เอกสารงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

การเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำอาชีพที่ทำรายได้สำคัญให้แก่เกษตรกร ในปี 2545 สัตว์น้ำที่ได้จากการเพาะเลี้ยงมีมูลค่าทั้งสิ้น 954.60 ล้านบาท จากผลผลิตทั้งหมด (จากสัตว์น้ำจืด 294.5 และสัตว์น้ำชายฝั่ง 660.1 ล้านบาท) และนับวันจะมีปริมาณและรายได้เพิ่มมากขึ้น (เกรียงศักดิ์, 2548) จากรายงานของกลุ่มวิจัยและวิเคราะห์สถิติประมง (2547) พบว่าผลิตผลทางการประมงของประเทศไทยตั้งแต่ปี 2534 ถึง 2545 จากการจับปลาน้ำจืด และน้ำเค็มมีแนวโน้มคงที่และลดลงในบางปี แต่การเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำจืดและชายฝั่งกลับเพิ่มขึ้นทุกปี โดยในปี 2545 มีปริมาณผลผลิตทั้งสิ้นประมาณ 3,780,000 ตัน เป็นการจับจากทะเล 69.6% (2,643,700 ตัน) จับจากน้ำจืด 5.2% (198,700 ตัน) จากการเพาะเลี้ยงชายฝั่ง 17.4% (660,100 ตัน) และจากการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำจืด 7.8% (294,500 ตัน) เมื่อพิจารณาแยกตามภูมิภาคการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำจืดพบว่า ภาคกลางให้ผลผลิตสูงที่สุด รองลงมาเป็นภาคเหนือ ภาคตะวันออกเฉียงเหนือ และภาคใต้ ตามลำดับ ในปัจจุบันการเพาะเลี้ยงปลาสวยงามในประเทศไทยได้รับความนิยมอย่างมาก เพราะสามารถเลี้ยงเพื่อเป็นงานอดิเรกหรือดำเนินกิจการทางการค้าได้ มีรายงานมูลค่าการส่งออกปลาสวยงามของไทยในปี พ.ศ. 2544 เป็นวงเงินประมาณ 1,000 ล้านบาท แต่ของโลกมีมูลค่ามากกว่า 30,000 ล้านบาท ซึ่งยอดซื้อปัจจุบันการเพาะเลี้ยงปลาสวยงามในประเทศไทยกำลังได้รับความนิยม เพราะสามารถเลี้ยงเพื่อเป็นงานอดิเรกหรือดำเนินกิจการทางการค้าได้ มีรายงานมูลค่าการส่งออกปลาสวยงามของไทยในปี พ.ศ. 2544 เป็นวงเงินประมาณ 1,000 ล้านบาท แต่ของโลกมีมูลค่ามากกว่า 30,000 ล้านบาท ซึ่งยอดซื้อขายปลาสวยงามทั่วโลกคิดเป็นปลาน้ำจืดร้อยละ 90-95 มีเพียงร้อยละ 5-10 ที่เป็นปลาทะเล (FAO, 1999) ปลาสวยงามน้ำจืดที่นิยมส่งออกได้แก่ ปลาหางนกยูง ปลานิออน ปลาแพลทตี้ ปลามอลลี่ ปลาสอด ปลาหมอสี ปลาคาร์ป ปลากัดและปลาทอง เป็นต้น (ยุพินธ์, 2544) การเพาะเลี้ยงปลาสวยงามในปัจจุบันส่วนใหญ่เป็นการเลี้ยงแบบพัฒนา (Intensive system) มักทำให้ปลาเกิดความเครียด ภูมิคุ้มกันโรคของปลาลดลง ส่งผลให้ปลาเกิดโรคในที่สุด ซึ่งการเกิดโรคในปลาจะเป็นปัจจัยสำคัญที่มีผลกระทบต่อมูลค่าการส่งออกปลาสวยงาม โรคปลาสวยงามมีสาเหตุหลายประการได้แก่ การติดเชื้อจากแบคทีเรีย ไวรัส เชื้อปรสิต และเชื้อรา (Richard, 1977; Schaperclaus *et al.*, 1992; Imai *et al.*, 2000)

โรคที่เกิดในปลา

การเกิดโรคในปลานั้น โดยทั่วไปจะไม่เกิดจากสาเหตุใดเพียงสาเหตุหนึ่ง แต่จะเกี่ยวข้องกับหลายปัจจัยร่วมกัน ทั้งสภาพสัตว์น้ำ สภาพแวดล้อม ชนิดและปริมาณของเชื้อโรค ซึ่ง Snieszko (1974) ได้อธิบายสาเหตุของการเกิดโรคว่าเกิดจาก

1. ตัวปลาหรือสัตว์น้ำ (Host) มีสุขภาพอ่อนแอ อันเนื่องมาจากอัตราการปล่อยแบบหนาแน่น ลักษณะทางพันธุกรรมหรือสายพันธุ์ที่อ่อนแอ ทำให้มีภูมิคุ้มกันโรคต่ำ หรือการได้รับบาดเจ็บ เป็นต้น

2. สภาพแวดล้อม (Environment) ที่ไม่เหมาะสมต่อการดำรงชีวิต อันได้แก่ คุณภาพน้ำต่างๆ เช่น อุณหภูมิ pH ปริมาณออกซิเจนที่ละลายในน้ำ ค่าความเป็นด่าง และค่าความกระด้างไม่เหมาะสม หรือการที่น้ำมีสารหรือก๊าซพิษ เช่น แอมโมเนีย ก๊าซไข่เน่า โลหะหนัก สารพิษ หรือของเสียต่างๆ มีในปริมาณที่มากเกินไป ตลอดจนวิธีการจัดการฟาร์ม เช่น วิธีการขนส่ง วิธีการเลี้ยง และวิธีการใช้ยาในการรักษาโรค เป็นต้น สิ่งต่างๆ เหล่านี้ล้วนแล้วแต่มีผลทำให้ปลาเกิดความเครียด และอ่อนแอ เกิดการติดโรคได้ง่าย

3. เชื้อโรค (Pathogens) ได้แก่ ไวรัส แบคทีเรีย ปรสิต และเชื้อรา การติดเชื้ออาจเป็นการติดเชื้อเพียงชนิดเดียวหรือหลายชนิดก็ได้ ทั้งนี้ความสามารถในการก่อโรคขึ้นกับชนิด ปริมาณของเชื้อโรค รวมถึงปัจจัยร่วมอื่นๆ เช่น สุขภาพของปลา และสภาพแวดล้อมในน้ำ

3.1 โรคติดเชื้อปรสิต

โรคติดเชื้อปรสิตในปลาเป็นปัญหาที่พบได้บ่อย เนื่องจากปรสิตมีแพร่กระจายอยู่ทั่วไปตามแหล่งน้ำที่มีสภาวะเหมาะสมต่อการเจริญเติบโต ตลอดจนปลาทุกชนิดมีคุณสมบัติที่ดีในการเป็นที่ยึดเกาะและเป็นแหล่งอาหารของปรสิตต่างๆ โดยทั่วไปมักตรวจพบปรสิตในปลาจากบ่อเลี้ยงมากกว่าแหล่งน้ำธรรมชาติโดยเฉพาะในการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำแบบพัฒนา ซึ่งมีอัตราการปล่อยแบบหนาแน่น มีการให้อาหารเป็นจำนวนมากส่งผลให้อาหารส่วนที่เหลือสะสมในบ่อปลา ตลอดจนของเสียที่ปลาปล่อยออกมาก็จะมีผลทำให้คุณภาพน้ำเปลี่ยนแปลงไป เช่น ปริมาณสารอินทรีย์ และปริมาณแอมโมเนียสูง และปริมาณออกซิเจนที่ละลายในน้ำต่ำลง ซึ่งปัจจัยเหล่านี้จะส่งผลให้ปรสิตเจริญได้ดี และก่อโรคในปลาได้เสมอ แม้ว่าการติดเชื้อปรสิตจะเป็นปัญหาที่ไม่รุนแรง และไม่ก่อให้เกิดการตายในสัตว์น้ำหากมีปริมาณไม่มากพอ แต่ผลจากการติดเชื้อปรสิตอาจทำให้เกิดปัญหาการติดเชื้ออื่นๆ (Secondary infection) เช่น แบคทีเรีย หรือเชื้อรา ตามมาได้ โรคปรสิตที่พบบ่อย ได้แก่ โรคจุดขาว โรคติดเชื้อเห็บระฆัง โรคสนิม โรคตัวเปื่อย และโรคตกเลือดตามซอกเกล็ด (ปณรัตน์, 2552)

3.2 โรคติดเชื้อแบคทีเรีย

โรคติดเชื้อแบคทีเรียสามารถก่อให้เกิดความสูญเสียเป็นอย่างมากต่อการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำ เนื่องจากมีความรุนแรงและก่อให้เกิดอัตราการตายสูง แบคทีเรียที่เป็นสาเหตุของการเกิดโรคส่วนใหญ่มักเป็นเชื้อที่ดำรงชีวิตในน้ำและใช้แร่ธาตุต่างๆ ที่อยู่ในน้ำเป็นแหล่งอาหาร พบว่าแบคทีเรียที่อาศัยอยู่ในแหล่งน้ำทั่วไป (Normal flora) อาจกลายเป็นเชื้อโรค (Opportunistic pathogens) ที่สามารถทำให้ปลาเกิดโรคได้ เมื่อสภาพแวดล้อมไม่เหมาะสมและปลาเกิดความเครียด หรือการที่ปลาติดเชื้อชนิดอื่นๆ อยู่แล้ว แบคทีเรียที่เป็นสาเหตุของการเกิดโรคในปลา ปัจจุบันพบประมาณ 92 กลุ่ม (Genus) ส่วนใหญ่เป็นแบคทีเรียแกรมลบที่มีรูปร่าง

แบบแท่งสั้น (Short rod) อยู่ในวงศ์ Enterobacteriaceae, Pseudomonadaceae, Vibrionaceae และ Flavobacteriaceae

3.3 โรคติดเชื้อเชื้อรา

โรคปลาที่เกิดจากเชื้อราที่มีรายงานในการสร้างความเสียหายให้กับการเพาะเลี้ยงปลาน้ำจืดชนิดต่างๆ โดยส่วนใหญ่เป็นเชื้อราที่ที่อยู่ในไฟลัม Oomycota ชั้น Oomycetes ลำดับ Saprolegniales วงศ์ Saprolegniaceae หรือที่เรียกว่า ราน้ำ (Water mould) ที่มีรายงาน คือ สกุล *Achlya*, *Aphanomyces*, *Saprolegnia*, *Dictyuchus*, *Leptolegnia*, *Allomyces*, *Isoachlya*, *Leptomitus*, *Pythium*, *Calyptralegnia*, *Pythiopsis* และ *Thraustotheca* นอกจากเชื้อราในลำดับ Saprolegniales แล้วยังพบเชื้อราในลำดับ Pythiales ซึ่งเป็น Saprophyte ร่วมอยู่ด้วย ราสกุลสำคัญที่พบบ่อยและก่อให้เกิดโรคต่อการเพาะเลี้ยงปลาหรือปลาที่อาศัยตามแหล่งน้ำธรรมชาติและปลาสวยงาม คือ สกุล *Aphanomyces, Saprolegnia, Branchiomyces, Ichthyophonus* และ *Achlya* หรือเชื้อราชั้นสูงอื่นๆ (Imperfect fungi) เช่น *Ochroconis, Exophiala, Phoma* และ *Fusarium* เป็นต้น เชื้อราเหล่านี้พบแพร่กระจายอยู่ทั่วไปทั้งน้ำจืดและน้ำกร่อย

3.4 โรคติดเชื้อไวรัส

การศึกษาโรคที่เกิดจากไวรัสแตกต่างจากโรคที่เกิดจากแบคทีเรีย และเชื้อรา เนื่องจากคุณสมบัติบางอย่างรวมทั้งขนาดของไวรัส ซึ่งมีขนาดเล็กมากจนไม่สามารถมองเห็นได้ด้วยกล้องจุลทรรศน์ธรรมดา ทำให้การวินิจฉัยโรคที่เกิดจากไวรัสนั้น ค่อนข้างจะยุ่งยากกว่าการวินิจฉัยโรคที่เกิดจากเชื้ออื่นๆ เนื่องจากมองไม่เห็นด้วยกล้องจุลทรรศน์ และวัสดุอุปกรณ์ที่ใช้ในการศึกษาไวรัสนั้นมีราคาแพง และต้องการผู้เชี่ยวชาญเฉพาะทางในการตรวจสอบและวินิจฉัย เช่น การเลี้ยงไวรัสต้องเลี้ยงในเซลล์สังเคราะห์ (Cell line) เนื่องจากในการเพิ่มจำนวน (Replication) ของไวรัสนั้น ไม่สามารถทำได้บนอาหารเลี้ยงเชื้อธรรมดา แต่จะต้องอาศัยการสังเคราะห์จากเซลล์ของเจ้าบ้าน (host) ที่มีชีวิต ซึ่งไวรัสจะเป็น Obligate parasite สารพันธุกรรมจะทำหน้าที่ผลิตไวรัสตัวใหม่ขึ้นมา อนุภาคของไวรัส (Virus particle) จะไม่มีการเจริญเติบโตในด้านขนาด และไม่มีการเพิ่มจำนวนแบบ Binary fission

2.2 เชื้อราที่ทำให้เกิดโรคในปลา

ราเป็นพวก Heterotroph (จุลินทรีย์ที่ได้พลังงานจากการออกซิเดชันของอินทรียสาร) จำแนกออกเป็น 2 พวกใหญ่คือ

1. Saprophyte อาศัยอยู่บนสิ่งที่เน่าหรือตาย

2. Parasite เป็นปรสิตซึ่งอาศัยอยู่บนหรือในร่างกายของสิ่งมีชีวิตอื่น (Host) แต่ละเซลล์ของรามีนิวเคลียสอยู่หนึ่งนิวเคลียส ผนังเซลล์มีสารจำพวกเซลลูโลส (Cellulose) ไคติน (Chitin) ซึ่งยอมให้

สารอาหารผ่านได้ โดยราจะปล่อยเอ็นไซม์สำหรับย่อยสารประกอบอินทรีย์ ให้มีขนาดเล็กลงจนสามารถผ่านผนังเซลล์ได้

โครงสร้างของราแต่ละชนิดจะแตกต่างกัน ราบางชนิดประกอบด้วยเซลล์เดี่ยวๆ เช่น ยีสต์ (Yeast) บางชนิดประกอบด้วยเซลล์หลายเซลล์ต่อกันเป็นสายยาวเรียก Hypha (พหูพจน์ คือ Hyphae) แต่ละ Hypha สามารถแตกแขนงได้ และอยู่รวมกันเป็นกลุ่มเรียกว่า ไมซีเลียม (Mycelium) ในแต่ละ Hypha อาจเป็น Septate hypha (มีผนังแบ่งกั้น) หรือ Non-septate hypha (ไม่มีผนังแบ่งกั้น) การสืบพันธุ์ของรามีทั้งแบบอาศัยเพศ และไม่อาศัยเพศ โดยทั้ง 2 แบบมีการสร้างสปอร์ เรียกว่า (Zoospore ในบางระยะ (Stage) ของวงจรชีวิต (Life cycle) สปอร์เป็นหน่วยแรกที่มีการถ่ายทอดได้ สปอร์ถูกปล่อยออกมาจากโครงสร้างที่ทำหน้าที่สร้างเซลล์สืบพันธุ์ และเกิดการติดต่อได้ถ้าเป็นเชื้อราที่เป็นปรสิต หรือปรสิตที่สามารถเป็นอิสระโดยไม่มีโฮสท์ (Facultative parasite) สปอร์ของราทนทานต่อความร้อน ความแห้งแล้ง ยาฆ่าเชื้อ และการต่อต้านจากโฮสท์ มีราหลายชนิดที่สามารถงอกขึ้นมาใหม่จากชิ้นส่วนของไมซีเลียม (Mycelium) ภายใต้สภาวะแวดล้อมที่เหมาะสม เช่น บริเวณพื้นผิวหรือภายในตัวโฮสท์

ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเชื้อรา

เชื้อรามีรูปร่างได้หลายแบบมีทั้งเป็น

1. แบบเซลล์เดียว (Unicellular) คือ พวกยีสต์ สืบพันธุ์โดยการ แตกหน่อ (Budding)

2. หลายเซลล์ (Multicellular) คือ พวกรา รูปร่างเป็น Filamentous มีทั้งแบบเส้นใย หรือไม่มีผนังกั้น ราบางชนิดมีรูปร่างได้ 2 แบบ เรียกว่า Dimorphic fungi ถ้าเจริญเติบโต ตามพื้นดินมีรูปร่างเป็นแบบ Filamentous fungi แต่ถ้าไปเจริญเป็นปาราสิตของคนหรือสัตว์ จะเปลี่ยนรูปร่างเป็นแบบยีสต์ เช่น เชื้อที่ทำให้เกิดกลาก เกลื้อน เชื้อโรคผิวหนังหลายชนิด

โรคปลาที่เกิดจากเชื้อราที่มีรายงานในการสร้างความเสียหายให้กับการเพาะเลี้ยงปลาน้ำจืดชนิดต่างๆ โดยส่วนใหญ่เป็นเชื้อราที่ที่อยู่ในไฟลัม Oomycota ชั้น Oomucetes ลำดับ Saprolegniales วงศ์ Saprolegniaceae หรือที่เรียกว่า ราน้ำ (Water moulds) ที่มีรายงาน คือ สกุล *Achlya*, *Aphanomyces*, *Saprolegnia* (Neish and Hughes, 1980; Egusa, 1992; Roberts, 2001) *Dictyuchus*, *Leptolegnia*, *Allomyces*, *Isoachlya*, *Leptomitus*, *Pythium*, *Calyptralegnia*, *Pythiopsis* และ *Thraustotheca* (Neish and Hughes, 1980) นอกจากเชื้อราในลำดับ Saprolegniales แล้วยังพบเชื้อราในลำดับ Pythiales ซึ่งเป็น Saprophyte ร่วมอยู่ด้วย ราสกุลสำคัญที่พบบ่อยและก่อให้เกิดโรคต่อการเพาะเลี้ยงปลาหรือปลาที่อาศัยตามแหล่งน้ำธรรมชาติ (Neish and Hughes, 1980; Egusa, 1992;) และปลาสวยงาม (Vorderwinkler *et al.*, 1962) คือ สกุล *Aphanomyces, Saprolegnia* และ *Achlya* เชื้อราเหล่านี้พบแพร่กระจายอยู่ทั่วไปในโลกทั้งน้ำจืดและน้ำกร่อย (Egusa, 1992; Noga, 1993)

โรคที่เกิดจากเชื้อรามักจะมีการระบาดมากในช่วงที่มีอุณหภูมิน้ำลดต่ำลง และทำให้เกิดความเสียหายแก่ปลาทุกระยะการเจริญเติบโต ตั้งแต่ระยะที่เป็นไข่ไปจนถึงพ่อแม่พันธุ์ (Hatai and Willoughby, 1988; Mayer, 1991; Hussein *et al.*, 2000) ซึ่ง Bromage *et al.* (1992) ได้ทำการศึกษาและพบว่า การที่แม่พันธุ์เกิดการติดเชื้อรานั้น จะมีผลกระทบต่อความดกและคุณภาพของไข่ปลา สำหรับไข่ที่รอการฟักเป็นตัวนั้น ไข่ที่ไม่ได้รับการผสมหรือไข่เสียนั้นจะเป็นแหล่งที่ทำให้เกิดการระบาดของเชื้อราได้อย่างรวดเร็ว ซึ่งทำให้อัตราการฟักต่ำและไข่อาจเสียได้ทั้งชุด ลักษณะของปลาหรือไข่ปลาที่เป็นโรคติดเชื้อรา มักจะพบเส้นใยของเชื้อราลักษณะคล้ายปุยฝ้ายสีขาวปนเทา เจริญอยู่บนผิวหนัง ครีบ เหงือก หรือบนไข่ปลา บางครั้งอาจพบเชื้อราเจริญลงไปในชั้นกล้ามเนื้อใต้ผิวหนัง แล้วก่อให้เกิดแผลหรือแผลหลุมลึก (Vorderwinkler *et al.*, 1962; Goven-Dixon, 1993; Hawe *et al.*, 1998; Roberts, 2001) ซึ่งจะก่อให้เกิดโรคที่เรียกว่า saprolegniasis, achlyoisis, leptolegniasis (Vorderwinkler *et al.*, 1962; Goven-Dixon, 1993; Neish and Hughes, 1980) หรือโรคแผลหลุมลึกที่แพร่กระจายไปหลายพื้นที่ทั่วโลก และมีชื่อเรียกแตกต่างกันไป เช่น Epizootic Ulcerative Syndrome (EUS) ใช้เรียกในประเทศในแถบเอเชียและตะวันออกกลาง, Mycotic Granulomatosis (MG) ใช้เรียกในประเทศญี่ปุ่น, Red Spot Disease (RSD) ใช้เรียกในประเทศออสเตรเลีย และ Ulcerative Mycosis (UM) ใช้เรียกในประเทศสหรัฐอเมริกา ซึ่งมีโรคเหล่านี้มีสาเหตุมาจากเชื้อรา *Aphanomyces invadans* หรือ *A. piscicida* (Callinan *et al.*, 1989; Noga, 1993; Chinabut *et al.*, 1995; Mohan and Shanker, 1995; Wada *et al.*, 1996; Blazer *et al.*, 2002)

ปัจจัยที่เป็นสาเหตุในการเกิดโรคติดเชื้อราในวงศ์ Saprolegniaceae ได้แก่ ระดับน้ำที่เลี้ยงปลาน้อยเกินไป เลี้ยงในความหนาแน่นสูงเกินไป ความบอบช้ำจากการขนส่งลำเลียง คุณภาพน้ำไม่เหมาะสม การเปลี่ยนแปลงของอุณหภูมิอย่างรวดเร็ว การรบกวนจากปรสิต โดยเฉพาะปลาที่อยู่ในฤดูกาลวางไข่ และในแหล่งน้ำมีสปอร์ของเชื้อราอยู่ (Willoughby, 1978; Neish and Hughes, 1980) โรคเชื้อราที่สำคัญได้แก่

1. โรค Saprolegniasis

Saprolegniasis เป็นโรคที่เกิดจากเชื้อราในสกุล *Saprolegnia* โดยเฉพาะอย่างยิ่ง *Saprolegnia parasitica* (Hatai, 1992) *S. diclina* และ *S. ferax* โรคนี้พบการระบาดมากในปลากลุ่ม Salmonids และปลา Brown trout (*Salmo trutta* L.) เป็นส่วนใหญ่ โดยเชื้อราในสกุลดังกล่าวจัดเป็น Primary pathogens ในการเข้าทำอันตรายต่อตัวปลา และสามารถก่อโรคในระบบสืบพันธุ์ได้ เมื่อปลาพ่อแม่พันธุ์ติดเชื้อจะถ่ายทอดไปสู่ลูกได้

โรค Saprolegniasis ก่อให้เกิดความเสียหายต่อปลา Brook trout (*Oncorhynchus rhodurus*) และปลา Rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) ในระยะตัวอ่อนและไข่ ในประเทศญี่ปุ่นพบการระบาดของโรคนี้อย่างมาก ในระหว่างปี ค.ศ. 1979-1988 และเชื้อราในสกุล *Saprolegnia* ยังคงก่อให้เกิดความเสียหายใน

ระบบโรงเพาะฟักเรื่อยมา เชื้อราอาจทำให้ไข่ที่อยู่ระหว่างการฟักกลายเป็นไข่เสียได้ถึง 100% ถึงแม้ว่าในระยะแรกจะมีไข่เสียเพียงบางส่วนที่ติดเชื้อรา อย่างไรก็ตาม สามารถพบเชื้อชนิดนี้ทั่วไปในแหล่งน้ำและตัวปลา ทั้งที่เป็นสาเหตุหลักในการก่อโรค (Primary infection) และที่เป็นสาเหตุรองในการก่อโรค (Secondary infection)

2. โรค Epizootic ulcerative syndromez (EUS)

สำหรับสาเหตุของ EUS ในระยะแรกๆ นั้นไม่เป็นที่แน่ชัด มีการตรวจพบว่ามีเชื้อราหลายสกุล เช่น *Aphanomyces, Achlya* sp. และ *Saprolegnia* sp. โดยเฉพาะอย่างยิ่ง *Achlya klebsiana* ซึ่งจัดเป็นเชื้อราที่พบมากที่สุด ปัจจุบันเป็นที่ทราบแล้วว่า *Aphanomyces invadans* หรือ *A. piscicida* เป็นสาเหตุของโรค EUS ซึ่งมีชื่อเรียกแตกต่างกันไปในแต่ละพื้นที่ เช่น Epizootic Ulcerative Syndrome (EUS) ใช้เรียกในประเทศในแถบเอเชียและตะวันออกกลาง, Mycotic Granulomatosis (MG) ใช้เรียกในประเทศญี่ปุ่น, Red Spot Disease (RSD) ใช้เรียกในประเทศออสเตรเลีย และ ulcerative mycosis (UM) ใช้เรียกในประเทศสหรัฐอเมริกา จากการศึกษาในประเทศญี่ปุ่น นอกจากจะพบเชื้อ *Aphanomyces piscicida* ในปลา Ayu (*Plecoglossus altivelis*) ที่ป่วยเป็นโรค MG แล้ว ยังอาจพบเชื้อ *Saprolegnia* sp. เข้าทำลายอันตรายเนื้อเยื่อบริเวณผิวหนังของปลา แล้วทำให้เกิดอาการแผลหลุมลึกได้ และเมื่อทำการตรวจวินิจฉัยทางพยาธิวิทยาของเนื้อเยื่อดังกล่าวจะมีลักษณะคล้ายคลึงกัน นอกจากนี้ปลาที่เป็นโรค EUS ยังอาจตรวจพบเชื้อไวรัสชนิด Rabdovirus และปรสิตชนิดต่างๆ เป็นจำนวนมาก

2.3 การจำแนกชนิดของเชื้อราที่ก่อโรคในสัตว์น้ำ

การศึกษาชนิดของเชื้อราวงศ์ Saprolegniaceae มีเกณฑ์ในการจัดจำแนกเชื้อราโดยพิจารณาจาก (1) การสืบพันธุ์แบบไม่อาศัยเพศ ซึ่งสังเกตจากลักษณะของ Zoosporangia รูปแบบการปล่อย Zoospores รูปแบบดังกล่าวสามารถจำแนกเชื้อราในระดับสกุลของเชื้อราได้ และ (2) การสืบพันธุ์แบบอาศัยเพศ โดยพิจารณาจากการสร้างเซลล์สืบพันธุ์เพศผู้เรียก Antheridia การสร้างเซลล์สืบพันธุ์เพศเมียเรียก Oogonia รูปแบบการเกาะของ Antheridia และชนิดของ Oospores (Johnson, 1956; Seymour, 1970, Scott, 1961) ใช้ในการระบุระดับชนิดของเชื้อรา

เชื้อราสกุล *Aphanomyces, Achlya, Leptolegnia, Dictyuchus* และ *Saprolegnia* จัดอยู่ในชั้น Oomycetes อันดับ Saprolegniales วงศ์ Saprolegniaceae เป็นเชื้อราที่พบแพร่กระจายทั่วไปในดินและในแหล่งน้ำจืด ลักษณะของเชื้อราเหล่านี้มีเส้นใยยาว ซึ่งปลายของเส้นใยมีลักษณะแหลม แตกแขนงเล็กน้อย เส้นใยที่อยู่รวมกัน

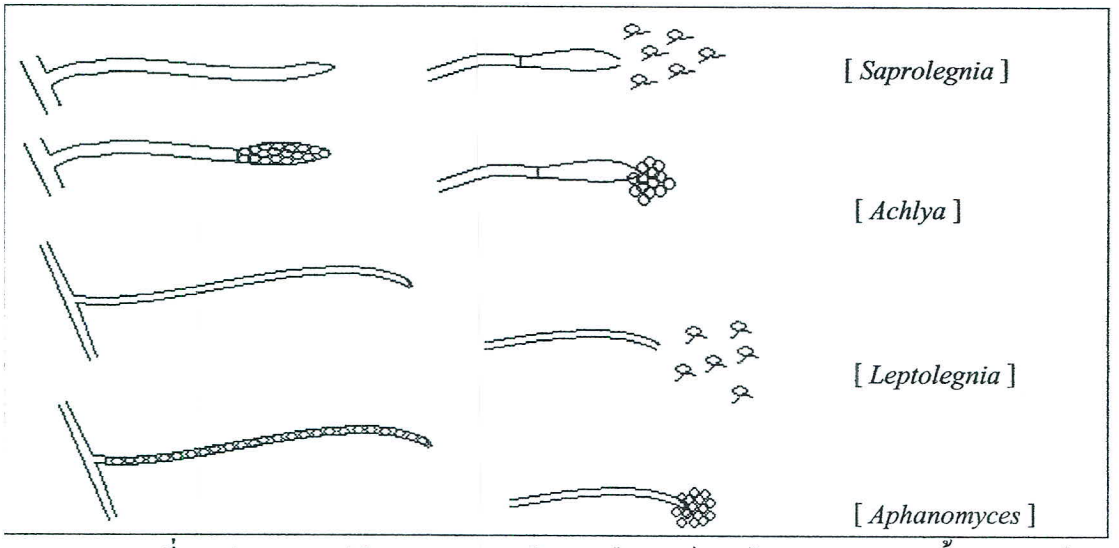
เป็นกลุ่มเรียกว่า Mycelium เส้นใยของเชื้อรากลุ่มนี้ไม่มีผนังกั้นระหว่างเซลล์ (Non-septate) วงจรชีวิตมีทั้งการสืบพันธุ์แบบไม่อาศัยเพศ และการสืบพันธุ์แบบอาศัยเพศ (Neish and Hughe, 1980; Daugherty *et al.*, 1998)

2.3.1 การสืบพันธุ์แบบไม่อาศัยเพศ

ลักษณะเซลล์สืบพันธุ์แบบไม่อาศัยเพศสามารถจำแนกชนิดในระดับสกุล (Genus) ของเชื้อราได้โดยการดูจากรูปแบบการเจริญของเชื้อราในน้ำสร้าง Zoosporangia และรูปแบบการปล่อย Zoospores ในน้ำ ซึ่งลักษณะของเชื้อราแต่ละชนิดจะแตกต่างกัน เช่น เชื้อราสกุล *Soprolegnia* และ *Loptolegnia* จะปล่อย Zoospores ออกจาก Zoosporangium โดยตรง แต่เชื้อราสกุล *Achlya* และ *Aphanomyces* นั้น Zoospores จะพักตัวโดยการสร้าง Cluster และเกาะเป็นกลุ่มอยู่ที่ช่องเปิด (Exit pore) ของ Zoosporangium ก่อนที่จะว่ายน้ำออกไป เป็นปรสิตของปลา หรือพัฒนาเป็นเส้นใย ดังภาพที่ 1

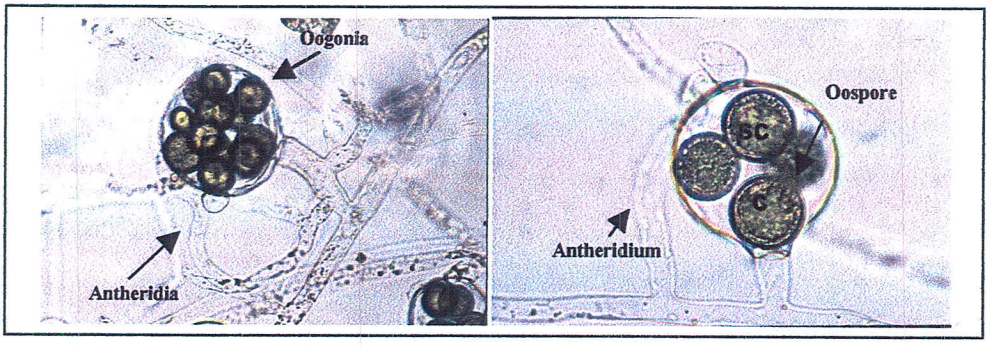
2.3.2 การสืบพันธุ์แบบอาศัยเพศ

การจำแนกเชื้อราในระดับชนิด (Species) จะพิจารณาจากลักษณะของการสร้างเซลล์สืบพันธุ์เพศผู้ (Antheridia) การสร้างเซลล์สืบพันธุ์เพศเมีย (Oogonia) รูปแบบการเกาะ Oogonia ของ Antheridia และชนิดของ Oospores สามารถทำได้โดยการส่องดูรูปร่างของเชื้อราในขณะที่สร้างเซลล์สืบพันธุ์แบบอาศัยเพศด้วยกล้องจุลทรรศน์ ตั้งแต่ระยะเริ่มต้น (Immature) จนถึงระยะเจริญพันธุ์ (Mature) ที่มีการเจริญของเซลล์สืบพันธุ์ทั้ง Oogonia และ Oospores (ภาพที่ 2) โดยศึกษารูปแบบต่างๆ ของการสืบพันธุ์แบบอาศัยเพศ ซึ่งมีอยู่หลายรูปแบบ ตามวิธีของ Willoughby (1994), Seymour (1970), Scott (1961) และ Johnson (1956) จากนั้นทำการวัดขนาด และนับจำนวน Oogonia และ Antheridia ที่พบ



ภาพที่ 1 รูปแบบการปล่อย Zoospores ในการสืบพันธุ์แบบไม่อาศัยเพศของเชื้อราในวงศ์ Saprolegniaceae 4 สกุล (ปณรัตน์, 2552)

นอกจากนี้ลักษณะการพัฒนาเป็นเส้นใยของเชื้อราน้ำในระยะ Secondary zoospores แบบ Indirect germination ยังนำมาใช้ประกอบการจำแนกเชื้อรา (Willoughby, 1985) รวมถึงปัจจัยทางชีววิทยาบางประการ เช่น ผลของอุณหภูมิ ความเป็นกรด-ด่าง และความเค็มของอาหารเลี้ยงเชื้อต่อคุณสมบัติการเจริญเติบโต ยังสามารถนำมาใช้จำแนกชนิดของเชื้อราได้ (Kitancharoen *et al.*, 1996)



ภาพที่ 2 ลักษณะการสืบพันธุ์แบบอาศัยเพศของเชื้อราในวงศ์ Saprolegniaceae ประกอบด้วย เซลล์สืบพันธุ์เพศผู้ (Antheridia) เซลล์สืบพันธุ์เพศเมีย (Oogonia) และไข่ของเชื้อรา (Oospores) (ปณรัตน์, 2552)

ในปัจจุบันได้มีการนำเอาเทคนิคทางอณูชีววิทยา เช่น เทคนิค PCR มาใช้ในการตรวจสอบ วินิจฉัย และการจำแนกชนิดของโรคที่เกิดจากเชื้อรา ทั้งเชื้อราที่ก่อให้เกิดโรคในมนุษย์ สัตว์ พืช และสัตว์น้ำ (Glass and Donaldson, 1995; Einsele *et al.*, 1997; Bretagne *et al.*, 1998; Bakan *et al.*, 2002, Weiland, 2000, Phadee *et al.*, 2004) การนำเทคนิคทางอณูชีววิทยามาใช้ในการตรวจ วินิจฉัย หรือจำแนกชนิดของเชื้อโรคมีความสำคัญอย่างยิ่ง เนื่องจากวิธีการนี้ใช้เวลาน้อยและมีความแม่นยำสูง จึงทำให้การวินิจฉัยโรคสามารถทำได้รวดเร็วและแม่นยำ และสามารถรักษาได้ถูกต้องทันเวลา (Bretagne *et al.*, 1998; Bakan *et al.*, 2002) นอกจากนี้ยังมีการนำเทคนิค Gel electrophoresis (Callinan *et al.*, 1995), Pyrolysis mass spectrophotometry (Lilley *et al.*, 2001), Random amplification of polymorphic DNA (RAPD) (Lilley *et al.*, 2003) อีกทั้งการศึกษาลำดับของ DNA เช่น Internal Transcribed Spacer (ITS) genes ซึ่งประกอบด้วย ITS1 และ ITS 2 ซึ่งอยู่ระหว่างยีนชนิด 18S, 5.8S และ 28S Ribosomal DNA (Baldwin, 1992) กันอย่างแพร่หลาย เนื่องจากยีนชนิดนี้เป็นยีนที่บ่งบอกถึงความแตกต่างระหว่างชนิด (Species) ของสิ่งมีชีวิตได้เป็นอย่างดี (Shinohara *et al.*, 1999; Leclerc *et al.*, 2000)

2.4 การป้องกันและรักษาโรคที่เกิดจากเชื้อราในปลา

การศึกษาโรคปลาที่เกิดจากเชื้อรานั้นมีการศึกษากันมากในต่างประเทศเท่านั้น โดยส่วนใหญ่จะเป็นปลาน้ำเย็น (Coldwater fish) เช่นปลาในกลุ่ม Salmonids อย่างไรก็ตามในประเทศไทยยังมีรายงานเรื่องนี้ไม่มากนัก (Lawhavinit *et al.*, 2002) อีกทั้งการศึกษาปัจจัยอื่นๆ ที่เกี่ยวข้อง ต่อการเกิดโรคในสัตว์น้ำ กลไกของการเกิดโรค การป้องกันและรักษาโรคที่เกิดจากเชื้อราก็ยังไม่พัฒนามากนัก เป็นที่ทราบกันดีว่าโรคที่เกิดจากเชื้อรานั้นก่อให้เกิดความเสียหายต่อธุรกิจการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำเป็นอย่างมาก เนื่องจากเชื้อราสามารถก่อโรคในปลาได้ทุกระยะ จึงทำให้มีการศึกษาถึงวิธีการป้องกันและรักษาโดยใช้สารเคมีกันอย่างแพร่หลาย (Willoughby and Roberts, 1994) ซึ่งสารเคมีที่ใช้ได้ผลดีที่สุดคือ มาลาไคท์กรีน อย่างไรก็ตามเป็นที่ทราบกันดีว่า มาลาไคท์กรีนนั้น สามารถก่อให้เกิดมะเร็ง การกลายพันธุ์ (Meyer and Jorgenson, 1983; Clemmensen *et al.*, 1984; Fernandes *et al.*, 1991) กดระบบภูมิคุ้มกัน (Prost and Sopinska, 1989) และตกค้างในเนื้อเยื่อปลาได้ (Meinertz *et al.*, 1995) ในขณะนี้บางประเทศได้ห้ามนำมาลาไคท์กรีนมาใช้ในการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำ อย่างไรก็ตามได้มีการศึกษาการนำสารชนิดอื่นที่มีความปลอดภัยมากกว่ามาใช้ในการป้องกันและรักษาโรคที่เกิดจากเชื้อรา อาทิ ฟอร์มาลิน ด่างทับทิม ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ และโพวิโดนไอโอดีน เป็นต้น

2.5 งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

นิลุบล และคณะ (2543) ได้ทำการศึกษาชนิดของเชื้อราในไข่ปลาน้ำจืดเศรษฐกิจในเขตภาคตะวันออกเฉียงเหนือ พบว่า เชื้อราในชั้น Oomycestes ที่พบมากที่สุดได้แก่ *Achlya* spp. รองลงมาคือ สกุล *Saprolegnia* spp. และสกุล *Aphanomyces* spp. ตามลำดับ และพบเชื้อราในลำดับ *Pyhiales* สกุล *Pyhium* ปะปนอยู่บ้าง สันนิษฐานว่าจะเป็น saprophyte ที่เข้ามาอาศัยเท่านั้น จากผลการศึกษาแสดงว่าชนิดของเชื้อราที่แยกได้มีแนวโน้มว่าจะมีความสัมพันธ์กับแหล่งที่ทำการศึกษา โดยไม่มีความสัมพันธ์กับชนิดของปลาแต่ประการใด ซึ่งสอดคล้องกับการทดลองของ Kitancharoen *et al.* (1996) ที่ได้ทำการสำรวจเชื้อราที่พบบนไข่ปลากลุ่ม Salmonids อย่างไรก็ตามปัญหาที่มักพบในการจัดจำแนกคือ การที่เชื้อราที่แยกได้มักไม่สร้างการสืบพันธุ์แบบอาศัยเพศเมื่อนำมาศึกษาในห้องปฏิบัติการทำให้ผลการศึกษาในบางส่วนยังไม่ชัดเจน จากการศึกษาคุณสมบัติของราน้ำเหล่านี้พบว่าสามารถเจริญได้ที่อุณหภูมิตั้งแต่ 5-30°C แต่ไม่เจริญที่อุณหภูมิ 35°C โดยที่อุณหภูมิที่ เหมาะสมต่อการเจริญอยู่ในช่วง 20-30°C ในการสร้างสปอร์ของเชื้อราที่แยกได้ จะพบว่ามีการสร้างสปอร์ที่อุณหภูมิ 10-20°C ที่อุณหภูมิ 30°C จะมีจำนวนสปอร์น้อยมาก โรคที่เกิดจากเชื้อรามักจะมีการระบาดมากในช่วงที่มีอุณหภูมิน้ำลดต่ำลง และทำให้เกิดความเสียหายแก่ปลาทุกระยะการเจริญเติบโต ตั้งแต่ระยะที่เป็นไข่ไปจนถึงพ่อแม่พันธุ์

Chukanhom (2004) ได้ทำการศึกษาชนิดของเชื้อราที่ทำให้เกิดโรคในปลาสวยงามในประเทศแถบเอเชีย ได้แก่ สิงคโปร์ ไทย อินโดนีเซีย และญี่ปุ่นจากปลา 23 ชนิด พบเชื้อรา 116 สายพันธุ์ ใน 4 สกุล ได้แก่ *Achlya,*

Aphanomyces, *Saprolegnia* and *Leptolegnia* จากลักษณะการสืบพันธุ์แบบไม่อาศัยเพศ โดยจำแนกเป็น *Achlya bisexualis* 10 ตัวอย่าง, *Achlya ambisexualis* 6 ตัวอย่าง, *Achlya diffusea* 3 ตัวอย่าง, *Achlya dubia* 4 ตัวอย่าง, *Achlya rodiqueziana* 1 ตัวอย่าง, *Achlya* spp. 50 ตัวอย่าง, *Saprolegnia diclina* 4 ตัวอย่าง, *Saprolegnia* spp. 12 ตัวอย่าง, *Aphanomyces piscicida* 21 ตัวอย่าง, *Aphanomyces* spp. 4 ตัวอย่าง, และ *Leptolegnia* 1 ตัวอย่าง โดยจะพบ *Achlya* มากที่สุด จากการศึกษาลักษณะทางชีววิทยาพบว่าเชื้อรา *Achlya* spp., *Saprolegnia* spp., *Aphanomyces* spp., *Aphanomyces piscicida* และ *Leptolegnia* spp. สามารถเจริญได้ดีที่อุณหภูมิ 30 - 35°C และ pH 6–8, 20-25°C และ pH 6–8, 30-35°C และ pH 7–8, 25°C และ pH 8, และที่ 25-30°C และ pH 6–8 ตามลำดับ และยังพบว่า *Achlya bisexualis* จะก่อให้เกิดโรคได้ก็ต่อเมื่อมีการติดเชื้อปรสิต *Tetrahymena*

ธีราภรณ์ (2544) ได้ทำการทดลองเชื้อราที่ทำให้เกิดโรคในปลาน้ำจืด : ราน้ำ ที่ก่อให้เกิผลกระทบต่อการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำจืดและสัตว์ทะเลส่วนใหญ่เป็นเชื้อราที่จัดอยู่ในชั้น Oomycetes โดยเฉพาะอย่างยิ่งเชื้อราในลำดับ *Saprolegniales, Pyhiales, Peronosporales* และ *Leptomitales* การระบาดพบได้ทั่วโลกทั้งในประเทศในเขตร้อนและประเทศในเขตหนาว เชื้อราในชั้นนี้จะก่อให้เกิดโรคที่มีความสำคัญและเป็นที่รู้จักกันดี เช่น โรค saprolegniasis, epizootic ulcerative syndrome (USE), branchiomycosis และโรค Ichthyophoniasis เป็นต้น โดยมีสาเหตุมาจากเชื้อราในสกุล *Saprolegnia, Aphanomyces, Branchomyces* และ *Ichthyophonus* ตามลำดับ ที่ทำให้เกิดอาการที่แตกต่างกันไปตามชนิดของเชื้อรา การตรวจวินิจฉัยทำได้โดยอาศัยเทคนิคทางด้านเนื้อเยื่อวิทยา และคุณสมบัติทางกายภาพและชีวเคมีของเชื้อแต่ละชนิด

Ankri and Mirelman (1999) รายงานว่า ระดับความเข้มข้นของอัลลิซินที่สามารถฆ่าเชื้อแบคทีเรีย 50 % (LD_{50}) มีค่าระหว่าง 3-100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร และความเข้มข้นต่ำสุดที่จะยับยั้ง (Minimum Inhibitory Concentration, MIC) การเจริญของยีสต์อยู่ระหว่าง 0.15-1.9 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร สำหรับเชื้อรา 1.57-6.25 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร และสำหรับโปรโตซัว *Entamoeba histolytica* เฉลี่ยอยู่ที่ 30 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ส่วน MIC ของอะโจอีนมีค่าอยู่ระหว่าง 5-20ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร สำหรับแบคทีเรียแกรมบวก 100-160 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร สำหรับแบคทีเรียแกรมลบ และต่ำกว่า 20 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร สำหรับยีสต์ และตั้งข้อสังเกตว่า ระดับความเข้มข้นของอะโรจีนที่จะสามารถฆ่าเชื้อจุลินทรีย์ (Minimum Bactericidal Concentration, MBC) อยู่ที่ระดับ 10 เท่า ของ MIC โดยจะผันแปรไปตามชนิดของจุลินทรีย์