



# نقش برخی عوامل استرس‌زا در ظهور عفونت‌های ناشی از آئروموناس هیدروفیلا (*Aeromonas hydrophila*) در کپور ماهیان پرورشی

مصطفی اخلاقی

بخش ایزبان، دانشکده دامپزشکی دانشگاه شیراز

شیراز - صندوق پستی: ۷۱۳۶۵-۱۷۳۱

تاریخ دریافت: دی ۱۳۷۶ تاریخ پذیرش: دی ۱۳۷۷

## چکیده

در این تحقیق نقش درجه حرارت بالا (تا ۳۲ درجه سانتیگراد)، کلدورت آب، تراکم و کمبود اکسیژن در ظهور عفونت‌های ناشی از باکتری آئروموناس هیدروفیلا (*Aeromonas hydrophila*) در شرایط آزمایشگاهی بر روی ماهیهای کپور معمولی و کپور نقره‌ای (فتیفاگ) پرورشی مورد بررسی قرار گرفت. ماهیهای با وزن ۴۰۰ تا ۵۰۰ گرم در آکواریوم‌های ۶۰ لیتری نگهداری شدند و ابتدا به مدت یک هفته در معرض ۱۰<sup>۹</sup> باکتری آئروموناس هیدروفیلا بیماریزا بصورت حمام دادن قرار گرفتند و سپس هر گروه که شامل ۱۰ ماهی بود در آکواریوم‌های مجزا در معرض استرس‌های مختلف فوق‌الذکر به مدت دو هفته قرار گرفتند. ماهیهایی که علائم بیماری از جمله خونریزی‌های پوستی و حرکات غیرعادی داشتند جمع‌آوری و کشت باکتریایی داده شدند تا باکتری عامل بیماری از کلیه آنها جدا شود. نتایج حاصله نشان داد ۸۰ درصد ماهیهایی که در درجه حرارت استرس (۳۲ درجه سانتیگراد) نگهداری شدند بصورت حاد بیمار شده و از بافت کلیه تمام آنها باکتری آئروموناس هیدروفیلا بصورت خالص جدا گردید. در گروه کلدورت آب و تراکم ماهیهای بیماری مشاهده نشد. در گروه گامش اکسیژن همه ماهیها تلف شدند و از بافت کلیه آنها باکتری جدا نگردید. نتایج نشان داد که تحت شرایط استرس ناشی از بالا رفتن درجه حرارت آئروموناس هیدروفیلا می‌تواند برای ماهیان فتیفاگ و ماهی کپور معمولی بیماریزا باشد.

## مقدمه

آئروموناس هیدروفیلا (*Aeromonas hydrophila*) از خانواده آئروموناداسه داشته

(Aeromonadacea) با نامهای مشابه آنروموناتس لیکوفاسینس (*Aeromonas liquifacence*) یا آنروموناتس پونکتاتا (*Aeromonas punctata*) از آنروموناتس‌های متحرک است که بصورت بخشی از فلور طبیعی محیطهای آبی و آبیان از جمله ماهیهای آب شیرین و گاهی نیز ماهیان آب شور می‌باشد (Austin & Austin, 1993). عفونتهای ناشی از آنروموناتس هیدروفیلا در پرورش کبور ماهیان از اهمیت زیادی برخوردار است (Jeny & Jeny, 1995). اگرچه تعدادی از محققین آنروموناتس هیدروفیلا را به عنوان عامل ثانویه سپتی سمی همورازیک ماهیها می‌دانند دیگران آن را عامل اولیه ایجاد بیماری در ماهیان می‌دانند (Austin & Austin, 1993). بیماری ایجاد شده در ماهی بصورت سپتی سمی همورازیک توأم با خونریزی‌ها، زخمهای پوستی و عضلانی، آب آوردگی و ورم شکم (dropsy) می‌باشد (Ansary et al., 1992). سپتی سمی ناشی از این باکتری می‌تواند در سه شکل حاد و مزمن و حاملین وجود داشته باشد (Grizzle & Kiryu, 1993).

در ایران رضویلر و همکاران (۱۳۶۰) آنروموناتس هیدروفیلا را از کبور ماهیان پرورشی جدا کردند و نقش بیماری‌زایی آن را بررسی نمودند. مطالعه مشابهی (۱۳۷۰) نشان داد که آنروموناتس هیدروفیلا به ترتیب در فصل گرم و سرد ۷۰ و ۹۰ درصد باکتریهای جدا شده از آب استخرهای پرورشی و ۷۱ و ۹۶ درصد باکتریهای جدا شده از سطح پوست کبور ماهیان پرورشی را تشکیل می‌داده است.

بیماری‌زایی آنروموناتس‌های متحرک بصورت ثانویه یا اولیه با نتایجی که از بررسی علل مرگ و میر ماهی‌آمور در استان خوزستان بدست آمده مورد بحث است (بیغان و همکاران، ۱۳۷۳). همچنین در مطالعه میکروبیولوژیک اندامهای آبشش، کلیه و کبد ماهیان کبور علفخوار (آمور) به ظاهر سالم و بیمار استان خوزستان که علائم سپتی سمی در آنها دیده می‌شد باکتریهای شبه آنروموناتس‌های متحرک از کلیه و کبد و بافت آبششی جدا گردید که حدس زده می‌شود موجب بروز برخی تلفات در کارگاههای پرورش آمور شده است (اسماعیلی و بیغان، ۱۳۷۶). در موارد متعددی نیز از کبور ماهیان بیمار کارگاههای پرورشی فارس در فصل گرم، آنروموناتس هیدروفیلا از زخمها و کلیه ماهیهای بیمار جدا گردید.

هدف از این تحقیق بررسی نقش برخی از عوامل استرس‌زا (که احتمال وقوع آنها در محیط

پرورشی می‌باشد) در ظهور عفونت‌های ناشی از آئروموناس هیدروفیلا می‌باشد تا با ارزیابی نقش استرسها در جهت پیشگیری از وقوع بیماری در این کارگاهها استفاده نمود.

## مواد و روشها

تعداد ۵۰ عدد ماهی بطور تصادفی از کارگاه تکثیر و پرورش کپور ماهیان سرودشت صید گردید. از این تعداد، ۱۶ عدد ماهی کپور معمولی و ۳۴ عدد ماهی کپور نقره‌ای (فینوفاگ) با وزن متوسط ۴۵۰ گرم بود. ماهیها در کیسه‌های پلاستیکی محتوی آب و اکسیژن به آزمایشگاه بخش آبیان دانشکده دامپزشکی دانشگاه شیراز منتقل شدند و در آکواریوم‌های ۶۰ لیتری با درجه دمای ۲۱ درجه سانتیگراد نگهداری و تغذیه شدند تا به محیط آکواریوم عادت کنند. ماهی‌ها بطور تصادفی به پنج گروه (گروه افزایش درجه حرارت، گروه کدورت، گروه تراکم ماهی، گروه کاهش اکسیژن و گروه شاهد) تقسیم شدند به نحوی که در هر گروه ۱۰ ماهی در یک آکواریوم حاوی ۶۰ لیتر آب مجهز به پمپ هوا قرار داشت. در گروه افزایش درجه حرارت از بخاری مخصوص آکواریوم استفاده گردید. آب مورد نیاز آکواریوم در گروه کدورت آب، از آب کف استخرهای پرورش سرودشت تأمین شد که کدورت این آب با استفاده از دیسک سی‌سی ۲۰ سانتیمتر بود. در گروه تراکم ماهی به جای ۶۰ لیتر از ۳۰ لیتر آب استفاده گردید، در گروه کاهش اکسیژن هوادهی به اندازه‌ای کم شد تا فقط ۱ میلی‌گرم در لیتر اکسیژن (روش وینکلر و دستگاه اکسیژن متر لوترون) در آب آکواریوم باشد و در گروه شاهد هیچکدام از شرایط استرس‌زا وجود نداشت و اکسیژن آب به میزان ۴/۶ میلی‌گرم در لیتر ثابت نگه داشته شد. باکتری آئروموناس هیدروفیلا (*Aeromonas hydrophila*) مورد استفاده که در بخش آبیان دانشکده دامپزشکی دانشگاه شیراز از زخمها و کلیه ماهیهای کپور معمولی بیمار جدا گردیده و بوسیله آزمایشهای بیوشیمیایی (جدول ۱) و همچنین آزمایشگاه مرجع بیماریهای ماهی دانمارک توسط دکتر دالسگارد مورد تأیید قرار گرفت و در آزمایشهای متعدد توانسته بود بصورت تجربی در آزمایشگاه سبب بیماری در کپور ماهیان گردد، تأمین شد.



جدول ۱: خصوصیات بیوشیمیایی باکتری آنروموناس هیدروفیلا (*Aeromonas hydrophila*) جدا شده از زخمها و کلیه ماهی‌های کبور معمولی بیمار (اقتباس از: Dalsgard, personal communication, 1993, Austin & Austin)

نتیجه کشت	موارد
+	Motility
+/+	Catalase/Oxidase
-	Methyl red test
+	Nitrate reduction
+/+	Indol/VP
	<b>Growth on/at:</b>
+	0-4% (w/v) NaCl
-	5% (w/v) NaCl
+	5-37°C
+	Potassium cyanide
	<b>Degradation of:</b>
+	Aesculin
+	Blood (Haemolysis)
+	Gelatin
+	Starch
+	Tween 80
-	Urea
+	Arginin
+	Lysin
-	Ornithin
	<b>Production of acid from:</b>
+	Sucrose
+	Mannitol
+	Glucose

این باکتری قبل از استفاده در آزمایشها از روی محیط ژلوز خوندار بصورت داخل صفاقی به دو ماهی کبور معمولی تزریق و پس از ۴۸ ساعت ماهیها با ضربه‌ای که به سر آنها وارد می‌شد کشته

شدند و با کشت از کلیه قدامی آنها بر روی ژلوز خوندار در دمای ۲۵ درجه سانتیگراد به مدت ۴۸ ساعت باکتریها بصورت پرگنه‌های خالص جدا گردیدند. از این پرگنه‌ها جهت تهیه آب حاوی باکتری برای ایجاد عفونت در ماهی استفاده گردید. برای تهیه آب حاوی  $10^9$  باکتری اقدام به تعیین تعداد باکتری در محلول اولیه باکتری و سرم فیزیولوژی شد که با استفاده از روش Akhlaghi et al., 1996 صورت گرفت. محلول باکتریایی تهیه شده وقتی که به  $20$  لیتر آب اضافه شد هر میلی‌لیتر آب حاوی  $10^9$  باکتری آنروموناتس هیدروفیلا بود. ماهیها در گروههای مختلف بصورت مجزا توسط ساچوک کوچک به محلول حاوی  $10^9$  باکتری مزبور همراه با هوادهی منتقل و به مدت یک دقیقه حمام داده شدند و پس از یک دقیقه با ساچوک به آکواریوم خود منتقل گردیدند. در این مرحله عوامل استرس‌زا شامل افزایش دما تا  $32$  درجه سانتیگراد، کدورت آب، تراکم ماهی و کاهش اکسیژن برای گروههای آزمایشی بطور مجزا ایجاد شد و گروه شاهد در شرایط معمولی و دمای آب  $21$  درجه سانتیگراد نگهداری شد. ماهیها به مدت ۲ هفته زیر نظر گرفته شدند. از کلیه ماهی‌های بیمار، جهت کشت باکتریایی نمونه‌برداری شد و نمونه‌ها مورد بررسی قرار گرفتند.

## نتایج

نتایج حاصله از آزمایش ایجاد عفونت در ماهیهایی که در معرض باکتری قرار گرفته بودند در جدول شماره ۲ آمده است. متعاقب قرار دادن ماهیها در معرض باکتری بیماریزای آنروموناتس هیدروفیلا و نگهداری آنها در شرایط استرس ایجاد شده ناشی از افزایش درجه حرارت و کاهش اکسیژن، به ترتیب  $80$  درصد و  $100$  درصد تلفات دیده شد.

از بافت کلیه ۸ مورد ( $80$  درصد) ماهیهایی که در شرایط استرس ناشی از درجه حرارت بودند باکتری بیماریزای آنروموناتس هیدروفیلا جدا گردید در حالیکه باکتری قوی در هیچ مورد از بافت کلیه ماهیهایی که در شرایط استرس ناشی از کاهش اکسیژن نگهداری شدند در آزمایشگاه جدا نگردید. هیچیک از ماهیهایی که در معرض باکتری بیماریزای آنروموناتس هیدروفیلا در شرایط استرس ناشی از کدورت کدر بودن آب و تراکم در واحد حجم قرار گرفتند تلفاتی را نشان ندادند. در هیچ مورد باکتری آنروموناتس هیدروفیلا از بافت کلیه این ماهیها جدا نگردید.

جدول ۲: نتایج حاصله از گروههای مختلف ماهی که ابتدا بصورت تجربی در معرض ۱۰<sup>۹</sup> باکتری آئروموناس هیدروفیلای بیماریزا و سپس در شرایط استرس قرار گرفتند

تعداد ماهی که باکتری از کلیه ماهیهای بیمار جدا شد	تلفات ماهیها تا دو هفته بعد از حمام	حمام یک دقیقه ای با باکتری	تعداد ماهی فیتوفاگ	تعداد ماهی کپور معمولی	تعداد کل	گروههای ماهی (استرسهای مختلف)
۸	۸	-	۶	۴	۱۰	افزایش درجه حرارت تا ۳۲°C
-	-	+	۶	۴	۱۰	ایجاد کمبود در آب
-	-	+	۶	۴	۱۰	ایجاد تراکم ماهی
-	۱۰	+	۱۰	۰	۱۰	کاهش اکسیژن
-	-	+	۶	۴	۱۰	شاهد (بدون استرس)

## بحث

مستعاقب قرار دادن ماهیها در معرض باکتری آئروموناس هیدروفیلای (*Aeromonas hydrophila*) بیماریزا و نگهداری آنها در شرایط استرس ایجاد شده ناشی از افزایش درجه حرارت و کاهش اکسیژن تلفات مشاهده گردید. با افزایش درجه حرارت باکتریها تزايد یافته و از بافتها به سیستم گردش خون راه می‌دهند و سمی را باعث می‌شوند. از طرفی افزایش درجه حرارت دستگاه ایمنی ماهی را مختل نموده و مقاومت ماهی در برابر عوامل بیماریزا را کاهش داده و منجر به مرگ ماهی می‌شود (Avtalion, 1981). در یک تحقیق مشابه نشان داده شده است قزل‌آلای رنگین کمانی که در طول سال در درجه حرارت زیاد (۱۸°C) نگهداری شده‌اند عیار پادتن کمی را نسبت به آئروموناس سالمونیسیدا داشته‌اند (Zeeman, 1986). در این گروه آزمایشی از بافت کلیه تمام ماهیهای تلف شده باکتری جدا گردید.

تمام ماهیها در گروه کاهش اکسیژن که قبل از قرار داده شدن در شرایط کاهش اکسیژن در معرض باکتری بیماریزای آئروموناس هیدروفیلا قرار داده شده بودند تلف شدند که نشان دهنده حساسیت زیاد این ماهیها به کم شدن اکسیژن می‌باشد. این اتفاق می‌تواند در فصل گرم که درجه حرارت بالا می‌رود براحتی در شرایط استخرهای پرورشی کپور ماهیان صورت گیرد و بخصوص



زمانی که میزان اکسیژن در شب کم شده و در استخر نیز از هیچ نوع هوادهی استفاده نشود. چون تلفات در ساعت‌های اولیه کاهش اکسیژن اتفاق می‌افتاد. به نظر می‌رسد باکتریها فرصت استقرار در بافت کلیه را نیافته که بتوان آنها را در کشت جداسازی نمود. برای اظهار نظر قطعی لازم است آزمایشات بیشتری در این زمینه صورت پذیرد.

اگر چه زیاد شدن جمعیت ماهیها در حجم مشخص آب باعث ضعف مکانیسم دفاعی ماهی می‌شود (Ellis, 1981) لیکن تراکم ماهیها در واحد حجم در آزمایشهای انجام شده در این تحقیق نتوانست ایجاد استرس نماید. در نتیجه عفونت ائروموناسی در این آزمایشها مشاهده نشد. نتیجه مشابهی در مورد ماهیهایی که در اکواریوم حاوی آب با کدورت مشخص بود، مشاهده گردید. این امر می‌تواند بیانگر این مطلب باشد که استرس ناشی از کدورت آب و تراکم ماهیها کمتر از استرس ناشی از افزایش درجه حرارت در ظروف عفونتهای ائروموناسی نقش دارد. نتایج بدست آمده از این تحقیق تأکید بر نظارت دقیق بر عوامل محیطی از جمله افزایش درجه حرارت که معمولاً همراه با کاهش اکسیژن در فصل گرم است، می‌نماید. در این زمان با زیاد بودن مواد آلی در آب استخرها تعداد باکتری نیز در محیط آبی زیاد بوده و زمینه مناسبی برای حمله باکتری و ایجاد عفونت در ماهی می‌باشد. لذا پیشنهاد می‌شود در استخرهای ماهیان گرمایی در صورت امکان از تغییرات درجه حرارت و اکسیژن جلوگیری گردد. همچنین تعویض درصدی از آب و استفاده از پمپهای هواده و آب افشان در فصل گرم توصیه می‌شود. شناخت بیشتر از طبیعت بیماری‌زایی باکتری ائروموناس هیدروفیلا و شناخت آنتی ژنهای مختلف این باکتری در جهت تهیه واکسن و استفاده از آن برای پیشگیری از تلفات ماهی تحقیقات بیشتر را می‌طلبد.

## تشکر و قدردانی

از خانم محترم کشاورزی کارشناس بخش میکروبی شناسی دانشکده دامپزشکی دانشگاه شیراز، نمایندگی شیلات فارس و مدیریت کارگاه پرورش کپور ماهیان مرودشت تشکر و قدردانی می‌شود. قسمتی از بودجه این تحقیق توسط موسسه تحقیقات شیلات ایران تأمین شد.

## منابع

اسماعیلی، ف.؛ پیغان، ر.، ۱۳۷۶. آلودگی ماهی کپور علفخوار به ارگانسیم‌های شبیه ائروموناس‌های متحرک. مجله علمی شیلات ایران. سال ششم، تابستان ۱۳۷۶، صفحات ۱ تا ۸.

- بیگان، ر.، عباسی، س.، اسماعیلی، ف.، ۱۳۷۳. بررسی علل مرگ و میر ماهیان آمور در استان خوزستان. موسسه تحقیقات شیلات ایران، صفحه ۵۶.
- رضویله، و.، حسنی طباطبائی، ع.، آذری تاکامی، ق.، ۱۳۶۰. بررسی نقش بیماریزایی آنروموتاس هیدروفیلا در بعضی از بیماریهای ماهی. نامه دانشکده دامپزشکی دانشگاه تهران، شماره ۴، دوره ۳۷، صفحات ۲۱ تا ۲۳.
- عبدا... مشای، م.ع.، ۱۳۷۰. بررسی باکتریهای گرم منفی پر اهمیت در کیور ماهیان منطقه فارس. پایان نامه دکترای دامپزشکی دانشگاه شیراز. شماره ۳۵۱، صفحات ۲۱ تا ۳۵.
- Akhalghi, M. ; Munday, B.L. and Whittington, R.J. , 1996.** Comparison of passive and active immunization of fish against streptococcosis (enterococcosis). *Journal of Fish Diseases*, Vol. 19. pp.251-258.
- Ansary, A. ; Haneef, R.M. ; Torres, J.L. and Yadav, M. , 1992.** Plasmids and antibiotic in *Aeromonas hydrophila* isolated in Malaysia from healthy and diseased fish. *Journal of Fish Diseases*, Vol. 15. pp.191-196.
- Austin, B. ; Austin, D.A. , 1993.** Bacteria fish pathogens, disease in farmed and wild fish. 2<sup>nd</sup> edition. Ellis Horwood, New York. pp.171-187.
- Avtalion, R.R. , 1981.** Environmental control of the immune response in fish. *Critical Review on Environmental Control*, Vol. 1. pp.163-188.
- Ellis, A.E. , 1981.** Stress and the modulation of defence mechanisms in fish. *In: Stress and fish*, A.D. Pickering (ed), Lodon, Academic Press, pp.147-169.
- Grizzle, J.M. ; Kiryu, Y. , 1993.** Histopathology of gill, liver and pancreas and serum enzyme levels of channel catfish infected with *Aeromonas hydrophila* complex. *Journal of Aquatic Animal Health*, Vol. 5. pp.36-50.
- Jeny, Z.S. ; Jeny, G. , 1995.** Major diseases of carp. *Aquaculture*, Vol. 129. pp.397-420.
- Zecman, M.G. , 1986.** Modulation of the immune response in fish. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, Vol. 12. pp.235-241.



# Effect of Stress Factors in the Occurrence of *Aeromonas hydrophila* Infection in Cultured Carp

Akhlagi M.

Aquatic Dep., Veterinary Faculty, Shiraz University  
P.O.Box : 71345-1731 Shiraz, Iran

received : January 1998

accepted : January 1999

## ABSTRACT

In this research, the role of high temperature (up to 32°C), water turbidity, fish crowding and oxygen deficiency on the occurrence of *in vitro* infection due to *Aeromonas hydrophila* in cultured carp (common carp & silver carp) was examined. The fish with the weight 400 - 500 gr were kept in 60 litre aquariums and were bathed with  $10^9$  pathogenic *Aeromonas hydrophila* for one week. Then separate groups (with population of 10 for each) in separate aquariums were exposed to different stress conditions for 2 weeks. Diseased fish that showed skin hemorrhage and abnormal swimming were collected and their kidney tissues cultured on common bacterology media. The obtained results showed that all the mortality were due to high temperature and no mortality was occurred in water turbidity and crowding conditions. Isolation of *Aeromonas hydrophila* was only from the high temperature stress group. The results obtain from this study show that *Aeromonas hydrophila* is a potential pathogens for common carp and silver carp in stress conditions such as high water temperature.