



ผลของการใช้นาโน-เคอร์ซีตินผสมในอาหารต่อการเจริญเติบโตและเสริมภูมิคุ้มกันต่อเชื้อ *Streptococcus agalactiae* ในปลานิล (*Oreochromis niloticus*)

Efficacy of Dietary Nano-quercetin on Growth, Innate Immune Responses, and Resistance of Nile Tilapia, *Oreochromis niloticus* against *Streptococcus agalactiae* Infection

พงศกร น้อยมูล*, สุดาพร ตงศิริ และ ชนกกันต์ จิตมนัส

Pongsakorn Noimoon*, Sudaporn Tongsir and Chanagun Chitmanat

คณะเทคโนโลยีการประมงและทรัพยากรทางน้ำ มหาวิทยาลัยแม่โจ้

Faculty of Fisheries Technology and Aquatic Resources, Maejo University

Received : 12 August 2020

Revised : 5 November 2020

Accepted : 30 December 2020

บทคัดย่อ

พัฒนาผลิตภัณฑ์นาโน-เคอร์ซีตินโดยละลายเคอร์ซีตินกับเอทานอลจนได้ (1 mg/mL) แล้วนำไปผสมกับ Pluronic F-127 ที่ละลายด้วยน้ำ DI (1 mg/mL) ในอัตราส่วน 1:3 คนให้สารละลายเข้ากันแล้วเติม Tween 80 20 μ L แล้วนำไปฟรีสตรายนํ้าไปวิเคราะห์อนุภาคจนได้ขนาด 12.27 ± 4.45 นาโนเมตร แล้วนำมาทดสอบการเจริญเติบโต และสร้างภูมิคุ้มกันต่อเชื้อ *S. agalactiae* ในปลานิล โดยเริ่มต้นปล่อยปลานิลขนาด 40 ± 10 กรัม จำนวน 20 ตัวมาปล่อยในกระชังขนาด 1 ตารางเมตร ทดลองโดยให้อาหาร 4 สูตรคือ อาหารควบคุม อาหารผสมนาโน-เคอร์ซีติน 25, 50 และ 75 มิลลิกรัมต่ออาหาร 1 กิโลกรัมให้อาหาร 4 เปอร์เซ็นต์ของน้ำหนักตัววันละ 2 มื้อ โดยทดลองเป็นระยะ 8 สัปดาห์ พบว่า ผลด้านค่าการเจริญเติบโต น้ำหนักที่เพิ่มขึ้น น้ำหนักที่เพิ่มขึ้นต่อวัน อัตราแลกเนื้อ การกินอาหารและอัตราการรอด ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ ($P > 0.05$) ผลของค่ากิจกรรมไลโซไซม์ของกลุ่มที่ได้รับนาโน-เคอร์ซีติน 25, 50 และ 75 มิลลิกรัม พบว่า ตั้งแต่สัปดาห์ที่ 4 จนถึงสัปดาห์สุดท้ายของการทดลองมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญเมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม ($P < 0.05$) แต่ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติระหว่างกลุ่มทดลองที่ได้รับนาโน-เคอร์ซีติน ($P > 0.05$) กระบวนการจับกินสิ่งแปลกปลอมพบว่าเมื่อสิ้นสุดการทดลองกลุ่มที่ได้รับนาโน-เคอร์ซีติน 50 มิลลิกรัม มีเปอร์เซ็นต์การจับกินที่ดีที่สุดและความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญกับกลุ่มทดลองอื่นๆ ($P < 0.05$) กระบวนการผลิตซูเปอร์ออกไซด์แอนไอออนพบว่า เมื่อสิ้นสุดการทดลองไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ ($P > 0.05$) ระหว่างกลุ่มทดลอง จากการทดสอบเชื้อ *S. agalactiae* ความเข้มข้น 1×10^8 CFU ต่อมิลลิลิตรต่อตัว พบว่ากลุ่มปลาที่ได้รับอาหารผสมนาโน-เคอร์ซีติน 75 มิลลิกรัมมีอัตราการตายสูงที่สุด (93.33%) รองลงมาคือกลุ่มได้รับนาโน-เคอร์ซีติน 50 (90%) และ 25 (80%) มิลลิกรัมต่ออาหาร 1 กิโลกรัมตามลำดับ จากการทดลองพบสารนาโน-เคอร์ซีตินไม่มีส่วนช่วยในเรื่องอัตราการเจริญเติบโตแต่สามารถช่วยเสริมภูมิคุ้มกันต่อเชื้อ *S. agalactiae* ได้

คำสำคัญ : ปลานิล ; อนุภาคนาโน ; เคอร์ซีติน ; ภูมิคุ้มกัน ; สเตรปโตคอคคัส



Abstract

Developed Nano-Quercetin by dissolving quercetin with ethanol (1:1). Mixed with Pluronic F-127 solution (DI water: Pluronic F-127, 1:1) ratio 1:3 shake and drop 20 μL Tween 80. Then Freeze-dry solution and analyzed with Malvern. Nano-Quercetin diameter 12.27 ± 4.45 nm test efficacy of dietary on growth, immune response and resistance of Nile tilapia against *S. agalactiae* was investigated. Fish (40 ± 10 grams, 20 fish/ m^3) were divided into 4 groups before being fed for 8 weeks with 0 (Control), 25, 50 and 75 mg of Nano-Quercetin. Fish were fed experimental diets at a rate of 4 body weight/day. The results showed that growth parameter weight gain, average daily gain, feed intake, FCR and survival rate were not significantly different ($P > 0.05$). The serum lysozyme activities of tilapia fed with 25, 50 and 75 mg of Nano-Quercetin enhanced significantly ($P < 0.05$) when compared with control after the 4th to 8th week of the experiment. Tilapia fed with 50 mg of Nano-Quercetin showed a highly significant difference ($P < 0.05$) in phagocytosis activity. While the respiratory burst activity was not significantly different ($P > 0.05$). After challenge with *S. agalactiae*, the survival rates were in groups fed with 75 (93.33%), 50 (90%) and 25 (80%) mg Nano-Quercetin, respectively. Results obtained in this study showed that a Nano-Quercetin supplementary diet could not increase growth performances but it could improve immune response against *S. agalactiae*.

Keywords : Nile tilapia ; quercetin ; nanoparticles ; immune response ; *Streptococcus agalactiae*

บทนำ

ปลานิลได้รับความนิยมจากตลาดทั้งในประเทศและต่างประเทศ เนื่องจากมีรสชาติดี เนื้อแน่น เจริญเติบโตและแพร่พันธุ์ได้รวดเร็ว อุตสาหกรรมการเลี้ยงปลานิลจึงมีการขยายตัวอย่างมากในประเทศ มีการผลิตปลานิลได้มากกว่า 217,928 ตัน ในปี 2560 คิดเป็นร้อยละ 52.73 ของปริมาณการผลิตปลาน้ำจืด (Fishery Statistics Analysis and Research Group, 2019) อย่างไรก็ตามเกษตรกรมักจะเลี้ยงปลานิลหนาแน่นมากเกินไปเพื่อให้ได้ผลผลิตต่อรอบสูง จึงส่งผลให้ปลาที่เลี้ยงโตช้า ขนาดปลาไม่สม่ำเสมอ เป็นโรคได้ง่าย ทำให้จำหน่ายไม่ได้ราคา (Kroanantarakul, 1999)

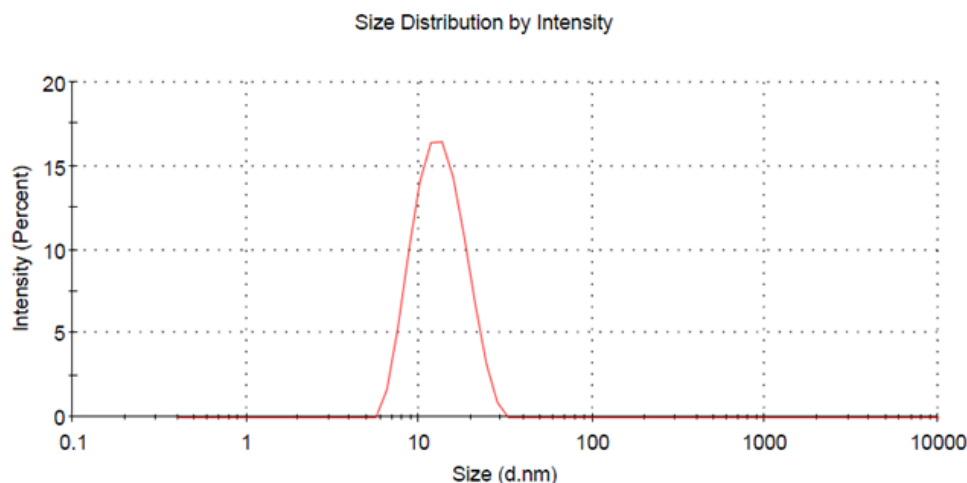
แม้ว่าปลานิลสามารถเลี้ยงได้ทั้งในบ่อดินและในกระชัง อุปสรรคที่สำคัญของการเพาะเลี้ยงปลานิล คือ โรคปลานิล ซึ่งปลานิลเป็นโรคได้ง่ายขึ้น เพราะเกิดบาดแผลจากการขนย้าย การปล่อยเลี้ยงหนาแน่นมากและขาดการจัดการที่ดี (Ghiraldelli *et al.*, 2006) รวมทั้งความแปรปรวนของสภาพแวดล้อม การใช้สารเคมีและยาปฏิชีวนะเพื่อป้องกันรักษาโรค ทำให้ไม่เป็นที่ยอมรับของผู้บริโภคและต้นทุนการผลิตสูงขึ้นมากจนผู้เลี้ยงไม่สามารถแข่งขันทางการตลาดได้ ดังนั้นการที่จะประสบผลสำเร็จในการเพาะเลี้ยงปลานิล จะต้องมีการจัดการสุขภาพที่ดี ได้แก่ การเตรียมบ่อที่ดี ใช้ลูกพันธุ์ที่มีคุณภาพ รักษาความสะอาดบ่อ เครื่องมือ อุปกรณ์ที่ใช้ เพื่อลดโอกาสความเสี่ยงในการเกิดโรคและแพร่ระบาดของโรคสัตว์น้ำ (Chitmanat, 2013) โรคติดเชื้อแบคทีเรียสเตรปโตโคคซิส (Streptococcosis) เป็นโรคที่สร้างความเสียหายแก่เกษตรกรผู้เลี้ยงปลานิล พบระบาดรุนแรงในหน้าร้อนสามารถทำให้ปลาตายจำนวนมากในเวลาอันสั้นหากมีการติดเชื้อรุนแรง อัตราการตายจากโรคนี้พบสูงเมื่ออุณหภูมิสูงกว่า 26 °C โรคติดเชื้อนี้สามารถติดต่อจากปลาที่เป็นโรคที่อาศัยอยู่ในบ่อหรือกระชังเดียวกัน (Mian *et al.*, 2009) เพื่อบรรเทาความเสียหายจากโรคติดเชื้อมากขึ้น ได้มีการทดลองหาสารกระตุ้นภูมิคุ้มกันที่หลากหลายมาผสมอาหารให้ปลานิล

เคอร์ซีติน (Quercetin) เป็นสารประกอบในกลุ่มฟลาโวนอยด์ (Flavonoids) อยู่ในหมู่ฟังกซ์ของฟลาโวนอล (Flavonols) (Wipob, 2013) ซึ่งเป็นสารที่พบมากและหาได้ง่ายในพืช ผลไม้หรือพืชสมุนไพร (Buchweitz *et al.*, 2016) และมีการศึกษาสารเคอร์ซีตินจากใบฝรั่ง (*Psidium guajava*) พบว่า ให้ผลการยับยั้งเชื้อก่อโรคในปลานิลได้ เช่น *A. hydrophila*, *S. agalactiae* (Rattanachaiunsopon & Phumkhachorn, 2007) นอกจากนี้การศึกษาฤทธิ์ของเคอร์ซีตินในปลา silver catfish (*Rhamdia quelen*) ซึ่งให้เห็้นว่าสามารถเพิ่มสารต้านอนุมูลอิสระและลดการอักเสบในเนื้อเยื่อได้ (Pès *et al.*, 2016) Jia *et al.* (2016) ทดลองเสริมเคอร์ซีติน 8% ในอาหาร พบว่าทำให้ปลา blunt snout bream (*Megalobrama amblycephala*) เจริญเติบโตดีขึ้น อย่างไรก็ตามเคอร์ซีตินเป็นสารที่ละลายน้ำได้ยาก (0.01 mg/mL ที่ 25 °C) และมีฤทธิ์ทางชีวภาพที่สั้น (Short biological half-life) (Gao *et al.*, 2011) การใช้วิธีพอลิเมอร์ไมเซลล์ (Polymeric Micelles) เป็นวิธีที่น่าสนใจ เนื่องจากเป็นวิธีที่ทำให้สารที่ละลายน้ำยากสามารถละลายน้ำได้ดีมากขึ้น มีความคงตัวเมื่ออยู่ในระบบทางเดินอาหารและให้อนุภาคขนาดเล็กประมาณ 10-100 นาโนเมตร (Woraphatphadung & Opanasopit, 2014) ดังนั้นทางผู้วิจัยจึงได้มีแนวคิดที่จะใช้สารเคอร์ซีติน (Quercetin) ที่ประยุกต์ใช้กับวิธีพอลิเมอร์ไมเซลล์ (Polymeric Micelles) นำมาผสมในอาหารเลี้ยงปลาเพื่อศึกษาการเจริญเติบโต การเพิ่มภูมิคุ้มกัน และการต้านเชื้อก่อโรคในปลานิล

วิธีดำเนินการวิจัย

1. การพัฒนานาโน-เคอร์ซีติน (Nano Quercetin)

ดัดแปลงการทดลองของ Sassa-deepaeng *et al.* (2016) โดยนำเคอร์ซีติน (Sigma, CAS Number 117-39-5) ไปละลายในตัวทำละลายเอทานอล (1 mg/mL) แล้วนำไปผสมกับ Pluronic F-127 (Sigma, CAS Number 9003-11-6) ที่ละลายด้วยน้ำ DI (1 mg/mL) ในอัตราส่วน 1:3 คนให้สารละลายเข้ากันแล้วเติม Tween 80 20 μ L (เคมีภัณฑ์ ประเทศไทย, CA2010-A-GM100-M) หลังจากนั้นนำสารละลายทั้งหมดไปแช่ที่ตู้ -20 องศาเซลเซียส แล้วทำให้แห้งด้วยเครื่อง freeze dry นำผลิตภัณฑ์ที่ได้ไปวิเคราะห์ด้วยเครื่อง Malvern (Zetasizer Ver. 7.11) นาโน-เคอร์ซีตินที่วิเคราะห์ได้มีค่าเฉลี่ย 12.27 ± 4.45 นาโนเมตร ดังภาพที่ 1



ภาพที่ 1 Size Distribution Report by Intensity ของ นาโน-เคอร์ซีตินวิเคราะห์ด้วยเครื่อง Malvern

2. อาหารทดลอง

นำอาหารปลานิลอัดเม็ดสำเร็จรูปโปรตีนไม่ต่ำกว่า 30 เปอร์เซ็นต์มาผสมกับนาโน-เคอร์ซีตินละลายในน้ำ DI 100 มิลลิลิตร ที่ระดับ 0, 25, 50 และ 75 มิลลิกรัมต่ออาหาร 1 กิโลกรัม แล้วนำไปฝังให้แห้งในที่เย็น นำอาหารผสมนาโน-เคอร์ซีตินทุกชุดการทดลองมาวิเคราะห์ค่าความชื้น เถ้า โปรตีน ไขมัน และเยื่อใยตามวิธีการมาตรฐานของ AOAC (2000)

ตารางที่ 1 ปริมาณของโปรตีน เยื่อใย ไขมัน เถ้าและความชื้นของสูตรอาหารเม็ดลอยที่ผสมนาโน-เคอร์ซีตินต่อกิโลกรัม (เปอร์เซ็นต์)

อาหารเม็ดลอยน้ำผสมนาโน-เคอร์ซีติน				
	ควบคุม	25 มิลลิกรัมต่อ กิโลกรัม	50 มิลลิกรัมต่อ กิโลกรัม	75 มิลลิกรัมต่อ กิโลกรัม
โปรตีน	32.01±0.22	32.03±0.01	32.07±0.19	32.09±0.20
เยื่อใย	4.45±2.53	4.68±1.62	4.42±1.56	4.32±1.59
ไขมัน	6.33±0.06	6.17±0.27	6.28±0.03	6.33±0.06
เถ้า	9.65±0.04	9.67±0.01	9.68±0.03	9.64±0.04
ความชื้น	7.99±0.13	8.10±0.50	8.14±0.05	8.06±0.01

3. สัตว์ทดลอง

นำปลานิลที่ได้รับการแปลงเพศขนาด 40 กรัมจำนวน 20 ตัวมาปล่อยในกระชังขนาด 1 ตารางเมตร จำนวน 12 กระชัง (4 ชุดการทดลอง ชุดทดลองละ 3 ซ้ำ) ปรับสภาพของปลาเป็นระยะเวลา 2 สัปดาห์ จากนั้นให้อาหารปลานิลอัดเม็ดสำเร็จรูปโปรตีนไม่ต่ำกว่า 30 เปอร์เซ็นต์ที่ผสมนาโน-เคอร์ซีติน 0, 25, 50 และ 75 มิลลิกรัมต่ออาหาร 1 กิโลกรัม ปริมาณ 4 เปอร์เซ็นต์ของน้ำหนักตัวต่อวัน ให้อาหารวันละ 2 ครั้ง สุ่มวัดอัตราการเจริญเติบโต (น้ำหนัก) ทุก 2 สัปดาห์ เลี้ยงเป็นระยะเวลา 8 สัปดาห์

4. วิเคราะห์ข้อมูลด้านการเจริญเติบโต

สุ่มปลาขึ้นมา 10 ตัวของแต่ละกระชัง ซึ่งน้ำหนักปลานิลมีหน่วยเป็นกรัม ทุก 2 สัปดาห์เป็นระยะเวลา 8 สัปดาห์ เมื่อสิ้นสุดการทดลองนับจำนวนปลาที่เหลือและชั่งน้ำหนัก นำข้อมูลที่ได้ไปคำนวณค่าต่าง ๆ ดังนี้

4.1 น้ำหนักปลาที่เพิ่มขึ้น (weight gain, WG; กรัมต่อตัว)

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

4.2 น้ำหนักที่เพิ่มขึ้นต่อวัน (Average Daily Gain, ADG; กรัมต่อตัว)

$$ADG = \left(\frac{\text{น้ำหนักปลาเมื่อสิ้นสุดการทดลอง} - \text{น้ำหนักปลาเมื่อเริ่มต้นการทดลอง}}{\text{ระยะเวลาทดลอง}} \right) \times 100 \quad (2)$$

4.3 น้ำหนักอาหารที่ปลากิน (Total Feed Intake, TFI; กรัมต่อตัวต่อวัน)

$$TFI = \frac{\text{น้ำหนักอาหารทั้งหมดที่ปลากิน} + \text{จำนวนวันที่เลี้ยง}}{\text{จำนวนปลาทั้งหมด}} \quad (3)$$

4.4 อัตราการเปลี่ยนอาหารเป็นเนื้อ (Food Conversion Ratio, FCR)

$$FCR = \frac{\text{น้ำหนักอาหารที่ปลากิน}}{\text{น้ำหนักปลาที่เพิ่มขึ้น}} \quad (4)$$

4.5 อัตรารอด (Survival Rate, SR; เปอร์เซ็นต์)

$$SR = \left(\frac{\text{จำนวนปลาเมื่อสิ้นสุดการทดลอง}}{\text{จำนวนปลาเริ่มต้น}} \right) \times 10 \quad (5)$$

5. ตรวจสอบผลการตอบสนองของภูมิคุ้มกันแบบไม่จำเพาะของปลานิล

ทุก 2 สัปดาห์ของการทดลอง จะสุ่มปลาในแต่ละชุดการทดลองมา 10 ตัว เพื่อทดสอบการตอบสนองของภูมิคุ้มกันแบบไม่จำเพาะ โดยนำปลามาสลบด้วยน้ำมันกานพลู (เคมีภัณฑ์ ประเทศไทย) 1 มิลลิลิตรต่อน้ำ 1 ลิตร เก็บตัวอย่างเลือดปลา ประมาณ 0.7 มิลลิลิตร จากเส้นเลือดตามแนวเส้นข้างลำตัวด้านท้าย (Caudal vein) เพื่อนำมาวิเคราะห์

5.1 กิจกรรมของซีรัมไลโซไซม์ (lysozyme activity) ดัดแปลงจากวิธีการของ Puangkaew *et al.* (2004) โดยการแยกซีรัมจากตัวอย่างเลือดชุดการทดลองละ 5 ตัว นำเลือดปลา 0.7 มิลลิลิตรใส่ microcentrifuge tube ทิ้งให้เลือดแข็งตัว 24 ชั่วโมงที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส นำตัวอย่างเลือดไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว $1,500 \times g$ เป็นเวลา 10 นาที ดูดซีรัมส่วนใสด้านบน เก็บที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียสจนกว่าจะทำการทดสอบ การวิเคราะห์กิจกรรมไลโซไซม์จะดูดซีรัม 25 ไมโครลิตรลงใน 96-well plate ตัวอย่างละ 2 ข้ำ แล้วเติมสารละลายแบคทีเรีย *Micrococcus lysodeikticus* (Sigma) ความเข้มข้น 3 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร (สารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ 0.05 โมลลาร์, pH 6.8) จำนวน 100 ไมโครลิตรผสมให้เข้ากัน แล้วนำไปวัดค่าดูดกลืนแสงทุก 5 นาทีที่ความยาวคลื่นแสง 450 นาโนเมตรด้วยเครื่อง Microplate Reader หน่วยเป็นยูนิตต่อ นาที (หนึ่งยูนิตเท่ากับปริมาณซีรัมที่ทำให้ค่าการดูดกลืนแสง ลดลง 0.001 ต่อนาที)

5.2 กิจกรรมการจับกินสิ่งแปลกปลอมของเม็ดเลือดขาว (phagocytic activity) ใช้วิธีการดัดแปลงของ Doana *et al.* (2014) และ Yoshida & Kitao (1991) เจาะเลือดปลา 1 มิลลิลิตรใส่ลงใน Heparin tube (DK medical service) ผสมกับ RPMI-1640 1 มิลลิลิตรนำเลือดมาค้อยๆหยดในหลอด Polyethylene (conical tube) ที่มีสารแยกชั้น (Histopaque, Sigma) 3 มิลลิลิตรปั่นเหวี่ยงที่ $400 \times g$ เป็นเวลา 30 นาทีที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส แยกเม็ดเลือดขาวที่แยกชั้นอยู่ตรงกลางออกมาใส่ใน conical tube หลอดใหม่เติมสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ 3 มิลลิลิตร pH 7.4 แล้วนำไปปั่นเหวี่ยงที่ $200 \times g$ เป็นเวลา 15 นาทีเทส่วนใสทิ้งทำซ้ำอีกครั้งเพื่อทำความสะอาดเซลล์ นำเม็ดเลือดขาวที่ได้ปรับความเข้มข้น 2×10^6 เซลล์ต่อ

มิลลิลิตร หยดลงบนแผ่นสไลด์ 200 ไมโครลิตร ตั้งทิ้งไว้ 2 ชั่วโมง ล้างเซลล์เม็ดเลือดขาวออกด้วย RPMI-1640 แล้วเติม latex beads ความเข้มข้น 2×10^7 เซลล์ต่อมิลลิลิตร จำนวน 200 ไมโครลิตร ลงบนแผ่นสไลด์บ่มที่อุณหภูมิห้องนาน 2 ชั่วโมง เพื่อให้เกิดกระบวนการจับกินสิ่งแปลกปลอมของเม็ดเลือดขาว แล้วเทของเหลวที่อยู่ด้านบนสไลด์ออกแล้วล้างด้วย RPMI-1640 2 ครั้งตรึงเซลล์ด้วยเมธานอล แล้วนำไปย้อมด้วยวิธี Diff-Quick staining dye เป็นเวลา 10 วินาที แล้วล้างสไลด์ด้วย PBS (pH 7.4)

$$\text{Phagocytic activity} = \left(\frac{\text{จำนวนเซลล์ที่จับกิน beads}}{\text{จำนวนเซลล์เม็ดเลือดขาวทั้งหมดที่นับได้}} \right) \times 100 \quad (6)$$

5.3 กระบวนการผลิตซูเปอร์ออกไซด์แอนไอออน (Respiratory burst activity) กระบวนการผลิตซูเปอร์ออกไซด์แอนไอออนของปลานิล จะใช้วิธีของ Doana *et al.* (2014) ที่ดัดแปลงมาจากวิธีการของ Secombes *et al.* (1990) นำเม็ดเลือดขาวจากข้อ 5.2 จำนวน 175 ไมโครลิตรปรับความเข้มข้น 6×10^6 เซลล์ต่อมิลลิลิตรในสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ ใส่ลงใน 96-well plate เติม Nitro Blue Tetrazolium (NBT) ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตรปริมาณ 25 ไมโครลิตร แล้วบ่มเป็นเวลา 2 ชั่วโมงที่อุณหภูมิห้อง ดูดส่วนใสด้านบนออก ด้วยไมโครปิเปตออกให้หมด แล้วล้างด้วยเมทานอล 100 เปอร์เซ็นต์ปริมาณ 125 ไมโครลิตรต่อหลุม ดูดส่วนใสออกแล้วล้างด้วยเมทานอล 70 เปอร์เซ็นต์ ปริมาณ 125 ไมโครลิตรต่อหลุมทำวิธีการเดิมซ้ำ จำนวน 2 ครั้ง แล้วดูดส่วนใสด้านบนออกให้มากที่สุดแล้วปล่อยทิ้งไว้เป็นเวลา 30 นาทีหลังจากนั้นเติม 2 นอร์มอลโพแทสเซียมไฮดรอกไซด์ (2N KOH) ปริมาณ 125 ไมโครลิตร แล้วเติมไดเมทิลซัลฟอกไซด์ (DMSO) ปริมาณ 150 ไมโครลิตร นำไปวัดค่าดูดกลืนแสงที่ 655 นาโนเมตร เปรียบเทียบกับ แบลงค์น้ำกลั่นแสดงผลเป็นการผลิต O_2^- (ค่าดูดกลืนแสงของแบลงค์ – ค่าดูดกลืนแสงที่ลดลงของ NBT ในตัวอย่างที่วิเคราะห์)

6. ทดสอบความต้านทานต่อเชื้อแบคทีเรีย

ในสัปดาห์ที่ 8 สุ่มปลานิลในกระชังละ 10 ตัวมาทดสอบการต้านทานเชื้อแบคทีเรียสเตรปโตคอคคัส (*S. agalactiae*) โดยนำปลานิลที่มีลักษณะติดเชื้อจากเกษตรกรอำเภอดอยหล่อ จังหวัดเชียงใหม่ มาแยกเชื้อจากตับ ไต ม้าม และสมอง มาเพาะเชื้อในอาหาร Tryptic Soy Broth (TSB) บ่มที่ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมงแล้วนำไปแยกเชื้อด้วยวิธีการ Streak plate ในอาหารเลี้ยงเชื้อ Tryptic Soy Agar (TSA) บ่มที่ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง นำเชื้อที่แยกได้ส่งตรวจกับห้องปฏิบัติการตรวจวิเคราะห์ทางจุลชีววิทยา มหาวิทยาลัยขอนแก่น แล้วนำเชื้อแบคทีเรียที่ระดับความเข้มข้น 1×10^8 CFU ต่อมิลลิลิตร (LD_{50}) ฉีดเข้าบริเวณช่องท้องปลาตัวละ 0.1 มิลลิลิตรบันทึกการตายของปลาทุกวันเป็นเวลา 10 วัน คำนวณหาเปอร์เซ็นต์การรอดตาย (จำนวนปลาที่ตาย $\times 100$ / จำนวนปลาที่สุ่มมาทดลอง) ในแต่ละวัน โดยปลาที่ตายนั้นจะถูกนำมาแยกเชื้อจากตับแล้วนำไปเลี้ยงในอาหาร TSA เพื่อยืนยันการตายจากเชื้อแบคทีเรียสเตรปโตคอคคัส



7. การวิเคราะห์ผลทางสถิติ

นำข้อมูลค่าพารามิเตอร์ต่าง ๆ ที่วัดได้ นำไปวิเคราะห์ทางสถิติ โดยหาค่าเฉลี่ยและส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน (Mean±SD) โดยวิเคราะห์ความแปรปรวน One way ANOVA แล้วเปรียบเทียบความแตกต่างระหว่างกลุ่มการทดลองด้วยวิธี Duncan's Multiple Range Test ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซนต์ ($P<0.05$)

ผลการวิจัย

ปลานิลที่ได้รับอาหารผสมนาโน-เคอร์ซีตินมีน้ำหนักที่เพิ่มขึ้นและน้ำหนักที่เพิ่มขึ้นต่อวันไม่แตกต่างกันทางสถิติ ($P>0.05$) แต่ในกลุ่มทดลองที่ได้รับอาหารผสมนาโน-เคอร์ซีติน 25 มิลลิกรัมต่ออาหาร 1 กิโลกรัมมีค่าการเจริญเติบโตดีกว่ากลุ่มควบคุมซึ่งมีแนวโน้มลดลงตามระดับเคอร์ซีตินที่เพิ่มขึ้น (ตารางที่ 2) อัตราการเปลี่ยนอาหารเป็นเนื้อ น้ำหนักอาหารที่ปลากินและอัตราการรอดระหว่างการเลี้ยง พบว่า ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ ($P>0.05$) แต่ในกลุ่มทดลองที่ได้รับอาหารผสมนาโน-เคอร์ซีติน 50 มิลลิกรัมต่ออาหาร 1 กิโลกรัมมีค่าอัตราการเปลี่ยนอาหารเป็นเนื้อ น้ำหนักอาหารที่ปลากินและอัตราการรอดระหว่างการเลี้ยงที่ดีกว่ากลุ่มควบคุม

ตารางที่ 2 ค่าเฉลี่ยและส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานน้ำหนักที่เพิ่มขึ้น น้ำหนักที่เพิ่มขึ้นต่อวัน อัตราการเปลี่ยนอาหารเป็นเนื้อ น้ำหนักอาหารที่ปลากิน และอัตราการรอดของปลานิลที่ทดลองด้วยอาหารผสมนาโน-เคอร์ซีติน เป็นระยะเวลา 8 สัปดาห์

	ควบคุม	25 มิลลิกรัมต่อ กิโลกรัม	50 มิลลิกรัมต่อ กิโลกรัม	75 มิลลิกรัมต่อ กิโลกรัม	P
น้ำหนักที่เพิ่มขึ้น (กรัมต่อตัว)	41.81±6.32	43.98±5.83	39.11±2.81	37.70±2.20	0.41
น้ำหนักที่เพิ่มขึ้นต่อวัน (กรัมต่อตัว)	0.77±0.12	0.82±0.11	0.72±0.05	0.70±0.04	0.39
อัตราการเปลี่ยนอาหารเป็นเนื้อ	1.69±0.32	1.46±0.12	1.42±0.09	1.46±0.04	0.17
น้ำหนักอาหารที่ปลากิน (กรัมต่อตัวต่อวัน)	2.49±0.7	1.97±0.09	1.91±0.16	1.93±0.03	0.23
อัตราการรอด (%)	80±25.98	96.67±5.77	100	98.33±2.89	0.30

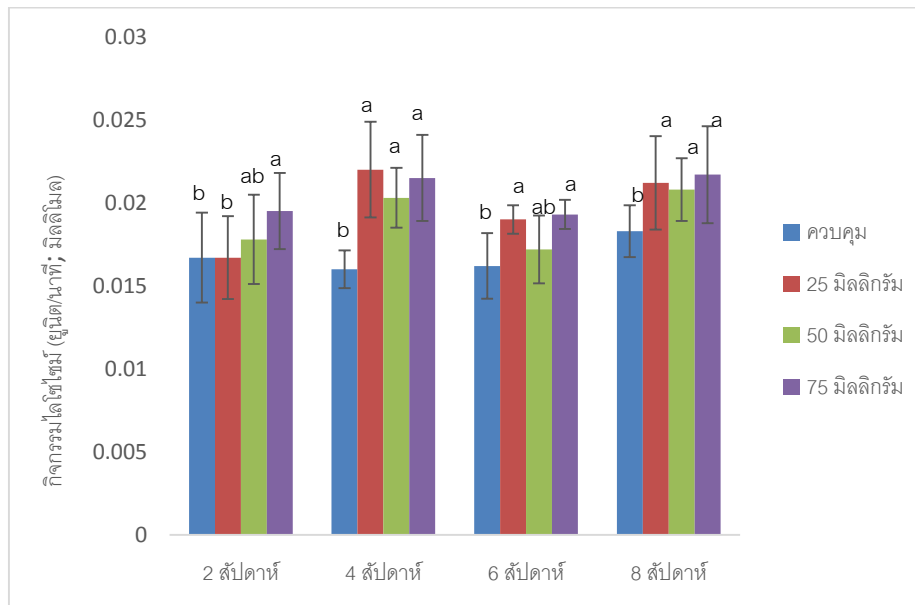
ปลานิลที่ได้รับอาหารผสมนาโน-เคอร์ซีติน 25, 50 และ 75 มิลลิกรัมต่ออาหาร 1 กิโลกรัม พบว่าในสัปดาห์ที่ 4 และ 8 กิจกรรมของซีสเต็มไคโซไซม์มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.05$) ระหว่างกลุ่มควบคุม แต่ไม่แตกต่างกันระหว่างกลุ่มที่ได้รับอาหารเสริมนาโน-เคอร์ซีติน ซึ่งกลุ่มทดลองที่ได้รับอาหารผสมนาโน-เคอร์ซีตินที่ระดับ 25 และ 75 มิลลิกรัม

ต่ออาหาร 1 กิโลกรัมให้แนวโน้มของกิจกรรมไลโซไซม์ที่มากกว่ากลุ่มควบคุม และกลุ่มได้รับอาหารผสมนาโน-เคอร์ซีติน 50 มิลลิกรัมต่ออาหาร 1 กิโลกรัม ดังภาพที่ 2

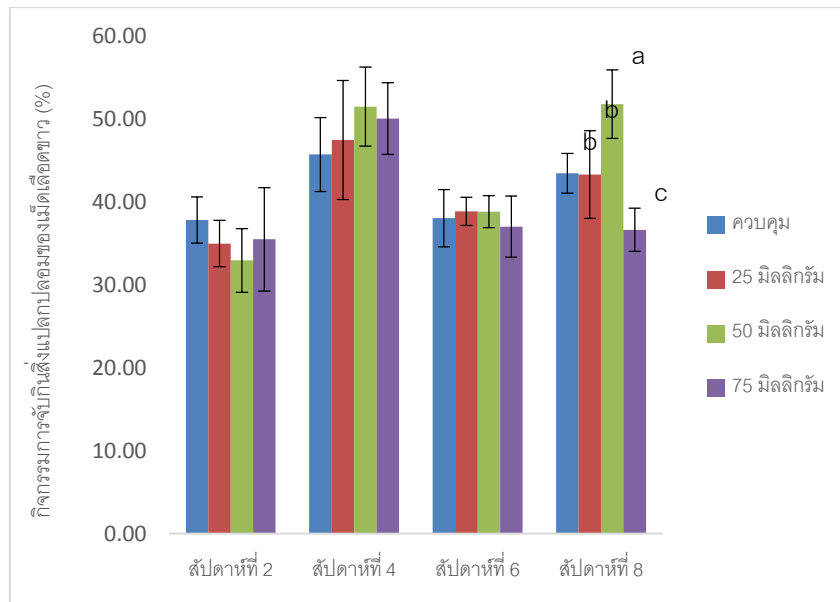
ผลการศึกษากิจกรรมการจับกินสิ่งแปลกปลอมของเม็ดเลือดขาวของปลานิลที่ได้รับอาหารผสมนาโน-เคอร์ซีติน 25, 50 และ 75 มิลลิกรัมต่ออาหาร 1 กิโลกรัม พบว่าในสัปดาห์ที่ 8 มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$) ระหว่างกลุ่มทดลอง ซึ่งตลอดการเลี้ยงกลุ่มที่ได้รับอาหารผสมอาหารผสมนาโน-เคอร์ซีติน 50 มิลลิกรัมต่ออาหาร 1 กิโลกรัมมีค่าเปอร์เซ็นต์แนวโน้มการจับกินสิ่งแปลกปลอมดีที่สุดเมื่อเทียบกับชุดการทดลองกลุ่มอื่น ดังภาพที่ 3

ผลการศึกษากระบวนการผลิตซูเปอร์ออกไซด์แอนไอออนของปลานิลที่ได้รับอาหารผสมนาโน-เคอร์ซีติน 25, 50 และ 75 มิลลิกรัมต่ออาหาร 1 กิโลกรัม พบว่าในสัปดาห์ที่ 4 มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$) ระหว่างกลุ่มควบคุมกับกลุ่มที่ได้รับอาหารผสมนาโน-เคอร์ซีติน 25 และ 75 มิลลิกรัมต่ออาหาร 1 กิโลกรัม แต่ในสัปดาห์ที่ 6 และ 8 ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ ($P > 0.05$) ซึ่งตลอดการเลี้ยงกลุ่มที่ได้รับอาหารผสมนาโน-เคอร์ซีติน 25 และ 75 มิลลิกรัมต่ออาหาร 1 กิโลกรัมมีแนวโน้มที่ดีกว่ากลุ่มควบคุม ดังภาพที่ 4

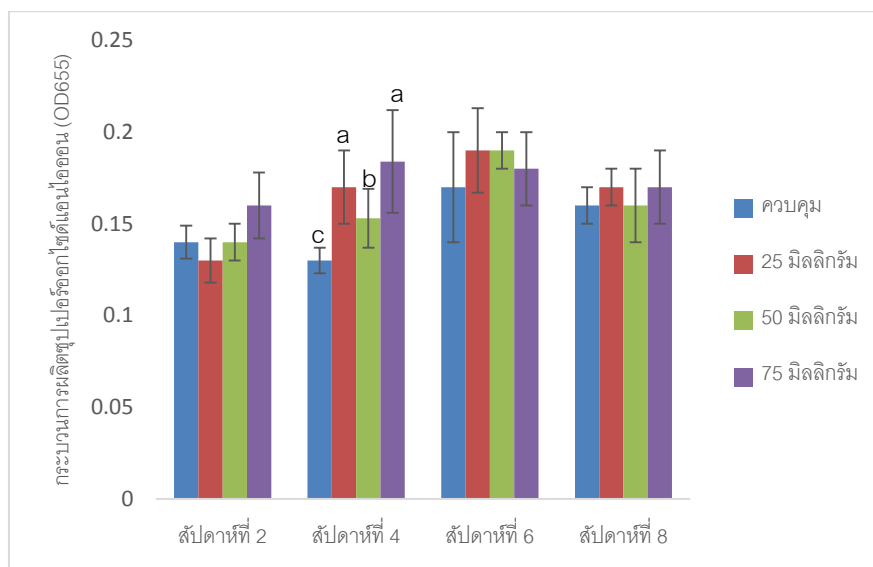
ผลการศึกษาความต้านทานเชื้อ *S. agalactiae* ของปลานิลที่ได้รับอาหารผสมนาโน-เคอร์ซีติน 25, 50 และ 75 มิลลิกรัมต่ออาหาร 1 กิโลกรัม พบว่าเมื่อเข้าสู่วันที่ 4 กลุ่มควบคุม เริ่มมีการตายเกิดขึ้น (16.67%) และในวันที่ 6 เริ่มมีการตายเกิดขึ้นในปลากลุ่มที่ได้รับอาหารผสมนาโน-เคอร์ซีติน 25 มิลลิกรัมต่ออาหาร 1 กิโลกรัม (3.33%) และเมื่อครบวันที่ 10 กลุ่มควบคุมมีการตายมากที่สุด (40%)



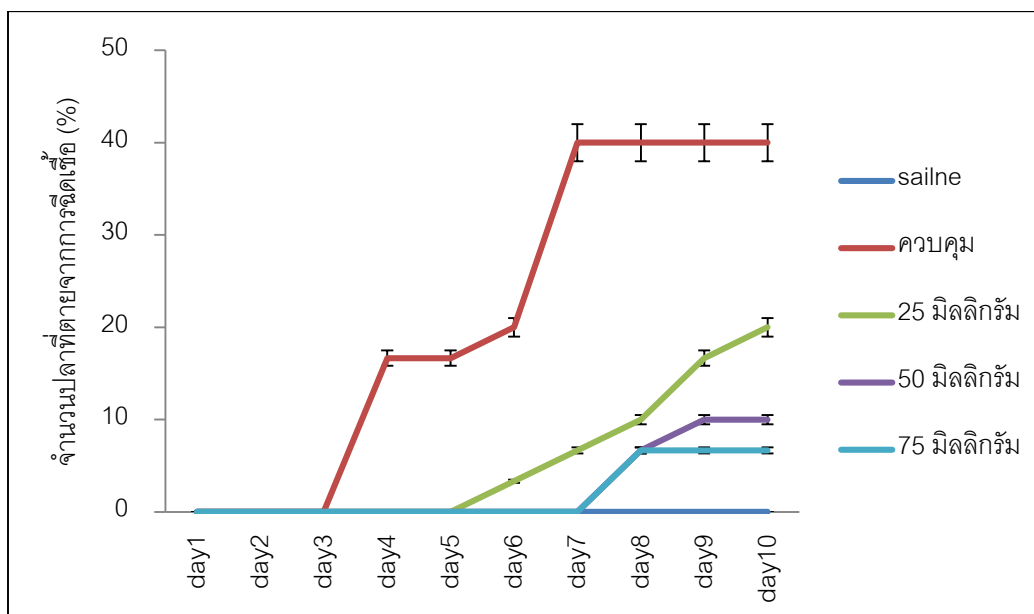
ภาพที่ 2 กิจกรรมไลโซไซม์ของปลานิลที่ได้รับอาหารผสมนาโน-เคอร์ซีตินที่ 0, 25, 50 และ 75 มิลลิกรัมต่ออาหาร 1 กิโลกรัม ตั้งแต่สัปดาห์ที่ 2 ถึงสัปดาห์ที่ 8 ตัวอักษร a และ b แสดงถึงความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$) ระหว่างกลุ่มทดลอง ทดสอบโดยใช้วิธีของ Duncan's Multiple Range Test



ภาพที่ 3 กิจกรรมการจับกินสิ่งแปลกปลอมของเมดเลือดขาวของปลานิลที่ได้รับอาหารผสมนาโน-เคอร์ซีตินที่ 0, 25, 50 และ 75 มิลลิกรัมต่ออาหาร 1 กิโลกรัมตั้งแต่สัปดาห์ที่ 2 ถึงสัปดาห์ที่ 8 ตัวอักษร a, b และ c แสดงถึงความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$) ระหว่างกลุ่มทดลอง ทดสอบโดยใช้วิธีของ Duncan's Multiple Range Test



ภาพที่ 4 กระบวนการผลิตซูเปอร์ออกไซด์แอนไอออนของปลานิลที่ได้รับอาหารผสมนาโน-เคอร์ซีตินที่ 0, 25, 50 และ 75 มิลลิกรัมต่ออาหาร 1 กิโลกรัมตั้งแต่สัปดาห์ที่ 2 ถึงสัปดาห์ที่ 8 ตัวอักษร a, b และ c แสดงถึงความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$) ระหว่างกลุ่มทดลอง ทดสอบโดยใช้วิธีของ Duncan's Multiple Range Test



ภาพที่ 5 การตายสะสมของปลานิลที่เลี้ยงด้วยอาหารผสมนาโน-เคอร์ซีตินที่ 0, 25, 50 และ 75 มิลลิกรัมต่ออาหาร 1 กิโลกรัม เป็นเวลา 8 สัปดาห์แล้วนำมาทดสอบด้วยเชื้อ *S. agalactiae* ที่ระดับความเข้มข้น 1×10^8 CFU ต่อมิลลิลิตร (LD_{50}) เป็นระยะเวลา 10 วัน

วิจารณ์ผลการวิจัย

ในการเลี้ยงปลานิลนั้น ปลานิลอาจจะประสบกับความเครียดระหว่างการขนส่ง การขนย้าย การคัดขนาดและการเลี้ยง ซึ่งทำให้การเจริญเติบโตและภูมิคุ้มกันของโรคลดลง ในการทดลองครั้งนี้ เมื่อเลี้ยงปลานิลด้วยอาหารผสมนาโน-เคอร์ซีตินเคอร์ซีติน พบว่า ไม่ส่งผลต่อการเจริญเติบโต เช่นเดียวกับการให้อาหารผสมเคอร์ซีตินในไก่เนื้อ (200, 400 และ 600 มิลลิกรัมต่ออาหาร 1 กิโลกรัม นาน 6 สัปดาห์) (Yang *et al.*, 2020) การศึกษาของ Pès *et al.* (2016) พบว่า เคอร์ซีติน 1.5 ถึง 3 กรัมต่ออาหาร 1 กิโลกรัมไม่มีผลต่อค่าโลหิตวิทยา ฮอร์โมนที่เกี่ยวข้องกับการเจริญเติบโตและการสืบพันธุ์ในปลา silver catfish (*Rhamdia quelen*) ($P > 0.05$) ซึ่งแตกต่างจากการทดลองของ Jia *et al.* (2019) ที่ทดลองเลี้ยงปลา Blunt snout bream โดยให้อาหารผสมเคอร์ซีติน 0.8% ต่ออาหาร 1 กิโลกรัม (8 กรัม) ระยะเวลา 4 สัปดาห์ พบว่ามีอัตราการเจริญเติบโต น้ำหนักที่เพิ่มขึ้นและอัตราแลกเนื้อแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ ($P < 0.05$) เมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม ทำนองเดียวกับการวิจัยของ Awad *et al.* (2013) ได้ศึกษาการให้อาหารเสริมเคอร์ซีตินในปลาเทราต์ (*Oncorhynchus mykiss*) พบว่าค่า Antiproteases activity ของปลาเพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$) จะเห็นว่าความแตกต่างของเคอร์ซีตินขึ้นอยู่กับชนิดของสัตว์และปริมาณที่ให้ หากปลาได้รับอาหารผสมเคอร์ซีตินในระดับที่สูงขึ้น 0.5% ถึง 1% ต่ออาหาร 1 กิโลกรัม (5 ถึง 10 กรัม) อาจจะทำให้การเจริญเติบโตดีขึ้น อย่างไรก็ตามในงานทดลองนี้ปลานิลที่ได้รับอาหารผสมนาโน-เคอร์ซีตินสูงสุด 75 มิลลิกรัมต่ออาหาร 1 กิโลกรัมจึงมีอัตราการเจริญเติบโตต่ำกว่ากลุ่มควบคุม ซึ่งในการให้อาหารเสริมผู้เลี้ยงต้องคำนึงถึงต้นทุนการผลิตด้วย

ไลโซไซม์ (lysozyme) เป็นเอนไซม์ที่ผลิตจากเม็ดเลือดขาวกลุ่มนิวโทรฟิล (neutrophils) และแมคโครฟาจ (macrophages) (Schmekel *et al.*, 2013) พบได้ในเมือกและน้ำเลือด เป็นส่วนหนึ่งของระบบภูมิคุ้มกันแบบไม่จำเพาะ (innate immune defense) ของสิ่งมีชีวิต ช่วยในการทำลายผนังเซลล์แบคทีเรีย ช่วยจับเชื้อโรคเพื่อให้เกิดฟาโกไซโตซิส (opsonization) และช่วยในการกระตุ้นระบบคอมพลีเมนต์ (complement system) ในการศึกษาครั้งนี้กลุ่มทดลองที่ได้รับนาโน-เคอร์ซีตินมีค่ากิจกรรมไลโซไซม์เพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญเมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุมตั้งแต่สัปดาห์ที่ 4 จนถึงสิ้นสุดการทดลอง ซึ่งสอดคล้องกับการทดลองของ Awad *et al.* (2013) ศึกษาพบว่ากิจกรรมไลโซไซม์ของปลาเทราต์เพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญในกลุ่มทดลองจากการให้อาหารผสมเคอร์ซีตินเป็นเวลา 14 วันโดยเฉพาะอย่างยิ่งในปลาที่ได้รับปริมาณเคอร์ซีตินสูงสุดจะมีค่ากิจกรรมไลโซไซม์ที่สูง ในทำนองเดียวกันการให้อาหารผสมเคอร์ซีตินปลาเทราต์ที่ระดับ 0.5% และ 1% ต่ออาหาร 1 กิโลกรัม (5 ถึง 10 กรัม) ให้ค่ากิจกรรมไลโซไซม์เพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$) เมื่อเทียบกับชุดควบคุม (Bilen *et al.*, 2011) และในการทดลองของ Yang *et al.* (2020) พบว่าเมื่อให้อาหารผสมเคอร์ซีติน 2 กรัมต่ออาหาร 1 กิโลกรัมในไก่เนื้อทำให้ระบบคอมพลีเมนต์ (complement) C3 เพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$) เมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุมและเพิ่มคอมพลีเมนต์ C4 เมื่อผสมเคอร์ซีติน 6 กรัมต่ออาหาร 1 กิโลกรัม ($P = 0.001$) มีระดับเพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญ ทั้งนี้ในการทดลองของค่ากิจกรรมไลโซไซม์ในสัปดาห์ที่ 6 นั้นเป็นเพราะอุณหภูมิในรอบวันมีความแตกต่างกันสูง (ต่ำสุด 19 องศาเซลเซียส สูงสุด 36 องศาเซลเซียส มีนาคม 2563) ทำให้ปลาเกิดความเครียดสะสม

กลไกการทำลายแบคทีเรียภายในเซลล์ฟาโกไซต์ เรียกว่า เรสไพราทอรีเบิสต์ (respiratory burst) เป็นกลไกการป้องกันโดยธรรมชาติที่สำคัญของปลาที่มีความเกี่ยวข้องกับเซลล์ภูมิคุ้มกันและมีการใช้กันอย่างแพร่หลายเป็นตัวบ่งชี้การวัดภูมิคุ้มกัน ประจุไฟฟ้าลบที่เกิดขึ้นจากปฏิกิริยานี้สามารถวัดได้ผ่านทางชุดทดสอบการลดไนโตรบลูเตตโซเลียม (NBT) (Sookchaiyaporn *et al.*, 2020) ปฏิกิริยาสามารถทำลายเชื้อจุลินทรีย์หลังจากกระบวนการจับกินสิ่งแปลกปลอม (phagocytosis) ผ่านการสร้างอนุมูลออกซิเจน (O_2^\bullet) (Gottfredsen *et al.*, 2013) ในการศึกษาครั้งนี้เมื่อสิ้นสุดการทดลองพบว่ากระบวนการจับกินสิ่งแปลกปลอมของกลุ่มที่ได้รับนาโน-เคอร์ซีติน 50 มิลลิกรัมต่ออาหาร 1 กิโลกรัมมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ ($P < 0.05$) และกระบวนการผลิตซูเปอร์ออกไซด์แอนไอออนพบว่าไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติเมื่อสิ้นสุดการทดลอง ($P > 0.05$) อาจจะกล่าวได้ว่าเคอร์ซีตินไม่ได้มีส่วนช่วยกระตุ้นการทำงานของเซลล์ฟาโกไซต์ จึงทำให้ผลที่แสดงออกมาไม่แตกต่างกันในแต่ละสัปดาห์

การฉีดเชื้อก่อโรคเข้าไปในตัวปลาก็เป็นอีกวิธีหนึ่งที่ใช้เป็นตัวบ่งชี้ความสามารถของระบบภูมิคุ้มกันหลังจากปลาได้รับอาหารเสริมนาโน-เคอร์ซีติน ซึ่งการใช้เชื้อ *Streptococcus agalactiae* มาเป็นตัวทดสอบความต้านทานเชื้อก่อโรคเนื่องจากเป็นเชื้อที่สร้างความเสียหายให้แก่เกษตรกร และมีอัตราการตายของปลาที่รวดเร็วเมื่อมีอุณหภูมิน้ำสูงขึ้น (Mian *et al.*, 2009) การทดลองครั้งนี้ให้เห็นว่าเมื่อปลาได้รับอาหารผสมนาโน-เคอร์ซีติน ทำให้มีอัตราการตายจากเชื้อก่อโรคลดลงเมื่อได้รับปริมาณนาโน-เคอร์ซีตินที่สูงขึ้น เช่นเดียวกับการทดลองของ Awad *et al.* (2013) พบว่าเมื่อปลาเทราต์ได้รับเคอร์ซีตินที่ระดับ 1% (10 กรัมต่ออาหาร 1 กิโลกรัม) ทำให้เชื้อ *A. hydrophila* มีอัตราการเจริญเติบโตลดลงอย่างมีนัยสำคัญ ($P < 0.05$) ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยของ Rattanachaiakunsopon & Phumkhachorn (2007) ได้ใช้สารสกัดจากใบฝรั่งซึ่งมีปริมาณของเคอร์ซีตินที่สูง พบว่าเมื่อทดลองค่า MIC โดยการเติมเคอร์ซีติน 200 ถึง 300 ไมโครกรัมต่ออาหารเลี้ยงเชื้อ 1 มิลลิลิตร ลงไปใน



อาหารเลี้ยงเชื้อ *A. hydrophila*, *A. salmonicida*, *F. columnare*, *L. garvieae*, *S. agalactiae* และ *V. salmonicida* สามารถลดการเจริญเติบโตของเชื้อก่อโรคลงได้ (OD600 nm) และมีการทดลองของ Kumar *et al.* (2016) ยืนยันผลการยับยั้งของเชื้อก่อโรคด้วยการบ่มนาโน-เคอร์ซีตินกับเชื้อ *S. aureus* (7.03 ppm, MIC) เป็นเวลา 3 ชั่วโมงที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียสแล้วนำไปสแกนด้วยกล้อง SEM พบว่าลักษณะของเซลล์ *S. aureus* มีลักษณะฝ่อลง โดยการทำงานของเคอร์ซีตินนั้นคล้ายกับตัวยับยั้งเอนไซม์ DNA gyrase ซึ่งเป็นตัวควบคุมลักษณะรูปร่างของ DNA (Ohemeng *et al.*, 1993) และยับยั้งเอนไซม์ ATPase (Plaper *et al.*, 2003) เคอร์ซีตินยังสามารถซึมผ่านเนื้อเยื่อและยับยั้งการเคลื่อนที่ของเซลล์แบคทีเรีย (Mirzoeva *et al.*, 1997) จึงสามารถกล่าวได้ว่า เมื่อเคอร์ซีตินซึมเข้าไปสู่เนื้อเยื่อจะทำให้แบคทีเรียไม่สามารถคงรูปร่างและทำลายเซลล์ในที่สุด การศึกษาในขั้นตอนนี้เป็นการศึกษาผลของนาโน-เคอร์ซีตินต่อการต้านอนุมูลอิสระ

สรุปผลการวิจัย

จากการทดลองครั้งนี้แสดงให้เห็นว่านาโน-เคอร์ซีตินไม่ได้มีส่วนช่วยในการเจริญเติบโตแต่แนวโน้มของสูตรอาหาร 25 มิลลิกรัมต่ออาหาร 1 กิโลกรัมมีค่าที่ดีกว่าสูตรอื่น ๆ เนื่องจากมีความสัมพันธ์ของค่าการเจริญเติบโต อัตราการเปลี่ยนอาหารเป็นเนื้อ และต่ออาหารที่ปลากินของปลานิล และนาโน-เคอร์ซีตินสามารถช่วยเสริมภูมิคุ้มกันต่อเชื้อ *S. agalactiae* ได้อย่างไรก็ตามสารเคอร์ซีตินมีราคาที่สูง ควรมีการทดลองหาแหล่งที่ให้สารสำคัญเคอร์ซีตินจากสารธรรมชาติเพื่อลดต้นทุนการผลิต

กิตติกรรมประกาศ

คณะผู้จัดทำงานวิจัยนี้ขอขอบคุณ ท่านจากโครงการพัฒนานักวิจัยและงานวิจัยเพื่ออุตสาหกรรม (พวอ.) คณะเทคโนโลยีการประมงและทรัพยากรทางน้ำ มหาวิทยาลัยแม่โจ้ และขอขอบคุณอาจารย์ ดร. ทนงค์ศักดิ์ สัสดีแพง มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลล้านนา ลำปาง

เอกสารอ้างอิง

- Awad, E., Austin, D. & Lyndon, A.R. (2013). Effect of black cumin seed oil (*Nigella sativa*) and nettle extract (Quercetin) on enhancement of immunity in rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum), *Aquaculture*, 388-391, 193-197.
- Bilen, S., Bulut, M., & Bilen, A.M. (2011). Immunostimulant effects of *Cotinus coggyria* on rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Fish & Shellfish Immunology*. 30, 451-455.
- Buchweitz, M., Kroon, P.A., Rich, G.T. & Wilde, P.J. (2016). Quercetin solubilisation in bile salts: A comparison with sodium dodecyl sulphate, *Food Chemistry*, 211, 356-364.



- Chitmanat, C. (2013). Effects of herbal products on fish immunity. *KKU Res. J.*, 18 (2), 257-268. (in Thai)
- Fishery Statistics Analysis and Research Group. (2019). *Statistics Of Freshwater Aquaculture Production 2017* (4). Bangkok: Fisheries Development Policy and Strategy Division. (in Thai)
- Gao, L., Liu, G., Wang, X., Liu, F., Xu, Y. & Ma, J. (2011). Preparation of a chemically stable quercetin formulation using nanosuspension technology. *International Journal of Pharmaceutics*, 404, 231–237.
- Ghiraldelli, L., Martins, M., Adamante, W., & Yamashita, M. (2006). First Record of *Trichodina compacta* Van As and Basson, 1989 (Protozoa: Ciliophora) from Cultured Nile Tilapia in the State of Santa Catarina, Brazil, *International Journal of Zoological Research*, 2(4), 369–375.
- Gottfredsen, R. H., Larsen, U. G, Enghild, J. J & Petersen, S. V. (2013). Hydrogen peroxide induce modifications of human extracellular superoxide dismutase that results in enzyme inhibition, *Redox Biology*, 1(1), 24–31.
- Hien, V. D., Doolgindachbaporna S., & Suksrib, A. (2014). Effects of low molecular weight agar and Lactobacillus plantarum on growth performance, immunity, and disease resistance of basa fish (*Pangasius bocourti*, Sauvage 1880), *Fish & Shellfish Immunology*, 41(2), 340–345.
- Kroanantakul, K. (1999). *Breeding tilapia monosex.*, Bangkok: Inland Fisheries Research and Development Division. (in Thai)
- Kumar, V. D., Verma, P. R. P. & Singh, S. K. (2016). Morphological and *in vitro* antibacterial efficacy of quercetin loaded nanoparticles against food-borne microorganisms, *Food Science and Technology*, 66, 638–650.
- Mian, G. F., Godoy, D. T., Leal, C. A. G., Yuhara, T. Y., Costa, G. M., & Figueiredo, H. C. P. (2009). Aspects of the natural history and virulence of *S. agalactiae* infection in Nile tilapia, *Veterinary microbiology*, 136(1-2), 180–183.



- Mirzoeva, O. K., Grishanin, R. N., & Calder, P. C. (1997). Antimicrobial action of propolis and some of its components: the effect on growth, membrane potential and motility of bacteria. *Microbiological Research*, 152(3), 239–246.
- Ohemeng, K A., Schwender, C. F., Fu, K. P., & Barrett, J. F. (1993). DNA gyrase inhibitory and antibacterial activity of some flavones (1). *Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters*, 3(2), 225–230.
- Pês T. S., Saccol, E.M., Ourique, G.M., Londero, E.P., Gressler, L.T., Golombieski, J.I., Glanzner, W.G., Llesuy, S.F., Gonçalves, P.B.D., Neto, J.R., Baldisserotto, B. & Pavanato, M.A. (2016). Quercetin in the diet of silver catfish: Effects on antioxidant status, blood parameters and pituitary hormone expression. *Aquaculture*, 458(1), 100–106.
- Plaper, A., Golob, M., Hafner, I., Oblak, M., Solmajer, T., & Jerala, R. (2003). Characterization of quercetin binding site on DNA gyrase. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 306(2), 276–536.
- Puangkaew, J., Kiron, V., Somamoto, T., Okamoto, N., Satoh, S., Takeuchi, T. & Watanabe, T. (2004). Nonspecific immune response of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss* Walbaum) in relation to different status of vitamin E and highly unsaturated fatty acids, *Fish & Shellfish Immunology*, 16(1), 25–39.
- Rattanachaikunsopon, P., & Phumkhachorn, P. (2007). Bacteriostatic effect of flavonoids isolated from leaves of *Psidium guajava* on fish pathogens, *Fitoterapia*, 78, 434–436.
- Sassa-deepaeng, T., Pikulkaew, S. & Okonogi, S. (2016). Development of chrysin loaded poloxamer micelles and toxicity evaluation in fish embryos, *Drug Discoveries & Therapeutics*, 10(3), 150–155.
- Secombes, C.J. (1990). Isolation of salmonid macrophages and analysis of their killing ability. In: Stolen JS, Fletcher TC, Anderson DP, Roberson BS, Van WB, Winkel M, Eds, *Techniques in fish immunology*, New Jersey: SOS Publication, 137–152.



- Sookchaiyaporn, N., Srisapome, P., Unajak, S. & Areechon, N. (2020). Efficacy of *Bacillus* spp. isolated from Nile tilapia *Oreochromis niloticus* Linn. on its growth and immunity, and control of pathogenic bacteria, *Fisheries Science*, 86, 353–365.
- Suttana, W. (2013). Anticancer Activities of Flavonoids: Mechanisms of Actions, *Srinagarind Med J*, 28(4), 567-582.
- Woraphatphadung, T. & Opanasopit, P. (2014). Polymeric micelles for drug delivery: Drug loading by physical entrapment and factors affecting its efficiency, *TBPS*, 9(2), 62–73. (in Thai)
- Yang, J. X., Maria, T. C., Zhou, F., Xiao, Wang, M., Mao, Y. J. & Li, Y. (2020). Quercetin improves immune function in Arbor Acre broilers through activation of NF- κ B signaling pathway. *Poultry Science* 99, 906–913.
- 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.