รายงานการวิจัย

เรื่อง

การเสริมเบต้ากลูแคนในอาหารเพื่อเพิ่มผลผลิตปลาโรซี่บาร์บ

Supplement beta glucan in fish feed for increasing production of rosy barb (*Barbus conchonius*)

โดย

ผศ. ดร. อัจฉรี เรืองเดช

รศ. ดร. นงนุช เลาหะวิสุทธิ์

หลักสูตรวิทยาศาสตร์การประมง สาขาเทคโนโลยีการผลิตสัตว์และประมง

คณะเทคโนโลยีการเกษตร

สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหาร ลาดกระบัง

ได้รับทุนสนับสนุนงานวิจัยจากรายได้ภาควิชา คณะเทคโนโลยีการเกษตร

ประจำปีงบประมาณ 2551

ชื่อโครงการวิจัย การเสริมเบต้ากลูแคนในอาหารเพื่อเพิ่มผลผลิตปลาโรซี่บาร์บ

Supplement beta glucan in fish feed for increasing production of rosy barb (*Barbus conchonius*)

ได้รับทุนอุดหนุนการวิจัยจาก งบประมาณคณะ **ประจำปี** 2551

จำนวนเงิน 40,000 บาท

ระยะเวลาที่ทำการวิจัย เดือนตุลาคม 2550 – เดือนกันยายน 2551

หน่วยงานและผู้ดำเนินการวิจัย ผศ. ดร. อัจฉรี เรืองเดช **E-mail:** kruschar@kmitl.ac.th

รศ. ดร. นงนุช เลาหะวิสุทธิ์

หลักสูตรวิทยาศาสตร์การประมง

สาขาวิชาเทคโนโลยีการผลิตสัตว์และประมง

คณะเทคโนโลยีการเกษตร

สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหาร ลาดกระบัง

ถ.ฉลองกรุง เขตลาดกระบัง กรุงเทพมหานคร 10520

โทรศัพท์ 0-2329-8517 โทรสาร 0-2329-8517

การเสริมเบต้ากลูแคนในอาหารเพื่อเพิ่มผลผลิตปลาโรซี่บาร์บ

อัจฉรี เรืองเดช และนงนุช เลาหะวิสุทธิ์

บทคัดย่อ

การทดลองเสริมเบต้ากลูแคนในอาหารเพื่อเพิ่มผลผลิต และเพิ่มภูมิคุ้มกันแบบไม่จำเพาะในปลาโรซี่บาร์บโดยใช้ปลาขนาด 1.30 ± 0.02 กรัม เลี้ยงด้วยอาหารสำเร็จรูปเสริมเบต้ากลูแคนสามระดับ คือ 1, 3 และ 5 กรัมต่ออาหาร 1 กิโลกรัมเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุมที่ใช้อาหารปกติไม่มีการเสริมเบต้ากลูแคน เลี้ยงปลาโรซี่บาร์บนาน 60 วัน ผลขององค์ประกอบเลือดที่เกี่ยวข้องกับภูมิคุ้มกันในกลุ่มที่ได้รับอาหารเสริมเบต้ากลูแคนแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญกับกลุ่มควบคุม ($P<0.05$) พบว่า จำนวนเม็ดเลือดในกลุ่มที่ให้เบต้ากลูแคนที่ระดับ 3 และ 5 กรัมต่อกิโลกรัมอาหาร มีจำนวนเม็ดเลือดขาว 7.33±0.33 และ 7.33±0.88 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ และมีปริมาณเม็ดเลือดแดงอัดแน่น 19.56±1.09 และ 19.26±1.08 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ แต่ไม่พบความแตกต่างในด้านการเจริญเติบโต น้ำหนักเฉลี่ยเมื่อสิ้นสุดการ

ทดลอง 1.90 ± 0.04 กรัม (P>0.05) เมื่อทำการทดสอบฉีดเชื้อที่ทำให้เกิดโรค (*Aeromonas hydrophila*) เข้าช่องท้อง สังเกตอาการภายใน 96 ชั่วโมง พบว่าปลาในกลุ่มที่ได้รับอาหารเสริมเบต้ากลูแคน 3 กรัม ต่ออาหาร 1 กิโลกรัมมีอัตรารอดสูงสุด (60%) รองลงมาคือกลุ่มที่ได้รับอาหารเสริมเบต้ากลูแคน 5 กรัม ต่ออาหาร 1 กิโลกรัม (50%) ขณะที่กลุ่มควบคุมไม่มีปลารอดชีวิตตั้งแต่ 18 ชั่วโมงของการทดสอบ ผลของการทดลองนี้แสดงว่าการเสริมเบต้ากลูแคนในอาหารสามารถช่วยเพิ่มภูมิคุ้มกันให้กับปลาโรซี่บาร์บได้

คำสำคัญ: เบต้ากลูแคน ภูมิคุ้มกันแบบไม่จำเพาะ ปลาโรซี่บาร์บ

Supplement beta glucan in fish feed for increasing production of rosy barb (*Barbus conchonius*)

Uscharee Ruangdej and Nongnuch Laohavisuti

Abstract

The effects of dietary beta glucan on increasing production and some non-specific immunity were investigated in rosy barb. The fish (mean body weight 1.30 ± 0.02 g) were fed commercial diets supplemented with various levels of beta glucan (1, 3, and 5 g beta glucan/kg feed) and a control diet without beta glucan supplemented, for 60 days. Blood components involved immune responses were significantly higher in fish given diets with beta glucan than fish given the control diet without beta glucan (P<0.05). The leucocytes number in the 3g beta glucan/kg feed group and 5g beta glucan/kg feed group were 7.33±0.33% and 7.33±0.88%, the haematocrit number were 19.56±1.09% and 19.26±1.08%, respectively. However, no significantly on growth (P>0.05), mean body weight 1.90 ± 0.04 g. Pathogen challenge test within 96 hours by intraperitoneal injection of *Aeromonas hydrophila* indicated that highest survival (60%) was obtained in the 3g beta glucan/kg feed group followed by 5g beta glucan/kg feed group (50%). The lowest survival was obtained in the control group. These results reveal that supplement beta glucan in diet could enhance some non-specific immunity of rosy barb.

Keywords: Beta glucan, Non-specific immunity, Rosy barb, *Barbus conchonius*

สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อภาษาไทย	I
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ	II
สารบัญ	III
สารบัญตาราง	IV
สารบัญภาพ	V
คำนำ	1
การตรวจเอกสาร	2
อุปกรณ์และวิธีการ	6
ผลการทดลองและวิจารณ์	11
สรุป	17
เอกสารอ้างอิง	18
ภาคผนวก	19

สารบัญตาราง

ตารางที่		หน้า
1	จำนวนเปอร์เซ็นต์เม็ดเลือดขาวของปลาโรซี่บาร์บ (*Puntius conchonius*) หลังจบการทดลอง	11
2	ปริมาณเม็ดเลือดแดงอัดแน่นของปลาโรซี่บาร์บ (*Puntius conchonius*) หลังจบการทดลอง	13

ตารางผนวกที่		หน้า
1	ค่า O.D.ที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร ของเชื้อ *Aeromonas hydrophila* และจำนวนโคโลนีเฉลี่ยที่ความเข้มข้นต่างๆกัน	19
2	อัตราการรอดชีวิตของปลาโรซี่บาร์บ (*Puntius conchonius*) หลังจากได้รับเชื้อ *Aeromonas hydrophila* ที่เวลาต่างๆกัน	20
3	เปอร์เซ็นต์เซลล์เม็ดเลือดขาว และเม็ดเลือดแดงของปลาโรซี่บาร์บ (*Puntius conchonius*)	21
4	น้ำหนักเฉลี่ยของปลาโรซี่บาร์บ (*Puntius conchonius*) เริ่มต้นและสิ้นสุดการทดลอง	22

สารบัญภาพ

ภาพที่		หน้า
1	ลักษณะของปลาโรซี่บาร์บ (*Puntius conchonius*)	2
2	ลักษณะของเซลล์เม็ดเลือดขาวของปลาโรซี่บาร์บ	12
3	จำนวนเม็ดเลือดขาวของปลาโรซี่บาร์บหลังสิ้นสุดการทดลอง	12
4	เม็ดเลือดแดงอัดแน่นของปลาโรซี่บาร์บหลังสิ้นสุดการทดลอง	14
5	น้ำหนักของปลาโรซี่บาร์บในแต่ละกลุ่ม ที่ชั่งตั้งแต่เริ่มการทดลองจนสิ้นสุดการทดลอง กลุ่มที่ให้อาหารทดลอง 20 วันแล้วให้อาหารธรรมดา (a), กลุ่มที่ให้อาหารทดลองตลอด การทดลอง (b), กลุ่มที่มีการให้อาหารทดลองสลับอาหารธรรมดา (c)	15
6	อัตราการรอดของปลาโรซี่บาร์บเมื่อได้รับเชื้อ *Aeromonas hydrophila*	16

ภาพผนวกที่		หน้า
1	กราฟมาตรฐานระหว่างค่า O.D. ที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตรและจำนวน โคโลนีเฉลี่ยของเชื้อ *Aeromonas hydrophila*	19

บทที่ 1
คำนำ

ปลาโรซี่บาร์บ (*Puntius conchonius*) เป็นปลาสวยงามขนาดเล็กที่อยู่ในครอบครัวเดียวกันกับปลาคาร์พ ขนาดลำตัวไม่เกิน 15 เซนติเมตร และมีสีส้มแดง เมื่อเลี้ยงร่วมกับพรรณไม้น้ำจะช่วยให้องค์ประกอบของตู้ปลามีความสวยงามมากขึ้น แต่เนื่องจากปลาสวยงามส่วนใหญ่มักมีภูมิต้านทานโรคต่ำกว่าปลาทั่วไปโดยเฉพาะอย่างยิ่งในช่วงฤดูหนาวที่มีอุณหภูมิต่ำ ปลาสวยงามจะเป็นโรคได้ง่ายที่สุด ในปัจจุบันการเลี้ยงสัตว์น้ำจึงใช้วิธีการป้องกันโรคมากกว่าการรักษา และวิธีที่ได้รับความนิยมคือการทำให้สัตว์น้ำมีภูมิคุ้มกันที่ดีด้วยวิธีการเสริมสารอาหารที่เหมาะสม เบต้ากลูแคนเป็นสารประกอบโพลีแซคคาไรด์ที่ได้มาจากข้าวโอ๊ต ผนังเซลล์ของยีสต์ รา หรือแบคทีเรีย มีโครงสร้างของ β (1-3) ต่อกับ β-D-glucopyranosyl โดยมี side chain ที่มีความยาวต่าง ๆ ทำให้สามารถไปจับโปรตีนบนผนังเซลล์ได้หลายชนิด เช่น เลคติน นิวโทรฟิลล์ ซึ่งพบว่าการเสริมเบต้ากลูแคนในอาหารสัตว์น้ำมีผลต่อระบบภูมิคุ้มกันและกำจัดสิ่งมีชีวิตขนาดเล็กได้ (Das *et al*., 2009) แต่การเสริมเบต้ากลูแคนลงในอาหารสำหรับเลี้ยงสัตว์น้ำ ถ้าใช้ในปริมาณที่มากเกินไปก็อาจไม่ใช่ระดับที่เหมาะสมในการเพิ่มภูมิคุ้มกัน (Misra *et al*., 2006) ดังนั้นในการศึกษานี้ต้องการทราบถึงระดับความเข้มข้น และระยะเวลาที่เหมาะสมสำหรับปลาโรซี่บาร์บในการได้รับอาหารผสมเบต้ากลูแคนต่อความสามารถในการเพิ่มภูมิคุ้มกัน โดยตรวจสอบทางโลหิตวิทยาและทดสอบโดยความทนได้ต่อการฉีดเชื้อก่อโรค

บทที่ 2

ตรวจเอกสาร

ปลาโรซี่บาร์บ (*Puntius conchonius*) ชื่อภาษาอังกฤษ "Rosy Barb" เป็นปลาบาร์บขนาดเล็กที่มีสีเหลือบเหลืองทองสวยงาม ปลาที่คัดสายพันธุ์ในชั้นหลังๆ มีสีอมแดงส้มคล้ายกลีบกุหลาบ (โรซี่) ร้านปลาส่วนใหญ่มักเรียกปลาตัวนี้ผิดๆ ว่า “ลูซี่บาร์บ” และจากความเปลี่ยนแปลงทางสังคมและเศรษฐกิจในปัจจุบันมีผลให้วิถีชีวิตของคนเราเปลี่ยนแปลงไปอย่างยิ่ง ภาวะที่เครียดกับการปฏิบัติภารกิจเพื่อปากท้องของคนในประเทศมีผลทำให้คนส่วนใหญ่ต้องการเพื่อน ปลาสวยงามจึงเป็นส่วนหนึ่งที่เข้ามาแทรกช่องว่างตรงนี้ได้อย่างพอดี ในบรรดาสัตว์เลี้ยงไม่ว่าจะเป็นสุนัข แมวหรือ นกจะเห็นว่าปลาเป็นเพื่อนที่ไม่ก่อความวุ่นวายให้แก่ผู้เลี้ยง ความใกล้ชิด ความผูกพันจากการที่ได้มีโอกาสเลี้ยง เห็นการเจริญเติบโตของเขาทำให้เกิดความรัก ความเอื้อเฟื้อเผื่อแผ่ จากประเด็นนี้นี่เองทำให้มีอัตราการขยายตัวของปลาสวยงาม มีแนวโน้มเพิ่มขึ้นในอัตรา 5-10% อย่างสม่ำเสมอเรื่อยมา

ภาพที่ 1 ลักษณะของปลาโรซี่บาร์บ (*Puntius conchonius*)
ที่มา : www.tropicalfishprofiles.com/cyprinids/rosy-barb-puntius-conchonius

เบต้ากลูแคน เป็นสารสำคัญที่ช่วยป้องกันโรคต่างๆ โดยเฉพาะ โรคที่เกิดจากระบบย่อยอาหารและระบบขับถ่าย กระตุ้นการทำงานของระบบภูมิคุ้มกัน เบต้ากลูแคน เป็นโพลีแซคคาไรด์ (น้ำตาล) ชนิดหนึ่ง ซึ่งพบได้ในผนังเซลล์ของยีสต์ สาหร่าย และเห็ด เบต้ากลูแคนมีหลายชนิดขึ้นอยู่กับชนิดและสายพันธุ์ของสิ่งมีชีวิตดังกล่าวที่นำมาเพาะเลี้ยงทำให้ได้เบต้ากลูแคนที่มีประสิทธิภาพแตกต่างกัน

เมื่อร่างกายได้รับสารเบต้ากลูแคนแล้ว สารตัวนี้จะไปกระตุ้นการทำงานของ เซลล์แมคโครเฟจ (Macrophage) ที่ทำหน้าที่ในการสร้างภูมิคุ้มกันและป้องกันสิ่งแปลกปลอมต่างๆ ให้ตื่นตัวอยู่ตลอดเวลา พร้อมที่จะทำงานอยู่เสมอ ซึ่งโดยปกติแล้วเซลล์ชนิดนี้จะอยู่นิ่งๆ จะทำงานก็ต่อเมื่อมีสิ่งแปลกปลอมเข้าสู่ร่างกาย นั่นจึงเป็นสาเหตุว่าทำไมจึงช่วยในเรื่องโรคภูมิแพ้และโรคต่างๆได้ผลเป็นอย่างดี

ประโยชน์ของเบต้ากลูแคนที่มีต่อสัตว์เลี้ยง คือ เป็นสารสำคัญที่ช่วยป้องกันโรคต่างๆ โดยเฉพาะ โรคที่เกิดจากระบบย่อยอาหารและระบบขับถ่าย กระตุ้นการทำงานของระบบภูมิคุ้มกัน ลดอาการผื่นแพ้ผิวหนังของสัตว์เลี้ยง และช่วยในการทำงานของระบบประสาทให้มีประสิทธิภาพดีมากขึ้น มักนำมาเป็นส่วนผสมของอาหาร ใช้ในประเทศที่พัฒนาแล้ว นี่จึงเป็นสาเหตุให้สัตว์เลี้ยงที่ได้รับประทานเบต้ากลูแคนมีสุขภาพที่แข็งแรง

หน้าที่สำคัญของเม็ดเลือดขาว คือ ต่อต้านการติดเชื้อและกำจัดสิ่งแปลกปลอมที่เข้าสู่ร่างกายมี 5 ชนิด คือ neutrophils, lymphocytes, monocytes, eosinophils และ basophils (เรียงลำดับพบมากไปน้อย) มีแหล่งกำเนิดที่ pluripotent stem cell ในไขกระดูกเช่นเดียวกับเม็ดเลือดแดง

เม็ดเลือดขาวทำหน้าที่ phagocytosis ได้อย่างดีที่สุดคือ monocyte ซึ่งมีอยู่ประมาณ 5% ของเม็ดเลือดขาวทั้งหมด เมื่อ monocyte ออกจากกระแสเลือดไปอยู่ที่เนื้อเยื่อจะมีขนาดใหญ่ขึ้นและกลายเป็น macrophage (= big eater) เมื่อมีเชื้อโรคเข้ามา macrophage จะห่อหุ้ม (engulf) เชื้อไว้แล้วปล่อยเอนไซม์จาก lysozyme ออกมาย่อย แต่มีเชื้อบางชนิดเช่น *Mycobacterium tuberculosis* ทนต่อเอนไซม์ดังกล่าวและสามารถเจริญได้ใน macrophage ส่วนใหญ่ macrophage จะอยู่ในม้ามและต่อมน้ำเหลือง และมีบางส่วนไปอยู่ถาวรตามเนื้อเยื่อต่าง ๆ และมีชื่อเรียกแตกต่างกันออกไปเช่น ในปอดคือ alveolar macrophage ในตับคือ Kuffer's cell ในไตคือ mesoglial cell ในสมองคือ microglial cell และในเนื้อเยื่อเกี่ยวพันคือ histiocytes เป็นต้น

นอกจาก macrophage แล้วยังมี neutrophil (มีประมาณ 60-70% ของเม็ดเลือดขาวทั้งหมด) ทำหน้าที่ phagocytosis ได้เช่นเดียวกัน โดยจะ engulf เชื้อเข้าไว้ภายในเซลล์แล้วตัวเองก็ตายไปพร้อมกับเชื้อ ดังนั้น neutrophil จึงมีอายุสั้นประมาณ 2-3 วันส่วน eosinophil (มีประมาณ 1.5% ของเซลล์เม็ดเลือดขาวทั้งหมดมีหน้าที่ทำลายปรสิตซึ่งมีขนาดโต เช่น พยาธิ โดยเข้าเกาะที่ตัวพยาธิแล้วปล่อยน้ำย่อยออกมาทำลายเซลล์อีกชนิดหนึ่งในระบบภูมิคุ้มกันที่ทำหน้าที่กำจัดเซลล์ของร่างกายที่ติดเชื้อไวรัสและเซลล์ของร่างกายที่ผิดปกติไป เช่น เซลล์มะเร็ง คือ Natural Killer cells (NK cell) โดยจะจู่โจมที่เยื่อหุ้มเซลล์ของเซลล์เป้าหมายแล้วหลั่งสารพวก cytolytic ทำลายเซลล์เป้าหมายโดยการทำให้เซลล์แตก

การสร้างภูมิคุ้มกันมีอยู่ด้วยกันหลายวิธีและก็เป็นที่ยอมรับกันว่าการทำให้เกิดภูมิคุ้มกันในปลานั้นจะเกิดได้ในระยะเวลาสั้น ฉะนั้นการฉีดหรือการซึมของสารที่กระตุ้นให้เกิดภูมิคุ้มกันในปลาขึ้นอยู่กับสภาพแวดล้อม โดยเฉพาะอย่างยิ่งอุณหภูมิจากการทดลอง แสดงให้เห็นว่าการฉีด antigen หรือการ

กิน antigen จะพบว่าการกินมีความจำเป็นมากในการคงสภาวะและการจะรักษาสภาพภูมิคุ้มกัน แต่ก็ยังไม่มีรายงานอย่างชัดเจนเท่าใดนัก เทคนิคหรือวิธีการสร้างภูมิคุ้มกันโรคในปลา หลักๆนั้นมีหลักการคือ

1. การฉีด Antigens เข้าสู่ตัวปลา หรือที่เรียกว่า Parenteral Injection ในที่นี้เราจะทำการฉีดเข้าสู่ช่องท้อง กล้ามเนื้อ เส้นเลือดหรือส่วนต่างๆของร่างกาย เพื่อกระตุ้นให้ร่างกายสร้างฮอร์โมนคุ้มกันตัวเอง วิธีการนี้สามารถให้ผลได้รวดเร็ว แต่ข้อเสียอยู่ที่จะใช้ได้ดีกับปลาจำนวนไม่มากนัก ซึ่งอาจจะใช้กับพ่อแม่พันธุ์หรือปลาขนาดใหญ่ เช่น ปลาคาร์พ

2. การกิน Antigens หรือที่เราเรียกว่า Oral Immunization จะเป็นวิธีการที่จะทำให้ปลาจำนวนมากๆเกิดภูมิคุ้มกัน และปลาสามารถที่จะดูดซึมชิ้นส่วนขนาดใหญ่ได้ทางลำไส้

3. สร้างภูมิคุ้มกันด้วยการแช่ มีข้อดีคือ สามารถแช่ปลาจำนวนมากได้ในครั้งเดียวกัน ในทางปฏิบัตินิยมแช่ปลาที่มีขนาดเล็ก

4. การแช่ปลาในน้ำเกลือที่มีแบคทีเรียหรือไวรัส ที่เรียกว่า Vacum Infiltration โดย Antigen ในถังสุญญากาศ ปลาและ Antigen ที่แขวนลอยจะถูกทำให้อยู่ในสภาพลดความกดอากาศ และเพิ่มขึ้นเท่าระดับปกติอย่างรวดเร็ว 3 ครั้ง ขบวนการนี้ใช้เวลาทั้งสิ้น 2-3 นาที

การใช้เบต้ากลูแคนเป็นอาหารเสริม

การเสริมภูมิคุ้มกันโดยการให้กิน

Ai *et al.* (2007) ได้มีการทดสอบผลของเบต้ากลูแคนที่มีผลต่อการสร้างภูมิคุ้มกันในปลา yellow croaker โดยทำการศึกษาโดยการใช้อาหารผสม เบต้ากลูแคน ที่ 3 ระดับ คือ 0%, 0.09%, และ 0.18% พบว่าปลาที่ได้ให้อาหารผสม เบต้ากลูแคนที่ระดับ 0.09% มีผลทำให้ปลามีการเจริญเติบโตมากกว่าปลาในกลุ่มควบคุมและกลุ่มที่ให้ เบต้ากลูแคนในระดับ 0.18%

หลังจากนั้นทำการฉีดเชื้อ *Vibrio harveyi* เข้าสู่ตัวปลาพบว่าปลาที่กินอาหารที่ระดับ 0.09% ปลามีอัตราการตายลดลงเมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุมและกลุ่มทดลองที่ได้รับอาหาร 0.18% เนื่องจากปลาที่ได้อาหารที่ผสมปริมาณเบต้ากลูแคนที่มีระดับสูงเกินไปจะไปยับยั้งระบบภูมิคุ้มกันและมีผลโดยตรงต่อระบบ respiratory burst หลังจากระยะเวลาหนึ่งที่เซลล์จะทำงานหนักและเสื่อมสภาพ แต่การให้อาหารผสม เบต้ากลูแคนที่ระดับ 0.18% จะมีปริมาณของ Lysozyme เพิ่มขึ้นอย่างเห็นได้ชัดเจน ซึ่งกระบวนการ Lysozyme จะคอยทำหน้าที่ในการทำลายผนังเซลล์ของเชื้อโรคโดยเฉพาะแบคทีเรีย ในกระบวนการ alternative complement pathway จะไม่มีผลต่อระดับของเบต้ากลูแคนที่เข้าสู่ร่างกาย Selvaraj *et al.* (2005) ได้ทำการศึกษาในปลาคาร์ฟโดยมีการผสมเบต้ากลูแคนลงในอาหารในระดับ 1%, 2%, และ 4% เมื่อปลาคาร์ฟได้รับเชื้อ *Aeromonas hydrophila* ผลของอัตรารอดไม่มีความ

แตกต่างกันและปริมาณของ Antibody ในอาหารในแต่ละระดับจะไม่มีความแตกต่างกัน

การเสริมภูมิคุ้มกันโดยการฉีดเข้าสู่ลำตัว

Whittington *et al.* (2005) ได้มีการศึกษาผลของการฉีดเบต้ากลูแคนเข้าสู่ลำตัวในปลานิลในปริมาณ 0, 50, 100, 200 มิลลิกรัม/กิโลกรัม ปริมาณของ เบต้ากลูแคน 50 และ 100 มิลลิกรัม/กิโลกรัม ทำให้ปลานิลมีอัตรารอดจากเชื้อ *Streptococcus iniae* ได้ถึง 100% ส่วนสารที่มีความเข้มข้น 200 มิลลิกรัม/กิโลกรัม จะมีอัตรารอดน้อยที่สุดเนื่องจากความเข้มข้นของเบต้ากลูแคนจะมีผลต่อการลดลงของภูมิคุ้มกันในการศึกษาของ Selvaraj *et al.* (2005) ได้มีการศึกษาของระดับปริมาณที่เหมาะสมของเบต้ากลูแคนที่ส่งผลต่อภูมิคุ้มกันของปลาคาร์ฟที่ฉีดเชื้อ *Aeromonas hydrophila* โดยมีการฉีดเบต้ากลูแคนที่ความเข้มข้น 100, 500, 1000 ไมโครกรัม ปลาคาร์ฟที่ได้รับการฉีดเบต้ากลูแคนที่ระดับ 500 ไมโครกรัม ขึ้นไปจะทำให้ปลาคาร์ฟมีอัตรารอดถึง 100% ปริมาณของเบต้ากลูแคนที่ฉีดเข้าสู่ตัวปลาจะมีผลต่อปริมาณภูมิคุ้มกันที่เพิ่มขึ้นปริมาณของ neutrophils และ monocytes เพิ่มขึ้นการดักจับและการทำลายแบคทีเรียจะเพิ่มขึ้นซึ่งเม็ดเลือดขาวทั้ง 2 ชนิดนี้มีหน้าที่ใกล้เคียงกันซึ่งทำให้การดักจับและการทำลายแบคทีเรียได้อย่างมีประสิทธิภาพขึ้นกว่าปลาที่ไม่ได้รับ เบต้ากลูแคน

Kumari and Sahoo (2006) ได้มีการทดลองเปรียบเทียบการให้อาหารเสริมหลายชนิดในการกระตุ้นภูมิคุ้มกันในปลา Asian catfish คือ lactoferrin, ß-glucan, levamisole และ วิตามิน C เมื่อนำมาทดสอบภูมิคุ้มกันระหว่างปลาปกติและปลาที่ได้รับสาร cyclophosphsmide ซึ่งเป็นสารยับยั้งการสร้างภูมิคุ้มกันซึ่งเกิดจากสารพิษในแหล่งน้ำพบว่าเมื่อนำปลาที่มีสุขภาพดีมาให้อาหารกระตุ้นภูมิคุ้มกันทั้ง 4 ชนิดพบว่าปลาที่ได้รับอาหารเสริมทั้ง 4 ชนิดสามารถเพิ่มกระบวนการ phagocytic ได้อย่างมีประสิทธิภาพแต่วิตามิน C สามารถเพิ่มปริมาณของ phagocytic ได้ดีที่สุด ส่วนปลาที่ได้รับสาร cyclophosphsmide กระบวนการ phagocytic จะมีปริมาณลดลงในอาหารกระตุ้นภูมิคุ้มกันทั้ง 4 ชนิดแต่ปริมาณของ phagocytic ของอาหารที่เสริม ß-glucan ปริมาณสัดส่วนการลดลงที่น้อยที่สุดเมื่อเปรียบกับปลากลุ่มปกติ

บทที่ 3
อุปกรณ์และวิธีการ

อุปกรณ์

1. ชุดเตรียมอาหารสำหรับการเลี้ยง
   1.1 อาหารเม็ดไฮเกร็ดขนาดเล็ก
   1.2 เบต้ากลูแคนผสมวิตามินซี (แมคโครการ์ด-ซี)
   1.3 amino tonic
   1.4 เครื่องชั่งทศนิยม 4 ตำแหน่ง
   1.5 ถาด
2. การนับจำนวนเซลล์เม็ดเลือดปลา
   2.1 เข็มฉีดยา (Syringe) เบอร์ 25G
   2.2 สไลด์
   2.3 หลอด hematocrit
   2.4 ดินน้ำมันขาว
   2.5 ผ้าขนหนู
   2.6 cover glass
   2.7 ยาสลบ
   2.8 โซเดียมซิเตรต 10 เปอร์เซ็นต์
   2.9 กล้องจุลทรรศน์
3. การเปรียบเทียบความสามารถในการต่อต้านเชื้อ
   3.1 เชื้อ *Aeromonas hydrophila*
   3.2 เครื่องแก้วสำหรับเลี้ยงเชื้อ
   3.3 เครื่องแก้วปรับปริมาตร
   3.4 ไมโครปิเปต
   3.5 ตะเกียงแอลกอฮอล์
   3.6 ตู้เลี้ยงเชื้อ (Laminar Flow)
   3.7 ตู้บ่มเชื้อ (Incubater)
   3.8 เครื่องวัดค่าดูดกลืนแสง (Spectrophotometer)
   3.9 เครื่องปั่นเหวี่ยงตกตะกอนความเร็วสูง (Centrifuge)
   3.10 หม้อนึ่งไอน้ำความดันสูง (Autoclave)

3.11 ตู้อบลมร้อน (Hot air oven)

3.12 โซเดียมคลอไรด์ (NaCl)

3.13 อาหารเลี้ยงเชื้อ Nutrient agar (NA), Nutrient broth (NB)

4. อุปกรณ์อื่นๆในการเลี้ยง

4.1 ปลาโรซี่บาร์บ

4.2 ถังพลาสติก 50 ลิตร (30×48×35)

4.3 หัวทรายและสายลม

4.4 สายยาง

4.5 เครื่องวัดความเป็นกรดด่าง

4.6 เครื่องวัดปริมาณออกซิเจนที่ละลายในน้ำ

4.7 เครื่องวัดอุณหภูมิ max-min

4.8 เครื่องชั่งทศนิยม 2 ตำแหน่ง

4.9 ปั๊มลม

4.10 กล่องสำหรับกรองตะกอน

4.11 ใยกรอง

วิธีการ

แผนการทดลอง

วางแผนการทดลองแบบ 3x4 factorial experiments in CRD และใช้แผนการทดลองแบบสุ่มตลอด (Completely Randomized Design) โดยแบ่งเป็น 2 ปัจจัย ปัจจัยที่หนึ่งมี 3 ระดับและปัจจัยที่สองมี 4 ระดับ

ปัจจัยที่หนึ่งแบ่งเป็นระยะเวลาการให้อาหาร มี 3 ระดับคือ

1. ให้อาหารที่มีส่วนผสมของเบต้ากลูแคน 20 วันแล้วให้อาหารธรรมดาตลอด
2. ให้อาหารที่มีส่วนผสมของเบต้ากลูแคนตลอดการทดลอง
3. ให้อาหารที่มีส่วนผสมของเบต้ากลูแคน สลับกับการให้อาหารธรรมดา

ปัจจัยที่สองแบ่งเป็นระดับของเบต้ากลูแคนที่ผสมอาหาร มี 4 ระดับคือ

1. อาหารที่ผสมเบต้ากลูแคนที่ระดับ 0 กรัม/อาหาร 1 กิโลกรัม
2. อาหารที่ผสมเบต้ากลูแคนที่ระดับ 1 กรัม/อาหาร 1 กิโลกรัม
3. อาหารที่ผสมเบต้ากลูแคนที่ระดับ 3 กรัม/อาหาร 1 กิโลกรัม
4. อาหารที่ผสมเบต้ากลูแคนที่ระดับ 5 กรัม/อาหาร 1 กิโลกรัม

วิธีการทดลอง

1.การเตรียมสัตว์ทดลองและอุปกรณ์สำหรับการเลี้ยง

นำปลาโรซี่บาร์บจำนวน 240 ตัว น้ำหนักเฉลี่ย 1.30 กรัมต่อตัวมาเลี้ยงในห้องปฏิบัติการก่อนการทดลองจริงเป็นเวลา 2 สัปดาห์ เลี้ยงด้วยอาหารเม็ดสำเร็จรูปโดยให้อาหาร 3% ของน้ำหนักตัวให้อาหารวันละ 2 ครั้ง เช้า-เย็น เปลี่ยนถ่ายน้ำอาทิตย์ละ 1 ครั้ง

เตรียมถังน้ำโดยเติมน้ำที่ระดับ 3 ใน 4 ส่วนจำนวน 12 ถัง ต่อสายออกซิเจนเข้ากล่องกรองทุกถัง นำปลามาชั่งน้ำหนักเริ่มต้นแล้วแยกใส่ถัง ถังละ 20 ตัว

2.การเตรียมอาหารและการให้อาหาร

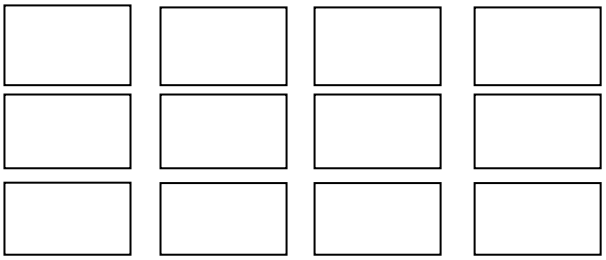
2.1 เตรียมเบต้ากลูแคนผสมวิตามินซีให้มีความเข้มข้น 0, 1, 3 และ 5 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัมอาหาร

2.2 นำเบต้ากลูแคนที่เตรียมมาคลุกเคล้ากับอาหารให้ทั่วกัน

2.3 นำอาหารที่ผสมแล้วมาฉีดพ่นกลิ่นเพื่อดึงดูดให้ปลากินอาหาร (amino tonic) นำไปผึ่งให้แห้งในที่ไม่มีแสง และเก็บรักษาในตู้แช่

2.4 ให้อาหารวันละ 2 ครั้ง เช้า-เย็น

3.แผนผังการทดลอง



ให้เบต้ากลูแคน20 วัน + อาหารปกติ 40

ให้เบต้ากลูแคน60 วัน

ให้เบต้ากลูแคน20 วัน +อาหารปกติ 20 วัน + เบต้ากลูแคนอีก 20 วัน

ควบคุม 1 g/kg feed 3 g/kg feed 5 g/kg feed

แถวแนวตั้ง คือระดับของเบต้ากลูแคนที่ผสมในอาหาร
แถวแนวนอน คือช่วงระยะเวลาที่ให้อาหารทดลอง

4. การตรวจสอบภูมิคุ้มกันของปลาโรซี่บาร์บ

4.1 การเก็บตัวอย่างเลือดเพื่อใช้วิเคราะห์ สุ่มเก็บตัวอย่างเลือดปลาโรซี่บาร์บหลังจากการเลี้ยงด้วยอาหารทดลองไป 30 และ 60 วัน จำนวนถังละ 3 ตัวทำการสลบปลาเจาะเลือดบริเวณส่วนหาง ด้วยเข็มฉีดยาขนาด 25G ใช้หลอดฉีดยาที่เคลือบด้วยสารป้องกันการแข็งตัวของเลือด (สารละลายโซเดียม-

ซิเตรต 10 เปอร์เซ็นต์) เพื่อใช้วิเคราะห์หาจำนวนเม็ดเลือดแดงและเม็ดเลือดขาวและปริมาณเม็ดเลือดแดงอัดแน่น

4.1.1 การหาปริมาณเม็ดเลือดแดงอัดแน่น นำเลือดใส่ในหลอดคาปิลาลี่สำหรับหาค่าฮีมาโตคริต ปิดปลายด้วยดินน้ำมันขาวนำหลอดคาปิลาลี่เข้าเครื่องหมุนเหวี่ยงที่ความเร็ว 12,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที วัดปริมาตรเม็ดเลือดแดงอัดแน่น

4.1.2 การนับเม็ดเลือดแดงเม็ดเลือดขาว ทำการเก็บเลือดปลานำเลือดปลาหยดลงบนสไลด์แล้วใช้สไลด์อีกแผ่น smear เลือดให้เป็นแผ่นบางๆโดยลากผ่านหยดเลือด ทิ้งสไลด์ให้แห้งแล้วนำมาย้อมด้วยน้ำยา Wright และ Giemsa ตรวจนับปริมาณเม็ดเลือดแดง และเม็ดเลือดขาวภายใต้กล้องจุลทรรศน์

4.2 การเปรียบเทียบความสามารถการต่อต้านเชื้อ *Aeromonas hydrophila* โดยนำเชื้อมาใช้ในการทดสอบดังนี้

4.2.1 เพิ่มจำนวนเชื้อ *Aeromonas hydrophila* ใน Nutrient Broth (NB) โดยบ่มเชื้อในตู้บ่มเชื้อ ที่ 32 องศาเซลเซียส ประมาณ 24 ชั่วโมง

4.2.2 ทำกราฟมาตรฐานระหว่างค่าดูดกลืนแสงและจำนวนเซลล์ของเชื้อในปริมาตร 1 มิลลิลิตร โดยนำเชื้อ *Aeromonas hydrophila* ที่อยู่ใน NB ไปปั่นเหวี่ยงที่ 3,500 รอบต่อนาที เป็นเวลา 15 นาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส หลังจากนั้นเทอาหารทิ้ง แล้วล้างเชื้อด้วย 0.85 เปอร์เซ็นต์โซเดียมคลอไรด์ที่ผ่านการฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งไอน้ำความดันสูง (Autoclave) ที่ อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที แล้วปั่นเหวี่ยงอีกครั้ง ปริมาตรเท่ากับปริมาตรของ NB แล้วนำไปวัดค่าดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร จากนั้นทำการเจือจางเชื้อด้วย 0.85 เปอร์เซ็นต์โซเดียมคลอไรด์ แล้ววัดค่าดูดกลืนแสงแต่ละความเจือจางของเชื้อไปหาจำนวนเซลล์ด้วยวิธีการหยดเชื้อ 10 จุด ใช้ปริมาตรจุดละ 10 ไมโครลิตร บน Nutrient Agar (NA) แล้วบ่มเชื้อประมาณ 16-18 ชั่วโมง หลังจากนั้นนับจำนวนโคโลนีของเชื้อ ทำการคำนวณหาจำนวนเซลล์ในปริมาตร 1 มิลลิลิตร แล้วนำค่าที่ได้มาทำกราฟมาตรฐาน และหาสมการเส้นตรง

4.2.3 ทำการเปรียบเทียบความสามารถในการต่อต้านเชื้อ *Aeromonas hydrophila* โดยการใช้เชื้อที่มีอายุ 18 ชั่วโมง เพื่อให้เชื้อออกฤทธิ์รุนแรงมากที่สุด ทำการล้างเซลล์ของเชื้อตามวิธีการข้อ 4.2.2 หลังจากนั้นนำมาวัดค่าดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตรแล้วหาจำนวนเซลล์โดยคำนวณจากสมการเส้นตรงที่ได้จากการทำกราฟมาตรฐานและทำการทดสอบดังนี้

4.2.3.1 นำถังพลาสติกขนาด 50 ลิตรใส่น้ำ 30 ลิตร นำปลาที่ทดลองเป็นเวลา 2 เดือน แยกใส่ถังโดยแบ่งเป็นชุด ชุดละ 10 ตัว ให้อากาศตลอดเวลา

4.2.3.2 นำเชื้อ *Aeromonas hydrophila* 0.1 มิลลิลิตร มาฉีดบริเวณกล้ามเนื้อท้องของปลาที่ความเข้มข้น 1×10^{8} cfu จากนั้นสังเกตพฤติกรรม และบันทึกอัตราการรอดชีวิต ที่เวลา 6, 12, 18,

24, 48, 72 และ 96 ชั่วโมงหลังฉีดเชื้อ

การบันทึกข้อมูล

1.บันทึกจำนวนเซลล์เม็ดเลือดของปลาโรซี่บาร์บ

2.บันทึกอัตราการรอดชีวิตของปลาโรซี่บาร์บหลังจากได้รับเชื้อ 6, 12, 18, 24, 48, 72 และ 96 ชั่วโมง

การวิเคราะห์ข้อมูล

นำข้อมูลที่ได้จากการทดลองมาวิเคราะห์และประเมินผลทางสถิติด้วยโปรแกรมคอมพิวเตอร์ SPSS for window version 15.0 และ Microsoft Excel 2007

บทที่ 4
ผลการทดลองและวิจารณ์

จากการตรวจนับจำนวนเซลล์เม็ดเลือดขาวของปลาโรซี่บาร์บ พบว่าเม็ดเลือดขาว(ภาพที่ 2) ในกลุ่มที่ได้รับเบต้ากลูแคนที่ระดับ 3 และ 5 กรัมต่อกิโลกรัมอาหารมีจำนวนเพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.05$) เมื่อเทียบกับกลุ่มที่ได้รับเบต้ากลูแคนระดับอื่นๆ โดยมีจำนวนเม็ดเลือดขาว 3.67±0.88 และ 2.00±0.58 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งมีปริมาณสูงกว่ากลุ่มควบคุม และกลุ่มที่ให้เบต้ากลูแคนที่ 1 กรัมต่อกิโลกรัมอาหาร ที่มีจำนวนเม็ดเลือดขาว 1.67±0.33, 1.67±0.67 เปอร์เซ็นต์ (ภาพที่ 3) และปริมาณเม็ดเลือดขาวที่เพิ่มขึ้นจะสัมพันธ์โดยตรงกับระดับความเข้มข้นของเบต้ากลูแคนที่เพิ่มขึ้น (ตารางที่ 1) ผลจากการทดลองพบว่าระยะเวลาของการได้รับเบต้ากลูแคนที่มีการให้สลับกับการหยุดให้เป็นช่วง ๆ จะทำให้ปริมาณเม็ดเลือดขาวเพิ่มสูงขึ้นอย่างเห็นได้ชัดเมื่อเทียบกับการได้รับเบต้ากลูแคนตลอดเวลา หรือได้รับเบต้ากลูแคน 20 วันแล้วหยุดให้เป็นเวลานาน 40 วัน ปริมาณเม็ดเลือดขาวของกลุ่มที่เคยได้รับเบต้ากลูแคน ก็ยังคงมีจำนวนเม็ดเลือดขาวที่สูงกว่ากลุ่มควบคุมที่ไม่ได้รับเบต้ากลูแคน (ภาพที่ 3)

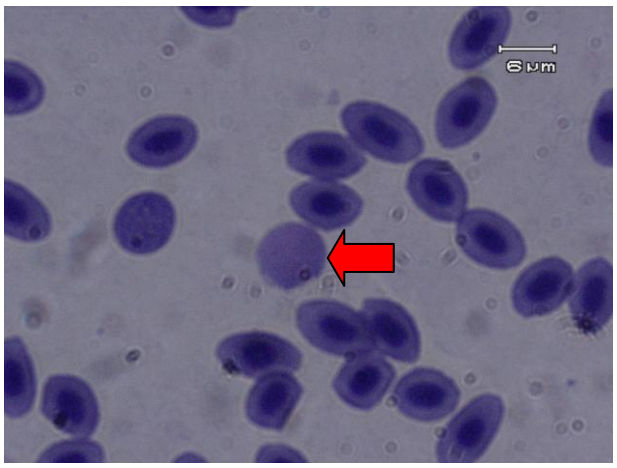
ตารางที่ 1 จำนวนเปอร์เซ็นต์เม็ดเลือดขาวของปลาโรซี่บาร์บ (*Puntius conchonius*) หลังสิ้นสุดการทดลอง

เบต้ากลูแคน (ก./กก. อาหาร)	จำนวนเม็ดเลือดขาว (เปอร์เซ็นต์)			Mean ± S.E.
	ให้ 20 วัน	ให้ตลอด	ให้สลับกัน	
0	1.67±0.33	1.67±0.33	1.67±0.33	1.67 ±0.33 [a]
1	1.67±0.67	1.67±0.67	3.33±0.33	2.22 ±0.34 [a]
3	2.00±0.58	3.67±0.88	7.33±0.33	4.33 ±0.34 [b]
5	3.67±0.88	4.33±0.33	7.33±0.88	5.11 ±0.34 [b]
Mean ± S.E.	2.25 ±0.29 [a]	2.83 ±0.29 [a]	4.917 ±0.29 [b]	

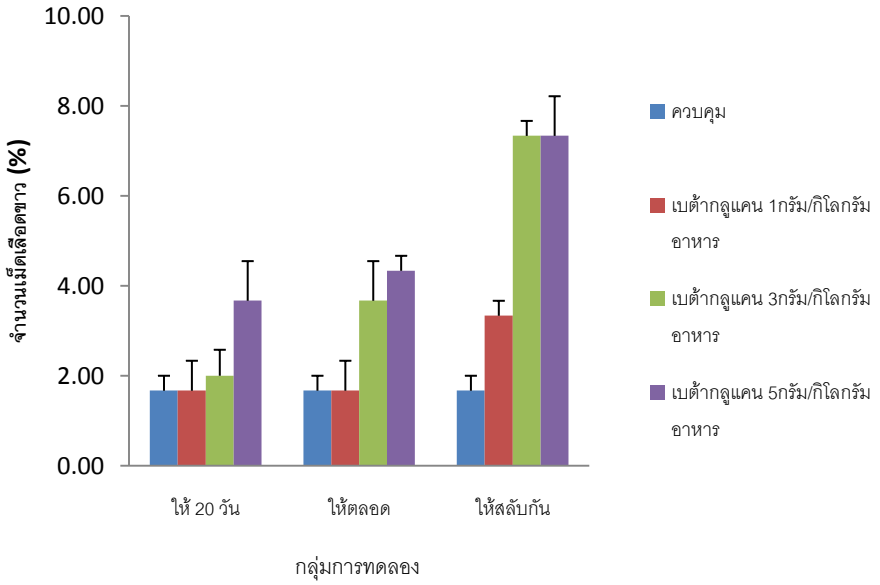
ตัวอักษรภาษาอังกฤษที่กำกับเหมือนกันในแต่ละปัจจัย หมายถึง ไม่มีความแตกต่างทางสถิติ ($p>0.05$)

แสดงว่านอกจากปริมาณแล้ว ระยะเวลาที่ให้เบต้ากลูแคนมีผลต่อการเพิ่มขึ้นของเม็ดเลือดขาว ซึ่งปริมาณของเม็ดเลือดขาว หรือ leucocyte ทั้ง 2 ชนิดที่พบมากคือ neutrophils และ monocytes มี

หน้าที่ใกล้เคียงกัน คือทำให้การดักจับและการทำลายแบคทีเรียเกิดได้อย่างมีประสิทธิภาพมากขึ้น (Whittington *et al*., 2005) การที่ปลาในกลุ่มที่ได้รับเบต้ากลูแคนในอาหาร สลับกับการหยุดให้ มีปริมาณเม็ดเลือดขาวที่สูงขึ้นอย่างเห็นได้ชัด โดยเพิ่มสูงกว่ากลุ่มที่ได้รับเบต้ากลูแคนตลอดการทดลอง เนื่องจากปลาที่ได้อาหารที่ผสมปริมาณเบต้ากลูแคนที่มีระดับสูงเกินไป จะไปยับยั้งระบบภูมิคุ้มกันและมีผลโดยตรงต่อระบบ respiratory burst หลังจากระยะเวลาหนึ่งที่เซลล์จะทำงานหนักและเสื่อมสภาพ จึงมีปริมาณของเม็ดเลือดขาวน้อยกว่า (Selvaraj *et al*., 2005, Ai *et al*.,2007)



ภาพที่ 2 ลักษณะของเซลล์เม็ดเลือดขาวของปลาโรซี่บาร์บ



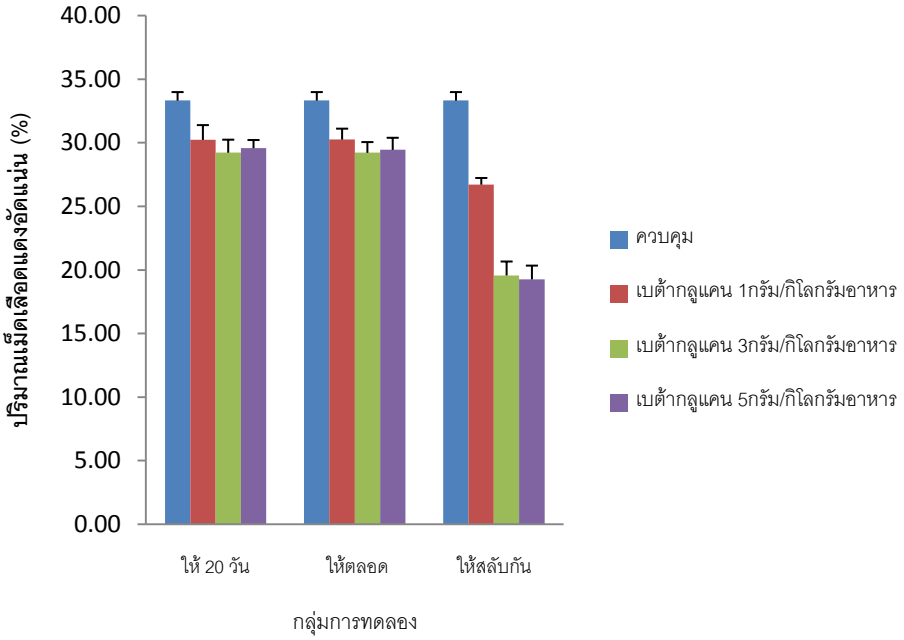
ภาพที่ 3 จำนวนเม็ดเลือดขาวของปลาโรซี่บาร์บหลังสิ้นสุดการทดลอง

จากการหาค่าปริมาณเม็ดเลือดแดงอัดแน่นของปลาโรซี่บาร์บในแต่ละกลุ่มการทดลอง พบว่าในกลุ่มที่ให้อาหารทดลอง 20 วันแล้วให้อาหารธรรมดาที่ระดับของเบต้ากลูแคนทุกระดับ ตั้งแต่กลุ่มควบคุม กลุ่มที่ให้เบต้ากลูแคน 1, 3 และ 5 กรัมต่อกิโลกรัมอาหาร (33.32±0.68, 30.23±1.16, 29.22±1.02 และ 29.58±0.64 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ) ไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p>0.05$) (ตารางที่ 2 และภาพที่ 4) ส่วนในกลุ่มที่ให้อาหารทดลองตลอดการทดลองที่การให้เบต้ากลูแคนทุกระดับไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p>0.05$) เช่นกัน ซึ่งในกลุ่มควบคุม กลุ่มที่ให้เบต้ากลูแคน 1, 3 และ 5 กรัมต่อกิโลกรัมอาหาร มีปริมาณเม็ดเลือดแดงอัดแน่น 33.32±0.68, 30.25±0.86, 29.21±0.84 และ 29.44±0.95 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ (ตารางที่ 2 และภาพที่ 4) และในกลุ่มที่มีการให้อาหารทดลองสลับอาหารธรรมดาที่การให้เบต้ากลูแคนที่ระดับ 3 และ 5 กรัมต่อกิโลกรัมอาหาร มีปริมาณเม็ดเลือดแดงอัดแน่น 19.56±1.09 และ 19.26±1.08 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ ซึ่งมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.05$) กับกลุ่มที่เหลือ ซึ่งกลุ่มควบคุมและกลุ่มที่ให้เบต้ากลูแคน 1 กรัมต่อกิโลกรัมอาหารมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.05$) เช่นกัน คือมีปริมาณเม็ดเลือดแดงอัดแน่น 33.32±0.68 และ 26.71±0.52 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ (ตารางที่ 2 และภาพที่ 4)

ตารางที่ 2 ปริมาณเม็ดเลือดแดงอัดแน่นของปลาโรซี่บาร์บ (*Puntius conchonius*) หลังสิ้นสุดการทดลอง

กลุ่มการทดลอง	ปริมาณเม็ดเลือดแดงอัดแน่น (เปอร์เซ็นต์)		
	ให้ 20 วัน	ให้ตลอด	ให้สลับกัน
ควบคุม	33.32±0.68 [a]	33.32±0.68 [a]	33.32±0.68 [a]
เบต้ากลูแคน 1กรัม/กิโลกรัมอาหาร	30.23±1.16 [ab]	30.25±0.86 [ab]	26.71±0.52 [b]
เบต้ากลูแคน 3กรัม/กิโลกรัมอาหาร	29.22±1.02 [ab]	29.21±0.84 [ab]	19.56±1.09 [c]
เบต้ากลูแคน 5กรัม/กิโลกรัมอาหาร	29.58±0.64 [ab]	29.44±0.95 [ab]	19.26±1.08 [c]

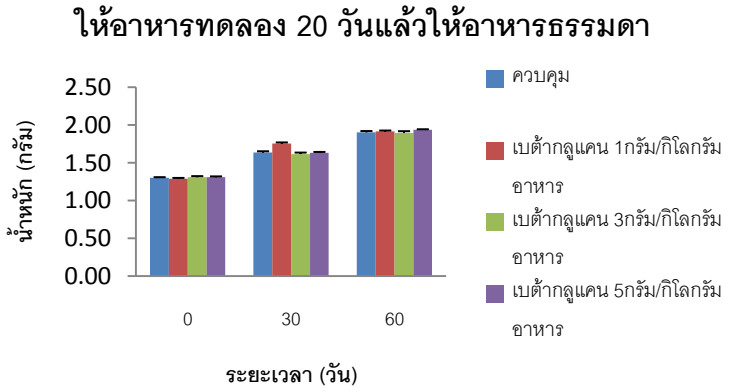
ตัวอักษรเหมือนกันในแนวตั้งแต่ละปัจจัย หมายถึง ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ ($p>0.05$)



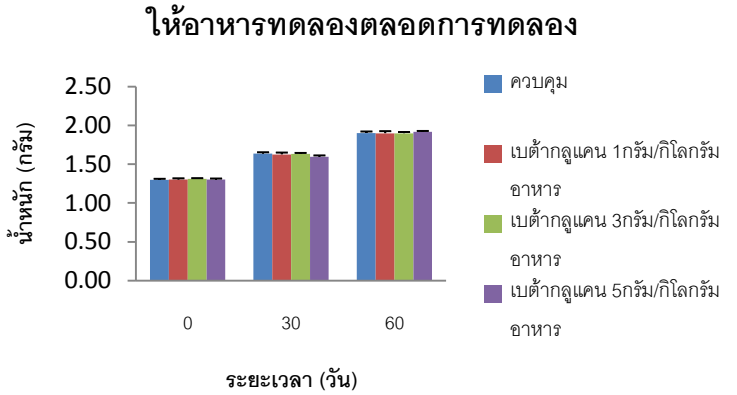
ภาพที่ 4 ปริมาณเม็ดเลือดแดงอัดแน่นของปลาโรซี่บาร์บหลังสิ้นสุดการทดลอง

การเจริญเติบโตของปลาโรซี่บาร์บ (*Puntius conchonius*) ในทุกกลุ่มการทดลองพบว่าเมื่อสิ้นสุดการทดลองน้ำหนักที่เพิ่มขึ้นไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p>0.05$) (ภาพที่ 5) โดยมีน้ำหนักเฉลี่ยหลังสิ้นสุดการทดลองดังนี้ กลุ่มควบคุม 1.90±0.02 กรัม กลุ่มที่ให้อาหารทดลอง 20 วันแล้วให้อาหารธรรมดาที่ให้เบต้ากลูแคน 1, 3 และ 5 กรัมต่อกิโลกรัมอาหารมีน้ำหนักเฉลี่ย 1.91±0.01, 1.90±0.02 และ 1.94±0.01 กรัม ตามลำดับ ส่วนกลุ่มที่ให้อาหารทดลองตลอดการทดลองที่ให้เบต้ากลูแคน 1, 3 และ 5 กรัมต่อกิโลกรัมอาหารมีน้ำหนักเฉลี่ย 1.90±0.03, 1.90±0.02 และ 1.92±0.01 กรัม ตามลำดับ และกลุ่มที่ให้อาหารทดลองสลับอาหารธรรมดาที่ให้เบต้ากลูแคน 1, 3 และ 5 กรัมต่อกิโลกรัมอาหารมีน้ำหนักเฉลี่ย 1.93±0.01, 1.89±0.02 และ 1.92±0.01 กรัม ตามลำดับ

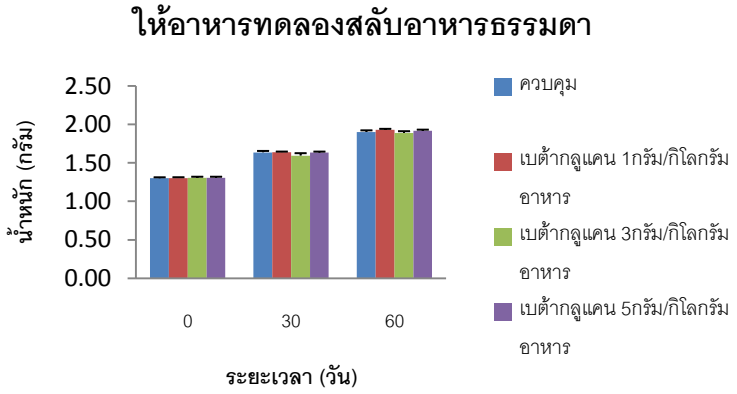
จากการเหนี่ยวนำให้เกิดโรคด้วยเชื้อ *Aeromonas hydrophila* ฉีดเข้าตัวปลาโรซี่บาร์บ (*Puntius conchonius*) บริเวณกล้ามเนื้อท้อง ประมาณ 0.1 มิลลิลิตร พบว่าเมื่อเวลาผ่านไป 6 ชั่วโมงหลังฉีดเชื้อ ปลาในทุกกลุ่มการทดลองมีอัตราการรอดชีวิตไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p>0.05$) แต่เมื่อผ่าน 12 ชั่วโมงพบอัตราการรอดเริ่มมีการแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ($p<0.05$) ที่กลุ่มควบคุมมีอัตราการรอดต่ำที่สุดคือ 30% และกลุ่มที่ให้อาหารทดลองสลับอาหารธรรมดาที่ให้เบต้ากลูแคน 3 กรัมต่อกิโลกรัมอาหารมีอัตราการรอดสูงที่สุดคือ 100%



(a)

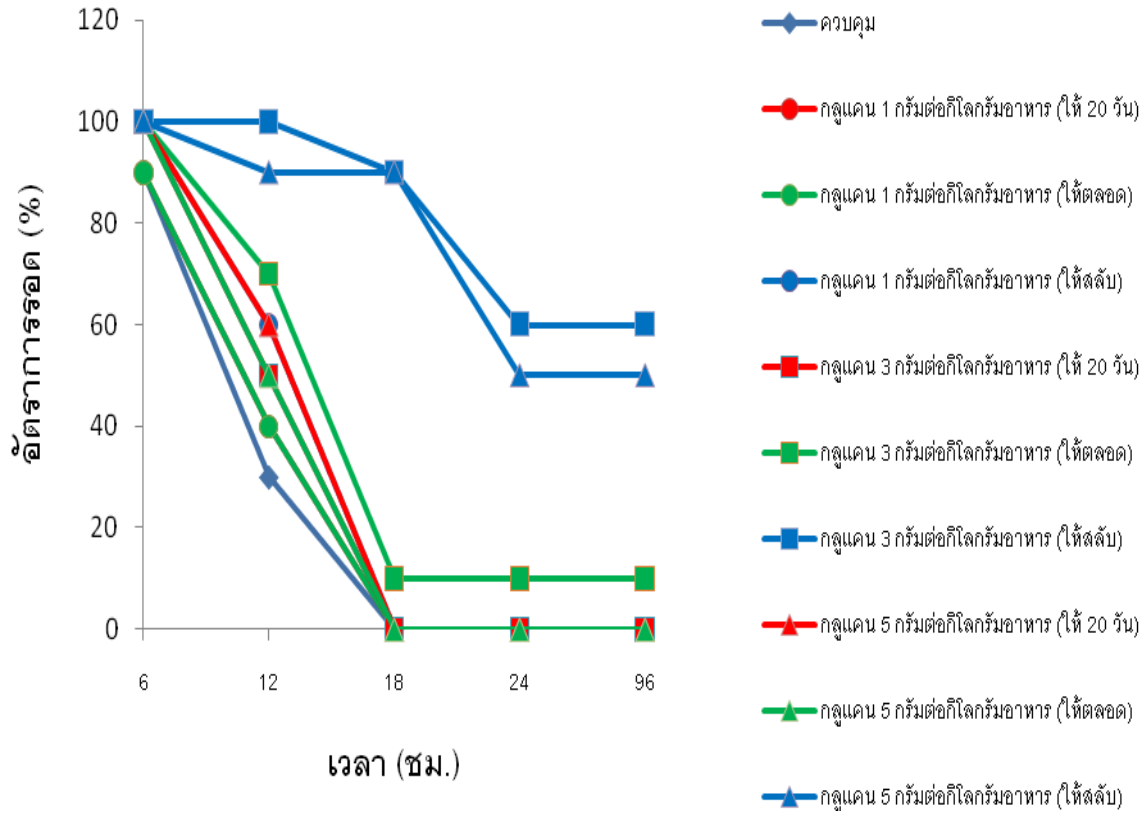


(b)



(c)

ภาพที่ 5 น้ำหนักของปลาโรซี่บาร์บในแต่ละกลุ่ม ที่ชั่งตั้งแต่เริ่มการทดลองจนสิ้นสุดการทดลอง กลุ่มที่ให้อาหารทดลอง 20 วันแล้วให้อาหารธรรมดา (a), กลุ่มที่ให้อาหารทดลองตลอดการทดลอง (b), กลุ่มที่มีการให้อาหารทดลองสลับอาหารธรรมดา (c)



ภาพที่ 6 อัตราการรอดของปลาโรซี่บาร์บเมื่อได้รับเชื้อ *Aeromonas hydrophila*

เมื่อเวลาผ่านไป 18 ชั่วโมงพบว่าอัตราการรอดเหลืออยู่แค่ 3 กลุ่มการทดลอง และกลุ่มที่มีอัตราการรอดสูงสุดอยู่ที่กลุ่มการให้อาหารทดลองสลับอาหารธรรมดาที่ให้เบต้ากลูแคน 3 และ 5 กรัมต่อกิโลกรัมอาหาร คือ 90% ทั้งสองกลุ่ม อัตราการรอดจะคงที่ตั้งแต่ 18 จนถึง 96 ชั่วโมง

จากผลการทดลองนี้ให้ผลสอดคล้องกับการทดลองของ Misra *et al.* (2006) ที่ทดลองใช้เบต้ากลูแคนที่ระดับต่างกัน 4 ระดับ คือ 0, 100, 250 และ 500 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัมอาหาร โดยทดลองกับลูกปลา *Labeo Rohita* พบว่าที่การให้เบต้ากลูแคนที่ระดับ 250 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัมอาหาร ส่งผลให้ลูกปลามีการเพิ่มภูมิคุ้มกันมากขึ้น โดยดูจากจำนวน leucocyte , อัตราส่วนของ phagocytic , แนวโน้มของ phagocytic , กิจกรรมของ lysozyme และ ระดับของซีรั่ม และเบต้ากลูแคนที่ระดับ 250 และ 500 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัมอาหารมีผลให้อัตราการเจริญเติบโตจำเพาะ(SGR) และอัตราการเปลี่ยนอาหารเป็นเนื้อ (FCR) ดีขึ้น

บทที่ 5
สรุปผลการทดลอง

จากการตรวจนับจำนวนเซลล์เม็ดเลือดของปลาโรซี่บาร์บ (*Puntius conchonius*) พบว่าปลาโรซี่บาร์บในกลุ่มที่ให้อาหารทดลองสลับอาหารธรรมดาที่ให้เบต้ากลูแคน 3 และ 5 กรัมต่อกิโลกรัมอาหาร มีจำนวนเซลล์เม็ดเลือดขาวมากที่สุด และมีปริมาณเม็ดเลือดแดงอัดแน่นน้อยที่สุด แสดงว่ามีการเพิ่มขึ้นของซีรั่ม ทำให้ปริมาณเม็ดเลือดแดงอัดแน่นลดลง

จากการเหนี่ยวนำให้เกิดโรคด้วยเชื้อ *Aeromonas hydrophila* ฉีดเข้าช่องท้องของปลาโรซี่บาร์บ พบว่าปลาโรซี่บาร์บในกลุ่มที่ให้อาหารทดลองสลับอาหารธรรมดาที่ให้เบต้ากลูแคน 3 และ 5 กรัมต่อกิโลกรัมอาหาร มีอัตราการรอดตายสูงที่สุดเมื่อสิ้นสุดการทดลอง และมีอัตราการตายช้ากว่ากลุ่มทดลองอื่นๆ ส่วนการเจริญเติบโตของปลาโรซี่บาร์บในแต่ละชุดการทดลองเมื่อสิ้นสุดการทดลองมีการเจริญเติบโตไม่แตกต่างกัน

จากการทดลองจึงสามารถกล่าวได้ว่าปลาที่ได้รับอาหารเสริมเบต้ากลูแคนที่ระดับ 3 และ 5 กรัมต่อกิโลกรัมอาหาร และระยะเวลาการให้ที่เหมาะสมที่สุดคือ การให้อาหารเสริมเบต้ากลูแคนสลับอาหารธรรมดา สามารถทำให้ปลาโรซี่บาร์บมีภูมิคุ้มกันสูงขึ้นมากที่สุด โดยทำให้ปลาโรซี่บาร์บมีความสามารถในการต่อต้านเชื้อ *Aeromonas hydrophila* ดีที่สุด และสามารถเพิ่มจำนวนเม็ดเลือดขาวและซีรั่มให้มีจำนวนมากที่สุดเมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มการทดลองอื่น

เอกสารอ้างอิง

Ai, Q., K. Mai, L. Zhang, B. Tan, W. Zhang, W. Xu and H. Li. 2007. Effects of dietary ß-1,3 glucan on innate immune response of large yellow croaker, *Pseudosciaena crocea*. Fish & Shellfish Immunology 22: 394-402.

Das, B.K. and C. Debnath, P. Patnaik, D. K. Swain, K. Kumar and B.K. Misrhra. 2009. Effect of ß-glucan on immunity and survival of early stage of *Anabas testudineus* (Bloch). Fish & Shellfish Immunology 27: 678-683.

Kumari, J. and P.K. Sahoo. 2006. Non-specific immune response of healthy and immunocompromised Asian catfish (*Clarias Batrachus*) to several immunostimulants. Aquaculture 255: 133-141.

Misra, C.K., K.D. Basanta, C.M. Sabhas and P. Phalguni. 2006. Effect of long term administration of dietary ß-glucan on immunity, growth and survival of *Labeo rohita* fingerlings. Aquaculture 255: 82-94.

Sahoo, P.K. and S.C. Mukherjee. 2001. Effect of dietary ß-1,3 glucan on immune responses and disease resistance of healthy and aflatoxin B_1-induced immunocompromised rohu (*Labeo rohita Hamilton*). Fish & Shellfish Immunology 11: 683-695.

Selvaraj, V., K. Sampath and V. Sekar. 2005. Administration of yeast glucan enhances survival and some non-specific and specific immune parameters in carp (*Cyprinus carpio*) infected with *Aeromonas hydrophila*. Fish & Shellfish Immunology 19: 293-306.

Selvaraj, V., K. Sampath and V. Sekar. 2006. Adjuvant and immunostimulatory effects of ß-glucan administration in combination with lipopolysaccharide enhances survival and some immune parameters in carp challenged with *Aeromonas hydrophila*. Veterinary Immunology and Immunopathology 114: 15-24.

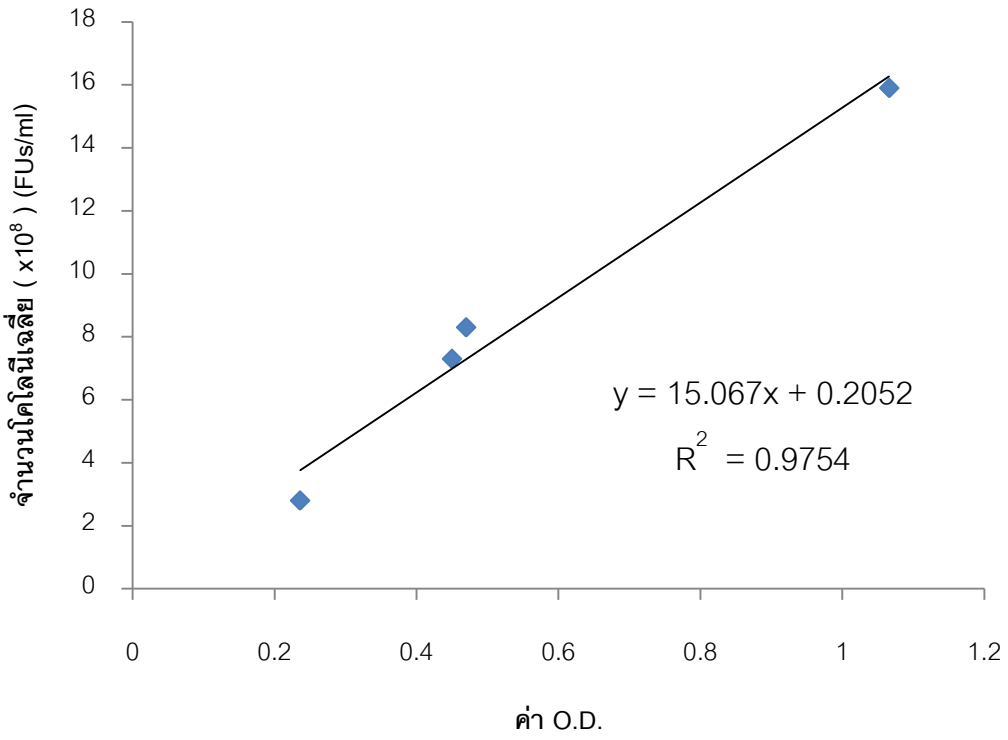
Whitting, R., C. Lim and P.H. Klesius. 2005. Effect of dietary ß-glucan level on the growth response and efficacy of *Streptococcus iniae vaccine* in Nile tilapia, *Oreochromis niloticus*. Aquaculture 248: 217-225.

www.tropicalfishprofiles.com/cyprinids/rosy-barb-puntius-conchonius

ภาคผนวก

ตารางผนวกที่ 1 ค่า O.D.ที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร ของเชื้อ *Aeromonas hydrophila* และจำนวนโคโลนีเฉลี่ยที่ความเข้มข้นต่างๆกัน

ค่า O.D.	จำนวนโคโลนีเฉลี่ย ($x10^8$)
0.236	2.8
0.45	7.3
0.47	8.3
1.066	15.9



ภาพผนวกที่ 1 กราฟมาตรฐานระหว่างค่า O.D. ที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตรและจำนวนโคโลนีเฉลี่ยของเชื้อ *Aeromonas hydrophila*

ตารางผนวกที่ 2 อัตราการรอดชีวิตของปลาโรซี่บาร์บ (*Puntius conchonius*) หลังจากได้รับเชื้อ *Aeromonas hydrophila* ที่เวลาต่างๆกัน

กลุ่มการทดลอง		อัตราการรอด (%) ที่เวลา (ชั่วโมง)				
		6	12	18	24	96
ควบคุม (1)	ให้ 20 วัน	90	20	0	0	0
ควบคุม (2)	ให้ตลอด	90	40	0	0	0
ควบคุม (3)	ให้สลับ	90	30	0	0	0
เบต้ากลูแคน 1 กรัม/กิโลกรัมอาหาร	ให้ 20 วัน	90	40	0	0	0
เบต้ากลูแคน 1 กรัม/กิโลกรัมอาหาร	ให้ตลอด	90	40	0	0	0
เบต้ากลูแคน 1 กรัม/กิโลกรัมอาหาร	ให้สลับ	100	60	0	0	0
เบต้ากลูแคน 3 กรัม/กิโลกรัมอาหาร	ให้ 20 วัน	100	50	0	0	0
เบต้ากลูแคน 3 กรัม/กิโลกรัมอาหาร	ให้ตลอด	100	70	10	10	10
เบต้ากลูแคน 3 กรัม/กิโลกรัมอาหาร	ให้สลับ	100	100	90	60	60
เบต้ากลูแคน 5 กรัม/กิโลกรัมอาหาร	ให้ 20 วัน	100	60	0	0	0
เบต้ากลูแคน 5 กรัม/กิโลกรัมอาหาร	ให้ตลอด	100	50	0	0	0
เบต้ากลูแคน 5 กรัม/กิโลกรัมอาหาร	ให้สลับ	100	90	90	50	50

ตารางผนวกที่ 3 เปอร์เซ็นต์เซลล์เม็ดเลือดขาว และเม็ดเลือดแดงของปลาโรซี่บาร์บ (*Puntius conchonius*)

กลุ่มการทดลอง		จำนวนเซลล์เม็ดเลือด (%)	
		เม็ดเลือดขาว	เม็ดเลือดแดง
ควบคุม (1)	ให้ 20 วัน	1.67	98.33
ควบคุม (2)	ให้ตลอด	1.67	98.33
ควบคุม (3)	ให้สลับ	1.67	98.33
เบต้ากลูแคน 1 กรัม/กิโลกรัมอาหาร	ให้ 20 วัน	1.67	98.33
เบต้ากลูแคน 1 กรัม/กิโลกรัมอาหาร	ให้ตลอด	1.67	98.33
เบต้ากลูแคน 1 กรัม/กิโลกรัมอาหาร	ให้สลับ	3.33	96.67
เบต้ากลูแคน 3 กรัม/กิโลกรัมอาหาร	ให้ 20 วัน	2.00	98.00
เบต้ากลูแคน 3 กรัม/กิโลกรัมอาหาร	ให้ตลอด	3.67	96.33
เบต้ากลูแคน 3 กรัม/กิโลกรัมอาหาร	ให้สลับ	7.33	92.67
เบต้ากลูแคน 5 กรัม/กิโลกรัมอาหาร	ให้ 20 วัน	3.67	96.33
เบต้ากลูแคน 5 กรัม/กิโลกรัมอาหาร	ให้ตลอด	4.33	95.67
เบต้ากลูแคน 5 กรัม/กิโลกรัมอาหาร	ให้สลับ	7.33	92.67

ตารางผนวกที่ 4 น้ำหนักเฉลี่ยของปลาโรซี่บาร์บ (*Puntius conchonius*) เริ่มต้นและสิ้นสุดการทดลอง

กลุ่มการทดลอง		น้ำหนักปลาโรซี่บาร์บ (กรัม)	
		เริ่มต้น	สุดท้าย
ควบคุม (1)	ให้ 20 วัน	1.3	1.94
ควบคุม (2)	ให้ตลอด	1.32	1.89
ควบคุม (3)	ให้สลับ	1.28	1.88
เบต้ากลูแคน 1 กรัม/กิโลกรัมอาหาร	ให้ 20 วัน	1.29	1.91
เบต้ากลูแคน 1 กรัม/กิโลกรัมอาหาร	ให้ตลอด	1.3	1.86
เบต้ากลูแคน 1 กรัม/กิโลกรัมอาหาร	ให้สลับ	1.3	1.93
เบต้ากลูแคน 3 กรัม/กิโลกรัมอาหาร	ให้ 20 วัน	1.32	1.94
เบต้ากลูแคน 3 กรัม/กิโลกรัมอาหาร	ให้ตลอด	1.29	1.91
เบต้ากลูแคน 3 กรัม/กิโลกรัมอาหาร	ให้สลับ	1.29	1.85
เบต้ากลูแคน 5 กรัม/กิโลกรัมอาหาร	ให้ 20 วัน	1.31	1.95
เบต้ากลูแคน 5 กรัม/กิโลกรัมอาหาร	ให้ตลอด	1.32	1.94
เบต้ากลูแคน 5 กรัม/กิโลกรัมอาหาร	ให้สลับ	1.33	1.94