magiran.com

تاثیر ضد عفونی‌کننده‌های متداول بر باکتری استرپتوکوکوس اینیایی (*Streptococcus iniae*) جدا شده از ماهی‌های قزل‌آلای رنگین کمان در شرایط آزمایشگاه و تانک

محمد رضا تابنده[۱] و مصطفی اخلاقی[۲]*

akhlaghi@shirazu.ac.ir

دانشکده دامپزشکی دانشگاه شیراز، شیراز صندوق پستی: ۱۷۳۱-۷۱۳۴۵

تاریخ دریافت: اسفند ۱۳۸۵ تاریخ پذیرش: تیر ۱۳۸۶

چکیده

بمنظور مطالعه تاثیر ضدعفونی کننده‌های متداول بر باکتری استرپتوکوکوس اینیایی جدا شده از مزارع استان فارس در سه سال متوالی (۱۳۸۱ تا ۱۳۸۳) در شرایط آزمایشگاهی و تانک‌های پرورش ماهی از ترکیبات فرمالین، اسید استیک، اسید سیتریک، کلرهگزیدین، یدور سدیم، پرمنگنات پتاسیم، هیپوکلریت سدیم و ستریماید ث استفاده شد. روش آزمایشگاهی مورد استفاده تعیین حداقل غلظت کشنده باکتریایی(**Minimum bactericidal concentration**) در زمانهای ۱۵، ۳۰، ۴۵ و ۶۰ دقیقه براساس **ppm** بود. با استفاده از تانکهای پرورش ماهی و اضافه نمودن سویه ۱۳۸۳ در آب، غلظت های موثر بدست آمده از هر ضد عفونی کننده در شرایط آزمایشگاهی هر تانک اضافه گردید. در زمانهای موثر در شرایط آزمایشگاهی نمونه‌گیری بعمل آمد. تاثیر ضد عفونی‌کننده‌ها با عدم رشد باکتری در محیط کشت ارزیابی و ثبت گردید. کلرهگزیدین و هیپوکلریت سدیم از نظر غلظت و زمان موثر بر باکتری استرپتوکوکوس اینیایی موثرترین ضد عفونی‌کننده‌ها بودند. ضعیف‌ترین ضد عفونی‌کننده‌های مورد استفاده در این تحقیق اسید استیک و اسید سیتریک بودند که اغلب در غلظت‌های بیشتر از ۵۰۰ **ppm** تاثیر داشتند ودر مقایسه با ضد عفونی‌کننده‌هایی مانند کلرهگزیدین و هیپوکلریت سدیم که در غلظت‌های حدود ۳ تا ۵ **ppm** موثر بودند، ضدعفونی کننده‌های ضعیفی بشمار می‌آیند. نتایج حاصل از آزمایش‌ها در تانک‌ها نشاندهنده تاثیر قطعی عوامل مداخله‌گر در محیط بر عملکرد ضدعفونی کننده‌های مختلف می‌باشد. بطوریکه در مورد اغلب ضدعفونی کننده‌ها، حداقل غلظت کشنده باکتری در زمانهایی بیشتر از زمان‌های موثر در شرایط آزمایشگاهی بدست آمد. هیپوکلریت سدیم و یدور سدیم موثرترین ضد عفونی‌کننده‌ها در این شرایط بودند.

لغات کلیدی: ضدعفونی کننده، استرپتوکوکوس اینیایی، *Streptococcus iniae*، قزل‌آلای رنگین کمان

* نویسندهٔ مسئول

magiran.com

مقدمه

استرپتوکوکوزیس یکی از مهمترین بیماریهای عفونی در ماهیان آب شیرین، شور و لب شور پرورشی می‌باشد (مظلومی، ۱۳۸۲). برای اولین بار این بیماری در ژاپن توسط Hoshina *et al.*, 1958 در ماهی قزل‌آلای رنگین کمان گزارش گردیده است. هم اکنون به نظر می‌رسد بیماری دارای همه گیری جهانی باشد و برآورد می‌شود که بیماری باعث ایجاد ضرر سالیانه معادل ۱۵۰ میلیون دلار به صنعت پرورش گونه‌های مختلف ماهی می‌شود (Woo & Bruno, 1999). برای اولین بار در ایران آلودگی توسط قیاسی و همکاران (۱۳۷۹) در ماهی‌های مولد قزل‌آلای رنگین کمان در استان مازندران گزارش گردیده است. در سال ۱۳۸۰ بیماری استرپتوکوکوزیس (استرپتوکوکوس اینیایی) در مزارع پرورش ماهی قزل‌آلای رنگین کمان گزارش شد (اخلاقی و کشاورزی، ۱۳۸۲؛ Soltani *et al.*, 2005). بدلیل پاسخ بسیار ضعیف باکتری به آنتی بیوتیکها (اخلاقی و کشاورزی، ۱۳۸۲)، هزینه بالا و در دسترس نبودن واکسن‌های تجاری منطقه‌ای، تنها راه مبارزه با بیماری، مدیریت صحیح بهداشتی و رعایت اصول امنیت زیستی بمنظور جلوگیری از ورود اولیه باکتری به مزارع می‌باشد که در این بین کنترل رویش‌های گیاهی در مدخل چشمه‌ها و کانال‌های آبرسان که مهترین مکان تجمع باکتری می‌باشد و نیز کاربرد ضد عفونی‌کننده‌ها برای جلوگیری از انتقال بیماری بین استخرها و مزارع در یک منطقه، اهمیت فراوانی دارد. از جمله اقدامات لازم در پیشگیری و کنترل بیماری آموزش، واکسیناسیون، استفاده صحیح از ضد عفونی کننده‌ها و داروهاست. ضدعفونی استخرها، وسایل و تجهیزات پرورش ماهی از مهمترین راههای پیشگیری از انتقال بیماری بین استخرها و بین مزارع می‌باشد.

با توجه به روند همه‌گیر بیماری استرپتوکوکوزیس ماهی در پرورش ماهیان سردآبی در کشور، بدست آوردن اطلاعات درخصوص غلظت و زمان مناسب تأثیر ضد عفونی‌کننده‌های متداول جهت ضد عفونی تجهیزات استخرها و آب علیه باکتری استرپتوکوکوس اینیایی ضروری بنظر می‌رسد. بدین منظور اثر فرمالین، اسیداستیک، اسید سیتریک، کلرهگزیدین، یدور سدیم، پرمنگنات پتاسیم، هیپوکلریت سدیم و ستریماید ث در شرایط آزمایشگاهی و در شرایط تانک بر روی باکتری مزبور بررسی شد. هدف از این بررسی تعیین مؤثرترین غلظت و مقایسه ضد عفونی‌کنندگی این مواد در زمانهای مختلف در محیط آزمایشگاهی و تانک‌های نگهداری ماهی‌ها و مقایسه حساسیت سویه باکتری در سه سال متوالی نسبت به هر یک از ضد عفونی‌کننده‌ها بود.

مواد و روش کار

سویه‌های سال ۱۳۸۱، ۱۳۸۲ و ۱۳۸۳ از نمونه‌های مبتلا به بیماری استرپتوکوکوزیس با علائم درمانگاهی مشخص این بیماری نظیر بیرون زدگی چشم، سیاه شدن رنگ پوست، خونریزی در چشمها و پایه باله‌ها، ارجاعی به بخش بهداشت و بیماریهای آبزیان دانشکده دامپزشکی شیراز با استفاده از ۵۴ آزمایش بیوشیمیایی (اخلاقی و کشاورزی، ۱۳۸۲) بررسی گردیدند و در آزمایشهای مولکولی استرپتوکوکوس اینیایی تشخیص داده شدند و مورد استفاده قرار گرفتند.

ستریماید ث، کلرهگزیدین، پرمنگنات پتاسیم، هیپوکلریت سدیم، یدور سدیم از محصولات شرکت کیمیا مواد (ایران) و فرمالدئید (۳۷ درصد)، اسید استیک و اسید سیتریک از محصولات شرکت مرک آلمان بعنوان ضد عفونی‌کننده‌ها تهیه و مورد استفاده قرار گرفتند. غلظتهای ۱ تا ۱۰۰ ppm برای ضد عفونی‌کننده‌های کلرهگزیدین، هیپوکلریت سدیم، ستریماید ث و پرمنگنات پتاسیم، غلظت‌های ۴۰ تا ۲۵۰ ppm جهت فرمالین و یدور سدیم و غلظت‌های ۱۰۰ تا ۲۰۰۰ ppm در مورد ضد عفونی‌کننده‌های اسید استیک و اسید سیتریک در نظر گرفته شدند.

بمنظور ارزیابی تأثیر ضد عفونی‌کننده‌های مختلف از آزمایش رقیق‌سازی در لوله استفاده شد. بدین منظور تعداد باکتری در هر میلی لیتر 10^7 در نظر گرفته شد که با تهیه منحنی استاندارد غلظت جذب نوری محاسبه گردید (Harrigan & MaCance, 1990). با بکارگیری این روش لوله‌های حاوی 10^7 باکتری مورد نیاز آزمایش تهیه گردیدند. برای تهیه غلظت معین هر ضد عفونی‌کننده، غلظت مورد نظر براساس ppm حجم لوله‌های آزمایش محاسبه و به لوله‌ها اضافه شد. لوله‌های آزمایش پس از بهم زده شدن با مخلوط‌کن در گرمخانه ۲۵ درجه سانتیگراد نگهداری و براساس فواصل زمانی مورد نیاز ۵، ۱۰، ۱۵، ۳۰، ۴۵ و ۶۰ دقیقه یک لوله خارج شد و به لحاظ تأثیر ضد عفونی‌کننده بر رشد باکتری بمنظور تعیین حداقل غلظت کشنده باکتریایی در شرایط آزمایشگاهی مورد بررسی قرار گرفت.

ارزیابی هر غلظت ضد عفونی‌کننده برای هر سویه سه بار تکرار گردید. پس از زمان مورد نظر، مقدار ۰/۱ میلی‌لیتر از هر لوله برداشته شده و به شیشه‌های دربدار حاوی ۱۰ سی‌سی محیط آبگوشت تریپتون سویا استریل شده منتقل گردید. شیشه‌های کشت داده شده بمدت ۲۴ ساعت در گرمخانه ۲۵ درجه سانتیگراد نگهداری شدند. پس از ۲۴ ساعت شیشه‌ها از لحاظ رشد باکتری مورد ارزیابی ظاهری قرار گرفتند و در صورت ایجاد کدورت در آنها، مقدار ۰/۱ میلی‌لیتر از هر شیشه بر روی

magiran.com

محیط آگار Brain Heart Infusion Agar (BHI) کشت داده شد. یک نمونه حاوی سرم فیزیولوژی بجای ضد عفونی‌کننده و تعداد 10^7 باکتری در هر میلی‌لیتر بعنوان نمونه کنترل در نظر گرفته شد.

جهت ارزیابی تاثیر ضد عفونی‌کننده‌ها در شرایط تانکهای پرورش ماهی، ابتدا تعداد ۶ تانک ۳۰۰ لیتری در سیستم مدار بسته آبگیری شد و تعداد ۱۰۰ عدد بچه ماهی قزل‌آلای رنگین کمان انگشت قد بین تانک‌ها تقسیم و ماهی‌ها بمدت ۷ روز در تانک‌ها نگهداری و مورد تغذیه قرار گرفتند. پس از آن ماهی‌ها از تانک‌ها خارج و محلولی از سویه باکتری ۱۳۸۳ بنحوی محاسبه شد که پس از اضافه کردن به تانک‌ها در هر میلی‌لیتر آب تانک 10^6 باکتری وجود داشته باشد. سپس کمترین مقدار غلظت مؤثر ضد عفونی‌کننده که در آزمایش‌های قبلی محاسبه شده بود به تانک‌ها اضافه گردید. سپس در زمانهای ۱۵ تا ۶۰ دقیقه از آب و دیواره تانک‌ها (با سواب از یک سانتیمترمربع دیواره تانک‌ها و از سه ناحیه مختلف) نمونه‌برداری شد. نمونه‌های برداشته شده در روش اول در روی آگار (BHI) کشت داده شده و در درجه حرارت ۲۵ درجه سانتیگراد نگهداری و تا ۴۸ ساعت بعد مورد بررسی قرار گرفتند. کلنی‌های رشد نموده با استفاده از کشت‌های متوالی، رنگ آمیزی گرم، کشت بر روی محیط آگار خونی جهت ارزیابی همولیز با محیط BHI حاوی ۲۰۰ میلی‌گرم سدیم آزاید (Bragg *et al.*, 1989) مورد شناسایی قرار گرفتند. از آنجا که بنظر می‌رسید در کشت مستقیم نمونه‌ها مقدار کافی باکتری که قابل شناسایی باشد، رشد ننماید، نمونه‌های برداشت شده از تانک‌ها و آب جهت غنی سازی در محیط آبگوشت BHI کشت داده شدند و پس از نگهداری در گرمخانه بمدت ۲۴ ساعت کلنی‌های رشد یافته از نظر باکتریولوژی مورد ارزیابی قرار گرفتند.

با استفاده از نرم افزار SPSS میانگین‌های بدست آمده از زمان مورد نیاز برای غلظت کشنده هر ضد عفونی‌کننده در هر آزمایش و سه تکرار آن، با هم مقایسه گردیدند.

نتایج

نتایج مربوط به حداقل غلظت کشنده باکتریایی ضد عفونی‌کننده‌های مورد استفاده در این تحقیق در زمانهای ۱۵، ۳۰، ۴۵ و ۶۰ دقیقه در شرایط آزمایشگاهی بر علیه سویه‌های سالهای متوالی باکتری استرپتوکوکوس اینیایی نشان داد که کلرهگزیدین و هیپوکلریت سدیم از نظر غلظت و زمان، موثرترین ضد عفونی‌کننده‌ها هستند. ضعیف‌ترین ضد عفونی‌کننده‌های مورد استفاده در این تحقیق اسید استیک و اسید سیتریک بودند که اغلب در غلظت ۳۵۰ تا ۵۰۰ تاثیر داشتند و در مقایسه با ضدعفونی کننده‌هایی مانند کلرهگزیدین و هیپوکلریت سدیم که در غلظت‌های حدود ۳ تا ۵ ppm موثر بودند، ضد عفونی کننده‌های ضعیفی بشمار می‌آیند.

نتایج مربوط به بررسی تاثیر ضد عفونی‌کننده‌ها در سیستم مدار بسته نشاندهندهٔ تفاوت قابل توجه غلظت زمان موثر ضد عفونی‌کننده‌ها با نتایج مرحله آزمایشگاهی بود. نتایج مربوط به حداقل غلظت کشنده باکتری برای هر ضد عفونی‌کننده و زمانهای بدست آمده برای کشتن باکتری استرپتوکوکوس اینیایی در شرایط آزمایشگاهی و شرایط تانک در جدول ۱ آمده است.

نتایج حاصل از آزمایش در شرایط تانک نشان دهنده تاثیر قطعی عوامل مداخله‌گر در محیط بر عملکرد ضدعفونی کننده‌های مختلف می‌باشد، بطوریکه در مورد اغلب ضدعفونی کننده‌ها حداقل غلظت کشنده باکتری در زمانهایی بیشتر از زمان‌های موثر در شرایط آزمایشگاهی بدست آمد. در این بین یدور سدیم ، هیپو کلریت سدیم و کلرهگزیدین بیشتر از سایر ضدعفونی کننده‌ها تحت تاثیر عوامل محیطی قرار گرفتند. فرمالین اگر چه در مقایسه با سایر ضدعفونی کننده‌ها تاثیر ضعیفی بر باکتری استرپتوکوکوس اینیایی داشت، ولی تفاوت چشمگیری بین غلظت زمان موثر آن در شرایط آزمایشگاهی و شرایط مزرعه‌ای مشاهده نگردید وکمتر تحت تاثیر عوامل مداخله‌گر موجود در شرایط طبیعی قرار گرفت.

در مقایسه آماری، اختلاف معنی داری بین افزایش حداقل غلظت ضدعفونی کننده‌ها و زمان لازم برای از بین بردن باکتری استرپتوکوکوس اینیایی وجود داشت ($P<0/01$) به گونه‌ای که با افزایش مقدار غلظت ضدعفونی کننده، مدت زمان لازم کاهش می‌یافت. بررسی همبستگی نشان داد روند مقاومت سویه‌های سالهای ۱۳۸۱ تا ۱۳۸۳ نسبت به ضد عفونی‌کننده‌ها از افزایش معنی‌داری برخوردار نمی‌باشند.

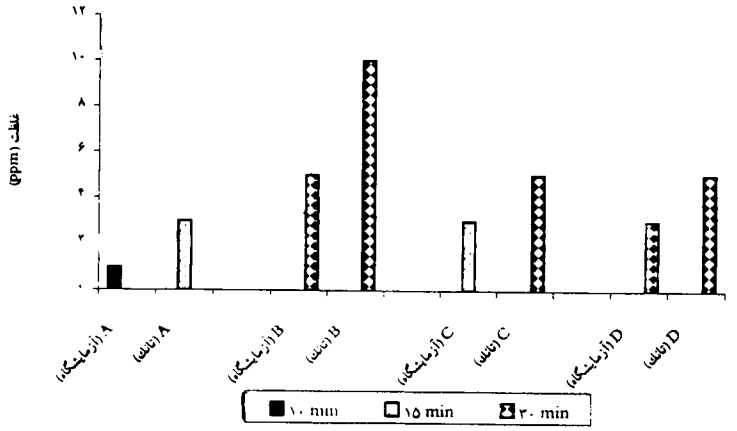
نمودارهای ۱ تا ۳ مقایسه حداقل غلظت/ زمان موثر ضد عفونی‌کننده‌های مختلف در شرایط آزمایشگاه و تانک‌های پرورشی بر باکتری استرپتوکوکوس اینیایی مورد مطالعه در این تحقیق را نشان می‌دهند.

magiran.com

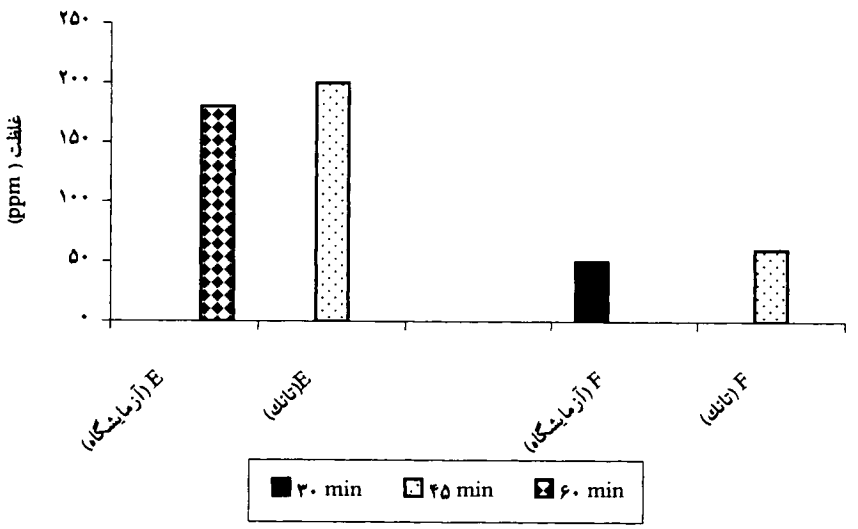
جدول ۱: غلظت (ppm) / زمان مؤثر ضدعفونی‌کننده‌ها برحسب حداقل غلظت کشنده بر باکتری استرپتوکوکوس اینیایی منطقه‌ای جدا شده در سالهای متوالی در شرایط آزمایشگاهی و در شرایط تانک (سال ۱۳۸۳)

باکتری	فرمالین		اسید استیک		اسید سیتریک		کلر هگزیدین		یدور سدیم		پرمنگنات پتاسیم		هیپوکلریت سدیم		سترپاید ث	
استرپتوکوکوس اینیایی منطقه‌ای	غلظت	زمان/دقیقه	غلظت	زمان/دقیقه	غلظت	زمان/دقیقه	غلظت	زمان/دقیقه	غلظت	زمان/دقیقه	غلظت	زمان/دقیقه	غلظت	زمان/دقیقه	غلظت	زمان/دقیقه
سویه ۱۳۸۱	۱۸۰	۶۰	۳۵۰	۳۰	۵۰۰	۳۰	۱	۱۰	۵۰	۳۰	۵	۳۰	۳	۱۵	۳	۳۰
	۲۰۰	۶۰	۵۰۰	۳۰	۷۵۰	۳۰	۳	۱۰	۶۰	۳۰	۱۰	۳۰	۵	۱۵	۵	۳۰
	۲۲۰	۴۵	۷۵۰	۱۵	۱۰۰۰	۱۵	۵	۱۰	۷۰	۱۵	۲۰	۳۰	۱۰	۱۰	۱۰	۱۵
	۲۵۰	۳۰	۱۰۰۰	۱۵	۱۲۵۰	۱۵	۱۰	۵	۸۰	۱۵	۳۰	۱۵	۲۰	۱۰	۲۰	۱۵
سویه ۱۳۸۲	۱۸۰	۶۰	۳۵۰	۳۰	۵۰۰	۳۰	۱	۱۰	۵۰	۳۰	۵	۳۰	۳	۱۵	۳	۳۰
	۲۰۰	۴۵	۵۰۰	۱۵	۷۵۰	۱۵	۳	۱۰	۶۰	۱۵	۱۰	۳۰	۵	۱۰	۵	۱۵
	۲۲۰	۳۰	۷۵۰	۱۵	۱۰۰۰	۱۵	۵	۵	۷۰	۱۵	۲۰	۱۵	۱۰	۱۰	۱۰	۱۵
	۲۵۰	۳۰	۱۰۰۰	۱۵	۱۲۵۰	۱۵	۱۰	۵	۸۰	۱۵	۳۰	۱۵	۲۰	۵	۲۰	۱۵
سویه ۱۳۸۳	۱۸۰	۶۰	۳۵۰	۳۰	۵۰۰	۳۰	۱	۱۰	۵۰	۳۰	۵	۳۰	۳	۱۵	۳	۳۰
	۲۰۰	۶۰	۵۰۰	۳۰	۷۵۰	۳۰	۳	۱۰	۶۰	۳۰	۱۰	۳۰	۵	۱۵	۵	۳۰
	۲۲۰	۴۵	۷۵۰	۱۵	۱۰۰۰	۱۵	۵	۱۰	۷۰	۳۰	۲۰	۳۰	۱۰	۱۵	۱۰	۱۵
	۲۵۰	۴۵	۱۰۰۰	۱۵	۱۲۵۰	۱۵	۱۰	۵	۸۰	۱۵	۳۰	۱۵	۲۰	۱۰	۲۰	۱۵
سویه ۱۳۸۳ (در شرایط تانک)	۲۰۰	۴۵	۵۰۰	۳۰	۷۵۰	۳۰	۳	۱۵	۶۰	۴۵	۱۰	۳۰	۵	۳۰	۵	۳۰

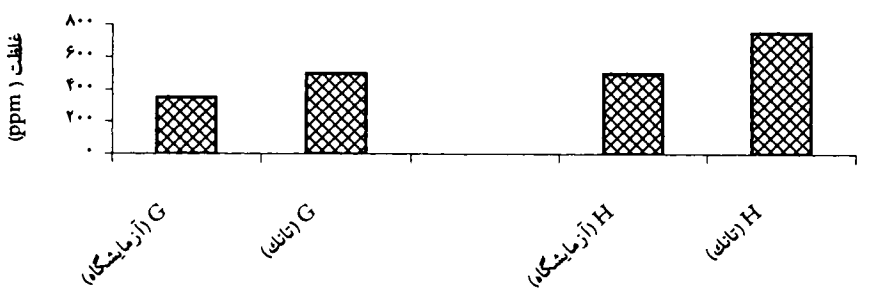
magiran.com



نمودار۱: مقایسه حداقل غلظت/ زمان موثر ضد عفونی‌کننده‌های کلرهگزیدین (A)، پرمنگنات پتاسیم (B)، هیپوکلریت سدیم (C) و ستریماید ث (D) در شرایط آزمایشگاه و تانک‌های پرورش بر باکتری استرپتوکوکوس اینیایی جدا شده در فاصله سالهای۱۳۸۳-۱۳۸۱



نمودار۲: مقایسه حداقل غلظت/ زمان موثر ضدعفونی کننده‌های فرمالین (E) و یدور سدیم (F) در شرایط آزمایشگاه و تانک‌های پرورش بر باکتری استرپتوکوکوس اینیایی جدا شده در فاصله سال‌های۱۳۸۳-۱۳۸۱



نمودار۳: مقایسه حداقل غلظت/ زمان موثر(۳۰ دقیقه) ضد عفونی‌کننده‌های اسید استیک (G) و اسید سیتریک (H) در شرایط آزمایشگاه و تانک‌های پرورش بر باکتری استرپتوکوکوس اینیایی جدا شده در فاصله سال‌های۱۳۸۳-۱۳۸۱

magiran.com

بحث

شاید بتوان گفت اولین سد دفاعی در برابر ورود اجرام بیماریزا بخصوص در کشورهایی که برنامه واکسیناسیون مشخص وجود ندارد بحث ضد عفونی باشد (Stickney, 2000). حضور عوامل مداخله‌گر، ساختارهای استخرهای پرورش، تانک‌ها و سرچشمه‌های تأمین آب همچنین ملاحظات محیطزیستی و کمبود اطلاعات از میزان مؤثر مواد ضد عفونی‌کننده، کاربرد آنها را در صنعت آبزی‌پروری با مشکلات بسیاری روبرو کرده است. درخصوص تأثیر ضد عفونی‌کننده‌ها بر باکتری استرپتوکوکوس بیماریزای ماهی اطلاعاتی در دسترس نمی‌باشد. این تحقیق نشان داد ضد عفونی‌کننده‌های رایج تأثیرات متنوعی را بر روی باکتری مورد نظر دارند.

در این تحقیق مقدار ۱۸۰ ppm فرمالین در یک ساعت توانست تمام باکتریها را در شرایط آزمایشگاهی و مقدار ۲۰۰ ppm در ۴۵ دقیقه در شرایط تانک، باکتریهای استرپتوکوکوس اینیایی را از بین ببرد. میزان توصیه شده فرمالین علیه باکتریها ۲۵۰ ppm برای یکساعت (Noga, 2000 ; Salvesen & Vadstein, 1997) و برای تجهیزات از ۲۷ تا ۲۲۰ ppm بمدت ۸ ساعت توصیه شده است (Favero & Bond, 1991). حداقل غلظت مهارکننده رشد فرمالدئید بر علیه آنتروکوکوس و استافیلوکوکوس بین ۳۰ تا ۶۰ ppm عنوان شده است (Aerestrup & Hasman, 2004).

کلرهگزیدین بمیزان ۱ ppm در مدت ۱۰ دقیقه در شرایط آزمایشگاه و ۳ ppm بمدت ۱۵ دقیقه استرپتوکوکوس اینیایی را متوقف ساخت. این نتیجه با نتایج Hugo & Russell, 1998 که غلظت مؤثر کلرهگزیدین بر علیه برخی کوکسی‌های گرم مثبت را ۰/۵ تا ۱ ppm بمدت ۵ دقیقه بدست آورده‌اند، مطابقت دارد.

حداقل غلظت کشنده کلر هگزیدین بر علیه سویه‌های بالینی باکتری استرپتوکوکوس موتانس را ۱ ppm بمدت ۵ دقیقه گزارش نموده‌اند (Järvinon *et al.*, 1993) و علیه آنتروکوکوس فیکالیس در شرایط آزمایشگاهی ۲ ppm بمدت ۱۰ دقیقه ذکر شده است (Aerestrup & Hasman, 2004). باید توجه داشت که تأثیر این ضد عفونی‌کننده تحت تأثیر مواد آلی بشدت کاهش می‌یابد (McDonnell & Russell, 1999)، بهمین دلیل میزان بیشتری از این ضدعفونی کننده در شرایط تانک لازم است.

در این تحقیق هیپوکلرید سدیم در غلظت ۳ ppm و ۱۵ دقیقه در شرایط آزمایشگاهی و ۵ و ۳۰ ppm دقیقه باکتری استرپتوکوکوس اینیایی را در شرایط تانک از بین برد. تحقیقات انجام شده قبلی نشان داد این ضد عفونی‌کننده قوی با غلظت ۲۵ تا ۱۰۰ ppm بمدت یک دقیقه توانسته است صد در صد باکتریهای استافیلوکوکوس آرئوس را از بین ببرد (Vimla *et al.*, 1997) و غلظتهای ۵ تا ۱۰ ppm کلر آزاد در مدت حداکثر ۱۵ دقیقه تمام باکتریها را می‌کشد (Ruttula & Weber, 1997).

یدور سدیم با غلظت ۸۰ ppm بمدت ۳۰ دقیقه بر علیه آنتروکوکهای روده مؤثر بوده است (Hays *et al.*, 1987) و دیگر محققین غلظتهای ۶ تا ۱۳ ppm ید بمدت ۳ تا ۱۵ ثانیه در pH خنثی را جهت کاهش ده برابری سلولهای زنده گزارش نموده‌اند (Mosley *et al.*, 1976). در این تحقیق غلظت ۵۰ و ۶۰ ppm یدور سدیم در مدت ۳۰ و ۴۵ دقیقه بترتیب در شرایط آزمایشگاهی و تانک توانستند باکتری استرپتوکوکوس اینیایی را از بین ببرند.

حداقل غلظت مهارکننده رشد آنتروکوکوس فیکالیس و همچنین استافیلوکوکوس آرئوس توسط سترمایدث کمتر از ۲ ppm گزارش شده است (Bamber & Ned, 1999) و در گزارش دیگری ۰/۲۵ تا ۲ ppm از این ضد عفونی‌کننده استافیلوکوکوس آرئوس را از بین برد (Suller & Russel, 2000). در این تحقیق غلظت ۳ و ۵ ppm سترمایدث در زمانهای ۳۰ دقیقه بترتیب در شرایط آزمایشگاهی و تانک توانستند باکتری استرپتوکوکوس اینیایی را از بین ببرند. این نتیجه در عین حالی که بلحاظ غلظت با نتایج قبلی مطابقت دارد، به طور دقیق زمان مورد نیاز و اختصاصاً در مورد باکتری عامل بیماری استرپتوکوکوس ماهی، غلظت‌های مؤثر را مشخص نمود.

در این تحقیق غلظتهای ۵ و ۱۰ ppm پرمنگنات پتاسیم در مدت ۳۰ دقیقه بترتیب در شرایط آزمایشگاهی و تانک

magiran.com

باکتریهای استرپتوکوکوس اینیایی را نابود ساخت. پرمنگنات پتاسیم بعنوان ضد انگل با غلظتهای ۲۰ ppm بمدت یکساعت و ۲ تا ۵ ppm برای طولانی مدت برای مبارزه با انگلهای ماهی عنوان شده است (Stoskopf, 1993). این ضد عفونی‌کننده کمتر برای عوامل باکتریایی در آبزی‌پروری مطرح شده است. نتایج تحقیق حاضر تأثیر مؤثر این دارو برای ضد عفونی آب و تجهیزات و وسایل علیه بیماری استرپتوکوکوزیس را نشان می‌دهد.

باکتری استرپتوکوکوس اینیایی در pH ۴/۵ و کمتر رشد نمی‌نماید (مظلومی، ۱۳۸۲ و اخلاقی و کشاورزی، ۱۳۸۲). بهمین دلیل اسید استیک و اسید سیتریک در شرایط آزمایشگاهی و تانک در این تحقیق مورد استفاده قرار گرفتند و توانستند بترتیب در غلظتهای ۳۵۰ و ۵۰۰ ppm در شرایط آزمایشگاهی و ۵۰۰ و ۷۵۰ ppm در شرایط تانک در مدت نیم ساعت باکتری عامل بیماری استرپتوکوکوزیس را از بین ببرند. حداقل غلظت ۱۰۰۰ ppm اسید استیک برای کشتن باکتریهای گرم مثبت از جمله استافیلوکوکوس و آنتروکوکوس توصیه شده است (Rhee *et al.*, 2003) که با در نظر گرفتن مقدار مؤثر بر باکتری این اسیدهای ضعیف در شرایط تانک مقدار گزارش شده نزدیک به نتایج بدست آمده از تحقیق جاری است.

نتایج بدست آمده از این تحقیق غلظت مورد نیاز و زمان مؤثر چند ضد عفونی‌کننده رایج و با آسیب کمتر به محیط زیست را منعکس می‌نماید تا کمکی به برنامه‌های پیشگیری و کنترل بیماریهای عفونی از جمله بیماری استرپتوکوکوزیس باشد. بدلیل حضور عوامل مداخله‌گر در شرایط تانک از جمله میکروارگانیسمهای دیگر و مواد آلی، نیاز به غلظت بیشتری می‌باشد. اگر چه بیماری استرپتوکوکوزیس بیماری عفونی سیستمیک است، بکارگیری ضد عفونی‌کننده‌ها در آب محیط زندگی این ماهی‌ها مستقیماً نمی‌تواند علیه بیماری مؤثر باشد ولی در کاهش تعداد باکتری در آب، در استخر و همچنین استفاده از آنها در اقدامات پیشگیری و کنترلی مزارع مفید و مؤثر است.

تشکر و قدردانی

از آقایان دکتر شکر فروش و دکتر رجائیان که در طول این تحقیق همکاریهای فراوان نمودند و همچنین از کارکنان بخش بهداشت و بیماریهای آبزیان تشکر و قدردانی می‌شود.

منابع

اخلاقی، م. و کشاورزی، م . ، ۱۳۸۲. وقوع استرپتوکوکوزیس در مزارع پرورش قزل‌آلای استان فارس. مجله تحقیقات دامپزشکی ایران. دوره ۳، شماره ۲، صفحات ۱۸۹تا ۱۸۲.

قیاسی، م. ؛ زاهدی، آ. و رستمی، ح. ، ۱۳۷۹. بروز اپیدمی استرپتوکوکوزیس در ماهیان مولد قزل‌آلای رنگین کمان در استان مازندران. اولین همایش بهداشت و بیماریهای آبزیان، اهواز، ۵۳ صفحه.

مظلومی، س.م. ، ۱۳۸۲. استرپتوکوکوز/ آنتروکوکوز بیماری مهم اقتصادی در پرورش ماهی. انتشارات نوید شیراز. ۹۴ صفحه.

Aerestrup, F.M. and Hasman, H. , 2004. Suseptibility of different bacterial species isolated from food animals to cooper sulphate, zinc chloride and antimicrobial substrates used for disinfection. Vet. Microbiol. Vol.100, pp.83-89.

Bamber, A.L. and Ned, J.J. , 1999. An assessment of cetrimide suseptibility in methcillin-resistant and methcillin-sensitve *Staphylococcus aureus* and feacal Entrococcus. Journal of Hos. Infec. Vol. 41, pp. 107-109.

Bragg, R. ; Todd, J.M. ; Lordan, S.M. and Combrink, M.E. , 1989. A selective procedure for the field isolation of pathogenic *Streptococcus sp.* of rainbow trout (*Salmon gairdneri*). Journal of Vet. Med. Vol. 56, pp.179-184.

magiran.com

Favero, M.S. and Bond, W.W. , 1991. Sterilization, disinfection and antiseptics in the hospital. *In:* (ed. A. Balows), manual of clinical, icrobiology, 5th Ed., American Society for Microbiology, Washington, D.C., USA. pp.183-200.

Harrigan, W.F. and McCance, M.E. , 1990. Laboratory methods in food and dairy microbiology. Academic Press, London, UK. pp.92-95.

Hays, H. ; Eriker, P.R. and Sandine, W.E. , 1987. Microbial destruction by hypochlorite and iodophor germicidesin alkaline and acidified water. App. Microbiol. Vol. 15, pp.575-581.

Hoshina, T. ; Sano, T. and Morinoto, Y. , 1958. A streptococcos pathogenic to fish. Journal of Tokyo Univ. Fish. Vol. 44, pp.57-68.

Hugo, W. B. and Russell, A.D. , 1998. Types of antimicrobial agents. *In:* (eds. A.D. Russell; W.B. Hugo and G.A.J. Ayliffe), Principles and practice of disinfection, preservation and sterilizeation, 3rd ed. Blackwell Science, Oxford, England. pp.121-142.

Järvinen, H. ; Tenovuo, J. and Huovinen P. , 1993. *In vitro* suseptibility of *Streptococcus mutans* to chlorhexidine and six other antimicrobial agents. Antimicrob. agents chemother. Vol. 37, pp.1158-1165.

McDonnell, G. and Russell, A.D. , 1999. Antiseptic and disinfectant: Activity, action and resistance. Clin. Microbiol. Rev. Vol. 12, pp.147-179.

Mosley, E.B. ; Elliker, P.R. and Hays, H. , 1976. Destruction of pathogenic organisms by various germicides in solution and stainless steal surface. Journal of Milk Food Technol. Vol. 39, pp.830-836.

Noga, E.J. , 2000. Fish diseases; Diagnostic and treatment. Iowa State University Press, Amesterdam. pp.271-299.

Rhee, M.S. ; Lee, S.Y. ; Dougherty, R.H. and Kang, D.H. , 2003. Antimicrobial effect of mustard flour and acetic acid against *Escerichia coli* O157:H7,*Staphylococcus aureus* and feacal enterococci. App. Envir. Microbiol. Vol. 69. pp.2959-2963.

Ruttula, W.B. and Weber D.J. , 1997. Uses of inorganic hypochlorite (bleach) in health–care facilities. Appl. Environ. Microbiol. Vol. 60, pp.2462-2466.

Salvesen, I.G. and Vadstein, O. , 1997. Surface disinfection of Atlantic halibut and turbot ponds with aldehydes, evaluation of concentration and contact times. Aquac. Int. Vol. 5, pp.249-258.

Soltani, M. ; Jamshidi, S.H. and Sharifpour, I. , 2005. Streptococcosis caused by *Streptococcus iniae* in farmed rainbow trout (*Oncorhynchys mykiss*) in Iran: Biophysical characteristics and pathogenesis. Bull. Eur. Assoc. Fish Pathol. Vol. 25. pp.91-95.

Stickney, R.R. , 2000. Encyclopedia of Aquaculture. John Willey & Sons Inc. pp.226-228.

Stoskopf, M.K. , 1993. Fish medicine. W. Bsaunders Co., London, UK. pp.835-839.

Suller, M.T. and Russell, A.D. , 2000. Cetrimide and antibiotic resistance in *Staphylococcus aureus*. Journal of Antimicrob. Chemother. Vol. 46, pp.11-18.

magiran.com

Vimla, M.P. ; Ramadas, B. and Balajis, B. , 1997. Bacterial efficiency of sodium hypochlorite against common pathogens. Indian Vet. J. Vol. 274, pp.123-127.

Woo, P.T.K. and Bruno, D.W. , 1999. Fish diseases and disorders, Vol. 3. CABI publishing, New York, USA. pp.303-319.

magiran.com

Efficacy of conventional disinfectants on isolated *Streptococcus iniae* from diseased rainbow trout in laboratory and culture tank conditions

Tabandeh M.R. and Akhlaghi M.*

akhlaghi@shirazu.ac.ir

Aquatic Animal Health Unit, School of Veterinary Medicine, P.O.Box: 71345-1731

Shiraz, Iran

Received: March 2006 Accepted: July 2007

Keywords: Disinfectants, *Streptococcus iniae*, Rainbow trout

Abstract

The efficacy of different disinfectants (formalin, acetic acid, citric acid, chlorhexidine, sodium iodide, potassium permanganate, sodium hypochlorite and cetrimide-c) was examined on *Streptococcus iniae*, isolated from diseased fish of Fars province over the years 2002-2004. In laboratory condition, minimum bactericidal concentration of disinfectants after 15, 30, 45 and 60 minutes were evaluated. Disinfectants were also tested under natural conditions with addition of a known concentration of bacterial suspension into water. An effective concentration of each disinfectant that had been determined in the first part of this study was added to the culture tanks and water samples were collected after 15, 30, 45 and 60 minutes to evaluate streptococcus isolation. A 3-5ppm concentration of chlorhexidine and sodium hypochlorite were powerful disinfectants against *Streptococcus iniae*. Acetic acid and citric acid were efficient in a concentration ranging between 350-500ppm showing very weak disinfectant activity against *Streptococcus iniae*. Results of tank tests showed that a bio-film is formed in the tanks may have significant effect on lowering the efficiency of disinfectants, thus most disinfectants were only effective at a higher concentration. Generally, sodium iodide and sodium hypochlorite were more efficient against *Streptococcus iniae* in tank condition than other disinfectants.

* Corresponding author