

การทดสอบผลของไคโตซานต่อการทำงานของ ของเซลล์จับกินในปลานิล

Investigation of Chitosan Effects on Activities of Phagocytic Cells in Nile Tilapia, *Oreochromis niloticus*

ดวงกมล แสนสวาท (Duangkamol Saensawath)* ดร.นิลุบล กิจอันเจริญ (Dr.Nilubol Kitancharoen)**
ดร.ชุตินา หาญจวนิช (Dr.Chutima Hanjavanij)*** ดร.พรทิพย์ วงศ์แก้ว (Dr.Porntip Wongkeaw)****

บทคัดย่อ

การทดสอบผลของไคโตซานต่อการทำงานของเซลล์จับกินในปลานิล (*Oreochromis niloticus*) โดยการผสมไคโตซานความเข้มข้น 0.5, 1.0, 1.5, 2.0 เปอร์เซ็นต์ในอาหารเป็นระยะเวลา 12 สัปดาห์ เปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุมซึ่งไม่ได้รับไคโตซาน จากการศึกษาทดลองที่ได้รับอาหารผสมไคโตซานเข้มข้น 2 เปอร์เซ็นต์ ทำให้ค่า haematocrit index ปริมาณเซลล์เม็ดเลือดขาว เปอร์เซ็นต์ phagocyte และค่า phagocytic index ของปลานิลเพิ่มสูงขึ้น รองลงมาคือกลุ่มที่ได้รับไคโตซานเข้มข้น 1.5, 1.0, 0.5 เปอร์เซ็นต์ และกลุ่มควบคุมตามลำดับ ค่า haematocrit index ปริมาณเซลล์เม็ดเลือดขาว เปอร์เซ็นต์ phagocyte และค่า phagocytic index เพิ่มขึ้นตามระยะเวลาที่ได้รับไคโตซาน ที่เพิ่มสูงที่สุดเมื่อได้รับไคโตซานเป็นเวลา 12 สัปดาห์ ในทางตรงกันข้ามพบว่าอัตราการเจริญเติบโตปลานิลที่ได้รับอาหารที่ผสมไคโตซานลดต่ำลงเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม

ABSTRACT

Investigation of chitosan effects on activities of phagocytic cells in Nile Tilapia, *Oreochromis niloticus* was performed. Feeds containing chitosan at 0.5, 1.0, 1.5 and 2.0 % were supplied to the fish for 12 weeks comparing to control group without chitosan. Fish fed with 2.0 % chitosan increased haematocrit index, numbers of white blood cells, percentage of phagocyte and phagocytic index than fish fed with 1.5, 1.0, 0.5% and control group. Haematocrit index, numbers of white blood cells, percentage of phagocyte and phagocytic index of all groups increased gradually during the experiment related to period of administration. In contrary, the fish fed with feeds containing chitosan showed decreased of growth rate comparing with the control group.

คำสำคัญ : ไคโตซาน ปลานิล เซลล์จับกิน

Key Words : Chitosan, Nile tilapia, Phagocytes cells

* นักศึกษา หลักสูตรวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาการประมง คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น

** ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ภาควิชาประมง คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น

*** รองศาสตราจารย์ ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น

**** รองศาสตราจารย์ ภาควิชาพืชศาสตร์และทรัพยากรการเกษตร คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น

บทนำ

ผลการเลี้ยงปลานิล (Nile Tilapia, *Oreochromis niloticus*) ได้ปรับเปลี่ยนรูปแบบเป็นการเลี้ยงแบบหนาแน่นเพื่อเพิ่มผลผลิตให้เพียงพอต่อความต้องการของตลาด เป็นผลให้สภาพบ่อหรือแหล่งน้ำที่เลี้ยงเสื่อมโทรมลงทำให้ปลาเกิดความเครียดเป็นสาเหตุให้เกิดการระบาดของโรค ซึ่งโรคที่พบในปลานิลได้แก่โรคที่เกิดจากปรสิต เชื้อรา และจากเชื้อแบคทีเรีย (กรมประมง, 2545; เพ็ญพรรณ, 2543) การแก้ปัญหาการระบาดของโรคในปลานิลมักใช้สารเคมีและยาปฏิชีวนะโดยเฉพาะโรคที่เกิดจากเชื้อแบคทีเรีย มักใช้ยาปฏิชีวนะก่อให้เกิดปัญหาการดื้อยาของเชื้อแบคทีเรีย รวมถึงการตกค้างของยาปฏิชีวนะในผลผลิตสัตว์น้ำซึ่งอาจส่งผลกระทบต่อผู้บริโภคและสภาพแวดล้อม (นิลบล, 2545) การหาวิธีการเพิ่มความต้านทานโรคของปลานิล จึงเป็นอีกทางเลือกที่น่าจะนำมาใช้เพื่อลดปัญหาการระบาดของโรคและการตกค้างของยาและสารเคมีในผลผลิตปลานิล มีการศึกษาการใช้วัคซีนในปลานิล พบว่าให้ผลดีในการป้องกันโรคสเตรปโตคอคโคซิสก่อนที่จะเกิดการระบาด (ธีรภรณ์ และคณะ, 2548) นอกจากการป้องกันโรคที่เกิดกับปลานิลโดยการใช้วัคซีนแล้วควรมีการกระตุ้นการทำงานของภูมิคุ้มกันให้อยู่ในระดับสูงอย่างสม่ำเสมอ โดยเฉพาะการกระตุ้นระบบภูมิคุ้มกันแบบไม่จำเพาะซึ่งเป็นด่านแรกของระบบภูมิคุ้มกันในสิ่งมีชีวิตชั้นสูง ปัจจุบันมีการใช้สารกระตุ้นภูมิคุ้มกัน (immunostimulants) หลายชนิดในการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำ เช่น แอสตาแซนทิน (astaxanthin) เปปติโดไกลแคน (peptidoglycan) ไคติน (chitin) และไคโตซาน (chitosan) ซึ่งสารที่ใช้กระตุ้นภูมิคุ้มกันจะทำงานเกี่ยวกับการกระตุ้นการทำงานของเซลล์ที่ทำหน้าที่ในการจับกินสิ่งแปลกปลอม (phagocytic cells) และช่วยกระตุ้นการตอบสนองของเซลล์อื่นๆ ที่เกี่ยวข้องกับระบบภูมิคุ้มกันทำให้ปลาที่ได้รับการกระตุ้นลดการติดเชื้อซึ่งเป็นสาเหตุของการตาย

(ชนกันต์, 2545)

ไคโตซาน (chitosan) คือ โมเลกุลโพลิเมอร์ของน้ำตาลกลูโคสที่มีหมู่เอมีโน ($-NH_2$) มาประกอบเรียกว่า poly amino glucose หรือ poly (2-amino-2-deoxy-D-glucose) หรือ poly (anhydro-D-glucosamine) หรือ poly (D-glucosamine) สูตรโมเลกุล $[C_6H_{12}O_4N]_n$ น้ำหนักโมเลกุล $[162.17]_n$ ไคโตซานเป็นอนุพันธ์ของไคตินที่ได้จากปฏิกิริยากำจัดหมู่อะซีทิล (deacetylation) ของไคตินด้วยสารละลายต่างเข้มข้น (ปิยะบุตร, 2004; Cha et al., 2008) มีการศึกษาเกี่ยวกับการนำไคติน-ไคโตซานมาเป็นสารเพิ่มภูมิคุ้มกันในสัตว์น้ำ ทั้งในปลาและกุ้ง พบว่าสามารถกระตุ้นให้ปลา เกิดความต้านทานต่อเชื้อก่อโรคเพิ่มมากขึ้น (Anderson and Siwicki, 1994) ไคโตซานจะกระตุ้นการทำงานของ macrophage ในปลา (Sakai et al., 1999) เพิ่มขบวนการ phagocytosis และ cytotoxic activity ซึ่งจะกระตุ้นการทำงานของภูมิคุ้มกันทั้ง humoral immunity และ cellular immunity ของสัตว์น้ำ (Esteban et al., 2000) ซึ่งเป็นแนวโน้มที่ดีในการเพิ่มความแข็งแรงและต้านทานต่อโรคให้ปลานิล ดังนั้นไคโตซานจึงเป็นวัตถุดิบที่น่าสนใจที่จะนำมาพัฒนาเป็นสารกระตุ้นภูมิคุ้มกันของปลานิล ซึ่งจะเป็นการเพิ่มคุณภาพและความปลอดภัย ยังช่วยลดต้นทุนการผลิตจากการใช้ยา และเป็นการรักษาสังแวดล้อมอีกทางหนึ่ง

อุปกรณ์และวิธีการวิจัย

1. ตัวอย่างปลาทดลอง

ปลานิลที่ใช้ในการศึกษามีขนาดเฉลี่ย 50.6 ± 2.6 กรัม นำปลาทั้งหมดมาปรับให้เข้ากับสภาพการทดลองในบ่อทดลองขนาด $1.5 \times 2 \times 0.6$ เมตร ก่อนการทดลอง 2 สัปดาห์ ความหนาแน่น 100 ตัว/บ่อ ให้อาหารเม็ดสำเร็จรูปในอัตรา 3 เปอร์เซ็นต์ของน้ำหนักตัว วันละ 2 ครั้ง ใช้ระบบน้ำไหลผ่านตลอด

2. การหาค่า Haematocrit index (HI)

ในการเก็บตัวอย่างเลือดปลานิลจาก caudal blood vessel ทุก 2 สัปดาห์ โดยเก็บ 1 มิลลิลิตร ต่อตัว และเติม EDTA เข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อเลือด 1 มิลลิลิตร เพื่อป้องกันการแข็งตัวของเลือด นำมาปั่นเหวี่ยงด้วยเครื่อง Haematocrit 24 (Hettich centrifugen, Thailand) ด้วยความเร็ว 12,800 รอบ ต่อนาที เป็นเวลา 3 นาที อ่านค่า Haematocrit index

3. การแยกเซลล์เม็ดเลือดขาว

ทำการแยกเซลล์เม็ดเลือดขาวจากตับของ ปลานิล โดยนำชิ้นส่วนตับมาล้างใน Phosphate Buffer Saline (PBS) pH 6.4 ที่ผ่านการฆ่าเชื้อ ปริมาตร 2 มิลลิลิตร แยกเซลล์เม็ดเลือดขาวโดยบดเนื้อเยื่อ ของตับผ่านตะแกรงขนาดตา 100 ไมโครเมตร จากนั้นนำเซลล์ที่ได้ไปปั่นล้างด้วย PBS 2 ครั้ง ที่ความเร็ว 2,500 รอบ เป็นเวลา 5 นาที จากนั้น ปรับปริมาตรให้ครบ 1.0 มิลลิลิตร นับจำนวนเซลล์ เม็ดเลือดขาวโดยใช้ hemacytometer (Neubauer Improved Briht-Line HBG, Germany) เหลือเก็บ ไว้สำหรับหาประสิทธิภาพของการทำงานของเซลล์ เม็ดเลือดขาว

4. การหาประสิทธิภาพของการทำงานของเซลล์ เม็ดเลือดขาว (Phagocytic index, PI)

การหาประสิทธิภาพของการทำงานของ เซลล์เม็ดเลือดขาวทำได้จากการหาค่าการจับกิน Zymosan A (Sigma, Germany) ของ phagocytes โดยนำเซลล์เม็ดเลือดขาวที่เตรียมจากข้อ 3 มา 100 ไมโครลิตร เติม Zymosan A ปริมาตร 100 ไมโครลิตร เก็บที่ไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 1 ชั่วโมง จากนั้นนำไปสเมียร์บนสไลด์รอให้แห้งนำไปย้อมด้วย Wright's Giemsa stain จากนั้นนำไป นับจำนวนเม็ดเลือดขาว และจำนวน phagocytes เพื่อหาค่า Phagocytic index (PI) และเปอร์เซ็นต์

phagocytes ตามวิธีของ Scott and Klesius (1981) ดังนี้

$$\% \text{ Phagocyte} = \frac{\text{จำนวน Phagocytes}}{\text{จำนวนเซลล์เม็ดเลือดขาวทั้งหมด (200 เซลล์)}} \times 100$$

หาค่า Phagocytic index (PI) จาก Zymosan A ใน เซลล์ phagocyte ในเซลล์ phagocytes แต่ละเซลล์ต่อ 40 เซลล์

$$PI = \frac{\text{จำนวนของ Zymosan A ที่ถูกจับกินใน phagocytes}}{\text{จำนวน Phagocytes ที่จับกิน (40 เซลล์)}}$$

5. ผลของโคโคซานต่อระบบเลือดของปลานิล

ในการศึกษาจะแบ่งการทดลองออกเป็น 5 กลุ่มทดลองๆ ละ 3 ซ้ำ ซ้ำละ 100 ตัว โดยให้อาหารผสมโคโคซานในรูปของสารละลายที่มีความเข้มข้น ของโคโคซานเท่ากับ 0.5, 1.0, 1.5 และ 2.0 เปอร์เซ็นต์ และกลุ่มควบคุม ซึ่งได้รับอาหารปกติ เป็นระยะเวลา 12 สัปดาห์ ทำการชั่งน้ำหนัก เริ่มต้นและน้ำหนักสุดท้ายของปลานิลเมื่อสิ้นสุด การทดลองเพื่อหาอัตราการเจริญเติบโตจำเพาะ (Specific Growth Rate, SGR) ของปลานิลตามวิธี การของ Ricker (1979)

$$SGR = \frac{\ln(\text{น้ำหนักสุดท้าย}) - \ln(\text{น้ำหนักเริ่มต้น})}{\text{ระยะเวลาทดลอง}} \times 100$$

ทำการเจาะเลือดปลานิลเพื่อนำมาวัดค่า Haematocrit index และแยกเก็บเซลล์เม็ดเลือดขาว จากตับทุก 2 สัปดาห์ โดยใช้ปลาจำนวน 10 ตัวต่อซ้ำ เพื่อนำมาหาค่าปริมาณเซลล์เม็ดเลือดขาว เปอร์เซ็นต์ phagocyte และ phagocytic index (PI) โดยวัดจาก การจับกิน Zymosan A (Sigma) ซึ่งดัดแปลง มาจากวิธีการของ Secombes (1990)

6. การวิเคราะห์ข้อมูล

ข้อมูลเชิงปริมาณที่ได้ นำ มาวิเคราะห์โดยใช้ วิธีวิเคราะห์ความแปรปรวน (Analysis of Variance)

และเปรียบเทียบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยตามวิธีของ Duncan's New Multiple Rang Test ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์ ด้วยโปรแกรมสำเร็จรูป SAS Version 6.12 (Schotzhauer and Littell., 1997)

ผลการวิจัยและการอภิปรายผล

1. ผลของโคโตซานต่ออัตราการเจริญเติบโตของปลานิล

อัตราการเจริญเติบโตจำเพาะของปลานิลที่ได้รับโคโตซานที่ระดับความเข้มข้นแตกต่างกัน 5 ระดับ คือ กลุ่มควบคุม 0.5, 1.0, 1.5 และ 2.0 เปอร์เซ็นต์ พบว่ากลุ่มที่มีอัตราการเจริญเติบโตจำเพาะสูงที่สุดคือกลุ่มที่ได้รับโคโตซานเข้มข้น 1.0 เปอร์เซ็นต์ แต่เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุมพบว่าไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ ($P>0.05$) โดยมีค่าเท่ากับ 0.86 ± 0.21 และ 0.82 ± 0.23 ตามลำดับ กลุ่มที่ได้รับโคโตซานเข้มข้นสูงกว่า 1 เปอร์เซ็นต์ จะมีอัตราการเจริญเติบโตต่ำกว่าอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติกับกลุ่มที่ได้รับโคโตซานเข้มข้น 0.5 เปอร์เซ็นต์ (ตารางที่ 1)

ตารางที่ 1 อัตราการเจริญเติบโตจำเพาะเฉลี่ยของปลานิลที่ได้รับโคโตซานผสมอาหารที่ระดับความเข้มข้นที่แตกต่างกัน

ความเข้มข้นโคโตซาน (%)	อัตราการเจริญเติบโตจำเพาะเฉลี่ย กรัม/วัน (Means $\pm$ S.D.)
กลุ่มควบคุม	0.82 ± 0.23^a
0.5	0.75 ± 0.22^{ab}
1.0	0.86 ± 0.21^a
1.5	0.68 ± 0.50^b
2.0	0.69 ± 0.17^b

หมายเหตุ ตัวอักษรภาษาอังกฤษตัวพิมพ์เล็กที่เหมือนกันในแนวนอง ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ ($P>0.05$)

2. ผลของโคโตซานต่อค่า Haematocrit index (HI)

ในการศึกษาผลของโคโตซานที่ระดับความเข้มข้นแตกต่างกันต่อค่า haematocrit index ของปลานิล จากผลการวิเคราะห์ทางสถิติพบว่าค่า haematocrit index ของปลานิลเพิ่มขึ้นตามปริมาณความเข้มข้นของโคโตซานที่เพิ่มขึ้น แต่กลุ่มที่ได้รับโคโตซานเข้มข้น 0.5 เปอร์เซ็นต์ ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ ($P>0.05$) กับกลุ่มควบคุม และค่า haematocrit index จะเพิ่มขึ้นตามระยะเวลาที่ได้รับโคโตซาน โดยจะเริ่มคงที่ในสัปดาห์ที่ 8 ของการให้โคโตซาน (ตารางที่ 2)

3. ผลของโคโตซานต่อปริมาณเซลล์เม็ดเลือดขาวของปลานิล

การให้โคโตซานที่ความเข้มข้นแตกต่างกัน มีผลต่อปริมาณเซลล์เม็ดเลือดขาวของปลานิล โดยกลุ่มที่ได้รับโคโตซานที่ระดับความเข้มข้นที่สูงขึ้นจะมีปริมาณเซลล์เม็ดเลือดขาวมากกว่าปลานิลกลุ่มที่ได้รับโคโตซานในความเข้มข้นที่ต่ำกว่า ($P<0.05$) ปลานิลที่ได้รับโคโตซานเป็นระยะเวลานานจะมีปริมาณเซลล์เม็ดเลือดขาวสูงกว่าปลานิลกลุ่มที่ได้รับโคโตซานในระยะเวลาสั้นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.05$) ตารางที่ 3

4. ผลของโคโตซานต่อเปอร์เซ็นต์ Phagocyte ของปลานิล

การศึกษาเปรียบเทียบผลของการให้โคโตซานผสมอาหารที่ระดับความเข้มข้นแตกต่างกันต่อค่าเปอร์เซ็นต์ phagocyte พบว่าทั้ง 5 กลุ่มทดลองมีความแตกต่างกันทางสถิติ ($P<0.05$) โดยกลุ่มที่ได้รับโคโตซานที่ระดับความเข้มข้น 2.0 เปอร์เซ็นต์ มีค่าเปอร์เซ็นต์ phagocyte สูงที่สุด รองลงไปได้แก่ 1.5, 1.0, 0.5 เปอร์เซ็นต์ และกลุ่มควบคุมตามลำดับ (ตารางที่ 4) และพบว่าค่าเปอร์เซ็นต์ phagocyte โดยจะมีแนวโน้มที่เพิ่มขึ้นตามระยะเวลาที่ได้รับโคโตซาน ในสัปดาห์ที่ 12 ของทุกกลุ่มการ

ทดลองมีค่าเปอร์เซ็นต์ phagocyte สูงที่สุด แต่ใน phagocyte ยังไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ ช่วง 4 สัปดาห์แรกของการได้ทดลองค่าเปอร์เซ็นต์ ($P>0.05$) (ตารางที่ 4)

ตารางที่ 2 ค่า Haematocrit index ของปลานิลที่ได้รับอาหารผสมโคโคซานที่ความเข้มข้นและระยะเวลาที่แตกต่างกัน

ความเข้มข้น โคโคซาน (%)	Haematocrit index (Means $\pm$ S.D.)					
	สัปดาห์ที่ 2	สัปดาห์ที่ 4	สัปดาห์ที่ 6	สัปดาห์ที่ 8	สัปดาห์ที่ 10	สัปดาห์ที่ 12
กลุ่มควบคุม	30.56 $\pm$ 3.76 ^{Dd}	37.76 $\pm$ 3.61 ^{Dc}	38.00 $\pm$ 4.92 ^{Db}	40.93 $\pm$ 5.42 ^{Dab}	41.26 $\pm$ 5.26 ^{Da}	41.26 $\pm$ 2.98 ^{Da}
0.5	28.60 $\pm$ 0.27 ^{Dd}	38.90 $\pm$ 5.05 ^{Dc}	41.93 $\pm$ 4.66 ^{Db}	41.06 $\pm$ 5.43 ^{Dab}	41.56 $\pm$ 5.39 ^{Da}	42.83 $\pm$ 5.54 ^{Da}
1.0	29.40 $\pm$ 5.14 ^{Cd}	42.06 $\pm$ 0.86 ^{Cc}	43.10 $\pm$ 5.56 ^{Cb}	47.90 $\pm$ 3.47 ^{Cab}	47.96 $\pm$ 2.35 ^{Ca}	47.86 $\pm$ 3.70 ^{Ca}
1.5	36.33 $\pm$ 3.08 ^{Bd}	43.63 $\pm$ 2.38 ^{Bc}	44.73 $\pm$ 3.41 ^{Bb}	48.80 $\pm$ 5.24 ^{Bab}	49.16 $\pm$ 4.43 ^{Ba}	49.46 $\pm$ 4.26 ^{Ba}
2.0	41.06 $\pm$ 2.27 ^{Ad}	44.86 $\pm$ 0.59 ^{Ac}	48.23 $\pm$ 2.50 ^{Ab}	52.80 $\pm$ 2.46 ^{Aab}	54.70 $\pm$ 2.86 ^{Aa}	54.80 $\pm$ 2.96 ^{Aa}

หมายเหตุ ตัวอักษรภาษาอังกฤษตัวพิมพ์ใหญ่ที่เหมือนกันในแนวดิ่งไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ ($P>0.05$)

ตัวอักษรภาษาอังกฤษตัวพิมพ์เล็กที่เหมือนกันในแนวนอน ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ ($P>0.05$)

ตารางที่ 3 ปริมาณเซลล์เม็ดเลือดขาวของปลานิลที่ได้รับอาหารผสมโคโคซานที่ความเข้มข้นและระยะเวลาที่แตกต่างกัน

ความเข้มข้น โคโคซาน (%)	จำนวนเซลล์เม็ดเลือดขาว ($\times 10^4$) ต่อ น้ำหนักตัว 1 กรัม (Means $\pm$ S.D.)					
	สัปดาห์ที่ 2	สัปดาห์ที่ 4	สัปดาห์ที่ 6	สัปดาห์ที่ 8	สัปดาห์ที่ 10	สัปดาห์ที่ 12
กลุ่มควบคุม	70.47 $\pm$ 2.10 ^{Ef}	73.68 $\pm$ 2.89 ^{Ec}	76.36 $\pm$ 0.06 ^{Ed}	79.72 $\pm$ 2.23 ^{Ec}	83.01 $\pm$ 3.26 ^{Eb}	83.32 $\pm$ 3.48 ^{Ea}
0.5	82.12 $\pm$ 4.07 ^{Dr}	106.35 $\pm$ 3.85 ^{Dc}	128.91 $\pm$ 3.59 ^{Dd}	133.37 $\pm$ 3.58 ^c	141.83 $\pm$ 3.99 ^{Db}	149.96 $\pm$ 3.90 ^{Da}
1.0	85.23 $\pm$ 3.92 ^{Cr}	125.27 $\pm$ 3.80 ^{Cc}	130.52 $\pm$ 3.64 ^{Cd}	137.83 $\pm$ 3.89 ^{Cc}	145.83 $\pm$ 3.85 ^{Cb}	151.83 $\pm$ 3.81 ^{Ca}
1.5	107.16 $\pm$ 3.72 ^{Bf}	145.91 $\pm$ 3.95 ^{Bc}	154.12 $\pm$ 3.86 ^{Bd}	158.40 $\pm$ 3.79 ^{Bc}	161.95 $\pm$ 4.51 ^{Bb}	169.23 $\pm$ 3.82 ^{Ba}
2.0	129.80 $\pm$ 1.46 ^{Af}	166.39 $\pm$ 0.69 ^{Ac}	166.39 $\pm$ 1.33 ^{Ad}	177.65 $\pm$ 1.87 ^{Ac}	185.43 $\pm$ 1.54 ^{Ab}	194.32 $\pm$ 1.52 ^{Aa}

หมายเหตุ ตัวอักษรภาษาอังกฤษตัวพิมพ์ใหญ่ที่เหมือนกันในแนวดิ่งไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ ($P>0.05$)

ตัวอักษรภาษาอังกฤษตัวพิมพ์เล็กที่เหมือนกันในแนวนอน ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ ($P>0.05$)

ตารางที่ 4 แสดงค่าเปอร์เซ็นต์ Phagocyte ของปลานิลที่ได้รับอาหารผสมโคโคซานที่ความเข้มข้นและระยะเวลาที่แตกต่างกัน

ความเข้มข้น โคโคซาน (%)	Phagocyte (%) (Means $\pm$ S.D.)					
	สัปดาห์ที่ 2	สัปดาห์ที่ 4	สัปดาห์ที่ 6	สัปดาห์ที่ 8	สัปดาห์ที่ 10	สัปดาห์ที่ 12
กลุ่มควบคุม	17.97 $\pm$ 1.19 ^{Dc}	18.27 $\pm$ 1.31 ^{Dc}	19.73 $\pm$ 1.50 ^{Dd}	20.93 $\pm$ 1.75 ^{Dc}	22.22 $\pm$ 1.27 ^{Db}	22.28 $\pm$ 1.55 ^{Da}
0.5	16.21 $\pm$ 1.57 ^{Ec}	16.63 $\pm$ 0.32 ^{Ec}	17.17 $\pm$ 1.03 ^{Ed}	17.76 $\pm$ 1.04 ^{Ec}	21.65 $\pm$ 1.32 ^{Eb}	23.98 $\pm$ 1.20 ^{Ea}
1.0	18.65 $\pm$ 1.74 ^{Cc}	18.81 $\pm$ 1.43 ^{Cc}	24.70 $\pm$ 1.04 ^{Cd}	26.36 $\pm$ 1.21 ^{Cc}	27.91 $\pm$ 1.43 ^{Cb}	30.11 $\pm$ 1.11 ^{Ca}
1.5	18.06 $\pm$ 2.33 ^{Bc}	18.98 $\pm$ 1.17 ^{Bc}	19.41 $\pm$ 1.93 ^{Bd}	19.70 $\pm$ 1.20 ^{Bc}	24.81 $\pm$ 1.08 ^{Bb}	33.06 $\pm$ 1.01 ^{Ba}
2.0	18.23 $\pm$ 2.75 ^{Ac}	19.66 $\pm$ 2.20 ^{Ac}	21.68 $\pm$ 22.73 ^{Ad}	22.73 $\pm$ 1.33 ^{Ac}	25.11 $\pm$ 1.41 ^{Ab}	34.15 $\pm$ 1.28 ^{Aa}

หมายเหตุ ตัวอักษรภาษาอังกฤษตัวพิมพ์ใหญ่ที่เหมือนกันในแนวดิ่งไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ ($P>0.05$)

ตัวอักษรภาษาอังกฤษตัวพิมพ์เล็กที่เหมือนกันในแนวนอน ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ ($P>0.05$)

5. ผลของโคโตซานต่อค่า Phagocytic index (PI)

การศึกษาเปรียบเทียบอัตราการให้ของโคโตซานต่อค่า phagocytic index พบว่าค่า phagocytic index ของทั้ง 5 กลุ่มทดลองแตกต่างกันทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญ ($P < 0.05$) โดยปลาที่ได้รับโคโตซานที่ระดับความเข้มข้น 2.0 เปอร์เซ็นต์ มีค่า phagocytic index สูงที่สุดรองลงมาได้แก่ 1.5, 1.0,

0.5 และกลุ่มควบคุมตามลำดับ (ตารางที่ 5) เมื่อเปรียบเทียบระยะเวลาที่ให้โคโตซานต่อค่า phagocytic index พบว่าปลาที่ได้รับโคโตซานเป็นเวลาสัปดาห์ที่ 12 มีค่า phagocytic index สูงที่สุด และค่า phagocytic index ลดลงเมื่อระยะเวลาในการให้โคโตซานลดลงตามลำดับ (ตารางที่ 5)

ตารางที่ 5 แสดงค่า Phagocytic index ของปลานิลที่ได้รับอาหารผสมโคโตซานที่ความเข้มข้นและระยะเวลาที่แตกต่างกัน

ความเข้มข้น โคโตซาน (%)	Phagocytic index (Means $\pm$ S.D.)					
	สัปดาห์ที่ 2	สัปดาห์ที่ 4	สัปดาห์ที่ 6	สัปดาห์ที่ 8	สัปดาห์ที่ 10	สัปดาห์ที่ 12
กลุ่มควบคุม	3.14 $\pm$ 0.09 ^{EF}	3.15 $\pm$ 0.10 ^{Ec}	3.32 $\pm$ 0.06 ^{Ed}	3.32 $\pm$ 0.08 ^{Ec}	3.33 $\pm$ 0.05 ^{Eb}	3.34 $\pm$ 0.04 ^{Ea}
0.5	3.47 $\pm$ 0.06 ^{Df}	3.54 $\pm$ 0.05 ^{Dc}	3.62 $\pm$ 0.04 ^{Dd}	3.65 $\pm$ 0.05 ^{Dc}	3.76 $\pm$ 0.06 ^{Dh}	3.80 $\pm$ 0.04 ^{Da}
1.0	3.47 $\pm$ 0.05 ^{Cf}	3.56 $\pm$ 0.03 ^{Cc}	3.73 $\pm$ 0.07 ^{Cd}	3.90 $\pm$ 0.04 ^{Cc}	4.01 $\pm$ 0.04 ^{Cb}	4.06 $\pm$ 0.0 ^{Ca}
1.5	3.49 $\pm$ 0.04 ^{Bf}	3.61 $\pm$ 0.04 ^{Bc}	3.81 $\pm$ 0.07 ^{Bd}	4.02 $\pm$ 0.07 ^{Bc}	4.13 $\pm$ 0.05 ^{Bb}	4.18 $\pm$ 0.05 ^{Ba}
2.0	3.66 $\pm$ 0.05 ^{Af}	3.91 $\pm$ 0.08 ^{Ac}	4.20 $\pm$ 0.07 ^{Ad}	4.40 $\pm$ 0.05 ^{Ac}	4.52 $\pm$ 0.06 ^{Ab}	4.76 $\pm$ 0.07 ^{Aa}

หมายเหตุ ตัวอักษรภาษาอังกฤษตัวพิมพ์ใหญ่ที่เหมือนกันในแนวนอนไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ ($P > 0.05$)

ตัวอักษรภาษาอังกฤษตัวพิมพ์เล็กที่เหมือนกันในแนวนอน ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ ($P > 0.05$)

สรุปผลการวิจัย

โคโตซานอนุพันธ์ของโคติน เป็นโพลิเมอร์ที่ถูกนำไปประยุกต์ใช้อย่างแพร่หลาย ส่วนหนึ่งถูกนำมาใช้เพื่อเพิ่มอัตราการเจริญเติบโต และเป็นสารกระตุ้นภูมิคุ้มกันของสัตว์เลี้ยง เช่น ไก่ และสุกร (ปิยะบุตร, 2004) ในการเลี้ยงกุ้งกุลาดำได้คลุกโคโตซานกับอาหารเม็ดเพื่อกระตุ้นภูมิคุ้มกันโรค กระตุ้นการย่อยอาหาร และเพิ่มการเจริญเติบโต (กมลศิริ, 2548) นอกจากนี้ยังมีการศึกษาผลของโคตินโคโตซานต่อระบบภูมิคุ้มกัน และความต้านทานเชื้อ *Vibrio alginolyticus* ของกุ้งขาวไวนาไม โดยวิธีการฉีดพบว่ากลุ่มที่ได้รับการฉีดโคตินและโคโตซานมีอัตราการรอดตาย และขบวนการ phagocytosis สูง haematocrit index ปริมาณเซลล์เม็ดเลือดขาว เปอร์เซ็นต์ phagocyte และค่า phagocytic index ของปลานิลเพิ่มสูงขึ้น รองลงมาคือกลุ่มที่ได้รับโคโตซานที่ความเข้มข้น

1.5, 1.0, 0.5 เปอร์เซ็นต์ผสมอาหารและกลุ่มควบคุมตามลำดับ และพบว่าค่า haematocrit index ปริมาณเซลล์เม็ดเลือดขาว เปอร์เซ็นต์ phagocyte และค่า phagocytic index จะค่อยๆ เพิ่มขึ้นตามระยะเวลาที่ได้รับโคโตซานโดยเพิ่มสูงที่สุดเมื่อได้รับโคโตซานเป็นเวลา 12 สัปดาห์ สอดคล้องกับรายงานของ Anderson and Siwicki (1994) ที่ทำทดสอบการเพิ่มขึ้นของระบบภูมิคุ้มกันโรคในปลา rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) โดยการให้โคโตซานผสมอาหาร พบว่ามีการเพิ่มขึ้นของระบบภูมิคุ้มกันโดยศึกษาจากความสามารถในการฆ่าทำลายเซลล์และปริมาณรวมของแอนติบอดี เช่นเดียวกับ Cha et al. (2008) ศึกษาผลของโคโตซานต่อระบบภูมิคุ้มกันที่มีมาแต่กำเนิด (innate immunity) ของปลาลิ้นหมา (*Paralichthys olivaceus*) โดยให้อาหารที่เคลือบด้วยโคโตซานเข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา

12 สัปดาห์ พบว่าสามารถเพิ่มการทำงานของระบบภูมิคุ้มกันแบบไม่จำเพาะได้แก่ myeloperoxidase (MPO), lysozyme, neutrophils และปริมาณ lysozyme จากเมือกปลาให้สูงขึ้น เมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม อย่างไรก็ตามจากการศึกษาผลของไคโตซานต่ออัตราการเจริญเติบโตของปลานิลพบว่าไม่มีความแตกต่างกันทั้งกลุ่มที่ได้รับหรือไม่ได้รับไคโตซานซึ่งคล้ายคลึงกับการศึกษาของ Shiau and Yu (1999) ซึ่งพบว่าอัตราการเจริญเติบโตของปลานิลลดต่ำลงเมื่อได้รับอาหารที่ผสมไคติน - ไคโตซานเมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม

ข้อเสนอแนะ

การให้ไคโตซานสำหรับกระตุ้นการทำงานของเซลล์จับกินในระบบภูมิคุ้มกันของปลานิลนั้นต้องให้ในปริมาณที่เหมาะสมและต่อเนื่องเพื่อประโยชน์สูงสุดในการกระตุ้นภูมิคุ้มกัน

กิตติกรรมประกาศ

งานวิจัยครั้งนี้ได้รับทุนอุดหนุนและส่งเสริมการทำวิทยานิพนธ์สำหรับนักศึกษาระดับบัณฑิตศึกษابัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยขอนแก่น ประจำปี 2550

เอกสารอ้างอิง

กมลศิริ พันธนียะ. 2548. ไคติน-ไคโตซาน.

สืบค้นจาก <http://www.nicaonline.com>

เมื่อ 5 กุมภาพันธ์ 2550.

กรมประมง. 2545. เอกสารประกอบคำแนะนำ

การเลี้ยงปลานิล. กระทรวงเกษตรและสหกรณ์. 4 หน้า.

ชนกันต์ จิตมนัส. 2545. สารกระตุ้นภูมิคุ้มกันปลา.

วารสารสงขลานครินทร์. 24(4),

739-747.

ธีราภรณ์ มอไรสง นิลุบล กิจอันเจริญ เพ็ญพรรณศรีสกุลเตียว และบัณฑิตย์ เต็งเจริญกุล.

2548. ประสิทธิภาพของการให้วัคซีนโดยการผสมอาหารเพื่อกระตุ้นภูมิคุ้มกัน และความต้านทานโรค Streptococcosis ในปลานิล. วารสารวิจัย มช. (ฉบับบัณฑิตศึกษา) 5(1). 50-58.

นิลุบล ยูอาสะ. 2545. การพัฒนาวิธีการในการป้องกันรักษาโรคที่เกิดกับปลานิลที่เลี้ยงในกระชังในเขตภาคตะวันออกเฉียงเหนือ. เอกสารประกอบงานวิจัยทุนอุดหนุนประจำปี 2545. มหาวิทยาลัย ขอนแก่น.

ปิยะบุตร วานิชพงษ์พันธุ์. 2004. ยุทธศาสตร์ไคติน-ไคโตซาน เพื่อพัฒนาเศรษฐกิจของประเทศไทย. วารสารเทคโนโลยีธนบุรี. 1: 18-26.

เพ็ญพรรณ ศรีสกุลเตียว. 2543. สภาพการเลี้ยงปลานิลในประเทศไทย. วารสารแก่นเกษตร. ภาควิชาประมง คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น. 28(4): 173-181.

Anderson, DP., and Siwicki, AK. 1994.

Duranton of protection against *Aeromonas salmonicida* in brook trout immunostimulated with glucan or chitosan by injection or immersion.

The progressive Fish Culturist

56: 258-261.

Cha, SH., Song, CB., Lee, KJ., And Jeon, YJ.

2008. Effects of chitosan-coated diet on improving water quality and innate immunity in the olive flounder,

Paralichthys olivaceus. Aquaculture

278: 110-118.

- Esteban , MA., Mulero, V., Cuesta, A., Ortuño J., and Meseguer, J. 2000. Effects of injecting chitin particles on the innate immune response of gilthead seabream (*Sparus aurata* L.). *Fish and Shellfish Immunology* 10: 543–554.
- Ricker, WE. 1979. Growth rates and models. In Hoar, W. S., Brett, P. J. Edited, *Fish Physiology*, vol 8. Academic Press, New York, pp. 677–743.
- Sakai, M. 1999. Current research status of fish immunostimulants. *Aquaculture* 172 : 63–92.
- Schotzhauer, SD., and Littell, RC. 1997. SAS System for Elementary Statical Analysis. 2nd Edition. SAS Institute., Gary, NC, USA.
- Scott, AL., and Klesius, PH. 1981. Chemiluminescence: A noval analysis of phagocytosis in fish. *Development Biology* Standard.49:243–254.
- Secombes, CJ. 1990. Isolation of salmonid macrophages and analysis of their killing activity. In Stolen, J. S., Fletcher, T. C., Anderson, D. P., Roberson, B. S., and Van Muiswinkel, W. B. 1990. *Techniques in Fish Immunology*. SOS Publication. USA. 137–155.
- Shiau, SY., and Yu. YP., 1999. Dietary supplementation of chitin and chitosan depresses growth in tilapia *Oreochromis niloticus* x *O. aureus*. *Aquaculture* 179: 439–446.
- Wang, SH., and Chen. JC. 2005. The protective effect of chitin and chitosan against *Vibrio alginolyticus* in white shrimp *Litopenaeus vannamei*. *Fish and Shellfish Immunology* 19 : 191–204.