

# جداسازی و شناسایی ارگانیس‌های شبیه فلاوباکتر کلومنار از جراحات ماهی کپور علفخوار پرورشی (*Ctenopharyngodon idella*)

## و مطالعه ضایعات بافتی ناشی از آن در برخی مزارع پرورشی استان خوزستان

فریبا اسماعیلی<sup>(۱)</sup>؛ عیسی شریف پور<sup>(۲)</sup> و مهدی سلطانی<sup>(۳)</sup>

Fesmaeili@yahoo.com

۱- موسسه تحقیقات شیلات ایران، تهران صندوق پستی: ۶۱۱۶-۱۴۱۵۵

۲- گروه بهداشت و بیماری‌های آبزیان، دانشکده دامپزشکی دانشگاه تهران،

تهران صندوق پستی: ۶۴۵۳-۱۴۱۵۵

تاریخ پذیرش: خرداد ۱۳۸۳

تاریخ ورود: تیر ۱۳۸۲

### چکیده

با مشاهده تلفات بالای ۴۰ درصد در ماهیان کپور علفخوار پرورشی (*Ctenopharyngodon idella*) در مزارع پرورشی شمال استان خوزستان در فصل تابستان و زمانی که دمای آب استخرها بالاتر از ۲۰ درجه سانتیگراد بود (۲۰ تا ۲۳ درجه سانتیگراد)، بررسی علایم بالینی در ماهیان انجام پذیرفت. در ماهیان بیمار، جراحات پوستی با حواشی پرخون در ناحیه پشتی، باله‌ها، ساقه دم و آبشش‌ها مشاهده شد که جراحات آبشش دارای لایه اکسودای موکوییدی سفید تا خاکستری رنگ بود و خوردگی باله دم و شکمی نیز مشاهده گردید. پس از نمونه‌برداری و کشت از زخم‌های پوستی و حواشی آنها، ساقه دم، باله دم و آبشش‌ها، باکتری شبیه فلاوباکتر کلومنار جدا گردید، ولی از کشت اندام‌های داخلی نظیر کلیه، کبد و روده این باکتری جدا نگردید. آسیب‌های بافتی آبشش‌ها در مقاطع میکروسکوپی تهیه شده شامل: پرخونی، خونریزی، تورم لایه پایه، هیپرپلازی سلولهای غضروفی و سلولهای پوششی و چسبیدن رشته‌ها به یکدیگر، نکروز و کنده شدن رشته‌های ثانویه و حضور توده باکتری‌های رشته‌ای در آبشش بود. همچنین آسیب‌های بافتی ساقه دم شامل نکروز لایه‌های پوست و توسعه جراحات به نواحی عضلات زیرپوست، دژنراسیون سلولهای عضلانی و نکروز دستجات عضلانی مشاهده شد. مشاهده تعداد زیاد باکتری لغزنده رشته‌ای گرم منفی شبیه فلاوباکتر کلومنار در گسترش‌های تهیه شده از جراحات پوستی و آبشش و جداسازی باکتری فوق‌الذکر در سطح محیط کشت انتخابی، مشاهده آسیب‌های شدید بافتی در جراحات و زخم‌ها همراه با حضور توده باکتری‌های رشته‌ای موید این موضوع است که باکتری جدا شده فوق‌الذکر می‌تواند در بروز عفونت مذکور بعنوان عامل اولیه و یا ثانویه نقش داشته باشد.

**لغات کلیدی:** باکتری، کپور علفخوار، *Ctenopharyngodon idella*، فلاوباکتر کلومنار، استان خوزستان

**مقدمه**

یکی از علل عمده تلفات در استخرهای پرورش متراکم، عفونت‌های باکتریایی پوست و آبشش است که عوامل متعددی از جمله گونه‌هایی از فلاوباکترها و فلکسی باکترها بویژه فلاوباکتر کلومناز، فلاوباکتر برانکیوفیلا و فلاوباکتر سایکروفیلا در آن نقش دارند (سلطانی، ۱۳۸۰). ماهیان بیمار علایمی از قبیل کم اشتها، تیرگی رنگ بدن، تغییر حالت شنا، تنفس سریع، آبشش‌های چسبیده بهم همراه با مخاط زیاد روی سطح آنها و قرار گرفتن ماهی در جریان شدید آب را نشان می‌دهند. در این بیماری حضور باکتریها و افزایش مخاط روی سطح آبشش می‌تواند مانع مبادله اکسیژن شده و تنفس را برای ماهی دشوار سازد (سلطانی، ۱۳۸۰؛ مخیر، ۱۳۶۷؛ Roberts, 2001 ; Roberts, 1978).

بسته به شرایط کیفی آب، تغذیه و روش پرورش، بیماری در درجه حرارت‌های متفاوت و از گونه‌های مختلف ماهیان آب شیرین از جمله کپور ماهیان (کپور معمولی) و نیز از مناطق مختلف دنیا گزارش شده است (سلطانی، ۱۳۸۰؛ Farkas & Ollah, 1986). در ایران نیز برخی عفونت‌های ناشی از این باکتریها گزارش شده است که از آن جمله می‌توان به بروز عفونت شبیه فلاوباکتریایی از مزارع قزل‌آلا توسط سلطانی (۱۳۸۰) و اسماعیلی و کر (۱۳۷۷) اشاره نمود. این بیماری برای اولین بار در شوروی توسط Achmerov, 1957 Cited in Schreckenbach *et al.*, 1975 و سپس Miaozyński (1966) گزارش شده است. در مورد علل شیوع و تلفات این بیماری در کپورهای پرورشی اروپا نظریه‌های متفاوتی وجود دارد که این نظریات شامل منشاء عفونی و غیرعفونی این بیماری است.

بروز ضایعات باکتریایی در ماهیان کپور علفخوار پرورشی در برخی مزارع پرورشی استان خوزستان موجب تلفات زیادی بویژه در دمای بالای ۲۰ درجه سانتیگراد (۲۰ تا ۲۳ درجه سانتیگراد) آب شده که گاهی اوقات بیش از ۴۰ درصد مرگ و میر ماهی‌ها را موجب گردیده است (اسماعیلی و کر، ۱۳۷۷). لذا این تحقیق به منظور بررسی ضایعات سطوح خارجی بدن و آبشش ماهی کپور علفخوار پرورشی در استان خوزستان با استفاده از روش‌های باکتری‌شناسی و آسیب شناسی بافتی انجام پذیرفت تا علت بروز بیماری مشخص شود.

**مواد و روش کار**

در این بررسی ۸۰ عدد ماهی کپور علفخوار پرورشی در حال مرگ با دامنه طولی ۱۰/۷ تا ۳۸/۵ سانتیمتر و دامنه وزنی ۷/۷ تا ۶۳۶ گرم از استخرهای پرورشی در مزارع پرورشی شمال استان خوزستان در دمای ۲۰ تا ۲۳ درجه سانتیگراد صید و به آزمایشگاه بیماریهای آبزیان مرکز تحقیقات شیلاتی استان خوزستان منتقل شدند. ابتدا وضعیت باله‌ها، پوست، آبشش و ساقه دم بررسی و از جراحات سطحی و آبشش‌ها گسترش‌های مرطوب تهیه گردید و به روش گرم (Hucker Cited in Frerich & Millar, 1993) (سلطانی و همکاران، ۱۳۸۳)، رنگ‌آمیزی شدند. از آنجا که در گسترش‌های مرطوب رشته‌های باریک با حرکات سر خورنده و در گسترش‌های رنگ‌آمیزی شده رشته‌های گرم منفی میله‌ای فراوانی مشاهده گردید، لذا اقدام به کشت باکتریایی از حاشیه جراحات پوستی و آبشش روی محیط انتخابی آگار سایتوفاگا گردید. بعلاوه از اندامهای داخلی روی محیط آگار

تریپتون سویا نیز کشت داده شد. از پرگنه‌های رشد یافته در دمای  $20 \pm 2$  درجه سانتیگراد به مدت ۷۲ ساعت گسترش تهیه شد و همچنین آزمایشهای کاتالاز، حرکت، تولید سولفیت، تشکیل حلقه اندول، اکسیداز، احیاء نیترات، ذوب ژلاتین، تولید اسید از گلوکز، مانیتول، سالیسین و سوکروز، اکسیداسیون و تخمیر گلوکز در دماهای ۴، ۲۸ و ۳۸ درجه سانتیگراد انجام شد.

به منظور مطالعه آسیب‌شناسی ضایعات موجود، از پوست، عضله و بافت آبشش ضایعه دیده نمونه‌برداری و در فرمالین ۱۰ درصد تثبیت گردید (Roberts, 1978 ; Roberts, 2001). نمونه‌های بافت آبشش و پوست به مدت ۲۴ ساعت در محلول ۱۰ درصد EDTA برای کلسیم‌زدایی نگهداری شده و پس از تثبیت بافتها در فرمالین، به مدت ۶ تا ۱۰ ساعت جهت شستشو در آب جاری قرار داده شدند. مراحل آبیگری، شفاف‌سازی و آغشتگی بافت با پارافین با استفاده از دستگاه خودکار آماده‌سازی بافت Automatic tissue processor, (Shandon 1000) انجام شد. پس از قالب‌گیری نمونه‌ها، برش‌هایی به ضخامت ۵ میکرون با استفاده از میکروتوم دورانی (Shandon lip Shaw Y-93042) تهیه و به روش هماتوکسیلین-آئوزین و گیمسا رنگ‌آمیزی شده و با میکروسکوپ نوری مورد مطالعه و بررسی قرار گرفتند.

## نتایج

در مشاهدات بالینی ماهیهای بیمار، جراحات در ناحیه پشتی، آبشش‌ها، باله‌ها و ساقه دم مشاهده گردید که جراحات سطحی دارای حاشیه‌های پرخون و جراحات آبشش دارای لایه اکسودای موکوییدی سفید تا خاکستری رنگ بودند. همچنین خوردگی باله دم و شکمی قابل مشاهده بود. در لامهای مرطوب تهیه شده از محل جراحات تعداد قابل توجه از باکتریهای رشته‌ای سرخ‌رونده مشاهده گردید که در رنگ‌آمیزی گرم به صورت میله‌ای، کشیده و گرم منفی بودند. در کشت باکتریایی بر روی محیط آگار سیتوفاگا پرگنه‌های باکتریایی متفاوتی رشد کرده بود که پرگنه‌های نازک با لبه‌های مژرس و گرم یا سفید رنگ در رنگ‌آمیزی گرم شبیه باکتری‌های رشته‌ای بودند که در گسترش‌های مستقیم از آبشش و ضایعات پوستی تهیه شده بود، لذا تنها اقدام به خالص‌سازی و شناسایی این نوع باکتریها گردید. نتایج کشت باکتریایی از اندامهای داخلی منفی بود. براساس بررسی مشخصات بیوشیمیایی باکتریهای جدا شده (جدول ۱) می‌توان آنها را سویه‌هایی مشابه فلاوباکتر کلومنار قلمداد نمود.

در مطالعه آسیب‌شناسی مقاطع میکروسکوپی تهیه شده از جراحات بافتی آبشش، پوست، ساقه دم و باله‌ها، ضایعات بافتی به شرح زیر مشاهده شد:

در آبششها پرخونی، خونریزی، تورم لایه پایه، هیپرپلازی سلولهای غضروفی و سلولهای پوششی، چسبیدن، نکروز و کنده شدن رشته‌های ثانویه دیده شد (شکل‌های ۱ و ۲). همچنین توده زیاد باکتری‌های میله‌ای در رشته‌های آبششی مشاهده گردید (شکل ۳).

در نواحی اطراف جراحات ساقه دم، نکروز لایه‌های پوست و آسیب نواحی عضلانی زیر پوست، دژنراسیون سلولهای عضلانی و نکروز دستجات عضلانی و همچنین حضور توده‌های باکتریایی مشاهده شد (شکل ۴).

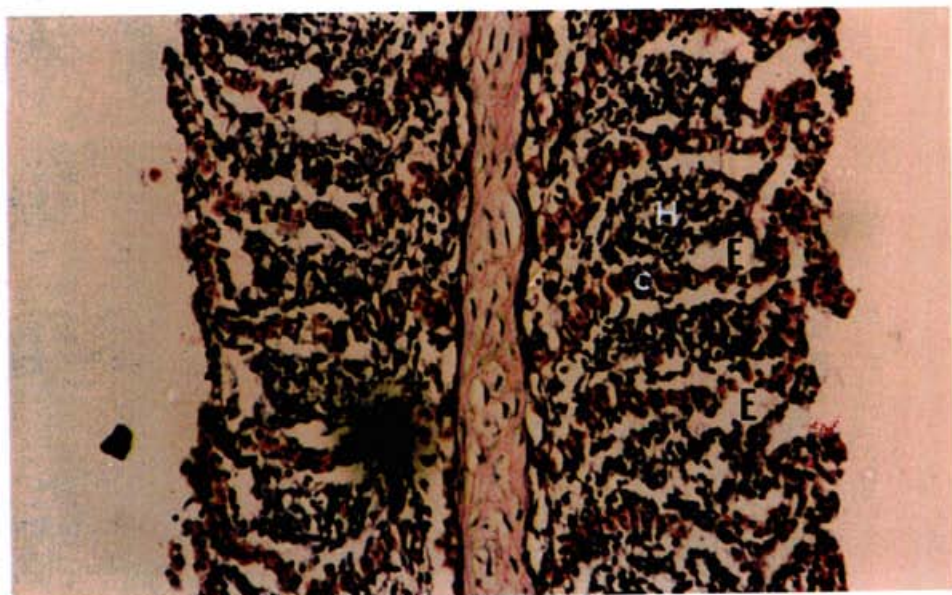
جدول ۱: نتایج آزمایش‌های بیوشیمیایی بروی باکتری‌های میله‌ای جدا شده از محل جراحات سطحی، پوست و آبشش ماهی کپور علفخوار

آزمایش‌ها	باکتری جدا شده در این مطالعه	فلاوباکتر کلومناز (Kuo <i>et al.</i> , 1980)	فلاوباکتر کلومناز (Austin & Austin, 1987)
رشد روی محیط آگار سائتوفاگا	خشک، ریزویدی و پنخش	خشک، ریزویدی و پنخش	---
رنگ کلنی	زرد	زرد	زرد
شکل باکتری	میله‌ای بلند	میله‌ای بلند	میله‌ای بلند
رنگ آمیزی گرم	گرم منفی	گرم منفی	گرم منفی
حرکت در محیط کشت	-	-	-
حرکت لغزنده	+	+	+
اکسیداز	+	d	+
کاتالاز	+	+	-
اندول	-	-	+
تولید هیدروژن سولفید	d	d	+
هیدرولیز ژلاتین	+	+	+
احیاء نیترات	d	d	---
تولید اسیداز:			
گلوکز	-	-	-
مانیتول	-	-	-
سالیسین	-	-	-
سوکروز	-	-	-
اکسیداسیون و تخمیر گلوکز	O/-	بدون واکنش	O/-
رشد در دمای:			
۴ درجه سانتیگراد	-	d	+
۲۸ درجه سانتیگراد	+	+	d
۳۸ درجه سانتیگراد	+	+	-

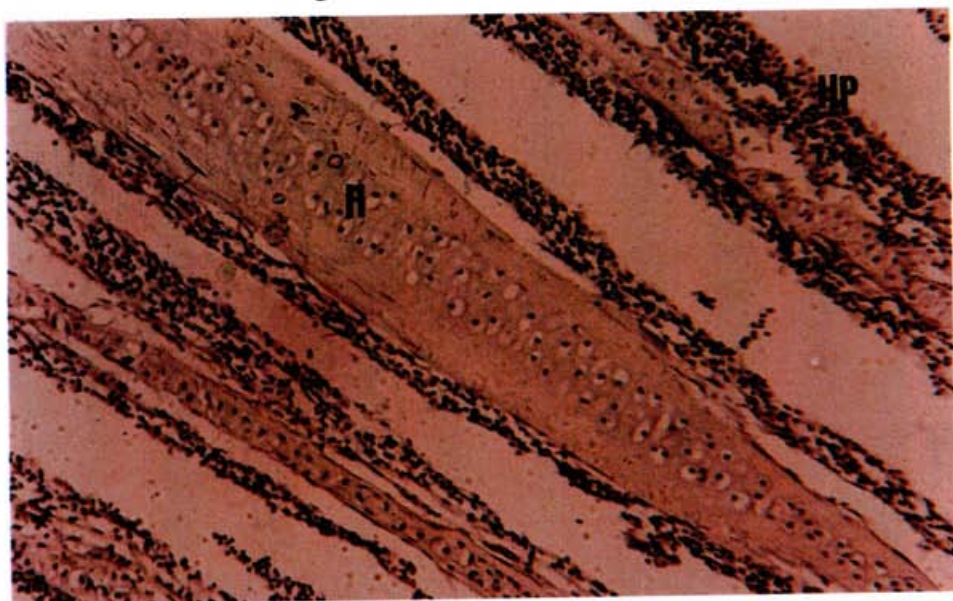
d - مواردی که نتایج متفاوت بدست آمده است.

O - اکسید کننده گلوکز در شرایط هوایی.

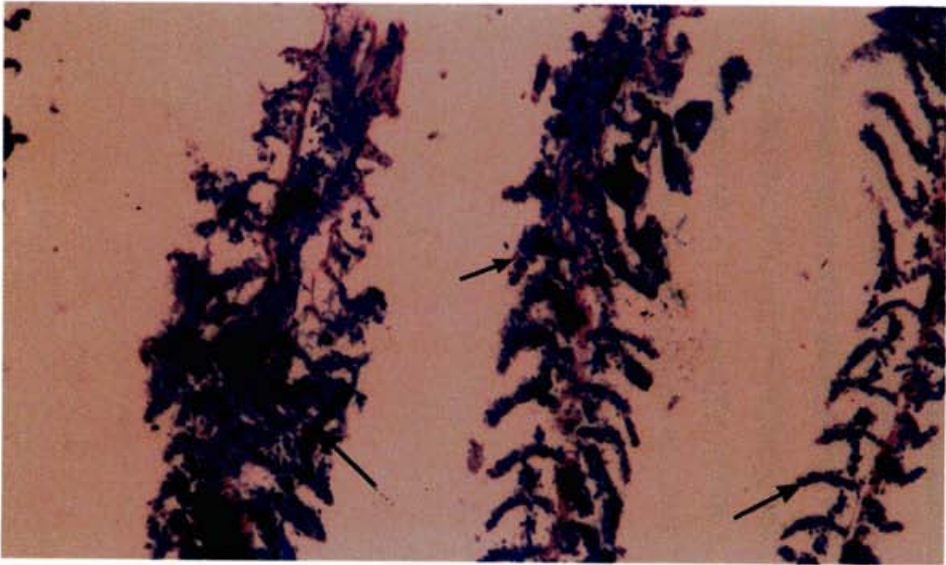
--- - نتیجه توسط نویسندگان ذکر نشده است.



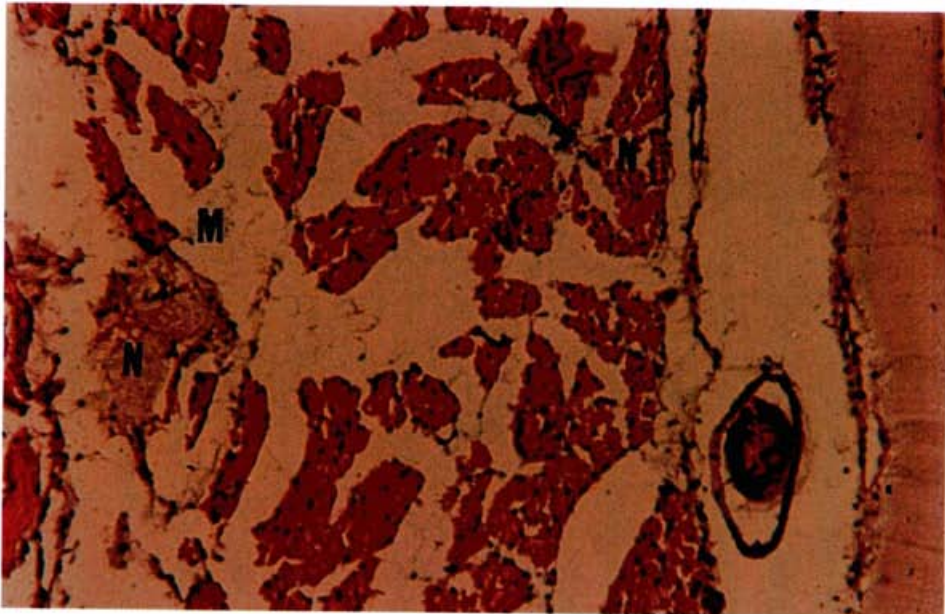
شکل ۱: پرخونی (C)، تورم غشاء پایه (E) و هیپرپلازی سلولهای پوششی (H) در رشته های ثانویه آبششی (رنگ آمیزی H & E - بزرگنمایی ۳۶۰)



شکل ۲: هیپرپلازی سلولهای غضروفی رشته های اولیه آبششی (H)، هیپرپلازی منطقه پری کندریوم (HP) و کنده شدن کامل رشته های ثانویه آبششی (رنگ آمیزی H & E - بزرگنمایی ۱۸۰)



شکل ۳: وجود توده‌های باکتریایی در رشته‌های آبشی (پیکان‌ها) و نکروز رشته‌های آبشی (رنگ آمیزی گیمسا، بزرگنمایی ۱۸۰)



شکل ۴: نکروز دسته‌جات عضلانی (N) و محو کامل بعضی دسته‌جات عضلانی در عضلات ساقه دمی که احتمالاً در اثر میوفازی توسط ماکروفاژها می‌باشد (M) (رنگ آمیزی H & E - بزرگنمایی ۹۰)

## بحث

نظریات متفاوتی در زمینه نکروز آبشش به وسیله محققین مختلف ارائه گردیده است. Schreckenbach (1975) و همکاران معتقدند که مسمومیت آمونیاکی با منشا داخلی و خارجی می‌تواند عامل مهمی در بروز بیماری نکروز آبشش باشد. (Farkas & Olah (1986) سه مرحله قابل تشخیص در بیماری نکروز آبشش ذکر کرده‌اند. مرحله اول که با استرس محیطی بخصوص تغییر آمونیاک، pH، دما، سموم و ... شروع می‌شود. این مرحله در دامنه وسیعی از درجه حرارت (۸ تا ۱۰ و ۲۰ تا ۲۵ درجه سانتیگراد) دیده می‌شود.

آبششها در بعضی اوقات قرمز تیره هستند و در مواردی نیز همراه با غلایم سفید رنگ یا کم رنگ همراه با خونریزی مشاهده می‌شود. در این مرحله فلاوباکترها در آبشش کم و یا اصلا مشاهده نمی‌شود.

در مرحله دوم، ضایعه به سبب اثرات استرسی بوجود آمده، به عفونت با فلاوباکترها تبدیل می‌شود و مهمترین عامل در این مرحله تغییر دمای آب می‌باشد که حداقل دمای ممکن برای بروز این وضعیت با عامل فلاوباکتر کلومنار، دمای ۲۰ درجه سانتیگراد می‌باشد. در این مرحله نقاط سفید رنگ روی آبشش ظاهر شده و آبششهای عفونی، رنگ چاکستری تیره بخود می‌گیرند که ناشی از مواد غیرآلی آب می‌باشد. در محل عفونت تعداد زیادی باکتری رشته‌ای حضور داشته و مرگ و میر در ماهیان محسوس می‌باشد. مرحله سوم این بیماری وقتی بوقوع می‌پیوندد که ماهی‌ها بعد از هجوم باکتریها زنده بمانند. در این هنگام فلاوباکترها با پوششی سفید مایل به خاکستری ناپدید می‌شوند و منطقه مورد هجوم باکتری نیز از شکل طبیعی خارج می‌گردد و گاهی اوقات نیمی از رشته‌های ثانویه آبششی بهم می‌چسبند. در یک جمعیت ماهی مراحل مختلفی از بیماری را می‌توان براحتی دید. (Anderson & Conroy (1969) کیور را جزء ۳۷ گونه مستعد به بیماری کلومناریس می‌دانند. اختلاف بین کیور و گونه‌های دیگر ماهی بخصوص آزاد ماهیان در این بیماری این است که ماهی کیور از مقاومت بیشتری برخوردار است.

طبق مطالعات Farkas & Olah (1981) بیماری خوردگی آبشش کیور بوسیله استرس‌های مختلف محیطی شروع می‌شود و در مرحله بعدی می‌توان هجوم باکتری‌های سرخ‌رنده را در ماهی دید. Pilarczyk (1977) با مطالعات آسیب‌شناسی که روی نکروز آبشش انجام داد به این نتیجه رسید که استرس می‌تواند علت ظهور اولین مرحله و هجوم باکتری‌ها علت مرحله دوم باشد.

(Frerichs & Millar (1993) اعتقاد دارند که ساختمان میکروسکوپی و ماکروسکوپی آبشش‌های طبیعی می‌تواند اساسی برای تشخیص تغییرات آسیب‌شناسی باشد.

(Kovacs-Gayer (1984) از لحاظ آسیب‌شناسی بافتی، نکروز آبششها را بررسی کرده و تغییرات را در چهار مرحله شرح داده است. در مرحله اول رشته‌های آبششی هیچ تغییری را نشان نمی‌دهند و در مرحله دوم آبششها متورم شده و سلولهای گرانولوسیته به تعداد زیاد در اپیتلیال رشته‌های آبششی دیده می‌شود. پرولیفراسیون

اپیتلیوم، چسبندگی رشته‌های آبشش، هیپرپلازی آنها و از بین رفتن کامل اپیتلیال در این مرحله مشاهده می‌شود. در مرحله سوم آبششها خاکستری رنگ هستند و بافت‌های اطراف شعاع‌های آبششی با مخاط پوشیده می‌شوند و گرانولوسیت‌ها نیز دیده می‌شوند. هیپرپلازی اپیتلیوم آبشش از راس رشته‌ها پیشرفت می‌کند و سلولهای اپیتلیوم در بعضی موارد تحلیل می‌روند. گرانولوسیت‌های انوزینوفیلی و هموراژی نیز مشاهده می‌شود. سلولهای مخاطی در ابتدا تکثیر می‌شوند و فلاوباکتر و دیگر باکتری‌ها طی این مرحله می‌توانند روی قسمت تغییر یافته دیده می‌شوند. تحلیل رفتن سلولهای اپیتلیوم باعث چسبندگی قسمت‌های مجاور به یکدیگر می‌گردد و فلاوباکتر در این مناطق تغییر یافته مشاهده می‌شود. در مرحله چهارم که نکروز آبششی دیده می‌شود آبششها خالی از هر گونه بافت پوششی می‌شوند و با شکستن رشته‌های آبششی ثانویه، آبششها دندان‌های بنظر می‌رسند. در انتها، تمامی مراحل قبلی به نکروز ختم می‌شوند و باعث تغییراتی در ساختمان آبششها شده و حجم آبششها بتدریج کاسته می‌شود. این روش در تشخیص مراحل اولیه نکروز آبشش مهم است. مراحل که طی انجام این تحقیق مشاهده شد با نتایج فوق مطابقت داشته است.

Fliss (1968) شکل حاد بیماری در ماهی کپور را بررسی نمود و در این رابطه آسیب‌شناسی بافتی را در مراحل اولیه نکروز آبششی مهم می‌داند. در مواردی نیز که بیماری شکل مزمن بخود می‌گیرد باکتری‌ها می‌توانند به تعداد زیادی ظاهر شوند. در این تحقیق باکتری شبیه فلاوباکتر کلومناز از جراحات پوستی و آبشش تمامی ماهیان کپور علفخوار در حال مرگ جدا گردید و این در زمانی که دمای آب بالاتر از ۲۰ درجه سانتیگراد بود، مشاهده شد. اختصاصات باکتری جدا شده از جراحات ماهی کپور علفخوار پرورشی در این مطالعه با گزارشهای ارائه شده در مورد عامل این بیماری تا حدود زیادی مطابقت دارد (Austin & Austin, ; Kuo et al. 1980, 1987, 1993). حداکثر تلفات در این بیماری در زمانی اتفاق افتاد که دمای آب بالاتر از ۲۰ درجه سانتیگراد بود. این موضوع ممکن است به این دلیل باشد که با افزایش درجه حرارت بر رشد و تکثیر و در نتیجه بر شدت باکتری افزوده می‌شود لذا باعث ایجاد ضایعات بافتی بیشتر و در نتیجه تلفات زیادتر می‌گردد. علت افزایش شدت و بیماری زایی برخی عوامل باکتریایی را می‌توان به رشد و تکثیر سریعتر آنها در دمای بالاتر نسبت داد. البته برخی گونه‌های فلاوباکتریایی/ فلکسی باکتریایی درگیر با شدت کم تنها در درجه حرارت ۲۰ درجه سانتیگراد و بالاتر بیماری‌زا می‌شوند (سلطانی، ۱۳۸۰). در این مطالعه، باکتری‌های میله‌ای گرم منفی از سطوح خارجی بدن و آبشش و زیر پوست در ناحیه ساقه دمی جدا گردید که این امر نشان دهنده این موضوع است که بدنبال شرایط استرس‌زا در استخرهای پرورشی این نوع باکتری‌ها می‌توانند براحتی تثبیت و بیماری‌زا شوند.

در این تحقیق جراحات بافتی در آبششها، سطوح خارجی بدن شامل پوست، باله‌ها و ساقه دمی و همچنین عضلات زیر پوست ساقه دمی مشاهده شد که در بررسی‌های میکروسکوپی آبششها، پرخونی، خونریزی، تورم لابه پایه، هیپرپلازی سلولهای غضروفی رشته‌های اولیه آبششی و سلولهای پوششی رشته‌های ثانویه، نکروز و



کنده شدن رشته‌های ثانویه آبششی و حضور توده باکتری میله‌ای دیده شد. نکروز رشته‌های آبششی در نواحی آسیب دیده بدون پاسخ آماسی که ممکن است دلیل انهدام سلولهای آماسی بوسیله سموم باکتریایی باشد، همچنین نکروز لایه‌های پوست و عضلات زیر پوست در منطقه ساقه دم و حضور باکتریهای میله‌ای در منطقه نکروزه ثبت گردید. کلیه علائم میکروسکوپی ثبت شده و نیز مراحل مختلف بیماری، حضور توده زیاد باکتری‌های رشته‌ای در محل جراحات، شبیه مشخصات بیماری است که توسط (Pilarczyk (1977)؛ Kovacs-Gayer (1975,1984) و Roberts (2001) و Kubota *et al.* (1985) و Farkas & Olah (1984,1986) و سلطانی (۱۳۸۰) به عنوان بیماری نکروز آبشش و بیماری کلومناریس توضیح داده شده‌اند.

با توجه به نتایج بدست آمده از این تحقیق و مقایسه آن با سایر تحقیقات مشابه، یکی از علل تلفات ماهیان کپور علفخوار پرورشی در مزارع پرورشی ماهی در استان خوزستان ممکن است ناشی از هجوم باکتری شبیه فلاوباکتر کلومنار باشد. در هر صورت مطالعات بیشتری نیاز است تا نقش دقیق این باکتری‌های رشته‌ای شبیه فلاوباکتریایی را در بروز اینگونه جراحات پوستی و نکروز آبشش در مزارع کپور علفخوار روشن سازد.

### تشکر و قدردانی

از جناب آقایان دکتر رضوانی، دکتر امیری‌نیا و مهندس کر و همچنین از همکاران محترم در بخش بهداشت و بیماریهای آبزیان مرکز تحقیقات شیلاتی استان خوزستان تشکر و قدردانی می‌گردد.

### منابع

- اسماعیلی، ف. و کر، ن. م. ، ۱۳۷۷. گزارش نهایی پروژه بررسی ضایعات باکتریایی در ماهیان پرورشی استان خوزستان. موسسه تحقیقات شیلات ایران. ۸۵ صفحه.
- سلطانی، م. ، ۱۳۸۰. بیماری‌های آزاد ماهیان. موسسه انتشارات و چاپ دانشگاه تهران. ۴۴۴ صفحه.
- سلطانی، م. ؛ شریف‌پور، ع. و قیاسی، م. ، ۱۳۸۳. جداسازی و شناسایی عوامل بیماری‌زای باکتریایی در ماهی. ترجمه انتشارات بین‌الملل شمس. ۹۵ صفحه.
- مخیر، ب. ، ۱۳۶۷. بیماریهای ماهیان پرورشی. موسسه انتشارات و چاپ دانشگاه تهران. ۳۶۹ صفحه.
- Anderson, J.L.W. and Conroy, D.A. , 1969. The pathogenic Myxobacteria with special reference to fish pathogens. Journal of Appl. Bact. Vol. 32, pp.30-39.
- Austin, B. and Austin, D.A. , 1987. Bacterial fish pathogens: Disease in farmed and wild fish. Ellis Horwood. 384P.

- Austin, B. and Austin, D.A. , 1993.** Bacterial fish pathogens: Disease in farmed and wild fish. Ellis Horwood. 384P.
- Farkas, J. , 1984.** *Flexibacter columnaris* in common carp (*Cyprinus carpio* L.). A comparative study of Hungarian and Dutch isolation of genus *Flexibacter*. Aquaculture. Vol. 5, pp.61-64.
- Farkas. J. and Ollah, J. , 1986.**Gill necrosis a complex of carp. Aquaculture. Vol. 58, pp. 17-26.
- Farkas, J. and Ollah, J. , 1981.** Occurrence, experimental infection and treatment of Myxobacterial gill disease of carp. 4<sup>th</sup> session of EIFAC (FAO), COPRAQ, Fish disease. Cadiz, Spain. 26-30. October, 1981.
- Fliss, J. , 1968.** Anatomic-histopathological changes in Carp (*Cyprinus carpio* L.). By Ammonia Water. 1-Effect of Toxic Concentration. Acta Hydrobiologica. Vol. 10, pp.205-224
- Frerichs, G.N. and Millar, S.D. , 1993.** Manual for the isolation and identification of fish bacterial pathogens. Institute of Aquaculture, University of Stirling, Pisces Press. Stirling, Scotland. 60P.
- Kovacs- Gayer, E. , 1975.** Studies on the gills of the fish, 1-Anatomy and the Microscopic Structure of gills of carp (*Cyprinus carpio* L.). Orszagos Allatgeesz Segugyi intezet. pp. 707-712.
- Kovacs- Gayer, E. , 1984.** Histopathological differential of gill changes with special regard to gill necrosis. Symposia biologica Hungarica. 23P.
- Kubota, S.S. ; Miyazaki, T. and Egusa, S. , 1985.** Atlas of Fish Histopathology. Vol.1. Shin Suisan shinloun. Sha Ltd. Japan. 211P.
- Kuo. S.C. ; Chung, H.Y. and Kou. G.H. , 1980.** Studies on identification and pathogenicity of the gliding bacteria in cultured fishes CAPD fisheries series. No. 3. Fish disease research of fresh water fish. App. Microbiol. Vol. 16, No. 12, pp.1901 – 1906.

- Miazynski, T.B. , 1966.** Infectious gill necrosis of carp. FAO fish, Rep. No. 44,5, pp.373-379.
- Pilarczyk, A. , 1977.** Haematological and histological changes in carp with necrotic gill disease (Branchionecrosis Cyprinorum). Acta hydrobiol. Krakow. Vol. 19, pp.9-23.
- Roberts, R.J. , 1978.** Easy diagnosis for a dangerous gill bacteria. Fish Farmer. 40P.
- Roberts, R.J. (ed.) 3rd ed. 2001.** Fish Pathology. Baillier Tindall, Landon, UK. 467P.
- Schreckenbach, K. ; Spangenberg, R. and Krug, S. , 1975.** Die ursache der Kiemenkrose. Z. Binnen fish. DDR. Vol. 22, pp.257-288.

**Isolation and identification of *Flavobacterium columnaris* – like organisms from Grass Carp (*Ctenopharyngodon idella*) and assessment of its histo-pathological effects in Khuzestan Province, Southern Iran**

**Esmaeili F.<sup>(1)</sup>; Sharifpour I.<sup>(2)</sup> and Soltani M.<sup>(3)</sup>**

Fesmaeili@yahoo.com

1,2- Iranian Fisheries Research Organization, P.O.Box: 14155-6116, Tehran, Iran

3 -Aquatic Animals' Diseases and Health Dept. Faculty of Veterinary Medicine, Tehran University, P.O. Box: 14155-6433, Tehran, Iran.

Received: July 2003

Accepted: June 2004

**Keywords:** *Ctenopharyngodon idella*, *Flavobacterium columnaris*, Bacteriology, Histopathology, Khuzestan province, Iran

## **Abstract**

Following a mortality of up to 40% of cultured Grass Carp (*Ctenopharyngodon idella*) in fish farms of Khuzestan province when water temperature was up to 20°C, samples were taken and examined for etiological clues. We observed that fish gills were coated with a gray-white mucus layer, fin was eroded and wounds were present in peduncle of the affected samples. Bacteriological studies on the samples of gills and eroded and wounded peduncle skin using Cytophaga selective medium, resulted in isolation of filamentous gram negative bacteria chemically similar to *Flavobacterium columnaris*.

Histological observations showed the affected fish carrying symptoms including congestion, hemorrhagia, edema in base membrane, hyperplasia of chondrocyte and secondary lamellae cells, fusion of lamellae, necrosis and peeling of secondary lamellae and also presence of filamentous bacteria in gill tissue sections. Necrosis of skin layers and expansion of ulcer to underlying muscles, degeneration of muscle cells and necrosis of muscle bundles were seen in peduncle muscles. We did not find this bacterium in internal organs. We conclude that the isolation of the bacterium and observation of histo-pathological changes suggest the organisms may be considered as a primary or secondary factor in occurrence of the disease.