ปรสิตและแบคทีเรียในลูกปลาบึก (*Pangasianodon gigas* Chevey)

Parasites and Bacteria of Giant Catfishes (*Pangasianodon gigas* Chevey) Larva

วัชริยา ภูรีวิโรจน์กุล

ภาควิชาสัตววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ จตุจักร กทม. 10900

นนทวิทย์ อารีย์ชน

ภาควิชาเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำ คณะประมง มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ จตุจักร กทม. 10900

ชาญชัย ภู่รักษ์เกียรติ

ศูนย์วิจัยและพัฒนาประมงน้ำจืดพะเยา ต.เวียง อ.เมือง จ.พะเยา 56000

บทคัดย่อ

การศึกษาปรสิตและแบคทีเรียที่พบในลูกปลาบึกที่ได้จากการผสมเทียมจากพ่อแม่พันธุ์ในบ่อดินที่ศูนย์วิจัยและพัฒนาประมงน้ำจืดพะเยา จังหวัดพะเยา โดยทำการเลี้ยงลูกปลาบึกในบ่อดินตั้งแต่ฟักออกจากไข่ ตั้งแต่เดือนกรกฎาคม 2546 – มิถุนายน 2547 ระยะเวลาเป็นระยะเวลา 12 เดือน พบปลาบึกที่มีปรสิตและแบคทีเรียจำนวน 60 ตัว จากปลาตัวอย่างทั้งหมด 60 ตัว คิดเป็น 100 เปอร์เซ็นต์ของปลาบึกทั้งหมด โดยพบปรสิต 3 ชนิด ได้แก่ *Trichodina* sp.1, *Trichodina* sp.2 และ ตัวอ่อนหอยกาบน้ำจืด *Pilsbryoconcha exillis compressa* ระยะ glochidia โดย *Trichodina* sp.1 และ *Trichodina* sp. .2 พบในเดือนที่ 1-6 ส่วน glochidia พบในเดือนที่ 7-12 นอกจากนี้ในการศึกษาแบคทีเรียในลูกปลาบึก พบว่ามีแบคทีเรีย 7 ชนิดได้แก่ *Aeromonas hydrophila*, *Pasteurella haemolytica*, *Serratia odorifera*, *Plesiomonas shigelloides*, *Vibrio cholerae*, *Chromobacterium violaceum* และ *Acinetobacter baumannii* โดย *A. hydrophila* เป็นแบคทีเรียที่พบทุกเดือน รองลงมาได้แก่ *P. shigelloides* ซึ่งพบในลูกปลาอายุ 2-12 เดือน ส่วนการเปลี่ยนแปลงทางพยาธิสภาพพบว่ามีการเพิ่มของเซลล์ (hyperplasia) บริเวณเหงือก เนื่องจากมีปรสิตเกาะอยู่ และการคั่งของเลือด (hyperemia) ในตับเนื่องจากการติดเชื้อแบคทีเรีย

Abstract

Study on parasites and bacteria in giant catfish (*Pangasianodon gigas* Chevey) conducted at Phayao Inland Fisheries Research and Development Center, Phayao province from July 2003 to June 2004. Total number of 60 fishes were investigated and 100% were found to be infected with parasites and bacteria. Three protozoa were found including *Trichodina* sp.1, *Trichodina* sp.2 and glochidia stage of *Pilsbryoconcha exillis compressa*. *Trichodina* sp.1 and *Trichodina* sp.2 were found in the first six months and glochidia stage of *Pilsbryoconcha exillis compressa* was found in the last six months. Seven genera of bacteria were isolated including *Aeromonas hydrophila*, *Pasteurella haemolytica*, *Serratia odorifera*, *Plesiomonas shigelloides*, *Vibrio cholerae*, *Chromobacterium violaceum* and *Acinetobacter baumannii*. *A. hydrophila* was found in every month and *P. shigelloides* was found in 2-12 months. Histopathological study of infected giant catfish revealed hyperplasia in gills which was caused by parasitic infection and hyperemia in liver caused by bacterial infection.

1. บทนำ

ปลาบึก (*Pangasianodon gigas* Chevey) เป็นปลาไม่มีเกล็ดที่มีขนาดใหญ่ที่สุดในโลก พบตามธรรมชาติในแม่น้ำโขงเท่านั้น ปลาบึกเป็นปลาที่มีรสชาดดี ราคาแพง ทำให้มีการจับปลาบึกมาขายมากขึ้น ปัจจุบันปลาบึกมีจำนวนลดลงมากเนื่องจากปลาบึกที่จับได้ส่วนใหญ่อยู่ในวัยเจริญพันธุ์ และอยู่ในฤดูผสมพันธุ์วางไข่ กรมประมงจึงได้ทำการเพาะขยายพันธุ์ปลาบึกขึ้น และมีการปล่อยลูกปลาบึกลงสู่แหล่งน้ำต่าง ๆ ทั่วประเทศ

หลังจากที่กรมประมงประสบความสำเร็จในการเพาะขยายพันธุ์ปลาบึกเป็นครั้งแรกของโลกเมื่อวันที่ 6 พฤษภาคม 2526 ได้มีการศึกษาชีววิทยาและการเพาะเลี้ยงปลาบึก [10] ซึ่งเป็นข้อมูลพื้นฐานที่สำคัญในการจัดการและบริหารการประมงปลาบึก รวมทั้งได้มีการศึกษาโรคและปรสิตที่พบในไข่และลูกปลาบึก [9] ซึ่งถือได้ว่าเป็นเรื่องสำคัญ เนื่องจากโรคและปรสิตมีผลต่อเปอร์เซ็นต์การฟักไข่ และอัตรารอดของลูกปลาบึกโดยตรง จากการศึกษาในปี พ.ศ. 2526 นั้น พบว่าลูกปลาบึกมีปรสิตเห็บระฆัง (*Trichodina* sp.) โดยพบที่เหงือกและเมือกอย่างหนาแน่น และแนะนำให้ใช้ฟอร์มาลิน 35 ppm ในการรักษา

นอกจากนี้ปรสิตจะมีผลต่อผลผลิตของปลาบึกโดยตรงหลายประการ ได้แก่ เมื่อปรสิตเกาะบนตัวปลาจะใช้ส่วนที่เป็นอวัยวะยึดเกาะ เกาะกับตัวปลาถือเป็นสาเหตุเบื้องต้น (primary infection) ทำให้ปลาเกิดบาดแผลขึ้น และหากในน้ำนั้นมีเชื้อแบคทีเรีย เชื้อรา หรือเชื้อไวรัสที่เป็นอันตรายต่อปลาอยู่ ก็จะเข้าสู่ตัวปลาทางบาดแผลที่เกิดจากการเกาะของปรสิตและทำให้ปลาติดเชื้อซึ่งถือว่าเป็น secondary infection ทำให้ปลาตายได้ ปรสิตจะแย่งอาหารของปลา ดูดกินเลือด และทำให้เกิดสารพิษภายในตัวเจ้าบ้าน รวมทั้งขัดขวางการทำงานของระบบต่าง ๆ [4]

จากอันตรายของปรสิตที่มีต่อเจ้าบ้านดังที่ได้กล่าวมาแล้ว จะเห็นได้ว่าถ้ามีปรสิตปริมาณมากสามารถทำให้ปลาตายได้ และหากมีปริมาณน้อยจะทำให้ปลาเจ้าบ้านอ่อนแอ น้ำหนักลดลง จึงมีผลต่อผลผลิตของปลาบึกโดยตรง ดังนั้นการศึกษาปรสิตและแบคทีเรียในลูกปลาบึกจึงมีความสำคัญ เนื่องจากผลของการศึกษาทำให้ทราบว่าพบโรคที่เกิดจากแบคทีเรีย หรือปรสิตชนิดใดบ้าง เพื่อที่จะได้วางมาตรการในการป้องกัน รักษาโรคที่เกิดขึ้น ทำให้ลูกปลาบึกมีอัตรารอดสูงขึ้น โดยข้อมูลทั้งหมดนี้จะเป็นประโยชน์ต่อการพัฒนาอุตสาหกรรมการเพาะเลี้ยงปลาบึกที่ยั่งยืนต่อไป

2. อุปกรณ์และวิธีการ

2.1 การเก็บตัวอย่างปลาบึก

เก็บตัวอย่างลูกปลาบึกที่ได้จากการผสมเทียมพ่อแม่ปลาบึกที่เลี้ยงในบ่อดิน จากศูนย์วิจัยและพัฒนาประมงน้ำจืดพะเยา ทุกเดือน ตั้งแต่อายุ 1-12 เดือน เดือนละ 5 ตัว วัดความยาวมาตรฐาน (standard length) และชั่งน้ำหนักหน่วยเป็นกรัม (grams) ของปลาตัวอย่างก่อนทำการตรวจหาปรสิตและแบคทีเรีย

2.2 การตรวจหาปรสิต

ตรวจปรสิตภายนอกตัวปลาเพื่อหาปรสิตที่อาศัยอยู่ตามผิวตัว ครีบ เมือก ตัดซี่เหงือกออกใส่จานแก้วที่มีน้ำสะอาดนำไปตรวจหาปรสิตด้วยกล้องจุลทรรศน์กำลังขยายต่ำ รวมทั้งตรวจหาปรสิตภายในตัวปลา โดยเปิดท้องปลาเพื่อนำเอาอวัยวะภายในแต่ละส่วนใส่จานแก้วที่มีน้ำสะอาดอยู่ ตรวจดูปรสิตด้วยกล้องจุลทรรศน์

2.3 การตรวจหาแบคทีเรีย

ทำการเปิดช่องท้องโดยใช้กรรไกรสอดเข้าไปตัดช่องเปิดให้เห็นอวัยวะภายใน ทำการแยกเชื้อโดยวิธี aseptic จากตับ ไต และม้าม ลงบนอาหาร Brain Heart Infusion Agar (BHI Agar) บ่มที่อุณหภูมิ 30 °C เป็นเวลา 18-24 ชั่วโมง นำเชื้อที่ได้ไปแยกให้ได้เชื้อที่บริสุทธิ์ แล้วทำการแยกชนิดโดยนำมาย้อมแกรม ดูลักษณะของเซลล์ และตรวจสอบคุณสมบัติทางชีวเคมี (biochemical test) จำแนกชนิดของแบคทีเรียโดยใช้ชุดทดสอบสำเร็จรูป API 20E (Biomérieux) และวิธีของ Buchanan and Gibbons [17]

2.4 การศึกษาทางพยาธิสภาพ

นำตัวอย่างอวัยวะต่าง ๆ ได้แก่ เหงือก ตับ ไต และม้าม จากลูกปลาบึกที่ติดเชื้อแบคทีเรีย หรือมีปรสิต เดือนละ 2-3 ตัว แช่ในน้ำยาฟอร์มาลิน 10 % เป็นเวลา 24 ชั่วโมง นำเอาส่วนเหงือกซึ่งมีองค์ประกอบของกระดูกแช่ในน้ำยา decalcified นาน 1-3 ชั่วโมง เพื่อให้กระดูกอ่อนตัว นำไปล้างโดยให้น้ำประปาไหลผ่าน 1 ชั่วโมง นำตัวอย่างเนื้อเยื่อทั้งหมดเข้าเครื่อง automatic tissue processor โดยผ่านแอลกอฮอล์ที่ระดับเข้มข้นต่าง ๆ ตั้งแต่ 50 ถึง 100 % และผ่านลงในคลอโรฟอร์มและพาราฟินหลอมเหลว จากนั้นจะนำตัวอย่างมาฝัง (embed) ด้วยพาราฟินทำเป็นพิมพ์แข็งแล้วนำตัวอย่างเนื้อเยื่อที่ได้ไปตัดด้วยเครื่องไมโครโตม ให้มีความหนา 5 ไมครอน นำตัว

อย่างเนื้อเยื่อที่ได้ไปลอยในน้ำอุ่นที่อุณหภูมิ 45 – 50 °C เมื่อเนื้อเยื่อยืดตัวดีแล้วใช้แผ่นสไลด์สะอาดช้อนเนื้อเยื่อที่สมบูรณ์นำไปวางบนเครื่องอุ่นสไลด์ (slide warmer) ที่อุณหภูมิ 45 – 50 °C นาน 3 - 4 ชั่วโมง เพื่อให้ตัวอย่างติดแน่นบนแผ่นสไลด์

นำสไลด์ที่ได้ไปย้อมสีฮีมาท๊อกไซลิน และอีโอซิน (Hematoxylin & Eosin) ตามวิธีของ Humason [27] และศึกษาการเปลี่ยนแปลงของเนื้อเยื่อภายใต้กล้องจุลทรรศน์กำลังขยายสูง

3. ผลการทดลอง

3.1 ผลการตรวจปรสิตในลูกปลาบึก

จากการศึกษาโรคและปรสิตของลูกปลาบึกอายุ 1 เดือน – 12 เดือน ที่ได้จากการผสมเทียมจากพ่อแม่พันธุ์ในบ่อดินของศูนย์วิจัยและพัฒนาประมงน้ำจืดพะเยา ระหว่างเดือนกรกฎาคม 2546 ถึงมิถุนายน 2547 เป็นระยะเวลา 12 เดือน โดยการสุ่มตัวอย่างเดือนละ 5 ตัว รวมทั้งหมด 60 ตัว พบปรสิตทั้งหมด 3 ชนิด ซึ่งเป็นปรสิตภายนอกทั้งหมด คือ *Trichodina* spp. (ภาพที่ 1) 2 ชนิด (species) และตัวอ่อนหอยกาบน้ำจืด *Pilsbryoconcha exillis compressa* (ภาพที่ 2) ชนิดและเปอร์เซ็นต์ของปลาบึกอายุ 1-12 เดือน ที่พบปรสิตแต่ละชนิดแสดงในตารางที่ 1

ปรสิตที่พบในลูกปลาบึกมีรายละเอียดดังนี้

***Trichodina* sp.1** (ภาพที่ 1)

เป็นโปรโตซัวในกลุ่มซิลิเอท (ciliate) มีรูปร่างคล้ายระฆังคว่ำมีขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางขนาด 179 (157-192) ไมครอน เมื่อมองจากทางด้านท้องจะเห็นเป็นรูปวงกลม และมีขนสั้น (cilia) เรียงกันแน่น ใช้ในการเคลื่อนที่ ส่วนล่างเว้ามีอวัยวะช่วยในการยึดเกาะกับตัวปลา เป็น adhesive disc มีเส้นผ่าศูนย์กลาง 155 (132-148) ไมครอน ซึ่งด้านในจะมีตะขอแบนๆ (process) 24 อันเรียงซ้อนกันเป็นวงกลมเรียกว่า dentriculate ring มีขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 125 (117-138) ไมครอน ตะขอแต่ละอันที่เรียงซ้อนกัน แบ่งเป็น 2 ส่วนคือ external process และ internal process โดย external process มีลักษณะเป็นเส้นโค้งหนาปลายเล็กแหลมในแนวระนาบตรงบริเวณด้านนอกของวงมีความยาว 10 (8-11.5) ไมครอน ส่วน internal process มีลักษณะเหมือนเข็มแหลมยื่นส่วนปลายแหลมเข้าหาจุดศูนย์กลางแต่ไม่จรดกันที่กลางเซลล์ มีความยาว 23 (15-26) ไมครอน [4,15, 18,25,27,30] พบปรสิตชนิดนี้บริเวณเหงือก และ ผิวตัวของลูกปลาบึก โดยพบปรสิตในปลาบึก 24 ตัว จาก 60 ตัว คิดเป็น 40 % และปลาบึกแต่ละตัวพบปรสิตปริมาณ 2-24 ตัว

***Trichodina* sp.2** (ภาพที่ 1)

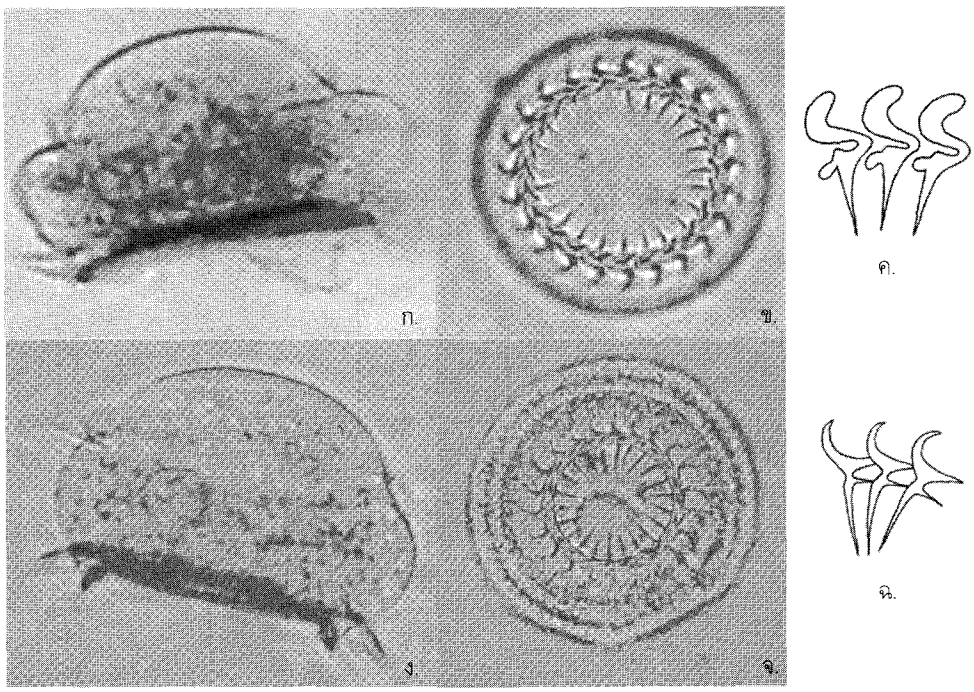
มีลักษณะต่าง ๆ คล้ายคลึงกับ *Trichodina* sp.1 แต่มีขนาดเล็กกว่าและมีจำนวนตะขอที่ dentriculate ring น้อยกว่า โดยมีขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางขนาด 149 (124-156) ไมครอน adhesive disc มีเส้นผ่าศูนย์กลาง 127 (113-139) ไมครอน ซึ่งด้านในจะมีตะขอแบนๆ 22 อันเรียงซ้อนกันเป็น dentriculate ring มีขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 73 (61-84) ไมครอน ตะขอแต่ละอันที่เรียงซ้อนกัน แบ่งเป็น 2 ส่วนคือ external process และ internal process โดย external processมีลักษณะเป็นเส้นโค้งหนาปลายเล็กแหลมในแนวระนาบตรงบริเวณด้านนอกของวงมีความยาว 12 (9.6-14) ไมครอน ส่วน internal process มีลักษณะเหมือนเข็มแหลมยื่นส่วนปลายแหลมเข้าหาจุดศูนย์กลางแต่ไม่จรดกันที่กลางเซลล์ มีความยาว 19 (16-22) ไมครอน พบปรสิตชนิดนี้บริเวณเหงือก และ ผิวตัวของลูกปลาบึก โดยพบในปลาบึก 25 ตัว จาก 60 ตัว คิดเป็น 41.67 % และปลาบึกแต่ละตัวพบปรสิตปริมาณ 1-17 ตัว

Glochidia ของหอยกาบน้ำจืด *Pilsbryoconcha exillis compressa* (ภาพที่ 2)

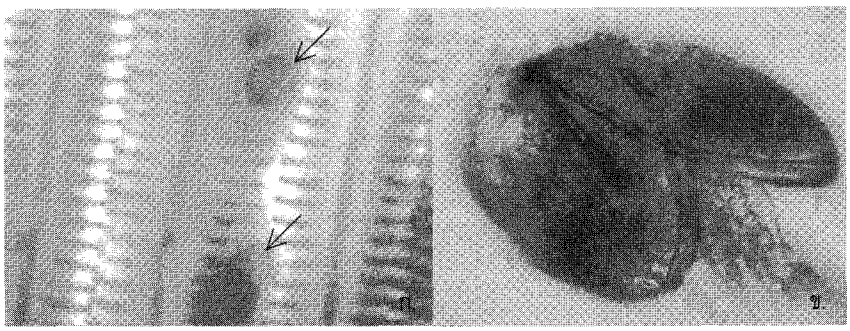
ตัวอ่อนระยะ glochidia ของหอยกาบนี้พบฝังอยู่ในซี่เหงือก มีลักษณะเป็นฝา 2 อันประกบกัน ลำตัวแบนข้าง มีความยาวประมาณ 1.58-1.78 เท่าของความกว้าง โดยมีความยาวเฉลี่ย 682 (523-811) ไมครอน ความกว้างเฉลี่ย 408.8 (324-513) ไมครอน เมื่อมองจากทางด้านข้าง (lateral view) จะเห็นลักษณะเป็น 2 ฝาที่มีบานพับ (hinge ligament) ยึดเปลือกทั้งสองไว้ด้วยกัน [3,34] พบปรสิตชนิดนี้ในปลาบึก 30 ตัว จาก 60 ตัว คิดเป็น 50% และปลาบึกแต่ละตัวพบปรสิตปริมาณ 10-411 ตัว

ตารางที่ 1 จำนวนปลาบึก (%) ที่พบปรสิต *Trichodina* spp. และ ตัวอ่อนระยะ glochidia ของหอยสองฝา *Pilsbryoconcha exillis compressa*

ชนิดของปรสิต	% ปลาบึกที่พบปรสิตในเดือนที่ 1-12											
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
Trichodina sp. 1	100	80	20	80	100	100	0	0	0	0	0	0
Trichodina sp. 2	100	80	40	80	100	100	0	0	0	0	0	0
ตัวอ่อนระยะ glochidia ของหอยสองฝา *Pilsbryoconcha exillis compressa*	0	0	0	0	0	0	100	100	100	100	100	100



ภาพที่ 1 *Trichodina* spp. (40X) (ก. *Trichodina* sp.1 มองจากด้านข้าง ข. มองจากด้านท้อง ค. denticular blades ง. *Trichodina* sp.2 มองจากด้านข้าง จ. มองจากด้านท้อง ฉ. denticular blades)



ภาพที่ 2 โกลคิเดียของหอยกาบน้ำจืด *Pilsbryoconcha exillis compressa*

ก. โกลคิเดียเมื่อเกาะบนซี่เหงือกลูกปลาบึก (ลูกศรชี้) (4X) ข. ตัวอ่อนของหอยที่อยู่ภายใน (ลูกศรชี้) (20X)

ตารางที่ 2 ชนิดของแบคทีเรียและเปอร์เซ็นต์ที่พบในปลาบึกอายุ 1-12 เดือน

ชนิดของแบคทีเรีย	เดือนที่ (% ปลาบึกที่พบแบคทีเรีย)											
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
Aeromonas hydrophila	60	100	60	60	40	60	80	100	80	80	80	100
Plesiomonas shigelloides	0	40	20	20	20	40	20	20	40	40	40	40
Pasteurella haemolytica	20	0	0	0	0	0	0	0	20	0	0	0
Vibrio cholerae	0	0	0	0	20	0	20	0	0	20	0	0
Serratia odorifera	20	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Chromobacterium violaceum	0	0	0	0	20	0	20	0	20	0	20	20
Acinetobacter baumannii	0	0	0	0	20	20	20	0	0	0	0	0

3.2 ผลการตรวจแบคทีเรียในลูกปลาบึก

จากตัวอย่างปลาบึกทั้งหมด 60 ตัว พบแบคทีเรียที่แยกได้จากตับ ไต และม้าม 7 ชนิด ได้แก่ *Aeromonas hydrophila, Pasteurella pneumotropica/haemolytica, Serratia odorifera, Plesiomonas shigelloides, Vibrio cholerae, Chromobacterium violaceum* และ *Acinetobacter baumannii* ซึ่งชนิดและเปอร์เซ็นต์ของปลาบึกที่พบแบคทีเรียแต่ละชนิดในแต่ละเดือนมีความแตกต่างกันดังแสดงในตารางที่ 2

ซึ่งแบคทีเรียที่พบในลูกปลาบึกมีรายละเอียดดังนี้

Aeromonas hydrophila

เป็นแบคทีเรียแกรมลบ เซลล์รูปร่างเป็นแท่งสั้น ปลายมน มีขนาดประมาณ 1.0-4.4 ไมครอน เคลื่อนที่โดยใช้แส้ (filaments) ที่อยู่บริเวณขั้วเซลล์ พบแบคทีเรียชนิดนี้ได้ทั้งในสภาพที่มีออกซิเจนและไม่มีออกซิเจน สามารถเจริญได้ที่อุณหภูมิต่ำ 0-5 °C หรืออุณหภูมิสูง 38-41 °C แต่เจริญดีที่อุณหภูมิ 20-30 °C pH 5.5-9.0

A. hydrophila ก่อให้เกิดโรคที่เรียกว่า Motile aeromonas disease พบในแหล่งน้ำทั่วไป พบมากในน้ำที่มีสารอินทรีย์มาก [45] น้ำทิ้งจากแหล่งชุมชน [22,44] น้ำทะเลที่ระดับความเค็มไม่เกิน 10 ppt [24,31] และในตะกอนดินจากแหล่งน้ำและบ่อเลี้ยงปลา [42] แบคทีเรียชนิดนี้ก่อให้เกิดโรคแก่ปลาเมื่อสภาพแวดล้อมเปลี่ยนแปลงไปในทางที่ไม่เหมาะสม เช่น การเปลี่ยนแปลงอุณหภูมิอย่างรวดเร็ว การบอบช้ำจากการขนส่ง มีบาดแผลผิวหนังและเหงือกถูกทำลายเนื่องจากปรสิต ปริมาณออกซิเจนที่ละลายในน้ำลดต่ำลง [36] หรือปริมาณอันไอออนไนซ์แอมโมเนียสูง จะทำให้ปลาเกิดความเครียด และอ่อนแอ ติดโรคได้ง่าย [44,50] *A. hydrophila* เป็นแบคทีเรียที่เป็นสาเหตุสำคัญที่ทำให้เกิดโรคในปลา เช่น ปลาไน ปลาไหลทะเล ปลาทอง ปลาช่อน ปลาดุกด้าน ปลาบู่ทราย ปลาสวาย ปลากริม ปลากระดี่ ปลาในตระกูลปลานิล ปลา Golden shiners (*Notemigonus crysoleucas*) และนอกจากนั้นยังพบในสัตว์เลือดเย็นอื่น ๆ หลายชนิด เช่น กบ จระเข้ งู เต่า และตะพาบน้ำเป็นต้น [1,11, 43] รวมทั้งเป็นสาเหตุของโรคแผลติดเชื้อ ท้องร่วง และโลหิตเป็นพิษในคน [5,29] โรคที่เกิดจากแบคทีเรียชนิดนี้มีชื่อเรียกต่างกันตามอาการของปลาหรือสัตว์ที่ป่วยได้แก่ haemorrhagic septicemia ซึ่งเป็นชื่อโรคในปลาเขตร้อนทั่ว ๆ ไป เช่นปลาไน (*Cyprinus carpio*) [46] red sore disease ในปลา pike (*Esoc lucius*) [40] red mouth disease ในปลา rainbow trout (*Salmo gaidneri*) [49] red pest disease ในปลาไหล (*Fluta alba*) [23] ulcer disease ในปลาสวาย (*Pangasius pangasius*) [7] และปลาช่อน (*Channa striata*) [2] และ bacterial septicemia ซึ่งเป็นลักษณะอาการที่มีเชื้อแพร่ไปยังอวัยวะต่างๆ ตามกระแสเลือด [12]

ปลาที่ติดเชื้อ *A. hydrophila* จะมีอาการแตกต่างกันออกไปขึ้นอยู่กับความรุนแรงของเชื้อ ชนิดปลาและสภาพแวดล้อมที่อาศัย แบ่งออกได้เป็น 4 กลุ่ม [12, 21,26] คือ

1. อาการรุนแรงเฉียบพลัน (acute form) ปลาจะตายอย่างรวดเร็วและเป็นจำนวนมากภายใน 1- 2 วัน โดยไม่ปรากฏอาการภายนอกให้เห็น หรือมีอาการเพียงเล็กน้อยเท่านั้น อวัยวะภายในโดยทั่วไปไม่มีเลือดคั่ง (congestion) เนื่องจาก

ความเครียด ที่เกิดจากการขนส่ง การอยู่รวมกันอย่างหนาแน่น และการที่มีอุณหภูมิของน้ำเพิ่มขึ้น

2. อาการกึ่งเฉียบพลัน (subacute form) ปลาจะตายภายใน 1-2 วัน เนื่องจากสารพิษ (toxin) ที่แบคทีเรียสร้างขึ้น โดยปลาจะมีอาการท้องบวมน้ำ (dropsy) แผลพุพอง (blister) แผลหนอง (abscesses) เกล็ดตั้งพอง (scale protrusion) และตาโปน (exopthalmia)

3. อาการเรื้อรังแบบมีแผลลึกถึงชั้นกล้ามเนื้อ (Chronic ulcerous) ระยะแรกแผลอาจจะตื้น มีขนาดเล็ก ต่อมาขยายใหญ่ขึ้นและลึกลงไปถึงชั้นกล้ามเนื้อ ปลาที่รอดตายจากอาการดังกล่าวส่วนมากจะพบแผลสีดำอย่างชัดเจน

4. ไม่แสดงอาการของโรค (latent form) ไม่สามารถเห็นอาการของโรคทั้งภายในและภายนอก แต่สามารถแยกเชื้อแบคทีเรียได้จากอวัยวะภายในต่างๆ ซึ่งพบว่าปลาเหล่านี้จะสร้างภูมิคุ้มกันต่อเชื้อแบคทีเรียชนิดนี้ และเป็นพาหะนำโรคนี้ต่อไป

Pasteurella haemolytica

เป็นแบคทีเรียแกรมลบ เซลล์รูปร่างค่อนข้างกลม หรือเป็นแท่งสั้น มีขนาดยาวประมาณ 1.4 ไมครอน กว้างประมาณ 0.4 ไมครอน อยู่เป็นเซลล์เดี่ยว เป็นคู่ หรือเป็นเส้นสายสั้น ๆ ไม่สร้าง endospore เจริญในสภาพที่ไม่ใช้ออกซิเจน สามารถเจริญได้ที่อุณหภูมิ 22-42 °C เจริญดีที่อุณหภูมิ 37°C เป็นแบคทีเรียที่พบในน้ำและในอาหาร ทำให้เกิดโรคในสัตว์พวกวัว [17]

Serratia odorifera

เป็นแบคทีเรียแกรมลบ เซลล์รูปร่างเป็นแท่ง (bacilli) ไม่มีการสร้างสปอร์ เคลื่อนที่โดยใช้แส้ (peritrichous flagella) พบแบคทีเรียชนิดนี้ได้ในดิน น้ำ รวมทั้งแยกได้จากพืช [17]

Plesiomonas shigelloides

เป็นแบคทีเรียแกรมลบ เซลล์รูปร่างเป็นแท่งสั้น ปลายกลมมน มีขนาดกว้างประมาณ 0.8-1.0 ไมครอน ยาวประมาณ 3.0 ไมครอน เคลื่อนที่โดยใช้แส้ที่อยู่บริเวณขั้วเซลล์ สามารถเจริญได้ทั้งสภาพที่มีออกซิเจนและไม่มีออกซิเจน ไม่สร้างสปอร์ [32]

เจริญได้ดีที่อุณหภูมิ 30-37 °C อุณหภูมิสูงสุดที่สามารถเจริญได้คือ 39-41 °C ไม่เจริญในอาหารที่มี NaCl 7.5 % พบแบคทีเรียชนิดนี้ได้ในแหล่งน้ำทั่วไปทั้งน้ำจืดและน้ำกร่อย [32] ดิน หรืออาจแยกได้จากสิ่งมีชีวิต เช่น นก ปลา รวมทั้งอาหารทะเล [48] ทำให้เกิดอาการปวดท้อง ท้องร่วงในคน

Vibrio cholerae

เป็นแบคทีเรียแกรมลบ เซลล์รูปร่างเป็นแท่งสั้น มีขนาดกว้างประมาณ 1.5 ไมครอน ยาวประมาณ 3.0 ไมครอน เคลื่อนที่โดยใช้แส้ที่อยู่บริเวณขั้วเซลล์ [41] พบแบคทีเรียชนิดนี้ได้ทั้งในสภาพที่มีออกซิเจนและไม่มีออกซิเจน สามารถเจริญได้ที่อุณหภูมิ 18-37 °C pH 6.0-9.0 NaCl ที่เหมาะสมคือ 3.0%

เจริญได้ทั้งในน้ำจืดและน้ำเค็ม รวมทั้งในร่างกายของคนและสัตว์ ทำให้เกิดท้องร่วงในคน โดยการปนเปื้อนในอาหารและน้ำ โดยปริมาณแบคทีเรียที่สามารถทำให้เกิดท้องร่วงมีปริมาณระหว่าง 10^6-10^{11} cfu./ml. [16]

Chromobacterium violaceum

เป็นแบคทีเรียแกรมลบ เซลล์รูปร่างเป็นแท่งสั้น ปลายกลมมน มีขนาดกว้างประมาณ 0.6-1.2 ไมครอน ยาวประมาณ 1.5-6 ไมครอน เคลื่อนที่โดยใช้แส้ที่อยู่บริเวณขั้วเซลล์ เจริญได้ทั้งในสภาพที่มีออกซิเจนและไม่มีออกซิเจน สามารถเจริญได้ดีที่อุณหภูมิ 25 °C ไม่เจริญที่ pH ต่ำกว่า 5 pH ที่เหมาะสม 7-8 ไม่เจริญในอาหารที่มี NaCl 6%

พบแบคทีเรียชนิดนี้ได้ในดิน และในน้ำ [20] ในเขตอากาศอบอุ่น [19,38] ผลิต pigment สีม่วง เรียก violacein ซึ่งละลายใน ethanol แต่ไม่ละลายในน้ำหรือคลอโรฟอร์ม สารนี้มีคุณสมบัติในการเป็น antibiotic สามารถที่จะเข้ามาในร่างกายของสิ่งมีชีวิต เกิดการแพร่กระจายเชื้อทางกระแสเลือด สามารถตรวจพบเชื้อนี้ได้ในตับของสัตว์บกและสัตว์น้ำ สายพันธุ์ที่รุนแรงสามารถที่จะรอดจากขบวนการกลืนกินของเซลล์ (phagocytosis) ได้ [19]

Acinetobacter baumannii

เป็นแบคทีเรียแกรมลบ เซลล์รูปร่างเป็นแท่งสั้น มีขนาดกว้างประมาณ 1.0-1.5 ไมครอน ยาวประมาณ 1.5-2.5 ไมครอน ในระยะที่เซลล์มีการเจริญเติบโต (logarithmic phase) และรูปร่างกลมในช่วง stationary phase อุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการเจริญเติบโต 30-32 °C pH 7 ต้านทานต่อยาปฏิชีวนะชนิด penicillin เป็นแบคทีเรียที่สามารถพบในแหล่งน้ำ และดิน สามารถทำให้เกิดโรคได้ โดยผ่านทางกระแสเลือด [47]

3.3 ผลการศึกษาทางพยาธิสภาพ

จากการศึกษาลักษณะทางพยาธิสภาพของเนื้อเยื่อในลูกปลาบึกอายุ 1-12 เดือน ที่มีการติดเชื้อแบคทีเรีย พบว่าเซลล์ตับมีการเสื่อมสภาพและมีการตายของเซลล์ (necrosis) ผนังเซลล์ตับไม่คงรูป (ภาพที่ 3) นิวเคลียสมีการหดตัวและติดสีเข้มขึ้น (pyknotic nuclei) (ภาพที่ 3) เนื่องจากสารพิษที่แบคทีเรียสร้างหรือผลิตขึ้นในกระแสเลือดทำให้เกิดการตายของเซลล์ พบเลือดคั่งตามท่อเลือด (hyperemia) ในตับ (ภาพที่ 3)

เนื้อเยื่อเหงือกปลาบึกบริเวณที่มีปรสิตโกลคิเดียอาศัยอยู่พบว่ามีการเพิ่มจำนวนของเซลล์เหงือก (hyperplasia) เกิดการเชื่อมของซี่เหงือกทำให้พื้นที่ในการแลกเปลี่ยนแก๊สลดลง (ภาพที่ 4)

4. วิจารณ์ผลการทดลอง

ในการศึกษาครั้งนี้พบว่าในช่วง 6 เดือนแรกพบปรสิตเห็บระฆัง *Trichodina* spp. 2 ชนิด อยู่เป็นปริมาณมากทั้งบริเวณเหงือก และผิวหนัง ซึ่งปรสิตชนิดนี้สามารถพบได้ในการเลี้ยงปลาในบ่อทั่วไป โดยปริมาณขึ้นอยู่กับปริมาณสารอินทรีย์และแบคทีเรียที่อยู่ในน้ำ ซึ่งการควบคุมปรสิตชนิดนี้สามารถควบคุมได้โดยใช้ฟอร์มาลิน [35] การที่พบปรสิตชนิดนี้เฉพาะในช่วง 6 เดือนแรกอาจเนื่องมาจากช่วงแรกมีการเลี้ยงลูกปลาบึกในบ่อในปริมาณที่หนาแน่น หลังจากนั้นเมื่อศูนย์วิจัยและพัฒนาประมงน้ำจืดพะเยา กรมประมง ได้นำลูกปลาดังกล่าวไปเลี้ยงที่อื่น ทำให้ปริมาณของลูกปลาลดน้อยลง ในช่วง 6 เดือนหลังจึงไม่พบปรสิตชนิดนี้ แต่จะพบปรสิตที่พบเป็นตัวอ่อนของหอยสองฝาซึ่งเมื่อทำการสำรวจหอยสองฝาในบ่อเลี้ยงปลาบึกพบว่ามีหอยสองฝา 1 ชนิด เมื่อทำการแยกชนิดแล้วพบว่าเป็นหอยกาบน้ำจืด *Pilsbryoconcha exillis compressa* ซึ่งเป็นหอยกาบน้ำจืดที่พบทั่วไปตามคูคลองในประเทศไทย ใช้ด้านหน้าตัว ฝังลงไปในโคลน ทรายตามพื้นท้องน้ำ เปลือกสีน้ำตาล ตัวยาวประมาณ 2.5-3.2 นิ้ว ลำตัวแบนทางด้านข้าง โดยหอยสองฝานี้ มีวงจรชีวิตระยะหนึ่งที่เป็นปรสิตในปลา โดยไข่ที่ปฏิสนธิแล้วเจริญเป็นตัวอ่อนโกลคิเดีย อยู่ที่บริเวณเหงือก แล้วจึงปล่อยออกมานอกตัวโกลคิเดียจะเกาะเข้ากับผิวหนังปลา หรือเข้าไปเกาะที่เหงือกปลาเป็นปรสิตภายนอกของปลา เกาะดูดกินสารอาหารจากปลาประมาณ 10 สัปดาห์ มีการเปลี่ยนแปลงรูปร่างในรูปของซีสต์แล้วจึงออกจากซีสต์ และเจริญเป็นตัวเต็มวัย [3] การควบคุมปรสิตชนิดนี้สามารถทำได้โดยการกำจัดหอยสองฝาในบ่อเลี้ยงปลา

การที่ในช่วง 6 เดือนแรกไม่พบปรสิตโกลคิเดียน่าจะเนื่องจากน้ำที่ใช้เลี้ยงปลาบึกในบ่อเป็นน้ำที่มาจากกว๊านพะเยา ซึ่งอาจมีตัวอ่อนหอยปนมากับน้ำจากกว๊านพะเยา ในระยะ 6 เดือนแรกหอยในบ่อเลี้ยงยังเป็นตัวอ่อน เมื่อเวลา 6 เดือนหลัง หอยเข้าสู่ระยะตัวเต็มวัย จากการตรวจสอบพบหอยสองฝาจำนวนมากในบ่อเลี้ยงปลาบึกซึ่งน่าจะเป็นสาเหตุที่ทำให้เกิดปรสิตโกลคิเดียในบ่อเลี้ยง

ชนิดของแบคทีเรียที่พบนั้น เป็นแบคทีเรียที่ตรวจพบในน้ำเลี้ยงในบ่อ [13,16,20,32] ซึ่งอาจเข้าสู่ตัวปลาได้ เนื่องจากการมีปรสิตเกาะ ทำให้เกิดบาดแผลซึ่งเป็นช่องทางให้แบคทีเรียที่อยู่ในน้ำเข้าสู่ตัวปลา และกระจายภายในร่างกายปลาได้โดยผ่านทางกระแสเลือด โดยแบคทีเรียที่พบแต่ละชนิดได้แก่ *Aeromonas hydrophila*, *Pasteurella haemolytica*, *Serratia odorifera*, *Plesiomonas shigelloides*, *Vibrio cholerae*, *Chromobacterium violaceum* และ *Acinetobacter baumannii* อย่างไรก็ตามปลาบึกที่ตรวจพบแบคทีเรียไม่มีอาการผิดปกติภายนอกทั้งนี้อาจเนื่องจากปริมาณของแบคทีเรียที่พบมีปริมาณน้อยและปลามีระบบภูมิคุ้มกันในระดับที่สูงแบคทีเรียจึงไม่สามารถทำให้เกิดโรคในปลาได้

จากการศึกษาลักษณะทางพยาธิสภาพของเนื้อเยื่อในลูกปลาบึกที่อวัยวะภายในตรวจพบเชื้อแบคทีเรีย พบการเปลี่ยนแปลงทางพยาธิที่คล้ายคลึงกัน ซึ่งพยาธิสภาพที่เปลี่ยนแปลงนั้นอาจมีผลสืบเนื่องมาจากเชื้อที่ปนอยู่ในน้ำ หรือ ปนมากับอาหารที่ให้ปลาบึก บริเวณ ตับ ไต ม้าม นั้นเป็นอวัยวะที่มีการเปลี่ยนแปลงซึ่งสังเกตได้ง่าย คือ ส่วนมากจะมีการเสื่อมของเซลล์เหล่านี้ในปลา channel catfish การติดเชื้อ *A. hydrophila* ทำให้เซลล์ตับเกิดการตาย [14] ซึ่งเหมือนกับอาการที่เกิดขึ้นกับปลาไหล *Anguilla anguilla* ที่ติดเชื้อ *A. hydrophila* [37] การติดเชื้อ *Pseudomonas* sp. [39] เนื้อเยื่อปลาดุกที่ฉีดเชื้อ *E. tarda* เข้าไป [6] ส่วนในปลากะพงขาวที่ติดเชื้อแบคทีเรียก็เกิดการเปลี่ยนแปลงทางพยาธิบริเวณตับเช่นเดียวกัน [8]

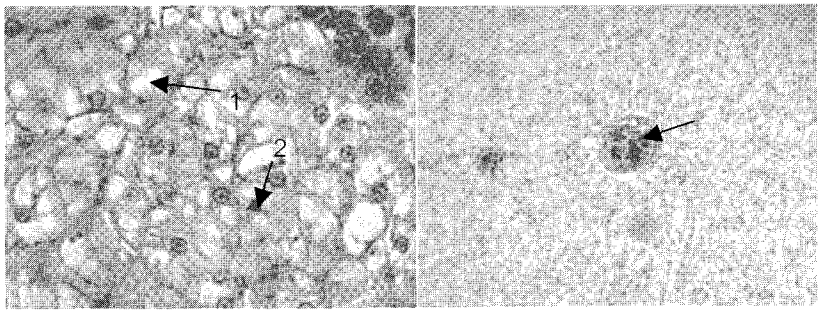
การเปลี่ยนแปลงของเนื้อเยื่อเหงือกพบว่าบริเวณที่มีปรสิตโกลคิเดียเกาะอยู่มีการเพิ่มจำนวนของเซลล์เยื่อบุผิวของ gill lamellae (hyperplasia) ทำให้เกิดการเชื่อมของซี่เหงือกทำให้บริเวณแลกเปลี่ยนแก๊สลดลง ถ้ามีปรสิตปริมาณมากอาจทำให้ลูกปลาตายได้เนื่องจากการขาดออกซิเจน

5. สรุปผลการทดลอง

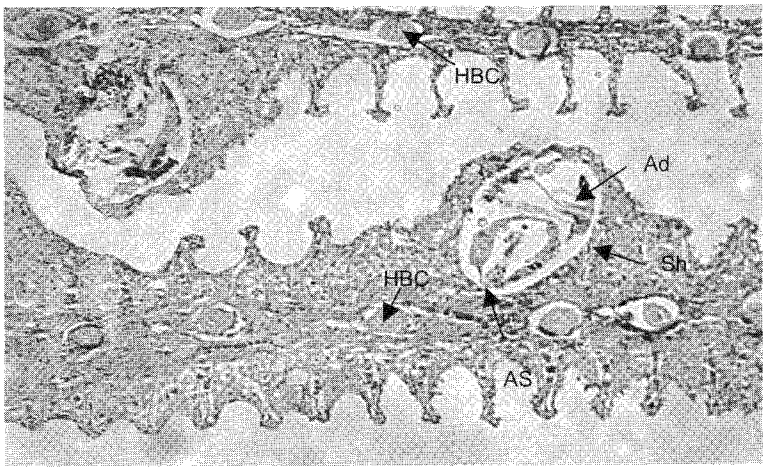
การตรวจหาปรสิตและแบคทีเรียในลูกปลาบึกที่เลี้ยงในบ่อดิน พบว่ามีแบคทีเรียอยู่ในตัวปลาซึ่งแบคทีเรียนั้นเป็นแบคทีเรียที่พบในน้ำอยู่แล้ว ส่วนปรสิตที่พบในลูกปลาบึกที่เลี้ยงในบ่อพบปรสิตเห็บระฆังในช่วง 6 เดือนแรก ซึ่งสามารถรักษาโดยการใช้ฟอร์มาลินความเข้มข้น 25 ppm และใน 6 เดือนหลังพบว่ามีตัวอ่อนของหอยระยะโกลคิเดีย ซึ่งเป็นไปได้ว่าหอยสามารถอยู่ในบ่อเลี้ยงได้โดยติดมาจากน้ำในกว๊านพะเยา ดังนั้นก่อนที่เติมน้ำในบ่อเลี้ยงปลาควรทำการกรองก่อน รวมทั้งฆ่าเชื้อในบ่อก่อนทำการเลี้ยง เพื่อแก้ปัญหาเชื้อแบคทีเรียและโกลคิเดียที่พบในลูกปลาบึก

6. กิตติกรรมประกาศ

งานวิจัยเรื่องนี้ได้รับทุนอุดหนุนวิจัยจากสำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย (สกว.) ขอขอบพระคุณ รศ.ประไพสิริ สิริกาญจน ที่ปรึกษาโครงการวิจัยที่กรุณาให้คำแนะนำที่เป็นประโยชน์หลาย ๆ อย่างในการทำวิจัย รศ.ดร.อุทัยวรรณ โกวิทวที ที่กรุณาช่วยอ่านผลเนื้อเยื่อปลาบึกที่มีปรสิตโกลคิเดีย ขอขอบคุณ คุณสุธิดา โสัะปีน และคุณเมธา คฑาภิชาติ นักวิชาการประมงศูนย์วิจัยและพัฒนาประมงน้ำจืดพะเยาที่ช่วยในการส่งตัวอย่างลูกปลาบึก และขอขอบพระคุณผู้ทรงคุณวุฒิที่กรุณาช่วยแก้ไขปรับปรุงบทความวิจัยนี้ให้สมบูรณ์ยิ่งขึ้น



ภาพที่ 3 ก. เซลล์ตับมีการเสื่อมสภาพและมีการตายของเซลล์ (necrosis) (1) นิวเคลียสมีการหดตัว และติดสีเข้มขึ้น (pyknotic nuclei) (2) (H&E: 40X)
ข. เลือดคั่งตามท่อเลือด (hyperemia) ในตับของปลาบึก (H&E: 20X)



ภาพที่ 4 บริเวณที่มีโกลคิเดียเกาะอยู่ มีการเพิ่มจำนวนของเซลล์เหงือก (hyperplasia) เกิดการเชื่อมของซี่เหงือก (H&E: 4X) (HBC = host branchial capillary, Ad = Adductor muscle of glochidium, Sh = Shell of glochidium, AS = Attachment spines of glochidium)

7. เอกสารอ้างอิง

[1] เกรียงศักดิ์ สายธนู,ปริมาณของเชื้อแอโรโมนาสไฮโดรฟิล่าและการเกิดโรคในตะพาบน้ำ, วารสารโรคสัตว์น้ำ 8 (2); น. 95-103, 2528.

[2] เกรียงศักดิ์ สายธนู และ เกรียงศักดิ์ พูนสุข, โรคเกล็ดหลุดและแผลในปลาช่อน, วารสารชมรมโรคปลา, 3 (1); น. 1-7, 2523.

[3] บพิธ จารุพันธุ์ และนันทพร จารุพันธุ์, สัตววิทยาปฏิบัติการ, สำนักพิมพ์มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ, 211 น., 2540.

[4] ประไพสิริ สิริกาญจน, ความรู้เรื่องปรสิตของสัตว์น้ำ, สำนักพิมพ์รั้วเขียว, กรุงเทพฯ, 2546.

[5] ประสิทธิ์ อัศวโภคี, อมร ลีลารัศมี และสุรพล กอบวรรธนะกุล. โรคติดเชื้อแอโรโมนาสไฮโดรฟิล่าในคน, แพทย์สภาสาร 12; น. 57-62, 2526.

[6] พิกุล จิรวณิชไพศาล, การก่อให้เกิดโรคของแบคทีเรีย *Edwardsiclla tarda* ในปลาดุกด้าน, วิทยานิพนธ์ปริญญาโท,มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ, 2532.

[7] วารินทร์ ธนาสมหวัง และ เกรียงศักดิ์ พูนสุข, โรคแผลในปลาสวยงาม, ชมรมวารสารโรคปลา 20 (3); น. 131-133, 2522.

[8] วีรวรรณ ชินอักษร, โรคและปรสิตของปลากะพงขาว, วิทยานิพนธ์ปริญญาโท, มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ, 2535.

[9] สิทธิ บุณยรัตผลิน และ จิราพร เกษรจันทร์, โรคปลาบึกปี 2526, เอกสารวิชาการ ฉบับที่ 29, สถาบันประมงน้ำจืดแห่งชาติ กรมประมง, 6 น., 2526.

[10] เสน่ห์ ผลประสิทธิ์ และ ภาณุ เทวรัตน์มณีกุล, ชีววิทยาและการเพาะเลี้ยงปลาบึก. เอกสารเผยแพร่ฉบับที่ 31. สถาบันวิจัยประมงน้ำจืด, 79 น., 2540.

[11] โสมทัต วงศ์สว่าง, เกรียงศักดิ์ พูนสุข และ เกรียงศักดิ์ สายธนู, โรคขาแดงในกบนา, วารสารโรคสัตว์น้ำ 5 (2); น. 57-62, 2525.

[12] Amlacher, E., Tashenbuch du fischrankhertin. Cited by G.L. Bullock, D.A. Conroy and S.F. Snieszko, Diseases of Fishes, T.F.H.Publication Inc., Neptune City, New Jersey, 1961.

[13] Austin, B. and Allen, D.A., Microbiology of laboratory-hatched brine shrimp (*Artemia*), Aquaculture, 26; pp. 369-383, 1982.

[14] Bach, R., Chen, P. K. and Chapman, G. B., Changes in the spleen of the channel catfish *Ictalurus punctatus* Refinesque induced by infection with *Aeromonas hydrophila,* J. Fish Dis, 1(3); pp. 205 – 217, 1978.

[15] Bassleer, G., Disease prevention and control, Freshwater and Marine Aquarium, 6; pp. 6 – 14, 1983.

[16] Bennish, M.L, Cholera : pathophysiology, clinical features and treatment *In* : *Vibriocholerae* and cholera : Molecular to global perspectives (Wachsmuth, K.I., Blake, P.A. and Olsik, O., Eds.), pp. 229-255, American Society for Microbiology, Washington, DC., 1994.[17] Buchanan, R. E. and Gibbons, N. E., The Shorten Bergey's Manual of Determination Bacteriology 8th, ed. The Williams & Wilkins Co., Baltimore, 1974.

[18] Bykhovskaya – Pavlovskaya, I. E., Guser, A. V., Dubinina, M. N., Izyumora, N. A., Smirnova, I. S., Sokolorskaya, I. L., Shtein, G. A., Shul' man, S. S. and Epsthtein, V. M, Key to Parasites of Fresh Water Fish of USSR, Translated from Russian, Israel Program for Scientific Translations, Jerusalem, 1964.

[19] Desjaridins, M., Fenlon, C. and Madison, D., Non-chromogenic *Chromobacterium violaceum* bacteremia. Clin. Microbiol. Newsl., 21; pp. 14-16, 1999.

[20] Durán, N. and Menck, C.F.M., *Chromobacterium violaceum*, A review of pharmacological and

industrial perspectives, Critical reviews in microbiology, 27; pp. 201-222, 2001.

[21] Gaines, J.L, Pathology of Experimantal Infection of *Aeromonas hydrophila* (Chister) Stainer, (Bacterial:Pseudomonales) in the Channel Catfish, (*Ictaratus punctatus*) (Rafinesque). Ph.D. Dissertation, Auburn Univ., Auburn, Alabama, 1972.

[22] Geldreich, E.E., Microbiology of water, J. Water Pol. Cont. Fed., 45; pp. 1244-1259, 1973.

[23] Ghittino, P., The principle aspects of bacterial fish diseases in Italy. Symp. Zool. Soc. Lond. No. 30; pp. 25-28, 1972.

[24] Hazen, T.C., Fliermans, C.B., Hirsch, R.P. and Esch, G.W., Prevalence and distribution of *Aeromonas hydrophila* in the United States, Appl. Envir. Microbiol, 36; pp. 731-738, 1978.

[25] Hoffman, G. L., Parasites of North America freshwater fishes, University of California Press, Los Angeles, 1967.

[26] Huizinga, H.W., Esch, G.W. and Hazen, T.C., Histopathology of red sore diseases *Aeromonas hydrophila* in naturally and experimentally infected large mouth bass *Micropterus salmoides* (Lacepede), J. Fish. Dis., 2; pp. 263-277, 1979.

[27] Humason, G. L., Animal Tissue Techniques, 4 th ed., W.H. Freeman, San Francisco, 1979.

[28] Jahn, T. L. and Jahn, F. F., How to know the Protozoa, W . M . C . Brown company Publishers Dubuque, IOWA, 1979.

[29] Joseph, S.W., Daily, O.P., Hunt, W.S., Seidleer, R.T., Allen, D.A. and Conwoll, R.R., *Aeromonas* primary wound infection of a driver in polluted water. J. Clin. Microb., 10; pp. 46-49, 1979.

[30] Kabata, Z., Parasites and Disease of Fish Cultured in the Tropics, Taylor & Francis (Printens) Ltd, London, 1985.

[31] Kaper, J.B., Seilder, J., Lockman, H. and Cowell, R.R., A medium for the presumptive indentification of *Aeromonas hydrophila* Enterobacteriaceae, Appl. Envir. Microbiol, 38; pp. 1023-1026, 1979.

[32] Krovacek, K., Eriksson, L. M., Gonz↑lez-Rey, C., Rosinsky, J. and Ciznar, I, Isolation, biochemical and serological characterisation of *Plesiomonas shigelloides* from freshwater in Northern Europe. Comparative Immunology, Microbiology & Infectious Diseases, 23; pp. 45-51, 2000.

[33] Lerssutthichawal, T., 1999, Monogeneans of the freshwater Siluriform fishes of Thailand, University of Malaya, 467 pp., 1999.

[34] Lutz, P.E., Invertebrate Zoology, Addison-Wesley Publishing Co.,Inc., San Juan, 734 p., 1986.

[35] Madsen H. C. K., K. Buchmann, S. Mellergaard, Association between trichodiniasis in eel (*Anguilla anguilla*) and water quality in recirculation systems, Aquaculture, 187; pp. 275-281, 2000.

[36] Meyer, F.P., Seasonal fluctuation in the incidence of diseases on fish farm, pp.21-29. *In* S.F. Sniesko (ed), A Symposium on Disease of Fishes and Shell fishes, Amer. Fish. Soc., Washington, D.C., 1970.

[37] Miyazaki, T., Histopathological study on bacterial infections in fishes. Mei. Univ. Bull. No. 7, 149 p., 1980.

[38] Murray, P.R., *Capnocytophaga*, *Eikenella*, *Kingella* and other fastidious or rarely encountered gram-negative rods, *In* P.R. Murray.

Manual of clinical microbiology, 7th ed., ASM Press, Washington, D.C., 1999.

[39] Post, G. W., Textbook of Fish Health, T.F.H. Publ., Inc. Ltd., Neptune city, New Jersey, 1983.

[40] Reed, G.B. and Toner, G.E., Red sore diseases of pike, J. Fish Res. Board. Can., 9; pp. 139-143, 1941.

[41] Reidl, J. and Klose, K. E., *Vibrio cholerae* and cholera : out of the water and into the host, FEMS Microbiology Reviews, 26; pp.125-139, 2002.

[42] Seilder, R.J., Allen, D.A., Lockman, H., Cowell, R.R., Joseph, S.W. and Daily, O.P., Isolation, enumeration, and characterization of *Aeromonas* from polluted water encountered in diving operations, Appl. Environ. Microbiol, 39; pp. 1010-1018, 1980.

[43] Shotts, J.R., Gaines, J.L., Marti, C. and Preswood, A.K., *Aeromonas* induced death among fish and repyiles in euthrophic lake. J. Am. Vet. Mad. Ass., 161; pp. 606-607, 1972.

[44] Snieszko, S.F., The effects of environmental stress on of infections diseases of fish, J. Fish Biol. 6; pp. 197-208, 1974.

[45] Snieszko, S.F. and Axelrod, H.R., The Preventation and Treatment of Diseases of Warmwater Fisher Under Subtropical Condition, with Specific Emphasis on Intensive Fish Farming Book 3, The Diseases of Fishes, T.F.H. Publication, Inc., Ltd, Hongkong, 1971.

[46] Snieszko, S.F., Piotrowska, W., Kocylowski, B. and Moreh, K., Bacteriological and Serological Studies on Bacteria of the carp Haemorrhagic Septicemia (English translation from Polish). Fish Jagellonia Univ., KraKow Polanf., 1989.

[47] Vinogradov, E.V., L. Brade, H. Brade and O. Holst, Structural and serological characterisation of the O-antigenic polysaccharide of the lipopolysac- charide from *Acinetobacter baumannii* strain 24, Carbohydrate Research, 338; pp. 2751-5756, 2003.

[48] Wadström T. and Ljungh Ä. *Aeromonas* and *Plesiomonas* as food and waterborne pathogens, International Journal of food microbiology, 12; pp. 303-311, 1991.

[49] Wagner, E.D. and Perkins, C.L., *Aeromonas hydrophila* the cause of "redmouth disease" in rainbow trout and "red leg disease"in frogs, Prog. Fish-Cult, 14; pp. 127-128, 1957.

[50] Walters, G.R. and Plumb, J.A., Environment stress and bacterial infection channel catfish, *Ictalurus punctatus* Refinesque, J. Fish. Biol., 17; pp. 177-185, 1980.