีค่าสูงสุดเท่ากับ 1.67 ± 0.07 เม็ดต่อเซลล์ รองลงมาคือปลาที่ได้รับอาหารทดลองสูตรที่ 3, 4, 1 และ 5 มีค่าเฉลี่ยเม็ดบีดที่ถูกเม็ดเลือดขาวจับกินเท่ากับ 1.60 ± 0.06 , 1.45 ± 0.05 , 1.43 ± 0.08 และ 1.42 ± 0.11 เม็ดต่อเซลล์ ตามลำดับ ปลาที่เลี้ยงด้วยอาหารทดลองสูตรที่ 2 มีค่าเฉลี่ยเม็ดบีดที่ถูกเม็ดเลือดขาวจับกินไม่แตกต่างทางสถิติ ($p > 0.05$) กับปลาที่เลี้ยงด้วยอาหารทดลองสูตรที่ 2 แต่มีค่าเฉลี่ยเม็ดบีดที่ถูกเม็ดเลือดขาวจับกินต่างกับปลาที่เลี้ยงด้วยอาหารทดลองสูตรที่ 1, 4 และ 5 อย่าง

มีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) (ภาพที่ 13 ตารางภาคผนวกที่ 1) ในช่วง 8 สัปดาห์ ค่าเฉลี่ยเม็ดบีทที่ถูกเม็ดเลือดขาวจับกิน ถูกเม็ดเลือดขาวจับกินมีค่าสูงสุดในปลาที่เลี้ยงด้วยอาหารทดลองสูตรที่ 5 คือเสริมด้วย ALA ที่ระดับความเข้มข้น 10 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม มีค่าเฉลี่ยเท่ากับ 2.05 ± 0.15 เม็ดต่อเซลล์ แต่ไม่ต่างทางสถิติ ($p > 0.05$) กับปลาที่เลี้ยงด้วยอาหารทดลองสูตรที่ 4, 3, 2 และ 1 ซึ่งมีค่าเฉลี่ยเท่ากับ 2.05 ± 0.04 , 2.02 ± 0.11 , 2.01 ± 0.07 และ 1.91 ± 0.12 เม็ดต่อเซลล์ ตามลำดับ (ภาพที่ 13 ตารางภาคผนวกที่ 2)

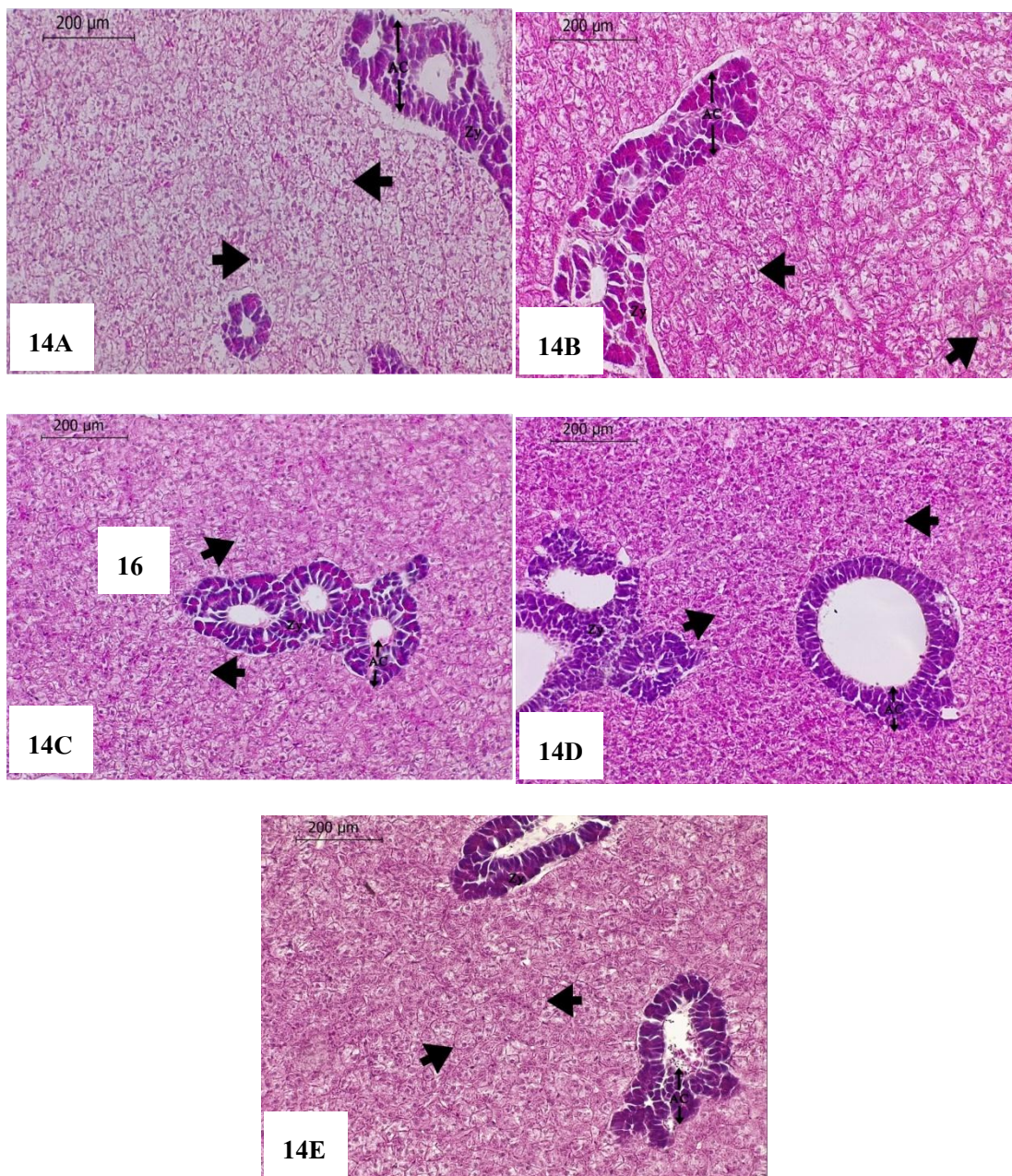


ภาพที่ 13 แสดงค่าเฉลี่ยเม็ดบีทที่ถูกเม็ดเลือดขาวจับกินของปลาสายปรับปรุงสายพันธุ์ที่เลี้ยงด้วยอาหารทดลองทั้ง 5 สูตรเป็นระยะเวลา 4 และ 8 สัปดาห์

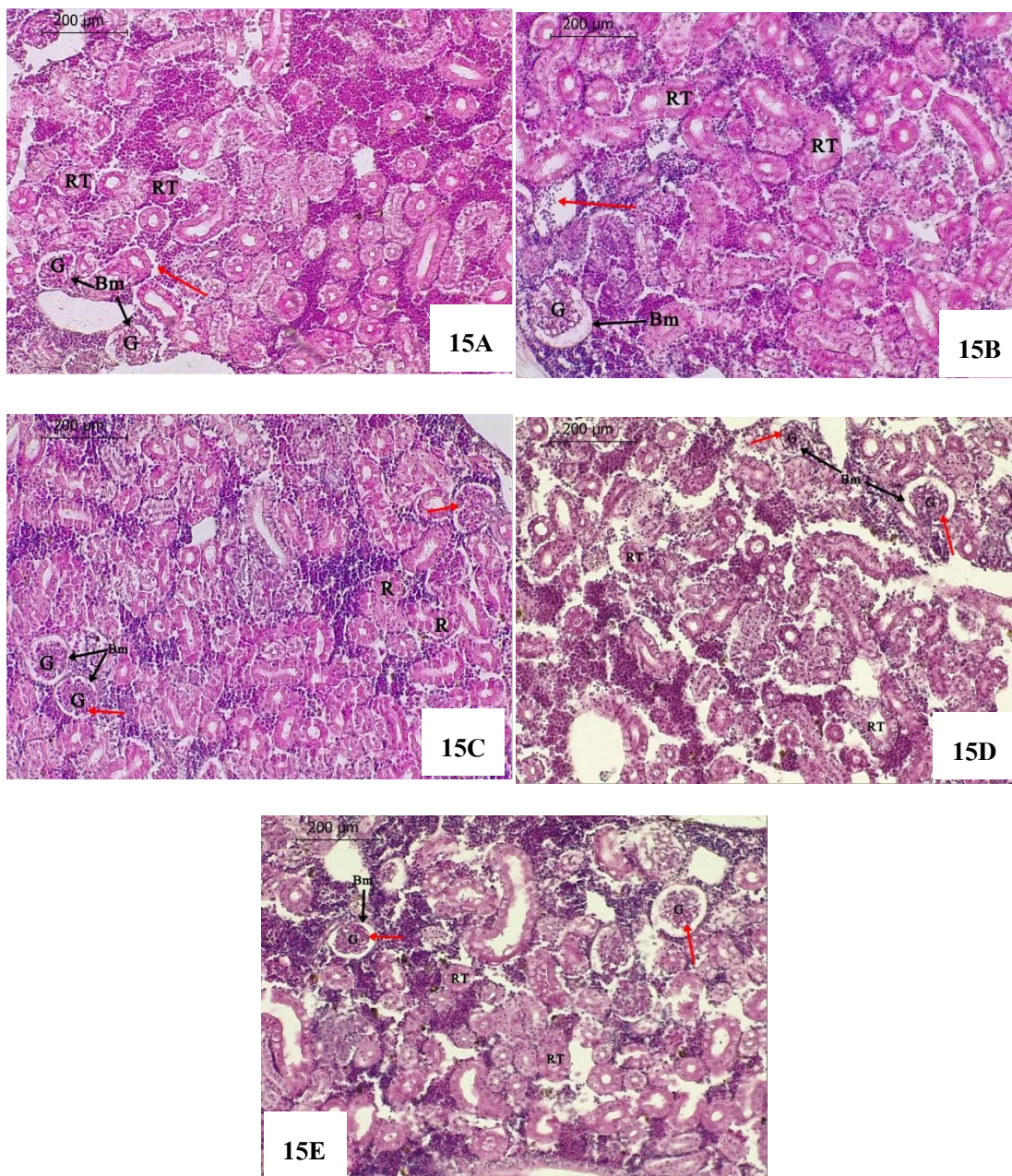
4.3 ผลการศึกษาการเปลี่ยนแปลงทางพยาธิสภาพของปลาสวายปรับปรุงสายพันธุ์ที่เลี้ยงด้วยอาหารทดลองเสริมด้วยสารสกัด ALA

4.3.1 การเปลี่ยนแปลงทางพยาธิสภาพของปลาสวายปรับปรุงสายพันธุ์ที่เลี้ยงด้วยอาหารทดลองเป็นเวลา 4 สัปดาห์

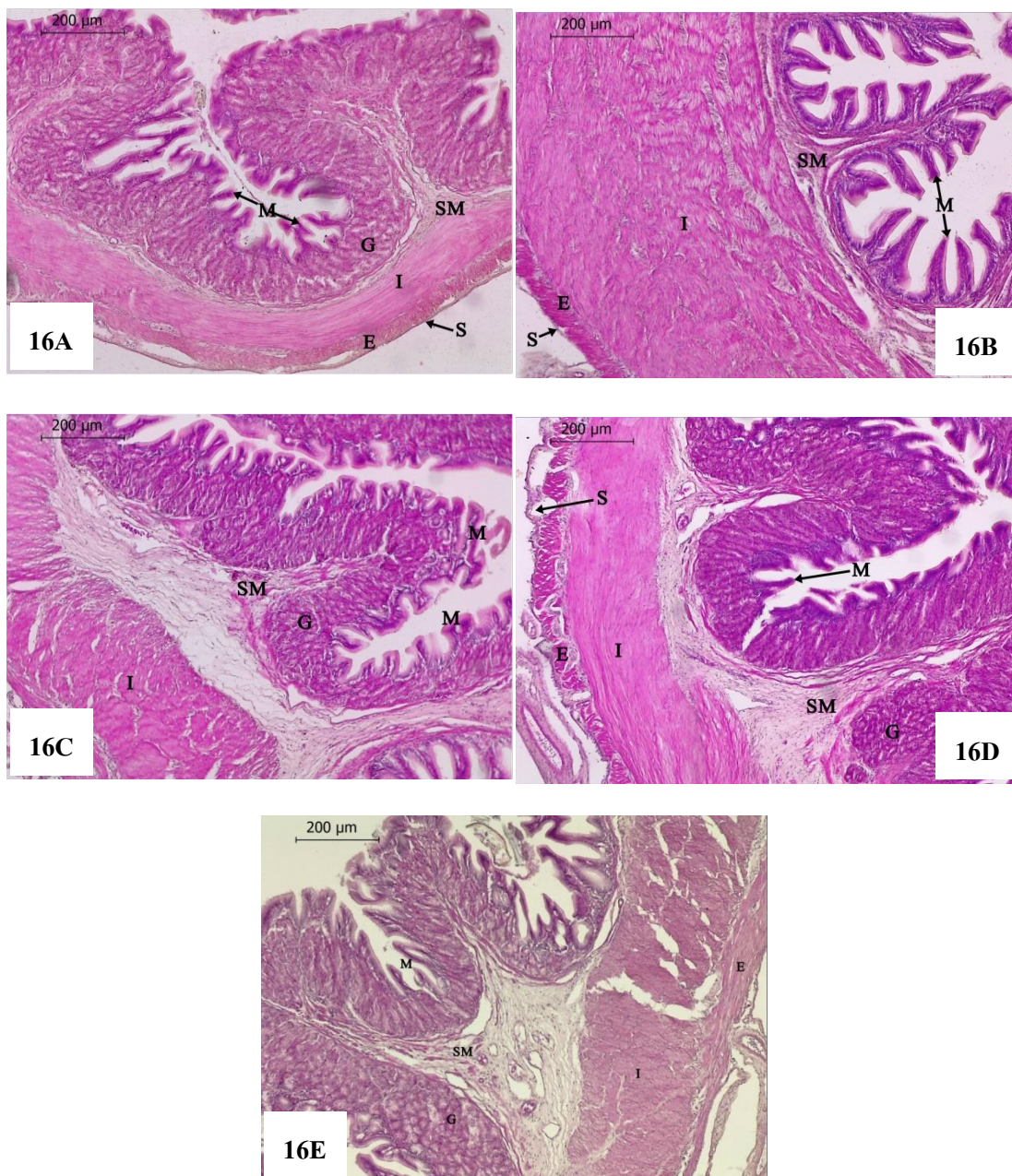
การศึกษากการเปลี่ยนแปลงทางพยาธิสภาพของเนื้อเยื่อ ตับ กระเพาะอาหาร ไต และลำไส้ของปลาสวายปรับปรุงสายพันธุ์ หลังได้รับอาหารทดลองเสริมด้วย ALA ที่ระดับความเข้มข้น 0 (ชุดควบคุม), 2.5, 5.0, 7.5 และ 10.0 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม โดยเลี้ยงเป็นระยะเวลา 4 สัปดาห์ พบว่า ALA ที่เสริมในอาหารทดลองระดับความเข้มข้น 0 (ชุดควบคุม), 2.5, 5.0, 7.5 และ 10.0 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม ไม่ส่งผลทำให้เนื้อเยื่อตับ ไต กระเพาะอาหาร และลำไส้ โดยปลาที่ได้รับอาหารผสม ALA ทุกชุดการทดลองมีรูปร่างและการจัดเรียงตัวของเซลล์ตับและตับอ่อนเป็นปกติ (ภาพที่ 14) เซลล์บริเวณท่อไตและโกลเมอรูลัสมีรูปร่าง และการจัดเรียงตัวเป็นปกติ (ภาพที่ 15) บริเวณกระเพาะอาหารพบต่อมสร้างน้ำย่อย เนื้อเยื่อชั้น mucosa ชั้น submucosa ชั้น internal mucosa layer ชั้น external mucosa layer และชั้น serosa มีรูปร่างและการจัดเรียงตัวเป็นปกติ (ภาพที่ 16) และพบเนื้อเยื่อบริเวณลำไส้ได้แก่ ชั้น mucosa ชั้น lamina propria ชั้น internal muscular layer ชั้น external muscular layer และชั้น serosa มีรูปร่างและการจัดเรียงตัวของเซลล์เป็นปกติ



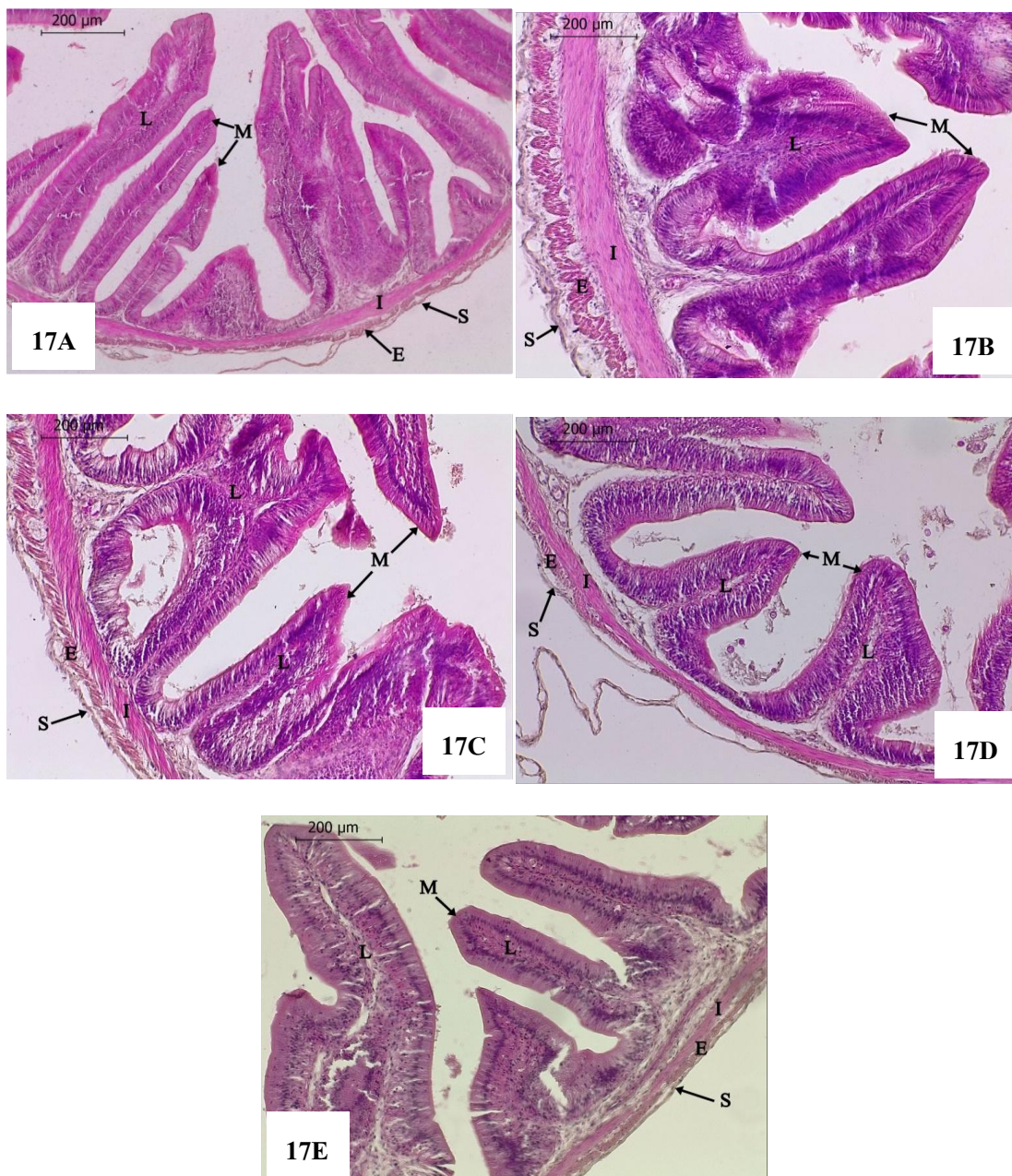
ภาพที่ 14 เนื้อเยื่อตับปลาสาวยปรับปรุงสายพันธุ์ที่เลี้ยงด้วยอาหารชุดควบคุม (14A) เสริม ALA 2.5 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม (14B) 5.0 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม (14C) 7.5 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม (14D) และ 10 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม (14E) เป็นเวลา 4 สัปดาห์ พบการจัดเรียงตัวและรูปร่างของเซลล์ตับ (arrow head) เป็นปกติ; zymogen granules-Zy, acinar cell-AC (H&E, Bar= 200 μm)



ภาพที่ 15 เนื้อเยื่อไตปลาสาวยปรับปรุงสายพันธุ์ที่เลี้ยงด้วยอาหารชุดควบคุม (15A) เสริม ALA 2.5 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม (15B) 5.0 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม (15C) 7.5 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม (15D) และ 10 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม (15E) เป็นเวลา 4 สัปดาห์ พบการจัดเรียงตัวและรูปร่างของเซลล์บริเวณท่อไตและโกลเมอรูลัสเป็นปกติ; glomerulus-G, Bowman's capsule-Bm, renal tubules-RT, red blood cell in capillary (red arrow) (H&E, Bar= 200 μm)



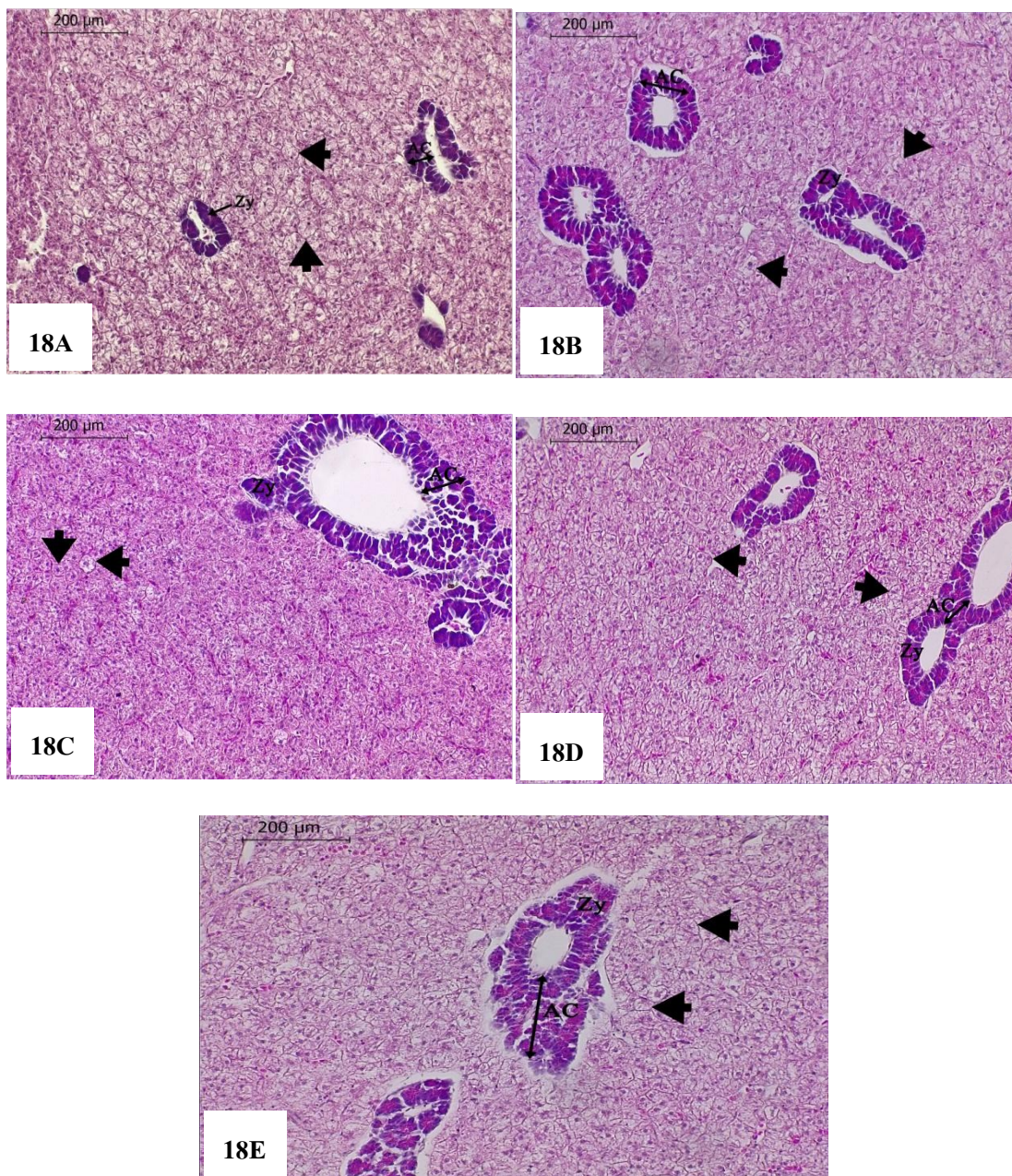
ภาพที่ 16 เนื้อเยื่อกระเพาะอาหารปลาสาวยปรับปรุงสายพันธุ์ที่เลี้ยงด้วยอาหารชุดควบคุม (16A) เสริม ALA 2.5 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม (16B) 5.0 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม (16C) 7.5 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม (16D) และ 10 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม (16E) เป็นเวลา 4 สัปดาห์ พบการจัดเรียงตัวและรูปร่างของเซลล์บริเวณเยื่อผนังกระเพาะอาหารเป็นปกติ; mucosa (M), gastric glands (G), submucosa (SM), internal muscular layer (I), external muscular layer (E), serosa (S), (H&E, Bar= 200 µm)



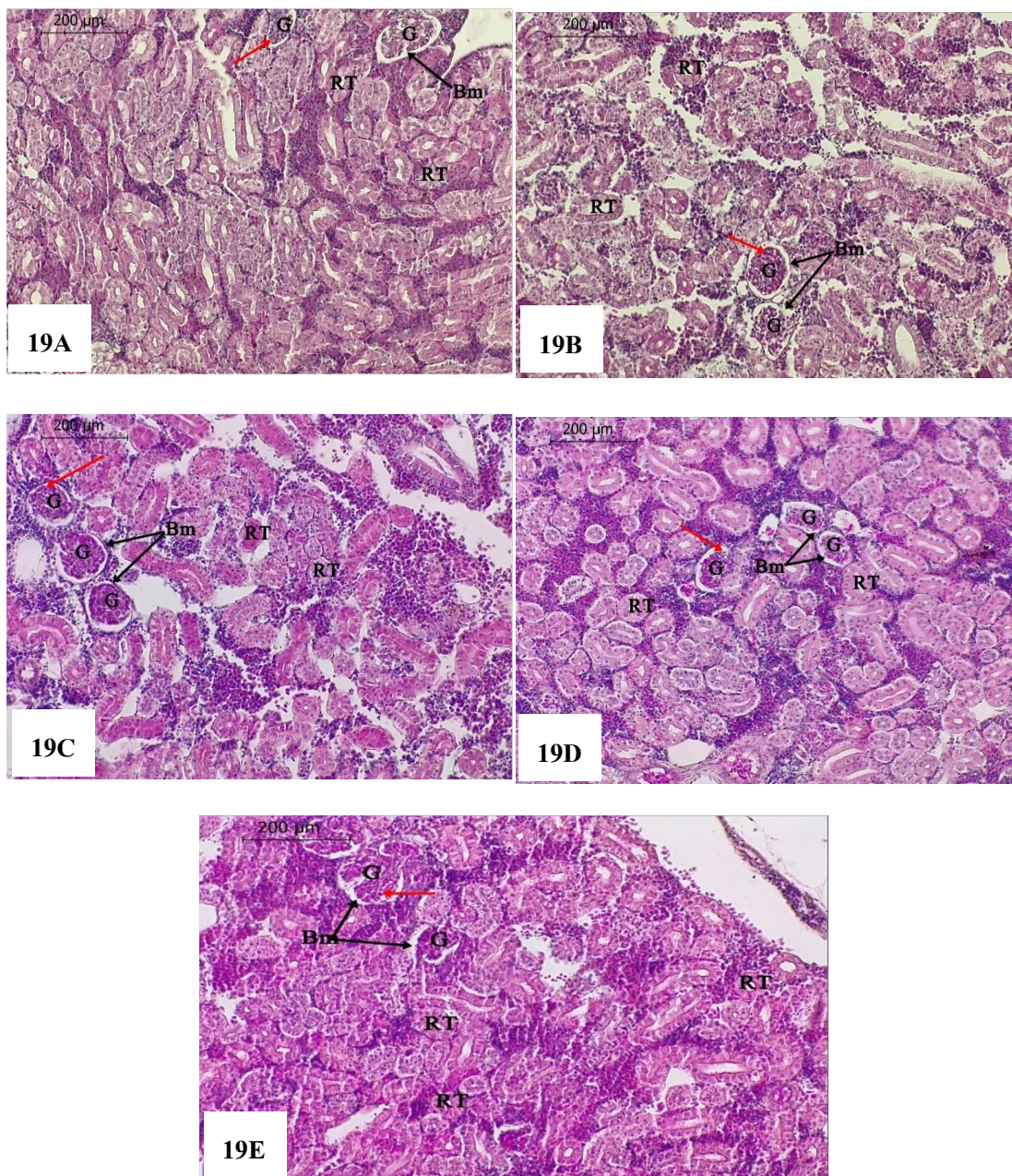
ภาพที่ 17 เนื้อเยื่อลำไส้ปลาสาวยปรับปรุงสายพันธุ์ที่เลี้ยงด้วยอาหารชุดควบคุม (17A) เสริม ALA 2.5 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม (17B) 5.0 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม (17C) 7.5 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม (17D) และ 10 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม (17E) เป็นเวลา 4 สัปดาห์ พบการจัดเรียงตัวและรูปร่างของเซลล์บริเวณเยื่อผนังลำไส้เป็นปกติ; mucosa (M), lamina propria (L), internal muscular layer (I), external muscular layer (E), serosa (S), (H&E, Bar= 200 µm)

4.3.2 การเปลี่ยนแปลงทางพยาธิสภาพของปลาสวายปรับปรุงสายพันธุ์ที่เลี้ยงด้วยอาหาร ทดลองเป็นเวลา 8 สัปดาห์

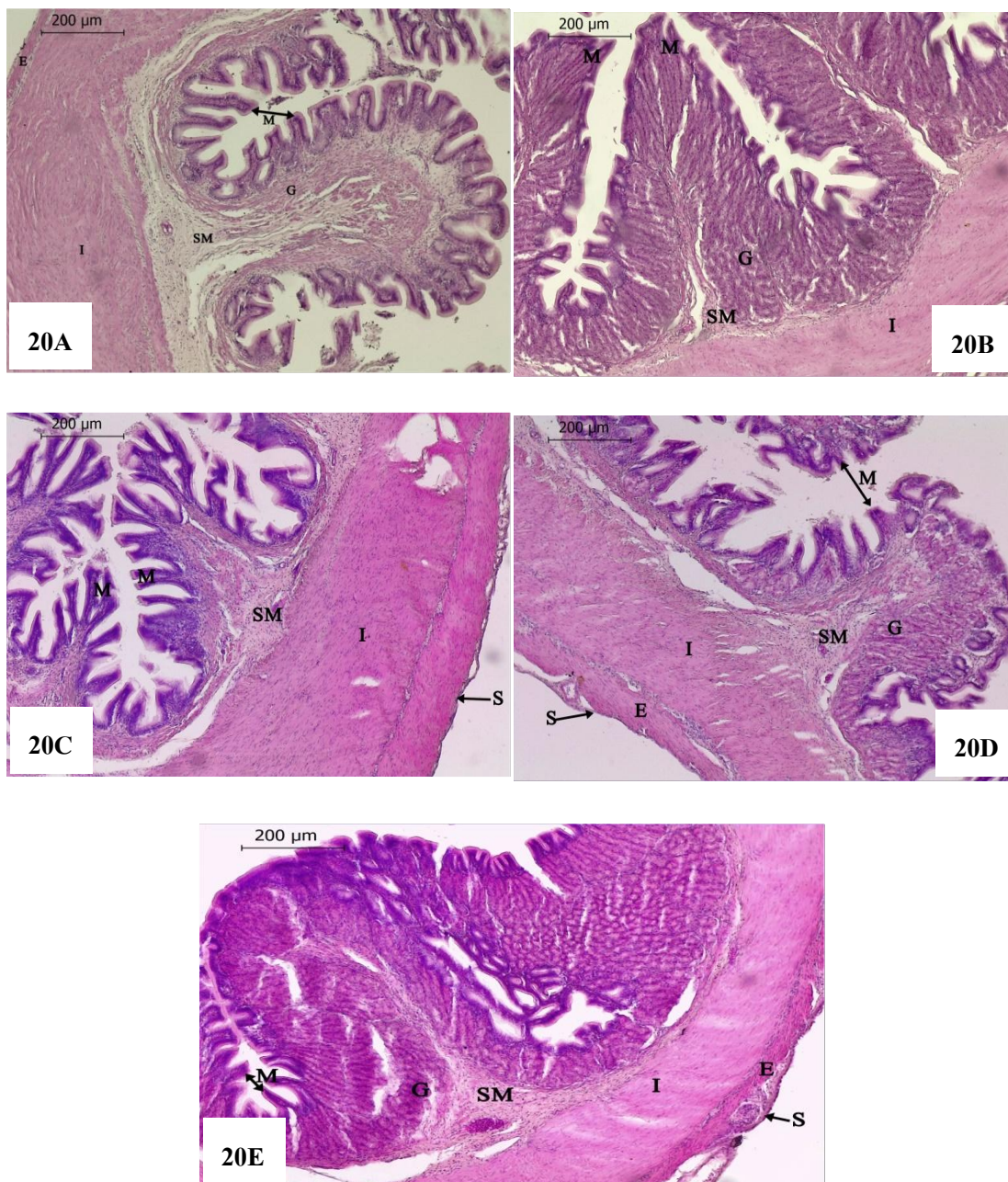
การศึกษาการเปลี่ยนแปลงทางพยาธิสภาพของเนื้อเยื่อ ตับ ภาวะเพาะอาหาร ไต และลำไส้ของปลาสวายปรับปรุงสายพันธุ์ หลังได้รับอาหารทดลองเสริมด้วย ALA ที่ระดับความเข้มข้น 0 (ชุดควบคุม), 2.5, 5.0, 7.5 และ 10.0 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม โดยเลี้ยงเป็นระยะเวลา 8 สัปดาห์ พบว่า ALA ที่เสริมในอาหารทดลองระดับความเข้มข้น 0 (ชุดควบคุม), 2.5, 5.0, 7.5 และ 10.0 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม ไม่ส่งผลทำให้เนื้อเยื่อตับ ไต ภาวะเพาะอาหาร และลำไส้ โดยปลาที่ได้รับอาหารผสม ALA ทุกชุดการทดลองมีรูปร่างและการจัดเรียงตัวของเซลล์ตับและตับอ่อนเป็นปกติ (ภาพที่ 14) เซลล์บริเวณท่อไตและโกลเมอรูลัสมีรูปร่าง และการจัดเรียงตัวเป็นปกติ (ภาพที่ 15) บริเวณภาวะอาหารพบต่อมสร้างน้ำย่อย เนื้อเยื่อชั้น mucosa ชั้น submucosa ชั้น internal mucosa layer ชั้น external mucosa layer และชั้น serosa มีรูปร่างและการจัดเรียงตัวเป็นปกติ (ภาพที่ 16) และพบเนื้อเยื่อบริเวณลำไส้ได้แก่ ชั้น mucosa ชั้น lamina propria ชั้น internal muscular layer ชั้น external muscular layer และชั้น serosa มีรูปร่างและการจัดเรียงตัวของเซลล์เป็นปกติ



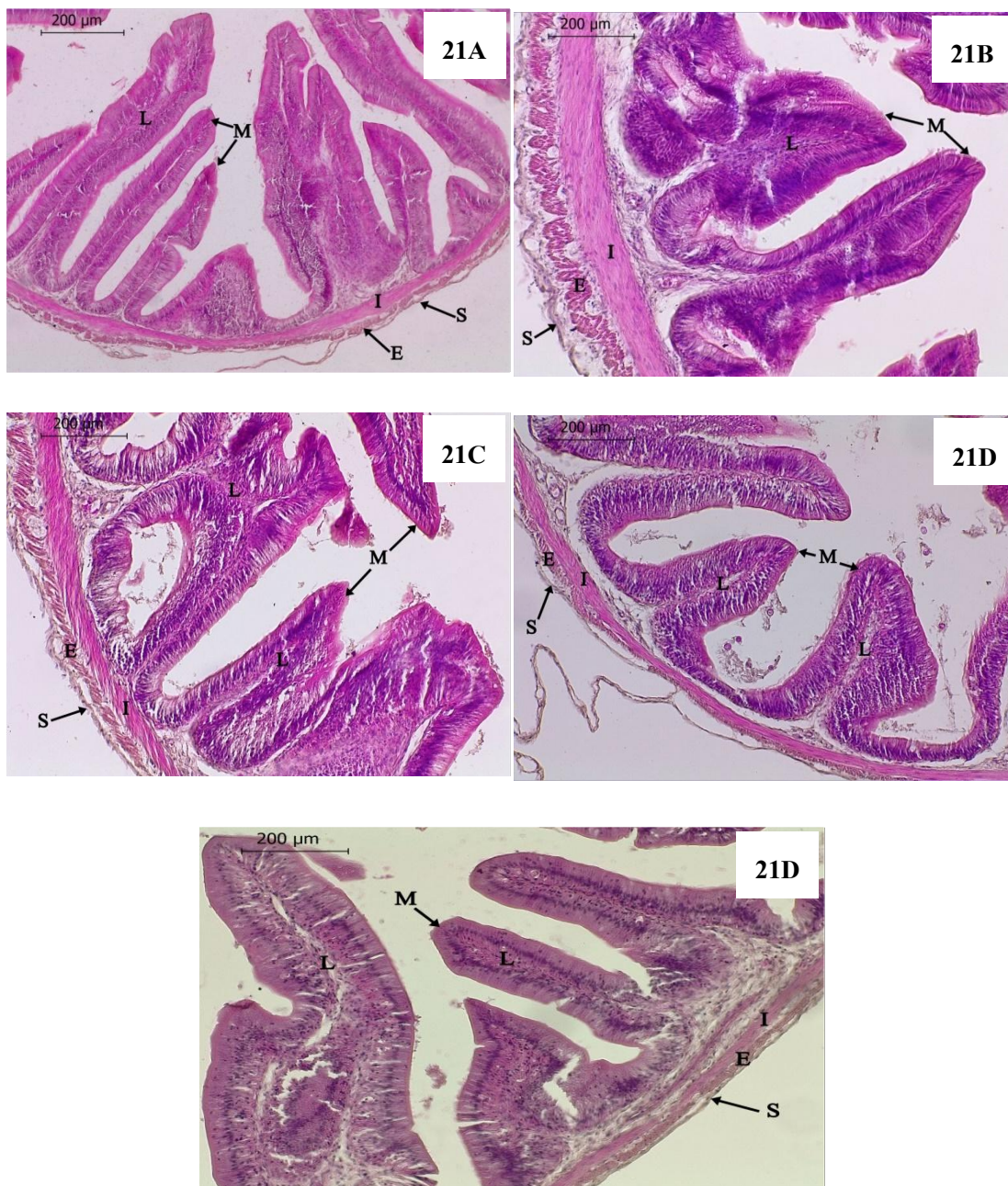
ภาพที่ 18 เนื้อเยื่อตับปลาสาวยปรับปรุงสายพันธุ์ที่เลี้ยงด้วยอาหารชุดควบคุม (18A) เสริม ALA 2.5 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม (18B) 5.0 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม (18C) 7.5 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม (18D) และ 10 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม (18E) เป็นเวลา 8 สัปดาห์ พบการจัดเรียงตัวและรูปร่างของเซลล์ตับ (arrow head) เป็นปกติ; zymogen granules-Zy, acinar cell-AC (H&E, Bar= 200 µm)



ภาพที่ 19 เนื้อเยื่อไตปลาสาวยปรับปรุงสายพันธุ์ที่เลี้ยงด้วยอาหารซดควมคุม (19A) เสริม ALA 2.5 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม (19B) 5.0 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม (19C) 7.5 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม (19D) และ 10 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม (19E) เป็นเวลา 8 สัปดาห์ พบการจัดเรียงตัวและรูปร่างของเซลล์บริเวณท่อไตและโกลเมอรูลัสเป็นปกติ; glomerulus-G, Bowman's capsule-Bm, renal tubules-RT, red blood cell in capillary (red arrow) (H&E, Bar= 200 μm)



ภาพที่ 20 เนื้อเยื่อกระเพาะอาหารปลาสาวยปรับปรุงสายพันธุ์ที่เลี้ยงด้วยอาหารชุกควม (20A) เสริม ALA 2.5 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม (20B) 5.0 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม (20C) 7.5 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม (20D) และ 10 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม (20E) เป็นเวลา 8 สัปดาห์ พบการจัดเรียงตัวและรูปร่างของเซลล์บริเวณเยื่อผนังกระเพาะอาหารเป็นปกติ; mucosa (M), gastric glands (G), submucosa (SM), internal muscular layer (I), external muscle layer (E), serosa (S), (H&E, Bar= 200 μm)



ภาพที่ 21 เนื้อเยื่อลำไส้ปลาสาวยปรับปรุงสายพันธุ์ที่เลี้ยงด้วยอาหารชุกควบคุม (21A) เสริม ALA 2.5 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม (21B) 5.0 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม (21C) 7.5 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม (21D) และ 10 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม (21E) เป็นเวลา 8 สัปดาห์ พบการจัดเรียงตัวและรูปร่างของเซลล์บริเวณเยื่อผนังลำไส้เป็นปกติ; mucosa (M), lamina propria (L), internal muscular layer (I), external muscular layer (E), serosa (S), (H&E, Bar= 200 μ m)

4.4 วิจารณ์ผลการทดลอง

ALA เป็นสารชีวภาพที่ไม่เป็นอันตรายต่อมนุษย์และสัตว์ สามารถกระตุ้นการเจริญเติบโตของพืชและสัตว์หลายชนิด (Tanaka *et al.*, 1992; Chen *et al.*, 2008; Wang *et al.*, 2011a) แต่เนื่องจาก ALA เป็นสารที่ไม่คงตัว สามารถสลายตัวได้ในอุณหภูมิและพีเอชสูง การเก็บรักษาชีวภัณฑ์ ALA ที่พีเอชเท่ากับ 8 อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ทำให้เกิดการสูญเสีย ALA ร้อยละ 61.15 แต่ในขณะที่การเก็บ ALA ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส พีเอชเท่ากับ 5 เกิดการสูญเสีย ALA เพียงร้อยละ 28.74 (พิชิต, 2550) ดังนั้นการเก็บรักษาชีวภัณฑ์ ALA และอาหารทดลองที่เสริม ALA จึงควรเก็บไว้ที่อุณหภูมิต่ำ การศึกษาผลของการเสริม ALA ในอาหารที่ระดับความเข้มข้นต่างๆ ต่อการเจริญเติบโต และการตอบสนองของภูมิคุ้มกันในปลาสายปรับปรุงสายพันธุ์ เป็นระยะเวลา 4 และ 8 สัปดาห์ พบว่าปลาสายปรับปรุงสายพันธุ์ที่ใช้ในการศึกษาครั้งนี้มีอัตราการเจริญเติบโตจำเพาะ (2.24-2.61 เปอร์เซ็นต์ต่อวัน) และอัตราการเปลี่ยนอาหารเป็นเนื้อ (1.02-1.19) ใกล้เคียงกับรายงานของวิศรุต และคณะ (2562) ที่ศึกษาการแทนที่ปลาป่นด้วยแหล่งโปรตีนจากพืชในอาหารปลาสายลูกผสมเป็นระยะเวลา 8 สัปดาห์ พบว่าปลาทดลองมีอัตราการเจริญเติบโตจำเพาะ (1.77-2.63 เปอร์เซ็นต์ต่อวัน) และอัตราการเปลี่ยนอาหารเป็นเนื้อ (1.12-1.50) การศึกษาในครั้งนี้พบว่าในช่วงระยะเวลา 4 สัปดาห์แรก ปลาที่เลี้ยงด้วยอาหารทดลองสูตรที่ 2 (ALA 2.5 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม) มีน้ำหนักสุดท้าย น้ำหนักที่เพิ่มขึ้น อัตราการเจริญเติบโตจำเพาะ และอัตราการเปลี่ยนอาหารเป็นเนื้อดีที่สุดอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) เมื่อเปรียบเทียบกับปลาในชุดการทดลองอื่นๆ ทั้งนี้เนื่องจาก ALA มีคุณสมบัติเป็นสารตั้งต้นในกระบวนการสังเคราะห์ฮีม (heme) โดยใช้เอนไซม์ ALA synthetase ทำหน้าที่ในการสังเคราะห์ ALA จากกรดอะมิโนไกลซีนและซัคซินิลโคเอ (Sattayasmitstid, 2002) จากนั้น ALA เปลี่ยนเป็น โปรโตพอร์ไฟริน (protoporphyrin IX) แล้วเกิดปฏิกิริยาการรวมตัวโดยใช้เอนไซม์เฟอร์โรเคลตาเซส (ferrochelatase) เปลี่ยนโปรโตพอร์ไฟรินเป็นฮีม (Hallberg and Hulthen, 2000) ในสารประกอบฮีมีโมเลกุลของธาตุเหล็กเป็นองค์ประกอบเมื่อฮีมรวมตัวกับ โปรตีน โกลบิน (globin) กลายเป็นสารประกอบฮีโมโกลบินในเม็ดเลือดแดงทำหน้าที่ในการลำเลียงออกซิเจนไปยังเซลล์ต่างๆ เพื่อใช้ในการบวนการเมแทบอลิซึม เพื่อสร้างพลังงานสำหรับการเจริญเติบโต และซ่อมแซมส่วนที่สึกหรอ ดังนั้นการเสริมอาหารด้วย ALA ในความเข้มข้นที่เหมาะสมจึงทำให้ปลามีการเจริญเติบโตที่ดี ผลการศึกษานี้สอดคล้องกับ Yan และ Kim (2011) ที่รายงานผลของการเสริม ALA ร่วมกับไลโคโอไลโกแซคคาไรด์ต่ออัตราการเจริญเติบโต ประสิทธิภาพการย่อยอาหาร และองค์ประกอบเลือดในลูกสุกรพันธุ์ผสม พบว่าลูกสุกรที่เลี้ยงด้วยอาหารเสริม ALA ที่ระดับความเข้มข้น 3 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม นาน 2 - 5 สัปดาห์ มีอัตราการเจริญเติบโตเฉลี่ยสูงสุดอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) เมื่อเปรียบเทียบกับลูกสุกรที่

เลี้ยงด้วยอาหารทดลองสูตรอื่น แต่แตกต่างกับรายงานของ Min และคณะ (2004) ที่รายงานว่า การส่งเสริมอัตราการเจริญเติบโตเฉลี่ยของลูกสุกรต้องใช้อาหารเสริม ALA ที่ระดับความเข้มข้นสูงถึง 500 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม และรายงานของ Chen และคณะ (2008) ที่ศึกษาผลของ ALA ต่อการเจริญเติบโตประสิทธิภาพการกินอาหาร องค์ประกอบเลือดและการตอบสนองต่อระบบภูมิคุ้มกันในลูกสุกรทั้งก่อนและหลังได้รับลิโปโพลีแซคคาไรด์ (LPS) จากเชื้อ *Escherichia coli* โดยพบว่า ลูกสุกรที่เลี้ยงด้วยอาหารทดลองเสริม ALA ที่ระดับความเข้มข้น 15 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม มีอัตราการเจริญเติบโตเฉลี่ยสูงที่สุดในสัปดาห์ที่ 5 แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) กับลูกสุกรที่เลี้ยงด้วยอาหารทดลองสูตรอื่น นอกจากนี้ยังพบว่าลูกสุกรที่เลี้ยงด้วยอาหารเสริมด้วย ALA มีเปอร์เซ็นต์น้ำหนักแห้งและปริมาณไนโตรเจนที่น้อยกว่าลูกสุกรที่เลี้ยงด้วยอาหารชุดการทดลองอื่น ($p < 0.05$) การศึกษาผลของการเสริม ALA ที่ระดับความเข้มข้นต่างๆ ในอาหารปลาสาวยปรับปรุงพันธุ์เป็นเวลานาน 8 สัปดาห์ พบว่าปลาที่เลี้ยงด้วยอาหารทดลองเสริมด้วย ALA ทั้ง 5 สูตร มีน้ำหนักสุดท้าย น้ำหนักที่เพิ่มขึ้น อัตราการเจริญเติบโตจำเพาะ และอัตราการเปลี่ยนอาหารเป็นเนื้อไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p > 0.05$) ซึ่งให้เห็นว่าการใช้ ALA เป็นระยะเวลา นานเกินไป ไม่ส่งเสริมการเจริญเติบโตของปลา ทั้งนี้อาจเนื่องจากระบบต่างๆ ภายในร่างกาย สิ่งมีชีวิต โดยเฉพาะอย่างยิ่งในสัตว์ จำเป็นต้องใช้สารอาหารและพลังงาน ดังนั้นเมื่อใช้สารกระตุ้น ภูมิคุ้มกันต่อเนื่องเป็นระยะเวลานาน พลังงานและสารอาหารอาจถูกนำมาใช้ในกระบวนการภูมิคุ้มกัน จึงทำให้ระบบอื่นๆ ภายในร่างกายได้รับสารอาหารและพลังงานไม่เพียงพอ ส่งผลทำให้อัตราการเจริญเติบโตช้าลง (Spurlock, 1997) ผลการศึกษาค้นคว้านี้ใกล้เคียงกับรายงานของ Wang และคณะ (2011a) ที่ศึกษาผลของ ALA ต่อการเจริญเติบโต ค่าองค์ประกอบเลือด และการตอบสนองของระบบภูมิคุ้มกันในลูกสุกรหย่านม พบว่า ALA ที่เสริมลงในอาหารไม่มีผลต่ออัตราการเจริญเติบโต ในลูกสุกรหย่านมที่เลี้ยงเป็นระยะเวลา 6 สัปดาห์

การศึกษากการเปลี่ยนแปลงองค์ประกอบเลือดและภูมิคุ้มกันของปลาสาวยปรับปรุงสายพันธุ์ที่ได้รับอาหารผสม ALA ที่ระดับความเข้มข้นต่างๆ พบว่าผลการทดลองมีความสอดคล้องกับการเจริญเติบโต โดยปลาที่เลี้ยงด้วยอาหารทดลองสูตรที่ 2 (ALA 2.5 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม) เป็นเวลานาน 4 สัปดาห์ มีปริมาณเม็ดเลือดแดง ฮีโมโกลบินรวม และค่าฮีมาโตคริตสูงที่สุด แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) กับปลาชุดควบคุม ทั้งนี้เนื่องจาก ALA เป็นสารตั้งต้นในกระบวนการสังเคราะห์ฮีม (heme) (Sattayasmithstid, 2002; Hallberg and Hulthen, 2000) ซึ่งต่อไป จะรวมตัวกับสายโกลบิน (globin chain) เกิดเป็นสารประกอบตัวใหม่คือ ฮีโมโกลบิน โดยฮีโมโกลบินมีโครงสร้างโมเลกุลที่ประกอบด้วยสายโพลีเปปไทด์ (polypeptide) ซึ่งเป็นหน่วยย่อย

ของโปรตีนที่เรียกว่าสายโกลบิน (globin chain) กับหมู่ฮีม (heme group) ซึ่งฮีมมีโครงสร้างทางเคมีเป็นพอร์ไฟริน (porphyrin) ที่มีโมเลกุลของเหล็ก (iron หรือ Fe) อยู่ตรงกลาง เพื่อทำหน้าที่จับและปล่อยออกซิเจน ฮีโมโกลบิน 1 โมเลกุล ประกอบด้วยสายโกลบินชนิดต่างกัน 2 ชนิดๆ ละ 2 สาย แต่ละสายจะมีฮีม 1 หมู่ และมีเหล็ก 1 โมเลกุลซึ่งจับออกซิเจนได้ 1 โมเลกุล ดังนั้นฮีโมโกลบิน 1 โมเลกุล จึงมีโกลบิน 4 สาย และสามารถจับกับออกซิเจนได้ 4 โมเลกุล (ธนศักดิ์และคณะ, 2539) ดังนั้นการผสม ALA ที่ระดับความเข้มข้น 2.5 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม จึงเป็นระดับความเข้มข้นที่เหมาะสม ส่งผลให้ปลาฮีโมโกลบิน ปริมาณเม็ดเลือดแดง และค่าฮีมาโตคริตสูงสุด ใกล้เคียงกับรายงานของ Yan และ Kim (2011) พบว่าปริมาณเม็ดเลือดแดงมีค่าสูงสุดในลูกสุกรที่เลี้ยงด้วยอาหารเสริม ALA ระดับความเข้มข้น 3 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม เป็นระยะเวลา 5 สัปดาห์ แต่ต่ำกว่าการศึกษาของ Wang และคณะ (2011b) ที่ศึกษาผลของ ALA และวิตามินซีต่อการเจริญเติบโต ระบบภูมิคุ้มกันและปริมาณธาตุเหล็กในเม็ดเลือดแดงของลูกไก่เนื้อ พบว่าปริมาณเม็ดเลือดแดงมีค่าสูงสุดในลูกไก่ที่เลี้ยงด้วยอาหารเสริม ALA ระดับความเข้มข้น 5 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม และการศึกษาของ Chen และคณะ (2008) ที่รายงานว่าปริมาณเม็ดเลือดแดง ฮีโมโกลบินและธาตุเหล็กมีค่าสูงสุดในสุกรที่เลี้ยงด้วยอาหารเสริม ALA ที่ระดับความเข้มข้น 10 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม ทั้งในสัปดาห์ที่ 3 และสัปดาห์ที่ 5 ของการทดลอง

การศึกษานี้พบว่า ปลาสาวยปรับปรุงสายพันธุ์ที่เลี้ยงด้วยอาหารทดลองเสริมด้วย ALA ที่ระดับความเข้มข้น 2.5 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม มีปริมาณเม็ดเลือดขาว การจับกินสิ่งแปลกปลอม ดัชนีการจับกินสิ่งแปลกปลอม และค่าเฉลี่ยเม็ดบีทที่ถูกเม็ดเลือดขาวจับกินสูงสุดอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) เมื่อเปรียบเทียบกับปลาที่เลี้ยงด้วยอาหารชุดควบคุม สอดคล้องกับรายงานของ Chen และคณะ (2008) ที่รายงานว่า ALA ที่เสริมในอาหารระดับความเข้มข้นต่ำสุดที่ใช้ในการทดลองคือ 5 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม สามารถเพิ่มปริมาณเม็ดเลือดขาวในสุกรได้สูงสุดในสัปดาห์ที่ 5 อย่างไรก็ตามการศึกษานี้แตกต่างกับรายงานของ Mateo และคณะ (2006) ที่ศึกษาผลของการเสริม ALA ต่อการเจริญเติบโต ค่าองค์ประกอบเลือดและการตอบสนองของระบบภูมิคุ้มกันในลูกสุกร พบว่าการเสริม ALA ในอาหารสามารถเพิ่มปริมาณเม็ดเลือดแดง แต่ไม่มีผลต่อการเพิ่มจำนวนเม็ดเลือดขาวในลูกสุกร

การศึกษากการเปลี่ยนแปลงองค์ประกอบเลือดและภูมิคุ้มกันของปลาสาวยปรับปรุงสายพันธุ์ที่ได้รับอาหารผสม ALA ที่ระดับความเข้มข้นต่างๆ เป็นเวลานาน 8 สัปดาห์ พบว่าปลาปริมาณเม็ดเลือดแดง ปริมาณเม็ดเลือดขาว และฮีมาโตคริตเท่ากับ $2.91-3.23 \times 10^9$ เซลล์ต่อมิลลิลิตร $4.33-4.69 \times 10^7$ เซลล์ต่อมิลลิลิตร และ 34.35-39.58 เปอร์เซ็นต์ตามลำดับ ซึ่งมีค่าใกล้เคียงกับ

รายงานของวิศรุต และคณะ (2562) ที่รายงานว่าปลาช่อนปรับปรุงสายพันธุ์มีปริมาณเม็ดเลือดแดง ปริมาณเม็ดเลือดขาวและฮีมาโตคริตเท่ากับ $2.63-2.99 \times 10^9$ เซลล์ต่อมิลลิลิตร $4.02-5.23 \times 10^7$ เซลล์ต่อมิลลิลิตร และ 34.99-43.83 เปอร์เซ็นต์ตามลำดับ นอกจากนี้ยังพบว่าปลาที่ได้รับอาหารผสม ALA ที่ระดับความเข้มข้น 10 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม มีปริมาณฮีโมโกลบินรวม ฮีมาโตคริต และ โปรตีนในซีรัมลดลงอย่างมีนัยสำคัญ ($p < 0.05$) ทั้งนี้อาจเนื่องจากการเสริม ALA ความเข้มข้นสูงในอาหารทดลองเป็นเวลานาน มีผลกระตุ้นกิจกรรมการแสดงออกของเอนไซม์ฮีโมออกซีจีเนส-1 (Ito *et al.*, 2018) ซึ่งสามารถย่อยสลายฮีโมให้กลายเป็นบิลิเวอร์ดีน (biliverdin) คาร์บอนมอนอกไซด์ (carbon monoxide) และเหล็ก (iron) (Ryter *et al.*, 2006) โดยธาตุเหล็กจะถูกรวบรวมโดยโปรตีนทรานส์เฟอร์ริน (transferrin) สะสมไว้ในไซโทโครม หรืออาจเก็บไว้ในตัวในรูปของเฟอร์ริติน (ferritin) เพื่อใช้ยามจำเป็น หรืออาจนำไปสร้างเป็นไมโอโกลบิน (myoglobin) ในกล้ามเนื้อ ซึ่งอยู่ในรูปของฮีโมไซด์เอน (hemosiderin) (Martini และคณะ, 2006) เมื่อฮีโมถูกย่อยสลายจึงส่งผลให้ปลาที่มีปริมาณฮีโมโกลบินรวม ฮีมาโตคริต และ โปรตีนในซีรัมลดลง อย่างไรก็ตามสารบิลิเวอร์ดีนที่ได้จะถูกเอนไซม์บิลิเวอร์ดีนรีดักเตส (biliverdin reductase) รีดิวซ์และเปลี่ยนเป็นบิลิรูบิน (bilirubin) เฟอร์รัสไอออน (Fe^{2+}) โดยทั้งบิลิเวอร์ดีน/บิลิรูบิน และคาร์บอนมอนอกไซด์มีคุณสมบัติเป็นสารต้านอนุมูลอิสระ (Ryter *et al.*, 2006) ด้านการอักเสบ และป้องกันเซลล์ถูกทำลายโดยอนุมูลอิสระจากการทดสอบฤทธิ์ด้านการอักเสบของ ALA และ โซเดียมเฟอร์รัสซัลเฟต (SFC) โดยทดสอบในเซลล์ไลน์เม็ดเลือดขาวชนิดแมคโครฟาจ (RAW 264 cell) พบว่าเอนไซม์ HO-1 ที่ถูกกระตุ้นด้วย ALA ร่วมกับโซเดียมเฟอร์รัสซัลเฟตจะถูกเอนไซม์ MEK/EKR และ p38 MAPK ยับยั้งไปบางส่วน จากนั้นเอนไซม์ NF-E2 related factor 2 (Nrf2) จะถูกกระตุ้นและย้ายจากไซโตซอลไปยังนิวเคลียสเพื่อตอบสนองต่อ ALA และ โซเดียมเฟอร์รัสซัลเฟต จึงทำให้ระดับของฮีโมภายในเซลล์เพิ่มขึ้น (Nishio *et al.*, 2014)

การศึกษาโดย Immenschuh และคณะ (2003) พบว่า ALA สามารถกระตุ้นการแสดงออกของเอนไซม์ฮีโมออกซีจีเนส-1 ภายในเซลล์มาโครฟาจในหนูทดลองซึ่งทำหน้าที่จับกินสิ่งแปลกปลอม สอดคล้องกับการศึกษาครั้งนี้ที่พบว่าปลาที่เลี้ยงด้วยอาหารทดลองสูตรที่ 5 (ALA 10 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม) มีดัชนีการจับกินสิ่งแปลกปลอมสูงสุดอย่างมีนัยสำคัญ ($p < 0.05$) เมื่อเปรียบเทียบกับปลาชุดควบคุม ซึ่งชี้ให้เห็นว่าการเลี้ยงปลาด้วยอาหารเสริม ALA สามารถกระตุ้นระบบภูมิคุ้มกันชนิดเซลล์แบบไม่จำเพาะเจาะจงได้ ซึ่งสอดคล้องกับรายงานของ Sato และคณะ (2012) ที่ศึกษาผลของการเสริม ALA ลงในอาหารต่อการเจริญเติบโตและการตอบสนองของระบบภูมิคุ้มกันในลูกไก่ พบว่าลูกไก่ที่เลี้ยงด้วยอาหารทดลองเสริมด้วย ALA ที่ระดับความเข้มข้นต่ำสุด

ที่ใช้ในการทดลอง 0.001 % (10 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม) มีกิจกรรมการจับกินสิ่งแปลกปลอมสูงสุด แตกต่างกับลูกไก่ที่เลี้ยงด้วยอาหารชุดควบคุมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$)

การศึกษาผลของ ALA ต่อระบบภูมิคุ้มกันสัตว์น้ำยังมีไม่มากนัก มีเพียงอมรรัตน์ (2549) ศึกษาผลของกรด 5-อะมิโนลิวูลินิกในการกระตุ้นภูมิคุ้มกันของกุ้งกุลาดำ โดยการฉีดสารละลาย ALA เกรดวิเคราะห์เข้าไปในกุ้งที่ความเข้มข้นต่ำคือ 66 ส่วนในพันล้าน เป็นเวลา 3 วัน พบว่ามีผลกระตุ้นระบบภูมิคุ้มกันของกุ้งกุลาดำโดยพิจารณาจากการเพิ่มจำนวนของเม็ดเลือดรวมทั้งหมดเท่ากับ 4.64×10^7 เซลล์ต่อมิลลิลิตร กิจกรรมของเอนไซม์ฟีนอลออกซิเดสมีค่าเท่ากับ 400 ยูนิตต่อนาที่ต่อมิลลิกรัมโปรตีน และอัตราการรอดตายจากการติดเชื้อไวรัสตัวแดงดวงขาวร้อยละ 70 เมื่อศึกษาในหลอดทดลองโดยการเติม ALA เกรดวิเคราะห์ที่ระดับความเข้มข้น 10-10,000 ส่วนในล้าน ลงใน อาหาร K-199 ที่ใช้เลี้ยงเซลล์เม็ดเลือดกุ้งบนสไลด์พบว่า สามารถกระตุ้นให้เม็ดเลือดชนิด semi-granular cell เกิดกระบวนการดีเกรนูลेशनได้ร้อยละ 29.5 ± 11 การศึกษาครั้งนี้ไม่สามารถเปรียบเทียบกับการศึกษาของอมรรัตน์ (2549) ได้เนื่องจากความแตกต่างของชนิดสัตว์น้ำที่ศึกษา อย่างไรก็ตามผลการศึกษาของอมรรัตน์ (2549) และการศึกษาครั้งนี้ชี้ให้เห็นว่า การใช้ ALA สามารถกระตุ้นภูมิคุ้มกันในสัตว์น้ำได้

การเก็บตัวอย่างเนื้อเยื่อ ตับ ไต กระเพาะอาหาร และลำไส้ของปลาชวยปรับปรุงสายพันธุ์โดยสุ่มตัวอย่างปลาชวยปรับปรุงสายพันธุ์ หลังได้รับอาหารทดลองเสริมด้วย ALA ที่ระดับความเข้มข้นต่างๆ โดยเลี้ยงเป็นระยะเวลา 4 และ 8 สัปดาห์ พบว่า ALA ที่เสริมในอาหารทดลองทุกระดับความเข้มข้น ไม่ส่งผลทำให้เนื้อเยื่อ ตับ ไต สมอง ลำไส้ และกระเพาะอาหาร แสดงความผิดปกติ สอดคล้องกับการศึกษาของ Wood และคณะ (2017) พบว่า ALA ไม่มีความเป็นพิษต่อเซลล์ ชี้ให้เห็นว่า การเสริม ALA ในอาหารปลาที่ระดับความเข้มข้น 0-10 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัมมีความปลอดภัยต่อปลา สามารถส่งเสริมการเจริญเติบโตและกระตุ้นภูมิคุ้มกันในปลาชวยปรับปรุงสายพันธุ์ได้

บทที่ 5

สรุปผลการทดลองและข้อเสนอแนะ

5.1 สรุปผลการศึกษา

การศึกษาผลของ ALA ที่ผลิตจากแบคทีเรียสังเคราะห์แสง *R. palustris* JP225 ต่อการเจริญเติบโตและการตอบสนองของภูมิคุ้มกันในปลาซวายปรับปรุงสายพันธุ์ พบว่าการเสริม ALA ระดับความเข้มข้นต่ำ (2.5 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม) เป็นเวลานาน 4 สัปดาห์ สามารถส่งเสริมการเจริญเติบโต โดยมีน้ำหนักสุดท้าย น้ำหนักที่เพิ่มขึ้น และอัตราการเจริญเติบโตจำเพาะ สูงสุด นอกจากนี้การเลี้ยงปลาซวายปรับปรุงสายพันธุ์ด้วยอาหารทดลองผสม ALA 2.5 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม ยังทำให้ปลามีปริมาณเม็ดเลือดแดง เม็ดเลือดขาว ซีโมโกลบิน เม็ดเลือดแดงอัดแน่น กิจกรรมการจับกินสิ่งแปลกปลอม ดัชนีการจับกินสิ่งแปลกปลอม และค่าเฉลี่ยเม็ดบิที่ถูเม็ดเลือดขาวจับกินให้มีค่าสูงที่สุด อย่างไรก็ตามการเสริม ALA ในอาหารปลาซวายปรับปรุงสายพันธุ์เป็นเวลานาน 8 สัปดาห์ ไม่มีผลต่อการเจริญเติบโตของปลา แต่ส่งผลต่อการเปลี่ยนแปลงภูมิคุ้มกันในปลาซวายปรับปรุงสายพันธุ์

การเก็บตัวอย่างเนื้อเยื่อ ตับ ไต ลำไส้ และกระเพาะอาหารของปลาซวายปรับปรุงสายพันธุ์โดยสุ่มตัวอย่างปลาซวายปรับปรุงสายพันธุ์ หลังได้รับอาหารทดลองเสริมด้วย ALA ที่ระดับความเข้มข้นต่างๆ โดยเลี้ยงเป็นระยะเวลา 4 และ 8 สัปดาห์ พบว่า ALA ที่เสริมในอาหารทดลองทุกระดับความเข้มข้น ไม่ส่งผลทำให้เนื้อเยื่อ ตับ ไต สมอง ลำไส้ และกระเพาะอาหาร แสดงความผิดปกติ

การศึกษาในครั้งนี้แนะนำให้ใช้ชีวภัณฑ์ ALA ที่ผลิตจากเชื้อแบคทีเรียสังเคราะห์แสง *R. palustris* JP225 ที่ระดับความเข้มข้น 2.5 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม ที่ระยะเวลา 4 สัปดาห์ เพื่อการเจริญเติบโตและกระตุ้นภูมิคุ้มกันในปลาซวายปรับปรุงสายพันธุ์

5.2 ข้อเสนอแนะ

การศึกษาผลของ ALA ในปลาซวายปรับปรุงสายพันธุ์ยังเป็นการทดลองในระดับห้องปฏิบัติการ เมื่อเปรียบเทียบกับความเสี่ยงของเกษตรกรในบ่อคินอาจให้ผลการทดลองที่แตกต่างกัน ดังนั้นควรศึกษาผลของ ALA ต่อปลาซวายปรับปรุงสายพันธุ์ที่เลี้ยงในบ่อคินต่อไป

เอกสารอ้างอิง

- กิจการ สุภมาตย์, สาวิตรี, ศิลาเกษ วุฒิพร พรหมขุนทอง และ สติธิ บุญรัตผลิน. 2539. คู่มือปฏิบัติการ โรคและพยาธิปลา. ภาควิชาชีววิทยาวิชาสัตวศาสตร์ คณะทรัพยากรธรรมชาติ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์
- กรมประมง 2554. การแปรรูปสัตว์น้ำ กรุงเทพฯ: โรงพิมพ์ชุมนุมสหกรณ์การเกษตรแห่งประเทศไทย. 71 หน้า
- เกรียงศักดิ์ เม่งอำพัน, ดวงพร อมรเลิศพิศาล, สุดาพร ดงศิริ และอุดมลักษณ์ สมพงษ์. 2554. ระบบการเลี้ยงปลาบึกและปลาหนังลูกผสมที่มีประสิทธิภาพ. รายงานผลงานวิจัย. สำนักวิจัยและส่งเสริมวิชาการการเกษตร และสำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ.
- เกรียงศักดิ์ เม่งอำพัน, จิตรลดา สอนตะโก และ ดวงพร อมรเลิศพิศาล. 2555. ผลของสาหร่ายสไปรูลินาต่อการเจริญเติบโตและการเจริญพันธุ์ของพ่อแม่พันธุ์ของปลาหนังกลุ่ม *Pangasius* และการอนุบาลปลาหนัง 4 สายพันธุ์ในกระชัง, วารสารเทคโนโลยีการประมง 5: 12 – 26.
- เกรียงศักดิ์ เม่งอำพัน, ดวงพร อมรเลิศพิศาล, สุดาพร ดงศิริ, เกศจี เม่งอำพัน และนภดล จันทรมณี, 2553. คู่มือการเพาะเลี้ยงปลาหนังลูกผสม เพื่อพัฒนาอาชีพแก่เกษตรกร. เชียงใหม่: สำนักพิมพ์มหาวิทยาลัยแม่โจ้ 33 หน้า
- เกรียงศักดิ์ เม่งอำพัน, ดวงพร อมรเลิศพิศาล, สุดาพร ดงศิริ, ชนกันต์ จิตมนัส, วิวัฒน์ หวังเจริญ และชนันท์ สุกกิจจานนท์, 2555. คู่มือการเลี้ยงปลาสาวยและปลาลูกผสม (บึกสยาม) เพื่อเพิ่มมูลค่าและการตลาด เชียงใหม่: สำนักพิมพ์แม่โจ้ 48 หน้า
- ชลอ ลิมสุวรรณ. 2528. โรคปลา. คณะประมง มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ กรุงเทพฯ. 227 หน้า.
- ชวลิต วิทยานนท์ และสมศักดิ์ รุ่งทองใบสุรีย์, 2536. พรรณปลาสาวยและสังกะวาดของประเทศไทยเอกสารวิชาการฉบับที่ 150. กรุงเทพฯ: สถาบันวิจัยการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำจืด กรมประมง. 57 หน้า
- ชนกันต์ จิตมนัส. 2545. สารกระตุ้นภูมิคุ้มกันปลา. วารสารสงขลานครินทร์ (วทท). 24: 739-744.
- พิชิต โชคค. 2550. การใช้กรดไขมันระเหยเพื่อผลิตกรด 5-อะมิโนลิวูลินิกโดยแบคทีเรียสังเคราะห์แสงทนกรดที่คัดเลือกได้, *Rhodospseudomonas palustris* KG31. วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตร์มหาบัณฑิต สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ มหาวิทยาลัยวลัยลักษณ์.
- ไพยม เบญญากุล. 2532. ชีวสาร. คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ สงขลา. 298 หน้า

- ควงพร อมรเลิศพิศาล, เกียรติศักดิ์ เม่งอำพัน, ชุตติมา ศรีมะเร็ง, 2557. การเพิ่มมูลค่าปลาหนังลูกผสมด้วยอาหารเสริมสาหร่ายไค. รายงานผลการวิจัย, เทคโนโลยีการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำ, มหาวิทยาลัยแม่โจ้
- ธนศักดิ์ ตาตุ, อุมพร อุดมทรัพย์ากุล, กาญจนา ภู่มาลา, อรวรรณ ภูชัยวัฒนาวงศ์ และ พงษ์จันทร์ หัตถิรัตน์. 2539. การศึกษาระดับ Zinc Protoporphyrin (ZPP) ในชายไทยปกติ. วารสารโลหิตวิทยาและเวชศาสตร์บริการโลหิต. 2: 112-117.
- ธีรพันธ์ ภูคาสวรรค์, 2511. ปลาบึก, วารสารการประมง 21: 244 – 252.
- นิวุฒิ หวังชัย, 2551. โภชนศาสตร์สัตว์น้ำเชียงใหม่: คณะเทคโนโลยีการประมงและทรัพยากรทางน้ำ มหาวิทยาลัยแม่โจ้.
- มัชลิน แดงเวชงาม. 2559. การดื้อยาปฏิชีวนะออกซีเตตราไซคลิกของแบคทีเรีย *Streptococcus agalactice* ที่แยกจากปลานิล (*Oreochromis spp.*) ที่เลี้ยงในประเทศไทย. วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตร์มหาบัณฑิต สาขาวิชาวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์.
- เมธัส เงินจันทร์. 2557. ผลของการเสริมสาหร่ายไคต่อการเจริญเติบโตและการป้องกันภาวะออกซิเจนในปลาหนังลูกผสม. วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตร์มหาบัณฑิต สาขาวิชาเทคโนโลยีการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำ มหาวิทยาลัยแม่โจ้.
- วันเพ็ญ ชัยคำภา. 2525. อิมมูโนวิทยาเพื่อวินิจฉัยโรค. คณะเวชศาสตร์เขตร้อน มหาวิทยาลัยมหิดล. กรุงเทพฯ. 200 หน้า.
- วันเพ็ญ มินกาญจน์. 2527. เปรียบเทียบลักษณะของลูกปลาบึกและปลาสวาย. วารสารการประมง 37: 106 - 112.
- วิศรุต ช่อเส็ง, นัทธ์ นันทพงศ์ และ วุฒิพร พรหมขุนทอง. 2562. การแทนที่ปลาป่นด้วยแหล่งโปรตีนจากพืชในอาหารปลาสวายลูกผสม. แก่นเกษตร 47(2), 281-292.
- เวียง เชื้อโพธิ์หัก. 2543. โภชนศาสตร์และการให้อาหารสัตว์น้ำ. กรุงเทพฯ : คณะประมง มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์. 255 หน้า.
- สุทธิพันธ์ สารสมบัติ, วิบูลย์ศรี พิมลพันธุ์, นภาพร บานชื่น, ทศนีย์ สุโกศล, ชารินทร์ ชารากุล คันสนีย์ เสนะวงษ์ และ สิริฤกษ์ ทรงศิริวิไล. 2543. อิมมูโนวิทยา คณะแพทยศาสตร์ศิริราชพยาบาล มหาวิทยาลัยมหิดล กรุงเทพฯ. 414 หน้า.

- สมทรง เลขะกุล. 2543. ชีวเคมีของวิตามิน สุภาวนิชากรพิมพ์ กรุงเทพมหานคร 273 หน้า
- เสน่ห์ ผลประสิทธิ์ และภาณุ เทวรัตน์มณีกุล. 2540. ชีววิทยาและการเพาะเลี้ยงปลาบึก, กรุงเทพฯ : สถาบันวิจัยประมงน้ำจืดแห่งชาติ กรมประมง. 79 หน้า.
- เสน่ห์ ผลประสิทธิ์. 2527. การเพาะพันธุ์ปลาบึก, เอกสารการประชุมทางวิชาการครั้งที่ 22 สาขาการประมงกรุงเทพฯ : มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์. 403 หน้า.
- หิรัญ กังแฮ. 2548. โรคสเตรฟโตคอกโคคซิสในปลานิลแปลงเพศและผลของสารสกัดสมุนไพร 19 ชนิด ในการยับยั้งเชื้อสเตรฟโตคอกคัส. วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาวาริชศาสตร์, มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์.
- อมรรัตน์ ตั้งประสิทธิ์ภาพ. 2549. การผลิตกรด 5-อะมิโนลิวูลินิกภายในเซลล์จาก *Rhodobacter sphaeroides* SH5 และผลต่อการเจริญเติบโตและกลไกการป้องกันตนเองของกุ้งกุลาดำ (*Penaeus monodon*). วิทยานิพนธ์ปรัชญาดุษฎีบัณฑิต สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ, มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์.
- อังคณา ไส้เกื้อ. 2556. การคัดแยกแบคทีเรียสังเคราะห์แสงทนกรด จากเขตดินเปรี้ยวในจังหวัดนครศรีธรรมราช และการส่งเสริมการผลิตชีวมวลและกรด 5-อะมิโนลิวูลินิก โดยเทคนิค Plackett-Burman. วารสารวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลธัญบุรี. 3(2): 75-89.
- Ahmed, G.U., Chakma, A., Shamsuddin, M., Minar, M.H., Islam, T. and Majumdar, M.Z. 2013. Growth performance of Thai pangus (*Pangasianodon hypophthalmus*) using prepared ercial feed. International Journal of Life Sciences Biotechnology and Pharma and commercial feed. Internation Research 2: 92-102.
- Anderson, D. P. 1992. Immunostimulants adjuvants and vaccine carriers in fish: applications to aquaculture. Annual Review of Fish Diseases. 2: 281-307.
- AOAC (Association of Official Analytical Chemists). 1999. Official Methods Of Analysis. WashingtonDC: Association of Official Analytical Chemists.

- Aoki, Y., Wada, G., Urata, G., Takaku, F. and Nakao, K. 1971. Purification and some properties of δ -aminolevulinic acid synthetase in rabbit reticulocytes. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 42: 568-575.
- Beale, S.I. 1970. The biosynthesis of δ -aminolevulinic acid in *Chlorella*. *Plant Physiology* 45: 504-506.
- Blaxhall, P.C. and Daisley, K.W. 1973. Routine hematological methods for use with fish blood. *Journal of Fish Biology* 5: 771 - 781.
- Burnham, B.F. 1970. δ -aminolevulinic acid synthetase (*Rhodobacter spheroides*). In *Methods in Enzymology* (vol. XVIII A). (eds. T. Harbert and W.T. Celia). pp 195-200. New York and London : Academic Press.
- Chen, Y.J., Kim, I.H., Cho, J.H., Min, B.J., Yoo, J.S. and Wang, Q. 2008. Effect of δ -aminolevulinic acid on growth performance, nutrient digestibility, blood parameters and the immune response of weanling pigs challenged with *Escherichia coli* lipopolysaccharide. *Journal of Livestock Science*. 114 :108–116.
- Chung, S. and Secombes, C.J. 1988. Analysis of events occurring within teleost macrophages during the respiratory burst. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology Education*. 88: 539 - 544.
- Demer, N.E. and Bayne, C.J. 1997. The immediate effects of stress on hormones and plasma lysozyme in rainbow trout. *Developmental & Comparative Immunology*. 21: 363 – 373.
- De Silva, S.S. and Anderson, T.A. (1995). *Fish Nutrition in Aquaculture*. London: Chapman & Hall.
- Duncan, D.W. 1995. Multiple – range and Multiple F-test. *Biometric*. 11: 1-42.
- Dupree, H.K. and Sneed, K.P. 1996. Response of Channel Catfish Fingerling to Difference Levels of Major Nutrients in Purified Diets. U.S. Bureau of Sport Fish and Wildlife. Tech. Pap. No. 9.

- FAO. 2012. The State of World Fisheries and Aquaculture 2012. [online]. Available http://www.fao.org/fishery/culturedspecies/Pangasius_hypophthalmus/en Access on 27 July 2017.
- Flannagan, R.S., Cosío G., Grinstein S. 2009. Antimicrobial mechanisms of phagocytes and bacterial evasion strategies. *Nature Reviews Microbiology*. 5: 355-66.
- Fukada, H., Casas, A. and Batlle, A. 2005. Aminolevulinic acid: from its unique biological function to its star role in photodynamics therapy. *J. Biochem and Cell Bio*. 37: 272-276.
- Gibson, K.D., Laver, W.G. and Neuberger, A. 1958. Initial stages in the biosynthesis of porphyrin. *Journal of Biological Chemistry*. 70: 71-80
- Gibson, K.D., Neuberger, A. and Tait, G.H. 1974. Studies on the biosynthesis of porphyrin and bacteriochlorophyll by *Rhodospseudomonas spheroides*. *Biochemical Journal*. 83 :539-548.
- Grimm, B., Bull, A. and Breu, V. 1991. Structural genes of glutamate 1-semialdehyde aminotransferase for porphyrin synthesis in cyanobacterium and *Escherichai coli*. *Molecular and General Genetics*. 225: 1-10.
- Hallberg, L., Hulthen, L., 2000. Prediction of dietary iron absorption: an algorithm for calculation absorption and bioavailability of dietary iron. *The American Journal of Clinical Nutrition*. 71, 1147–1160
- Hayashi, H., Wada, H., Yoshimura, T., Esaki, N. and Soda, K. 1990. Recent topics in pyridoxal 5 phosphate enzyme studies. *Annual Review of Biochemistry*. 59: 87 110.
- Hogan, Z. 2011. *Pangasianodon gigas*. In IUCN 2012, IUCN red list of threatened species, version 2012.[Online]. Available. www.Iucnredlist.org. Access on 5 October 2017.
- Humason, G.L. 1979. *Animal Tissue Techniques*. San Francisco: W.H. Freeman and Company 661 p.

- Hunter, G.A. and Ferreira, G.C. 1999. Lysine-313 of 5-aminolevulinic acid synthase act as a general baseduring formation of the quinonoid reaction intermediates. *Journal of Biochemistry*. 38: 3711-2028.
- Immenschuh, S., Baumgart-Vogt, E., Tan, M., Iwahara, S., Ramadori, G. and Fahimi, H.D. 2003. Differential cellular and subcellular localization of heme-binding protein 23/peroxiredoxin I and heme oxygenase-1 in rat liver. *Journal of Histochemistry & Cytochemistry*. 51: 1621–1631.
- Ito, H., Nishio, Y., Hara, T., Sugihara, H., Tanaka, T. and Li, X.K. 2018. Oral administration of 5-aminolevulinic acid induces heme oxygenase-1 expression in peripheral blood mononuclear cells of healthy human subjects in combination with ferrous ion. *European Journal of Pharmacology*. 833: 25-33.
- Jaenchen, R., Gilles, H.H. and Thauer, R.K. 1981. Inhibition of factor_{F430} Synthesis by levulinic acid in *Methanobacterium thermoautotrophicum*. *FEMS Microbiology Letters*. 12:16-170
- Jahn, D., Verkamp, E. and Soll, D. 1992 Glutamyl-transfer RNA : a precursor of heme and chlorophyll biosynthesis. *Trends in Biochemical Sciences*. 17: 215-218.
- Kajiwara, M., Mizutani, M., Matauda, R., Hara, K. and Kojima, I. 1994. A new biosynthetic pathway of porphyrin form isopropanol. *Journal of Fermentation and Bioengineering*. 77: 626-629.
- Kiatpapan, P., Phonghatsabun, M., Yamashita, M., Murooka, Y. and Panbangred, W. (2011). Production of 5-aminolevulinic acid by *Propionibacterium acidipropionici* TISTR442. *Journal of Bioscience and Bioengineering*. 111: 425-428.
- Kim, J.S., Ito, K. and Takahashi, H. 1982. Production of molecular hydrogen in outdoor batch cultures of *Rhodospseudomonas sphaeroides*. *Agricultural and Biological Chemistry*. 46 : 937-941
- Klein, O., Dornemann, D. and Senger, H. (1980). Two biosynthetic pathways to 5-aminolevulinic acid in algae. *International Journal of Biochemistry*. 12: 725-728.

- Koesnandar, S.A., Nishio, A. and Nagai, S. 1989. Production of extracellular aminolevulinic acid by *Clostridium thermoaceticum* grown in minimal medium. *Biotechnology Letters* 11 : 567-572.
- Larsen, H.N. and Snieszko, S.F. 1961. Modification of microhematocrit technique with trout blood. *Transactions of the American Fisheries Society*. 90: 139 – 142.
- Lascells, J. 1956. The synthesis of porphyrins and bacteriochlorophyll by cell_suspensions of *Rhodobacter sphaeroides*. *Biochemical Journal*. 62: 7893
- Lin, D., Nishio, N., and Nagai, S. 1989. Production of 5-aminolevulinic acid by methanogens. *Journal of Fermentation and Bioengineering*. 68: 88-91.
- Liu, S., Zhang, G., Li, J., Li, X. and Zhang, J. 2016. Optimization of biomass and 5-aminolevulinic acid production by *Rhodobacter sphaeroides* ATCC17023 via response surface methodology. *Applied Biochemistry and Biotechnology*. 179: 444-58.
- Martini, H. Frederic. 2006. *Fundamentals of Anatomy And Physiology*. 7thed. Pearson Education Inc., New York.
- Mateo, R.D., Morrow, J.L., Daily, J.W., Ji, F. and Kim, S.W. 2006. Use of δ -aminolevulinic acid in swine diet: effect on growth performance, behavioral characteristics and hematological/immune status in nursery pig. *Asian-Australasian Journal of Animal Sciences*. 19:97-101.
- Mauzerall, D. and Granick, S. 1956. The occurrence and determination of δ -aminolevulinic acid and porphobilinogen in urine. *Journal of Biological Chemistry*. 219: 435-446.
- Mengumphan, K. and Saengkrachang, J. 2008. Production of Generation 2 Mekong Giant Catfish (*Pangasinodon gigas*) Cultured with *Spirulina* sp. *Maejo International Journal of Science and Technology*. 2: 559-567.
- Mengumphan, K., Sorntako, J. and Amornlerdpison, D. 2011. Effect of *Spirulina* supplement on the growth and maturation of *Pangasius* Catfish brood stock and the nursery performance of four species of their fingerlings. *Journal of Fisheries Science and Technology* 5: 12 – 25.

- Min, B.J., Hong, J.W., Kwon, O.S., Kang, D.K., and Kim, I.H. (2004). Influence of dietary δ -aminolevulinic acid supplement on growth performance and hematological changes in weaned pig. *J. Korean Soc. Food. Sci. Nutr.* 33: 1606-1610.
- Nankervis, L., Matthews, S. 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.
- Natalie, M., Brocklhurst, K., Cooper, B., Stephen, P. and Martin, J. 1996. Comparative studies on the 5-aminolevulinic acid dehydratase from *Pisum sativum*, *Escherichia coli* and *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochemical Journal.* 320: 401-412.
- Nausser, C.L., Conrad A.F. and Steven H.S. 2017. Complement recognition pathways in renal transplantation. *Journals of the American Society of Nephrology.* 28: 2571–2578
- Nishio, Y., Fujino, M., Zhao, M., Ishii, T., Ishizuka, M., Ito, H., Takahashi, K., Abe, F., Nakajima, M., Tanaka, T. and Taketani, S. 2014. 5-Aminolevulinic acid combined with ferrous iron enhances the expression of heme oxygenase-1. *International Immunopharmacology.* 19: 300–307.
- Noparatnaraporn, N. Watanabe, M. and Sasaki, K. 2000. Extracellular formation of 5 aminolevulinic by intact cells of the marine photosynthetic bacterium *Rhodovulum* sp. under various pH condition. *World Journal of Microbiology and Biotechnology.* 16 :313-315.
- Phan, L.T., Bui, T.M., Ingram, B.A., Nguyen, T.I.T., Gooley, G.J., Nguyen, H.V., Nguyen, P.I. and De Silva, S.S. 2009. Seed production practices of striped catfish, *Pangasianodon hypophthalmus* in the Mekong delta region, Vietnam. *Aquaculture* 306: 92-100.
- Pholprasith, S. and Tavarutmaneeagul, P. 1998. Biology and culture of the Mekong giant catfish *Pangasianodon gigas* (Chevey, 1930). Paper number 31. Bangkok: National Inland Fisheries Institute.

- Rengpipat, S., S. Rukpratanporn, S. Piyatiratitivorakul, and P. Menasaveta. 2000. Immunity enhancement in black tiger shrimp (*Penaeus monodon*) by a probiont bacterium (*Bacillus* S11). *Aquaculture* 191: 271-288.
- Ryter, S.W., Alam, J. and Choi, M.K. (2006). Heme oxygenase-1/Carbon monoxide: From basic science to therapeutic applications. *Physiological Reviews*. 86: 583-650.
- Saikeur, A., Choorit, W., Prasertsan, P., Kantachote, D. and Sasaki, K. 2009. Influence of precursors and inhibitor on the production of extracellular 5-aminolevulinic acid: and biomass by *Rhodopseudomonas palustris* KG31. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*. 73: 987-992.
- Sandy, J.D., Davies, R.C. and Neuberger, A. 1985. Control of 5-aminolevulinic synthetase activity in *Rhodopseudomonas sphaeroides*. A role of trisulphides. *Biochemical Journal* 150: 245-257.
- Sasaki, K., Ikeda, S., Konishi, T., Nishizawa, Y., and Hayashi, M. 1989. Influence of iron on the excretion of 5-aminolevulinic acid by photosynthetic bacterium, *Rhodobacter sphaeroides*. *Journal of Fermentation and Bioengineering*. 68: 378-381.
- Sasaki, K., Ikeda, S., Nishizawa, Y. and Hayashi, M. 1987. Production of 5 aminolevulinic acid by photosynthetic bacteria. *Journal of Fermentation Technology*. 65 : 511-515.
- Sasaki, K., Tanaka, T., Nishizawa, Y. and Hayashi, Y. 1990. Production of herbicide, 5-aminolevulinic acid by *Rhodobacter sphaeroides* using the effluent of swine wastes from an anaerobic digester. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 32: 727-731.
- Sasaki, K., Watanbe, K., Tanaka, T., Hotta, Y. and Nagai, S. 1995. 5-aminolevulinic acid production by *Chlorella* sp. during heterotrophic cultivation in the dark. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*. 11: 361-362.
- Sasikala, C., Ramana, C.V. and Rao, P.R. 1994. 5-Aminolevulinic acid : A potential herbicide insecticide from microorganism. *Biotechnology Progress*. 10: 451-459.

- Sato, K., Ishida, K., Mutsushika, O. and Shimizu, S. 1985. Purification and some properties of δ -aminolevulinic acid synthetase from *Rhodobacter ruber* and *Rhodopseudomonas sphaeroides*. *Agricultural and Biological Chemistry*. 49: 3415-3421.
- Sato, K., Matsushita, K., Aoki, M., Fuziwara, J., Miyanari, S. and Kamada, T. 2012. Dietary supplementation with 5-aminolevulinic acid modulates growth performance and inflammatory response in broiler chickens. *Poultry Science*. 91: 1582-1589.
- Sattayasmithstid, S. 2002. Optimization for production of 5-aminolevulinic acid from halotolerant photosynthetic bacteria *Rhodobacter capsulatus* SS3. Master of Science Thesis in Biotechnology. Prince of Songkla University.
- Shin, J.H., Yeong, D. K., OH, H. K., Heung, S. L., and Pil, K. 2007. 5-Aminolevulinic acid biosynthesis in *Escherichia coli* coexpressing NADP-dependent malic enzyme and 5-Aminolevulinic Synthase. *Journal of Microbiology and Biotechnology*. 17: 1579–1584
- Shipman, R.H., Fan, L.T. and Kao, I.C. 1997. Single cell protein production by photosynthetic bacteria. *Advances in Applied Microbiology*. 21: 161-181.
- Spurlock, M.E. (1997). Regulation of metabolism and growth during immune challenge: an overview of cytokine function. *Journal of Animal Science*. 75: 1773-1783.
- Stasiak, A.S. and Baumann, C.P. 1996. Neutrophil activity as a potential bioindicator for contaminant analysis. *Fish and Shellfish Immunology*. 6: 537 - 539.
- Stobart, A.K. and Ameen-Bukhari, J. 1984. Regulation of alpha-aminolevulinic acid synthesis and protochlorophyllide regeneration in the leaves of dark-grown barley (*Hordeum vulgare*) seedlings. *Journal of Biochemistry*. 222: 419-426.
- Straka, R.P. and Stokes, J.L. 1957. Rapid destruction of bacteria in commonly used diluent and its elimination. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 5: 21.
- Suwannasang, A., Dangwetngam, M., Issaro, A., Phromkunthong, and Suanyuk, N. 2014. Pathological manifestations and immune responses of serotypes Ia and III *Streptococcus agalactiae* and infections in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). *Songklanakarin Thai Journal of Science and Technology*. 36: 499 – 506.

- Tait, G.H. 1973. Aminolevulinate synthetase of *Micrococcus demitrificans*. Purification and properties of enzyme and the effect of growth condition on the enzyme activity in cell. *Biochemical Journal*. 131:389-403.
- Tanaka, T., Sasaki, K., Napatratnaraporn, N. and Nishio, N. 1994. Utilization of volatile fatty acid from the anaerobic digestion liquor of sewage sludge for 5-aminolevulinic production by photosynthetic bacteria. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*. 10 : 667-680.
- Tanaka, T., Takahashi, K., Hotta, T., Takeuchi, Y. and Konnai, M. 1992. Promotive effect 5-aminolevulinic on yield of several crops. In: Proceedings of the 19th annual meeting of plant growth regulator Society of America, San Francisco. Plant Growth Regulator Society of America. Washington DC. pp. 237-241.
- Viale, A.A., Wider, E.A. and Battle, A.M.C. 1983. Some properties of the 5-aminolevulinate synthetase form *Rhodopseudomonas pulustris*. *Revista Argentina de Microbiología* 15: 233-238.
- Wakui, M, Yokoyama, Y., Wang, H., Shigeto, T., Futagami, M. and Mizaunuma, H. 2010. Efficacy of methyl ester of 5-aminolevulinic acid in photodynamic therapy for ovarian cancers. *Journal of Cancer Research and Clinical Oncology*. 136: 1143-1150.
- Wang, J.P., Jung, J.H. and Kim, I.H. (2011a). Effects of dietary supplementation with delta-aminolevulinic acid on growth performance, hematological status, and immune responses of weanling pigs. *Livestock Science*. 140: 131–135.
- Wang, J.P., Yan, L., Lee, J.H., Zhou, T.X. and Kim, I.H. (2011b). Effect of dietary delta-aminolevulinic acid and vitamin C on growth performance, immune organ weight and ferrum status in broiler chicks. *Livestock Science*. 135: 148-152.
- Warnick, G.R. and Burnham, B.F. 1971. Regulation of porphyrin biosynthesis. Purification and characterization of 8 -aminolevulinic acid synthase. *Journal of Biological Chemistry*. 246: 6880-6885.

- Wood, .K.E.A, Estevez-Cebrero, M.L.A and Smith, S. 2017 Specificity and toxicity of 5-aminolevulinic acid (5-ALA gliolan) on core and invasive glioblastoma cell populations. *Journal of Neuro-Oncology*19: i11–i12
- Yan, L. and Kim, I.H. (2011). Evaluation of dietary supplementation of delta-aminolevulinic acid and chitooligosaccharide on growth performance, nutrient digestibility, blood characteristic and fecal microbial shedding in weaned pigs. *Animal Feed Science and Technology*. 169: 275-280.
- Zhang, J., Kang, Z., Chen, J. and Du, G. (2015). Optimization of the heme biosynthesis pathway for the production of 5-aminolevulinic acid in *Escherichia coli*. *Scientific Reports*. 5: 8584.

ภาคผนวก

การเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ และสารเคมี

1. วิธีการเตรียมกราฟมาตรฐานของสาร ALA

สารเคมี

1. Sodium Acetate (NaOAc) ที่ความเข้มข้น 1 โมลาร์ (pH 4.7)
2. Acetyl acetone
3. Dimethyl - p - aminobenzaldehyde (DMAB)
4. 70% Perchloric acid 5. Glacial acetid acid

นำสารละลาย ALA มาตรฐานที่เจือจางอย่างเหมาะสมที่ความเข้มข้น 0, 2, 4, 6, 8, 10, 20, 30, 40, 50, 100, 150 และ 200 ไมโครโมลาร์ ปริมาตร 1 มิลลิลิตร เติมโซเดียมอะซิเตตความเข้มข้น 1 โมลาร์ (pH 4.7) ปริมาตรปริมาตร 2 มิลลิลิตร และเติมอะซิโตน ปริมาตร 50 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันและนำส่วนผสม ทั้งหมดไปต้มในน้ำเดือดนาน 15 นาที ทำให้เป็นอย่างรวดเร็วโดยแช่ในอ่างบรรจุน้ำแข็ง หลังจากนั้นเติม modified Ehrlich's reagent ปริมาตร 3.5 มิลลิลิตร ตั้งทิ้งไว้เป็นเวลา 15 นาที หลังจากนั้นนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 533 นาโนเมตร และเขียนกราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของสาร ALA กับค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 533 นาโนเมตร

หมายเหตุ : ส่วนผสมของ Modified Ehrlich s reagent (100 ml)

1. Dimethyl - p - aminobenzaldehyde 2 g
2. 70% Perchloric acid 16 ml
3. Glacial acetid acid 84 ml

วิธีการวิเคราะห์สารละลาย ALA

นำน้ำเลี้ยงเซลล์แบคทีเรียสังเคราะห์แสง *R. palustris* JP225 ปริมาตร 1 มิลลิลิตร เติมโซเดียมอะซิเตตความเข้มข้น 1 โมลาร์ (pH 4.7) ปริมาตรปริมาตร 2 มิลลิลิตร และเติมอะซิโตน ปริมาตร 50 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันและนำส่วนผสม ทั้งหมดไปต้มในน้ำเดือดนาน 15 นาที ทำให้เป็นอย่างรวดเร็วโดยแช่ในอ่างบรรจุน้ำแข็ง หลังจากนั้นเติม modified Ehrlich's

reagent ปริมาตร 3.5 มิลลิลิตร ตั้งทิ้งไว้เป็นเวลา 15 นาที หลังจากนั้นนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 533 นาโนเมตร แล้วนำมาตรวจหาปริมาณ ALA โดยคำนวณในสมการที่ได้จากกราฟมาตรฐานพบว่า ในชีวภัณฑ์ ALA ที่ผลิตได้จากแบคทีเรียสังเคราะห์แสง *R. palustris* JP225 1 กรัม มี ALA ปริมาณ 250 ไมโครกรัม

2. การเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ

1.1 Tryptic Soy Agar (TSA)

ซึ่งอาหาร Tryptic Soy Agar (TSA) ปริมาณ 40 กรัม ละลายในน้ำกลั่นปริมาตร 1 ลิตร ผสมให้เข้ากันและปรับพีเอชให้ได้เท่ากับ 7.3 ± 0.2 และนำไปต้มให้เดือด จากนั้นนำอาหารไปฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งความดัน (autoclave) ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว 15 นาที เมื่ออาหารมีอุณหภูมิลดลงเหลือ 40 ถึง 45 องศาเซลเซียส จึงเทลงในจานเพาะเชื้อที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้วในตู้ laminar air flow

1.2 Tryptic Soy Broth (TSB)

ซึ่งอาหาร Tryptic Soy Broth (TSB) ปริมาณ 30 กรัม ละลายในน้ำกลั่นปริมาตร 1 ลิตร ผสมให้เข้ากันและปรับพีเอชให้ได้เท่ากับ 7.3 ± 0.2 จากนั้นนำอาหารไปฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งความดัน (autoclave) ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้วนาน 15 นาที

1.3 Mueller-Hinton Borth

ซึ่งอาหาร Mueller-Hinton Agar (MHA) ปริมาณ 34 กรัม ละลายในน้ำกลั่นปริมาตร 1 ลิตร ผสมให้เข้ากัน ปรับพีเอชให้ได้เท่ากับ 7.3 ± 0.2 จากนั้นนำไปฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งความดัน (autoclave) ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว 15 นาที

3. การเตรียมสารเคมี

2.1 สารละลายน้ำเกลือเข้มข้น 0.85 เปอร์เซ็นต์ (0.85% NaCl)

ละลายสารโซเดียมคลอไรด์ (Sodium chloride: NaCl) ปริมาณ 8.5 กรัมในน้ำกลั่นปริมาตร 1 ลิตร ผสมให้เข้ากัน นำไปใส่ขวดสะอาดและฆ่าเชื้อโดยใช้หม้อนึ่งความดัน (autoclave) ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้วนาน 15 นาที และเก็บสารละลายที่อุณหภูมิห้อง

2.2 สารละลาย phosphate buffer saline (PBS)

สารเคมี

1. โซเดียมคลอไรด์ (NaCl)	8	กรัม
2. โพแทสเซียมคลอไรด์ (KCl)	0.2	กรัม
3. ไดโซเดียมไฮโดรเจนฟอสเฟต ($\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$)	1.44	กรัม
4. โพแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต ($\text{KH}_2\text{PO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$)	0.2	กรัม

ชั่งโซเดียมคลอไรด์ (Sodium chloride: NaCl) ปริมาณ 8 กรัม โพแทสเซียมคลอไรด์ (Potassium chloride: KCl) ปริมาณ 0.2 กรัม ไดโซเดียมไฮโดรเจนฟอสเฟต (Disodium Hydrogen Phosphate: Na_2HPO_4) ปริมาณ 1.44 กรัม และโพแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต (Potassium Hydrogen Phosphate: KH_2PO_4) 0.24 กรัม ละลายในน้ำกลั่นปริมาตร 800 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันและนำไปปรับพีเอชตามที่กำหนด และปรับปริมาตรให้ครบ 1000 มิลลิลิตร นำสารละลายใส่ขวดสะอาด และฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งความดัน (autoclave) ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว 15 นาที เก็บสารละลายที่อุณหภูมิห้อง

4. การวิเคราะห์องค์ประกอบเลือด

1. ปริมาณเม็ดเลือดแดง (Red blood cell) และเม็ดเลือดขาว (White blood cell)

ตามวิธี Braxhall และ Daisley (1973)

สีย้อม Yokoyama s fluid

สารเคมี

Solution A:

1. โซเดียมคลอไรด์ (NaCl)	4.00	กรัม
2. น้ำตาลเด็คโทส (D-glucose)	1.25	มิลลิกรัม
3. โซเดียมไบคาร์บอเนต (NaHCO_3)	0.25	กรัม
4. โพแทสเซียมคลอไรด์ (KCl)	0.2	กรัม
5. ฟอรัมาลิน (Formaldehyde) ความเข้มข้น 40 เปอร์เซ็นต์	50	มิลลิลิตร

Solution B:

1. เมทิลไวโอเล็ต (Methyl violet)	0.075	กรัม
2. ไพโรนินบี (Pyronin B)	0.075	กรัม
3. น้ำกลั่นปลอดเชื้อ	250	มิลลิลิตร

Solution A:

ชั่งโซเดียมคลอไรด์ (NaCl) ปริมาณ 4 กรัม ละลายในน้ำกลั่นปลอดเชื้อ คนให้ละลาย เติมน้ำตาลเด็คโตส (D-glucose) ปริมาณ 1.25 มิลลิกรัม โซเดียมไบคาร์บอเนต (NaHCO₃) ปริมาณ 0.25 กรัม และโพแทสเซียมคลอไรด์ (KCl) ปริมาณ 0.2 กรัม คนให้เข้ากัน ปรับปริมาตรให้ครบ 200 มิลลิลิตร จากนั้นเติมฟอร์มัลดีไฮด์ (Formaldehyde) ความเข้มข้น 40 เปอร์เซ็นต์ ปริมาตร 50 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน เก็บสารละลายที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

Solution B:

ชั่งเมทิลไวโอเล็ต (Methyl violet) ปริมาณ 0.075 กรัม ละลายในน้ำกลั่นปลอดเชื้อ คนให้ละลายแล้วเติมไพโรนินบี (Pyronin B) ปริมาณ 0.075 กรัม ผสมให้เข้ากัน จากนั้นปรับปริมาตรให้ครบ 250 มิลลิลิตร เก็บสารละลายไว้ในที่มืดที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

เตรียม working solution โดยการผสม Solution A และ Solution B ในอัตราส่วน 1:1 ผสมให้เข้ากัน กรองด้วยกระดาษกรองเบอร์ 1 ก่อนนำไปใช้

วิธีการ

1. ใช้ปิเปตสำหรับเจือจางเลือด (RBC diluting pipette) ดูดเลือดที่เจาะใหม่ๆ ให้ถึงขีด 0.5 ถ้าเกิน 0.5 ให้ปรับโดยใช้กระดาษที่ซุกค่อยๆ ชั้บออก แล้วเช็ดปลายปิเปตให้สะอาด
2. ใช้ปิเปตอันเดิมดูด working solution ด้วยสายยาง เพื่อเจือจางเลือด จนกระทั่งถึงขีด 101 ตรงปลายปิเปต
3. ใช้นิ้วชี้ปิดปลายปิเปตแล้วถอดสายยางออก จากนั้นใช้นิ้วหัวแม่มือกับนิ้วชี้ปิดปลายปิเปตทั้งสองข้างเข้าไปมาในแนวนอน 2-3 นาที
4. หยดของเหลวในปลายปิเปต 3-4 หยดทิ้ง เพราะของเหลวส่วนนี้อยู่ในก้านไม่ได้ ถูกนำไปผสมกับเลือดในกะเปาะของปิเปต

5. หยอดของเหลวต่อไปลงบนสไลด์นับเม็ดเลือด (Hemocytometer) ที่มีแผ่นปิดสไลด์ 7 glass) ปิดอยู่ หากมีฟองอากาศหรือของเหลวล้นขอบสไลด์นับเม็ดเลือด ให้ทำความสะอาดแล้วหยดตัวอย่างเลือดใหม่

6. นับจำนวนเม็ดเลือดแดงและเม็ดเลือดขาวภายใต้กล้องจุลทรรศน์กำลังขยาย 40X

2. ฮีมาโตคริต โดยวิธีดัดแปลงจาก Braxhal และ Daisley (1973)

วิธีการ

1. นำเลือดที่เจาะได้ใหม่ๆ ใส่ในหลอดเล็กๆ สำหรับหาค่าฮีมาโตคริต (haematocrit tube) จนปริมาณถึงขีดแดง อุดปลายด้านหนึ่งของหลอดด้วยดินน้ำมันจำนวน 2 หลอดต่อตัวอย่าง

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

3. วัดหาอัตราส่วนของปริมาตรเม็ดเลือดกับปริมาตรเลือดทั้งหมดนำมาคำนวณหาเปอร์เซ็นต์ฮีมาโตคริตหรือฮีมาโตคริต จากสูตร

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

5. การหาค่าปริมาณฮีโมโกลบิน ตามวิธีการของ Larsen และ Sneizsko (1961)

1 การเตรียม Drabkin's solution

สารเคมี

1. โซเดียมไฮโดรเจนคาร์บอเนต (NaHCO ₃)	1.00	กรัม
2. โพแตสเซียมไซยาไนด์ (KCN)	0.05	กรัม
3. โพแตสเซียมเฟอร์ริกไซยาไนด์ (K ₃ Fe (CN) ₆)	0.20	กรัม
4. น้ำกลั่น (2 ครั้ง) ที่ฆ่าเชื้อแล้ว	1,000	มิลลิลิตร

ซังโซเดียมไบคาร์บอเนต (Sodium bicarbonate: NaHCO_3) ปริมาณ 1 กรัม
โพแทสเซียมไซยาไนด์ (Potassium cyanide: KCN) ปริมาณ 0.05 กรัม และโพแทสเซียมเฟอร์ริก
ไซยาไนด์ (Potassium ferricyanide: $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$) ปริมาณ 0.2 กรัม ละลายในน้ำกลั่นปลอดเชื้อผสม
ให้เข้ากันแล้วปรับปริมาตรให้ครบ 1 ลิตร เก็บสารละลายในขวดสีชาที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

วิธีการ

ใช้ไมโครปิเปตขนาด 20 ไมโครลิตร ดูดเลือดที่เจาะใหม่ๆ มาผสมรวมกับ
Drabkin Solution 5 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากันดีแล้วทิ้งไว้อย่างน้อย 20 นาที จากนั้นนำไปเซนตริฟิวจ์
เพื่อขจัดเศษเซลล์เม็ดเลือด และ fibrin ต่างๆ นำส่วนที่ใสมาวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น
540 นาโนเมตร ค่าที่ได้จะนำมาเปรียบเทียบกับค่าฮีโมโกลบินมาตรฐานที่ทราบความเข้มข้น โดย
ใช้ Drabkin solution เป็น blank

6. การหาฮีโมโกลบิน ตามวิธีการของ Suwannasang และคณะ (2014)

1. สารละลาย Alkaline copper

สารเคมี

1. คอปเปอร์ซัลเฟต (Copper sulfate: $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$)	0.015	กรัม
2. โพแทสเซียมโซเดียมทาร์เตรต ($\text{KNaC}_4\text{H}_4\text{O}_6$)	0.03	กรัม
3. โซเดียมคาร์บอเนต (Na_2CO_3)	1.00	กรัม
4. โซเดียมไฮดรอกไซด์ (NaOH)	2.00	กรัม
5. น้ำกลั่นปราศจากไอออน	100	มิลลิลิตร

วิธีการ

สาร A: เตรียมสารละลายคอปเปอร์ซัลเฟต (Copper sulfate: $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$) 0.5
เปอร์เซ็นต์ โดยชั่งคอปเปอร์ซัลเฟต 0.015 กรัม ละลายในน้ำกลั่นปราศจากไอออน คนจน
สารละลาย จากนั้นปรับปริมาตรให้ครบ 3 มิลลิลิตร

สาร B: เตรียมสารละลายโพแทสเซียมโซเดียมทาร์เตรต ($\text{KNaC}_4\text{H}_4\text{O}_6$) 1
เปอร์เซ็นต์ โดยละลายโพแทสเซียมโซเดียมทาร์เตรต 0.03 กรัม ในน้ำกลั่นปราศจากไอออน คนจน
สารละลาย ปรับปริมาตรให้ครบ 3 มิลลิลิตร

สาร C: เตรียมสารละลายโซเดียมคาร์บอเนต (Na_2CO_3) 1 เปอร์เซ็นต์ โดยชั่งโซเดียมไฮดรอกไซด์ (NaOH) ปริมาณ 2 กรัมละลายในน้ำกลั่นปราศจากไอออน คนจนสารละลายเติมสารละลายโซเดียมคาร์บอเนต (Na_2CO_3) ปริมาณ 1 กรัม คนจนสารละลาย ปรับปริมาตรให้ครบ 100 มิลลิลิตร

นำสารละลาย A, B และ C ผสมให้เข้ากันในอัตราส่วน 1:1 :50 เก็บสารละลายในที่มืดและเย็น

2. สารละลาย Folin s reagent 1:10

สารเคมี

1. Folin Clocalteus phenol reagent	1	ส่วน
2. น้ำกลั่น (2 ครั้ง) ที่ฆ่าเชื้อแล้ว	10	ส่วน

สารละลายที่ผสมแล้วจะต้องเก็บไว้ในขวดสีชา

วิธีการ

ดูดซีรัม มา 5 ไมโครลิตร ผสมรวมกับน้ำกลั่น 995 ไมโครลิตร แล้วเติม alkaline copper solution 2 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากันแล้วทิ้งไว้ 10 นาที แล้วจึงเติม folin reagent 1 : 10 ลงไป 3 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากันแล้วทิ้งไว้ 5 นาที แล้วนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 640 นาโนเมตร ค่าที่ได้จะนำมาเปรียบเทียบกับค่าแอลบูมินมาตรฐานที่ทราบความเข้มข้น โดยใช้ blank ที่เตรียมขึ้นตามขั้นตอนนี้แต่ไม่เติมซีรัม

7. วิเคราะห์การลดลงของไนโตรบลูเตตราโซเลียมตามวิธีการของ Stasiak และ Baumann (1996)

1. สารละลาย Anticoagulant acid citrate dextrose (ACD)

สารเคมี

1. กรดซิตริก ($\text{C}_6\text{H}_8\text{O}_7$; anhydrous)	4.0	กรัม
2. โซเดียมซิเตรทไดไฮเดรต ($\text{Na}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$)	.3.0	กรัม
3. น้ำตาลเด็ทโทรส (D-glucose)	11.0	กรัม
4. น้ำกลั่นปลอดเชื้อ	500	มิลลิลิตร

วิธีการ

ซึ่งกรดซิตริก ($C_6H_8O_7$; anhydrous) ปริมาณ 4 กรัม โซเดียมซिटเรทไดไฮเดรต ($Na_3C_6H_5O_7 \cdot 2H_2O$) ปริมาณ 11.3 กรัม และน้ำตาลเด็คโทรส (D-glucose) ปริมาณ 11 กรัม นำสารละลายในน้ำกลั่นปลอดเชื้อปรับปริมาตรให้ครบ 500 มิลลิลิตร และฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งความดัน (autoclave) ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้วนาน 15 นาที เก็บสารละลายที่อุณหภูมิห้อง

2. สารละลาย Nitro blue tetrazolium (NBT) ความเข้มข้น 0.2 เปอร์เซ็นต์ ในน้ำเกลือ (NaCl) ความเข้มข้น 0.85 เปอร์เซ็นต์

สารเคมี

1. ไนโตรบลูเตตราโซเลียม (Nitro blue tetrazolium)	0.02	กรัม
น้ำเกลือความเข้มข้น 0.85 เปอร์เซ็นต์	10	มิลลิลิตร

วิธีการ

ซึ่งสารไนโตรบลูเตตราโซเลียม (Nitro blue tetrazolium) ปริมาณ 0.02 กรัม ละลายในน้ำเกลือความเข้มข้น 0.85 เปอร์เซ็นต์ปริมาตร 10 มิลลิลิตร คนจนสารละลาย เก็บในขวดสีชาหรือเก็บให้พ้นแสง และเก็บสารละลายที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

3. สารละลายโพแทสเซียมไฮดรอกไซด์ ความเข้มข้น 2 นอร์มอล

ซึ่งสารละลายโพแทสเซียมไฮดรอกไซด์ (KOH) ปริมาณ 11.2 กรัม ละลายในน้ำกลั่นปริมาตร 100 มิลลิลิตร เก็บสารละลายไว้ที่อุณหภูมิห้อง

4. สารละลาย Phosphate Citrate buffer Solution พีเอช 5.8

สารเคมี

1. ไดโซเดียมไฮโดรเจนฟอสเฟต (Na_2HPO_4)	7.098	กรัม
2. กรดซิตริก (Citric acid)	10.507	กรัม

วิธีการ

Solution A:

ซึ่งไดโซเดียมไฮโดรเจนฟอสเฟต (Na_2HPO_4) ปริมาณ 7.098 กรัม ละลายในน้ำกลั่นปราศจากไอออนคนจนสารละลาย จากนั้นปรับปริมาตรให้ครบ 500 มิลลิลิตร

Solution B:

ซึ่่งกรดซึ่ตริค (Citric acid) ปริมาณ 10.507 กรัม ละลายในน้ำกลั่่นปราศจากไอออน คนจนสารละลาย จากนั้นปรับปริมาตรให้ครบ 500 มิลลิลิตร

เตรียม Working solution โดยการผสม solution A และ solution B ในอัตราส่วน 3.1 ผสมเข้ากัน ปรับพีเอชให้ได้ 5.8 หากพีเอชต่ำกว่า 5.8 ใช้ solution A ปรับพีเอชให้สูงขึ้น หากพีเอชสูงกว่า 5.8 ใช้ solution B ปรับพีเอชให้ลดลง จากนั้นนำไปขวดสะอาด และฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งอบความดัน (autoclave) ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว นาน 15 นาที เก็บสารละลายที่อุณหภูมิห้อง

8. ปริมาณไลโซไซม์ (Lysozyme activity) ตามวิธีการของ Demers และ Bayne (1997)

สารเคมี

สารละลาย 0.1 โมล Phosphate/citrate buffer Solution (PBS), พีเอช 5.8: ประกอบด้วย

(a) ซึ่่งไดโซเดียมไฮโดรเจนฟอสเฟต (Na_2HPO_4 7.098 กรัม ละลายในน้ำกลั่่น ปราศจากไอออนปรับปริมาตรเป็น 500 มิลลิลิตร

(b) ซึ่่งกรดซึ่ตริค แอสิค (Citric acid) 10.507 กรัม ละลายในน้ำกลั่่นปราศจากไอออน 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 เเปอร์เซ็นต์: เตรียมโดยซึ่่งผงเชื้อแบคทีเรีย *Micrococcus lysodeikticus* มา 37.5 มิลลิกรัม ละลายในฟอสเฟตบัฟเฟอร์ 0.1 โมล พีเอช 5.8 ปริมาตร 40 มิลลิลิตร จากนั้นปรับปริมาตรเป็น 50 มิลลิลิตร

วิธีการ

ปิเปตซึ่ริมมาตัวอย่างละ 25 ไมโครลิตร ใส่ในเพลท 96 หลุมกั่นแบน โดยใส่ตัวอย่างละ 3 หลุม จากนั้นเติมสับเสตทเชื้อแบคทีเรีย 0.075 เเปอร์เซ็นต์ 175 ไมโครลิตร หลังจาก

นั้น 1 นาที นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 450 นาโนเมตร ด้วยเครื่อง Kinetic mode โดยวัดทุก 30 วินาที เป็นเวลา 5 นาที จากนั้นนำค่าการดูดกลืนแสงที่วัดได้ไปเทียบกับไลโซไซม์มาตรฐาน (hen egg white lysozyme) ที่ทราบความเข้มข้น รายงานผลเป็นยูนิท (unit) ต่อมิลลิกรัมโปรตีน โดยหนึ่งยูนิทไลโซไซม์เท่ากับปริมาณซีรัมที่ทำให้ค่าการดูดกลืนแสงลดลง 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 ละลายในสารละลาย ฟอสเฟตบัฟเฟอร์ 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 นำแต่ละหลอดมาทำตามขั้นตอนการหาปริมาณไลโซไซม์เช่นเดียวกับหาปริมาณไลโซไซม์ในซีรัมตัวอย่างดังที่ได้กล่าวแล้วข้างต้น

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

9. วิเคราะห์กิจกรรมการจับกินสิ่งแปลกปลอมตามวิธีการของ Chung และ Secombes (1988)

1. **ยาสลบปลา** คือ น้ำมันกานพลู เตรียมโดยนำ stock น้ำมันกานพลูมาละลายให้เอทิลแอลกอฮอล์ความเข้มข้น 95 เปอร์เซ็นต์ เพื่อน้ำมันกานพลูจะละลายน้ำได้ดียิ่งขึ้น

2. **สารละลาย Fetal Calf Serum** เก็บที่อุณหภูมิ -80 องศาเซลเซียส วางไว้ที่อุณหภูมิห้อง จนละลายก่อนนำไปใช้

3. สารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ (PBS) พีเอช 7.2

ซึ่งสารโซเดียมคลอไรด์ปริมาณ 8.5 กรัม โซเดียมไฮโดรเจนฟอสเฟตปริมาณ 1.07 กรัม และโซเดียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟตปริมาณ 0.39 กรัม นำสารละลายในน้ำกลั่นปราศจากไอออน 0 มิลลิลิตร ปรับพีเอชให้ได้ 7.2 จากนั้นปรับปริมาตรให้ครบ 100 มิลลิลิตร จากนั้นนำไปขวดสะอาด และฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งความดัน (autoclave) ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้วนาน 15 นาที เก็บสารละลายที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

4. สารละลายเฮพาริน 1000 ยูนิต

โดยเจือจางสารละลายเฮพาริน (Heparin) ความเข้มข้น 5000 ยูนิตด้วยสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์พีเอช 7.2 ในอัตราส่วน 1:4 เก็บสารละลายเฮพาริน 1000 ยูนิต ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส จนกว่าใช้งาน

5. สารละลาย L-15

ละลายผง L-15 ปริมาณ 1 ชอง ในน้ำกลั่นปราศจากไอออน 850 มิลลิลิตร ปรับพีเอชให้ได้ 7.4 และปรับปริมาตรให้ครบ 1 ลิตร จากนั้นกรองด้วยตัวกรองขนาด 0.2 ไมครอน เก็บสารละลายใส่ขวดสะอาดที่ผ่านการฆ่าเชื้อและเก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

6. สารละลาย L-15 I

นำสารละลาย L-15 ปริมาตร 99 มิลลิลิตร เติมยาปฏิชีวนะเพนนิซิลลิน (Penicillin) 1 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน กรองด้วยตัวกรองขนาด 0.2 ไมโครเมตรเก็บสารละลายใส่ขวดสะอาดที่ผ่านการฆ่าเชื้อและเก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

7. สารละลาย L-15 II

นำสารละลาย L-15 ปริมาตร 96 มิลลิลิตร เติมเฮพารินความเข้มข้น 1000 ยูนิต ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ยาปฏิชีวนะเพนนิซิลลินปริมาตร 1 มิลลิลิตร และ Fetal Calf Serum ปริมาตร 2 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน แล้วกรองด้วยตัวกรองขนาด 0.2 ไมโครเมตรเก็บสารละลายใส่ขวดสะอาดที่ผ่านการฆ่าเชื้อและเก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

8. สารละลาย L-15 IV

นำสารละลาย L-15 IV ปริมาตร 98.9 มิลลิลิตร เติมยาปฏิชีวนะเพนนิซิลลิน ปริมาตร 1 มิลลิลิตร และ Fetal Calf Serum ปริมาตร 0.1 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน กรองด้วยตัวกรอง

ขนาด 0.2 ไมครอนเก็บสารละลายใส่ขวดสะอาดที่ผ่านการฆ่าเชื้อและเก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

9. สารแยกเม็ดเลือด (Percall Gradients) 34/51 เปอร์เซ็นต์

ก. สารละลายโซเดียมคลอไรด์ความเข้มข้น 1.5 โมล โดยชั่งสารโซเดียมคลอไรด์ 8.77 กรัม ละลายในน้ำกลั่นปราศจากไอออนปริมาตร 100 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน เก็บสารละลายใส่ขวดสะอาดที่ผ่านการฆ่าเชื้อและเก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

ข. สารละลาย Percall 90 เปอร์เซ็นต์ โดยละลายสาร Percall ปริมาตร 90 มิลลิลิตร กับสารละลายโซเดียมคลอไรด์ 1.5 โมล ปริมาตร 10 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน เก็บสารละลายใส่ขวดสะอาดที่ผ่านการฆ่าเชื้อและเก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

ค. สารละลายโซเดียมคลอไรด์ความเข้มข้น 0.15 โมล นำสารละลายโซเดียมคลอไรด์ 1.5 โมล ปริมาตร 10 มิลลิลิตร ผสมกับน้ำกลั่นปราศจากไอออนปริมาตร 90 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน เก็บสารละลายใส่ขวดสะอาดที่ผ่านการฆ่าเชื้อและเก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

ง. สารละลาย Percall 34 เปอร์เซ็นต์ เตรียมโดยนำสารละลาย Percall 90 เปอร์เซ็นต์ ปริมาตร 37.8 มิลลิลิตร ผสมกับสารละลายโซเดียมคลอไรด์ความเข้มข้น 0.15 โมล ปริมาตร 62.2 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน เก็บสารละลายใส่ขวดสะอาดที่ผ่านการฆ่าเชื้อและเก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

จ. สารละลาย Percall 51 เปอร์เซ็นต์ เตรียมโดยนำสารละลาย Percal 90 เปอร์เซ็นต์ ปริมาตร 56.7 มิลลิลิตร ผสมกับสารละลายโซเดียมคลอไรด์ความเข้มข้น 0.15 โมล ปริมาตร 43.3 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน เก็บสารละลายใส่ขวดสะอาดที่ผ่านการฆ่าเชื้อและเก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

ฉ. สารละลาย Percall 34 ใน 51 เปอร์เซ็นต์ ดูดสารละลาย Percall 34 เปอร์เซ็นต์ ปริมาตร 2 มิลลิลิตร ใส่ในหลอดไมโครเซนตริฟิวขนาด 10 มิลลิลิตร และดูดสารละลาย Percall 51 เปอร์เซ็นต์ ปริมาตร 2 มิลลิลิตร ใส่ใน Percall 34 เปอร์เซ็นต์ จะได้ Percall Gradients 34 ใน 51 เปอร์เซ็นต์ เก็บสารละลายที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

10. สารละลายกลูตารัลดีไฮด์ (Glutaraldehyde) 0.125 เปอร์เซ็นต์

นำสารละลายกลูตารัลดีไฮด์ปริมาตร 0.125 มิลลิลิตร ผสมกับสารละลาย L-15I ปริมาตร 100 ไมโครลิตร เก็บสารละลายไว้ขวดสะอาดที่ผ่านการฆ่าเชื้อและเก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

11. สีย้อมทริปแฟนบลู (Trypan blue) 0.2 เปอร์เซ็นต์

ชั่งสารทริปแฟนบลู 0.2 กรัม ละลายในน้ำกลั่นปราศจากไอออน 100 มิลลิลิตร ปั่นทิ้งไว้ข้ามคืน เมื่อสารละลายหมดนามากรองด้วยกระดาษกรองเบอร์ 1 เก็บที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ก่อนนำไปใช้นำ ทริปแฟนบลู 0.2 เปอร์เซ็นต์ ผสมกับสารละลายโซเดียมคลอไรด์ 4.25 เปอร์เซ็นต์ (โซเดียมคลอไรด์ 4.25 กรัม ละลายในน้ำกลั่นปราศจากไอออน 100 มิลลิลิตร) ในอัตราส่วน 4:1

วิธีการ

1. หลังจากพลาสติกตัดไตส่วนหน้าใส่ในหลอดทดลอง 1.5 มิลลิลิตร ซึ่งมีอาหารเลี้ยง เซลล์ L-15 II ปริมาตร 500 มิลลิลิตร จากนั้นใช้แท่งแก้วบิดเบาๆ
2. คูตสารละลายซึ่งกรองผ่านผ้ากรองในลอนขนาดตา 100 ไมโครเมตร ลงในหลอดแก้ว ขนาด 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 Percoll Gradients 34/51 เปอร์เซ็นต์ จากนั้นนำไปเหวี่ยงที่ ความเร็ว 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 ไมโครลิตรย้อมด้วยสารละลายทริปแฟนบลู 20 ไมโครลิตร เพื่อนับจำนวนเซลล์เม็ดเลือดขาวมีชีวิตไม่ควรต่ำกว่า 98% ภายใต้อุปกรณ์จุลทรรศน์

6. ปรับจำนวนเซลล์เม็ดเลือดขาวด้วย L-15 IV ให้ได้เซลล์ประมาณ 2×10^6 เซลล์ ต่อ มิลลิลิตร สำหรับวิเคราะห์ Phagocytotic activity

10. สารเคมีและวิธีการศึกษาพยาธิสภาพทางเนื้อเยื่อ ตามวิธีของ Humason (1979)

3.1 การเตรียมสารละลายคงสภาพ (Fixative) (ฟอร์มาลินความเข้มข้น 10 เปอร์เซ็นต์)

สารเคมี

1. ฟอร์มาลิน (Formalin)	10.00	มิลลิลิตร
2. น้ำกลั่น	90.00	มิลลิลิตร

ผสมเข้าด้วยกัน

3.2 การดึงน้ำออกจากเซลล์ (Dehydration)

ทำการตัดแต่งตัวอย่างให้มีขนาดพอเหมาะนำมาบรรจุในบล็อกพลาสติก และรวบรวมใส่ ในตะกร้าโลหะเพื่อที่จะนำไปสู่ขั้นตอนการดึงน้ำออกจากเซลล์ด้วยเครื่องเตรียมเนื้อเยื่ออัตโนมัติ มี ขั้นตอนดังต่อไปนี้

ขั้นตอนที่	สารละลาย	เวลา (ชั่วโมง)
1.	เอทิลแอลกอฮอล์ 50 เปอร์เซ็นต์	2
2.	เอทิลแอลกอฮอล์ 70 เปอร์เซ็นต์	2
3.	เอทิลแอลกอฮอล์ 70 เปอร์เซ็นต์	2
4.	เอทิลแอลกอฮอล์ 95 เปอร์เซ็นต์	2
5.	เอทิลแอลกอฮอล์ 95 เปอร์เซ็นต์	2
6.	แอบโซลูทแอลกอฮอล์ (absolute alcohol)	2
7.	ไอโซโพรพิลแอลกอฮอล์ (isopropyl alcohol)	1
8.	ไอโซโพรพิลแอลกอฮอล์	1
9.	ไซลีน (xylol)	1

ขั้นตอนที่	สารละลาย	เวลา (ชั่วโมง)
10.	ไซลีน	1
11.	พาราพลาสต์ (paraplast)	1
12.	พาราพลาสต์	1

หลังจากตัวอย่างผ่านขั้นตอนการคั่งน้ำออกจากเซลล์ นำตัวอย่างเข้าสู่ขั้นตอนการฝัง (embedding)

ในพาราพลาสต์ ตกแต่งตัวอย่างให้สวยงามและนำไปผ่านขั้นตอนการตัด (sectioning) และการย้อมสีฮีมาทอกไซลีนและอีโอซิน

3.3 การย้อมสีฮีมาทอกไซลีนและอีโอซิน

3.3.1 การเตรียมสีฮีมาทอกไซลีน

สารเคมี

1. ฮีมาทอกไซลีน	4.00	กรัม
2. โซเดียมไอโอเดต (Sodium iodate)	0.80	กรัม
3. อลูมิเนียม (potassium aluminium sulfate, alum)	100.00	กรัม
4. กรดซิตริก (Citric acid)	4.00	กรัม
5. คลอรัลไฮเดรต (choral hydrate)	200.00	กรัม
6. น้ำกลั่น 2,000 มิลลิลิตร		

ละลายอลูมิเนียมในน้ำกลั่น เติมสีฮีมาทอกไซลีน ผสมจนกระทั่งละลายหมด แล้วจึงเติมโซเดียมไอโอเดต หลังจากนั้นเติมกรดซิตริกและคลอรัลไฮเดรตเข้าด้วยกัน ผสมจนละลายเป็นเนื้อเดียวกัน นำเก็บบรรจุในขวดสีชาหรือขวดพลาสติกทึบแสง ทิ้งไว้ประมาณ 1 สัปดาห์ ก่อนนำไปใช้

3.3.2 การเตรียมสีอีโอซิน

สารเคมี

1. อีโอซิน (eosin Y, CI 45380)	1.00	กรัม
2. เอทิลแอลกอฮอล์	1,000	มิลลิลิตร
3. กรดอะซิติกเข้มข้น	5.00	มิลลิลิตร

ละลายสีไออินลงในเอทิลแอลกอฮอล์จนกระทั่งละลายหมด แล้วจึงเติมกรดอะซิติคเข้ากัน นำเก็บบรรจุในขวดสีชาหรือขวดพลาสติกทึบแสง

วิธีการ

นำสไลด์ตัวอย่างเนื้อเยื่อที่ผ่านการอบที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 - 12 ชั่วโมงแล้วนำไปผ่านขั้นตอนการย้อมสีสีมาทอกไซลินและไออิน ซึ่งมีขั้นตอนดังนี้

ขั้นตอนที่	สารละลาย	เวลา(นาที)
1.	ไซลิน	2
2.	ไซลิน	2
3.	ไซลิน	2
4.	ไอโซโปรพิลแอลกอฮอล์	1
5.	ไอโซโปรพิลแอลกอฮอล์	1
6.	แอปโซลูทแอลกอฮอล์	1
7.	เอทิลแอลกอฮอล์ 95 เปอร์เซ็นต์	1
8.	เอทิลแอลกอฮอล์ 70 เปอร์เซ็นต์	1
9.	เอทิลแอลกอฮอล์ 50 เปอร์เซ็นต์	1
10.	น้ำกลั่น	1
11.	สีสีมาทอกไซลิน	10
12.	น้ำประปา	3
13.	น้ำกลั่น	1
14.	เอทิลแอลกอฮอล์ 50 เปอร์เซ็นต์	1
15.	สีไออิน	3-5
16.	เอทิลแอลกอฮอล์ 70 เปอร์เซ็นต์	2
17.	เอทิลแอลกอฮอล์ 95 เปอร์เซ็นต์	2
18.	แอปโซลูทแอลกอฮอล์	2

ขั้นตอนที่	สารละลาย	เวลา(นาที)
19.	ไอโซโพรพิลแอลกอฮอล์	2
20.	ไอโซโพรพิลแอลกอฮอล์	2
21.	ไซลีน	2
22.	ไซลีน	2
23.	ไซลีน	2
24.	ไซลีน	2

หลังจากนำสไลด์ตัวอย่างผ่านขั้นตอนสุดท้าย คือแช่ในไซลีน แล้วจึงทำการเคลือบด้วยน้ำยาเปอร์เมาท์ ตั้งทิ้งไว้ให้แห้งและนำไปส่องด้วยกล้องจุลทรรศน์

ตารางภาคผนวกที่ 1 ปริมาณเม็ดเลือดแดงและเม็ดเลือดขาว ฮีโมโกลบิน ฮีมาโตคริต โปรตีนในซีรัม กิจกรรมของเอนไซม์ไลโซไซม์ การลดลงของไนโตรบลูเตตราไซเลียม และกิจกรรมการจับกินสิ่งแปลกปลอม ของปลาสวายปรับปรุงสายพันธุ์ที่เลี้ยงด้วยอาหารทดลองผสม ALA ที่ระดับความเข้มข้นต่างๆ เป็นระยะเวลา 4 สัปดาห์

พารามิเตอร์	ความเข้มข้นของ ALA				
	T1: 0 mg/kg	T2: 2.5 mg/kg	T3: 5 mg/kg	T4: 7.5 mg/kg	T5: 10 mg/kg
องค์ประกอบเลือด					
เม็ดเลือดแดง ($\times 10^9$ cell/ml)	2.65 \pm 0.11 ^a	2.90 \pm 0.07 ^b	2.82 \pm 0.12 ^{ab}	2.70 \pm 0.12 ^a	2.66 \pm 0.22 ^a
เม็ดเลือดขาว ($\times 10^7$ cell/ml)	3.79 \pm 0.70 ^a	4.95 \pm 0.39 ^c	4.77 \pm 0.11 ^{bc}	4.24 \pm 0.10 ^{abc}	3.95 \pm 0.51 ^{ab}
ฮีมาโตคริต (%)	32.78 \pm 1.59 ^a	42.61 \pm 1.79 ^c	38.23 \pm 1.51 ^b	38.12 \pm 2.02 ^b	36.16 \pm 2.39 ^b
ฮีโมโกลบินรวม (g/dl)	11.44 \pm 0.55 ^a	15.85 \pm 1.43 ^c	12.66 \pm 0.60 ^b	12.64 \pm 0.68 ^b	11.55 \pm 0.59 ^a
กิจกรรมของเอนไซม์ไลโซไซม์ (μ g/ml)	11.08 \pm 2.82 ^{ns}	12.85 \pm 2.80 ^{ns}	10.90 \pm 3.58 ^{ns}	11.09 \pm 2.19 ^{ns}	10.85 \pm 2.04 ^{ns}
โปรตีนในซีรัม (mg/ml)	49.60 \pm 4.11 ^{ns}	55.82 \pm 5.74 ^{ns}	52.53 \pm 6.90 ^{ns}	45.19 \pm 5.20 ^{ns}	44.81 \pm 7.78 ^{ns}
การลดลงของไนโตรบลูเตตราไซเลียม	0.126 \pm 0.02 ^{ns}	0.136 \pm 0.027 ^{ns}	0.138 \pm 0.011 ^{ns}	0.124 \pm 0.013 ^{ns}	0.113 \pm 0.008 ^{ns}
กิจกรรมการจับกินสิ่งแปลกปลอม					
กิจกรรมการจับกินสิ่งแปลกปลอม (%)	32.50 \pm 1.32 ^a	39.00 \pm 4.92 ^b	34.67 \pm 2.75 ^{ab}	32.67 \pm 1.76 ^a	31.83 \pm 1.61 ^a
ดัชนีการจับกินสิ่งแปลกปลอม (%)	15.20 \pm 1.99 ^a	25.77 \pm 7.72 ^b	18.47 \pm 3.69 ^a	15.47 \pm 1.19 ^a	14.49 \pm 1.32 ^a
ค่าเฉลี่ยของเม็ดบัพที่ถูกล้อมโดยเม็ดเลือดขาวจับกิน	1.43 \pm 0.08 ^a	1.67 \pm 0.07 ^b	1.60 \pm 0.06 ^b	1.45 \pm 0.05 ^a	1.42 \pm 0.11 ^a

หมายเหตุ: - ค่าเฉลี่ย \pm ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานจำนวน 3 ซ้ำ, ค่าเฉลี่ยที่กำกับด้วยตัวอักษรต่างกัน ในแถวเดียวกัน มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซนต์ ($p < 0.05$)

- ns ไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p > 0.05$)

ตารางภาคผนวกที่ 2 ปริมาณเม็ดเลือดแดงและเม็ดเลือดขาว ฮีโมโกลบิน ฮีมาโตคริต โปรีตีนในซีรัม กิจกรรมของเอนไซม์ไลโซไซม์ การลดลงของไนโตรบลูเตตราไซเลียม และกิจกรรมการจับกินสิ่งแปลกปลอม ของปลาสาวยปรับปรุงสายพันธุ์ที่เลี้ยงด้วยอาหารทดลองผสม ALA ที่ระดับความเข้มข้นต่างๆ เป็นระยะเวลา 8 สัปดาห์

พารามิเตอร์	ความเข้มข้นของ ALA				
	T1: 0 mg/kg	T2: 2.5 mg/kg	T3: 5 mg/kg	T4: 7.5 mg/kg	T5: 10 mg/kg
องค์ประกอบเลือด					
เม็ดเลือดแดง ($\times 10^9$ cell/ml)	3.23 \pm 0.38 ^{ns}	3.19 \pm 0.34 ^{ns}	3.07 \pm 0.11 ^{ns}	2.99 \pm 0.20 ^{ns}	2.91 \pm 0.21 ^{ns}
เม็ดเลือดขาว ($\times 10^7$ cell/ml)	4.33 \pm 0.55 ^{ns}	4.69 \pm 0.63 ^{ns}	4.43 \pm 0.63 ^{ns}	4.51 \pm 0.40 ^{ns}	4.54 \pm 0.80 ^{ns}
ฮีมาโตคริต (%)	39.58 \pm 1.38 ^b	39.36 \pm 3.40 ^b	38.38 \pm 3.31 ^b	36.97 \pm 2.27 ^{ab}	34.35 \pm 3.98 ^a
ฮีโมโกลบินรวม (g/dl)	14.18 \pm 0.77 ^b	14.12 \pm 0.92 ^b	14.11 \pm 1.12 ^b	13.39 \pm 1.07 ^{ab}	12.73 \pm 0.84 ^a
กิจกรรมของเอนไซม์ไลโซไซม์ (μ g/ml)	11.84 \pm 2.78 ^{ns}	11.56 \pm 1.41 ^{ns}	11.85 \pm 1.78 ^{ns}	12.53 \pm 2.49 ^{ns}	12.61 \pm 2.02 ^{ns}
โปรีตีนในซีรัม (mg/ml)	47.56 \pm 4.25 ^b	47.51 \pm 3.49 ^b	47.38 \pm 4.99 ^b	44.10 \pm 4.52 ^b	39.62 \pm 3.57 ^a
การลดลงของไนโตรบลูเตตราไซเลียม	0.148 \pm 0.05 ^a	0.163 \pm 0.027 ^{ab}	0.167 \pm 0.018 ^{ab}	0.197 \pm 0.046 ^{bc}	0.211 \pm 0.057 ^c
กิจกรรมการจับกินสิ่งแปลกปลอม					
กิจกรรมการจับกินสิ่งแปลกปลอม (%)	29.50 \pm 3.08 ^{ns}	31.83 \pm 0.76 ^{ns}	32.33 \pm 1.26 ^{ns}	32.50 \pm 1.00 ^{ns}	35.50 \pm 1.05 ^{ns}
ดัชนีการจับกินสิ่งแปลกปลอม (%)	16.81 \pm 3.60 ^a	20.37 \pm 1.79 ^{ab}	21.09 \pm 1.48 ^{ab}	21.69 \pm 1.60 ^{ab}	25.81 \pm 2.45 ^b
ค่าเฉลี่ยของเม็ดบีทที่ถูกเม็ดเลือดขาวจับกิน	1.91 \pm 0.12 ^{ns}	2.01 \pm 0.07 ^{ns}	2.02 \pm 0.11 ^{ns}	2.05 \pm 0.04 ^{ns}	2.05 \pm 0.15 ^{ns}

หมายเหตุ: - ค่าเฉลี่ย \pm ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานจำนวน 3 ซ้ำ, ค่าเฉลี่ยที่กำกับด้วยตัวอักษรต่างกัน ในแถวเดียวกัน มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซนต์ ($p < 0.05$)

- ns ไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p > 0.05$)

ประวัติผู้เขียน

ชื่อ สกุล

นายวิรุพท์ศักดิ์ ทองสุภา

รหัสนักศึกษา

5810620023

วุฒิการศึกษา

วุฒิ	ชื่อสถาบัน	ปีที่สำเร็จ
วิทยาศาสตร์บัณฑิต (ชีววิทยาประยุกต์)	มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลศรีวิชัย	2558

การตีพิมพ์เผยแพร่ผลงาน

วิรุพท์ศักดิ์ ทองสุภา, นเรศ ช้วนยุค, อังคณา ไส้เกื้อ และสุภณัฐ ธานีรัตน์. 2563. ผลของกรด 5-อะมิโนลิวูลินิกต่อการเจริญเติบโต และการตอบสนองของภูมิคุ้มกันในปลาสวายปรับปรุงสายพันธุ์ (*Pangasianodon gigas* x *Pangasianodon hypophthalmus*) วารสารวิชา มหาวิทยาลัยราชภัฏนครศรีธรรมราช 39:16-30.