بحث أصلي

ع ع السلامة ، أ ع الصنيهر

دراسات عن بكتيريا الزائفة المتألقة المعزولة من أسماك البلطي المستزرعة في المملكة العربية السعودية مع الاهتمام الخاص بأمراضيتها

المستخلص : تم جمع 200 سمكة بلطي من 15 مزرعة سمكية تستزرع أسماك البلطي في المياه العذبة تمثل 3 من مناطق المملكة المختلفة في الفترة من شهر محرم إلى شهر شعبان 1419 هـ . وبعد إخضاع العينات السمكية للفحوصات الظاهرية والباكتريولوجية والتشريحية تبين تفاوت حدة أعراض الأصابة بميكروب الزائفه المتألقه في الأسماك من مزرعة لأخرى .حيث تمثلت أعراض المرض الظاهرية بتواجد علامات التسمم الدموي ، جحوظ العينيين ، تآكل الزعانف وتساقط الحراشف ، إنتفاخ البطن وبروز فتحة الشرج وإحتقانها. أما الأعراض التشريحية، فتمثلت بتضخم الكبد وإحتقانه إضافة إلى إحتقان معظم الأعضاء الداخلية ووجود سائل إرتشاحي في منطقة البطن، وكذلك إحتقان الصفائح الخيشومية مع زيادة الإفرازات المخاطية بها .

وقد كانت نسبة إصابة الأسماك بالبكتيريا المذكورة متباينة من منطقة لأخرى ، حيث كانت نسبة الإصابة في منطقة الرياض 28,90% ، والمنطقة الشرقية 12,76% ومنطقة مكة 16%. وكانت نسبة الاصابة في مجموع الأسماك المفحوصة 23,5%.وأسفرت الفحوصات البيوكيميائية عن عزل 47 عترة بكتيرية وأظهرت الخصائص البيوكيميائية أنها بكتيريا الزائفة المتألقة . واثبت إختبار حساسية المعزولات للمضادات الحيوية حساسيتها لجنتامايسين، نيومايسين ،مركبات السلفوناميد ، سفتازيديم، نالديكسك أسد ، أوكسيتتراسايكلين و كاناميسين. بينما كانت مقاومة للمضادات الحيوية نيتروفيرانتوين، اريثرومايسين و كلورامفينكول .وبينت العدوى التجريبية لأسماك سليمة بنفس الميكروب، حدوث الأعراض المرضية المتباينة والتي كانت في مجملها تماثل الأعراض المرضية للأسماك المصابة طبيعياً بميكروب الزائفة المتألقة.وعلى هذا فإن نتائج هذه الدراسة أثبتت تواجد هذا الميكروب كمسبب مرضي هام في بعض مزارع أسماك البلطي في المملكة العربية السعودية .

كلمات مدخلية الأسماك –السعودية ، الأسماك – مزارع – دراسات ، الأسماك – الزائفة المتألقة

Studies on the Bacteria *Pseudomonas fluorescens* Recovered from Some Cultured Tilapia Fishes in the Kingdom of Saudi Arabia with Special Reference to its Pathogenicity

A A Al-Salamah and A E Al-Sunaiher

Abstract: A total of 200 naturally diseased live tilapia (*Oreochromis niloticus*) fishes were collected from 15 freshwater fish farms from three provinces of the Kingdom of Saudi Arabia during the period of Muhram to Shaban 1419 H . These fishes were subjected to clinical, microbiological and postmortem examination.The results obtained revealed different forms of clinical signs and pathological lesions with various intensities due to *Pseudomonas flourescens* bacteria.

The analysis of the data obtained on the incidence of *P. flourescens* bacteria among naturally infected fishes showed remarkable differences from one province to another, the incidence was (28.90%) in Riyadh Province, (12.76%) in Eastern Province and (16.0%) in Makkah Province. The total incidence in all infected fishes was 23.5%. The bacteriological examinations resulted in recovery of 47 *P. flourescens* strains.

In vitro antibiotic susceptability clarified the sensitivity of recovered strains to Gentamycin, Neomycin, Oxytetracycline, Ceftazidime, Sulphonamide Compounds, Kanamycin and Nalidixic acid and their resistence to Erythromycin, Chloramphenicol and Nitrofurantoin. Experimental infection with isolated strains resulted in the development of different clinical signs and pathological lesions resembling those seen in fishes naturally infected with the same microbe. The finding of this study proved the occurrence of *P. flourescens* infections among cultured fish in the fish farms of the Kingdom of Saudi Arabia.

Keywords: Studies , Pseudomonas, Cultured Fishes, Saudi Arabia

المقدمـــــــــــة

خلال السنوات القليلة الماضية، حيث أتجهت الأنظار للإستثمار في مجال الأستزراع السمكي ، تعقد الأمر بسبب التكثيف في عمليات الإنتاج خاصة في أنظمة الاستزراع المكثفة وشبه المكثفة. ذلك لأن التربية بأعداد كبيرة من الأسماك في وحدة ضيقة ،أدي إلى خلل في أحد عوامل الأتزان البيئي الطبيعي الهامة، وهو عامل التخفيف. وقد أدى ذلك إلى سهولة انتقال مسببات الأمراض من كائن إلى أخر، وبذلك أزدادت أضرار الميكروبات،وخصوصاً البكتيرية والفيروسية (المنظمة العربية للتنمية الزراعية ،1995). وقد دلت الكثير من الدراسات الموثقة على حدوث الأمراض البكتيرية والطفيلية في الأسماك وإرتباطها بالتغيرات الموسمية أو المناخية(Meyer,1970). ويتفاوت الدور الأساسي لهذه الميكروبات في كونها ميكروبات ممرضة أولية إلى تلك الممرضات الانتهازية التي تهاجم العائل المصاب بمرض آخر(Roberts, 1989). وتشير عدة دراسات (Okaeme,1989 & Innglis *et al.*,1993)، بأن ميكروب

*علي عبدالله السلامة ، أنور عيسى الصنيهر
* قسم النبات والأحياء الدقيقة، كلية العلوم، جامعة الملك سعود،
ص.ب. 2455 الرياض 11451 , المملكة العربية السعودية
هاتف: 4675816 - فاكس: 4675833
البريد الالكتروني: aaasalah@maktoob.com

الزائفة المتألقة من البكتيريا الشائعة التي تصيب الاسماك ،حيث تتميز أعراض الاصابة بهذا الميكروب باعراض التسمم الدموي .كما عزل (Yoo *et al.* 1990) هذه البكتيريا من مزارع الأسماك في كوريا.في حين يثبت (Toranzo *et al.* 1993) تواجد بكتيريا الزائفة المتألقة بصورة سائدة من مجموع البكتيريا المعزولة من الأسماك المستزرعة، وقد تمثلت أعراض الاصابة بهذا الميكروب في وجود أنزفة دموية وتقرحات في مناطق مختلفة من جسم السمكة . ومع انتشار هذه الأمراض أنخفض الإنتاج فازدادت الحاجة لدراسة وبائية للأمراض المختلفة ومحاولة السيطرة عليها.

المـــواد وطـــرق العمـــل

1 . الفحص الظاهري والتشريحي للأسماك :
تم جـــمـــع 200 سـمـكـة مـن الـنـوع الـبـلـطـي الـنـيـلـي (Oreochromisniloticus) ممثلة من15 مزرعة سمكية تستزرع أسماك البلطي في المياه العذبة بإستخدام أنظمة التربية المكثفة وشبه المكثفة. وشملت هذه المزارع منطقة الرياض والمنطقة الشرقية ومنطقة مكة في الفترة من شهر محرم الى شهر شعبان 1419 هـ . جمعت هذه الاسماك من برك وأحواض التربية التي تعاني من بعض المشاكل المرضية .وتراوحت أحجام هذه الاسماك من 50 - 250 جرام . معظم تلك الاسماك المجمعة كانت تظهر أعراضاً مرضية، بينما كان القليل منها تبدو ظاهرياً سليمة .وقد أخضعت الأسماك التي أحضرت للمختبر وهي حية، الى الفحوصات الظاهرية والتشريحية وفقاً للطرق المتبعة في الكتب المرجعية (Austin & Austin, 1989) و (Post, 1987).

2. الفحص البكتريولوجي وعزل البكتيريا على المستنبتات :
تحت ظروف التعقيم الجيدة ،ولغرض العزل البكتيري ،أخذت مسحات من الأسماك المصابة ،وذلك بعد تعقيم سطح الأعضاء المراد الزرع منها ،وهي الكبد، والطحال والكلى. زرعت المسحات على مستنبتات آجار الصويا التربسيني (Tryptic Soya Agar, Oxoid) ،آجار نقيع المخ والقلب (Brain Heart Infusion Agar, Oxoid) ومستنبت أساس آجار السودوموناس (Agar Base,Oxoid Pseudomonas) ، وحضنت أطباق الزرع في حضانة عند درجة حرارة 25°م لمدة 24-48 ساعة . وبعد نمو المستعمرات البكتيرية على أطباق الزرع ، أعيد زرع مستعمرات ممثلة من البكتيريا المشتبه فيها للتنقية .كما تم كذلك زرع المستعمرات البكتيرية النقيـــة على وســط الآجــار المغـــذي المـــائـــل (Nutrient Agar, Oxoid Slant) بغية إجراء الاختبارات البيوكيميائية المختلفة، إستناداً للطرق المتبعة في (Koneman *et al.*,1997).

3. تعريف العـــزلات البكـــتيرية :
أخضعت المستعمرات النقية لعزلات البكتيريا، الى الفحوصات الشكلية على الأطباق، وكذلك الفحص الميكروسكوبي لشرائح مصبوغة بصبغة جرام، وكذلك الفحوصات البيوكيميائية إستـــناداً للطرق المتـــبعة (Austin & Austin, 1993 and Lennette *et al* ,1985) باستخدام نظام (API-20E, BioMerieux, France) لتعريف العزلات البكتيرية.وقد تمت دراسة قدرة البكتيريا على النمو عند درجة حرارة 4° و 42°م. إضافة الى ذلك ، تم إجراء اختبار الكشف عن خاصية الحركة للمعزولات على وسط الآجار المغذي نصف الصلب (Nutrient Agar, Oxoid). وللكشف عن خاصية تحلل الدم (Haemolysis) للبكتيريا المعزولة، زرعت مستعمرات بكتيريا الزائفة المتألقة على مستنبت آجار دم الخروف 5% وحضنت أطباق الزرع عند درجة حرارة 25 °م لمدة 24 ساعة .

4. إختبار الحساسية للمضادات الحيوية :
تم استخدام أقراص المضادات الحيوية 10 ميكروجرام جنتامايسين ، 30 ميكروجرام لكل من كاناميسين، اريثرومايسين، نالديكسك أسد ، نيومايسين، سفتازيديم، أوكسيتتراسايكلين، كلورامفينكول. 300 ميكروجرام لكل من نيتروفيرانتوين و مركبات السلفوناميد (Oxoid, England). وذلك للكشف عن مدى حساسية عزلات الزائفـــة المتـــألقـــة بـــاســـتـــخدام طـريـقـة الانـتـشـار بـالأطـبـــاق Disk Diffusion Method (Balows *et al.*, 1991) وبالأستعانة بمستنبت آجار مولر هنتون (Oxoid). وحضنت الآطباق عند درجة حرارة 25°م لمدة 24 ساعة .

5. العدوى التجريبية لأسماك سليمة بنفس الميكروب :
لإحداث العدوى التجريبية، أستخدمت عترة من الزائفة المتألقة في تحضير معلق بكتيري، حسب طريقة (Madigan *et al.*, 1997) وذلك بإستخدام آجار العد بالآطباق (Plate Count Agar). تم توزيع 30 سمكة بلطي سليمة تراوحت أوزانها (80 ± 5 جم) الى ست مجموعات بكل منها 5 سمكات، في أحواض زجاجية منفصلة بحجم (60 × 40 × 35 سم^3. بينما أبقيت 10 سمكات في حوض آخر مستقل للمقارنة .وقد تأقلمت الأسماك لبيئة الأسر في الأحواض، وكذلك لدرجة حرارة الماء 22-25°م لمدة عشرة أيام قبل الحقن. تم حقن مجموعات الأسماك بجرعات مختلفة (5.4 × 10^5، 1.0 × 10^6 و 1.64 × 10^6 بكتيريا/مل) .وقد أجري الحقن بطريقتين : الأولى ،الحقن داخل العضلة و الثانية داخل التجويف البريتوني (الصفاقي) (Peritoneal Cavity) وذلك تبعاً لطريقة (Lucky, 1977).

النتـــائـــج

(1) نتائـــج الفحـــص الظاهـــري والتشريحـــي :

1.1 الفحص الظاهري :
أتضح من فحص الأسماك المصابة طبيعياً، وجود إرتشاحات دموية في أماكن متفرقة من الجسم، وخصوصاً على منابت الزعانف البطنية والصدرية ،علـي البـطـن، وتحت مـنـطـقـة الـفـم . وتراوحت هذه الأرتشاحات الدموية مابين دموية صغيرة إلى بقع دموية كبيرة . كانت الأعراض واضحة بشكل أكبر في الأسماك الصغيرة، بينما كانت في الأسماك الكبيرة متباينة. كما وجد بروز وأحتقان فتحة الشرج، ولوحظ أيضاً تآكل في الزعانف، وكذلك تغير في لون الجلد، وتساقط الحراشف من علـى الجلد .في حين تمثلت الأعراض المرضية في الأسماك التي أظهرت أعراضاً في مراحل متقدمة من المرض، بجحوظ في أحدى أو كلا العينين أو وجود عتامة في العينيين. كما لوحظ في بعض الحالات أستسقاء (تضخم) في البطن.وقد وجد تبايناً في نسب الأصابة ببكتيريا الزائفة المتألقة في أسماك البلطي بين المناطق المختلفة (جدول 1).

جدول (1) نسب الأصابة بميكروب الزائفة المتألقة في أسماك البلطي بين المناطق الثلاثة بالمملكة

أسم المنطقة	عدد المزارع	عدد الاسماك المفحوصه	عدد الأسماك الأيجابية لميكروب الزائفة المتألقة	نسبة الأصابة
منطقة الرياض	9	128	37	%28.90
المنطقة الشرقية	4	47	6	%12.76
منطقة مكة	2	25	4	%16.00

2.1 الفحص التشريحي :

لقد كان واضحاً في نسبة كبيرة من الأسماك المشرحة، إحتقان الخياشيم وتضخم المرارة والكبد، مع وجود إرتشاحات دموية. وفي حالات أخرى وجد الكبد هشاً (Friable) وشاحب في اللون. كما كان الطحال في حالات كثيرة متضخماً ومدمماً .ووجدت الكلى أيضاً في بعض الحالات محتقنةً .ولوحظ في بعض الحالات أنتفاخ المرارة . كما تبين إلتصاق الأحشاء الداخلية ببعضها البعض، مع وجود سائل إرتشاحي في تجويف البطن، يتراوح في تكوينه من سائل أصفر ، إلي مخاطي مدمم .

وفي حالات قليلة وجدت المناسل متورمة بصورة كبيرة وتغطيها الإرتشاحات الدموية. كما لوحظ أيضاً إحتقان الأمعاء في بعض الحالات . وقد وجد إختلافاً في نسب تواجد بكتيريا الزائفة المتألقة في الأعضاء الداخلية (جدول 2) .

جدول (2) نسب تواجد عترة ميكروب الزائفة المتألقة في الأعضاء الداخلية

عدد الأسماك المصابة	توزيع تواجد ميكروب الزائفة المتألقة في الأعضاء الداخلية		
	الكبد	الطحال	الكلية
47	%41.79	%31.34	%26.86

(2) نتائج الفحص البكتريولوجي :

كشفت الفحوصات البكتريولوجية، وذلك من خلال العزل من الكبد والطحال والكلى، نمو بكتيريا الزائفة المتألقة على مستنبت آجار الصويا التربسيني (Tryptic Soya Agar, Oxoid) ، ومستنبت آجار نقع المخ والقلب (Brain Heart Infusion Agar, Oxoid) ، وكذلك مستنبت أساس آجار السودوموناس (Pseudomonas Agar Base, Oxoid) . ولقد وجد تبايناً في كفاءة كل مستنبت في إظهار صفات الميكروب والتعرف المبدئي عليه. حيث تبين نمو البكتيريا بصورة أفضل على مستنبت أساس السودوموناس (Pseudomonas Agar Base, Oxoid) عن باقي المستنبتات. وتطلب الأمر إعادة زرع البكتيريا في حالة النمو على مستنبتي آجار الصويا التربسيني (Tryptic Soya Agar, Oxoid) ، ومستنبت آجار نقع المخ والقلب (Brain Heart Infusion Agar, Oxoid) لأجل التنقية في بعض أطباق الزرع. وتميزت المستعمرات البكتيرية بأنها دائرية محدبة ، لامعة وشفافة وتراوح قطرها ما بين 1-2 ملم. كما أفرزت البكتيريا الصبغة الخضراء المصفرة المميزة، و أنتشرت هذه الصبغة على السطح المجاور للمستعمرات. كما أومضت تحت الأشعة فوق البنفسجية . تميزت رائحة المستعمرات بأنها رائحة متعفنة تشبه رائحة التفاح الفاسد . وبعد 48 ساعة، أصبحت المستعمرات البكتيرية ذات حواف متموجة، والبعض منها أعطى شكل النجمة، أو شكل مغزلي، بينما أنتشرت الصبغة على كامل سطح المستنبت .

ولقد اتضح من صبغة جرام، أنها بكتيريا سالبة لصبغة جرام عصوية الشكل . كما بينت الأختبارات بأنها تمتلك خاصية الحركة . وأوضحت أختبارات تحلل الدم المجراة لعترات هذه البكتيريا بأنها محللة للدم بنسبة (78.72 %) (جدول 3). كما أن معظم العزلات المحللة للدم كانت تمتلك أنزيم تحلل الدم من النوع بيتا (β) والبعض منها كان من النوع ألفا (α) . نمت هذه البكتيريا عند درجة حرارة 4°م لكن كان نمواً بطيئاً جداً. بينما لم تنمو عند 42°م وهذا يميزها عن الزائفة الزنجارية،التي لا تستطيع النمو عند 4°م ولكن تنمو عند 42°م . ولقد لوحظ أن خصائص النمو الشكلية على المستنبتات المختلفة و نتائج الفحوصات البيوكيميائية لعترات بكتيريا الزائفة المتألقة أنها

جدول (3) نتائج الأختبارات البيوكيميائية لعترات الزائفة المتألقة

الأختبار	النتيجة	
	عدد العزلات الموجبة	النسبة المئوية %
Cytochrom Oxidase	47	100.00
Motility	47	100.00
Citrate Utilization	37	100.00
H9S Production	3	6.38
Urease	14	29.78
Tryptophane Deaminase	23	48.93
Indol Production	0	0.00
Voges-Proskauer	12	25.53
Gelatin Hydrolysis	47	100.00
Ortho-nitrophenyl galactosidase	2	4.25
Arginin Dihydrolase	41	87.23
Lysine Decarboxylase	2	4.25
Ornithin Decarboxylase	9	19.14
تحـــليل السكريات :		
Glucose	37	78.72
Mannitol	4	8.51
Inositol	0	0.00
Sorbitol	7	14.89
Rhamnose	6	12.76
Sucrose	7	38.29
Amygdalin	4	8.51
Arabinose	15	31.91

(عدد العترات المختبرة 47)

تتوافق مع ما ذكرته بعض المراجع (Kreig and Holt, 1984 ; *et al.*, 1985; Faisal and Easa,1987; Egusa, 1992 Lennette) لذلك عرفت هذه العترات على أنها بكتيريا الزائفة المتألقة .

(3) نتائج حساسية العترات للمضادات الحيوية ونسبها المئوية :

أوضحت نتائج أختبارات الحساسية تباين العترات البكتيرية في استجابتها للمضادات الحيوية المختلفة (جدول 4). فقد كانت حساسة بدرجة كبيرة للمضادات الحيوية جنتامايسين (CN) بنسبة 100%، نيومايسين (N) بنسبة 93.61% ، أوكسيتتراسايكلين (OT) بنسبة 89.36% ، سفتازيدايم (CAZ)بنسبة 85.10% و متوسطة الحساسية للمضادات مركبات السلفوناميد (S3) بنسبة 63.82% ، كاناميسين (K) بنسبة 46.80% ، نالديكسك أسد (NA) بنسبة 44.68% . بينما كانت العزلات مقاومة للمضادات الحيوية أريثرومايسين (E)، نيتروفيرانتوين (N) و كلورامفينكول (C).

(4) نتائج العدوى التجريبية:

1.4 الأعراض المرضية الظاهرية :

بعد يوم من بدء الحقن ببكتيريا الزائفة المتألقة، وجد تغيراً في سلوك وحركة الأسماك المحقونة بالجرعات 1.0×10^6 و 1.64×10^6 بكتيريا/مل داخل البطن. حيث ظهرت الأسماك في حالة خمول. وتتحرك ببطئ. وشوهد تورم بسيط وأحمرار في موقع الحقن، بينما تلك الأسماك المحقونة بجرعة 5.4×10^5 بكتيريا/مل داخل البطن لم تظهر تغيراً واضحاً في سلوكها أو حركتها،ما عدا أحمراربسيط في موضع الحقن .أما مجاميع الأسماك المحقونة داخل العضلة بجرعة 1.0×10^6 و 1.64×10^6 بكتيريا/مل، فقد تورم فيها موضع الحقن. وكان هذا البروز واضحاً عند مشاهدة السمكة من مقدمتها . أما مجموعة الأسماك المحقونة داخل العضلة بجرعة 5.4×10^5 بكتيريا/مل فقد وجد أحمرار بسيط فقط في موضع الحقن.

في اليوم الثالث من التجربة، تطورت الأعراض بشكل ملحوظ، حيث ظلت الأسماك المحقونة في البطن ضعيفة الحركة، وهبطت الى قاع الحوض وفقدت شهيتها للطعام، كما كان البعض منها يسبح سباحة غير متزنة، وفي وضع مائل وخصوصاً في الجرعات العالية 1.64×10^6 و1.0×10^6 بكتيريا/مل . كما ازداد معدل التنفس، بالأضافة الى بروز وإحتقان فتحة الشرج بدرجات متفاوتة، ووجود أنتفاخ بسيط مع ظهور نقط نزفية في منطقة البطن . كما انتشرت نقط نزفية في أماكن متفرقة من جسم السمكة، وكذلك في منطقة خلف الخياشيم. وظهر أيضاً إحتقان في العين. في حين أن الأسماك المحقونة بنفس الجرعة داخل العضلة، كان موضع الحقن بارزاً ومحتقناً. وقد تساقطت بعض القشور من حوله.أما الأسماك المحقونة داخل التجويف البريتوني بجرعة5.4×10^5 بكتيريا/ مل، فقد شوهد بها بروز بسيط في منطقة الشرج .

في اليوم الرابع ، ظلت مجاميع الأسماك المحقونة داخل البطن سابحة في قاع الحوض مع بطئ حركتها بشكل ملحوظ، لدرجة أنه يمكن مسكها باليد. ولوحظ بهتان لون جلد السمك. كما انتفخت منطقة البطن مع بروز فتحة الشرج واحتقانها، وكذلك إنتشار النقط النزفية في الأماكن المختلفة لجسم السمكة، وخاصة في منطقة البطن وعند منابت الزعانف. ووجد أيضاً تهتك بسيط في الزعانف الذيلية . بينما ظلت الأسماك المحقونة عضلياً كما كان الحال في اليوم الثالث .

جدول رقم (4) نتائج حساسية عترات الزائفة المتألقة المعزولة للمضادات الحيوية ونسبها المئوية

رقم المجموعة	عدد العترات	أقراص المضادات الحيوية									
		N	S3	K	E	F	NA	OT	C	CAZ	CN
1	5	ح	ح	ح	م	م	م	ح	م	ح	ح
2	14	ح	ح	م	م	م	م	ح	م	ح	ح
3	4	ح	م	م	م	م	م	ح	م	م	ح
4	10	ح	م	ح	م	م	ح	ح	م	ح	ح
5	6	ح	ح	م	م	م	ح	ح	م	ح	ح
6	3	م	ح	ح	م	م	ح	ح	م	ح	ح
7	2	ح	م	ح	م	م	م	م	م	ح	ح
8	1	ح	م	م	م	ح	م	م	ح	م	ح
9	2	ح	ح	ح	م	ح	ح	م	ح	م	ح
النسبة المئوية لحساسية المعزولات للمضادات الحيوية		%93.61	%63.82	%46.80	%00.00	%6.38	%44.68	%89.36	%6.38	%85.10	%100.00

N :نيومايسين — S3: مركبات السلفوناميد — E: اريثرومايسين — CAZ: سفتازيدايم

CN:جنتامايسين — K :كاناميسين — F: نيتروفيرانتوين — NA :نالديكسك اسد

OT: أوكسيتتراسايكلين — C: كلورامفينكول

ح : حساسة للمضاد الحيوي
م: مقاومة للمضاد الحيوي

أما في الأيام التالية حتى اليوم التاسع، ظلت الأسماك المحقونة بالجرعات العالية 1.64×10^6 و 1.0×10^6 بكتيريا/مل ، داخل البطن، بنفس الأعراض الظاهرية. بينما في تلك الأسماك المحقونة بنفس الجرعات عضلياً، فقد بدأت بعض الأعراض الظاهرية السابق ذكرها في مكان الحقن في التراجع وأسترجعت بعض نشاطها، كما لو كانت سليمة .إلا أنها لم تقبل على أكل الطعام بشهية. الأسماك المحقونة عضلياً بجرعة 5.4×10^5 بكتيريا/مل، فقد عادت طبيعية وتناقص البروز والأحمرار في موضع الحقن وأصبحت ظاهرياً طبيعية في سباحتها وحركتها واقبالها على الطعام .و لم يتم تسجيل أي نفوق في الأسماك في اليوم العاشر.وعموماً فإن أسماك الحكم والمحقونة بالمرق المغذي فقط، لم تظهر أي أعراض مرضية ظاهرية طوال فترة التجربة.

2.4 الأعراض التشريحية :

كشفت الفحوصات التشريحية بعد عشرة أيام من الملاحظة في مجموعة الأسماك المحقونة داخل البطن بالجرعات 1.0×10^6 و 1.64×10^6 بكتيريا/مل، تباين الصفات التشريحية ما بين أطوار الأعراض الحادة والأعراض المزمنة. فقد ظهرت علامات التسمم الدموي، ووجد الكبد في معظم الأسماك في الحالات الحادة متضخماً بشكل كبير وتغطيه الإرتشاحات الدموية، وفي حالات أخرى، وجد الكبد تغطيه النقط النزفية . إلا انه في حالات أخرى ايضاً وجد الكبد متحللاً شاحب اللون، ولوحظ الطحال متضخماً ومدمما. وفي بعض الأسماك وجدت المرارة منتفخة وممتلئة بسائل الصفراء. إضافة الى ذلك ، فقد وجدت الكلى متضخمة ومحتقنة. وكذلك الحال بالنسبة للأمعاء فقد وجدت متورمة ومحتقنة بشدة في بعض الحالات . كما وجدت المناسل، في بعض الحالات متضخمة ومغطاة بالأرتشاحات الدموية. وعند إزالة غطاء الخياشيم، شوهدت الصفائح الخيشومية محتقنة في معظم الأسماك، بينما في الحالات المتقدمة وجدت الأحشاء الداخلية ملتصقة ببعضها البعض مكونة كتلة واحدة .وهذا الألتصاق كان بدرجات متفاوتة ، ففي بعض الحالات لوحظ الإلتصاق في مراحله الأولى، بينما وجد في حالات أخرى في مرحلة متقدمة. بينما في الأسماك المحقونة بجرعة 5.4×10^5 بكتيريا/مل داخل البطن، فقد كانت الأعراض أقل تواجدا، ماعدا احتقان الكبد والامعاء. بينما في البعض وجدت سوائل إرتشاحية صفراء .أما في المجاميع التي حقنت عضلياً بجرعات 1.0×10^6 و 1.64×10^6 بكتيريا/مل، وبعد اجراء قطع جزئي للعضلة في موقع الحقن، وجد تهتك وتحلل للعضلة . وعند إجراء الفحص البكتريولوجي للأسماك المحقونة، تم عزل بكتيريا الزائفة المتألقة بصورة نقية من العضلة ومن الأعضاء الداخلية .

المناقشة

بالرغم من أن ميكروب الزائفة المتألقة لا يشكل أهمية كبيرة كبكتيريا مسببة للأمراض الوبائية للأنسان، إلا أنه على العكس بالنسبة للأسماك. فهذه البكتيريا واسعة الأنتشار، تعيش في نفس البيئة التي يعيش فيها السمك في توازن طبيعي (Bullock *et al.*, 1971) ،بل وتعيش في مخاط السمك وأمعاؤه بصورة أليفة ، هذا ما إذا وجدت الظروف البيئية لهذا الوسط المائي بصورة طبيعية وغير مجهدة ،كما هو الحال في البيئات الطبيعية لهذه الأسماك . ويرتبط حدوث أمراض الأسماك إرتباطاً وثيقاً بعوامل الاجهاد التي تتعرض لها (Roberts,1989). وبذلك تحولت هذه البكتيريا من الحالة الأليفة الى الحالة الإنتهازية الممرضة بصورة أكبر في الأسماك المستزرعة (Richards *et al.* , 1985).

في هذه الدراسة عزلت معظم عترات الزائفة المتألقة من أسماك بلطي تظهر أعراضاً مرضية. بينما عزلت بعض السلالات من أسماك بلطي كانت تبدو ظاهرياً سليمة. وهذا يعكس أختلاف الاستجابة المناعية من سمكة لأخرى في مقاومة تطورات المرض مع حمل البكتيريا. وتؤكد أبحاث عديدة على عزل بكتيريا الزائفة المتألقة من عدة أنواع من الأسماك مصابة طبيعياً فضلاً عن أسماك البلطي المستزرعة (Easa, 1987; Gierer *et al.*, 1992 ; Sousa *et al.*, 1996 & Faisal) ولقد كانت نسبة حدوث الأصابة طبيعياً ببكتيريا الزائفة المتألقة في مجموع الأسماك المفحوصة 23.5 % في الدراسة الحالية وهذه النسبة أقل من نسبة حدوث الاصابة بنفس البكتيريا في الدراسة التي أجراها (Abd El-Aziz, 1988)على أسماك البلطي المرباه في المياه العذبة في مصر حيث كانت نسبة الأصابة الطبيعية 36.25% من مجموع 80 سمكة بلطي .أما فيما يتعلق باختلاف نسب الأصابة ببكتيريا الزائفة المتألقة في أسماك البلطي بين ثلاث من مناطق المملكة المختلفة (انظر جدول 2) ، فيعزى هذا الإختلاف إلى تباين العوامل البيئية من منطقة لأخرى، والاختلاف في شدة الضراوة بين العترات وحالة التغذية بين الأسماك ومناعتها . و كما هو معلوم، فإن العوامل البيئية أهم العوامل التي تلعب دوراً في إحداث الإصابة (Walter & Plumb, 1980).

وبإلقاء نظرة شاملة على نتائج الفحوصات الظاهرية والتشريحية للأسماك المصابة طبيعياً ، تمثلت أعراض الأصابة بأنتشار الارتشاحات الدموية بدرجات متفاوتة على الجلد،الزعانف ومنطقة الفك. وتدل هذه المؤشرات على أعراض التسمم الدموي من جراء انتشار البكتيريا في الدورة الدموية للسمك، وأفرازه للأنزيم المحلل للدم . وهذه الأعراض المتحصل عليها تتوافق الى حد كبير مع ما توصل إليه الباحثون .(Badran & Eisa, 1991; Toranzo *et al.*, 1993) ومما كان واضحاً أنتفاخ منطقة البطن واحمرار وبروز فتحة الشرج . أما الأعراض المرضية في العينيين، فقد تمثلت في جحوظ إحداها أو كلاها، وفي حالات أخرى وجدت العينان مبيضتان وبهما عتامة.

وعند فتح البطن شوهدت سوائل ارتشاحية مدممة تملأ التجويف البطني أحياناً، ويعزى إرتشاح هذه السوائل لتدمير الكبد بالسموم التي تفرزها البكتيريا . أما الأعراض المرضية الظاهرة على الكبد والطحال والكلى والمرارة، فقد كانت متفاوته مما يعكس أختلاف ضراوة البكتيريا فيما بين سلالتها ، فقد كان الكبد في معظم الحالات متضخماً ومحتقناً تنتشر عليه النقط الدموية، أو ارتشاحات نزفية، كما كان الطحال والكلى محتقنان ومتضخمان في أغلب الحالات. أما المرارة فقد شوهدت منتفخة وممتلئة بسائل الصفراء. وهذا يدعم ما ذكرة الباحثون (Post, 1987; Badran & Eisa, 1991). في حين شوهدت الصفائح الخيشومية محتقنة وفي بعض الحالات شاحبة. وتتفق هذه النتائج مع ما توصل إليه (Easa, 1987 & Faisal).

أسفرت نتائج الفحوصات البكتريولوجية المجراة على أسماك البلطي المصابة طبيعياً، عن عزل(47) عترة من بكتيريا الزائفة المتألقة. كما بينت هذه الدراسة مقدرة هذه العترات على النمو في أوساط بيئية

متعددة . فلقد نمت على مستنبت آجار الصويا التربسيني (Oxoid Tryptic Soya Agar,)، وتميزت المستعمرات البكتيرية بأنها دائرية ، محدبة ، لامعة ولزجة. إلا ان الصبغة المميزة لها لم تظهر بشكل ملحوظ في الوسط البيئي .بينما نمت هذه الميكروبات على بيئة آجار نقيع المخ والقلب (Brain Heart Infusion Agar, Oxoid) بصورة أكبر من في بيئة آجار الصويا التربسيني، نظراً لأنها بيئة مغذاة أكثر وكانت خصائص المستعمرات متماثلة مع الصفات التي ظهرت على بيئة آجار الصويا التربسيني، إلا ان المستعمرات كانت صغيرة. وفي الجانب الأخر ، فعند إستخدام بيئة أساس آجار السودوموناس(Pseudomonas Agar Base, Oxoid)، تعزز النمو بشكل كبير، نظراً لأنها بيئة أنتخابية، حيث نمت البكتيريا بصورة نقية بعد 18-48 ساعة وأظهرت المستعمرات البكتيرية الصفات النموذجية لهذه البكتيريا .

وفي ضوء التباين في كفاءة المستنبتات المختلفة في إبراز صفات البكتيريا ، يتضح أفضلية بيئة أساس آجار السودوموناس في تنمية بكتيريا الزائفة المتألقة بصورة أنتخابية ونقية، وكذلك إبراز صفاتها النموذجية، وتحفيز إفراز الصبغة المميزة وبالتالي سهولة التعرف عليها ..ومن ثم يأتي بعدها بيئة آجار الصويا التربسيني ، حيث أظهرت خصائص الميكروب، إلا أنها لم تعزز إفراز الصبغة بكفاءة عالية. ويليها بيئة آجار نقيع المخ والقلب، والتي لم تحفز أنتاج الصبغة أيضاً. وعلى ذلك فأنه حسب النتائج السابق ذكرها، ينصح باستخدام بيئة أساس آجار السودوموناس . كما أثبتت الأختبارات بأن هذه البكتيريا متحركة ولها القدرة على النمو عند درجة حرارة 4°م ولا تنمو عند 42°م وإن كان النمو الأمثل لها عند درجة حرارة 25°م.وصفات البكتيريا على المستنبتات المختلفة المتحصل عليها في هذه الدراسة توافقت مع ما ذكر في العديد من المراجع (Post, 1987 ; Roberts, 1989; Balows *et al* , 1991). أما فيما يتعلق بنمو هذه البكتيريا على بيئة آجار الدم، فلقد نمت البكتيريا بصورة جيدة، وتبين مقدرة أغلب سلالاتها على تحلل الدم بنسبة 78.72% حيث شوهدت مناطق الدم المتحللة على المستنبت و تفاوتت صفة تحلل الدم من النوع بيتا (β) الى النوع الفا (α)، بينما البعض منها لم يحلل الدم .(Krieg & Holt, 1984) وتدل النسبة العالية من عترات الزائفة المتألقة المحللة للدم على مدى أهمية هذا النوع من الأنزيمات المفرزة. وقد يدل ذلك على الدور الذي يلعبه هذا الأنزيم في حدوث أعراض التسمم .

فيما يتعلق بحساسية عترات الزائفة المتألقة للمضادات الحيوية ، تبين وبعد تطبيق أختبارات الحساسية، أن العترات كانت متفاوته في استجابتها للمضادات الحيوية المختلفة . فقد كانت حساسة بدرجة كبيرة للمضادات الحيوية جنتامايسين ، نيومايسين ، أوكسيتتراسايكلين ، سفتازيديم. في حين كانت متوسطة الحساسية للمضادات الحيوية مركبات السلفوناميد، كانامايسين ، نالديكسك أسد . بينما كانت العترات مقاومة للمضادات الحيوية اريثرومايسين، نيتروفيرانتوين ، كلورامفينكول. و حساسية هذه البكتيريا للمضادات الحيوية جنتامايسين ، نيومايسين و كانامايسين تتفق مع ما وجده (Faisal & Easa, 1987) ولكن حساسيتهامع كانامايسين لم تتفق مع (Gado,1988) حيث يشير الى مقاومة الزائفة المتألقة لهذا المضاد الحيوي.أما حساسية هذه البكتيريا للمضاد الحيوي أوكسيتتراسايكلين. فقد كانت موافقة إلى حد كبير مع ما وجده . (Abd El Aziz, 1988). أما فيما يتعلق بحساسيتها للمضادين سفتازيديم و نالديكسك أسد والذين أظهرا تأثيراً تثبيطياً جيداً ومتوسطاً على التوالي، فلم يتاح الحصول على أبحاث منشورة تناولته في دراستها للمقارنة. وقد يعزى ذلك لمحدودية تطبيق هذين المضادين في معالجة الأسماك .وفي حين أن عدداً من الأبحاث تشير إلى أن بكتيريا الزائفة المتألقة مقاومة لمركبات السلفا (Meyer & Collar, 1964 ; Toranzo *et al.*, 1993). إلا أن ما وجد في هذا البحث كان العكس، فلقد أظهرت حساسية بدرجة متوسطة (63.82%) لمركب مركبات السلفوناميد، وهذا ما يؤكده الباحث (Kimura, 1983)عند إستخدامه مركبات سلفا من نوع آخر وهو سلفاديازين، حيث يظهر التأثير التثبيطي لبكتيريا الزائفة المتألقة .

أما نتيجة مقاومة هذه البكتيريا للمضادين الحيويين أريثرومايسين و كلورامفينكول، فقد كانت متوافقة مع ما توصل إليه . (Meyer & Collar , 1964) وأخيراً فقد كانت نتيجة مقاومة الميكروب للمضاد الحيوي نيتروفيرانتوين متوافقة مع وجده (Faisal & Easa, 1987). واللذان وجدا أيضاً، أن بكتيريا الزائفة المتألقة كانت مقاومة لهذا المضاد الحيوي بينما كانت النتيجة مخالفة مع (Toranzo *et al.*, 1993)، والذي وجد أن الميكروب حساس لهذا المضاد . وتدل إختلافات حساسية بكتيريا الزائفة المتألقة في هذه الدراسة ،على وجود عدة عترات مختلفة من الزائفة المتألقة، وحدوث نوع من عوامل المقاومة للمضادات الحيوية بين سلالات الزائفة المتألقة فيما بينها أو مع البكتيريا الأخرى .

حول اختبارات العدوى التجريبية ، فلقد أثبتت هذه الأختبارات، أن بكتيريا الزائفة المتألقة المحقونة داخل العضلة أو داخل التجويف البريتوني، قادرة على أحداث الأعراض المرضية. وهذه الأعراض تباينت من سمكة لأخرى، حسب مقدار الجرعة البكتيرية وكذلك طريقة الحقن . وقد توافقت نتائج العدوى التجريبية في هذه الدراسة والى حد كبير، مع ما ذكرته بعض المراجع (Faisal & Easa, 1987 ; Meyer and Collar, 1964). وتجدر الإشارة الى أنه ليست كل الأسماك تمر بنفس مراحل المرض في نفس الوقت ولذا أختلفت صور أعراض المرض لإختلاف مقاومة كل سمكة، ومدى إستعدادها وتقبلها للإصابة بالبكتيريا المحقونه. وهذا يعكس تواجد أعراض الإصابة بالصورة الحادة والمتمثلة بعلامات التسمم الدموي. وكذلك تواجد الأعراض بالصورة المزمنة والتي تتمثلت في إلتصاق الأعضاء الداخلية ببعضها البعض، وتلك الأعراض تماثل ما ذكره (Post, 1987; Roberts, 1989) .إلا أن هذه العدوى الصناعية لم تؤدي الى نفوق الاسماك المحقونة خلال العشرة أيام من فترة التجربة. ويعزى ذلك الى متوسط ضراوة البكتيريا المحقونه، إضافة الى تباين الأستجابة المناعية للأسماك المحقونة .وبينت الدراسة أن الحقن داخل التجويف البريتوني أكثر تأثيراً من الحقن داخل العضلة في إحداث المرض .

الأستنتاج والتوصيات

يستنتج من هذه الدراسة أهمية تواجد بكتيريا الزائفة المتألقة كمسبب مرضي يؤثر بوضوح على الحالة الصحية لأسماك المزارع السمكية ومن ثم على الكفاءة الإنتاجية والإقتصادية لتلك المزارع .

وفي ضوء النتائج المتحصل عليها من هذه الدراسة فإنه يوصى بالأتي :

(1) أهمية القيام بالفحص الدوري لمزارع الأسماك لاستبيان مدى تواجد بكتيريا الزائفة المتألقة .

(2) يجب أن يؤخذ في الأعتبار عند تقييم الحالة المرضية الناتجة عن الإصابة ببكتيريا الزائفة المتألقة في المزارع السمكية، الظروف والعوامل البيئية المؤثرة في ديناميكية الإصابة. نظراً للإرتباط الوثيق بين عناصر المشكلة المرضية الثلاث وهي الوسط البيئي ، المسبب المرضي والعائل .

(3) سرعة تشخيص الإصابة وسرعة تقديم العلاج المناسب، والأخذ بالشروط والضوابط المنظمة للإستخدام الأمثل للمضادات الحيوية والكيميائية المستخدمة في العلاج. مع الأخذ في الإعتبار خطورة تواجد بقايا تلك المواد في أنسجة الأسماك. وذلك لاعتبارات الصحة العامة للإنسان، وكذلك لتلافي أستحداث سلالات بكتيرية مقاومة.

المراجـــــع العربية

المنظمة العربية للتنمية الزراعية (1995). دراسة فنية حول آفاق الإستزراع السمكي في دولة الكويت.جامعة الدول العربية ، الخرطوم ، صفحة 32 .

References

Abd El-Aziz, E. S. (1988). Some studies on bacterial agents causing tail and fin rot among freshwater fishes in Egypt. M.V.Sc.Thesis, Dept. of Infect. Dis., Fac. Vet. Med. Cairo Univ.

Austin, B and Austin, D. A. (1989). Methods for the Microbiological Examination of Fish and Shellfish. 1st ed. Ellis Horwood Ltd, England.

Austin, B. and Austin, D.A. (1993). Bacterial Fish Pathogens Disease in Farmed and Wild Fish. 2nd ed. Ellis Horwood Ltd , New York.

Badran, A.F. , and Eissa, I. A. M. (1991). Studies on bacterial diseases among cultured freshwater fish (*Oreochromis niloticus*) in relation to the incidence of bacterial pathogens at Ismailia Governorate. J. Egypt. Vet. Med. Assoc., **51** (4):837-847.

Balows A., Hausler W. J., Herrmann, K. L., Isenberg H. D. and Shadomy, H. J. (1991).Manual of Clinical Microbiology. 5th ed. American Society for Microbiology, Washington, D.C.

Bullock, G. L. Conroy, D. A. and Snieszko, S. F. (1971). Bacterial disease of fishes. *In* **S. F. Snieszko and H. R. Axelrod (eds).** ***Diseases of Fishes***. Neptune, N. J., T. F. H. Publishers.

Egusa, S. (1992). Infectious Diseases of Fish. 1st ed. A.A. Balkema Publications, Brookfield, U.S.A.

Faisal, M. and Easa, M. S. (1987). Acute septicaemia in silver carp (*Hypophthalmichthys moltrix,* VAL.) caused by a capsulated Pseudomonas following transport. J. Egypt. Vet. Med. Ass., **47** (1/2):25-36 .

Gado, M. S. M.(1988) . Studies on some bacterial diseases of cultured fresh water fish in Kafr El-Sheikh Governorate. M.V.Sc. Thesis, Cairo University.

Gierer, W., Rabsch, W. and Reissbrodt, R. (1992). Siderphore pattern of fish-pathogenic *Vibrio anguillarum*, *Aeromonas* spp. and *Pseudomonas* spp. from the German Baltic coast. J. of Fish Dis., **15**: 417-423.

Inglis, V., Roberts, R. J. and Bromage, N. (1993). Bacterial Disease of Fishes. Blackwell Scientific Publications, London, Edinburgh, Boston, ch.10:169-174 pp.

Kimura, T. M. Yoshimizu and M. Wada (1983). In vitro antibacterial activity of the combination of sulfadiazine and trimethoprim on bacterial fish pathogens. J. Fish Dis., **6**: 625-632.

Koneman E W., Allen S D., Janda W M., Schreckenberger P C. and Winn, Jr W C.(1997). Color Atlas and Textbook of Diagnostic Microbiology, 5th Ed. Lippincott-Raven Publishers

Krieg N. R. and Holt, J. G. (1984). Bergey`s Manual of Systematic Bacteriology, 9th ed. vol.1. Williamas & Wilkins. Baltimore, U.S.A.

Lennette, E. H. , Balows. A. , Hausler, W. J. and Traunt, J. P. (1985). Manual of Clinical Microbiology. 4th ed. Amer. Soc. Micro., Washington, D. C.

Lucky, Z. (1977). Methods for the diagnosis of fish diseases. 1st ed. Amerind Publishing Co. PVI Ltd. New York.

Madigan, M. T. , Martinko, J. M. and Parker J. (1997). Biology of Microorganisms, 8th ed. Prentice Hall International, Inc.

Meyer, F. P. and Collar, J. D. (1964). Description and treatment of a pseudomonas infection in white catfish. Appl. Microbial, **12**: 201-203.

Meyer F. P. (1970). Seasonal fluctuations in the incidence of disease on fish farm. ***In*** **Snieszko, Stanislas F. (eds)** ***.Symposium on disease of fish and shellfishes.*** American Fisheries Society, Washington .

Okaeme, A. N.(1989). Bacteria associated with mortality in *Tilapias heterobranchus bidorsalls* and outdoor ponds. J. Aquaculture in the Tropics, **4** (2):143-146.

Post, G.(1987). Textbook of Fish Health. 2nd ed. T.F.H.Publications Inc., Neptune City .

Richards, R. H. ; Roberts, R. J. and Schlottfeldt, H. H. (1985). Bakterielle Erkrankung der Knochenfishe. P. 147-208pp. ***In: Grundlagen der Fischpathologie*** **(R. J. Roberts and H. H. Schlottfeldt).** Verlag Paul Parey.

Roberts R. J. (1989). Fish Pathology. 3rd ed. Bailliere Tindall. Great Britain .

Sousa, J. A., Romalde, J. L. , Ledo, A. , Eiras, J. C. , Barja, J. L. , and Toranzo, A. E. (1996). Health status of salmnid aquaculture facilities in North Portugal: characterization of the bacterial and viral pathgens causing notifiable diseases. J. of Fish Dis., **19**: 83-89 .

Toranzo, A. E., Novoa , B., Romalde, J. L., Nunez, S., Devesa, S., Marino, E., Silva, R., Martinez, E., Figueras, A. and Barja, J. L. (1993). Microflora associated with healthy and diseased turbot (*Scophthalmus maximus*) from three farms in northwest Spain. Aquaculture.**114**:189-202.

Walter, G. R. and Plumb, J. A. (1980). Environmental stress and bacterial infection in channel catfish, *Ictalurus punctatus* Rafinesque. J. Fish Biol.,**17** (2): 177-185 .

Y. H. Sang, Y. D. Yoon, J. M. Park and S. Ho Choi (1990). Survey of bacterial pathogens in inland aquaculture fishes. Res. Rep. Rural Dev ADM (SUWEON), **32**: 52-55.

(Received 13/11/1999, in revised form 30/04/2001)