

بررسی اثر استرس دمایی در بروز علائم ناشی از باکتری آیروموناس هیدروفیلا در ماهی *Capoeta damascina* در شرایط آزمایشگاهی

لاله یزدانپناه گوهرریزی^{*۱}

The Study of thermal stressor effect on confession signs of *Aeromonas hydrophila* on *Capoeta damascina* in invitro condition.

Yazdanpanah Goharrizy, L.¹

1- Agriculture and natural recourses research center
in of kerman-Iran

*l_yazdanpanah@yahoo.com

Abstract

Our reasearcher harvested some of *Capoeta damascina* fish that they are local fish of province kerman , from Baft rivers in 1382-83 and put them in variety of temperature (below 10- 10 to 20- 20 to 30- 30 and above 30°C) in some aquvariums . After days, some confession signs on fish saw such as hemorrhagic in the surface of fin and through fin-corrosion fins- unusuall swimming scites andReasult of this research was showing 80% of fish which was in 20-30°C and upper, became sick and bacteria *Aeromonas hydrophila* was isolated from kindy and fins, fish which was in 10-20°C, 40% was polluting, but 1% fish were in below 10°C was involved.

Key words: Temperature stress – *Aeromonas hydrophila* – *Capoeta damascina*

حرارتی زیر ۱۰ قرار داشتند حدوداً ۱٪ دچار آلودگی شدند. از آکواریومی که در شرایط نرمال ذکر شده قرار داشت باکتری آیروموناس ایزوله نگردید. ماهیان جوانتر و با وزن کمتر بیشتر مبتلا شده و حساس تر بودند.

چکیده

طی تحقیقات انجام شده در سالهای ۸۳-۱۳۸۲ تعدادی ماهی *Capoeta damascina* را که از ماهیان بومی استان کرمان می باشد از رودخانه بافت صید و داخل چند آکواریوم با تراکم یکسان در آزمایشگاه قرار گرفت. آکواریومها را به ترتیب در رنجهای حرارتی زیر ۱۰، ۱۰ تا ۲۰، ۲۰ تا ۳۰ و بالاتر از ۳۰ درجه سانتی گراد تنظیم و ماهیان به صورت تصادفی داخل آب قرار داده شد. (یکی از آکواریومها در شرایط مناسب دمایی، تراکم ۱۵ قطعه و اکسیژن مناسب قرار گرفت). پس از گذشت ۸-۵ روز در تعدادی از ماهیان نشانههایی بصورت خونریزیهای وسیع نامنظم در سطح بدن و بین بالهها، خوردگی بالهها، حرکات غیر عادی، آب آوردگی شکم (ascites) مشاهده گردید. در کالبد گشایی اعضای داخلی نیز تجمع خون و مناطق خونریزی در سطح صفاق دیده شد. نتایج حاصله نشان داد که ۸۰٪ ماهیانی که در درجه حرارت استرس ۲۰-۳۰ درجه سانتی گراد و بالاتر نگهداری شدند بصورت حاد بیمار و از بافت کلیه، باله های آنها باکتری آیروموناس هیدروفیلا بصورت خالص جدا سازی گردید، درصد ابتلا در بین ماهیانی که به این باکتری آلوده شدند به ۱۰۰٪ نیز رسید. در این حالت عامل بیماریزا از بافت و دستگاه گوارش تمام ماهیان جدا سازی گردید. ماهیان موجود در دامنه حرارتی ۱۰ تا ۲۰ درجه سانتی گراد حدود ۴۰٪ آلوده شدند، اما ماهیانی که در دامنه

۱- مرکز تحقیقات کشاورزی و منابع طبیعی بخش تحقیقات شیلات

کرمان، کرمان- ایران

*- نویسنده مسؤل: l_yazdanpanah@yahoo.com

واژگان کلیدی: استرس دمایی، آیروموناس هیدروفیلا،

Capoeta damascina

مقدمه

می‌رساند. محل جایگزینی طبیعی‌اش معمولاً در آبهای شیرین بویژه در آبهایی که حاوی مقدار زیادی مواد آلی نظیر فاضلاب هستند می‌باشد (۳). ولی مطالعات جدید نشان می‌دهند که باکتری *آیروموناس هیدروفیلا* می‌تواند جزئی از فلور میکروبی لوله گوارش ماهیان محسوب شود.

محققین مختلف بیماری ناشی از *آیروموناس*‌های متحرک را تحت عناوین بیماریهای *آیروموناس هیدروفیلا*، گند خونی باکتریایی خونریزی دهنده، آب آوردگی شکم کپور ماهیان (استسقاء عفونی کپور ماهیان) و گند خونی *آیروموناس* توصیف کرده‌اند. ماهیان حساس به *آیروموناد*‌های متحرک محدود به آبهای شیرین می‌باشند که شامل ماهیان گرمابی و سرد آبی هستند. ماهیان گرمابی بصورت وسیعی دچار همه گیریهای *آیروموناسی* می‌شوند (۱). بیماری ناشی از *آیروموناس* در ایران نیز شایع می‌باشد. جنس *آیروموناس* دارای دو گونه به نام *آیروموناس هیدروفیلا* و *آیروموناس پونکتاتا* می‌باشد. این دو گونه باکتری کاملاً شبیه یکدیگرند. این موجودات گرچه بیماریزای اجباری نیستند ولی در بسیاری از ماهیان آب شیرین عامل اولیه بیماریزایی هستند. بسیاری از باکتریهای غیر اختصاصی با ویژگیهای جنس *آیروموناس* در آب و خاک وجود دارند که بعضی از آنها عامل عفونت‌های ثانویه در ماهیها هستند. عوامل مسبب بیماریهای ناشی از *آیروموناس*‌های متحرک یک باکتری میله‌ای شکل، گرم منفی و متحرک با تاژک قطبی است و همه آنها هوازی و یا بیهوازی موقتی هستند (۵).

این باکتری بویژه در ماهیانی که تحت استرسهای حرارتی و تراکمی قرار می‌گیرند بیشتر دیده می‌شود و نهایتاً زمینه برای تهاجم باکتریهای فرصت طلب فراهم

باکتری *آیروموناس* مسئول ایجاد انواع بیماریها در ماهیان می‌باشد این باکتری را برای اولین بار (Sanarelli, ۱۸۹۱) جدا کرد و آن را *باسیلیوس هیدروفیلوس فوسکوس* نامید که بعداً *آیروموناس هیدروفیلا* نام گرفت. پس از آن یک بیماری از کپور معمولی با ویژگی التهاب شکمی توسط (Shaperclaus ۱۹۳۰، بررسی گردید. *آیروموناس هیدروفیلا* همچنین از قورباغه‌های بیمار (۱۰) و تمساح (۱۲) نیز جدا سازی گردیده است.

از جمله بیماریهای اختصاصی که توسط این باکتری ایجاد می‌شود پوسیدگی یا نکروز باله‌های شنا (Fin rot) می‌باشد. در این بیماری تغییرات مختلف بافتی ایجاد شده در باله‌های شنا می‌باشد و در گذشته جزء بسیاری از ناهنجاریها منجمله فرونکلوز بیماری قرحه و غیره محسوب می‌شد ولی نتیجه بررسیهای انجام شده نشان می‌دهد که یک بیماری مستقل است. باله‌های پشتی و دمی دچار تغییرات مرضی گشته و گاهی به از بین رفتن کامل آنها منجر می‌شود. این تغییرات ممکن است سایر باله‌های شنا را نیز شامل گردد. در مراحل اولیه خط سفید کم و بیش واضح در طول لبه‌های خارجی باله شنا ظاهر می‌شود و به تدریج به سمت قاعده آن پیش می‌رود و قسمت‌هایی از لبه خارجی باله شنا از بین می‌رود. این باکتری ایجاد کننده انواع بیماریها در ماهیان می‌باشد، برخی از سویه‌های آن تا دمای ۵ درجه سانتی گراد هم بیماریزا هستند اما اکثر آنها در دماهای پایتتر از ۱۲-۱۰ درجه سانتی‌گراد نمی‌توانند تکثیر یابند و بیماری ایجاد کنند. باکتری *آیروموناس* اساساً با زهرابه‌ها یا سمومی که در خلال رشد و تکثیر خود در میزبان ترشح می‌کند به آن آسیب

سواب استریل از قسمت پایه باله (محل پوسیدگی و بافت سالم) محلی که حضور باکتریها بیشتر است نمونه برداری صورت گرفت و روی محیط های نوترینت آگار، بلاد آگار و EMB (اوزین متیلن بلو) کشت و به مدت ۲۴-۷۲ ساعت انکوبه شدند.

این نمونه برداری ها هم از آب و هم از ضایعات بافتی، باله های پستی، دمی و کلیه ماهیان صورت گرفت. پس از ایزوله سازی و تهیه کشت خالص و آزمایشات بیوشیمیایی و تستهای افتراقی باکتری آیروموناس هیدروفیلا جدا سازی گردید.

شایان ذکر است برای شناسایی کامل پرگنه های مربوطه، اقدام به انجام آزمایشهای گرام، سیمون سترات، سولفید هیدروژن، اندول، حرکت، وژسپروسکال، ام آر، اکسیداسیون احیاء، اکسیداز، اوره آز، ژلاتین مالتاز، سه قندی آهن دار، همولیزین، کاتالاز، ایزولین، لیزین، آرژنین و تولید NO₂ گردید. شناسایی باکتریهای رشد یافته بر اساس روشهای توصیه شده در منابع (۹-۱۳) انجام گرفت.

نتایج

در این بررسی فقط عامل درجه حرارت استرس زا در شرایط آزمایشگاهی روی ماهی *Capoeta damascina* را مورد بررسی قرار داده و باکتری آیروموناس هیدروفیلا از باله ها و بعضی اندام های داخلی جداسازی گردید. شایان ذکر است که ماهیان جوانتری که بالطبع دارای وزن کمتری بودند بیشتر مبتلا گشتند.

نتایج حاصله نشان داد که ۸۰٪ ماهیانی که در درجه حرارت استرس ۳۰-۲۰ درجه سانتی گراد و بالاتر نگهداری شده اند به شکل حاد بیمار شده اند و از بافت

می آید. در این میان خصوصا ماهیانی که مبتلا به فقر غذایی هستند حساسیت بیشتری نشان می دهند. افزایش درجه حرارت در بهار و تابستان به همراه استرس سبب افزایش همه گیری بیماری می شود. ماهیان جوان حساستر از سایر ماهیان هستند و توسط ماهیانی که به فرم مزمن یا نهفته بیماری مبتلا شده اند و یا حاملهایی که در استخر یا آکواریوم باقی مانده اند آلوده می شوند (۶).

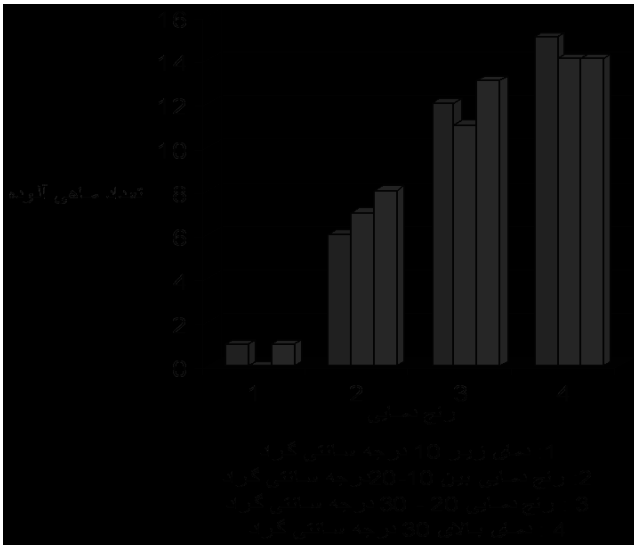
مواد و روشها

در این بررسی ماهیان *Capoeta damascina* صید شده از رودخانه بافت به آزمایشگاه منتقل و داخل چند آکواریوم که از آب شهر پر شده و برای اطمینان به آن مواد ضد عفونی کننده اضافه گشته بود با تراکم یکسان قرار گرفتند. ماهیان موجود در یک آکواریوم را در شرایط دمایی مناسب، با تراکم ۱۵ قطعه و اکسیژن مناسب و بقیه را در شرایط استرس دمایی قرار دادیم. آکواریوم ها را به ترتیب در دامنه های حرارتی زیر ۱۰، ۲۰-۳۰، ۳۰-۲۰ و بالاتر از ۳۰ درجه سانتی گراد تنظیم و ماهیان به صورت تصادفی (در اوزان متفاوت) و تراکم یکسان (۱۵ قطعه در هر آکواریوم) به آنها انتقال یافتند. درجه حرارت با گرم کننده ترموستات دار تنظیم گردید. پس از گذشت ۵ تا ۸ روز در ماهیان علائمی از قبیل خونریزی نامنظم در سطح بدن، بین باله ها، خوردگی باله ها، حرکات غیر عادی و آب آوردگی شکم مشاهده شد.

برای ضد عفونی کردن بدن ماهی ها، جهت ایزوله باکتری از روش ضد عفونی کردن سطح بدن با الکل ۷۰٪ استفاده شد. وسایل کالبد گشایی نیز با غوطه ور کردن در الکل ۷۰٪ و شعله دادن آنها قبل از استفاده استریل گردید. برای نمونه گیری از پوسیدگی باله ها با

که در شرایط نرمال قرار داشت باکتری آیروموناس ایزوله نگردید. ماهیان جواتر با وزن کمتر نیز در این میان حساستر و به این باکتری بیشتر آلوده گردیدند. این آزمایش در ۳ تکرار انجام شد و نتایج تقریباً یکسانی بدست آمد.

میزان آلودگی ماهی به باکتری آیروموناس هیدروفیلا در ۳ تکرار



جدول ۲- تجزیه واریانس اثر استرس دمایی در بروز علائم ناشی از باکتری آیروموناس هیدروفیلا در ماهی Capoeta

منابع تغییر	درجه آزادی df	مجموع مربعات	میانگین مربعات	F
تیمار	۳	۳۲۹/۶۷	۱۰۹/۸۹	۰××
خطا	۸	۵/۳۳	۰/۶۶۷	
کل	۱۱	۳۳۵		

جدول ۳- مقایسه میانگین‌ها با آزمون چند دامنه ای دانکن

درجه حرارت	تیمار ۱	تیمار ۲	تیمار ۳	تیمار ۴
میانگین	۰/۶۷ a	۷ b	۱۲ c	۱۴/۳۳ d

a,b,c,d: اعداد ردیف که حروف غیر مشابه دارند با یکدیگر اختلاف معنی داری دارند.

تیمار ۱: رنج دمایی زیر ۱۰ درجه سانتی‌گراد تیمار ۲: رنج دمایی ۱۰-۲۰ درجه سانتی‌گراد تیمار ۳: رنج دمایی ۲۰-۳۰ درجه سانتی‌گراد تیمار ۴: رنج دمایی ۳۰ درجه

کلیه، باله‌های شنای آنها باکتری آیروموناس هیدروفیلا به صورت خالص جداسازی گردید. پس از کشت باکتری بر روی محیط کشت پرگنه‌های گرد، کامل، محدب یا پهن و نیمه شفاف مشاهده گردید. تستهای زیر بر روی باکتری انجام و باکتری آیروموناس هیدروفیلا ایزوله گردید.

جدول ۱- آزمایشات انجام شده جهت جداسازی باکتری:

-	Gram
تولید NO ₂	محیط نیترات
+ یا -	SIM
+	H ₂ S
+	Indol
+	Motility
-	MR
+	VP
+	O/F
+	Oxidase
-	Urase
+	Maltase
+	Gelatinase
A/A	TSI
+	Hemolysin
+	Catalase
+	Esculine
+SH ₂	Lysine
-	Arginin

این آزمایشات حضور باکتری آیروموناس

هیدروفیلا را تأیید نمود.

ماهیانی که در دامنه حرارتی زیر ۱۰ درجه سانتی‌گراد قرار داشتند حدود ۱٪ دچار آلودگی، ماهیان موجود در دامنه حرارتی ۱۰ تا ۲۰ حدود ۴۰٪ آلودگی و در درجه حرارت ۲۰ تا ۳۰ و بالاتر ۸۰ تا ۱۰۰٪ آلوده شدند در اینحالت عامل بیماریزا را می توان از بافت ها یا دستگاه گوارش تمام ماهیان جدا کرد. از آکواریومی

باکتری نیز میسر است. در این بررسی با مقایسه آماری بین تیمارها و استفاده از آزمون چند دامنه‌ای دانکن این نتیجه بدست آمد که بین تیمار ۱ با بقیه تیمارها، بین تیمار ۲ با ۳، تیمار ۲ با ۴ و تیمار ۳ با ۴ در سطح $(p < 0.01)$ اختلاف معنی داری وجود دارد، ولی بین تکرارها اختلاف معنی دار نیست. بنابراین میتوان به این نتیجه رسید که استرس دمایی یکی از فاکتورهای مهم در بروز بیماریهای ناشی از باکتری آیروموناس هیدروفیلا می باشد.

سپاسگزاری

با تشکر فراوان از جناب آقای مهندس پیروز شاکری که در بررسی آماری همکاری کردند.

منابع

- ۱- اینگلس، روبرت و برومیخ. ترجمه؛ سلطانی، م. (۱۳۷۵). بیماریهای باکتریایی ماهی.
- ۲- سلطانی، م. (۱۳۷۴). پاتوزنهای جدید باکتریایی ماهی، مجله سلامت، انتشارات سازمان دامپزشکی کشور. سال اول، شماره ۲۱.
- ۳- ستاری، م. روستایی، م. (۱۳۷۸). بهداشت ماهی، (ترجمه)، انتشارات دانشگاه گیلان.
- ۴- سلطانی، م (۱۳۷۵). بیماریهای باکتریایی ماهی (ترجمه). انتشارات سازمان دامپزشکی کشور و نشر جهاد دانشگاهی.
- ۵- لیت ریتز، ا. ترجمه؛ عمادی، ح. (۱۳۷۴)، چاپ چهارم. راهنمای تکثیر و پرورش ماهی قزل آلا و ماهی آزاد.

سانتی گراد به بالا
میانگین‌ها با حروف متفاوت دارای اختلاف معنی دار می باشند. (۰/۰۱، p)

بحث

بسیاری از همه گیری های ناشی از آلودگی های آیروموناسی وابسته به استرس هستند. این بیماری همچنین با عفونت های خونریزی دهنده ماهیانی که به علل دیگری تحت شرایط استرس می باشند ارتباط پیدا می کند. ازدحام جمعیت ماهی در استخرها یا آکواریوم سبب کمبود اکسیژن و افزایش ترشحات و فضولات ناشی از فعالیت های حیاتی ماهی شده و موجب فراهم شدن شرایط مناسبی برای تهاجم باکتریهای فرصت طلب می گردد. افزایش درجه حرارت در فصول بهار و تابستان که سبب استرس در ماهی می شود به بروز همه گیری ها کمک می کند. ماهیان آلوده به آیروموناسها در صورتی که در حرارت های کمتر از ۸-۷ درجه سانتی گراد قرار گیرند هرگز دچار بیماری نخواهند شد در حالیکه همین ماهیان اگر در حرارت های بیشتر از ۱۲ تا ۱۴ درجه سانتی گراد قرار گیرند عفونت نهایی شکوفا شده و سبب افزایش مرگ و میر می گردد.

ماهیان بیمار که معمولا بوسیله سایر عوامل تحت استرس می باشند با رنگ تیره و خونریزی های نامنظم وسیعی در سطح بدن و بین باله ها و آب آوردگی شکم مشخص می شوند. تشخیص بیماری با علائم آسیب شناسی و کشت اختصاصی این باکتری گرم منفی و مشاهده مستقیم باکتریهای کوکسی شکل یا میله ای کوتاه (2×1 تا $4/5$ میکرون) و یا با له کردن بافت های آزوده امکان پذیر است. تشخیص تفریقی بیماری ناشی از آیروموناس های متحرک همراه با واکنشهای شیمیایی

- rainbow trout fry syndrom.* Journal Disease of Aquatic Organisms, 31(3).
- 17- Michaelk. Stoskopf (1993); Text Book of Fish Medicine. Pub: Saunders [35]. Wiklund, T., Lonn Strom, L. & Niranen, H., (1993). *Aeromonas Salmonicida ssp. Salmonicida Lacking Pigment Production, isolated from farmed salmonids in finland.* Disease of Aquatic Organisms, 15: 219-223.
- 18- *Microscope Diagnosis of common parasite infections of fish.* (2002). [http://www.ntlabs.co.uk/microscope diagnosis.htm](http://www.ntlabs.co.uk/microscope_diagnosis.htm).
- 19- Post, E. (1989): Text book of fish health. T.F.H. publication Inc. 293pp.
- 20- Roberts, R.J. (1978). Fish pathology Baillier Tindal book published by cassell Ltd 318pp.
- 21- Wiklund, T. & Bylund, G., (1990). *Pseudomonas anguilliseptica as a pathogen of salmonid fish in finland.* Disease of Aquatic Organisms, 8: 13-19. Company.
- 22- Wiklund, T., Lonn Strom, L. & Niranen, H., (1993). *Aeromonas Salmonicida ssp. Salmonicida Lacking Pigment Production, isolated from farmed salmonids in finland.* Disease of Aquatic Organisms, 15: 219-223.
- 23- Wiklund, T. & Bylund, G., (1990). *Pseudomonas anguilliseptica as a pathogen of salmonid fish in finland.* Disease of Aquatic Organisms, 8: 13-19.
- ۶- معینیان، م. ۱۳۷۱، پرورش ماهی و معالجه بیماریهای ماهیان. انتشارات دانشگاه تهران.
- ۷- مخیر، ب، (۱۳۷۴)، بیماریهای ماهیان پرورشی، انتشارات دانشگاه تهران، شماره ۱۸۶۹.
- ۸- ماهنامه کشاورزی- تخصصی- علمی- تحلیلی، ویژه شیلات و آبزیان - شماره ۲۴، آذر ماه ۱۳۸۰، اولین همایش ماهیان پرورشی ایران.
- 9- Austin, B. and Stobie, D.A (1993), *Bacterial Fish Pathogen Disease in Farmed and Wild Fish.* Ellise Horwood Chichester.
- 10- Bullock, G.L. (1968) *The bacteriology of brook trout with tail rot.* *Progressive Fish Cultureist* . 30, 19-22
- 11- Chakrabaiti, N.M. (1998). Disease of cultivable fresh water fishes and their control. International books and periodicals supply service dilni-110034(India), 149pp
- 12- Defigvereido, J. and Plumb, J.A. (1971) *Virulence of different isolates of Aeromonas hydrophila in channel catfish.* *Aquaculture*, 11, 349-54.
- 13- Frerichs, G. N. And Millar, S.D. (1994). *Manual for the Isolation and Identification of Fish Bacterial Pathogen,* Pisces Press Strilling.
- 14- John Hayer. (2000). *Aeromonas Hydrophila.* <http://hmsc.Oregonstated.edu/classes/MB492/hydrophilahayes>
- 15- James L. Shelton. (2000). *Trout Aquaculture. Cooperative State Research Service and Extension Service,* U.S. Department of Agriculture, under Special Project No. 87-EXCA-3-0836.
- 16- Lorenzen, E. Dalsgaard, I. Francois, B, J. (1997); *Characterization of Isolates of Flavobacterium Psychrophilum associated with cold - water disease or*