

การเปลี่ยนแปลงทางโลหิตวิทยาของปลานิล *Oreochromis niloticus*
หลังได้รับสารสกัดเมล็ดสะเดาอินเดีย *Azadirachta indica*
ความเข้มข้นต่ำเป็นเวลานาน

นางสาว บังอร ตั้งทอง

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต

สาขาวิชาสัตววิทยา ภาควิชาชีววิทยา

บัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ปีการศึกษา 2540

ISBN 974-638-878-9

ลิขสิทธิ์ของบัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย


**HAEMATOLOGICAL ALTERATION OF NILE TILAPIA
Oreochromis niloticus AFTER LONG-TERM LOW LEVEL
EXPOSURE TO NEEM *Azadirachta indica* SEED EXTRACT**

Miss Bangon Tangtong

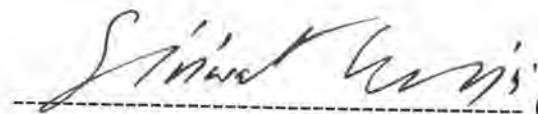
**A Thesis Submitted in Partial Fullfillment of the Requirements
for the Degree of Master of Science in Zoology
Department of Biology
Graduate School
Chulalongkorn University
Academic Year 1997
ISBN 974-638-878-9**


Thesis Title Haematological alteration of Nile tilapia *Oreochromis niloticus* after long-term low level exposure to neem *Azadirachta indica* seed extract
By Miss Bangon Tangtong
Department Biology
Thesis Advisor Assoc.Prof. Kingkaew Wattanasirmkit, Ph.D.
Thesis Co-advisor Assist.Prof.Patchanee Singh-asa, Ph.D.


Accepted by the Graduate School, Chulalongkorn University in Partial Fulfillment of the Requirements for the Master's Degree/

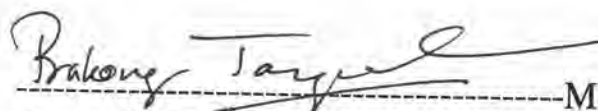

-----Dean of Graduate School
(Professor Supawat Chutivongse, M.D.)

Thesis Comittee


-----Chairman
(Professor Siriwat Wongsiri, Ph.D.)


-----Thesis Advisor
(Associate Professor Kingkaew Wattanasirmkit, Ph.D.)


-----Thesis Co-advisor
(Assistant Professor Patchanee Singh-asa, Ph.D.)


-----Member
(Associate Professor Prakong Tangpraputgul , Ph.D.)

วิทยานิพนธ์ของบัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีพระจอมเกล้าธนบุรี

บ้งอร ดั่งทอง : การเปลี่ยนแปลงทางโลหิตวิทยาของปลานิล *Oreochromis niloticus* หลังได้รับสารสกัดเมล็ดสะเดาอินเดีย *Azadirachta indica* ความเข้มข้นต่ำเป็นเวลานาน (HAEMATOLOGICAL ALTERATION OF NILE TILAPIA *Oreochromis niloticus* AFTER LONG-TERM LOW LEVEL EXPOSURE TO NEEM *Azadirachta indica* SEED EXTRACT) อ.ที่ปรึกษา : รศ.ดร.กิ่งแก้ว วัฒนเสริมกิจ, อ.ที่ปรึกษาร่วม : ผศ.ดร.พัชนี สิงห์ อาษา ; 187 หน้า. ISBN 974-638-878-9.

ศึกษาความเป็นพิษเฉียบพลันและกึ่งเรื้อรังของสารสกัดเมล็ดสะเดาอินเดีย *Azadirachta indica* ต่อเลือดของปลานิล *Oreochromis niloticus* โดยนำปลานิลอายุประมาณ 1 เดือน ทั้งเพศผู้และเพศเมีย มาทำการหาค่ามัธยฐานความเป็นพิษเฉียบพลัน (96-hr LC₅₀) ซึ่งมีค่าเท่ากับ 36.25 มิลลิกรัมต่อลิตร นำค่ามาทำการคำนวณหาความเข้มข้นสำหรับการศึกษาความเป็นพิษที่ระดับความเข้มข้นต่ำ เป็นเวลานาน 7 เดือน ซึ่งมีค่าเท่ากับ 25.07 มิลลิกรัมต่อลิตร เก็บตัวอย่างปลาทุก 7 เดือน เพื่อศึกษาการเปลี่ยนแปลงทางด้านโลหิตวิทยา ได้แก่ ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเม็ดเลือดแต่ละชนิด การนับเม็ดเลือดขาวแยกชนิด การหาค่าฮีมาโตคริต ปริมาณกลูโคส และการตรวจวัดปริมาณเอนไซม์ในพลาสมา 3 ชนิด คือ ALP (alkaline phosphatase), GOT (glutamic oxaloacetic transaminase) และ GPT (glutamic pyruvic transaminase)

ผลการศึกษาพบว่า เลือดปลานิล ประกอบด้วยเม็ดเลือดแดง ทромโบไซต์ และเม็ดเลือดขาว ได้แก่ ลิมโฟไซต์ โมโนไซต์ นิวโทรฟิล เบโซฟิล และอีโอซิโนฟิล ปลากลุ่มทดลองมีความผิดปกติทางสัณฐานวิทยาของเม็ดเลือดแดง 8 แบบ ได้แก่ เซลล์มีรูปร่างผิดปกติ การแตกของนิวเคลียส การจับตัวแน่นของโครมาติน การเกิดช่องว่างในไซโตพลาสซึม การเกิดรอยหยักของเยื่อหุ้มเซลล์ที่มีลักษณะคล้ายหนามยี่น การย้อมติดสีน้อยลงของเม็ดเลือด ไซโตพลาสซึมย้อมติดสีเทา และเม็ดเลือดแดงในกระแสเลือดมีการแบ่งตัว ส่วนเม็ดเลือดขาวโมโนไซต์มีนิวเคลียสขนาดใหญ่ และการเกิดช่องว่างภายในไซโตพลาสซึมของนิวโทรฟิล ผลการศึกษาเปอร์เซ็นต์เม็ดเลือดขาวแต่ละชนิด พบว่ามีค่าเพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญ ($p \leq 0.05$) ของเปอร์เซ็นต์เม็ดเลือดขาว ชนิด ลิมโฟไซต์ นิวโทรฟิล เบโซฟิลและอีโอซิโนฟิล ตรงกันข้าม มีการลดลงอย่างมีนัยสำคัญ ($p \leq 0.05$) ของเปอร์เซ็นต์เม็ดเลือดขาวชนิดโมโนไซต์ ส่วนจำนวนเม็ดเลือดขาวทั้งหมดมีการเพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญ ($p \leq 0.05$) และปลาในกลุ่มทดลองมีการลดลงอย่างสอดคล้องกันของจำนวนเม็ดเลือดแดง ค่าฮีมาโตคริต และปริมาตรเฉลี่ยของเซลล์เม็ดเลือดแดง ซึ่งบ่งบอกถึงภาวะของโรคโลหิตจาง ส่วนผลการศึกษาการเปลี่ยนแปลงทางชีวเคมีของเลือด พบว่ามี ปริมาณกลูโคสมีการลดลง และมีการเพิ่มขึ้นของเอนไซม์ GPT อย่างมีนัยสำคัญ ($p \leq 0.05$) ซึ่งบ่งบอกถึงสภาวะที่มีระดับน้ำตาลในเลือดต่ำ และการเกิดความเป็นพิษต่อตับ สรุปแล้วการเปลี่ยนแปลงในช่วงต้นส่วนใหญ่เป็นการเกิดความผิดปกติทางสัณฐานวิทยาของเซลล์ ในขณะที่การเปลี่ยนแปลงทางด้านชีวเคมีจะเกิดขึ้นภายหลังที่ปลาได้รับสารสกัดติดต่อกันเป็นเวลานานหลายเดือน

ภาควิชา สัตววิทยา
สาขาวิชา สัตววิทยา
ปีการศึกษา 2540

ลายมือชื่อนิสิต บ้งอร ดั่งทอง
ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา กิ่งแก้ว วัฒนเสริมกิจ
ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษาร่วม พัชนี สิงห์ อาษา

3970877223 : MAJOR ZOOLOGY

KEY WORD: : TOXICITY / *Oreochromis niloticus* / NEEM SEED EXTRACT / HAEMATOLOGICAL PARAMETERS / BLOOD BIOCHEMISTRY

BANGON TANTONG : HAEMATOLOGICAL ALTERATION OF NILE TILAPIA *Oreochromis niloticus* AFTER LONG-TERM LOW LEVEL EXPOSURE TO NEEM *Azadirachta indica* SEED EXTRACT. THESIS ADVISOR : ASSOC.PROF.KINGKAEW WATTANASIRMKIT, Ph.D. THESIS CO-ADVISOR : ASSIST.PROF.PATCHANEE SINGH-ASA, Ph.D. 187 pp. ISBN 974-638-878-9.

Acute toxicity and sublethal effects of neem *Azadirachta indica* seed extract on haematological parameters in Nile tilapia *Oreochromis niloticus* were studied. Both sexes of young Nile tilapia at the age of 1 month were tested to determine the median lethal concentration (96-hr LC₅₀) for acute toxicity using static bioassay. LC₅₀ value of the extract was 36.25 mg/l. Based on this value, a sublethal concentration for the long-term study was computed at 25.07 mg/l. Blood samplings from both control and treatment groups were done monthly until the seventh month of experimentation. Morphological aberrations in blood cellular elements and changes in blood parameters and blood chemistry including blood glucose, ALP (alkaline phosphatase), GOT (glutamic oxaloacetic transaminase) and GPT (glutamic pyruvic transaminase) were observed.

From the results, the peripheral blood of Nile tilapia blood cell consisted of erythrocyte, thrombocyte and five types of leukocytes ; lymphocytes, monocytes, neutrophils, basophils and eosinophils. The morphological alterations of erythrocytes were poikilocytosis, extrusion of nuclear material, increased nuclear interchromatin space, vacuolization, appearance of a "ragged" cytoplasmic membrane, hypochromia, gray cytoplasm and division of cell. The hypertrophy of nuclear monocyte and vacuolated neutrophil also appeared. Differential leukocyte counts presented a significant ($p \leq 0.05$) elevation in lymphocyte, neutrophil, basophil and eosinophil numbers. By contrast, a significant decrease was exhibited in monocyte number. Correlation between a fall in the total red blood cell, haematocrit and mean cell volume was suggestive of anemia. A significant ($p \leq 0.05$) reduction in blood glucose and increase in GPT levels was noted indicating the hypoglycemic and hepatotoxic effects. The morphological changes in blood cell were found earlier than the response of blood chemistry to the extract in the treatment group. The severity of effect was thus time dependent.

ภาควิชา.....สัตววิทยา
สาขาวิชา.....สัตววิทยา
ปีการศึกษา..... 2540

ลายมือชื่อนิสิต..... พงศ พงทอง
ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา..... Kingkaew Wattanasirmit
ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษาร่วม..... Patchanee Singh-asa

ACKNOWLEDGEMENTS

I am very much indebted to my thesis advisor, Associate Professor Dr.Kingkaew Wattanasirmkit and Assistant Professor Dr.Patchanee Singh-asa who encouraged me, carry out this thesis, and provided helpful advice and invaluable suggestions, without their support this thesis would not have been possible.

I wish to extend my grateful thank to Professor Dr.Siriwat Wongsiri, the Head of Department of Biology for providing necessary facilities and serving as thesis chairman.

I am specially grateful to thesis committee, Associate Professor Dr.Prakong Tangpraprutgul for her valuable advice, comments and suggestions in completion this thesis.

I also would like to express my thank to Professor Dr.Mir S. Mulla for his assistance in correcting the abstract.

I gratefully acknowledge Professor Dr.Puttipong Voravudhi for giving me the scholarship and Dr.Art-Ong Pradatsundarasar for his kindness and accorded me every facility during period of being a teaching assistant.

I wish to thank Biology Department for use of facilities and to the staff members of Biology for their assistance in many ways. Special thanks to Miss Samphan Suwannarat for her kindness assistance with some materials required for the study.

I want to offer my thanks to the Graduate School, Chulalongkorn University for the financial support for partly undertaking this thesis.

I am specially thankful to Mr.Noppadon Kitana for his valuable advice in statistical analysis. Extra special thanks to Miss Pimphan Saiphet, Miss Jirarach Srijunggam, Miss Siriraks Arrathrakorn, Miss Laksana Keawmanee and Mr.Wudthipong Kerdmoh for their excellent assistance in many things and encouragement with friendly and kindness during the period of thesis presentation preparing.

I wish to express my appreciation to Mr.Yodchai Lapakulchai for his assistance with valuable information required for the study and encouragement as always. Many thanks are due to Cham-cha, a cat of the Department of Biology for being my best friend during the period of thesis writing.

I am most grateful to Mrs.Linda Goldberg for her continuous support, help in many situations and encouragement during the entire period of my both undergraduate and graduate study.

Finally, I would like to extend my deepest appreciation to my family, for their always love, support, trustfulness and understanding. This thesis is dedicated to my grandmother and my uncle who passed away for their fondness, attentiveness and hopefulness in my education.

CONTENT

	PAGE
THAI ABSTRACT.....	D
ENGLISH ABSTRACT.....	E
ACKNOWLEDGEMENT.....	F
CONTENT.....	G
LIST OF TABLES.....	H
LIST OF FIGURES.....	J
CHAPTER I INTRODUCTION.....	1
CHAPTER II LITERATURE REVIEW.....	5
CHAPTER III MATERIALS AND METHODS.....	35
CHAPTER IV RESULTS.....	46
CHAPTER V DISCUSSION.....	85
CHAPTER VI CONCLUSION AND RECOMMENDATION.....	96
REFERENCES.....	98
APPENDIX A.....	109
APPENDIX B.....	113
APPENDIX C.....	116
APPENDIX D.....	129
BIOGRAPHY.....	187

LIST OF TABLES

		PAGE
Table 2.1	A comparison between differential leukocyte count in some fish species	9
Table 2.2	Terpenes and steroids of neem seed <i>A. indica</i> .	21
Table 4.1	Percent mortality of Nile tilapia at various concentrations of neem <i>A. indica</i> seed extract over 96 hours.	47
Table 4.2	Calculated LC ₅₀ values (ppm) of neem <i>A. indica</i> seed extract to Nile tilapia <i>O. niloticus</i> using probit analysis	49
Table 4.3	Incidence of morphological anomalies of blood cell in Nile tilapia after exposure to a sublethal concentration (25.07 ppm) of neem seed extract from 1-7 months.	56
Table 4.4	Severty of morphological alteration of blood cell in Nile tilapia after exposure to a sublethal concentration (25.07 ppm) of neem seed extract from 1-7 months.	57
Table 4.5	Differential leukocyte count of Nile tilapia <i>O. niloticus</i> exposed to a sublethal concentration (25.07 ppm) of neem <i>A. indica</i> seed extract for 7 months.	70
Table 4.6	Haematological parameters of Nile tilapia <i>O. niloticus</i> exposed to 25.07 ppm neem <i>A. indica</i> seed extract from the 4 th -7 th month.	76
Table 4.7	Blood glucose levels in Nile tilapia <i>O. niloticus</i> exposed to neem <i>A. indica</i> seed extract at a sublethal concentration (25.07 ppm) from the 2 nd -7 th month.	77
Table 4.8	Blood biochemistry of Nile tilapia <i>O. niloticus</i> exposed to a sublethal concentration of neem <i>A. indica</i> seed extract from the 4 th -7 th month.	81
Table 4.9	Water quality during a sublethal toxicity test of neem <i>A. indica</i> seed extract on Nile tilapia <i>O. niloticus</i> .	84

LIST OF FIGURES

		PAGE
Figure 2.1	Biochemical determination of serum transaminases ...	15
Figure 2.2	The photograph of neem <i>Azadirachtin indica</i> A. Juss. tree	18
Figure 2.3	The chemical structure of azadirachtin..... (Mulla et al., 1997)	19
Figure 3.1	Photograph of Nile tilapia <i>Oreochromis niloticus</i> Linn. at the age of 1 and 6 months.	43
Figure 3.2	An alcoholic extract of neem <i>Azadirachta indica</i> seed from commercial source.	43
Figure 3.3	This photograph shows cardiac puncture technique for blood sampling.	44
Figure 3.4	This photograph shows blood sampling by cutting..... caudal peduncle.	44
Figure 3.5	(a) Hemacytometer (b) RBC diluting pipette (c) WBC diluting pipette.	45
Figure 4.1	Percent mortality of Nile tilapia <i>O. niloticus</i> after acute toxicity test.	50
Figure 4.2	Percent survival of Nile tilapia <i>O. niloticus</i> after acute toxicity test.	50
Figure 4.3	Micrograph of normal erythrocyte of 2 months old.... Nile tilapia <i>Oreochromis niloticus</i> .	58
Figure 4.4	Micrograph of the normal round shaped thrombocyte with a thin rim of cytoplasm.	58
Figure 4.5	Micrograph of normal spindle shaped thrombocyte ... with elongated nucleus centrally located.	59
Figure 4.6	Micrograph of the characteristic of teardrop-shaped thrombocyte.	59
Figure 4.7	Micrograph of normal lymphocyte with numerous fine pseudopodia extending from cell membrane and a thin rim of light pale blue cytoplasm	60
Figure 4.8	Micrograph of normal monocyte shows a magenta-colored eccentrically located nucleus in the vacuolated cytoplasm.	60

LIST OF FIGURES (Cont.)

	PAGE
Figure 4.9	Micrograph of normal neutrophil with numerous61 fine dark violet granules shows an intended nucleus eccentrically located.
Figure 4.10	Micrograph of normal basophil shows61 the large oval, eccentric nucleus and the cytoplasm stains small darkly granules.
Figure 4.11	Micrograph of eosinophil with an eccentric62 nucleus shows refractile eosinophilic red-orange granules.
Figure 4.12	Micrograph shows immature erythrocyte62 and a “ragged” appearance of cytoplasmic membrane of Nile tilapia blood after exposure to 25.07 ppm neem seed extract for 1 month.
Figure 4.13	Micrograph shows extrusion of nuclear material63 in immature erythrocyte after exposure to 25.07 ppm of neem seed extract for 2 months.
Figure 4.14	Micrograph of anomalous erythrocyte63 shows poikilocytosis and an increase of nuclear interchromatin spaces in fish exposed to a sublethal concentration (25.07 ppm) of neem seed extract for 1 month.
Figure 4.15	Micrograph shows the extrusion of nuclear64 material in mature erythrocyte of fish after exposure to a sublethal concentration (25.07 ppm) of neem seed extract for 1 month.
Figure 4.16	Micrograph of anomalous erythrocyte of64 Nile tilapia shows gray cytoplasm and an increase of nuclear interchromatin space in the fourth month of fish exposure to a sublethal concentration of neem seed extract.
Figure 4.17	Micrograph shows vacuolated erythrocyte after65 exposure to a sublethal concentration (25.07 ppm) of neem seed extract for 3 months.

LIST OF FIGURES (Cont.)

		PAGE
Figure 4.18	Micrograph of hypochromic erythrocyte65 after exposure to a sublethal concentration (25.07 ppm) of neem seed extract for 4 months.	65
Figure 4.19	Micrograph of hypochromic erythrocyte66 shows gray cytoplasm and mildly extrusion of nuclear material after exposure to neem seed extract for 4 months.	66
Figure 4.20	Micrograph of dividing erythrocyte66 after exposure to a sublethal concentration of neem seed extract for 1 month.	66
Figure 4.21	Micrograph of anomalous monocyte67 shows nuclear hypertrophy caused by exposure to a sublethal concentration (25.07 ppm) of neem seed extract for 2 months.	67
Figure 4.22	Micrograph shows anomalous vacuolated.....67 neutrophil of Nile tilapia after exposure to a sublethal concentration (25.07 ppm) of neem seed extract for 5 months	67
Figure.4.23	Differential leukocyte count of Nile tilapia.....71 <i>O. niloticus</i> in control group at the of 2-8 months.	71
Figure.4.24	Percentage of lymphocyte in control.....72 and treatment group at each time interval exposure.	72
Figure.4.25	Percentage of monocyte in control and treatment.....72 group at each time interval of exposure.	72
Figure.4.26	Percentage of neutrophil in control and.....73 treatment group at each time interval of exposure.	73
Figure.4.27	Percentage of basophil in control and.....73 treatment group at each time interval of exposure.	73
Figure.4.28	Percentage of eosinophil in control and.....74 treatment group at each time interval of exposure.	74
Figure.4.29	Total leukocyte count in control and.....78 treatment group at each time interval of exposure to a sublethal concentration of neem <i>A. indica</i> seed extract.	78

LIST OF FIGURES (Cont.)

	PAGE
Figure.4.30	Total red blood cell count in control and.....78 treatment group at each time interval of exposure to sublethal concentration of neem <i>A. indica</i> seed extract.
Figure.4.31	Haematocrit in control and treatment.....79 group at each time interval of exposure to a sublethal concentration of neem <i>A. indica</i> seed extract.
Figure.4.32	Mean cell volume (MCV) in control.....79 and treatment group at each time interval of exposure to a sublethal concentration of neem <i>A. indica</i> seed extract.
Figure.4.33	Blood glucose level in control and.....82 treatment group at each time interval of exposure to a sublethal concentration of neem <i>A. indica</i> seed extract.
Figure.4.34	ALP level in control and treatment.....82 group at each time interval of exposure to a sublethal concentration of neem <i>A. indica</i> seed extract.
Figure.4.35	GOT level in control and treatment.....83 group at each time interval of exposure to a sublethal concentration of neem <i>A. indica</i> seed extract.
Figure.4.36	GPT level in control and treatment.....83 group at each time interval of exposure to a sublethal concentration of neem <i>A. indica</i> seed extract.