ใบรับรองวิทยานิพนธ์

บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต (จุลชีววิทยาทางสัตวแพทย์)

ปริญญา

จุลชีววิทยาทางสัตวแพทย์ จุลชีววิทยาและวิทยาภูมิคุ้มกัน

สาขา **ภาควิชา**

เรื่อง การศึกษาลักษณะทางชีววิทยาและการก่อโรคของราน้ำที่แยกได้จากไข่ปลาบึก

Study on Biological Characteristic and Infection of Aquatic Fungi Isolated from Eggs of Mekong Giant Catfish (*Pangasianodon gigas*, Chevey)

นามผู้วิจัย นายณรงค์ อาบกิ่ง

ได้พิจารณาเห็นชอบโดย

อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก .....

(รองศาสตราจารย์องอาจ เลาหวินิจ, Ph.D.)

หัวหน้าภาควิชา .....

(รองศาสตราจารย์พรทิพภา เล็กเจริญสุข, Ph.D.)

บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์รับรองแล้ว

.....

(รองศาสตราจารย์กัญจนา ธีระกุล, D.Agr.)

คณบดีบัณฑิตวิทยาลัย

วันที่ ..... **เดือน** ..... **พ.ศ.** .....

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

วิทยานิพนธ์

เรื่อง

การศึกษาลักษณะทางชีววิทยาและการก่อโรคของราน้ำที่แยกได้จากไข่ปลาบึก

Study on Biological Characteristic and Infection of Aquatic Fungi Isolated from Eggs of Mekong Giant Catfish (*Pangasianodon gigas*, Chevey)

โดย

นายณรงค์ อาบกิ่ง

เสนอ

บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

เพื่อความสมบูรณ์แห่งปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต (จุลชีววิทยาทางสัตวแพทย์)

พ.ศ. 2557

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ณรงค์ อาบกิ่ง 2557: การศึกษาลักษณะทางชีววิทยาและการก่อโรคของราน้ำที่แยกได้จากไข่ปลาบึก ปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต (จุลชีววิทยาทางสัตวแพทย์) สาขาจุลชีววิทยาทางสัตวแพทย์ ภาควิชาจุลชีววิทยาและวิทยาภูมิคุ้มกัน อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก: รองศาสตราจารย์องอาจ เลาหวินิจ, Ph.D. 61 หน้า

การศึกษาชนิดของเชื้อราน้ำที่แยกจากตัวอย่างไข่ปลาบึกด้านชีววิทยาและการก่อโรค และตัวอย่างน้ำจากบ่อเพาะฟัก ที่เก็บจากสถาบันวิจัยเพาะพันธุ์สัตว์น้ำจืด จังหวัดพระนครศรีอยุธยา ตั้งแต่ปี พ.ศ.2551 ถึง 2553 (ในช่วงฤดูวางไข่) ผลการศึกษา พบราน้ำ 2 สกุล คือ ราน้ำสกุล *Achlya* พบจำนวน 8 สายพันธุ์ที่แยกได้จากไข่ปลาบึก 1 สายพันธุ์ที่แยกได้จากน้ำ และราน้ำสกุล *Saprolegnia* พบจำนวน 5 สายพันธุ์ที่แยกได้จากไข่ปลาบึก 2 สายพันธุ์ที่แยกได้จากน้ำ ผลการศึกษาคุณสมบัติทางชีววิทยาของเชื้อราน้ำพบว่า อุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการเจริญของราน้ำ สกุล *Achlya* และ สกุล *Saprolegnia* ที่แยกได้จากไข่ปลาบึก และน้ำ คือ 30 องศาเซลเซียส (°C) ผลของความเค็มของเกลือโซเดียมคลอไรด์ต่อการเจริญของราน้ำสกุล *Achlya* และสกุล *Saprolegnia* คือ 10 ส่วนในพันส่วน (part per thoundson: ppt) และ 25 ppt ตามลำดับ ยกเว้น *Saprolegnia* sp. E3/52-P2 ที่ทนความเค็มของเกลือโซเดียมคลอไรด์ที่ 30 ppt ค่าความเป็นกรด – ด่าง (pH) ของอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวที่มีผลต่อการเจริญของสายราน้ำทั้ง 2 สกุล คือ ช่วง pH 4-11 ค่า pH ที่เหมาะสมต่อการเจริญของสายรา คือ 5 และ 6 ตามลำดับ ผลการศึกษาความสามารถในการก่อโรคของราน้ำในไข่ปลาบึกในระดับห้องปฏิบัติการ โดยให้ไข่ปลาบึกได้รับ zoospores ความเข้มข้น 1×10^4 สปอร์/มิลลิลิตร และผลการศึกษาทางจุลพยาธิของไข่ปลาบึกที่ติดเชื้อราน้ำพบเส้นใยของราน้ำแทรกผ่านชั้นเยื่อหุ้มไข่เข้าไปย่อยสลายไข่แดงเกิดเป็นช่องว่างภายในไข่ปลาบึก จากผลการศึกษาสรุปได้ว่า ราน้ำที่สามารถก่อโรคกับไข่ปลาบึกในห้องทดลอง คือ เชื้อ *Achlya* spp. สายพันธุ์ T.MCF1-02, E.MCF 2-001 และ E4/52-10 และ เชื้อ *Saprolegnia* spp. สายพันธุ์ E1/53-12

_____ _____ ___ / ___ / ___

ลายมือชื่อนิสิต ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

Narong Abking 2014: Study on Biological Characteristic and Infection of Aquatic Fungi Isolated from Eggs of Mekong Giant Catfish (*Pangasianodon gigas*, Chevey). Master of Science (Veterinary Microbiology), Major Field: Veterinary Microbiology, Department of Veterinary Microbiology and Immunology. Thesis Advisor: Associate Professor Ong-ard Lawhavinit, Ph.D. 61 pages.

The 2 genus aquatic fungi were isolated from the both of a Makong Giant Catfish, (*Pangasianodon gigas*, Chevey) eggs and the rearing water at Inland Aquaculture Research Institute, Phra Nakhon Sriayutthaya province, in spawning season, during 2008 to 2010. Aquatic fungi were morphological characterized as following: genus *Achlya* including *Achlya* spp. 8 of Achlya spp. isolated from Mekong Giant Catfish eggs and 1 isolated from rearing water. Genus *Saprolegnia* including 5 isolates of *Saprolegnia* spp. isolated from Mekong Giant Catfish eggs and 2 isolates from rearing water. From some biological characteristic study, optimal temperature for 2 genera were 30 °C. Almost the isolated of *Achlya* spp. and *Saprolegnia* spp. could tolerated to high salinity medium at 10 part per thoundson (ppt) and 25 ppt, respectively. Except for *Saprolegnia* spp. (E3/52-P2) could tolerated up to 30 ppt. Those isolates could grow in broth at pH 4 -11, while the optimal pH for *Achlya* spp. and *Saprolegnia* spp. were pH 5 and 6, respectively. The studies on pathogenicity test were conducted in eggs of Mekong Giant Catfish by exposed 1×10^4 spores/mL and the histological examination of infected eggs showed hyphae penetrated into cell membrane of eggs and digested yolk granules dued to vacuole form inside. The results show that, pathogens are *Achlya* spp. (T.MCF1-02, E.MCF 2-001, E4/52-10) and *Saprolegnia* spp. (E1/53-12).

_____ _____ ___ / ___ / ___

Student's signature Thesis Advisor's signature

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

กิตติกรรมประกาศ

ข้าพเจ้าขอกราบขอบพระคุณ รศ.ดร.องอาจ เลาหวินิจ ประธานกรรมการที่ปรึกษา ที่ช่วยเหลือแนะนำวิธีการและแก้ไขวิทยานิพนธ์เล่มนี้จนเสร็จสมบูรณ์ด้วยดี และขอขอบพระคุณประธานการสอบและ ผู้ทรงคุณวุฒิภายนอก ที่ให้คำแนะนำแก้ไข ทำให้วิทยานิพนธ์เล่มนี้สมบูรณ์ยิ่งขึ้น

ขอขอบพระคุณมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ที่อนุญาตให้พนักงานมหาวิทยาลัย (เงินงบประมาณ) สายช่วยวิชาการได้ลาศึกษาต่อในระดับปริญญาโท และขอขอบคุณกองทุนพัฒนามหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ที่สนับสนุนทุนการศึกษาทุนการศึกษาให้แก่ข้าพเจ้า

ขอขอบพระคุณคณะเทคนิคการสัตวแพทย์ที่สนับสนุนและเปิดโอกาศให้บุลากรสายช่วยวิชาการได้ลาศึกษาต่อในระดับปริญญาโท และเอื้อเฟื้ออุปกรณ์ในการทำวิจัย

ขอขอบพระคุณคณาจารย์ และบุคลากรของภาควิชาจุลชีววิทยาและวิทยาภูมิคุ้มกันทุกท่านที่ให้ความช่วยเหลือ และเอื้อเฟื้อสถานที่ อุปกรณ์ในการทำวิจัย ตลอดจนให้คำแนะนำ และเป็นกำลังใจให้ปฏิบัติงานสำเร็จ

ขอขอบพระคุณสถาบันวิจัยการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำจืด กรมประมง จังหวัดพระนครศรีอยุธยา ที่เอื้อเฟื้อตัวอย่างไข่ปลาบึกในการศึกษาและวิจัยจนสำเร็จในครั้งนี้

สุดท้ายขอขอบพระคุณ คุณพ่อ คุณแม่ และครอบครัวของข้าพเจ้าคอยเป็นกำลังใจ และสนับสนุนให้ข้าพเจ้าได้ศึกษาจนสำเร็จการศึกษาและได้ทำงานในตำแหน่งหน้าที่การงานที่ดี

ณรงค์ อาบกิ่ง

พฤศจิกายน 2557

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

สารบัญ

หน้า

สารบัญ (1)

สารบัญตาราง (2)

สารบัญภาพ (3)

คำนำ 1

วัตถุประสงค์ 2

การตรวจเอกสาร 3

อุปกรณ์และวิธีการ 22

อุปกรณ์ 22

วิธีการ 23

ผลและวิจารณ์ 28

สรุปและข้อเสนอแนะ 40

สรุป 40

ข้อเสนอแนะ 41

เอกสารและสิ่งอ้างอิง 42

ภาคผนวก 47

ภาคผนวก ก อาหารเลี้ยงเชื้อ 48

ภาคผนวก ข การคำนวณปริมาณ Zoospores 50

ภาคผนวก ค ภาพการผสมเทียมปลาบึก การเก็บตัวอย่างไข่ปลาบึกจากบ่อเพาะฟักลูกปลาบึก ณ สถาบันวิจัยการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำจืดกรมประมง จังหวัดพระนครศรีอยุธยา 52

ภาคผนวก ง การเตรียมสีย้อม Hematoxilin and Eosin (H&E) และ สีย้อม Grocott – Gomori methenamine Silver และการย้อมสีชิ้นเนื้อเยื่อไข่ปลาบึก 56

ประวัติการศึกษา และการทำงาน 61

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

สารบัญตาราง

ตารางที่		หน้า
1	จำนวนตัวอย่างไข่และน้ำที่ใช้เพาะพันธุ์ปลาบึก ระหว่างปี พ.ศ. 2551 – 2553	28
2	จำนวนและชนิดของราน้ำที่แยกได้ ในระหว่างปี พ.ศ. 2551 – 2553	29
3	แสดงผลของอุณหภูมิ ความเค็มของเกลือโซเดียมคลอไรด์ และค่าความเป็นกรด – ด่างที่เหมาะสมต่อการเจริญของเชื้อราน้ำ	35
4	อัตราการฟักรอดของไข่ปลาบึกหลังจากติดเชื้อราน้ำ	37

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

สารบัญภาพ

ภาพที่		หน้า
1	แสดงวิการของโรคติดเชื้อราน้ำในปลาสวยงาม	3
2	แสดงลักษณะรูปร่างของ Zoospore ของราน้ำใน Class Oomycetes	5
3	พัฒนาการของ *Achlya colorata* และ *Thraustotheca clavata*	7
4	ลักษณะของสายราน้ำใน Genus *Saprolegnia*	9
5	พัฒนาการของ *Dictyuchus sterile* และ *Pythiopsis cymosa*	10
6	การสืบพันธุ์แบบไม่อาศัยเพศของราในสกุล *Achlya* และ *Saprolegnia*	12
7	การสืบพันธุ์แบบอาศัยเพศของราในสกุล *Achlya*	12
8	ลักษณะส่วนประกอบที่สำคัญของปลาบึกวัยต่างๆ	16
9	การทดสอบความสามารถของเชื้อราน้ำ ในการก่อโรคในไข่ปลาบึก	27
10	พัฒนาการของ Sporangium ที่ปลายสายรา	30
11	ลักษณะการปล่อย Zoospores ออกจากบริเวณปลายเปิดของ Sporangium ของราน้ำในสกุล *Achlya*	30
12	ลักษณะของ Zoosporangium ของราน้ำสกุล *Achlya* หลังจากปล่อย primary zoospores	31
13	ลักษณะของ Zoosporangium ของราน้ำสกุล *Saprolegnia* หลังจากปล่อย primary zoospores	31
14	พัฒนาการของ Oogonium ของราน้ำในสกุล *Achlya* ที่แยกได้จากไข่ปลาบึก	32
15	พัฒนาการของ Oogonium ของราน้ำในสกุล *Saprolegnia* ที่แยกได้จากไข่ปลาบึก	32
16	แสดงการงอกของ Germ tube ของราน้ำในสกุล *Achlya*	33
17	แสดงการเจริญของสายราบนจานเพาะเชื้อ GY agar ที่อุณหภูมิ 20 °C, เวลา 1 วัน	33
18	แสดงการทดสอบผลของความเป็น กรด – ด่าง ของอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวที่มีผลต่อการเจริญของสายราน้ำ	34
19	แสดงผลการเพาะเชื้อราน้ำจากตัวอย่างไข่ปลาบึกที่ไม่สามารถฟักรอดเป็นลูกปลาบึกได้ หลังการทดลองการก่อโรคของราน้ำในไข่ปลาบึก เปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม	36

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

สารบัญภาพ (ต่อ)

ภาพที่		หน้า
20	จุลพยาธิของไข่ปลาบึกที่ติดเชื้อราน้ำ พบสายราน้ำสามารถแทรกผ่านชั้นเยื่อหุ้มไข่เข้าไปทำลายไข่แดง	38
21	จุลพยาธิของไข่ปลาบึกที่ติดเชื้อราน้ำ ย้อมด้วยสี Hematoxylin and Eosin (H&E)	38
22	จุลพยาธิของไข่ปลาบึกที่ติดเชื้อราน้ำ ย้อมด้วยสี Grocott-Gomori methenamine-silver	39

ภาพผนวกที่

ค1	การรีดไข่จากแม่พันธุ์ปลาบึก	53
ค2	การรีดน้ำเชื้อจากพ่อพันธุ์ปลาบึก	53
ค3	การใช้ขนไก่กวนผสมระหว่างไข่ปลาบึกกับน้ำเชื้อ	54
ค4	การเพาะฟักไข่ปลาบึกในถังเพาะฟักทรงกรวยแบบเป่าน้ำวน	54
ค5	การเก็บตัวอย่างไข่ปลาบึกจากบ่ออนุบาลเพาะฟักลูกปลาบึก	55

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

การศึกษาลักษณะทางชีววิทยาและการก่อโรคของราน้ำที่แยกได้จากไข่ปลาบึก

Study on Biological Characteristic and Infection of Aquatic Fungi Isolated from Eggs of Mekong Giant Catfish (*Pangasianodon gigas*, Chevey)

คำนำ

ปัญหาที่มักเกิดควบคู่กับการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำโดยทั่วไป คือการเกิดโรคสัตว์น้ำ โรคจากเชื้อราน้ำในปลาเป็นอีกโรคหนึ่งที่มีความสำคัญในอุตสาหกรรมการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำมีรายงานพบการติดเชื้อราในไข่ปลาน้ำจืด และน้ำกร่อย ส่วนใหญ่มีสาเหตุมาจากการติดเชื้อราน้ำในวงศ์ Saprolegniaceae ได้แก่ ราน้ำสกุล *Saprolegnia* spp. และ *Achlya* spp. และมักพบการเกิดโรคราน้ำในช่วงที่ปลาวางไข่ ส่งผลให้อัตราการฟักรอดที่ต่ำ ปลาบึกเป็นปลาน้ำจืดที่ไม่มีเกล็ดขนาดใหญ่ที่สุดในโลก มีแหล่งอาศัยเฉพาะในแม่น้ำโขงและแม่น้ำสาขา ปลาบึก จัดอยู่ในกลุ่มของสัตว์น้ำที่ใกล้สูญพันธุ์ ตามอนุสัญญาว่าด้วยการอนุรักษ์พันธุ์พืชและสัตว์ป่า (Convention on International Trade in Endangered Species of Wold Fauna and Flora : CITES) จากรายงานประจำปี 2549 ของสถาบันวิจัยการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำจืด สำนักวิจัยและพัฒนาประมงน้ำจืด กรมประมง พบว่า สามารถเพาะพันธุ์ปลาบึกและปล่อยคืนแหล่งน้ำธรรมชาติ กว่า 16,800 ตัว และลูกปลาบึกอีกส่วนหนึ่งยังสามารถแบ่งขายให้กับเกษตรกรได้นำไปเพาะเลี้ยง ในราคาตัวละ 40 บาท ซึ่งสามารถทำรายได้ให้แก่ภาครัฐได้อีกทางหนึ่ง หากการเพาะฟักลูกปลาบึกมีอัตราการรอดที่สูงขึ้น จะสามารถเพิ่มจำนวนประชากรปลาบึกในธรรมชาติให้สูงขึ้นอีกทั้งยังสามารถสร้างมูลค่าให้กับปลาบึกให้สูงขึ้นตามไปด้วย

การศึกษาในครั้งนี้เพื่อต้องการหาเชื้อราน้ำ ที่อาจเป็นสาเหตุที่ทำให้อัตราการเพาะฟักของลูกปลาบึกลดลง เพื่อหาแนวทางป้องกันและหาวิธีการที่ช่วยเพิ่มอัตราการเพาะฟักของปลาบึกให้สูงขึ้น และรวมทั้งการศึกษาลักษณะบางประการของเชื้อราน้ำที่แยกได้ เพื่อนำข้อมูลที่ได้ไปวางแผนในการป้องกันและลดการปนเปื้อนของเชื้อราน้ำในระหว่างการเพาะฟักไข่ปลาบึก และช่วงอนุบาลลูกปลาบึก อีกทั้งยังทำการศึกษาความสามารถในการก่อโรคในไข่ปลา ของเชื้อราที่แยกได้จากไข่ปลาบึก เพื่อให้ได้ข้อมูลทางพยาธิวิทยาที่เป็นประโยชน์ต่อการป้องกันและรักษาโรคที่เกิดขึ้น

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

วัตถุประสงค์

1. ศึกษาเพื่อแยกเชื้อและจำแนกชนิดของราน้ำที่ปนเปื้อนในไข่ปลาบึก และตัวอย่างน้ำจากบ่ออนุบาลเพาะฟักลูกปลาบึก

2. ศึกษาลักษณะทางชีววิทยาบางประการของราน้ำที่แยกจากไข่ปลาบึก และตัวอย่างน้ำจากบ่ออนุบาลเพาะฟักลูกปลาบึก

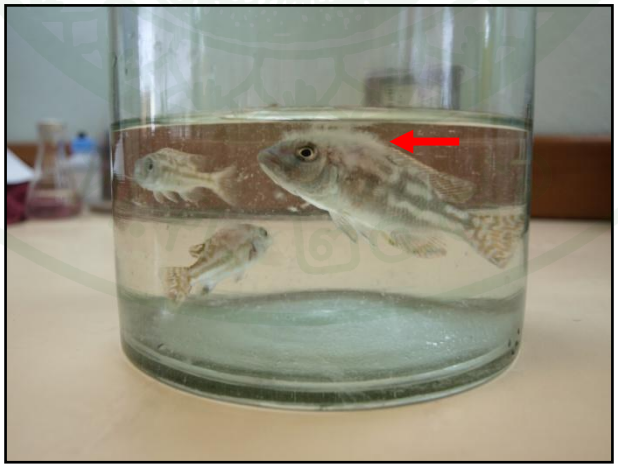
3. ศึกษาการก่อโรคของราน้ำในไข่ปลาบึก

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

การตรวจเอกสาร

ราน้ำ

ราน้ำ (aquatic fungi) จัดอยู่ใน Kingdom *Straminipila*, Division *Oomycota* (Dick, 2001) สมาชิกของราน้ำใน Order *Saprolegniales* ซึ่งได้แก่ ราในกลุ่ม *Saprolegnia* spp., *Achlya* spp.และ *Aphonomyces* spp. เป็นกลุ่มของราน้ำที่สำคัญ และสามารถก่อให้เกิดการติดเชื้อรา ในปลาหลายชนิด รวมถึงปลาที่เพาะเลี้ยงในระบบฟาร์ม และก่อโรคในปลาสวยงาม (West, 2006) ราน้ำใน Order *Saprolegnia*les เป็นสาเหตุที่ทำให้เกิดโรค Saprolegniasis ซึ่งมีลักษณะอาการของโรคที่สังเกตได้ คือ พบวิการของโรค เป็นแผ่น สีขาว/ เทา (white or gray patch) ของสายรา กระจายตามลำตัวและครีบของปลาน้ำจืด (West, 2006) การติดเชื้อราน้ำมักเกิดในช่วงฤดูการวางไข่ และมีปัจจัยที่ส่งเสริมให้เกิดการติดเชื้อราน้ำ คือ การเกิดบาดแผลตามผิวหนัง ความเครียดและการติดเชื้อชนิดอื่นมาก่อน (Neish and Huges, 1980) ลักษณะของปลาหรือไข่ปลาที่ติดเชื้อราน้ำ จะมีผลทำให้ไข่ปลาจะมีอัตราการเพาะฟักที่ต่ำ พบลักษณะเส้นใยสีขาว คล้ายปุยฝ้าย หรือสีขาวปนน้ำตาลเนื่องจากมีตะกอนในน้ำเกาะอยู่บนเส้นใยราน้ำ เจริญอยู่ตามผิวหนัง ครีบ เหงือก หรือบนไข่ปลา บางครั้งพบว่าเชื้อราสามารถแทรกสายราลงไปในชั้นกล้ามเนื้อใต้ผิวหนังของปลาได้ด้วย (Vorderwinkler *et al*., 1962; Goven-Dixon, 1993; Howe *et al*., 1998; Bruno and Wood, 1999)



ภาพที่ 1 แสดงวิการของโรคติดเชื้อราน้ำในปลาสวยงาม พบลักษณะเส้นใยสีขาว คล้ายปุยฝ้าย ปกคลุมบริเวณส่วนหัวและลำตัวตัวส่วนบนของตัวปลา

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

1. อนุกรมวิธานของราน้ำ

อนุกรมวิธานของราน้ำ (Dick, 2001) มีดังนี้

Kingdom Straminipila

Division Oomycota

Class Oomycetes

Order Saprolegniales

Family Saprolegniaceae

Genus *Saprolegnia*

Genus *Achlya*

Genus *Aphanomyces*

Genus *Thraustotheca*

Genus *Dictyuchus*

2. ลักษณะทั่วไปของราน้ำใน Class Oomycestes

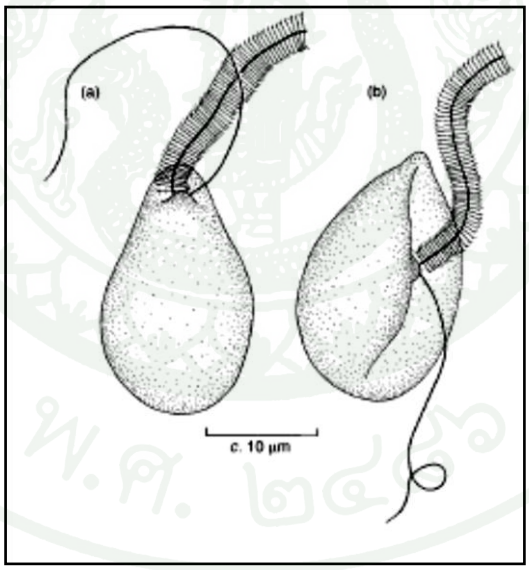
ราน้ำใน Class Oomycetes มีลักษณะทั่วไป คือ สามารถสร้าง Zoospore ที่สามารถว่ายน้ำได้ โดย Zoospore จะประกอบด้วยตัวเซลล์ที่ลักษณะคล้ายหยอดน้ำ และด้านข้างตัวเซลล์จะมีแฟลกเจลล่า 2 เส้น โดยมีหนึ่งเส้นที่มีลักษณะแบบ whiplash type ไม่มี lateral hairs บนเส้นของแฟลกเจลล่า ส่วนอีกเส้นมีลักษณะ แบบ tinsel type ที่มี lateral hairs บนเส้นของแฟลกเจลล่า (ภาพที่ 2) สมาชิกส่วนใหญ่ใน Class นี้ มีถิ่นอาศัยตามแหล่งน้ำ แต่มีบางกลุ่ม เช่น Order Saprolegniales และ Order Peronosporales ที่สามารถเจริญได้ในดิน ผนังเซลล์ของราน้ำใน Class Oomycetes นั้นต่างจากผนังเซลล์ของราทั่วไป คือไม่มีองค์ประกอบที่เป็น chitin ราน้ำใน Class นี้ส่วนใหญ่มีองค์ประกอบหลักเป็น glucan ที่เชื่อมต่อกันด้วยพันธะ β-(1-3) และ β-(1-3) glucosidic linkage ส่วนองค์ประกอบของผนังเซลล์ที่เป็น cellulose พบในปริมาณน้อย ราน้ำใน Class Oomycetes มีสมาชิก 4 Order ดังนี้ Order Saprolegniales, Order Leptomitales, Order Lageenidiales และ Order Peronosporales

ราน้ำใน Order Saprolegniales สมาชิกของราน้ำในกลุ่มนี้เป็นที่รู้จักเป็นอย่างดี ในชื่อ Aquatic fungi มีถิ่นอาศัย ในดินที่เปียกชื้น ชายฝั่งของทะเลสาบ และในแหล่งน้ำจืด ดำรงชีพแบบ

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

saprophytes ราน้ำใน Genus *Saprolegnia* และ *Achlya* มีความสำคัญและสร้างความเสียหายต่อสัตว์น้ำ ดำรงชีพแบบ parasites ก่อโรคในปลา และในไข่ปลา (Webster, 1980)

ลักษณะของ Zoospore มีแฟลกเจลล่า 2 เส้นเกาะติดทางด้านข้าง แฟลกเจลล่าที่อยู่ด้านหน้าเป็นแบบ tinsel type ส่วนแฟลกเจลล่าที่อยู่ด้านท้ายเป็นแบบ whiplash type primary zoospore รูปร่างคล้ายหยดน้ำ (pear-shaped) มีแฟลกเจลล่า 2 เส้นเกาะติดทางด้านบน สามารถว่ายน้ำได้ในช่วงเวลาสั้นๆ จากนั้น primary zoospore จะเข้าสู่ระยะพัก (primary cyst) โดยสลัดชิ้นส่วนที่เป็นแฟลกเจลล่าทิ้ง ระยะต่อมาจะงอกให้ secondary zoospore รูปร่างคล้ายเมล็ดถั่ว (bean-shaped) มีแฟลกเจลล่า 2 เส้นเกาะติดทางด้านข้าง สามารถว่ายน้ำได้ระยะเวลาที่นานกว่า primary zoospore (ภาพที่2) จากนั้น secondary zoospore จะเข้าสู่ระยะพักครั้งที่ 2 ในระยะนี้ cyst ที่เกิดขึ้นสามารถงอกให้ secondary zoospore ที่สามารถว่ายน้ำได้อีกครั้ง เราเรียกรูปแบบการงอกนี้ว่า repeated emergence หรือจากระยะพักครั้งที่ 2 นี้ cyst ที่เกิดขึ้นจะงอกเป็น germ tube ที่จะพัฒนาไปเป็นเส้นใยสายราได้ต่อไป (Webster, 2007)



ภาพที่ 2 แสดงลักษณะรูปร่างของ Zoospore ของราน้ำใน Class Oomycetes, a = primary zoospore, b = secondary zoospore

ที่มา: Webster (2007)

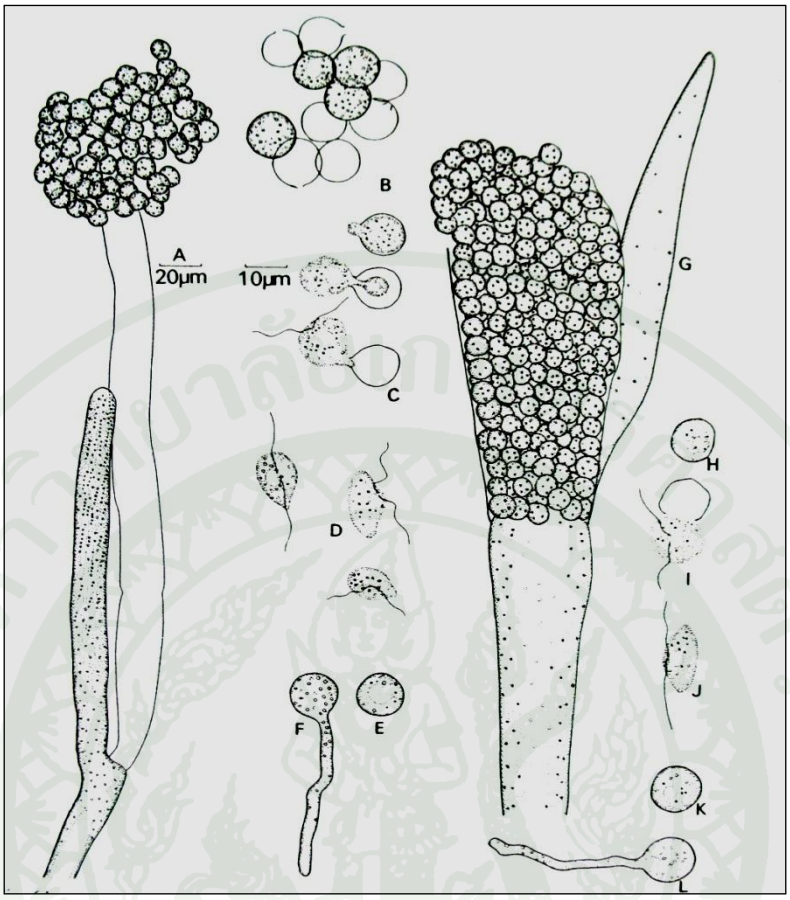
ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ราน้ำใน Family Saprolegniaceace นี้ มีสมาชิกประมาณ 20 Genus กลุ่มของเชื้อที่พบได้บ่อยๆ คือ Genus *Saprolegnia*, *Achlya, Aphanomyces, Dictyuchus* และ *Thraustotheca* เป็นเชื้อราที่ไม่มีผนังกั้น (coenocytic hyphae) สามารถแยกเชื้อได้จากตัวอย่างน้ำ โคลน และดินที่เปียกชื้น โดยใช้เมล็ดฝิ่นที่ผ่านการต้มแล้ว (boiled hemp seed) เป็นเหยื่อล่อ โดยใส่ลงไปในจานเพาะเชื้อที่ภายในบรรจุ ตัวอย่างน้ำ หรือ ดิน จากนั้นภายใน 2 วันหากตัวอย่างมีราน้ำปะปนอยู่ จะสังเกตเห็นเส้นใยสายราเจริญบนเมล็ดฝิ่น เราสามารถตัดปลายเส้นใยสายราไปทำการเพาะเลี้ยงบนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็งที่มีความเหมาะสมได้ต่อไป (Shigeki and Tokumasu, 2002)

2.1 ราน้ำใน Genus *Achlya*

พบได้ทั่วไปในดิน และในน้ำที่มีเศษซากของพืช มีรายงานการก่อโรคในปลา พัฒนาการของ zoosporangia ของ *Achlya* คล้ายกับ *Saprolegnia* ในระยะแรก แตกต่างกันที่รูปแบบการปล่อย primary zoospores ออกจาก zoosporangium ของ *Achlya*นั้นจะไม่ว่ายน้ำออกไป แต่จะเกาะกลุ่มกันที่ บริเวณปลายเปิดของ zoosporangium (ภาพที่ 3) จากนั้นจะเข้าสู่ระยะพัก (encyst) ระยะต่อมาจะงอกให้ secondary zoospore ที่มีแฟลกเจลล่า 2 เส้น สามารถว่ายน้ำได้ จากนั้นจะเข้าสูระยะพักครั้งที่ 2 แล้วจึงงอกให้ germ tube ที่เจริญไปเป็นเส้นใยสายรา หรืออาจงอกให้ secondary zoospore ได้อีกครั้ง

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์



ภาพที่ 3 พัฒนาการของ *Achlya colorata* และ *Thraustotheca clavata* *Achlya colorata* (A-F): A การเกาะกลุ่มของ primary zoospore ที่บริเวณปลายเปิดของ zoosporangium, B แสดง primary cyst, C ระยะต่างๆ ของการปล่อย secondary zoospore, D secondary zoospore, E-F secondary cyst และ การงอกเป็น germ tube; *Thraustotheca clavata* (G-L): G การเข้าสู่ระยะพักที่บริเวณ zoosporangium, H primary cyst, I การปล่อย secondary zoospore, J secondary zoospore, K secondary cyst และ L การงอกของ secondary cyst เป็น germ tube

ที่มา: Webster (1980)

2.2 รานำ้ใน Genus *Aphanomyces*

มีความแตกต่างจาก Genus *Achlya* ตรงที่ขนาดของสายราและขนาดของ sporangium ที่แคบกว่าภายใน มีการจัดเรียงสปอร์เพียงแถวเดียว zoospore สามารถว่ายน้ำได้ที่อุณหภูมิต่ำกว่า 20

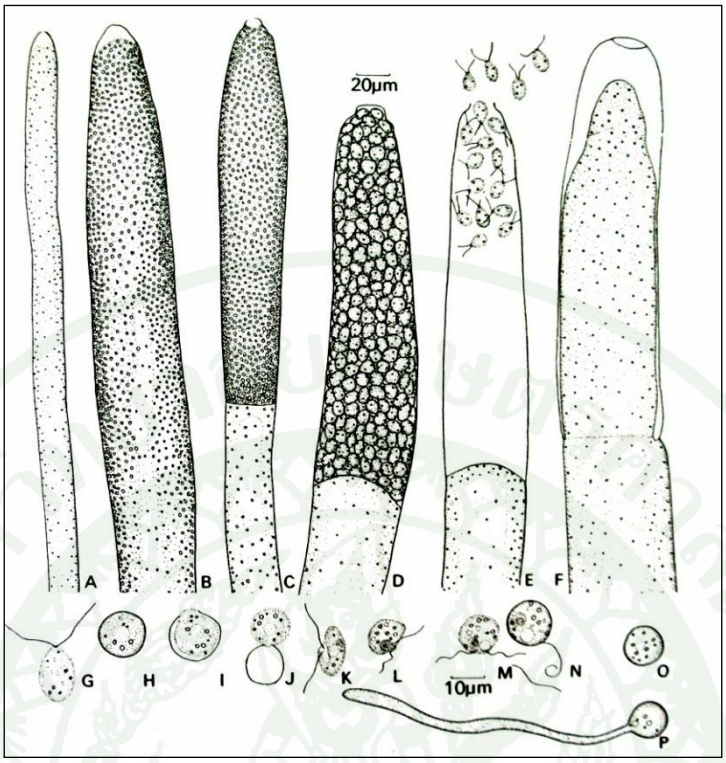
ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

องศาเซลเซียส จากนั้น primary zoospore จะเข้าสู่ระยะพัก (encyst) ที่บริเวณปลายเปิดของ sporangium หากอุณหภูมิของน้ำสูงกว่า 20 องศาเซลเซียส พบว่า primary zoospore จะว่ายน้ำออกไปจาก sporangium และเข้าสู่ระยะพักที่ไกลออกไปจากบริเวณปลายเปิดของ sporangium และเคยมีรายงานว่า *Aphanomyces astaci* สามารถก่อโรคใน crayfish (Unestam, 1965)

2.3 ราน้ำใน Genus *Saprolegnia*

พบได้ทั่วไปในตัวอย่างดิน และน้ำจืด ดำรงชีพ ส่วนใหญ่ดำรงชีวิตแบบ saprophyte บนซากพืช และสัตว์ที่ตายแล้ว ส่วนราน้ำชนิดที่สามารถก่อโรคในปลาหรือสัตว์น้ำจะเป็นทั้ง saprophyte และ facultative parasite เช่น *Saprolegnia parasitica* มีรายงานการก่อโรคในปลา และในไข่ปลา ราใน Genus *Saprolegnia* มีโครงสร้างการสืบพันธุ์แบบไม่อาศัยเพศ (Asexual reproduction) โดยที่ปลายสายราจะพัฒนาสร้าง sporangia ขึ้นมา โดยที่ปลายสายรามีการเปลี่ยนแปลงรูปร่าง บวมขึ้น และเป็น club-shaped ไซโตพลาสซึมรวมตัวหนาแน่นขึ้น และสร้างผนังกั้นที่ฐานของ sporangia (ภาพที่ 4)

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์



ภาพที่ 4 ลักษณะของสายราน้ำใน Genus *Saprolegnia*

A ลักษณะของปลายสายรา, B-D พัฒนาการของ zoosporangia, E รูปแบบการปล่อย zoospore, F พัฒนาการของ secondary zoosporangium, G primary zoospore, H primary cyst, I-J การงอกของ primary cyst ไปเป็น secondary zoospore, K-M secondary zoospore, N secondary zoospore เข้าสู่ระยะพัก, O secondary cyst, P การงอกของ secondary cyst

ที่มา: Webster (1980)

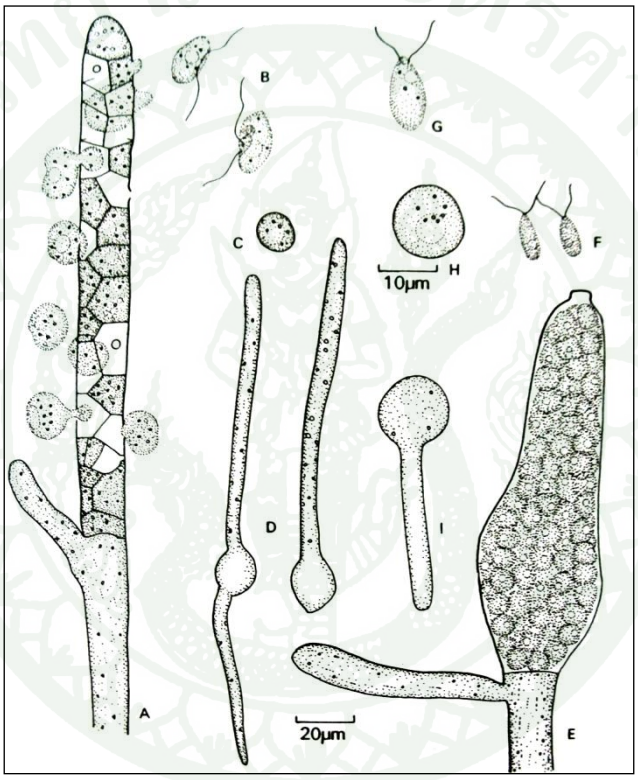
2.4 ราน้ำใน Genus *Thraustotheca*

มีลักษณะของ sporangium ที่กว้าง club-shaped ระยะ primary zoospore ไม่สามารถว่ายน้ำได้ และเข้าสู่ระยะพัก (primary cyst) ที่ sporangium จากนั้นงอกให้ secondary zoospore ที่สามารถว่ายน้ำได้ รูปร่างคล้ายเม็ดถั่ว (bean-shaped) มีแฟลกเจลล่าเกาะติดทางด้านข้าง จากนั้นเข้าสู่ระยะพักครั้งที่ 2 (secondary cyst) และงอกให้ germ tube หรือ อาจงอกให้ zoospore ที่ว่ายน้ำได้อีกครั้ง (ภาพที่ 3)

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

2.5 ราน้ำใน Genus *Dictyuchus*

มีระยะ primary zoospore ที่ไม่สามารถว่ายน้ำได้ การเข้าสู่ระยะพัก จะพบใน cylindrical sporangium โดย primary cyst จะมีลักษณะรูปร่างเหลี่ยม จากนั้นจะงอกให้ secondary zoospores ที่สามารถว่ายน้ำได้ และมีการปล่อย zoospores อย่างอิสระ จากรูเปิดของผนัง sporangium (ภาพที่ 5)



ภาพที่ 5 พัฒนาการของ *Dictyuchus sterile* และ *Pythiopsis cymosa*
Divtyuchus sterile (A-D): A ลักษณะของ zoosporangium ที่มี cyst อยู่ภายใน และปล่อย secondary zoospore จากรูเปิดด้านข้างของผนัง zoosporeangium, B secondary zoospores, C secondary Cyst, D การงอกของ secondary cyst เป็น germ tube; *Pythiopsis cymosa* (E-I): E zoosporangium, F และ G primary zoospore, H primary cyst, I การงอกของ primary cyst เป็น germ tube

ที่มา: Webster (1980)

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

3. ชีววิทยาของราสกุล *Achlya* และ *Saprolegnia*

จุฑารัตน์ (2546) ได้รายงานว่า เชื้อราในสกุล *Achlya* และ *Saprolegnia* จัดอยู่ใน Class Oomycetes, Order Saprolegniales, Family saprolegniaceae เป็นราที่พบแพร่กระจายทั่วไปในดิน และในแหล่งน้ำจืด ลักษณะของราในสกุล *Achlya* นี้มีเส้นใยยาว ซึ่งปลายของเส้นใยมีลักษณะแหลม แตกแขนงเล็กน้อย และมีขนาดใหญกว่าเส้นใยของราในสกุล *Saprolegnia* ลักษณะของราในสกุล *Saprolegnia* นี้ เป็นเส้นใยยาว ปลายของเส้นใยกลมมนแตกแขนงเล็กน้อย เส้นใยอยู่รวมกันเป็นกลุ่มเรียกว่า mycelium เส้นใยของรากลุ่มนี้ไม่มีผนังกั้นระหว่างเซลล์ (non-septate hyphae) วงจรชีวิตมีทั้งแบบไม่อาศัยเพศ (ภาพที่ 6) และการสืบพันธุ์แบบอาศัยเพศ (ภาพที่ 7)

การสืบพันธุ์แบบไม่อาศัยเพศของเชื้อราสกุล *Saprolegnia* โดยมีการสร้าง zoosporangia โตเต็มที่บริเวณปลายเส้นใย ภายในมีการบรรจุ zoospores ซึ่งสามารถว่ายน้ำออกมาและมีรูปร่าง pear-shape มีแฟลกเจลล่า 2 เส้น เรียกว่า primary zoospores ต่อมา primary zoospores เข้าสู่ระยะพัก (primary cyst) จากนั้นจะงอกให้ secondary zoospores ซึ่งมีรูปร่างแบบ kidney-shape ซึ่งมีแฟลก-เจลล่า 2 เส้น สามารถว่ายน้ำได้นานกว่า primary zoospores จากนั้น secondary zoospores มีการเข้าสู่ระยะพักอีกครั้ง (secondary cyst) แล้วจึงงอกเป็นเส้นใยใหม่ต่อไป (Carlile and Watkinson, 1994)

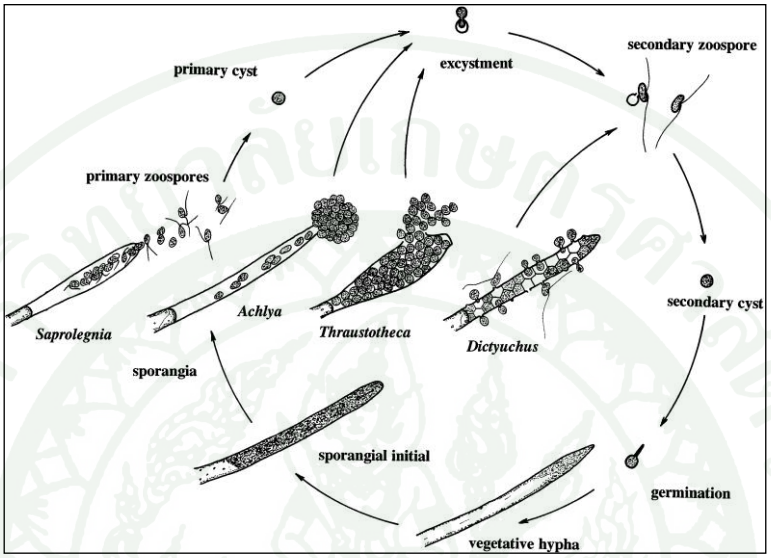
การสืบพันธุ์แบบไม่อาศัยเพศของราสกุล *Achlya* มีการสร้าง zoosporangia โตเต็มที่ที่ปลายสายราภายในบรรจุ primary zoospores โดย primary zoospores จะถูกปล่อยออกมารวมกลุ่มกัน (accumulate) ที่ปลายเปิดของ zoosporangia และมีการเข้าสู่ระยะพัก (primary cyst) จากนั้นเจริญไปเป็น secondary zoospores ซึ่งว่ายน้ำเป็นอิสระ zoospores มีแฟลกเจลล่า 2 เส้น จากนั้น secondary zoospores มีการเข้าสู่ระยะพักอีกครั้ง และงอก germ tube เจริญเป็นเส้นใยของราต่อไป (จุฑารัตน์, 2546)

การสืบพันธุ์แบบอาศัยเพศของราทั้ง 2 สกุลนี้มีลักษณะคล้ายกัน โดยมีอวัยวะสร้างเซลล์สืบพันธุ์ 2 แบบ คือ

1) อวัยวะสร้างเซลล์สืบพันธุ์เพศผู้ (Antheridium)
2) อวัยวะสร้างเซลล์สืบพันธุ์เพศเมีย (Oogonium)

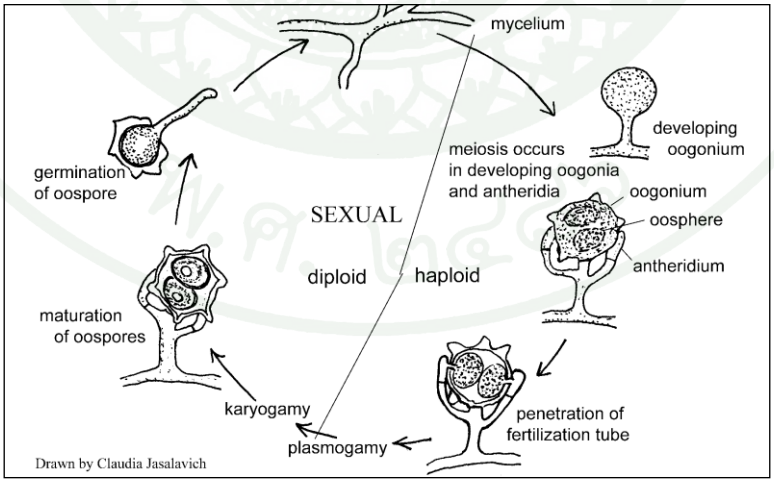
ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

เมื่อเซลล์สืบพันธุ์เพศผู้เข้าผสมกับเซลล์สืบพันธุ์เพศเมียได้เป็น oospore ซึ่งมีลักษณะกลม ผนังหนา ภายในมี ooplast อยู่ตรงกลาง ประกอบด้วยแกรนูล และไขมันซึ่งใช้เป็นอาหารของ oospore ที่จะเจริญเป็นเส้นใยของเชื้อราต่อไป



ภาพที่ 6 การสืบพันธุ์แบบไม่อาศัยเพศของราในสกุล *Achlya* และ *Saprolegnia*

ที่มา: Daugherty *et al*. (1998)



ภาพที่ 7 การสืบพันธุ์แบบอาศัยเพศของราในสกุล *Achlya*

ที่มา: Daugherty *et al*. (1998)

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

4. การศึกษาวิจัยเกี่ยวกับราน้ำ

Chukanhom and Hatai (2004) ได้รายงานการแยกราน้ำได้จากไข่ของปลาคาร์ฟ (Common Carp) จากฟาร์มเลี้ยงปลาคาร์ฟ ในจังหวัดขอนแก่น ผลการศึกษาพบว่า สามารถจำแนกราน้ำออกเป็น 3 ชนิด คือ *Saprolegnia diclina* และ *Achlya klebsiana* จากนั้นทำการทดลองการก่อโรคด้วยสปอร์ 10^4 สปอร์/มิลลิลิตร ของ *Saprolegnia diclina* *Achlya klebsiana* ในปลา platyfish (*Xiphophorus maculatus*) ให้ผลปลาทดลองตายทั้งหมด

Kwanprasert *et al.* (2007) ได้รายงานการตรวจพบราน้ำบนไข่ปลานิลที่เก็บตัวอย่างจากโรงเพาะฟักจังหวัดกาฬสินธุ์ ขอนแก่น มหาสารคาม และสกลนคร ผลการตรวจสอบลักษณะทางสัณฐานวิทยาสามารถจำแนกราได้ 2 Family 4 Genus ได้แก่ Family Saproleginaceae ประกอบด้วย Genus *Achlya* spp., Genus *Aphanomyces* spp., Genus *Saprolegnia* spp. และ Family Pythiaceae Genus *Pythium* spp. ผลการศึกษาคุณสมบัติทางชีววิทยาบางประการของเชื้อรา พบว่า อุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการเจริญของเส้นใยรา Genus *Achlya* และGenus *Aphanomyces* อยู่ในช่วง 25-35 องศาเซลเซียส ส่วนราน้ำ Genus *Pythium* และ Genus *Saprolegnia* อยู่ในช่วง 20-35 องศาเซลเซียส ส่วนอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการสร้างสปอร์ของราน้ำ Genus *Achlya*, Genus *Aphanomyces* และ Genus *Saprolegnia* อยู่ที่ 25 องศาเซลเซียส ยกเว้นราน้ำ Genus *Pythium* ที่ไม่สร้างสปอร์ ส่วนพีเอชที่เหมาะสมต่อการเจริญของเส้นใยราน้ำ Genus *Achlya*, Genus *Aphanomyces*, Genus *Saprolegnia* และ Genus *Pythium* อยู่ในช่วง 6.0-8.0, 6.0-9.0, 7.9-9.0 และ 6.0-7.0 ตามลำดับ

Phadee *et al*. (2007) ได้แยกเชื้อราน้ำจากตัวอย่างน้ำ และปลาจากแม่น้ำชี ที่ไหลผ่านจังหวัดชัยภูมิ ขอนแก่น และ มหาสารคาม ในช่วงเดือน เมษายน ถึง มิถุนายน สามารถแยกเชื้อราน้ำได้ 48 สายพันธุ์จากตัวอย่างน้ำ และ 2 สายพันธุ์จากตัวอย่างปลาป่วย ราน้ำที่แยกได้อยู่ใน Class Oomycetes, Order Saprolegniales, Family Saprolegniaceace ประกอบด้วย Genus *Achlya*, Genus *Aphanomyces*, Genus *Leptolegnia* และ Genus *Saprolegnia*

5. อนุกรมวิธานและลักษณะทางชีววิทยาของปลาบึก

ชวลิต และ สมศักดิ์ (2536) ศึกษาอนุกรมวิธานของปลาบึกและปลาสวาย (วงศ์ Pangasiidae) ประกอบด้วยปลา 5 สกุล 23 ชนิด ได้จำแนกปลาบึกอยู่ในสกุล Pangasianodon โดยใช้

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ลักษณะสำคัญ คือ มีฟันลดรูปลงเมื่อปลามีขนาดใหญ่ขึ้น ก้านครีบท้องมีจำนวน 8-10 อัน มีถุงลมตอนเดียว และใช้ชื่อวิทยาศาสตร์ ของปลาบึกว่า *Pangasianodon gigas* ตาม Chevey (1930) และ Nelson (1994) ดังนี้

การศึกษาทางอนุกรมวิธานของปลาบึกจาก Chevey (1930) และ Nelson (1994)

Phylum Chordata
Suphylum Vertebrata
Superclass Gnathostomata
Grade Teleostomi
Class Actinopterygii
Subclass Neopterygii
Division Teleostei
Subdivision Euteleostei
Superorder Ostariophysi
Order Siluriformes
Family Pangasiidae
Genus *Pangasianodon*
Species *gigas*

ปลาบึก เป็นปลาน้ำจืดชนิดที่ไม่มีเกล็ดขนาดใหญ่ที่สุดในโลก มีชื่อสามัญว่า Mekong giant catfish หรือ huge fish เมื่อโตเต็มวัยจะมีความยาวประมาณ 3 เมตร มีน้ำหนักประมาณ 250 กิโลกรัม Chevey (1930) แยกปลาบึกออกจากกลุ่มปลาสวาย (Pangasius) โดยสังเกตข้อแตกต่าง คือ ปลาบึกไม่มีฟันทั้งขากรรไกรและเพดานปาก และมีตำแน่งที่ตั้งของตาที่อยู่ต่ำกว่าระดับมุมปาก ส่วนกลุ่มของปลาสวาย (Pangasius) มีฟันทั้งขากรรไกรและเพดานปาก ส่วนนัยน์ตาอยู่เหนือ หรืออยู่ระดับเดียวกับมุมปาก (Unakornsawat *et al*., 2001)

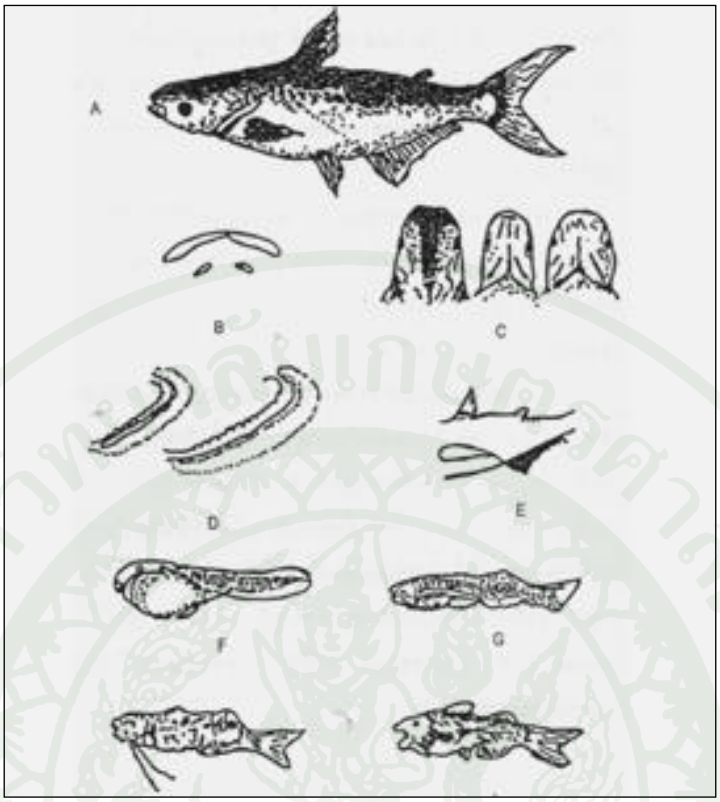
ปลาบึกมีรูปร่างลำตัวเรียวยาว แบนข้างเล็กน้อย ลูกปลาขนาดเล็กมีสีคล้ำเหลือบเหลืองข้างลำตัวมีแถบสีคล้ำตามยาว 1-2 แถบ ปลาขนาดใหญ่ด้านหลังของลำตัวจะมีสีเทาอมน้ำตาลแดง ด้านข้างเป็นสีเทาปนน้ำเงิน ด้านท้องเป็นสีขาวเงิน (เสน่ห์, 2527) หัวปลาบึกมีขนาดใหญ่คิดเป็น

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

31.5 - 32.0% ของความยาวลำตัว (สมศักดิ์ และคณะ, 2531) ความยาวลำตัวสุดโคนหาง ยาวประมาณ 3.6 เท่าของความลึกลำตัว และเป็น 3.3 เท่า ของความยาวหัว (ธีรพันธ์, 2511) จงอยปากใหญ่กลมมนอยู่บนปลายสุดของหัว ความกว้างลำตัวคิดเป็น 37.7 – 44.7% ของความยาวหัว (สมศักดิ์ และคณะ, 2531) หรือมีความกว้างมากกว่า 12% ของความยาวลำตัว (Vidthayanon, 1993) มีหนวดเส้นเล็กๆ ซ่อนอยู่ที่ร่องหลังมุมปาก 1 คู่ ที่มุมขากรรไกรบนเป็นเส้นแบนสีแดง มีความยาวน้อยกว่าเส้นผ่าสูนย์กลางตา (ธีรพันธ์, 2511; สมโภชน์, 2521; สมศักดิ์ และคณะ, 2531) ส่วนหนวดขากรรไกรล่างมีสีขาวขนาดสั้นกว่าหนวดที่ขากรรไกรบน (วันเพ็ญ, 2527) บริเวณจงอยปากมีรูจมูก 2 คู่ ตั้งอยู่บริเวณริมฝีปากด้านข้างของหัว จมูกคู่หน้าอยู่ชิดกันมากกว่าคู่หลัง นัยน์ตามีขนาดเล็กอยู่เป็นอิสระไม่ติดกับขอบตามีเส้นผ่าศูนย์กลางคิดเป็น 1 ใน 20 เท่าของความยาวหัว (ธีรพันธ์, 2511; สมโภชน์, 2521)

ชวลิต และสมศักด์ (2536) ได้ศึกษาเหงือกปลาบึก พบว่า โครงเหงือกตอนล่างยาวกว่า 3 เท่าของโครงเหงือกตอนบน ถุงลมมีตอนเดียว กระดูกสันหลังตอนต้นติดกับกระดูกท้ายทอย (ภาพที่ 8)

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์



ภาพที่ 8 ลักษณะส่วนประกอบที่สำคัญของปลาบึกวัยต่างๆ

A. ปลาบึกโตเต็มวัย, B. ลักษณะแถบฟันบนขากรรไกรบน, C. ลักษณะของหัวด้านบนและด้านล่าง, D. ลักษณะซี่เหงือก, E. ลักษณะถุงลม, F-I. ลักษณะการพัฒนาของลูกปลาวัยอ่อน

ที่มา: ชวลิต และสมศักดิ์ (2536)

Mongkonpanya *et al.* (1996) ได้ศึกษาลักษณะของปลาบึก ปลาสวาย และปลาบิ๊กหวาย พบว่า น้ำหนักของปลาอายุ 2-5 ปีที่เลี้ยงในฟาร์ม ปลาบึกมีน้ำหนักมากที่สุด คือ 8 กิโลกรัม ปลาบิ๊กหวายมีน้ำหนัก 3.5 กิโลกรัม และปลาสวายมีน้ำหนัก 2 กิโลกรัม ปลาบึกมีเปอร์เซ็นต์เนื้อ 52-53% ปลาบิ๊กหวายมีเปอร์เซ็นต์เนื้อ 49% และปลาสวายมีเปอร์เซ็นต์เนื้อ 47% ส่วนเปอร์เซ็นต์โปรตีนและความชื้นไม่มีความแตกต่างกัน แต่ปริมาณไขมันในเนื้อมีความแตกต่างกัน ปลาบึกมีเปอร์เซ็นต์ไขมันในเนื้อ 3% ปลาบิ๊กหวาย 0.6% และปลาสวายมี 0.3% เนื่องจากปลาบึกมีปริมาณไขมันมากทำให้สามารถสะสมพลังงานได้มาก ปลาบึกในแม่น้ำโขงอาจจะหยุดกินอาหารขณะอพยพวางไข่

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

5.1 ระบบปกคลุมร่างกาย (integumentary system) ผิวหนังของปลาบึกด้านหลังของลำตัวมีสีเข้มปนน้ำตาลอ่อน ด้านข้างของลำตัวมีสีเทาปนน้ำเงินและจางลงเมื่อค่อนมาทางด้านท้องซึ่งมีสีขาวปนเหลือง ผิวหนังของปลาบึกประกอบด้วยเนื้อเยื่อ 2 ชั้นเชื่อมกันสนิท ชั้นนอกเป็นชั้น epidermis มีสีเข้ม และชั้นในเป็นชั้น dermis มีสีขาว ชั้นถัดลงไป มีพังผืด (fascia) เป็นเส้นใยสานกันเป็นตาข่ายยึดระหว่างผิวหนังกับ myomere ของกล้ามเนื้อ ด้านหลังของลำตัวมีจุด subepidermal pigment กระจายอยู่ไม่หนาแน่นมากนัก มีต่อมเมือกขนาดใหญ่แทรกอยู่รอบๆ ดวงตา มีชั้นไขมันมาแทรกที่ผิวหนังของส่วนท้อง ด้านข้างลำตัวมี lateral line ยาวตั้งแต่กระดูกปิดเหงือกถึงโคนหาง มีแขนงแยกออกไปทั้งด้านบนและล่าง (นวลอนงค์, 2537)

5.2 ระบบการย่อยอาหาร (digestive system) ระบบการย่อยอาหารของปลาบึกประกอบด้วย ปาก ช่องปาก คอหอย หลอดอาหาร กระเพาะอาหาร ลำไส้ ทวารหนัก ตับ ตับอ่อน ปลาบึก อายุ 6 เดือน พบว่ายังมีฟันฝังอยู่ที่กระดูกขากรรไกร แต่ในปลาอายุ 3 ปี ครึ่ง และปลาบึกวัยเจริญพันธุ์ จะไม่มีฟันในปาก (ลำพอง, 2534)

การสังเกตการเจริญของอวัยวะภายใน และลักษณะทางเนื้อเยื่อของลูกปลาวัยอ่อนตั้งแต่อายุ 1 วัน จนถึง 12 วัน พบว่า ในลูกปลาอายุ 1 วัน กล้ามเนื้อเริ่มเห็นระบบทางเดินอาหารเป็นท่อตรง ในลูกปลาอายุ 2 วัน ถุงอาหารมีขนาดเล็กลง เซลล์ตับเห็นชัดขึ้น แต่ยังไม่พบฟัน ถุงไข่แดง (yolk sac) จะยุบหมด เมื่อลูกปลามีอายุได้ 4 วันในส่วนระบบทางเดินอาหารและระบบขับถ่ายจะพัฒนามากขึ้น กระเพาะอาหารจะพัฒนาสมบูรณ์เมื่อปลาอายุ 8-9 วัน (สุปราณี และ คณะ, 2527)

หลอดอาหารมีขนาดสั้น มีกล้ามเนื้อเรียงตัวตามยาวกระจายอยู่เป็นกลุ่มๆ ในชั้น submucosa ซึ่งต่างจากอวัยวะส่วนอื่น ชั้น muscularis ของหลอดอาหารมีกล้ามเนื้อลายเรียงเป็นชั้นเดียว กระเพาะอาหารของปลาบึกมีลักษณะเป็นถุงคล้ายตัวเอส (s) แบ่งเป็นสองส่วน ซึ่งมีความแตกต่างทางจุลกายวิภาคที่เห็นได้ชัดเจน คือ กระเพาะอาหารส่วน cardiac มีต่อม gastric glands ซึ่งเป็น simple branched tubular type และ mucosal folds มีขนาดใหญ่ แต่กระเพาะอาหารส่วน pylorus จะไม่มี gastric glands และ mucosal folds มีขนาดเล็ก เยื่อบุผิวของกระเพาะทั้งสองส่วนเป็นชนิด simple columnar epithelium (เกรียงศักดิ์, 2543)

ลำไส้แบ่งออกเป็น 3 ส่วน คือ ลำไส้ส่วนต้น ส่วนกลาง และส่วนท้ายซึ่งแบ่งตามลักษณะทางกายวิภาค และจุลกายวิภาคของเนื้อเนื่อแตกต่างกันที่จำนวนและขนาดของ mucosal

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

folds, goblet cells โดยมีจำนวนเพิ่มมากขึ้นในลำไส้ส่วนปลาย และตลอดความยาวของลำไส้ไม่พบ muscularis mucosae สวนลักษณะอื่นๆ ที่ยืนยันว่าปลาบึกน่าจะเป็นปลากินพืชเป็นอาการ คือ ปลาบึกวัยอ่อนจะมีฟัน แต่ฟันจะหายไปเมื่ออายุประมาณ 1 ปีครึ่ง นอกจากนี้ปลาบึกยังมีกระเพาะอาหารและลำไส้ที่ยาว และมี folding ยื่นเข้าไปในช่องว่างอาหารเหมือนปลากินพืชทั่วไป (เสน่ห์และภาณุ, 2540)

5.3 ระบบสืบพันธุ์ (reproductive system) ระบบสืบพันธุ์ของปลาบึกเพศเมียอายุ 3 ปีครึ่ง ณ สถานีประมงน้ำจืดปทุมธานี จากการศึกษาพบว่า รังไข่มีจำนวน 1 คู่ ลักษณะเป็นท่อยาวบริเวณช่องว่างในลำตัวตอนท้ายไต ส่วยปลายห่อหุ้มด้วยเนื้อเยื่อประสานชนิดเส้นใย ภายในรังไข่มี ovigerous lamellae ยื่นออกมาจากผนังรังไข่เข้าสู่สวนกลางท่อ ภายใน lamellae พบไข่ 2 ระยะ คือ

5.3.1 ระยะ oogonia อยู่เป็นกลุ่มหรืออยู่เดี่ยวฝังอยู่ภายในผนัง lamellae ซึ่งเป็นเซลล์ขนาดเล็ก ไซโตพลาสซึมมีเนื้อเยื่อย้อมติดสีน้ำเงินจาง เมื่อย้อมด้วยสี hematoxylin และ eosin (H&E) มีนิวเคลียสขนาดใหญ่อยู่กลางเซลล์

5.3.2 เซลล์ไข่ระยะ primary growth phase มีขนาดใหญ่กว่า ไข่ระยะ oogonia ไซโตพลาสซึมย้อมติดสีน้ำเงินเข้มเมื่อย้อมด้วยสี H&E ซึ่งจะติดสีเข้มกว่านิวเคลียส นิวเคลียสมีขนาดใหญ่และมีนิวคลีโอลัสมากกว่าหนึ่ง ปลาเพศเมียที่เลี้ยงในบ่อดินอายุ 3 ปีครึ่ง พบว่าอวัยวะสืบพันธุ์ยังไม่เจริญเต็มที่ (เกรียงศักดิ์, 2543)

รังไข่ของปลาบึกวัยเจริญพันธุ์มีขนาดใหญ่มาก มีไข่ระยะต่างๆ บรรจุอยู่ การเจริญของไข่แบ่งได้ 5 ระยะ ซึ่งสองระยะแรก คือ oogonia และ primary growth phase ซึ่งมีลักษณะเช่นเดียวกับ ที่พบในปลาปลาบึกวัย 3 ปีครึ่ง แต่พบจำนวนน้อย ไข่ระยะที่ 3 คือ ระยะ early-vitellogenesis ขนาดของไข่และนิวเคลียสมีขนาดใหญ่ขึ้น ไซโตพลาสซึมเริ่มใส และมีการเพิ่มจำนวนนิวคลีโอลัส ไข่ระยะที่ 4 คือ ระยะ mid-vitellogenesis ไข่ในระยะนี้มีโครงสร้างห่อหุ้มหลายชั้น จากชั้นนอกเข้าไปถึงชั้นในตามลำดับคือ theca externa, theca interna, follicular layer granulose และ zona radiate

ไซโตพลาสซึมมี yolk granules จำนวนมากอยู่ใกล้นิวเคลียส เริ่มมีการเคลื่อนตัวของนิวเคลียสไปอยู่ขอบเซลล์ด้าน animal pole ซึ่ง yolk granules จะเริ่มเชื่อมติดกันเกิดช่องว่างทำให้ไข่

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

เริ่มใสขึ้น แสดงให้เห็นว่าปลาบึกที่นำมาศึกษาเป็นปลาที่กำลังเข้าสู่ฤดูผสมพันธุ์ ไข่ระยะที่ 5 คือ maturation egg stage ไข่ระยะนี้มีเส้นผ่านศูนย์กลางประมาณ 1.5 มิลลิเมตร yolk granules เชื่อมติดกัน ไข่มีลักษณะใส และนิวเคลียสอยู่ตำแหน่งชิดขอบเซลล์ (เกรียงศักดิ์, 2543)

ระบบสืบพันธุ์เพศผู้ของปลาบึกเพศผู้อายุ 3 ปีครึ่ง ประกอบด้วยอัณฑะ 1 คู่ ห่อหุ้มด้วยเนื้อเยื่อประสานชนิดเส้นใยเรียกว่า tunica albuginea อัณฑะมีลักษณะเป็นท่อพูเล็กๆ ยึดติดกับเยื่อบุช่องท้องทอดไปตามความยาวลำตัวถึงบริเวณทวาร ภายในพบ germ cells เพียงระยะเดียว คือ spermatogonia (เกรียงศักดิ์, 2543)

อัณฑะของปลาบึกวัยเจริญพันธุ์ มีขนาดใหญ่ขึ้นคล้ายนิ้วมือ ในแต่ละพู ประกอบด้วย seminiferous tubules ซึ่งเป็นแหล่งสร้างตัวอสุจิ บริเวณผนังท่อมี interstitial cell (leydig cell) ภายใน lumen ของท่อ และมี spermatogenic cells ระยะต่างๆ อยู่หนาแน่น โดยเซลล์ระยะเดียวกันจะอยู่รวมกันเป็นกลุ่มๆ ได้แก่ spermatogonia, primary spermatocytes, secondary spermatocytes, spermatids และ spermatozoa ในกลุ่มเซลล์เหล่านี้มี sertoli cells ซึ่งทำหน้าที่สร้างอาหารให้แก่ตัวอสุจิแทรกอยู่ด้วย แสดงให้เห็นว่าปลาบึกกเพศผู้ที่นำมาศึกษานี้ เป็นปลาที่พร้อมจะผสมพันธุ์ (กฤษณ์, 2536)

กฤษณ์ (2536) ได้ศึกษาค่าความสมบูรณ์ของรังไข่ และอัณฑะ [gonadosomatic index (GSI)] การเลี้ยงปลาบึกในขนาดต่างๆ กัน ในรูปแบบต่างๆ กัน พบว่า ปลาบึกเพศเมียและเพศผู้ที่อยู่ในวัยเจริญพันธุ์จากแม่น้ำโขงขนาด 190 และ 142 กิโลกรัม มีค่า GSI 8.7% และ 6.3% ตามลำดับ ขณะที่ปลาบึกที่เลี้ยงในกระชัง ตัวเมียขนาด 6.67 กิโลกรัม ตัวผู้ 5.25 กิโลกรัม มีค่า GSI 0.1% และ 0.02% ตามลำดับ ซึ่งมีค่าน้อยมากเมื่อเทียบกับปลาบึกวัยเจริญพันธุ์จากแม่น้ำโขง

ความดกของไข่ปลาบึก ไข่ปลาบึกนั้นเป็นเม็ดกลมสีเหลืองอ่อน เส้นผ่านศูนย์กลางประมาณ 1.7 มิลลิเมตร เป็นไข่ประเภทไข่ติด (adhesive egg) เช่นเดียวกับปลาสวาย แม่ปลาบึกที่จับได้เมื่อปี พ.ศ. 2524 มีขนาดความยาวลำตัว 2.38 เมตร น้ำหนัก 178 กิโลกรัม รังไข่มีน้ำหนัก 13.5 กิโลกรัม จากการประมาณความดกของไข่ พบว่าไข่ปลาบึก 1 กิโลกรัม มีไข่อยู่ประมาณ 800,000 ฟอง (เสน่ห์ และ ภาณุ, 2540)

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

5.4 การสืบพันธุ์ของปลาบึก จากการศึกษาจากเอกสารพบว่าปลาบึกเป็นปลาที่มีการอพยพย้ายถิ่นจำกัดอยู่ภายในน่านน้ำจืด (Potamodromous fish) ซึ่ง เสน่ห์ (2526) ได้ให้เหตุผลว่าเส้นทางการอพยพย้ายถิ่นของปลาบึกน่าจะเริ่มตั้งแต่แม่น้ำโขงตอนบน เมื่อปลาบึกผสมพันธุ์ในช่วงฤดูฝน ซึ่งอยู่ในช่วงน้ำหลาก ลูกปลาวัยอ่อนก็จะล่องลอยมาตามกระแสน้ำลงสู่แม่น้ำโขงตอนล่างแล้วเข้าไปอาศัยเลี้ยงตัวอยู่ในทะเลสาบต่างๆ ที่ติดต่อแม่น้ำโขง เช่น Tonle Sap ในสาธารณรัฐประชาธิปไตยประชาชนกัมพูชา เมื่อเจริญเป็นตัวเต็มวัยก็จะอพยพเข้าสู่แม่น้ำโขง ซึ่งเป็นข้อสันนิษฐานถึงแหล่งสืบพันธุ์ปลาบึกในอดีต

จากที่กรมประมงได้ตั้งหน่วยเฉพาะกิจผสมเทียมปลาบึก ณ บ้านหาดไคร้ อำเภอเชียงของ จังหวัดเชียงราย พบว่า ปลาบึกเพศผู้ที่จับได้ในฤดูจับปลามีน้ำเชื้อสมบูรณ์ ส่วนปลาบึกเพศเมียที่จับได้ระหว่าง 17 เมษายน ถึง 5 พฤษภาคม ของแต่ละปีนั้น ไข่ส่วนมากยังไม่เจริญถึงระยะที่สามารถกระตุ้นให้ไข่สุกเพื่อผสมกับน้ำเชื้อได้ ส่วนแม่ปลาที่จับได้ในช่วงหลัง5 พฤษภาคมของแต่ละปีนั้น ไข่ส่วนมากจะพัฒนาถึงระยะที่สามารถกระตุ้นด้วยฮอร์โมนให้ไข่สุกได้ แม่ปลาบึกที่จับได้ที่ อำเภอเชียงแสน จังหวัดเชียงราย เมื่อวันที่ 3 มิถุนายน พ.ศ. 2533 มีไข่สุกมากสามารถผสมกับน้ำเชื้อได้ทันที โดยไม่จำเป็นต้องกระตุ้นด้วยฮอร์โมน จึงทำให้เชื่อว่าปลาบึกมีนิสัยการสืบพันธุ์เช่นเดียวกับปลาสวาย คือ จะมีแหล่งวางไข่เฉพาะ ณ จุดต่างๆ ตลอดลำน้ำโขง (เกรียงศักดิ์, 2543)

จากความสำเร็จของการเพาะพันธุ์ปลาบึกโดยการผสมเทียมช่วยยืนยันว่าปลาบึกมีฤดูผสมพันธุ์อยู่ในต้นฤดูฝน ประมาณเดือนพฤษภาคมถึงมิถุนายนของทุกปี (เกรียงศักดิ์, 2543)

Baird (1996) ได้ศึกษาการอพยพเพื่อไปวางไข่ของปลากลุ่ม Pangasiidae เช่น ปลาบึก ปลาเทพา ปลาเทโพ ปลาสวายในแม่น้ำโขง พบว่ามักจะเกิดขึ้นในช่วงเดือนพฤษภาคมถึงมิถุนายน

5.5 ถิ่นที่อยู่อาศัยและการแพร่กระจายของปลาบึก พบเฉพาะในแม่น้ำโขงและลำน้ำสาขา (โสม, 2510) ปลาบึกอาศัยอยู่ในอ่างปลาบึก ซึ่งเป็นบริเวณที่มีน้ำลึก และไหลเชี่ยว พื้นท้องน้ำเต็มไปด้วยก้อนหินขนาดใหญ่ และยิ่งถ้าเป็นบริเวณที่มีถ้ำใต้น้ำด้วยแล้วปลาบึกจะชอบอาศัยอยู่ และกินตะไคร่น้ำที่เกาะตามโขดหินใต้น้ำเป็นอาหาร (เกรียงศักดิ์, 2543)

Smith (1945) กล่าวว่าปลาบึกอาศัยอยู่ทั่วไปในแม่น้ำโขง นับตั้งแต่ประเทศสาธารณรัฐประชาชนจีน เมียนมาร์ สาธารณรัฐประชาธิปไตยประชาชนลาว ไทย สาธารณรัฐ

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ประชาธิปไตยประชาชนกัมพูชา และสาธารณรัฐสังคมนิยมเวียดนามตอนใต้ แต่ไม่เคยพบปลาบึกในบริเวณน้ำกร่อย หรือบริเวณปากแม่น้ำโขงที่ไหลออกทะเลจีนใต้

ในประเทศไทยปลาบึกอาศัยอยู่ในแม่น้ำโขงที่กั้นพรมแดน ตั้งแต่ อำเภอเชียงแสน จังหวัดเชียงราย ลงไปจนถึง อำเภอโขงเจียม จังหวัดอุบลราชธานี เดิมแหล่งที่พบปลาบึกอาศัยอยู่ชุกชุมมากที่สุดอยู่ที่ จังหวัดหนองคาย โดยเฉพาะ อ่างปลาบึก บ้านผาตั้ง อำเภอศรีเชียงใหม่ ซึ่งเป็นแหล่งที่อยู่อาศัยของปลาบึกมาช้านาน เมื่อ 40 ปีก่อน ชาวประมงที่อ่างปลาบึกสามารถจับปลาบึกได้ปีละ 40 -50 ตัว (โสม, 2510) ส่วนปลาบึกที่ชาวประมงจับได้ที่จังหวัดเชียงรายนั้นเชื่อว่า เป็นปลาบึกที่อพยพย้ายถิ่นมาจาก อ่างปลาบึก ที่อำเภอหลวงพระบาง สาธารณรัฐประชาธิปไตยประชาชนลาว (ธีรพันธุ์, 2526)

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

อุปกรณ์และวิธีการ

อุปกรณ์

1. Pipette man P100
2. Yellow tips ขนาด 200 µl.
3. Micro tube ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 1.5 มิลลิลิตร
4. ถุงมือยาง
5. ผ้าปิดจมูก (Mask)
6. จานเพาะเชื้อ ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 90 mm.
7. จานเพาะเชื้อ ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 120 mm
8. สไลด์แก้ว และ cover slip
9. หลอดทดลองขนาด 16x150 มิลลิเมตร ฝาเกลียว
10. หลอดทดลองขนาด 13x100 มิลลิเมตร ฝาเกลียว
11. โหลแก้ว ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 150 x 2500 มิลลิเมตร
12. กระชอนตักปลา
13. เครื่องชั่งทศนิยม 2 ตำแหน่ง
14. ตู้บ่มเชื้อ 20 องศาเซลเซียส
15. ตู้บ่มเชื้อ 37 องศาเซลเซียส
16. อาหารเลี้ยงเชื้อ
    16.1 Glucose Yeast extracts agar (GY agar)
    16.2 Glucose Yeast extract broth (GY broth)
17. แอลกอฮอล์ 95 %
18. สารละลาย 1 N NaoH
19. สารละลาย 1 N HCl
20. สารละลาย 10% phosphate buffered formalin
21. ชุดสีย้อม Hematoxilin and Eosin (H&E stainning)
22. ชุดสีย้อม Grocotte – Gomori methanamine silver
23. เครื่องวัดค่าความเป็นกรด – ด่าง (pH meter)
24. สีย้อมเชื้อรา (Lactophenol cotton blue)

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

25. เครื่องเตรียมชิ้นเนื้อเยื่อ Embedding
26. เครื่องตัดชิ้นเนื่อเยื่อ (Microtome)
27. ตู้ดูดควัน (frume hood)
28. ยาปฏิชีวนะ Ampicillin ชนิดผง
29. ยาปฏิชีวนะ Streptomycin sulphate ชนิดผง
30. กล้องจุลทรรศน์ (Light microscope)
31. กล้องจุลทรรศน์แบบเลนส์หัวกลับ (Inverted microscope)
32. เชื้อมาตรฐาน *Alchya bisexualis* NJM 0611, *Saprolegnia diclina* NJM 0501

วิธีการ

1. การแยกเชื้อราและการจัดจำแนกชนิดของเชื้อราน้ำ

1.1 การเก็บตัวอย่างไข่ปลาบึก และตัวอย่างน้ำจากบ่ออนุบาลเพาะฟักลูกปลาบึก

เก็บตัวอย่างไข่ปลาบึกหลังจากการผสมเทียม ลูกปลาบึกที่ตายหลังจากการเพาะฟัก และตัวอย่างน้ำจากบ่ออนุบาลเพาะฟักลูกปลาบึก จากแหล่งเพาะพันธุ์ปลาบึก สถาบันวิจัยการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำจืด อำเภอบางประอิน จังหวัดพระนครศรีอยุธยา

1.2 การแยกเชื้อรา

นำตัวอย่างไข่ปลาบึก และลูกปลาบึกที่ตายหลังจากการเพาะฟัก มาทำการเพาะเลี้ยงเชื้อราบนอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดแข็ง Glucose-Yeast extract agar, (GY agar) ซึ่งประกอบด้วย glucose 1% , yeast extract 0.25% และ agar 1.5% ตามสูตรการเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อของ Hatai & Egusa (1979) และใส่ยาปฏิชีวนะ ampicillin และ streptomycin ความเข้มข้น 500 µg/ml เพื่อยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรีย บ่มไว้ที่อุณหภูมิ 20 องศาเซลเซียส (°C) เมื่อโคโลนีของราเจริญขึ้นจึงทำการแยกเชื้อเชื้อให้บริสุทธิ์ตามวิธีของ Kitancharoen *et al*. (1995) โดยตัดอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีราเจริญขนาด 5 × 5 ตารางมิลลิเมตร วางลงในจานเลี้ยงเชื้อปลอดเชื้อ ที่บรรจุน้ำประปาที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว เพื่อกระตุ้นให้เชื้อราสร้าง zoospores นำไปบ่มไว้ที่อุณหภูมิ 20 °C จากนั้นทำการนับจำนวน zoospores ด้วย Hematocytometer และดูด suspension ของ zoospores ในน้ำประปา ปริมาตร 100 µl ไปหยดลง

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

บนผิวหน้าของอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดแข็ง GY agar แล้วใช้แท่งแก้ว spreader ปลอดเชื้อ (L-shape spreader) เกลี่ยให้กระจายทั่วผิวหน้าอาหารเลี้ยงเชื้อ จากนั้นนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 20 °C ทำการแยกเชื้อราที่เจริญเป็นโคโลนีเดี่ยว โดยเลือกตัดเอาสายรามาเลี้ยงบนอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดแข็ง และทำการเพาะเชื้อราน้ำบนอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดแข็งใหม่ทุกๆ 1 เดือน เพื่อเก็บไว้ใช้ในการศึกษาต่อไป

1.3 การจัดจำแนกชนิดของเชื้อรา

ทำการศึกษาและจำแนกชนิดของราน้ำโดยอาศัยลักษณะสัณฐานวิทยาของ sporangium และรูปแบบการปล่อย zoospores ออกจาก sporangium

1.3.1 การเตรียม zoospores ของเชื้อรา

โดยตัดอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดแข็งที่มีราเจริญอยู่ ขนาด 8x8 มิลลิเมตร ใส่ลงในจานเพาะเชื้อปลอดเชื้อขนาด 90 x 20 มิลลิเมตร ภายในบรรจุอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดเหลว glucose-yeast extract broth, GY broth ซึ่งประกอบด้วย glucose 1% และ yeast extract 0.25% และบ่มเชื้อไว้ที่อุณหภูมิ 20 °C เป็นเวลา 1-2 วัน เพื่อให้ราเจริญ จากนั้นตัดเส้นใยของรามาล้างในน้ำประปาที่ปลอดเชื้อ 2-3 ครั้ง แล้วย้ายไปใส่ในจานเพาะเชื้อปลอดเชื้อที่บรรจุน้ำประปาที่ปลอดเชื้อปริมาตร 30 มิลลิลิตร เพื่อกระตุ้นการสร้าง zoospores บ่มไว้ที่อุณหภูมิ 20 °C เป็นเวลา 18-24 ชั่วโมง ซึ่งรูปแบบการปล่อยของ zoospores สามารถใช้จำแนกเชื้อราในระดับสกุล โดยใช้เอกสาร Frederick and Sparrow (1960), Johnson (1956) และ Seymour (1970) เป็นเกณฑ์ในการศึกษา

1.3.2 การเตรียม oogonia และ antheridia

โดยตัดอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดแข็งที่มีราเจริญอยู่ ขนาด 5 × 5 มิลลิเมตร ใส่ลงในจานเพาะเชื้อปลอดเชื้อที่บรรจุน้ำประปาที่ปลอดเชื้อและนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 20 °C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง และนำไปส่องด้วยกล้องจุลทรรศน์แบบ inverted microscope (Olympus, Japan) เมื่อพบการสร้าง zoospores แล้วจึงนำเมล็ดฝิ่น (hemp seed) ที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้วใส่ลงในจานเลี้ยงเชื้อที่ปลอดเชื้อ และบ่มที่อุณหภูมิ 20 °C เพื่อให้ zoospores มาเกาะบน hemp seed ซึ่งสามารถสังเกตุได้ด้วยตาเปล่า จากนั้นจึงย้าย hemp seed ดังกล่าวใส่ลงในจานเพาะเชื้อที่บรรจุน้ำประปาที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว โดยใส่ hemp seed 1 เมล็ด ต่อ 1 จานเลี้ยงเชื้อและนำไปบ่มที่อุณหภูมิต่างๆ กันดังนี้ 5, 10, 15, 20

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

และ 25 °C ตามลำดับ สังเกตการสร้าง oogonia และantheridia ทุกวันภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบ inverted microscope จนกระทั่งสังเกตเห็น oogonia และantheridia ซึ่งลักษณะของ oogonia และ antheridia สามารถใช้จำแนกเชื้อราในระดับชนิดได้ โดยใช้เอกสารของ Frederick and Sparrow (1960), Johnson (1959) และ Seymour (1970) เป็นเกณฑ์ในการศึกษา

2. การศึกษาลักษณะทางชีววิทยาบางประการของเชื้อราน้ำ

2.1 การศึกษาผลของอุณหภูมิที่มีผลต่อการเจริญของเส้นใยของเชื้อราน้ำ

เพาะเลี้ยงเชื้อราน้ำสายพันธุ์ที่แยกได้บนอาหารเลี้ยงเชื้อ GY agar และบ่มที่อุณหภูมิ 20 °C จากนั้นปลายสายราน้ำแต่ละสายพันธุ์ ที่บริเวณปลายเส้นใยด้วยอุปกรณ์เจาะวุ้น (cork borer) โดยเลือกใช้ cork borer เบอร์ 2 ที่มีเส้นผ่านศูนย์กลาง 5.5 ตารางมิลลิเมตร จากนั้นนำก้อนวุ้นที่มีสายราน้ำติดอยู่มาวางตรงจุดศูนย์กลางของจานเลี้ยงเชื้อขนาด 90 × 20 มิลลิเมตร ที่บรรจุอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดแข็ง GY agar ปริมาตร 20 มิลลิลิตร จากนั้นนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35 และ 40 °C ตามลำดับ เชื้อราแต่ละสายพันธุ์ทำการทดลอง 3 ซ้ำ สังเกตการเจริญของเส้นใยของเชื้อราทุกวัน โดยวัดเส้นผ่านศูนย์กลางการเจริญของเส้นใยทุกวันเป็นระยะเวลา 1 สัปดาห์ และหาค่าเฉลี่ย

2.2 การศึกษาผลของความเป็นกรด-ด่าง ของอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวที่มีต่อการเจริญของเส้นใยของเชื้อราน้ำ

เพาะเลี้ยงเชื้อราน้ำสายพันธุ์ที่แยกได้บนอาหารเลี้ยงเชื้อ GY agar และบ่มที่อุณหภูมิ 20 °C จากนั้นปลายสายราน้ำแต่ละสายพันธุ์ ที่บริเวณปลายเส้นใยด้วย cork borer เบอร์ 2 จากนั้นนำก้อนวุ้นที่มีสายราน้ำติดอยู่มาวางลงในจานเลี้ยงเชื้อปลอดเชื้อที่บรรจุอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดเหลว GY broth ปริมาตร 10 มิลลิลิตร ซึ่งปรับค่าความเป็นกรด-ด่างที่ระดับ 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11 และ 12 ตามลำดับ โดยใช้ 1N NaOH และ 1N HCl เป็นสารละลายที่ใช้ในการปรับค่าความเป็นกรด-ด่างของอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวตามวิธีของ Kwanprasert *et al*., (2007) จากนั้นนำจานเพาะเชื้อไปบ่มไว้ที่อุณหภูมิ 20 °C ทำการทดสอบผลของความเป็นกรด-ด่าง ของอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวที่มีต่อการเจริญของเส้นใยของเชื้อ แต่ละสายพันธุ์อย่างละ 3 ซ้ำ สังเกตการเจริญของของเส้นใยราทุกวัน เป็นระยะเวลา 1 สัปดาห์

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

2.3 การศึกษาผลของความเค็มที่มีต่อการเจริญของเส้นใยของเชื้อราน้ำ

เพาะเลี้ยงเชื้อราน้ำสายพันธุ์ที่แยกได้บนอาหารเลี้ยงเชื้อ GY agar และบ่มที่อุณหภูมิ 20 °C จากนั้นปลายสายราน้ำแต่ละสายพันธุ์ ที่บริเวณปลายเส้นใยด้วย cork borer เบอร์ 2 จากนั้นนำก้อนวุ้นที่มีสายราน้ำติดอยู่มาวางตรงจุดศูนย์กลางของจานเลี้ยงเชื้อขนาด 90 × 20 มิลลิเมตร ที่ภายในบรรจุอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดแข็ง GY agar ปริมาตร 20 มิลลิลิตร ซึ่งมีความเค็มของโซเดียมคลอไรด์ 0, 5, 10, 15, 20, 25, 30 และ 35 ส่วนในพันส่วน (part per thousand : ppt) จากนั้นบ่มไว้ที่อุณหภูมิ 20 °C ทำการทดสอบผลของความเค็มของอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวที่มีต่อการเจริญของเส้นใยของเชื้อราน้ำ แต่ละสายพันธุ์อย่างละ 3 ซ้ำ สังเกตและทำการวัดการเจริญของของเส้นใยราทุกวัน เป็นระยะเวลา 1 สัปดาห์

3. การศึกษาความสามารถในการก่อโรคของเชื้อราน้ำ ในไข่ปลาบึก

เพาะเลี้ยงเชื้อราบนอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดแข็ง GY agar นาน 2 วัน จากนั้นตัดอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดแข็งที่มีราเจริญอยู่ ขนาด 1 × 19 ตารางเซนติเมตร จำนวน 2-3 ชิ้นนำไปวางบนในจานเพาะเชื้อปลอดเชื้อขนาด 90 × 20 มิลลิเมตร ซึ่งภายในบรรจุอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว GY broth ปริมาตร 20 มิลลิลิตร บ่มเชื้อไว้ที่อุณหภูมิ 20 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1-2 วัน จากนั้นตัดเส้นใยสายราที่เจริญและนำไปล้างด้วยน้ำประปาที่ปลอดเชื้อจำนวน 3 ครั้ง และย้ายไปเลี้ยงไว้ในจานเพาะเชื้อที่ภายในบรรจุน้ำประปาปลอดเชื้อปริมาตร 30 มิลลิลิตร นำไปบ่มไว้ที่อุณหภูมิ 20 °C เป็นเวลา 18-24 ชั่วโมงเพื่อเหนี่ยวนำให้เชื้อราสร้าง zoospores จากนั้นสังเกตลักษณะการปล่อยของ zoospores ภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบ inverted microscope (Olympus, Japan) และนับจำนวน zoospores ด้วย Hematocytometer และปรับความเข้มข้นของ zoospores ให้เท่ากับ 1×10^4 สปอร์/มิลลิลิตร จากนั้นนำไข่ปลาบึกที่ผ่านการผสมเทียมจำนวน 30 ใบแช่ลงในจานเพาะเชื้อที่ภายในบรรจุน้ำประปาที่มีความเข้มข้นของ zoospores เท่ากับ 1×10^4 สปอร์/มิลลิลิตร เป็นเวลา 1 ชั่วโมง ตามวิธีของ Chukanhom and Hatai (2004) ส่วนไข่ปลาบึกกลุ่มควบคุมไม่ต้องแช่ไข่ใน suspension ของ zoospores โดยทดลองกลุ่มละ 3 ซ้ำ และทำการเพาะฟักไข่ที่อุณหภูมิห้อง บันทึกอัตราการเพาะฟักรอดของไข่ปลาบึกที่ผ่านการแช่ใน suspension ของ zoospores ในน้ำประปาเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม ทำการเก็บตัวอย่างไข่ที่ไม่ฟักเป็นลูกปลาไปตรวจยืนยันการติดเชื้อราน้ำ โดยทำการเพาะเลี้ยงเชื้อ และจำแนกชนิดของเชื้อทางห้องปฏิบัติการ และเก็บตัวอย่างไข่ปลาบึกที่ไม่ฟักเป็นตัวส่วนหนึ่งมาเก็บรักษาสภาพของตัวอย่างในสารละลาย 10 % phosphate buffered formalin (PBS)

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

เพื่อนำตัวอย่างไปทำการศึกษาจุลพยาธิวิทยาต่อไป ด้วยการย้อมสี Hematoxilin and Eosin (H&E stainning) และ ย้อมสี Grocott – Gomori methanamine silver

นำข้อมูลที่ได้มาวิเคราะห์ความแปรปรวนทางเดียว (One - way Analysis of variance) ส่วนการเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยของชุดการทดลองใช้วิธี Duncan's New Multiple Range Test

ภาพที่ 9 การทดสอบความสามารถของเชื้อราน้ำในการก่อโรคในไข่ปลาบึก
โดยทำการฟักไข่ปลาบึกภายในโหลแก้ว มีปั๊มลมเพื่อเติมอากาศ ที่อุณหภูมิห้อง

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ผลและวิจารณ์

1. การแยกเชื้อราและการจัดจำแนกชนิดของเชื้อราน้ำ

1.1 การเก็บตัวอย่างไข่ปลาบึก และตัวอย่างน้ำจากบ่ออนุบาลเพาะฟักลูกปลาบึก

เก็บตัวอย่างไข่ และน้ำที่ใช้เพาะพันธุ์ปลาบึก ตั้งแต่ปี พ.ศ. 2551 - 2553 ในช่วงฤดูวางไข่ ซึ่งตรงกับฤดูฝนของทุกปี ในปี พ.ศ. 2551 (เดือน กรกฎาคม ถึง กันยายน) เก็บตัวอย่างไข่จำนวน 85 ตัวอย่าง และตัวอย่างน้ำจากบ่อเพาะฟักจำนวน 16 ตัวอย่าง ในปี พ.ศ. 2552 (เดือน พฤษภาคม ถึง สิงหาคม) เก็บตัวอย่างไข่ปลาบึกจำนวน 150 ตัวอย่าง และตัวอย่างน้ำจากบ่อเพาะฟักจำนวน 30 ตัวอย่าง และในปี พ.ศ. 2553 (เดือน พฤษภาคม ถึง สิงหาคม) เก็บตัวอย่างไข่ปลาบึกจำนวน 150 ตัวอย่าง และตัวอย่างน้ำจากบ่อเพาะฟัก 30 ตัวอย่าง จากแหล่งเพาะพันธุ์ปลาบึกภายในสถาบันวิจัยการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำจืด จังหวัดพระนครศรีอยุธยา (ตารางที่ 1)

ตารางที่ 1 จำนวนตัวอย่างไข่ปลาบึกและน้ำที่ใช้เพาะพันธุ์ปลาบึก ระหว่างปี พ.ศ. 2551 – 2553

ปี พ.ศ.	ชนิดของตัวอย่าง	
	ไข่ปลาบึก	น้ำจากบ่อเพาะฟัก
2551	85	16
2552	150	30
2553	150	30

1.2 การแยกเชื้อและจำแนกชนิดของราน้ำ

สามารถแยกเชื้อราน้ำจากตัวอย่างไข่ปลาบึกและตัวอย่างน้ำจากบ่อเพาะฟักในช่วงฤดูวางไข่ตั้งแต่ปีพ.ศ. 2551 ถึง 2553 จำแนกได้เป็นเชื้อ *Achlya* spp. จำนวน 9 สายพันธุ์ และเชื้อ *Saprolegnia* spp. จำนวน 7 สายพันธุ์ (ตารางที่ 2)

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

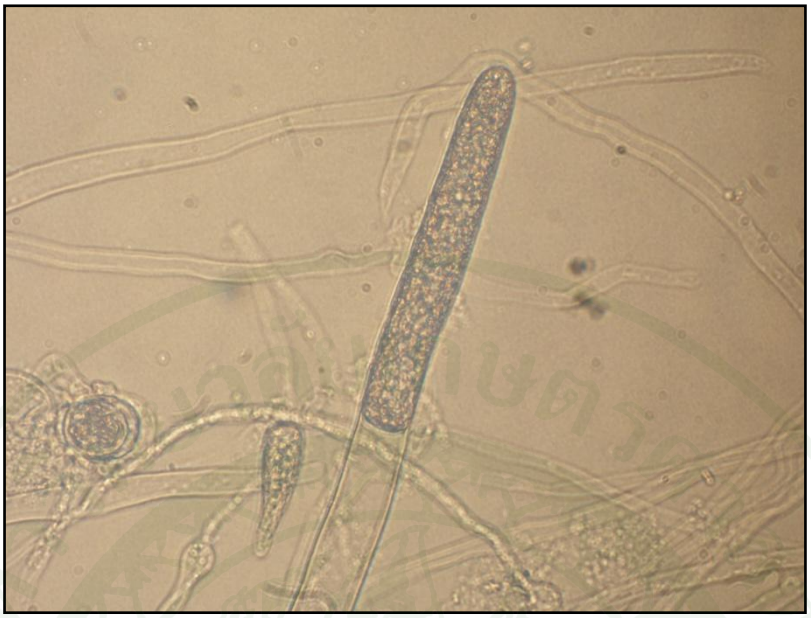
ตารางที่ 2 จำนวนและชนิดของราน้ำที่แยกได้ ในระหว่างปี พ.ศ. 2551 – 2553

ปี พ.ศ.	ชนิดของราน้ำที่แยกได้	
2551	*Achlya* spp.	(E.MCF1-02, T.MCF2-001)
2552	*Achlya* spp.	(E4/52-2, E4/52-3, E4/52-5, E4/52-8, E4/52-10, E4/52-11 และ E4/52-12)
	Saprolegnia spp.	(E3/52-P1, E3/52-P2, E3/52-P3 และ E3/52-P4)
2553	*Saprolegnia* spp.	(E1/53-12, T3/53-3 และ T3/53-5)

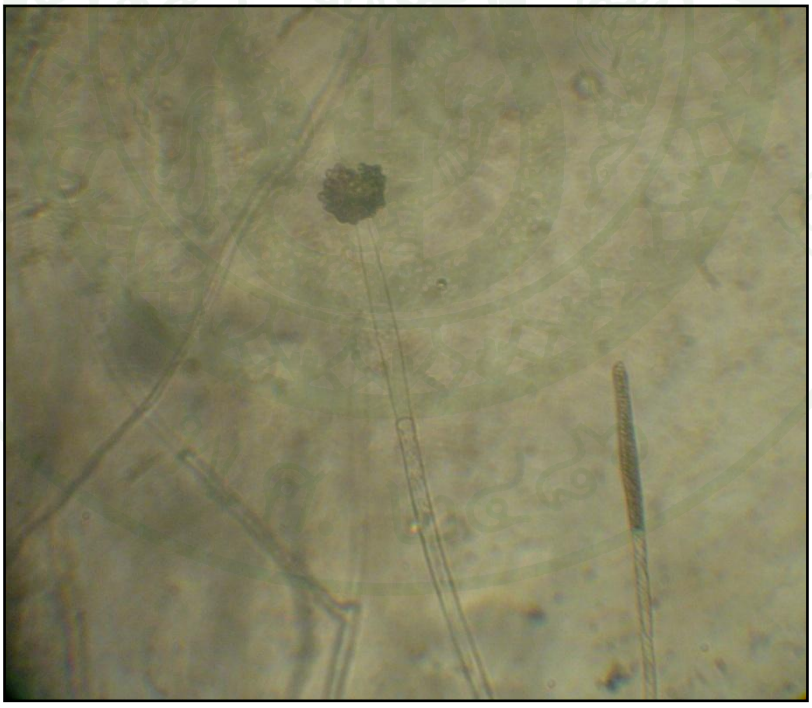
หมายเหตุ: E = ราน้ำที่แยกได้จากไข่ปลาบึก, T = ราน้ำที่แยกได้จากตัวอย่างน้ำ, MCF = ปลาบึก
3/52 = เก็บตัวอย่างครั้งที่ 3 ในปี 2552, 4/52 = เก็บตัวอย่างครั้งที่ 4 ในปี 2552,
1/53 = เก็บตัวอย่างครั้งที่ 1 ในปี 2553, 3/53 = เก็บตัวอย่างครั้งที่ 3 ในปี 2553,
P1 = จานเพาะเชื้อที่ 1, P2 = จานเพาะเชื้อที่ 2, P3 = จานเพาะเชื้อที่ 3 และ
P4 = จานเพาะเชื้อที่ 4

เชื้อราน้ำในสกุล *Achlya* spp. ที่แยกได้มีลักษณะทางสัณฐานวิทยา ดังนี้ คือ สายราเป็นปุยมีสีขาว (puffy and whitish colony) เจริญได้ดีบนอาหารเลี้ยงเชื้อ GY agar สายราเจริญได้เต็มจานเลี้ยงเชื้อขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 90 มม.ในเวลา 3-4 วัน และเกิดรอยแยกเป็นวงกลมบนอาหาร GY agar เมื่อนำสายราแช่ในน้ำประปาปลอดเชื้อเป็นเวลา 18-20 ชั่วโมง พบระยะ asexual stage มีการปล่อย zoopores เป็นแบบ “Achlyoid type” คือ zoospores จะเกาะกลุ่มกันบริเวณปลายเปิดของ sporangium (ภาพที่ 11 และ 12) ส่วนเชื้อราน้ำในสกุล *Saprolegnia* spp. ที่แยกได้มีลักษณะทางสัณฐานวิทยา ดังนี้ คือ มีสายราที่ฟู มีสีขาว (cotton-like whitish colony) สายราไม่มีผนังกั้น (aseptate hyphae) เจริญได้ดีบนอาหาร GY agar สายราเจริญได้เต็มจานเลี้ยงเชื้อขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 90 มิลลิเมตร (มม.) ในเวลา 2 วัน เมื่อตัดสายราแช่ในน้ำประปาปลอดเชื้อเป็นเวลา 18-20 ชั่วโมง พบระยะ asexual stage มีการปล่อย zoospores แบบ “Saprolegnoid type” คือ zoospores จะว่ายน้ำออกไปจากปลายเปิดของ sporangium (ภาพที่ 13)

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

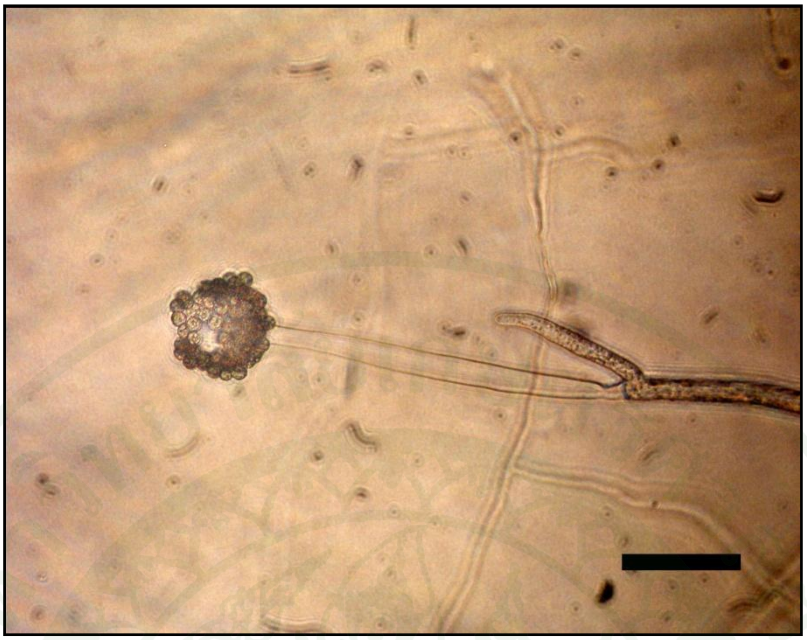


ภาพที่ 10 พัฒนาการของ Sporangium ที่บริเวณปลายสายรา, กำลังขยาย 400 เท่า

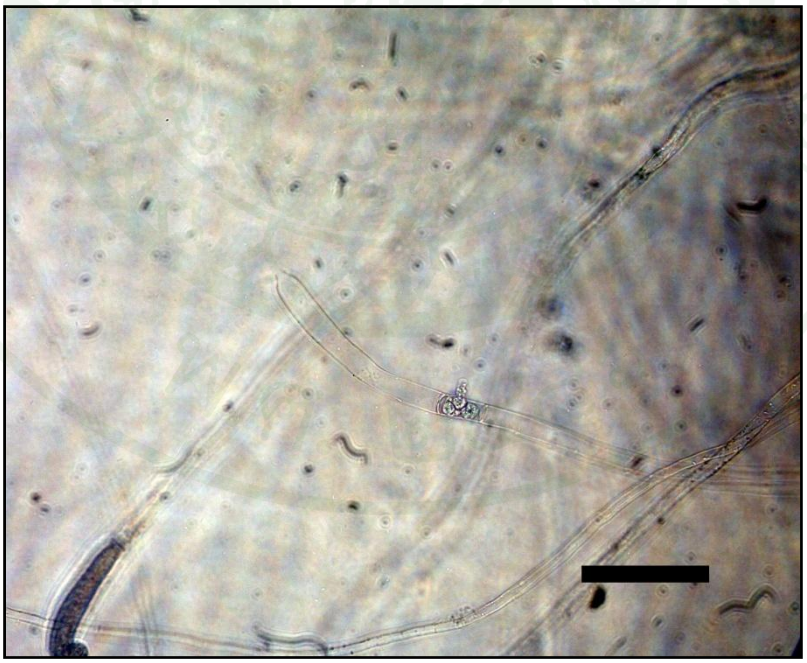


ภาพที่ 11 ลักษณะการปล่อย Zoospores ออกจากบริเวณปลายเปิดของ Sporangium ของราน้ำ ในสกุล *Achlya*, กำลังขยาย 400 เท่า

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

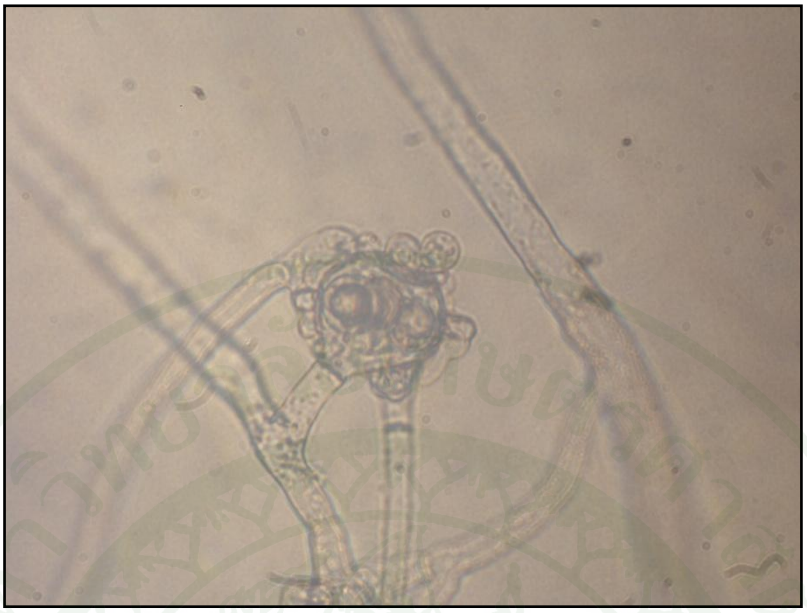


ภาพที่ 12 ลักษณะของ sporangium ของราน้ำสกุล *Achlya* หลังจากปล่อย primary zoospores (bar = 50 µm)

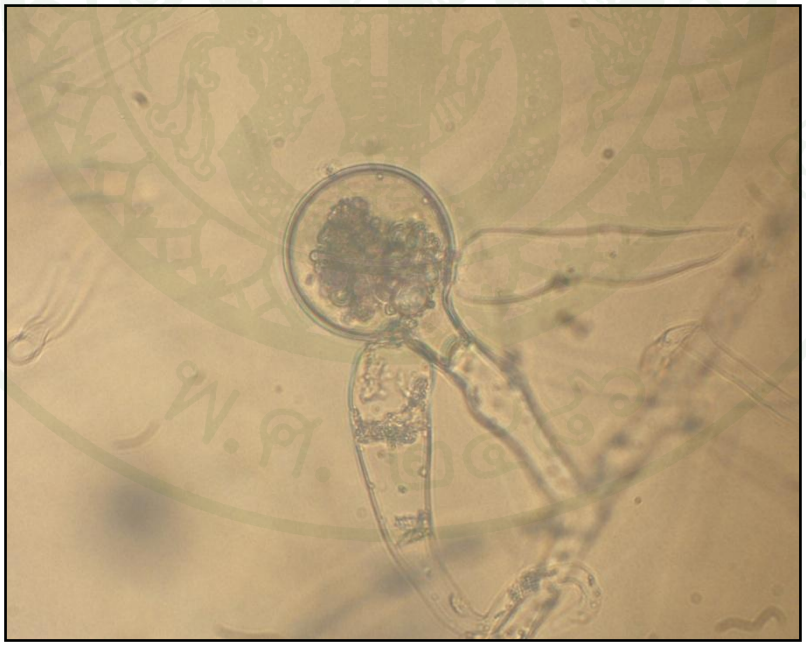


ภาพที่ 13 ลักษณะของ sporangium ของราน้ำสกุล *Saprolegnia* หลังจากปล่อย primary zoospores (bar = 50 µm)

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์



ภาพที่ 14 แสดงพัฒนาการของ Oogonium ของราน้ำในสกุล *Achlya* ที่แยกได้จากไข่ปลาบึก, กำลังขยาย 400 เท่า



ภาพที่ 15 แสดงพัฒนาการของ Oogonium ของราน้ำในสกุล *Saprolegnia* ที่แยกได้จากไข่ปลาบึก, กำลังขยาย 400 เท่า

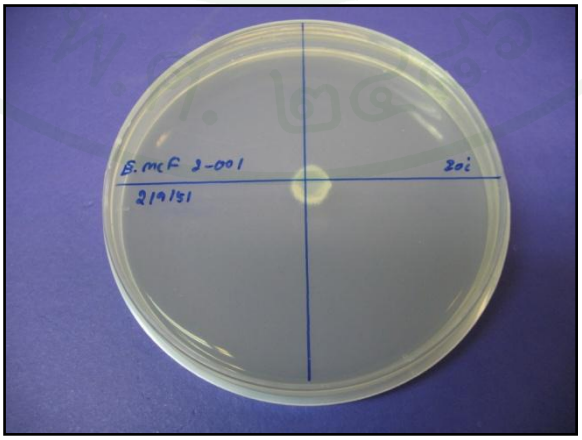
ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ภาพที่ 16 แสดงการงอกของ Germ tube ของราน้ำสกุล *Achlya* ที่แยกได้จากไข่ปลาบึก, กำลังขยาย 400 เท่า

2. การศึกษาลักษณะทางชีววิทยาบางประการของเชื้อราน้ำ

2.1 การศึกษาผลของอุณหภูมิที่มีผลต่อการเจริญของเส้นใยของเชื้อราน้ำ

พบว่าอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการเจริญของสายราน้ำสายพันธุ์ *Achlya* spp. T.MCF 1-02, E.MCF 2-001, E4/52-2, E4/52-3, E4/52-5, E4/52-8, E4/52-10, E4/52-11 และ E4/52-12 คือ 30 °C และอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการเจริญของสายราน้ำสายพันธุ์ *Saprolegnia* spp. E3/52-P1, E3/53-P2, E3/53-P3, E3/52-P4, E1/53-12, T3/53-3 และ T3/53-5 คือ 30 °C

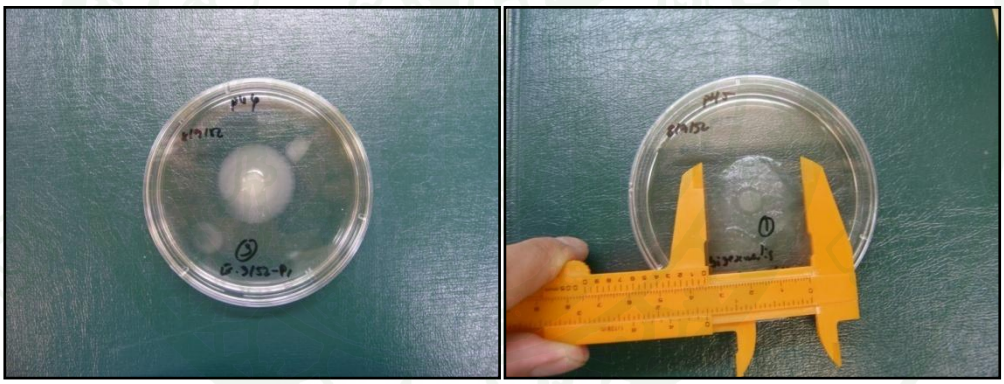


ภาพที่ 17 แสดงการเจริญของสายราบนจานเพาะเชื้อ GY agar ที่อุณหภูมิ 20 °C ระยะเวลา 1 วัน

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

2.2 การศึกษาผลของความเป็นกรด-ด่าง ของอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวที่มีต่อการเจริญของเส้นใยของเชื้อราน้ำ

พบว่าราน้ำสายพันธุ์ *Achlya* spp. T.MCF 1-02, E.MCF 2-001, E4/52-2, E4/52-3, E4/52-5, E4/52-8, E4/52-10, E4/52-11 และ E4/52-12 สามารถเจริญได้ในอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดเหลวที่มีค่าความเป็นกรด-ด่าง (pH) ในช่วง 4-11 ค่าความเป็นกรด-ด่างที่เหมาะสมต่อการเจริญของสายรา คือ pH 5 ส่วนราน้ำสายพันธุ์ *Saprolegnia* spp. E3/52-P1, E3/52-P2, E3/52-P3, E3/52-P4, E1/53-12, T3/53-3 และ T3/53-5 สามารถเจริญได้ในอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดเหลวที่มีค่าความเป็นกรด-ด่าง (pH) ในช่วง 4-11 เช่นเดียวกัน และค่าความเป็นกรด-ด่างที่เหมาะสมต่อการเจริญของสายรา คือ pH 6 และราน้ำอ้างอิงสายพันธุ์ *A. bisexualis* NJM 0611 และ *S. diclina* NJM 0501 สามารถเจริญได้ในอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดเหลวที่มีค่าความเป็นกรด-ด่าง (pH) ในช่วง 4-11 เช่นเดียวกัน และค่าความเป็นกรด-ด่างที่เหมาะสมต่อการเจริญของสายรา คือ pH 5 และ 6 ตามลำดับ



ภาพที่ 18 แสดงการทดสอบผลความเป็นกรด – ด่างของอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวที่มีผลต่อการเจริญของสายราน้ำ

2.3 การศึกษาผลของความเค็มที่มีต่อการเจริญของเส้นใยของเชื้อราน้ำ

พบว่าราน้ำสายพันธุ์ *Achlya* spp. T.MCF 1-02, E.MCF 2-001, E4/52-2, E4/52-3, E4/52-5, E4/52-8, E4/52-10, E4/52-11 และ E4/52-12 และราน้ำอ้างอิงและ *A. bisexualis* NJM 0611ทนต่อความเค็มของเกลือโซเดียมคลอไรด์ที่ 10 ppt แต่ไม่พบการเจริญของสายราน้ำที่ 15 ppt ส่วนเชื้อราน้ำสายพันธุ์ *Saprolegnia* spp. E3/52-P1, E3/52-P3, E3/52-P4, E1/53-12, T3/53-3 และ

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

T3/53-5 ทนต่อความเค็มของเกลือโซเดียมคลอไรด์ในอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดแข็ง ที่ความเค็ม 25 ppt แต่ไม่พบการเจริญของสายราที่ความเค็ม 30 ppt ยกเว้นราน้ำสายพันธุ์ *Saprolegnia* spp. E3/52-P2 และราน้ำอ้างอิง *S. diclina* NJM 0501 ที่ทนต่อความเค็มของเกลือโซเดียมคลอไรด์ที่ความเค็ม 30 ppt แต่ไม่พบการเจริญของสายราที่ความเค็ม 35 ppt

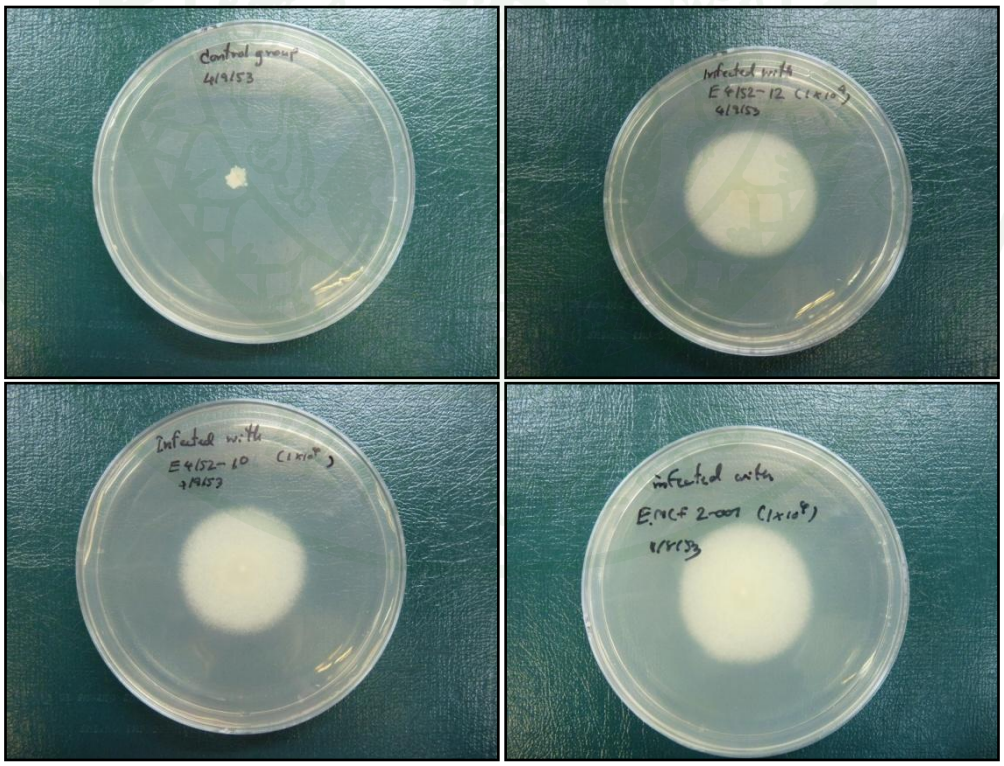
ตารางที่ 3 แสดงผลของอุณหภูมิ ความเค็มของเกลือโซเดียมคลอไรด์ และค่าความเป็นกรด – ด่างที่เหมาะสมต่อการเจริญของเชื้อราน้ำเปรียบเทียบกับ เชื้อราน้ำมาตรฐาน *Achlya bisexualis* NJM 0611 and *Saprolegnia diclina* NJM 9219.

Isolated years	**Aquatic fungus**	**Temperatures (°C)**	**Salinity (ppt)**	**pH**
2008	*Achlya* spp. T.MCF 1-02	30	10	5
	Achlya spp. E.MCF 2-001	30	10	5
2009	*Achlya* spp. E4/52-2	30	10	5
	Achlya spp. E4/52-3	30	10	5
	Achlya spp. E4/52-5	30	10	5
	Achlya spp. E4/52-8	30	10	5
	Achlya spp. E4/52-10	30	10	5
	Achlya spp. E4/52-11	30	10	5
	Achlya spp. E4/52-12	30	10	5
	Saprolegnia spp. E3/52-P1	30	25	6
	Saprolegnia spp. E3/52-P2	30	30	6
	Saprolegnia spp. E3/52-P3	30	25	6
	Saprolegnia spp. E3/52-P4	30	25	6
2010	*Saprolegnia* spp. E1/53-12	30	25	6
	Saprolegnia spp. T3/53-3	30	25	6
	Saprolegnia spp. T3/53-5	30	25	6
Reference	*Achlya bisexualis* NJM 0611	30	10	5
	Saprolegnia diclina NJM 0501	30	30	6

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

3. ผลการศึกษาความสามารถในการก่อโรคในไข่ปลาบึกของราน้ำ

ผลการศึกษาพบว่าเชื้อราน้ำสกุล *Achlya* ที่แยกได้ในปี พ.ศ. 2551 คือ T.MCF 1-02 และ E.MCF 2-001) ปี พ.ศ. 2552 คือ E4/52-10 และปี พ.ศ. 2553 คือ *Saprolegnia* spp. E1/53-12 มีความสามารถในการก่อโรคในไข่ปลาบึกในห้องทดลอง เช่นเดียวกับเชื้ออ้างอิง คือ *A. bisexualis* NJM 0611 (ตารางที่ 4) และผลการสุ่มตัวอย่างไข่ปลาบึกที่ไม่ฟักเป็นลูกปลานำมาเพาะเชื้อรา พบเชื้อราน้ำตามชนิดที่ใช้ในการทดลอง (ภาพที่ 19) และเมื่อนำตัวอย่างไข่ปลาบึกที่ไม่สามารถฟักรอดเป็นลูกปลาไปเตรียมชิ้นเนื่อและย้อมสี Hematoxilin and Eosin และอ่านผลพยาธิสภาพของเนื้อเยื่อไข่ปลาบึกภายใต้กล้องจุลทรรศน์พบว่า มีสายราเจริญโดยรอบไข่ปลาบึก และพบสายราเจริญแทรกตัวผ่านเข้าไปภายในไข่ปลาบึก และย่อยไข่ปลาบึกเกิดเป็นช่องว่างภายในไข่ปลาบึกจำนวนมาก (ภาพที่ 20-21) และ ยืนยันผลการติดเชื้อราน้ำในตัวอย่างไข่ปลาบึกด้วยการย้อมสีเนื้อเยื่อไข่ปลาบึกด้วยสี Grocott – Gomori methanamine silver และอ่านผลพยาธิสภาพเนื้อเยื่อไข่ปลาบึกภายใต้กล้องจุลทรรศน์พบว่า มีสายราน้ำที่ย้อมติดสีดำ และสามารถแทรกเข้าไปในเนื้อเยื่อไข่ปลาบึกได้ (ภาพที่ 22)



ภาพที่ 19 แสดงผลการเพาะเชื้อราน้ำจากตัวอย่างไข่ปลาบึกที่ไม่สามารถฟักรอดเป็นลูกปลาบึกได้หลังการทดลองการก่อโรคของราน้ำในไข่ปลาบึก เปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม

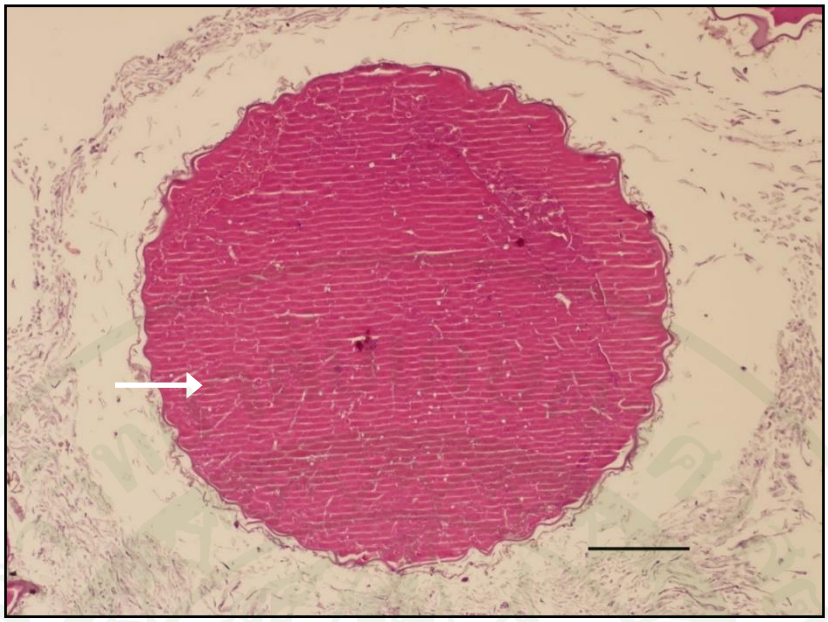
ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ตารางที่ 4 อัตราการฟักรอดของไข่ปลาบึกหลังจากติดเชื้อราน้ำ

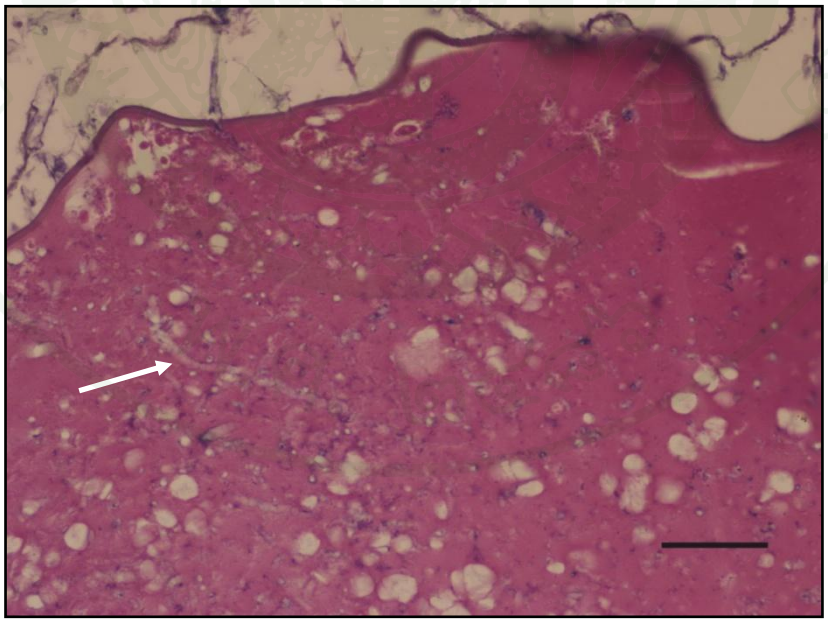
ราน้ำ	Zoospores (Spores/ml)	จำนวนไข่ปลาบึก (ใบ)	จำนวนลูกปลาบึกที่ฟักรอด (ตัว)	อัตราการฟักรอดเฉลี่ย (%)
กลุ่มควบคุม	0	30, 30	3, 2	8.33 ± 0.023^{a}
T.MCF 1-02	1×10^{4}	30, 30	0, 0	0^{b}
E.MCF 2-001	1×10^{4}	30, 30	0, 0	0^{b}
E 4/52-5	1×10^{4}	30, 30	3, 2	8.33 ± 0.023^{a}
E 4/52-8	1×10^{4}	30, 30	2, 3	8.33 ± 0.023^{a}
E 4/52-10	1×10^{4}	30, 30	0, 0	0^{b}
E 4/52-11	1×10^{4}	30, 30	4,1	8.33 ± 0.071^{a}
E 4/52-12	1×10^{4}	30, 30	2, 1	$5\pm0.024^{a,b}$
Saprolegnia spp.E 1/53-12	1×10^{4}	30, 30	0, 0	0^{b}
A. bisexualis NJM 0611	1×10^{4}	30, 30	0, 0	0^{b}

หมายเหตุ อักษร a b ที่อยู่บนค่าตัวเลขในตาราง แสดงความแตกต่างทางสถิติ ที่ P-value < 0.05.

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

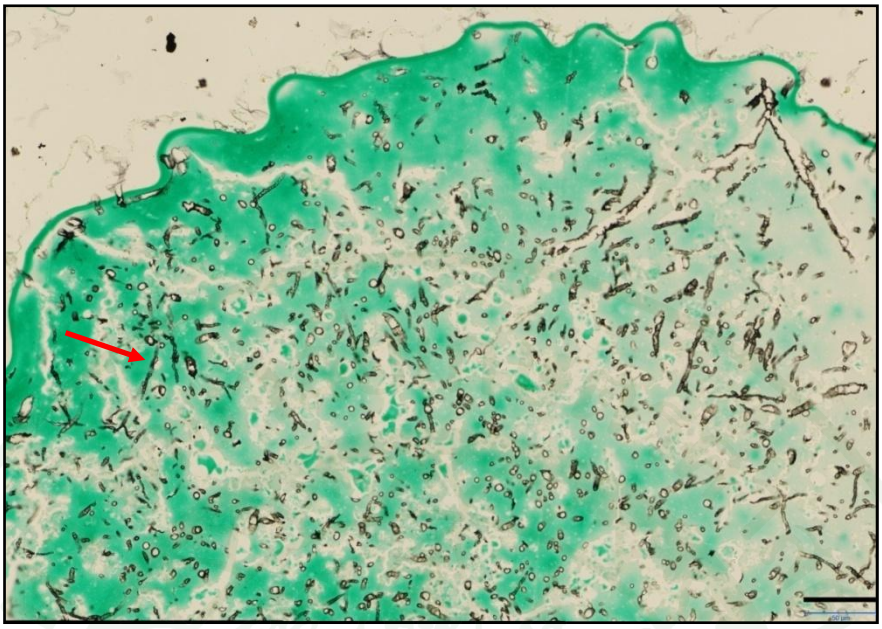


ภาพที่ 20 จุลพยาธิของไข่ปลาบึกที่ติดเชื้อราน้ำ พบสายราน้ำสามารถแทรกผ่านชั้นเยื่อหุ้มไข่เข้าไปทำลายไข่แดง ที่กำลังขยาย 100 เท่า ย้อมด้วยสี Hematoxylin and Eosin (H&E) (bar = 100 µm.)



ภาพที่ 21 จุลพยาธิของไข่ปลาบึกที่ติดเชื้อราน้ำ ย้อมด้วยสี Hematoxylin and Eosin (H&E) พบสายราน้ำสามารถแทรกผ่านชั้นเยื่อหุ้มไข่เข้าไปทำลาย และย่อยสลายไข่แดงเกิดเป็นช่องว่างภายในไข่, กำลังขยาย 400 เท่า (bar = 25 µm.)

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์



ภาพที่ 22 จุลพยาธิของไข่ปลาบึกที่ติดเชื้อราน้ำ ย้อมด้วยสี Grocott-Gomori methenamine-silver พบสายราน้ำ (เส้นใยย้อมติดสีดำ) สามารถแทรกผ่านชั้นเยื่อหุ้มไข่เข้าไปทำลายและย่อยสลายไข่แดงเกิดเป็นช่องว่างภายในไข่ กำลังขยาย 400 เท่า (bar = 50 µm.)

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

สรุปและข้อเสนอแนะ

สรุป

ผลการเพาะแยกเชื้อราน้ำจากตัวอย่างไข่ปลาบึกและตัวอย่างน้ำจากบ่อเพาะฟัก ที่เก็บจากสถาบันวิจัยเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำจืด จังหวัดพระนครศรีอยุธยา ตั้งแต่ปี พ.ศ.2551 ถึง 2553 สามารถแยกเชื้อราน้ำได้ 2 สกุล คือ *Achlya* spp. จำนวน 9 สายพันธุ์และ *Saprolegnia* spp. จำนวน 7 สายพันธุ์ จากไข่ปลาบึกและน้ำจากบ่อเพาะฟัก

ราน้ำสายพันธุ์ *Achlya* spp. และ *Saprolegnia* spp.ทุกสายพันธุ์ ที่แยกได้จากไข่ปลาบึกและน้ำ ตลอดระยะเวลา 3 ปี สามารถทนต่อความเค็มของเกลือโซเดียมคลอไรด์ที่ 10 ส่วนในพันส่วน (part per thoundson: ppt) และ 25 ppt ตามลำดับยกเว้น *Saprolegnia* spp. E3/52-P2 ที่ทนความเค็มของเกลือโซเดียมคลอไรด์ที่ 30 ppt สอดคล้องกับการศึกษาของ Chukanhom and Hatai (2004) ที่รายงานว่า *A. klebsiana* NJM 0210 ทนต่อความเค็มของเกลือโซเดียมคลอไรด์ที่ 10 ppt แต่ไม่พบการเจริญของสายราที่ 20 ppt และ *S. diclina* NJM 0208 ทนต่อความเค็มของเกลือโซเดียมคลอไรด์ที่ 30 ppt แต่ไม่พบการเจริญของสายราที่ 40 ppt

อุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการเจริญของสายราสายพันธุ์ *Achlya* spp. และ *Saprolegnia* spp.ที่แยกได้จากไข่ปลาบึก คือ 30 °C สอดคล้องกับการศึกษาของ Chukanhom and Hatai (2004) ที่รายงานว่าอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการเจริญของ *S. diclina* NJM 0208 และ *A. klebsiana* NJM 0210 คือ 25-30 °C และ 30-35 °C ค่าความเป็นกรด-ด่าง (pH) ที่มีผลต่อการเจริญของสายราสายพันธุ์ *Achlya* spp.และ*Saprolegnia* spp.ที่แยกได้จากไข่ปลาบึก คือ ช่วง pH 4-11 ซึ่งค่าที่เหมาะสมต่อการเจริญของสายรา คือ pH 5 และ 6 ตามลำดับ ซึ่งต่างจากการศึกษาของ Chukanhom and Hatai (2004) ที่รายงานว่า *A. klebsiana* NJM 0210 และ*S. diclina* NJM 0208 สามารถเจริญได้ในอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดเหลวที่มีค่าความเป็นกรด-ด่าง (pH) ในช่วง 4-10 ค่าความเป็นกรด-ด่างที่เหมาะสมต่อการเจริญของสายรา คือ pH 6-7

จากผลการศึกษาความสามารถในการก่อโรคในไข่ปลาบึกของราน้ำสกุล *Achlya* ที่แยกได้ในปี พ.ศ. 2551 คือ T.MCF 1-02 และ E.MCF 2-001 ปี พ.ศ. 2552 คือ E4/52-10 และปี พ.ศ. 2553 คือ *Saprolegnia* spp. E1/53-12 มีความสามารถในการก่อโรคในไข่ปลาบึกในห้องทดลอง

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

เช่นเดียวกับเชื้ออ้างอิง คือ *A. bisexualis* NJM 0611 (ตารางที่ 4) และผลการสุ่มตัวอย่างไข่ปลาบึกที่ไม่ฟักเป็นลูกปลานำมาเพาะเชื้อรา พบเชื้อราน้ำตามชนิดที่ใช้ในการทดลอง และผลพยาธิเนื้อเยื่อพบการแพร่กระจายของสายราบริเวณโดยรอบเยื่อหุ้มไข่ และมีสายราแทรกเข้าไปในเนื้อเยื่อไข่

ข้อเสนอแนะ

การศึกษาในครั้งนี้ ไม่พบเชื้อราน้ำจากตัวอย่างไข่ที่เก็บมาจากแม่พันธุ์ปลาบึกที่รีดจากแม่พันธุ์ปลาบึกก่อนการผสมน้ำเชื้อของพ่อพันธุ์ปลาบึกลงไปเพื่อการผสมเทียม แต่สามารถแยกเชื้อราน้ำได้จากตัวอย่างไข่ที่ผสมเทียมแล้ว และตัวอย่างน้ำในระบบการเพาะฟักไข่ปลาบึก แสดงว่าสิ่งแวดล้อมในระบบการเพาะฟักไข่ปลาบึกนั้น มีการปนเปื้อนเชื้อราน้ำ ดังนั้นเพื่อให้ระบบการเพาะฟักไข่ปลาบึกมีประสิทธิภาพสูงขึ้น ให้ผลอัตราการฟักรอดสูงขึ้น จึงควรมีการศึกษาสิ่งแวดล้อมในระบบการเพาะฟักที่สามารถลดการปนเปื้อนราน้ำได้ เช่น การเลือกศึกษาการเพาะฟักแบบลดอุณหภูมิของน้ำในระบบเพาะฟักไข่ปลาบึก โดยเลือกช่วงอุณหภูมิที่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อราน้ำได้มาทำการศึกษาและเปรียบเทียบอัตราการฟักรอด กับระบบการเพาะฟักเดิม หรือควรมีการศึกษาการใช้สารเคมีในการยับยั้งการการเจริญของสายราน้ำ และการสร้าง zoopores ของราน้ำได้ เช่น การเลือกใช้ความเค็มของเกลือโซเดียมคลอไรด์ ในระบบการเพาะฟักไข่ปลาบึกเพื่อเพิ่มอัตราการฟักรอดของลูกปลาบึก และเมื่ออัตราการฟักรอดของไข่ปลาบึกสูงขึ้น และมีการปล่อยพันธุ์ปลาบึกลงในแหล่งน้ำธรรมชาติ แหล่งน้ำสาธารณะอื่นๆ เช่น แม่น้ำโขง และลำน้ำสาขา ทะเลสาบ หรือเขื่อนขนาดใหญ่ ก็จะสามารถเพิ่มจำนวนประชากรของปลาบึกในแหล่งธรรมชาติได้ และเป็นการอนุรักษ์สายพันธุ์ของปลาบึกไม่ให้สูญพันธุ์ไปจากธรรมชาติ ตลอดจนควรส่งเสริมให้เกษตรกรผู้สนใจนำลูกปลาบึกไปเพาะเลี้ยงในระบบฟาร์ม เพื่อทดแทนการจับปลาบึกในแหล่งน้ำธรรมชาติได้ด้วย

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

เอกสารและสิ่งอ้างอิง

กฤษณ์ มงคลปัญญา. 2536. **การเก็บน้ำเชื้อปลาแบบแช่แข็ง**. ภาควิชาวิทยาศาสตร์ทั่วไป, คณะวิทยาศาสตร์, มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

เกรียงศักดิ์ เม่งอำพัน. 2543. ปลาบึก. **เอกสารเผยแพร่ชุดโครงการ "อุตสาหกรรมสัตว์น้ำ" สกว. ชุดที่ 1**. สำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย.

จุฑารัตน์ มูลจันทร์. 2546. **ลักษณะบางประการทางชีววิทยาและพยาธิวิทยาของเชื้อราสกุล *Saprolegnia* และ สกุล *Achlya* ที่แยกได้จากปลาสวยงาม**. วิทยานิพนธ์ปริญญาโท, มหาวิทยาลัยขอนแก่น.

ชวลิต วิทยานนท์ และ สมศักดิ์ รุ่งทองใบสุรีย์. 2536. **อนุกรมวิธานของปลาบึกและปลาสวาย (วงศ์ *Pagasiidae*)**. สถาบันวิจัยการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำจืด, กรมประมง.

ธีรพันธ์ ภูคาสวรรค์. 2511. ปลาบึก. **วารสารการประมง** 21(3) : 244-252.

ธีรพันธ์ ภูคาสวรรค์. 2526. ป่าบึ้กเจียงของ. สถาบันประมงน้ำจืดแห่งชาติ **วารสารการประมง** 36(4) : 399-346.

นวลอนงค์ นาคคง. 2537. **ลักษณะทางกายวิภาคของปลาบึก**. วิทยานิพนธ์ปริญญาโท, มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

ลำพอง ทองปน. 2534. **ลักษณะทางจุลกายวิภาคของระบบย่อยอาหารในปลาบึก**. วิทยานิพนธ์ปริญญาโท, มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

วันเพ็ญ มีนกาญจน์. 2527. เปรียบเทียบลักษณะของลูกปลาบึกและลูกปลาสวาย. **วารสารการประมง** 37(2) : 106-112.

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

สมโภชน์ อัคคทวีวัฒน์. 2521. ลักษณะอนุกรมวิธานและชีวประวัติบางประการของปลาน้ำจืดที่สำคัญของประเทศไทย. **เอกสารวิชาการฉบับที่ 7/2521**. สถาบันประมงน้ำจืดแห่งชาติ, กรุงเทพมหานคร.

สมศักดิ์ รุ่งทองใบสุรีย์, ชวลิต วิทยานนท์ และ ณรงค์ วีระไวทยะ. 2531. การสำรวจปลาในครอบครัว Schibeidae และ Pagasiidae ที่พบในแม่น้ำโขงและสาขา. **เอกสารวิชาการฉบับที่ 1/2531**. สถานีประมงน้ำจืดจังหวัดหนองคาย, กรมประมง.

สุปราณี ชินบุตร, พรเลิศ จันทร์รัชชกูล และ ชะลอ ลิ้มสุวรรณ. 2527. **ศึกษาการเกิดอวัยวะและลักษณะทางเนื้อเยื่อของปลาวัยอ่อน**. สถาบันประมงน้ำจืดแห่งชาติ.

เสน่ห์ ผลประสิทธิ์. 2526. การผสมเทียมปลาบึก. **วารสารการประมง** 36(4): 347-360.

_____. 2527. การเพาะพันธุ์ปลาบึก หน้า 403. **ใน เอกสารการประชุมวิชาการครั้งที่ 22 สาขาประมง**. มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพมหานคร.

เสน่ห์ ผลประสิทธิ์ และ ภาณุ เทวรัตน์มณีกุล. 2540. ชีววิทยาการเพาะเลี้ยงปลาบึก. **เอกสารวิชาการ ฉบับที่ 31.** กรมประมง, กรุงเทพมหานคร.

โสม พัตรสันดร. 2510. การล่าปลาบึก. **วารสารการประมง** 20(1): 225-231.

Baird G. 1996. **Khone falls Fishers**. Mekong Fisheries Network Newletter. Vol.2 (2): 1-5.

Bruno, D.W. and B.P. Wood. 1999. Saprolegnia and other oomycetes. **Fish Diseases and Disorders**. Vol. 3 Viral, Bacterial and Fungal Infractions. 599-658.

Carlile, M.J. and S.C. Watkinson. 1994. **The fungi**. Academic Press, London.

Chevey, P. 1930. Sur un nouveau silure geant du basin du Mekong, Pangasianodon gigas nov**.** g., nov. sp. **Bull Soc. Zool. France**. 55: 536-542.

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

Chukanhom, K. and K. Hatai. 2004. Freshwater fungi isolated from eggs of the common carp (*Cyprinus carpio*). **The Mycological Society of Japan and Springer-Verlag Tokyo.** 45: 42-48.

Daugherty, J., Evans, T.M., Skilom. T., Watson, L.S. and N.P. Money. 1998. Evolotion of spore release mechanism in the Saprolegniaceae (Oomycetes): evidence from a phylogenetic analysis of internal transcribed spacer sequences. **Fungal Genetics and Biology** 24: 354-363.

Dick, M.W. 2001. Straminipilous Fungi. **Kluwer Academic Publishers**, Dordrecht.

Frederick, K. and J. Sparrow. 1960. **Aquatic Phycomycetes.** 2nd edition. The University of Michigan Press.

Goven-Dixon, B.A. 1993. Fungl and algal diseases of freshwater tropical fishes. **In: Fish Medicine**.

Hatai, K. and S. Egusa. 1979. Studies on the pathogenic fungus of mycotic granulomatisis-III. Development of the medium for MG- fungus. **Fish pathol.** 13: 147-152.

Howe, G.E., Rach, J.J. and J.J. Olson. 1998. Method for inducing saprolegniasis in channel catfish. **Jounal of Aquatic Animal Health** 10: 62-68.

Johnson, T.W. 1959. **The genus Achlya: Morphology and Taxonomy**. The University of Michigan Press, Ann Arbor.

Kwanprasert, P., C. Hanjavanit and N. Kitancharoen. 2007. **Characteristics of *Achlya bisexualis* Isolated from Eggs of NileTilapia (*Oreochromis niloticus* Linn.)**. KKU Res J. 12(3): 195- 202.

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

Kitancharoen, N., K. Hatai, R. Ogihara and D.N.N. Aye. 1995. A new record of *Achlya klebsiana* from snakehead, *Channa striatus*, with fungal infection in Myanmar. **Mycoscience** 36: 235-238.

Mongkonpanya, K., Senawong, C., Pupipat, T. and T. Tiersch. 1996. The Mekong Giant Catfish and ChaoPhraya Catfish and Their Hybrid : Mopholog, Carcass Composition and Press-Out Precentages. **Thai J. Agric. Sci.** 29: 373-381.

Neish, G.A. and G.C. Huges. 1980. **Fungal Disease of Fishes**. T.F.H. Publications,Inc., Neptune, New Jersey.

Nelson, J.S. 1994. **Fishes of the world**. 3rd edition. John Wiley & Sons, Inc., New York.

Phadee P., C. Hanjavanit and O. Lawhavinit. 2007. **Biodiversity of water moulds in water and fungal infection in fish in Chi River**. 11th BRT Anaual meeting 2007

Seymour, R. 1970. **The Genus *Saprolegnia***. J. Cramer, Germany.

Shigeki, I. and S. Tokumasu. 2002. The genus *Brevilegnia* (Saprolegniales, Oomycetes) in Japan. **Mycoscience** 43: 59-66.

Smith, H.M. 1945. **The fresh-water fish of siam or Thailand**. U.S. Nath. Mus., Bull.118.xi.

Unakornsawat, Y., P. Pittathano and M. Khachpichat. 2001. Artificial Propagation of Mekong Giant Catfish *Pangasisnodon gigas* (Chevey) by First Filial Generation Brood stock (F_1) rearing in earthen ponds at Phayao inland fisheries Station. **Phayao Inland Fisheries Station Extention Paper** No.1/2001: 1-57.

Unestarn, T. 1965. Studies on the crayfish plague fungus *Aphanomyces astaci* Some factors affecting growth in vitro. **Physiologia Plantarum** 18: 483-505.

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

Vidthayanon, C. 1993. **Taxonomic revision of the catfish family Pangasisdae**. Ph.D. thesis. Tokyo University of Fisheries, Tokyo, Japan.

Vorderwinkler, A., Sculthorpe, E. and P. Socolof. 1962. **Exotic Tropical Fishes**. T.F.H. Publications, Inc.

Webster, J. 1980. **Introduction to Fungi**. Cambridge University Press, Australia.

Webster, J and R. W. S. Weber. 2007. **Introduction to Fungi**. 3rd edition. Cambridge University Press, United state of America.

West, P.V. 2006. Saprolegnia parasitica, an oomycete pathogen with a fishy appetite: new challenges for an old problem. **Mycologist**. Volume 20: 99-104.

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ภาคผนวก

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ภาคผนวก ก

อาหารเลี้ยงเชื้อ

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

อาหารเลี้ยงเชื้อ

1. สูตรอาหารเลี้ยงเชื้อ

1.1 Glucose Yeast extract agar (GY agar)

Glucose	10	กรัม
Yeast extract	2.5	กรัม
Agar	15	กรัม
น้ำกลั่น	1	ลิตร

ละลายส่วนผสมแต่ละส่วนเข้าด้วยกัน จากนั้นนำไปฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งความดันไอที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว 15 นาที เมื่อฆ่าเชื้อเสร็จแล้วตั้งทิ้งไว้ให้เย็นลงที่อุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียส แล้วเติมยาปฏิชีวนะแอมพิซิลิน (Ampicillin) และสเต็ปโตมัยซินซัลเฟลท (Streptomycin sulphate) ที่ความเข้มข้น 500 µg/mL.

1.2 Glucose Yeast extract broth (GY broth)

Glucose	10	กรัม
Yeast extract	2.5	กรัม
น้ำกลั่น	1	ลิตร

ละลายส่วนผสมแต่ละส่วนเข้าด้วยกัน จากนั้นนำไปฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งความดันไอที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว 15 นาที เมื่อฆ่าเชื้อเสร็จแล้วตั้งทิ้งไว้ให้เย็นลงที่อุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียส แล้วเติมยาปฏิชีวนะแอมพิซิลิน (Ampicillin) และสเต็ปโตมัยซินซัลเฟลท (Streptomycin sulphate) ที่ความเข้มข้น 500 µg/mL.

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ภาคผนวก ข

การคำนวณปริมาณ Zoospores

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

1. การคำนวณปริมาณ zoospores

นับจำนวน zoopores บริเวณมุมตารางทั้ง 4 ช่อง ของ Hemacytometer (Improved Neubauer chamber) ตำแหน่งเดียวกันกับบริเวณที่ใช้นับเม็ดเลือดขาว

ปริมาตรของ Hemacytometer = กว้าง (mm.) × ยาว (mm.) × สูง (mm.)

= 1 × 1 × 0.1

= 0.1

จำนวนช่องที่นับ 4 ช่อง = 4 × 0.1

ปริมาตร 0.4 mm^3 นับ zoopores ได้ = a cell

ปริมาตร 1 mm^3 จะนับ zoopores ได้ = $\frac{a \times 1}{0.4}$ cell

จำนวน zoopores /ml = $\frac{a \times 1}{0.4} \times 10^3$

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ภาคผนวก ค

ภาพการผสมเทียมปลาบึก การเก็บตัวอย่างไข่ปลาบึกจากบ่อเพาะฟักลูกปลาบึก
ณ สถาบันวิจัยการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำจืด กรมประมง จังหวัดพระนครศรีอยุธยา

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ภาพผนวกที่ ค1 การรีดไข่จากแม่พันธุ์ปลาบึก

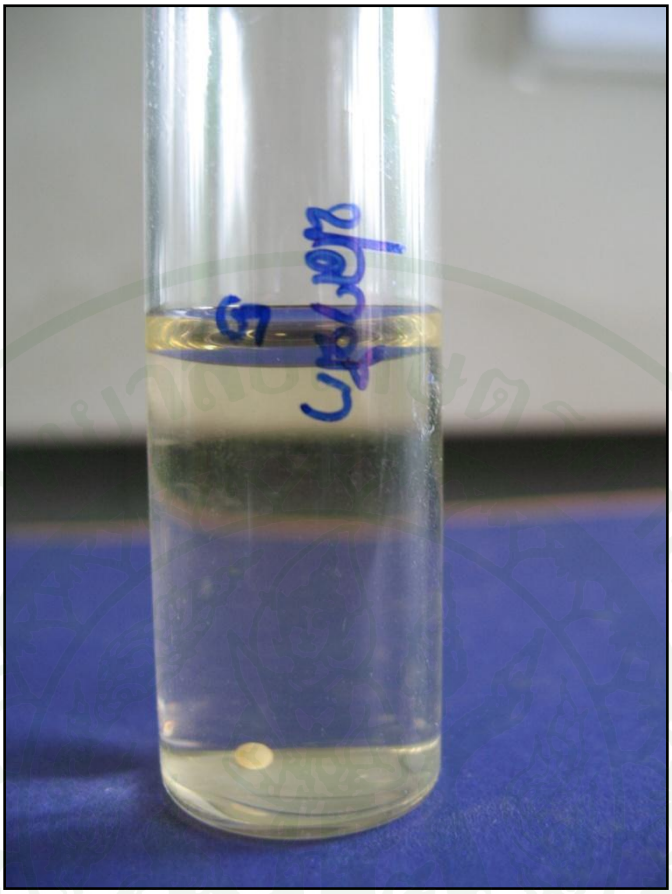
ภาพผนวกที่ ค2 การรีดน้ำเชื้อจากพ่อพันธุ์ปลาบึก

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ภาพผนวกที่ ค3 การใช้ขนไก่กวนผสมระหว่างไข่ปลาบึกกับน้ำเชื้อ

ภาพผนวกที่ ค4 การเพาะฟักไข่ปลาบึกในถังเพาะฟักทรงกรวยแบบเป่าน้ำวน

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์



ภาพผนวกที่ ค5 การเก็บตัวอย่างไข่ปลาบึกจากบ่ออนุบาลเพาะฟักลูกปลาบึก

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ภาคผนวก ง

การเตรียมสีย้อม Hematoxilin and eosin และ สีย้อม Grocott - Gomori methenamine silver และการย้อมสีชิ้นเนื้อเยื่อไข่ปลาบึก

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

1. การเตรียม 10% Phosphate bufferd formalin (10% PBF)

$NaH_2PO_4.2H_2O$	4.4	กรัม
Na_2HPO_4	6.5	กรัม
Formalin	100	มิลลิลิตร
น้ำกลั่น	900	มิลลิลตร

ละลาย $NaH_2PO_4.2H_2O$ และ Na_2HPO_4 ในน้ำกลั่น จากนั้นเติม Formalin ลงไปผสมให้เข้ากัน เก็บไว้ในขวดแก้ว

2. การเตรียมสีย้อม Hematoxilin และ Eosin (H&E)

2.1 การเตรียม Harris Hematoxilin

Hematoxilin	1	กรัม
Ammonia alum	20	กรัม
Ethyl aclcohol	10	กรัม
Mercuric oxide	0.5	กรัม
น้ำกลั่น	200	มิลลิลิตร

ละลายสี hematoxilin ใน ethyl aclcohol ส่วน ammonia alum ละลายในน้ำกลั่นให้ความร้อนเพื่อให้ละลาย จากนั้น เทสารละลายสี hematoxilin ลงไปแล้วให้ความร้อนโดยการต้มอีก 30 วินาที จากนั้นเติม mercuric oxide แล้วทำให้เย็นอย่างรวดเร็ว แล้วจึงเติม acetic acid ลงไป 2 - 3 หยด

2.2 การเตรียมสี Eosin

Eosin Y (C.I. 45380)	1	กรัม
70% ethyl aclcohol	100	มิลลิลิตร
Gracial acetic acid	5	มิลลิลตร

ผสมให้สารเคมีทั้ง 3 อย่างเข้าด้วยกัน เก็บไว้ในขวดสีชา

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

3. วิธีการย้อมสี hematoxilin and eosin (H&E)

3.1 นำตัวอย่างชิ้นเนื้อเยื่อที่ติดอยู่บนกระจกสไลด์ ไปละลายพาราฟินด้วยการแช่ใน xylene และทำการดูดน้ำกลับเข้าเซลล์ โดยการแช่ในแอลกอออล์ระดับต่างๆ ตั้งแต่ 100, 95, 70 เปอร์เซต์ไปจนถึงแช่ในน้ำนานอย่างน้อย 2 – 3 นาที

3.2 ย้อมสี Mayer's hematoxilin นาน 5 – 10 นาที เวลาที่ใช้ขึ้นอยู่กับคุณภาพของสีย้อมว่าใช้งานมานานเพียงใด

3.3 ล้างสีส่วนที่เกินออกด้วยน้ำประปาแบบปล่อยให้ไหลผ่านสไลด์ นาน 2 -3 นาที

3.4 ซับน้ำออก แล้วย้อมด้วยสี Eosin นาน 5 – 10 นาที เวลาที่ใช้ขึ้นอยู่กับคุณภาพสีย้อมว่าใช้งานมานานเพียงใด

3.5 นำสไลด์ที่ย้อมสีแล้วมาผ่านกระบวนการดึงน้ำออกจากเซลล์ โดยการแช่สไลด์ในแอลกอฮอล์ 100 เปอร์เซ็นต์, แอลกอฮอล์ผสม Xylene และแช่ใน Xylene อีก 2 ครั้ง

3.6 ทำการปิดสไลด์ด้วย Cover glass โดยการหยด Permount เพื่อทำเป็นสไลด์ถาวร

ผล: นิวเคลียสย้อมติดสีน้ำเงิน, ไซโตพลาสซึมย้อมติดสีชมพู - แดง

4. การเตรียมสีย้อม Grocotte – Gomori methenamine silver

4.1 เตรียมสารละลาย 4% aq Chromic Acid

Chromium trioxide (analytical)	4	กรัม
น้ำกลั่น	100	มิลลิลิตร

4.2 เตรียมสารละลายซิลเวอร์ (Silver solution)

3% methanamine (hexamine)	23	มิลลิลิตร
5% silver nitrate	1.25	มิลลิลิตร

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

5% borax (sodium tetraborate)	3	มิลลิลิตร
น้ำกลั่น	25	มิลลิลิตร

4.3 เตรียมสารละลาย 0.2% aq Sodium chloroaurate (yellow gold chloride)

Gold Chloride (analytical)	1	กรัม
น้ำกลั่น	500	มิลลิลิตร

4.4 เตรียมสารละลาย 2% aq Sodium thiosulphate (hypo)

Sodium thiosulphate	2	กรัม
น้ำกลั่น	100	มิลลิลิตร

4.5 เตรียมสารละลาย Working light green

1% light green (CI 42095) ใน 1% acetic acid 10 มิลลิลิตร

น้ำกลั่น	40	มิลลิลิตร

5. วิธีการย้อมสี Grocotte – Gomori methenamine silver

5.1 นำตัวอย่างชิ้นเนื้อเยื่อที่ติดอยู่บนกระจกสไลด์ ไปละลายพาราฟินด้วยการแช่ใน xylene และทำการดูดน้ำกลับเข้าเซลล์ โดยการแช่ในแอลกอฮอล์ระดับต่างๆ ตั้งแต่ 100, 95, 70 เปอร์เซ็นต์ไปจนถึงแช่ในน้ำนานอย่างน้อย 2 – 3 นาที

5.2 จุ่มสไลด์ในสารละลาย 4% aq Chromic acid ปริมาตร 40 มล. เปิดฝา Coplin jar เล็กน้อย แล้วนำเข้าตู้ไมโครเวฟ ตั้งกำลังไฟฟ้า 150 วัตต์ ใช้เวลา 2 นาที 30 วินาที

5.3 จุ่มสไลด์ขึ้น - ลงใน Coplin jar แล้วตั้งไสลด์ไว้ 2 นาที จากนั้นล้างสไลด์ด้วยน้ำประปา 30 วินาที

5.4 จุ่มสไลด์ในสารละลาย 1% Sodium metabisulphite 30 วินาที จากนั้นล้างด้วยน้ำประปา 30 วินาที

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

5.5 อุ่นสารละลาย Silver solution ด้วยตู้ไมโครเวฟ ใช้กำลังไฟฟ้า 450 วัตต์ นาน 60 วินาที

5.6 ล้างสไลด์ด้วยน้ำกลั่น จากนั้นจุ่มสไลด์ลงในสารละลาย Silver solution ที่ร้อนอยู่ จากนั้นอุ่นในตู้ไมโครเวฟ ใช้กำลังไฟฟ้า 150 วัตต์ นาน 30 วินาที

5.7 จุ่มสไลด์ขึ้น – ลง จากนั้นตั้งสไลด์ไว้ 1 นาที ล้างด้วยน้ำประปาและตรวจเช็คการติดสีภายใต้กล้องจุลทรรศน์ ถ้าติดสีย้อมไม่ดีให้กลับไปจุ่มในสารละลาย Silver solution อีกครั้งและตรวจสอบการติดสี ทุกๆ 1 นาที ผลการติดสี สายราจะติดสีน้ำตาลเข้ม (dark brown)

5.8 จุ่มสไลด์ใน สารละลาย 2% Gold chloride นาน 1 นาที จากนั้นล้างด้วยน้ำกลั่น

5.9 จุ่มสไลด์ลงในสารละลาย 2 % Sodium thiosulphate 1 นาที จากนั้นล้างสไลด์ด้วยน้ำประปา

5.10 ย้อมสีทับด้วยสี Working light green นาน 15 วินาที จากนั้นล้างสีส่วนเกินออกด้วย แอลกอฮอล์ ปล่อยสไลด์ให้แห้ง เช็ดทำความสะอาดและปิดทับด้วย Cover glass ด้วยการหยด Permount เพื่อทำเป็นสไลด์ถาวร

ผล: สายราย้อมติดสีดำ (black), mucin ย้อมติดสี เทาเข้ม (Dark gray), background ย้อมติดสีเขียว (pale green)

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ประวัติการศึกษา และการทำงาน

ชื่อ –นามสกุล	นายณรงค์ อาบกิ่ง
วัน เดือน ปี ที่เกิด	วันที่ 25 กรกฎาคม 2523
สถานที่เกิด	จังหวัดนครราชสีมา
ประวัติการศึกษา	วท.บ. (เทคนิคการสัตวแพทย์) มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์
ตำแหน่งหน้าที่การงานปัจจุบัน	นักวิทยาศาสตร์
สถานที่ทำงานปัจจุบัน	คณะเทคนิคการสัตวแพทย์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์
ผลงานดีเด่นและรางวัลทางวิชาการ	-
ทุนการศึกษาที่ได้รับ	ทุนการศึกษาจากกองทุนพัฒนา มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ปี 2550

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์