บทที่ 1
บทนำ

ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา

ปลากะพงขาว (*Lates calcarifer*, Bloch) เป็นปลาน้ำกร่อยที่มีความสำคัญทางเศรษฐกิจและมีการเพาะเลี้ยงอย่างแพร่หลายในแถบพื้นที่ชายฝั่งทะเล เนื่องจากเป็นปลาที่เลี้ยงง่ายตั้งแต่ในน้ำจืด กร่อย ไปจนถึงน้ำเค็ม ทั้งยังเจริญเติบโตเร็วและให้เนื้อรสชาติดี เป็นที่ต้องการของผู้บริโภคทั่วไปทั้งในและต่างประเทศ สภาพการเลี้ยงปลาแบบหนาแน่นเพื่อให้ได้ผลผลิตต่อพื้นที่สูงขึ้น อาจส่งผลกระทบต่อสุขภาพปลา ทำให้ปลาป่วยเป็นโรคได้ง่ายขึ้น ก่อให้เกิดความเสียหายต่อผลผลิตและสูญเสียต้นทุนการเลี้ยง แม้ว่าจะมีการใช้ยาปฏิชีวนะและสารเคมีเพื่อป้องกัน รักษาและควบคุมโรคที่เกิดขึ้นในระบบการเพาะเลี้ยงก็ตาม แต่การใช้ยาและสารเคมีเหล่านั้นในชนิดและปริมาณที่ไม่เหมาะสมมีโอกาสทำให้เกิดปัญหาการดื้อยาทั้งในปลาและผู้บริโภคได้ (Anderson, 1992) รวมไปถึงปัญหาสารตกค้างในผลิตภัณฑ์สัตว์น้ำและสิ่งแวดล้อมอันเป็นปัญหาสำคัญที่มีผลกระทบทางเศรษฐกิจของชาติอยู่ในปัจจุบัน การใช้สารกระตุ้นภูมิคุ้มกัน (Immunostimulant) เพื่อเพิ่มความต้านทานโรคจึงเป็นอีกทางเลือกหนึ่งในการจัดการสุขภาพปลากะพงขาว (Vadstein, 1997; Gannam & Schrock, 2001)

ในช่วง 10 ปีที่ผ่านมา ไคโตซาน (Chitosan) ถูกนำมาศึกษาเพื่อใช้เป็นสารกระตุ้นภูมิคุ้มกันปลาอีกด้านหนึ่ง นอกเหนือจากการใช้ประโยชน์ด้านการจัดการคุณภาพน้ำ อาหารเสริม และสารควบคุมการปลดปล่อยวัคซีน ที่ได้ถูกนำมาประยุกต์ใช้ในวงการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำกันอย่างแพร่หลาย (อนวัช บุญญภักดี และคณะ, 2550; Romøren et al., 2002; Chung et al. 2005; Kumar et al., 2008) ไคโตซานมีศักยภาพในการเป็นสารกระตุ้นภูมิคุ้มกันเนื่องจากสามารถกระตุ้นการทำงานของเซลล์ในระบบภูมิคุ้มกันได้หลายชนิด เช่น Antigen Presenting Cells และ T lymphocytes (Porporatto et al., 2003; 2005) อีกทั้งการศึกษาต่อมายังพบว่าโมเลกุลของไคโตซานจะเข้าจับกับ Mannose Receptor บนเซลล์มาโครฟาจและกระตุ้นการทำงานของเซลล์ได้ (Mori et al., 2005; Han et al., 2005) สำหรับงานวิจัยด้านสัตว์น้ำก่อนหน้านี้พบว่า ไคโตซานสามารถกระตุ้นภูมิคุ้มกันแบบไม่จำเพาะ (Non-specific immunity) ในปลา Rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*), Japanese flounder (*Paralichthys olivaceus*) และปลาคาร์พ (*Cyprinus carpio*) ได้ (Siwicki et al., 1994; Gopalakannan & Arul, 2006; Cha et al., 2008) เมื่อปลามีสุขภาพแข็งแรงและต้านทานโรคได้ดี ย่อมส่งผลให้ปลาเจริญเติบโตเร็ว ทนต่อสภาวะแวดล้อมที่แปรปรวนได้ดี

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

อัตรารอดสูง (Gannam & Schrock, 2001) และช่วยให้เกษตรกรดำเนินธุรกิจการเพาะเลี้ยงปลาได้อย่างมีประสิทธิภาพและยั่งยืนต่อไป อย่างไรก็ตาม แม้จะมีรายงานการใช้สารกระตุ้นภูมิคุ้มกันมากขึ้น แต่กลับยังไม่เคยมีการศึกษาเกี่ยวกับบทบาทของไคโตซานในแง่ของการใช้เป็นสารกระตุ้นภูมิคุ้มกันในปลากะพงขาวอย่างจริงจังมาก่อน ซึ่งไคโตซานได้มีการจำหน่ายอยู่แล้วในท้องตลาด สามารถหาซื้อได้ง่ายและราคาถูก ปลากะพงขาวได้ถูกรายงานการป่วยและตายด้วยโรคติดเชื้อแบคทีเรียแกรมลบกลุ่ม *Vibrio* spp. และ *Photobacterium damselae* ssp. *damselae* (Renault et al., 1994; Kumar et al., 2008; Sasmita, 2009) ดังนั้นเพื่อให้เกิดประโยชน์สำหรับเกษตรกรผู้เพาะเลี้ยงปลากะพงขาวและผู้สนใจต่อไปในอนาคต ควรมีการศึกษาเพิ่มเติมเกี่ยวกับปริมาณไคโตซานและระยะเวลาการใช้ที่เหมาะสม ในการเสริมสร้างภูมิคุ้มกันและเพิ่มความสามารถต้านทานโรคติดเชื้อ *Vibrio harveyi* ในปลากะพงขาว

วัตถุประสงค์ของการวิจัย

1. หาปริมาณร้อยละของไคโตซานที่เสริมในอาหารเม็ดสำเร็จรูปและระยะเวลาการใช้ที่เหมาะสมต่ออัตราการเจริญเติบโต ภูมิคุ้มกันแบบจำเพาะและไม่จำเพาะของปลากะพงขาว
2. ศึกษาผลของการเสริมอาหารด้วยปริมาณไคโตซานที่ต่างกันในการป้องกันการเกิดโรคและการตายหลังได้รับเชื้อแบคทีเรีย *V. harveyi* เข้าช่องท้อง

สมมติฐานของการวิจัย

1. ปลากะพงขาวที่กินอาหารเสริมไคโตซานมีอัตราการเจริญเติบโตสูงกว่าปลากะพงขาวที่กินอาหารสูตรปกติ
2. ปลากะพงขาวที่กินอาหารเสริมไคโตซานมีภูมิคุ้มกันแบบไม่จำเพาะและจำเพาะที่มีประสิทธิภาพดีกว่าปลากะพงขาวที่กินอาหารสูตรปกติ
3. ปลากะพงขาวที่กินอาหารเสริมไคโตซานมีอัตราป่วยและตายจากการติดเชื้อน้อยกว่าปลากะพงขาวที่กินอาหารสูตรปกติ

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับจากการวิจัย

1. เป็นแนวทางในการใช้ไคโตซานผสมอาหารเพื่อกระตุ้นภูมิคุ้มกันของปลากะพงขาว ให้สามารถต้านทานโรคที่เกิดขึ้นในการเพาะเลี้ยงได้อย่างเหมาะสม ไม่สิ้นเปลือง

2. ลดต้นทุนของเกษตรกรผู้เลี้ยง เนื่องจากลดการสูญเสียผลผลิตจากการเกิดโรค ทำให้มีรายได้เพิ่มขึ้น

3. ลดการใช้ยาปฏิชีวนะและสารเคมีเพื่อป้องกัน รักษา และควบคุมโรคในระบบการเพาะเลี้ยงปลากะพงขาว ซึ่งนำไปสู่ปัญหาการตกค้างของยาและสารเคมี รวมถึงการดื้อยาของเชื้อก่อโรคทั้งในปลาหรือสัตว์น้ำชนิดอื่น ๆ และมนุษย์

4. เป็นทางเลือกหนึ่งในการวางแผนการจัดการสุขภาพปลากะพงขาวในระบบการเพาะเลี้ยงแบบชีวภาพ

5. ส่งเสริมการใช้ผลิตภัณฑ์ไคโตซานซึ่งสามารถผลิตได้จากวัตถุดิบเหลือใช้ (เปลือกกุ้ง กระดองปู) ภายในประเทศ ทดแทนการนำเข้าผลิตภัณฑ์หรือยาปฏิชีวนะจากต่างประเทศ

ขอบเขตของการวิจัย

แบ่งเป็น 3 ส่วน ได้แก่

1. การผลิตอาหารทดลอง

2. การทดลองที่ 1: ผลของการเสริมอาหารด้วยไคโตซานต่ออัตราการเจริญเติบโตและภูมิคุ้มกันแบบไม่จำเพาะและจำเพาะของปลากะพงขาว

3. การทดลองที่ 2: ผลของการเสริมอาหารด้วยไคโตซานต่ออัตราป่วยและรอดตายของปลากะพงขาวหลังได้รับเชื้อแบคทีเรีย *V. harveyi* (Challenge test)

การผลิตอาหารทดลอง

เลี้ยงปลาด้วยอาหารสำเร็จรูปแบบแห้ง สูตรโปรตีนร้อยละ 42 เสริมไคโตซานลงในอาหารโดยการพ่นสารละลายไคโตซานในกรดอะซิติกเข้มข้นร้อยละ 1 เคลือบลงบนผิวอาหาร (คิดปริมาณไคโตซานเป็นร้อยละของน้ำหนักอาหาร) ในปริมาตรที่เท่ากันในแต่ละชุดการทดลอง สำหรับอาหารทดลองในกลุ่มควบคุมนั้นเตรียมโดยพ่นกรดอะซิติกเข้มข้นร้อยละ 1 เคลือบลงบนผิวอาหารแทนสารละลายไคโตซานในปริมาตรที่เท่ากันกับในแต่ละชุดทดลอง จากนั้นพ่นน้ำมันตับปลาเคลือบทับ ทิ้งไว้ให้แห้งก่อนนำไปทดลอง

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

การทดลองที่ 1: การเสริมอาหารด้วยไคโตซานต่ออัตราการเจริญเติบโตและภูมิคุ้มกันแบบไม่จำเพาะและจำเพาะของปลากะพงขาว

เลี้ยงปลากะพงขาวน้ำหนัก 30 - 50 กรัม ด้วยอาหารสำเร็จรูปผสมไคโตซานที่ปริมาณต่างกัน 4 ระดับ โดยแบ่งกลุ่มการทดลองออกเป็น 4 กลุ่มตามระดับของปริมาณไคโตซานที่ใช้เสริมอาหาร ได้แก่ กลุ่มที่ 1: กลุ่มควบคุม (อาหารสูตรปกติ ไม่เสริมไคโตซาน) กลุ่มที่ 2: กลุ่มเสริมไคโตซานปริมาณร้อยละ 0.5 ของน้ำหนักอาหารเม็ด กลุ่มที่ 3: กลุ่มเสริมไคโตซานปริมาณร้อยละ 1.0 ของน้ำหนักอาหารเม็ด และกลุ่มที่ 4: กลุ่มเสริมไคโตซานปริมาณร้อยละ 1.5 ของน้ำหนักอาหารเม็ด เลี้ยงเป็นระยะเวลา 47 วัน สลบปลาเพื่อเจาะเก็บตัวอย่างเลือดปลา วัดความยาวและชั่งน้ำหนักปลาทุก 7 วัน นำเลือดมาตรวจนับชนิดและจำนวนของเม็ดเลือดขาว (Total and differential white blood cell count) ปริมาณโปรตีนรวม (Total plasma protein) และปริมาณ Immunoglobulin ในเลือด เมื่อเลี้ยงครบ 47 วัน สลบปลาและผ่าตัดแยกไตส่วนหน้าออกมาเพื่อแยกเม็ดเลือดขาว และทดสอบประสิทธิภาพกระบวนการกลืนทำลาย (Phagocytic activity) และ Respiratory burst activity ของเซลล์มาโครฟาจ เมื่อสิ้นสุดการทดลองเปรียบเทียบอัตราการเจริญเติบโตและระดับภูมิคุ้มกันที่ตรวจสอบได้ในแต่ละกลุ่มทดลอง

การทดลองที่ 2: การเสริมอาหารด้วยไคโตซานต่ออัตราป่วยและรอดตายของปลากะพงขาวหลังได้รับเชื้อแบคทีเรีย *V. harveyi*

เลี้ยงลูกปลากะพงขาวขนาด 5 - 10 กรัม แบ่งเป็น 2 กลุ่ม คือ กลุ่มควบคุมที่เลี้ยงด้วยอาหารสำเร็จรูปสูตรปกติที่ไม่เสริมไคโตซาน และกลุ่มที่เลี้ยงด้วยอาหารสำเร็จรูปที่ผสมไคโตซานที่เลือกจากการทดลองที่ 1 เลี้ยงเป็นระยะเวลา 49 วัน สุ่มชั่งน้ำหนักและวัดความยาวของปลาทดลองทุก 7 วัน เมื่อสิ้นสุดการเลี้ยงนำปลามาทดสอบการติดเชื้อด้วยเชื้อแบคทีเรีย *V. harveyi* ทั้งสองกลุ่มทดลอง บันทึกจำนวนปลาตายในแต่ละวัน ตรวจวัดคุณภาพน้ำทุกสัปดาห์ เมื่อสิ้นสุดการทดลอง คำนวณหาอัตราป่วย อัตราตาย และ Relative percentage survival (RPS) ของปลาแต่ละกลุ่มทดลอง

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University