ผลของไบโอฟลอคที่ผลิตจากแหล่งคาร์บอนที่แตกต่างกันต่อการตอบสนองของภูมิคุ้มกันในปลานิล (*Oreochromis niloticus*)

Effect of Biofloc Produced from Different Carbon Sources on Immune Response of Nile Tilapia (*Oreochromis niloticus*)

ศุภณัฐ วัฒิธรรม[1] ณัฏนิชา เมืองกาญจน์[1] ธีรวุฒิ เลิศสุทธิชวาล[1,2] นิอร จิรพงศธรกุล[1,2] และกิตติชนม์ อุเทนะพันธุ์[1,2*]

[1]สาขาประมง คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลศรีวิชัย วิทยาเขตนครศรีธรรมราช อ.ทุ่งสง จ.นครศรีธรรมราช

[2]หน่วยวิจัยการจัดการสุขภาพสัตว์น้ำ มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลศรีวิชัย วิทยาเขตนครศรีธรรมราช อ.ทุ่งสง จ.นครศรีธรรมราช

*E-mail : e_aquatic1@hotmail.com, kittichon.u@rmutsv.ac.th

บทคัดย่อ

เทคโนโลยีไบโอฟลอคเป็นเทคนิคการจัดการจุลินทรีย์ในระบบเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำ โดยการเติมคาร์บอนในปริมาณที่เหมาะสมต่อปริมาณไนโตรเจน (ของเสียในระบบการเลี้ยง) ทำให้เกิดมวลจุลินทรีย์ (จุลินทรีย์กลุ่ม heterotrophic โปรโตซัว แพลงก์ตอน และสารอินทรีย์) ในระบบเพิ่มมากขึ้นจนสามารถเป็นแหล่งอาหารของสัตว์น้ำ รวมถึงสามารถกระตุ้นภูมิคุ้มกันแบบไม่จำเพาะผ่านระบบการตรวจจับสิ่งแปลกปลอมของสัตว์น้ำได้ ส่งผลให้สัตว์น้ำมีความพร้อมและต้านทานต่อการบุกรุกมากขึ้น จากการศึกษาที่ผ่านมาแสดงให้เห็นถึงผลของแหล่งคาร์บอนที่แตกต่างกันในการผลิตไบโอฟลอคต่อปริมาณและชนิดของจุลินทรีย์ในฟลอคและรูปแบบการกระตุ้นภูมิคุ้มกันของสัตว์น้ำที่ต่างกัน ซึ่งการวิจัยนี้ได้ศึกษาผลของไบโอฟลอคสดที่ผลิตจากแหล่งคาร์บอนที่แตกต่างกัน (แป้ง 100% แป้ง 50%+กากน้ำตาล 50% และ กากน้ำตาล 100%) ในการกระตุ้นภูมิคุ้มกันปลานิลซึ่งเป็นปลาเศรษฐกิจสำคัญของไทย โดยตรวจวัดค่าพารามิเตอร์เลือดที่เกี่ยวข้องกับระบบภูมิคุ้มกันในปลานิล ได้แก่ ปริมาณเม็ดเลือดแดง อัดแน่น การตอบสนองภูมิคุ้มกันของสารน้ำในรูปแบบพลาสมาและซีรั่มจากตัวอย่างเลือดในวันที่ 1 2 3 และ 7 หลังจาก ปลานิลกินไบโอฟลอคสดต่อเนื่องเป็นเวลา 7 วัน ผลการทดลองพบว่าไบโอฟลอคที่ผลิตจากแหล่งคาร์บอนต่าง ๆ สามารถกระตุ้นและเพิ่มการตอบสนองของพารามิเตอร์เลือดอย่างมีนัยสำคัญเมื่อเปรียบเทียบกับปลานิลที่ไม่ได้รับไบโอฟลอค (ชุดควบคุม) โดยไบโอฟลอคที่ผลิตจากแหล่งคาร์บอนต่างกันจะกระตุ้นให้มีการตอบสนองทางภูมิคุ้มกันของปลานิลในรูปแบบและระยะเวลาที่แตกต่างกัน อย่างไรก็ตามค่าพารามิเตอร์เลือดจะลดลงเข้าใกล้ค่าของชุดควบคุมเมื่อเวลาผ่านไป ซึ่งแสดงให้เห็นว่าไบโอฟลอคสามารถกระตุ้นภูมิคุ้มกันได้เพียงระยะเวลาหนึ่งเท่านั้น จึงไม่น่าจะส่งผลกระทบต่อการเจริญเติบโตของปลานิล ผลการศึกษาครั้งนี้จึงเป็นข้อมูลที่แสดงให้เห็นถึงความสำคัญของแหล่งคาร์บอนในการผลิตไบโอฟลอคเพื่อใช้เป็นสารกระตุ้นภูมิคุ้มกันในปลานิลและการประยุกต์ใช้ในการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำต่อไปในอนาคต

คำสำคัญ : ไบโอฟลอค ปลานิล แหล่งคาร์บอน ระบบภูมิคุ้มกันแบบไม่จำเพาะ

Abstract

Biofloc technology (BFT) has been considered as a microorganism management technique in aquaculture. Balancing the external carbon added to the system with the proper amount can eliminate the nitrogen waste by conversing it into the microorganism mass, biofloc, consisting of heterotrophic microorganisms, protozoa, planktons, and organic particles. It can provide natural food for aquatic animals as well as function as immunostimulant enhancing the animals' innate immunity through pathogen-associated molecular patterns (PAMPs) recognizing system. As a result, biofloc fed aquatic animals are primed and more resistant against pathogen attack. There has been reported that different carbon sources could affect the types and amounts of microbes in biofloc and its immunostimulatory efficacy. This study aimed to establish the effect of different carbon sources (100% cassava starch, 50% cassava starch+50% molasses and 100% molasses) on immune response of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*), an economically important fish of Thailand. Blood parameters, including hematocrit and humoral responses in plasma and serum, were analyzed in tilapia at 1, 2, 3 and 7 days after fed with bioflocs for 7 days. The results showed that all bioflocs produced from different carbon sources could induce immunity by significantly increased blood parameters compared to the non-biofloc fed fish. The variation of response patterns and period of induction times were observed with different carbon sources used. However, all blood parameter levels decreased to the basal level of control fish after being boosted suggesting that the tested bioflocs may not affect the fish growth. These results showed a significance of carbon sources on biofloc production for immunostimulant development and its application in aquaculture.

Keywords : Biofloc; Nile tilapia; Carbon source; Innate immunity

บทนำ

อุตสาหกรรมการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำของไทยมีการขยายตัวเพิ่มขึ้นอย่างต่อเนื่องเพื่อตอบสนองความต้องการบริโภคทั้งภายในประเทศและการขยายตัวด้านการส่งออก จากสถิติการประมงในปี 2556 แสดงให้เห็นว่าประเทศไทยมีกำลังการผลิตสัตว์น้ำจากการเพาะเลี้ยงทั้งหมดกว่า 997,000 ตัน มีมูลค่ามากกว่า 9 หมื่นล้านบาท [1] ซึ่งมีความสำคัญทางเศรษฐกิจอย่างยิ่งต่อการพัฒนาประเทศ เพื่อให้ประเทศหลุดพ้นกับดักประเทศกำลังพัฒนา โดยระบบเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำปัจจุบันเน้นระบบการผลิตแบบหนาแน่นเพื่อเพิ่มผลผลิตต่อพื้นที่ให้มากขึ้น อย่างไรก็ตามเกษตรกรมักประสบปัญหาของเสียในระบบการเลี้ยง ส่งผลให้สัตว์น้ำเกิดความเครียด อ่อนแอ เป็นเหตุให้เกิดปัญหาการระบาดของโรคได้ง่าย ดังนั้นการหาแนวทางในการจัดการระบบทรัพยากรที่ยั่งยืนต่อระบบการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำที่เป็นมิตรต่อสิ่งแวดล้อมจึงเป็นสิ่งสำคัญ แนวทางหนึ่งที่มีศักยภาพ ได้แก่ การพัฒนาสารกระตุ้นภูมิคุ้มกันในรูปแบบของจุลินทรีย์จากธรรมชาติ เช่น การพัฒนาสารกระตุ้นภูมิคุ้มกันจากไบโอฟลอค (biofloc) เพื่อลดปัญหาโรคที่เกิดในระหว่างการเลี้ยง รวมถึงการใช้ยาปฏิชีวนะของเกษตรกร

เทคโนโลยีไบโอฟลอค (biofloc technology) มีการศึกษาอย่างแพร่หลายทั่วโลก เนื่องจากสามารถเปลี่ยนสารอินทรีย์เหลือทิ้งในระบบการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำเป็นอาหารธรรมชาติให้แก่สัตว์น้ำได้ ไบโอฟลอคคือมวลตะกอนที่แขวนลอยอยู่ในน้ำ

มีขนาด 50-1,000 μm ซึ่งประกอบด้วยโปรโตซัว แพงก์ตอน สิ่งมีชีวิตขนาดเล็ก และจุลินทรีย์กลุ่ม heterotrophic เป็นหลัก สิ่งมีชีวิตเหล่านี้จะทำหน้าที่เปลี่ยนของเสียที่สัตว์น้ำขับถ่าย เช่น แอมโมเนีย และของเสียสารอินทรีย์อื่น ๆ เป็น biomass ของสิ่งมีชีวิตและจุลินทรีย์ ซึ่งสัตว์น้ำสามารถใช้เป็นอาหารได้ [2], [3], [4], [5] นอกจากจะเป็นอาหารแก่สัตว์น้ำแล้วยังมีรายงานวิจัยที่แสดงถึงคุณสมบัติและศักยภาพของไบโอฟลอคในการเป็นสารกระตุ้นภูมิคุ้มกันในสัตว์น้ำ โดยเมื่อสัตว์น้ำได้รับอาหารผสมไบโอฟลอคจะส่งผลให้มีภูมิต้านทานเพิ่มขึ้น เช่น ปลานิล (*Oreochromis niloticus*) [6] กุ้งขาว (*Litopenaeus vannamei*) [7] และปลายี่สกเทศ (*Labeo rohita*) [8] รวมถึงอัตราการรอดตายสูงกว่าสัตว์น้ำที่ได้รับอาหารปกติ [9]

สารกระตุ้นภูมิคุ้มกันที่พบในไบโอฟลอคส่วนใหญ่มีที่มาจากสารชีวโมเลกุลที่เป็นองค์ประกอบของเซลล์แบคทีเรีย (bacterial derivatives) เช่น β-glucan peptidoglycan lipopolysaccharide (LPS) และ flagellin ซึ่งเป็นสารที่ถูกจัดเป็นกลุ่ม pathogen-associated molecular patterns (PAMPs) เนื่องจากสารเหล่านี้จะไม่พบในเซลล์เจ้าบ้านจึงเป็นสารแปลกปลอม และถูกตรวจจับโดยระบบ Toll-like receptors (ตัวรับสัญญาณในกลุ่ม pattern recognition receptors, PRRs) ของสิ่งมีชีวิตชั้นสูงพร้อมส่งสัญญาณ ทำให้ระบบภูมิคุ้มกันสามารถรับรู้และจำแนกได้ว่ามีสารชีวโมเลกุลกลุ่ม PAMPs เข้าสู่ร่างกาย จึงทำให้มีการตอบสนองเพื่อปกป้องการรุกรานจากเชื้อก่อโรค การใช้สารกระตุ้นภูมิคุ้มกันจะทำให้สัตว์น้ำมีการตอบสนองทางภูมิคุ้มกันแบบไม่จำเพาะทั้งรูปแบบของสารน้ำและระบบเซลล์ มีผลให้ร่างกายสัตว์น้ำมีความพร้อมในการตอบสนองและสามารถทำลายเชื้อแบคทีเรียก่อโรคได้ [10], [11] แต่ปัจจุบันสารกระตุ้นภูมิคุ้มกันในอุตสาหกรรมสัตว์น้ำมีราคาสูงส่งผลด้านต้นทุนของเกษตรกรเมื่อนำมาใช้ในระบบฟาร์ม ดังนั้นการศึกษาไบโอฟลอคเพื่อเป็นสารกระตุ้นภูมิคุ้มกันในสัตว์น้ำเศรษฐกิจจึงเป็นสิ่งที่น่าสนใจเป็นอย่างมากโดยจะเป็นส่วนสำคัญในการพัฒนารูปแบบระบบการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำของไทยให้ผลิตอาหารที่ปลอดภัยแก่ผู้บริโภค รวมถึงลดโอกาสการเกิดโรคและลดการใช้ยาปฏิชีวนะในการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำ

อย่างไรก็ตาม มีรายงานว่าการเกิดไบโอฟลอคจะมีความแตกต่างกันทั้งในเชิงปริมาณและคุณภาพขึ้นอยู่กับสัดส่วนคาร์บอนและไนโตรเจน (C:N ratio) [12] รวมถึงชนิดของแหล่งคาร์บอนที่แตกต่างกัน มีผลโดยตรงต่อโครงสร้างจุลินทรีย์ในไบโอฟลอค [13] ปัจจุบันยังไม่มีการศึกษาเพื่อแสดงถึงศักยภาพของไบโอฟลอคที่ผลิตจากแหล่งคาร์บอนที่แตกต่างกันต่อการกระตุ้นภูมิคุ้มกันในปลานิลซึ่งเป็นปลาเศรษฐกิจสำคัญของประเทศไทย ดังนั้นคณะผู้วิจัยจึงทำการศึกษาผลของไบโอฟลอคต่อการตอบสนองของระบบภูมิคุ้มกันแบบไม่จำเพาะในปลานิลโดยการวัดค่าพารามิเตอร์เลือดที่เกี่ยวข้องกับระบบภูมิคุ้มกัน การวิจัยนี้ได้ให้ความสำคัญต่อรูปแบบของแหล่งคาร์บอนหรือคาร์โบไฮเดรตที่จะมีผลต่อการเจริญเติบโตของกลุ่มจุลินทรีย์ในไบโอฟลอค โดยจะทดสอบผลของโครงสร้างของกลุ่มจุลินทรีย์ในไบโอฟลอคที่อาจมีการแปรผันต่อการกระตุ้นการทำงานของระบบภูมิคุ้มกันในปลานิล

วัสดุอุปกรณ์และวิธีการวิจัย

1. ปลาและระบบทดลอง

นำลูกปลานิลน้ำหนักเฉลี่ย 5.0±0.3 g จำนวน 1,000 ตัว จากฟาร์มเกษตรกร ในจังหวัดนครศรีธรรมราช ทำการปรับสภาพโดยฝึกให้ลูกปลานิลกินอาหารเปียก (อาหารทางการค้า (ดีไลท์, ไทยยูเนี่ยนฟีดมิลล์) ผสมน้ำ 10%) 3 มื้อ/วัน (เวลา 09.00 น. 12.00 น. และ 15.00 น.) เลี้ยงปลานิลให้มีน้ำหนักเฉลี่ย 80±3 g จากนั้นนำปลานิลจำนวน 15 ตัว ลงในถังทดลองขนาดถัง 200 l (บรรจุน้ำ 150 l) จำนวน 12 ถัง เปลี่ยนถ่ายน้ำทุกวัน ที่เวลา 15.00 น. ด้วยระบบการเปลี่ยนถ่ายน้ำอัตโนมัติ ย้ายปลานิลลงถังทดลอง 1 สัปดาห์ ก่อนทำการทดลองเพื่อให้ปลานิลปรับตัวเข้าสภาพแวดล้อม

2. การผลิตไบโอฟลอคและการเตรียมอาหาร

ผลิตไบโอฟลอค (C:N ratio ที่ 16:1) โดยนำแหล่งไนโตรเจน (ไส้ปลาหมัก+อาหารกุ้งหมดอายุ

(โปรตีน 35%)) และแหล่งคาร์บอนที่แตกต่างกัน (แป้ง 100% แป้ง 50 %+กากน้ำตาล 50% และกากน้ำตาล 100%) หมักแบบให้อากาศตลอดเวลาเป็นระยะเวลา 18-24 วัน (stationary phase) สำหรับการเตรียมอาหารไบโอฟลอคทุกมื้อตลอดการทดลอง โดยนำไบโอฟลอคใส่ใน Imhoff cone แล้วตรวจสอบปริมาณตะกอนไบโอฟลอค (ไม่น้อยกว่า 500 ml l^{-1}) ดัดแปลงตามวิธีการ Crab และคณะ [4], Ahmad และคณะ [14] (Figure 1) หลังจากนั้นนำตะกอนไบโอฟลอค สดจากแหล่งคาร์บอนที่แตกต่างกันมาผลิตเป็นอาหารปลาชนิดเปียก โดยผสมกับ กลูเตน (gluten) 1% ก่อนให้เป็นอาหารปลาทุกมื้อ ในขณะที่อาหาร ชุดควบคุมจะใช้อาหารเม็ดสำเร็จรูปทางการค้า (ดีไลท์) ผสมน้ำ 10% และกลูเตน 1%

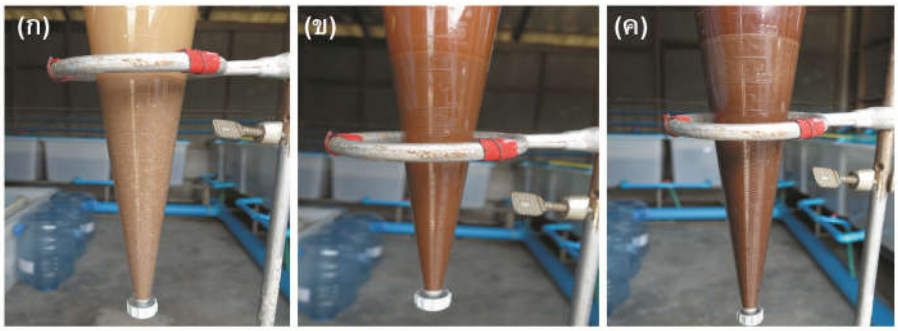

Figure 1 ตะกอนไบโอฟลอคใน Imhoff cone: BFC **(ก)** BFC+M **(ข)** และ BFM **(ค)**

3. การออกแบบการทดลอง

ออกแบบการทดลองแบบสุ่มตลอด (completely randomized design, CRD) ประกอบด้วย 4 ชุดทดลอง ๆ ละ 3 ซ้ำ โดยชุดการทดลองที่ 1 ปลานิลที่กินอาหารเม็ดสำเร็จรูปทางการค้า (ชุดควบคุม) ชุดการทดลองที่ 2 ปลานิลที่กินไบโอฟลอคผลิตจากแป้งมันสำปะหลัง 100% (BFC) และชุดการทดลองที่ 3 ปลานิลที่กินไบโอฟลอคผลิตจากแป้งมันสำปะหลัง 50%+กากน้ำตาล 50% (BFC+M) ชุดการทดลองที่ 4 ปลานิลที่กินไบโอฟลอคผลิตจากกากน้ำตาล 100% (BFM)

4. การทดสอบการตอบสนองทางภูมิคุ้มกันแบบไม่จำเพาะในปลานิล

4.1 การให้อาหารและการเก็บตัวอย่าง

นำไบโอฟลอคที่มีแหล่งคาร์บอนที่แตกต่างกันให้ปลานิลกินเป็นอาหาร 2 มื้อ/วัน เวลา 08.30 น. และ 16.30 น. ทำการเปลี่ยนถ่ายน้ำทั้งหมดหลังจากให้อาหารมื้อเย็น โดยการทดลองจะให้อาหารไบโอฟลอค ติดต่อกันเป็นเวลา 7 วัน จากนั้นเก็บตัวอย่างปลานิลเพื่อทดสอบการตอบสนองทางภูมิคุ้มกันแบบไม่จำเพาะในวันที่ 1 2 3 และ 7 หลังปลาได้รับไบโอฟลอคเป็นเวลา 7 วัน โดยเก็บปลานิลในทุกชุดการทดลอง ๆ ละ 6 ตัว ฆ่าปลานิลด้วยวิธีการุณยฆาตด้วยการสลบด้วยน้ำมันกานพลูเข้มข้น 80 ppm [15] จากนั้นดูดเลือดจากเส้นเลือดบริเวณคอดหางด้านท้อง (caudal vein) ของปลานิลตัวละประมาณ 2 ml แบ่งเลือดออกเป็น 3 ส่วน

ส่วนที่ 1 เลือด 0.1 ml ใช้สำหรับศึกษาปริมาณเม็ดเลือดแดงอัดแน่น (hematocrit)

ส่วนที่ 2 เลือด 1 ml ใช้สำหรับศึกษาการทำงานของระบบภูมิคุ้มกันในพลาสมา ได้แก่ total immunoglobulin และ plasma bactericidal activity โดยเก็บเลือดใส่ในหลอด ขนาด 1.5 ml ที่มี heparin 10 µl นำไปปั่นตกตะกอนที่ความเร็วรอบ 15,000 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 4 °C เป็นเวลา 5 นาที จากนั้นดูดส่วนใสเก็บไว้ที่อุณหภูมิ -80 °C [16] จนกว่าจะนำไปศึกษาต่อไป

ส่วน 3 เลือด 1 ml ใช้สำหรับศึกษาการทำงานของระบบภูมิคุ้มกันในซีรั่ม ได้แก่ กิจกรรมของเอนไซม์ lysozyme และ peroxidase รวมถึง

antiprotease activity โดยนำเลือดเก็บที่อุณหภูมิ 4 °C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ไปปั่นตกตะกอนที่ความเร็วรอบ 15,000 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 4 °C เป็นเวลา 5 นาที จากนั้นเก็บเฉพาะส่วนใสไว้ที่อุณหภูมิ -80 °C (ดัดแปลงจาก Wang และคณะ [17]) จนกว่าจะนำไปศึกษาต่อไป

4.2 การศึกษาการตอบสนองทางภูมิคุ้มกันแบบไม่จำเพาะ

4.2.1 ระบบน้ำเลือด

- Hematocrit

ดัดแปลงวิธีการศึกษาของนพดล และคณะ [18] โดยใช้ Na-heparinised capillary tube ที่บรรจุเลือด อุดปลายหลอดด้วยดินน้ำมัน จากนั้นปั่นเหวี่ยงด้วยเครื่อง hematocrit centrifuge (MPW-215, MPW) ที่ความเร็ว 10,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 นาที คำนวณค่า hematocrit (%) โดยวัดสัดส่วนของเม็ดเลือดแดงอัดแน่นต่อปริมาตรของเลือดทั้งหมด ดังสูตร

Hematocrit (%) = (Packed cell volume/Total blood volume) x 100

4.2.2 ระบบภูมิคุ้มกันแบบไม่จำเพาะของสารน้ำในน้ำเลือด

การศึกษาระบบภูมิคุ้มกันของสารน้ำในน้ำเลือดสามารถศึกษาจากพลาสมาและซีรั่ม โดยพลาสมาจะมีโปรตีนและโมเลกุลที่เกี่ยวข้องกับระบบภูมิคุ้มกันเช่นเดียวกับน้ำเลือด แต่จะมีโปรตีน อื่น ๆ ที่เกี่ยวข้องกับการแข็งตัวของเลือดในปริมาณมาก ในขณะที่ซีรั่มจะไม่มีโปรตีนที่เกี่ยวข้องกับการแข็งตัวของเลือด จึงทำให้สามารถศึกษากิจกรรมของเอมไซม์ในระบบภูมิคุ้มกันได้ชัดเจนกว่า ดังนั้นในการศึกษานี้จึงศึกษาพารามิเตอร์เลือดทั้งในพลาสมาและซีรั่ม แต่จะศึกษาพารามิเตอร์ต่างชนิดกัน

4.2.2.1 ระบบภูมิคุ้มกันแบบไม่จำเพาะในพลาสมา

- Total immunoglobulin

การศึกษา total immunoglobulin ดัดแปลงวิธีการศึกษาจาก Khosravi และคณะ [19], Ahmad และคณะ [14] โดยแบ่งพลาสมาออกเป็น 2 ส่วน ส่วนที่ 1 สำหรับวัดปริมาณโปรตีน ทั้งหมด (total protein) และส่วนที่ 2 หาปริมาณอัลบูมิน (albumin) โดยผสมกับ 12% polyethylene glycol (PEG) 6000 (อัตราส่วน 1:1) เป็นเวลา 30 นาที แล้วปั่นตกตะกอนที่ความเร็วรอบ 15,000 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 4 °C เป็นเวลา 5 นาที จากนั้นนำพลาสมาทั้ง 2 ส่วนมาหาค่าโปรตีนตามวิธีการของ Lowry และคณะ [20] แล้ววัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 640 nm ด้วยเครื่อง microplate reader (EZ Read 2000, Biochrom) คำนวณปริมาณโปรตีนโดยเปรียบเทียบกับกราฟมาตรฐาน bovine serum albumin (BSA) คำนวณค่า total immunoglobulin ดังนี้

Total immunoglobulin = Total protein – Albumin

- Plasma bactericidal activity

การศึกษา plasma bactericidal activity ดัดแปลงวิธีการศึกษาจาก Aly และคณะ [21], Rao และคณะ [22] นำพลาสมา 50 µl ผสมกับเชื้อ *Aeromonas hydrophila* (ความเข้มข้น 10^7 CFU ml^{-1}) 50 µl (สัดส่วน 1:1) บ่มที่อุณหภูมิ 37 °C เป็นเวลา 1 ชั่วโมง หลังจากนั้นนำไปหาปริมาณเชื้อแบคทีเรียด้วยวิธี spread plate บนอาหาร tryptone soya agar (TSA, HiMedia) บ่มที่อุณหภูมิ 35 °C เป็นระยะเวลา 18-24 ชั่วโมง โดยคำนวณค่า bactericidal activity (%) ดังนี้

Bactericidal activity (%) = $[(C_1 - C_2)/ C_1] \times 100$

เมื่อ C_1 = จำนวนโคโลนีทั้งหมดของเชื้อ *A. hydrophila* ในการทดลองที่ไม่มีพลาสมา

C_2 = จำนวนโคโลนีทั้งหมดของเชื้อ *A. hydrophila* ในการทดลองที่มีพลาสมาของปลาตัวอย่าง

4.2.2.2 ระบบภูมิคุ้มกันแบบไม่จำเพาะในซีรั่ม

- Lysozyme activity

การศึกษา lysozyme activity ดัดแปลงวิธีการศึกษาจาก U-taynapun และคณะ [23] โดยนำซีรั่มของปลาตัวอย่าง 20 µl ผสมกับ 0.03% *Micrococcus lysodeikiticus* solution (Sigma) 200 µl วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 490 nm ด้วยเครื่อง microplate reader (EZ Read 2000) ที่เวลา 30 วินาทีและ 4 นาที 30 วินาที โดยค่า lysozyme ที่ได้จะรายงานผลในหน่วยของ Units ml^{-1} โดย

1 Unit lysozyme activity = การลดลงของค่า OD 0.001 ในเวลา 1 นาที

- Antiprotease activity

การศึกษา antiprotease activity ดัดแปลงวิธีของ Christybapita และคณะ [24] โดยนำซีรั่ม 10 µl บ่มกับสารละลาย ทริปซินมาตรฐาน (trypsin porcine pancreas ใน 0.1 M Tri-HCl pH 8.2, Sigma) 20 µl เป็นเวลา 10 นาที ที่อุณหภูมิห้อง จากนั้นเติม 2 mM sodium-benzoyl-DL-arginine-*p*-nitroanilide hydrochloride (BAPNA, Sigma) 500 µl และ 0.1 M Tris-HCl pH 470 µl บ่มที่อุณหภูมิ 25 °C เป็นเวลา 25 นาที จากนั้นเติม 30% acetic acid 150 µl วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 415 nm ด้วยเครื่อง microplate reader (EZ Read 2000) โดยค่า trypsin inhibition (%) คำนวณดังนี้

$$\text{Trypsin inhibition (\%)} = [(A_1 - A_2)/ A_1)] \times 100$$

เมื่อ A_1 = ค่า OD ของการทดลองที่มีเอนไซม์ทริปซิน (ไม่มีซีรั่ม)

A_2 = ค่า OD ของการทดลองที่มีเอนไซม์ทริปซินที่บ่มซีรั่ม

- Peroxidase activity

ดัดแปลงวิธีการศึกษาของ Lazado และคณะ [25] และ Güllü และคณะ [26] นำตัวอย่างซีรั่ม 10 µl ผสมกับ HBSS (Ca^{2+}, Mg^{2+} Free) 90 µl เติมสารผสม 20 mM 3,3',5,5'-tetramethylbenzidine hydrochloride (TMB, Sigma) และ 5 mM H_2O_2 35 µl บ่มที่อุณหภูมิห้องในที่มืดเป็นเวลา 2 นาที หลังจากนั้นเติม 4M H_2SO_4 35 µl แล้วนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 450 nm ด้วยเครื่อง microplate reader (EZ Read 2000) โดยค่า peroxidase activity รายงานผลด้วยค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 450 nm

5. การวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ

การวิเคราะห์ทางสถิติของข้อมูลทั้งหมดจากการทดลองจะใช้โปรแกรมสำเร็จรูป SPSS version 16.0 (SPSS Inc.) วิเคราะห์ความแปรปรวน (ANOVA) ค่าเฉลี่ยของพารามิเตอร์เลือดที่เกี่ยวข้องกับระบบภูมิคุ้มกัน โดยใช้ ANOVA และเปรียบเทียบความแตกต่างระหว่างค่าเฉลี่ยโดย Tukey's HSD multiple comparison test ที่ระดับความเชื่อมั่น 95%

ผลการวิจัยและวิจารณ์

การศึกษาการตอบสนองของระบบภูมิคุ้มกันแบบไม่จำเพาะของปลานิลที่ได้รับไบโอฟลอคที่ผลิตจากแหล่งคาร์บอนที่แตกต่างกันทั้ง 3 รูปแบบ ได้แสดงถึงประสิทธิภาพของไบโอฟลอคในการกระตุ้นภูมิคุ้มกันของปลานิล โดยค่าเฉลี่ยเปอร์เซ็นต์เม็ดเลือดแดงอัดแน่นตลอดการทดลองของปลานิลที่กินไบโอฟลอค BFC (55-63%) BFC+M (55-62%) และ BFM (55-61%) มีค่าสูงกว่าชุดควบคุม (47-48%) อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.05$) ยกเว้นในวันที่ 1 หลังจากปลาทดลองได้รับ BFC+M และ BFM มีค่าเม็ดเลือดแดงอัดแน่นไม่แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P>0.05$) จากชุดควบคุม (Figure 2)

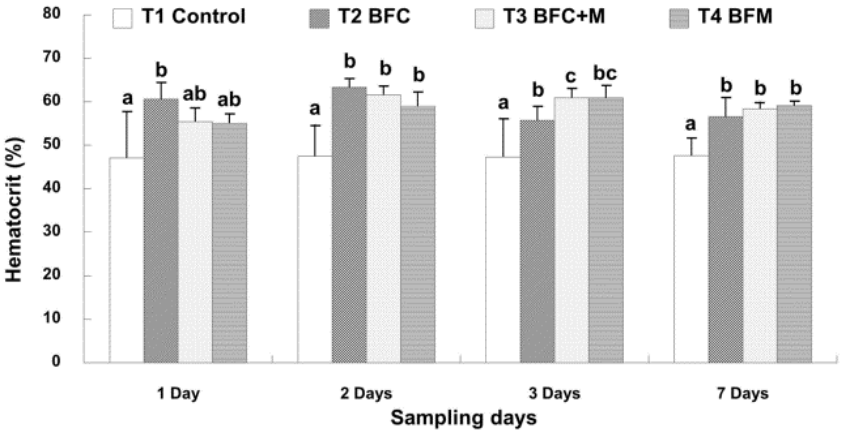

Figure 2 ค่าเม็ดเลือดแดงอัดแน่น (hematocrit) ในน้ำเลือดปลานิลที่ได้รับไบโอฟลอคต่อเนื่องเป็นเวลา 7 วัน และไม่ได้รับไบโอฟลอค (ชุดควบคุม)

จากการศึกษาการตอบสนองภูมิคุ้มกันแบบไม่จำเพาะของสารน้ำในรูปพลาสมาในปลานิล พบว่าค่า total immunoglobulin ในวันที่ 1 และ 2 ของปลานิลที่ได้รับไบโอฟลอคมีค่าสูงกว่าชุดควบคุมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (*P<0.05*) ซึ่งผลการศึกษาในวันที่ 1 (มีค่า total immunoglobulin สูงที่สุด) แสดงให้เห็นว่าปลานิลในชุดการทดลอง BFC BFC+M และ BFM มีค่า total immunoglobulin ที่ระดับ 865.74 837.96 และ 787.04 mg dl^{-1} ตามลำดับ ซึ่งสูงกว่าชุดควบคุม (495.37 mg dl^{-1}) อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (*P<0.05*) เมื่อเข้าสู่วันที่ 2 หลังจากการให้ไบโอฟลอคเป็นเวลา 7 วัน ชุดการทดลอง BFC+M (775.46 mg dl^{-1}) มีค่า total Immunoglobulin สูงกว่าชุดควบคุม (418.73 mg dl^{-1}) อย่างมีนัยสำคัญ (*P>0.05*) ในขณะที่วันที่ 3 และ 7 หลังจากการให้ไบโอฟลอคเป็นเวลา 7 วันพบว่าค่า total immunoglobulin ของ ทุกชุดการทดลองมีค่าใกล้เคียงและไม่มีความแตกต่างทางสถิติกับชุดควบคุม (Figure 3A)

ค่า plasma bactericidal activity ของปลานิลที่ได้รับไบโอฟลอคในชุดการทดลอง BFC+M (เฉลี่ยในช่วง 55%-70%) และ BFM (55%-70%) มีความแตกต่างทางสถิติกับชุดควบคุม (43%-47%) (*P<0.05*) ตลอดระยะเวลาที่ทำการศึกษา ขณะที่ชุดการทดลอง BFC (เฉลี่ยในช่วง 50%-70%) มีความแตกต่างทางสถิติกับชุดควบคุม (*P<0.05*) เฉพาะวันที่ 1 2 และ 3 เท่านั้น แต่ค่า plasma bactericidal activity ของปลาทั้ง 3 ชุดการทดลองที่กินไบโอฟลอคไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ (*P>0.05*) (Figure 3B)

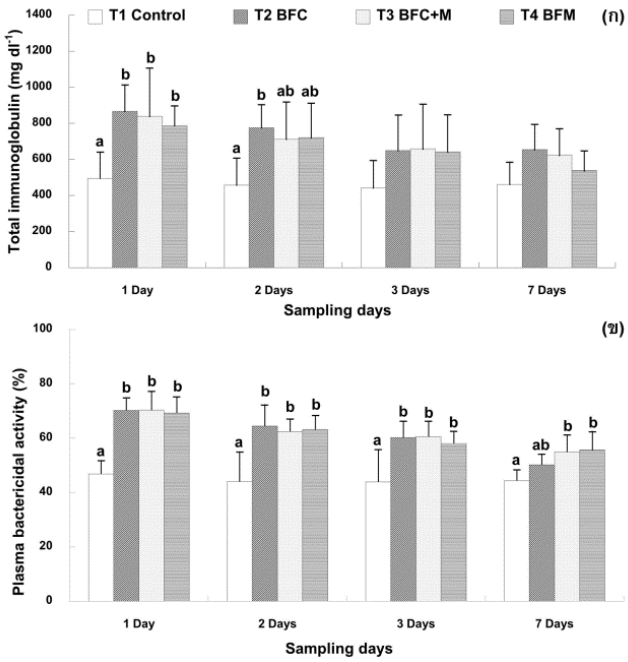

Figure 3 การตอบสนองภูมิคุ้มกันแบบสารน้ำ (พลาสมา) ในปลานิลที่ได้รับไบโอฟลอคต่อเนื่องเป็นเวลา 7 วัน และไม่ได้รับไบโอฟลอค (ชุดควบคุม): Total immunoglobulin **(ก)** และPlasma bactericidal activity **(ข)**

การศึกษาการตอบสนองภูมิคุ้มกันแบบไม่จำเพาะของสารน้ำในรูปแบบซีรั่มของปลานิลพบว่าค่าพารามิเตอร์ของระบบภูมิคุ้มกันทุกค่าที่ศึกษาในปลานิลที่ได้รับไบโอฟลอคมีค่าสูงกว่าชุดควบคุม โดยระดับ lysozyme activity ของปลานิลที่ได้รับไบโอฟลอคที่ผลิตจากแหล่งคาร์บอนต่างกันจะมีความแตกต่างกัน โดย lysozyme activity ในชุดการทดลอง BFC (1,175-1,300 Units ml^{-1}) สูงกว่าชุดควบคุม (872-895 Units ml^{-1}) อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (*P<0.05*) ตลอดช่วงการทดลอง ชุดการทดลอง BFC+M (1,104-1,158 Units ml^{-1}) มีค่าสูงกว่าชุดควบคุม (*P<0.05*) ในวันที่ 1 2 และ 3 เท่านั้น ในขณะที่ชุด BFM (1,070-1,254 Units ml^{-1}) มีค่าสูงกว่าชุดควบคุม (*P<0.05*) ในวันที่ 2 และ 3 เท่านั้น อย่างไรก็ตาม lysozyme activity ของทั้ง 3 ชุดการทดลองที่ให้ไบโอฟลอคต่างกันไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ (*P>0.05*) (Figure 4A)

ค่า antiprotease ในซีรั่มของปลานิลที่ได้รับไบโอฟลอค ชุดการทดลอง BFC มีค่าสูงกว่าชุดควบคุมในวันที่ 1 (60.78%) และ 3 (54.42%) ในขณะที่การทดลอง BFC+M (56.54%) มีค่าสูงกว่าชุดควบคุมในวันที่ 1 เท่านั้น และผลการทดลองในชุด BFM มีค่าสูงกว่าชุดควบคุมในวันที่ 1 (56.69%) และ 2 (53.60%) (Figure 4B)

จากค่า peroxidase activity ของปลานิลที่ได้รับไบโอฟลอคพบว่า ในวันที่ 1 มีเฉพาะชุดการทดลอง BFM เท่านั้นที่แตกต่างทางสถิติ (*P<0.05*) กับชุดควบคุม ขณะที่วันที่ 2 และ 3 ค่า peroxidase activity ในปลานิลที่กินไบโอฟลอคทุกชุดการทดลองมีค่าสูงกว่าชุดควบคุมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (*P<0.05*) และวันที่ 7 มีเฉพาะชุดการทดลอง BFM เท่านั้นที่มีความแตกต่างกับชุดควบคุมอย่างมีนัยสำคัญ (*P<0.05*) (Figure 4C)

ผลการศึกษาแสดงให้เห็นว่าไบโอฟลอคทุกแบบที่ผลิตได้สามารถกระตุ้นภูมิคุ้มกันในปลานิลได้อย่างชัดเจน สอดคล้องกับการวิจัยอื่น ๆ ที่ได้ศึกษาในสัตว์น้ำชนิดต่าง ๆ [6], [8], [27] ทั้งนี้เนื่องจากไบโอฟลอคคือ biomass ของจุลินทรีย์ และสารชีวโมเลกุลที่เป็นองค์ประกอบของจุลินทรีย์ ได้แก่ β-glucan peptidoglycan LPS และ flagellin สามารถทำหน้าที่เป็น PAMPs กระตุ้นภูมิคุ้มกันได้ในสัตว์น้ำทั้งในกลุ่มที่มีกระดูกสันหลังและไม่มีกระดูกสันหลัง อย่างไรก็ตาม ไบโอฟลอคที่ผลิตจากแหล่งคาร์บอนที่แตกต่างกัน (แป้ง 100% แป้ง 50% +กากน้ำตาล 50% และกากน้ำตาล 100%) กระตุ้นภูมิคุ้มกันแบบไม่จำเพาะของปลานิลได้แตกต่างกันในรูปแบบการกระตุ้นภูมิคุ้มกัน (ระยะเวลาและผลการแสดงออกของพารามิเตอร์เลือดทางภูมิคุ้มกัน) ซึ่งจากการทดลองแสดงให้เห็นค่า hematocrit และ antiprotease มีความแตกต่างกันระหว่างชุดการทดลอง 2 3 และ 4 ในขณะที่ค่าพารามิเตอร์อื่น ๆ จากการศึกษา ไบโอฟลอคทุกแบบมีค่าการตอบสนองที่ไม่แตกต่างทางสถิติ (*P>0.05*) ซึ่งน่าจะเป็นผลจากองค์ประกอบจุลินทรีย์ในไบโอฟลอคเมื่อเลี้ยงด้วยแหล่งคาร์บอนต่างกัน สอดคล้องกับงานวิจัยของ Wei และคณะ [13] ที่รายงานว่าไบโอฟลอคที่ผลิตจากแหล่งคาร์บอนที่ต่างกัน เช่น แป้ง น้ำตาล และกลีซอรอล ส่งผลต่อโครงสร้างของจุลินทรีย์ในไบโอฟลอคและส่งผลต่อการตอบสนองของระบบภูมิคุ้มกันแบบไม่จำเพาะในสัตว์น้ำ และการศึกษาของ Ahmad และคณะ [14] ซึ่งได้ศึกษาการเลี้ยงปลายี่สกเทศในระบบไบโอฟลอคโดยใช้แหล่งคาร์บอน 4 ชนิด (แป้งมันสำปะหลัง แป้งสาลี แป้งข้าวโพดและกากอ้อยจากการผลิตน้ำตาล) เป็นเวลา 60 วัน พบว่าฟลอคที่เกิดขึ้นในระบบการเลี้ยงที่ใช้แหล่งคาร์บอนทั้ง 4 ชนิดสามารถกระตุ้นภูมิคุ้มกันปลายี่สกเทศได้ แต่ประสิทธิภาพการกระตุ้นภูมิคุ้มกันแตกต่างกัน โดยแป้งมันสำปะหลังสามารถกระตุ้นได้ดีที่สุด

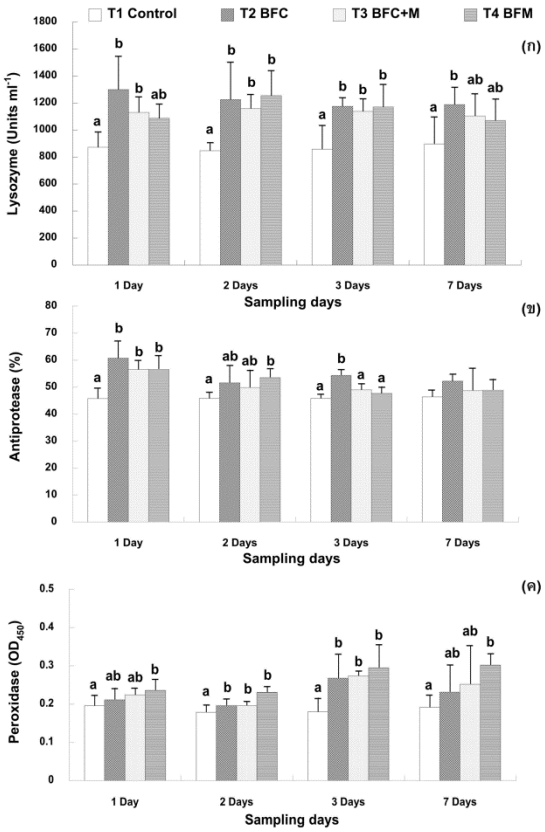

Figure 4 การตอบสนองภูมิคุ้มกันแบบสารน้ำ (ซีรั่ม) ในปลานิลที่ได้รับไบโอฟลอคต่อเนื่องเป็นเวลา 7 วัน และไม่ได้รับไบโอฟลอค (ชุดควบคุม): Lysozyme activity **(ก)**, Antiprotease **(ข)** และ Peroxidase activity **(ค)**

การใช้แหล่งคาร์บอนที่แตกต่างกันในการผลิตไบโอฟลอคยังส่งผลให้มีความแตกต่างในการกระตุ้นความต้านทานต่อเชื้อก่อโรคในสัตว์น้ำชนิดอื่น ๆ นอกจากปลานิลด้วย มีการศึกษาผลของแหล่งคาร์บอนที่แตกต่างกันต่อการตอบสนองทางภูมิคุ้มกันของกุ้งขาวแปซิฟิกที่เลี้ยงในระบบไบโอฟลอค ซึ่งแสดงให้เห็นว่ากุ้งที่ได้รับไบโอฟลอคมีอัตราการรอดตายเมื่อได้รับเชื้อไวรัส infectious myonecrosis สูงกว่าชุดควบคุม แต่การให้แหล่งคาร์บอนที่แตกต่างกันมีผลต่ออัตราการตายของกุ้งที่แตกต่างกัน โดยการใช้กากน้ำตาลและของเหลือจากการผลิตแป้งมันสำปะหลังให้ผลการ

รอดตายที่ดี [7] ดังนั้น จากการศึกษาที่ผ่านมาสนับสนุนข้อมูลในการศึกษาของคณะผู้วิจัยครั้งนี้ที่แสดงให้เห็นว่า ไบโอฟลอคจากการผลิตโดยใช้แหล่งคาร์บอนต่าง ๆ สามารถกระตุ้นภูมิคุ้มกันสัตว์น้ำได้ แต่การใช้แหล่งคาร์บอนต่างกันในการผลิตไบโอฟลอคจะส่งผลต่อประสิทธิภาพการกระตุ้นภูมิคุ้มกันในสัตว์น้ำแต่ละชนิดที่ต่างกัน

จากค่าพารามิเตอร์เลือดทุกค่าที่ทำการศึกษาเพื่อยืนยันความสามารถของไบโอฟลอคในการกระตุ้นภูมิคุ้มกันในปลานิล พบว่าเมื่อเวลาผ่านไปค่าพารามิเตอร์เลือดจะลดลง โดยจะมีค่าใกล้เคียงกับค่าที่ตรวจวัดได้ของชุดควบคุม (ไม่แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ) ซึ่งแสดงให้เห็นว่าไบโอฟลอคสามารถกระตุ้นภูมิคุ้มกันได้เพียงระยะเวลาหนึ่งเท่านั้น นอกจากนี้ได้มีการศึกษาผลกระทบของไบโอฟลอคในการเป็นอาหาร/อาหารผสมต่อการเจริญเติบโตของสัตว์น้ำ พบว่าไบโอฟลอคไม่ส่งผลกระทบด้านลบต่อการเจริญเติบโต [28], [29] ดังนั้น จากคุณลักษณะการกระตุ้นภูมิคุ้มกันในช่วงระยะเวลาหนึ่งของไบโอฟลอคในการศึกษาครั้งนี้ผนวกกับผลการศึกษาก่อนหน้าแสดงให้เห็นว่าไบโอฟลอคสามารถพัฒนาเป็นสารกระตุ้นภูมิคุ้มกันที่ไม่เป็นอันตรายต่อสัตว์น้ำได้

สรุปและเสนอแนะ

เทคโนโลยีไบโอฟลอคเป็นการผลิตอาหารธรรมชาติให้แก่สัตว์น้ำโดยใช้แหล่งไนโตรเจนที่ได้จากของเสียในการเลี้ยงสัตว์น้ำและเติมแหล่งคาร์บอนเพื่อสร้างสมดุลในการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์ โดยมวลชีวภาพของจุลินทรีย์ที่ถูกสร้างขึ้นจะเป็นแหล่งอาหารและสารกระตุ้นภูมิคุ้มกันให้แก่สัตว์น้ำ นอกจากจะเป็นระบบการเลี้ยงสัตว์น้ำที่เป็นมิตรต่อสิ่งแวดล้อมแล้วเทคโนโลยีไบโอฟลอคยังช่วยลดการใช้สารเคมีและยาปฏิชีวนะ ดังนั้นการใช้เทคโนโลยีไบโอฟลอคร่วมในระบบการเลี้ยงจึงเป็นการผลิตสัตว์น้ำที่ปลอดภัยต่อผู้บริโภค วัตถุประสงค์หลักของการศึกษาในครั้งนี้เพื่อเปรียบเทียบการแสดงออกของพารามิเตอร์เลือดที่สำคัญทางภูมิคุ้มกันของปลานิลเมื่อได้รับไบโอฟลอคที่ผลิตจากแหล่งวัตถุดิบคาร์โบไฮเดรตต่าง ๆ ซึ่งสามารถหาได้ง่ายในพื้นที่การเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำของประเทศไทย จากผลการศึกษาแสดงให้เห็นว่าไบโอฟลอคที่ผลิตจากแหล่งคาร์บอนต่าง ๆ (แป้ง 100% แป้ง 50%+กากน้ำตาล 50% และกากน้ำตาล 100%) สามารถกระตุ้นการตอบสนองของระบบภูมิคุ้มกันแบบไม่จำเพาะในปลานิลได้ จากข้อมูลที่ได้จะถูกใช้เป็นแนวทางในการเพิ่มมูลค่าให้กับวัสดุเหลือทิ้งทางการเกษตร โดยเปลี่ยนให้เป็นวัตถุดิบอาหารสัตว์น้ำได้ อย่างไรก็ตามการใช้ในแหล่งคาร์บอนต่างชนิดกันจะส่งผลต่อระดับการกระตุ้นและระยะเวลาในการกระตุ้นภูมิคุ้มกันที่แตกต่างกัน ดังนั้นอาจกล่าวได้ว่าแหล่งคาร์บอนมีความสำคัญในการพัฒนาเทคโนโลยีไบโอฟลอคสำหรับระบบการเลี้ยงปลานิล

กิตติกรรมประกาศ

งานวิจัยนี้เป็นส่วนหนึ่งของโครงการวิจัยเรื่อง “การประยุกต์ใช้แหล่งคาร์บอนต้นทุนต่ำในการผลิตไบโอฟลอคเพื่อการผลิตปลาน้ำจืดผสมผสานเชิงธุรกิจ” ได้รับทุนอุดหนุนการวิจัยจากทุนงบประมาณแผ่นดิน มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลศรีวิชัย ประจำปีงบประมาณ 2557-2558

เอกสารอ้างอิง

[1] สำนักงานเศรษฐกิจการเกษตร. 2558. **สถิติการเกษตรของประเทศไทย ปี ๒๕๕๘**. กรุงเทพฯ : สำนักงานพระพุทธศาสนาแห่งชาติ.

[2] Azim, M.E. and Little, D.C. 2008. The biofloc technology (BFT) in indoor tanks: water quality, biofloc composition, and growth and welfare of Nile tilapia *(Oreochromis niloticus).* **Aquaculture**. 283(1-4): 29-35.

[3] Crab, R. and et al. 2012. Biofloc technology in aquaculture: beneficial effects and future challenges. **Aquaculture**. 356-357: 351-356.

[4] Crab, R. and et al. 2007. Nitrogen removal techniques in aquaculture for a sustainable production. **Aquaculture**. 270(1-4): 1-14.

[5] Kuhn, D.D. and et al. 2016. Evaluation of bioflocs derived from confectionary food effluent water as a replacement feed ingredient for fishmeal or soy meal for shrimp. **Aquaculture**. 454: 66-71**.**

[6] Long, L. and et al. 2015. Effect of biofloc technology on growth, digestive enzyme activity, hematology, and immune response of genetically improved farmed tilapia (*Oreochromis niloticus*). **Aquaculture**. 448: 135-141.

[7] Ekasari, J. and et al. 2014. Immune response and disease resistance of shrimp fed biofloc grown on different carbon sources. **Fish & Shellfish Immunology**. 41(2): 332-339.

[8] Kheti, B. and et al. 2017. Dietary microbial floc potentiates immune response, immune relevant gene expression and disease resistance in rohu, *Labeo rohita* (Hamilton, 1822) fingerlings. **Aquaculture**. 468: 501-507.

[9] Kim, S.-K. and et al. 2014. Effect of bioflocs on growth and immune activity of Pacific white shrimp, *Litopenaeus vannamei* postlarvae. **Aquaculture Research**. 45(2): 362-371.

[10] มลฤดี สนธิ. 2559. **การใช้สารกระตุ้นภูมิคุ้มกันในกุ้งทะเล**. วารสารแก่นเกษตร. 44(2): 373-382.

[11] Mastan, S.A. 2015. Use of immunostimulants in aquaculture disease management. **International Journal of Fisheries and Aquatic Studies**. 2(4): 277-280.

[12] De Scheyver, P. and et al. 2008. The basics of bio-flocs technology: The added value for aquaculture. **Aquaculture**. 277: 125-137.

[13] Wei, Y.F., Liao, S-A. and Wang, A. 2016. The effect of different carbon sources on the nutritional composition, microbial community and structure of bioflocs. **Aquaculture**. 465: 88-93.

[14] Ahmad, H.I. and et al. 2016. Growth, non-specific immunity and disease resistance of *Labeo rohita* against *Aeromonas hydrophila* in biofloc systems using different carbon sources. **Aquaculture**. 457: 61-67.

[15] นาวิก มหาวงศ์, เมธา คชาภิชาติ, ปฏิพัทธ์ อภิธนกุล และประโยชน์ บุญประเสริฐ. 2549. **การทดลองเบื้องต้นในการใช้น้ำมันกานพลูเป็นยาสลบในปลาน้ำจืดที่สำคัญทางเศรษฐกิจบางชนิด**. เอกสารเผยแพร่สำนักงานประมงจังหวัดพะเยา. 15 น.

[16] Li, L. and et al. 2016. Hematological and Immunological plasma assays for grass carp (*Ctenopharyngodon idella*) infected with *Aeromonas hydrophila* as an immune model in carp aquaculture. **Fish & Shellfish Immunology**. 55: 647-653.

[17] Wang, E. and et al. 2016. Plant polysaccharides used as immunostimulants enhance innate immune response and disease resistance against *Aeromonas hydrophila* infection in fish. **Fish & Shellfish Immunology**. 59: 196-202.

[18] นภดล ศุกระกาญจน์ และคณะ. 2555. “ค่าโลหิตวิทยาของปลาดุกลำพัน (*Clarias nieuhofii*) ในระบบการเพาะเลี้ยง”. **การประชุมทางวิชาการของมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ครั้งที่ 50** ณ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ 31 มกราคม-2 กุมภาพันธ์ 2555 หน้า 534-543.

[19] Khosravi, S. and et al. 2015. Effects of protein hydrolysates supplementation in low fish meal diets on growth performance, innate immunity and disease resistance of red sea bream *Pagrus major*. **Fish & Shellfish Immunology**. 45(2): 858-868.

[20] Lowry, H., O., Rosebrough, N., J., Farr, A., L. and Randall, R., J. 1951. Protein measurement with the folin phenol reagent. **The Journal of Biological Chemistry**. 193: 265-275.

[21] Aly, S.M. and et al. 2008. Studies on *Bacillus subtilis* and *Lactobacillus acidophilus*, as potential probiotics, on the immune response and resistance of Tilapia nilotica (*Oreochromis niloticus*) to challenge infections. **Fish & Shellfish Immunology**. 25(1-2): 128-136.

[22] Rao, Y.V. and et al. 2006. Effect of *Achyranthes aspera* on the immunity and survival of *Labeo rohita* infected with *Aeromonas hydrophila*. **Fish & Shellfish Immunology**. 20(1-2): 263-273.

[23] U-taynapun, K. and et al. 2016. CpG ODN mimicking CpG rich region of myxosporean *Myxobolus supamattayai* stimulates innate immunity in Asian sea bass (*Lates calcarifer*) and defense against *Streptococcus iniae*. **Fish & Shellfish Immunology**. 58: 116-124.

[24] Christybapita, D., Divyagnaneswari, M. and Michael, R.D. 2007. Oral administration of *Eclipta alba* leaf aqueous extract enhances the non-specific immune responses and disease resistance of *Oreochromis mossambicus*. **Fish & Shellfish Immunology**. 23(4): 840-852.

[25] Lazado, C.C., Skov, P.V. and Pedersen, P.B. 2016. Innate immune defenses exhibit circadian rhythmicity and differential temporal sensitivity to a bacterial endotoxin in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). **Fish & Shellfish Immunology**. 55: 613-622.

[26] Güllü, K. and et al. 2016. Beneficial effects of Oral Allspice, *Pimenta dioica* powder supplementation on the hemato-immunological and serum biochemical responses of *Oreochromis mossambicus*. **Aquaculture Research**. 47(9): 2697-2704.

[27] Xu, W.-J. and Pan, L.-Q. 2013 . Enhancement of immune response and antioxidant status of *Litopenaeus vannamei* juvenile in biofloc-based culture tanks manipulating high C/N ratio of feed input. **Aquaculture**. 412-413: 117-124.

[28] Mansour, A.T. and Esteban, M.Á. 2017. Effects of carbon sources and plant protein levels in a biofloc system on growth performance, and the immune and antioxidant status of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus).* **Fish & Shellfish Immunology**. 64: 202-209.

[29] Bauer, W. and et al. 2012. Substitution of fishmeal with microbial floc meal and soy protein concentrate in diets for the pacific white shrimp *Litopenaeu vannamei*. **Aquaculture**. 342-343: 112-116.