เอกสาร

วารสารวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี(ภาษาไทย) ปีที่ 12 ฉบับที่ 1 ก.ย.- ธ.ค.47

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 exilis 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 exilis compressa*. *Trichodina* sp 1 and *Trichodina* sp 2 were found in the first six months and glochidia stage of *Pilsbryoconcha exilis 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 จากศูนย์วิจัยและพัฒนาประมงน้ำจืดพะยาทุกเดือน 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 asepuc 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

นำสไลด์ที่ได้ไปย้อมสีฮีมาท็อกไซลิน 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)

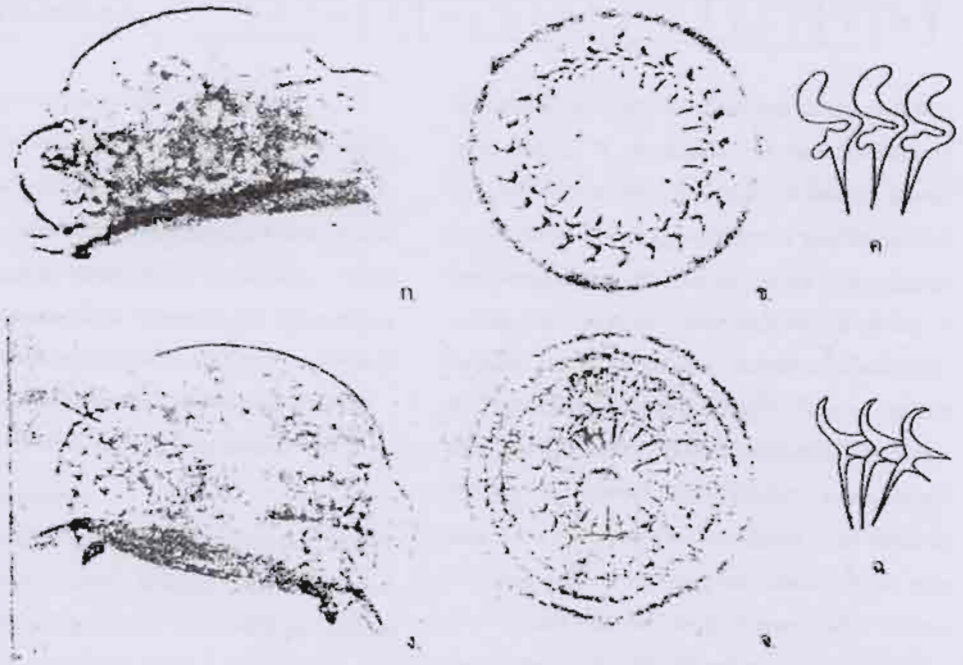
มีลักษณะต่าง ๆ คล้ายคลึงกับ *Trichodina* sp.1 แต่มีขนาดเล็กกว่าและมีจำนวนตะขอที่ dentriculate ring น้อยกว่า โดยมีขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางขนาด 149 (124-156) ไมครอน adhesive disc มีเส้นผ่าศูนย์กลาง 127 (113-139) ไมครอน ซึ่งด้านในจะมีตะขอแบนๆ 22 อันเรียงซ้อนกันเป็น dentriculate ring มีขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 73 (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 จำนวนเปอร์เซ็นต์ (%) ที่พบปรสิต *Trichodina* spp. และตัวอ่อนระยะ glochidia ของหอยสองฝา *Pilsbryoconcha exillis compressa*

ชนิดของปรสิต	% และปีที่พบปรสิตในเดือนที่ 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 โกลคีเดียของหอยน้ำจืด *Pilsbryoconcha exillis compressa*

ก โกลคีเดียเมื่อเกาะบนซี่เหงือกลูกปลาบึก (ลูกศรชี้) (4X) ข 1 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 (flaments) 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] รวมทั้งเป็นสาเหตุของโรคผลติดเชื้อ 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 หรือเป็นสายสั้น 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 ต้านทานต่อยาปฏิชีวะชนิด 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 exilis compressa* ซึ่งเป็นหอยกาบน้ำจืดที่พบทั่วไปตามคูคลองในประเทศไทย ใช้ด้านหน้าตัว ฝังลงไปในโคลน ทรายตามพื้นท้องน้ำ เปลือกสีน้ำตาล ตัวยาวประมาณ 2.5-3.2 นิ้ว ลำตัวแบนทางด้านข้าง โดยหอยสองฝานี้ มีวงจรชีวิตระยะหนึ่งที่เป็นปรสิตในปลา โดยไข่ที่ปฏิสนธิแล้วเจริญเป็นตัวอ่อนโกลคิเดีย อยู่ที่บริเวณเหงือก แล้วจึงปล่อยออกมานอกตัว โกลคิเดียจะเกาะเข้ากับผิวหนังปลา 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 ส่วนมากจะมีการเสื่อมของเซลล์เหล่านี้ ในปลา channel catfish การติดเชื้อ *A. hydrophila* ทำให้เซลล์ตับเกิดการตาย [14] ซึ่งเหมือนกับอาการที่เกิดขึ้นกับปลาไหล *Anguilla anguilla* ที่ติดเชื้อ *A. hydrophila* [37] การติดเชื้อ *Pseudomonas* sp. [39] เนื้อเยื่อปลาคุกที่ฉีดเชื้อ *E. tarda* เข้าไป [6] ส่วนในปลากะพงขาวที่ติดเชื้อแบคทีเรียก็เกิดการเปลี่ยนแปลงทางพยาธิบริเวณตับเช่นเดียวกัน [8]

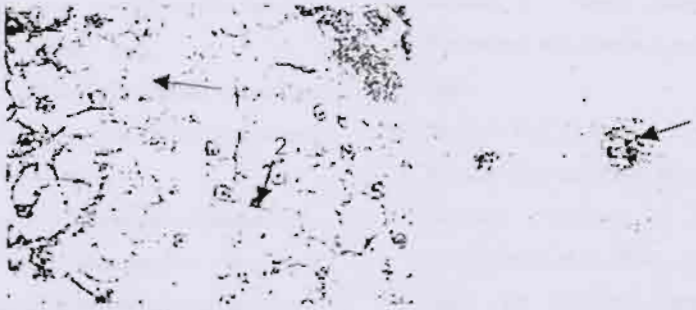
การเปลี่ยนแปลงของเนื้อเยื่อเหงือกพบว่าบริเวณที่มีปรสิตโกลคิเดียเกาะอยู่มีการเพิ่มจำนวนของเซลล์เยื่อบุผิวของ gill lamellae (hyperplasia) ทำให้เกิดการเชื่อมของซี่เหงือกทำให้บริเวณแลกเปลี่ยนแก๊สลดลง ถ้ามีปรสิตปริมาณมากอาจทำให้ลูกปลาตายได้เนื่องจากการขาดออกซิเจน

5. สรุปผลการทดลอง

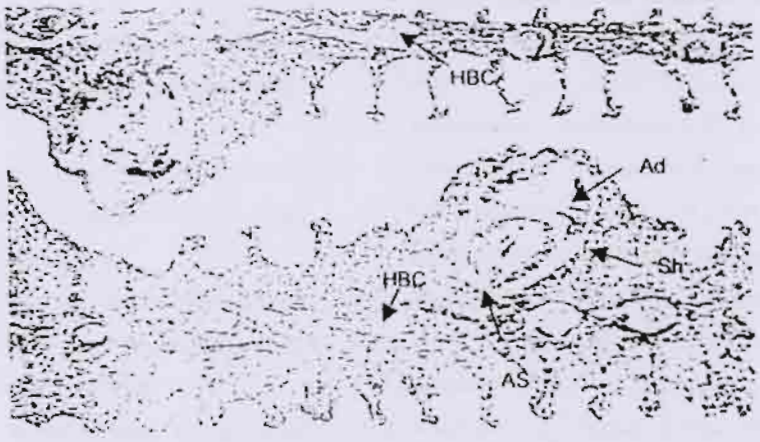
การตรวจหาปรสิตและแบคทีเรียในลูกปลาบึกที่เลี้ยงในบ่อดิน พบว่ามีแบคทีเรียอยู่ในตัวปลาซึ่งแบคทีเรียนั้นเป็นแบคทีเรียที่พบในน้ำอยู่แล้ว ส่วนปรสิตที่พบในลูกปลาบึกที่เลี้ยงในบ่อพบปรสิตเห็บระฆังในช่วง 6 เดือนแรก ซึ่งสามารถรักษาโดยการใช้ฟอร์มาลินความเข้มข้น 25 ppm และใน 6 เดือนหลังพบว่ามีตัวอ่อนของหอยระยะโกลคิเดีย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

6. กิตติกรรมประกาศ

งานวิจัยเรื่องนี้ได้รับทุนอุดหนุนวิจัยจากสำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย (สกว.) ขอขอบพระคุณ รศ.ประไพสิริ สิริกาญจน ที่ปรึกษาโครงการวิจัยที่กรุณาให้คำแนะนำที่เป็นประโยชน์หลาย ๆ อย่างในการทำวิจัย รศ.ดร.อุทัยวรรณ โกวิทวที ที่กรุณาช่วยอ่านผลเนื้อเยื่อปลาบึกที่มีปรสิตโกลคิเดีย ขอขอบคุณ คุณสุชีดา โสะปิน และคุณแมว คชาภิชาติ 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] ประโพสิริ สิริกาญจน, ความรู้เรื่องปรสิตของสัตว์น้ำ, สำนักพิมพ์ร้าวเขียว กรุงเทพฯ, 2546

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

[6] พิกุล จีรวณิชไพศาล, การก่อให้เกิดโรคของแบคทีเรีย *Edwardsiella tarda* ในปลาดุกด้าน, วิทยานิพนธ์ปริญญาโท,มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ, 2532

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

[8] วิรวรรณ ชินอักษร, โรคและปรสิตของปลากะพงขาว, วิทยานิพนธ์ปริญญาโท, มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ, 2535

[9] สิทธิ บุณยรัตผลิน และ จิราพร เกษรจันทร์, โรคปลาบึก ปี 2526 เอกสารวิชาการ ฉบับที่ 29, สถานีประมงน้ำจืดแห่งชาติ 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., Taschenbuch 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] Desjardins, 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. Snieskо (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 rately 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., Martt, 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] Wadstrom T. and Ljungh A. *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.

เอกสารแ

Kasetsart J. (Nat. Sci.) 39 : 57 - 67 (2005)

Bacterial and Fungal Infection in Mekong Giant Catfish (*Pangasianodon gigas* Chevey) Hatchery

Watchariya Purivirojkul[1], Nontawith Areechon[2], Ong-ard Lawhavinit[3] and Charnchai Purokkiate[4]

ABSTRACT

Bacterial and fungal isolation in Mekong giant catfish (*Pangasianodon gigas* Chevey) hatchery was conducted. Egg and fry were obtained from artificial spawning at Phayao Inland Fisheries Research and Development Center, Phayao province, Thailand during May 2004 to June 2004. Total numbers of 150 eggs and 90 fries of giant catfish were investigated and 100% were found to be infected with bacteria and fungi. Seven species of bacteria were isolated namely *Aeromonas hydrophila*, *Pseudomonas fluorescens*, *Plesiomonas shigelloides*, *Chromobacterium violaceum*, *Chryseomonas meningosepticum*, *Pasteurella haemolytica* and *Ochrobactrum anthropi*. Three fungal genera of *Saprolegnia* sp., *Aphanomyces* sp. and the vesicle producing fungi were isolated. These pathogens could come from water supply which had high number of bacteria and fungi at $2.9 \pm 1.8 \times 10^9$ cfu/ml and 10.2 ± 10.3 zoospores/ml, respectively. Live feed for fry including water flea and brine shrimp also contained high number of bacteria dominated by *A. hydrophila*. The results obtained from this study suggested that water supply used in hatchery could be the source of bacterial and fungal infection that caused low hatching rate of eggs and low survival rate of fry.

Key words: Mekong giant catfish, *Pangasianodon gigas*

INTRODUCTION

Mekong giant catfish *Pangasianodon gigas* is the biggest, scaleless freshwater fish in the world. The size was up to 3 m in length and weight was more than 300 kg when fully grown. It is a bottom feeder, living from algae and other aquatic plants. This giant catfish can only be found in the Mekong River in the region of Chiang Khong, Chiang rai province in Thailand during their spawning period (from the middle of April to the end of May).

The generic name is derived from Pangasius + an (Greek for without) +odon (Greek for tooth) in reference to the toothless state of the adult fish. This fish has the fastest growth rate of any fish in the world reaching 150-200 kg in six years (Rainboth, 1996).

The Mekong giant catfish is in danger of disappearing from Thailand because of the high demand from local market in which the selling price can be more than 500 baht/kg. The population of the Mekong giant catfish in the Mekong river has decreased rapidly because a lot of adult female

[1] Department of Zoology, Faculty of Science, Kasetsart University, Bangkok 10900, Thailand

[2] Department of Aquaculture, Faculty of Fisheries, Kasetsart University, Bangkok 10900, Thailand

[3] Department of Microbiology and Immunology, Faculty of Veterinary medicine, Kasetsart University, Bangkok 10900, Thailand

[4] Phayao Inland Fisheries Research and Development Center, Phayao 56000, Thailand

fish are caught in the spawning season. Moreover, the water level in the Mekong river has dropped to an all time low due to the dams built upstream. Little water is released from the dams during the dry season causing the river to run dry and may force the Mekong giant catfish to find other suitable spawning ground.

Although in 1983 Thailand succeeded in artificially breeding the Mekong giant catfish and could produce a lot of fry, the hatching rate and survival rate of fry were very low (in 2003, 120,000 fries hatched from egg but only 30,000 survived after 7 days). This paper reported the study of bacterial and fungal infection in eggs and fry of Mekong giant catfish, bacterial contamination in live feed and water supply in the hatchery.

MATERIALS AND METHODS

Mekong giant catfish egg sampling

Mekong giant catfish eggs used in the study were obtained from artificial breeding at Phayao Inland Fisheries Research and Development Center, Phayao province, Thailand. One hundred eggs were collected for parasite and bacteria isolation and 50 eggs for fungi study.

Fry of giant catfish sampling

Giant catfish fry used in the study were obtained from artificial spawning at Phayao Inland Fisheries Research and Development Center, Phayao province, Thailand. Sixty samples were collected for bacteria isolation and 30 samples for fungi study.

Water flea (*Moina macrocopa*) and brine shrimp (*Artemia*) sampling

Water flea and brine shrimp, feed for giant catfish fry used in the study. Forty samples were collected for bacteria isolation and 20 samples for fungi study.

Bacterial isolation

The surface of egg and the skin of fry were cleaned by 70% ethyl alcohol before grinding by homogenizer and streaked with an inoculating loop on Brain Heart Infusion Agar (BHI Agar) incubated at 30°C for 18-24 h. Colonies of bacteria were selected from the plate according to their phenotypic differences (color, size, density and shape) and purification on Nutrient Agar (NA).

Bacterial Identification

Phenotypical characteristics, Gram strain, oxidase production, oxidative/ fermentative utilization of glucose (OF medium), motility and growth on MacConky agar were determined for every selected isolate. Only those isolates confirmed as Gram negative were characterised by biochemical typing using API 20E kit (Biomérieux). Tests were performed according to the instructions of the manufacturer, incubated at 30°C for 24 h. Bacterial identification was performed by using the APILAB Plus identification software (Biom?rieux).

Isolation of fungi

The samples were washed 2 times before cultured on the Gy plus antibiotic medium (1% glucose, 0.25% yeast extract and 50 ug/ml of ampicillin and streptomycin). The cultured medium were incubated at 25 °C for 2 days and purified by cutting the marginal colony to put on the new medium.

Identification of fungi

The pure culture of fungi were used to study studied to the morphology of asexual zoospore reproduction in sterilized tap water. The genus of isolated fungi were indentified by the method belonging to Willoughby (1985).

Number of bacteria and fungi from rearing water and stock water

Water samples were collected from egg hatching water, fry rearing water and stock water (holding in 500 tons cement tanks obtained from

reservoir). Water samples (10 ml/pond) were taken from approximately 5 cm below the water surface in sterile glass bottles. A tenth ml of each sample were spreaded on NA agar and incubated at 30 °C for a day. The numbers of colony were counted and calculated for the total number of bacteria in cfu/ml. Another 0.1 ml of each sample were spreaded on Gy plus antibiotic medium and incubated at 25 °C for 2 days. The numbers of fungi colony were reported as unit of zoospores per ml.

Water qualities in Mekong giant catfish hatchery

Water analysis consisting of dissolved oxygen (mg/l), pH, temperature (C°), alkalinity (ppm as $CaCO_3$), hardness (ppm as $CaCO_3$), total ammonia nitrogen (ppm) and nitrite nitrogen (ppm) from water using for Mekong giant catfish egg hatching, fry nursing and stock water were conducted.

RESULTS AND DISCUSSION

Bacterial isolation

The identification of bacteria isolates from egg, fry of Mekong giant catfish, water flea, brine shrimp, egg hatching water, fry rearing water and stock water as displayed in Table 1, showed a high incidence of *Aeromonas hydrophila* in all samples, followed by *Plesiomonas shigelloides* and *Pasteurella haemolytica*.

The results from Table 1 showed that bacteria isolated from eggs and fry dominated by *A. hydrophila* were also found in water used in each step of the hatchery. Moreover, *A. hydrophila* could be found in water flea and brine shrimp which were feed of Mekong giant catfishes fry. Therefore, sources of pathogenic bacterias might come from water and food. Although, brine shrimps were cultured in salt water (5 ppt), *A. hydrophila* could be found in water where salinity was up to 10 ppt (Hazen *et al.*, 1978).

Table 1 Percentages of bacteria found in eggs, fry of Mekong giant catfish, water fleas, brine shrimps, egg hatching water, fry rearing water and stock water.

Bacterial species	Percentage of bacteria found						
	Egg	Fry	Water flea	Brine shrimp	Egg hatching water	Fry rearing water	Stock water
(Number of samples)	(100)	(60)	(40)	(40)	(12)	(12)	(12)
Aeromonas hydrophila	50	66	60	80	80	50	60
Pseudomonas fluorescens	25	0	0	0	0	0	0
Plesiomonas shigelloides	15	16	0	0	10	10	20
Chromobacterium violaceum	15	0	0	0	0	0	0
Chryseomonas meningosepticum	15	0	0	0	0	0	0
Pasteurella haemolytica	10	16	0	0	30	20	10
Ochrobactrum anthropi	0	20	0	0	0	0	0
Morganella morganii	0	0	100	0	0	0	0
Vibrio cholerae	0	0	0	30	0	0	0
Vibrio alginolyticus	0	0	0	50	0	0	0
Chryseomonas luteda	0	0	0	0	0	10	0
Not Identified	0	10	0	0	0	10	10

All of eleven species of bacteria namely *Aeromonas hydrophila*, *Pseudomonas fluorescens*, *Plesiomonas shigelloides*, *Chromobacterium violaceum*, *Chryseomonas meningosepticum*, *Pasteurella haemolytica*, *Ochrobactrum anthropi*, *Morganella morganii*, *Vibrio cholerae*, *Vibrio alginolyticus* and *Chryseomonas luteda* were found in water and soil (Rutala *et al.*,1982; Khardori and Fainstein, 1988; Bennish, 1994; Austin and Adum, 1996; Krovacek *et al.*, 2000; Reidl and Klose, 2002). When host (eggs, fishes, water fleas and brine shrimps) had a wound, these pathogens could attack on the host and distribute in host body by blood circulation system.

Some bacteria, found in this study, could be pathogenic in other animals or human such as *Pasteurella haemolytica* which was the principal pathogen in the bovine respiratory disease complex, a major disease of economic importance in the cattle industry. *Vibrio cholerae* infection in human normally starts with the oral ingestion of food or water contaminated with *V. cholerae*, but the infectious dose was determined to be fairly high ranging from 10^6 to 10^{11} colony-forming units (Bennish, 1994).

Fungal isolation from eggs and fry

Three fungal genera were found in this study consisting of *Saprolegnia* sp., *Aphanomyces* sp. and the vesicle producing fungi. These genera were reported to be found in aquaculture of many regions in the world. *Aphanomyces* sp. especially *Aphanomyces invadans* (also called *A. invaderis* and *A. piscicida*) (Lilley *et al.*, 1997) is a pathogenic water mold that causes mycotic granulomatosis in warm freshwater fish. *A. piscicida* invades the muscle by extending the hyphae (Miyazaki and Egusa, 1972). Chinabut *et al.* (1995) reported *A. invadans* infection in snakehead fish in Asia.

Saprolegniasis is a widespread mycotic infection in freshwater aquaculture caused by *Saprolegnia* sp. which is a waterborne fungi. This fungal infection on fish and fish eggs causes problem among cultured fish that causes low

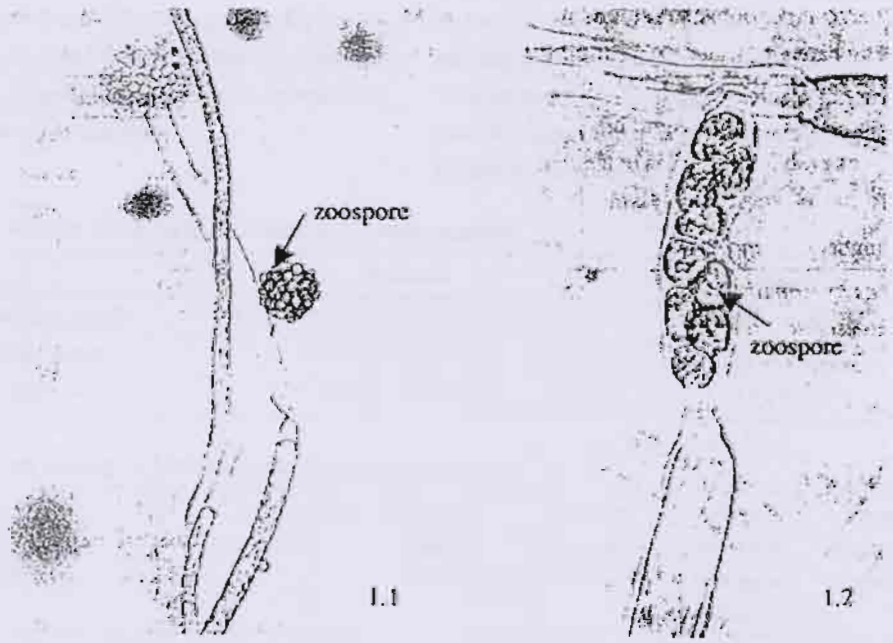


Figure 1 Asexual reproduction of fungi
1.1 *Aphanomyces* sp. 1.2 *Saprolegnia* sp. (40X).

hatching and survival rate (Ghittino, 1983). *Saprolegnia* sp. produces large numbers of infectious asexual zoospores at low temperatures (Bly *et al.*, 1992). Noble and Summerfelt (1996) reported *Saprolegnia* sp. infection in rainbow trout culture.

Fungi in water flea and brine shrimp

Twenty five percents of water flea infected by fungi were found in this experiment (5 samples from 20 samples). While fifteen percents of brine shrimp samples infected by fungi were found (3 samples from 20 samples).

A number of bacteria and fungi from water sample and stock water

Numbers of total fungi in hatching water, fry rearing water and stock water were 90.7 ± 60.8, 11.4 ± 14.6 and 12 ± 13 zoospores per ml, respectively. Numbers of total bacteria in hatching water, fry rearing water and stock water were 2.22 $\pm 0.89 \times 10^9$, $5.5 \pm 4.95 \times 10^9$ and $2.9 \pm 1.8 \times 10^9$ cfu per ml, respectively. (Table 2)

Bacteria found in hatching water, fry rearing water and stock water were *Aeromonas hydrophila*, *Plesiomonas shigelloides*, *Pasteurella haemolytica* and *Chryseomonas luteda*.

Fungi found in hatching water, fry rearing water and stock water were *Saprolegnia* sp., *Aphanomyces* sp. and the vesicle producing fungi.

All of bacteria and fungi species were similar to bacteria and fungi found in eggs and fry of Mekong giant catfish.

Water qualities in Mekong giant catfish hatchery

Water analysis consisting of dissolved oxygen, pH, temperature, alkalinity, hardness, total ammonia nitrogen and nitrite nitrogen of hatching water for giant catfishes egg, fry rearing water and stock water were reported in Table 3. All of water qualities were in normal ranges for aquaculture.

CONCLUSION

The most severe problem was associated with pathogenic *Aeromonas hydrophila* (amongst seven bacteria that were found) which was also found in water supply in hatchery system and in live feed. Although the disinfectant has been used as an effective fungicide, more awareness on safety and impact on the environment has been increased. To improve the hatchery activity of Mekong giant catfish, sanitation of water supply and live feed is highly recommended.

Table 2 A number of bacteria and fungi from water sample.

Source	Bacteria	Fungi
Egg hatching water	$2.22 \pm 0.89 \times 10^9$	90.7 ± 60.8
Fry rearing water	$5.5 \pm 4.95 \times 10^9$	11.4 ± 14.6
Stock water	$2.9 \pm 1.8 \times 10^9$	12 ± 13

Table 3 Water quality in Mekong giant catfish hatchery.

Water sample	Dissolved Oxygen (mg/l)	pH	Temperature (C°)	Alkalinity (ppm as $CaCO_3$)	Hardness (ppm as $CaCO_3$)	Total Ammonia Nitrogen (ppm)	Nitrite Nitrogen (ppm)
Egg	5.5 ± 0.1	7.65 ± 0.13	25.9 ± 0.26	40 ± 10	87.5 ± 2.5	0.14 ± 0.02	0.04 ± 0.02
Fry	5.2 ± 0.2	7.88 ± 0.03	25.13 ± 0.12	65 ± 5	90 ± 5	0.14 ± 0.02	0.008 ± 0.003
Stock	5.0 ± 0.53	7.75 ± 0.25	26.67 ± 0.76	76.67 ± 5.77	68.33 ± 17.56	0.13 ± 0.03	0.01

ACKNOWLEDGEMENTS

This research was supported by The Thailand Research Fund (TRF). We thank Miss Sutida Sopeen and Mr. Metha Katapichat, Fishery Biologist, Phayao Inland Fisheries Research and Development Center for their assistance.

LITERATURE CITED

Austin, B. and C. Adum. 1996. Fish pathogens, pp.198-243. *In* B. Austin, M. Altwegg, P.J. Gosling and S. Joseph (eds.). **The Genus *Aeromonas***. Wiley, Chichester

Bennish, M.L. 1994. Cholera : pathophysiology, clinical features and treatment, pp.229-255. *In* K.I. Wachsmuth, P.A. Blake and O. Olsik (eds.). ***Vibrio cholerae*and cholera : Molecular to global perspectives** American Society for Microbiology, Washington, DC.

Bly, J.E., L.A. Lawson, D. J. Dale, A.J. Szalai, R.M. Durborow and L.W. Clem. 1992. Winter saprolegniosis in channel catfish. **Dis. Aquat. Organ** 13 : 155-164.

Chinabut, S., R.J. Roberts, L.G. Willoughby and M. D. Pearson. 1995. Histopathology of snake heads, *Channa striatus* (Bloth), experimentally infected with specific *Aphanomyces* involved inepizootic ulcerative syndrome (EUS) with other similar fungi. **J. Fish. Dis.** 20:135-144.

Forneris, G., S. Bellardi, G.B. Palmegiano, M. Saraglia, B. Sicuro, L. Gasco and I. Zoccarato. 2003. The use of ozone in trout hatchery to reduce saprolegniasis incidence. **Aquaculture** 221 : 157-166.

Ghittino, P. 1983. **Tecnologia e patologia in acquacoltura: vol. II. Patologia.** Tipografia. Bono, Torino. 444 p. (in Italian)

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

Khardori, N. and V. Fainstein 1988. *Aeromonas* and *Plesiomonas* as etiological agents. **Ann. Rev. Microbiol.** 42 : 395-419.

Krovacek, K., L.M. Eriksson, C. González-Rey, J. Rosinsky and I. Ciznar. 2000. Isolation, biochemical and serological characterisation of *Plesiomonas shigelloides* from freshwater in Northern Europe. **Comp. Immunol. Microb.** 23 : 45-51.

Lilley, J.H., D. Hant, R.H. Richards, R.J. Roberts, L. Cerenius and K. Söderhäll. 1997. Pan-Asian spread of single fungal clone results in large scale fish-kills. **Vet. Rec.** 140 : 11-12.

Marking, L.L., J.J. Rach and T.M. Schreier. 1994. Evaluation of antifungal agents for fish culture. **Progr. Fish Cult.** 56 : 225-231.

Miyazaki, T. and S. Egusa. 1972. Study on mycotic granulomatosis in fresh water fish I. Mycotic granulomatosis prevalled in gold fish. **Fish Pathol.** 7 : 15-25. (in Japanese)

Noble, A.C. and S.T. Summerfelt. 1996. Diseases encountered in rainbow trout cultured in recirculating systems. **Ann. Review of Fish Dis.** 6 : 65-92.

Rainboth, W.J. 1996. **Fishes of the Cambodian Mekong.** FAO Species Identification Field Guide for Fishery Purposes. FAO, Rome, 265 pp. Origin and or Distribution: Endemic to the Mekong basin where it has become rare due to overexploitation. International trade banned (CITES I).

Rutala, W.A., F.A. Sarribbi, C.S. Finch, J.N. MacCormak and G.E. Steomlaris. 1982. Oyster-associated outbreak of diarrheal disease possibly caused by *Plesiomonas shigelloides*. **Lancet** I : 739.

Reidl, J. and K. E. Klose. 2002. *Vibrio cholerae* and cholera : out of the water and into the host. **FEMS Microbiol. Rev.** 26 : 125-139.

Willoughby, L.G. 1985. Rapid preliminary screening of Saprolegnia on fish. **J. Fish. Dis.** 8 : 473-476.

การติดเชื้อแบคทีเรียและเชื้อราในการเพาะและอนุบาลปลาบึก

Bacterial and Fungal Infection in Mekong Giant Catfish (Pangasianodon gigas Chevey) Hatchery

วัชริยา ภูริวิโรจน์กุล[1] นนทวิทย์ อารีย์ชน[2] องอาจ เลาหวินิจ[3] และชาญชัย ภูรักษ์เกียรติ[4]

Watchariya Purivirojkul[1], Nontawith Areechon[2], Ong-ard Lawhavinit[3] and Charnchai Purukkiate[4]

บทคัดย่อ

การศึกษาชนิดของแบคทีเรียและเชื้อราในไข่และลูกปลาบึกที่ได้จากการผสมเทียมระหว่างพ่อแม่พันธุ์ที่เลี้ยงในบ่อดินที่ศูนย์วิจัยและพัฒนาประมงน้ำจืดพะเยา จ.พะเยา ระหว่างเดือนพฤษภาคมถึงเดือนกรกฎาคม 2547 จากตัวอย่างไข่ 150 ฟอง และลูกปลาบึกจำนวน 90 ตัว พบว่าตัวอย่างทั้งหมดมีการติดเชื้อแบคทีเรียและเชื้อรา โดยพบแบคทีเรีย 7 ชนิด ได้แก่ *Aeromonas hydrophila*, *Pseudomonas fluorescens*, *Plesiomonas shigelloides*, *Chromobacterium violaceum*, *Chryseomonas meningosepticum*, *Pasteurella haemolytica* และ *Ochrobactrum anthropi* เชื้อรา 3 สกุล ได้แก่ *Saprolegnia sp.*, *Aphanomyces sp.* และเชื้อราในกลุ่มที่สร้าง vesicle การติดเชื้อน่าจะมีสาเหตุส่วนหนึ่งจากน้ำที่นำมาใช้ซึ่งพบว่ามีการปนเปื้อนของแบคทีเรียปริมาณ 2.9 + 1.8 x 10 9cfu/มล. และเชื้อรา 10.2 + 10.3 zoospores/มล. และพบว่าอาหารของลูกปลาบึก ได้แก่ ไรแดง และอาร์ทีเมียก็มีปริมาณแบคทีเรียสูงเช่นเดียวกันโดยเฉพาะ *A. hydrophila* ผลสรุปที่ได้จากการวิจัยครั้งนี้พบว่าน้ำและอาหารที่ใช้ในการเพาะและอนุบาลลูกปลาบึกมีปริมาณแบคทีเรียและเชื้อราในปริมาณที่สูงเป็นสาเหตุที่ทำให้อัตราฟักของไข่และอัตรารอดของลูกปลาต่ำ ดังนั้นหากสามารถควบคุมการปนเปื้อนของเชื้อแบคทีเรียและเชื้อราในน้ำและอาหารมีชีวิตที่ใช้ในขบวนการเพาะและอนุบาลลูกปลาบึกได้ ก็จะทำให้การเพาะขยายพันธุ์ปลาหายากชนิดนี้ประสพความสำเร็จยิ่งขึ้นต่อไป

ABSTRACT

Bacterial and fungal isolation from Mekong giant catfish (Pangasianodon gigas Chevey) hatchery was conducted. Egg and fry were obtained from artificial spawning at Phayao Inland Fisheries Research and Development Center, Phayao province, Thailand during May 2004 to June 2004. Total number of 150 eggs and 90 fries of giant catfish were investigated and 100% were found to be infected with bacteria and fungi. Seven species of bacteria were isolated including *Aeromonas hydrophila*, *Pseudomonas fluorescens*, *Plesiomonas shigelloides*, *Chromobacterium violaceum*,

[1]ภาควิชาสัตวาวิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ จตุจักร กทม. 10900

[1]Department of Zoology, Faculty of Science, Kasetsart University Jatujak, Bangkok THAILAND 10900

[2]ภาควิชาเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำ คณะประมง มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ จตุจักร กทม. 10900

[2]Department of Aquaculture, Faculty of Fisheries, Kasetsart University Jatujak, Bangkok THAILAND 10900

[3]ภาควิชาจุลชีววิทยาและวิทยาภูมิคุ้มกัน คณะสัตวแพทย์ศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ จตุจักร กทม. 10900

[3]Department of Microbiology and Immunology, Faculty of Veterinary medicine, Kasetsart University Jatujak, Bangkok 10900

[4]ศูนย์วิจัยและพัฒนาประมงน้ำจืดพะเยา จังหวัดพะเยา 56000

[4]Phayao Inland Fisheries Research and Development Center, Phayao province 56000

Chryseomonas meningosepticum, *Pasteurella haemolytica* and *Ochrobactrum anthropi*. Three genera of fungi were isolated including *Saprolegnia sp.*, *Aphanomyces sp.* and the vesicle producing fungi. These bacteria and fungi are water borne microorganism which can infect aquatic animals. These pathogens could come from water supply which had high number of bacteria and fungi at 2.9+1.8 x 10 9 cfu/ml and 10.2 + 10.3 zoospores/ml, respectively. Live feed for fry including water flea and brine shrimp also contained high number of bacteria which was dominated by *A. hydrophila*. The results obtained from this study suggested that water supply for giant catfish hatchery and feed could be the source of bacterial and fungal infection that caused low hatching rate of eggs and low survival rate of fry. Establishment of sanitary condition in the hatchery is highly recommended for the improvement of hatching and survival rate of this valuable species.

Key Words : bacteria, fungi, Mekong giant catfish, egg, fry

Email address : fsciwyp@ku.ac.th

INTRODUCTION

Mekong giant catfish *Pangasianodon gigas* is the biggest, scaleless freshwater fish in the world with size measuring up to 3 m in length and weighing more than 300 kg when fully grown. It is a bottom feeder, feeding on algae and other aquatic plants. This giant catfish can only be found in the Mekong River in the region of Chiang Khong, Chiang rai province in Thailand during their spawning period (from the middle of April to the end of May).

The generic name is derived from Pangasius + an (Greek for without) +odon (Greek for tooth) in reference to the toothless state of the adult fish. This fish has the fastest growth rate of any fish in the world reaching 150-200 kg in six years (Rainboth, 1996)

The Mekong giant catfish is in danger of disappearing from Thailand because of the high demand from local market in which the selling price can be more than 500 bath/kg. The population of the Mekong giant catfish in the Mekong river has been decreased rapidly because a lot of adult female fish were caught in spawning season. Moreover, the water level in the Mekong River has dropped to an all time low due to the dams that have been built upstream. Little water is released from the dams during the dry season causing the river to run dry and may force the Mekong giant catfish to find other suitable spawning ground.

Although, in 1983 the Department of Fisheries has been succeeded in artificially breeding the Mekong giant catfish and could produce a lot of fry but the hatching rate and survival rate of fry were very low (in 2003, 120,000 fries hatched from egg but only 30,000 survived after 7 days). This paper reported the study of bacterial and fungal infection in eggs and fry of Mekong giant catfish; bacterial contamination in live feed and water supply in the hatchery.

MATERIALS AND METHODS

Mekong giant catfish egg sampling

Mekong giant catfish eggs used in the study were obtained from artificial spawning at Phayao Inland Fisheries Research and Development Center, Phayao province, Thailand. One hundred eggs were collected for bacteria isolation and 50 eggs for fungi study.

Fry of giant catfish sampling

Giant catfish fry used in the study were obtained from artificial spawning at Phayao Inland Fisheries Research and Development Center, Phayao province, Thailand. Sixty samples were collected for bacteria isolation and 30 samples for fungi study.

Water flea (*Moina macrocopa*) and brine shrimp (*Artemia*) sampling

Water flea and brine shrimp, feed for giant catfish fry used in the study. Forty samples were collected for bacteria isolation and 20 samples for fungi study.

Bacterial isolation

The surface of eggs and the skin of fry were cleaned by 70% ethyl alcohol before grinding by homogenizer and streaked with an inoculating loop on Brain Heart Infusion Agar (BHI Agar) and incubated at 30° C for 18-24 h. Colonies of bacteria were selected from the plate according to their phenotypic differences (color, size, density and shape) and purification on Nutrient Agar (NA).

Bacterial Identification

Phenotypical characteristics, Gram strain, oxidase production, oxidative/ fermentative utilization of glucose (OF medium), motility and growth on MacConky agar were determined for every selected isolate. Only Gram negative were found and they were further characterized by biochemical typing using API 20E kit (Biomérieux). Tests were performed according to the instructions of the manufacturer, incubated at 30° C for 24 h. Bacterial identification was performed by using the APILAB Plus identification software (Biomérieux).

Isolation of fungi

The samples were washed 2 times before culture on the Gy plus antibiotic medium (1% glucose, 0.25% yeast extract and 50 ug/ml of ampicillin and streptomycin). The cultured medium were incubated at 25 °C for 2 days and purified by cutting the marginal colony to put on the new medium.

Identification of fungi

The pure culture of fungi were studied to the morphology of asexual zoospore reproduction in sterilized tap water. The genus of isolated fungi were identified by the method belong to Willoughby (1985)

Number of bacteria and fungi from rearing water and stock water

Water samples were collected from egg hatching water, fry rearing water and stock water (holding in 500 ton cement tanks obtained from Phayao reservior). Water samples (10 ml/pond) were taken from approximately 5 cm below the water surface in sterile glass bottles. A tenth ml of each sample were spreaded on NA agar and incubated at 30 °C for a day. The number of colony were counted and calculated for the total number of bacteria as cfu/ml. Another 0.1 ml of each sample were spreaded on Gy plus antibiotic medium and incubated at 25 °C for 2 days. The number of fungi colony were reported as unit of zoospores per ml.

Water qualities in Mekong giant catfish hatchery

Water analysis consisting of dissolved oxygen (mg/l), pH, temperature (C°), alkalinity (ppm as $CaCO_3$), hardness (ppm as $CaCO_3$), total ammonia nitrogen (ppm) and nitrite nitrogen (ppm) from water using for Mekong giant catfish egg hatching, fry nursing and stock water were conducted.

RESULTS AND DISCUSSIONS

Bacterial Isolation

The identification of bacteria isolated from egg, fry of Mekong giant catfish, water flea, brine shrimp, egg hatching water, fry rearing water and stock water as displayed in Table 1, showed a high incidence of *Aeromonas hydrophila* in all samples, followed by *Plesiomonas shigelloides* and *Pasteurella haemolytica*.

The results from Table 1 showed that bacteria isolated from eggs and fry dominated by *A. hydrophila* were also found in water used in each step of the hatchery. Moreover, *A. hydrophila* could be found in water flea and brine shrimp which were feed of Mekong giant catfish fry. So, sources of these pathogenic bacteria should be from water and live feed. Although, brine shrimp were cultured in salt water (5 ppt) but *A. hydrophila* could be found in water which salinity up to 10 ppt (Hazen *et al.*, 1978; Kaper *et al.*, 1979)

All of eleven species of bacteria including *Aeromonas hydrophila*, *Pseudomonas fluorescens*, *Plesiomonas shigelloides*, *Chromobacterium violaceum*, *Chryseomonas meningosepticum*, *Pasteurella haemolytica*, *Ochrobactrum anthropi*, *Morganella morganii*, *Vibrio cholerae*, *Vibrio alginolyticus* and *Chryseomonas luteda* were found in water and soil (Austin and Adum, 1996; Austin and Allen, 1982; Bennish, 1994; Durán and Menck, 2001; Jeppesen, 1995; Khardori and Fainstein, 1988; Krovacek *et al.*, 2000; de Mondino *et al.*, 1995; Reidl and Klose, 2002; Rutala *et al.*,1982). When host (eggs, fishes, water fleas and brine shrimps) had a wound, these pathogens could attach on the host and distribute in host body by blood circulation system

Some bacteria, found in this study, can be pathogenic in other animals or human such as *Pasteurella haemolytica* which is the principal pathogen in the bovine respiratory disease complex, a

major disease of economic importance in the cattle industry. *Vibrio cholerae* infection in human normally starts with the oral ingestion of food or water contaminated with *V. cholerae*. But the infectious dose was determined to be fairly high ranging from 10^6 to 10^{11} colony-forming units (Bennish, 1994)

Fungal isolation from eggs and fry

Three genera of fungi were found in this study consisting of *Saprolegnia* sp., *Aphanomyces* sp. and the vesicle producing fungi. These three genera were reported to be found in aquaculture of many regions in the world. *Aphanomyces* sp. especially *Aphanomyces invadans* (also called *A. invaderis* and *A. piscicida*) (Lilley *et al.*, 1997) is a pathogenic water mold that causes mycotic granulomatosis in warm freshwater fish. *A. piscicida* invades the muscle by extending the hyphae (Miyazaki and Egusa, 1972; Miyazaki and Egusa, 1973a; Miyazaki and Egusa, 1973b; Miyazaki and Egusa, 1973c). Chinabut *et al.* (1995) reported *A. invadans* infection in snakehead fish in Asia.

Table 1 Percent of bacterial found in eggs, fry of Mekong giant catfish, water fleas, brine shrimps, egg hatching water, fry rearing water and stock water

Bacterial species	Percent of bacterial found						
	Egg	Fry	Water flea	Brine shrimp	Egg hatching water	Fry rearing water	Stock water
(Number of samples)	(100)	(60)	(40)	(40)	(12)	(12)	(12)
Aeromonas hydrophila	50	66	60	80	80	50	60
Pseudomonas fluorescens	25	0	0	0	0	0	0
Plesiomonas shigelloides	15	16	0	0	10	10	20
Chromobacterium violaceum	15	0	0	0	0	0	0
Chryseomonas meningosepticum	15	0	0	0	0	0	0
Pasteurella haemolytica	10	16	0	0	30	20	10
Ochrobactrum anthropi	0	20	0	0	0	0	0
Morganella morganii	0	0	100	0	0	0	0
Vibrio cholerae	0	0	0	30	0	0	0
Vibrio alginolyticus	0	0	0	50	0	0	0
Chryseomonas luteda	0	0	0	0	0	10	0
Not-identified	0	10	0	0	0	10	10

Saprolegniasis is a widespread mycotic infection in freshwater aquaculture caused by *Saprolegnia* sp. which is a waterborne fungi. This fungi infection on fish and fish eggs causes problem among cultured fish that causes low hatching and survival rate (Ghittino, 1983; Bruno and Poppe, 1996). *Saprolegnia* sp. produces large numbers of infectious asexual zoospores at low temperatures (Bly *et al.*, 1992). Noble and Summerfelt (1996) reported *Saprolegnia* sp. infection in rainbow trout culture

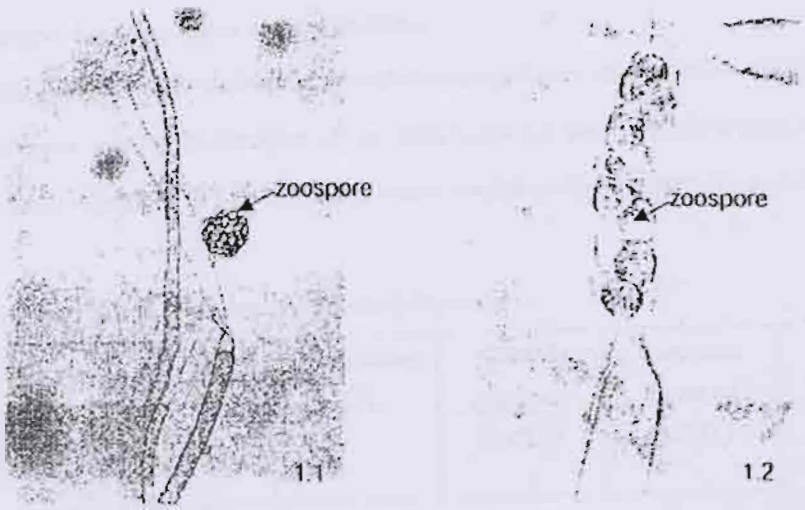


Figure 1 Asexual reproduction of fungi 1.1 *Aphanomyces* sp. 1.2 *Saprolegnia* sp. (40X)

Fungi in water flea and brine shrimp

Twenty five percents of water flea samples infected by fungi were found in this experiment (5 samples from 20 samples). Fifteen percents of brine shrimp samples infected by fungi were found in this experiment (3 samples from 20 samples).

Number of bacteria and fungi from water sample

Number of total fungi in hatching water, fry rearing water and stock water were 90.7 $\pm$ 60.8, 11.4 $\pm$ 14.6 and 12 $\pm$ 13 zoospores per ml, respectively. Number of total bacteria in hatching water, fry rearing water and stock water were 2.22 $\pm$ 0.89 x 10^9, 5.5 $\pm$ 4.95 x 10^9 and 2.9 $\pm$ 1.8 x 10^9 cfu per ml, respectively (Table 2).

Bacteria which was found in hatching water, fry rearing water and stock water were *Aeromonas hydrophila*, *Plesiomonas shigelloides*, *Pasteurella haemolytica* and *Chryseomonas luteda*.

Table 2 Number of bacteria and fungi from water sample

Source	Number of bacteria	Number of fungi
Egg hatching water	2.22 $\pm$ 0.89 x 10^9	90.7 $\pm$ 60.8
Fry rearing water	5.5 $\pm$ 4.95 x 10^9	11.4 $\pm$ 14.6
Stock water	2.9 $\pm$ 1.8 x 10^9	12 $\pm$ 13

Fungi which was found in hatching water, fry rearing water and stock water were *Saprolegnia* sp., *Aphanomyces* sp. and the vesicle producing fungi

All of bacteria and fungi species were similar with bacteria and fungi which were found in eggs and fry of Mekong giant catfish

Water qualities in Mekong giant catfish hatchery

Water analysis consisting of dissolved oxygen, pH, temperature, alkalinity, hardness, total ammonia nitrogen and nitrite nitrogen of hatching water for giant catfishes egg, fry rearing water and stock water were reported in Table 3. All of water qualities were in normal range for aquaculture.

Table 3 Water quality in Mekong giant catfish hatchery

Water Sample	Dissolved Oxygen (mg/l)	pH	Temperature (C°)	Alkalinity (ppm as $CaCO_3$)	Hardness (ppm as $CaCO_3$)	Total Ammonia Nitrogen (ppm)	Nitrite Nitrogen (ppm)
Egg	5.5 ± 0.1	7.65 ± 0.13	25.9 ± 0.26	40 ± 10	87.5 ± 2.5	0.14 ± 0.02	0.04 ± 0.02
Fry	5.2 ± 0.2	7.88 ± 0.03	25.13 ± 0.12	65 ± 5	90 ± 5	0.14 ± 0.02	0.008±0.003
Stock	5.0 ± 0.53	7.75 ± 0.25	26.67 ± 0.76	76.67 ± 5.77	68.33 ± 17.56	0.13 ± 0.03	0:01

CONCLUSION

This study clearly showed the heavy infection rate of both eggs and fry of Mekong giant catfish. The most severe problem should be associated with pathogenic *Aeromonas hydrophila* (amongst seven bacteria that were found) which was also found in water supply in hatchery system and in live feed. This could clearly influence the success of the whole hatchery activity of this valuable species.

To control these pathogens, formaldehyde is the most commonly used disinfectants for prophylaxis in the embryonic period and the first stage of larval development (Fomeris *et al.*, 2003). Although this chemical has been used as an effective fungicide, awareness on safety and impact on the environment has been increased. Marking *et al.* (1994) identified two promising fungicides consisting of hydrogen peroxide and sodium chloride. Noble and Summerfelt (1996) recommended artificial seawater salt 1-1.5% for 1 hr.

To improve the hatchery activity of Mekong giant catfish, sanitation of water supply and live feed is highly recommended.

ACKNOWLEDGEMENTS

This research was supported by The Thailand Research Fund (TRF). We thank Miss Sutida Sopeen and Mr. Metha Katapichat, Fishery Biologist, Phayao Inland Fisheries Research and Development Center for their assistance.

LITERATURE CITED

Austin, B. and C. Adum. 1996. Fish pathogens, pp.198-243. *In* B. Austin, M. Altwegg, P.J. Gosling and S. Joseph (Eds.). The Genus *Aeromonas*. Wiley, Chichester.

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

Bennish, M.L. 1994. Cholera:pathophysiology, clinical features and treatment, pp. 229-255. *In* K.I. Wachsmuth, P.A. Blake and O. Olsik (Eds.). *Vibrio cholerae* and cholera : Molecular to global perspectives. American Society for Microbiology, Washington, DC.

Bly, J.E., L.A. Lawson, D. J. Dale, A.J. Szalai, R.M. Durborow & L.W. Clem. 1992. Winter saprolegniosis in channel catfish. Dis. Aquat. Organ. 13:155-164.

Bruno, D.W. and T.T. Poppe. 1996. A colour atlas of salmonids diseases. Harcourt Bruce & Company, London. 194 p.

Chinabut, S., R.J. Roberts, L.G. Willoughby and M. D. Pearson. 1995. Histopathology of snake heads, *Channa striatus* (Bloth), experimentally infected with specific *Aphanomyces* involved in epizootic ulcerative syndrome (EUS) with other similar fungi. J. Fish. Dis. 20:135-144.

Durán N. and C.F.M. Menck. 2001. *Chromobacterium violaceum*. A review of pharmacological and industrial perspectives. Crit. Rev. microbiol. 27:201-222.

Forneris, G., S. Bellardi, G.B. Palmegiano, M. Saraglia, B. Sicuro, L. Gasco and I. Zoccarato. 2003. The use of ozone in trout hatchery to reduce saprolegniasis incidence. Aquaculture. 221:157-166.

Ghittino, P. 1983. Tecnologia e patologia in acquacoltura: vol. II. Patologia. Tipografia. Bono, Torino. 444 p. (in Italian)

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

Jeppesen, C. 1995. Media for *Aeromonas* spp., *Plesiomonas shigelloides* and *Pseudomonas* spp. from food and environment. Int. J. Food Microbio. 26:25-41.

Kaper, J.B., J. Seilder, H. Lockman and R.R.Cowell. 1979. A medium for the presumptive identification of *Aeromonas hydrophila* Enterobacteriaceae. Appl. Envir. Microbiol. 38:1023-1026.

Khardori, N. and V. Fainstein 1988. *Aeromonas* and *Plesiomonas* as etiological agents. Ann. Rev. Microbiol. 42:395-419.

Krovacek, K., L.M. Eriksson, C. González-Rey, J. Rosinsky and I. Ciznar. 2000. Isolation, Biochemical and serological characterisation of *Plesiomonas shigelloides* from freshwater in Northern Europe. Comp. Immunol. Microb. 23:45-51.

Lilley, J.H., D. Hant, R.H. Richards, R. J. Roberts, L. Cerenius and K. Soderhall. 1997. Pan-Asian Spread of single fungal clone results in large scale fish-kills. Vet. Rec. 140:11-12.

Marking, L.L., J.J. Rach and T.M. Schreier. 1994. Evaluation of antifungal agents for fish culture. Progr. Fish Cult. 56:225-231.

Miyazaki, T. and S. Egusa. 1972. Study on mycotic granulomatosis in fresh water fish I. Mycotic granulomatosis prevalled in gold fish. Fish Pathol. 7:15-25. (in Japanese)

Miyazaki, T. and S. Egusa. 1973a. Study on mycotic granulomatosis in fresh water fish II. Mycotic granulomatosis prevalled in ayu. Fish Pathol. 7:125-133. (in Japanese)

Miyazaki, T. and S. Egusa. 1973b. Study on mycotic granulomatosis in fresh water fish III. Mycotic granulomatosis in bluegill. Fish Pathol. 8:41-43. (in Japanese)

Miyazaki, T. and S. Egusa. 1973c. Study on mycotic granulomatosis in fresh water fish IV. Mycotic granulomatosis in some wild fishes. Fish Pathol. 8:44-47. (in Japanese)

de Mondino, SS., M.P. Nunes and I.D. Ricciardi. 1995. Occurrence of *Plesiomonas shigelloides* in water environments of Rio de Janeiro city. Mem Inst Oswaldo Cruz. 90:1-4.

Narayanan, S.K., T.G. Nagaraja, M.M. Chengappa and G.C. Stewart. 2002. Leukotoxins of gram-negative bacteria. Vet. Microbiol. 84:337–356.

Noble, A.C. and S.T. Summerfelt. 1996. Diseases encountered in rainbow trout cultured in recirculating systems. Ann. Rev. Fish Dis. 6:65-92.

Rainboth, W.J. 1996. Fishes of the Cambodian Mekong. FAO Species Identification Field Guide for Fishery Purposes. *In* FAO, Rome Origin and or Distribution: Endemic to the Mekong basin where it has become rare due to overexploitation. International trade banned (CITES I). 265 pp.

Rutala, W.A., F.A. Sarribbi, C.S. Finch, J.N. MacCormak and G.E. Steomlaris. 1982. Oyster-associated outbreak of diarrhea disease possibly caused by *Plesiomonas shigelloides*. Lancet. I:739.

Reidl, J. and K. E. Klose. 2002. *Vibrio cholerae* and cholera : out of the water and into the host. FEMS Microbiol. Rev. 26:125-139.

Willoughby, L.G. 1985. Rapid preliminary screening of Saprolegnia on fish. J. Fish. Dis. 8:473-476.

Bacteria of Mekong giant catfish (*Pangasianodon gigas* Chevey) fry - larva and their chemical control

W. Purivirojkul[1], N. Areechon[2] and M. Endo[3]

[1]Faculty of Fisheries, Kasetsart University, Bangkok, Thailand
[2]Faculty of Science, Kasetsart University, Bangkok , Thailand
[3]Tokyo University of Marine Science and Technology, Tokyo, Japan

Abstract

Bacterial isolation from Mekong giant catfish (*Pangasianodon gigas* Chevey) fry and larva was conducted. Fry and larva were obtained from artificial spawning at Phayao Inland Fisheries Research and Development Center, Phayao province, Thailand during July 2003 to June 2004. Total number of 90 fries and 60 fishes of giant catfish were investigated and 100% were found to be infected with bacteria. Eleven species of bacteria were isolated including *Aeromonas hydrophila*, *Plesiomonas shigelloides*, *Pasteurella* sp., *Ochrobactrum anthropi*, *Morganella morganii*, *Vibrio cholerae*, *Vibrio alginolyticus*, *Chryseomonas luteda*, *Serratia* sp., *Chromobacterium violaceum* and *Acinetobacter baumannii*. *A. hydrophila* was found in every samples and *P. shigelloides* was found in fry, larva and water except live feed. These bacteria are water borne microorganism which can infect aquatic animals. These pathogens could come from water supply which had high number of bacteria at $2.9 \pm 1.8 \times 10^{9}$cfu/ml. Live feed for fry including water flea and brine shrimp also contained high number of bacteria which was dominated by *A. hydrophila*. The results obtained from this study suggested that water supply for giant catfish hatchery and feed could be the source of bacterial that caused low survival rate of fry. Establishment of sanitary condition in the hatchery is highly recommended for the improvement of hatching and survival rate of this valuable species.

To control these bacteria, 4 bath treatment trials with Mekong giant catfish using formalin, hydrogen peroxide, povidone iodine and potassium permanganate were conducted. Povidone iodine and potassium permanganate were very effective removing all bacteria with MIC 3.91-7.81 ppm. Formalin and hydrogen peroxide were less effective than povidone iodine and potassium permanganate with MIC 31.25 and 15.63-31.25 ppm, respectively. For toxicity study, the hybrid of *P. gigas* was used instead of *P. gigas* because its fry is difficult to obtain. Acute toxicity of formalin, hydrogen peroxide, povidone iodine and potassium permanganate to the hybrid of *P. gigas* larva were tested by using static bioassay. The 24-hour LC_{50} of formalin, hydrogen peroxide, povidone iodine and potassium permanganate were 85, 44, 16.5, 12 ppm, respectively.

Based on the results of the trials, all four chemicals including formalin, hydrogen peroxide, povidone iodine and potassium permanganate were selected for the treatment to control all species of bacteria found in Mekong giant catfish culture because of inhibition concentration were lower than toxicity concentration by 2.69, 2.82, 2.11 and 1.54 times, respectively. Hydrogen peroxide was found to be the most effective one.

Keywords : bacteria, Mekong giant catfish, chemical control

Introduction

Mekong giant catfish *Pangasianodon gigas* is the biggest, scaleless freshwater fish in the world. Size measuring up to 3 m in length and weighing more than 300 kg when fully grown. It is a bottom feeder, living from algae and other aquatic plants. This giant catfish can only be found in the Mekong River in the region of Chiang Khong, Chiang rai province in Thailand during their spawn period (from the middle of April to the end of May). The generic name is derived from Pangasius + an (Greek for without) +odon (Greek for tooth); in reference to the toothless state of the adult fish. This fish has the fastest growth rate of any fish in the world reaching 150-200 kg in six years (Rainboth, 1996)

The Mekong giant catfish is in danger of disappearing from Thailand because of the high demand from local market in which the selling price can be more than 500 bath/kg. The population of the Mekong giant catfish in the Mekong river has been decreased rapidly because a lot of adult female fish were caught in spawning season. Moreover, the water level in the Mekong River has dropped to an all time low due to the dams that have been built upstream. Little water is released from the dams during the dry season causing the river to run dry and may force the Mekong giant catfish to find other suitable spawning period.

Although, in 1983 the Department of Fisheries has been succeeded in artificially breeding the Mekong giant catfish and could produce a lot of fry but the survival rate of fry was very low (in 2003, 120,000 fries hatched from egg but only 30,000 survived after 7 days). Bacteria was one cause of the mortality of giant catfish, so if bacteria in hatchery could be controlled from environment, live feed, and water, survival of this fish may increase. This paper reported the study of bacterial infection in fry and larva of Mekong giant catfish, bacterial contamination in live feed, water supply in the hatchery and their control by formalin, hydrogen peroxide, povidone iodine and potassium permanganate.

Materials and Methods

Experiment 1 Bacteria of Mekong giant catfish fry, larva, live feed and water

Fry and larva of Mekong giant catfish sampling

Mekong giant catfish fry and larva used in the study were obtained from artificial breeding at Phayao Inland Fisheries Research and Development Center, Phayao province, Thailand. Sixty samples of fry and sixty samples of larva were collected for bacteria isolation.

Water flea (*Moina macrocopa*) and brine shrimp (*Artemia*) sampling

Forty samples of water flea and brine shrimp, feed for giant catfish fry used in the study were collected for bacteria isolation.

Bacterial isolation

The skin of fry and larva were sterilized by 70% ethyl alcohol before grinding by homogenizer and streaked with an inoculating loop on Brain Heart Infusion Agar (BHI Agar) and incubated at 30^{0} C for 18-24 h. Selecting colonies growing on the plate according to their phenotypic differences (color, size, density and shape) and purification on NA agar was performed.

Bacterial Identification

Phenotypical characteristics, Gram strain, oxidase production, oxidative/fermentative utilization of glucose (OF medium), motility and growth on MacConky agar were determined for every selected isolate. Only those isolates confirmed as Gram negative were characterised by biochemical typing using API 20E kit (Biomérieux). Tests were performed according to the instructions of the manufacturer, incubated at 30° C for 24 h. Bacterial identification was performed by using the APILAB Plus identification software (Biomérieux).

Water qualities in Mekong giant catfish hatchery

Water analysis consisting of dissolved oxygen (mg/l), pH, temperature (C°), alkalinity (ppm as $CaCO_3$), hardness (ppm as $CaCO_3$), total ammonia nitrogen (ppm), nitrite nitrogen (ppm) and total bacterial plate count from water using for Mekong giant catfish fry nursing, stock water and larva pond were conducted.

Experiment 2 Efficiency and toxicity of formalin, hydrogen peroxide, povidone iodine and potassium permanganate

Minimum inhibitory concentration assay

This assay comprised a standard minimum inhibitory concentration (MIC) determination of test compound against the isolated bacteria from experiment 1. Four chemicals were diluted to give a starting concentration of 500 microgram/ml which was then diluted out across a 96-well microtitre plate in a two-fold serial dilution to give a final concentration range from 500 to 1 μg/ml. The bacteria were inoculated into each well at a density of 5×10^5 cfu/ml. The plate was incubated at 37 °C for 18 h and the MIC recorded as the lowest concentration at which no growth was observed. This was facilitated by the addition of 20 microlit of 3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyltetrazolium bromide. 10 mg/ml in MeOH to each well and incubation at 37 °C for 20 min where bacterial growth was indicated by a blue colouration.

Median lethal concentration (LC_{50}) of the hybrid of *P. gigas* larva

The hybrid of *P. gigas* is used for this experiment because of Mekong giant catfish could be artificially bred in low number and its high price.

Lethal effects of formalin, hydrogen peroxide, povidone iodine and potassium permanganate on the hybrid of *P. gigas* larva were studied using a 24-hour static bioassay. The LC_{50} were determined using the logarithmic method (Litchfield and Wilcoxon, 1949)

Results

Experiment 1 Bacteria of Mekong Giant Catfish fry, larva, live feed and water

The identification of bacterial isolates from fry and larva of Mekong giant catfish, water flea, brine shrimp, fry rearing water, larva pond water and stock water as displayed in Table 1, showed a high incidence of *Aeromonas hydrophila* in all samples, followed by *Plesiomonas shigelloides* and *Pasteurella* sp.

The results from Table 1 showed that bacteria isolated from fry and larva are commonly found in all water sources. Moreover, *A. hydrophila* could be found in all water sources, water flea and brine shrimp which were feed of Mekong giant catfishes. So, sources of pathogenic bacteria might come from water and food. Although, brine shrimps were cultured in salt water (5 ppt) but *A. hydrophila* could be found in water which salinity up to 10 ppt (Hazen *et al.*, 1978; Kaper *et al.*, 1979).

Table 1 Percent of bacteria found in eggs, fry of Mekong giant catfish, water fleas, brine shrimps, egg hatching water, fry rearing water and stock water

Bacterial species	Percent of bacterial found						
	Fry	Larva	Water flea	Brine shrimp	Fry rearing water	Larva pond water	Stock water
Aeromonas hydrophila	66	75	60	80	50	60	60
Plesiomonas shigelloides	16	28.33	0	0	10	10	20
Pasteurella sp.	16	3.33	0	0	20	0	10
Ochrobactrum anthropi	20	0	0	0	0	0	0
Morganella morganii	0	0	100	0	0	0	0
Vibrio cholerae	0	5	0	30	0	10	0
Vibrio alginolyticus	0	0	0	50	0	0	0
Chryseomonas luteda	0	0	0	0	10	0	0
Serratia sp.	0	1.67	0	0	0	0	0
Chromobacterium violaceum	0	8.33	0	0	0	0	0
Acinetobacter baumannii	0	5	0	0	0	0	0
Not-Identified	10	0	0	0	10	10	10

All species of bacteria which found in Mekong giant catfish, live feed and water could be found as contaminant in fish and water as description:

Aeromonas hydrophila is a facultative anaerobic, gram-negative rod size 1.0-4.4 μm indigenous to the aquatic environment. General characteristics of *A. hydrophila* include : motility by a single polar flagellum; metabolism of glucose by both fermentative and respiratory pathways. Positive catalase and oxidase tests. (Jeppesen, 1995). They are found in freshwater, chlorinated water, polluted water, brackish water, estuarine water, sewage and fish pond (Snieszko and Axeleod, 1971; Geldreich, 1973; Snieszko, 1974; Hazen *et al.*, 1978; Kaper *et al.*, 1979; Seilder *et al.*, 1980). They are associated with a wide variety of diseases in warm and cold blooded vertebrates including frogs, fish, reptiles, snakes, birds and rarely in humans. They are capable of causing gastroenteritis and wound infections in humans, especially those individuals with liver disease. These microorganisms are also considered important fish pathogen (Austin and Adams, 1996) such as Golden shiners (*Notemigonus crysoleucas*) *Cyprinus carpio* (Snieszko *et al.*, 1989), red sore disease in pike (*Esoc lucius*) (Reed and Toner, 1941) red mouth disease in rainbow trout (*Salmo gaidneri*) (Wagner and Perkins, 1957) red pest disease in *Fluta alba* (Ghittino, 1972)

Plesiomonas shigelloides is gram negative rod, size 0.8-1.0 x 3.0 μm, motile, oxidase and catalase positive facultatively anaerobic having both a respiratory and a facultative type of metabolism. The primary reservoirs of *P. shigelloides* are fresh water and estuarine water in temperate and tropical climates from freshwater in Northern Europe (Krovacek *et al.*, 2000). They can be isolated from bird, fish, sea food (Wadstrom and Ljungh, 1991) American catfish, eel, gourami, rainbow trout and sturgeon (Buller, 2004).

***Pasteurella* sp.** is a gram-negative, non-motile, facultatively anaerobic coccobacilli. Size 0.4 x 1.4 μm. This bacteria is the causative agent of fish pasteurellosis, a serious bacterial disease affecting different economically important marine fish species such as yellowtail, gilthead seabream, striped jack, and sea bass (Thune *et al.*, 1993; Magariños *et al.*, 1996a).

Ochrobactrum anthropi is an oxidase-producing gram-negative bacillus preferring aqueous environments. It is an opportunist of low pathogenicity with a wide and unpredictable antibiotic resistance (Deliere *et al.*, 2000).

Morganella morganii is a gram-negative rod commonly found in the environment and in the intestinal tracts of humans, mammals, and reptiles as normal flora.

Vibrio alginolyticus is a facultatively anaerobic, gram-negative bacillus with a single polar flagellum for mobility. *V. alginolyticus* is implicated in severe vibriosis of marine aquaculture systems although many strains are avirulent and could be used as probiotic strains. They can be isolated from Australian native and introduced fish, molluscs (larva and juvenile), red abalone, south african abalone, scallop larva, eel, rainbow trout, sea bream, turbot, turtles, sea horse and shrimp (Buller, 2004).

Chryseomonas luteola is a motile aerobic gram-negative rod with yellow-orange pigment. Yellow and smooth colonies are obtained after 48 h of incubation on heart infusion agar supplemented with 5% horse blood. *C. luteola* can be distinguished from most other motile yellow-pigmented nonfermenters by a negative oxidase reaction and from the enterobacteria by its strict aerobic growth. The normal habitat of *C. luteola* is unclear, but it is frequently found in water, soil and other damp environments (Silver *et al.*, 1985; Freney *et al.*, 1988).

Vibrio cholerae is a facultative anaerobic, motile, gram negative curved rod that belongs to the family Vibrionaceae. Size 1.5 x 3.0 μm (Reidl and Klose, 2002). *V. cholerae* normally lives in aquatic environments, Ayu, goldfish, shellfish, attached to particular types of algae and plankton (Buller, 2004). People acquire the infection by ingesting water, seafood, or other foods contaminated with the bacteria. In human volunteer studies, the infectious dose was determined to be fairly high, and varied depending on the inocula conditions ranging from 10^6-10^{11} CFU/ml (Bennish, 1994).

***Serratia* sp.** is an aerobic gram-negative bacillus that grows readily on most microbiological media producing a white colony. It is capable of growth between 4°C and 40°C. It produces a pungent musty-potato-like odor (2-methoxy-3-isopropyl-pyrazine). They can be isolated from water, soil, Atlantic salmon, turbot, bass, trout, food and plants (Buller, 2004).

Chromobacterium violaceum is a gram-negative rod, size 0.6-1.2 x 1.5-6 μm and is isolated from soil and water in tropical and subtropical regions (Durán and Menck, 2001). It is commonly found in water and soil in tropical climate such as southeast Asia, south America and the southeast United States (Desjaridins *et al.*, 1999; Murray, 1999).

Acinetobacter baumannii is an aerobic gram-negative bacillus widely distributed in nature (soil, sewage, and water) and in the hospital environment. It had a bacilli shape size 1.0-1.5 x 1.5-2.5 μm in logarithmic phase and coccus in stationary phase. It is able to survive on both moist and dry surfaces and may be part of the normal skin flora of humans. It causes hospital-acquired respiratory, urinary tract, wound infections, abscesses, and meningitis in debilitated humans. The natural habitats of the genus of this bacteria are soil and water (Vinogradov *et al.*, 2003).

Number of bacteria from water sample and stock water

Number of total bacteria in fry rearing water, larva pond water and stock water were $5.5 \pm 4.95 \times 10^9$, $4.65 \pm 8.69 \times 10^9$ and $2.9 \pm 1.8 \times 10^9$ cfu per ml, respectively. Bacteria which was found in fry rearing water, larva pond water and stock water were *Aeromonas hydrophila*, *Plesiomonas shigelloides*, *Pasteurella* sp., *Vibrio cholerae* and *Chryseomonas luteda*.

All of bacteria species were similar with bacteria which were found in fry and larva of Mekong giant catfish.

Water qualities in Mekong giant catfish hatchery

Water analysis consisting of dissolved oxygen, pH, temperature, alkalinity, hardness, total ammonia nitrogen and nitrite nitrogen of fry rearing water, larva pond water and stock water were reported in Table 3. All of water qualities were in normal range for aquaculture.

Table 3 Water quality in Mekong giant catfish culture

Water Sample	Dissolved Oxygen (mg/l)	pH	Temperature (C°)	Alkalinity (ppm as $CaCO_3$)	Hardness (ppm as $CaCO_3$)	Total Ammonia Nitrogen (ppm)	Nitrite Nitrogen (ppm)
Fry	5.2 ± 0.2	7.88 ± 0.03	25.13 ± 0.12	65 ± 5	90 ± 5	0.14 ± 0.02	0.008±0.003
Larva	5.3 ± 0.21	7.45 ± 0.34	26.46 ± 0.69	41.67 ± 2.46	51.67 ± 2.46	0.18 ± 0.07	0.018 ± 0.004
Stock	5.0 ± 0.53	7.75 ± 0.25	26.67 ± 0.76	76.67 ± 5.77	68.33 ± 17.56	0.13 ± 0.03	0.01

Experiment 2 Efficiency and toxicity of formalin, hydrogen peroxide, povidone iodine and potassium permanganate

Minimum inhibitory concentration assay

From the results, formalin, hydrogen peroxide, povidone iodine and potassium permanganate were effective removing all bacteria with MIC 31.25, 15.63-31.25, 3.91-7.81 and 3.91-7.81 ppm, respectively (Table 4).

Table 4 Minimum inhibitory concentration of formalin, hydrogen peroxide, povidone iodine and potassium permanganate to bacteria in Mekong giant catfish culture

Bacteria	Minimum inhibitory concentration (MIC) (ppm)			
	Formalin	Hydrogen peroxide	Povidone iodine	Potassium permanganate
Aeromonas hydrophila	31.25	31.25	7.81	3.91
Plesiomonas shigelloides	31.25	15.63	7.81	7.81
Pasteurella sp.	31.25	15.63	3.91	3.91
Ochrobactrum anthropi	31.25	15.63	7.81	7.81
Morganella morganii	31.25	15.63	3.91	7.81
Vibrio cholerae	31.25	31.25	7.81	3.91
Vibrio alginolyticus	31.25	15.63	3.91	3.91
Chryseomonas luteda	31.25	15.63	3.91	7.81
Serratia sp.	31.25	15.63	7.81	7.81
Chromobacterium violaceum	31.25	15.63	7.81	7.81
Acinetobacter baumannii	31.25	15.63	3.91	7.81

Median lethal concentration (LC_{50}) of the hybrid of *P. gigas* larva

Acute toxicity of formalin, hydrogen peroxide, povidone iodine and potassium permanganate to the hybrid of *P. gigas* larva were tested by using static bioassay. The 24-hours LC_{50} of formalin, hydrogen peroxide, povidone iodine and potassium permanganate were 85, 44, 16.5, 12 ppm, respectively (Table 5).

Table 5 Median lethal concentration (LC_{50}) and slope function of the hybrid of *P. gigas* larva to formalin, hydrogen peroxide, povidone iodine and potassium permanganate

Chemical	LC_{50} (ppm)	Slope function
Formalin	85 (76.03-95.03)	1.37 (1.28-1.47)
Hydrogen peroxide	44 (35.82-54.05)	1.78 (1.47-2.15)
Povidone iodine	16.5 (12.72-20.8)	1.43 (1.33-1.54)
Potassium permanganate	12 (9.58-14.89)	1.64 (1.43-1.88)

The results from Table 6 indicated that formalin, hydrogen peroxide and povidone iodine were recommended for use to control bacteria in Mekong giant catfish culture because the toxicity were higher than inhibition concentration 1.54-2.82 times.

Table 6 MIC of formalin, hydrogen peroxide, povidone iodine and potassium permanganate and LC_{50} of the hybrid of *P. gigas* larva to these chemicals

Chemical	MIC (ppm)	LC_{50} (ppm)	LC_{50} / MIC
Formalin	31.25	85	2.69
Hydrogen peroxide	15.63	44	2.82
Povidone iodine	7.81	16.5	2.11
Potassium permanganate	7.81	12	1.54

Discussions

In this paper we focus only bacterial diseases and chemical for control them although in fry and larva, we also found fungi and parasitic infection. *Saprolenia* sp., *Aphanomyces* sp. and the vesicle producing fungi were the fungi found in fry (Purivirojkul *et al.*, 2005). *Trichodina* sp.1, *Trichodina* sp.2 and glochidia stage of *Pilsbryoconcha exillis compressa* were the parasites found in larva (Purivirojkul *et al.*, 2004).

All of eleven species of bacteria which found in Mekong Giant Catfish fry, larva, live feed and water including *Aeromonas hydrophila*, *Plesiomonas shigelloides*, *Pasteurella* sp., *Ochrobactrum anthropi*, *Morganella morganii*, *Vibrio cholerae*, *Vibrio alginolyticus*, *Chryseomonas luteda*, *Serratia sp.*, *Chromobacterium violaceum* and *Acinetobacter baumannii* were found in water and soil (Austin and Adum, 1996; Austin and Allen, 1982; Bennish, 1994; Durán and Menck, 2001; Jeppesen, 1995; Khardori and Fainstein, 1988; Krovacek *et al.*, 2000; de Mondino *et al.*, 1995; Reidl and Klose, 2002; Rutala *et al.*,1982). When host (fishes, water fleas and brine shrimps) had a wound or some stress, these pathogens could attach on the host and distribute in host body by blood circulation system. Supply water can be a major source of the microbes associated with an aquaculture facility (Douillet and Pickering, 1999). In the present study, some of the bacterial isolates found in the live feed and water were not detected in the fish.

Some bacteria were found in this study can be pathogenic in other animals or human such as *Pasteurella* sp. which is the principal pathogen in the bovine respiratory disease complex, a major disease of economic importance in the cattle industry. *V. cholerae* infection in human normally starts with the oral ingestion of

food or water contaminated with *V. cholerae*. But the infectious dose was determined to be fairly high ranging from 10^6 to 10^{11} colony-forming units (Bennish, 1994).

For control bacteria, formalin, hydrogen peroxide, povidone iodine and potassium permanganate were used in the experiment. The results indicated that all 4 chemicals were safe to use for control bacteria from Mekong giant catfish. Although formalin is the most commonly used disinfectants for prophylaxis in the embryonic period and the first stage of larval development (Forneris *et al.*, 2003), but formalin is toxic to aquatic life at low concentrations, with 96 hr LC_{50} values ranging from 1 to 1000 ppm depending on species (Katz, 1989). Hydrogen peroxide in a treatment regime similar to that which is available for formalin but it does not deplete oxygen in the rearing tanks (Montgomery-Brock, 2004).

Conclusion

This study clearly showed the heavy infection rate of fry of Mekong giant catfish. The most severe problem should be associated with pathogenic *Aeromonas hydrophila* (amongst seven bacteria that were found) which was also found in water supply in hatchery system and in live feed. This could clearly influence the success of the whole hatchery activity of this valuable species. To improve the hatchery activity of Mekong giant catfish, sanitation of water supply and live feed is highly recommended.

To control these pathogens, formalin, hydrogen peroxide, povidone iodine and potassium permanganate may be used at a treatment level of 31.25, 15.63, 3.91 and 3.91 ppm, respectively for 24 hours static bath.

Acknowledgements

This research was supported by The Thailand Research Fund (TRF). We would like to thank Mr.Charnchai Purukkiate Director of Phayao Inland Fisheries Research and Development Center, Miss Sutida Sopeen and Mr. Metha Katapichat, Fishery Biologist, Phayao Inland Fisheries Research and Development Center for their assistance.

References

Austin, B. and C. Adum. 1996. Fish pathogens. *In* Austin, B., M. Altwegg, P.J. Gosling and S. Joseph (Eds.), The Genus *Aeromonas*. Wiley, Chichester, pp.198-243.

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

Bennish, M.L. 1994. Cholera : pathophysiology, clinical features and treatment. *In* : *Vibrio cholerae* and cholera : Molecular to global perspectives (K.I. Wachsmuth, P.A. Blake and O. Olsik, Eds.), pp. 229-255. American Society for Microbiology, Washington, DC.

Buller, N.B. 2004. Bacteria from fish and other aquatic animals. A practical identification manual. CABI publishing, Massachusetts.

Deliere, E., H. Vu-Thien, V. Levy, S. Barquins, L. Schlegel, A. Bouvet. 2000. Epidemiological investigation of *Ochrobactrum anthropi* strains isolated from a haematology unit. J. Hosp. Infect. 44(3): 173-8.

Desjaridins, M., C. Fenlon and D. Madison. 1999. Non-chromogenic

Chromobacterium violaceum bacteremia. Clin. Microbiol. Newsl. 21: 14-16.

Durán N. and C.F.M. Menck. 2001. *Chromobacterium violaceum*. A review of Pharmacological and industrial perspectives. Critical reviews in microbiology. 27 : 201-222.

Freney, J., W. Hansen, J. Etienne, F. Vandenesch and J. Fleurette. 1988. Postoperative infant septicemia caused by *Pseudomonas luteola* (CDC group Ve-1) and *Pseudomonas oryzihabitans* (CDC group Ve-2). J. Clin. Microbiol. 26:1241-1243.

Ghittino, P. 1983. Tecnologia e patologia in acquacoltura: vol. II. Patologia. Tipografia. Bono, Torino. 444 pp. (in Italian)

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

Jeppesen, C. 1995. Media for *Aeromonas* spp., *Plesiomonas shigelloides* and *Pseudomonas* spp. from food and environment. International Journal of Food Microbiology. 26 : 25-41.

Kaper, J.B., J. Seilder, H. Lockman and R.R.Cowell. 1979. A medium for the presumptive identification of *Aeromonas hydrophila* Enterobacteriaceae. Appl. Envir. Microbiol. 38 : 1023-1026.

Katz, 1989. Environmental impact assessment for the use of formalin-F in the control of external protozoa on penaeid shrimp. Unpublished report to US FDA, August 1989, 12 p.

Khardori, N. and V. Fainstein 1988. *Aeromonas* and *Plesiomonas* as etiological agents. Ann. Rev. Microbiol. 42 : 395-419.

Krovacek, K., L.M. Eriksson, C. González-Rey, J. Rosinsky and I. Ciznar. 2000. Isolation, Biochemical and serological characterisation of *Plesiomonas shigelloides* from freshwater in Northern Europe. Comparative Immunology, Microbiology & Infectious Diseases. 23 : 45-51.

Magariños B, Toranzo AE, Romalde JL (1996a) Phenotypic and pathobiological characteristics of *Pasteurella piscicida*. Annu Rev Fish Dis 6:41–46

Mondino, S.S., M.P. Nunes and I.D. Ricciardi. 1995. Occurrence of *Plesiomonas shigelloides* in water environments of Rio de Janeiro city. Mem Inst Oswaldo Cruz. 90 : 1-4.

Montgomery-Brock, D., R.P. Weidenbach, E.P. Weidenbach, C.J. Knickerbocker, G. McNaulty, and J.A. Koch. 2004. Testing the efficacy of a long-term/ low-dose hydrogen peroxide treatment on commonly observed ectoparasites of commercially raised freshwater fish in Hawaii. CTSA Regional Notes 15(3):4–6.

Purivirojkul, W., N. Areechon and C. Purukkiate. 2004. Parasites and bacteria of giant catfishes (*Pangasianodon gigas* Chevey) larva. Thai science and technology journal 12: 1-11. (in Thai)

Purivirojkul, W., N. Areechon, O. Lawhavinit and C. Purukkiate. 2005. Bacterial and Fungal Infection in Mekong giant catfish (*Pangasianodon gigas* Chevey) hatchery, pp. 50-58. The proceedings of 43rd Kasetsart University Annual Conference. 1-4 February 2005.

Rainboth, W.J. 1996. Fishes of the Cambodian Mekong. FAO Species Identification Field Guide for Fishery Purposes. FAO, Rome, 265 pp. Origin and or Distribution: Endemic to the Mekong basin where it has become rare due to overexploitation. International trade banned (CITES I).

Rutala, W.A., F.A. Sarribbi, C.S. Finch, J.N. MacCormak and G.E. Steomlaris. 1982. Oyster-associated outbreak of diarrheal disease possibly caused by *Plesiomonas shigelloides*. Lancet. I : 739.

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

Silver, M.R., T.P. Felegie and M.I. Sorkin. 1985. Unusual bacterium, group Ve-2, causing peritonitis in a patient on continuous ambulatory peritoneal dialysis. J. Clin. Microbiol. 21:838-839.

Thune R.L., Stanley LA, Cooper RK (1993) Pathogenesis of Gram-negative bacterial infections in warmwater fish. Annu Rev Fish Dis 3:37–38