

การตอบสนองทางภูมิคุ้มกันของปลากะพงขาว (*Lates calcarifer*, Bloch)
ต่อการเสริมอาหารด้วยไคโตซาน

กัญช์ เกศมณี

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต
สาขาชีววาริชศาสตร์
คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา
พฤษภาคม 2553
ลิขสิทธิ์เป็นของมหาวิทยาลัยบูรพา

การวิจัยได้รับทุนอุดหนุนการทำวิทยานิพนธ์ประจำปีงบประมาณ 2552 จากคณะวิทยาศาสตร์
มหาวิทยาลัยบูรพา และ ทุนวิจัยจากสภาวิจัยแห่งชาติใน โครงการการสำรวจทางชีวภาพ
ในสัตว์น้ำเศรษฐกิจตามแนวชายฝั่งทะเลจังหวัดชลบุรีและการจัดการ
ความเสี่ยงเบื้องต้นต่อสาร PAHs ในหอยแมลงภู่

ประกาศคุณูปการ

วิทยานิพนธ์ฉบับนี้สำเร็จลงได้ด้วยความกรุณาจาก ผศ.ดร.ปภาศิริ บาร์เนท อาจารย์ที่ปรึกษาหลัก และ รศ.ดร.กเชนทร เกลิมวัฒน์ อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม ที่กรุณาให้คำปรึกษาแนะนำแนวทาง ตลอดจนแก้ไขข้อบกพร่องต่าง ๆ ด้วยความละเอียดถี่ถ้วนและเอาใจใส่ด้วยดีเสมอมา ผู้เขียนรู้สึกซาบซึ้งเป็นอย่างยิ่ง จึงขอกราบขอบพระคุณเป็นอย่างสูงมา ณ โอกาสนี้

ขอขอบพระคุณในความเอื้อเฟื้อของคุณวาสนา มณีรัตน์ ที่ได้ให้ความรู้และความอนุเคราะห์เรื่องสถานที่เลี้ยงปลากะพงขาวภายในฟาร์มทะเลทอง ตลอดจนพี่ ๆ น้อง ๆ และเจ้าหน้าที่ประจำฟาร์มทะเลทองทุกคน ที่ให้ความร่วมมือและช่วยเหลือในการเก็บตัวอย่างและรวบรวมข้อมูลที่ใช้ในงานวิจัยเป็นอย่างดี

เนื่องจากการวิจัยครั้งนี้ได้รับความอนุเคราะห์ Mouse monoclonal anti-seabass immunoglobulin จาก ดร.ศุภลักษณ์ พุดินแวรรัตน์ สถาบันวิจัยสุขภาพสัตว์น้ำจืด กรมประมง และสารละลาย Eugenol เพื่อใช้ในการสลบปลาจาก อ.สพ.ญ.วรรณศิริมานะพงษ์ คณะสัตวแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล จึงขอขอบพระคุณทั้งสองท่านมา ณ ที่นี้ด้วย

ผู้วิจัยขอขอบพระคุณการสนับสนุนโดยทุนอุดหนุนการทำวิทยานิพนธ์ของ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา และทุนวิจัยจากสภาวิจัยแห่งชาติในโครงการการสำรวจทางชีวภาพในสัตว์น้ำเศรษฐกิจตามแนวชายฝั่งทะเลจังหวัดชลบุรีและการจัดการความเสี่ยงเบื้องต้นต่อสาร PAHs ในหอยแมลงภู่

ขอกราบขอบพระคุณคุณพ่อและคุณแม่ เพื่อน พี่น้องทุก ๆ คนที่ให้คำแนะนำ กำลังใจ และสนับสนุนผู้วิจัยเสมอมา

คุณค่าและประโยชน์ของวิทยานิพนธ์ฉบับนี้ ผู้วิจัยขอบเป็นกตัญญูคุณเวทิตาแด่ บุพการี บุรพจารย์ และผู้มีพระคุณทุกท่านตั้งแต่อดีตจนถึงปัจจุบัน ที่ทำให้ข้าพเจ้าเป็นผู้มี การศึกษาและประสบความสำเร็จมาครบเท่าทุกวันนี้

กัญช์ เกตุคณี

50910378: สาขาวิชา: วาริชศาสตร์; วท.ม. (วาริชศาสตร์)

คำสำคัญ: ไคโตซาน/ ปลากระพงขาว/ ภูมิคุ้มกัน

กัญช์ เกตุกมล: การตอบสนองทางภูมิคุ้มกันของปลากระพงขาว (*Lates calcarifer*, Bloch)

ต่อการเสริมอาหารด้วยไคโตซาน (IMMUNE RESPONSE OF ASIAN SEABASS (*Lates calcarifer*, Bloch), FOLLOWING DIET SUPPLEMENTATION WITH CHITOSAN)

คณะกรรมการควบคุมวิทยานิพนธ์: ปภาศิริ บาร์เนท, Ph.D., คเชนทร เฉลิมวัฒน์, Ph.D. 97 หน้า.
ปี พ.ศ. 2553.

งานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อหาปริมาณไคโตซานเสริมอาหารที่เหมาะสมต่ออัตราการเจริญเติบโต ภูมิคุ้มกันแบบจำเพาะและไม่จำเพาะของลูกปลากระพงขาว รวมถึงศึกษาประสิทธิภาพของการเสริมไคโตซานในอาหารต่ออัตราการตายหลังทดสอบการติดเชื้อแบคทีเรีย *Vibrio harveyi* ในการทดลองที่ 1 ผลการเสริมไคโตซานในปริมาณร้อยละ 0, 0.5, 1.0 และ 1.5 ของน้ำหนักอาหารเม็ด เพื่อใช้เลี้ยงปลากระพงขาวน้ำหนักเริ่มต้นเฉลี่ย 41.05 ± 7.55 กรัม พบว่า การเสริมไคโตซานปริมาณร้อยละ 1.0 ของน้ำหนักอาหารต่อเนื่องเป็นเวลา 47 วัน ช่วยเพิ่มประสิทธิภาพการเก็บกินสิ่งแปลกปลอมและการสร้างสารซูเปอร์ออกไซด์ของเซลล์มาโครฟาจที่ใดส่วนหน้าได้อย่างมีนัยสำคัญ ($P < 0.05$) นอกจากนี้ยังพบว่า การเสริมไคโตซานในอาหารปริมาณร้อยละ 1.5 ของน้ำหนักอาหารเป็นเวลา 7 – 36 วัน มีแนวโน้มว่าสามารถช่วยเพิ่มประสิทธิภาพการทำงานของระบบภูมิคุ้มกันแบบจำเพาะของปลากระพงขาวได้เช่นกัน โดยมีผลเพิ่มปริมาณอิมมูโนโกลบูลินรวมในกระแสเลือดให้สูงขึ้น ในการทดลองที่ 2 ผลการเสริมไคโตซานในปริมาณร้อยละ 0 และ 1.0 ของน้ำหนักอาหารเม็ด เพื่อใช้เลี้ยงลูกปลากระพงขาวน้ำหนักเริ่มต้นเฉลี่ย 6.80 ± 0.96 กรัม เป็นเวลา 49 วัน พบว่าการเสริมไคโตซานปริมาณร้อยละ 1.0 ของน้ำหนักอาหาร ต่อเนื่องเป็นเวลา 49 วัน ช่วยเร่งการเจริญเติบโตของลูกปลากระพงขาวได้อย่างมีนัยสำคัญ ($P < 0.05$) และมีแนวโน้มว่าช่วยลดอัตราการตายจากการทดสอบการติดเชื้อแบคทีเรีย *V. harveyi* และเพิ่มประสิทธิภาพความคุ้มโรคได้ถึงร้อยละ 75

50910378: MAJOR: AQUATIC SCIENCE; M.Sc. (AQUATIC SCIENCE)

KEYWORDS: CHITOSAN/ *Lates calcarifer*, Bloch/ IMMUNE

KAN KLEDMANEE: IMMUNE RESPONSE OF ASIAN SEABASS (*Lates calcarifer*, Bloch), FOLLOWING DIET SUPPLEMENTATION WITH CHITOSAN.

ADVISORY COMMITTEE: PRAPASIRI BARNETTE, Ph.D., KACHANE CHALERMWAT, Ph.D. 97 P. 2010.

This study aims to investigate the effect of chitosan - coated diets on growth and immune responses of Asian Seabass (*Lates calcarifer*, Bloch). In the first experiment, fish (average initial body weight 41.05 ± 7.55 g) were fed with diet supplemented with 0, 0.5, 1.0 and 1.5% chitosan by pellet weight within 47 days. Results show that phagocytic activities by head kidney macrophages of fish fed with 1.0% chitosan by pellet weight at day 47 did significantly increased ($P < 0.05$). Fish fed with 1.5% chitosan by pellet weight tended to have higher total plasma immunoglobulin levels on day 7 – 36. In the second experiment, fish (average initial body weight 6.80 ± 0.96 g) were fed with diets supplemented with 0 and 1.0% chitosan by pellet weight within 49 days. Growth of chitosan supplemented fish was significantly higher than the non-chitosan supplemented group ($P < 0.05$). Fish fed with 1.0% chitosan by pellet weight at day 49 tended to have lower mortality, as relative percentage survival was 75%, when challenged by the pathogen *Vibrio harveyi*.

สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อภาษาไทย.....	จ
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ.....	ฉ
สารบัญ.....	ช
สารบัญตาราง.....	ฌ
สารบัญภาพ.....	ฎ
บทที่	
1 บทนำ.....	1
ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา.....	1
วัตถุประสงค์ของการวิจัย.....	2
สมมติฐานของการวิจัย.....	2
ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับการวิจัย.....	3
ขอบเขตของการวิจัย.....	3
2 เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง.....	5
ปลากระพงขาว.....	5
ระบบภูมิคุ้มกันของปลา (Fish immunity).....	6
สารกระตุ้นภูมิคุ้มกัน (Immunostimulants).....	7
Polysaccharide Biological Response Modifiers.....	9
ไคติน-ไคโตซาน (Chitin-chitosan).....	10
บทบาทของไคโตซานต่อการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำ.....	14
กลไกการกระตุ้นภูมิคุ้มกันของไคโตซาน.....	16
บททวนเอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง.....	16

สารบัญ (ต่อ)

บทที่	หน้า
3 วิธีดำเนินการวิจัย.....	19
อุปกรณ์และสารเคมี.....	19
การเลี้ยงปลาทดลองและการตรวจวัดคุณภาพน้ำ.....	23
การเตรียมอาหารทดลอง.....	23
การเตรียมสารละลายโคโคซาน.....	23
การทดสอบทางภูมิคุ้มกัน.....	24
การวิเคราะห์ทางสถิติ.....	34
4 ผลการวิจัย.....	35
การทดลองที่ 1.....	35
การทดลองที่ 2.....	37
5 วิจัยและสรุปผลการวิจัย.....	63
การทดลองที่ 1.....	63
การทดลองที่ 2.....	69
สรุปผลการวิจัย.....	71
ข้อเสนอแนะ.....	72
บรรณานุกรม.....	73
ภาคผนวก.....	81
ประวัติย่อของผู้วิจัย.....	85

สารบัญตาราง

ตารางที่	หน้า
1 สารกระตุ้นภูมิคุ้มกันที่ใช้ในวงการเพาะเลี้ยงปลาและกุ้ง.....	8
2 ค่าเฉลี่ยความยาว (Total length) หน่วยเป็นเซนติเมตร ของปลากะพงขาว ที่ได้รับการเสริมโคโคซานในปริมาณแตกต่างกัน เป็นระยะเวลา 47 วัน.....	39
3 ค่าเฉลี่ยความกว้างลำตัว (Body width) หน่วยเป็นเซนติเมตรของปลากะพงขาว ที่ได้รับการเสริมโคโคซานในปริมาณแตกต่างกัน เป็นระยะเวลา 47 วัน.....	40
4 ค่าเฉลี่ยน้ำหนักตัว (Body weight) หน่วยเป็นกรัมของปลากะพงขาว ที่ได้รับการเสริมโคโคซานในปริมาณแตกต่างกัน เป็นระยะเวลา 47 วัน.....	41
5 ค่าเฉลี่ยพารามิเตอร์ด้านการเจริญเติบโตของปลากะพงขาว ที่ได้รับการเสริมโคโคซานในปริมาณแตกต่างกัน เป็นระยะเวลา 47 วัน.....	42
6 ปริมาณเม็ดเลือดขาวรวมในเลือด ($\times 10^3$ เซลล์/มิลลิลิตร) ของปลากะพงขาว ที่ได้รับการเสริมโคโคซานในปริมาณแตกต่างกัน เป็นระยะเวลา 47 วัน.....	44
7 จำนวนเม็ดเลือดขาวชนิด Small lymphocyte คิดเป็นร้อยละของเม็ดเลือดขาว ในปลากะพงขาวที่ได้รับการเสริมโคโคซานในปริมาณแตกต่างกัน เป็นระยะเวลา 47 วัน.....	45
8 จำนวนเม็ดเลือดขาวชนิด Large lymphocyte คิดเป็นร้อยละของเม็ดเลือดขาว ในปลากะพงขาวที่ได้รับการเสริมโคโคซานในปริมาณแตกต่างกัน เป็นระยะเวลา 47 วัน.....	46
9 จำนวนเม็ดเลือดขาวชนิด Neutrophil คิดเป็นร้อยละของเม็ดเลือดขาว ในปลากะพงขาวที่ได้รับการเสริมโคโคซานในปริมาณแตกต่างกัน เป็นระยะเวลา 47 วัน.....	47
10 จำนวนเม็ดเลือดขาวชนิด Monocyte คิดเป็นร้อยละของเม็ดเลือดขาว ในปลากะพงขาวที่ได้รับการเสริมโคโคซานในปริมาณแตกต่างกัน เป็นระยะเวลา 47 วัน.....	48
11 ปริมาณโปรตีนรวมในเลือด (Total plasma protein; TPP) ของปลากะพงขาว ที่ได้รับการเสริมโคโคซานในปริมาณแตกต่างกัน เป็นระยะเวลา 47 วัน.....	49

สารบัญตาราง (ต่อ)

ตารางที่	หน้า
12 ปริมาณอิมมูโนโกลบูลินในเลือด (Total plasma Immunoglobulin; TPIg) ของปลากะพงขาวที่ได้รับการเสริมโคโตซานในปริมาณแตกต่างกัน เป็นระยะเวลา 47 วัน.....	50
13 Phagocytosis percentage (PP) และ Phagocytic index (PI) ของปลากะพงขาว ที่ได้รับการเสริมโคโตซานในปริมาณแตกต่างกัน เป็นระยะเวลา 47 วัน.....	51
14 ค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 620 nm ของ Nitroblue tetrazolium reduction เมื่อ กระตุ้นด้วยสาร HBSS และ PMA โดยเซลล์เม็ดเลือดขาวจากไตของปลากะพงขาวที่ได้รับการเสริมโคโตซานในปริมาณแตกต่างกัน เป็นระยะเวลา 47 วัน.....	52
15 ค่าเฉลี่ยความยาว (Total length) หน่วยเป็นเซนติเมตร ของลูกปลากะพงขาว ที่ได้รับการเสริมโคโตซานในปริมาณแตกต่างกัน เป็นระยะเวลา 49 วัน.....	54
16 ค่าเฉลี่ยความกว้างลำตัว (Body width) หน่วยเป็นเซนติเมตรของลูกปลากะพงขาว ที่ได้รับการเสริมโคโตซานในปริมาณแตกต่างกัน เป็นระยะเวลา 49 วัน.....	55
17 ค่าเฉลี่ยน้ำหนักตัว (Body weight) หน่วยเป็นกรัมของลูกปลากะพงขาว ที่ได้รับการเสริมโคโตซานในปริมาณแตกต่างกัน เป็นระยะเวลา 49 วัน.....	56
18 ค่าเฉลี่ยพารามิเตอร์ด้านการเจริญเติบโตของลูกปลากะพงขาวที่ได้รับการเสริมโคโตซาน ในปริมาณแตกต่างกัน เป็นระยะเวลา 49 วัน.....	58
19 อัตราตายเฉลี่ยเป็นร้อยละของลูกปลากะพงขาวที่ได้รับการเสริมโคโตซานในปริมาณ แตกต่างกัน หลังฉีดน้ำเกลือปลอดเชื้อเข้มข้นร้อยละ 0.85 และเชื้อแบคทีเรีย <i>V. harveyi</i> เข้าทางช่องท้อง.....	60
20 ประสิทธิภาพความคุ้มโรค (Relative Percent Survival; RPS) ของลูกปลากะพงขาว ที่รับการเสริมโคโตซานในปริมาณแตกต่างกัน เป็นเวลา 49 วัน หลังฉีดเชื้อแบคทีเรีย <i>V. harveyi</i> เข้าช่องท้อง.....	62

สารบัญภาพ

ภาพที่		หน้า
1	ปลากะพงขาว <i>Lates calcarifer</i> , Bloch ขนาดโตเต็มวัย.....	5
2	แผนภาพแสดงการกระตุ้นเซลล์ในระบบภูมิคุ้มกัน โดย Polysaccharide BRMs	9
3	โครงสร้างทางเคมีของเซลลูโลส ไคติน และไคโตซาน.....	11
4	โครงสร้างการจัดเรียงตัวของเส้นใยไคติน 3 รูปแบบ.....	12
5	หลักการสำคัญในการผลิตไคตินและไคโตซานจากเปลือกกุ้ง.....	13
6	แผนการทดลองที่ 1.....	26
7	แผนการทดลองที่ 2.....	33
8	ค่าเฉลี่ยความยาว (Total length) หน่วยเป็นเซนติเมตร ของปลากะพงขาว ที่ได้รับการเสริมไคโตซานในปริมาณแตกต่างกัน เป็นระยะเวลา 47 วัน.....	39
9	ค่าเฉลี่ยความกว้างลำตัว (Body width) หน่วยเป็นเซนติเมตรของปลากะพงขาว ที่ได้รับการเสริมไคโตซานในปริมาณแตกต่างกัน เป็นระยะเวลา 47 วัน.....	40
10	ค่าเฉลี่ยน้ำหนักตัว (Body weight) หน่วยเป็นกรัมของปลากะพงขาว ที่ได้รับการเสริมไคโตซานในปริมาณแตกต่างกัน เป็นระยะเวลา 47 วัน.....	41
11	ค่าเฉลี่ยพารามิเตอร์ด้านการเจริญเติบโตของปลากะพงขาว ที่ได้รับการเสริมไคโตซานในปริมาณแตกต่างกัน เป็นระยะเวลา 47 วัน.....	43
12	ปริมาณเม็ดเลือดขาวรวมในเลือด ($\times 10^3$ เซลล์/มิลลิลิตร) ของปลากะพงขาว ที่ได้รับการเสริมไคโตซานในปริมาณแตกต่างกัน เป็นระยะเวลา 47 วัน.....	44
13	จำนวนเม็ดเลือดขาวชนิด Small lymphocyte คิดเป็นร้อยละของเม็ดเลือดขาว ในปลากะพงขาวที่ได้รับการเสริมไคโตซานในปริมาณแตกต่างกัน เป็นระยะเวลา 47 วัน.....	45
14	จำนวนเม็ดเลือดขาวชนิด Large lymphocyte คิดเป็นร้อยละของเม็ดเลือดขาว ในปลากะพงขาวที่ได้รับการเสริมไคโตซานในปริมาณแตกต่างกัน เป็นระยะเวลา 47 วัน.....	46
15	จำนวนเม็ดเลือดขาวชนิด Neutrophil คิดเป็นร้อยละของเม็ดเลือดขาว ในปลากะพงขาวที่ได้รับการเสริมไคโตซานในปริมาณแตกต่างกัน เป็นระยะเวลา 47 วัน.....	47

สารบัญภาพ (ต่อ)

ภาพที่	หน้า
16 จำนวนเม็ดเลือดขาวชนิด Monocyte คิดเป็นร้อยละของเม็ดเลือดขาว ในปลากระพงขาวที่ได้รับการเสริมโคโคซานในปริมาณแตกต่างกัน เป็นระยะเวลา 47 วัน.....	48
17 ปริมาณโปรตีนรวมในเลือด (Total plasma protein; TPP) ของปลากระพงขาว ที่ได้รับการเสริมโคโคซานในปริมาณแตกต่างกัน เป็นระยะเวลา 47 วัน.....	49
18 ปริมาณอิมมูโนโกลบูลินในเลือด (Total plasma Immunoglobulin; TPIg) ของปลากระพงขาวที่ได้รับการเสริมโคโคซานในปริมาณแตกต่างกัน เป็นระยะเวลา 47 วัน.....	50
19 Phagocytosis percentage (PP) และ Phagocytic index (PI) ของปลากระพงขาว ที่ได้รับการเสริมโคโคซานในปริมาณแตกต่างกัน เป็นระยะเวลา 47 วัน.....	51
20 ค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 620 nm ของ Nitroblue tetrazolium reduction เมื่อกระตุ้นด้วยสาร HBSS และ PMA โดยเซลล์เม็ดเลือดขาวจากไตของปลากระพงขาวที่ ได้รับการเสริมโคโคซานในปริมาณแตกต่างกันเป็นระยะเวลา 47 วัน.....	53
21 ค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 620 nm ของ Nitroblue tetrazolium reduction เมื่อกระตุ้นด้วยสาร HBSS และ PMA โดยเซลล์เม็ดเลือดขาวจากไตของปลากระพงขาวหลัง ได้รับการเสริมโคโคซานในปริมาณแตกต่างกันเป็นเวลา 47 วัน.....	53
22 ค่าเฉลี่ยความยาว (Total length) หน่วยเป็นเซนติเมตร ของลูกปลากระพงขาว ที่ได้รับการเสริมโคโคซานในปริมาณแตกต่างกัน เป็นระยะเวลา 47 วัน.....	54
23 ค่าเฉลี่ยความกว้างลำตัว (Body width) หน่วยเป็นเซนติเมตรของลูกปลากระพงขาว ที่ได้รับการเสริมโคโคซานในปริมาณแตกต่างกัน เป็นระยะเวลา 49 วัน.....	55
24 ค่าเฉลี่ยน้ำหนักตัว (Body weight) หน่วยเป็นกรัมของลูกปลากระพงขาว ที่ได้รับการเสริมโคโคซานในปริมาณแตกต่างกัน เป็นระยะเวลา 47 วัน.....	57
25 ค่าเฉลี่ยพารามิเตอร์ด้านการเจริญเติบโตของลูกปลากระพงขาวที่ได้รับการเสริมโคโคซาน ในปริมาณแตกต่างกัน เป็นระยะเวลา 49 วัน.....	59
26 อัตราตายเฉลี่ยเป็นร้อยละของลูกปลากระพงขาวที่ได้รับการเสริมโคโคซานในปริมาณ แตกต่างกัน หลังฉีดน้ำเกลือปลอดเชื้อเข้มข้นร้อยละ 0.85 และเชื้อแบคทีเรีย <i>V. harveyi</i> เข้าทางช่องท้อง.....	61