โรคติดเชื้อโปรโตซัวกลุ่ม hexamitid flagellates ในปลาสวยงาม

Hexamitid Flagellates Infection in Ornamental Fish

สุชัญญา มรรคาเขต

Suchanya Mankhakhet

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต

สาขาวิชาวาริชศาสตร์

มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์

A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements for the Degree of

Master of Science in Aquatic Science

Prince of Songkla University

2554

ลิขสิทธิ์ของมหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์

ชื่อวิทยานิพนธ์ โรคติดเชื้อโปรโตซัวกลุ่ม hexamitid flagellates ในปลาสวยงาม

ผู้เขียน สุชัญญา มรรคาเขต

สาขาวิชา วาริชศาสตร์

อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก **คณะกรรมการสอบ**

....ประธานกรรมการ

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. ชุติมา ตันติกิตติ) (ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. สถาพร ดิเรกบุษราคม)

.....กรรมการ

อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม (ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. ชุติมา ตันติกิตติ)

....กรรมการ

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. ธีรวุฒิ เลิศสุทธิชวาล) (ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. ธีรวุฒิ เลิศสุทธิชวาล)

....กรรมการ

(ดร. สุภฎา คีรีรัฐนิคม) (ดร. นเรศ ซ่วนยุก)

บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ อนุมัติให้นับวิทยานิพนธ์ฉบับนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษา ตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวาริชศาสตร์

.....

(ศาสตราจารย์ ดร. อมรรัตน์ พงศ์ดารา)

คณบดีบัณฑิตวิทยาลัย

ชื่อวิทยานิพนธ์ โรคติดเชื้อโปรโตซัวกลุ่ม hexamitid flagellates ในปลาสวยงาม

ผู้เขียน นางสาวสุชัญญา มรรคาเขต

สาขาวิชา วาริชศาสตร์

ปีการศึกษา 2553

บทคัดย่อ

โรคสไปโรนิวคลีโอซีสเป็นโรคที่สร้างปัญหาอย่างมากต่อการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำทั่วโลก การศึกษาโรคชนิดนี้ในปลาสวยงาม 4 ชนิด ได้แก่ ปลาเทวดา (*Pterophyllum scalare*) ปลาออสการ์ (*Astronotus ocellatus*) ปลาหมอสี (*Labeotropheus fuelleborni*) และปลากัด (*Betta splendens*) พบปรสิต hexamitid flagellates ในปลา 3 ชนิด คือปลาเทวดา ปลาออสการ์และปลาหมอสี โดยอัตราการติดเชื้อในปลาเทวดา คิดเป็นร้อยละ 90.0 (109/121) ปลาออสการ์ ร้อยละ 75.4 (83/110) และปลาหมอสี ร้อยละ 61.0 (61/100) โดยพบปรสิตบริเวณผิวหนัง ครีบหาง และในอวัยวะภายใน ได้แก่ ลำไส้ กระเพาะอาหาร ตับ ถุงน้ำดี หัวใจและม้าม การตรวจสอบปรสิตที่แยกได้จากปลาเทวดาพบโทรโฟซอยท์ของปรสิต *Spironucleus* sp. ที่เคลื่อนที่เร็ว มีรูปร่างยาวรีหรือรูปไข่ ความยาว 9.0-16.0 ไมโครเมตร ความกว้าง 3.0-10.0 ไมโครเมตร มีแฟลกเจลลา 8 เส้น แบ่งเป็นด้านหน้า 6 เส้น และด้านท้าย 2 เส้น การศึกษาลักษณะโครงสร้างของปรสิตด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเลคตรอนแบบส่องกราดพบว่าปรสิตมีผิวลำตัวเรียบประกอบด้วยเส้นข้างลำตัวทั้งสองด้าน ส่วนปลายสุดของเซลล์โค้ง ส่วนของแฟลกเจลลา 6 เส้นที่อยู่ด้านบนพบอยู่บริเวณกึ่งกลางค่อนไปทางด้านล่างของด้านเปิดของไซโตสโตมและแฟลกเจลลาอีก 2 เส้นที่อยู่ด้านล่างจะยื่นพ้นออกมาจากส่วนปลายสุดของด้านล่างของลำตัวโดยมีลักษณะเป็นรูปพระจันทร์เสี้ยว บริเวณปลายสุดของลำตัวมีพาพิลลัมและช่องเปิดของแฟลกเจลลาพ็อกเก็ต การศึกษาด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเลคตรอนแบบส่องผ่านพบว่าปรสิตมีนิวเคลียสเรียวยาวเป็นรูปตัวเอส มีเซลล์แวคคิวโอลขนาดใหญ่ ไคนีโตโซมอยู่ในตำแหน่งกึ่งกลางจากส่วนยอดของนิวเคลียส รีเคอเรนท์แฟลกเจลลาอยู่ในตำแหน่งระหว่างนิวเคลียสทั้ง 2 อัน และยาวไปจนถึงส่วนท้ายของลำตัว ส่วนของรีเคอเรนท์แฟลกเจลลาที่หุ้มด้วยแฟลกเจลลาพ็อกเก็ตยาวไปจนถึงส่วนท้ายของลำตัว มีซูปรานิวเคลียร์ไมโครทูบูลาและอินฟรานิวเคลียร์ไมโครทูบูลาบริเวณส่วนหัวของลำตัว จากลักษณะทั้งหมดจึงจำแนกชนิดของปรสิตเป็น *Spironucleus vortens* การศึกษาครั้งนี้ไม่สามารถจำแนก

ปรสิต *Spironucleus* sp. ที่พบในปลาหมอสีและปลาออสการ์ได้เนื่องจากไม่สามารถเลี้ยงปรสิตที่พบในปลาทั้งสองชนิดในอาหารเลี้ยงเซลล์ได้

การศึกษาการเปลี่ยนแปลงทางพยาธิสภาพของเนื้อเยื่อปลาเทวดาที่ติดปรสิต พบการเกิดกรานูโลมาในตับ เกิดเมลาโนมาโครฟาจเป็นจำนวนมากในม้าม และพบการอักเสบของลำไส้ การศึกษาสภาวะที่เหมาะสมต่อการเจริญของปรสิตในอาหารเลี้ยงเซลล์พบว่าปรสิต *S. vortens* ที่แยกจากปลาเทวดาสามารถเจริญได้ดีที่สุดที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส และความเป็นกรด-ด่าง 7.0 นอกจากนี้ปรสิตสามารถเจริญได้ที่อุณหภูมิ 20 และ 30 องศาเซลเซียส ที่ความเป็นกรด-ด่าง ตั้งแต่ 7-9 แต่ไม่สามารถเจริญได้ที่อุณหภูมิ 5 และ 10 องศาเซลเซียส ที่ทุกระดับความเป็นกรด-ด่าง และยังพบระยะซีสต์ของปรสิตในระหว่างการเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเซลล์ที่อุณหภูมิ 20 และ 25 องศาเซลเซียส การทดสอบความรุนแรงของปรสิต *S. vortens* ในปลาเทวดา พบว่าปริมาณปรสิตที่ทำให้ปลาเทวดาตาย 50 เปอร์เซ็นต์ ภายในเวลา 14 วัน มีค่าเท่ากับ $2.99x10^3$ เซลล์ การทดสอบการยอมรับปรสิต *S. vortens* ในปลาทอง (*Carassius auratus*) ปลาหางนกยูง (*Poecilia reticulata*) และปลาแพลทตี้ (*Xiphophorus macullatus*) พบว่าปลาทั้งสามชนิดไม่ยอมรับปรสิต *S. vortens* ที่แยกจากปลาเทวดา

การทดสอบประสิทธิภาพของยาในการยับยั้งการเจริญของปรสิต *S. vortens* ในหลอดทดลอง พบว่ายาไดเมทริดาโซลมีประสิทธิภาพดีที่ความเข้มข้นมากกว่าหรือเท่ากับ 4 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร หลังได้รับยานาน 48 ชั่วโมง ยาเมโทรนิดาโซลมีประสิทธิภาพดีที่ความเข้มข้นมากกว่าหรือเท่ากับ 6 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร หลังได้รับยานาน 48 ชั่วโมง และแมกนีเซียมซัลเฟตมีประสิทธิภาพดีที่ความเข้มข้นมากกว่าหรือเท่ากับ 60 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร หลังได้รับยานาน 72 ชั่วโมง การทดสอบประสิทธิภาพของยาไดเมทริดาโซลในปลาเทวดาที่ติดปรสิต *S. vortens* ตามธรรมชาติ พบว่ายาไดเมทริดาโซลความเข้มข้นมากกว่า 4 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร สามารถยับยั้งการเจริญของปรสิต *S. vortens* หลังได้รับยานาน 24 ชั่วโมง ชี้ให้เห็นว่ายาไดเมทริดาโซลเป็นยาที่มีประสิทธิภาพมากที่สุดและสามารถใช้ป้องกันโรคสไปโรนิวคลีโอซีสในปลาเทวดาได้

Thesis Title	Hexamitid Flagellates Infection in Ornamental Fish
Major Program	Aquatic Science
Academic Year	2010

ABSTRACT

Spironucleosis is an increasing problem in aquaculture worldwide. The study on spironucleosis in ornamental fishes, angelfish (*Pterophyllum scalare*), oscar (*Astronotus ocellatus*), blue mbuna (*Labeotropheus fuelleborni*) and Siamese fighting fish (*Betta splendens*) revealed *Spironucleus* sp. infection in three out of four ornamental fish species, angelfish, oscar and blue mbuna. The highest percentage infection was recorded in angelfish (109 out of 121=90.0%) followed by oscar (83 out of 110=75.4%) and blue mbuna (61 out of 100=61.0%), respectively. The infection was found in several organs of infected fish including skin, fin, intestine, liver, gall bladder, heart and spleen. Examination of *Spironucleus* sp. from angelfish showed that the parasites were typically highly motile and rotate around their longitudinal axis. Live trophozoite shape was of 9.0-16.0 µm long and 3.0-10.0 µm wide with six anterior flagella, two posterior flagella. Scanning electron microscopy of trophozoite showed smooth body surface, adorned body with compound lateral longitudinal ridges, posterior end swirled. Six anterior flagella emerged posterior-medially from the cytostome opening. Two recurrent flagella protruded from the posterior end of the body surrounded by a crescent-shaped ridge. The posterior end of the body bears two papillae and opening of flagellar pockets. Transmission electron microscopy showed the compound S-shape of nuclei. The parasites had a highly vacuolated cell with prominent recurrent flagella, kinetosomes just below the apex of the S-shape of nuclei. Lateral ridge is supported by microtubules, recurrent flagellar between two nuclei and extended to posterior end. The parasite had both supra nuclear microtubular and infra nuclear microtubular. Recurrent flagella with flagellar pockets (cytosomal canals) passing posteriorly through the cell. Identification by means of morphological studies under light and electron microscopes indicated that

the parasite was *Spironucleus vortens*. Identification of *Spironucleus* sp. from discus and oscar was not achieved due to no parasite growth on culture medium.

Histopathological changes of infected angelfish revealed granulomatous liver, numerous numbers of melanomacrophage in the spleen and inflammation of the intestine. *In vitro* study on the optimal growth conditions of *S. vortens* isolated from angelfish in culture medium showed that the maximal growth of parasite was at 25°C and pH 7. In addition, *S. vortens* could be cultured at 20°C and 30°C and pH 7 to 9 but not at 5°C and 10°C at any pH levels. Moreover, the cyst stage of parasite was recorded at 20°C and 25°C. Pathogenicity study of *S. vortens* in angel fish showed 14 days-LD_{50} of $2.99x10^3$ cells. Susceptibility study of *S. vortens* to goldfish (*Carassius auratus*), guppy (*Poecilia reticulata*) and platy (*Xiphophorus macullatus*) indicated that these experimental fish were resistant to artificial infection.

The growth inhibition assay of *S. vortens* was examined *in vitro*. The results showed that dimetridazole and metronidazole were effective in inhibiting parasite growth after 48 h exposure at concentration of 4.0 µg/ml or higher and 6.0 µg/ml or higher, respectively. Magnesium sulfate inhibited the parasite growth at concentration of 60 mg/ml or higher after 72 h exposure. For the spironucleosis of naturally infected angelfish, dimetridazole was chosen to determine its efficiency on natural infection of *S. vortens*. It was found that dimetridazole at 4.0 µg/ml provide the highest efficiency a which can be used for treatment of spironucleosis in angelfish.

กิตติกรรมประกาศ

วิทยานิพนธ์ฉบับนี้สำเร็จได้โดยได้รับความช่วยเหลือเกื้อกูลจากบุคคลหลายฝ่าย บุคคลเหล่านี้ล้วนควรแก่การกล่าวถึงด้วยความรู้สึกขอบคุณและยกย่องไว้ ณ ที่นี้

ผู้ศึกษาวิจัยขอขอบพระคุณ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. ชุติมา ตันติกิตติ ประธานกรรมการที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ รองศาสตราจารย์ ดร. กิจการ ศุภมาตย์ และ ดร. นเรศ ซ่วนยุก ที่ได้กรุณาชี้แนวทางในการวิจัย คำแนะนำปรึกษาในระหว่างดำเนินการวิจัย การค้นคว้าและการตรวจแก้ไขข้อบกพร่องในการเขียนวิทยานิพนธ์ ตลอดจนการให้ความสะดวกในทุก ๆ ด้าน ด้วยความเอาใจใส่ดูแลเป็นอย่างดี ทำให้การวิจัยสำเร็จลุล่วงไปด้วยดีตามวัตถุประสงค์ที่วางไว้

ขอขอบพระคุณ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. ธีรวุฒิ เลิศสุทธิชวาล และ ดร.สุภฎา คีรีรัฐนิคม กรรมการที่ปรึกษาร่วม ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. สถาพร ดิเรกบุษราคม ประธานกรรมการสอบวิทยานิพนธ์ ที่กรุณาให้คำปรึกษาในงานวิจัยและข้อคิดเห็นต่าง ๆ ที่มีประโยชน์ต่อการแก้ไขปรับปรุงวิทยานิพนธ์ให้สมบูรณ์ยิ่งขึ้น

ขอขอบพระคุณศูนย์วิจัยสุขภาพสัตว์น้ำ คณะทรัพยากรธรรมชาติ ที่ได้อนุเคราะห์อุปกรณ์และเครื่องมือในการวิจัย ขอขอบคุณ คุณญาติศมล วิชากรชัย และคุณฐาปนีย์ ศิริรัตน์ ที่ให้ความอนุเคราะห์ตัวอย่างปลาสวยงาม

ขอขอบคุณทุนงบประมาณแผ่นดินปี 2551 บัณฑิตวิทยาลัย และศูนย์ความเป็นเลิศด้านเทคโนโลยีชีวภาพเกษตร สำนักพัฒนาบัณฑิตศึกษาและวิจัยด้านวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี สำนักงานคณะกรรมการการอุดมศึกษา กระทรวงศึกษาธิการ (AG-BIO/PERDO-CHE) ที่สนับสนุนทุนอุดหนุนการวิจัยครั้งนี้ งานวิจัยครั้งนี้ไม่สามารถสำเร็จลงได้ หากไม่ได้รับความร่วมมือจาก คุณกิตติชนม์ อุเทนะพันธ์ คุณบุญกอบ วิริยพงศ์สุธี และคุณสุพัตรา อรุณรัตน์ ที่ช่วยเหลือในด้านการใช้เครื่องมือ คำปรึกษา และช่วยเหลือในระหว่างดำเนินการวิจัย รวมทั้งเพื่อน ๆ พี่ ๆ น้องๆ วาริชศาสตร์ทุกท่านและครอบครัวที่ให้กำลังใจเสมอมา โดยเฉพาะคุณพ่อ คุณแม่ และคุณรุ่งโรจน์ แกสมาน ที่ให้กำลังใจและกำลังทรัพย์

สุชัญญา มรรคาเขต

สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อ	(3)
กิตติกรรมประกาศ	(7)
รายการตาราง	(12)
รายการตารางผนวก	(13)
รายการภาพประกอบ	(16)
บทที่ 1 บทนำ	1
บทนำต้นเรื่อง	1
การตรวจเอกสาร	3
1. ปลาสวยงาม	3
1.1 การเลี้ยงปลาสวยงามในประเทศไทย	3
1.2 แหล่งเพาะเลี้ยงปลาสวยงามของไทย	3
2. อนุกรมวิธานของปลาสวยงามที่ศึกษา	4
2.1 ปลาออสการ์ (*Astronotus ocellatus* Cuvier)	5
2.2 ปลาเทวดา (*Pterophyllum scalare* Lichtenstein)	6
2.3 ปลาหมอสี (*Labeotropheus fuelleborni* Ahl)	7
2.4 ปลากัด (*Betta splendens* Regan)	8
3. โรคปรสิตกับการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำ	9
3.1 ลักษณะทางอนุกรมวิธาน	11
3.2 วงจรชีวิต การสืบพันธุ์และการเพาะเลี้ยงปรสิตกลุ่ม hexamitid flagellates	14
3.3 อาการของโรคสไปโรนิวคลีโอซีสในสัตว์น้ำ	15
3.4 การแพร่กระจายของโรคสไปโรนิวคลีโอซีสในสัตว์น้ำ	16
3.5 การควบคุมโรคสไปโรนิวคลีโอซีสในสัตว์น้ำ	18
วัตถุประสงค์ของการวิจัย	19
บทที่ 2 วัสดุ อุปกรณ์ และวิธีการทดลอง	20
วัสดุ	20

สารบัญ (ต่อ)

	หน้า
1. ปลาที่ศึกษา	20
2. ปลาทดลอง	20
3. สารเคมี	21
อุปกรณ์	22
1.อุปกรณ์สำหรับการเก็บปลาตัวอย่าง	22
2. อุปกรณ์สำหรับแยกเชื้อแบคทีเรีย	22
3. อุปกรณ์สำหรับการตรวจวัดคุณภาพน้ำ	22
4. อุปกรณ์สำหรับศึกษาการเปลี่ยนแปลงทางพยาธิสภาพ	23
5. อุปกรณ์สำหรับการเลี้ยงปรสิตกลุ่ม hexamitid flagellates ในหลอดทดลอง	23
6. อุปกรณ์สำหรับศึกษาโครงสร้างของปรสิตกลุ่ม hexamitid flagellates ด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเลคตรอน	24
7. อุปกรณ์สำหรับทดสอบความรุนแรง การยอมรับปรสิตในปลาสวยงาม และการควบคุมโรคสไปโรนิวคลีโอซีสโดยการใช้ยาและสารเคมี	24
วิธีการทดลอง	25
1. การเก็บตัวอย่างปลาที่ศึกษา	25
2. การตรวจสอบปรสิตกลุ่ม hexamitid flagellates	25
3. การเลี้ยงปรสิตกลุ่ม hexamitid flagellates ในหลอดทดลอง	26
4. การจำแนกชนิดปรสิตกลุ่ม hexamitid flagellates ที่แยกจากปลาเทวดา	26
4.1 การเตรียมตัวอย่างและการวินิจฉัยภายใต้กล้องจุลทรรศน์ธรรมดา	26
4.2 การเตรียมตัวอย่างและการวินิจฉัยโดยใช้เทคนิคทางจุลทรรศน์อิเลคตรอน	27
4.3 การจำแนกชนิดของปรสิต	28
5. การศึกษาการเปลี่ยนแปลงทางพยาธิสภาพ	28
6. การศึกษาสภาวะที่เหมาะสมต่อการเจริญของปรสิตกลุ่ม hexamitid flagellates ในหลอดทดลอง	29

สารบัญ (ต่อ)

	หน้า
7. การทดสอบความรุนแรงของโรคสไปโรนิวคลีโอซีสในปลาเทวดา	29
7.1 สัตว์ทดลอง	29
7.2 วิธีการทดลอง	29
8. การยอมรับปรสิตกลุ่ม hexamitid flagellates ในปลาสวยงามชนิดอื่น ๆ	30
9. การควบคุมโรคสไปโรนิวคลีโอซีสโดยการใช้ยาและสารเคมี	30
9.1 การทดลองในหลอดทดลอง	31
9.1.1 การเตรียมยาและสารเคมี	31
9.1.2 การเตรียมปรสิตกลุ่ม hexamitid flagellates	31
9.1.3 การทดสอบประสิทธิภาพของยาและสารเคมีในการยับยั้งการเจริญของปรสิตกลุ่ม hexamitid flagellates ในหลอดทดลอง	31
9.2 การทดลองในปลาเทวดา	32
บทที่ 3 ผลการทดลอง	33
3.1 โรคสไปโรนิวคลีโอซีสในปลาสวยงาม	33
3.2 การเลี้ยงปรสิตกลุ่ม hexamitid flagellates ในหลอดทดลอง	34
3.3 การจำแนกชนิดปรสิต hexamitid flagellates ในปลาเทวดา	35
1) การตรวจวินิจฉัยภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบธรรมดา	35
2) การตรวจวินิจฉัยโดยใช้เทคนิคทางจุลทรรศน์อิเลคตรอน	35
3.4 การเปลี่ยนแปลงทางพยาธิสภาพ	39
3.5 การศึกษาสภาวะที่เหมาะสมต่อการเจริญของปรสิต *S. vortens* ในหลอดทดลอง	41
3.6 การทดสอบความรุนแรงของโรคสไปโรนิวคลีโอซีสในปลาเทวดา	44
3.7 การทดสอบการยอมรับปรสิต *S. vortens* ในปลาสวยงามชนิดอื่น	45
3.8 การทดสอบประสิทธิภาพของยาและสารเคมีในการยับยั้งการเจริญของปรสิต *S. vortens*	47
1) การทดลองในหลอดทดลอง	47

สารบัญ (ต่อ)

	หน้า
2) การทดลองในปลาเทวดา	49
บทที่ 4 วิจารณ์ผลการทดลอง	50
4.1 โรคสไปโรนิวคลีโอซีสในปลาสวยงาม	50
4.2 การเปลี่ยนแปลงทางพยาธิสภาพ	54
4.3 การศึกษาสภาวะที่เหมาะสมต่อการเจริญของปรสิต *S. vortens* ในอาหารเลี้ยงเซลล์	56
4.4 การทดสอบความรุนแรงของโรคสไปโรนิวคลีโอซีสในปลาเทวดา	59
4.5 การควบคุมโรคสไปโรนิวคลีโอซีสโดยการใช้ยาและสารเคมี	62
บทที่ 5 สรุปผลการทดลองและข้อเสนอแนะ	65
เอกสารอ้างอิง	67
ภาคผนวก	76
ภาคผนวก ก	77
ภาคผนวก ข	87
ประวัติผู้เขียน	127

รายการตาราง

ตารางที่		หน้า
1	ลักษณะที่ใช้ในการจำแนกสกุลของปรสิตกลุ่ม hexamitid flagellates	14
2	การแพร่กระจายของปรสิตสกุล *Spironucleus* sp. ในปลาชนิดต่าง ๆ	17
3	อัตราการติดเชื้อปรสิตกลุ่ม hexamitid flagellates ในปลาสวยงามที่ศึกษา	34
4	การทดสอบการยอมรับปรสิต *S. vortens* และผลการตรวจสอบปรสิตหลังการฉีดเชื้อเป็นเวลา 10 วัน ในปลาสวยงามชนิดอื่น ๆ	46

รายการตารางภาคผนวก

ตารางผนวกที่		หน้า
ข 1	คุณภาพน้ำระหว่างการตรวจสอบปรสิตกลุ่ม hexamitid flagellates ในปลาสวยงามที่ศึกษา	87
ข 2	น้ำหนักและความยาวลำตัวของปลาสวยงามที่ศึกษาและอวัยวะที่ตรวจพบปรสิตกลุ่ม hexamitid flagellates	88
ข 3	ขนาดและความยาวลำตัวของปรสิต *S. vortens* ที่แยกจากปลาเทวดา	108
ข 4	จำนวนเฉลี่ย±ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานของปรสิต *S. vortens* ในอาหารเลี้ยงเซลล์ที่อุณหภูมิ 5 องศาเซลเซียส และที่ระดับ ความเป็นกรด–ด่าง ตั้งแต่ 5-10	111
ข 5	จำนวนเฉลี่ย±ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานของปรสิต *S. vortens* ในอาหารเลี้ยงเซลล์ที่อุณหภูมิ 10 องศาเซลเซียส และที่ระดับ ความเป็นกรด–ด่าง ตั้งแต่ 5-10	112
ข 6	จำนวนเฉลี่ย±ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานของปรสิต *S. vortens* ในอาหารเลี้ยงเซลล์ที่อุณหภูมิ 20 องศาเซลเซียส และที่ระดับความเป็นกรด–ด่าง ตั้งแต่ 5-10	113
ข 7	จำนวนเฉลี่ย±ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานของปรสิต *S. vortens* ในอาหารเลี้ยงเซลล์ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส และที่ระดับความเป็นกรด–ด่าง ตั้งแต่ 5-10	114
ข 8	จำนวนเฉลี่ย±ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานของปรสิต *S. vortens* ในอาหารเลี้ยงเซลล์ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส และที่ระดับความเป็นกรด–ด่าง ตั้งแต่ 5-10	115
ข 9	การวิเคราะห์ข้อมูลเพื่อหา LD_{50} ที่ 14 วัน ตามวิธีของ Reed และ Muench (1938)	116
ข 10	คุณภาพน้ำระหว่างการทดสอบความรุนแรงของโรคสไปโรนิวคลีโอซีสในปลาเทวดา	118
ข 11	คุณภาพน้ำระหว่างการทดสอบการยอมรับปรสิต *S. vortens* ในปลาสวยงามชนิดอื่นๆ	120
ข 12	อัตราการตายสะสมหลังการฉีดปรสิต *S. vortens* ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ	122
ข 13	ประสิทธิภาพของยาไดเมทริดาโซลในการยับยั้งการเจริญของปรสิต *S. vortens* ที่ระดับความเข้มข้นต่าง ๆ	123
ข 14	ประสิทธิภาพของยาเมโทรนิดาโซลในการยับยั้งการเจริญของปรสิต *S. vortens* ที่ระดับความเข้มข้นต่าง ๆ	124
ข 15	ประสิทธิภาพของแมกนีเซียมซัลเฟตในการยับยั้งการเจริญของปรสิต *S. vortens* ที่ระดับความเข้มข้นต่าง ๆ	125

รายการตารางภาคผนวก (ต่อ)

ตารางผนวกที่ **หน้า**

ข 16 ประสิทธิภาพของยาไดเมทริดาโซลในการยับยั้งการเจริญของปรสิต *S. vortens* ในปลาเทวดา 126

รายการภาพประกอบ

ภาพที่		หน้า
1	ปลาออสการ์ (*Astronotus ocellatus* Cuvier)	6
2	ปลาเทวดา (*Pterophyllum scalare* Lichtenstein)	7
3	ปลาหมอสี (*Labeotropheus fuelleborni* Ahl)	8
4	ปลากัด (*Betta splendens* Regan)	9
5	ลักษณะของปรสิตกลุ่ม hexamitid flagellates ที่พบในปลา	13
6	ปลาเทวดา (A) และปลาออสการ์ (B) ที่ติดปรสิต *Spironucleus* sp. อย่างรุนแรงมีลักษณะครีบกร่อน สีลำตัวซีด ซูบผอมและทยอยตายในที่สุด	36
7	ปรสิต *Spironucleus* sp. จำนวนมากในลำไส้ปลาเทวดา จากการเตรียมสไลด์สด (fresh impression smear) กำลังขยาย 40x (bar=10 µm)	36
8	โทรโฟซอยท์ของปรสิต *Spironucleus* sp. ที่ผ่านการย้อมสีดิฟควิก กำลังขยาย 100x (bar=10 µm)	36
9	โทรโฟซอยท์ของปรสิต *S. vortens* ที่ศึกษาภายใต้กล้องจุลทรรศน์อิเลคตรอนแบบส่องกราด	37
10	แสดงลักษณะภายในเซลล์ของปรสิต *S. vortens* ที่ศึกษาภายใต้กล้องจุลทรรศน์อิเลคตรอนแบบส่องผ่าน	38
11	เนื้อเยื่อตับปลาเทวดาแสดงลักษณะตับและตับอ่อนปกติ กำลังขยาย 20x (H&E, bar=50 µm)	39
12	เกิดกรานูโลมา (Gr) ในตับปลาเทวดาที่ติดปรสิต *S. vortens* กำลังขยาย 20x (H&E, Bar=100 µm)	40
13	การเกิดเมลาโนมาโครฟาจ (Me) เป็นจำนวนมากในม้ามของปลาเทวดาที่ติดปรสิต*S. vortens* กำลังขยาย 20x (H&E, bar=50 µm)	40
14	เกิดการอักเสบ (*) ในลำไส้ปลาเทวดาที่ติดปรสิต *S. vortens* กำลังขยาย 20x (H&E, bar=50 µm)	41
15	ปรสิต *S. vortens* ที่เจริญในอาหารเลี้ยงเซลล์ที่อุณหภูมิ 5 องศาเซลเซียส และที่ระดับความเป็นกรด ด่าง ต่าง ๆ	42

รายการภาพประกอบ (ต่อ)

ภาพที่		หน้า
16	ปรสิต *S. vortens* ที่เจริญในอาหารเลี้ยงเซลล์ที่อุณหภูมิ 10 องศาเซลเซียส และที่ระดับความเป็นกรด-ด่าง ต่าง ๆ	42
17	ปรสิต *S. vortens* ที่เจริญในอาหารเลี้ยงเซลล์ที่อุณหภูมิ 20 องศาเซลเซียส และที่ระดับความเป็นกรด-ด่าง ต่าง ๆ	43
18	ปรสิต *S. vortens* ที่เจริญในอาหารเลี้ยงเซลล์ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส และที่ระดับความเป็นกรด-ด่าง ต่าง ๆ	43
19	ปรสิต *S. vortens* ที่เจริญในอาหารเลี้ยงเซลล์ ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส และที่ระดับความเป็นกรด-ด่าง ต่าง ๆ	44
20	อัตราการตายสะสมของปลาเทวดาหลังการฉีด *S. vortens* ที่ความเข้มข้นต่างๆ	45
21	ประสิทธิภาพของยาไดเมทริดาโซลในการยับยั้งการเจริญของปรสิต *S. vortens* ที่ระดับความเข้มข้นต่าง ๆ	47
22	ประสิทธิภาพของยาเมโทรนิดาโซลในการยับยั้งการเจริญของปรสิต *S. vortens* ที่ระดับความเข้มข้นต่าง ๆ	48
23	ประสิทธิภาพของแมกนีเซียมซัลเฟตในการยับยั้งการเจริญของปรสิต *S. vortens* ที่ระดับความเข้มข้นต่าง ๆ	48
24	ประสิทธิภาพของยาไดเมทริดาโซลในการยับยั้งการเจริญของปรสิต *S. vortens* ในปลาเทวดา	49

บทที่ 1

บทนำ

บทนำต้นเรื่อง

การเพาะเลี้ยงปลาสวยงามเป็นธุรกิจที่มีความสำคัญทางเศรษฐกิจและมีแนวโน้มการเพิ่มปริมาณการผลิตมากขึ้น เนื่องจากมูลค่าการส่งออกที่เพิ่มขึ้นอย่างต่อเนื่องทุกปี มูลค่าการส่งออกปลาสวยงามมีอัตราการขยายตัวเฉลี่ยร้อยละ 9.0-10.0 ต่อปี นอกจากนี้มีการประมาณการมูลค่าการส่งออกปลาสวยงามทั่วโลกสูงถึง 1,000 ล้านดอลลาร์สหรัฐฯ และมูลค่าการค้าปลีกสูงถึง 3,000 ล้านดอลลาร์สหรัฐฯ (Boonyaratpalin and Sermwatanakul, 2004) การส่งออกปลาสวยงามในตลาดโลกนั้นผลผลิตกว่าร้อยละ 50 มาจากตลาดทางเอเชีย โดยสิงคโปร์เป็นผู้นำอันดับหนึ่งในการส่งออกปลาสวยงามของโลก โดยมีส่วนแบ่งในตลาดการค้าปลาสวยงาม ร้อยละ 21.5 รองลงมาคือมาเลเซีย ร้อยละ 8.9 สาธารณรัฐเช็ก ร้อยละ 7.8 สเปน ร้อยละ 7.0 ญี่ปุ่น ร้อยละ 6.7 และอินโดนีเซีย ร้อยละ 5.7 ส่วนไทยนั้นอยู่ในอันดับที่ 7 มีส่วนแบ่งในตลาดโลกร้อยละ 5 ปัจจุบันประเทศไทยส่งออกปลาสวยงามไปสู่ประเทศต่าง ๆ มากกว่า 50 ประเทศทั่วโลก และมีผู้ส่งออกที่เกี่ยวข้องในธุรกิจปลาสวยงาม 60 บริษัท โดยประเทศที่นำเข้าสินค้าปลาสวยงาม ได้แก่ สหรัฐอเมริกา เป็นตลาดนำเข้าปลาสวยงามที่ใหญ่ที่สุดในโลกและมีมูลค่าการนำเข้าจากประเทศไทยมากที่สุด รองลงมาคือกลุ่มประเทศสหภาพยุโรปและประเทศญี่ปุ่น จึงทำให้มีการขยายตัวของธุรกิจการเพาะเลี้ยงปลาสวยงามเพิ่มมากขึ้นในประเทศไทย (อมรรัตน์, 2548) โดยการส่งออกปลาสวยงามของปี พ.ศ. 2549 มีปริมาณ 1,517.43 ตัน มูลค่า 518.42 ล้านบาท และปริมาณการส่งออกปลาสวยงามในช่วงครึ่งแรกของปี 2551 มีปริมาณ 2,508.29 ตัน มูลค่า 444.55 ล้านบาท เมื่อเทียบกับช่วงเดียวกันของปี 2550 ที่มีปริมาณการส่งออก 861.37 ตัน มูลค่า 252.97 ล้านบาท โดยทั้งปริมาณและมูลค่าการส่งออกเพิ่มขึ้นร้อยละ 191.2 และ 76.1 ตามลำดับ โดยการส่งออกเป็นลูกปลาร้อยละ 9.4 ปลาทะเลร้อยละ 40.1 และปลาน้ำจืด ร้อยละ 50.5 (พลพจน์ และคณะ, 2552) โดยปลากัดเป็นปลาสวยงามที่มีการส่งออกมากที่สุด ส่วนปลาที่กำลังเป็นที่นิยมในปัจจุบัน คือ ปลาหางไหม้ ปลาน้ำผึ้ง ปลาทรงเครื่อง ปลากาแดง ปลาเทศบาล ปลาปล้องอ้อย และปลาซะโด เนื่องจากปลาเหล่านี้มีความสวยงามและมีลักษณะความแปลกเฉพาะตัวที่โดดเด่น อย่างไรก็ตาม พบว่ากลุ่มปลาพื้นเมืองของไทยก็กำลังเป็นที่นิยมในตลาดยุโรปและสหรัฐอเมริกา และมี

โอกาสขยายตลาดได้ดีอย่างต่อเนื่องในระยะยาว ได้แก่ ปลาเล็บมือนางและปลาน้ำผึ้ง เนื่องจากเป็นปลาที่กินตะไคร่น้ำในตู้ปลาเป็นอาหาร ลูกค้าจึงนิยมสั่งซื้อเพื่อนำมาใช้ทำความสะอาดตู้ปลาและนำมาใช้ในการทำสปา แนวโน้มในอนาคตกระทรวงเกษตรและสหกรณ์ได้มีการกำหนดยุทธศาสตร์การส่งออกปลาสวยงาม โดยตั้งเป้าว่าในปี 2553 มูลค่าการส่งออกปลาสวยงามจะเพิ่มขึ้นเป็น 2,000 ล้านบาท โดยเน้นให้เกษตรกรรวมกลุ่มกันเช่นเดียวกับที่อำเภอบ้านโป่ง จังหวัดราชบุรี ซึ่งประสบความสำเร็จเป็นแหล่งผลิตและส่งออกปลาสวยงามของไทยและเตรียมขยายโครงการส่งออกปลาสวยงามไปยังจังหวัดพิจิตร เนื่องจากมีความพร้อมในด้านแหล่งน้ำและความหลากหลายของพันธุ์ปลาน้ำจืดสวยงาม (พลพจน์ และคณะ, 2552)

ทั้งนี้ปัญหาสุขภาพของปลาและการเกิดโรคระบาดในฟาร์มเพาะเลี้ยงนับเป็นอุปสรรคที่สำคัญอย่างหนึ่งในกระบวนการผลิตปลาที่มีคุณภาพ โดยเฉพาะโรคที่เกิดจากปรสิตกลุ่ม hexamitid flagellates นับเป็นสาเหตุหนึ่งที่ก่อให้เกิดความเสียหายต่อการเพาะเลี้ยงปลาเป็นอย่างมาก เนื่องจากเป็นปรสิตที่อาศัยอยู่ในระบบทางเดินอาหารทำให้การดูดซึมอาหารของปลาลดลง เกิดอาการขี้ขาว มีอาหารไม่ย่อยปนมากับอุจจาระ เนื่องจากระบบทางเดินอาหารผิดปกติ เยื่อบุผิวลำไส้ถูกทำลาย ตกเลือด บวม อักเสบ และเป็นแผล นอกจากนี้การเคลื่อนที่หรือการแพร่กระจายของปรสิตไปยังอวัยวะอื่น ๆ โดยผ่านทางกระแสเลือดทำให้เกิดการติดเชื้อทั้งระบบ ส่งผลให้เกิดการเสียหายของเนื้อเยื่อตับ ไต ม้าม และกล้ามเนื้อ ทำให้ปลาเจริญเติบโตช้าอ่อนแอ ไม่กินอาหาร และมีภูมิต้านทานลดลงจนแสดงอาการของโรค (Yasutake *et al*., 1961; Post, 1983; Poynton and Morrison, 1990; Poppe *et al*., 1992; Woo and Poynton, 1995; Sterud *et al*., 1998; Sangmaneedet and Smith, 1999; Guo and Woo, 2004a, 2004b) หากปลาติดปรสิตอย่างรุนแรงก็จะส่งผลให้ปลาตาย หรือหากการติดปรสิตไม่รุนแรงมากนักก็จะพบความผิดปกติจากร่องรอยของโรค เช่น ปลามีขนาดเล็ก ซูบผอม มีแผลกร่อนและการตายของเนื้อเยื่อบริเวณส่วนหัว เกิดการบวมบริเวณรูทวาร ว่ายน้ำเสียการทรงตัว ลำตัวมีสีคล้ำหรือซีดกว่าปกติ (Paull and Matthews, 2001; Guo and Woo, 2004a, 2004b) ซึ่งเป็นลักษณะที่ไม่ตรงกับความต้องการของตลาด และมักจะไม่ผ่านการตรวจคุณภาพก่อนการส่งออก ส่งผลกระทบต่อการส่งออกปลาสวยงามและอาจถูกกีดกันทางการตลาดจากประเทศผู้รับซื้อในที่สุด (นิรัติศัย, 2535) การติดปรสิตกลุ่ม hexamitid flagellates สามารถพบได้ในปลาน้ำจืดและปลาทะเลทั้งในเขตหนาวและเขตอบอุ่น โดยเฉพาะกลุ่มปลาสวยงามและกลุ่มปลาแซลมอน โดยเชื่อว่าปรสิตกลุ่ม hexamitid flagellates เป็นสาเหตุที่ก่อให้เกิดโรครูบนหัว (hole in the head : HITH) ลำไส้อักเสบ ส่งผลให้ปลาเกิดการตายค่อนข้างสูงโดยเฉพาะในปลาน้ำจืดวัยอ่อน และโรคแผลกร่อนในปลา

ทะเล (head and lateral line erosion : HLLE) (Moore, 1922; Davis, 1926; Miura and Ohsima, 1960; Sano, 1970; Ferguson and Moccia, 1980; Bassleer, 1983; Kent *et al*., 1992; Poynton *et al*., 1995; Woo and Poynton, 1995; Koudela *et al*., 1996; Uldal and Buchmann, 1996; Sterud *et al*., 1998)

การศึกษาเกี่ยวกับปรสิตกลุ่ม hexamitid flagellates ในประเทศไทยยังมีน้อย ดังนั้นการศึกษาเกี่ยวกับชนิดของปรสิต กลไกการเกิดโรค ความรุนแรงและการแพร่กระจายของปรสิตไปสู่ปลาชนิดอื่น ๆ รวมทั้งการใช้ยาและสารเคมีในการควบคุมโรคดังกล่าวนับเป็นสิ่งจำเป็นและควรศึกษาเพื่อเป็นประโยชน์ต่อการจัดการสุขภาพปลา การป้องกันและการควบคุมโรคปรสิตในปลาสวยงามต่อไปในอนาคต

การตรวจเอกสาร

1. ปลาสวยงาม

1.1 การเลี้ยงปลาสวยงามในประเทศไทย

ประเทศไทยนิยมเลี้ยงปลาสวยงามเป็นงานอดิเรกมานานแล้ว และความนิยมเลี้ยงปลาสวยงามได้ขยายตัวอย่างมากในช่วง 10 ปีที่ผ่านมา ดังจะเห็นได้จากการขยายตัวของตลาดปลาสวยงามที่เพิ่มสูงขึ้นอย่างต่อเนื่อง โดยมีอัตราการเติบโตเฉลี่ยเพิ่มขึ้นปีละ 9-10 เปอร์เซ็นต์ เมื่อเปรียบเทียบปลาสวยงามกับปลาที่เลี้ยงเป็นอาหารแล้ว การเลี้ยงปลาสวยงามน่าจะมีลู่ทางที่สดใส เนื่องจากปลาสวยงามมีราคาสูงเมื่อเทียบกับปลาที่ใช้เป็นอาหารในขนาดเดียวกันรวมทั้งใช้เวลาเลี้ยงไม่นานและใช้พื้นที่ในการเลี้ยงน้อยกว่า (สำนักวิจัยเศรษฐกิจการเกษตร, 2541) ปลาสวยงามที่ได้จากการเพาะขยายพันธุ์ในฟาร์มเพาะเลี้ยงจะมีข้อดี คือ มีขนาดตรงกับความต้องการของตลาดและมีขนาดใกล้เคียงกัน เมื่อนำไปเลี้ยงในตู้ปลาแล้วดูสวยงามอีกทั้งเป็นการอนุรักษ์พันธุ์ปลาในแหล่งน้ำธรรมชาติ นอกจากนี้การเพาะขยายพันธุ์ปลาสวยงามในฟาร์มสามารถกำหนดปริมาณสินค้าให้ตรงกับความต้องการของตลาดปลาได้ (วันเพ็ญและคณะ, 2533)

1.2 แหล่งเพาะเลี้ยงปลาสวยงามของไทย

ประเทศไทยเป็นประเทศที่มีความอุดมสมบูรณ์ของทรัพยากร การประกอบธุรกิจปลาสวยงามจึงมีความเหมาะสมอย่างยิ่ง เนื่องจากเป็นการลงทุนต่ำให้ผลตอบแทนอัตราที่สูงใน

ระยะเวลาสั้น พบว่าการทำธุรกิจปลาสวยงามในประเทศเริ่มมาประมาณ 50 ปี โดยเป็นการประกอบธุรกิจขนาดเล็ก ใช้แรงงานในครอบครัว ใช้สถานที่ไม่มาก ลงทุนน้อย และได้มีการพัฒนารูปแบบการเพาะเลี้ยงแตกต่างกันหลายรูปแบบตามชนิดของปลา ธุรกิจการเพาะเลี้ยงปลาสวยงามส่วนใหญ่เพาะเลี้ยงในกรุงเทพฯ และเขตปริมณฑล นอกจากนี้มีกลุ่มเพาะเลี้ยงปลาไทยที่เน้นในเรื่องของปริมาณ ราคาต่ำ แหล่งเพาะเลี้ยงปลาส่วนใหญ่เป็นบริเวณที่ราบลุ่มริมฝั่งแม่น้ำและเขตชลประทาน ได้แก่ อำเภอบ้านโป่ง อำเภอโพธาราม จังหวัดราชบุรี ปลาส่วนใหญ่ที่นิยมเลี้ยง ได้แก่ ปลากาแดง ปลาทรงเครื่อง ปลาหางไหม้ ปลากาเผือก ปลาน้ำผึ้ง ปลาเทวดา นอกจากนี้มีปลาสำหรับบริโภคที่นิยมเลี้ยงเป็นปลาสวยงามด้วย เช่น ปลาสวาย ปลาแรด และปลาชะโด พบว่ามีการเลี้ยงมากที่จังหวัดนครสวรรค์ สุพรรณบุรี อุทัยธานี และปทุมธานี ปลาสวยงามที่เป็นสายพันธุ์ต่างประเทศที่นิยมเลี้ยงได้แก่ ปลาทอง ปลาทองรักเล่ห์ ปลาคาร์พ ปลาหางนกยูง ปลาสอด ปลาออสการ์ ปลาเทวดา ส่วนปลาพื้นเมืองของไทยที่นิยมเลี้ยง ได้แก่ ปลากราย ปลาทรงเครื่อง ปลาหางไหม้ ปลากาแดง เป็นต้น (ยุพิน, 2539) นอกจากนี้สำนักวิจัยเศรษฐกิจการเกษตร (2541) รายงานว่า ประเทศไทยยังมีแหล่งเพาะเลี้ยงปลาสวยงามที่สำคัญอีกหลายแหล่งโดยในแต่ละท้องที่มีชนิดของปลาแตกต่างกันออกไป

2. อนุกรมวิธานของปลาสวยงามที่ศึกษา

ปลาสวยงามที่ใช้ในการศึกษาครั้งนี้มี 4 ชนิด คือ ปลาออสการ์ ปลาหมอสี ปลาเทวดา และปลากัด ซึ่ง Nelson (1994) ได้จัดจำแนกทางอนุกรมวิธานไว้ดังนี้

Phylum Chordata

Class Actinopterygii

Order Perciformes

Suborder Labroidei

Family Cichlidae

Subfamily Astronotinae

Scientific name *Astronotus ocellatus* (Cuvier)

ชื่อไทย ปลาออสการ์

Subfamily Cichlasomatinae

Scientific name *Pterophyllum scalare* (Lichtenstein)

ชื่อไทย ปลาเทวดา

Subfamily Pseudocrenilabrinae

Scientific name *Labeotropheus fuelleborni* (Ahl)

ชื่อไทย ปลาหมอสี

Family Osphronemidae

Subfamily Macropodinae

Scientific name *Betta splendens* (Regan)

ชื่อไทย ปลากัด

2.1 **ปลาออสการ์** (*Astronotus ocellatus* Cuvier)

ปลาออสการ์มีถิ่นกำเนิดในบริเวณแถบลุ่มแม่น้ำอเมซอน ปานามา รวมถึงทวีปอเมริกาใต้ ปลาออสการ์จัดอยู่ในวงศ์เดียวกับปลาหมอเทศและเป็นปลาที่รู้จักกันทั่วไปทั้งในประเทศและต่างประเทศ เพราะปลาชนิดนี้มีทั้งความสวยงามและความมีเสน่ห์อยู่ในตัว มีขนาดพอเหมาะและสง่างาม (ยุทธวัช, 2544) ลักษณะปลาออสการ์พันธุ์แท้ดั้งเดิมนั้นเมื่อโตเต็มที่ตัวจะมีสีดำ มีลายส้มหรือสีส้มแดง ดูสวยงามและสะดุดตากว่าปลาสวยงามชนิดอื่น ลำตัวค่อนข้างกว้างหนา ปากยื่นออกมาเล็กน้อย แนวลำตัวด้านบนโค้งมน (ภาพที่ 1) ลักษณะพันธุ์ปลาออสการ์ที่เห็นอยู่ทุกวันนี้เป็นฝีมือของคนไทยที่เพาะพันธุ์จนได้ปลาออสการ์ที่สวยงาม เช่น ปลาออสการ์ลายเสือ ปลาออสการ์สีทอง ซึ่งทำให้ชาวต่างประเทศรู้จักเมืองไทยในนาม “ ราชาปลาออสการ์ ” เหตุผลนี้ทำให้ปลาออสการ์ได้รับความนิยมจากหมู่นักเพาะพันธุ์มาโดยตลอดจนถึงปัจจุบัน ปลาชนิดนี้สามารถแยกเพศได้ไม่ยาก โดยเพศผู้จะมีส่วนหัวนูนสูงขึ้น ครีบต่าง ๆ เช่น ครีบก้น ครีบท้อง ครีบกระโดงจะยื่นแหลมยาวกว่าตัวเมีย มีติ่งเพศแหลมยื่นออกมา ส่วนตัวเมียช่องเพศจะมีลักษณะกลม และส่วนนี้จะยื่นยาวออกมา เมื่อมีการผสมพันธุ์วางไข่ ส่วนท่อวางไข่ของเพศเมียจะมีลักษณะเป็นท่อ และยื่นยาวกว่าปลาตัวผู้ ปลาออสการ์ที่อาศัยอยู่ตามแหล่งน้ำธรรมชาติพบว่ามีสีสันไม่สวยงามเหมือนกับปลาที่ได้จากการเพาะพันธุ์ขึ้นมาเอง เนื่องจากคุณค่าของอาหารที่ปลาได้รับมีน้อย นิสัยโดยธรรมชาติโดยทั่วไปจัดว่าเป็นปลาดุร้าย กินเนื้อและสิ่งมีชีวิตขนาดเล็ก เช่น ลูกกุ้ง ลูกปลา ลูกน้ำ ไส้เดือน เป็นอาหาร (ถวิล, 2539; ชูศักดิ์, 2541)

ภาพที่ 1 ปลาออสการ์ (*Astronotus ocellatus* Cuvier)

2.2 **ปลาเทวดา** (*Pterophyllum scalare* Lichtenstein)

ปลาเทวดาเป็นปลาที่มีถิ่นกำเนิดในทวีปอเมริกาใต้ โดยเฉพาะในแถบลุ่มแม่น้ำอเมซอน ลุ่มแม่น้ำโอริโนโกในแถบประเทศเวเนซูเอลา และในแม่น้ำบางสายในทวีปอาฟริกา (เกียรติศักดิ์, 2531) ปลาเทวดามีลักษณะลำตัวแบนข้าง ลำตัวกว้างลึกรูปไข่ มีส่วนหัวแหลม ครีบหลังและครีบทวาร มีก้านครีบเป็นกระโดงยื่นยาวออกไปและอยู่ค่อนไปทางด้านหาง ส่วนครีบท้องจะอยู่บริเวณใต้ครีบอกและมีก้านครีบยื่นยาวออกไปเช่นกัน ครีบหางบางเป็นแพนใหญ่รูปทรงของปลาเทวดาเป็นรูปสามเหลี่ยมมุมฉาก ริมฝีปากค่อนข้างเล็ก ดวงตากลมโต (ภาพที่ 2) ปลาเทวดามีหลายสีตามสายพันธุ์ เช่น เทวดาดำ เทวดาหินอ่อน เทวดาจุด เทวดาสีเงิน เทวดาม้าลาย เทวดาสีทอง เทวดาขาว (ยุทธวัช, 2544) การสังเกตเพศปลาสามารถทำได้โดยการดูจากปลายครีบกระโดงหลังและปลายครีบทวารของปลาตัวผู้จะยื่นยาวออกมามากกว่าตัวเมีย นอกจากนี้ในช่วงเวลาใกล้จะผสมพันธุ์สามารถสังเกตเห็นอวัยวะเพศของปลาตัวผู้ยื่นยาวออกมามากกว่าตัวเมีย (เกียรติศักดิ์, 2531) ปลาเทวดาจัดเป็นปลาที่มีนิสัยรักสงบ ชอบอยู่เป็นคู่ หรือเป็นฝูงขนาดเล็กและลอยตัวอยู่นิ่ง ๆ บริเวณผิวน้ำ สามารถเลี้ยงรวมกันหลายตัวได้ในบริเวณที่มีต้นไม้น้ำหรือก้อนหิน แต่ปลาเทวดามีนิสัยที่ค่อนข้างตื่นตกใจง่าย มีความไวต่อสภาพแวดล้อมที่เปลี่ยนแปลงไป ตายง่ายหากได้รับการดูแลเอาใจใส่ไม่ดีพอ หรือคุณภาพน้ำมีการเปลี่ยนแปลงปลาเทวดาจะแสดงอาการผิดปกติทันที อาหารของปลาเทวดาได้แก่ พืชน้ำ ไรน้ำ ลูกน้ำ และแมลงน้ำเล็ก ๆ แต่สามารถเลี้ยงได้ด้วยอาหารเม็ด (ถวิล, 2539)

ภาพที่ 2 ปลาเทวดา (*Pterophyllum scalare* Lichtenstein)

2.3 **ปลาหมอสี** (*Labeotropheus fuelleborni* Ahl)

ปลาหมอสีเป็นปลาน้ำจืดจัดอยู่ในวงศ์ Cichlidae มีถิ่นกำเนิดและแพร่กระจายอยู่ทั่วภูมิภาคในเขตร้อนของโลก ได้แก่ ทวีปอาฟริกา ซึ่งมีถึง 900 ชนิด ทวีปอเมริกาใต้ 290 ชนิด บางชนิดพบในตอนล่างของทวีปอเมริกาเหนือ สี่ชนิดพบในตะวันออกกลาง และสามชนิดพบในอินเดีย เนื่องจากอาณาเขตการแพร่กระจายของปลาวงศ์นี้มีภูมิประเทศและสิ่งแวดล้อมที่แตกต่างกัน ส่งผลให้ปลามีความหลากหลายทั้งชนิด สายพันธุ์ และรูปร่าง รวมทั้งการดำรงชีวิตที่แตกต่างกัน สามารถปรับตัวเข้ากับสภาพแวดล้อมที่เปลี่ยนแปลงไปได้เป็นอย่างดี ปลาหมอสีส่วนใหญ่เป็นปลาน้ำจืด มีพฤติกรรมการเลี้ยงดูไข่และลูกอ่อน ส่วนใหญ่ผสมพันธุ์วางไข่ในฤดูหนาวช่วงเดือนสิงหาคมถึงปลายเดือนพฤศจิกายน เป็นปลาที่เลี้ยงง่าย (ภาพที่ 3) (เกียรติศักดิ์, 2531)

ภาพที่ 3 ปลาหมอสี (*Labeotropheus fuelleborni* Ahl)

2.4 **ปลากัด** (*Betta splendens* Regan)

ปลากัดเป็นปลาพื้นเมืองของไทย พบแพร่กระจายทั่วไปทุกภาคของประเทศ อาศัยอยู่ในทะเลสาบ หนองบึง แอ่งน้ำ ลำคลอง เป็นปลาที่มีขนาดเล็ก ลักษณะลำตัวยาวแบนข้าง หัวเล็ก ปากขนาดเล็ก เชิดขึ้นด้านบนเล็กน้อย มีฟันที่ขากรรไกรบนและล่าง มีเกล็ดปกคลุมหัวและตัว ครีบอกมีขนาดเล็กกว่าครีบอื่น ๆ ไม่มีเส้นข้างลำตัว (ภาพที่ 4) ชอบอาศัยในบริเวณที่มีระดับน้ำตื้น ๆ น้ำค่อนข้างใส น้ำนิ่งหรือไหลเอื่อย ๆ มีพรรณไม้น้ำขึ้นประปราย และชอบว่ายช้า ๆ บริเวณผิวน้ำ เป็นปลาที่อดทน มีอวัยวะช่วยหายใจ (labyrinth organ) ซึ่งตั้งอยู่ในโพรงอากาศหลังช่องเหงือก มีลักษณะเป็นเนื้อเยื่อที่มีรอยหยักและมีเส้นเลือดฝอยมาหล่อเลี้ยงมากมายทำให้สามารถใช้ออกซิเจนจากการฮุบอากาศที่ผิวน้ำได้โดยตรง ในปลาวัยอ่อนจะไม่พบอวัยวะที่ช่วยหายใจแต่จะเริ่มพบอวัยวะดังกล่าวนี้เมื่อปลามีอายุ 10 วัน จึงสามารถเลี้ยงปลากัดได้แม้ในที่แคบโดยไม่ต้องเพิ่มออกซิเจน ปลากัดเป็นปลาที่หวงถิ่นอาศัย ชอบอยู่ตัวเดียว และจับคู่ในฤดูผสมพันธุ์จะต่อสู้ทันทีเมื่อมีตัวอื่นเข้าใกล้ ปลาตัวผู้สามารถเปลี่ยนสีได้งดงามเมื่อถูกกระตุ้นในสภาวะตื่นตัว ครีบทุกครีบจะแผ่กางออก แผ่นเยื่อหุ้มเหงือกจะขยายพองออก พร้อมกับสีน้ำเงินเหลือบ หรือสีแดงเหลือบจะปรากฏออกมาให้เห็นได้อย่างชัดเจน ทำให้ดูสง่าสวยงาม สำหรับความแตกต่างระหว่างเพศของปลากัดอาจดูได้จากสี โดยปลากัดตัวผู้จะมีสีสดใสกว่าตัวเมีย ครีบหูของตัวผู้ยาวและใหญ่กว่าตัวเมีย เมื่อถึงฤดูกาลผสมพันธุ์ปลากัดตัวผู้จะก่อหวอดระหว่างกอของพืชน้ำ จึงจะเริ่มผสมพันธุ์และวางไข่ ไข่ที่ปล่อยออกมาจะถูกนำไปติดอยู่ที่หวอดที่สร้างขึ้น หลังจากตัวเมียออกไข่จนหมดแล้วปลากัดตัวผู้จะไล่ตัวเมียออกไป เพราะตัวเมียจะกินไข่ของมันเอง ซึ่งตัวผู้จะระมัดระวังไม่ให้ตัวเมียกินไข่ ปลากัดตัวผู้จะดูแลไข่และไข่จะฟักออกเป็นตัวในเวลาประมาณ 36

ชั่วโมง ลูกปลากัดที่ฟักออกจากไข่ใหม่ ๆ จะเกาะอยู่ที่หวอดและมีถุงอาหารติดตัว ลูกปลาจะใช้อาหารจากถุงอาหารจนหมดภายในเวลา 3-4 วัน หลังจากนั้นจึงหากินอาหาร ซึ่งอาหารระยะแรกเป็นพวกแพลงก์ตอน ไรน้ำ หนอนแดง ลูกกุ้งและเนื้อลูกปลา เป็นต้น ในช่วงเวลาต่อมาเมื่อลูกปลากัดโตเต็มที่มีอายุได้ 3-4 เดือน ขึ้นไปก็สามารถผสมพันธุ์วางไข่สืบพันธุ์ได้ต่อไป ธรรมชาตินิสัยของปลากัดเป็นปลาที่ก้าวร้าว รักและหวงถิ่นอาศัย ชอบกัดต่อสู้กัน แต่ในปลาวัยอ่อนยังไม่พบว่ามีความก้าวร้าว ปลาจะเริ่มแสดงพฤติกรรมก้าวร้าวเมื่ออายุหนึ่งเดือนครึ่งหรือสองเดือน โดยปลากัดตัวผู้จะชอบต่อสู้กันและชอบทำร้ายปลาเพศเมียเวลาผสมพันธุ์ และจากลักษณะนิสัยนี้เองทำให้ประเทศไทยมีประวัติการใช้ปลากัดต่อสู้กัน ทั้งเพื่อเป็นเกมส์กีฬาและการพนันจนเป็นที่รู้จักกันไปทั่วโลก เช่นเดียวกันก็ได้มีผู้นำไปเลี้ยงในยุโรปตั้งแต่ปี พ. ศ. 2414 (Hoedeman, 1975 อ้างโดย ชาติ, 2534) ซึ่งได้นำไปเพาะเลี้ยงอย่างกว้างขวาง และเมื่อปี พ.ศ. 2436 (Gilbert, 1970 อ้างโดย ชาติ, 2534) ก็เพาะพันธุ์ได้สำเร็จที่ประเทศฝรั่งเศส ปัจจุบันประเทศไทยมีการเพาะเลี้ยงปลากัดกันแพร่หลาย เนื่องจากเป็นปลาที่เลี้ยงและเพาะพันธุ์ได้ง่าย

ภาพที่ 4 ปลากัด (*Betta splendens* Regan)

3. โรคปรสิตกับการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำ

การเลี้ยงปลาทั้งปลาสวยงามหรือปลาสำหรับการบริโภค ผู้เลี้ยงมักประสบปัญหาการเกิดโรค เนื่องจากการเลี้ยงปลาในบ่อจะมีสภาพแวดล้อมส่วนใหญ่ผิดจากธรรมชาติ ปลามีจำนวนมากและอยู่กันอย่างหนาแน่น มีการให้อาหารสมทบทำให้คุณสมบัติของน้ำเปลี่ยนแปลง

โอกาสที่ปลาจะเกิดโรคในบ่อเลี้ยงจึงมีมากกว่าปลาที่อาศัยอยู่ตามธรรมชาติ (ชลอ, 2528; Andrews *et al*., 1988) โรคปลามีสาเหตุจากหลายปัจจัย เช่น แบคทีเรีย เชื้อรา ไวรัส รวมทั้งปรสิต ซึ่งก่อให้เกิดความสูญเสียและการเจ็บป่วยของตัวสัตว์น้ำ (กมลพร และสุปราณี, 2526; 2539)

ปรสิตคือสิ่งมีชีวิตที่ใช้ชีวิตในช่วงระยะเวลาหนึ่งของชีวิตหรือตลอดชีวิต อาศัยอยู่บนสิ่งมีชีวิตชนิดอื่นที่รู้จักในนามของเจ้าบ้าน (host) หรืออีกความหมายหนึ่ง ปรสิตหมายถึงสิ่งมีชีวิตที่อาจมีเซลล์เดียวหรือหลายเซลล์ อาศัยอยู่ร่วมกับสิ่งมีชีวิตชนิดอื่นและเป็นฝ่ายได้รับผลประโยชน์จากการอยู่ร่วมกัน (ประไพสิริ, 2546) ชนิดที่เสียเปรียบเรียกว่า เจ้าบ้าน และชนิดที่ได้เปรียบคือปรสิต ปรสิตสามารถพบได้ในทุกส่วนของเจ้าบ้าน ขนาดปรสิตมีตั้งแต่ขนาดเล็กมากต้องตรวจสอบผ่านกล้องจุลทรรศน์จนถึงปรสิตที่มีขนาดใหญ่สามารถมองเห็นด้วยตาเปล่า (กิจการ และคณะ, 2539)

โรคปรสิตในปลาเป็นปัญหาที่พบได้บ่อย โดยเฉพาะปลาที่อยู่ในระบบการเพาะเลี้ยง ซึ่งมีปัจจัยต่าง ๆ ค่อนข้างจำกัด แต่เกื้อหนุนให้มีการเพิ่มจำนวนของปรสิต จึงส่งผลให้มีการระบาดของโรคปรสิตได้มากกว่าเมื่อเทียบกับในแหล่งน้ำธรรมชาติ แม้ว่าการติดปรสิตจะเป็นปัญหาที่ไม่รุนแรงมากนัก แต่ผลจากการติดปรสิตอาจทำให้เกิดการติดเชื้ออื่น ๆ เช่น แบคทีเรียหรือเชื้อราตามมาได้ โดยปัจจัยเกื้อหนุนที่ทำให้เกิดปัญหาโรคปรสิตในระบบการเพาะเลี้ยงปลาได้แก่ การปล่อยสัตว์น้ำในบ่อเลี้ยงที่ค่อนข้างหนาแน่น คุณภาพน้ำที่ไม่เหมาะสมในบ่อเพาะเลี้ยง เช่น ปริมาณสารอินทรีย์ หรือปริมาณแอมโมเนียสูง การนำพันธุ์สัตว์น้ำต่างถิ่นเข้ามาในระบบ ซึ่งอาจเป็นพาหะของปรสิตชนิดใหม่ ๆ ที่จะก่อให้เกิดปัญหาการติดเชื้อในประชากรสัตว์น้ำที่มีอยู่เดิมได้ สุขภาพของปลาที่ค่อนข้างอ่อนแอเนื่องมาจากสาเหตุ อื่น ๆ เช่น ขาดสารอาหาร ความเครียดจากคุณภาพน้ำจนทำให้ปลามีโอกาสติดปรสิตมากขึ้น (นพดล, 2549)

โปรโตซัวเป็นสิ่งมีชีวิตเซลล์เดียว จำแนกได้มากกว่า 80,000 ชนิด มีรูปร่างและขนาดที่แตกต่างกัน คือ มีขนาดตั้งแต่ 1-500 ไมโครเมตร มีการดำรงชีวิตทั้งแบบอิสระและปรสิต ชนิดที่เป็นปรสิตรวมแล้วมีมากกว่า 16,000 ชนิด ในจำนวนนี้มีหลายชนิดที่เป็นปรสิตของปลาและเป็นสาเหตุของโรคที่สำคัญทางการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำ (Saghari Fard, 2008)

hexamitid flagellates เป็นปรสิตกลุ่มโปรโตซัว จัดเป็นปรสิตภายในที่อาศัยอยู่ในระบบทางเดินอาหารของปลา มีรูปร่างรูปไข่หรือรูปกระสวย เป็นปรสิตในปลาน้ำจืดและน้ำเค็มทั้งในเขตหนาวและเขตอบอุ่น มี 2 ระยะ คือ ระยะเข้าเกราะและไม่เข้าเกราะ (ประไพสิริ, 2546)

3.1 ลักษณะทางอนุกรมวิธาน

Lom และ Dykova (1992) ได้จัดจำแนกทางอนุกรมวิธานของปรสิตกลุ่ม hexamitid flagellates ไว้ดังนี้ คือ

Subkingdom Protozoa

Phylum Mastigophora

Subphylum Mastigophora

Class Zoomastigophorea

Order Diplomonadina

Suborder Diplomonadida

Family Hexamitidae

Genus *Hexamita* sp.

Genus *Spironucleus* sp.

Genus *Octomitus* sp.

Genus *Giardia* sp.

Genus *Trimitus* sp.

Genus *Trepomonas* sp.

Genus *Retortamonas* sp.

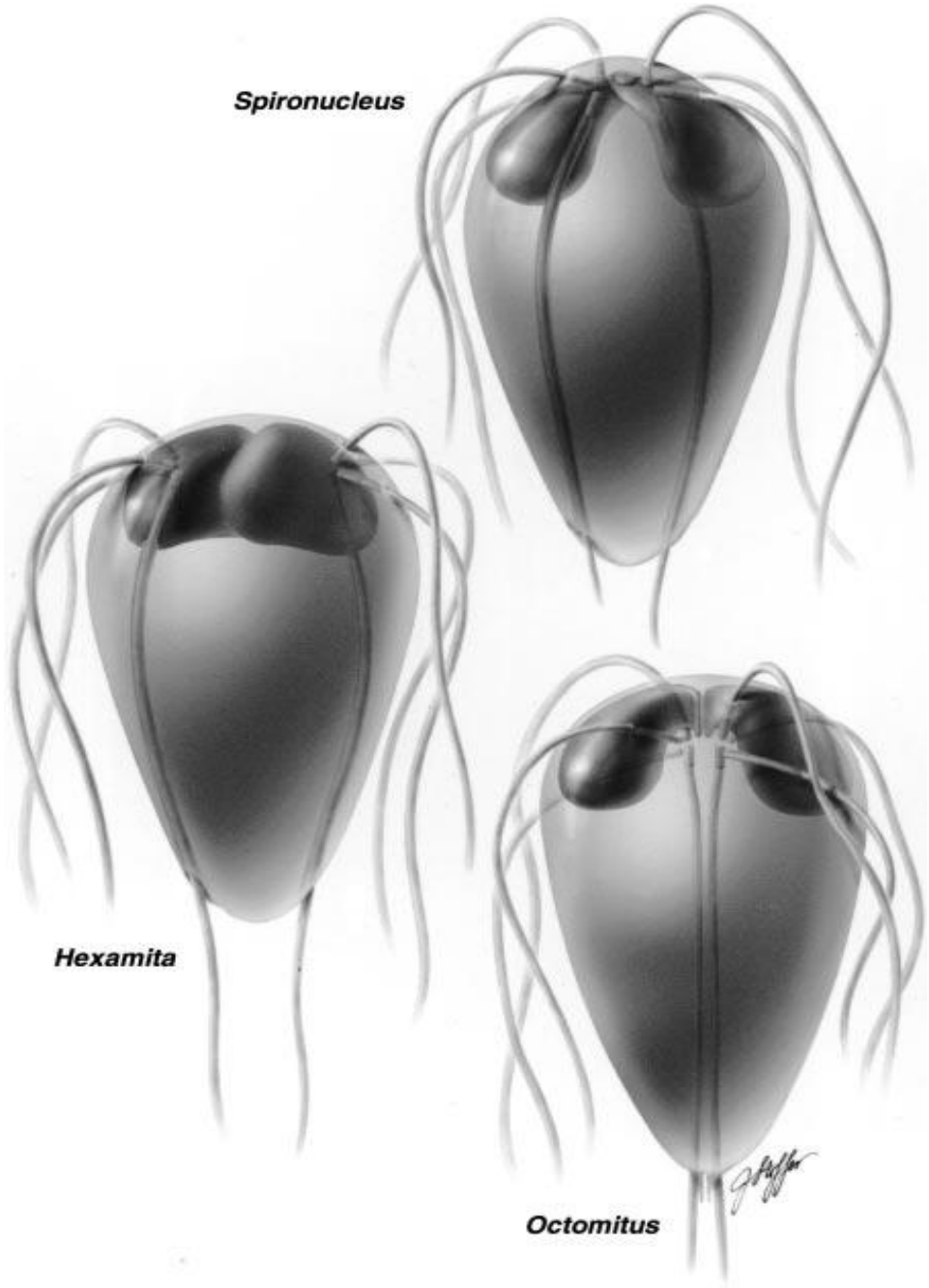
Genus *Carpediemonas* sp.

Genus *Trimastix* sp.

Genus *Tetramitus* sp.

จากการศึกษาพบว่าปรสิตกลุ่ม hexamitid flagellates มีทั้งหมด 10 สกุล โดยในจำนวนนี้มี 3 สกุล ที่เป็นปรสิตและก่อโรคในปลาเป็นหลักคือสกุล *Hexamita* สกุล *Octomitus* และสกุล *Spironucleus* (Poynton and Morrison, 1990; Poynton *et al*., 1995; Sterud *et al*., 1997, 1998; Poynton and Sterud, 2002; Poynton *et al*., 2004) ปรสิตกลุ่ม hexamitid flagellates ถูกตรวจพบครั้งแรกในปลากลุ่มแซลมอน (ปลาเรนโบว์เทร้าท์) ในปี 1903 และให้ชื่อว่า *Urophagus intestinalis* (Syns. *Hexamitus intestinalis*) ในประเทศยุโรป 17 ปี ต่อมา ได้มีการตรวจพบปรสิตกลุ่มนี้ในปลาเทร้าท์ในประเทศเยอรมนี และให้ชื่อว่า *Octomitus intestinalis truttae* (Moroff, 1903, Schmidt, 1919; 1929 อ้างโดย Saghari Fard *et al*., 2007) และมีรายงานการพบในสัตว์น้ำหลากหลายชนิดทั้งในปลาน้ำจืดและปลาทะเลทั้งในเขตหนาวและเขต

อบอุ่น โดยทั่วไปปรสิตกลุ่มนี้มีรูปร่างรูปไข่หรือรูปกระสวย หัวท้ายค่อนข้างแหลม มีสมมาตรของซีกซ้ายขวา มีนิวเคลียสจำนวน 2 อัน อยู่ทางด้านหน้า มีแฟลกเจลลัม 8 เส้น แบ่งเป็นด้านหน้า 6 เส้น และด้านท้าย 2 เส้น (ภาพที่ 5) มี axostyle ซึ่งเป็นโครงสร้างสำหรับช่วยค้ำจุนโครงร่างและช่วยในการเคลื่อนไหว 2 อัน มีช่องสำหรับขับถ่ายของเสีย 2 ช่อง มีขนาด 10-20 ไมครอน เป็นปรสิตภายในที่อาศัยอยู่ในระบบทางเดินอาหารของสัตว์มีกระดูกสันหลัง เป็นสาเหตุของโรคที่เรียกว่า hexamitiasis หรือ spironucleosis และ โรค hole in the head ในกลุ่มปลาแซลมอน ปลาไน ปลาไหล และกลุ่มปลาสวยงาม โดยการอาศัยอยู่ในเนื้อเยื่อเจ้าบ้าน โดยเฉพาะอย่างยิ่งในระบบทางเดินอาหารและสามารถพบได้บ้างบริเวณผิวหนังของปลา ปรสิตมีการแพร่กระจายผ่านทางกระแสเลือด และแพร่กระจายไปยังเนื้อเยื่ออื่น ๆ ทำให้เกิดการติดเชื้อทั้งระบบ และเกิดการแพร่กระจายของปรสิตไปยังปลาตัวอื่นหรือปลาชนิดอื่นที่สามารถยอมรับปรสิตกลุ่มนี้ได้ผ่านทางการกินอุจจาระของปลา (Kulda and Lom,1964a; 1964b; Bassleer, 1983; Levine, 1985; Siddall *et al*., 1992; Poynton *et al*., 1995; Woo and Poynton, 1995; Sterud *et al*., 1997; Paull and Matthews, 2001; Poynton and Sterud, 2002) สำหรับลักษณะที่ใช้ในการจำแนกสกุลของปรสิตกลุ่ม hexamitid flagellates ดังแสดงในตารางที่ 1



ภาพที่ 5 ลักษณะของปรสิตกลุ่ม hexamitid flagellates ที่พบในปลา

ที่มา : Poynton และ Sterud (2002)

ตารางที่ 1 ลักษณะที่ใช้ในการจำแนกสกุลของปรสิตกลุ่ม hexamitid flagellates

Character	*Spironucleus*	*Hexamita*	*Octomitus*
Flagellar pocket	+	+	-
Central axis formed by recurrent axonemes microtubular bands, endoplasmic reticulum	-	-	+
Two terminal spike	-	-	+
Shape of nuclei	S-shape	Spherical	Reniform
Location of kinetosomes relative to nuclei	Sub-apical	External surface	Between
Position of recurrent flagella relative to nuclei	Medial	Lateral	Medial
Supra nuclear microtubular band	+	+	Reduce
Infra nuclear microtubular band	+	+	Reduce

ที่มา : Poynton และ Sterud (2002)

3.2 วงจรชีวิต การสืบพันธุ์และการเพาะเลี้ยงปรสิตกลุ่ม hexamitid flagellates

ปรสิตกลุ่ม hexamitid flagellates มีวงจรชีวิต 2 ระยะ คือ ระยะโทรโฟซอยท์และซีสต์ ระยะโทรโฟซอยท์เป็นระยะที่มีการเคลื่อนที่ กินอาหาร และสืบพันธุ์แบบไม่อาศัยเพศโดยแบ่งเซลล์เพิ่มจำนวนแบบ longitudinal binary fission ส่วนระยะซีสต์แบ่งเซลล์แบบ binary division ชนิดที่เป็นปรสิตระยะโทรโฟซอยท์จะพบอาศัยอยู่ในระบบทางเดินอาหารของเจ้าบ้าน ระยะซีสต์จะพบอยู่ภายนอกเซลล์และมีชีวิตภายนอกเซลล์ของเจ้าบ้านได้ และทั้งสองระยะสามารถพบได้ในทั้งรูปแบบที่ดำรงชีวิตเป็นอิสระและปรสิต ระยะโทรโฟซอยท์และซีสต์มีการแพร่กระจายไปยังเจ้าบ้านได้โดยผ่านทางการกินอุจจาระ (Moore, 1922; Kulda and Lom, 1964a; 1964b; Kulda and Nohynkuva, 1978; Poynton and Morrison,1990; Kent *et al*.,1992; Poppe *et al*., 1992; Brugerolle and Lee, 2002; Woo, 2006) การเจริญของปรสิตกลุ่มนี้ขึ้นอยู่กับปัจจัยหลายอย่าง เช่น จากรายงานของ Poynton และคณะ (1995) พบว่า *S. vortens* ที่ก่อโรคในปลาเทวดาสามารถเจริญได้ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส ในอาหาร TYI-S-33 ที่มีส่วนประกอบสำคัญของ trypticase, yeast extract และ iron serum จากการศึกษาของ Sterud และ Poynton (2002) รายงานว่าปรสิตชนิดนี้สามารถเจริญได้ในช่วงอุณหภูมิ 2-34 องศาเซลเซียส และเพาะเลี้ยงใน

หลอดทดลองได้สำเร็จที่อุณหภูมิ 5 และ 10 องศาเซลเซียส Sangmaneedet และ Smith (2000) ได้เพาะเลี้ยง *S. vortens* ที่แยกจากปลาเทวดาในหลอดทดลองพบว่าช่วงความเป็นกรด–ด่าง ที่ปรสิตสามารถเจริญได้คือ 6.5-7.5 และเจริญได้ดีที่สุดที่ความเป็นกรด-ด่าง 7.5 และอาหารที่ใช้เลี้ยงต้องมีการเสริม bovine bile นอกจากนี้จากรายงานของ Sterud (1998a) พบว่า *S. barkhanus* ที่แยกจากปลาแอตแลนติกแซลมอน (*Salmo salar*) และ grayling (*Thymallus thymallus*) เจริญได้ดีที่อุณหภูมิ 5 องศาเซลเซียส

3.3 อาการของโรคสไปโรนิวคลีโอซีสในสัตว์น้ำ

โดยทั่วไปอาการของโรคสไปโรนิวคลีโอซีสในปลาที่ปรากฏให้เห็นภายนอก เช่น ตาโปน บวมน้ำ และก่อให้เกิดการตายสูงในปลาขนาดเล็ก จากการศึกษาของ Guo และ Woo (2004a) พบปรสิต *S. barkhanus* อยู่ในกระแสเลือดสัปดาห์ที่ 1-8 หลังจากการฉีดปรสิตให้กับปลาแอตแลนติกแซลมอนและอวัยวะสำคัญที่พบปรสิต คือ ม้าม ตับ ตา และกล้ามเนื้อ อาการที่เกิดจากการติดปรสิตคือติดเชื้อในกระแสเลือด เป็นเม็ดพุพองบนผิวหนัง เป็นแผลบริเวณกล้ามเนื้อ มีแกรนูโลมาในม้ามและตับ ส่งผลให้ปลาตายสูงถึง 95 เปอร์เซ็นต์ และจากการศึกษาของ Becker (1977) และ Gratzek (1988) พบปรสิตชนิดนี้ในปลาไน ปลาไหล และปลาแซลมอน โดยพบในอวัยวะภายในคือ หัวใจ ไต ตับ ม้าม ตา สมอง และกระแสเลือด เช่นเดียวกับกรณีการติดปรสิต *S. vortens* ในปลาเทวดา ซึ่งทำให้เกิดแผลบริเวณหัวและอวัยวะภายใน เช่น ลำไส้ ไต ม้าม และตับ (Poynton *et al.,* 1995) นอกจากนี้พบว่าการติดปรสิต *Hexamita salmonis* ก่อให้เกิดการตายสูงในปลาที่อยู่ในระยะวัยอ่อนมากกว่าระยะโตเต็มวัย เช่น ปลาเรนโบว์เทร้าท์ (*Oncorhynchus mykiss*) ที่มีขนาด 2.5-7.5 เซนติเมตร สามารถติดปรสิตสูงถึง 70 เปอร์เซ็นต์ ขนาด 7.5-12.8 เซนติเมตร ติดปรสิต 10 เปอร์เซ็นต์ และขนาด 12.5-17.5 เซนติเมตร ติดปรสิต 2 เปอร์เซ็นต์ โดยพบการติดปรสิตบริเวณกระเพาะอาหารและลำไส้ส่วนหน้ามากกว่าลำไส้ส่วนกลางและส่วนท้าย (Uldal and Buchmann, 1996) สอดคล้องกับการศึกษาของ Kent และคณะ (1992) พบว่าในปรสิตชนิดนี้ทำให้เกิดการตายสูงในปลา Chinook salmon (*Oncorhynchus tshawytscha*) และจากรายงานของ Poppe และคณะ (1992) พบว่าการติดปรสิต *Hexamita salmonis* ส่งผลให้เกิดการตายของเนื้อเยื่อตายตับและไตของปลาแอตแลนติกแซลมอน (*Salmo salar*)

3.4 การแพร่กระจายของโรคสไปโรนิวคลีโอซีสในสัตว์น้ำ

สไปโรนิวคลีโอซีสเป็นโรคที่พบในปลาหลายชนิด ทั้งปลาน้ำจืดและปลาทะเล รวมทั้งสัตว์ครึ่งบกครึ่งน้ำ นก และสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม (Kulda and Nohynkova, 1978) นอกจากนี้ยังพบว่าโรคชนิดนี้ก่อให้เกิดการตายสูงในปลาเทวดา ปลาแซลมอน ปลาเรนโบว์เทร้าท์ ปลาแอตแลนติกคอด (*Gadus morhua*) และปลาแฮตดอก (*Melamogrammus aeglefinus*) (Ferguson, 1979; Poynton and Morrison, 1990; Poppe *et al*., 1992; Sterud *et al*., 1997) ในประเทศสหรัฐอเมริกาพบการระบาดของโรคนี้ในหลายพื้นที่ เช่น รัฐแคลิฟอร์เนียร์ รัฐยูท่า รัฐอาลาบาม่า รัฐฟลอริด้า และรัฐเวอร์จีเนียร์ ส่วนในแถบเอเชียพบในประเทศสิงคโปร์ ประเทศอินโดนีเซียและประเทศฮ่องกง นอกจากนี้ยังพบในทวีปอเมริกาใต้ที่แม่น้ำอเมซอน พบปรสิตในลำไส้ของปลาเทวดา 2 ชนิด คือ *Pterophyllum altum* และ *P. scalare* (Poynton *et al.,* 1995) จากการศึกษาของ Sterud และคณะ (1998) รายงานว่าปลาแอตแลนติกแซลมอนที่เลี้ยงในประเทศนอร์เวย์สามารถติดปรสิต *S. barkhanus* ได้โดยการรับเชื้อจากอุจจาระของปลา Arctic char (*Salvelinus alpinus*) นอกจากนี้มีปรสิตอีกกลุ่มหนึ่งที่ก่อโรคเหมือนกับโรคสไปโรนิวคลีโอซีสเพราะอยู่ในครอบครัวเดียวกัน คือ *Hexamita* sp. ก่อให้เกิดการตายสูงในปลาน้ำจืดและปลาทะเลที่ประเทศแคนนาดา เช่น การเลี้ยงปลา Chinook salmon โดยครั้งแรกพบปรสิตในปลาแอตแลนติกแซลมอน ต่อมาเกิดแพร่ระบาดของปรสิตชนิดนี้ไปสู่ปลาน้ำจืดและปลาทะเลบางชนิดที่สามารถรับปรสิตชนิดนี้ได้ (Kent *et al.,* 1992) สำหรับการแพร่กระจายของปรสิตสกุล *Spironucleus* sp. ในปลาชนิดต่าง ๆ ดังแสดงในตารางที่ 2

ตารางที่ 2 การแพร่กระจายของปรสิตสกุล *Spironucleus* sp. ในปลาชนิดต่าง ๆ

Species	Host	Location	Geographic locality	Literature source
S. barkhanus	Arctic char	intestine, gall bladder	W, D Norway	Sterud *et al*., 1998
	Grayling	intestine, gall bladder	W, F Norway	Sterud *et al*., 1997
S. salmonicida [a]	Arctic char	systemic (intracellular)	A, S Norway	Sterud *et al*., 2003
	Atlantic salmon	systemic	A, S Norway	Sterud *et al*., 1997; 1998
	Chinook salmon	systemic	A, S Canada	Kent *et al*., 1992
S. salmonis [b]	Brook trout	intestine (pyloric)	A, F USA	Moore, 1922; Davis, 1926
	Brown trout	intestine (pyloric)	A, F USA	Moore, 1922; Davis, 1926
	Lake trout	intestine (pyloric)	A, F USA	Moore, 1922; Davis, 1926
	Rainbow trout	intestine (pyloric)	A, F USA	Ferguson, 1979
	Rainbow trout	intestine (pyloric)	A,F Ireland	Poynton *et al*., 2004
S. torosa	Burbot	intestine (rectum)	W, F Norway	Sterud, 1998a
	Cod	intestine (rectum)	W, S Norway	Sterud, 1998b

ตารางที่ 2 การแพร่กระจายของปรสิตสกุล *Spironucleus* sp. ในปลาชนิดต่าง ๆ (ต่อ)

Species	Host	Location	Geographic locality	Literature source
S. torosa	Cod	intestine (rectum)	W, S Canada	Poynton and Morrison, 1990
	Haddock	intestine (rectum)	W, S Canada	Poynton and Morrison, 1990
	Saithe	intestine (rectum)	W, S Norway	Sterud, 1998b
S. vortens	Angelfish	intestine (middle), lip tumor	A, F USA	Poynton *et al*., 1995
	Angelfish	intestine, head lesions	A, F UK	Paull and Matthews, 2001
	Discus	systemic	A, F UK	Paull and Matthews, 2001
	Ide	intestine	W, D Norway	Sterud and Poynton, 2002

A:aquaculture, D:anadromous, F:freshwater, S: seawater, W:wild

[a] diplomonads initially reported as a hexamitid infection by Kent *et al*. (1992) and as *S. barkhanus* by Sterud *et al*. (1997, 1998, 2003) and then renamed to *S. salmonicida* by Jørgensen and Sterud (2006).

[b] Diplomonads initially reported as *Hexamita salmonis* by Moore (1922), Davis (1926) and Ferguson (1979) and renamed to *S. salmonis* by Poynton *et al*. (2004).

3.5 การควบคุมโรคสไปโรนิวคลีโอซีสในสัตว์น้ำ

การศึกษาของ Sangmaneedet และ Smith (1999) พบว่าการใช้ยาไดเมทริดาโซล (dimetridazole) ที่ระดับความเข้มข้นมากกว่าหรือเท่ากับ 4 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร สามารถลดจำนวนปรสิต *S. vortens* ได้ถึง 50 เปอร์เซ็นต์ หลังให้ยา 48 ชั่วโมง และพบว่ายาเมโทรนิดาโซล (metronidazole) และมีเบนดาโซล (mebendazole) สามารถยับยั้งการเจริญของปรสิต *S. vortens* ได้ และการศึกษาของ Tojo และ Santamarina (1998) รายงานว่ายาเมโทรนิดาโซลสามารถยับยั้งปรสิต *S. salmonis* ในปลาเรนโบว์เทร้าท์ (*O. mykiss*) ได้เช่นกัน

วัตถุประสงค์ของการวิจัย

1. เพื่อศึกษาชนิดและความรุนแรงของโรคจากปรสิตกลุ่ม hexamitid flagellates ในปลาสวยงามบางชนิด

2. เพื่อศึกษาผลของปรสิตต่อการเปลี่ยนแปลงทางพยาธิสภาพของเนื้อเยื่อปลาที่ติดปรสิต

3. เพื่อศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการเพาะเลี้ยงปรสิตกลุ่ม hexamitid flagellates ในอาหารเลี้ยงเซลล์

4. เพื่อศึกษาการยอมรับปรสิตกลุ่ม hexamitid flagellates ในปลาสวยงามชนิดอื่น

5. เพื่อศึกษาการใช้ยาและสารเคมีที่เหมาะสมในการป้องกันรักษาโรคปรสิตกลุ่ม hexamitid flagellates ในปลาสวยงาม

บทที่ 2

วัสดุ อุปกรณ์ และวิธีการทดลอง

วัสดุ

1. ปลาที่ศึกษา

ปลาหมอสี (*Labeotropheus fuelleborni*) ปลาเทวดา (*Pterophyllum scalare*) ปลาออสการ์ (*Astronotus ocellatus*) และปลากัด (*Betta splendens*) จากฟาร์มเลี้ยงปลาสวยงามเอกชน อำเภอบ้านโป่ง จังหวัดราชบุรี ทั้งปลาป่วยและปลาปกติ ระหว่างเดือนพฤศจิกายน 2552 ถึงเดือน พฤษภาคม 2553 โดยนำปลามาเลี้ยงที่ศูนย์วิจัยสุขภาพสัตว์น้ำ คณะทรัพยากรธรรมชาติ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ โดยใช้ตู้กระจกขนาด 44x19x20 นิ้ว ที่บรรจุน้ำปริมาตร 50 ลิตร ปล่อยปลาแต่ละชนิดจำนวน 40-50 ตัวต่อตู้ ให้อาหารวันละ 2 ครั้ง ตอนเช้าเวลา 9. 00 น. ตอนเย็นเวลา 16.30 น. เปลี่ยนถ่ายน้ำสัปดาห์ละครั้ง เพื่อตรวจสอบปรสิตต่อไป

2. ปลาทดลอง

ปลาสวยงามชนิดอื่น ๆ ได้แก่ ปลาทอง (*Carassius auratus*) ปลาหางนกยูง (*Poecilia reticulata*) และปลาแพลทตี้ (*Xiphophorus maculates*) สำหรับทดสอบการยอมรับปรสิต hexamitid flagellates จากฟาร์มเลี้ยงปลาสวยงามเอกชน อำเภอบ้านโป่ง จังหวัดราชบุรี โดยนำปลามาเลี้ยงที่ศูนย์วิจัยสุขภาพสัตว์น้ำ คณะทรัพยากรธรรมชาติ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ โดยใช้ตู้กระจกขนาด 44x19x20 นิ้ว ที่บรรจุน้ำปริมาตร 50 ลิตร ปล่อยปลาแต่ละชนิดจำนวน 50 ตัวต่อตู้ ให้อาหารวันละ 2 ครั้ง ตอนเช้าเวลา 9. 00 น. ตอนเย็นเวลา 16.30 น. เปลี่ยนถ่ายน้ำสัปดาห์ละครั้ง ตรวจสอบปรสิต hexamitid flagellates และต้องไม่มีการติดปรสิตกลุ่มนี้ในปลาทดลองดังกล่าว

3. สารเคมี

3.1 สารเคมีสำหรับตรวจปรสิตในอวัยวะต่าง ๆ จากตัวอย่างปลามีชีวิต ได้แก่ สารละลายเกลือแกงปลอดเชื้อความเข้มข้น 0.85 เปอร์เซ็นต์ น้ำมันกานพลู และฟอร์มาลินความเข้มข้น 5 เปอร์เซ็นต์

3.2 สารเคมีสำหรับศึกษาพยาธิสภาพของเนื้อเยื่อด้วยกล้องจุลทรรศน์แบบธรรมดา ได้แก่ ฟอร์มาลินความเข้มข้น 10 เปอร์เซ็นต์ เอธิลแอลกอฮอล์ ความเข้มข้น 50, 70, 95 และ 100 เปอร์เซ็นต์ ไซลีน พาราพลาสท์ สีฮีมาทอกไซลิน สีอิโอซิน และน้ำยาเปอร์เมาท์

3.3 สารเคมีสำหรับเตรียมตัวอย่างเพื่อศึกษาโครงสร้างของปรสิตกลุ่ม hexamitid flagellates ด้วยกล้องจุลทรรศน์ธรรมดา ได้แก่ สีย้อมดิฟควิก (diff quick) และเมทานอล

3.4 สารเคมีสำหรับเตรียมตัวอย่างเพื่อศึกษาโครงสร้างของปรสิตกลุ่ม hexamitid flagellates ด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเลคตรอนแบบส่องกราด (scanning electron microscope: SEM) และส่องผ่าน (transmission electron microscope: TEM) ได้แก่ กลูตารัลดีไฮด์ ความเข้มข้น 2.5 เปอร์เซ็นต์ ที่ละลายในคาร์โคดีเลทบัฟเฟอร์ สารละลายบัฟเฟอร์ ออสเมียมเตตราออกไซด์ความเข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์ ที่ละลายใน คาร์โคดีเลทบัฟเฟอร์ ความเข้มข้น 0.1 โมลาร์ (pH 7.4) และเอธิลแอลกอฮอล์

3.5 สารเคมีสำหรับการเลี้ยงปรสิตกลุ่ม hexamitid flagellates ในหลอดทดลอง ได้แก่ อาหารเลี้ยงเซลล์ Leibovitz's L-15 ยาปฏิชีวนะ คือ เพนนิซิลลิน-สเตรปโตมัยซิน (penicillin-streptomycin) เพนนิซิลลิน (penicillin) สเตรปโตมัยซิน (streptomycin) เจนต้ามัยซิน (gentamicin) แอมโฟเทอริซิน บี (amphotericin B) บายน์ โบวายน์ (bile bovine) เฮพาริน (heparin) และ ฟีทัลโบวายน์ ซีรัม (fetal bovine serum)

3.6 ยาและสารเคมีสำหรับทดสอบการยับยั้งการเจริญของปรสิตกลุ่ม hexamitid flagellates ได้แก่ ยาไดเมทริดาโซล ยาเมโทรนิดาโซล แมกนีเซียมซัลเฟต (magnesium sulfate) และไดเมทิลซัลฟอกไซด์ (dimethyl sulfoxide : DMSO)

อุปกรณ์

1. อุปกรณ์สำหรับการเก็บปลาตัวอย่าง

ประกอบด้วยถังไฟเบอร์ ปริมาตร 1,000 ลิตร ตู้กระจกขนาด 44x19x20 นิ้ว อุปกรณ์ระบบให้อากาศประกอบด้วยเครื่องให้อากาศ สายยางและหัวทราย

2. อุปกรณ์สำหรับแยกเชื้อแบคทีเรีย

อุปกรณ์สำหรับแยกเชื้อแบคทีเรีย ได้แก่ จานเพาะเชื้อ (plate) ลูปเขี่ยเชื้อ (loop) ชุดผ่าตัด ตะเกียงแอลกอฮอล์ ตู้บ่มเชื้อ (incubator) อาหารเลี้ยงเชื้อแบคทีเรีย ได้แก่ Tryptic Soy Agar (TSA: Merck, Darmstadt, Germany) และ Tryptic Soy Broth (TSB: Merck, Darmstadt, Germany) และอุปกรณ์สำหรับแยกชนิดแบคทีเรีย ได้แก่ ชุดทดสอบคุณสมบัติทางชีวเคมีของเชื้อ (API 20E system, bioMérieux, France)

3. อุปกรณ์สำหรับการตรวจวัดคุณภาพน้ำ

3.1 อุปกรณ์วัดอุณหภูมิน้ำ คือ เทอร์โมมิเตอร์ (thermometer)

3.2 เครื่องวัดปริมาณออกซิเจนละลาย คือ เครื่องดีโอมิเตอร์ (DO meter) ของ YSI model 57

3.3 อุปกรณ์วัดค่าความเป็นกรด-ด่าง คือ เครื่องพีเอชมิเตอร์ (pH meter) ของ Mettler Delta รุ่น 340

3.4 อุปกรณ์วัดค่าความเป็นด่าง (alkalinity) ได้แก่ ขวดรูปชมพู่ บีกเกอร์ ปิเปต กระบอกตวง ลูกยาง ขวดเก็บตัวอย่างน้ำ บิวเรต และชุดจับบิวเรต

4. อุปกรณ์สำหรับศึกษาการเปลี่ยนแปลงทางพยาธิสภาพ

4.1 ขวดเก็บตัวอย่างขนาด 50 มิลลิลิตร

4.2 ชุดเครื่องมือผ่าตัด

4.3 อุปกรณ์เตรียมเนื้อเยื่อซึ่งประกอบด้วยบล็อกพลาสติก (casette) และตะกร้าโลหะ

4.4 เครื่องเตรียมเนื้อเยื่ออัตโนมัติ (automatic tissue processer) ของ technicon corporation รุ่น Mod. 2A Autotechnicon Mono MOD 2A

4.5 เครื่องหยอดพาราฟิน (embedding center) รวมทั้งบล็อกโลหะ (mold) และบล็อกพลาสติก (embedding ring)

4.6 เครื่องตัดชิ้นเนื้อเยื่อ (microtome) (Jung AG Heidelberg) ใบมีดตัดเนื้อเยื่อ (Leica, Disposable Microtome Blades) อ่างน้ำอุ่น (water bath)

4.7 อุปกรณ์สำหรับเตรียมสไลด์ถาวร ได้แก่ ตู้อบควบคุมอุณหภูมิ (Memmert) ชุดสำหรับใส่สีย้อม ตู้ดูดควัน สไลด์และแผ่นปิดสไลด์

4.8 นาฬิกาจับเวลา

4.9 ดินสอและกระดาษติดฉลาก

4.10 เตาร้อน (hot plate)

4.11 กล้องจุลทรรศน์แบบเลนส์ประกอบของ Olympus รุ่น C-35 AD ที่ติดตั้ง

5. อุปกรณ์สำหรับการเลี้ยงปรสิตกลุ่ม hexamitid flagellates ในหลอดทดลอง

5.1 อุปกรณ์พื้นฐาน ได้แก่ ขวดใส กระบอกตวง บีกเกอร์ ขวดรูปชมพู่ หลอดทดลอง จานเพาะเชื้อ เครื่องคนสาร (magnetic stirrer) และลูกเหล็กคนสาร (magnetic bar) ขวด T-flask ขนาด 50 150 250 500 มิลลิลิตร ปิเปตขนาด 5 และ 10 มิลลิลิตร Automatic pipette พร้อมทิป

5.2 ตู้บ่มเชื้อ

5.3 ตู้เย็น

5.4 สไลด์นับเม็ดเลือด (haemacytometer) และ เคาน์เตอร์ (counter)

5.5 ไซริงค์ ฟิลเตอร์ ขนาด 0.45 และ 0.20 ไมครอน

5.6 กล้องจุลทรรศน์แบบเลนส์ประกอบของ Olympus รุ่น C-35 AD

5.7 กล้องจุลทรรศน์แบบหัวกลับ (inverted microscope) ของ Olympus รุ่น IX 70

6. อุปกรณ์สำหรับศึกษาโครงสร้างของปรสิตกลุ่ม hexamitid flagellates ด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเลคตรอน

6.1 อุปกรณ์พื้นฐาน ตามข้อ 5.1

6.2 สไลด์และแผ่นแก้วบาง (cover glass)

6.3 เครื่องหมุนเหวี่ยง (centrifuge)

6.4 แคปซูลพลาสติก

6.5 จานย้อมสี

6.6 อัลตราไมโครโตม (ultramicrotome) ของ Sorvall MT 500

6.7 มีดเพชร และมีดแก้ว

6.8 กริด (grid)

6.9 กล้องจุลทรรศน์อิเลคตรอนแบบส่องกราดและส่องผ่าน ของ Joel JEM 100CX II พร้อมชุดถ่ายภาพ

7. อุปกรณ์สำหรับทดสอบความรุนแรง การยอมรับปรสิตในปลาสวยงาม และการควบคุมโรคสไปโรนิวคลีโอซีสโดยการใช้ยาและสารเคมี

7.1 กระบอกฉีดยาพร้อมเข็มฉีดยา

7.2 ตู้ทดลอง ใช้ตู้กระจกขนาด 44x19x20 นิ้ว

7.3 อุปกรณ์ระบบให้อากาศ ประกอบด้วย เครื่องให้อากาศ สายยางและหัวทราย

7.4 อุปกรณ์ทำความสะอาดตู้กระจก

7.5 อาหารสำเร็จรูป

7.6 สไลด์นับเม็ดเลือด และเคาน์เตอร์

7.7 เครื่องหมุนเหวี่ยง

วิธีการทดลอง

1. การเก็บตัวอย่างปลาที่ศึกษา

เก็บตัวอย่างปลาสวยงามโดยรวบรวมจากฟาร์มปลาสวยงามในอำเภอบ้านโป่ง จังหวัดราชบุรี จำนวน 4 ชนิด คือ ปลาหมอสี น้ำหนักเฉลี่ย 3.17±1.11 กรัม จำนวน 100 ตัว ปลาเทวดา น้ำหนักเฉลี่ย 2.46±0.30 กรัม จำนวน 121 ตัว ปลาออสการ์ น้ำหนักเฉลี่ย 5.56±1.16 กรัม จำนวน 110 ตัว และปลากัด น้ำหนักเฉลี่ย 3.19±0.31 กรัม จำนวน 98 ตัว ทั้งปลาป่วยและปลาปกติ โดยสังเกตความผิดปกติภายนอก พฤติกรรมการว่ายน้ำ การกินอาหาร บันทึกอาการของโรคอย่างละเอียดและถ่ายภาพเก็บไว้ โดยนำปลามาเลี้ยงที่ศูนย์วิจัยสุขภาพสัตว์น้ำ คณะทรัพยากรธรรมชาติ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ โดยใช้ตู้กระจกขนาด 44x19x20 นิ้ว ที่บรรจุน้ำปริมาตร 50 ลิตร ปล่อยปลาแต่ละชนิดจำนวน 40-50 ตัวต่อตู้ เพื่อตรวจสอบปรสิตต่อไป ตัวอย่างปลาสวยงามส่วนหนึ่งจะถูกสุ่มเพื่อวินิจฉัยโรคปรสิตภายใต้กล้องจุลทรรศน์และแยกเชื้อแบคทีเรียจากตับ ไต สมอง และแผลหลุม ด้วยเทคนิคปลอดเชื้อ (aseptic techniques) บนอาหารเลี้ยงเชื้อ Tryptic Soy Agar และจำแนกเชื้อที่แยกได้โดยการทดสอบคุณสมบัติทางชีวเคมีเบื้องต้นรวมทั้งการใช้ชุดทดสอบ API system (BioMerieux) ในระหว่างการเก็บตัวอย่างปลาจะทำการวิเคราะห์คุณภาพน้ำพื้นฐานได้แก่ อุณหภูมิของน้ำ (water temperature) โดยใช้เทอร์โมมิเตอร์ ความเป็นกรด-ด่าง (pH) โดยใช้เครื่อง pH meter ปริมาณออกซิเจนละลายน้ำ (dissolved oxygen) โดยใช้เครื่อง DO Meter และค่าความเป็นด่าง (alkalinity)

2. การตรวจสอบปรสิตกลุ่ม hexamitid flagellates

ตรวจสอบปรสิตภายนอกบริเวณ เกล็ด ครีบ ผิวลำตัว ตา และเหงือก ส่วนการศึกษาปรสิตในอวัยวะภายใน ได้แก่ ตับ ถุงน้ำดี ถุงลม หัวใจ ม้าม กระเพาะอาหารและลำไส้ โดยการนำแต่ละอวัยวะมาวางบนสไลด์แล้วหั่นเป็นชิ้นเล็ก ๆ ก่อนหยดสารละลายเกลือแกงความเข้มข้น 0.85 เปอร์เซ็นต์ 1-2 หยด และปิดด้วยแผ่นปิดสไลด์ ก่อนนำไปส่องดูด้วยกล้องจุลทรรศน์กำลังขยาย 200-1,000 เท่า ตัวอย่างที่เหลือจะดองในน้ำยาคงสภาพ (ฟอร์มาลิน ความเข้มข้น 10 เปอร์เซ็นต์) และเก็บไว้สำหรับการศึกษาทางพยาธิสภาพต่อไป หลังจากเสร็จสิ้นขั้นตอนการตรวจสอบปรสิตในตัวอย่างที่เก็บรวบรวมได้ ทำการจดบันทึกชนิดปรสิตที่พบ ชนิดและจำนวนของ

ปลาที่ติดปรสิตและไม่ติดปรสิต โดยนำข้อมูลดังกล่าวมาคำนวณเป็นอัตราการติดเชื้อเพื่อใช้ในการเปรียบเทียบการแพร่กระจายและการติดปรสิตในปลาแต่ละชนิด ดังนี้

$$\text{อัตราการติดเชื้อ (Occurrence; \%)} = \frac{\text{จำนวนตัวปลาที่พบปรสิต}}{\text{จำนวนปลาทั้งหมด}} \times 100$$

3. การเลี้ยงปรสิตกลุ่ม hexamitid flagellates ในหลอดทดลอง

นำปรสิตกลุ่ม hexamitid flagellates ที่แยกจากลำไส้ของปลาเทวดา ปลาออสการ์และปลาหมอสีป่วยด้วยเทคนิคปลอดเชื้อมาเพิ่มจำนวนในอาหารเลี้ยงเซลล์ที่ดัดแปลงจากวิธีการของ Paull และ Matthews (2001) โดยใช้อาหารเลี้ยงเซลล์ Leibovitz's L-15 ที่มียาปฏิชีวนะเพนนิซิลลิน-สเตรปโตมัยซิน ความเข้มข้น 10 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร เพนนิซิลลิน สเตรปโตมัยซิน เจนต้ามัยซิน ความเข้มข้น 150 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร และแอมโฟเทอริซิน บี ความเข้มข้น 40 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร บายน์โบวายน์ ความเข้มข้น 10 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร เฮพาริน ความเข้มข้น 5 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ฟีทัลโบวายน์ซีรั่ม ความเข้มข้น 30 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร และตับปลานิลสดน้ำหนักประมาณ 0.01 กรัม บ่มที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส สังเกตการเคลื่อนที่ของปรสิตในอาหารเลี้ยงเซลล์ทุกวันภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบหัวกลับ (inverted microscope) และทำการถ่ายเชื้อ (subculture) ทุก 1-2 วัน ปรสิตที่ได้จะใช้เป็นปรสิตตั้งต้นสำหรับศึกษาการจำแนกชนิดปรสิตกลุ่ม hexamitid flagellates ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ธรรมดาและกล้องจุลทรรศน์อิเลคตรอนต่อไป

4. การจำแนกชนิดปรสิตกลุ่ม hexamitid flagellates ที่แยกจากปลาเทวดา

จำแนกชนิดของปรสิตที่แยกจากปลาเทวดาโดยใช้กล้องจุลทรรศน์ธรรมดาและเทคนิคทางจุลทรรศน์อิเลคตรอน ดังรายละเอียดต่อไปนี้

4.1 การเตรียมตัวอย่างและการวินิจฉัยภายใต้กล้องจุลทรรศน์ธรรมดา

นำปลาเทวดามาสลบด้วยน้ำมันกานพลูจากนั้นจึงแยกชิ้นเนื้อเยื่อที่ติดปรสิตออกจากตัวปลา แล้วแบ่งชิ้นเนื้อเยื่อที่ได้ออกเป็นสามส่วน ส่วนที่ 1 นำไปเกลี่ย (smear) บนแผ่นสไลด์แล้วรักษาสภาพเนื้อเยื่อด้วยฟอร์มาลินความเข้มข้น 5 เปอร์เซ็นต์ ก่อนนำไปส่องดูภายใต้กล้อง

จุลทรรศน์ธรรมดา ส่วนที่ 2 นำเนื้อเยื่อปลาไปเกลี่ยบนสไลด์ ทิ้งไว้ให้แห้ง แล้วรักษาสภาพเนื้อเยื่อด้วยเมทานอล ความเข้มข้น 50 80 และ 100 เปอร์เซ็นต์ ความเข้มข้นละ 1 นาที ก่อนนำไปย้อมด้วยสีย้อมดิฟควิก ตามวิธีการของ Culling และคณะ (1985) สำหรับนำไปศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยารวมทั้งรูปร่างนิวเคลียสของปรสิต ส่วนที่ 3 นำปรสิตไปเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเซลล์ที่ดัดแปลงจากวิธีการของ Paull และ Matthews (2001) เพื่อศึกษาลักษณะของปรสิตโดยใช้เทคนิคทางจุลทรรศน์อิเลคตรอนและศึกษาการเจริญของปรสิตในอาหารเลี้ยงเซลล์ที่สภาวะต่าง ๆ ต่อไป

4.2 การเตรียมตัวอย่างและการวินิจฉัยโดยใช้เทคนิคทางจุลทรรศน์อิเลคตรอน

นำปรสิตกลุ่ม hexamitid flagellates ที่แยกจากปลาเทวดาด้วยเทคนิคปลอดเชื้อมาเพิ่มจำนวนในอาหารเลี้ยงเซลล์ตามวิธีการที่ระบุในข้อ 3 เมื่อปรสิตเพิ่มจำนวนมากขึ้นแล้วนำมาหมุนเหวี่ยงด้วยเครื่องหมุนเหวี่ยงที่ความเร็ว 1,500 รอบต่อนาที นาน 5 นาที แล้วนำไปเกลี่ยบนสไลด์ที่เคลือบด้วยเจลาติน ก่อนนำไปดองในกลูตาราลดีไฮด์ ความเข้มข้น 2.5 เปอร์เซ็นต์ ที่ละลายในคาโคดีเลทบัฟเฟอร์ (cacodylate buffer) นาน 24 ชั่วโมง ก่อนเปลี่ยนเป็นสารละลายบัฟเฟอร์เพื่อรักษาสภาพเนื้อเยื่อแทนและเก็บรักษาไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส จากนั้นเมื่อต้องการทดลองจึงนำตัวอย่างล้างด้วยสารละลายบัฟเฟอร์ 3 ครั้ง ๆ ละ 15 นาที ก่อนนำไปผ่านขั้นตอนการคงสภาพขั้นสุดท้าย (post fixation) ด้วยออสเมียมเตตราออกไซด์ (osmium tetraoxide) ความเข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์ ที่ละลายในคาโคดีเลทบัฟเฟอร์ ความเข้มข้น 0.1 โมลาร์ (pH 7.4) นาน 1 ชั่วโมง หลังจากนั้นผ่านกระบวนการดึงน้ำออกจากเซลล์โดยใช้แอลกอฮอล์ความเข้มข้นต่าง ๆ แล้วจึงทำให้แห้งโดยใช้เครื่อง critical point dryer (CPD-Hitachi) เมื่อตัวอย่างแห้งแล้วจึงนำไปเคลือบด้วยอนุภาคทองคำโดยใช้เครื่อง Polaron sputter coater แล้วจึงนำตัวอย่างที่ได้ไปส่องดูโครงสร้างของปรสิตด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเลคตรอนแบบส่องกราด (Scanning Electron Microscopy: SEM) พร้อมกับบันทึกและถ่ายภาพที่ได้

สำหรับการวิเคราะห์ตัวอย่างโดยใช้เทคนิคจุลทรรศน์อิเลคตรอนแบบส่องผ่าน (Transmission Electron Microscopy: TEM) เตรียมตัวอย่างและดองเช่นเดียวกับการเตรียมตัวอย่างสำหรับวิเคราะห์ด้วยเทคนิค SEM ก่อนนำไปผ่านขั้นตอนการคงสภาพขั้นสุดท้าย (post fixation) ด้วยออสเมียมเตตราออกไซด์ (osmium tetraoxide) ที่ละลายใน Vernal acetate buffer (pH 7.3) แล้วจึงนำตัวอย่างฝังใน Epon-812 แล้วตัดตัวอย่างเนื้อเยื่อด้วยอัลตราไมโครโตม โดยครั้งแรกจะตัดแบบหนา (thick section) ในช่วง 0.5-1 ไมครอน แล้วย้อมด้วยสีทูลูดีน บลู (toluidine blue) เคลือบสไลด์ด้วยน้ำยาเปอร์เมาท์แล้วนำไปตรวจเช็คด้วยกล้องจุลทรรศน์แบบ

ธรรมดา เมื่อได้ตัวอย่างที่ต้องการจึงตัดตัวอย่างอันเดิมแบบบาง (thin section) ให้มีความหนา 60-90 นาโนเมตร ก่อนย้อมด้วยยูรานิลอะซิเตท (uranyl acetate) และเลด ซิเตรท (lead citrate) ตามวิธีการของ Robinson และคณะ (1987) นำไปศึกษาโครงสร้างของปรสิตด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเลคตรอนแบบส่องผ่านและบันทึกกำลังขยาย

4.3 การจำแนกชนิดของปรสิต

จำแนกชนิดของปรสิตโดยใช้ลักษณะทางสัณฐานวิทยาและโครงสร้างภายในไซโตพลาสซึมของปรสิตที่ได้จากการส่องดูภายใต้กล้องจุลทรรศน์ธรรมดาและจุลทรรศน์อิเลคตรอน คือ จำนวนนิวเคลียส จำนวนแฟลกเจลลา รูปร่างของปรสิต ลักษณะเซลล์ เพื่อใช้เป็นข้อมูลสำหรับจำแนกชนิดของปรสิตโดยใช้คู่มือสำหรับจำแนกชนิดของปรสิตกลุ่ม diplomonad flagellates ที่พบในปลาตามวิธีการของ Poynton และ Sterud (2002)

5. การศึกษาการเปลี่ยนแปลงทางพยาธิสภาพ

นำอวัยวะของปลาตัวอย่างที่ผ่านการคงสภาพในข้อ 2 นานอย่างน้อย 72 ชั่วโมง เปลี่ยนเป็นการรักษาสภาพในแอลกอฮอล์ความเข้มข้น 50 และ 70 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ จากนั้นนำไปผ่านขั้นตอนการเตรียมเนื้อเยื่อตามวิธีการมาตรฐานของ Humason (1979) โดยตัดชิ้นเนื้อให้มีขนาดเล็กใส่บล็อคพลาสติกและรวบรวมในตะกร้าโลหะลงในเครื่องเตรียมเนื้อเยื่ออัตโนมัติ ผ่านกระบวนการดึงน้ำออกจากเซลล์ (dehydration) ด้วยแอลกอฮอล์ความเข้มข้นต่างกัน ผ่านไซลีน (xylene) และพาราพลาสท์เพื่อแทนที่ (infiltration) ช่องว่างภายในเซลล์อย่างน้อยขั้นตอนละ 2 ชั่วโมง ก่อนฝังชิ้นเนื้อลงในพาราพลาสท์อีกครั้งและปล่อยให้แข็งตัว หลังจากนั้นนำมาแช่น้ำแข็งและตัดด้วยไมโครโตมโดยให้แผ่นชิ้นเนื้อมีความหนา 3-5 ไมครอน ลอยในอ่างน้ำอุ่นที่อุณหภูมิ 35-40 องศาเซลเซียส นาน 1-2 นาที ก่อนใช้สไลด์สะอาดตักขึ้นไปอบที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส นาน 10-12 ชั่วโมง แล้วจึงนำไปสู่ขั้นตอนการย้อมสีฮีมาทอกซิลินและสีอิโอซินตามวิธีการของ Bancroft (1967) และศึกษาผลการเปลี่ยนแปลงทางพยาธิสภาพของเนื้อเยื่อด้วยกล้องจุลทรรศน์พร้อมบันทึกกำลังขยาย

6. การศึกษาสภาวะที่เหมาะสมต่อการเจริญของปรสิตกลุ่ม hexamitid flagellates ในหลอดทดลอง

นำปรสิตกลุ่ม hexamitid flagellates ที่แยกจากปลาเทวดาด้วยเทคนิคปลอดเชื้อมาเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเซลล์ตามวิธีการที่ระบุในข้อ 3 และทำการถ่ายเชื้อ (subculture) ทุก 2 วัน ปรสิตที่ได้จะใช้เป็นปรสิตตั้งต้นสำหรับศึกษาการเจริญของปรสิตที่ระดับความเป็นกรด-ด่าง และอุณหภูมิต่าง ๆ โดยนำปรสิตที่บริสุทธิ์ใส่ลงในหลอดทดลองขนาด 50 มิลลิลิตร ที่บรรจุอาหารเลี้ยงเซลล์ ปริมาตร 10 มิลลิลิตร ที่มีระดับความเป็นกรด-ด่างต่างกัน คือ 5 6 7 8 9 และ 10 โดยให้มีจำนวนปรสิตเท่ากันทุกหลอด หลอดละ 2,500 เซลล์ต่อมิลลิลิตร นำหลอดทดลองที่เติมปรสิตแล้วไปบ่มที่อุณหภูมิ 5 10 20 25 และ 30 องศาเซลเซียส แล้วจึงนับจำนวนปรสิตที่เวลา 24 48 72 96 และ 120 ชั่วโมง ตามวิธีการของ Sangmaneedet และ Smith (2000) ทำการนับจำนวนปรสิตโดยการสุ่มเก็บตัวอย่างในอาหารเลี้ยงเซลล์ 2 ครั้ง ครั้งละ 50 ไมโครลิตร และฆ่าปรสิตโดยการเติมฟอร์มาลินความเข้มข้น 5 เปอร์เซ็นต์ ปริมาตร 50 ไมโครลิตร แล้วนับจำนวนตัวอย่างปรสิตด้วยสไลด์นับเม็ดเลือดและคำนวณผลที่ได้เป็นจำนวนปรสิตต่ออาหาร 1 มิลลิลิตร และค่าที่ได้จะนำมาเขียนกราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างจำนวนปรสิตกับอุณหภูมิและความเป็นกรด-ด่าง ที่เวลาต่าง ๆ กัน

7. การทดสอบความรุนแรงของโรคสไปโรนิวคลีโอซีสในปลาเทวดา

7.1 สัตว์ทดลอง

นำปลาเทวดาน้ำหนัก 1.81±0.44 กรัม มาเลี้ยงที่ศูนย์วิจัยสุขภาพสัตว์น้ำ คณะทรัพยากรธรรมชาติ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ ก่อนการทดลองทำการกำจัดปรสิตในตัวปลาโดยแช่ยาไดเมทริดาโซลที่ความเข้มข้น 4 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร เป็นเวลา 5 วัน และพักปลาไว้เพื่อปรับสภาพให้เข้ากับตู้ทดลองเป็นเวลา 7 วัน และสุ่มตรวจปรสิตในปลาเทวดาจำนวน 20 ตัว ก่อนการทดลองตามวิธีการในข้อ 2 และต้องไม่พบปรสิตในตัวปลา

7.2 วิธีการทดลอง

ทดสอบความรุนแรงของปรสิตกลุ่ม hexamitid flagellates ที่ทำให้ปลาตายครึ่งหนึ่ง (LD_{50}) โดยเตรียมตัวอย่างปรสิตที่แยกได้จากปลาเทวดาป่วยด้วยเทคนิคปลอดเชื้อมาเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเซลล์ตามวิธีการในข้อ 3 นำปรสิตที่เจริญในอาหารเลี้ยงเซลล์มาหมุนเหวี่ยง

ด้วยเครื่องหมุนเหวี่ยงที่ความเร็ว 1,500 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส นาน 10 นาที แล้วเจือจางปรสิตด้วยสารละลาย PBS (pH 7.4) ให้ได้จำนวน $1.1x10^3$, $4.2x10^3$, $1.20x10^4$, $4.6x10^4$, $1.12x10^5$, $4.5x10^5$ และ $1.25x10^6$ เซลล์ต่อมิลลิลิตร แล้วนำมาฉีดเข้าช่องท้องปลาเทวดาตัวละ 0.1 มิลลิลิตร จำนวน 5 ตัวต่อซ้ำ ทดลอง 3 ซ้ำ ต่อความเข้มข้น และชุดควบคุมฉีดด้วยสารละลาย PBS (pH 7.4) บันทึกอัตราการตายในแต่ละวันเป็นเวลานาน 14 วัน ยืนยันสาเหตุของการตายของปลาทุกตัวโดยการตรวจสอบปรสิตในปลาตายเช่นเดียวกับวิธีการในข้อ 2 และนำมาคำนวณหาค่า 14 days-LD_{50} ตามวิธีการของ Reed และ Muench (1938) และในระหว่างการทดสอบความรุนแรงของปรสิตในปลาเทวดาจะทำการวิเคราะห์คุณภาพน้ำพื้นฐาน ได้แก่ อุณหภูมิของน้ำโดยใช้เทอร์โมมิเตอร์ ความเป็นกรด-ด่าง (pH) โดยใช้เครื่อง pH meter ปริมาณออกซิเจนละลายน้ำโดยใช้เครื่อง DO Meter และค่าความเป็นด่าง

8. การยอมรับปรสิตกลุ่ม hexamitid flagellates ในปลาสวยงามชนิดอื่น ๆ

ทดสอบการยอมรับปรสิตกลุ่ม hexamitid flagellates ในปลาสวยงามชนิดอื่น ๆ ได้แก่ ปลาทอง ปลาหางนกยูง และปลาแพลทตี้ที่ผ่านการตรวจสอบปรสิตและไม่มีการติดปรสิตกลุ่มนี้ โดยเตรียมตัวอย่างปรสิตกลุ่ม hexamitid flagellates ที่แยกจากปลาเทวดาให้ได้ความเข้มข้นใกล้เคียงกับค่า LD_{50} ที่ได้จากการทดสอบในปลาเทวดาและนำมาฉีดเข้าช่องท้องปลาปกติชนิดต่าง ๆ จำนวน 10 ตัวต่อปลา 1 ชนิด ส่วนชุดควบคุมฉีดด้วยสารละลาย PBS (pH 7.4) ทดลอง 3 ซ้ำ ซ้ำละ 10 ตัว และเก็บข้อมูลโดยการบันทึกอัตราการตายเป็นเวลานาน 10 วัน ปลาที่รอดชีวิตจะนำไปตรวจสอบการคงอยู่ของปรสิตในตัวปลาโดยใช้วิธีการเช่นเดียวกับข้อ 2 และในระหว่างการทดสอบการยอมรับปรสิตกลุ่ม hexamitid flagellates ในปลาสวยงามชนิดอื่น ๆ จะทำการวิเคราะห์คุณภาพน้ำพื้นฐานได้แก่ อุณหภูมิของน้ำโดยใช้เทอร์โมมิเตอร์ ความเป็นกรด-ด่าง (pH) โดยใช้เครื่อง pH meter ปริมาณออกซิเจนละลายน้ำโดยใช้เครื่อง DO Meter และค่าความเป็นด่าง

9. การควบคุมโรคสไปโรนิวคลีโอซีสโดยการใช้ยาและสารเคมี

ศึกษาการควบคุมโรคสไปโรนิวคลีโอซีสในปลาเทวดาโดยใช้ยาและสารเคมีรวม 3 ชนิด ได้แก่ ยาไดเมทริดาโซล ยาเมโทรนิดาโซล และแมกนีเซียมซัลเฟต โดยแบ่งการทดลองออกเป็น 2 การทดลอง ได้แก่

9.1 การทดลองในหลอดทดลอง

9.1.1 การเตรียมยาและสารเคมี

เตรียมยาไดเมทริดาโซล และเมโทรนิดาโซลละลายด้วยสารทำละลายไดเมทิลซัลฟอกไซด์ (Hili *et al*., 1997) 1 เปอร์เซ็นต์ โดยเตรียมสารที่ความเข้มข้นเริ่มต้น 10,000 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร จากนั้นเจือจางด้วยน้ำกลั่นให้มีความเข้มข้นเท่ากับ 1,000 800 600 400 200 100 50 และ 25 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร และเตรียมแมกนีเซียมซัลเฟต ละลายด้วยน้ำกลั่น 1 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน จากนั้นเจือจางด้วยน้ำกลั่นให้มีความเข้มข้นเท่ากับ 1,000 800 600 400 200 100 50 และ 25 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร และเก็บที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียสจนกว่าจะนำไปใช้งาน

9.1.2 การเตรียมปรสิตกลุ่ม hexamitid flagellates

นำปรสิตกลุ่ม hexamitid flagellates ที่แยกจากปลาเทวดาด้วยเทคนิคปลอดเชื้อมาเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเซลล์ตามวิธีการในข้อ 3 จนเจริญถึงระยะ stationary phase จึงเจือจางให้ได้ปริมาณ 2,500 เซลล์ต่อมิลลิลิตร จากนั้นจึงถ่ายปรสิตลงในหลอดทดลองปลอดเชื้อเพื่อนำไปทดสอบต่อไป

9.1.3 การทดสอบประสิทธิภาพของยาและสารเคมีในการยับยั้งการเจริญของปรสิตกลุ่ม hexamitid flagellates ในหลอดทดลอง (*in vitro*)

เติมสารละลายยาไดเมทริดาโซลและเมโทรนิดาโซลที่เตรียมไว้ลงในหลอดทดลองที่เตรียมปรสิตไว้ในอัตราส่วน 1:100 (สารละลายยา 50 ไมโครลิตร:อาหารเลี้ยงเซลล์ 4,950 ไมโครลิตร) จะได้ยาความเข้มข้นสุดท้ายตั้งแต่ 0.25 0.50 1.0 2.0 4.0 6.0 8.0 และ 10 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร และเติมสารละลายแมกนีเซียมซัลเฟตให้ได้ความเข้มข้นสุดท้ายตั้งแต่ 2.5 5.0.10 20 40 60 80 และ 100 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ทำการทดสอบ 3 ซ้ำ แล้วนำแต่ละหลอดไปบ่มที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส และบันทึกจำนวนปรสิตโดยการนับจำนวนปรสิตทุก 24 ชั่วโมง จนกว่าปรสิตในชุดทดลองหรือชุดควบคุมจะตาย ตามวิธีการของ Sangmaneedet และ Smith (1999)

9.2 **การทดลองในปลาเทวดา** (*in vivo*)

คัดเลือกยาและสารเคมีที่มีประสิทธิภาพดีที่สุดที่ได้จากการทดลองในหลอดทดลองและนำไปประยุกต์ใช้ในปลาเทวดาที่ติดปรสิตกลุ่ม hexamitid flagellates ตามธรรมชาติ โดยสุ่มตรวจปริมาณปรสิตกลุ่ม hexamitid flagellates ในตัวปลาก่อนทำการทดลอง 10 ตัว (ปริมาณปรสิตกลุ่ม hexamitid flagellates เท่ากับ $3.0x10^{3}$-$4.5x10^{5}$ ตัวต่อกรัมเนื้อเยื่อ) จากนั้นจึงแช่ยาดังกล่าวที่ความเข้มข้นต่าง ๆ คือ 0 0.25 0.5 1.0 2.0 4.0 6.0 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร เป็นเวลา 9 วัน โดยไม่มีการเปลี่ยนถ่ายน้ำ ทำการทดสอบ 2 ซ้ำ ซ้ำละ 45 ตัว และสุ่มตรวจปรสิตกลุ่ม hexamitid flagellates ในตัวปลาความเข้มข้นละ 10 ตัวต่อวัน ตามวิธีการในข้อ 2 พร้อมทั้งสังเกตและบันทึกอาการรวมทั้งอัตราการตายของปลาเทวดาที่ได้รับยาความเข้มข้นต่าง ๆ เปรียบเทียบกับชุดควบคุมซึ่งไม่ได้รับยา

บทที่ 3

ผลการทดลอง

3.1 โรคสไปโรนิวคลีโอซีสในปลาสวยงาม

การศึกษาโรคสไปโรนิวคลีโอซีสในปลาสวยงาม 4 ชนิด คือ ปลาเทวดา ปลาออสการ์ ปลาหมอสีและปลากัด พบปรสิตกลุ่ม hexamitid flagellates บริเวณโคนครีบหาง ครีบหาง ผิวลำตัว และในอวัยวะภายใน ได้แก่ ตับ ถุงน้ำดี หัวใจ ลำไส้ ม้าม กระเพาะอาหาร (ภาคผนวก ข 2) และพบอัตราการติดเชื้อในปลาเทวดา ปลาออสการ์ ปลาหมอสีและปลากัด คิดเป็น ร้อยละ 90.0 75.4 61.0 และ 0 ตามลำดับ (ตารางที่ 3) ปลาที่มีการติดปรสิตรุนแรงมักพบอาการสีลำตัวซีดหรือคล้ำกว่าปกติ ว่ายน้ำผิดปกติ ท้องบวม เซื่องซึม ตกเลือดบริเวณรูทวาร ซูบผอม (ภาพที่ 6A, B) เจริญเติบโตช้ากว่าปกติ บริเวณลำตัวมีเมือกมาก มีแผลเปื่อยบริเวณโคนครีบหาง การสึกกร่อนของครีบหาง มูลปลามีสีขาว เฉพาะปลาหมอสีพบมีรูบนหัว 1-2 รู และปลาบางส่วนทยอยตายซึ่งเป็นอาการเฉียบพลันที่มีสาเหตุมาจากการขนส่ง การเคลื่อนย้าย การจับ ความหนาแน่นสูง ปริมาณออกซิเจน อุณหภูมิหรือคุณภาพน้ำที่เปลี่ยนแปลง จนทำให้ปลาเครียด ประกอบกับปลาอาจมีการติดเชื้อชนิดอื่นร่วมด้วย ส่งผลให้ปลาอ่อนแอ มีการติดเชื้อรุนแรงมากขึ้น จนแสดงอาการของโรคและตายในที่สุด แต่ส่วนใหญ่มักพบปรสิตได้ในปลาที่มีลักษณะอาการภายนอกปกติ อวัยวะภายในของปลาที่ติดปรสิตพบตับมีสีซีด ลีบเล็กกว่าปกติ มีของเหลวในช่องท้องและมีกลิ่นเหม็น ลำไส้บวมพอง อักเสบ ตรวจพบปรสิตจำนวนมากในลำไส้ โดยพบการตายค่อนข้างสูงในปลาเทวดา (ภาพที่ 7) และจากการตรวจสอบปรสิตภายนอกบริเวณ เกล็ด ครีบ ผิวลำตัว ตา เหงือก ของปลาสวยงาม 4 ชนิด คือ ปลาเทวดา ปลาออสการ์ ปลาหมอสีและปลากัด พบปรสิตภายนอก ได้แก่ *Vorticella* sp., *Oodinium* sp., *Trichodina* sp. และ *Dactylogyrus* sp. การตรวจสอบการติดเชื้อแบคทีเรียพบ *Aeromonas hydrophila* ในปลาหมอสีและปลาออสการ์ *Serratia plymuthica* ในปลากัด และ *Citrobacter freundii* ในปลาเทวดา คุณภาพน้ำระหว่างการตรวจสอบมีอุณหภูมิในช่วง 26-27 องศาเซลเซียส ความเป็นกรด-ด่าง ในช่วง 6.90-7.20

ปริมาณออกซิเจนละลายน้ำในช่วง 6-7 มิลลิกรัมต่อลิตร และความเป็นด่าง ในช่วง 17-24 มิลลิกรัมต่อลิตร (ภาคผนวก ข 1)

ตารางที่ 3 อัตราการติดเชื้อปรสิตกลุ่ม hexamitid flagellates ในปลาสวยงามที่ศึกษา

เจ้าบ้าน	เปอร์เซ็นต์การติดเชื้อ (จำนวนปลาที่ติดเชื้อ/จำนวนปลาทั้งหมด)	อวัยวะที่ติดเชื้อ
ปลาเทวดา	90.0 (109/121)	ผิวลำตัว ครีบหาง ลำไส้ ตับ ม้าม หัวใจ กระเพาะอาหาร ถุงน้ำดี
ปลาออสการ์	75.4 (83/110)	ผิวลำตัว ครีบหาง ลำไส้ ตับ ม้าม หัวใจ กระเพาะอาหาร ถุงน้ำดี
ปลาหมอสี	61.0 (61/100)	ผิวลำตัว ลำไส้ ตับ ม้าม หัวใจ กระเพาะอาหาร ถุงน้ำดี
ปลากัด	0 (0/98)	-

3.2 การเลี้ยงปรสิตกลุ่ม hexamitid flagellates ในหลอดทดลอง

สามารถเลี้ยงปรสิตกลุ่ม hexamitid flagellates ที่แยกได้จากลำไส้ปลาเทวดาป่วยสำเร็จในอาหารเลี้ยงเซลล์ โดยปรสิตสามารถมีชีวิตและแบ่งตัวเพิ่มจำนวนมากขึ้นหลังการต่อเชื้อ 24 ชั่วโมง และตายภายใน 4 วัน ถ้าไม่ทำการถ่ายเชื้อลงในอาหารใหม่ แต่จากการศึกษาครั้งนี้ไม่ประสบความสำเร็จในการเลี้ยงปรสิตที่แยกได้จากลำไส้ปลาออสการ์และปลาหมอสีในอาหารเลี้ยงเซลล์สูตรเดียวกัน โดยปรสิตไม่มีการเพิ่มจำนวนและเคลื่อนที่ในอาหารเลี้ยงเซลล์เมื่อสังเกตภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบหัวกลับหลังการต่อเชื้อที่เวลา 24 ชั่วโมง

3.3 การจำแนกชนิดปรสิตกลุ่ม hexamitid flagellates ในปลาเทวดา

1) การตรวจวินิจฉัยภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบธรรมดา

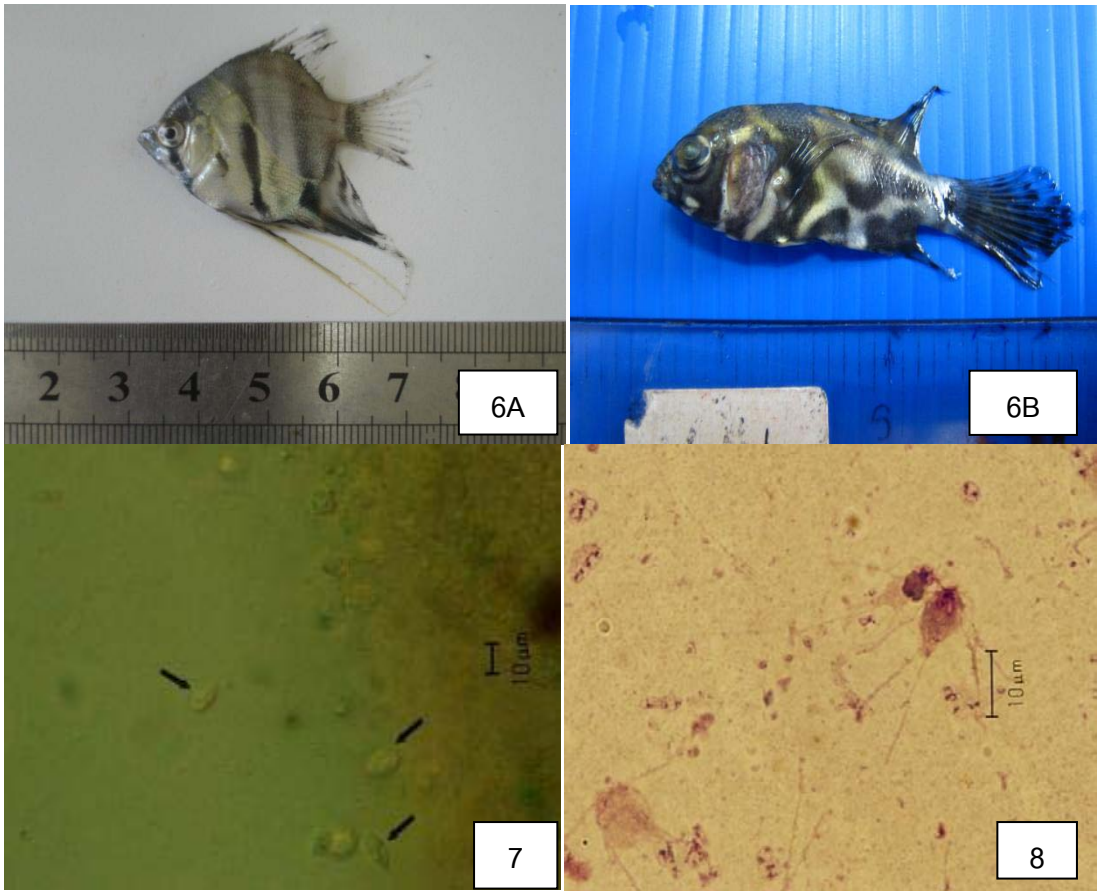
การศึกษาลักษณะรูปร่างของปรสิตที่แยกได้จากปลาเทวดาโดยใช้กล้องจุลทรรศน์พบว่าปรสิตที่พบเคลื่อนที่เร็ว มีรูปร่างยาวรีจนถึงรูปไข่ ลักษณะหัวท้ายค่อนข้างแหลม โทรโฟซอยท์มีความยาว 9.0-16.0 ไมโครเมตร (12.86±1.51) ความกว้าง 3.0-10.0 ไมโครเมตร (6.52±1.11) (n=50) (ภาพที่ 7) โทรโฟซอยท์ที่ย้อมสีดิฟควิกมีความยาว 11.0-17.0 ไมโครเมตร (13.42±1.32) ความกว้าง 5.0-11.0 ไมโครเมตร (6.28±1.24) (n=50) (ภาพที่ 8) ดังตาราง ภาคผนวก ข 3 ลักษณะของปรสิตที่พบมีความคล้ายคลึงกับปรสิตสกุล *Spironucleus* sp. ซึ่งจากการศึกษาพบว่าปรสิตมีนิวเคลียสเรียวยาวเป็นรูปตัวเอส (S-shaped) จำนวน 2 อัน ตั้งอยู่บริเวณส่วนหัวของเซลล์ มีแฟลกเจลลาทั้งหมด 8 เส้น แบ่งเป็นด้านหน้า (anterior) 6 เส้น และด้านท้าย (posterior) 2 เส้น (ภาพที่ 8)

2) การตรวจวินิจฉัยโดยใช้เทคนิคทางจุลทรรศน์อิเลคตรอน

การศึกษาลักษณะโทรโฟซอยท์ของปรสิตที่แยกได้จากปลาเทวดาโดยใช้กล้องจุลทรรศน์อิเลคตรอนแบบส่องกราด พบว่าโทรโฟซอยท์มีขนาดเล็กลงเล็กน้อย และใกล้เคียงกับขนาดของปรสิตที่ยังมีชีวิต มีความยาวเฉลี่ยประมาณ 10.5 ไมโครเมตร (8.5-12.5 ไมโครเมตร) และความกว้างเฉลี่ยประมาณ 3.05 ไมโครเมตร (2.5-4.6 ไมโครเมตร) (ภาคผนวก ข 3) เมื่อตรวจสอบลักษณะของผิวภายนอกพบว่ามีผิวลำตัวเรียบประดับด้วยเลเทอรัลริดจ์ (lateral ridge) ที่อยู่บริเวณด้านข้างลำตัวทั้งสองด้านชัดเจน บริเวณปลายสุดของเซลล์เป็นรูปโค้ง (posterior end swirled) โดยมีลักษณะเป็นรูปพระจันทร์เสี้ยว (crescent-shaped) มีพาพิลลัม (papillum) และช่องเปิดของแฟลกเจลลาพอกเก็ต (flagellar pockets) บริเวณส่วนท้ายของเซลล์ ส่วนของแฟลกเจลลา 6 เส้นที่อยู่ด้านบนพบอยู่บริเวณกึ่งกลางค่อนไปทางด้านล่างของด้านเปิดของไซโตสโตม (cytostome) และแฟลกเจลลาอีก 2 เส้น ที่อยู่ด้านล่างยื่นพ้นออกมาจากส่วนปลายสุดของด้านล่างของลำตัว (ภาพที่ 9)

เมื่อศึกษาด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเลคตรอนแบบส่องผ่าน พบว่าบริเวณส่วนหัวของเซลล์มีนิวเคลียสเรียวยาวเป็นรูปตัวเอส (S-shape) เซลล์แวคคิวโอลมีขนาดใหญ่อยู่ในตำแหน่งกึ่งกลางของเซลล์ ไคนีโตโซม (kinetosomes) อยู่ในตำแหน่งกึ่งกลางจากส่วนยอดของนิวเคลียสที่มีรูปร่างแบบตัวเอส มีรีเคอเรนท์แฟลกเจลลา (recurrent flagella) ที่หุ้มด้วยแฟลกเจลลาพอกเก็ตอยู่ในตำแหน่งระหว่างนิวเคลียสทั้ง 2 อัน และยาวไปจนถึงส่วนท้ายของเซลล์ มีซูปรานิวเคลียร์ไม

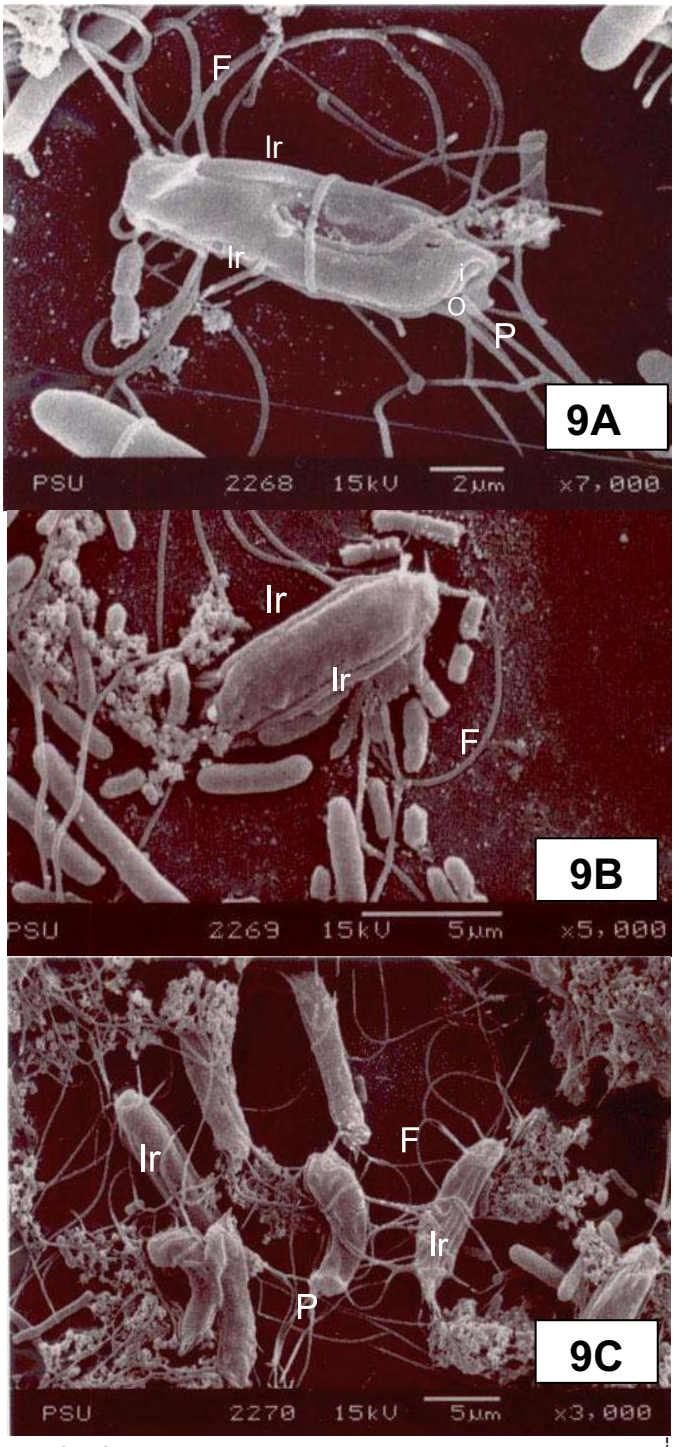
โครทูบูลา (supra nuclear microtubular) และอินฟรานิวเคลียร์ไมโครทูบูลา (infra nuclear microtubular) บริเวณส่วนหัวของเซลล์ จากลักษณะทั้งหมดจึงจำแนกชนิดของปรสิตได้เป็น *S. vortens* (ภาพที่ 10)



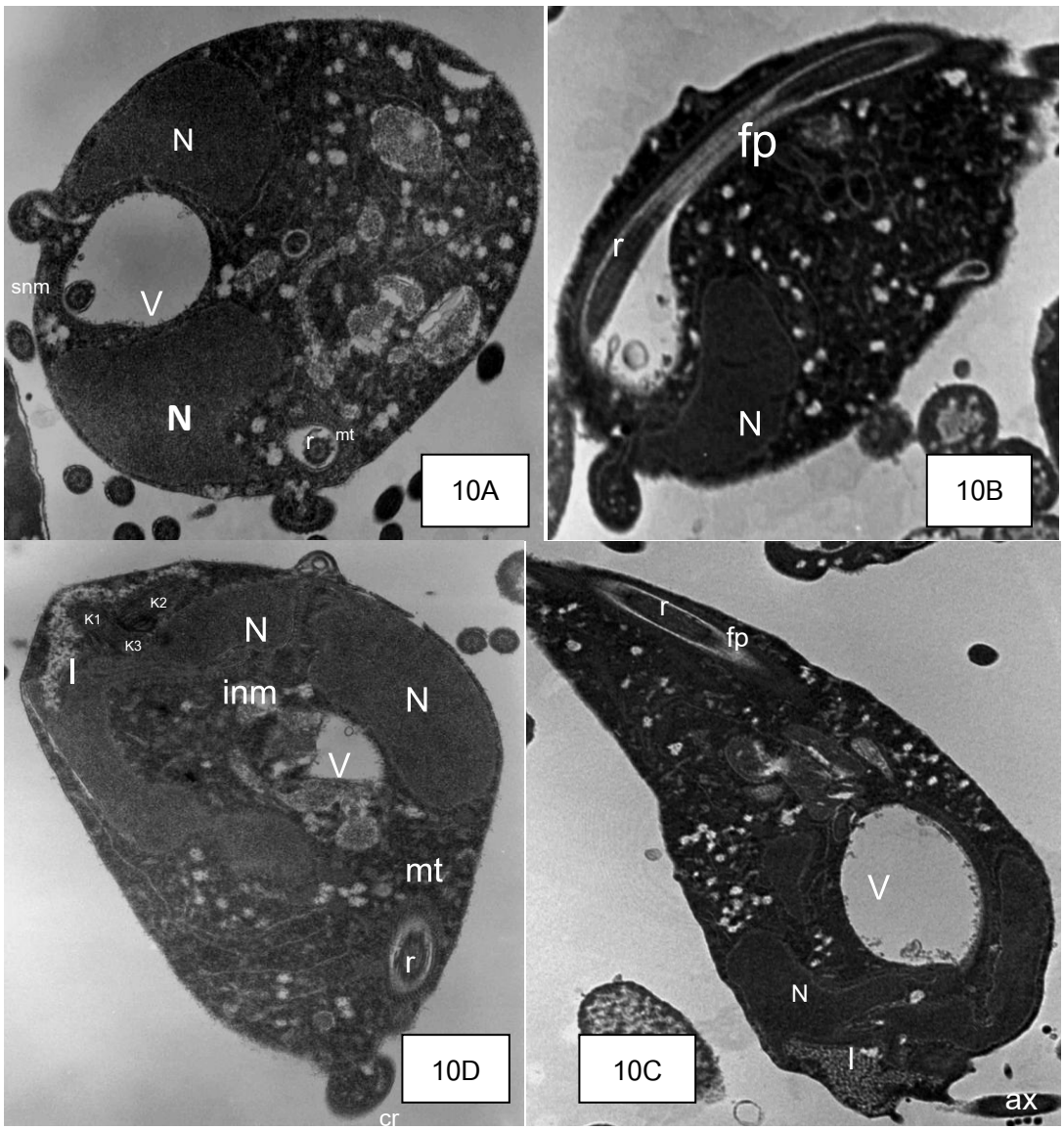
ภาพที่ 6 ปลาเทวดา (A) และปลาออสการ์ (B) ที่ติดปรสิต *Spironucleus* sp. อย่างรุนแรงมีลักษณะครีบกร่อน สีลำตัวซีด ซูบผอมและทยอยตายในที่สุด

ภาพที่ 7 ปรสิต *Spironucleus* sp. (ศรชี้) จำนวนมากในลำไส้ปลาเทวดา จากการเตรียมสไลด์สด (fresh impression smear) กำลังขยาย 40x (bar=10 µm)

ภาพที่ 8 โทรโฟซอยท์ของปรสิต *Spironucleus* sp. จากลำไส้ปลาเทวดาที่ผ่านการย้อมสีดิฟควิก กำลังขยาย 100x (bar=10 µm)



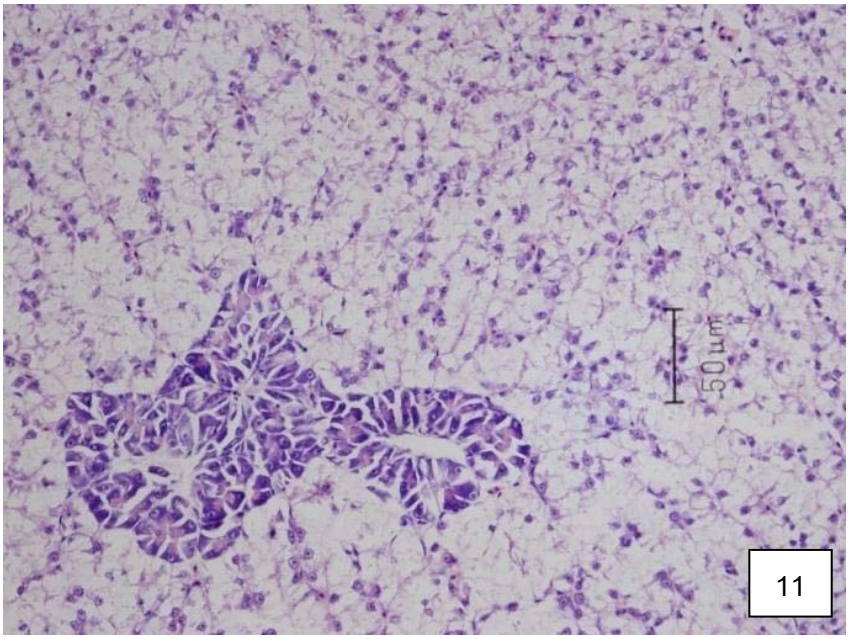
ภาพที่ 9 (A, B, C) โทรโฟซอยท์ของปรสิต *S. vortens* จากปลาเทวดาที่ศึกษาภายใต้กล้องจุลทรรศน์อิเลคตรอนแบบส่องกราด (lr=lateral ridge; F=flagella; P=posterior; O=opening of the flagellar pocket; i=isoneme)



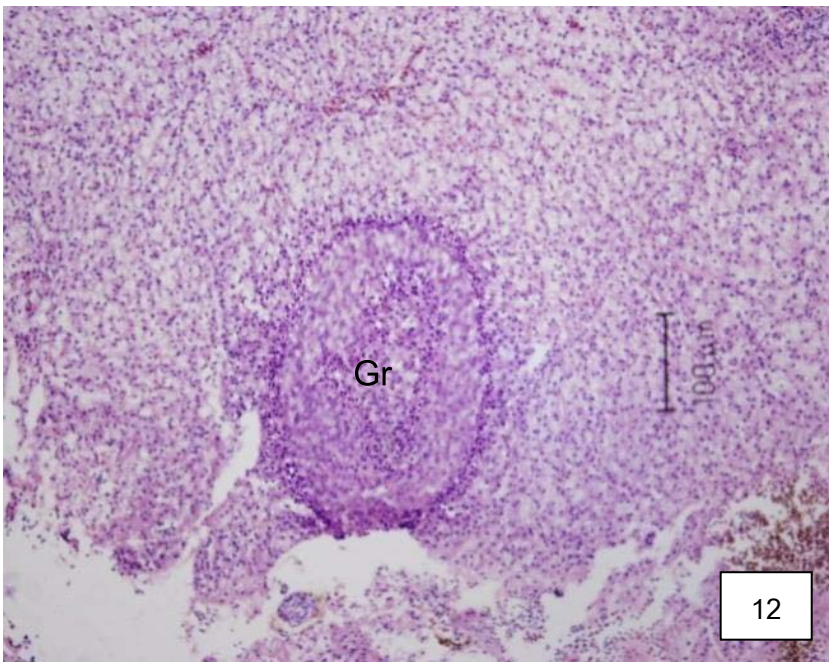
ภาพที่ 10 (A, B, C, D) แสดงลักษณะภายในเซลล์ของปรสิต *S. vortens* จากปลาเทวดาที่ศึกษาภายใต้กล้องจุลทรรศน์อิเลคตรอนแบบส่องผ่าน (N = nucleus; K = kinetosome; V = vacuole; r = recurrent flagella; fp = flagellar pockets; snm = supra nuclear microtubular; inm = infra nuclear microtubular; cr =central ridge; mt = microtubule; ax = axoneme of anterior flagella; l = lamella)

3.4 การเปลี่ยนแปลงทางพยาธิสภาพ

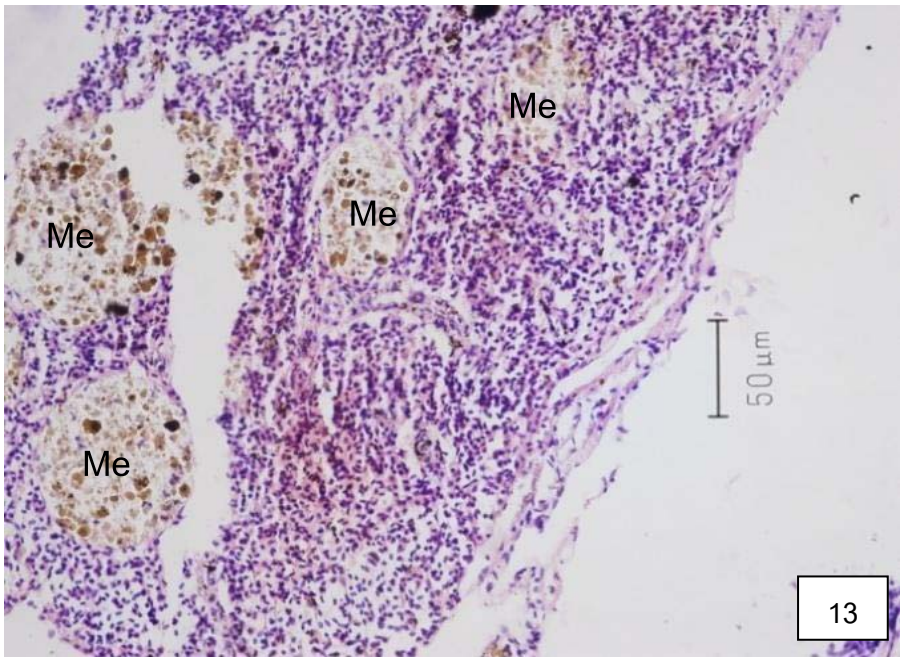
การเปลี่ยนแปลงทางพยาธิสภาพของเนื้อเยื่อปลาเทวดาที่ติดปรสิต *S. vortens* พบการเกิดกรานูโลมา (granuloma) ในตับ (ภาพที่ 12) เป็นจำนวนมากซึ่งแตกต่างอย่างเห็นได้ชัดเมื่อเปรียบเทียบกับปลาเทวดาปกติ (ภาพที่ 11) เกิดเมลาโนแมคโครฟาจ (melanomacrophage) ในม้าม (ภาพที่ 13) และพบการอักเสบในลำไส้ (ภาพที่ 14) การศึกษาครั้งนี้ไม่พบการเปลี่ยนแปลงทางพยาธิสภาพของเนื้อเยื่อปลาหมอสีและปลาออสการ์ที่ติดปรสิตกลุ่ม hexamitid flagellates เนื่องจากมีอัตราการติดเชื้อและปริมาณปรสิตที่พบในตัวปลาน้อยกว่าที่พบในปลาเทวดาประกอบกับสุขภาพของปลาที่สามารถต้านทานโรคตามธรรมชาติได้



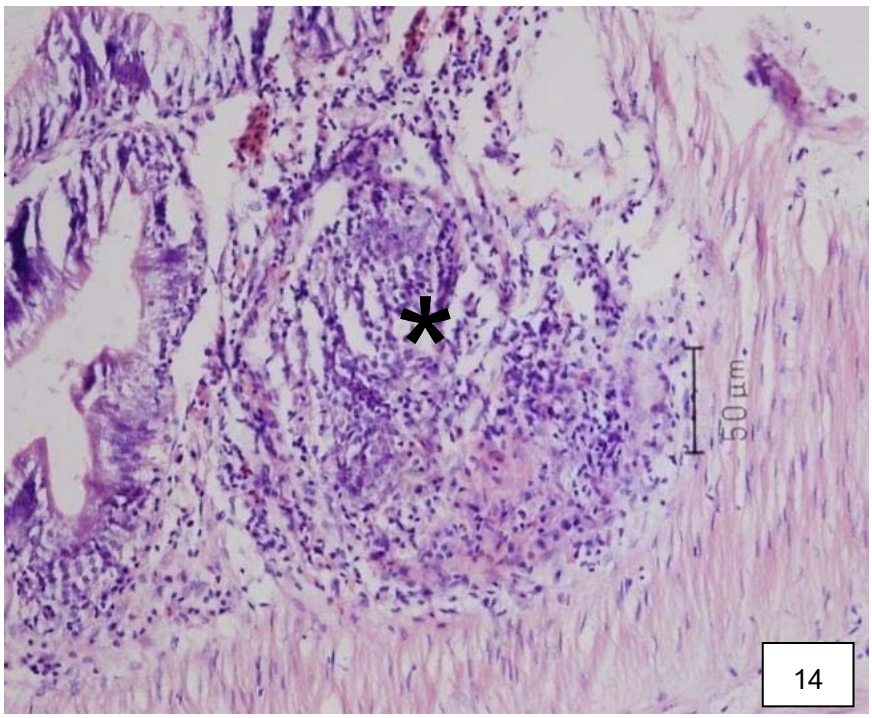
ภาพที่ 11 เนื้อเยื่อตับปลาเทวดาแสดงลักษณะตับและตับอ่อนปกติ กำลังขยาย 20x (H&E, bar=50 µm)



ภาพที่ 12 เกิดกรานูโลมา (Gr) ในตับปลาเทวดาที่ติดปรสิต *S. vortens* กำลังขยาย 20x (H&E, Bar=100 µm)



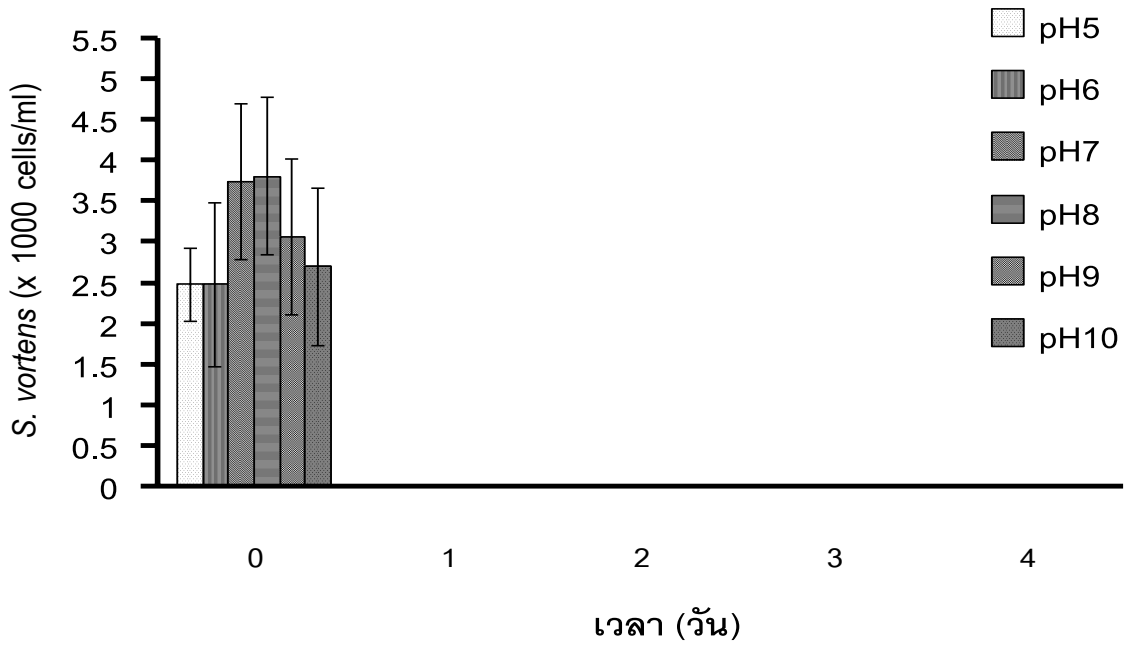
ภาพที่ 13 การเกิดเมลาโนมาโครฟาจ (Me) เป็นจำนวนมากในม้ามของปลาเทวดาที่ติดปรสิต *S. vortens* กำลังขยาย 20x (H&E, bar=50 µm)



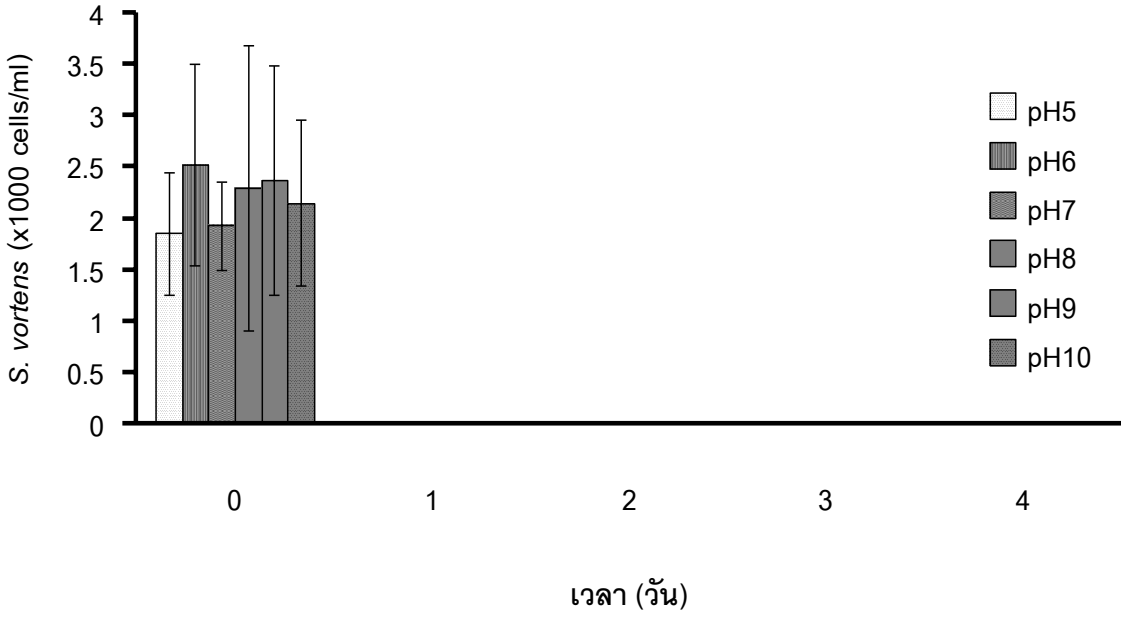
ภาพที่ 14 เกิดการอักเสบ (*) ในลำไส้ปลาเทวดาที่ติดปรสิต *S. vortens* กำลังขยาย 20x (H&E, bar=50 µm)

3.5 การศึกษาสภาวะที่เหมาะสมต่อการเจริญของปรสิต *S. vortens* ในหลอดทดลอง

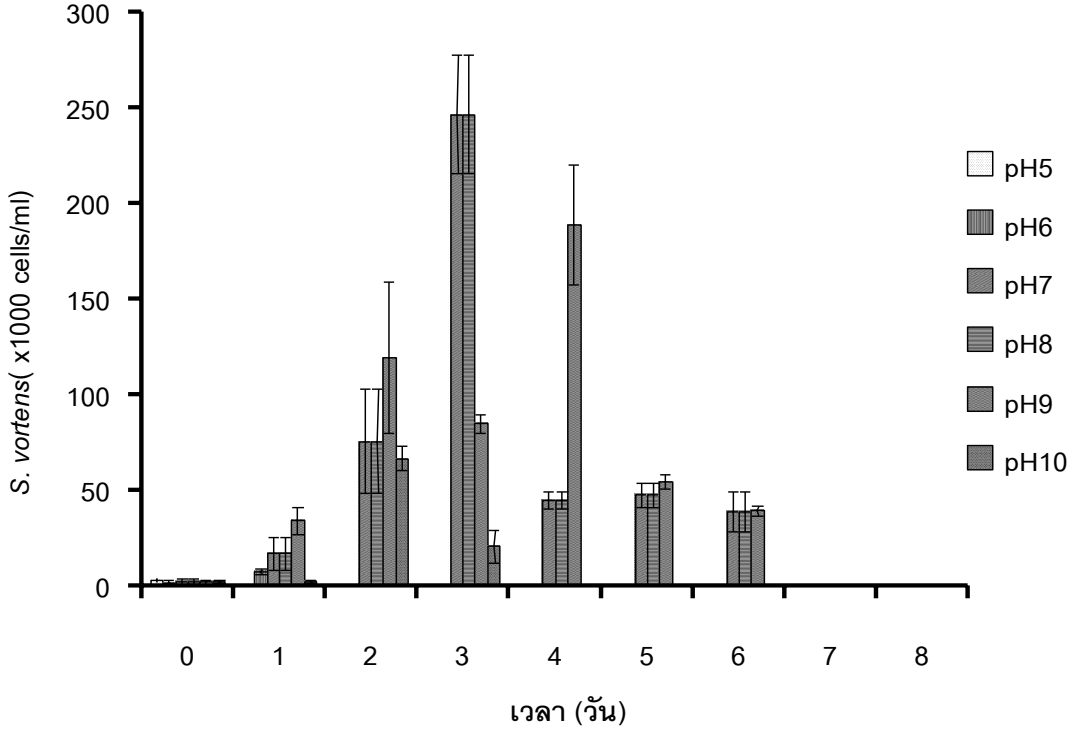
การศึกษาสภาวะที่เหมาะสมต่อการเจริญของปรสิตในอาหารเลี้ยงเซลล์ พบว่าปรสิต *S. vortens* ที่แยกจากลำไส้ปลาเทวดาสามารถเจริญได้ที่อุณหภูมิ 20-30 องศาเซลเซียส และความเป็นกรด-ด่าง 7-9 โดยปรสิตจะเจริญได้ดีที่สุดที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส และความเป็นกรด-ด่าง 7.0 มีการแบ่งตัวเพิ่มจำนวนได้มากที่สุดในวันที่ 3 เมื่อเวลาผ่านไปปริมาณปรสิตจะเริ่มลดลงจนถึงเวลา 9 วัน โดยปรสิตไม่สามารถเจริญได้ที่อุณหภูมิ 5 และ 10 องศาเซลเซียส ที่ทุกระดับความเป็นกรด–ด่าง (ภาพที่ 15-20) และยังพบระยะซีสต์ของปรสิตที่อุณหภูมิ 20 และ 25 องศาเซลเซียส ในระหว่างการเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเซลล์



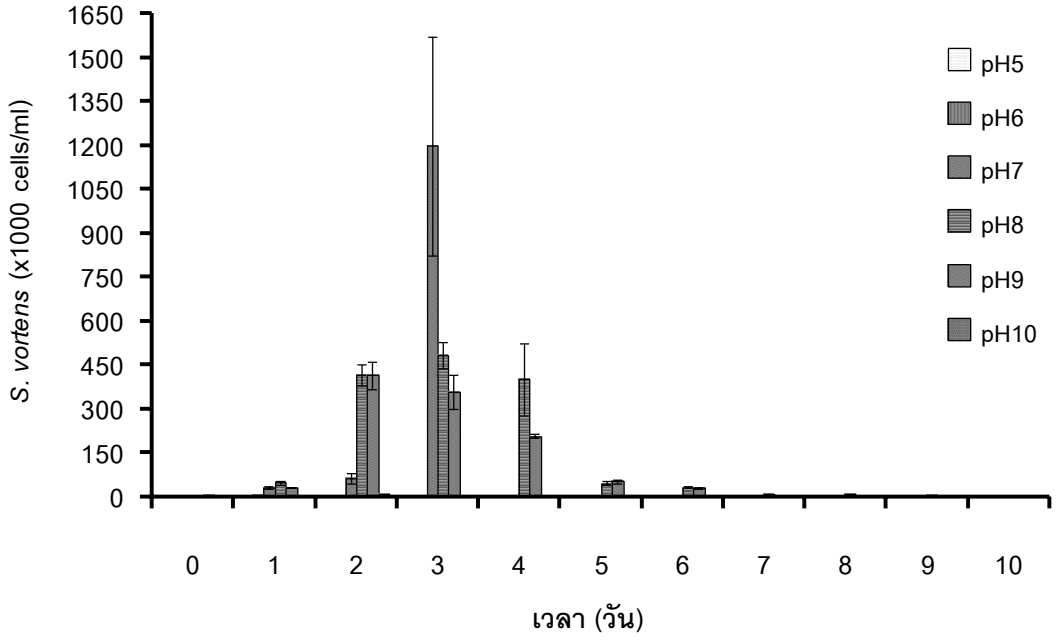
ภาพที่ 15 ปรสิต *S. vortens* ที่เจริญในอาหารเลี้ยงเซลล์ที่อุณหภูมิ 5 องศาเซลเซียส และที่ระดับความเป็นกรด-ด่าง ต่าง ๆ



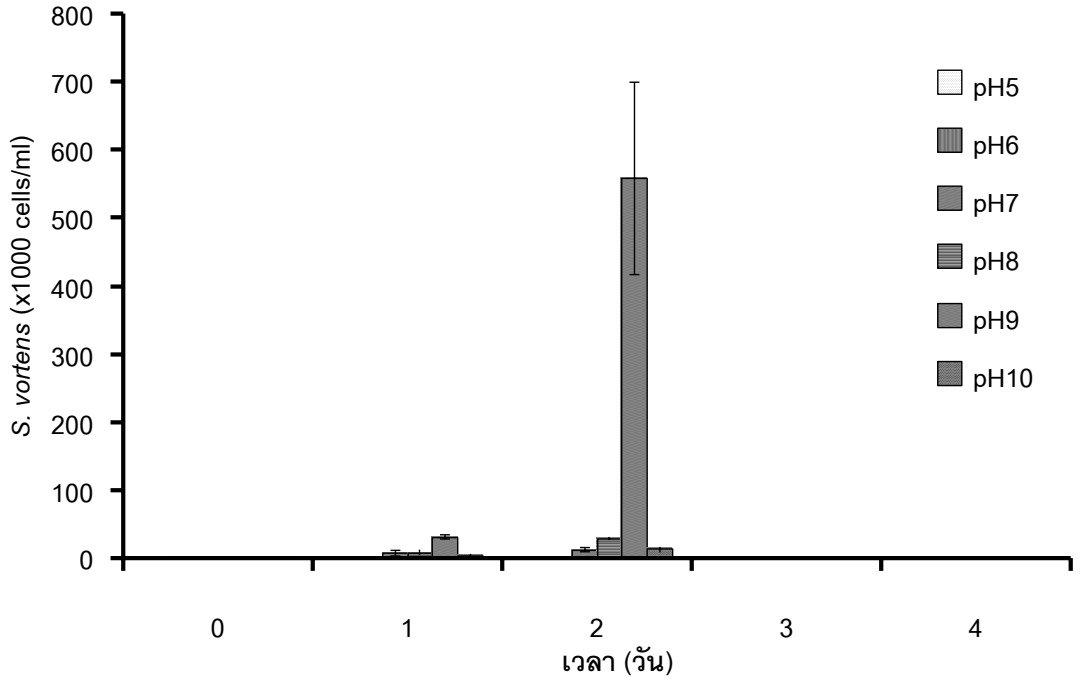
ภาพที่ 16 ปรสิต *S. vortens* ที่เจริญในอาหารเลี้ยงเซลล์ที่อุณหภูมิ 10 องศาเซลเซียส และที่ระดับความเป็นกรด-ด่าง ต่าง ๆ



ภาพที่ 17 ปรสิต *S. vortens* ที่เจริญในอาหารเลี้ยงเซลล์ที่อุณหภูมิ 20 องศาเซลเซียส และที่ระดับความเป็นกรด-ด่าง ต่าง ๆ



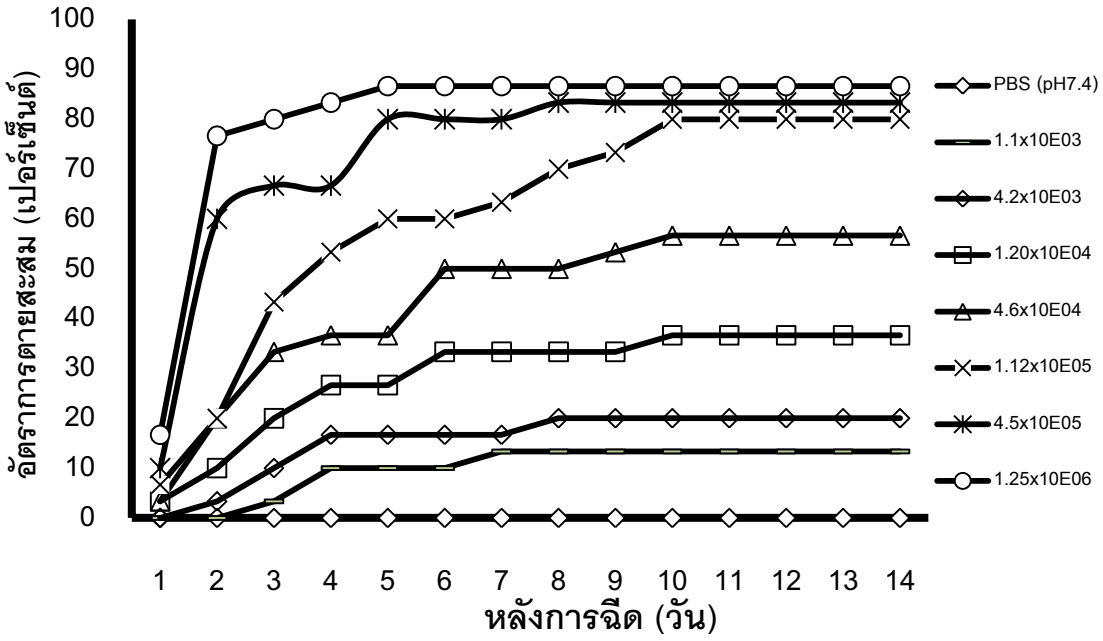
ภาพที่ 18 ปรสิต *S. vortens* ที่เจริญในอาหารเลี้ยงเซลล์ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส และที่ระดับความเป็นกรด-ด่าง ต่าง ๆ



ภาพที่ 19 ปรสิต *S. vortens* ที่เจริญในอาหารเลี้ยงเซลล์ ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส และที่ระดับความเป็นกรด-ด่าง ต่าง ๆ

3.6 การทดสอบความรุนแรงของโรคสไปโรนิวคลีโอซีสในปลาเทวดา

จากการทดสอบการติดปรสิต *S. vortens* ด้วยวิธีการฉีดเข้าช่องท้องปลาเทวดาปกตินำ้หนัก 1.81±0.40 กรัม ที่เลี้ยงในนำ้ที่มีอุณหภูมิในช่วง 26.5-28.5 องศาเซลเซียส ความเป็นกรด-ด่าง ในช่วง 7.27-7.88 ความเป็นด่างของนำ้ในช่วง 14-27 มิลลิกรัมต่อลิตร (ภาคผนวก ข 11) พบว่าหลังการติดเชื้อปลามีอาการอ่อนแอ หลบตามมุมตู้ ว่ายนำ้ผิดปกติ ครีบกางออก ท้องบวม ขี้ขาว เมื่อผ่าท้องพบมีกลิ่นเหม็น มีของเหลวในช่องท้อง ลำไส้บวมพอง ตับซีด ตกเลือด ม้ามมีสีผิดปกติ แต่ไม่พบลักษณะแผลหลุมบริเวณผิวลำตัว การตรวจสอบปลาใกล้ตายจากการติดเชื้อหรือปลาตายใหม่ ๆ พบปรสิตจำนวนมากในอวัยวะภายใน ได้แก่ ลำไส้ ตับ ถุงนำ้ดี กระเพาะอาหาร ม้าม และหัวใจ ซึ่งจากการทดลองการติดเชื้อแสดงให้เห็นว่าปรสิตชนิดนี้สามารถก่อโรคอย่างรุนแรงในปลาเทวดาปกติที่เลี้ยงภายในห้องทดลอง เมื่อสิ้นสุดการทดลองพบว่ามีค่าความรุนแรงของปรสิตที่ทำให้ปลาตายครึ่งหนึ่งภายในเวลา 14 วัน (14 days-LD_{50}) เท่ากับ $2.99x10^3$ เซลล์ ดังภาพที่ 20 (ตารางภาคผนวก ข 10)



ภาพที่ 20 อัตราการตายสะสมของปลาเทวดาหลังการฉีด *S. vortens* ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ

3.7 การทดสอบการยอมรับปรสิต *S. vortens* ในปลาสวยงามชนิดอื่น ๆ

การทดสอบการยอมรับปรสิต *S. vortens* ในปลาสวยงามชนิดอื่น ๆ ได้แก่ ปลาทอง ปลาหางนกยูงและปลาแพลทตี้ (ตารางที่ 4) พบว่าปลาทั้งสามชนิดที่เลี้ยงในน้ำที่มีอุณหภูมิในช่วง 27-28 องศาเซลเซียส ความเป็นกรด-ด่าง ในช่วง 7.01-7.89 ความเป็นด่างของน้ำในช่วง 8.0-30 มิลลิกรัมต่อลิตร และออกซิเจนละลายน้ำอยู่ในช่วง 6.9-7.5 มิลลิกรัมต่อลิตร (ภาคผนวก ข 12) ปลาทั้งสามชนิดไม่ยอมรับปรสิตชนิดดังกล่าว โดยปลาไม่แสดงอาการผิดปกติใด ๆ และไม่พบการตายภายหลังการฉีดเชื้อ การทดสอบยืนยันโดยการตรวจสอบปรสิตในตัวปลาที่รอดตายหลังการฉีดเชื้อนาน 10 วัน ก็ไม่พบปรสิตในตัวปลา แสดงให้เห็นว่าปลาทั้งสามชนิดไม่ยอมรับปรสิต *S. vortens* ที่แยกได้จากปลาเทวดา

ตารางที่ 4 การทดสอบการยอมรับปรสิต *S. vortens* และผลการตรวจสอบปรสิตหลังการฉีดเชื้อเป็นเวลา 10 วัน ในปลาสวยงามชนิดอื่น ๆ

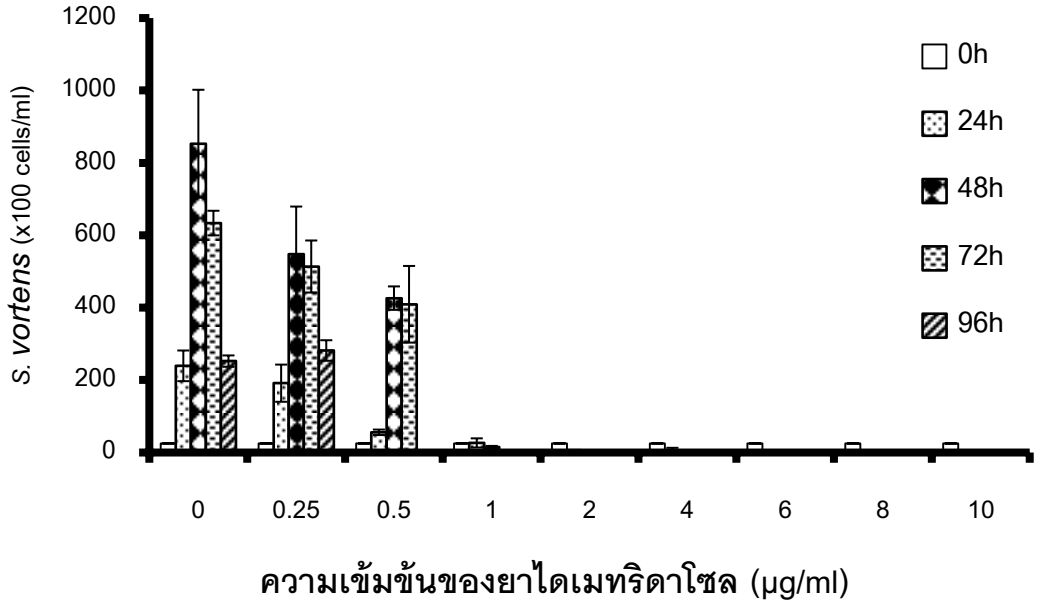
ชนิดปลา	ชุดการทดลอง	อัตราการตาย (เปอร์เซ็นต์)										ผลการตรวจปรสิต *S. vortens*
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	
ปลาทอง	control	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	N
	R1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	N
	R2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	N
	R3	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	N
ปลาแพลทตี้	Control	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	N
	R1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	N
	R2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	N
	R3	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	N
ปลาหางนกยูง	Control	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	N
	R1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	N
	R2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	N
	R3	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	N

*N= not found

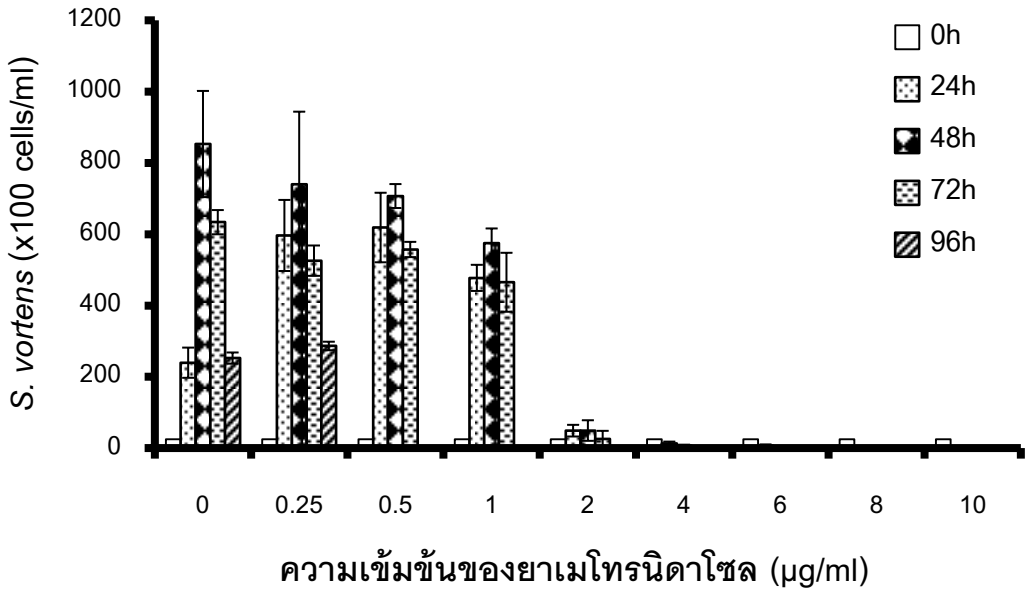
3.8 การทดสอบประสิทธิภาพของยาและสารเคมีในการยับยั้งการเจริญของปรสิต *S. vortens*

1) การทดลองในหลอดทดลอง

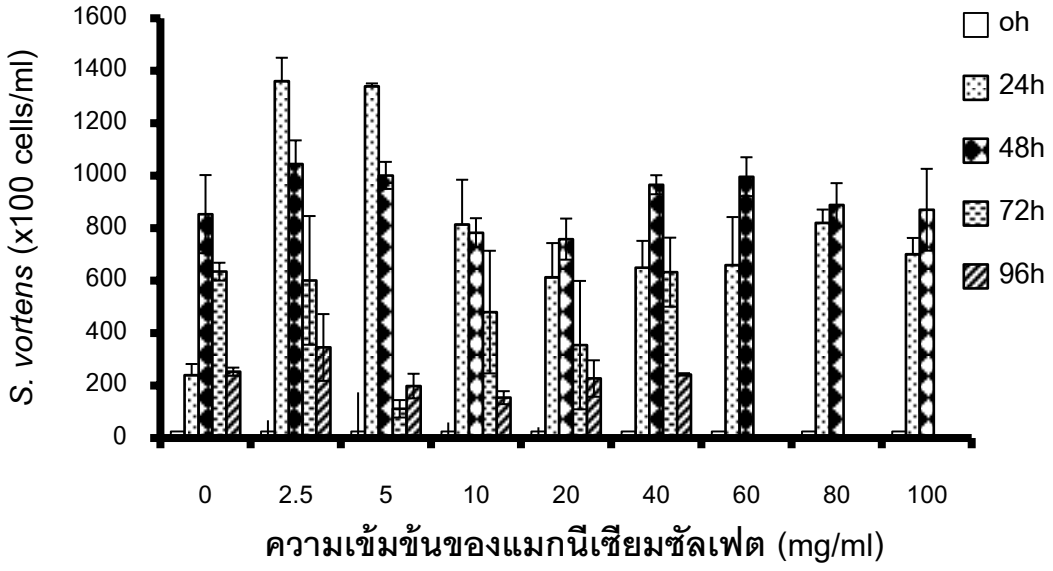
จากการทดสอบประสิทธิภาพของยาในการยับยั้งการเจริญของปรสิต *S. vortens* ในหลอดทดลองพบว่ายาไดเมทริดาโซลมีประสิทธิภาพดีที่ความเข้มข้นมากกว่าหรือเท่ากับ 4 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร สามารถลดจำนวนปรสิต *S. vortens* ได้ 100 เปอร์เซ็นต์ หลังให้ยานาน 48 ชั่วโมง (ภาพที่ 21) ยาเมโทรนิดาโซลมีประสิทธิภาพดีที่ความเข้มข้นมากกว่าหรือเท่ากับ 6 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร สามารถลดจำนวนปรสิต *S. vortens* ได้ 100 เปอร์เซ็นต์ หลังให้ยานาน 48 ชั่วโมง (ภาพที่ 22) และแมกนีเซียมซัลเฟตมีประสิทธิภาพดีที่ความเข้มข้นมากกว่าหรือเท่ากับ 60 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร สามารถลดจำนวนปรสิต *S. vortens* ได้ 100 เปอร์เซ็นต์ หลังให้ยานาน 72 ชั่วโมง (ภาพที่ 23)



ภาพที่ 21 ประสิทธิภาพของยาไดเมทริดาโซลในการยับยั้งการเจริญของปรสิต *S. vortens* ที่ระดับความเข้มข้นต่าง ๆ



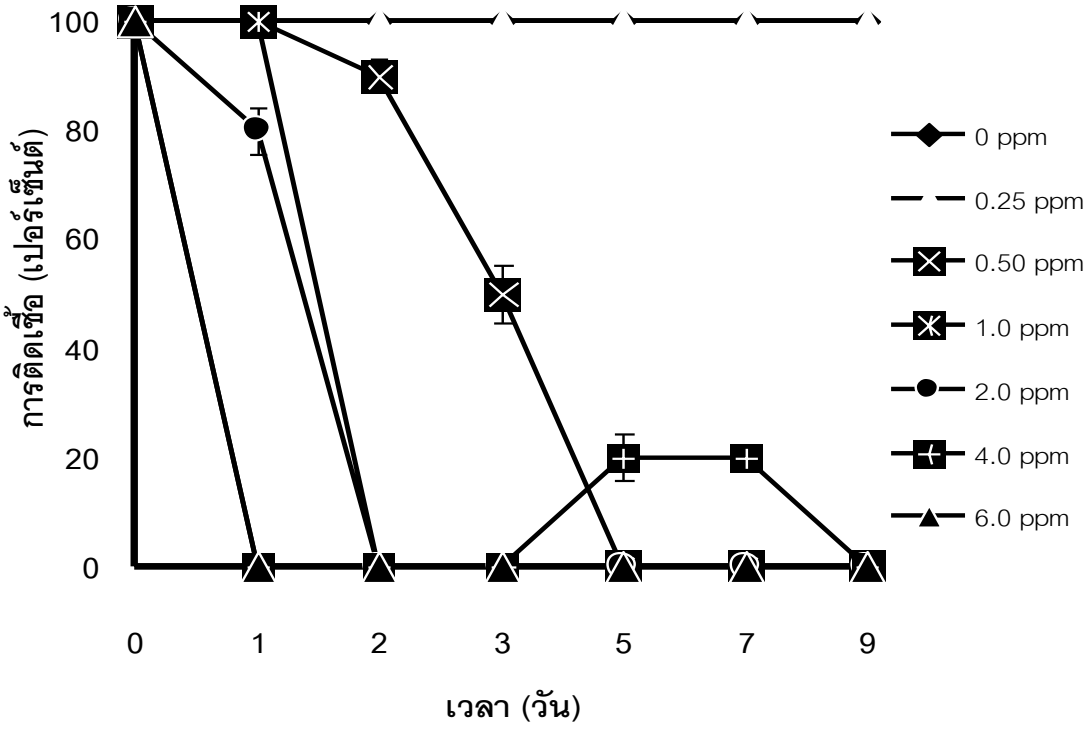
ภาพที่ 22 ประสิทธิภาพของยาเมโทรนิดาโซลในการยับยั้งการเจริญของปรสิต *S. vortens* ที่ระดับความเข้มข้นต่าง ๆ



ภาพที่ 23 ประสิทธิภาพของแมกนีเซียมซัลเฟตในการยับยั้งการเจริญของปรสิต *S. vortens* ที่ระดับความเข้มข้นต่าง ๆ

2) การทดลองในปลาเทวดา

การทดลองครั้งนี้ใช้ยาไดเมทริดาโซลสำหรับทดสอบประสิทธิภาพของยาในการยับยั้งการเจริญของปรสิต *S. vortens* ในตัวปลา เนื่องจากเป็นยาที่มีประสิทธิภาพดีที่สุด พบว่าเมื่อทดลองแช่ยาไดเมทริดาโซลที่ความเข้มข้น 0 0.25 0.50 1.0 2.0 4.0 และ 6.0 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ปลาเทวดาที่ติดปรสิต *S. vortens* ตามธรรมชาติที่ได้รับยาไดเมทริดาโซลที่ความเข้มข้นเท่ากับ 4 และ 6 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร สามารถยับยั้งการเจริญของปรสิต *S. vortens* ได้ 100 เปอร์เซ็นต์ หลังแช่ยานาน 1 วัน อย่างไรก็ตาม ตรวจพบปรสิตในตัวปลาหลังการแช่ยาความเข้มข้น 4 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร หลังแช่ยานาน 5 และ 7 วัน คิดเป็น 20 เปอร์เซ็นต์ ของการติดเชื้อ (พบปรสิตในตัวปลาเพียง 1-2 เซลล์ต่อตัวปลา) ส่วนยาความเข้มข้นเท่ากับ 1 และ 2 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร สามารถยับยั้งการเจริญของปรสิต *S. vortens* ได้ 100 เปอร์เซ็นต์ หลังแช่ยานาน 2 วัน ยาความเข้มข้นเท่ากับ 0.5 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร สามารถยับยั้งการเจริญของปรสิต *S. vortens* ได้ 100 เปอร์เซ็นต์ หลังแช่ยานาน 5 วัน และยาความเข้มข้นเท่ากับ 0.25 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ไม่สามารถยับยั้งการเจริญของปรสิต *S. vortens* ได้ หลังแช่ยานาน 9 วัน (ภาพที่ 24)



ภาพที่ 24 ประสิทธิภาพของยาไดเมทริดาโซลในการยับยั้งการเจริญของปรสิต *S. vortens* ในปลาเทวดา

บทที่ 4

วิจารณ์ผลการทดลอง

4.1 โรคสไปโรนิวคลีโอซีสในปลาสวยงาม

โรคสไปโรนิวคลีโอซีสสร้างปัญหาอย่างมากต่อการเพาะเลี้ยงปลาทั้งในปลาน้ำจืดและปลาทะเลในเขตหนาวจนถึงเขตอบอุ่น (Ferguson, 1979; Poynton and Morrison, 1990; Kent *et al*., 1992; Poynton *et al*., 1995; Sterud, 1998a, b, c) ปัจจุบันพบว่าปรสิต *Spironucleus* sp. จัดเป็น hexamitid flagellates กลุ่มหลักที่ก่อโรค มีเพียงบางชนิดในสกุล *Octomitus* หรือ *Hexamita* เท่านั้นที่พบว่าเป็นสาเหตุของโรคในปลา (Paull and Matthews, 2001; Poynton and Sterud, 2002)

การศึกษาโรคสไปโรนิวคลีโอซีสในปลาสวยงามระหว่างเดือนพฤศจิกายน 2552 ถึงเดือน พฤษภาคม 2553 พบปรสิตกลุ่ม hexamitid flagellates บริเวณผิวหนัง โคนครีบหาง ครีบหาง ลำไส้ กระเพาะอาหาร ตับ ถุงน้ำดี หัวใจ และม้าม ในปลา 3 ชนิด ได้แก่ ปลาเทวดา ปลาออสการ์และปลาหมอสี แต่ไม่พบปรสิตกลุ่มนี้ในปลากัดที่มาจากจังหวัดราชบุรีทั้งนี้อาจเนื่องจากปลากัดเป็นปลาที่ก้าวร้าว จึงต้องเลี้ยงแยกกัน หรืออาจจะยังไม่ได้รับปรสิตจากปลากัดตัวอื่น ปลาชนิดอื่นหรือปลาจากแหล่งอื่นจึงทำให้ตรวจไม่พบปรสิตดังกล่าวในปลากัด โดยปรสิต *Spironucleus* sp. ที่พบจัดอยู่ในไฟลัมโปรโตซัว คลาส diplomonadida ระยะโทรโฟซอยท์เคลื่อนที่ได้เร็วมาก จัดเป็นปรสิตแท้จริง เนื่องจากต้องการเจ้าบ้านเพียงชนิดเดียวที่มักพบในช่องว่างลำตัวของปลาแต่มีรายงานการพบในเนื้อเยื่อปลารวมทั้งก่อให้เกิดโรค “hole in the head disease” ในปลาหลายชนิดในวงศ์ Anabantidae, Belontidae และ Cichlidae รวมทั้งปลาทะเลในวงศ์ Acanthuridae และ Pomacentridae (Becker, 1977; Ferguson and Moccia, 1980; Bassleer, 1983; Post, 1987; Andrews *et al*., 1988; Gratzek, 1988; Paull and Matthews, 2001) สอดคล้องกับรายงานหลายฉบับที่พบว่าปลาเจ้าบ้านของปรสิตกลุ่มนี้ คือ ปลาเทวดา ปลาปอมปาดัวร์ ปลาไน ปลาไหล ปลากัด ปลาแซลมอน ปลาเรนโบว์เทร้าท์ ปลาแอตแลนติกคอด ปลาแอตแลนติกแซลมอน ปลาแฮดดอก รวมทั้งสัตว์ในกลุ่มหอยและสัตว์ครึ่งบกครึ่งน้ำ (องอาจ และ

คณะ, 2538; Kulda and Lom, 1964a, 1964b; Molnar, 1974; Becker, 1977; Ferguson and Moccia, 1980; Bassleer, 1983; Post, 1987; Andrews *et al*., 1988; Gratzek,1988; Specht *et al*., 1989; Andrews, 1990; O' Brien *et al*., 1993; Poynton *et al*., 1995; Woo and Poynton, 1995) โดยทั่วไปสามารถพบปรสิต *Spironucleus* sp. ได้ทั้งในปลาปกติ (Mo *et al*., 1990) และปลาป่วย (Uzmann *et al*., 1965; Kent *et al*., 1992) มีหลายรายงานที่พบว่าปรสิตกลุ่มนี้ทำให้ปลาป่วยมีอาการหลากหลาย ทั้งนี้ขึ้นอยู่กับชนิดของปลาและชนิดของปรสิต เช่น ปลา Atlantic salmon ที่ติดปรสิต *S. salmonicida* มีอาการตาโปน เกิดแผลหลุมบนกล้ามเนื้อ เกิดการเสียหาย (necrotic) ของเนื้อเยื่อตับ ไตและม้าม (Poppe *et al*., 1992; Sterud *et al*., 1997; 1998) ปลา Chinook salmon ที่ติดปรสิต *S. salmonicida* มีอาการเป็นแผลพุพองบริเวณผิวหนัง เกิดแผล ก้อนเนื้อ (nodule) และอักเสบในตับและม้าม focal เกิดการตกเลือดในลำไส้ และโลหิตจาง (Kent *et al*., 1992; Meseck *et al*., 2007) ปรสิต *S. salmonis* พบว่ามีทั้งสามารถทำให้ปลาไม่เกิดพยาธิสภาพของโรค (Allison, 1963; Uzmann *et al*., 1965) และก่อให้เกิดพยาธิสภาพของโรค คือทำให้ปลาเทร้าท์มีอาการซูบผอม เบื่ออาหาร เซื่องซึม ขี้ขาว เกิดแผลหลุมบริเวณส่วนหัว ว่ายน้ำควงสว่าน ท้องบวมและมีของเหลวในช่องท้อง ตกเลือดและอักเสบในลำไส้ (Moore, 1922a, 1922b ;Davis, 1926; Ferguson, 1979; Robert and Shepherd, 1979; Robert, 1989) ปรสิต *S. vortens* ส่วนใหญ่พบมีการติดเชื้อในปลาเทวดาและปลาปอมปาดัวร์ ก่อให้เกิดแผลหลุมบริเวณส่วนหัว และเกิดการติดเชื้อในตับ ม้าม และไต นอกจากนี้ มีรายงานการพบปรสิตในลำไส้ของปลา ide (Poynton *et al*., 1995; Paull and Matthews, 2001; Sterud and Poynton, 2002) จากรายงานของกมลพรและสุปราณี (2532) พบการระบาดของปรสิตกลุ่มนี้ในปลาปอมปาดัวร์ในฟาร์มบริเวณกรุงเทพมหานคร โดยปลาป่วยมีลำตัวสีคล้ำกว่าปกติ ว่ายน้ำช้า เสียการทรงตัว ไม่กินอาหาร ผอมแห้ง ขี้ขาว มีเมือกมากบริเวณลำตัว และพบรูบนหัวประมาณ 1-2 รู หลังจากพบอาการดังกล่าวปลาก็เริ่มทยอยตาย นอกจากนี้ องอาจ และคณะ (2538) ยังพบว่าปลาปอมปาดัวร์มีอัตราการติดเชื้อตั้งแต่ 0-40 เปอร์เซ็นต์ (เฉลี่ย 13 เปอร์เซ็นต์) จากการศึกษาครั้งนี้พบอัตราการติดเชื้อในปลาเทวดาสูงสุดถึง 90.0 เปอร์เซ็นต์ รองลงมาคือปลาออสการ์และปลาหมอสี เท่ากับ 75.4 และ 61.0 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ ซึ่งเป็นอัตราการติดเชื้อที่สูงมากและปลาสวยงามทั้งสามชนิดแสดงอาการของโรค hole in the head disease หรือโรคสไปโรนิวคลีโอซีสซัดเจน เนื่องจาก

อาจเป็นผลมาจากการนำปลาที่ติดปรสิตมาเลี้ยงรวมกับปลาที่ไม่เคยติดเชื้อมาก่อน จะทำให้ปลาในสิ่งแวดล้อมใหม่มีการติดปรสิตที่รุนแรงมากขึ้น จึงทำให้พบการติดเชื้อในอัตราสูง ปัจจัยความรุนแรงของโรคปรสิตจะมีอาการมากน้อยขึ้นอยู่กับ ชนิดของปรสิต ขนาดของปรสิต จำนวนของปรสิต อวัยวะที่ปรสิตเข้าไปทำลาย สุขภาพของปลาเจ้าบ้าน ความไวต่อปรสิตของปลา และภูมิคุ้มกันของปลาต่อปรสิต แสดงให้เห็นว่าปรสิตชนิดนี้ก่อให้เกิดโรคในปลาสวยงามที่เพาะเลี้ยงและเป็นสาเหตุที่ก่อให้เกิดความเสียหายอย่างมากต่อการเพาะเลี้ยงปลาสวยงามในประเทศไทย

การเกิดโรคสไปโรนิวคลีโอซีสในปลาสวยงามและปลาชนิดอื่น ๆ สามารถเกิดขึ้นได้บ่อย (Lom and Dykova, 1992) แม้ปลาจะไม่แสดงอาการของโรค โดยพบว่าปลาจะแสดงอาการของโรคเพิ่มขึ้นเมื่ออยู่ในภาวะเครียด เช่น การเลี้ยงปลาในสภาพที่มีคุณภาพน้ำไม่เหมาะสม ความหนาแน่นสูง หรือสารอาหารไม่เพียงพอร่วมกับการขาดแคลเซียม ฟอสฟอรัสและวิตามินซี (Noga, 2000a, 2000b) จากสภาวะดังกล่าวทำให้ปรสิตมีจำนวนเพิ่มขึ้นส่งผลให้ปลาเบื่ออาหาร ซูบผอม อ่อนแอ จนทำให้ปลามีโอกาสติดปรสิตมากขึ้นและในกรณีที่ติดเชื้อรุนแรงมักพบการอักเสบและตกเลือดในลำไส้ เป็นสาเหตุให้ปลาตายได้ (Amlacher,1970; Molnar, 1974; Becker,1977; Post,1987; Gratzek, 1988; Woo and Poynton, 1995; Morrison *et al*., 2007) การติดปรสิตชนิดนี้ในปลาพ่อแม่พันธุ์ส่งผลให้ปลามีจำนวนไข่ลดลง และเป็นสาเหตุการตายของปลาวัยอ่อนหลังการฟักเนื่องจากการติดปรสิต (Amlacher,1970; Post, 1987) นอกจากนี้ยังพบว่าปลาที่ติดปรสิตจะมีการแสดงออกของโรคสัมพันธ์กับน้ำหนักและความยาวลำตัว โดยก่อให้เกิดการตายสูงในปลาที่อยู่ในระยะวัยอ่อนมากกว่าระยะโตเต็มวัย เช่น ในปลาเรนโบว์เทร้าท์ (*O. mykiss*) ขนาด 2.5–7.5 เซนติเมตร สามารถติดปรสิต *S. barkhanus* สูงถึง 70 เปอร์เซ็นต์ ขนาด 7.5–12.8 เซนติเมตร ติดปรสิต 10 เปอร์เซ็นต์ และขนาด 12.5–17.5 เซนติเมตร ติดปรสิต 2 เปอร์เซ็นต์ และยังสัมพันธ์กับการอนุบาลปลาในระยะวัยอ่อนในอัตราที่หนาแน่นสูง ขาดการจัดการที่ดี และการเปลี่ยนแปลงของช่วงฤดูกาล (Mo *et al*., 1990; Uldal and Buchman, 1996) นอกจากนี้จากการตรวจสอบปรสิตภายนอกพบ *Vorticella* sp., *Oodinium* sp. และ *Dactylogyrus* sp. เกาะตามบริเวณเหงือก และ *Trichodina* sp. เกาะบริเวณผิวลำตัว ซึ่งปรสิตภายนอกดังกล่าวเป็นอันตรายต่อปลาเพราะ rhizoid แทรกผ่านเข้าไปในผนังเซลล์ทำให้เซลล์เกิดการอักเสบ เกิดการเพิ่มจำนวนของเซลล์ เซลล์บางส่วนเกิดการตาย เกิดการตกเลือดของเนื้อเยื่อในบริเวณที่ปรสิตเข้าเกาะและทำให้ความสามารถในการแลกเปลี่ยนก๊าซบริเวณเหงือกลดลง การที่มีปรสิต *Trichodina* sp. เกาะอยู่บริเวณผิวลำตัวและเหงือกจะทำให้ปลาขับเมือกออกมา

มากกว่าปกติ เซลล์ผิวหนังเกิดการตายและลอกหลุด ซึ่งการตรวจพบปรสิตภายนอกโดยเฉพาะ *Dactylogyrus* sp. และ *Trichodina* sp. เป็นตัวบ่งชี้ถึงการขาดการจัดการที่เหมาะสมและสุขภาพของปลาที่ไม่ดี ทำให้ผิวลำตัวโป่งบวม ครีบเปื่อย เหงือกถูกทำลายและมีเมือกมาก สีลำตัวซีดและเกิดบาดแผล เนื่องจากตะขอหนามของปรสิตฝังลึกลงในเนื้อเยื่อเป็นเหตุให้เกิดการบวมอักเสบ (ประไพสิริ, 2546) เยื่อเมือกบริเวณเหงือกและผิวหนังที่ถูกทำลายโดยปรสิต *Dactylogyrus* sp. ทำให้เกิดภาวะที่เหมาะสมต่อการเพิ่มจำนวนของ *Trichodina* sp. เมื่อปรสิต *Trichodina* sp. เพิ่มจำนวนมากขึ้น ปลาจะมีการขับเมือกออกมามากขึ้นเช่นกันทำให้มีการสะสมของสารอินทรีย์ในน้ำเพิ่มขึ้น เป็นภาวะที่เหมาะสมต่อการเพิ่มจำนวนของแบคทีเรียในน้ำ ทำให้ปลาที่อ่อนแอมีโอกาสติดแบคทีเรียแทรกซ้อนได้มากขึ้น และอาจเป็นผลทำให้ปรสิต *Spironucleus* sp. ที่หลุดออกจากตัวปลาผ่านทางอุจจาระเข้าเกาะบริเวณผิวหนังที่เสียหายจากการติดปรสิตข้างต้นได้ง่ายขึ้นดังที่ตรวจพบปรสิต *Spironucleus* sp. บริเวณผิวหนัง โคนครีบหางและครีบหางในปลาหมอสี ปลาออสการ์และปลาเทวดา และพบการติดแบคทีเรีย *Aeromonas hydrophila* ร่วมด้วยในปลาหมอสีและปลาออสการ์ เนื่องจากแบคทีเรียชนิดนี้เป็นเชื้อที่มีอยู่แล้วตามปกติในน้ำทำให้ปลาติดเชื้ออย่างรุนแรงและเป็นสาเหตุทำให้ปลาตายได้ โดยเฉพาะปลาขนาดเล็กที่เลี้ยงรวมกันอย่างหนาแน่น และการนำปลาที่มีการติดปรสิตไปเลี้ยงรวมกับปลาที่ไม่เคยติดเชื้อมาก่อนจะทำให้ปลาในสิ่งแวดล้อมใหม่ติดเชื้อรุนแรงมากขึ้น แสดงให้เห็นว่าปรสิตกลุ่ม hexamitid flagellates ทำให้เกิดโรคสไปโรนิวคลีโอซีสในปลาสวยงามโดยเฉพาะปลากลุ่มซิคลิดหลายชนิด ก่อให้เกิดความเสียหายทั้งสุขภาพปลาและธุรกิจการเพาะเลี้ยงปลาสวยงามเป็นจำนวนมาก แม้ว่าอาจควบคุมปรสิตได้โดยการใช้ยารักษาแต่ก็ยังเป็นเพียงส่วนน้อย ดังนั้นโรคสไปโรนิวคลีโอซีสจึงยังเป็นอุปสรรคที่สำคัญในการพัฒนาคุณภาพปลาสวยงาม สุขภาพปลา และธุรกิจการเพาะเลี้ยงปลาสวยงามของประเทศไทย ดังนั้นเพื่อลดความเสี่ยงในการติดเชื้อจึงไม่ควรใช้อุปกรณ์ในการเลี้ยงร่วมกัน ควรแช่อุปกรณ์ด้วยน้ำยาฆ่าเชื้อก่อน วิธีการที่ดีที่สุดที่จะทำให้ปลาสวยงามไม่ถูกทำลายด้วยปรสิตคือการป้องกัน โดยเริ่มจากน้ำที่ใช้เลี้ยงควรเป็นน้ำที่ปราศจากคลอรีนตกค้าง การใช้น้ำประปาควรมีการพักน้ำไว้อย่างน้อย 3 วัน ก่อนการปล่อยปลาลงเลี้ยง ควรมีออกซิเจนเพียงพอ ค่าความเป็นกรด-ด่างควรจะเป็นกลางหรือด่างเล็กน้อย อุณหภูมิน้ำไม่ควรจะต่ำเนื่องจากเสี่ยงต่อการติดเชื้อราในน้ำ และที่สำคัญคือก่อนการปล่อยปลาลงเลี้ยงควรกำจัดปรสิตภายนอกและภายในก่อนซึ่งมีทั้งการใช้ยาและสารเคมี เช่น เกลือแกง ฟอร์มาลิน ด่างทับทิม และยากลุ่มไนโตรอิมิดาโซลในการกำจัดปรสิต *Spironucleus* sp. ในตัวปลา เป็นต้น

การศึกษาครั้งนี้ประสบความสำเร็จในการเลี้ยงปรสิตกลุ่ม hexamitid flagellates ที่แยกจากลำไส้ปลาเทวดาป่วยในอาหารเลี้ยงเซลล์และจำแนกชนิดปรสิตที่แยกได้เป็น *S. vortens* เนื่องจากมีผิวลำตัวเรียบและมีส่วนของเลเทอรัลริดจ์บริเวณด้านข้างลำตัวทั้งสองด้าน บริเวณส่วนท้ายของลำตัวมีช่องเปิดของแฟลกเจลลาพ็อกเก็ตและพาพิลลัม นอกจากนี้แฟลกเจลลาพ็อกเก็ตยาวไปจนถึงส่วนท้ายของเซลล์ นิวเคลียสเรียวยาวและมีรูปร่างเป็นแบบตัวเอส มีรีเคอเรนท์แฟลกเจลลาอยู่ในตำแหน่งกึ่งกลางบริเวณปลายสุดของนิวเคลียส และบริเวณส่วนปลายสุดของเซลล์ที่เป็นรูปพระจันทร์เสี้ยวซึ่งแตกต่างจากปรสิต *S. elegans* ซึ่งบริเวณปลายสุดของเซลล์เป็นแบบสมมาตร (symmetry) และไม่มีพาพิลลัม (Poynton *et al*., 1995; Sterud and Poynton, 2002) สอดคล้องกับรายงานของ Poynton และคณะ (1995) ที่รายงานการพบปรสิตชนิดเดียวกันนี้ที่ก่อโรคในปลาเทวดาในประเทศสหรัฐอเมริกา อย่างไรก็ตาม การทดลองครั้งนี้ไม่ประสบความสำเร็จในการเลี้ยงปรสิตกลุ่ม hexamitid flagellates ที่แยกได้จากลำไส้ปลาหมอสีและปลาออสการ์ทั้งนี้อาจเนื่องจากเป็นปรสิตกลุ่ม hexamitid flagellates ชนิดอื่นหรืออาจต้องการสารอาหาร สภาวะอุณหภูมิ ความเป็นกรด-ด่าง ที่แตกต่างจากชนิดที่แยกได้จากปลาเทวดา การศึกษาเพิ่มเติมเพื่อให้สามารถเพาะเลี้ยงปรสิตเหล่านี้เพื่อนำไปสู่การจำแนกชนิด การทดสอบความรุนแรงของโรค การยอมรับปรสิตในปลาชนิดอื่น ๆ รวมทั้งการใช้ยาและสารเคมีในการป้องกันโรคดังกล่าวจึงนับเป็นสิ่งจำเป็นและควรศึกษาต่อไป

4.2 การเปลี่ยนแปลงทางพยาธิสภาพ

การศึกษาการเปลี่ยนแปลงทางพยาธิสภาพของเนื้อเยื่อปลาสวยงามที่ติดปรสิต *S. vortens* พบการเกิดกรานูโลมาในตับ เกิดเมลาโนมาโครฟาจจำนวนมากในม้าม และเกิดการอักเสบของลำไส้ในปลาเทวดา ซึ่งลักษณะการเปลี่ยนแปลงทางพยาธิสภาพของเนื้อเยื่อที่เกิดขึ้นอาจไม่ได้เกิดจากการติดปรสิต *S. vortens* โดยตรง เนื่องจากการติดปรสิตชนิดนี้เป็นการติดปรสิตตามธรรมชาติและเป็นการติดเชื้อแบบเรื้อรัง ซึ่งอาจมีการติดเชื้อชนิดอื่นมาก่อนร่วมด้วย ประกอบกับอาจมีการจัดการที่ไม่เหมาะสม ปลาอยู่ในภาวะเครียด ความสามารถในการต้านทานโรคตามธรรมชาติและสุขภาพของปลาที่เป็นปัจจัยเกื้อหนุนให้เกิดพยาธิสภาพดังกล่าว ซึ่งผลกระทบของปรสิตต่อการเปลี่ยนแปลงทางพยาธิสภาพของเนื้อเยื่อ อาจเกิดจากการที่ปรสิตเข้าไปอาศัย และดำรงชีวิตอยู่กับปลาโดยไม่ก่อให้เกิดโรคหรือพยาธิสภาพแก่ปลาโดยตรง อย่างไรก็ตาม ปรสิตอาจก่อให้เกิดโรคได้เมื่อปลามีสภาวะที่เปลี่ยนแปลงไป เช่น มีภูมิคุ้มกันต่ำ อยู่ในภาวะเครียดและ

สภาวะแวดล้อมที่ไม่เหมาะสม ปรสิตจะเพิ่มจำนวนขึ้นอย่างรวดเร็ว จนก่อให้เกิดการเปลี่ยนแปลงทางพยาธิสภาพขึ้น หรืออาจเกิดจากปรสิตที่เข้าไปอาศัยแล้วก่อให้เกิดโรคหรือพยาธิสภาพแก่ปลา โดยอาจมีระดับความรุนแรงต่างกัน แต่โดยทั่วไปความรุนแรงของโรคจากการติดปรสิตมักจะขึ้นอยู่กับปัจจัยต่าง ๆ ผสมผสานกัน เช่น ชนิดและจำนวนของปรสิต กล่าวคือปรสิตที่มีขนาดใหญ่ แม้มีจำนวนน้อยอาจก่อความเสียหายต่อปลาได้มาก ในทำนองเดียวกันปรสิตที่มีขนาดเล็กถ้ามีจำนวนมากก็อาจก่อความเสียหายได้มากเช่นกัน อวัยวะที่ปรสิตเข้าไปอาศัย รวมทั้งการปรับตัวของปลาและปรสิต ซึ่งผลกระทบจากการที่ปรสิตเข้าไปอาศัยอยู่ในอวัยวะต่าง ๆ ของปลาจะก่อให้เกิดผลกระทบต่ออวัยวะเหล่านั้นรวมทั้งตัวของปลาโดยตรง นอกจากนี้ผลกระทบต่อปลายังขึ้นอยู่กับการเดินทางหรือการเคลื่อนที่ของปรสิตในร่างกายและในอวัยวะสำคัญที่ปรสิตเข้าไปอาศัย ซึ่งอาจก่อให้เกิดผลกระทบทางอ้อมหรือก่อให้เกิดอาการข้างเคียงต่าง ๆ แก่ปลาได้หลายประการ เช่น การที่ปรสิตเคลื่อนที่ไปตามอวัยวะต่าง ๆ จะปล่อยสารกระตุ้นภูมิแพ้ (allergen) เข้าสู่กระแสเลือด ทำให้ปลาที่ติดเชื้อมีภาวะภูมิไวเกิน (hypersensitivity) และแสดงอาการของโรคในที่สุด นอกจากนี้อาการของโรคจากการติดปรสิตมักจะรุนแรงหลังจากการควบคุมและกำจัดปรสิตของระบบภูมิคุ้มกันในปลาระยะแรกไม่ได้ผล โดยภูมิคุ้มกันที่เป็นสาเหตุให้เกิดพยาธิสภาพแก่ปลาเกิดจากผลของปฏิกิริยาระหว่างภูมิคุ้มกันของปลาและปรสิตที่อาจเป็นสาเหตุให้เกิดการเปลี่ยนแปลงพยาธิสภาพตามอวัยวะต่างๆ ของปลาได้เช่นกัน โดยสาเหตุที่ก่อให้เกิดการเปลี่ยนแปลงทางพยาธิสภาพของเนื้อเยื่อเมื่อมีการติดปรสิต คือ เกิดจากการทำลายเซลล์ เนื้อเยื่อหรืออวัยวะต่างๆ ของปรสิต เกิดการแย่งสารอาหารจากปลา เกิดจากสารพิษที่ปรสิตหลั่งออกมา เกิดจากระบบภูมิคุ้มกันที่จะมาทำลายปรสิตนั้นส่งผลให้มีการทำลายเซลล์หรือเนื้อเยื่อที่ปกติ และเกิดจากการที่ปรสิตเข้าไปเปลี่ยนแปลงระบบภูมิคุ้มกันของปลา เช่น การกดภูมิคุ้มกันของปลาที่ตอบสนองต่อแอนติเจนชนิดอื่นทำให้ปลามีการติดเชื้อแทรกซ้อน และมีอัตราการติดเชื้อที่รุนแรงมากขึ้น สอดคล้องกับรายงานหลายฉบับที่กล่าวว่าเนื้อเยื่อปลาเทวดา ปลาปอมปาดัวร์ และปลาแซลมอนที่ติดปรสิตกลุ่มนี้มีลักษณะของเซลล์เสื่อมสภาพ เกิดช่องว่างของเซลล์ เกิดกรานูโลมา เกิดการบวมแดง ตกเลือด และการอักเสบของลำไส้ เนื่องจากการรวมกลุ่มของเม็ดเลือดขาว เกิดการตายของเนื้อเยื่อ และพบปรสิตแทรกตัวอยู่ระหว่างเนื้อเยื่อลำไส้ ทำให้ลำไส้มีการผลิตเมือกมากกว่าปกติ และเกิดการหลุดลอกของเซลล์เยื่อบุผิว ทำให้เนื้อเยื่อลำไส้ถูกทำลาย เกิดการอักเสบของท่อตับ พบการตายของเนื้อเยื่อตับ ตับและไตบวมน้ำ เกิดการคั่งและตกเลือดในบริเวณที่เกิดการตายของเนื้อเยื่อ เกิดก้อนเนื้อในม้าม ตับ กล้ามเนื้อ เกิดสภาวะม้ามโต การเสื่อมสลายของเซลล์กล้ามเนื้อ สมองและเยื่อหุ้มสมองอักเสบ ส่งผลให้ปลาอ่อนแอและตายได้ (องอาจ และคณะ,

2538; van Dujin ,1956; Sano, 1970; Mo *et al*., 1990; Poppe *et al*., 1992; Siddall *et al*., 1992; O' Brien *et al*.,1993; Uldal and Buchman, 1996; Paull and Matthews, 2001; Guo and Woo, 2004a, 2004b) การศึกษาครั้งนี้ไม่พบการเปลี่ยนแปลงทางพยาธิสภาพของเนื้อเยื่อปลาออสการ์และปลาหมอสีทั้งนี้อาจเนื่องจากปริมาณปรสิตที่พบในตัวปลาไม่มากนัก รวมทั้งอัตราการติดเชื้อน้อยกว่าที่พบในปลาเทวดา นอกจากนี้สุขภาพของปลา ซึ่งขึ้นอยู่กับอายุ ชนิด และสายพันธุ์ ประกอบกับเมื่อมีปรสิตเข้าสู่ร่างกาย ปลาจะสร้างภูมิคุ้มกันขึ้นมาต่อต้านและทำลาย ภูมิคุ้มกันนี้อาจเป็นทั้งภูมิคุ้มกันที่ไม่จำเพาะต่อชนิดใดชนิดหนึ่งของปรสิต (non-specific acquired immunity) และภูมิคุ้มกันชนิดจำเพาะต่อชนิดของปรสิตโดยภูมิคุ้มกันที่ทำหน้าที่ควบคุมการเติบโต การเพิ่มจำนวนของปรสิตและกำจัดพยาธิสภาพที่มีสาเหตุจากปรสิต (immunoprotective) ซึ่งการควบคุมและกำจัดปรสิตเป็นปฏิกิริยาที่ซับซ้อนของระบบภูมิคุ้มกันของปลา โดยจะเกิดขึ้นทันทีที่ปรสิตเข้าสู่ร่างกาย ปฏิกิริยาที่เกิดขึ้นเริ่มตั้งแต่การจู่โจมเข้าทำลายปรสิตโดยตรงของเซลล์เม็ดเลือดขาวชนิดมาโครฟาจ และนิวโทรฟิล และโดยการสร้างแอนติบอดีและหลั่งสารบางอย่างออกมาทำลายปรสิตโดยเซลล์เม็ดเลือดขาว ชนิด บี ลิมโฟไซต์ ที ลิมโฟไซต์ อีโอสิโนฟิล รวมทั้งเกล็ดเลือด ซึ่งอาจเป็นอีกเหตุผลหนึ่งที่ทำให้ปลาสามารถกำจัดและต้านทานโรคปรสิตตามธรรมชาติได้

4.3 การศึกษาสภาวะที่เหมาะสมต่อการเจริญของปรสิต *S. vortens* ในอาหารเลี้ยงเซลล์

การศึกษาสภาวะที่เหมาะสมต่อการเจริญของปรสิต *S. vortens* ที่แยกจากลำไส้ปลาเทวดาในอาหารเลี้ยงเซลล์ พบว่าปรสิตสามารถเพิ่มจำนวนมากขึ้นภายในเวลา 24 ชั่วโมง และมีจำนวนมากที่สุดในวันที่ 3 ของการเพาะเลี้ยง โดยมีจำนวนมากถึง 11,964,070 เซลล์ต่อมิลลิลิตร และค่อย ๆ ลดจำนวนลงเรื่อย ๆ จนถึงวันที่ 9 และตายในวันที่ 10 ในอาหารเลี้ยงเซลล์ โดยปรสิตที่เจริญในอาหารเลี้ยงเซลล์พบว่ามีรูปร่างยาวรี (pyriform-shape) ที่ทุก ๆ สภาวะอุณหภูมิ และความเป็นกรด-ด่าง เช่นเดียวกับลักษณะของปรสิตตั้งต้นที่แยกได้จากลำไส้ปลาเทวดาป่วย และจากการศึกษาครั้งนี้พบว่าโทรโฟซอยท์ของปรสิตจะหยุดการเจริญและตายในเวลารวดเร็วที่อุณหภูมิสูง การปรับอุณหภูมิน้ำให้สูงขึ้นอาจจะช่วยลดจำนวนโทรโฟซอยท์ของปรสิตที่อาศัยอยู่ในเจ้าบ้านและอาจลดการติดปรสิตลงได้ ดังนั้น อุณหภูมิจึงเป็นปัจจัยที่สำคัญสำหรับการเจริญของปรสิต และข้อมูลดังกล่าวสามารถนำไปใช้ประโยชน์ในการควบคุมและป้องกันโรค

ปรสิตชนิดนี้ในฟาร์มเพาะเลี้ยงปลาได้ การทดลองครั้งนี้ยังพบระยะซีสต์ของปรสิตในระหว่างการเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเซลล์ที่อุณหภูมิ 20 และ 25 องศาเซลเซียส โดยซีสต์ที่พบมีลักษณะกลม เกาะตัวรวมกันเป็นกลุ่ม ไม่มีการเคลื่อนที่ และส่วนของแฟลกเจลลาหายไป โทรโฟซอยท์ของโปรโตซัวส่วนใหญ่จะรวมกลุ่มและเชื่อมติดกันก่อนที่จะเข้าสู่ระยะซีสต์ สอดคล้องกับรายงานของ Moore (1922) และ Sano (1970) ที่พบซีสต์ของปรสิต *Hexamita salmonis* ในอาหารเลี้ยงเซลล์ การศึกษาครั้งนี้พบว่าความเป็นกรด-ด่างที่เหมาะสมต่อการเจริญของปรสิต คือ 7-9 โดยปรสิตสามารถเพิ่มจำนวนได้มากที่สุดที่ความเป็นกรด-ด่าง 7 มีชีวิตได้นานที่สุดที่ความเป็นกรด-ด่าง 8 (9 วัน) และพบว่าปรสิตตายในเวลา 24 ชั่วโมงที่อุณหภูมิ 5 และ 10 องศาเซลเซียส ที่ทุกระดับความเป็นกรด-ด่าง นอกจากนี้ยังพบว่าจำเป็นต้องมีการเสริม bovine bile และตับปลานิลสดในอาหารเลี้ยงเซลล์ สอดคล้องกับการทดลองของ Paull และ Matthews (2001) ที่รายงานว่าปรสิต *S. vortens* ที่แยกจาก ลำไส้ ตับ ไต ม้าม แผลหลุมของปลาเทวดาและปลาปอมปาดัวร์ สามารถเจริญในอาหารเลี้ยงเซลล์ Eagle's MEM ที่ผสมยาปฏิชีวนะ 4 ชนิด (เพนนิซิลลิน สเตรปโตมัยซิน เจนต้ามัยซิน และ ฟังไจโซน) โบวายน์ซีรั่ม เกลือน้ำดี และตับปลานิลสด และจากการศึกษาของ Sangmaneedet และ Smith (2000) ที่แยกปรสิต *S. vortens* จากปลาเทวดาและเพาะเลี้ยงในอาหาร TYI–S–33 พบว่าความเป็นกรด-ด่าง ที่ปรสิตสามารถเจริญได้คือ 6.5–7.5 และเจริญได้ดีที่ความเป็นกรด-ด่าง 7.5 และจากรายงานของ Poynton และคณะ (1995) ที่แยกปรสิต *S. vortens* จากระบบทางเดินอาหารและก้อนเนื้อบริเวณปากของปลาเทวดาพบว่าปรสิตสามารถเจริญได้ดีในสภาวะที่ไม่มีออกซิเจน ที่อุณหภูมิ 25-30 องศาเซลเซียส ในอาหาร modified TYM medium ที่ผสม casein hydrolysate, bovine serum ยาปฏิชีวนะเพนนิซิลลิน และ สเตรปโตมัยซิน และสามารถเก็บรักษาปรสิตชนิดนี้ได้ในสารละลายไดเมทิลซัลฟอกไซด์ (cryoprotective agent) ที่อุณหภูมิ -80 องศาเซลเซียส และสามารถนำปรสิตกลับมาเลี้ยงต่อได้ในอาหาร TYI-S-33 โดยมีอัตรารอดประมาณ 90 เปอร์เซ็นต์ (Poynton *et al*., 1995; Sangmaneedet and Smith, 2000)

การศึกษาสภาวะที่เหมาะสมต่อการเจริญของปรสิตมีความสำคัญต่อการแพร่กระจายและการเกิดโรคสไปโรนิวคลีโอซีสในธรรมชาติ ซึ่งวงจรชีวิตของปรสิต *S. vortens* ต้องการเจ้าบ้านเพียงเจ้าบ้านเดียว แต่ในวงจรชีวิตประกอบด้วย 2 ระยะ คือ โทรโฟซอยท์และซีสต์ โดยที่โทรโฟซอยท์จะเปลี่ยนเป็นระยะซีสต์ก่อนที่จะออกมานอกตัวปลา ซีสต์เป็นระยะที่หยุดกินอาหาร แต่จะสะสมอาหารและสลายอวัยวะที่ใช้ในการเคลื่อนที่ และสร้างผนังหุ้มซีสต์ทำให้มีความทนทานต่อสภาพแวดล้อมภายนอกร่างกายปลา และในระยะซีสต์จะมีการแบ่งตัวของนิวเคลียสจะทำให้ได้จำนวนปรสิตที่เกิดจากซีสต์เพิ่มขึ้นด้วย ซีสต์จะแพร่กระจายอยู่ตามธรรมชาติ

จนกว่าจะมีโอกาสเข้าไปในเจ้าบ้านใหม่ เมื่อเข้าไปแล้วโทรโฟซอยท์ที่อยู่ในระยะติดต่อจะออกจากซีสต์แล้วเจริญต่อไป จากการศึกษาครั้งนี้พบว่าที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เป็นอุณหภูมิที่เหมาะสมสำหรับการเจริญของปรสิต *S. vortens* เนื่องจากปรสิตสามารถเพิ่มจำนวนได้มากขึ้น เคลื่อนที่อย่างรวดเร็ว และมีชีวิตรอดมากกว่า 6 วัน ในขณะที่ปลาเทวดาเป็นปลาพื้นเมืองในเขตร้อน (Axelord, 1985) สามารถเพาะพันธุ์และเพาะเลี้ยงได้ในช่วงอุณหภูมิตั้งแต่ 22-30 องศาเซลเซียส (Mills *et al*., 1988) ซึ่งเป็นอุณหภูมิที่อยู่ในช่วงเดียวกับอุณหภูมิที่เหมาะสมสำหรับการเจริญของปรสิต *S. vortens* เช่นกัน นอกจากนี้ จากการศึกษาของ Sterud และ Poynton (2002) รายงานว่าปลา ide (*Leuciscus idus*) จัดเป็นปลาในวงศ์ cyprinidae เป็นปลาน้ำจืดตามธรรมชาติที่พบแพร่กระจายในทวีปยุโรปและเอเชีย มีการติดปรสิต *S. vortens* บริเวณลำไส้ ซึ่งสันนิษฐานว่าปลาอาจได้รับปรสิตโดยบังเอิญจากแหล่งน้ำธรรมชาติที่มีปรสิตชนิดนี้เป็นเชื้อประจำถิ่น แต่ไม่เคยมีรายงานการพบมาก่อน หรืออาจได้รับปรสิตจากปลาเทวดาในประเทศคู่ค้าที่พบมีการติดเชื้อเป็นประจำ (Levsen, 1995 อ้างโดย Sterud and Poynton, 2002) เช่น จากรัฐฟลอริด้าประเทศสหรัฐอเมริกาหรือประเทศไทย ประกอบกับอาจมีการกำจัดปลาที่เป็นโรคหรือตายโดยการทิ้งลงแม่น้ำหรือท่อระบายน้ำ ส่งผลให้เกิดการแพร่กระจายของปรสิตตามมา และจากการศึกษาของ Sterud และ Poynton (2002) พบว่ายังสามารถเพาะเลี้ยงปรสิตชนิดนี้จากลำไส้ปลา ide ได้สำเร็จที่อุณหภูมิ 5 และ 15 องศาเซลเซียส โดยก่อนหน้านี้สามารถเพาะเลี้ยงปรสิตได้ที่อุณหภูมิตั้งแต่ 2-34 องศาเซลเซียส (Sterud and Poynton, 2002) โดยตรวจพบว่าปรสิตสามารถดำรงชีวิตในตัวปลาได้ในฤดูหนาวที่มีอุณหภูมิต่ำเพียง 1 องศาเซลเซียส ซึ่งจะเห็นได้ว่าปรสิต *S. vortens* มีความทนทานต่อสภาวะอุณหภูมิและการเปลี่ยนแปลงของสิ่งแวดล้อมได้มากกว่าเมื่อเทียบกับปลาทั้งสองชนิด ประกอบกับที่อุณหภูมิต่ำระบบภูมิคุ้มกันของปลาจะทำงานลดลงหรือช้าลง ส่งผลให้ปลาติดปรสิตได้ง่ายขึ้น เป็นเหตุให้ปรสิตสามารถแพร่กระจายได้อย่างกว้างขวางในหลายภูมิภาคทั่วโลก ซึ่งมีสภาวะอุณหภูมิที่แตกต่างกัน นอกจากนี้ ปรสิตกลุ่มนี้ยังมีความทนทานต่อปัจจัยอื่น ๆ ได้ดี เช่น ความเค็ม (Poppe *et al*., 1992; Sterud *et al*., 1997; Sterud, 1998c) โดยพบการแพร่กระจายของปรสิต *S. barkhanus* มีการติดเชื้อในปลาคอด (gadids) หลายพื้นที่ในประเทศแคนาดาและประเทศนอร์เวย์ (Poynton and Morrison, 1990; Sterud, 1998b) ปัจจัยเหล่านี้นับว่ามีความสำคัญต่อการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำ ทั้งนี้เนื่องจากปลาแต่ละชนิดมีการเพาะเลี้ยงหรืออาศัยอยู่ในสภาวะแวดล้อมที่แตกต่างกัน จึงทำให้ปลาที่เป็นเจ้าบ้านกักตุนหรือเจ้าบ้านสุดท้าย (reservoir host) เป็นพาหะของปรสิตได้ เช่น ในกรณีที่ปลา arctic char (เจ้าบ้านกักตุน) เป็นปลาแซลมอนน้ำจืดตามธรรมชาติที่ต้องว่ายเข้าสู่ปากแม่น้ำเพื่อวางไข่ ทำให้เกิดการแพร่กระจาย

ของปรสิต*S. barkhanus* ไปยังปลาแอตแลนติกแซลมอนที่เลี้ยงในกระชัง (Sterud *et al*., 1998) และพบว่าปรสิต *S. torosa* สามารถแพร่กระจายได้ทั้งในปลาน้ำจืดและปลาทะเลเช่นเดียวกับปรสิต *S. barkhanus* เป็นต้น แสดงให้เห็นว่าปรสิต *Spironucleus* sp. สามารถทนทานต่อสภาวะแวดล้อมได้ในช่วงกว้างทั้งสภาวะความเค็ม อุณหภูมิและการเปลี่ยนแปลงของสิ่งแวดล้อมได้ดีจึงแพร่กระจายได้วงกว้างทั้งในปลาธรรมชาติและปลาเลี้ยงในหลายภูมิภาคทั่วโลก (Poynton and Morrison, 1990; Poppe *et al*., 1992; Sterud *et al*., 1997; Sterud, 1998a, b, c) โดยลักษณะเหล่านี้เป็นคุณสมบัติที่พบได้เฉพาะในปรสิตกลุ่ม ciliated เช่น *Ichthyophthirius multifiliis* และ *Cryptocaryon irritans* (Dickerson and Dawe, 1995) ซึ่งมีความจำเพาะต่อตัวเจ้าบ้านต่ำจึงก่อโรคได้กว้างในเจ้าบ้านหลายชนิด

4.4 การทดสอบความรุนแรงของโรคสไปโรนิวคลีโอซีสในปลาเทวดา

การทดสอบความรุนแรงของปรสิตในปลาเทวดาพบว่าปริมาณปรสิต *S. vortens* ที่ทำให้ปลาทดลองตาย 50 เปอร์เซ็นต์ ภายในเวลา 14 วัน มีค่าเท่ากับ 2.99×10^3 เซลล์ และพบว่าหลังการติดเชื้อปลาที่ติดปรสิตมีลำตัวสีคล้ำหรือซีดกว่าปกติ เสียการทรงตัว เคลื่อนที่ช้า ท้องบวม ขี้ขาว อวัยวะภายในมีกลิ่นเหม็น มีของเหลวในช่องท้อง ลำไส้บวมพอง ตับซีด ตกเลือด และม้ามมีสีผิดปกติ การตรวจวินิจฉัยอวัยวะภายในของปลาใกล้ตายจากการติดปรสิตชนิดนี้พบปรสิตจำนวนมากในอวัยวะต่าง ๆ ได้แก่ ลำไส้ กระเพาะอาหาร ถุงน้ำดี ตับ หัวใจและม้าม โดยการศึกษาครั้งนี้ใช้เชื้อในปริมาณต่ำก็สามารถทำให้ปลาเทวดายอมรับปรสิตและก่อโรครุนแรงได้ ซึ่งให้ผลการทดลองที่ดีกว่าเมื่อเทียบกับการศึกษาของ Sangmaneedet (1999) ที่ฉีดปรสิต *S. vortens* ความเข้มข้น 2×10^6 เซลล์ต่อมิลลิลิตร แต่ทำให้ปลาเทวดาตายเพียง 20 เปอร์เซ็นต์ หลังการฉีดเชื้อนาน 3 สัปดาห์ ทั้งนี้เนื่องจากการทดลองครั้งนี้เลือกใช้วิธีการฉีดปรสิตเข้าช่องท้อง ซึ่งเป็นวิธีการที่ทำให้ปลาได้รับปรสิตอย่างเต็มที่ประกอบกับอาจเกิดการปนเปื้อนของเชื้อแบคทีเรียระหว่างการฉีด ส่งผลให้เกิดอาการของโรครุนแรง นอกจากนี้การตรวจพบปรสิตเป็นจำนวนมากในระบบทางเดินอาหารจะส่งผลรบกวนการดูดซึมและแย่งสารอาหารจากปลา จนทำให้ปลาเริ่มขาดอาหาร อ่อนแอ มีภูมิต้านทานลดลงจนแสดงอาการของโรคและตายในที่สุด (Yasutake *et al*., 1961; Poynton and Morrison, 1990) โดยปรสิตที่อาศัยอยู่ภายในร่างกายของปลาจำเป็นต้องมีการปรับตัวเพื่อให้สามารถทนทานต่อการเปลี่ยนแปลงของสิ่งแวดล้อม อาจกล่าวได้ว่าการวิวัฒนาการของทั้งปรสิตและปลาเกิดขึ้นควบคู่กัน ต่างฝ่ายต่างปรับตัวเพื่อความอยู่รอด แต่ปรสิต

มีการปรับตัวที่ดีกว่าทำให้มีชีวิตรอดและสามารถสืบพันธุ์ต่อไปได้ โดยพบว่าปรสิต *S. vortens* อาศัยอยู่ในระบบทางเดินอาหาร จึงสามารถทนทานต่อการย่อยสลายจากเอนไซม์ต่าง ๆ ในระบบทางเดินอาหารของปลาได้ ปัจจุบันยังไม่เป็นที่แน่ชัดว่าอะไรเป็นปัจจัยที่ช่วยให้ปรสิตสามารถดำรงชีวิตอยู่ได้ท่ามกลางปฏิกิริยาของเอนไซม์เหล่านี้ และยังไม่มีรายงานเกี่ยวกับกลไกการก่อโรคในปลาโดยปรสิตชนิดนี้ นอกจากนี้การเคลื่อนที่ของปรสิตในระบบทางเดินอาหาร และเคลื่อนที่เข้าไปในระบบหมุนเวียนเลือด เข้าสู่อวัยวะอื่น ๆ เช่น ตับ ไต หัวใจและม้าม จากนั้นจึงออกมาแล้วเข้าสู่ระบบทางเดินอาหารอีกครั้งนั้น ปรสิตจะต้องผ่านการย่อยของเอนไซม์ในระบบทางเดินอาหาร และสามารถมีชีวิตรอดจากการต่อต้านของภูมิคุ้มกันในระบบหมุนเวียนเลือดของปลาได้ สิ่งเหล่านี้นับว่าเป็นวิธีการปรับตัว วิวัฒนาการ และความสัมพันธ์ระหว่างปรสิตและปลา นอกจากนี้ปรสิตยังมีกลไกที่ใช้ในการหลบเลี่ยงจากระบบภูมิคุ้มกันของปลา ได้แก่ ตำแหน่งที่อยู่ของปรสิตในร่างกาย ปรสิตที่อาศัยอยู่ภายในเซลล์จะรอดพ้นจากระบบภูมิคุ้มกัน เนื่องจากปรสิตชนิดนี้จะเข้าไปอาศัยอยู่ในช่องว่างภายในลำไส้ซึ่งเป็นช่องว่างของอวัยวะที่มีลักษณะกลวง (Macdonald and Monteleon, 2005) ปรสิตขัดขวางการทำงานของระบบภูมิคุ้มกันของปลา และการเปลี่ยนแปลงแอนติเจนของปรสิต ซึ่งจากการตรวจสอบปรสิตจากอวัยวะต่าง ๆ ของปลาเทวดาหลังการติดเชื้อพบว่ามีปริมาณปรสิตเพิ่มมากขึ้นในทุกอวัยวะหลังจากได้รับปรสิตอย่างน้อย 3 ชั่วโมง ทั้งนี้เนื่องจากปรสิตมีการปรับตัวให้เหมาะสมกับสภาพภายในตัวปลาก่อนเจริญเติบโตและเพิ่มจำนวนขึ้นอย่างรวดเร็ว และเมื่อเวลาผ่านไปปริมาณของปรสิตอาจจะลดลง เนื่องจากระบบภูมิคุ้มกันภายในตัวปลา ซึ่งในการเพิ่มขึ้นหรือลดลงของปรสิตจะมีลักษณะที่เหมือนกับการเพาะเลี้ยงในหลอดทดลอง และพบว่าที่เวลา 10 วัน ปริมาณปรสิตในตัวปลาลดลง เนื่องจากปลามีการกำจัดปรสิตที่เข้ามาในระบบโดยกลไกการกำจัดสิ่งแปลกปลอมที่เข้ามาในร่างกาย อย่างไรก็ตาม ความเป็นไปได้สำหรับช่องทางการก่อโรคของปรสิต ได้แก่ การเข้าสู่อวัยวะเป้าหมายโดยผ่านทางกระแสเลือด หรือเข้าสู่อวัยวะเป้าหมายโดยตรงทางเมือกและผิวหนังจากนั้นปรสิตพัฒนาในอวัยวะต่าง ๆ ของปลา ประกอบกับปลาอาจมีภูมิคุ้มกันต่ำลงเนื่องจากการอดอาหาร และสุขภาพของปลา ส่งผลให้ปรสิตเข้าทำลายและก่อโรคได้ง่ายขึ้น ดังนั้น ปรสิตที่จะดำรงชีวิตอยู่ได้จะต้องสามารถปรับกระบวนการเมตาโบลิซึม (metabolism) ของตัวเองทุกครั้งที่มีการเปลี่ยนแปลงของสิ่งแวดล้อม ในทำนองเดียวกันการเปลี่ยนแปลงของสิ่งแวดล้อมแต่ละครั้งจะเป็นปัจจัยที่กระตุ้นให้ปรสิตมีการเปลี่ยนแปลงเข้าสู่ระยะต่อไปในวงจรชีวิต โดยปรสิตจะมีอัตราการเจริญพันธุ์ที่สูงเมื่อเทียบกับสิ่งมีชีวิตชนิดอื่น อาจเป็นไปได้ว่าปรสิตมีวิวัฒนาการก้าวหน้ากว่าปลาที่เข้าไปอาศัย นอกจากนี้การเลี้ยงปลาในภาวะเครียด เช่น ความหนาแน่นสูง คุณภาพน้ำไม่ดี หรืออุณหภูมิน้ำสูง-ต่ำเกินไป

จะเป็นปัจจัยเหนี่ยวนำให้ปลาอ่อนแอและติดเชื้อในที่สุด (Post, 1987; Klontz, 1993; Conte, 2004) และจากการหาค่า LD_{50} พบว่าปลาเทวดาสามารถยอมรับการติดเชื้อได้ง่ายและรวดเร็ว โดยปริมาณปรสิตที่ทำให้ปลาตายขึ้นอยู่กับขนาดปลา ปลาขนาดเล็กจะมีการติดเชื้อรุนแรง แม้ปลาจะได้รับเชื้อในปริมาณต่ำ บ่งชี้ให้เห็นว่าปรสิตชนิดนี้ก่อให้เกิดโรครุนแรงได้ในปลาปกติ นอกจากนี้จากการทดสอบการยอมรับปรสิตในปลาทอง ปลาหางนกยูงและปลาแพลทตี้ พบว่าปลาทั้งสามชนิดไม่ยอมรับปรสิต *S. vortens* ที่แยกได้จากปลาเทวดา เนื่องจากปรสิตอาจมีความจำเพาะเจาะจงกับปลาเจ้าบ้านบางชนิดหรือบางวงศ์เท่านั้น ซึ่งการเข้าสู่ปลาของปรสิตนั้นจะต้องเผชิญกับการเปลี่ยนแปลงของสภาวะแวดล้อมทั้งทางกายภาพและชีวภาพ เช่น อุณหภูมิ ความเป็นกรด-ด่าง สารอาหาร ความเข้มข้นของสารละลาย หรือสภาวะแวดล้อมที่ไม่เหมาะสมต่อการเจริญของปรสิต ประกอบกับปลาทั้งสามชนิดอาจมีภูมิคุ้มกันที่สามารถกำจัดปรสิตออกจากร่างกายได้ จึงไม่พบปรสิตในตัวปลาหลังการฉีดเชื้อ 10 วัน เนื่องจากในวงจรชีวิตของปรสิตมีความจำเป็นที่จะต้องเปลี่ยนจากสภาวะแวดล้อมหนึ่งไปยังอีกสภาวะแวดล้อมหนึ่งที่มีความแตกต่างกันทั้งโครงสร้าง สรีรวิทยา และชีวเคมี ดังนั้นวิธีการที่ปรสิตจะเข้าสู่เจ้าบ้านชนิดอื่น จึงเป็นอีกปัญหาหนึ่งที่สำคัญของปรสิต และเมื่อปรสิตเข้าสู่เจ้าบ้านได้แล้วปรสิตจะต้องสามารถเจริญเติบโต สืบพันธุ์และแพร่กระจายพันธุ์ได้ อาจกล่าวได้ว่าปรสิตกินเพื่อสืบพันธุ์ไม่ได้กินเพื่อดำรงชีวิต ซึ่งจะเห็นได้ว่าการเปลี่ยนจากปลาชนิดหนึ่งไปยังอีกชนิดหนึ่งจะเกี่ยวข้องโดยตรงกับการสืบพันธุ์และการแพร่กระจายพันธุ์ของปรสิตเป็นสำคัญ ดังนั้น การเข้าสู่ปลาผิดชนิดจะทำให้ปรสิตไม่สามารถมีชีวิตและเจริญต่อไปได้ ประกอบกับปรสิตเป็นสิ่งแปลกปลอมที่แอบแฝงอาศัยอยู่ภายในร่างกายของปลา ส่งผลให้ปลาไม่สามารถดำเนินชีวิตได้ตามปกติหรืออาจถึงกับเสียชีวิตได้ ดังนั้น ปลาจึงต้องมีวิธีการที่จะป้องกัน ควบคุมหรือกำจัดปรสิตให้หมดไปจากร่างกายโดยอาศัยกระบวนการต่าง ๆ หรือความต้านทาน (resistance) ซึ่งครอบคลุมปฏิกิริยาทุกชนิดที่ปลามีอยู่ในธรรมชาติเพื่อต้านทานการติดปรสิตและปฏิกิริยาอื่น ๆ ที่ปลาสร้างขึ้นเพื่อควบคุมหรือทำลายปรสิต รวมทั้งการสร้างภูมิคุ้มกัน (immunity) ของปลาขึ้นมาต่อต้านปรสิต โดยทั่วไปปลาจะมีความต้านทานต่อการติดปรสิตตามธรรมชาติ (innate resistance) โดยไม่เกี่ยวข้องกับภูมิคุ้มกันที่สร้างขึ้น แต่ขึ้นอยู่กับชนิดของปลาและชนิดของปรสิต ความต้านทานตามธรรมชาติลักษณะนี้อาจเรียกอีกอย่างหนึ่งว่าความจำเพาะเจาะจงระหว่างปรสิตและปลา (host-parasite specificity) ปรสิตที่มีความจำเพาะต่อปลาสูงจะเข้าไปเจริญในปลาได้น้อยชนิด ในทางตรงข้ามปรสิตที่มีความจำเพาะต่อปลาต่ำจะสามารถเข้าไปเจริญในปลาได้หลากหลายชนิด ปัจจุบันยังไม่มีข้อมูลมากพอที่จะอธิบายให้ชัดเจนว่าอะไรเป็นปัจจัยสำคัญที่ควบคุมความจำเพาะระหว่างปรสิตและปลา (Van Muiswinkel, 1995;

Woo, 1996) ดังนั้น การศึกษาครั้งนี้ทำให้ทราบชัดเจนว่าปรสิต *S. vortens* ที่แยกได้มีความจำเพาะเจาะจงกับปลาเทวดาเท่านั้น เนื่องจากปรสิตสามารถเพิ่มปริมาณในตัวปลาได้มากขึ้นจนก่อให้ปลาแสดงอาการของโรคชัดเจนและตายได้เมื่อปรสิตมีจำนวนมาก ในขณะที่การทดลองในปลาสวยงามชนิดอื่น ๆ คือปลาทอง ปลาหางนกยูงและปลาแพลทตี้ตรวจไม่พบปรสิตในตัวปลาและไม่ก่อให้เกิดอาการของโรคและไม่ทำให้ปลาตาย

4.5 การควบคุมโรคสไปโรนิวคลีโอซีสโดยการใช้ยาและสารเคมี

การติดปรสิต *S. vortens* อย่างรุนแรงส่งผลให้ระบบทางเดินอาหารถูกทำลายและปลาเจริญเติบโตช้ากว่าปกติ (Yasutake *et al*., 1961) การใช้ยาและสารเคมีเพื่อควบคุมและรักษาโรคจึงเป็นสิ่งจำเป็น ยาและสารเคมีที่นิยมใช้ในการยับยั้งการเจริญของปรสิตกลุ่มนี้ ได้แก่ ยาไดเมทริดาโซล ยาเมโทรนิดาโซล ยาแอลเบนดาโซล และ ยามีเบนดาโซล ซึ่งเป็นยาในกลุ่มไนโตรอิมิดาโซลที่ใช้ในการฆ่าโปรโตซัวและแบคทีเรียที่ไม่ใช้ออกซิเจน และไม่เป็นพิษต่อปลา โดยยามีคุณสมบัติในการแทรกซึมและสะสมภายในเซลล์โดยไม่ส่งผลต่อปฏิกิริยาการขนส่งสารระหว่างเซลล์ (Amon *et al*., 1978; Muller, 1983; Chapman *et al*., 1985; Church *et al*., 1996) การศึกษาก่อนหน้านี้โดย Sangmanedet และ Smith (1999) ได้ศึกษาประสิทธิภาพของยา 7 ชนิด คือยาไดเมทริดาโซล ยาเมโทรนิดาโซล ยาไพริเมทามีน ยาแอลเบนดาโซล ยาเฟนเบนดาโซล ยามีเบนดาโซล และ แมกนีเซียมซัลเฟต ในการยับยั้งการเจริญของปรสิต *S. vortens* พบว่ายาไดเมทริดาโซล ยามีเบนดาโซล และยาเมโทรนิดาโซล ความเข้มข้นมากกว่าหรือเท่ากับ 1 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร มีประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญของปรสิตได้ 33 เปอร์เซ็นต์ หลังให้ยานาน 24 ชั่วโมง ยาไดเมทริดาโซลและยามีเบนดาโซล ความเข้มข้นมากกว่าหรือเท่ากับ 4 และ 6 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ สามารถยับยั้งการเจริญของปรสิตได้ 50 เปอร์เซ็นต์ หลังให้ยานาน 48 ชั่วโมง และยามีเบนดาโซล ความเข้มข้นมากกว่าหรือเท่ากับ 0.5 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร สามารถยับยั้งการเจริญของปรสิต *S. vortens* ได้ 50 เปอร์เซ็นต์ หลังให้ยานาน 72 ชั่วโมง รวมทั้งการใช้แมกนีเซียมซัลเฟต ความเข้มข้นมากกว่าหรือเท่ากับ 70 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร สามารถยับยั้งการเจริญของปรสิต *S. vortens* ได้หลังให้ยานาน 24 ชั่วโมง และพบว่ายาไพริเมทามีนความเข้มข้นตั้งแต่ 1-10 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ไม่สามารถยับยั้งการเจริญของปรสิตได้ และจากการศึกษาของ Tojo และ Santamarina (1998) รายงานว่า ยาเมโทรนิดาโซล สามารถยับยั้งการเจริญของปรสิต *S. salmonis* ในปลาเรนโบว์เทร้าท์ (*O. mykiss*) ได้เช่นกัน สอดคล้องกับ

การศึกษาครั้งนี้ที่พบว่าปลาเทวดาที่ติดปรสิต *S. vortens* ตามธรรมชาติที่ได้รับยาไดเมทริดาโซลที่ความเข้มข้น 4 และ 6 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร สามารถยับยั้งการเจริญของปรสิตได้หลังแช่ยานาน 1 วัน แต่หลังการแช่ยาไดเมทริดาโซลที่ความเข้มข้น 4ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ที่เวลา 5 และ 7 วัน ตรวจพบปรสิตในตัวปลาคิดเป็น 20 เปอร์เซ็นต์ โดยพบปรสิตเพียง 1-2 เซลล์ต่อตัวปลา ทั้งนี้อาจเนื่องจากยาดังกล่าวเริ่มหมดฤทธิ์ หรือปลาอาจได้รับปรสิตจากระยะซีสต์ที่อยู่ในน้ำเข้าสู่ตัวปลาอีกครั้ง ส่วนยาเมโทรนิดาโซลมีความเป็นพิษค่อนข้างสูงและเป็นสารก่อมะเร็ง ไม่อนุญาตให้นำมาใช้ในปลาสำหรับการบริโภค แต่สามารถนำมาใช้ในการรักษาโรคปรสิตในแหล่งเพาะเลี้ยงปลาสวยงามได้ ดังนั้น ผลการศึกษาครั้งนี้แสดงให้เห็นว่ายาไดเมทริดาโซลเป็นยาที่มีประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญของปรสิต *S. vortens* ได้ทั้งในหลอดทดลองและในตัวปลา

จากการทดสอบประสิทธิภาพของยาในการยับยั้งการเจริญของปรสิต *S. vortens* ครั้งนี้นับว่าเป็นประโยชน์อย่างยิ่งสำหรับการจัดการการสุขภาพปลาสวยงามและปลาเพื่อการบริโภคต่อไปในอนาคต เนื่องจากสามารถนำข้อมูลที่ได้มาใช้เพื่อป้องกันการแพร่กระจาย และควบคุมการเกิดโรคในปลาสวยงาม ลดความเสียหายจากการระบาดของปรสิตในแหล่งเพาะเลี้ยงหรือแหล่งใหม่ และอาจส่งผลดีต่อเศรษฐกิจการส่งออกปลาสวยงามของประเทศอีกทางหนึ่ง คือ ก่อนการส่งออกหรือจำหน่ายปลาควรทำการแช่ยาไดเมทริดาโซลที่ความเข้มข้น 6 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร เป็นเวลาอย่างน้อย 1 วัน เพื่อป้องกันการตายของปลาและการระบาดของโรคปรสิต ทำให้ผู้ซื้อหรือประเทศผู้รับซื้อเชื่อถือในคุณภาพของปลาจากประเทศไทย นอกจากนี้การจัดการสุขภาพปลาในฟาร์มเพาะเลี้ยงปลาสวยงาม แนะนำให้ใช้แมกนีเซียมซัลเฟต ที่ความเข้มข้นมากกว่า 60 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร แช่ปลานานอย่างน้อย 3 วัน ทั้งนี้เนื่องจากแมกนีเซียมซัลเฟตเป็นโคเอนไซม์หรือโคแฟกเตอร์ของปฏิกิริยาในร่างกายของสิ่งมีชีวิต ในสัตว์น้ำแนะนำให้ใช้แมกนีเซียมซัลเฟต 7,000 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร แช่นาน 5-10 นาที ในการรักษาปรสิตภายนอก และยังพบว่าแมกนีเซียมซัลเฟตยังมีส่วนช่วยกระตุ้นทำให้ระบบภูมิคุ้มกันทำงานดีขึ้น (Sangmaneedet and Smith, 1999) และในอนาคตควรมีการศึกษาเพิ่มเติมในเรื่องการนำสมุนไพรมาประยุกต์ใช้ในการยับยั้งการเจริญของปรสิตดังกล่าว เพื่อป้องกันการดื้อยา การปนเปื้อนของยาในสิ่งแวดล้อม และช่วยลดต้นทุนในการผลิตปลาสวยงามของเกษตรกร

ปรสิต *Spironucleus* sp. เป็นปรสิตที่อาศัยอยู่ในระบบทางเดินอาหาร สามารถแพร่กระจายผ่านทางกระแสเลือดและเข้าสู่อวัยวะอื่น ๆ ทำให้เกิดการติดเชื้อทั้งระบบ และแพร่กระจายไปยังปลาตัวอื่นหรือปลาชนิดอื่นที่สามารถยอมรับปรสิตได้ นอกจากนี้ปรสิตยังมีความจำเพาะต่อตัวเจ้าบ้านต่ำจึงก่อโรคได้กว้างในปลาหลายชนิด ทั้งในปลาธรรมชาติและปลา

เลี้ยงในหลายภูมิภาคทั่วโลก (Poynton and Morrison, 1990; Poppe *et al*., 1992; Sterud *et al*., 1997; Sterud, 1998a, b, c) โรคสไปโรนิวคลีโอซีสจึงนับเป็นโรคสำคัญที่สร้างปัญหาอย่างมากต่อการเพาะเลี้ยงปลา การควบคุมโรคปรสิตชนิดนี้ให้ได้ผลดีนอกจากการหาวิธีการป้องกันการลดความผิดปกติหรือผลกระทบของโรคต่อสุขภาพของปลาก็เป็นสิ่งจำเป็นที่จะต้องกระทำควบคู่กันไป ดังนั้น การป้องกันรักษาโรคชนิดนี้จึงนับเป็นสิ่งจำเป็นที่ต้องปฏิบัติเพื่อป้องกันโรคนี้อย่างมีประสิทธิภาพต่อไป

บทที่ 5

สรุปผลการทดลองและข้อเสนอแนะ

1. ศึกษาโรคสไปโรนิวคลีโอซีสในปลาสวยงามสี่ชนิด ได้แก่ ปลาเทวดา ปลาออสการ์ ปลาหมอสี และปลากัด พบปรสิตกลุ่ม hexamitid flagellates ในปลาสวยงามสามชนิด ได้แก่ ปลาเทวดา ปลาออสการ์ และปลาหมอสี โดยปรสิตที่พบในปลาเทวดาสามารถจำแนกชนิดได้เป็น *Spironucleus vortens*

2. ปลาสวยงามที่ติดปรสิตกลุ่ม hexamitid flagellates มีสีลำตัวซีดหรือคล้ำกว่าปกติ ว่ายน้ำเสียการทรงตัว ท้องบวม เซื่องซึม ตกเลือดบริเวณใกล้รูทวาร ซูบผอม เจริญเติบโตช้ากว่าปกติ บริเวณลำตัวมีเมือกมาก มีแผลบริเวณโคนครีบหาง ครีบหางสึกกร่อน มูลปลามีสีขาว เฉพาะในปลาหมอสีพบมีรูบนหัว 1-2 รู และพบการตายของปลาบางส่วนที่ติดเชื้อรุนแรง อวัยวะภายในของปลาที่ติดปรสิตพบตับมีสีซีด มีของเหลวในช่องท้อง ลำไส้บวมพอง และอักเสบ

3. การเปลี่ยนแปลงทางพยาธิสภาพในปลาเทวดาที่ติดปรสิต *S. vortens* พบการเกิดกรานูโลมาในตับ เกิดเมลาโนมาโครฟาจเป็นจำนวนมากในม้าม และเกิดการอักเสบในลำไส้

4. ปรสิต *S. vortens* สามารถเจริญได้ดีในอาหารเลี้ยงเซลล์ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส และความเป็นกรด-ด่าง 7

5. ปริมาณปรสิต *S. vortens* ที่ทำให้ปลาเทวดาน้ำหนัก 1.81±0.44 กรัม ตาย 50 เปอร์เซ็นต์ ในเวลา 14 วัน (LD_{50} ที่เวลา 14 วัน) คือ $2.99x10^3$ เซลล์ แต่ปลาสวยงามชนิดอื่น ๆ เช่น ปลาทอง ปลาแพลทตี้ และปลาหางนกยูง จะไม่ยอมรับปรสิตชนิดนี้หลังการฉีดเชื้อนาน 10 วัน

6. ยาไดเมทริดาโซลมีประสิทธิภาพดีที่สุดในการยับยั้งการเจริญของปรสิต *S. vortens* ทั้งในหลอดทดลองและในตัวปลาที่ความเข้มข้นมากกว่าหรือเท่ากับ 6 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

ข้อเสนอแนะ

1. ก่อนการส่งออกหรือจำหน่ายปลาควรทำการแช่ยาไดเมทริดาโซลที่ความเข้มข้น 6 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร เป็นเวลาอย่างน้อย 1 วัน และแนะนำให้ใช้แมกนีเซียมซัลเฟต ที่ความเข้มข้นมากกว่า 60 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร แช่ปลานานอย่างน้อย 3 วัน เพื่อเสริมภูมิต้านทานและป้องกันการแพร่กระจายของปรสิต

2. ศึกษาเพิ่มเติมเรื่องการนำสมุนไพรมาประยุกต์ใช้ในการยับยั้งการเจริญของปรสิต เพื่อป้องกันการดื้อยา การปนเปื้อนของยาในสิ่งแวดล้อม และเพื่อช่วยลดต้นทุนการผลิตปลาสวยงามของเกษตรกร

เอกสารอ้างอิง

กมลพร ภาวภูตานนท์ และ สุปราณี ชินบุตร. 2526. ปรสิตปลาน้ำจืดของไทย. สถาบันประมงน้ำจืดแห่งชาติ กรมประมง กระทรวงเกษตรและสหกรณ์. กรุงเทพฯ: อักษรสยามการพิมพ์. 63 หน้า.

กมลพร ทองอุไทย และ สุปราณี ชินบุตร. 2532. *Hexamita symphysodonis* nov. sp. ปรสิตชนิดใหม่ในปลาปอมปาดัวร์. ว. การประมง 42: 141-144.

กมลพร ทองอุไทย และ สุปราณี ชินบุตร. 2539. การป้องกันและกำจัดโรคปลา. เอกสารแนะนำ สถาบันวิจัยสุขภาพสัตว์น้ำ กรมประมง กระทรวงเกษตรและสหกรณ์. กรุงเทพฯ: อักษรสยามการพิมพ์. 33 หน้า.

กิจการ ศุภมาตย์, สาวิตรี ศิลาเกษ, วุฒิพร พรหมขุนทอง และสิทธิ บุณยรัตผลิน. 2539. โรคและพยาธิปลา. ภาควิชาวาริชศาสตร์ คณะทรัพยากรธรรมชาติ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์. 209 หน้า.

เกียรติศักดิ์ พงศ์พณิช. 2531. ศาสตร์และศิลปแห่งการเลี้ยงปลา. มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลล้านนา ลำปาง. 157 หน้า.

ชลอ ลิ้มสุวรรณ. 2528. โรคปลา. เอกสารประกอบการสอนวิชา ชีววิทยาประมง คณะประมง มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์. 227 หน้า.

ชาติ ไชยณรงค์. 2534. ปลากัด. กรุงเทพฯ: เทพพิทักษ์การพิมพ์. 87 หน้า.

ชูศักดิ์ แสงธรรม. 2541. เทคนิคการเพาะเลี้ยงปลาตู้. กรุงเทพฯ: เทพพิทักษ์การพิมพ์. 103 หน้า.

ถวิล มนัสน้อม. 2539. คู่มือเลี้ยงปลาตู้สวยงาม. กรุงเทพฯ: เอส พี เอฟ พริ้นติ้ง กรุ๊ป. 145 หน้า.

นพดล ศุกระกาญจน์. 2549. คู่มือปฏิบัติการโรคสัตว์น้ำ. ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยทักษิณ. 103 หน้า.

นิรัติศัย เพชรสุภา. 2535. การศึกษาโรคและปรสิตของปลาสวยงามที่นำเข้า. วิทยานิพนธ์ปริญญาโท สาขาวิชาวิทยาศาสตร์การประมง. มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

ประไพสิริ สิริกาญจน. 2546. ความรู้เรื่องปรสิตของสัตว์น้ำ. ภาควิชาชีววิทยาประมง คณะประมง มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์. 270 หน้า.

พลพจน์ กิตติสุวรรณ, นนทรี ปานพรหมมินทร์ และสมเกียรติ มณีฉาย. 2552. ปลาสวยงาม ศักยภาพการวิจัยและพัฒนาระบบการตลาดและการส่งออกของประเทศไทย. สถาบันวิจัยสัตว์น้ำสวยงามและพรรณไม้น้ำ สำนักวิจัยและพัฒนาประมงน้ำจืด กรมประมง. 17 หน้า.

ยุทธวัช เกิดนวล. 2544. เทคนิคและวิธีการเลี้ยงปลาตู้แบบมืออาชีพ. กรุงเทพฯ: สำนักพิมพ์คนทำหนังสือ. 165 หน้า.

ยุพิน วิวัฒนชัยเศรษฐ์. 2539. คุยกับเกษตรกรเลี้ยงปลาสวยงามที่บ้านโป่ง. ว. การประมง 49: 365-373.

วันเพ็ญ มีนกาญจน์, นงนุช เลาหะวิสุทธิ์ และ สุภาพ พรหมยศ. 2533. ธุรกิจปลาสวยงามของไทย. เอกสารเผยแพร่. สถาบันวิจัยประมงน้ำจืด กรมประมง บางเขน กรุงเทพฯ : อักษรสมัย. 37 หน้า.

สำนักวิจัยเศรษฐกิจการเกษตร. 2541. การผลิตและการค้าปลาสวยงาม. เอกสารเศรษฐกิจการเกษตร. สำนักงานเศรษฐกิจการเกษตรและสหกรณ์.

องอาจ เลาหวินิจ, กิติ ศรีสุภาพ, นงนุช จันทราช และ สุปราณี ชินบุตร. 2538. การศึกษาโรคเฮกซามิต้าในลำไส้ปลาปอมปาดัวร์. ว.เกษตรศาสตร์. 28: 66-73.

อมรรัตน์ เสริมวัฒนากุล. 2548. ตลาดปลาสวยงาม. เอกสารเผยแพร่ฉบับที่ 6/2548. สถาบันวิจัยสัตว์น้ำสวยงามและพรรณไม้น้ำ กรมประมง. 82 หน้า.

Amon, I., Amon, K. and Huller, H. 1978. Pharmacokinetics and therapeutic efficacy of metronidazole at different dosages. Int. J. Clin. Pharmacol. Biopharm. 16: 384-386.

Amlacher, E., 1970. Textbook of Fish Diseases. Translated from German by D.A. Conroy and R. L. Herman. Jersey City: T.F.H. Publications Inc. 302 p.

Andrews, C., Exel, A. and Carrington, N. 1988. The Interpet Manual of Fish Health. Vincent Lane, United Kingdom: Dorking Surrey. 208 p.

Andrews, C. 1990. The ornamental fish trade and fish conservation. J. Fish Biol. 37: 53-59.

Axelrod, H. R. 1985. The anglefish, *Pterophyllum*. Trop. Fish Hobbyist. 5: 34-53.

Bancroft, J. D. 1967. Histological Techniques. London: Butterworths. 348 p.

Bassleer, G. 1983. Disease prevention and control *Spironucleus*/*Hexamita* infection, hole-in the-head disease. Freshw. Mar. Aquar. 6: 38-60.

Becker, C. D. 1977. Flagellate parasites of fish. *In*: Kreier, J. P. (ed.). Parasitic Protozoa. Vol 1. New York: Academic Press. pp. 358-416.

Boonyaratpalin, S. and Sermwatanakul, A. 2004. The Current State of the Ornamental Fish Industry in Thailand. Department of Fisheries, Thailand. 22 p.

Brugerolle, G. and Lee, J. J. 2002. Order Diplomonadida. *In*: Lee JJ, Leedale GF, Bradbury P (eds). An Illustrated. Guide to the Protozoa. 2nd edition. Society of Protozoologists, Lawrence: KS. pp. 1125–1135.

Buchmann, K. and Uldal, A. 1996. Temperature, pH and bile dependent *in vitro* cultivation of *Hexamita salmonis* from rainbow trout *Oncorhynchus mykiss* intestine. Dis. Aquat. Org. 24: 169-172.

Chapman, A R., Linstead, C. D. and Lloyd, D. 1985. The generation of metronidazole radicals in hydrogenosomes isolated from *Trichomonas vaginalis*. J. Gen. Microbiol. 131: 2141–2144.

Church, D. L., Bryant, R. D., Sim, V. and Laishley, E. J. 1996. Metronidazole susceptibility and the presence of hydrogenase in pathogenic bacteria. Anaerobe. 2: 147-153.

Conte, F. S. 2004. Stress and the welfare of cultured fish. Appl. Anim. Behav. Sci. 86: 205–223.

Culliing, C. F. A., Allison, R. T. and Barr, W. T. 1985. Cellular Pathology Technique. London: Butterworths. pp.155-163.

Davis, H. S. 1926. *Octomitus salmonis*, a parasitic flagellate of trout. Bull. Bur. Fish. Wash. 42: 9-26.

Dickerson, H.W. and Dawe, D. L. 1995. *Ichthyophthirius multifiliis* and *Cryptocaryon irritans* (Phylum Ciliophora). *In*: Woo, P.T.K. (ed), Fish Diseases and Disorders, Vol.1 Protozoan and Metazoan infection. Wallingford, UK: CAB International. pp. 181-227.

Ferguson, H. W. 1979. Scanning and transmission electron microscopical observations on *Hexamita salmonis* (Moore, 1922) related to mortalities in rainbow trout fry *Salmo gairdneri* Richardson. J. Fish Dis. 2: 57-67.

Ferguson, H. W. and Moccia, R. D. 1980. Disseminated hexamitiasis in Siamese fighting fish. J. Am. Vet. Med. Assoc. 177: 854-857.

Gratzek, J. B. 1988. Parasites associated with ornamental fish. Veterinary Clinics of North America, small animal practice. Trop. Fish. Med. 18: 375-399.

Guo, F. C. and Woo, P. T. K. 2004a. Detection and quantification of *Spironucleus barkhanus* in experimentally infected Atlantic salmon *Salmo salar*. Dis. Aquat. Org. 61: 175-178.

Guo, F. C. and Woo, P. T. K. 2004b. Experimental infections of Atlantic salmon *Salmo salar* with *Spironucleus barkhanus*. Dis. Aquat. Org. 61: 59-66.

Hili, P., Evans, C.S. and Veness, R.G. 1997. Antimicrobial action of essential oil: the effect of dimethylsulphoxide on the activity of cinnamon oil. Lett. Appl. Microbiol. 24: 269-275.

Humason, G. 1979. Animal Tissue Techniques (4th edition). San Francisco: W. H. Freeman and Company. 661 p.

Jørgensen, A. and Sterud, E. 2006. The marine pathogenic genotype of *Spironucleus barkhanus* from farmed salmonids redescribed as *Spironucleus salmonicida* n. sp. Eukaryot. Microbiol. 53: 531–541.

Kent, M. L., Ellis, J., Fournie, J. W., Dawe, S. C., Bagshaw, J. W. and Whitaker, D. J. 1992. Systemic hexamitid (Protozoa: Diplomonadida) infection in seawater pen-reared Chinook salmon *Oncorhynchus tshawytscha*. Dis. Aquat. Org. 14: 81-89.

Klontz, G. W. 1993. Environmental Requirements and Environmental Diseases of Salmonids. *In*: Stoskopf, M. (Ed.), Fish Medicine. USA: Saunders, Philadelphia, PA. pp. 333–342.

Koudela, B., Karr, C. D., Mayer, E. A., Mayer, B. and Jarroll, E. L. 1996. *In vitro* excystation of *Spironucleus muris*. J. Eukaryot. Microbiol. 43: 61-64.

Kulda, J. and Lom, J. 1964a. Remarks on the diplomastigine flagellates from the intestine of fishes. Parasitol. 54: 753-762.

Kulda, J. and Lom, J. 1964b. *Spironucleus elegans* Lavier, parasite of fish. Cesk Parasitol. 11: 187-192.

Kulda, J. and Nohynkova, E. 1978. Flagellates of the Human Intestine and Intestine of the Other Species. *In*: Kreier, J. P. (ed.). Parasitic Protozoa. New York: Academic Press. 138 p.

Leivine, N. D. 1985. Flagellates: *Spironucleus*, *Giardia*, and Other Flagellates. *In*: Veterinary Protozoology. Ames, Iowa : The Iowa State University Press. pp. 89-108.

Lom, J. and Dykova, I. 1992. Developments in Aquaculture and Fisheries Science, Vol 26. Protozoan Parasites of Fishes. New York: Elsevier Science Publishers B. V. 315 p.

Mcdonald, T. T and Monteleon, G. 2005. Immunity, inflammation and allergy in the gut. Sci. 307: 1920-1925.

McElwain, I. B. 1968. Efficacy of cyzine for trout hexamitiasis. Prog. Fish. Cult. 30: 84-91.

Mills, D., Sand, D. and Scott, P. W. 1988. The Concise Encyclopedia of Tropical Aquarium Fishes. New York: Crescent Books. 320 p.

Miura, S. and Ohsima, K. 1960. On octomitiasis in rainbow trout with special reference to the pathological findings. J. Vet. Sci. 22: 201-208.

Mo, T. A., Poppe, T. T. and Iversen, L. 1990. Systemic hexamitosis in salt-water reared Atlantic salmon (*Salmo salar* L.). Bull. Eur. Assoc. Fish Pathol. 10: 69-70.

Molnar, K. 1974. Data on the “octomitosis” (spironucleosis) of cyprinids and aquary fishes. Acta. Vet. Acad. Sci. Hung. 24: 99-106.

Moore, E. 1922. *Octomitus salmonis*, a new species of intestinal parasite in trout. Trans. Am. Fish. Soc. 52: 74-97.

Morrison, C. M., O’ Neil, D. and Wright Jr, J. R. 2007. Histopathology of “hole-in–the-head” disease in the Nile tilapia *Oreochromis niloticus*. Dis. Aquat. Org. 273: 427-433.

Muller, M. 1983. Mode of action of metronidazole on anaerobic bacteria and protozoa. Surgery 93: 165-171.

Nelson, J. S. 1994. Fish of the World. New York: John Wiley and Sons, Inc. 600 p.

Noga, E. J. 2000a. Problem 89. Freshwater Hole-in–the–Head Syndrome (Freshwater Head and Lateral Line Erosion, FHLLE). Fish Diseases: Diagnosis and Treatment. Blackwell Publishing. 244 p.

Noga, E. J. 2000b. Problem 90. Marine hole-in–the–head syndrome (Marine Head and Lateral Line Erosion, MHLLE). Fish Diseases: Diagnosis and Treatment. Blackwell Publishing. 245 p.

Paull, G. C. and Matthews, R. A. 2001. *Spironucleus vortens*, a possible cause of hole-in-the-head-disease in cichlids. Dis. Aquat. Org. 45: 197-202.

Poppe, T. T., Mo, T. A. and Iversen, L. 1992. Disseminated hexamitosis in sea-caged Atlantic salmon *Salmo salar*. Dis. Aquat. Org. 14: 91-97.

Post, G. 1983. Textbook of Fish Health. Neptune City, New Jersey: TFH Publications Inc. 288 p.

Post, G. 1987. Textbook of Fish Health (2^{nd} edition). Neptune City, New Jersey: TFH Publications Inc. 288 p.

Poynton, S. L., Fard, M. R. S., Jenkins, J. and Ferguson, H. W. 2004. Ultrastructure of *Spironucleus salmonis* n. comb. (formerly *Octomitus salmonis* sensu Moore 1922, Davis 1926, and *Hexamita salmonis* sensu Ferguson 1979), with a guide to *Spironucleus* species. Dis. Aquat. Org. 60: 49-64.

Poynton, S. L., Fraser, W., Francis-Floyd, R., Rutledge, P., Reed, P. and Nerad, T. A. 1995. *Spironucleus vortens* n. sp. from the freshwater angelfish *Pterophyllum scalare*: morphology and culture. J. Eukaryot. Microbiol. 42: 731-742.

Poynton, S. L. and Morrison, C. M. 1990. Morphology of diplomonad flagellates: *Spironucleus torosa* from Atlantic Cod *Gadus morhua* L., and Haddock *Melanogrammus aeglefinus* (L.) and *Hexamita salmonis* from brook trout *Salvelinus fontinalis* (Mitchill). J. Soc. Protozool. 37: 369-383.

Poynton, S. L. and Sterud, E. 2002. Guidelines for species descriptions of diplomonad flagellates from fish. J. Fish Dis. 25: 15-31.

Reed, L. J. and Muench, H. 1938. A simple method of estimating fifty percent endpoints. J. Am. Hyg. 27: 493-497.

Robinson, D. G., Ehlers, U., Herken, R., Herrmann, B., Mayer, R. and Schurmann, F. W. 1987. Method of Preparation for Electron Microscopy. Berlin:Springer-Verlag. 190 p.

Rodina, A.G. 1972. Method in Aquatic Microbiology. Balltimore : University Park Press. pp. 100-101.

Saghari Fard, M. R., Jørgensen, A., Sterud, E., Bleiss, W. and Poynton, S. L. 2007. Ultrastructure and molecular diagnosis of *Spironucleus salmonis* (Diplomonadida) from rainbow trout *Oncorhynchus mykiss* in Germany. Dis. Aquat. Org. 75: 37–50.

Sangmaneedet, S. 1999. *Spironucleus vortens* of the Freshwater Angelfish (*Pterophyllum scalare*): Growth Requirements, Chemotherapeutants, Pathogenesis and Immunity. Doctor of Philosophy in Veterinary Medical Science. Verginia Polytechnic Institute and State University.

Sangmaneedet, S. and Smith, S. A. 1999. Efficacy of various chemotherapeutic agents on the growth of *Spironucleus vortens*, an intestinal parasite of freshwater angelfish. Dis. Aquat. Org. 38: 47-52.

Sangmaneedet, S. and Smith, S. A. 2000. *In vitro* studies on optimal requirements for the growth of *Spironucleus vortens*, an intestinal parasite of the freshwater angelfish. Dis. Aquat. Org. 39: 135-141.

Sano, T. 1970. Etiology and histopathology of hexamitiasis and an IPN-like disease of rainbow trout. J. Tokyo Univ. Fish. 56: 23-30.

Siddall, M. E., Hong, H. and Desser, S. S. 1992. Phylogenetic analysis of the Diplomonadida (Wenyon, 1926) Brugerolle, 1975: Evidence for heterochrony in protozoa and against *Giardia lamblia* as a missing link. J. Protozool. 39: 361-367.

Specht, D. R., Francis-Floyd, Bolon, B. and Watson, C. 1989. Significant of intestinal parasitism in the mortality of domestically-bred and imported angelfish, *Pterophyllum scalare*, IAAAM Proceedings. 20: 57-62.

Sterud, E. 1998a. *In vitro* cultivation and temperature-dependent growth of two strains of *Spironucleus barkhanus* (Diplomonadida: Hexamitidae) from Atlantic salmon *Salmo salar* and grayling *Thymallus thymallus*. Dis. Aquat. Org. 33: 57-61.

Sterud, E. 1998b. Ultrastructure of *Spironucleus torosa* Poynton and Morrison, 1990 (Diplomonadida: Hexamitidae) in cod *Gadus morhua* (L.) and saithe *Pollachius virens* (L.) from southeastern Norway. Eur. J. Protistol. 34: 69-77.

Sterud, E. 1998c. Ultrastructure of *Spironucleus torosa* Poynton and Morrison 1990 (Diplomonadida: Hexamitidae), in cod *Gadus morhua* (L.) and saithe *Pollachius virens* (L.) from south-eastern Norway. Eur. J. Protistol. 34: 69-77.

Sterud, E., Mo, T. A. and Poppe, T. T. 1997. Ultrastructure of *Spironucleus barkhanus* n. sp. (Diplomonadida: Hexamitidae) from grayling *Thymallus thymullus* (L.) (Salmonidae) and Atlantic salmon *Salmo salar* L. (Salmonidae). J. Eukaryot. Microbiol. 44: 399-407.

Sterud, E., Mo, T. A. and Poppe, T. T. 1998. Systemic spironucleosis in sea-farm Atlantic salmon *Salmo salar*, caused by *Spironucleus barkhanus*? transmitted from feral Arctic *Salvelinus alpinus*. Dis. Aquat. Org. 33: 63-66.

Sterud, E. and Poynton, S. L. 2002. *Spironucleus vortens* (Diplomonadida) in the Ide, *Leuciscus idus* (L.) (Cyprinidae): a warm water hexamitid flagellate found in Northern Europe. J. Eukaryot. Microbiol. 49: 137-145.

Sterud, E., Poppe, T. and Bornø, G. 2003. Intracellular infection with *Spironucleus barkhanus* (Diplomonadida:Hexamitidae) in farmed Arctic charr *Salvelinus alpinus*. Dis. Aquat. Org. 56: 155 – 161.

Tojo, J. L. and Santamarina, M. T. 1998. Oral Pharmacological treatments for parasitic disease of rainbow trout *Oncorhynchus mykiss*. I: *Hexamita salmonis*. Dis. Aquat. Org. 33: 51-56.

Uldal, A. and Buchmann, K. 1996. Parasite host relations: *Hexamita salmonis* in rainbow trout *Oncorhynchus mysis*. Dis. Aquat. Org. 25: 229-231.

Uzmann, J. R., Paulik, G. J. and Hayduk, S. H. 1965. Experimental hexamitiasis in juvenile coho salmon (*Oncorhynchus kisutch*) and steelhead trout (*Salmo gairdneri*). Trans. Am. Fish. Soc. 94: 53-61.

Van Duijn, C. 1956. Disease of Fishes. London: Life Books Ltd. 309 p.

Van Miswinkel, W. B. 1995. The piscine immune system: innate and acquire immunity. *In*: Woo, P.T.K. (ed). Fish Disease and Disorders. Vol 1. Protozoan and Metazoan Infections. Wallingford: CAB International. pp. 729-750.

Woo, P. T. K. 1996. Protective immune response of fish to parasitic flagellates. Ann. Rev. Dis.6: 121-131.

Woo, P. T. K. and Poynton, S. L. 1995. Diplomonadida, Kinetoplastida and Amoebida (Phylum Sarcomastigophorea). *In*: Woo P.T.K. (ed) Fish Disease and Disorders, Vol 1. Protozoan and Metazoan Infections. Wallingford: CAB International. pp. 27-96.

Woo, P. T. K. 2006. Fish Disease and Disorders, Volume 1. Protozoan and Metazoan Infection. UK: AMD Dataset Ltd. 791 p.

Yasutake, W. T., Buhler, D. R. and Shanks, W. E. 1961. Chemotherapy of hexamitiasis in fish. J. Parasitol. 47: 81-86.

ภาคผนวก

ภาคผนวก ก

สารเคมีและวิธีการวิเคราะห์

1. สีย้อมแกรม (Gram stain) โดยวิธี Hucker modification of gram method (Rodina, 1972)

การเตรียมสารละลาย

1. crystal violet-ammonium oxalate ประกอบด้วย

- crystal violet (90% dye content)	2	กรัม
- ammonium oxalate	0.8	กรัม
- ethyl alcohol (95เปอร์เซ็นต์)	20	มิลลิลิตร
- distilled water	80	มิลลิลิตร

ทำการผสมสารละลายทั้งหมดเข้าด้วยกัน ทิ้งไว้ 48 ชั่วโมง แล้วกรองด้วยกระดาษกรองก่อนนำไปใช้งาน และนำไปเก็บไว้ในขวดสีชาเพื่อป้องกันแสงแดด

2. Safranin solution

เตรียม stock safranin ความเข้มข้น 2.5 เปอร์เซ็นต์ โดยใช้เอธิลแอลกอฮอล์ความเข้มข้น 95 เปอร์เซ็นต์ เป็นตัวทำละลาย แล้วเจือจางด้วยน้ำกลั่นอัตราส่วน 1:10 แล้วนำไปเก็บไว้ในขวดสีชาเพื่อป้องกันแสงแดด

3. Gram's iodine ประกอบด้วย

- Iodine	1	กรัม
- Potassium iodine	2	กรัม
- Distilled water	300	มิลลิลิตร

4. Decolorize

Ethyl alcohol (95%)

วิธีการย้อมสีแกรม

นำเชื้อมาเกลี่ย (smear) บาง ๆ ลงบนสไลด์ แล้วทิ้งไว้ให้แห้ง หลังจากนั้นนำไปผ่านเปลวไฟ (fixed) เพื่อให้เซลล์ยึดติดกับสไลด์ แล้วหยด crystal violet ให้ท่วม วางทิ้งไว้ 1 นาที ล้างออกด้วยน้ำประปาประมาณ 2 วินาที หยดแกรมไอโอดีนทิ้งไว้ 1 นาที ทำการล้างสี (decolorized) ด้วยเอธิลแอลกอฮอล์ ความเข้มข้น 95 เปอร์เซ็นต์ นาน 30 วินาที ล้างด้วยน้ำกลั่น แล้วหยดสี safranin ประมาณ 1 นาที ล้างด้วยน้ำประปา ตั้งทิ้งไว้ให้แห้ง นำไปดูด้วยกล้องจุลทรรศน์ (light microscope) ที่กำลังขยาย 100 เท่า บันทึกการติดสีและรูปร่างของแบคทีเรีย

ผลการทดสอบ คือ แบคทีเรียแกรมบวกจะติดสีม่วง

แบคทีเรียแกรมลบติดสีแดง

2. การทดสอบด้วยชุดทดสอบคุณสมบัติของเชื้อแบคทีเรียทางชีวเคมี (Api 20E system, BioMeriux)

Api 20E system (Biomerieux) เป็นชุดทดสอบคุณสมบัติของเชื้อทางชีวเคมีอย่างรวดเร็ว ซึ่งสามารถทดสอบคุณสมบัติทั้งหมดได้ 20 คุณสมบัติ

วิธีการทดสอบ

เตรียมสารละลายเชื้อแบคทีเรียให้มีความขุ่นเท่ากับ McFarland เบอร์ 0.5 นำแถบ Api มาวางในถาดที่มีน้ำกลั่นที่ผ่านการฆ่าเชื้อเรียบร้อยแล้วใช้ไมโครไปเปตที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้วเติมสารละลายเชื้อลงในกระเปาะที่บรรจุอาหารเลี้ยงเชื้อสำหรับทดสอบคุณสมบัติทางชีวเคมีของชุดทดสอบสำเร็จรูป API 20E โดยที่กระเปาะ ADH, ODC, H_2S และ URE จะต้องปิดหน้าด้วย liquid paraffin และกระเปาะ ICITI, IVPI และ IGELI จะต้องเติมสารละลายเชื้อให้เต็มทั้งในส่วนที่เป็นกระเปาะและส่วนบน หลังจากเติมสารละลายเชื้อลงในช่องต่าง ๆ จนเรียบร้อยแล้วปิดฝา จากนั้นนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง แล้วเติมสารละลาย reagents แล้วนำไปบ่มต่อที่ อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 18-24 ชั่วโมง แล้วทำการตรวจสอบผลของปฏิกิริยาที่เกิดขึ้นตามตารางการแปรผลในคู่มือที่แนบมากับชุดทดสอบ พร้อมบันทึกผลลงในแผ่นบันทึกรายการ หลังจากได้ผลแล้วใช้ผลการตรวจสอบคุณสมบัติทางชีวเคมีวินิจฉัยชนิดของแบคทีเรียของเชื้อตัวอย่างโดยใช้ Identification table ในคู่มือที่แนบมากับชุดทดสอบหรือการวินิจฉัยของบริษัทผู้ผลิต โปรแกรม APILAB Plus software เพื่อจำแนกชนิดของแบคทีเรีย

การเตรียมสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ซาลีน (PBS, pH 7.4)

สารเคมี

1. โซเดียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟตไดไฮเดรต (NaH_2PO_4 $2H_2O$)	0.62	กรัม
2. ไดโซเดียมไฮโดรเจนฟอสเฟตแฮบตะไฮเดรต (Na_2HPO_4 $7H_2O$)	1.61	กรัม
3. โซเดียมคลอไรด์ (NaCl)	15.00	กรัม
4. น้ำกลั่น	1,000	มิลลิลิตร

ละลายสารแยกกันแล้ว นำสารที่ละลายมาผสมรวมกันปรับปริมาตรให้ได้ 1,000 มิลลิลิตร และปรับ pH 7.4 จากนั้นนำไปฆ่าเชื้อในหม้อนึ่งความดันที่ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว นาน 15 นาที

วิธีการศึกษาพยาธิสภาพของเนื้อเยื่อปลา

1. สารเคมี วิธีการเตรียมตัวอย่างและวิธีการศึกษาพยาธิสภาพของเนื้อเยื่อ (Bancroft, 1967; Humason, 1979)

สารเคมี

ก. การเตรียมน้ำยาดองเนื้อเยื่อและสีย้อม

1. ฟอร์มาลีน (formalin) ความเข้มข้น 10 เปอร์เซ็นต์

- ฟอร์มาลีน (formalin)	100	มิลลิลิตร
- น้ำกลั่น	900	มิลลิลิตร

ผสมเข้าด้วยกัน

2. สีย้อมฮีมาทอกซิลิน (haematoxylin) เตรียมโดยใช้

- ฮีมาทอกซิลิน (haematoxylin crystal)	4	กรัม
- โซเดียมไอโอเดท (sodium iodate)	0.8	กรัม
- อลัม (potasium aluminium sulfate, alum)	100	กรัม

- กรดซิตริก (citric acid)	4	กรัม
- คลอรัลไฮเดรท (chloral hydrate)	200	กรัม
- น้ำกลั่น	2,000	มิลลิลิตร

ละลายอลัมลงในน้ำกลั่น เติมฮีมาทอกซิลินผสมจนกระทั่งละลายหมด จึงเติมโซเดียมไอโอเดทผสมให้เข้ากัน จากนั้นเติมกรดซิตริกและคลอรัลไฮเดรทผสมจนกระทั่งเป็นเนื้อเดียวกันทิ้งไว้ 1 สัปดาห์ก่อนนำมาใช้งาน

3. สีย้อมอีโอซิน (eosin) เตรียมโดยใช้

- อีโอซิน (eosin Y.CI 45380)	1	กรัม
- เอทธิลแอลกอฮอล์ ความเข้มข้น 70 เปอร์เซ็นต์	1,000	มิลลิลิตร
- กรดอะซิติกเข้มข้น	5	มิลลิลิตร

ข. การเตรียมตัวอย่างเนื้อเยื่อ

1. สลบปลาด้วยสารละลายควินาดีน (quinaldine) ความเข้มข้น 50 ส่วนในล้านส่วน

2. ใช้กรรไกรผ่าตัดเปิดช่องท้องของปลาออก ตัดตับ ถุงน้ำดี หัวใจ ม้าม กระเพาะอาหารและลำไส้ออกแล้วดองในน้ำยารักษาสภาพเนื้อเยื่อ (ฟอร์มาลิน ความเข้มข้น 10 เปอร์เซ็นต์) ทันที เก็บรักษาตัวอย่างในน้ำยาดองดังกล่าวเป็นเวลา 3 วัน แล้วจึงเปลี่ยนน้ำยาดองเป็นเอธิลแอลกอฮอล์ ความเข้มข้น 50 และ 70 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ

ขั้นตอนการ dehydration และ embedding

1. ตัดแต่งตัวอย่าง (trim) ที่ผ่านการดองแล้วให้มีขนาดพอเหมาะเพื่อสะดวกต่อการ embed และนำไปตัด section

2. นำตัวอย่างไปผ่านขั้นตอน dehydration ด้วยเครื่องเตรียมเนื้อเยื่ออัตโนมัติ (automatic tissue processor) ซึ่งมีขั้นตอนดังนี้

ขั้นตอนที่	สารละลาย	เวลา (ชั่วโมง)
1	แอลกอฮอล์ 50 เปอร์เซ็นต์	1
2	แอลกอฮอล์ 70 เปอร์เซ็นต์	1
3	แอลกอฮอล์ 70 เปอร์เซ็นต์	1
4	แอลกอฮอล์ 95 เปอร์เซ็นต์	1
5	แอลกอฮอล์ 95 เปอร์เซ็นต์	1
6	แอบโซลูท แอลกอฮอล์ (absolute alcohol)	
7	ไอโซโพรพิล แอลกอฮอล์ (isopropyl alcohol)	1
8	ไอโซโพรพิล แอลกอฮอล์	1
9	ไซลีน (xylene)	1
10	ไซลีน	1
11	พาราพลาสท์ (paraplast)	1
12	พาราพลาสท์	1

3. นำตัวอย่างที่ผ่านขั้นตอนที่ 2 ไป embed ด้วยพาราพลาสท์ จากนั้นนำ block ไปแช่ตู้เย็นเพื่อง่ายต่อการนำไปตัด section ต่อไป

4. ตัดแต่งตัวอย่างที่อยู่ใน block ให้มีขนาดพอดีกับขนาดสไลด์ และแผ่นปิดสไลด์ ปิดได้สนิท จากนั้นนำไปตัดด้วยเครื่องตัดเนื้อเยื่อ ให้มีความหนาประมาณ 3-4 ไมครอน นำไปลอยในน้ำอุ่นที่อุณหภูมิ 45-50 องศาเซลเซียส

5. ใช้แผ่นสไลด์ช้อนตัวอย่าง แล้วนำไปอบที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส นาข้ามคืน เพื่อให้ตัวอย่างยึดติดแผ่นสไลด์ได้ดี

6. นำสไลด์ไปผ่านขบวนการย้อมสีฮีมาทอกซิลินและอีโอซิน โดยมีขั้นตอนดังนี้

ขั้นตอนที่	สารละลาย	เวลา (นาที)
1	ไซลีน	2
2	ไซลีน	2
3	ไซลีน	2
4	ไอโซโพรพิล แอลกอฮอล์	1
5	ไอโซโพรพิล แอลกอฮอล์	1
6	แอลกอฮอล์ 95 เปอร์เซ็นต์	1

ขั้นตอนที่	สารละลาย	เวลา (นาที) (ต่อ)
7	แอลกอฮอล์ 70 เปอร์เซ็นต์	1
8	แอลกอฮอล์ 50 เปอร์เซ็นต์	1
9	น้ำกลั่น	1
10	ฮีมาทอกซิลิน	10-20
11	น้ำประปา	1
13	แอลกอฮอล์ 50 เปอร์เซ็นต์	1
14	อีโอซิน	2-4
15	แอลกอฮอล์ 70 เปอร์เซ็นต์	2
16	แอลกอฮอล์ 95 เปอร์เซ็นต์	2
17	แอบโซลูท แอลกอฮอล์	2
18	ไอโซโพรพิล แอลกอฮอล์	2
19	ไอโซโพรพิล แอลกอฮอล์	2
20	ไซลีน	2
21	ไซลีน	2
22	ไซลีน	2

7. เมาท์ (mount) ด้วยน้ำยาเปอร์เมาท์ (permount) เพื่อทำสไลด์ถาวร แล้วนำตัวอย่างไปศึกษาพยาธิสภาพด้วยกล้องจุลทรรศน์

สารเคมีและวิธีการเตรียมตัวอย่างสำหรับการศึกษาด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเลคตรอน

การเตรียมสารละลายคงสภาพ (fixative solution) และสารละลายบัฟเฟอร์รักษาสภาพเนื้อเยื่อ (washing buffer)

สารเคมีและวิธีการเตรียม

1. โซเดียมคาโคไดเลทบัฟเฟอร์ความเข้มข้น 0.4 M pH 7.4

โซเดียมคาโคไดเลท ($C_2H_6Na\ ASO_3\ 3H_2O$)	42.806	กรัม
น้ำกลั่น	500	มิลลิลิตร

ละลายโซเดียมคาโคไดเลทในน้ำกลั่นโดยใช้เครื่องคนสารละลาย เมื่อสารละลายเข้ากันดีแล้วจึงเติมกรดไฮโดรคลอริค (hydrochloric acid) 0.2 N เพื่อปรับ pH 7.4 ก่อนนำไปใช้งานในขั้นตอนต่อไป

2. สารละลายคงสภาพเนื้อเยื่อขั้นแรก (primary fixative)

กลูตาราลดีไฮด์ (glutaraldehyde) ความเข้มข้น 50 เปอร์เซ็นต์	20 มิลลิลตร
โซเดียมคาโคไดเลทบัฟเฟอร์ ความเข้มข้น 0.4 M (จากข้อ 1)	50 มิลลิลตร
โซเดียมคลอไรด์ ความเข้มข้น 10 เปอร์เซ็นต์	36 มิลลิลิตร
น้ำกลั่น	94 มิลลิลิตร

ผสมสารละลายทั้งหมดลงในน้ำกลั่น บรรจุในขวดสีชาปิดฝาให้มิดชิดและนำเก็บในตู้เย็น

3. สารละลายบัฟเฟอร์รักษาสภาพเนื้อเยื่อ (washing buffer)

โซเดียมคาโคไดเลทบัฟเฟอร์ 0.4 M (จากข้อ 1)	50 มิลลิลิตร
โซเดียมคลอไรด์ ความเข้มข้น 10 เปอร์เซ็นต์	100 มิลลิลิตร
น้ำกลั่น	94 มิลลิลิตร

ผสมสารละลายทั้งหมดเข้าด้วยกัน บรรจุในขวดสีชาปิดฝาให้มิดชิดและนำเก็บในตู้เย็น

ขั้นตอนการเตรียมตัวอย่างสำหรับการศึกษาด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเลคตรอน

ก. ขั้นตอนการเตรียมตัวอย่างสำหรับการศึกษาด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเลคตรอนแบบส่องผ่าน (TEM)

1. นำปรสิต *Spironucleus* sp. ที่เจริญในอาหารเลี้ยงเซลล์ไปหมุนเหวี่ยงที่ความเร็ว 1,500 รอบ/นาที จากนั้นเขี่ยตัวอย่างป้ายลงบนสไลด์ที่ผ่านการเคลือบ (coat) ด้วย poly-L-lysine ทิ้งไว้ให้แห้ง และแช่ตัวอย่างในสารละลายคงสภาพเนื้อเยื่อขั้นแรก (primary fixative) เป็นเวลา 1-2 ชั่วโมง

2. เทส่วนใสทิ้ง ล้างตะกอนที่ได้ด้วยสารละลายบัฟเฟอร์รักษาสภาพเนื้อเยื่อ (washing buffer) 3 ครั้ง ครั้งละ 5 นาที (หากรอทำขั้นตอนต่อไปสามารถเก็บรักษาในบัฟเฟอร์นี้แล้วแช่ในตู้เย็นข้ามคืน)

3. นำตัวอย่างแช่ในสารละลาย ออสเมียมเตตราออกไซด์ ความเข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์ นาน 1-2 ชั่วโมง (post fixative)

4. ล้างด้วยน้ำกลั่น 3 ครั้ง ครั้งละ 5 นาที

5. เพิ่มความคมชัดให้แก่ตัวอย่าง (En block-stain) โดยย้อมตัวอย่างใน uranyl acetate ความเข้มข้น 2 เปอร์เซ็นต์ นาน 20 นาที

6. ขั้นตอนการ Dehydration โดยแช่ตัวอย่างในสารละลายตามลำดับดังนี้

Ethanol ความเข้มข้น 50 เปอร์เซ็นต์ 2 ครั้ง ครั้งละ 15 นาที

Ethanol ความเข้มข้น 70 เปอร์เซ็นต์ 2 ครั้ง ครั้งละ 15 นาที

Ethanol ความเข้มข้น 80 เปอร์เซ็นต์ 2 ครั้ง ครั้งละ 15 นาที

Ethanol ความเข้มข้น 90 เปอร์เซ็นต์ 2 ครั้ง ครั้งละ 15 นาที

Ethanol ความเข้มข้น 100 เปอร์เซ็นต์ 2 ครั้ง ครั้งละ 15 นาที

7. ขั้นตอน Infiltration (การนำสารเข้าสู่เนื้อเยื่อ)

7.1 Propylene oxide 2 ครั้ง ครั้งละ 15 นาที

7.2 Propylene oxide : Epoxy resin (1:1) 1-2 ชั่วโมง

7.3 Propylene oxide oxide : Epoxy resin (1:2) 1-2 ชั่วโมง

7.4 Pure epoxy resin 2-3 ชั่วโมง

8. ขั้นตอน Embedding

8.1 หยด Pure epoxy resin ลงในแคปซูลประมาณ 1 ใน 4 แล้วไล่ฟองอากาศออก

8.2 นำตัวอย่างเทลงบนกระดาษ แล้วเขี่ยใส่ลงในแคปซูล โดยให้ตัวอย่างอยู่ตรงก้นแคปซูล

8.3 ตรวจดูฟองอากาศ เติม Pure epoxy resin วางไว้ 2-3 ชั่วโมง

9. ขั้นตอน Polymerization โดยนำตัวอย่างใส่ในตู้อบที่อุณหภูมิ 70-80 องศาเซลเซียส ทิ้งไว้ค้างคืน

10. ขั้นตอนการตัด (section) และย้อมสี โดยนำตัวอย่างไปตัดด้วยเครื่องอัลตราไมโครโตม (ultramicrotome) ให้ได้ความหนา 60-90 นาโนเมตร แล้วย้อมด้วย uranyl acetate ความเข้มข้น 5 เปอร์เซ็นต์ และ lead citrate นำตัวอย่างที่พร้อมไปศึกษาภายใต้ด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องผ่าน (TEM)

ข. ขั้นตอนการเตรียมตัวอย่างสำหรับการศึกษาด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเลคตรอนแบบส่องกราด (SEM)

1. นำปรสิต *Spironucleus* sp. ที่เจริญในอาหารเลี้ยงเซลล์ไปหมุนเหวี่ยงที่ความเร็ว 1,500 รอบ/นาที จากนั้นเขี่ยตัวอย่างป้ายลงบนสไลด์ที่ผ่านการเคลือบ (coat) ด้วย poly-L-lysine แล้วทิ้งไว้ให้แห้ง และแช่ตัวอย่างในสารละลายคงสภาพเนื้อเยื่อขั้นแรก (primary fixative) เป็นเวลา 1-2 ชั่วโมง

2. เทส่วนใสทิ้ง ล้างตะกอนที่ได้ด้วยสารละลายบัฟเฟอร์รักษาสภาพเนื้อเยื่อ (washing buffer) 3 ครั้ง ครั้งละ 5 นาที (หากรอทำขั้นตอนต่อไปสามารถเก็บรักษาในบัฟเฟอร์นี้แล้วแช่ในตู้เย็นข้ามคืน)

3. ล้างด้วยน้ำกลั่น 3 ครั้ง ครั้งละ 5 นาที

4. นำตัวอย่างแช่ในสารละลาย ออสเมียมเตตราออกไซด์ ความเข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์ นาน 1-2 ชั่วโมง (post fixative)

5. นำตัวอย่างมาผ่านขั้นตอนการ Dehydration ในสารละลายตามลำดับดังนี้

Ethanol ความเข้มข้น 50 เปอร์เซ็นต์ 3 ครั้ง ครั้งละ 15 นาที

Ethanol ความเข้มข้น 70 เปอร์เซ็นต์ 3 ครั้ง ครั้งละ 15 นาที

Ethanol ความเข้มข้น 80 เปอร์เซ็นต์ 3 ครั้ง ครั้งละ 15 นาที

Ethanol ความเข้มข้น 90 เปอร์เซ็นต์ 3 ครั้ง ครั้งละ 15 นาที

Ethanol ความเข้มข้น 100 เปอร์เซ็นต์ 2 ครั้ง ครั้งละ 15 นาที

7. ทำตัวอย่างให้แห้งที่จุดวิกฤติ (critical point drying:CPD) โดยนำตัวอย่างเข้าเครื่อง Samdri จนตัวอย่างแห้งสนิท

8. นำตัวอย่างที่แห้งสนิทมาติดบนแผ่นทองเหลือง (stub) โดยใช้เทปกาว 2 หน้า ทิ้งไว้ให้แห้งหรืออาจเก็บในตู้เย็นค้างคืน

9. ขั้นตอนการฉาบทอง (coating) โดยการให้แก๊สเฉื่อย (Ar) ไปกระตุ้นอิออนของทองคำ (Au) ให้หลุดออกมาไปฉาบตัวอย่าง (ion sputter) เป็นเวลา 4 นาที ซึ่งจะได้ความหนาในการฉาบทอง 20-30 นาโนเมตร นำตัวอย่างที่พร้อมจะดูไปส่องด้วยกล้องจุลทรรศน์ SEM

วิธีการนับปริมาณปรสิต

ใช้ไมโครปิเปตอัตโนมัติดูดปรสิตในอาหารเลี้ยงเซลล์ 50 ไมโครลิตร ผสมกับฟอร์มาลิน ความเข้มข้น 5 เปอร์เซ็นต์ 50 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันในหลอดพลาสติก (microtube) นำไปหยอดลงบนสไลด์นับเม็ดเลือด (haemacytometer) แล้วนับปรสิตภายใต้กล้องจุลทรรศน์ธรรมดาแล้วคำนวณปรสิตที่นับได้เป็นเซลล์ต่อมิลลิลิตร จากสูตร

ปริมาตรของสไลด์นับเม็ดเลือด = กว้างxยาวxสูง

=1 mm x1 mm x0.1 mm

= 0.1 ลูกบาศก์มิลลิเมตร (mm^3)

จำนวนปรสิต/ลูกบาศก์มิลลิเมตร = จำนวนปรสิตที่นับได้

จำนวนปรสิต/มิลลิลิตร = จำนวนปรสิตที่นับได้ x 10^4

ภาคผนวก ข

ตารางผนวกที่ ข 1 คุณภาพน้ำระหว่างการตรวจสอบปรสิตกลุ่ม hexamitid flagellates ในปลาสวยงามที่ศึกษา

ตู้	pH	อุณหภูมิ (องศาเซลเซียส)	ออกซิเจนละลายน้ำ (มก./ล.)	อัลคาไลนิตี้ (มก./ล.)	ไนไตรท์ (มก./ล.)	ไนเตรท (มก./ล.)
ถังพักน้ำ	7.20	27	7	24	0	0
ปลาเทวดา	7.07	26	6	21	0.5	0.15
ปลาออสการ์	7.02	26	7	17	0.5	0.15
ปลาหมอสี	6.90	26	7	18	0.5	0.15
ปลากัด	7.05	26	7	17	0.5	0.15

ตารางผนวก ข 2 น้ำหนักและความยาวลำตัวของปลาสวยงามที่ศึกษาและอวัยวะที่ตรวจพบปรสิตกลุ่ม hexamitid flagellates

ชนิดปลา	ตัวที่	น้ำหนัก (กรัม)	ความยาว (เซนติเมตร)	อวัยวะที่พบปรสิตกลุ่ม hexamitid flagellates.						
				ลำไส้	กระเพาะอาหาร	ตับ	ถุงน้ำดี	ม้าม	หัวใจ	ผิวลำตัว, ครีบ
เทวดา	1	2.004	5.1	-	-	-	-	-	-	-
	2	2.148	6.1	+	+	+	+	-	-	-
	3	2.253	7.5	+	+	+	+	+	+	-
	4	2.213	7.2	+	+	+	+	-	-	-
	5	2.611	7.8	+	+	-	-	-	+	-
	6	2.079	5.2	+	+	+	-	-	-	-
	7	2.018	5.0	+	+	+	+	+	-	-
	8	2.063	5.1	+	+	+	-	+	+	-
	9	2.128	5.2	+	+	+	+	+	-	-
	10	2.273	5.2	+	-	+	-	-	+	-
	11	2.152	5.2	+	+	+	+	+	+	-
	12	2.283	5.2	+	+	+	+	+	+	-
	13	2.156	5.1	+	+	+	+	+	-	-
	14	2.098	5.0	+	+	+	-	+	-	-
	15	2.342	5.3	-	-	-	-	-	-	-
	16	2.176	5.1	+	+	-	+	+	-	-
	17	2.066	5.0	+	+	-	+	+	-	-
	18	2.379	5.2	+	+	+	+	+	+	-
	19	2.546	5.3	+	+	+	+	+	+	-
	20	3.012	7.2	+	+	+	+	+	+	-
	21	2.712	6.5	+	+	+	+	+	+	-
	22	2.834	6.7	-	-	-	-	-	-	-
	23	2.546	5.6	+	+	+	+	+	-	-
	24	2.112	5.1	+	+	+	+	+	-	-
	25	2.905	5.8	+	+	+	+	+	-	-

ตารางผนวกที่ ข 2 น้ำหนักและความยาวลำตัวของปลาสวยงามที่ศึกษาและอวัยวะที่ตรวจพบปรสิตกลุ่ม hexamitid flagellates (ต่อ)

ชนิดปลา	ตัวที่	น้ำหนัก (กรัม)	ความยาว (เซนติเมตร)	อวัยวะที่พบปรสิตกลุ่ม hexamitid flagellates						
				ลำไส้	กระเพาะอาหาร	ตับ	ถุงน้ำดี	ม้าม	หัวใจ	ผิวลำตัว, ครีบ
เทวดา	26	2.845	5.7	+	+	+	-	+	+	-
	27	2.550	6.0	-	-	-	-	-	-	-
	28	2.789	6.1	+	+	+	+	+	+	-
	29	2.657	6.1	+	+	+	-	-	+	-
	30	2.099	5.0	-	-	-	-	-	-	-
	31	2.409	5.3	+	+	+	-	+	-	-
	32	2.854	5.9	-	-	-	-	-	-	-
	33	3.102	6.8	+	+	+	+	+	-	-
	34	2.893	5.9	+	+	+	-	+	-	-
	35	2.871	6.1	+	+	+	-	-	-	-
	36	2.795	5.4	+	+	+	-	-	-	-
	37	2.987	5.8	+	+	+	+	+	+	-
	38	2.548	5.4	+	+	+	+	+	-	-
	39	2.671	5.7	-	-	-	-	-	-	-
	40	2.546	5.3	+	+	+	+	-	+	-
	41	2.772	5.6	+	+	+	-	-	+	-
	42	2.889	6.0	+	-	-	-	-	-	-
	43	2.560	5.5	+	-	-	-	-	-	-
	44	2.449	5.4	+	+	+	+	-	-	-
	45	2.439	5.4	+	+	+	+	+	+	+
	46	2.679	5.6	+	+	+	+	+	+	-
	47	2.401	5.4	-	-	-	-	-	-	-
	48	2.515	5.5	+	+	+	+	+	+	-
	49	2.671	5.6	+	+	+	+	+	+	-
	50	2.459	5.4	+	+	+	+	+	+	-

ตารางผนวกที่ ข 2 น้ำหนักและความยาวลำตัวของปลาสวยงามที่ศึกษาและอวัยวะที่ตรวจพบปรสิตกลุ่ม hexamitid flagellates (ต่อ)

ชนิดปลา	ตัวที่	น้ำหนัก (กรัม)	ความยาว (เซนติเมตร)	อวัยวะที่พบปรสิตกลุ่ม hexamitid flagellates						
				ลำไส้	กระเพาะอาหาร	ตับ	ถุงน้ำดี	ม้าม	หัวใจ	ผิวลำตัว, ครีบ
เทวดา	51	2.587	5.5	-	-	-	-	-	-	-
	52	2.564	5.5	+	+	+	+	+	+	-
	53	2.896	5.8	+	+	+	+	-	-	-
	54	2.567	5.5	-	-	-	-	-	-	-
	55	2.312	5.3	+	+	+	-	-	+	-
	56	2.056	5.2	+	+	+	-	+	+	-
	57	2.826	5.7	+	+	+	-	-	-	-
	58	2.760	5.7	+	-	-	-	-	-	-
	59	2.895	5.7	+	+	-	-	-	-	-
	60	2.959	5.8	-	-	-	-	-	-	-
	61	2.491	5.3	+	+	+	+	+	+	-
	62	2.438	5.3	+	+	+	+	+	+	+
	63	2.817	5.8	+	+	+	+	+	+	+
	64	2.983	5.8	+	+	+	+	+	+	+
	65	2.602	5.6	+	+	+	+	+	+	+
	66	2.581	5.4	+	+	+	+	+	+	+
	67	2.907	5.8	+	+	+	+	+	+	+
	68	2.839	5.8	+	+	+	+	-	-	-
	69	2.801	5.7	+	+	+	+	+	+	+
	70	2.694	5.6	+	+	+	-	-	-	-
	71	2.610	5.6	+	+	+	+	-	+	-
	72	2.827	5.8	+	+	+	+	+	+	-
	73	2.679	5.6	+	+	+	-	-	+	-
	74	3.121	5.9	+	+	+	-	-	-	-
	75	2.739	5.6	+	-	-	-	-	-	-

ตารางผนวกที่ ข 2 น้ำหนักและความยาวลำตัวของปลาสวยงามที่ศึกษาและอวัยวะที่ตรวจพบปรสิตกลุ่ม hexamitid flagellates (ต่อ)

ชนิดปลา	ตัวที่	น้ำหนัก (กรัม)	ความยาว (เซนติเมตร)	อวัยวะที่พบปรสิตกลุ่ม hexamitid flagellates						
				ลำไส้	กระเพาะอาหาร	ตับ	ถุงน้ำดี	ม้าม	หัวใจ	ผิวลำตัว, ครีบ
เทวดา	76	3.121	5.9	+	+	-	+	-	-	-
	77	2.739	5.6	+	+	+	+	+	-	-
	78	2.284	5.0	+	+	+	+	+	-	-
	79	2.178	5.1	+	+	+	+	-	-	-
	80	2.343	5.1	+	+	+	-	-	-	-
	82	2.467	5.3	+	+	-	-	+	+	-
	83	2.378	5.4	+	+	-	-	+	+	+
	84	2.671	5.5	+	+	+	+	+	-	-
	85	2.219	5.2	+	+	+	+	+	+	-
	86	2.342	5.2	+	+	+	-	+	+	-
	87	2.156	5.1	+	+	+	+	+	+	-
	88	2.153	5.0	+	+	+	+	-	+	-
	89	2.004	5.0	+	+	+	+	-	-	-
	90	2.149	5.0	+	+	-	+	+	-	-
	91	2.258	5.1	+	+	+	+	-	-	-
	92	2.219	5.1	+	+	+	-	-	+	-
	93	2.616	5.5	+	+	+	-	-	+	-
	94	2.652	5.6	+	+	+	+	+	-	-
	95	2.089	5.1	+	+	+	+	-	+	-
	96	2.073	5.0	+	+	+	+	+	-	-
	97	2.139	5.0	+	+	+	-	+	-	-
	98	2.276	5.1	+	+	+	+	+	-	-
	99	2.159	5.1	+	+	+	+	+	-	+
	100	2.285	5.1	+	+	+	+	+	+	+
	101	2.158	5.1	+	+	+	+	+	+	-

ตารางผนวกที่ ข 2 น้ำหนักและความยาวลำตัวของปลาสวยงามที่ศึกษาและอวัยวะที่ตรวจพบปรสิตกลุ่ม hexamitid flagellates (ต่อ)

ชนิดปลา	ตัวที่	น้ำหนัก (กรัม)	ความยาว (เซนติเมตร)	อวัยวะที่พบปรสิตกลุ่ม hexamitid flagellates						
				ลำไส้	กระเพาะอาหาร	ตับ	ถุงน้ำดี	ม้าม	หัวใจ	ผิวลำตัว, ครีบ
เทวดา	102	2.094	5.0	+	+	+	+	-	-	-
	103	2.168	5.0	+	+	+	+	+	-	-
	104	2.346	5.1	+	+	+	+	-	-	-
	105	2.341	5.1	+	+	+	+	+	+	-
	106	2.178	5.1	+	+	-	+	+	+	-
	107	2.176	5.1	+	+	-	+	-	+	-
	108	2.077	5.0	+	+	-	-	-	-	-
	109	2.019	5.0	+	+	-	-	-	-	-
	110	2.387	5.1	+	+	+	-	+	-	-
	111	2.389	5.2	+	+	+	-	-	-	-
	112	2.549	5.4	+	+	+	-	-	-	-
	113	2.471	5.4	+	+	+	+	+	+	-
	114	2.894	5.7	+	+	+	+	+	+	-
	115	2.345	5.2	+	+	+	+	+	+	-
	116	2.659	5.5	+	+	+	+	+	+	-
	117	2.964	5.9	+	+	+	+	+	+	-
	118	2.969	5.9	+	+	-	-	-	+	-
	119	2.641	5.3	+	+	+	-	-	-	-
	120	2.226	5.1	+	+	+	+	-	-	-
	121	2.229	5.2	+	+	+	-	-	-	-

ตารางผนวกที่ ข 2 น้ำหนักและความยาวลำตัวของปลาสวยงามที่ศึกษาและอวัยวะที่ตรวจพบปรสิตกลุ่ม hexamitid flagellates (ต่อ)

ชนิดปลา	ตัวที่	น้ำหนัก (กรัม)	ความยาว (เซนติเมตร)	อวัยวะที่พบปรสิตกลุ่ม hexamitid flagellates						
				ลำไส้	กระเพาะอาหาร	ตับ	ถุงน้ำดี	ม้าม	หัวใจ	ผิวลำตัว, ครีบ
หมอสี	1	2.385	6.2	-	-	-	-	-	-	-
	2	3.473	6.4	-	-	-	-	-	-	-
	3	5.202	7.5	-	-	-	-	-	-	-
	4	5.923	7.7	-	-	-	-	-	-	-
	5	3.953	7.1	+	-	-	-	-	-	-
	6	1.855	5.8	-	-	-	-	-	-	-
	7	1.362	5.4	+	-	-	-	-	-	-
	8	1.870	5.4	+	+	-	-	-	-	-
	9	1.756	5.3	+	-	-	-	-	-	-
	10	2.450	5.3	+	-	-	-	-	-	-
	11	2.569	5.4	-	-	-	-	-	-	-
	12	2.846	6.3	-	-	-	-	-	-	-
	13	3.474	6.4	-	-	-	-	-	-	-
	14	2.986	6.5	-	-	-	-	-	-	-
	15	1.980	5.4	-	-	-	-	-	-	-
	16	2.591	5.8	+	+	-	-	-	-	-
	17	2.623	5.8	+	+	+	+	+	+	+
	18	2.626	6.2	+	+	+	-	-	-	+
	19	3.111	6.4	+	+	-	-	-	-	+
	20	3.287	6.4	+	-	-	-	-	-	-
	21	3.312	6.3	-	-	-	-	-	-	-
	22	3.402	6.2	-	-	-	-	-	-	-
	23	3.124	6.1	-	-	-	-	-	-	-
	24	1.645	5.2	-	-	-	-	-	-	-

ตารางผนวกที่ ข 2 น้ำหนักและความยาวลำตัวของปลาสวยงามที่ศึกษาและอวัยวะที่ตรวจพบปรสิตกลุ่ม hexamitid flagellates (ต่อ)

ชนิดปลา	ตัวที่	น้ำหนัก (กรัม)	ความยาว (เซนติเมตร)	อวัยวะที่พบปรสิตกลุ่ม hexamitid flagellates						
				ลำไส้	กระเพาะอาหาร	ตับ	ถุงน้ำดี	ม้าม	หัวใจ	ผิวลำตัว, ครีบ
หมอสี	25	3.961	6.5	+	+	-	-	-	+	-
	26	2.428	5.7	-	-	-	-	-	-	-
	27	2.953	5.8	-	-	-	-	-	-	-
	28	2.818	5.7	+	+	+	-	-	-	-
	29	2.634	5.8	-	-	-	-	-	-	-
	30	3.162	6.3	-	-	-	-	-	-	-
	31	3.621	6.7	+	-	-	-	-	-	-
	32	3.783	6.8	-	-	-	-	-	-	-
	33	3.810	6.8	+	-	-	-	-	-	-
	34	3.801	6.7	+	-	-	-	-	-	-
	35	3.450	6.8	+	-	-	-	-	-	-
	36	5.208	7.2	+	-	-	-	-	-	-
	37	5.293	7.1	+		-	-	-	-	-
	38	3.911	6.6	-	-	-	-	-	-	-
	39	1.894	5.2	-	-	-	-	-	-	-
	40	1.328	5.3	-	-	-	-	-	-	-
	41	1.893	5.2	+	+	-	-	-	-	-
	42	1.726	5.1	+	+	+	-	-	-	-
	43	1.711	5.1	+	+	-	-	-	-	-
	44	1.753	5.0	+	-	-	-	-	-	-
	45	1.861	5.2	+	-	-	-	-	-	-
	46	1.869	5.1	-	-	-	-	-	-	-
	47	1.463	5.3	+	-	-	-	-	-	-
	48	1.965	5.5	+	-	-	-	-	-	-

ตารางผนวกที่ ข 2 น้ำหนักและความยาวลำตัวของปลาสวยงามที่ศึกษาและอวัยวะที่ตรวจพบปรสิตกลุ่ม hexamitid flagellates (ต่อ)

ชนิดปลา	ตัวที่	น้ำหนัก (กรัม)	ความยาว (เซนติเมตร)	อวัยวะที่พบปรสิตกลุ่ม hexamitid flagellates						
				ลำไส้	กระเพาะอาหาร	ตับ	ถุงน้ำดี	ม้าม	หัวใจ	ผิวลำตัว, ครีบ
หมอสี	49	3.985	6.8	+	+	+	+	-	-	-
	50	5.961	7.7	+	+	+	-	-	-	-
	51	5.102	7.5	+	+	+	-	-	-	-
	52	3.452	6.8	+	-	-	-	-	-	-
	53	3.741	7.0	+	-	-	-	-	-	-
	54	2.531	5.7	-	-	-	-	-	-	-
	55	2.485	5.5	-	-	-	-	-	-	-
	56	2.715	5.4	-	-	-	-	-	-	-
	57	4.626	6.2	+	+	+	-	-	-	-
	58	4.138	6.1	+	+	+	+	-	-	-
	59	4.610	6.2	+	+	+	+	-	-	-
	60	4.932	6.1	+	+	+	+	-	-	-
	61	5.101	6.6	+	+	+	+	-	-	-
	62	4.038	6.4	-	-	-	-	-	-	+
	63	2.912	5.9	+	-	-	-	-	-	-
	64	3.718	6.5	-	-	-	-	-	-	-
	65	3.625	6.4	+	-	-	-	-	-	-
	66	3.115	6.2	+	+	-	-	-	-	-
	67	2.485	5.8	+	-	-	+	-	-	-
	68	3.373	6.3	-	-	-	-	-	-	-
	69	5.302	6.6	+	+	+	-	+	-	-
	70	5.632	5.4	+	+	+	-	-	-	-
	71	3.863	6.6	-	-	-	-	-	-	+
	72	1.965	5.2	+	-	+	+	-	-	-

ตารางผนวกที่ ข 2 น้ำหนักและความยาวลำตัวของปลาสวยงามที่ศึกษาและอวัยวะที่ตรวจพบปรสิตกลุ่ม hexamitid flagellates (ต่อ)

ชนิดปลา	ตัวที่	น้ำหนัก (กรัม)	ความยาว (เซนติเมตร)	อวัยวะที่พบปรสิตกลุ่ม hexamitid flagellates						
				ลำไส้	กระเพาะอาหาร	ตับ	ถุงน้ำดี	ม้าม	หัวใจ	ผิวลำตัว, ครีบ
หมอสี	73	1.487	5.3	-	-	-	-	-	-	+
	74	1.890	5.2	+	-	-	-	-	-	-
	75	1.876	5.2	+	+	-	-	-	-	-
	76	3.653	6.8	+	+	+	-	-	-	-
	77	4.287	7.7	+	+	-	-	-	-	-
	78	5.735	7.5	+	+	+	+	+	+	-
	79	3.842	6.8	+	+	+	+	+	+	-
	80	3.912	7.1	-	-	-	-	-	-	-
	81	1.989	5.8	+	+	+	+	+	-	-
	82	2.689	5.6	-	-	-	-	-	-	-
	83	2.635	5.6	+	+	+	+	+	+	-
	84	2.635	5.5	+	+		-	-	-	-
	85	3.152	5.4	+	+	+	+	-	-	-
	86	3.269	6.2	+	+	+	-	-	-	+
	87	3.256	6.1	+	-	-	-	-	-	-
	88	3.415	6.2	+	-	-	-	-	-	-
	89	3.215	6.2	-	-	-	-	-	-	-
	90	1.645	6.1	-	-	-	-	-	-	-
	91	3.982	5.9	-	-	-	-	-	-	-
	92	2.526	6.6	-	-	-	-	-	-	-
	93	2.968	6.4	+	+	-	-	-	-	-
	94	2.859	5.9	+	+	+	-	-	-	-
	95	2.634	6.5	+	+	+	-	-	-	-
	96	3.261	6.5	+	+	+	+	+	-	-

ตารางผนวกที่ ข 2 น้ำหนักและความยาวลำตัวของปลาสวยงามที่ศึกษาและอวัยวะที่ตรวจพบปรสิตกลุ่ม hexamitid flagellates (ต่อ)

ชนิดปลา	ตัวที่	น้ำหนัก (กรัม)	ความยาว (เซนติเมตร)	อวัยวะที่พบปรสิตกลุ่ม hexamitid flagellates						
				ลำไส้	กระเพาะอาหาร	ตับ	ถุงน้ำดี	ม้าม	หัวใจ	ผิวลำตัว, ครีบ
หมอสี	97	3.218	6.4	-	-	-	-	-	-	-
	98	3.870	6.2	+	-	-	-	-	-	-
	99	3.296	6.3	-	-	-	-	-	-	-
	100	3.108	5.9	+	+	-	-	-	-	-

ตารางผนวกที่ ข 2 น้ำหนักและความยาวลำตัวของปลาสวยงามที่ศึกษาและอวัยวะที่ตรวจพบปรสิตกลุ่ม hexamitid flagellates (ต่อ)

ชนิดปลา	ตัวที่	น้ำหนัก (กรัม)	ความยาว (เซนติเมตร)	อวัยวะที่พบปรสิตกลุ่ม hexamitid flagellates						
				ลำไส้	กระเพาะอาหาร	ตับ	ถุงน้ำดี	ม้าม	หัวใจ	ผิวลำตัว, ครีบ
ออสการ์	1	6.321	7.7	-	-	-	-	-	-	-
	2	2.964	5.9	-	-	-	-	-	-	-
	3	3.281	6.0	+	+	-	-	-	-	-
	4	5.345	6.9	+	-	-	+	-	-	-
	5	5.752	6.8	+	-	-	-	-	-	-
	6	5.773	7.6	+	+	+	+	+	+	-
	7	6.601	7.5	+	+	+	+	+	+	-
	8	5.201	7.2	-	-	-	-	-	-	-
	9	2.246	5.7	-	-	-	-	-	-	-
	10	6.213	7.6	+	+	+	-	-	-	-
	11	6.395	7.4	+	+	+	+	+	+	-
	12	8.717	7.9	-	-	-	-	-	-	-
	13	6.018	7.9	+	-	-	-	-	-	-
	14	5.268	7.0	+	+	+	+	+	+	-
	15	4.542	6.7	-	-	-	-	-	-	-
	16	4.203	6.8	-	-	-	-	-	-	-
	17	7.469	7.6	+	-	-	-	-	-	-
	18	8.464	7.9	-	-	-	-	-	-	-
	19	3.184	6.1	-	-	-	-	-	-	-
	20	6.189	7.4	-	-	-	-	-	-	-
	21	7.388	7.6	-	-	-	-	-	-	-
	22	5.024	7.3	+	-	-	-	-	-	-
	23	4.626	6.9	-	-	-	-	-	-	-
	24	6.641	7.4	+	+	-	-	-	-	-
	25	5.006	6.8	+	+	+	+	+	+	+

ตารางผนวกที่ ข 2 น้ำหนักและความยาวลำตัวของปลาสวยงามที่ศึกษาและอวัยวะที่ตรวจพบปรสิตกลุ่ม hexamitid flagellates (ต่อ)

ชนิดปลา	ตัวที่	น้ำหนัก (กรัม)	ความยาว (เซนติเมตร)	อวัยวะที่พบปรสิตกลุ่ม hexamitid flagellates						
				ลำไส้	กระเพาะอาหาร	ตับ	ถุงน้ำดี	ม้าม	หัวใจ	ผิวลำตัว, ครีบ
ออสการ์	26	5.342	6.4	+	+	-	-	-	-	-
	27	6.421	6.8	+	+	+	+	-	-	-
	28	5.981	6.8	-	-	-	-	-	-	-
	29	5.893	6.7	+	+	+	+	+	+	-
	30	4.626	6.9	-	-	-	-	-	-	-
	31	5.768	6.4	+	+	+	+	+	+	-
	32	6.483	7.6	+	+	-	-	-	-	-
	33	3.987	6.3	+	+	+	-	+	-	-
	34	2.679	6.2	+	+	+	+	+	+	-
	35	5.492	6.5	+	+	+	-	+	+	-
	36	5.823	6.7	+	+	+	-	-	-	-
	37	5.762	6.7	+	+	+	-	+	-	-
	38	6.771	7.5	+	+	+	-	+	-	-
	39	6.683	7.5	+	-	-	-	-	+	-
	40	7.322	7.6	+	-	-	-	-	-	-
	41	3.968	6.3	+	-	-	-	-	-	-
	42	2.485	5.9	+	+	-	-	-	-	-
	43	5.624	6.7	+	+	-	-	-	-	-
	44	5.852	6.5	+	+	+	-	+	-	-
	45	5.897	6.6	+	-	-	-	+	+	-
	46	6.532	6.8	+	+	+	-	-	-	-
	47	5.220	6.1	+	-	+	+	-	-	-
	48	2.354	5.3	+	+	+	+	-	+	-
	49	6.391	7.1	+	-	-	+	+	-	-

ตารางผนวกที่ ข 2 น้ำหนักและความยาวลำตัวของปลาสวยงามที่ศึกษาและอวัยวะที่ตรวจพบปรสิตกลุ่ม hexamitid flagellates (ต่อ)

ชนิดปลา	ตัวที่	น้ำหนัก (กรัม)	ความยาว (เซนติเมตร)	อวัยวะที่พบปรสิตกลุ่ม hexamitid flagellates						
				ลำไส้	กระเพาะอาหาร	ตับ	ถุงน้ำดี	ม้าม	หัวใจ	ผิวลำตัว, ครีบ
ออสการ์	50	6.368	7.1	+	+	+	+	-	+	-
	51	8.781	8.2	+	+	+	+	-	-	-
	52	6.126	6.3	+	+	+	+	-	-	-
	53	5.346	5.6	+	+	+	-	-	+	-
	54	4.562	5.0	+	+	+	-	-	-	-
	55	4.320	5.1	+	+	-	-	-	-	-
	56	7.539	6.8	+	+	+	-	-	-	-
	57	8.563	7.8	+	-	-	-	-	-	-
	58	3.264	5.6	+	-	-	-	-	-	+
	59	6.293	5.9	+	+	+	-	+	-	-
	60	7.362	7.0	+	+	+	-	-	+	-
	61	5.034	5.9	+	+	-	-	+	+	
	62	4.539	5.1	+	+	+	+	+	-	-
	63	6.941	5.9	+	+	+	+	+	+	-
	64	3.264	6.5	+	+	-	+	+	+	-
	65	2.653	4.5	+	+	-	-	-	+	-
	66	7.690	7.1	+	+	-	-	-	-	-
	67	5.712	6.5	+	-	-	-	-	-	-
	68	5.930	5.0	+	+	+	+	-	-	-
	69	6.124	5.2	-	-	-	-	-	-	-
	70	2.239	4.5	+	+	+	+	-	-	-
	71	6.392	6.2	+	+	-	+	+	-	-
	72	6.354	6.3	+	-	-	-	-	-	-
	73	8.821	7.8	+	-	-	-	-	-	-

ตารางผนวกที่ ข 2 น้ำหนักและความยาวลำตัวของปลาสวยงามที่ศึกษาและอวัยวะที่ตรวจพบปรสิตกลุ่ม hexamitid flagellates (ต่อ)

ชนิดปลา	ตัวที่	น้ำหนัก (กรัม)	ความยาว (เซนติเมตร)	อวัยวะที่พบปรสิตกลุ่ม hexamitid flagellates						
				ลำไส้	กระเพาะอาหาร	ตับ	ถุงน้ำดี	ม้าม	หัวใจ	ผิวลำตัว, ครีบ
ออสการ์	74	6.023	6.5	+	-	-	-	-	-	-
	75	5.363	6.2	+	-	-	-	-	-	-
	76	4.356	5.9	+	+	+	-	+	+	-
	77	4.235	5.6	+	+	-	-	-	-	-
	78	7.496	7.4	+	+	+	-	-	-	-
	79	8.562	7.8	+	-	-	-	-	-	-
	80	3.260	4.9	+	+	+	+	-	+	-
	81	6.314	7.1	-	-	-	-	-	-	-
	82	7.312	7.8	+	-	-	-	-	-	-
	83	5.132	6.7	+	-	-	-	-	-	-
	84	4.936	6.0	+	+	+	-	-	-	-
	85	6.623	7.6	+	+	+	+	-	-	-
	86	3.256	5.0	+	+	+	+	+	+	-
	87	2.395	4.8	+	+	+	+	+	+	-
	88	5.432	6.4	+	+	+	+	+	+	-
	89	5.634	6.5	+	-	-	-	-	-	-
	90	5.862	6.3	+	-	-	-	-	-	-
	91	6.259	6.9	+	+	-	-	-	-	-
	92	5.223	6.0	+	+	+	+	+	+	-
	93	3.250	4.8	+	+	+	+	-	+	-
	94	6.310	6.5	+	-	-	+	+	+	-
	95	6.371	6.2	-	-	-	-	-	-	-
	96	8.177	7.9	-	-	-	-	-	-	-
	97	6.210	6.1	+	+	+	+	+	+	-

ตารางผนวกที่ ข 2 น้ำหนักและความยาวลำตัวของปลาสวยงามที่ศึกษาและอวัยวะที่ตรวจพบปรสิตกลุ่ม hexamitid flagellates (ต่อ)

ชนิดปลา	ตัวที่	น้ำหนัก (กรัม)	ความยาว (เซนติเมตร)	อวัยวะที่พบปรสิตกลุ่ม hexamitid flagellates						
				ลำไส้	กระเพาะอาหาร	ตับ	ถุงน้ำดี	ม้าม	หัวใจ	ผิวลำตัว, ครีบ
ออสการ์	98	5.210	5.8	+	+	+	-	+	-	-
	99	4.652	5.0	+	+	+	+	-	-	-
	100	4.302	4.7	+	+	+	-	-	-	-
	101	7.523	7.6	+	-	-	-	-	+	-
	102	8.456	7.9	+	+	+	+	-	+	-
	103	3.187	5.6	+	+	+	+	+	+	-
	104	6.983	5.9	+	+	+	-	-	-	-
	105	7.326	6.8	-	-	-	-	-	-	-
	106	5.014	5.2	+	+	+	-	-	-	-
	107	4.636	5.1	+	+	-	+	+	-	-
	108	4.691	6.5	+	+	+	-	+	+	-
	109	4.658	6.5	+	+	+	-	+	+	-
	110	3.269	6.0	-	-	-	-	-	-	-

ตารางผนวกที่ ข 2 น้ำหนักและความยาวลำตัวของปลาสวยงามที่ศึกษาและอวัยวะที่ตรวจพบปรสิตกลุ่ม hexamitid flagellates (ต่อ)

ชนิดปลา	ตัวที่	น้ำหนัก (กรัม)	ความยาว (เซนติเมตร)	อวัยวะที่พบปรสิตกลุ่ม hexamitid flagellates						
				ลำไส้	กระเพาะอาหาร	ตับ	ถุงน้ำดี	ม้าม	หัวใจ	ผิวลำตัว, ครีบ
ปลากัด	1	2.98	2.5	-	-	-	-	-	-	-
	2	3.52	2.9	-	-	-	-	-	-	-
	3	3.12	2.4	-	-	-	-	-	-	-
	4	3.01	2.6	-	-	-	-	-	-	-
	5	3.69	2.7	-	-	-	-	-	-	-
	6	3.05	2.5	-	-	-	-	-	-	-
	7	3.16	2.8	-	-	-	-	-	-	-
	8	3.09	2.6	-	-	-	-	-	-	-
	9	3.11	2.4	-	-	-	-	-	-	-
	10	3.82	2.5	-	-	-	-	-	-	-
	11	2.78	2.5	-	-	-	-	-	-	-
	12	2.63	2.6	-	-	-	-	-	-	-
	13	2.91	2.7	-	-	-	-	-	-	-
	14	2.45	2.8	-	-	-	-	-	-	-
	15	2.68	2.7	-	-	-	-	-	-	-
	16	2.93	2.6	-	-	-	-	-	-	-
	17	2.15	2.5	-	-	-	-	-	-	-
	18	3.32	2.8	-	-	-	-	-	-	-
	19	3.24	2.8	-	-	-	-	-	-	-
	20	3.85	2.9	-	-	-	-	-	-	-
	21	3.41	2.4	-	-	-	-	-	-	-
	22	3.24	2.5	-	-	-	-	-	-	-
	23	3.56	2.6	-	-	-	-	-	-	-
	24	3.61	2.7	-	-	-	-	-	-	-

ตารางผนวกที่ ข 2 น้ำหนักและความยาวลำตัวของปลาสวยงามที่ศึกษาและอวัยวะที่ตรวจพบปรสิตกลุ่ม hexamitid flagellates (ต่อ)

ชนิดปลา	ตัวที่	น้ำหนัก (กรัม)	ความยาว (เซนติเมตร)	อวัยวะที่พบปรสิตกลุ่ม hexamitid flagellates						
				ลำไส้	กระเพาะอาหาร	ตับ	ถุงน้ำดี	ม้าม	หัวใจ	ผิวลำตัว, ครีบ
ปลากัด	25	3.53	2.8	-	-	-	-	-	-	-
	26	3.31	2.7	-	-	-	-	-	-	-
	27	3.3	2.7	-	-	-	-	-	-	-
	28	3.25	2.6	-	-	-	-	-	-	-
	29	3.26	2.6	-	-	-	-	-	-	-
	30	3.3	2.6	-	-	-	-	-	-	-
	31	3.69	2.9	-	-	-	-	-	-	-
	32	3.52	2.8	-	-	-	-	-	-	-
	33	3.63	2.7	-	-	-	-	-	-	-
	34	3.2	2.4	-	-	-	-	-	-	-
	35	3.52	2.4	-	-	-	-	-	-	-
	36	3.29	2.5	-	-	-	-	-	-	-
	37	3.24	2.3	-	-	-	-	-	-	-
	38	3.12	2.6	-	-	-	-	-	-	-
	39	3.14	2.6	-	-	-	-	-	-	-
	40	3.19	2.9	-	-	-	-	-	-	-
	41	3.22	2.8	-	-	-	-	-	-	-
	42	3.29	2.4	-	-	-	-	-	-	-
	43	3.58	2.7	-	-	-	-	-	-	-
	44	3.48	2.5	-	-	-	-	-	-	-
	45	3.42	2.6	-	-	-	-	-	-	-
	46	3.4	2.5	-	-	-	-	-	-	-
	47	3.47	2.6	-	-	-	-	-	-	-
	48	3.61	2.7	-	-	-	-	-	-	-

ตารางผนวกที่ ข 2 น้ำหนักและความยาวลำตัวของปลาสวยงามที่ศึกษาและอวัยวะที่ตรวจพบปรสิตกลุ่ม hexamitid flagellates (ต่อ)

ชนิดปลา	ตัวที่	น้ำหนัก (กรัม)	ความยาว (เซนติเมตร)	อวัยวะที่พบปรสิตกลุ่ม hexamitid flagellates						
				ลำไส้	กระเพาะอาหาร	ตับ	ถุงน้ำดี	ม้าม	หัวใจ	ผิวลำตัว, ครีบ
ปลากัด	49	3.54	2.8	-	-	-	-	-	-	-
	50	3.45	2.8	-	-	-	-	-	-	-
	51	3.41	2.6	-	-	-	-	-	-	-
	52	3.44	2.6	-	-	-	-	-	-	-
	53	3.34	2.7	-	-	-	-	-	-	-
	54	3.39	2.7	-	-	-	-	-	-	-
	55	2.96	2.8	-	-	-	-	-	-	-
	56	3.02	2.5	-	-	-	-	-	-	-
	57	2.91	2.4	-	-	-	-	-	-	-
	58	2.95	2.3	-	-	-	-	-	-	-
	59	2.85	2.5	-	-	-	-	-	-	-
	60	2.69	2.6	-	-	-	-	-	-	-
	61	2.98	2.3	-	-	-	-	-	-	-
	62	3.14	2.8	-	-	-	-	-	-	-
	63	3.29	2.7	-	-	-	-	-	-	-
	64	3.33	2.5	-	-	-	-	-	-	-
	65	3.34	2.9	-	-	-	-	-	-	-
	66	3.45	2.9	-	-	-	-	-	-	-
	67	3.62	3.1	-	-	-	-	-	-	-
	68	2.67	2.8	-	-	-	-	-	-	-
	69	2.86	2.6	-	-	-	-	-	-	-
	70	2.95	2.7	-	-	-	-	-	-	-
	71	2.87	2.5	-	-	-	-	-	-	-
	72	2.59	2.6	-	-	-	-	-	-	-

ตารางผนวกที่ ข 2 น้ำหนักและความยาวลำตัวของปลาสวยงามที่ศึกษาและอวัยวะที่ตรวจพบปรสิตกลุ่ม hexamitid flagellates (ต่อ)

ชนิดปลา	ตัวที่	น้ำหนัก (กรัม)	ความยาว (เซนติเมตร)	อวัยวะที่พบปรสิตกลุ่ม hexamitid flagellates						
				ลำไส้	กระเพาะอาหาร	ตับ	ถุงน้ำดี	ม้าม	หัวใจ	ผิวลำตัว, ครีบ
ปลากัด	73	2.63	2.5	-	-	-	-	-	-	-
	74	2.88	2.3	-	-	-	-	-	-	-
	75	2.78	2.9	-	-	-	-	-	-	-
	76	3.54	3.2	-	-	-	-	-	-	-
	77	3.21	2.9	-	-	-	-	-	-	-
	78	2.69	2.8	-	-	-	-	-	-	-
	79	2.84	2.8	-	-	-	-	-	-	-
	80	2.86	2.5	-	-	-	-	-	-	-
	81	2.87	2.7	-	-	-	-	-	-	-
	82	3.29	2.6	-	-	-	-	-	-	-
	83	3.05	2.5	-	-	-	-	-	-	-
	84	3.13	2.3	-	-	-	-	-	-	-
	85	3.26	2.9	-	-	-	-	-	-	-
	86	3.24	2.8	-	-	-	-	-	-	-
	87	3.68	2.7	-	-	-	-	-	-	-
	88	3.11	2.4	-	-	-	-	-	-	-
	89	3.32	2.6	-	-	-	-	-	-	-
	90	3.31	2.6	-	-	-	-	-	-	-
	91	3.36	3.3	-	-	-	-	-	-	-
	92	3.15	3.2	-	-	-	-	-	-	-
	93	3.29	2.5	-	-	-	-	-	-	-
	94	3.31	2.6	-	-	-	-	-	-	-
	95	3.05	2.7	-	-	-	-	-	-	-
	96	3.09	2.6	-	-	-	-	-	-	-

ตารางผนวกที่ ข 2 น้ำหนักและความยาวลำตัวของปลาสวยงามที่ศึกษาและอวัยวะที่ตรวจพบปรสิตกลุ่ม hexamitid flagellates (ต่อ)

ชนิดปลา	ตัวที่	น้ำหนัก (กรัม)	ความยาว (เซนติเมตร)	อวัยวะที่พบปรสิตกลุ่ม hexamitid flagellates						
				ลำไส้	กระเพาะอาหาร	ตับ	ถุงน้ำดี	ม้าม	หัวใจ	ผิวลำตัว, ครีบ
ปลากัด	97	3.18	2.4	-	-	-	-	-	-	-
	98	3.48	2.9	-	-	-	-	-	-	-

ตารางผนวกที่ ข 3 ขนาดและความยาวลำตัวของปรสิต *S. vortens* ที่แยกจากปลาเทวดา

No.	กล้องจุลทรรศน์ธรรมดา				SEM	
	Live parasite		Diff quick			
	Long (μm)	Wide (μm)	Long (μm)	Wide (μm)	Long (μm)	Wide (μm)
1	12	7	13	7	8.5	2.5
2	10	7	15	6	10.5	3.0
3	13	6	12	6	11.0	2.8
4	10	5	13	7	12.0	3.0
5	11	7	12	7	12.5	4.6
6	13	8	14	8	10.0	3.0
7	9	10	15	5	9.5	3.2
8	10	3	14	7	10.0	2.8
9	11	6	12	5	10.0	2.9
10	12	6	15	6	11.0	2.7
11	12	6	13	7	-	-
12	11	6	11	5	-	-
13	13	5	13	5	-	-
14	14	6	13	6	-	-
15	13	7	14	6	-	-
16	13	6	13	7	-	-
17	13	5	13	7	-	-
18	14	6	13	7	-	-
19	13	6	13	9	-	-
20	13	7	12	5	-	-
21	12	6	14	9	-	-
22	13	6	12	5	-	-
23	11	6	14	5	-	-

ตารางผนวกที่ ข 3 ขนาดและความยาวลำตัวของปรสิต *S. vortens* ที่แยกจากปลาเทวดา (ต่อ)

No.	กล้องจุลทรรศน์ธรรมดา				SEM	
	Live parasite		Diff quick stained			
	Long (µm)	Wide (µm)	Long (µm)	Wide (µm)	Long (µm)	Wide (µm)
24	13	8	13	5	-	-
26	14	7	13	8	-	-
27	13	7	12	11	-	-
28	12	7	13	5	-	-
29	12	6	12	5	-	-
30	12	6	13	5	-	-
31	13	5	13	5	-	-
32	13	6	12	6	-	-
33	14	7	13	6	-	-
34	15	7	14	6	-	-
35	15	7	15	6	-	-
36	15	8	13	5	-	-
37	16	8	12	5	-	-
38	15	8	14	6	-	-
39	14	7	15	7	-	-
40	13	7	16	6	-	-
41	12	7	17	6	-	-
42	16	7	16	6	-	-
43	14	8	16	7	-	-
44	12	7	15	7	-	-
45	12	5	14	7	-	-
46	13	6	13	7	-	-
47	14	6	13	7	-	-

ตารางผนวกที่ ข 3 ขนาดและความยาวลำตัวของปรสิต *S. vortens* ที่แยกจากปลาเทวดา (ต่อ)

No.	กล้องจุลทรรศน์ธรรมดา				SEM	
	Live parasite		Diff quick			
	Long (µm)	Wide (µm)	Long (µm)	Wide (µm)	Long (µm)	Wide (µm)
48	14	6	12	6	-	-
49	13	7	12	6	-	-
50	14	7	12	5	-	-

ตารางผนวกที่ ข 4 จำนวนเฉลี่ย±ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานของปรสิต *S. vortens* ในอาหารเลี้ยงเซลล์ที่อุณหภูมิ 5 องศาเซลเซียส และที่ระดับความเป็นกรด–ด่าง ตั้งแต่ 5-10[1]

วันที่	จำนวนปรสิต (x 10^3 เซลล์ต่อมิลลิลิตร)					
	pH5	pH6	pH7	pH8	pH9	pH10
0	2.481±0.44	2.481±1.01	3.740±1.22	3.814±0.96	3.074±0.96	2.703±0.96
1	0.00±0.00	0.00±0.00	0.00±0.00	0.00±0.00	0.00±0.00	0.00±0.00
2	0.00±0.00	0.00±0.00	0.00±0.00	0.00±0.00	0.00±0.00	0.00±0.00
3	0.00±0.00	0.00±0.00	0.00±0.00	0.00±0.00	0.00±0.00	0.00±0.00
4	0.00±0.00	0.00±0.00	0.00±0.00	0.00±0.00	0.00±0.00	0.00±0.00
5	0.00±0.00	0.00±0.00	0.00±0.00	0.00±0.00	0.00±0.00	0.00±0.00
6	0.00±0.00	0.00±0.00	0.00±0.00	0.00±0.00	0.00±0.00	0.00±0.00
7	0.00±0.00	0.00±0.00	0.00±0.00	0.00±0.00	0.00±0.00	0.00±0.00
8	0.00±0.00	0.00±0.00	0.00±0.00	0.00±0.00	0.00±0.00	0.00±0.00
9	0.00±0.00	0.00±0.00	0.00±0.00	0.00±0.00	0.00±0.00	0.00±0.00
10	0.00±0.00	0.00±0.00	0.00±0.00	0.00±0.00	0.00±0.00	0.00±0.00

[1]ตัวเลขที่นำเสนอเป็นค่าเฉลี่ย±ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน จากข้อมูล 9 ซ้ำ

ตารางผนวกที่ ข 5 จำนวนเฉลี่ย±ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานของปรสิต *S. vortens* ในอาหารเลี้ยงเซลล์ที่อุณหภูมิ 10 องศาเซลเซียส และที่ระดับความเป็นกรด–ด่าง ตั้งแต่ 5-10[1]

วันที่	จำนวนปรสิต (x 10^3 เซลล์ต่อมิลลิลิตร)					
	pH5	pH6	pH7	pH8	pH9	pH10
0	1.851±0.60	2.518±0.98	1.925±0.43	2.296±1.39	2.370±1.12	2.148±0.81
1	0.00±0.00	0.00±0.00	0.00±0.00	0.00±0.00	0.00±0.00	0.00±0.00
2	0.00±0.00	0.00±0.00	0.00±0.00	0.00±0.00	0.00±0.00	0.00±0.00
3	0.00±0.00	0.00±0.00	0.00±0.00	0.00±0.00	0.00±0.00	0.00±0.00
4	0.00±0.00	0.00±0.00	0.00±0.00	0.00±0.00	0.00±0.00	0.00±0.00
5	0.00±0.00	0.00±0.00	0.00±0.00	0.00±0.00	0.00±0.00	0.00±0.00
6	0.00±0.00	0.00±0.00	0.00±0.00	0.00±0.00	0.00±0.00	0.00±0.00
7	0.00±0.00	0.00±0.00	0.00±0.00	0.00±0.00	0.00±0.00	0.00±0.00
8	0.00±0.00	0.00±0.00	0.00±0.00	0.00±0.00	0.00±0.00	0.00±0.00
9	0.00±0.00	0.00±0.00	0.00±0.00	0.00±0.00	0.00±0.00	0.00±0.00
10	0.00±0.00	0.00±0.00	0.00±0.00	0.00±0.00	0.00±0.00	0.00±0.00

[1]ตัวเลขที่นำเสนอเป็นค่าเฉลี่ย±ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน จากข้อมูล 9 ซ้ำ

ตารางผนวกที่ ข 6 จำนวนเฉลี่ย±ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานของปรสิต *S. vortens* ในอาหารเลี้ยงเซลล์ที่อุณหภูมิ 20 องศาเซลเซียส และที่ระดับความเป็นกรด–ด่าง ตั้งแต่ 5-10[1]

วันที่	จำนวนปรสิต (x10^3 เซลล์ต่อมิลลิลิตร)					
	pH5	pH6	pH7	pH8	pH9	pH10
0	2.889±0.66	1.740±1.35	2.296±1.43	2.000±1.36	2.000±0.95	2.407±0.70
1	0.00±0.00	7.296±1.58	13.851±2.01	16.841±8.32	33.962±7.26	2.000±0.78
2	0.00±0.00	0.00±0.00	9.518±2.02	75.481±27.28	119.222±39.56	66.629±6.33
3	0.00±0.00	0.00±0.00	0.00±0.00	246.592±30.82	84.814±4.82	20.667±8.50
4	0.00±0.00	0.00±0.00	0.00±0.00	44.867±4.23	188.851±31.07	0.00±0.00
5	0.00±0.00	0.00±0.00	0.00±0.00	47.733±6.32	54.185±3.72	0.00±0.00
6	0.00±0.00	0.00±0.00	0.00±0.00	39.000±10.51	39.200±2.77	0.00±0.00
7	0.00±0.00	0.00±0.00	0.00±0.00	0.00±0.00	0.00±0.00	0.00±0.00
8	0.00±0.00	0.00±0.00	0.00±0.00	0.00±0.00	0.00±0.00	0.00±0.00
9	0.00±0.00	0.00±0.00	0.00±0.00	0.00±0.00	0.00±0.00	0.00±0.00
10	0.00±0.00	0.00±0.00	0.00±0.00	0.00±0.00	0.00±0.00	0.00±0.00

[1]ตัวเลขที่นำเสนอเป็นค่าเฉลี่ย±ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน จากข้อมูล 9 ซ้ำ

ตารางผนวกที่ ข 7 จำนวนเฉลี่ย±ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานของปรสิต *S. vortens* ในอาหารเลี้ยงเซลล์ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส และที่ระดับความเป็นกรด–ด่าง ตั้งแต่ 5-10[1]

วันที่	จำนวนปรสิต (x10^3 เซลล์ต่อมิลลิลิตร)					
	pH5	pH6	pH7	pH8	pH9	pH10
0	1.407±0.49	1.925±0.82	1.814±1.23	1.481±1.23	2.592±0.96	2.148±0.95
1	0.00±0.00	3.851±2.16	30.185±3.72	47.481±7.12	31.259±2.06	1.667±0.84
2	0.00±0.00	0.00±0.00	61.925±17.86	416.518±34.52	414.296±46.05	9.467±0.93
3	0.00±0.00	0.00±0.00	1196.407±371.95	482.259±46.06	356.259±57.83	0.00±0.00
4	0.00±0.00	0.00±0.00	0.00±0.00	401.111±121.66	207.556±6.15	0.00±0.00
5	0.00±0.00	0.00±0.00	0.00±0.00	45.370±6.11	51.703±7.62	0.00±0.00
6	0.00±0.00	0.00±0.00	0.00±0.00	32.740±1.19	30.889±2.04	0.00±0.00
7	0.00±0.00	0.00±0.00	0.00±0.00	18.148±1.48	0.00±0.00	0.00±0.00
8	0.00±0.00	0.00±0.00	0.00±0.00	8.556±0.84	0.00±0.00	0.00±0.00
9	0.00±0.00	0.00±0.00	0.00±0.00	4.703±0.97	0.00±0.00	0.00±0.00
10	0.00±0.00	0.00±0.00	0.00±0.00	0.00±0.00	0.00±0.00	0.00±0.00

[1]ตัวเลขที่นำเสนอเป็นค่าเฉลี่ย±ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน จากข้อมูล 9 ซ้ำ

ตารางผนวกที่ ข 8 จำนวนเฉลี่ย±ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานของปรสิต *S. vortens* ในอาหารเลี้ยงเซลล์ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส และที่ระดับความเป็นกรด–ด่าง ตั้งแต่ 5-10[1]

วันที่	จำนวนปรสิต ($x10^3$ เซลล์ต่อมิลลิลิตร)					
	pH5	pH6	pH7	pH8	pH9	pH10
0	1.148±0.64	2.185±0.80	1.851±1.13	1.925±0.75	1.111±0.62	1.518±1.05
1	0.00±0.00	0.00±0.00	8.703±4.74	9.185±3.94	31.889±3.14	3.733±0.92
2	0.00±0.00	0.00±0.00	13.467±2.14	30.074±5.02	558.851±142.14	14.333±1.52
3	0.00±0.00	0.00±0.00	0.00±0.00	0.00±0.00	0.00±0.00	0.00±0.00
4	0.00±0.00	0.00±0.00	0.00±0.00	0.00±0.00	0.00±0.00	0.00±0.00
5	0.00±0.00	0.00±0.00	0.00±0.00	0.00±0.00	0.00±0.00	0.00±0.00
6	0.00±0.00	0.00±0.00	0.00±0.00	0.00±0.00	0.00±0.00	0.00±0.00
7	0.00±0.00	0.00±0.00	0.00±0.00	0.00±0.00	0.00±0.00	0.00±0.00
8	0.00±0.00	0.00±0.00	0.00±0.00	0.00±0.00	0.00±0.00	0.00±0.00
9	0.00±0.00	0.00±0.00	0.00±0.00	0.00±0.00	0.00±0.00	0.00±0.00
10	0.00±0.00	0.00±0.00	0.00±0.00	0.00±0.00	0.00±0.00	0.00±0.00

[1]ตัวเลขที่นำเสนอเป็นค่าเฉลี่ย±ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน จากข้อมูล 9 ซ้ำ

ตารางภาคผนวกที่ ข 9 การวิเคราะห์ข้อมูลเพื่อหา LD_{50} ที่ 14 วัน ตามวิธีของ Reed และ Muench (1938)

Conc.	Lny D	n	nDd	nAl	Per M
$1.25x10^{6}$	14.03	30	26	4	86.67
$4.5x10^{5}$	13.01	30	25	5	83.33
$1.12x10^{5}$	11.62	30	23	17	76.67
$4.60x10^{4}$	10.74	30	17	23	56.67
$1.20x10^{4}$	9.39	30	11	19	36.67
$4.20x10^{3}$	8.34	30	6	24	20
$1.10x10^{3}$	7.00	30	4	26	13.33
Control (PBS pH 7.4)	0	30	0	30	0

conc. = concentration of *S. vortens* (cell/ml/fish)

Iny D = Iny dose

n = number of test fish per concentration

nDd = number of dead fish

nAl = number of living fish

Per M = cumulative percentage mortality

การคำนวณค่า LD_{50} ที่ 14 วัน

จากสูตร

LD_{50} = Iny concentration below 50 % mortality + (50 – mortality below 50 % / mortality above 50 % - mortality below 50 %) x (Iny concentration above 50 % - Iny concentration below 50 %)

= 9.39 + (50 – 36.67 / 56.67 – 36.67) x (10.74 – 9.39)

= 9.39+ (13/20) x (1.35)

= 9.39 + 0.918

= 10.308

get anti 10.308 = $2.99x10^4$ Cell/ml

LD_{50} = $2.99x10^3$ Cells

ตารางผนวกที่ ข 10 คุณภาพน้ำระหว่างการทดสอบความรุนแรงของโรคสไปโรนิวคลีโอซีสในปลาเทวดา (1st 27/7/53)

ตู้ที่	ความเข้มข้นเชื้อ	ความเป็นกรด-ด่าง	อุณหภูมิ (องศาเซลเซียส)	อัลคาไลนิตี้ (มก./ล.)
1	ชุดควบคุม	7.88	27	24
2		7.72	26.5	27
3		7.59	26.5	24
4	$1.10x10^3$	7.45	27	25
5		7.55	27	15
6		7.53	27	18
7	$4.20x10^3$	7.58	27	17
8		7.54	28	17
9		7.52	27.5	15
10	$1.20x10^4$	7.65	28	22
11		7.68	27	14
12		7.99	27	22
13	$4.60x10^4$	7.64	27	24
14		7.47	26.5	24
15		7.70	26.5	25
16	$1.12x10^5$	7.68	26.5	20
17		7.69	26.5	22
18		7.73	26.5	22
19	$4.50x10^5$	7.76	26.5	22
20		7.57	26.5	24
21		7.67	26.5	21
22	$1.25x10^6$	7.75	26.5	19
23		7.67	26.5	18
24		7.58	26.5	19

ตารางผนวกที่ ข 10 คุณภาพน้ำระหว่างการทดสอบความรุนแรงของโรคสไปโรนิวคลีโอซีสในปลาเทวดา (2^{nd} 3/8/53)

ตู้ที่	ความเข้มข้นของปรสิต	ความเป็นกรด-ด่าง	อุณหภูมิ (องศาเซลเซียส)	อัลคาไลนิตี้ (มก./ล.)	ออกซิเจนละลายน้ำ (มก./ล.)
1	ชุดควบคุม	7.69	27.5	22	6.7
2		7.68	27	20	6.7
3		7.61	27	20	6.6
4	$1.10x10^3$	7.40	27	14	6.9
5		7.27	27	12	6.9
6		7.42	27	16	6.8
7	$4.20x10^3$	7.39	27	12	6.9
8		7.53	27	10	6.9
9		7.39	28.5	14	6.9
10	$1.20x10^4$	7.61	28	18	6.9
11		7.58	28	20	6.9
12		7.71	27	22	6.7
13	$4.60x10^4$	7.45	27.5	18	6.7
14		7.26	28	22	7.1
15		7.53	27.5	20	7.1
16	$1.12x10^5$	7.60	27	18	7.0
17		7.54	27	20	6.9
18		7.83	27	20	6.8
19	$4.20x10^5$	7.65	27	22	6.8
20		7.45	27	20	6.8
21		7.56	26.5	18	6.9
22	$1.25x10^6$	7.32	27	20	6.8
23		7.51	27	18	6.8
24		7.55	27	16	6.8

ตารางผนวกที่ ข 11 คุณภาพน้ำระหว่างการทดสอบการยอมรับปรสิต *S. vortens* ในปลาสวยงามชนิดอื่นๆ (1st 31/7/53

ชนิดปลา	ซ้ำ	อุณหภูมิ (องศาเซลเซียส)	ความเป็นกรด-ด่าง	อัลคาไลนิตี้ (มก./ล.)	ออกซิเจนละลายน้ำ (มก./ล.)
ปลาทอง	Control	27	7.67	30	7.1
	R1	27	7.86	22	7.0
	R2	27	7.73	12	7.0
	R3	27	7.66	8	7.5
ปลาแพลทตี้	Control	27	7.62	20	7.3
	R1	27	7.66	20	7.2
	R2	27	7.66	20	7.1
	R3	27	7.57	20	6.9
ปลาหางนกยูง	Control	27	7.66	16	7.3
	R1	27	7.66	16	7.1
	R2	27	7.75	16	7.1
	R3	27	7.83	16	7.4

ตารางผนวกที่ ข 11 คุณภาพน้ำระหว่างการทดสอบการยอมรับปรสิต *S. vortens* ในปลาสวยงามชนิดอื่นๆ (2^{nd} 3/8/53)

ชนิดปลา	ซ้ำ	อุณหภูมิ (องศาเซลเซียส)	ความเป็นกรด-ด่าง	อัลคาไลนิตี้ (มก./ล.)	ออกซิเจนละลายน้ำ (มก./ล.)
ปลาทอง	Control	28	7.89	30	7.1
	R1	28.5	7.62	22	7.1
	R2	27.5	7.28	12	7.0
	R3	27.5	7.01	8	7.0
ปลาแพลทตี้	Control	27.5	7.51	20	7.0
	R1	27.5	7.58	20	7.0
	R2	27.5	7.54	20	7.1
	R3	27.5	7.50	20	6.9
ปลาหางนกยูง	Control	27.5	7.55	16	7.0
	R1	27.5	7.62	16	7.0
	R2	27.5	7.65	16	7.0
	R3	27.5	7.66	16	7.0

ตารางผนวกที่ ข 12 อัตราการตายสะสมของปลาเทวดาหลังการฉีดปรสิต *S. vortens* ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ

ความเข้มข้นเชื้อ	ชุดการทดลอง	อัตราการตายสะสม (เปอร์เซ็นต์ต่อวัน)													
		วันที่ 1	วันที่2	วันที่3	วันที่4	วันที่5	วันที่6	วันที่7	วันที่8	วันที่9	วันที่10	วันที่11	วันที่12	วันที่13	วันที่14
control	R1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	R2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	R3	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
ค่าเฉลี่ย±SD		0±0	0±0	0±0	0±0	0±0	0±0	0±0	0±0	0±0	0±0	0±0	0±0	0±0	0±0
$1.10x10^3$	R1	0	0	0	0	0	0	10	10	10	10	10	10	10	10
	R2	0	0	10	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20
	R3	0	0	0	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10
ค่าเฉลี่ย±SD		0±0	0±0	3.33±5.77	10±10	10±10	10±10	13.33±5.77	13.33±5.77	13.33±5.77	13.33±5.77	13.33±5.77	13.33±5.77	13.33±5.77	13.33±5.77
$4.20x10^3$	R1	0	0	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20
	R2	0	0	0	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10
	R3	0	10	10	20	20	20	20	30	30	30	30	30	30	30
ค่าเฉลี่ย±SD		0±0	3.33±5.77	10±10	16.66±5.77	16.66±5.77	16.66±5.77	16.66±5.77	20±10	20±10	20±10	20±10	20±10	20±10	20±10
$1.20x10^4$	R1	0	0	10	20	20	30	30	30	30	30	30	30	30	30
	R2	10	20	20	30	30	40	40	40	40	50	50	50	50	50
	R3	0	10	30	30	30	30	30	30	30	30	30	30	30	30
ค่าเฉลี่ย±SD		3.33±5.77	10±10	20±10	26.66±5.77	26.66±5.77	33.33±5.77	33.33±5.77	33.33±5.77	33.33±5.77	36.66±11.54	36.66±11.54	36.66±11.54	36.66±11.54	36.66±11.54
$4.50x10^4$	R1	0	10	30	30	30	30	30	30	40	40	40	40	40	40
	R2	10	20	30	30	30	30	30	30	30	40	40	40	40	40
	R3	0	30	40	50	50	90	90	90	90	90	90	90	90	90
ค่าเฉลี่ย±SD		3.33±5.77	20±10	33.33±5.77	36.66±11.54	36.66±11.54	50±34.64	50±34.64	50±34.64	53.33±32.14	56.66±28.86	56.66±28.86	56.66±28.86	56.66±28.86	56.66±28.86
$1.12x10^5$	R1	0	10	10	30	50	50	50	50	50	60	60	60	60	60
	R2	0	10	60	60	60	60	70	80	90	90	90	90	90	90
	R3	20	40	60	70	70	70	70	80	80	90	90	90	90	90
ค่าเฉลี่ย±SD		6.66±11.54	20±17.32	43.33±28.86	53.33±20.81	60±10	60±10	63.33±11.54	70±17.32	73.33±20.81	80±17.32	80±17.32	80±17.32	80±17.32	80±17.32
$4..50x10^5$	R1	20	80	90	90	90	90	90	90	90	90	90	90	90	90
	R2	10	70	80	80	80	80	80	80	80	80	80	80	80	80
	R3	0	30	30	30	70	70	70	80	80	80	80	80	80	80
ค่าเฉลี่ย±SD		10±10	60±26.45	66.66±32.14	66.66±10	80±10	80±10	80±5.77	83.33±5.77	83.33±5.77	83.33±5.77	83.33±5.77	83.33±5.77	83.33±5.77	83.33±5.77
$1.25x10^6$	R1	10	80	90	90	90	90	90	90	90	90	90	90	90	90
	R2	20	70	70	80	90	90	90	90	90	90	90	90	90	90
	R3	20	80	80	80	80	80	80	80	80	80	80	80	80	80
ค่าเฉลี่ย±SD		16.66±5.77	76.66±5.77	80±10	83.33±5.77	86.66±5.77	86.66±5.77	86.66±5.77	86.66±5.77	86.66±5.77	86.66±5.77	86.66±5.77	86.66±5.77	86.66±5.77	86.66±5.77

ตารางผนวกที่ ข 13 ประสิทธิภาพของยาไดเมทริดาโซลในการยับยั้งการเจริญของปรสิต *S. vortens* ที่ระดับความเข้มข้นต่าง ๆ [1]

Time	Dimetridazole (µg/ml)(x100 cells/ml)								
(hour)	0	0.25	0.50	1.00	2.00	4.00	6.00	8.00	10.00
0	25.18±0.98	25.18±0.98	25.18±0.98	25.18±0.98	25.18±0.98	25.18±0.98	25.18±0.98	25.18±0.98	25.18±0.98
24	239.667±42.36	191.667±51.39	56.00±7.54	26.667±12.66	6.667±0.57	6.333±6.80	4.833±1.75	2.833±0.76	2.667±1.15
48	853.333±148.89	548.00±131.65	426.667±32.39	15.333±3.05	7.333±3.05	0.00±0.00	0.00±0.00	0.00±0.00	0.00±0.00
72	634.00±34.00	514.00±71.86	409.667±105.87	0.00±0.00	0.00±0.00	0.00±0.00	0.00±0.00	0.00±0.00	0.00±0.00
96	252.667±15.69	282±28.35	0.00±0.00	0.00±0.00	0.00±0.00	0.00±0.00	0.00±0.00	0.00±0.00	0.00±0.00

[1]ตัวเลขที่นำเสนอเป็นค่าเฉลี่ย±ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน จากข้อมูล 9 ซ้ำ

ตารางผนวกที่ ข 14 ประสิทธิภาพของยาเมโทรนิดาโซลในการยับยั้งการเจริญของปรสิต *S. vortens* ที่ระดับความเข้มข้นต่าง ๆ[1]

Time	metronidazole (µg/ml)(100 cells/ml)								
(hour)	0	0.25	0.50	1.00	2.00	4.00	6.00	8.00	10.00
0	25.18±0.98	25.18±0.98	25.18±0.98	25.18±0.98	25.18±0.98	25.18±0.98	25.18±0.98	25.18±0.98	25.18±0.98
24	239.667±42.36	596.667±99.72	619.00±97.55	477.667±36.69	49.00±16.37	13.333±4.93	7.00±3.46	3.667±0.57	2.333±0.57
48	853.333±148.89	740.667±203.31	707.333±33.60	575.333±41.00	49.333±28.86	6.667±3.05	0.00±0.00	0.00±0.00	0.00±0.00
72	634.00±34.00	526.00±42.56	557.333±21.38	465.333±82.71	25.333±23.18	0.00±0.00	0.00±0.00	0.00±0.00	0.00±0.00
96	252.667±15.69	286.667±11.93	0.00±0.00	0.00±0.00	0.00±0.00	0.00±0.00	0.00±0.00	0.00±0.00	0.00±0.00

[1]ตัวเลขที่นำเสนอเป็นค่าเฉลี่ย±ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน จากข้อมูล 9 ซ้ำ

ตารางผนวกที่ ข 15 ประสิทธิภาพของแมกนีเซียมซัลเฟตในการยับยั้งการเจริญของปรสิต *S. vortens* ที่ระดับความเข้มข้นต่าง ๆ [1]

Time (hour)	Magnesium sulphate (mg/ml)(x100 cells/ml)								
	0	2.5	5.0	10	20	40	60	80	100
0	25.18±0.98	25.18±0.98	25.18±0.98	25.18±0.98	25.18±0.98	25.18±0.98	25.18±0.98	25.18±0.98	25.18±0.98
24	239.667±42.36	1360.00±89.28	1340.667±10.81	814.00±170.27	612.00±130.96	648.667±102.65	659.333±182.78	820.00±50.71	700.667±61.84
48	853.333±148.89	1044.667±89.67	1000.776±51.58	782.667±55.07	758.00±78.30	965.333±36.29	996.00±74.08	888.667±82.71	870.00±155.85
72	634.00±34.00	600.667±245.29	111.333±33.24	480.00±233.61	354±244.63	632.00±131.63	0.00±0.00	0.00±0.00	0.00±0.00
96	252.667±15.69	345±127.36	198±46.89	153.667±24.78	226.67±69.51	242.33±4.61	0.00±0.00	0.00±0.00	0.00±0.00

[1]ตัวเลขที่นำเสนอเป็นค่าเฉลี่ย±ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน จากข้อมูล 9 ซ้ำ

ตารางผนวกที่ ข 16 ประสิทธิภาพของยาไดเมทริดาโซลในการยับยั้งการเจริญของปรสิต *S. vortens* ในปลาเทวดา

ความเข้มข้นของยาไดเมทริดาโซล	อัตราการติดเชื้อปรสิต *S. vortens* (เปอร์เซ็นต์/วัน)						
(µg/ml)	0	1	2	3	5	7	9
0	100	100	100	100	100	100	100
0.25	100	100	100	100	100	100	100
0.50	100	100	90	50	0	0	0
1.0	100	100	0	0	0	0	0
2.0	100	80	0	0	0	0	0
4.0	100	0	0	0	20*	20*	0
6.0	100	0	0	0	0	0	0

* พบการติดปรสิต *S. vortens* เพียง 1-2 เซลล์ต่อตัวปลา

ประวัติผู้เขียน

ชื่อ นางสาวสุชัญญา มรรคาเขต

รหัสประจำตัวนักศึกษา 5010620030

วุฒิการศึกษา

วุฒิ	ชื่อสถาบัน	ปีที่สำเร็จการศึกษา
วิทยาศาสตรบัณฑิต (วิทยาศาสตร์การเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำ)	มหาวิทยาลัยทักษิณ	2550

การตีพิมพ์เผยแพร่ผลงาน

Mankhakhet, S., Suanyuk, N., Tantikitti, C. and Phromkunthong, W. 2009. Hexamitid flagellates infection in ornamental fish cultured in Thailand. Asian Pacific Aquaculture 2009. 3-5 November 2009. Kuala Lumper, Malaysia.