

## تأثیر ضد عفونی کننده‌های متداول بر باکتری استرپتوکوکوس اینیایی (*Streptococcus iniae*)

### جدا شده از ماهی‌های قزل‌آلای رنگین کمان

### در شرایط آزمایشگاه و تانک

محمد رضا تابنده<sup>(۱)</sup> و مصطفی اخلاقی<sup>(۲)</sup>

akhlaghi@shirazu.ac.ir

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

تاریخ پذیرش: تیر ۱۳۸۶

تاریخ دریافت: اسفند ۱۳۸۵

#### چکیده

بمنظور مطالعه تأثیر ضد عفونی 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 ستریمایدت استفاده شد. روش آزمایشگاهی مورد استفاده تعیین حداقل غلظت کشنده باکتریایی (**Minimum bactericidal concentration**) در زمانهای ۱۵، ۳۰، ۴۵ و ۶۰ دقیقه بر اساس ppm بود. با استفاده از تانکهای پرورش ماهی و اضافه نمودن سویه ۱۳۸۳ در آب، غلظت‌های موثر بدست آمده از هر ضد عفونی کننده در شرایط آزمایشگاهی هر تانک اضافه گردید. در زمانهای موثر در شرایط آزمایشگاهی نمونه‌گیری بعمل آمد. تأثیر ضد عفونی کننده‌ها 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 عفونی کننده‌ها بودند. ضعیف‌ترین ضد عفونی کننده‌های مورد استفاده در این تحقیق اسید استیک و اسید سیتریک بودند که اغلب در غلظت‌های بیشتر از ۵۰۰ ppm تأثیر داشتند و در مقایسه با ضد عفونی کننده‌هایی مانند کلرهگزیدین و هیپوکلریت سدیم که در غلظت‌های حدود ۳ تا ۵ ppm موثر بودند، ضد عفونی کننده‌های ضعیفی بشمار می‌آیند. نتایج حاصل از آزمایش‌ها در تانک‌ها نشان‌دهنده تأثیر قطعی عوامل مداخله‌گر در محیط بر عملکرد ضد عفونی کننده‌های مختلف می‌باشد. بطوریکه در مورد اغلب ضد عفونی کننده‌ها، حداقل غلظت کشنده باکتری در زمانهایی بیشتر از زمان‌های موثر در شرایط آزمایشگاهی بدست آمد. هیپوکلریت سدیم و یدور سدیم موثرترین ضد عفونی کننده‌ها در این شرایط بودند.

**کلمات کلیدی:** ضد عفونی کننده، استرپتوکوکوس اینیایی، *Streptococcus iniae*، قزل‌آلای رنگین کمان

## مقدمه

## مواد و روش کار

سویه‌های سال ۱۳۸۱، ۱۳۸۲ و ۱۳۸۳ از نمونه‌های مبتلابه 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، کلرگزیدین، پرمنگنات پتاسیم، هیپوکلریت سدیم، یدور سدیم از محصولات شرکت کیمیا مواد (ایران) و فرمالدئید (۲۷ 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 کلرگزیدین، 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 ۱/۱ میلی لیتر از هر لوله برداشته شده و به شیشه‌های دربدار حاوی ۱۰ سی سی 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 میلی لیتر از هر شیشه بر روی

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 مهمترین 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 عفونی‌کننده‌ها و داروهاست. ضد عفونی 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، کلرگزیدین، 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.

کلرگزیدین و هیپوکلریت سدیم از نظر غلظت و زمان، موثرترین ضد عفونی کننده‌ها هستند. ضعیف‌ترین ضد عفونی کننده‌های مورد استفاده در این تحقیق اسید استیک و اسید سیتریک بودند که اغلب در غلظت ۳۵۰ تا ۵۰۰ تاثیر داشتند و در مقایسه با ضد عفونی کننده‌هایی مانند کلرگزیدین 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 عفونی کننده‌ها در سیستم مدار بسته نشان‌دهنده تفاوت قابل توجه غلظت زمان موثر ضد عفونی کننده‌ها با نتایج مرحله آزمایشگاهی بود. نتایج مربوط به حداقل غلظت کشنده باکتری برای هر ضد عفونی کننده 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 ضد عفونی کننده‌های مختلف می‌باشد، بطوریکه در مورد اغلب ضد عفونی 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 کلرگزیدین بیشتر از سایر ضد عفونی کننده‌ها تحت تاثیر عوامل محیطی قرار گرفتند. فرمالین اگر چه در مقایسه با سایر ضد عفونی کننده‌ها تاثیر ضعیفی بر باکتری استرپتوکوکوس اینیایی داشت، ولی تفاوت چشمگیری بین غلظت زمان موثر آن در شرایط آزمایشگاهی و شرایط مزرعه‌ای مشاهده نگردید و کمتر تحت تاثیر عوامل مداخله‌گر موجود در شرایط طبیعی قرار گرفت.

در مقایسه آماری، اختلاف معنی داری بین افزایش حداقل غلظت ضد عفونی کننده‌ها و زمان لازم برای از بین بردن باکتری استرپتوکوکوس اینیایی وجود داشت ( $P < 0.01$ ) به گونه‌ای که با افزایش مقدار غلظت ضد عفونی کننده، مدت زمان لازم کاهش می‌یافت. بررسی همبستگی نشان داد روند مقاومت سویه‌های سالهای ۱۳۸۱ تا ۱۳۸۳ نسبت به ضد عفونی کننده‌ها از افزایش معنی داری برخوردار نمی‌باشند.

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

محیط آگار Brain Heart Infusion Agar (BHI) کشت داده شد. یک نمونه حاوی سرم فیزیولوژی بجای ضد عفونی کننده و تعداد ۱۰<sup>۷</sup> باکتری در هر میلی لیتر بعنوان نمونه کنترل در نظر گرفته شد.

جهت ارزیابی تاثیر ضد عفونی کننده‌ها در شرایط تانکهای پرورش ماهی، ابتدا تعداد ۶ تانک ۳۰۰ لیتری در سیستم مدار بسته آبیگری شد و تعداد ۱۰۰ عدد بچه ماهی قزل آلا 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 میلی لیتر آب تانک ۱۰<sup>۶</sup> باکتری وجود داشته باشد. سپس کمترین مقدار غلظت مؤثر ضد عفونی کننده 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 سانتیمتر مربع دیواره تانک‌ها و از سه ناحیه مختلف) نمونه برداری 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 میلی گرم 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 آگوشت 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 عفونی کننده در هر آزمایش و سه تکرار آن، با هم مقایسه گردیدند.

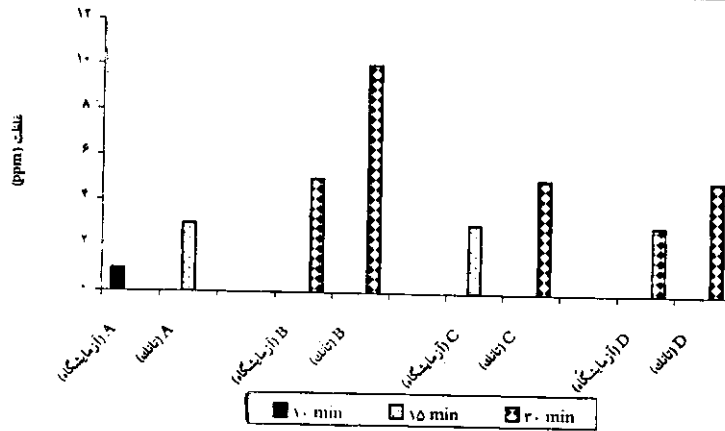
## نتایج

نتایج مربوط به حداقل غلظت کشنده باکتریایی ضد عفونی کننده‌های 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

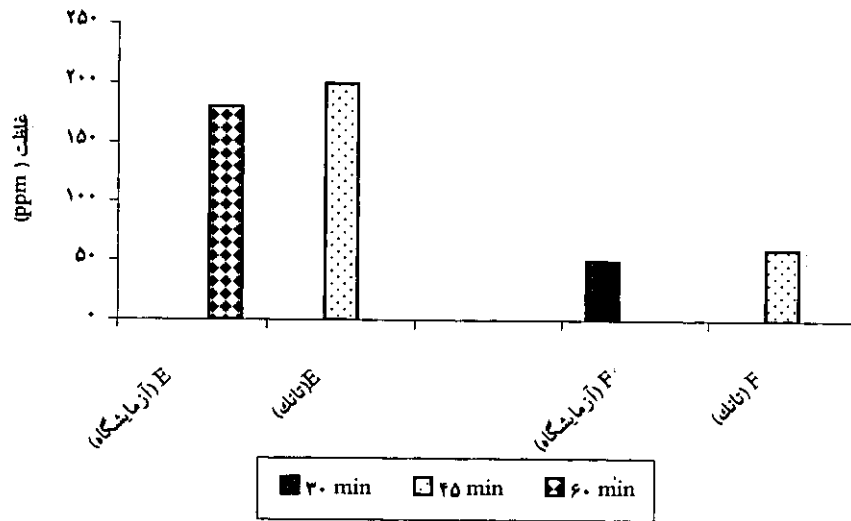
جدول ۱: غلظت / زمان تور ضد عفونی‌کننده‌ها بر حسب حداقل غلظت-زمان بر باکتری استرپتوکوکوس اینیایی متعلقه جدا شده

در سالهای متوالی در شرایط آزمایشگاهی و در شرایط تانک (سال ۱۳۸۳)

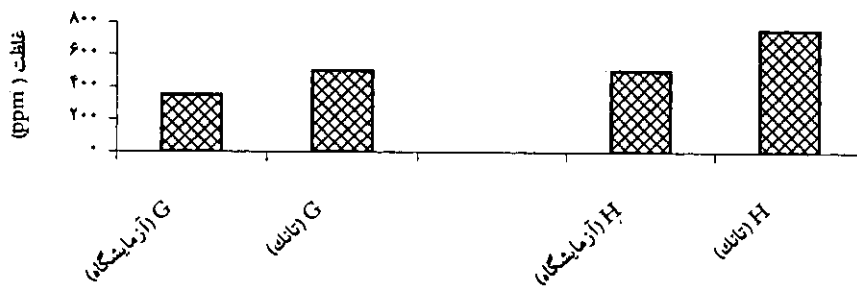
سازیداد	هیپرکلریت سدیم		برمنگات پتاسیم		یدور سدیم		کلر جگریدین		اسید ستریک		اسید استیک		فرمالین		باکتری
	غلظت	زمان/دقیقه	غلظت	زمان/دقیقه	غلظت	زمان/دقیقه	غلظت	زمان/دقیقه	غلظت	زمان/دقیقه	غلظت	زمان/دقیقه	غلظت	زمان/دقیقه	
۳۰	۳	۱۵	۳	۲۰	۵	۳۰	۵۰	۱	۱۰	۳۰	۳۰	۲۵۰	۶۰	۱۸۰	سویه ۱۳۸۱
۳۰	۵	۱۵	۵	۲۰	۱۰	۳۰	۶۰	۳	۱۰	۳۰	۳۰	۵۰۰	۶۰	۲۰۰	
۱۵	۱۰	۱۰	۱۰	۳۰	۲۰	۱۵	۷۰	۵	۱۰	۱۵	۱۵	۷۵۰	۴۵	۲۲۰	
۱۵	۲۰	۱۰	۲۰	۱۵	۳۰	۱۵	۸۰	۱۰	۵	۱۵	۱۵	۱۰۰۰	۳۰	۲۵۰	
۳۰	۳	۱۵	۳	۳۰	۵	۳۰	۵۰	۱	۱۰	۳۰	۳۰	۳۵۰	۶۰	۱۸۰	سویه ۱۳۸۲
۱۵	۵	۱۰	۵	۳۰	۱۰	۱۵	۶۰	۳	۱۰	۱۵	۱۵	۵۰۰	۴۵	۲۰۰	
۱۵	۱۰	۱۰	۱۵	۱۵	۲۰	۱۵	۷۰	۵	۵	۱۵	۱۵	۷۵۰	۳۰	۲۲۰	
۱۵	۲۰	۵	۲۰	۱۵	۳۰	۱۵	۸۰	۱۰	۵	۱۵	۱۵	۱۰۰۰	۳۰	۲۵۰	
۳۰	۳	۱۵	۳	۳۰	۵	۳۰	۵۰	۱	۱۰	۳۰	۳۰	۳۵۰	۶۰	۱۸۰	سویه ۱۳۸۳
۳۰	۵	۱۵	۵	۳۰	۱۰	۳۰	۶۰	۳	۱۰	۳۰	۳۰	۵۰۰	۶۰	۲۰۰	
۱۵	۱۰	۱۵	۱۰	۳۰	۲۰	۳۰	۷۰	۵	۱۰	۱۵	۱۵	۷۵۰	۴۵	۲۲۰	
۱۵	۲۰	۱۰	۲۰	۱۵	۳۰	۱۵	۸۰	۱۰	۵	۱۵	۱۵	۱۰۰۰	۴۵	۲۵۰	
۳۰	۵	۳۰	۵	۳۰	۱۰	۴۵	۶۰	۳	۱۵	۳۰	۳۰	۵۰۰	۴۵	۲۰۰	سویه ۱۳۸۴ (در شرایط تانک)



نمودار ۱: مقایسه حداقل غلظت / زمان موثر ضد عفونی کننده های کلرگزیدین (A)، پرمنگنات پتاسیم (B)، هیپوکلریت سدیم (C) و ستریمایدت (D) در شرایط آزمایشگاه و تانک های پرورش بر باکتری استرپتوکوکوس اینیایی جدا شده در فاصله سالهای ۱۳۸۱-۱۳۸۳



نمودار ۲: مقایسه حداقل غلظت / زمان موثر ضد عفونی کننده های فرمالین (E) و یدور سدیم (F) در شرایط آزمایشگاه و تانک های پرورش بر باکتری استرپتوکوکوس اینیایی جدا شده در فاصله سالهای ۱۳۸۱-۱۳۸۳



نمودار ۳: مقایسه حداقل غلظت / زمان موثر (۳۰ دقیقه) ضد عفونی کننده های اسید استیک (G) و اسید سیتریک (H) در شرایط آزمایشگاه و تانک های پرورش بر باکتری استرپتوکوکوس اینیایی جدا شده در فاصله سالهای ۱۳۸۱-۱۳۸۳

## بحث

می‌یابد (McDonnell & Russell, 1999) بهمین دلیل میزان بیشتری از این ضد عفونی 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 عفونی کننده قوی با غلظت ۲۵ تا ۱۰۰ ppm بمدت یک دقیقه توانسته است صد در صد باکتریهای استافیلوکوکوس آرنوس 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).  
 بدور 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 بد مدت 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 بدور 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 آرنوس توسط سترماپد ث کمتر از ۲ ppm گزارش شده است (Bamber & Ned, 1999) و در گزارش دیگری ۰/۲۵ تا ۲ ppm از این ضد عفونی کننده استافیلوکوکوس آرنوس را از بین برد (Suller & Russel, 2000). در این تحقیق غلظت ۳ و ۵ ppm سترماپد ث 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

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 عفونی کننده، کاربرد آنها را در صنعت آبی‌پروری با مشکلات بسیاری روبرو کرده است. درخصوص تأثیر ضد عفونی کننده‌ها بر باکتری استرپتوکوکوس بیماریزای ماهی اطلاعاتی در دسترس نمی‌باشد. این تحقیق نشان داد ضد عفونی کننده‌های 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 (Salvesen & Noga, 2000 ; 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 (Aerstrup & Hasman, 2004).

کلر هگزیدین 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 کلر هگزیدین 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 سوبه‌های بالینی باکتری استرپتوکوکوس موتانس را ۱ ppm بمدت ۵ دقیقه گزارش نموده‌اند (Järvinen et al., 1993) و علیه آنتروکوکوس فیکالیس در شرایط آزمایشگاهی ۲ ppm بمدت ۱۰ دقیقه ذکر شده است (Aerstrup & Hasman, 2004). باید توجه داشت که تأثیر این ضد عفونی کننده تحت تأثیر مواد آلی شدت کاهش

## تشکر و قدردانی

از آقایان دکتر شکر فروش و دکتر رجاییان 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 ۱۸۹ تا 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-sensitive *Staphylococcus aureus* and faecal 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.

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 عفونی کننده کمتر برای عوامل باکتریایی در آبی پروری 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 عفونی کننده 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 عفونی کننده‌ها 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.

- Favero, M.S. and Bond, W.W. , 1991.** Sterilization, disinfection and antiseptics in the hospital. *In:* (ed. A. Balows), manual of clinical, microbiology, 5<sup>th</sup> 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 germicides in alkaline and acidified water. *App. Microbiol.* Vol. 15, pp.575-581.
- Hoshina, T. ; Sano, T. and Morimoto, Y. , 1958.** A streptococcus 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. Aylliffe), Principles and practice of disinfection, preservation and sterilization, 3rd ed. Blackwell Science, Oxford, England. pp.121-142.
- Järvinen, H. ; Tenovuo, J. and Huovinen P. , 1993.** *In vitro* susceptibility 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 steel surface. *Journal of Milk Food Technol.* Vol. 39, pp.830-836.
- Noga, E.J. , 2000.** Fish diseases; Diagnostic and treatment. Iowa State University Press, Amsterdam. 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 *Escherichia coli* O157:H7, *Staphylococcus aureus* and fecal 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 (*Oncorhynchus 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.** Cetrinide and antibiotic resistance in *Staphylococcus aureus*. *Journal of Antimicrob. Chemother.* Vol. 46, pp.11-18.



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.

# 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