สำนักหอสมุดกลาง พระจอมเกล้าลาดกระบัง

ปัญหาพิเศษ

เรื่อง

การเพิ่มภูมิคุ้มกันในปลาโรซี่บาร์บด้วยอาหารเสริมเบต้ากลูแคน

Increasing immune response in rosy barb (*Puntius conchonius*) by supplement ß-glucan in fish feed

T104588

โดย

นายหัสชัย จันทร์ศรีทอง

ว/ท.
ร 476 ก
2550
เลขหมู่.....
เลขทะเบียน.....104588
วัน.เดือน.ปี.....- 5 พ.ย. 2552

b.....12160120.....
i.....

ภาควิชาวิทยาศาสตร์การประมง
คณะเทคโนโลยีการเกษตร
สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง
กรุงเทพมหานคร 10520

ปีการศึกษา 2550

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ใบรับรองปัญหาพิเศษ
ภาควิชาวิทยาศาสตร์การประมง

เรื่อง การเพิ่มภูมิคุ้มกันในปลาโรซี่บาร์บด้วยอาหารเสริมเบต้ากลูแคน
Increasing immune response in rosy barb (*Puntius conchonius*) by supplement ß-glucan in fish feed

ชื่อนักศึกษา นายหัสชัย จันทร์ศรีทอง

ชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.อัจฉรี เรืองเดช

ได้พิจารณาเห็นชอบโดย

อาจารย์ที่ปรึกษา.....

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.อัจฉรี เรืองเดช)

ภาควิชารับรองแล้ว

.....

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ปวีณา ทวีกิจการ)
หัวหน้าภาควิชาวิทยาศาสตร์การประมง
วันที่ 3 **เดือน** ธ.ค. **พ.ศ.** 51

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทคัดย่อปัญหาพิเศษ
เรื่อง

การเพิ่มภูมิคุ้มกันในปลาโรซี่บาร์บด้วยอาหารเสริมเบต้ากลูแคน

Increasing immune response in rosy barb (*Puntius conchonius*) by supplement ß-glucan in fish feed

ปัจจุบันการเลี้ยงปลาสวยงามเป็นที่นิยมเลี้ยงกันอย่างแพร่หลาย ปลาสวยงามส่วนใหญ่มักมีภูมิต้านทานโรคต่ำกว่าปลาทั่วไป จึงต้องมีการให้อาหารเสริมที่ทำให้ปลามีภูมิคุ้มกันต่อโรคมากขึ้นเพื่อเพิ่มความเชื่อมั่นต่อผู้เลี้ยงว่าปลามีร่างกายที่แข็งแรงและทนต่อโรคมากขึ้น เบต้า-กลูแคน เป็นสาระสำคัญที่ช่วยป้องกันโรคต่างๆ เมื่อร่างกายได้รับสารเบต้า-กลูแคนแล้ว สารตัวนี้จะไปกระตุ้นการทำงานของ เซลล์ Microphage ที่ทำหน้าที่ในการสร้างภูมิคุ้มกันและป้องกันสิ่งแปลกปลอมต่างๆ ให้ตื่นตัวอยู่ตลอดเวลา พร้อมที่จะทำงานอยู่เสมอ การศึกษาในครั้งนี้จึงศึกษาถึงความสามารถของเบต้ากลูแคนในการสร้างภูมิคุ้มกันในปลาโรซี่บาร์บ ซึ่งจากการศึกษาพบว่าจำนวนเม็ดเลือดขาวในกลุ่มที่ให้อาหารทดลองสลับอาหารธรรมดา และให้เบต้ากลูแคนที่ระดับ 3 และ 5 กรัมต่อกิโลกรัมอาหาร มีจำนวนเม็ดเลือดขาว 7.33±0.33 และ 7.33±0.88 เปอร์เซ็นต์ตามลำดับ และมีปริมาณเม็ดเลือดแดงอัดแน่น 19.56±1.09 และ 19.26±1.08 เปอร์เซ็นต์ตามลำดับ จากการเหนี่ยวนำให้เกิดโรคด้วยเชื้อ *Aeromonas hydrophila* พบว่า ปลาที่อยู่ในกลุ่มที่ให้อาหารทดลองสลับอาหารธรรมดา และให้เบต้ากลูแคนที่ระดับ 3 และ 5 กรัมต่อกิโลกรัมอาหาร มีอัตราการรอดตายสูงที่สุด โดยมีอัตราการรอดตาย 60 และ 50% ตามลำดับ เมื่อสิ้นสุดการทดลอง (96 ชั่วโมงหลังการฉีดเชื้อ) ส่วนการเจริญเติบโตของปลาโรซี่บาร์บในแต่ละชุดการทดลองมีการเจริญเติบโตที่ไม่แตกต่างกันเมื่อสิ้นสุดการทดลอง จากการศึกษานี้สามารถกล่าวได้ว่า ที่ระดับเบต้ากลูแคน 3 และ 5 กรัมต่อกิโลกรัมอาหาร และให้อาหารที่เสริมเบต้ากลูแคนสลับอาหารธรรมดาสามารถเสริมสร้างภูมิคุ้มกันในปลาโรซี่บาร์บได้ดีที่สุด

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

คำนิยม

ปัญหาพิเศษในครั้งนี้จะไม่สำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยดี ถ้าขาดบุคคลที่สำคัญ 2 ท่าน คือผู้ช่วยศาสตร์จารย์ ดร. อัจฉรี เรืองเดช และผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. นงนุช เลาหะวิสุทธิ์ ที่ช่วยเหลือและผลักดันให้ปัญหาพิเศษฉบับนี้ผ่านพ้นไปได้ด้วยดี โดยเฉพาะอาจารย์อัจฉรี ที่ให้ความรู้ ให้คำปรึกษา และ คำแนะนำดีๆแก่ข้าพเจ้าเสมอมา พร้อมทั้งให้อะไรดีๆอีกหลายอย่างที่ข้าพเจ้าไม่เคยได้รับมาก่อน ขอบพระคุณครับ และปัญหาพิเศษนี้จะไม่สมบูรณ์เลย หากขาดบุคคลสำคัญเหล่านี้ได้แก่

ขอบพระคุณอาจารย์ภาควิชาวิทยาศาสตร์การประมงทุกท่านที่คอยอบรมสั่งสอนข้าพเจ้าทั้ง อาจารย์อนัญญา, อาจารย์สมชาย, อาจารย์ศักดิ์ชัย, อาจารย์ปวีณา, อาจารย์มณฑล, อาจารย์รุ่งตะวัน, อาจารย์สุนีรัตน์ และอาจารย์ดุสิต

ขอขอบคุณพี่ๆเจ้าหน้าที่ภาคทุกท่าน พี่แสง, พี่มอญ, พี่โก๋, พี่นิพนธ์ และพี่กิ๊บ ที่ให้ความช่วยเหลือในด้านอุปกรณ์พร้อมคำแนะนำที่ดี

ขอขอบคุณพี่ปริญญาโท ที่ให้ความช่วยเหลือ และให้คำแนะนำในการแก้ปัญหามาโดยตลอด โดยเฉพาะพี่ป่าน พี่เต้ ขอขอบคุณจากใจจริง

ขอบคุณเพื่อนๆรุ่น 11 ทุกคน ที่ให้ความช่วยเหลือ คำปรึกษา และช่วยแก้ปัญหาต่างๆที่เกิดขึ้นให้ผ่านพ้นไปได้ด้วยดี

สุดท้ายนี้ขอกราบขอบคุณพ่อแม่ และพี่ชาย รวมทั้งญาติผู้ใหญ่ทุกท่านที่ให้ทั้งกำลังใจและกำลังทรัพย์มาโดยตลอด และอีกหลายสิ่งหลายอย่างจนทำให้ผมมีวันนี้

หากปัญหาพิเศษฉบับนี้เป็นประโยชน์แก่ผู้ใด ผมขอยกความดีส่วนนี้ให้แก่บุคคลที่กล่าวมาทั้งหมด และถ้ามีความผิดพลาดประการใดผมขอรับไว้แต่เพียงผู้เดียว

นายหัสชัย จันทร์ศรีทอง

มีนาคม 2551

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญ

	หน้า
สารบัญ	I
สารบัญตาราง	II
สารบัญภาพ	III
คำนำ	1
การตรวจเอกสาร	2
อุปกรณ์และวิธีการ	6
ผลการทดลองและวิจารณ์	11
สรุป	17
เอกสารอ้างอิง	18

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

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

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

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 นาโนเมตร และจำนวน โคโลนีเฉลี่ยของเชื้อ *Aeromonas hydrophila*	19

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

คำนำ

ปลาสวยงามส่วนใหญ่มักมีภูมิต้านทานโรคต่ำกว่าปลาทั่วไป เนื่องจากปลาสวยงามมาจากการดัดแปลงพันธุกรรมของสายพันธุ์ต่างๆและยิ่งในช่วงที่มีอุณหภูมิต่ำ ปลาสวยงามจะเป็นโรคได้ง่ายที่สุด ในปัจจุบันปลาสวยงามจัดเป็นปลาที่มีการเลี้ยงเพื่อการค้าเป็นจำนวนมาก จึงต้องมีการให้อาหารเสริมที่ทำให้ปลามีภูมิคุ้มกันต่อโรคมากขึ้นเพื่อเพิ่มความเชื่อมั่นต่อผู้เลี้ยงว่าปลามีร่างกายที่แข็งแรงและทนต่อโรคมากขึ้น ซึ่งเป็นที่ยอมรับกันว่า เบต้ากลูแคนและวิตามินซีมีประสิทธิภาพในการกระตุ้นการตอบสนองภูมิคุ้มกันแบบไม่จำเพาะในสัตว์น้ำหลายๆชนิด เช่นการใช้เบต้ากลูแคนเพิ่มในกุ้งกุลาดำทำให้กุ้งเป็นโรคน้อยลง มีอัตราการรอดมากขึ้น และการใช้วิตามินซีเพิ่มในปลากะพง ทำให้ปลากะพงมีภูมิคุ้มกันแบบไม่จำเพาะมากขึ้น

การใช้เบต้ากลูแคน แม้ว่าจะช่วยเพิ่มภูมิคุ้มกันให้ดีขึ้น แต่ยังไม่มีข้อมูลการใช้อย่างต่อเนื่องเป็นระยะเวลานานจะให้ผลอย่างไร รวมทั้งปริมาณการใช้ที่เหมาะสมควรเป็นเท่าไร ดังนั้นจึงมีการทดลองใช้เบต้ากลูแคนร่วมกับวิตามินซีผสมในอาหาร เพื่อดูระบบภูมิคุ้มกันในร่างกายของปลาว่ามีการเพิ่มภูมิคุ้มกันการต่อต้านโรคสัตว์น้ำมากน้อยเพียงใด

วัตถุประสงค์

1.เพื่อศึกษาระดับของเบต้ากลูแคนที่เหมาะสมในการเพิ่มภูมิคุ้มกันในปลาสวยงาม

2.ศึกษาถึงช่วงระยะเวลาการให้เบต้ากลูแคนที่ในการเพิ่มภูมิคุ้มกันในปลาสวยงาม

ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

1.หลังจากที่ปลาได้รับอาหารเสริมเบต้ากลูแคน คาดว่าปลาจะมีระดับภูมิคุ้มกันที่สูง และทำให้ปลามีอัตรารอดสูงขึ้น

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

การตรวจเอกสาร

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

ภาพที่ 1 ลักษณะของปลาโรซี่บาร์บ (*Puntius conchonius*)

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

เบต้า-กลูแคน เป็นสารสำคัญที่ช่วยป้องกันโรคต่างๆ โดยเฉพาะ โรคที่เกิดจากระบบย่อยอาหารและระบบขับถ่าย กระตุ้นการทำงานของระบบภูมิคุ้มกัน เบต้า-กลูแคน เป็นโพลีแซคคาไรด์ (น้ำตาล) ชนิดหนึ่ง ซึ่งพบได้ในผนังเซลล์ของยีสต์ สาหร่าย และเห็ด เบต้า-กลูแคนมีหลายชนิดขึ้นอยู่กับชนิดและสายพันธุ์ของสิ่งมีชีวิตดังกล่าวที่นำมาเพาะเลี้ยงทำให้ได้เบต้า-กลูแคนที่มีประสิทธิภาพแตกต่างกัน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เมื่อร่างกายได้รับสารเบต้า-กลูแคนแล้ว สารตัวนี้จะไปกระตุ้นการทำงานของ เซลล์ไมโครเฟจ (Microphage) ที่ทำหน้าที่ในการสร้างภูมิคุ้มกันและป้องกันสิ่งแปลกปลอมต่างๆ ให้ตื่นตัวอยู่ตลอดเวลา พร้อมที่จะทำงานอยู่เสมอ ซึ่งโดยปกติแล้วเซลล์ชนิดนี้จะอยู่นิ่งๆ จะทำงานก็ต่อเมื่อมีสิ่งแปลกปลอมเข้าสู่ร่างกาย นั่นจึงเป็นสาเหตุว่าทำไมจึงช่วยในเรื่องโรคภูมิแพ้และโรคต่างๆได้ผลเป็นอย่างดี

ประโยชน์ของเบต้า-กลูแคนที่มีต่อสัตว์เลี้ยง คือ เป็นสารสำคัญที่ช่วยป้องกันโรคต่างๆ โดยเฉพาะ โรคที่เกิดจากระบบย่อยอาหารและระบบขับถ่าย กระตุ้นการทำงานของระบบภูมิคุ้มกัน ลดอาการผื่นแพ้ผิวหนังของสัตว์เลี้ยง และช่วยในการทำงานของระบบประสาทให้มีประสิทธิภาพดีมากขึ้น มักนำมาเป็นส่วนผสมของอาหาร ใช้ในประเทศที่พัฒนาแล้ว นี่จึงเป็นสาเหตุให้สัตว์เลี้ยงที่ได้รับประทานเบต้า-กลูแคนมีสุขภาพที่แข็งแรง

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

การสร้างภูมิคุ้มกันมีอยู่ด้วยกันหลายวิธีและก็เป็นที่ยอมรับกันว่าการทำให้เกิดภูมิคุ้มกัน

เอกสารนี้เป็นการ... ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ในปลานั้นจะเกิดได้ในระยะเวลาสั้น ฉะนั้นการฉีดหรือการชีมของสารที่กระตุ้นให้เกิดภูมิคุ้มกันในปลาขึ้นอยู่กับสภาพแวดล้อม โดยเฉพาะอย่างยิ่งอุณหภูมิจากการทดลอง แสดงให้เห็นว่าการฉีด antigen หรือการกิน 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

การใช้ ß-glucan เป็นอาหารเสริม

การเสริมภูมิคุ้มกันโดยการกิน

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 หลังจากระยะเวลาหนึ่งที่เซลล์จะทำงานหนักและเสื่อมสภาพแต่การให้อาหารผสม เบต้ากลูแคนที่ระดับ 0.18% จะมีปริมาณของ Lysozyme เพิ่มขึ้นอย่างเห็นได้ชัดเจน ซึ่งกระบวนการ Lysozyme จะคอยทำหน้าที่ในการทำลายผนังเซลล์ของเชื้อโรคโดยเฉพาะแบคทีเรีย ในกระบวนการ alternative complement pathway จะไม่มีผลต่อระดับของเบต้ากลูแคนที่เข้าสู่ร่างกาย Selvaraj et al., 2005 ได้ทำการศึกษาในปลา

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

คาร์ฟโดยมีการผสมเบต้ากลูแคนลงในอาหารในระดับ 1%, 2%, และ 4% เมื่อปลาคาร์ฟได้รับเชื้อ *Aeromonas hydrophila* ผลของอัตรารอดไม่มีความแตกต่างกันและปริมาณของ Antibody ในอาหารในแต่ละระดับจะไม่มีความแตกต่างกัน

การเสริม ß-glucan โดยการฉีดเข้าสู่ลำตัว

Whittington et al.,2005 ได้มีการศึกษาผลของการฉีดเบต้ากลูแคนเข้าสู่ลำตัวในปลานิล ในปริมาณ 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

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

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)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

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

วางแผนการทดลองแบบแฟคทอเรียล (Factorial Experiment) และใช้แผนการทดลองแบบสุ่มตลอด (Completely Randomized Design) โดยแบ่งเป็น 2 ปัจจัย เมื่อปัจจัยที่หนึ่งมี 3 ระดับและปัจจัยที่สองมี 4 ระดับ ดังนั้นจึงเรียกแผนการทดลองนี้ว่า 3x4 factorial experiments in CRD

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

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

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

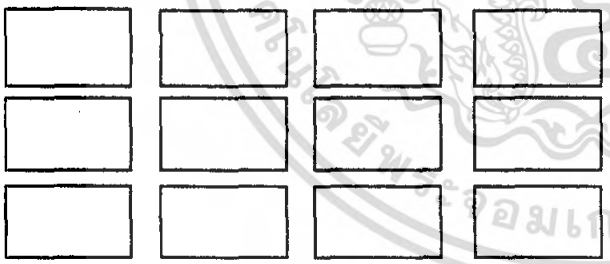
2.1 เตรียมเบต้ากลูแคนผสมวิตามินซีให้มีความเข้มข้น 0, 1, 3 และ 5 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัมอาหาร

2.2 นำเบต้ากลูแคนที่เตรียมมาคลุกเคล้ากับอาหารให้ทั่วกัน

2.3 นำอาหารที่ผสมแล้วมาฉีดพ่นกลิ่นเพื่อดึงดูดให้ปลากินอาหาร (amino tonic) นำไปผึ่งให้แห้งในที่ไม่มีแสง และเก็บรักษาในตู้แช่

2.4 ให้อาหารวันละ 2 ครั้ง เช้า-เย็น

3.แผนผังการทดลอง



แถวแนวตั้ง คือระดับของ ß-glucan ที่ผสมในอาหาร

แถวแนวนอน คือช่วงระยะเวลาที่ให้อาหารทดลอง

4.การตรวจสอบภูมิคุ้มกันของปลาโรซี่บาร์บ

4.1 การเก็บตัวอย่างเลือดเพื่อใช้วิเคราะห์ สุ่มเก็บตัวอย่างเลือดปลาโรซี่บาร์บหลังจากการเลี้ยงด้วยอาหารทดลองไป 30 และ 60 วัน จำนวนถังละ 3 ตัวทำการสลบปลาเจาะเลือดบริเวณส่วนหาง ด้วยเข็มฉีดยาขนาด 25G ใช้หลอดฉีดยาที่เคลือบด้วยสารป้องกันการแข็งตัวของ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เลือด (สารละลายโซเดียมซิเตรต 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

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

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

สถานที่ทำการทดลอง

ห้อง D116 ภาควิชาวิทยาศาสตร์การประมง คณะเทคโนโลยีการเกษตร สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง เขตลาดกระบัง กรุงเทพฯ 10520

ระยะเวลาในการทดลอง

เดือนพฤศจิกายน 2550 ถึงมีนาคม 2551

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ผลการทดลองและวิจารณ์

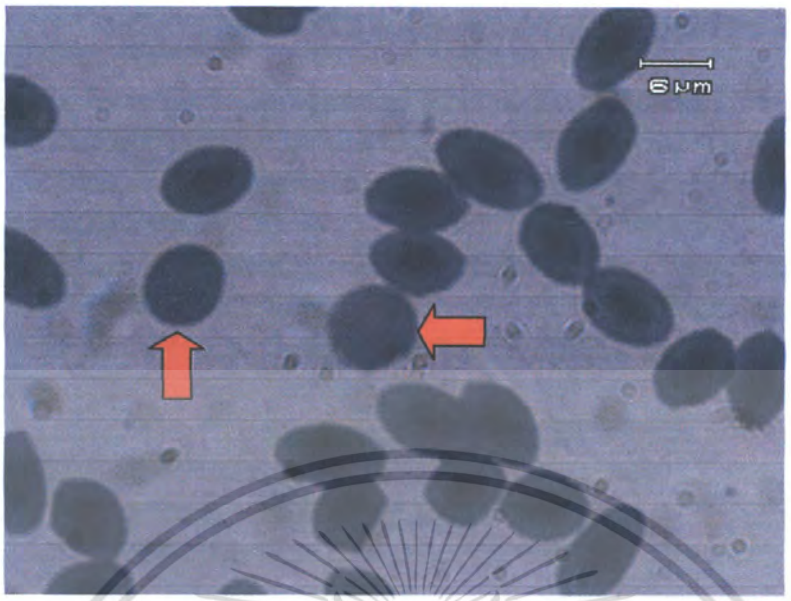
จากการตรวจนับจำนวนเซลล์เม็ดเลือดขาวและเม็ดเลือดแดงของปลาโรซี่บาร์บ (*Puntius conchonius*) พบว่าจำนวนเม็ดเลือดขาวในกลุ่มที่ให้อาหารทดลอง 20 วันแล้วให้อาหารธรรมดาที่การให้เบต้ากลูแคนระดับ 5 กรัมต่อกิโลกรัมอาหารมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.05$) กับกลุ่มที่ให้เบต้ากลูแคนระดับอื่นๆ โดยมีจำนวนเม็ดเลือดขาว 3.67±0.88 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งมีปริมาณสูงกว่ากลุ่มควบคุม และกลุ่มที่ให้เบต้ากลูแคนที่ 1 และ 3 กรัมต่อกิโลกรัมอาหาร คือมีจำนวนเม็ดเลือดขาว 1.67±0.33, 1.67±0.67 และ 2.00±0.58 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ (ตารางที่ 1 และภาพที่ 3) จำนวนเม็ดเลือดขาวในกลุ่มที่ให้อาหารทดลองตลอดการทดลองที่การให้เบต้ากลูแคนระดับ 3 และ 5 กรัมต่อกิโลกรัมอาหาร ซึ่งมีจำนวนเม็ดเลือดขาว 3.67±0.88 และ 4.33±0.33 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.05$) กับกลุ่มควบคุมและกลุ่มที่ให้เบต้ากลูแคน 1 กรัมต่อกิโลกรัมอาหาร คือมีจำนวนเม็ดเลือดขาว 1.67±0.33 และ 1.67±0.67 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ (ตารางที่ 1 และภาพที่ 3) จำนวนเม็ดเลือดขาวในกลุ่มที่ให้อาหารทดลองสลับอาหารธรรมดา กลุ่มที่ให้เบต้ากลูแคนที่ระดับ 3 และ 5 กรัมต่อกิโลกรัมอาหารมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.05$) กับกลุ่มการทดลองอื่น ซึ่งมีจำนวนเม็ดเลือดขาว 7.33±0.33 และ 7.33±0.88 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ และกลุ่มที่ให้เบต้ากลูแคนที่ระดับ 1 กรัมต่อกิโลกรัมอาหาร มีจำนวนเม็ดเลือดขาว 3.33±0.33 เปอร์เซ็นต์ มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.05$) กับกลุ่มควบคุม ซึ่งมีจำนวนเม็ดเลือดขาว 1.67±0.33 เปอร์เซ็นต์ (ตารางที่ 1 และภาพที่ 3)

ตารางที่ 1 จำนวนเปอร์เซ็นต์เม็ดเลือดขาวของปลาโรซี่บาร์บ (*Puntius conchonius*) หลังจบการทดลอง

กลุ่มการทดลอง	จำนวนเม็ดเลือดขาว (เปอร์เซ็นต์)		
	ให้ 20 วัน	ให้ตลอด	ให้สลับกัน
ควบคุม	1.67±0.33[a]	1.67±0.33[a]	1.67±0.33[a]
เบต้ากลูแคน 1กรัม/กิโลกรัมอาหาร	1.67±0.67[a]	1.67±0.67[a]	3.33±0.33[b]
เบต้ากลูแคน 3กรัม/กิโลกรัมอาหาร	2.00±0.58[a]	3.67±0.88[b]	7.33±0.33[c]
เบต้ากลูแคน 5กรัม/กิโลกรัมอาหาร	3.67±0.88[b]	4.33±0.33[b]	7.33±0.88[c]

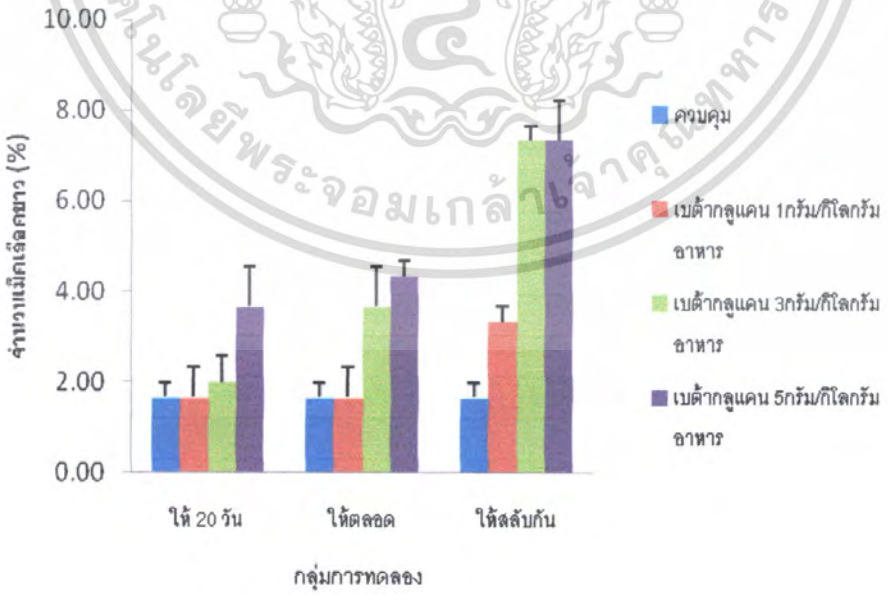
ตัวอักษรเหมือนกันในแนวตั้งแต่ละปัจจัย หมายถึง ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ ($p>0.05$)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



ภาพที่ 2 ลักษณะของเซลล์เม็ดเลือดขาวของปลาโรซี่บาร์บ

จากตารางที่ 1และภาพที่ 3 พบว่าจำนวนเม็ดขาวมีการเพิ่มขึ้นอย่างให้ได้ชัดในกลุ่มที่ให้อาหารทดลองสลับอาหารธรรมดา และให้เบต้ากลูแคนที่ระดับ 3 และ 5 กรัมต่อกิโลกรัมอาหาร แสดงว่าระยะเวลาที่ให้อาหารทดลองมีผลต่อการเพิ่มขึ้นของเม็ดเลือดขาวด้วย



ภาพที่ 3 จำนวนเม็ดเลือดขาวของปลาโรซี่บาร์บหลังสิ้นสุดการทดลอง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

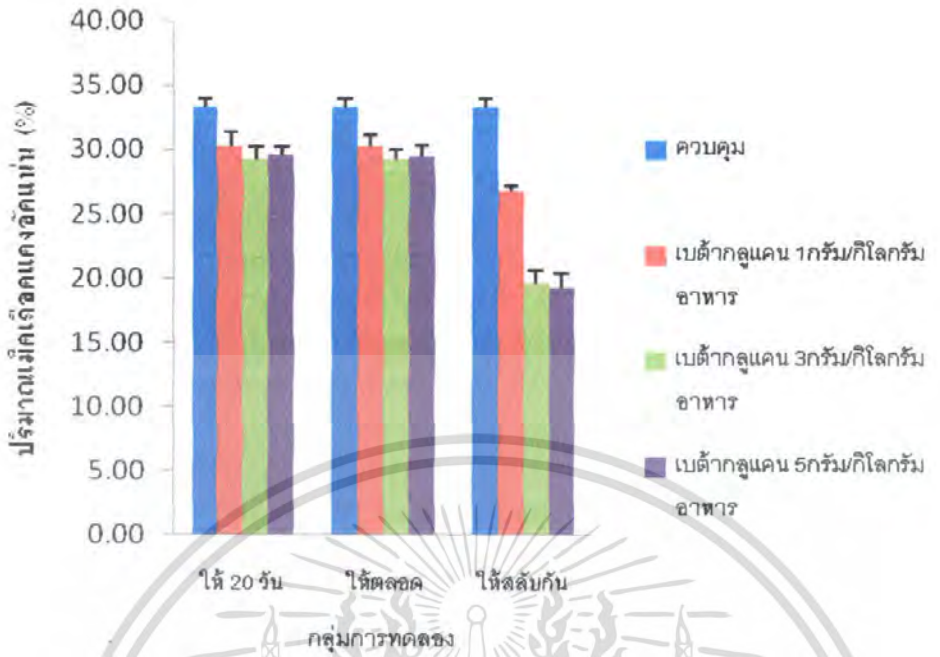
จากการหาค่าปริมาณเม็ดเลือดแดงอัดแน่นของปลาโรซี่บาร์บในแต่ละกลุ่มการทดลอง พบว่าในกลุ่มที่ให้อาหารทดลอง 20 วันแล้วให้อาหารธรรมดาที่ระดับของเบต้ากลูแคนทุกระดับตั้งแต่กลุ่มควบคุม กลุ่มที่ให้เบต้ากลูแคน 1, 3 และ 5 กรัมต่อกิโลกรัมอาหาร (33.32±0.68, 30.23±1.16, 29.22±1.02 และ 29.58±0.64 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ) 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*) หลังจบการทดลอง

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 ($p>0.05$)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

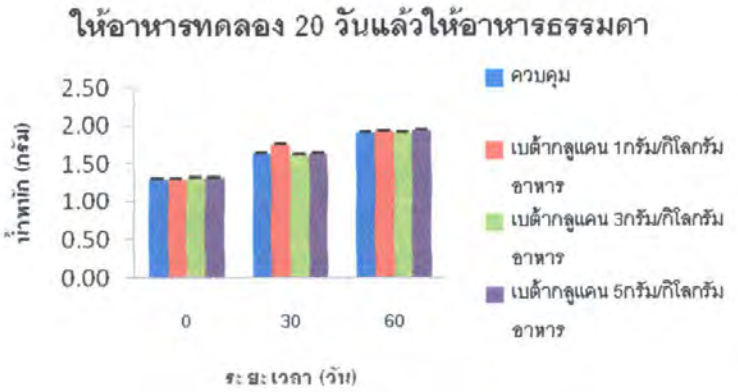


ภาพที่ 4 ปริมาณเม็ดเลือดแดงอัดแน่นของปลาโรซี่บาร์บหลังสิ้นสุดการทดลอง

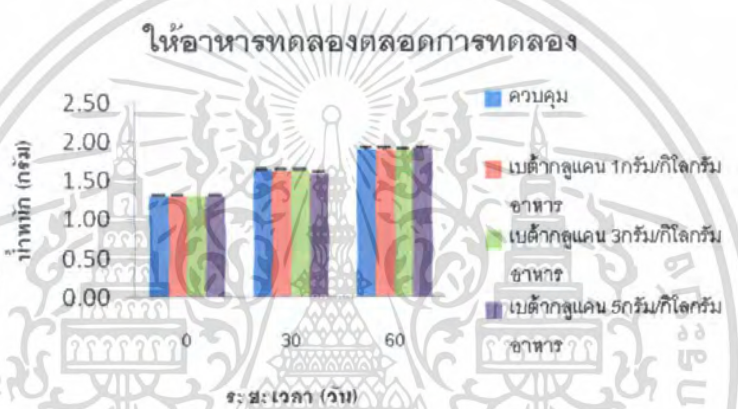
การเจริญเติบโตของปลาโรซี่บาร์บ (*Puntius conchonius*) ในทุกกลุ่มการทดลองพบว่าเมื่อสิ้นสุดการทดลองน้ำหนักที่เพิ่มขึ้นไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p>0.05$) (ภาพที่ 5) โดยมีน้ำหนักเฉลี่ยหลังสิ้นสุดการทดลองดังนี้ กลุ่มควบคุม 1.90±0.02 กรัม กลุ่มที่ให้อาหารทดลอง 20 วันแล้วให้อาหารธรรมดาที่ให้เบต้ากลูแคน 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%

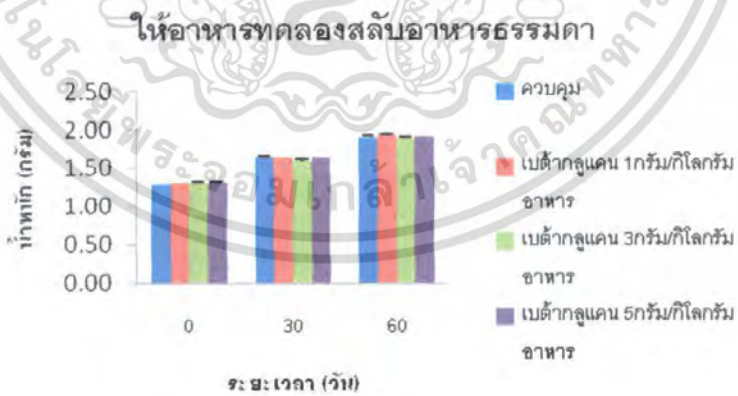
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



(a)



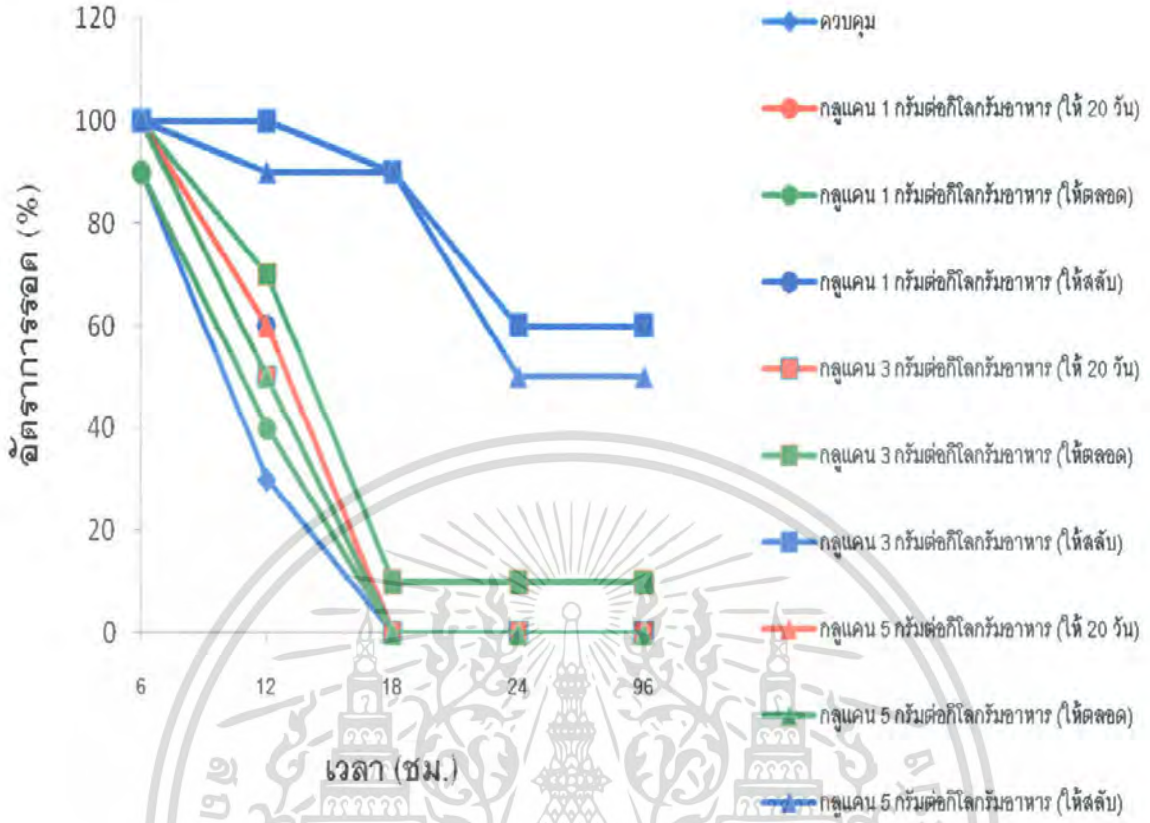
(b)



(c)

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

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



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

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สำนักหอสมุดกลาง พระจอมเกล้าลาดกระบัง

สรุป

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

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

104588

เอกสารอ้างอิง

Ai. Qinghui, 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.

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.

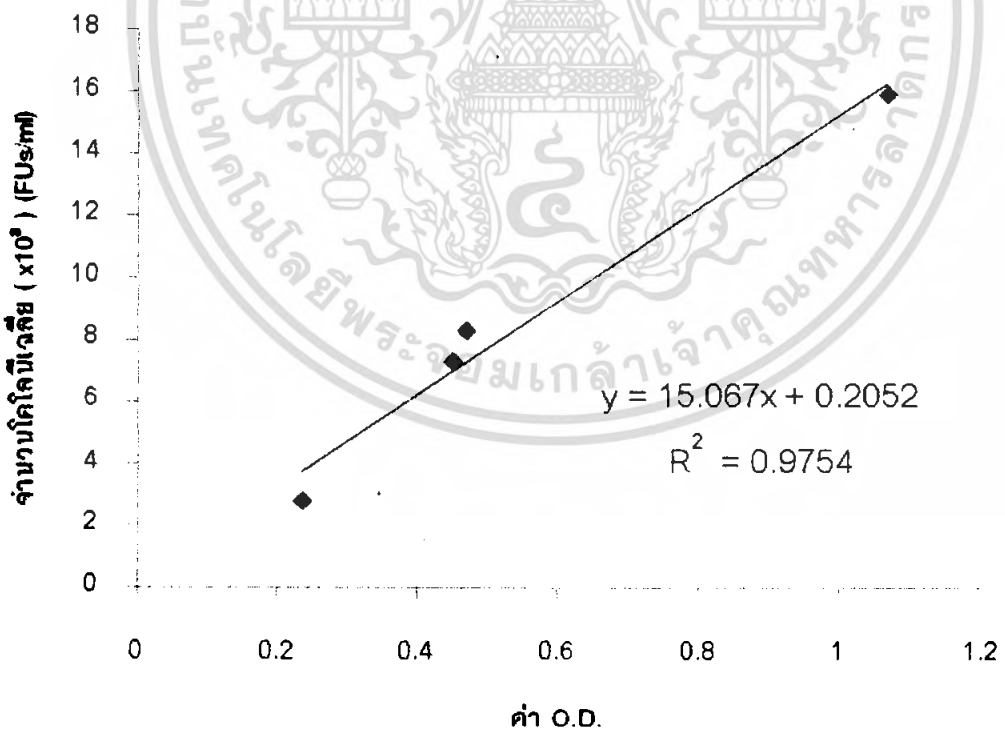
www.tropicalfishprofiles.com/cyprinids/rosy-barb-puntius-conchonius

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก

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

ค่า O.D.	จำนวนโคโลนีเฉลี่ย ($\times 10^8$)
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*

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

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

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

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

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

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

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้