วารสารวิทยาศาสตร์บูรพา ปีที่ 29 (ฉบับที่ 1) มกราคม – เมษายน พ.ศ. 2567
BURAPHA SCIENCE JOURNAL Volume 29 (No.1) January – April 2024 บทความวิจัย

ผลของวิตามินซีในสารสกัดมะขามป้อมต่อการเจริญเติบโต ค่าชีวเคมีของเลือดบางประการ ระบบภูมิคุ้มกันแบบไม่จำเพาะ และการต้านทานเชื้อแบคทีเรียก่อโรค *Streptococcus agalactiae* ในปลานิล (*Oreochromis niloticus*)

Effects of Vitamin C in Indian Gooseberry (*Phyllanthus emblica*) Extract on Growth Performance, Blood Biochemical, Non-Specific Immune Responses and Bacterial Resistance, *Streptococcus agalactiae* in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*)

กรทิพย์ กันนิการ์*, ดุจฤดี ปานพรหมมินทร์, กัญญาณัฐ สุนทรประสิทธิ์, พัฒนพงษ์ เห็นสุข, สหัสา สดุดี และ กัญยาณี เพียงไธสง

Korntip Kannika*, Dutrudi Panprommin, Kanyanat Soontomprasit, Pattanapong Hensuk, Sahutsa Sadudee and Kanyanee Piangtaisong

สาขาเทคโนโลยีและนวัตกรรมการประมง คณะเกษตรศาสตร์และทรัพยากรธรรมชาติ มหาวิทยาลัยพะเยา ประเทศไทย

Division of Technology and Innovation for Fisheries, School of Agriculture and Natural Resources, University of Phayao, Thailand

Received : 7 December 2023, Received in revised form : 18 March 2024, Accepted : 18 March 2024

Available online : 9 April 2024

บทคัดย่อ

วัตถุประสงค์และที่มา : การวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาผลของวิตามินซีในสารสกัดมะขามป้อม (*Phyllanthus emblica*) ในอาหารต่อการเจริญเติบโต ค่าชีวเคมีของเลือดบางประการ ระบบภูมิคุ้มกันแบบไม่จำเพาะ และการต้านทานเชื้อแบคทีเรียก่อโรค *Streptococcus agalactiae* ในปลานิล

วิธีดำเนินการวิจัย : วางแผนการทดลองแบบสุ่มตลอด (CRD) แบ่งชุดการทดลองออกเป็น 5 ชุดการทดลอง ได้แก่ ชุดควบคุม (อาหารเม็ดสำเร็จรูปที่ไม่เสริมวิตามินซี), T1-T3 อาหารเม็ดสำเร็จรูปที่เสริมวิตามินซีจากสารสกัดมะขามป้อม (natural ascorbic acid) อัตรา 3, 6 และ 10 เปอร์เซ็นต์ และ T4 อาหารเม็ดสำเร็จรูปที่เสริมวิตามินซีสังเคราะห์ 3 กรัม/อาหาร 1 กิโลกรัม เป็นระยะเวลา 60 วัน

ผลการวิจัย : ปลาทดลองในกลุ่มที่เลี้ยงด้วยอาหารผสมสารสกัดจากมะขามป้อม 3 เปอร์เซ็นต์ มีค่าน้ำหนักเฉลี่ยสุดท้าย น้ำหนักที่เพิ่มขึ้น และอัตราการเจริญเติบโตต่อวัน และค่าอัตราแลกเนื้อ มีค่าดีที่สุด แต่ไม่มีความแตกต่างกับชุดทดลองที่ได้รับอาหารผสมสารสกัดมะขามป้อม 10 เปอร์เซ็นต์ และวิตามินซีสังเคราะห์ ($P > 0.05$) และปลานิลกลุ่มทดลองทั้งที่เลี้ยงด้วยวิตามินซีจากสารสกัดมะขามป้อมทุกชุดการทดลอง และวิตามินซีสังเคราะห์ มีอัตราการเจริญเติบโต ระบบภูมิคุ้มกันแบบไม่จำเพาะ ได้แก่ ค่ากิจกรรมการจับกินสิ่งแปลกปลอมของเซลล์เม็ดเลือดขาว (Phagocytic activity) ค่ากิจกรรมไลโซไซม์

ของซีรัม (Lysozyme activity) และความสามารถในการต้านทานต่อเชื้อแบคทีเรียก่อโรค *S. agalactiae* ดีกว่ากลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$)

สรุปผลการวิจัย : ผลจากศึกษานี้จะเห็นได้ว่า สามารถใช้สารสกัดจากมะขามป้อม (*P. emblica*) เสริมในอาหารทดลองเลี้ยงปลานิลเพื่อทดแทนการใช้วิตามินซีสังเคราะห์ได้

คำสำคัญ : ปลานิล ; สารสกัดมะขามป้อม ; การเจริญเติบโต ; ระบบภูมิคุ้มกัน ; ความต้านทานเชื้อแบคทีเรีย

Abstract

Background and Objectives : The aim of this research is to determine the effects of vitamin C in Indian gooseberry (*Phyllanthus emblica*) extract on growth performance, blood biochemical, non-specific immune response and bacterial resistance against, *Streptococcus agalactiae* in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*)

Methodology : A completely randomized design (CRD) was used in this experiment, Five groups of Nile tilapia were fed experimental diets containing control group (without vitamin C), T1-T3: supplemented with vitamin C (natural ascorbic acid) from Indian gooseberry extract at 3, 6, and 10%, and T4: supplemented synthetic vitamin C at 3 g/kg for 60 days.

Main Results : The experimental fish supplemented with Indian gooseberry extract at 3 % had a final average weight, weight gain, average dairy gain (ADG) and the feed conversion ratio (FCR) were not significantly different compared with Indian gooseberry extract at 10 % and synthetic vitamin C groups ($P > 0.05$). Nile tilapia in the experimental group were fed with vitamin C (natural ascorbic acid) from Indian gooseberry extract and synthetic vitamin C has a growth rate, non specific immune response; Phagocytic activity and lysozyme activity; and bacterial resistance, *S. agalactiae* significantly better than control group ($P<0.05$).

Conclusions : The results of this study can be seen that Indian gooseberry (*P. emblica*) extract can be used as a supplemented in tilapia diets to replace the use of synthetic vitamin C.

Keywords : nile tilapia; Indian gooseberry extract; growth performance; immune response; bacterial resistance

***Corresponding author. E-mail** : korntip.ka@up.ac.th

บทนำ

ปลานิล (Nile Tilapia) มีชื่อวิทยาศาสตร์ว่า *Oreochromis niloticus* เป็นปลาน้ำจืดชนิดหนึ่งที่มีคุณค่าทางเศรษฐกิจและนิยมบริโภคกันอย่างกว้างขวาง เนื่องจากเนื้อปลามีรสชาติดี เลี้ยงง่ายเจริญเติบโตเร็ว สามารถเลี้ยงได้ในทุกสภาพเนื่องจากสามารถปรับตัวกับสภาพแวดล้อมได้ดี ในปี ค.ศ. 2022 Food & Agriculture Organization (FAO, 2022) รายงาน

ว่าปริมาณผลผลิตปลานิลทั่วโลกมีสูงถึง 4.4 ล้านตัน โดยผลผลิตส่วนใหญ่ได้จากการเพาะเลี้ยง ประเทศที่มีการเพาะเลี้ยงปลานิลมากที่สุดคือ ประเทศจีน รองลงมาได้แก่ อียิปต์ อินโดนีเซีย ฟิลิปปินส์ และไทย ตามลำดับ จากความต้องการบริโภคปลานิลทั้งในและต่างประเทศในปริมาณสูง ทำให้มีการพัฒนารูปแบบการเลี้ยงอย่างต่อเนื่อง มีระบบการเลี้ยงแบบหนาแน่น มีการปล่อยปลาในอัตราความหนาแน่นที่สูง ทำให้ยากแก่การจัดการระบบการเลี้ยง จึงส่งผลให้การเพาะเลี้ยงปลานิลประสบปัญหาการระบาดของโรค โดยเฉพาะอย่างยิ่งโรคที่เกิดจากแบคทีเรีย ได้แก่ โรคสเตรปโตคอกโคซิส (Streptococcosis) ซึ่งเกิดจากเชื้อแบคทีเรียแกรมบวกชนิด *S. agalactiae* พบระบาดในการเลี้ยงปลานิลของไทย ทำให้เกิดการตายของปลาขนาดใหญ่ตั้งแต่ 200-800 กรัม มักระบาดในช่วงฤดูร้อนจนถึงต้นฤดูฝน มีอาการของโรค คือ ตาโปน ท้องบวม และว่ายน้ำแบบควงสว่าน (Al-Harbi, 1994; Suanyuk *et al*., 2008; Jantrakajorn *et al*., 2014; Kayansamruaj *et al*., 2015; Areechon *et al*., 2016) ในอดีตนิยมใช้ยาปฏิชีวนะหรือสารเคมีต่างๆ เพื่อควบคุมและแก้ปัญหาการตายของปลา ทำให้เกิดการตกค้างของยาในสิ่งแวดล้อมและสัตว์น้ำ และทำให้เกิดปัญหาการดื้อยาของเชื้อก่อโรคได้ ปัจจุบันมีการนำสารอื่นมาทดแทนการใช้ยาปฏิชีวนะหรือสารเคมี เช่น วิตามิน (Vitamins) สารกระตุ้นภูมิคุ้มกัน (Immunostimlants) โพรไบโอติค (Probiotic) เป็นต้น ซึ่งเป็นอีกทางเลือกหนึ่งในการพัฒนาและป้องกันเชื้อก่อโรคในปลานิลได้

วิตามินซี (Ascorbic acid) เป็นวิตามินที่มีความจำเป็นต่อสัตว์น้ำ เนื่องจากเป็นวิตามินที่สัตว์น้ำไม่สามารถสร้างขึ้นมาเองได้ จะต้องได้รับจากสารอาหารที่สัตว์น้ำกินเข้าไปเท่านั้น วิตามินซีมีความสำคัญต่อการเจริญเติบโตของสัตว์น้ำ ปกป้องอนุมูลอิสระ (Free Radicals) ลดความเครียด และช่วยส่งเสริมภูมิคุ้มกันของปลา (Anbarasu & Chandran, 2001; Ortuño *et al*., 2001; Ai *et al*., 2004) การเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำในปัจจุบันนิยมใช้วิตามินซีที่ได้จากการสังเคราะห์ เช่น วิตามินซีในรูป Na/Ca-ascorbyl-2-monophosphate และจากการที่วิตามินซีธรรมชาติสามารถดูดซึมได้ดีกว่าวิตามินซีสังเคราะห์ ทำให้มีการศึกษาเกี่ยวกับปริมาณวิตามินซีในผักและผลไม้ เพื่อคัดเลือกชนิดของผักและผลไม้ ที่สามารถนำมาใช้ทดแทนวิตามินซีสังเคราะห์ได้ จากการวิเคราะห์ปริมาณวิตามินซีจากน้ำคั้นผลสดของผักและผลไม้ ทั้ง 6 ชนิด ได้แก่ ฝรั่ง (*Psidium guajava* Linn.), มะขามป้อม (*Phyllanthus embica* Linn.), มะนาว (*Citrus aurantifollia* Swing.), พริกยักษ์ (*Capsicum annuum* Linn.), มะดัน (*Garcinia schomburgkiana* Pierre.), เสาวรส (*Passiflora laurifolia* Linn.) โดยวิธี Iodometric method จากผลการทดลองพบปริมาณวิตามินซีมากที่สุด คือ มะขามป้อม (226.0, 6 มิลลิกรัมต่อ 100 กรัมผลสด) รองลงมาคือ ฝรั่ง (80.1 มิลลิกรัมต่อ 100 กรัมผลสด) พริกยักษ์ (52.8 มิลลิกรัมต่อ 100 กรัมผลสด) เสาวรส (39.0 มิลลิกรัมต่อ 100 กรัมผลสด) มะนาว (10.5 มิลลิกรัมต่อ 100 กรัมผลสด) และมะดัน (4.6 มิลลิกรัมต่อ 100 กรัมผลสด) ตามลำดับ และเมื่อนำน้ำคั้นมะขามป้อมมาทำเป็นผงแห้งโดยวิธีการทำแห้งแบบเยือกแข็ง พบว่ามีปริมาณวิตามินซี 179.8 มิลลิกรัมต่อ 100 กรัมผลสด (Nilkamhank & Paochom , 2000) และ Scartezzini *et al.* (2006) ตรวจปริมาณวิตามินซีในผลมะขามป้อมด้วยเครื่อง HPLC พบวิตามินซีในรูป ascorbic acid ประมาณ 0.4% (w/w)

ดังนั้นการวิจัยนี้ ผู้วิจัยได้มีแนวคิดในการใช้ประโยชน์จากสารสกัดมะขามป้อม (*P. emblica*) ทดแทนการใช้วิตามินซีสังเคราะห์ในอาหารปลานิล ต่อการเจริญเติบโต ระบบภูมิคุ้มกันของปลานิล และการต้านทานเชื้อก่อโรค โดยคาดว่าผลที่ได้

จากการวิจัยสามารถนำวิตามินซีจากแหล่งธรรมชาติ (Natural ascorbic acid) มาใช้ในอุตสาหกรรมการผลิตปลานิล เพื่อเพิ่มมูลค่าสินค้า และได้ผลผลิตสัตว์น้ำที่มีความปลอดภัย

วิธีดำเนินการวิจัย

1.การเตรียมตัวอย่างปลาทดลองและกระชังทดลอง

เตรียมปลานิลแปลงเพศที่ได้จากพ่อแม่ชุดเดียวกัน มาเลี้ยงในบ่อซีเมนต์ความจุน้ำ 6 ตัน ให้อาหารเม็ดสำเร็จรูปที่มีระดับโปรตีน 35 เปอร์เซ็นต์ วันละ 2 ครั้ง เป็นเวลา 2 สัปดาห์ เพื่อประเมินความสมบูรณ์และปลอดโรคก่อนทำการทดลอง คัดเลือกปลานิลน้ำหนักเฉลี่ย 38-40 กรัม/ตัว จำนวน 900 ตัว ชั่งและบันทึกน้ำหนักปลานิลก่อนเริ่มการทดลอง โดยปล่อยลงกระชังจำนวน 15 กระชัง จำนวน 60 ตัว/กระชัง (ซ้ำ) โดยใช้กระชังไนล่อนขนาดตากระชัง 24 ตา (ขนาด 0.90X1.20X1.00 เมตร) โดยแขวนกระชังทดลองในบ่อซีเมนต์ขนาด 2.0x3.0เมตร จำนวน 3 กระชัง/บ่อ โดยให้ขอบด้านบนของกระชังอยู่เหนือผิวน้ำ ประมาณ 20 เซนติเมตร และทำการติดตั้งระบบให้อากาศโดยใช้หัวทรายใส่ในแต่ละกระชัง จำนวน 4 หัว ส่วนน้ำที่ใช้สำหรับทดลองจะต้องทำการพักเตรียมน้ำสะอาดในบ่อซีเมนต์ขนาดใหญ่ ปริมาตรบรรจุ 12 ตัน เพื่อใช้ในการเปลี่ยนถ่ายน้ำระหว่างทดลองทุกๆ 3-4 วัน การทดลองนี้เป็นไปตามมาตรฐานการเลี้ยงสัตว์ทดลองของสำนักสัตว์ทดลองแห่งชาติ ภายใต้การกำกับของคณะกรรมการจรรยาบรรณการใช้สัตว์ทดลอง มหาวิทยาลัยพะเยา (รหัสนักวิจัย U1-02994-2559) เลขที่รับรองโครงการ 5901040033 ณ ศูนย์เศรษฐกิจพอเพียงฯ พื้นที่ปฏิบัติการสาขาวิชาการประมง คณะเกษตรศาสตร์และทรัพยากรธรรมชาติ

2. การเตรียมสารสกัดมะขามป้อม

เตรียมสารสกัดมะขามป้อม (*P. emblica*) นำผลมะขามป้อมแก่ที่ได้รวบรวมจากตลาดในพื้นที่ จ.พะเยา นำมาล้างทำความสะอาด และหั่นให้เป็นชิ้นเล็กๆ เพื่อแยกเมล็ดออก จากนั้นนำเนื้อผลมะขามป้อมสดไปทำการสกัดในลักษณะ crude extract ด้วยเอทานอล 50 เปอร์เซ็นต์ เป็นตัวทำละลาย อัตราส่วน มะขามป้อม 1 ส่วน : เอทานอล 2 ส่วน (W/V) หมักในภาชนะที่ปิดสนิทเป็นเวลา 7 วัน กรองเฉพาะส่วนของสารสกัดมะขามป้อมสำหรับใช้ในการทดลองเพื่อนำไปเคลือบบนอาหารเม็ดสำเร็จรูป ตามอัตราส่วนที่กำหนดไว้ โดยสารสกัดที่ได้จะเก็บรักษาสภาพไว้ในตู้แช่ -20 องศาเซลเซียส จนกว่าจะนำมาใช้ในการทดลอง ตรวจวิเคราะห์ปริมาณวิตามินซีในสารสกัดมะขามป้อมด้วยวิธี Compendium of method for food analysis (2002) ณ ห้องปฏิบัติการทดสอบศูนย์บริการวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ (ปริมาณวิตามินซี 52.88 มิลลิกรัมต่อ 100 มิลลิลิตร)

3. การวางแผนการทดลองและการเตรียมอาหารทดลอง

วางแผนการทดลองแบบสุ่มตลอด CRD (Complete randomized design) แบ่งการทดลองเป็น 5 ชุดการทดลอง (Treatments) ได้แก่ ชุดควบคุม (อาหารเม็ดสำเร็จรูปที่ไม่เสริมวิตามินซี), T1-T3 อาหารเม็ดสำเร็จรูปที่เสริมวิตามินซีจากสารสกัดมะขามป้อม อัตรา 3, 6 และ 10 เปอร์เซ็นต์ ส่วน T4 อาหารเม็ดสำเร็จรูปที่เสริมวิตามินซีสังเคราะห์ 3 กรัม/อาหาร

1 กิโลกรัม ชุดการทดลองละ 3 ซ้ำๆ เตรียมอาหารทดลองโดยการนำสารสกัดมะขามป้อมที่ได้ไปฉีดพ่น (spray) บนผิวอาหารเม็ดสำเร็จรูปชนิดลอยน้ำ (โปรตีน 30 เปอร์เซ็นต์) ตามชุดการทดลองที่กำหนด เคลือบผิวหน้าอาหารด้วยน้ำมันปลาหมึก 3 เปอร์เซ็นต์ เพื่อป้องกันการสูญเสียสารผสมในระหว่างการกินอาหารของปลา

4. การเก็บข้อมูลต่อการเจริญเติบโต และอัตรารอดของปลานิล

สุ่มชั่งน้ำหนักในแต่ละชุดทดลอง ทุก 10 วัน เพื่อเก็บข้อมูลการเจริญเติบโต ได้แก่ ค่าน้ำหนักปลาที่เพิ่มขึ้น อัตราการเจริญเติบโตต่อวัน อัตราการเปลี่ยนอาหารเป็นเนื้อ ส่วนอัตราการรอด จะทำการเก็บและวิเคราะห์เมื่อสิ้นสุดการทดลอง โดยมีระยะเวลาการทดลอง 60 วัน โดยสูตรคำนวณการเจริญเติบโต ดังนี้

4.1 น้ำหนักปลาที่เพิ่มขึ้น (weight gain, WG, กรัมต่อตัว)

$$WG = \text{น้ำหนักปลาเมื่อสิ้นสุดการทดลอง} - \text{น้ำหนักปลาเมื่อเริ่มการทดลอง} \quad (1)$$

4.2 อัตราการเจริญเติบโตต่อวัน (Average Daily Gain; ADG; กรัมต่อตัวต่อวัน)

$$ADG = \left(\frac{\text{น้ำหนักปลาเมื่อสิ้นสุดการทดลอง} - \text{น้ำหนักปลาเมื่อเริ่มต้นการทดลอง}}{\text{ระยะเวลาทดลอง}} \right) \quad (2)$$

4.3 อัตราการเปลี่ยนอาหารเป็นเนื้อ (Feed Conversion Ratio, FCR)

$$FCR = \frac{\text{น้ำหนักอาหารที่ปลากิน}}{\text{น้ำหนักปลาที่เพิ่มขึ้น}} \quad (3)$$

4.4 อัตราการรอด (Survival Rate, SR; เปอร์เซ็นต์)

$$SR = \left(\frac{\text{จำนวนปลาเมื่อสิ้นสุดการทดลอง}}{\text{จำนวนปลาเริ่มการทดลอง}} \right) \times 100 \quad (4)$$

5. การเก็บตัวอย่างเลือดปลา

สุ่มเก็บตัวอย่างเลือดปลา จำนวน 8 ตัวต่อชุดการทดลอง โดยเก็บตัวอย่าง 4 ครั้ง คือ หลังให้อาหารทดลองเป็นเวลา 15, 30, 45 และ 60 วัน ทำการสลบปลาด้วยน้ำมันกานพูล (clove oil) ที่ระดับ 100 มิลลิกรัมต่อลิตร (Perdikaris *et al*., 2010) ดูดเลือดจากเส้นเลือดแนวเส้นข้างลำตัวบริเวณโคนหาง (Caudal vein) ด้วยหลอดฉีดยาพลาสติกขนาด 1 มิลลิลิตร และเข็มขนาด 23 G × 1นิ้ว เก็บเลือดให้ได้ปริมาตร 1 มิลลิลิตรต่อตัว แบ่งเลือดส่วนแรก ปริมาตร 0.1 มิลลิลิตร ใส่ในหลอด K3 EDTA microtube เพื่อนำไปวิเคราะห์ค่าฮีมาโตคริต (Haematocrit) ส่วนเลือดที่เหลือนำไปใส่ในหลอด Eppendorf tube ปล่อยไว้ให้เลือดแข็งตัวเป็นเวลา 1 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิห้อง นำไปปั่นเหวี่ยงด้วยเครื่อง Microcentrifuge (Centrifuge 5810R, Eppendorf, USA) ที่ 2,500 รอบต่อนาที เป็นเวลา 15 นาที เพื่อแยกส่วนของซีรัมออกจากเม็ดเลือด ดูดส่วนของซีรัม (ส่วนใสด้านบน) ใส่ใน

หลอด Eppendorf หลอดใหม่ เพื่อใช้สำหรับการศึกษาค่าปริมาณโปรตีนในน้ำเลือด (Serum protein) และค่ากิจกรรม Lysozyme activity ต่อไป โดยจะเก็บรักษาไว้ที่ -20 องศาเซลเซียส จนกว่าจะทำการทดสอบ

6. การวิเคราะห์ค่าชีวเคมีของเลือดบางประการ

การวิเคราะห์ค่าชีวเคมีของเลือดบางประการในการศึกษานี้ ได้แก่ ค่าฮีมาโตคริต (Haematocrit) และปริมาณโปรตีนอัลบูมิน (Bovine serum albumin) และโปรตีนแกมม่า-โกลบูลิน (Bovine gamma-globulin) โดยมีขั้นตอนดังนี้

6.1 ค่าฮีมาโตคริต (Haematocrit; Hct)

การวิเคราะห์ค่าฮีมาโตคริตหรือปริมาตรของเม็ดเลือดแดงอัดแน่น (Packed red blood cell) ด้วยวิธี microhaematocrit โดยบรรจุเลือดปลาที่แยกไว้ในหลอด K3 EDTA microtube เข้าไปในหลอดขนาดเล็กที่มีสารป้องกันการแข็งตัวของเลือด Na-heparinised capillary tube โดยดูดเลือดปลาตัวอย่างประมาณ 2 ใน 3 ของความยาวหลอด จากนั้นทำการปิดปลายด้านหนึ่งด้วยดินน้ำมัน แล้วนำหลอดไปปั่นเหวี่ยงด้วยเครื่อง Haematocrit centrifuge (HC-12C, Lugar) ที่ความเร็วรอบ 12,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 นาที นำมาคำนวณค่าเปอร์เซ็นต์ฮีมาโตคริต โดยวัดสัดส่วนของเม็ดเลือดแดงอัดแน่นต่อปริมาตรของเลือดทั้งหมด

$$\% \text{ Haematocrit (Hct)} = \left(\frac{\text{Packed cell volume}}{\text{Total blood volume}}\right) \text{x100} \qquad (5)$$

6.2 ปริมาณโปรตีนในน้ำเลือด (Serum protein)

ทำการวัดปริมาณโปรตีนในน้ำเลือด (Serum protein) ด้วยวิธี Bradford method (Bio-Rad Protein Assay)โดยเติมซีรัมปลาตัวอย่าง ปริมาตร 10 ไมโครลิตร ลงใน 96 well plate ก้นแบน (ตัวอย่างละ 2 ซ้ำ) จากนั้นเติมสารละลาย Dye reagent (Coomassie® Brilliant Blue G-250) 200 ไมโครลิตร ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 10 นาที นำไปตรวจสอบการเกิดปฏิกิริยาโดยวัดค่าดูดกลืนแสงที่ 595 นาโนเมตร ด้วยเครื่อง Microplate reader โดยเปรียบเทียบกับ Blank (สารละลาย Phosphate buffer saline) ที่เติมสารเช่นเดียวกับตัวอย่าง จากนั้นคำนวณความเข้มข้นของโปรตีนในตัวอย่าง โดยเปรียบเทียบกับกราฟมาตรฐานของโปรตีน Bovine serum albumin standard และ Bovine gamma globulin standard

7. การเก็บข้อมูลด้านระบบภูมิคุ้มกันแบบไม่จำเพาะเจาะจง (Non-specific immunity) ของปลานิล

ได้แก่ ค่ากิจกรรมการจับกินสิ่งแปลกปลอมของเซลล์เม็ดเลือดขาว (Phagocytic activity) และค่ากิจกรรม Lysozyme activity นำปลามาทำให้สลบด้วยน้ำมันกานพลู (clove oil) เก็บตัวอย่างเลือดและเนื้อเยื่อไตส่วนหน้าของปลานิล โดยมีขั้นตอนดังนี้

7.1 กิจกรรมการจับกินสิ่งแปลกปลอมของเซลล์เม็ดเลือดขาว (Phagocytic activity)

แยกเซลล์เม็ดเลือดขาวจากไตส่วนหน้าดัดแปลงจากวิธีการของ Christybapita *et al.* (2007) และ Ortuño *et al.* (2003) โดยตัดไตส่วนหน้าใส่ใน petri dish แก้วที่มี RPMI-1640 medium (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) 3 มิลลิลิตร ตัดเนื้อเยื่อไตด้วยกรรไกรที่ผ่านการฆ่าเชื้อ กรองสารละลายผ่านผ้ากรองไนลอนตาถี่ ใส่ในหลอด conical tube ที่มีสารแยกชั้น

Histopaque (Sigma -Aldrich, USA) 3 มิลลิลิตร ปั่นเหวี่ยงที่ 400x g เป็นเวลา 30 นาที ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส ด้วยเครื่องหมุนเหวี่ยงแบบ swing rotor (Centrifuge 5810R, Eppendorf, USA) แยกเซลล์เม็ดเลือดขาวใส่ใน conical tube หลอดใหม่ เติมสารละลาย Phosphate buffer saline pH 7.4 (PBS) ปั่นเหวี่ยงที่ 200 × g ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที เทส่วนใสทิ้งและทำซ้ำ 2 ครั้ง เพื่อทำความสะอาดเซลล์ ปรับความเข้มข้นเซลล์เม็ดเลือดขาวให้ได้ $5x10^6$ เซลล์ต่อมิลลิลิตร เพื่อศึกษากิจกรรม Phagocytic activity ดัดแปลงวิธีการจาก Ai *et al.* (2004) และ Yoshida & Kitao (1991) หยดสารละลายเซลล์เม็ดเลือดขาวลงบนแผ่นสไลด์ ปริมาตร 200 ไมโครลิตร บ่มที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 1 ชั่วโมง 30 นาที เติม latex beads ($1 x10^7$ Bead/ml) (Sigma -Aldrich, USA) ปริมาตร 200 ไมโครลิตร บ่มที่อุณหภูมิห้องนาน 2 ชั่วโมง ย้อมสีเซลล์เม็ดเลือดด้วย Diff-Quick staining dye และนับจำนวนเซลล์เม็ดเลือดขาวจำนวน 300 เซลล์/1 cover slip ดูอัตราการจับกินของเม็ดเลือดขาวใต้กล้องจุลทรรศน์ เพื่อนำไปคำนวณหา Phagocytic activity ดังสมการ

$$\text{Percent phagocytosis} = \frac{\text{จำนวนเม็ดเลือดที่จับกิน Beads}}{300} \times 100 \qquad (6)$$

7.2 ค่ากิจกรรม Lysozyme activity

ดัดแปลงมาจากวิธีของ Parry *et al.* (1965) โดยหลักการคือ Lysozyme ในซีรัมจะมีความไวต่อการสลายเซลล์แบคทีเรียแกรมบวก *Micrococcus lysodeikticus* โดยดูดซีรัมปลาตัวอย่าง หลุมละ 10 ไมโครลิตร ลงใน 96 well plate ก้นแบน (ทำตัวอย่างละ 2 ซ้ำ) จากนั้นเติมสารละลายแบคทีเรีย *M. lysodeikticus* (Sigma -Aldrich, USA) ความเข้มข้น 0.2 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร (ในสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ 0.05 โมลลาร์, pH 6.2) ปริมาตร 250 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากัน นำไปตรวจสอบการเกิดปฏิกิริยาโดยวัดค่าดูดกลืนแสงที่ 540 นาโนเมตร ด้วยเครื่อง Microplate reader (TriStar^2 S LB942, Berthold Technology, Germany) ระหว่าง 0.5+6.5 นาที ที่อุณหภูมิห้อง ซึ่งการคำนวณ lysozyme activity (ยูนิตต่อนาที) โดยหนึ่งยูนิตเท่ากับปริมาณซีรัมที่ทำให้ค่าการดูดกลืนแสงลดลง 0.001 ต่อนาที

8. การต้านทานต่อแบคทีเรีย Streptococcus agalactiae ของปลาทดลอง

เมื่อสิ้นสุดการทดลอง ระยะเวลาการเลี้ยง 60 วัน สุ่มปลานิลทดลองจากกระชังละ 10 ตัว จำนวน *3* ถัง (ซ้ำ) ใส่ถังไฟเบอร์ปริมาตรน้ำ 150 ลิตร เพื่อทดสอบความต้านทานต่อเชื้อแบคทีเรีย เตรียมตัวอย่างเชื้อแบคทีเรียก่อโรค *S. agalactiae* จากห้องปฏิบัติการสาขาวิชาการประมง คณะเกษตรศาสตร์และทรัพยากรธรรมชาติ มหาวิทยาลัยพะเยา โดยนำเชื้อมาเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อ Tryptic Soy Agar (TSA) ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 18-24 ชั่วโมง เพื่อให้ได้โคโลนีเดี่ยว (Single colony) จากนั้นนำไปเพิ่มจำนวนโดยเลี้ยงในอาหาร Tryptic Soy Broth (TSB) ในเครื่องเขย่า (Shaking incubator) ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 18-24 ชั่วโมง จากนั้นปั่นแยกเซลล์แบคทีเรียออกจากอาหารเลี้ยงเชื้อ แล้วปั่นล้างแบคทีเรียด้วย 0.85% NaCl ที่ความเร็วรอบ 3,000 รอบ/นาที ปรับปริมาตรแบคทีเรียที่ความเข้มข้น $1x10^8$ CFU ต่อมิลลิลิตร นำเชื้อที่ได้ไปฉีดเข้าบริเวณช่องท้อง (Intraperitoneal injection: IP) ในปลาแต่ละชุดการทดลอง ตัวละ 0.15 มิลลิลิตร สังเกตอาการปลาทุกวัน

โดยนำปลาที่ตายมาเขี่ยแยกเชื้อเพื่อยืนยันสาเหตุของการเกิดโรค ทำการบันทึกอัตราการตายเป็นเวลา 14 วัน หรือจนกว่าไม่มีการตายเพิ่ม เปรียบเทียบอัตราการตายระหว่างกลุ่มควบคุมและกลุ่มทดลองเพื่อคำนวณหาอัตราการตายสะสม อัตรารอด และอัตราการรอดสัมพัทธ์ (Relative Percent Survival; RPS) จากสูตร

$$\text{อัตราการตาย} = \frac{(\text{จำนวนการตายของปลาในแต่ละกลุ่มทดลอง})}{(\text{จำนวนของปลาที่ฉีดเชื้อเริ่มต้น})} \times 100 \quad (7)$$

$$\text{อัตรารอด} = \frac{(\text{จำนวนปลาที่เหลือในแต่ละกลุ่มทดลอง})}{(\text{จำนวนของปลาที่ฉีดเชื้อเริ่มต้น})} \times 100 \quad (8)$$

$$\text{Relative Percent Survival (Ellis, 1988)} = 1 - \left\{\frac{\text{เปอร์เซ็นต์การตายของปลาในกลุ่มทดลอง}}{\text{เปอร์เซ็นต์การตายของปลาในกลุ่มควบคุม}}\right\} \times 100 \quad (9)$$

9.การวิเคราะห์ข้อมูล

วิเคราะห์ความแตกต่างทางสถิติโดยการวิเคราะห์ความแปรปรวน (one-way analysis of variance; ANOVA) ของแต่ละชุดการทดลอง ได้แก่ การเจริญเติบโต ค่าชีวเคมีของเลือดบางประการ ระบบภูมิคุ้มกันแบบไม่จำเพาะเจาะจง และค่าความต้านทานต่อเชื้อแบคทีเรีย โดยเปรียบเทียบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยด้วยวิธี Duncan's New Multiple Range Test (DMRT) ที่ระดับความเชื่อมั่น 95% (α = 0.05) โดยใช้โปรแกรมสำเร็จรูป SPSS for window version 16.0

ผลการวิจัย

1. ผลของวิตามินซีในสารสกัดมะขามป้อมต่อการเจริญเติบโต และอัตรารอดของปลานิล

ผลการเจริญเติบโตของปลานิลในแต่ละชุดการทดลอง ได้แก่ น้ำหนักเฉลี่ยสุดท้าย (FW) น้ำหนักที่เพิ่มขึ้น (WG) อัตราการเจริญเติบโตต่อวัน (ADG) และอัตราการแลกเนื้อ (FCR) พบว่า ปลาทดลองในกลุ่มที่เลี้ยงด้วยอาหารผสมสารสกัดจากมะขามป้อม 3 เปอร์เซ็นต์ มีการเจริญเติบโตดีที่สุด ได้แก่ ค่าน้ำหนักเฉลี่ยสุดท้าย น้ำหนักที่เพิ่มขึ้น และอัตราการเจริญเติบโตต่อวัน สูงที่สุด และอัตราแลกเนื้อ มีค่าต่ำที่สุด แต่ไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติกับปลาในชุดทดลองที่ได้รับอาหารผสมสารสกัดมะขามป้อม 10 เปอร์เซ็นต์ และวิตามินซีสังเคราะห์ ($P > 0.05$) ส่วนค่าอัตราการรอด มีค่าอยู่ระหว่าง 64.4-96.5 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งไม่มีความแตกต่างทางสถิติระหว่างทุกชุดการทดลอง ($P > 0.05$) (Table 1)

Table 1 Growth performance and survival rate of Nile Tilapia (*Oreochromis niloticus*) feeding with experimental diets: Control (0%), T1-T3 (Indian gooseberry extract 3, 6, 10%) and T5 (Vit C 3g/kg) at 60 days period.

	Control (0%)	T1 (3%)	T2 (6%)	T3 (10%)	T4 (VC 3 g/kg)
Initial weight (g/fish)	38.4±1.2 ^{a}	38.4±0.6 ^{a}	38.4±0.7 ^{a}	38.1±0.4 ^{a}	38.3±0.5 ^{a}
Final weight (g/fish)	79.5±1.8 ^{ab}	84.4±1.8 ^{a}	78.5±3.5 ^{b}	81.3±3.6 ^{ab}	81.6±2.8 ^{ab}
WG (g/fish)	41.1±0.8 ^{ab}	46.1±2.4 ^{a}	40.1±3.9 ^{b}	43.2±3.9 ^{ab}	43.3±2.3 ^{ab}
ADG (g. d^{-1})	0.68±0.01 ^{ab}	0.77±0.04 ^{a}	0.67±0.06 ^{b}	0.72±0.06 ^{ab}	0.72±0.04 ^{ab}
FCR	1.62+0.03 ^{ab}	1.44+0.07 ^{a}	1.66+0.16 ^{b}	1.54+0.13 ^{ab}	1.53+0.08 ^{ab}
Survival rate (%)	96.5±3.2 ^{a}	94.4±2.4 ^{a}	95.8±4.2 ^{a}	94.4±1.2 ^{a}	96.5±3.2 ^{a}

Note : WG; Weight gain, ADG ; Average daily gain, FCR ;Feed conversion ratio. Means in same row with different superscripts were significant differences ($P < 0.05$)

2. ผลของวิตามินซีในสารสกัดมะขามป้อมต่อค่าชีวเคมีของเลือดบางประการ

ค่าเปอร์เซ็นต์ฮีมาโตคริตหรือปริมาตรของเม็ดเลือดแดงอัดแน่นของปลานิลพบว่า ในวันที่ 15 หลังปลานิลที่ได้รับอาหารผสมสารสกัดจากมะขามป้อมและวิตามินซีสังเคราะห์มีค่าฮีมาโตคริตสูงกว่าปลานิลในกลุ่มควบคุม แต่ไม่มีความแตกต่างทางสถิติในทุกชุดการทดลอง ($p>0.05$) แต่พบว่าในวันที่ 30 45 และ 60 ปลานิลในชุดทดลองมีค่าฮีมาโตคริตต่ำกว่ากลุ่มควบคุม ยกเว้นปลานิลที่ได้รับอาหารผสมสารสกัดมะขามป้อมที่ 6 เปอร์เซ็นต์ พบว่ามีค่าสูงกว่ากลุ่มควบคุม ($p>0.05$) (*Figure* 1A)

ค่าอัลบูมินโปรตีนและแกมม่าโกลบูลินโปรตีนในซีรัมของปลานิลที่ทดลองเลี้ยงด้วยสารสกัดจากมะขามป้อม พบว่าในวันที่ 15 ปริมาณโปรตีนอัลบูมินในซีรัมของปลานิลที่ได้รับสารสกัดมะขามป้อมที่ 3, 6 และ 10 เปอร์เซ็นต์ มีปริมาณต่ำกว่าปลานิลในกลุ่มควบคุมและกลุ่มที่ได้รับวิตามินซีสังเคราะห์ ซึ่งมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติในทุกชุดการทดลอง ($P < 0.05$) ซึ่งพบว่าค่าอัลบูมินโปรตีนและแกมม่าโกลบูลินโปรตีนในซีรัมมีค่าเพิ่มสูงขึ้นตามระดับการเพิ่มขึ้นของสารสกัดมะขามป้อม ส่วนในวันที่ 30 และ 45 พบว่าปลานิลในชุดการทดลองมีค่าอัลบูมินโปรตีนและแกมม่าโกลบูลินโปรตีนในซีรัมต่ำกว่าชุดควบคุม ($p<0.05$) แต่พบว่าในวันที่ 60 ปลานิลในชุดการทดลองมีค่าอัลบูมินโปรตีนและแกมม่าโกลบูลินโปรตีนในซีรัมสูงกว่าชุดควบคุม แต่ไม่มีความแตกต่างทางสถิติ ($p>0.05$) (*Figure* 1B, 1C)

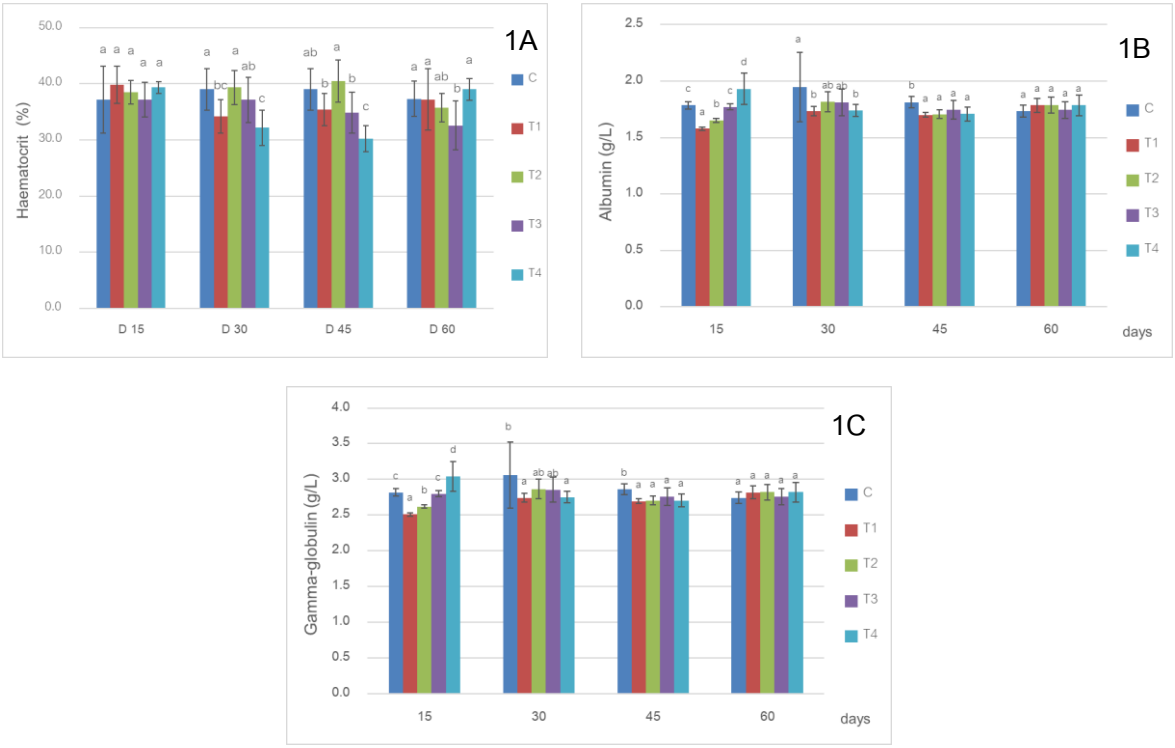

Figure 1 Blood/serum biochemical parameters of Nile Tilapia (*Oreochromis niloticus*) feeding with experimental diets: Control (0%), T1-T3 (Indian gooseberry extract 3, 6, 10%) and T5 (Vit C 3g/kg) at 15, 30, 45, 60 days. (1A) percentage of haematocrit (1B) albumin serum protein and (1C) gamma-globulin protein. Data were represented as mean ± SD, (n = 8).

3. ระบบภูมิคุ้มกันแบบไม่จำเพาะเจาะจง (Non-specific immunity) ของปลานิล

จากการศึกษาการจับกินสิ่งแปลกปลอมของเซลล์เม็ดเลือดขาว (Phagocytic activity) ในปลานิลที่ได้รับอาหารผสมวิตามินซีจากสารสกัดมะขามป้อมที่ระดับต่างๆ และวิตามินซีสังเคราะห์ พบว่า มีค่าเปอร์เซ็นต์กระบวนการจับกินสิ่งแปลกปลอม (Phagocytic activity) เพิ่มสูงกว่ากลุ่มควบคุม ซึ่งมีความแตกต่างทางสถิติระหว่างกลุ่มทดลองและกลุ่มควบคุม ($P<0.05$) โดยพบว่าค่า Phagocytic activity มีค่าเพิ่มสูงตั้งแต่วันที่ 15 เป็นต้นไป (Figure 2A)

ค่ากิจกรรมไลโซไซม์ของซีรัม (Lysozyme activity) ในปลานิลที่ได้รับอาหารผสมวิตามินซีจากสารสกัดมะขามป้อมที่ระดับต่างๆ และวิตามินซีสังเคราะห์ พบว่า มีค่ากิจกรรมไลโซไซม์ของซีรัมเพิ่มสูงกว่ากลุ่มควบคุม ซึ่งมีความแตกต่างทางสถิติระหว่างกลุ่มทดลองและกลุ่มควบคุม ($P<0.05$) โดยพบว่าค่ากิจกรรมไลโซไซม์ของซีรัมมีค่าเพิ่มสูงตั้งแต่วันที่ 15 เป็นต้นไป และมีค่าสูงที่สุดในวันที่ 45 หลังได้รับอาหารทดลอง (Figure 2B)

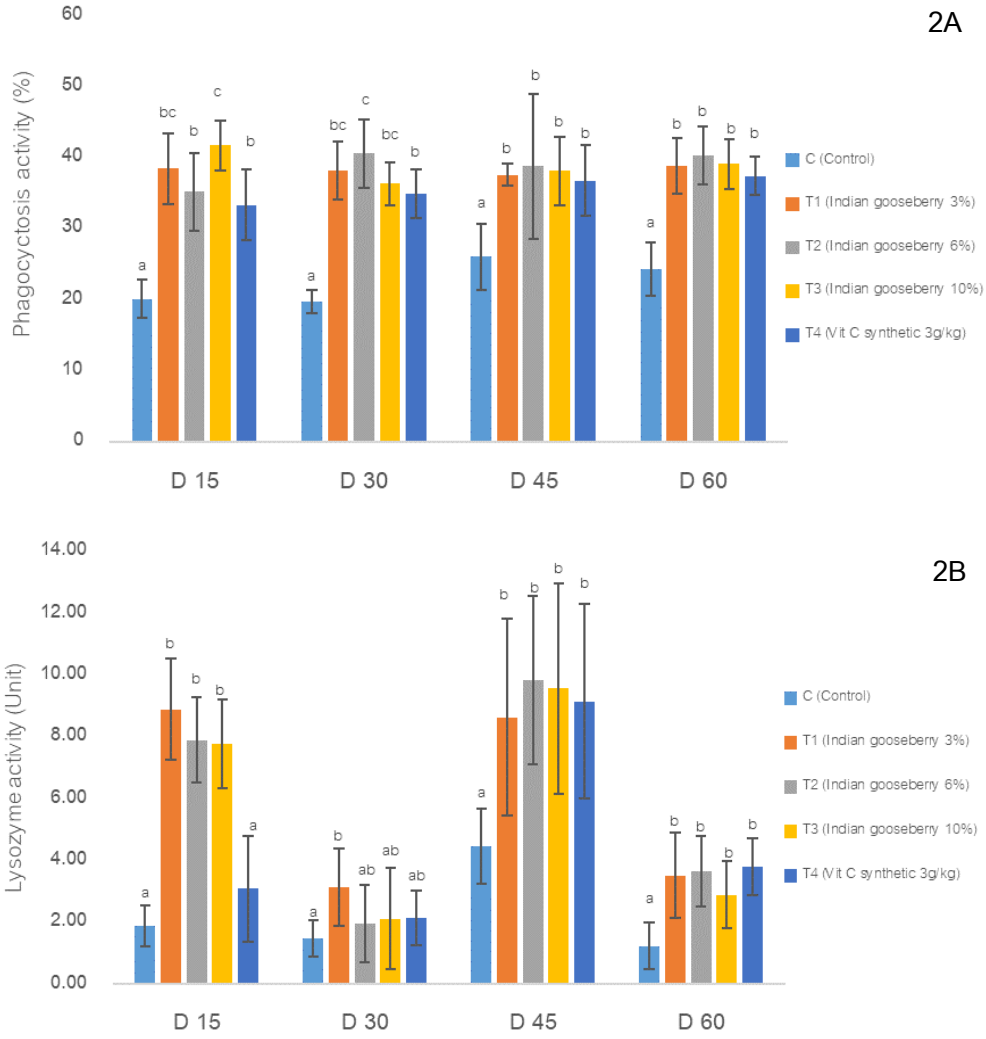

Figure 2 (2A) Phagocytosis activity and (2B) Lysozyme activity of Nile Tilapia (*Oreochromis niloticus*) feeding with different experimental diets at 15, 30, 45, 60 days.

4. ผลของวิตามินซีในสารสกัดมะขามป้อมต่อความสามารถในการต้านทานต่อแบคทีเรีย S. agalactiae

จากการศึกษาความสามารถในการต้านทานต่อเชื้อแบคทีเรียก่อโรค *S.agalactiae* ในปลานิลที่ได้รับอาหารผสมวิตามินซีจากสารสกัดมะขามป้อมในระดับต่างๆ และวิตามินซีสังเคราะห์ พบว่า ปลาที่ได้รับอาหารผสมวิตามินซีสังเคราะห์ 3 กรัม/กิโลกรัมอาหาร มีอัตราการตายน้อยที่สุด (Figure 3) โดยมีค่าอยู่ที่ 26.7±5.8 เปอร์เซ็นต์ และมีค่าอัตราการรอดสัมพัทธ์ (RPS) สูงที่สุด ที่ 57.9±9.1 เปอร์เซ็นต์ โดยพบว่าไม่มีความแตกต่างจากปลาในกลุ่มทดลองที่ได้รับสารสกัดวิตามินซี

จากมะขามป้อมที่ระดับต่าง ๆ (P > 0.05) อย่างไรก็ตามพบว่าปลาในทุกกลุ่มทดลองให้ผลที่ดีกว่ากลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (P < 0.05) (Table 2)

Table 2 Mortality rate, Survival rate and Relative Percent Survival of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) fed with different experimental diets after challenged with *S. agalactiae* for a period 14 days (mean±SD)

	Control (0%)	T1 (3%)	T2 (6%)	T3 (10%)	T4 (VC 3 g/kg)
Mortality rate (%)	63.3±15.3 [a]	36.7±5.8 [b]	33.3±11.5 [b]	36.7±5.8 [b]	26.7±5.8 [b]
Survival rate (%)	36.7±15.3 [a]	63.3±5.8 [b]	66.7±11.5 [b]	63.3±5.8 [b]	73.3±5.8 [b]
RPS (%)	0.0±0.0 [a]	42.1±9.1 [b]	47.3±18.2 [b]	42.1±9.1 [b]	57.9±9.1 [b]

Means in same row with different superscripts are significant differences (P < 0.05)

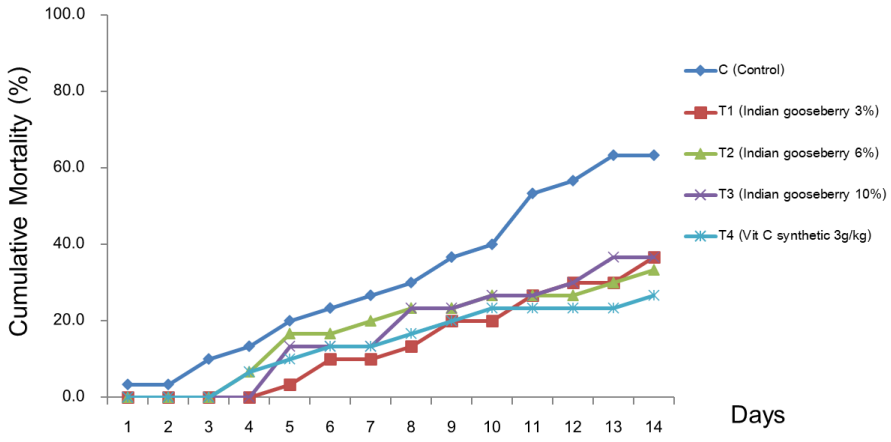

Figure 3 Cumulative mortality (percent) of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) feeding with different experimental diets after challenged with *S. agalactiae* for a period 14 days.

วิจารณ์ผลการวิจัย

จากการศึกษาผลของวิตามินซีในสารสกัดมะขามป้อมต่อการเจริญเติบโต ค่าชีวเคมีของเลือดบางประการ ระบบภูมิคุ้มกันแบบไม่จำเพาะ และการต้านทานเชื้อแบคทีเรียก่อโรคในปลานิล โดยการศึกษานี้ได้ทำการตรวจวิเคราะห์ปริมาณวิตามินซีในสารสกัดมะขามป้อมสำหรับใช้ในการทดลองพบปริมาณวิตามินซี 52.88 มิลลิกรัมต่อ 100 มิลลิลิตร จากผลการศึกษาด้านการเจริญเติบโตของปลานิล พบว่าวิตามินซีส่งผลต่อการเจริญเติบโตของปลานิล โดยปลานิลที่ได้รับอาหารผสมสารสกัดมะขามป้อม 3 เปอร์เซ็นต์ มีการเจริญเติบโตดีที่สุด แต่ไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติกับปลาในชุดทดลองที่ได้รับอาหารผสมสารสกัดมะขามป้อม 10 เปอร์เซ็นต์ และวิตามินซีสังเคราะห์ (P > 0.05) ซึ่งสอดคล้องกับการศึกษา

ของ Duangwongsa & Ungsethaphand (2021) ที่ศึกษาการใช้สารสกัดจากพืชมะขามป้อม (*P. emblica*) หอมแดง (*Allium ascalonicum*) และดอกแค (*Sesbania grandiflora*) เสริมในอาหารต่อสมรรถนะการเจริญเติบโต องค์ประกอบทางเคมีในเนื้อปลา และภูมิคุ้มกันแบบไม่จำเพาะ โดยใช้อาหารทดลอง 4 สูตร ได้แก่ อาหารเสริมวิตามินซี (VC) กลุ่มควบคุม, มะขามป้อม (MP), หอมแดง (HD) และดอกแค (DK) ทดลองเป็นเวลา 90 วัน พบว่า ปลานิลที่เลี้ยงด้วย VC, MP และ HD มีน้ำหนักสุดท้าย น้ำหนักที่เพิ่มขึ้น อัตราการเจริญเติบโตต่อวัน (ADG) สูงกว่าปลาที่เลี้ยงด้วย DK อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$) อัตราการแลกเนื้อ (FCR) ของปลาที่เลี้ยงด้วยอาหารเสริม DK และ HD มีค่าต่ำกว่าปลาที่เลี้ยงด้วยอาหารควบคุม VC อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$) แต่ไม่แตกต่างกับปลาที่เลี้ยงด้วยอาหารเสริม MP ($P > 0.05$) ส่วนการศึกษาของ Tamta & Saxena (2018) ได้ศึกษาผลของมะขามป้อมที่ความเข้มข้นต่างกันเสริมในอาหารต่อค่าทางโลหิตวิทยาและพารามิเตอร์ทางชีวเคมีในซีรัมของปลายี่สกเทศวัยอ่อน (*Labeo rohita*) โดยมีอาหารทดลอง 4 สูตร คือ เสริมผงมะขามป้อมแห้งที่ 0, 1, 5 และ 10 เปอร์เซ็นต์ต่ออาหาร 1 กิโลกรัม พบว่า ค่าโลหิตวิทยาและค่าชีวเคมีของซีรัมมีผลดีที่สุดในทุกการทดลองโดยเฉพาะปลาทดลองที่ได้รับมะขามป้อมที่ระดับ 10 เปอร์เซ็นต์ต่ออาหาร 1 กิโลกรัม โดยมีค่าทางด้านการเจริญเติบโต ได้แก่ ความยาวที่เพิ่มขึ้น น้ำหนักที่เพิ่มขึ้น อัตราการเปลี่ยนอาหารเป็นเนื้อ (FCR) ประสิทธิภาพของการเปลี่ยนอาหาร (FCE) อัตราการเจริญเติบโตจำเพาะ (SGR) อัตราการรอดตาย มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.05$) และการศึกษาของ Sangkhonkhet & Haemasaton (2019) ได้ศึกษาระดับน้ำหมักจากมะขามป้อม (*P. emblican*) ที่เหมาะสมในสูตรอาหาร ต่อการเจริญเติบโตและอัตราการรอดตายของกุ้งขาวแวนนาไม (*Litopenaenaeus vannamei*) โดยใช้ความเข้มข้น 4 ระดับ คือ 0, 2, 2.5 และ 3 เปอร์เซ็นต์ ทดลองเลี้ยงในลูกกุ้งขาวแวนนาไมความยาวเริ่มต้น 1.5 เซนติเมตร และน้ำหนักเฉลี่ย 0.07 กรัม ระยะเวลาทดลอง 56 วัน พบว่า ลูกกุ้งขาวแวนนาไมที่เลี้ยงด้วยอาหารผสมทั้ง 4 ชุดการทดลอง มีอัตราการเปลี่ยนอาหารเป็นเนื้อไม่แตกต่างกันทางสถิติ ($P>0.05$) แต่พบว่าอาหารที่ผสมน้ำหมักมะขามป้อมที่ 3.0 เปอร์เซ็นต์ มีการเจริญเติบโตทั้งน้ำหนักเฉลี่ย ความยาวเฉลี่ย น้ำหนักเฉลี่ยต่อวัน และอัตราการรอดตายดีที่สุด ซึ่งมีความแตกต่างทางสถิติกับชุดการทดลองอื่น ($P<0.05$) จากการทดลองนี้แสดงให้เห็นว่าที่ระดับการเสริมวิตามินซีจากสารสกัดมะขามป้อม 3 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งเป็นวิตามินซีจากธรรมชาติ (natural ascorbic acid) เป็นระดับที่เหมาะสมที่จะนำมาใช้ผสมอาหารแทนวิตามินซีสังเคราะห์เพื่อส่งเสริมการเจริญเติบโตของปลานิล

จากการศึกษาชีวเคมีของเลือดบางประการ ได้แก่ ระดับฮีมาโตคริต ค่าอัลบูมินโปรตีนและแกมม่าโกลบูลินโปรตีนในซีรัมของปลานิลที่ได้รับอาหารผสมสารสกัดมะขามป้อมที่ระดับต่าง ๆ และวิตามินซี พบว่า ในภาพรวมไม่มีความแตกต่างกันในแต่ละชุดทดลองและชุดควบคุม ($P>0.05$) ซึ่งอาจเป็นผลมาจากการที่วิตามินซีไม่ได้มีผลต่อองค์ประกอบของเลือดโดยตรง โดยวิตามินซีจัดเป็นสารต้านอนุมูลอิสระ (antioxidant substance) ช่วยลดความเครียดและส่งเสริมเม็ดเลือดขาวให้ทำงานในการกำจัดสิ่งแปลกปลอม ไม่สามารถทำลายเชื้อได้โดยตรง (Peter-Futre, 2002) ผลการทดลองสอดคล้องกับการศึกษาของ Fazio *et al.* (2020) ที่ได้ศึกษาผลของวิตามินซีเสริมในอาหารต่อชีวเคมีของเลือดในปลา Striped Bass (*Morone saxatilis*) โดยมี 2 ชุดการทดลอง คือ กลุ่มที่ 1 ได้รับวิตามินซีในระดับต่ำ และ กลุ่มที่ 2 ได้รับวิตามินซีในระดับสูง พบว่า ปลาที่ได้รับวิตามินซีทั้ง 2 กลุ่ม มีค่าชีวเคมีของเลือดบางค่าเท่านั้น โดยพบว่าระดับฮีมาโตคริต (Hct) และค่าอัลบูมิน (ALB) ไม่มีความ

แตกต่างทางสถิติ (P>0.05) และสอดคล้องกับ Rahimnejad *et al*. (2021) ศึกษาผลของวิตามินซีและอีในอาหารปลาเรนโบว์เทร้าต์ (*Oncorhynchus mykiss*) ต่อการเจริญเติบโต ค่าภูมิคุ้มกันแบบไม่จำเพาะ และค่าชีวเคมีของเลือด พบว่าค่าโปรตีนรวมของซีรัม (Total Protein serum) ในทุกชุดการทดลองไม่มีความแตกต่างกัน (P>0.05) และสอดคล้องกับการศึกษาของ Ren *et al*. (2008) ทำการศึกษาผลของ ascorbyl-2-monophosphate Na/Ca (AMP-Na/Ca) ต่อค่าชีวเคมีของเลือดและระบบภูมิคุ้มกันแบบไม่จำเพาะในปลา red sea bream (*Pagrus major*) ที่ระดับ 0, 107 และ 325 มิลลิกรัมต่ออาหาร พบว่าค่าอัลบูมินโปรตีน และค่าโปรตีนรวมของซีรัมของปลาทุกชุดการทดลองไม่มีความแตกต่างกัน (P>0.05)

ส่วนผลการศึกษาด้านระบบภูมิคุ้มกันแบบไม่จำเพาะ และการต้านทานเชื้อแบคทีเรียก่อโรคในปลานิลต่อเชื้อแบคทีเรียก่อโรค *S. agalactiae* พบว่า ปลานิลกลุ่มทดลองทั้งที่เลี้ยงด้วยวิตามินซีจากสารสกัดมะขามป้อมทุกชุดการทดลองและเลี้ยงด้วยวิตามินซีสังเคราะห์ มีระบบภูมิคุ้มกันแบบไม่จำเพาะ ได้แก่ ค่ากิจกรรมการจับกินสิ่งแปลกปลอมของเซลล์เม็ดเลือดขาว (Phagocytic activity) ค่ากิจกรรมไลโซไซม์ของซีรัม (Lysozyme activity) และความสามารถในการต้านทานต่อเชื้อแบคทีเรียก่อโรค *S. agalactiae* ของปลานิลที่ได้รับอาหารผสมสารสกัดมะขามป้อมที่ระดับต่าง ๆ และวิตามินซีสังเคราะห์ พบว่า ปลาในกลุ่มทดลองที่ได้รับวิตามินซีสังเคราะห์มีค่าอัตราการรอดสัมพัทธ์ (RPS) สูงที่สุด แต่ไม่มีความแตกต่างจากปลาในกลุ่มทดลองที่ได้รับสารสกัดวิตามินซีจากมะขามป้อมที่ระดับต่าง ๆ อย่างไรก็ตามพบว่าปลาในทุกกลุ่มทดลองให้ผลที่ดีกว่ากลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (P < 0.05) แสดงให้เห็นว่าวิตามินซีที่สกัดได้จากมะขามป้อม และวิตามินซีสังเคราะห์มีผลส่งเสริมความต้านทานของปลานิลต่อเชื้อแบคทีเรีย ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยของ Doan *et al*. (2022) ได้ศึกษาผลของสารสกัดจากผลมะขามป้อม (*P. emblica*) ต่อการเจริญเติบโต ภูมิคุ้มกันของเยื่อเมือกของผิวหนัง (skin mucosal immunity) และซีรัม (serum immunity) และการต้านทานโรคของปลานิล (*Oreochromis niloticus*) ต่อเชื้อแบคทีเรียก่อโรค *S. agalactiae* ภายใต้ระบบการเลี้ยงแบบไบโอฟลอค (biofloc system) น้ำหนักปลาเริ่มต้น 10.48±0.56 กรัม โดยให้อาหารทดลองที่ผสมสารสกัดผลมะขามป้อม ที่ 0, 5, 10, 20 และ 40 มิลลิกรัมต่ออาหาร 1 กิโลกรัม ทดลองเลี้ยงเป็นเวลา 8 สัปดาห์ พบว่า ปลานิลที่ได้รับอาหารผสมสารสกัดจากผลมะขามป้อมที่ 20 มิลลิกรัมต่ออาหาร 1 กิโลกรัม มีอัตราการเจริญเติบโต ระบบภูมิคุ้มกันแบบไม่จำเพาะเจาะจง ได้แก่ serum lysozyme, peroxidase activity, alternative complement, phagocytosis activity และ respiratory burst activity มีค่าเพิ่มสูงที่สุด ซึ่งมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญกับชุดการทดลองอื่น (P<0.05) ส่วนปลาในกลุ่มควบคุมมีค่า lysozyme และ peroxidase activity ต่ำที่สุด (P<0.05) ส่วนผลการต้านทานเชื้อแบคทีเรียก่อโรค พบว่าปลานิลที่ได้รับอาหารผสมสารสกัดผลมะขามป้อมที่ 20 มิลลิกรัมต่ออาหาร 1 กิโลกรัม มีค่าความต้านทานโรคและค่าอัตราการรอดสัมพัทธ์ (RPS) สูงที่สุด (P<0.05) Anto & Balasubramanian (2015) ทำการศึกษาผลของ *P. emblica* ต่อปลา Common Carp (*Cyprinus carpio*) ที่ได้รับเชื้อแบคทีเรีย *Aeromonas hydrophila* พบว่า ปลาคาร์ฟมีการเจริญเติบโตเพิ่มขึ้น และอัตราการรอดตายเพิ่มสูงขึ้น แต่การศึกษาของ Duangwongsa & Ungsethaphand (2021) ที่ศึกษาการใช้สารสกัดจากพืชมะขามป้อม (MP) หอมแดง (HD) และดอกแค (DK) เสริมในอาหาร พบว่า ปลาที่เลี้ยงด้วยอาหาร MP มีปริมาณโปรตีนในเนื้อปลา ปริมาณฮีมาโตคริต และปริมาณโปรตีนในซีรัม ไม่แตกต่างจากอาหารเสริมวิตามินซี (VC) (P > 0.05) โดยพบว่าสูตร

อาหารที่ใช้ทดลองนี้ไม่ส่งผลต่อปริมาณซีรัมไลโซไซม์ ปริมาณเม็ดเลือดแดง และปริมาณเม็ดเลือดขาวของปลา อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ($P > 0.05$)

จากการศึกษานี้ จะเห็นได้ว่าปลานิลที่ได้รับวิตามินซีทั้งในสารสกัดจากผลมะขามป้อมและวิตามินซีสังเคราะห์มีระบบภูมิคุ้มกันแบบไม่จำเพาะ และความสามารถในการต้านทานต่อเชื้อแบคทีเรียก่อโรค ดีกว่ากลุ่มควบคุม โดยพบว่าวิตามินซีสามารถกระตุ้นการทำงานของเซลล์ Phagocyte ในกระบวนการ Phagocytosis โดยจะสร้างเอนไซม์ Lysozyme ให้สูงขึ้น ซึ่งเป็นเอมไซม์ที่มีบทบาทสำคัญในระบบภูมิคุ้มกันแบบมีมาแต่กำเนิด (innate immunity) ในการกำจัดสิ่งแปลกปลอมโดยจะทำลายผนังเซลล์แบคทีเรีย (Eo & Iee, 2008; Lin & Shiau, 2005; Saurabh & Sahoo, 2008 ; Schmekel *et al*., 2013) ส่วนกระบวนการ Phagocytosis เป็นอีกหนึ่งกลไกการป้องกันตัวของสัตว์มีกระดูกสันหลัง โดยอาศัยการทำงานของเซลล์ของเม็ดเลือดขาวกลุ่มฟาโกไซต์ (Phagocytes) แมโครเฟจ (Macrophages) และกรานูโลไซต์ (Granulocytes) ในการกำจัดสิ่งแปลกปลอม เช่น แบคทีเรีย เซลล์เนื้อเยื่อที่ตายแล้ว รวมถึงอนุภาคขนาดเล็ก โดยการย่อยภายในเซลล์หรือเอนโดไซโทซิส (Endocytosis) (Neumann *et al*., 2001; Magnadottir, 2006; Benard *et al*., 2014; Grayfer *et al*., 2014; Esteban *et al*., 2015) สอดคล้องกับการทดลองของ Phoonsamran (2009) กล่าวว่า การเสริมวิตามินซีมีผลต่อการตอบสนองของระบบภูมิคุ้มกันโรคของสัตว์น้ำ โดยวิตามินซีในระดับต่างๆ มีส่วนในการช่วยกระตุ้นระบบภูมิคุ้มกันแบบไม่จำเพาะในปลาบึก โดยพบว่าการเสริมวิตามินซีที่ระดับ 500 และ 750 มิลลิกรัมต่ออาหาร 1 กิโลกรัม จะทำให้ค่าฮีมาโตคริต ปริมาณเซลล์เม็ดเลือดแดง และซีรัมไลโซไซม์ ในปลาบึกมีค่าเพิ่มสูงขึ้นจากปลากลุ่มที่ไม่ได้รับอาหารเสริมวิตามินซี อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.05$) ส่วนการศึกษาของ Ortuño *et al*. (1999) กล่าวว่า อาหารที่มีวิตามินซีสูง ช่วยเพิ่มการตอบสนองภูมิคุ้มกันแบบไม่จำเพาะของปลา *Sparus aurata* ได้แก่ ค่า Complement activity และปริมาณเม็ดเลือดขาวชนิด Leucocyte ให้เพิ่มขึ้น ส่วน Sobhana *et al*. (2002) กล่าวว่า วิตามินซีมีบทบาทสำคัญในการเพิ่มความทนทานต่อโรคของปลา และวิตามินซีช่วยเสริมด้านการต่อต้านการอักเสบ คล้ายรายงานของ Xavier *et al*. (2011) พบว่า การเสริมด้วยสารกระตุ้นภูมิคุ้มกันกลุ่มวิตามินซีในอาหารช่วยเพิ่มจำนวนเม็ดเลือดขาวและลดความเครียดที่เกิดจากเชื้อก่อโรค ทำให้ปลามีความต้านทานต่อการติดเชื้อ โดยวิตามินซี (Ascorbic acid หรือ Ascorbate) เป็นสารต้านอนุมูลอิสระ หรือ antioxidant มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ (Free radical) ที่เกิดขึ้นภายในร่างกาย มีความจำเป็นต่อสัตว์น้ำเนื่องจากเป็นวิตามินที่สัตว์น้ำไม่สามารถสร้างขึ้นมาเองได้ จะต้องได้รับจากสารอาหารที่สัตว์น้ำกินเข้าไปเท่านั้น เนื่องจากปลาส่วนใหญ่ขาดเอนไซม์ L-gulonolactone oxidase หรือมีน้อยเป็นเอนไซม์ที่ทำหน้าที่ในกระบวนการสังเคราะห์วิตามินซี ช่วยซ่อมแซมและการเจริญเติบโตของเนื้อเยื่อในร่างกาย และเป็น Cofactor ในกระบวนสังเคราะห์คอลลาเจน (Collagen synthesis) (Roberts *et al*., 1995; Wang *et al*., 2003; Eo & Lee, 2008) ช่วยในกระบวนการสลายพิษให้มีความเป็นพิษลดน้อยลง (detoxification) ช่วยลดความเครียด (Stress) ซึ่งจะไปลดปริมาณ Corticosteroid (cortisol hormone) ในระบบหมุนเวียนเลือด (Dorfman *et al*., 1956; Cooper & Rosendalh, 1962; Kitabchi, 1967) และมีความสำคัญในระบบภูมิคุ้มกันของสิ่งมีชีวิต เช่น Phagocytic activity, Lysozyme activity, Complement activity และ Respiratory burst (Anbarasu & Chandran, 2001; Ortuño *et al.,* 2001; Ai *et al.,* 2004)

สรุปผลการวิจัย

จากการศึกษานี้พบว่าปลานิลที่ได้รับวิตามินซีทั้งในสารสกัดจากผลมะขามป้อมและวิตามินซีสังเคราะห์ มีการเจริญเติบโต ระบบภูมิคุ้มกันแบบไม่จำเพาะ และความสามารถในการต้านทานต่อเชื้อแบคทีเรียก่อโรค ดีกว่ากลุ่มควบคุม โดยปลานิลที่เลี้ยงด้วยอาหารผสมสารสกัดจากมะขามป้อม 3 เปอร์เซ็นต์ มีค่าการเจริญเติบโตดีที่สุด ทั้งค่าน้ำหนักเฉลี่ยสุดท้าย น้ำหนักที่เพิ่มขึ้น อัตราการเจริญเติบโตต่อวัน และอัตราการแลกเนื้อ ดีที่สุด ผลจากการศึกษานี้จะเห็นได้ว่า ระดับการเสริมวิตามินซีจากสารสกัดมะขามป้อม 3 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งเป็นวิตามินซีจากธรรมชาติ (natural ascorbic acid) เป็นระดับที่เหมาะสมที่จะนำมาใช้ผสมอาหารแทนวิตามินซีสังเคราะห์เพื่อส่งเสริมการเจริญเติบโตของปลานิล อีกทั้งยังเป็นแนวทางในการลดต้นทุนในการใช้วิตามินซีสังเคราะห์ เนื่องจากมะขามป้อมเป็นผลไม้ที่สามารถหาได้ง่ายในท้องถิ่นและมีราคาที่ไม่สูง

เอกสารอ้างอิง

Ai, Q., Mai, K., Xu, W., Zhang, C., Duan, Q., Tan, B., & Liufu, Z. (2004). Effects of dietary vitamin C on growth and immune response of Japanese seabass, *Lateolabrax japonicus*. *Aquaculture*, *242*, 489-500. doi.org/10.1016/j.aquaculture.2004.08.016

Al-Harbi, A.H. (1994). First isolation of *Streptococcus* sp. from hybrid tilapia (*Oreochromis niloticus* x *O. aureus*) in Saudi Arabia. *Aquaculture*, *128*, 195-201. doi.org/10.1016/0044-8486(94)90308-5

Anbarasu, K., & Chandran, M. R. (2001). Effect of ascorbic acid on the immune response of the catfish, *Mystus gulio* (Hamilton), to different bacterins of *Aeromonas hydrophila*. *Fish Shellfish Immunol*, *11*, 347-355. doi.org/10.1006/fsim.2000.0322

Anto, A.V.J., & Balasubramanian, V. (2015). Therapeutic effect of *Phyllanthus emblica* on disease induced Common Carp (*Cyprinus carpio*) by *Aeromonas hydrophila*. *International Journal of Zoological Research*, *11*(3), 96-101. doi: 10.3923/ijzr.2015.96.101

Areechon, N., Kannika, K., Hirono, I., Kondo, H., & Unajak, S. (2016). Draft genome sequences of *Streptococcus agalactiae* serotype Ia and III isolates from Tilapia farms in Thailand. *Genome Announcements*, 4(2). doi.org/10.1128/genomea.00122-16

Benard, E. L., Roobol, S. J., Spaink, H. P., & Meijer, A. H. (2014). Phagocytosis of mycobacteria by zebrafish macrophages is dependent on the scavenger receptor Marco, a key control factor of pro-inflammatory signalling. *Developmental & Comparative Immunology*, *47*(2), 223–233. doi.org/10.1016/j.dci.2014.07.022

Christybapita, D., Divyagnaneswari, M., & Michael, R.D. (2007). Oral administration of *Eclipta alba* leaf aqueous extract enhances the non-specific immune response and disease resistance of *Oreochromis niloticus*. *Fish Shellfish Immunol, 23*, 840-852. doi: 10.1016/j.fsi.2007.03.010

Cooper, D. Y., & Rosendalh, O. (1962). Action of noradrenaline and ascorbic acid on C-21 hydroxylation of steroids by adrenocortical microsomes. *Archives of Biochemistry*. *96*, 331-335. doi: 10.1016/0003-9861(62)90416-2

Doan, H. V., Lumsangkul, C., Sringarm, K., Hoseinifar, S. H., Dawood, M. A. O., El-Haroun, E., Harikrishnan, R., Jaturasitha, S., & Paolucci, M. (2022). Impacts of Amla (*Phyllanthus emblica*) fruit extract on growth, skin mucosal and serum immunities, and disease resistance of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) raised under biofloc system. *Aquaculture Reports*, *22*, 100953. doi.org/10.1016/j.aqrep.2021.100953

Dorfman, R. I., Hayono, M., Hechter, O., & Saba, N. (1956). Some aspects of the biogenesis of adrenal steroid hormones. *Recent progress in hormone research*, *12*, 79–123. PMID: 13401052.

Duangwongsa, J., & Ungsethaphand, T. (2021). Effect of plant extracts (*Phyllanthus emblica Allium ascalonicum* and *Sesbania grandiflora*) on growth hematology and non-specific immune response of tilapia (*Oreochromis niloticus*). *Khon Kaen Agriculture Journal*, *49*(1), 192-202. doi:10.14456/kaj.2021.16 (in Thai)

Eo, J., & Lee, K. J. (2008). Effect of dietary ascorbic acid on growth and non-specific immune responses of tiger puffer, *Takifugu rubripes*. *Fish & Shellfish Immunology*, *25*(5), 611–616. doi.org/10.1016/j.fsi.2008.08.009

Ellis, A. E. (1988). Vaccination against enteric redmouth. In A. E. Ellis (Ed.), *Fish Vaccination*, (pp. 85-92). London: Academic Press.

Esteban, M. A., Cuesta, A., Chaves-Pozo, E., & Meseguer, J. (2015). Phagocytosis in teleosts: Implications of the new cells involved. *Biology* (Basel), *4*(4), 907–922. doi.org/10.3390/biology4040907

FAO. 2022. The State of World Fisheries and Aquaculture 2022. Towards Blue Transformation. Rome, FAO. doi.org/10.4060/cc0461en

Fazio, F., Iaria, C., Saoca, C., Costa, A., Piccione, G., & Spanò, N. (2020). Effect of dietary vitamin C supplementation on the blood parameters of Striped Bass *Morone saxatilis* (Walbaum, 1752). *Turkish Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, 20(6). doi.org/10.4194/1303-2712-v20_6_07

Grayfer, L., Hodgkinson, J. W., & Belosevic, M. (2014). Antimicrobial responses of teleost phagocytes and innate immune evasion strategies of intracellular bacteria. *Developmental & Comparative Immunology*, *43*(2), 223–242. doi.org/10.1016/j.dci.2013.08.003

Jantrakajorn, S., Maisak, H., & Wongtavatchai, J. (2014). Comprehensive Investigation of Streptococcosis outbreaks in cultured Nile Tilapia, *Oreochromis niloticus*, and Red Tilapia, *Oreochromis* sp., of Thailand. *Journal of the World Aquaculture Society*, 45(4), 392–402. doi.org/10.1111/jwas.12131

Kayansamruaj, P., Pirarat, N., Kondo, H., Hirono, I., & Rodkhum, C. (2015). Genomic comparison between pathogenic *Streptococcus agalactiae* isolated from Nile tilapia in Thailand and fish-derived ST7 strains. Infection, *Genetics and Evolution*, 36, 307–314. doi.org/10.1016/j.meegid.2015.10.009

Kitabchi, A. E. (1967). Ascorbic acid in steroidgenesis. *Nature*, *215*, 1385-1386. doi: 10.1038/2151385a0.

Lin, M. F., & Shiau, S. Y. (2005). Dietary l-ascorbic acid affects growth, nonspecific immune responses and disease resistance in juvenile grouper, *Epinephelus malabaricus*. *Aquaculture*, *244*(1–4), 215–221. doi.org/10.1016/j.aquaculture.2004.10.026

Magnadottir, B. (2006). Innate immunity of fish (overview). *Fish & Shellfish Immunology*, *20*(2), 137–151. doi.org/10.1016/j.fsi.2004.09.006

Neumann, N. F., Stafford, J. L., Barreda, D., Ainsworth, A. J., & Belosevic, M. (2001). Antimicrobial mechanisms of fish phagocytes and their role in host defense. *Developmental & Comparative Immunology*, *25*(8–9), 807–825. doi.org/10.1016/s0145-305x(01)00037-4

Nilkamhank, S., & Paochom, A. (2000) Isolation of herbal vitamin C. A special project submitted in the bachelor degree of science in Pharmacy. Mahidol university. (in Thai)

Ortuño, J., Esteban, M. A., & Meseguer, J. (1999). Effects of high dietary intake of vitamin C on non-specific immune response of gilthead seabream (*Sparus aurata* L.). *Fish Shellfish Immunology*. *9*, 429– 443. doi.org/10.1006/fsim.1998.0201

Ortuño, J., Esteban, M. A., Meseguer, J., & Cuesta, A. (2001). Effect of oral administration of high vitamin C and E dosages on the gilthead seabream (*Sparus aurata* L.) innate immune system. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, *79*, 167-180. doi: 10.1016/s0165-2427(01)00264-1.

Ortuño, J., Esteban, M. A., & Meseguer, J. (2003). The effect of dietary intake of vitamins C and E on the stress response of gilthead seabream (*Sparus aurata* L.). *Fish & Shellfish Immunology*, *14*, 145-156. doi: 10.1006/fsim.2002.0428.

Parry, R. M., Chandau, R. C., & Shahani, R. M. (1965). A rapid and sensitive assay of muramidase. In Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine, 119, (pp. 384-386). doi:10.3181/00379727-119-30188

Perdikaris, C., Nathanailides, C., Gouva, E., Gabriel, U.U., Bitchava, K., Athanasopoulou, F., Paschou, A., & Paschos, I. (2010). Size-relative effectiveness of clove oil as an anaesthetic for rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss* Walbaum, 1792) and goldfish (*Carassius auratus* Linnaeus, 1758). *Acta Veterinaria Brno*, *79*, 481-490. doi.org/10.2754/avb201079030481

Peter-Futre, E. M. 2002. Vitamin C and exercise-induced oxidative and inflammatory stress in ultramarathon athletes. Ph. D. Thesis. University of Pretoria.

Phoonsamran, K. (2009). Effects of Vitamin C dietary supplementation on growth, survival and immune response of Maekong Giant Catfish (*Pangasianodon gigas*, Chevey). Master's thesis, Maejo University. (in Thai)

Rahimnejad, S., Dabrowski, K., Izquierdo, M., Hematyar, N., Imentai, A., Steinbach, C., & Policar, T. (2021). Effects of vitamin C and E supplementation on growth, fatty acid composition, innate Immunity, and antioxidant capacity of Rainbow Trout (*Oncorhynchus mykiss*) fed oxidized fish oil. *Frontiers in Marine Science*, 8. doi.org/10.3389/fmars.2021.760587

Ren, T., Koshio, S., Uyan, O., Komilus, C. F., Yokoyama, S., Ishikawa, M., & Abdul, K. (2008). Effects of dietary Vitamin C on blood chemistry and nonspecific immune response of juvenile red sea bream, *Pagrus major*. *Journal of the World Aquaculture Society*, 39(6), 797–803. doi.org/10.1111/j.1749-7345.2008.00216.x

Roberts, M. L., Davies, S. J., & Pulsford, A. L. (1995). The influence of ascorbic acid (vitamin C) on non-specific immunity in the turbot (*Scophthalmus maximus* L.). *Fish Shellfish Immunol*, *5*, 27-38. doi.org/10.1016/S1050-4648(05)80004-X

Sangkhonkhet N., & Haemasaton, T. (2019). The study juice fermentation for Malacca tree (*Phyllanthus emblica* Linn.) levels diet on white Shrimp (*Litopenaeus vannamei*). Proceedings of the 29th Thaksin University National Academic Conference 2019: Research and innovation for sustainability development. (in Thai)

Saurabh, S., & Sahoo, P.K. (2008). Lysozyme: an important defence molecule of fish innate immune system. *Aquaculture Research*, *39*, 223–239. doi.org/10.1111/j.1365- 2109.2007.01883.x

Scartezzini, P., Antognoni, F., Raggi, M.A., Poli, F., & Sabbioni, C. (2006). Vitamin C content and antioxidant activity of the fruit and of the Ayurvedic preparation of *Emblica officinalis* Gaertn., *Journal of Ethnopharmacology*, *104*(1–2), 113-118. doi.org/10.1016/j.jep.2005.08.065.

Schmekel, B., Blomstrand, P., & Venge, P. (2013). Serum lysozyme - a surrogate marker of pulmonary microvascular injury in smokers? *Clinical Physiology Functional Imaging*, *33*, 307–312. doi.org/10.1111/cpf.12029

Sobhana, K. S., Mohan, C. V., & Shankar, K. M. (2002). Effect of dietary vitamin C on the disease susceptibility and inflammatory response of mrigal, *Cirrhinus mrigala* (Hamilton) to experimental infection of *Aeromonas hydrophila*. *Aquaculture*, *207*(3–4), 225–238. doi.org/10.1016/s0044-8486(01)00793-1

Suanyuk, N., Kong, F., Ko, D., Gilbert, G. L., & Supamattaya, K. (2008). Occurrence of rare genotypes of *Streptococcus agalactiae* in cultured red tilapia *Oreochromis* sp. and Nile tilapia *O. niloticus* in Thailand—Relationship to human isolates?. *Aquaculture*, *284*(1–4), 35-40. doi.org/10.1016/j.aquaculture.2008.07.034

Tamta, M., & Saxena, A. (2018). Effect of Amla (*Emblica officinalis*) on the Hematology and Serum Biochemical Parameters of Rohu Fingerlings in Tarai Conditions of Uttarakhand. *International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences*. doi.org/10.20546/ijcmas.2018.710.251

Wang, X., Kim, K. W., Bai, S. C., Huh, M. D., & Cho, B. Y. (2003). Effects of the different levels of dietary vitamin C on growth and tissue ascorbic acid changes in parrot fish (*Oplegnathus fasciatus*). *Aquaculture*, *215,* 203-211. doi.org/10.1016/S0044-8486(02)00042-X

Xavier, J. B., Kim, W., & Foster, K. R. (2011). A molecular mechanism that stabilizes cooperative secretions in *Pseudomonas aeruginosa*. *Molecular microbiology*, *79*, 166–179. doi: 10.1111/j.1365-2958.2010.07436.x

Yoshida, T., & Kitao, T. (1991). The opsonic effect of specific immune serum on the phagocytic and chemiluminescent response in rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* phagocytes. *Fish Pathology, 26,* 29–33. doi.org/10.3147/jsfp.26.29