

ผลของไคโตแซนและเลวามิโซลต่อการเจริญเติบโตและภูมิคุ้มกัน ของปลานิล (*Oreochromis niloticus*) ที่เลี้ยงในกระชังบ่อดิน

Effects of Chitosan and Levamisole on Growth and Immune Responses of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) Cage-Cultured in Earthen Pond

นพดล ศุภระกาญจน์*, กฤษณะ เรืองคล้าย และพันธสิทธิ์ โชคสวัสดิการ
สาขาวิชาวิทยาศาสตร์ชีวภาพและสิ่งแวดล้อม คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยทักษิณ วิทยาเขตพัทลุง
ตำบลบ้านพร้าว อำเภอป่าพะยอม จังหวัดพัทลุง 93210

Noppadon Sukrakanchana*, Kritsana Ruangkhlaai and Puntasit Choksawasdikorn
Department of Biological and Environmental Sciences, Faculty of Science, Thaksin University,
Phatthalung Campus, Ban Prao, Pa Payom, Phatthalung 93210

บทคัดย่อ

งานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาผลของการเสริมไคโตแซน (chitosan) และเลวามิโซล (levamisole) ในอาหารต่อการเจริญเติบโต ภูมิคุ้มกันแบบไม่จำเพาะ และความต้านทานโรคของปลานิลที่เลี้ยงในกระชังบ่อดิน โดยให้ปลาทดลองได้รับอาหารผสม chitosan และ levamisole ที่ระดับต่าง ๆ กัน ผลการศึกษาพบว่า การให้อาหารผสม chitosan ที่ระดับ 1 % และ levamisole ที่ระดับ 250 mg/kg อาหาร ต่อเนื่องกันเป็นเวลา 12 สัปดาห์ มีผลในการกระตุ้นการเจริญเติบโต และลดอัตราการแลกเนื้อของปลานิล นอกจากนี้ chitosan และ levamisole ยังมีผลในการกระตุ้นภูมิคุ้มกันแบบไม่จำเพาะ โดยเฉพาะ lysozyme activity และ natural haemolytic complement activity ของปลานิลอย่างมีนัยสำคัญ ซึ่งสัมพันธ์กับอัตราการรอดที่สูงขึ้นเมื่อเปรียบเทียบกับชุดควบคุม หลังการชักนำให้มีการติดเชื้อ *Streptococcus agalactiae* ผลการศึกษานี้ชี้ให้เห็นว่าการเสริม chitosan ที่ระดับ 1 % และ levamisole ที่ระดับ 250 mg/kg ในอาหารมีผลทำให้ปลานิลมีการเจริญเติบโตที่ดีขึ้นและสามารถเพิ่มความต้านทานต่อการติดเชื้อ *Streptococcus agalactiae* ในปลานิล

คำสำคัญ : ไคโตแซน; เลวามิโซล; การเจริญเติบโต; ภูมิคุ้มกัน; ปลานิล

Abstract

This experiment aimed to study the effects of dietary supplementation of chitosan and levamisole on the growth performance, non-specific immune responses and disease resistance of

Nile tilapia in earthen-pond cage culture. Fish were divided into 4 groups before being fed for 12 weeks with unsupplemented commercial diet as the control, 1% of chitosan, 250 mg/kg feed of levamisole and 1 % chitosan plus 250 mg/kg feed of levamisole. Results showed dietary supplementation of chitosan and levamisole enhanced the growth with better feed conversion ratio of all treated fish significantly. Lysozyme and complement activity were significantly enhanced in fish fed with 1 % of chitosan, 250 mg/kg levamisole and 1% chitosan plus 250 mg/kg diet, in correlation with higher survival rate of experimental fish challenged with *Streptococcus agalactiae*, compared to the control. These results suggest that administration of 1 % chitosan or 250 mg/kg feed of levamisole in the diet can enhance growth performance and improve resistance of Nile tilapia to *Streptococcus agalactiae*.

Keywords: chitosan; levamisole; growth performance; immune response; Nile tilapia

1. บทนำ

ปลานิลเป็นหนึ่งในปลาน้ำจืดที่เป็นที่นิยมของผู้บริโภค เป็นปลาที่เจริญเติบโตเร็ว เลี้ยงง่าย และสามารถทนทานต่อสภาพแวดล้อมที่เปลี่ยนแปลงได้เป็นอย่างดี ส่งผลให้การเพาะเลี้ยงปลานิลมีการขยายตัวไปในทุกพื้นที่ของประเทศอย่างรวดเร็ว มีรายงานว่าปลานิลเป็นปลาน้ำจืดจากการเพาะเลี้ยงที่มีปริมาณการผลิตสูงสุดตั้งแต่ปี พ.ศ. 2534 และตั้งแต่ปี พ.ศ. 2546 เป็นต้นมา การเพาะเลี้ยงปลานิลได้มีการขยายตัวอย่างรวดเร็ว และมีแนวโน้มสูงขึ้นเรื่อย ๆ โดยพบว่าในปี พ.ศ. 2551 มีปริมาณผลผลิตปลานิลจากการเพาะเลี้ยงสูงถึง 195,900 ตัน เพิ่มขึ้นจากปี พ.ศ. 2546 ร้อยละ 99 และมีมูลค่าผลผลิตปลานิลสูงถึง 5,770 ล้านบาท โดยเพิ่มขึ้นจากปี พ.ศ. 2546 ถึงร้อยละ 110 [1] ผู้ประกอบการมีการเพิ่มผลผลิตต่อหน่วยพื้นที่ และพัฒนารูปแบบการเลี้ยงเป็นแบบหนาแน่นมากขึ้น ซึ่งการเลี้ยงปลาแบบหนาแน่นมักส่งผลกระทบต่อสภาพแวดล้อมภายในบ่อเลี้ยง และความเครียดของปลา นำไปสู่อุบัติการณ์ของโรคที่มีความรุนแรงมากขึ้น โดยเฉพาะโรค Streptococcosis ซึ่งมีสาเหตุจาก

แบคทีเรีย *Streptococcus agalactiae* เป็นโรคที่มีความรุนแรงและก่อให้เกิดอัตราการตายค่อนข้างสูงในปลานิลที่ติดเชื้อ ส่งผลกระทบต่ออุตสาหกรรมการเพาะเลี้ยงปลานิลในวงกว้าง [2,3] และเมื่อเกิดปัญหาด้านโรค เกษตรกรมักจะใช้ยาปฏิชีวนะในการควบคุมโรค นำไปสู่ปัญหาการตกค้างของยาในเนื้อปลาและการื้อยาของแบคทีเรียตามมา การลดการใช้สารเคมีและยาปฏิชีวนะในการเลี้ยงปลา โดยหันมาใช้วิธีการกระตุ้นเพื่อเสริมสร้างภูมิคุ้มกัน ปลา จึงเป็นอีกแนวทางในการจัดการสุขภาพสัตว์น้ำที่ได้รับการยอมรับ ปัจจุบันมีสารกระตุ้นภูมิคุ้มกันหลายชนิดที่มีประสิทธิภาพสูงและมีการประยุกต์ใช้ในการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำ ทั้งที่เป็นสารธรรมชาติและสารสังเคราะห์ อาทิ levamisole, β -glucan, peptidoglycan, chitin, chitosan, vitamin อย่างไรก็ตาม การใช้สารกระตุ้นภูมิคุ้มกันแต่ละชนิดจำเป็นต้องมีการศึกษาถึงประสิทธิภาพ กลไกการออกฤทธิ์ และปริมาณที่เหมาะสมกับสัตว์น้ำแต่ละชนิดด้วย งานวิจัยนี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาผลของไคโตแซน (chitosan) และเลวามิโซล (levamisole) ที่ผสมในอาหารต่อการ

เจริญเติบโต ภูมิคุ้มกันแบบไม่จำเพาะ และความต้านทานต่อโรค Streptococcosis ในปลานิลที่เลี้ยงในกระชังบ่อดิน

โคโตแซนเป็นโพลิเมอร์ธรรมชาติ (linear polysaccharide) ซึ่งประกอบด้วย β -(1-4)-linked D-glucosamine และ N-acetyl-D-glucosamine ซึ่งเป็นผลผลิตที่เกิดจากกระบวนการ deacetylation ของไคติน (chitin) โดยไคตินเป็นสารประกอบที่พบได้ทั่วไปในเปลือกกุ้ง กระดองปู เปลือกแมลง และรา โคโตแซนเป็นผลิตภัณฑ์ที่มีการผลิตเพื่อการค้าและมีการนำมาประยุกต์ใช้อย่างหลากหลาย ทั้งในทางการแพทย์ เกษตรกรรม และอุตสาหกรรม รวมถึงมีการนำ chitosan มาประยุกต์ใช้ในการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำ โดยเฉพาะการใช้เป็นสารกระตุ้นภูมิคุ้มกันในปลาหลายชนิด [4]

เลวามิโซลเป็นสารสังเคราะห์ชนิด phenylimidazolthiazole {(S)-6-Phenyl-2,3,5,6-tetrahydroimidazo[2,1-b][1,3]thiazole} ภายใต้ชื่อทางการค้า Ergamisol (R12564) มีฤทธิ์ในการทำลายพยาธิตัวกลม โดยมีการนำมาใช้เป็นยาถ่ายพยาธิในกระเพาะอาหารลำไส้และปอดอย่างกว้างขวาง ทั้งในคนและในวงการสัตวแพทย์ ตั้งแต่ปี ค.ศ. 1965 [5] โดยมีฤทธิ์ในการขัดขวางการทำงานของสารสื่อประสาทของพยาธิ มีรายงานพบ levamisole เป็นยาชนิดแรกที่มีสมบัติในการกระตุ้นการตอบสนองของเซลล์แมคโครฟาจ (macrophage) และ T-lymphocyte ของสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนมทั้งในสภาวะปกติ [6] และในภาวะที่ร่างกายมีภูมิคุ้มกันต่ำ [7] จึงมีการนำ levamisole มาประยุกต์เป็นสารกระตุ้นภูมิคุ้มกันในสัตว์น้ำ โดยเฉพาะในปลา ซึ่งพบว่า levamisole มีศักยภาพสูงในการนำมาใช้เป็นสารกระตุ้นภูมิคุ้มกันในปลา โดยเฉพาะการกระตุ้นการทำงานของ T-lymphocyte และกระบวนการ phagocytosis [8,9]

2. อุปกรณ์และวิธีการ

2.1 สัตว์ทดลองและการวางแผนการทดลอง

วางแผนการทดลองแบบสุ่มสมบูรณ์ (completely randomized design, CRD) โดยนำปลานิลเทศผู้ (*Oreochromis niloticus*) น้ำหนักตัวเริ่มต้นประมาณ 10 กรัม ซึ่งได้จากการเพาะพันธุ์จากฟาร์มในจังหวัดพัทลุง มาปล่อยลงเลี้ยงในกระชังขนาด $3 \times 4 \times 2$ เมตร ในบ่อดิน กระชังละ 100 ตัว จำนวน 12 กระชัง ให้อาหารปกติ (basal diet) ซึ่งเป็นอาหารสำหรับปลากินพืชซึ่งผลิตขึ้นเอง โดยมีระดับโปรตีนไขมัน ความชื้น และเถ้า 30, 12, 7 และ 14 % ตามลำดับ เป็นเวลา 2 สัปดาห์ เพื่อให้ปลาคุ่นเคยกับสภาพการเลี้ยงในกระชัง หลังจากนั้นเริ่มให้อาหารซึ่งเป็นอาหารสูตรเดียวกับ basal diet ที่ผสม chitosan (commercial food grade) และ Levamisole hydrochloride (Sigma, USA) ที่ระดับต่าง ๆ โดยแบ่งการทดลองออกเป็น 4 ชุดการทดลอง ชุดการทดลองละ 3 ซ้ำ ประกอบด้วย ชุดที่ 1 (T1) เป็นชุดควบคุมให้อาหารปกติ (basal diet) ชุดที่ 2 (T2) ให้อาหารผสม chitosan ที่ระดับ 1 % ชุดที่ 3 (T3) ให้อาหารผสม levamisole ที่ระดับ 250 mg/kg ชุดที่ 4 (T4) ให้อาหารผสม chitosan 1 % ร่วมกับ levamisole 250 mg/kg

ให้อาหารปลารวันละ 2 ครั้ง ปริมาณ 3-5 % ของน้ำหนักตัวต่อวัน และเก็บข้อมูลปริมาณอาหารที่ปลากินต่อเนื่องเป็นเวลา 12 สัปดาห์ เมื่อครบกำหนดนำปลาทดลองมาชั่งน้ำหนัก วิเคราะห์การเจริญเติบโตและอัตราการรอด แล้วสุ่มเก็บตัวอย่างปลาแต่ละซ้ำในแต่ละชุดการทดลอง จำนวน 30 ตัว เพื่อตรวจวิเคราะห์ค่าปัจจัยภูมิคุ้มกันแบบไม่จำเพาะ และนำปลาจากแต่ละซ้ำในแต่ละชุดการทดลอง จำนวน 30 ตัว มาทดสอบความต้านทานโรค โดยชักนำให้มีการติดเชื้อ *Streptococcus agalactiae* โดยวิธีการแช่

2.2 การวิเคราะห์การเจริญเติบโต

วัดค่าอัตราการเจริญเติบโตของปลาในแต่ละชุดการทดลอง ซึ่งประกอบด้วยน้ำหนักเริ่มต้น (initial weight, g) น้ำหนักสุดท้าย (final weight, g) อัตราการเจริญเติบโตจำเพาะ (specific growth rate, SGR, % day⁻¹) อัตราการแลกเนื้อ (feed conversion ratio, FCR) และอัตราการรอด (survival rate, %)

2.3 การวิเคราะห์ภูมิคุ้มกันแบบไม่จำเพาะ

นำปลาจากแต่ละชุดการทดลองมาสลับด้วยสารละลาย ethyl 3-aminobenzoate methane sulfonate หรือ MS-222 (Sigma-Aldrich) ความเข้มข้น 100 ppm ชั่งน้ำหนัก แล้วเก็บเลือดปลาตัวละประมาณ 0.5 มิลลิลิตร (น้ำหนักปลาหลังสิ้นสุดการทดลองอยู่ระหว่าง 70-100 กรัมต่อตัว) โดยใช้เข็มขนาด 25G และหลอดฉีดยาปริมาตร 1 มิลลิลิตร ซึ่งหล่อภายในด้วยเฮพาริน (5 mg/mL) เพื่อป้องกันเลือดแข็งตัว โดยเจาะจากเส้นเลือดบริเวณโคนหางของปลา แล้วนำเลือดไปวิเคราะห์ nitroblue tetrazolium assay (NBT reduction) ทันที ส่วนเลือดที่เหลือทิ้งไว้ให้แข็งตัว แล้วนำไปหมุนเหวี่ยงที่ความเร็ว 3,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส แยกส่วนของน้ำเลือดเก็บไว้ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส สำหรับวิเคราะห์ lysozyme activity และ natural haemolytic complement activity ต่อไป

2.3.1 nitroblue tetrazolium assay (NBT reduction)

NBT reduction เป็นวิธีการตรวจวัดผลผลิตจากการหายใจระดับเซลล์ของเซลล์เม็ดเลือดขาว (respiratory burst of phagocytic cell) การวิเคราะห์ NBT reduction ใช้วิธีการของ Secombes [10] และ Stasiak และ Bauman [11] โดยใช้เลือดปริมาตร 50 ไมโครลิตร เติมนลงในหลุมของ microtitre plate ซึ่งมีสารป้องกันการแข็งตัวของเลือด (acid

citrate dextrose, ACD) ปริมาตร 30 ไมโครลิตร บรรจุอยู่แล้ว ทิ้งไว้ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง เพื่อให้เซลล์เม็ดเลือดเกาะกับพื้นผิวกันหลุม ดูดสารละลายส่วนใส่ทิ้ง ล้างเซลล์ด้วย phosphate buffer saline (PBS, pH 7.2) เติมน 0.2 % NBT ปริมาตร 50 ไมโครลิตร บ่มไว้ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง จากนั้นตรึง (fix) เซลล์เม็ดเลือดโดยการเติมสารละลาย 100 % methanol ลงไป ทิ้งไว้ 2-3 นาที แล้วล้างด้วย 70 % methanol ทิ้งไว้ให้แห้ง จากนั้นเติมสารละลาย 2N KOH ปริมาตร 60 ไมโครลิตร และ dimethyl sulfoxide (DMSO) ปริมาตร 70 ไมโครลิตร ลงในแต่ละหลุม เพื่อละลาย formazan วัดค่าดูดกลืนแสงของสารละลายสีฟ้าที่ความยาวคลื่น 630 นาโนเมตร ด้วย ELISA reader

2.3.2 lysozyme activity assay

lysozyme activity assay เป็นการวัดความว่องไวของปฏิกิริยาของ lysozyme ในน้ำเลือดในการทำลายผนังเซลล์แบคทีเรียแกรมบวก ตามวิธีการซึ่งดัดแปลงจากวิธีของ Parry และคณะ (1965) [12] โดยเตรียมสารละลายเชื้อ *Micrococcus lysodeikticus* (Sigma) ความเข้มข้น 0.2 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ในสารละลาย sodium phosphate buffer, pH 6 เติมน้ำเลือดของปลาลงใน microtitre plate ปริมาตรหลุมละ 10 ไมโครลิตร จากนั้นจึงเติมสารละลายเชื้อ *Micrococcus lysodeikticus* ปริมาตร 250 ไมโครลิตร ลงในแต่ละหลุม ตรวจสอบการเกิดปฏิกิริยาโดยวัดค่าดูดกลืนแสงที่ลดลงที่ความยาวคลื่น 540 นาโนเมตร โดยใช้ ELISA reader หลังจากบ่มที่อุณหภูมิห้องภายในเวลา 0.5 ถึง 6.5 นาที คำนวณหน่วยของ lysozyme activity โดยหนึ่งหน่วยของปฏิกิริยา คือ ปริมาณของเอนไซม์ที่ทำให้ค่าดูดกลืนแสงลดลง 0.001 ต่อนาที

2.3.3 natural haemolytic complement activity

natural haemolytic complement activity เป็นการวิเคราะห์กิจกรรมของโปรตีน complement ในน้ำเลือด (alternative complement pathway) ในการย่อยสลายเซลล์เม็ดเลือดแดงของไก่ (chicken red blood cells, ChRBC) ตามวิธีการของ Ortuno และคณะ (1998) [13] โดยเจือจางซีรัมตัวอย่างลงทีละ 2 เท่า ด้วยสารละลาย PBS เริ่มต้นด้วยการเติมซีรัมที่ไม่ได้เจือจางปริมาณ 100 ไมโครลิตร ลงในหลุมแรกของ microtitre plate แล้วตามด้วยการเติมซีรัมปริมาณ 100 ไมโครลิตร ลงในหลุมที่มี PBS ปริมาตร 100 ไมโครลิตร เติมน้ำ 3 % ChRBC ปริมาตร 100 ไมโครลิตร ลงในแต่ละหลุม ซึ่งจะทำให้ซีรัมในแต่ละหลุมมีความเข้มข้นสุดท้ายเท่ากับ 50, 25, 12.5, 6.25, 3.125, 1.5625 และ 0.78125 % ตามลำดับ บ่มไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 1 ชั่วโมง จากนั้นนำ microtiter plate มาหมุนเหวี่ยงด้วยความเร็ว 500 x g ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที เพื่อให้เซลล์เม็ดเลือดแดงตกตะกอน ดูดสารละลายส่วนใสในแต่ละหลุมออก นำมาเติมลงใน microtiter plate อันใหม่ หาปริมาณฮีโมโกลบินในสารละลายส่วนใสซึ่งเกิดจากการแตกของเซลล์เม็ดเลือดแดงโดยวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 540 นาโนเมตร

ค่าการแตกตัวของเม็ดเลือดแดงสูงสุดวัดได้จากการเติมน้ำกลั่นปริมาณ 100 ไมโครลิตร ลงไปในหลุมที่มี ChRBC 100 ไมโครลิตร จากนั้นสร้างกราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างเปอร์เซ็นต์การแตกตัวของเม็ดเลือดแดง (เปรียบเทียบกับค่าการแตกตัวของเม็ดเลือดแดงสูงสุด) กับส่วนกลับของสัดส่วนการเจือจางซีรัมโดยใช้สเกล Log10 - Log10 เพื่อหาสัดส่วนการเจือจางของซีรัมที่สามารถทำให้เม็ดเลือดแดงแตก 50 เปอร์เซ็นต์ (alternative complement pathway

hemolytic activity, ACH₅₀)

2.4 การทดสอบความต้านทานโรค

สุ่มปลาทดลองแต่ละซ้าในแต่ละชุดการทดลอง จำนวน 30 ตัว จากกระชัง มาทดสอบความต้านทานโรคโดยการชักนำให้เกิดการติดเชื้อแบคทีเรีย *Streptococcus agalactiae* โดยวิธีการแช่เชื้อภายใต้สภาพการเลี้ยงแบบหนาแน่นในตู้กระจกซึ่งมีปริมาตรน้ำ 30 ลิตร (ตู้ละ 10 ตัว) โดยใช้เชื้อ *Streptococcus agalactiae* บริสุทธิ์ที่แยกได้จากปลาไนซึ่งเลี้ยงบนอาหาร tryptic soy agar (TSA) เป็นเวลา 24 ชั่วโมง มาเตรียมเป็นสารละลายเชื้อด้วยน้ำเกลือ (0.85 % NaCl) ให้มีระดับความเข้มข้นของเชื้อประมาณ 10⁸ CFU/mL โดยเทียบความขุ่นของสารละลายเชื้อกับ McFarland standard No. 0.5 เติมน้ำเกลือเชื้อลงในตู้ปลาครั้งเดียว แล้วบันทึกอัตราการตายของปลาทดลองหลังจากการชักนำให้มีการติดเชื้อภายในเวลา 10 วัน ยืนยันการติดเชื้อ *Streptococcus agalactiae* ของปลาที่ตายโดยการแยกเชื้อจากสมองเพาะเลี้ยงบนอาหาร TSA สังเกตลักษณะของโคโลนีสีขาวขนาดเล็กที่เจริญบนอาหาร

2.5 การวิเคราะห์ทางสถิติ

การวิเคราะห์ความแปรปรวนของค่าเฉลี่ยของค่าการเจริญเติบโต อัตราการรอด ปัจจัยด้านภูมิคุ้มกันแบบไม่จำเพาะ และความต้านทานโรคของปลาในแต่ละชุดการทดลอง โดยใช้การวิเคราะห์ความแปรปรวนทางเดียว (one way analysis of variance, ANOVA) และเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยด้วยวิธี Duncan's new multiple range test (MRT) ที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 (p<0.05)

3. ผลการวิจัย

การทดลองเลี้ยงปลาไนในกระชังบ่อดินด้วยอาหารที่มีระดับโปรตีน 30 % ซึ่งผสม chitosan และ

levamisole ที่ระดับต่าง ๆ เป็นเวลา 12 สัปดาห์ พบว่าปลานิลกลุ่มที่ได้รับอาหารผสม chitosan ที่ระดับ 1 % (T2) levamisole ที่ระดับ 250 mg/kg อาหาร (T3) และ chitosan ร่วมกับ levamisole (T4) มีอัตราการเจริญเติบโตจำเพาะ (specific growth rate) (เปอร์เซ็นต์ต่อวัน) สูงกว่ากลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญ ในขณะที่ไม่มีความแตกต่างของอัตราการเจริญเติบโตจำเพาะภายในกลุ่มปลานิลที่ได้รับอาหารผสม chitosan และ levamisole (T2, T3 และ T4) และปลาในชุดการทดลอง T2, T3 และ T4 มีอัตราการ

แลกเนื้อ (FCR) ต่ำกว่าชุดควบคุมอย่างมีนัยสำคัญ ซึ่งบ่งชี้ประสิทธิภาพในการใช้อาหารที่สูงกว่าของปลานิลกลุ่มที่ได้รับอาหารผสม chitosan และ levamisole เมื่อเปรียบเทียบกับชุดควบคุม อย่างไรก็ตาม พบว่าปลานิลในทุกชุดการทดลองมีอัตราการรอดตลอดการทดลองไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ (อัตราการรอดอยู่ระหว่างร้อยละ 75.33-80.67) โดยอัตราการเจริญเติบโตจำเพาะ อัตราการแลกเนื้อ และอัตราการรอดของปลาทดลองแสดงไว้ในตารางที่ 1

ตารางที่ 1 ค่าเฉลี่ยอัตราการเจริญเติบโตจำเพาะ (specific growth rate) อัตราการแลกเนื้อ (FCR) และอัตราการรอด (survival rate) ของปลานิลที่ได้รับอาหารทดลองเป็นเวลา 12 สัปดาห์

Treatment	Specific growth rate (% day ⁻¹)	FCR	Survival rate (%)
T1	2.66±0.10 ^a	1.66±0.14 ^a	75.33±1.15 ^a
T2	2.98±0.05 ^b	1.27±0.04 ^b	79.33±5.77 ^a
T3	2.96±0.06 ^b	1.31±0.06 ^b	76.66±5.03 ^a
T4	2.84±0.03 ^b	1.41±0.06 ^b	80.67±6.43 ^a

Values (mean±S.D.) followed by the different letters in the same column indicate significant differences at $p < 0.05$

เมื่อสิ้นสุดการทดลองให้อาหาร เป็นเวลา 12 สัปดาห์ เมื่อวิเคราะห์ภูมิคุ้มกันแบบไม่จำเพาะของปลาทดลองที่ได้รับอาหารผสม chitosan และ levamisole ที่ระดับต่าง ๆ กัน พบว่าปลานิลกลุ่มที่ได้รับอาหารผสม chitosan ที่ระดับ 1 % (T2) กลุ่มที่ได้รับ levamisole ที่ระดับ 250 mg/kg (T3) และกลุ่มที่ได้รับ chitosan 1 % ร่วมกับ levamisole 250 mg/kg (T4) มีค่า lysozyme activity ซึ่งเป็นค่าความว่องไวของปฏิกิริยาของ lysozyme ในน้ำเลือดในการทำลายผนังเซลล์แบคทีเรีย และค่ากิจกรรมของโปรตีน complement ในน้ำเลือด (alternative comple-

ment activity) ในการย่อยสลายเซลล์เม็ดเลือดแดง (ACH₅₀) สูงขึ้นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบกับปลาในชุดควบคุม ในขณะที่ไม่มีความแตกต่างของ lysozyme activity และ complement activity ภายในกลุ่มปลานิลที่ได้รับอาหารผสม chitosan และ levamisole (T2, T3 และ T4) นอกจากนี้ยังพบว่าทั้ง chitosan และ levamisole ไม่มีผลต่อการกระตุ้นการหายใจระดับเซลล์ของเซลล์เม็ดเลือดขาว (respiratory burst of phagocytic cell) ของปลานิล สังเกตจากค่า NBT reduction (ค่าการดูดกลืนแสงที่ 630 นาโนเมตร) ที่ไม่แตกต่างกันในแต่ละชุดการทดลอง (ตารางที่ 2)

ตารางที่ 2 ค่าเฉลี่ยของปัจจัยทางภูมิคุ้มกันแบบไม่จำเพาะ (NBT reduction, lysozyme activity และ natural haemolytic complement activity) ของปลานิลที่ได้รับอาหารทดลองเป็นเวลา 12 สัปดาห์

Treatment	NBT reduction (OD ₆₃₀)	Lysozyme activity (units)	Natural haemolytic complement activity (ACH ₅₀)
T1	0.39±0.03 ^a	1.45±0.31 ^a	0.580±0.062 ^a
T2	0.38±0.01 ^a	2.85±0.25 ^b	2.287±0.173 ^b
T3	0.39±0.02 ^a	2.46±0.99 ^b	3.176±0.662 ^b
T4	0.38±0.01 ^a	2.56±0.50 ^b	2.637±0.468 ^b

Values (mean±S.D.) followed by the different letters in the same column indicate significant differences at $p < 0.05$

ตารางที่ 3 อัตราการรอด (survival rate) ของปลาทดลองหลังได้รับการชักนำให้เกิดการติดเชื้อ *Streptococcus agalactiae* โดยวิธีการแช่เป็นเวลา 10 วัน

Treatment	Survival rate after bacterial challenge (%)
T1	58.06±3.73 ^a
T2	97.72±4.37 ^b
T3	97.77±5.18 ^b
T4	95.23±5.42 ^b

Values (mean±S.D.) followed by the different letters in the same column indicate significant differences at $p < 0.05$

เมื่อนำปลาทดลองในแต่ละชุดการทดลองจำนวน 30 ตัว มาทดสอบความต้านทานโรคด้วยการแช่ในสารละลายเชื้อ *Streptococcus agalactiae* ที่ระดับความเข้มข้น 10^8 CFU/mL เป็นเวลา 10 วัน ผลการทดลองพบว่าปลานิลที่ได้รับอาหารผสม chitosan และ levamisole ทุกชุดการทดลองมีอัตราการรอดจากการชักนำให้เกิดการติดเชื้อสูงกว่าอย่างมีนัยสำคัญ

(อัตราการรอดอยู่ระหว่าง 95.23-97.77 %) เมื่อเปรียบเทียบกับปลาในชุดควบคุม ซึ่งมีอัตราการรอดเพียง 58.06 % (ตารางที่ 3)

4. วิจัยารณ์

การศึกษาผลของการเสริม chitosan และ levamisole ในอาหารต่อการเจริญเติบโต ผลการทดลองชี้ให้เห็นว่าปลานิลที่ได้รับอาหารผสม chitosan ที่ระดับ 1 % และ levamisole ที่ระดับ 250 mg/kg อาหาร มีอัตราการเจริญเติบโต (specific growth rate, SGR) สูง และมีอัตราการแลกเนื้อ (FCR) ต่ำเมื่อเปรียบเทียบกับปลาในกลุ่มควบคุม แม้ว่าอัตราการเจริญเติบโต และอัตราการแลกเนื้อของปลาในกลุ่มที่ได้รับ chitosan ร่วมกับ levamisole (T4) จะไม่แตกต่างจากกลุ่มที่ได้รับ chitosan หรือ levamisole อย่างใดอย่างหนึ่ง ทั้งนี้มีความเป็นไปได้ว่าทั้ง chitosan และ levamisole ในอาหารสามารถกระตุ้นการหลั่งเอนไซม์ที่เกี่ยวข้องกับการย่อยอาหาร (digestive enzyme) ส่งผลต่อประสิทธิภาพการใช้อาหารของปลา และนำไปสู่อัตราการเจริญเติบโตที่ดีขึ้น โดยมีรายงานการทดลองในปลา Mrigal carp (*Cirrhinus mrigala*) ยืนยันว่าปลาทดลองที่ได้รับ

อาหารผสม levamisole ในอัตรา 250 mg/kg เป็นเวลา 60 วัน มีอัตราการเจริญเติบโต อัตราการแลกเนื้อ และความสามารถในการย่อยโปรตีน (apparent protein digestibility) สูงขึ้น สัมพันธ์กับอัตราการเพิ่มขึ้นของกิจกรรมของเอนไซม์ในทางเดินอาหาร (intestinal enzyme activities) [14] สอดคล้องกับรายงานการศึกษาในปลา tiger puffer (*Takifugu rubripes*) ที่พบว่าปลาทดลองที่ได้รับอาหารผสม chitosan oligosaccharides (COS) ที่ระดับ 0.05, 0.1 และ 0.2 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 8 สัปดาห์ มีอัตราการเจริญเติบโต intestinal-somatic index (VSI) สูงขึ้น สัมพันธ์กับกิจกรรมของเอนไซม์ protease และ lipase ในทางเดินอาหาร [15] นอกจากนี้ยังมีรายงานการศึกษาในสัตว์มีกระดูกสันหลังอื่น ๆ ที่ชี้ให้เห็นความสัมพันธ์ระหว่างการเจริญเติบโตและประสิทธิภาพในการย่อยอาหารที่เป็นผลจากการกระตุ้นโดย chitosan อาทิ ในนก Red-billed leiothrix (*Leiothrix lutea*) พบว่า chitosan ที่ผสมในอาหารที่ระดับ 0.5 % มีผลต่อการกระตุ้นการทำงานของเอนไซม์ trypsin และ chymotrypsin ในทางเดินอาหาร และเพิ่มอัตราการสลายสารอาหาร (metabolic rate) [16] สอดคล้องกับรายงานการศึกษาที่พบว่าลูกสุกรหย่านม (weaned pig) อายุ 35 วัน ที่ได้รับอาหารผสม chitosan ที่ระดับ 100, 500, 1,000 และ 2,000 mg/kg อาหาร มีอัตราการเจริญเติบโต (average day growth) สูงขึ้นตามระดับความเข้มข้นของ chitosan สัมพันธ์กับประสิทธิภาพการย่อยสารอาหารหลัก ได้แก่ dry matter, crude protein, แคลเซียม และฟอสฟอรัส และกิจกรรมของเอนไซม์ amylase บริเวณ jejunum ของลำไส้เล็กที่สูงขึ้น [17] อย่างไรก็ตาม ในการทดลองครั้งนี้พบว่าปลานิลที่ได้รับอาหารผสม chitosan และ levamisole มีอัตราการรอดตลอดระยะเวลา 12 สัปดาห์ ของการทดลองอยู่ระหว่าง 76.66-80.67 %

ซึ่งไม่แตกต่างจากกลุ่มควบคุม (75.33 %)

โดยทั่วไป oxygen radical ในสัตว์จะมีบทบาทในการทำลายเซลล์แบคทีเรีย และความสามารถของเซลล์ macrophage ในการทำลายเซลล์สิ่งแปลกปลอมเป็นหนึ่งในกลไกสำคัญในการป้องกันการติดเชื้อก่อโรคในปลา [18] อย่างไรก็ตาม ผลการทดลองนี้พบว่า NBT reduction ของปลานิลที่ได้รับอาหารผสม chitosan หรือ levamisole มีค่าไม่แตกต่างจากปลาในกลุ่มควบคุม จึงมีความเป็นไปได้ว่าทั้ง chitosan และ levamisole ไม่มีผลต่อการกระตุ้น neutrophil หรือ macrophage ของปลาทดลอง แต่จากการทดลองของ Kumari และ Sahoo [19] พบว่าปลาตุ๊กตาด่าน (*Clarias batrachus*) ที่ได้รับอาหารผสม levamisole มีค่า respiratory burst (NBT) activity สูงกว่ากลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญ นอกจากนี้จากการทดลองในปลาไน (*Cyprinus carpio*) พบว่า respiratory burst activity ของ phagocytic cell วัดจากการลดลงของ NBT (NBT reduction) โดย intracellular superoxide radicals ที่ผลิตจากเซลล์เม็ดเลือดขาวจะสัมพันธ์กับระดับของ levamisole ที่เพิ่มขึ้นในอาหาร และสูงสุดที่อาหารผสม levamisole ที่ระดับ 5 % [18]

ผลการทดลองชี้ให้เห็นว่าปลานิลที่ได้รับอาหารผสม chitosan 1 % หรือ levamisole ที่ระดับ 250 mg/kg มีระดับของ lysozyme activity สูงขึ้นเมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม ซึ่งสัมพันธ์กับอัตราการรอดที่สูงขึ้นของปลานิลหลังจากถูกชักนำให้ติดเชื้อ *Streptococcus agalactiae* สอดคล้องกับรายงานที่พบว่าความสามารถในการต้านทานต่อการติดเชื้อจากแบคทีเรียที่สูงขึ้นของปลา Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) จะสัมพันธ์กับระดับของ lysozyme ในน้ำเลือด phagocytic activity, bactericidal activity ของเม็ดเลือดขาวบริเวณไตส่วนหน้า [20] นอกจากนี้

Cha และคณะ [21] ยังพบว่า lysozyme activity ในเมือกที่ผิวหนังของปลา Olive flounder (*Paralichthys olivaceus*) ที่ได้รับอาหารเคลือบ chitosan ที่ระดับ 1 % มีค่าสูงกว่าอย่างมีนัยสำคัญเมื่อเปรียบเทียบกับปลากลุ่มที่ไม่ได้รับอาหารเคลือบ chitosan และ chitosan ในอาหารยังส่งผลต่อการกระตุ้น respiratory burst activity, myeloperoxidase, lysozyme และค่าดัชนีอื่น ๆ ในน้ำเลือดอีกด้วย โดยเฉพาะฮิโมโกลบิน unsaturated fatty acid (HDL) และ saturated fatty acid (LDL) ซึ่งองค์ประกอบเหล่านี้เป็นดัชนีบ่งชี้สุขภาพของปลาที่สำคัญ สอดคล้องกับการทดลองในปลานิล (*Oreochromis niloticus*) ในประเทศอียิปต์ที่พบว่าปลาที่ได้รับอาหารผสม levamisole ที่ระดับ 225 mg/kg อาหาร เป็นเวลา 3 สัปดาห์ มีระดับความเข้มข้นของ lysozyme ในน้ำเลือด และอัตราการรอดจากการชักนำให้ติดเชื้อ *Aeromonas hydrophila* โดยวิธีการฉีดเข้าช่องท้อง สูงขึ้นเมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม [22] และในทำนองเดียวกัน ปลานิล (*Cyprinus carpio*) ที่ได้รับอาหารผสม chitosan ที่ระดับ 1 % และ levamisole ที่ระดับ 250 mg/kg อาหาร เป็นเวลา 45 และ 90 วัน จะมีอัตราการรอดเพิ่มสูงขึ้นหลังจากการชักนำให้ติดเชื้อ *Aeromonas hydrophila* ซึ่งเป็นผลจากการกระตุ้นภูมิคุ้มกันแบบไม่จำเพาะของ chitosan และ levamisole [23]

ผลการทดลองพบว่าค่ากิจกรรมของโปรตีน complement ในน้ำเลือด ในการย่อยสลายเซลล์เม็ดเลือดแดงของปลาที่ได้รับ chitosan และ levamisole มีค่าสูงขึ้นอย่างมีนัยสำคัญ เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม บ่งชี้ถึงความสามารถของ chitosan และ levamisole ในการกระตุ้นการหลั่งสารน้ำของเซลล์เม็ดเลือดขาว โปรตีน complement ในน้ำเลือดปลาเป็นองค์ประกอบสำคัญในระบบภูมิคุ้มกันแบบไม่

จำเพาะของปลา มีบทบาทในการทำลายเซลล์สิ่งแปลกปลอม และเป็นสาร opsonin ซึ่งจะไปจับกับเซลล์สิ่งแปลกปลอมก่อนที่จะถูกทำลายโดย phagocytic cells การเพิ่มขึ้นของค่า complement haemolytic activity ในน้ำเลือดปลาที่ได้รับอาหารผสม chitosan และ levamisole จึงสัมพันธ์กับอัตราการรอดของปลาทดลองหลังจากถูกชักนำให้ติดเชื้อ *Streptococcus agalactiae* ด้วย

มีรายงานพบว่าการผสม chitosan ในอาหารร่วมกับสารชนิดอื่นให้ผลในการกระตุ้นการเจริญเติบโต ภูมิคุ้มกันแบบไม่จำเพาะ และอัตราการรอดจากการชักนำให้ติดเชื้อจากแบคทีเรียในปลาบางชนิดได้ดีกว่าการใช้ chitosan เพียงอย่างเดียว โดยพบว่าปลา cobia (*Rachycentron canadum*) ที่ได้รับอาหารผสมโปรไบโอติก (*Bacillus subtilis*) ที่ระดับ 1.0 กรัมต่อกิโลกรัมอาหาร ร่วมกับ chitosan ที่ระดับ 6.0 กรัมต่อกิโลกรัมอาหาร เป็นเวลา 8 สัปดาห์ จะมีอัตราการเจริญเติบโต ภูมิคุ้มกันแบบไม่จำเพาะ (phagocytic activity และ respiratory burst activity) และอัตราการรอดจากการติดเชื้อ *Vibrio harveyi* เพิ่มสูงขึ้นเมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม และกลุ่มที่ได้รับ *Bacillus subtilis* หรือ chitosan อย่างใดอย่างหนึ่ง [24] อย่างไรก็ตาม ผลจากการทดลองครั้งนี้ไม่พบการเสริมฤทธิ์กัน (synergistic effect) ระหว่าง chitosan และ levamisole

5. สรุป

ผลจากการทดลองบ่งชี้ว่า chitosan ที่ผสมในอาหารที่ระดับ 1 % และ levamisole ที่ผสมในอาหารที่ระดับ 250 mg/kg มีผลในการกระตุ้นการเจริญเติบโตและภูมิคุ้มกันแบบไม่จำเพาะของปลานิลที่เลี้ยงในกระชังบ่อดินได้ อีกทั้ง chitosan และ levamisole สามารถเป็นสารกระตุ้นภูมิคุ้มกันที่มีประสิทธิภาพทั้ง

ในด้านการกระตุ้นภูมิคุ้มกันแบบไม่จำเพาะ ซึ่งนำไปสู่การเพิ่มความต้านทานโรคของปลานิลและกระตุ้นการเจริญเติบโตด้วย ผลจากการวิจัยนี้จะเป็นข้อมูลพื้นฐานสำคัญในการประยุกต์ใช้สารกระตุ้นภูมิคุ้มกันในการเลี้ยงปลานิลในกระชังอย่างเหมาะสม อันจะนำไปสู่การเพิ่มผลผลิตของการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำจืด และลดการพึ่งพายาปฏิชีวนะและสารเคมีในการจัดการสุขภาพสัตว์น้ำ

6. กิตติกรรมประกาศ

งานวิจัยนี้ได้รับการสนับสนุนทุนวิจัยจากงบประมาณเงินรายได้มหาวิทยาลัยทักษิณ ขอขอบคุณอาจารย์ ดร. นเรศ ช้วนยุค คณะทรัพยากรธรรมชาติ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ อาจารย์ วันวิภา หนูมา คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยราชภัฏสงขลา และนิสิตสาขาวิทยาศาสตร์การเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำ มหาวิทยาลัยทักษิณ ที่ได้มีส่วนสนับสนุนและช่วยเหลือให้งานวิจัยนี้ประสบความสำเร็จ และบรรลุวัตถุประสงค์

7. รายการอ้างอิง

- [1] ศูนย์สารสนเทศ กรมประมง, 2553, สถิติการประมงแห่งประเทศไทย พ.ศ. 2551, เอกสารฉบับที่ 12/2553. 91 น.
- [2] Suanyuk, N., Kong, F., Ko, D., Gilbert, G.L. and 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: 35-40.
- [3] Amal, M.N.A. and Zamri-Saad, M., 2011, Streptococcosis in Tilapia (*Oreochromis niloticus*): A review, *Pertanika J. Trop. Agric. Sci.* 34: 195-206.
- [4] Anderson, D.P. and Siwicki, A.K., 1994, Duration of protection against *Aeromonas salmonicida* in brook trout immunostimulated with glucan or chitosan by injection or immersion, *Prog. Fish Cult.* 56: 258-261.
- [5] Janssen, P.A., 1976, The levamisole story, *Prog. Drug Res.* 20: 347-383.
- [6] Renoux, G., 1980, The general immune pharmacology of levamisole, *Drugs* 19: 88-89.
- [7] Morimoto, C., Abe, T. and Homma, M., 1979, Restoration of T-cell function in aged mice with long-term administration of levamisole, *Clin. Immunol. Immunopathol.* 12: 316-322.
- [8] Anderson, D.P., Siwicki, A.K. and Dixon, O.W., 1989, Immunostimulation by Levamisole in Rainbow Trout (*Salmo gairdneri*) *In Vivo*, pp. 469-478, In Ahne, W. and Kurstak, E. (Eds.), *Viruses of Lower Vertebrates*, Springer-Verlag, New York.
- [9] Li, P., Wang, X. and Gatlin III, D.M., 2004, Excessive dietary levamisole suppresses growth performance of hybrid striped bass, *Morone chrysops* x *M. saxatilis*, and elevated levamisole *in vitro* impairs macrophage function, *Aquacult. Res.* 35: 1380-1383.
- [10] Secombes, C.J., 1990, Isolation of Salmonid Macrophages and Analysis of their Killing Activity, pp. 137-154, In Stolen, J.S.,

- Fletcher, T.C., Anderson, D.P., Robertson B.S. and van Muiswinkel, W.B. (Eds.), Techniques in Fish Immunology, Fair Haven, SOS Publications, New Jersey.
- [11] Stasiak, A.S. and Bauman, C.P., 1996, Neutrophil activity as a potential bioindicator for contaminant analysis, Fish Shellfish Immunol. 6: 537-539.
- [12] Parry, R.M., Chandau, R.C. and Shahani, R.M., 1965, A rapid and sensitive assay of muramidase, Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 119: 384-386.
- [13] Ortuno, J. Esteban, M.A., Mulero, V. and Meseguer, J., 1998, Methods for Studying the Haemolytic, Chemoattractant and Opsonic Activities of Seabream (*Sparus aurata* L.) Serum, pp. 97-100, In Barnes, A.C., Davidson, G.A., Hiney, M. P. and McIntosh, D. (Eds.), Methodology in Fish Diseases Research, Fisheries Research Services, Aberdeen.
- [14] Bhatnagar, A. and Lamba, R., 2016, Immunostimulating and growth promoting activity of dietary levamisole on *Cirrhinus mrigala* fingerlings, J. Aquacult. Mar. Biol. 4(6): 00102.
- [15] Su, P., Han, Y., Jiang, C., Ma, Y., Pan, J., Liu, S. and Zhang, T., 2017, Effects of chitosan-oligosaccharides on growth performance, digestive enzyme and intestinal bacterial flora of tiger puffer (*Takifugu rubripes* Temminck et Schlegel, 1850), J. Appl. Ichthyol. 33: 458-467.
- [16] Wang, L., Liao, T.T., Wang, X.L., Yuan, G.P. and Yuan, S.B., 2015, Chitosan supplementation may improve the digestive physiology and health of captive *Leiothrix lutea*, Avian Biol. Res. 8: 221-226.
- [17] Xu, Y., Shi, B., Yan, S., Li, J., Li, T., Guo, Y. and Guo, X., 2014, Effects of chitosan supplementation on the growth performance, nutrient digestibility, and digestive enzyme activity in weaned pigs, Czech J. Animal Sci. 59: 156-163.
- [18] Maqsood, S., Samoon, M.H. and Singh, P., 2009, Immunomodulatory and growth promoting effect of dietary levamisole in *Cyprinus carpio* fingerlings against the challenge of *Aeromonas hydrophila*, Turk. J. Fish. Aquat. Sci. 9: 111-120.
- [19] Kumari, J. and Sahoo, P.K., 2006, Non-specific immune response of healthy and immuno-compromised Asian catfish (*Clarias batrachus*) to several Immunostimulants, Aquaculture 255: 133-141.
- [20] Robertsen, B., 1994, Beta Glucans as Immunostimulants in Fish, pp. 83-99, In Engstad, R.E., Jorenson, J.B., Stolen, J.S., and Fletcher, T.C. (Eds.), Modulators of Fish Immune Responses: Models for Environmental Toxicology, Biomarkers and Immunostimulators, SOS Publications, Fair Haven.
- [21] Cha, S.H., Lee, J.S., Song, C.B., Lee, K.J. and Joen, Y.J., 2008, Effects of chitosan-coated diet on improving water quality and

- innate immunity in the olive flounder, *Paralichthys olivaceus*, Aquaculture 278: 110-118.
- [22] Abdelkhalek, N.K.M., Zaki, V.H. and Yousef, M.A., 2008, Effect of some immunostimulants on health status and disease resistance of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*), pp. 1073-1088, Proceedings of the 8th International Symposium on Tilapia in Aquaculture 2008.
- [23] Gopalakannan, A. and Arul, V., 2006, Immunomodulatory effects of dietary intake of chitin, chitosan and levamisole on the immune system of *Cyprinus carpio* and control of *Aeromonas hydrophila* infection in ponds, Aquaculture 255: 179-187.
- [24] Geng, X., Dong, X.H., Tan, B.T., Yang, Q.H., Chi, S.Y., Liu, H.Y. and Liu, X.Q., 2011, Effects of dietary chitosan and *Bacillus subtilis* on the growth performance, non-specific immunity and disease resistance of cobia, *Rachycentron canadum*, Fish Shellfish Immunol. 31: 400-406.