مجله شیلات
سال سوم، شماره چهارم، زمستان ۸۸

شناسایی و جداسازی باکتری‌های موجود در ضایعات خارجی ماهی پرورشی شیپ (*Acipenser nudiventris*) در مجتمع تکثیر و پرورش ماهیان خاویاری شهید دکتر بهشتی

*سیدجواد ابوالقاسمی[۱]، مهدی سلطانی[۲]، محمدپور کاظمی[۳]، عیسی شریف پور[٤]
بهیار جلالی جعفری[٥] و علیرضا شناور ماسوله[٦]

[۱]دانش‌آموخته دکترای تخصصی بهداشت و بیماری‌های آبزیان، دانشکده علوم تخصصی دامپزشکی، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد علوم و تحقیقات تهران، [۲]گروه بهداشت و بیماری‌های آبزیان، دانشکده دامپزشکی دانشگاه تهران، [۳و٦] انستیتو تحقیقات بین‌المللی ماهیان خاویاری دکتر دادمان، رشت، [٤]موسسه تحقیقات شیلات ایران، تهران، [٥]دانشکده علوم تخصصی دامپزشکی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد علوم و تحقیقات تهران، تهران

چکیده

در این تحقیق تعداد ٦۹۲ عدد ماهی شیپ پرورشی (با دامنهٔ وزنی ۵۷۰-۱۹ گرم) از نظر ضایعات سطح خارجی بدن و وجود عوامل باکتریایی در آنها مورد بررسی قرار گرفتند. این تحقیق از خرداد تا مهرماه ۱۳۸٦ در انستیتو تحقیقات بین‌المللی ماهیان خاویاری دکتر دادمان و کارگاه تکثیر و پرورش ماهیان خاویاری دکتر بهشتی که در مجاور حوزه سد سنگر رشت قرار دارند، انجام پذیرفت. تعداد ۲۳ عدد ماهی شیپ دارای ضایعات مشخص بر روی نقاط مختلف سطح بدن شناسایی و مورد نمونه‌برداری قرار گرفتند. در نتیجه این بررسی بیشترین میزان ضایعات در ناحیه صفحات استخوانی (Scute) با درصد فراوانی ۷۸/۳ درصد و پس از آن به‌ترتیب، پوست (۳۹/۱ درصد) و باله (۸/۷ درصد) مشاهده شد. در بررسی باکتریایی نیز گونه‌های *Aeromonas cavia* و *Acinetobacter lowffii* هریک با درصد فراوانی ۲۳/۵ درصد بیشترین (نسبت به باکتری‌های جدا شده از کل) و گونه *Pseudomonas flurescens* و گونه‌ای از جنس *Enterobacter* هر یک با ۲/۹ درصد کمترین فراوانی را در ضایعات دارا بودند. همچنین گونه‌های *Pseudomonas putida* با ۱٤/۷درصد، *Aeromonas sobria* با ۱۱/۸ درصد، *Acinetobacter calcoaceticus* با ۸/۹ درصد، *Klebsiella oxytoca* و *Aeromonas* (sp) هریک با ۵/۹ درصد به‌ترتیب در رده‌های بعدی فراوانی قرار داشتند. در پوست بیشترین درصد فراوانی از گونه *A.cavia* با ۲۵/۱ درصد (نسبت به دیگر باکتری‌های جدا شده از همین اندام) و در صفحات استخوانی نیز بیشترین درصد فراوانی از همین گونه با فراوانی ۲٦/٤ درصد دیده شد، در باله‌ها بیشترین میزان متعلق به گونه *A.lowffii* با فراوانی ۷۵ درصد بود. همان‌گونه که مشاهده می‌گردد تمامی باکتریایی جدا شده در این تحقیق از نوع گرم منفی می‌باشند. با توجه به ارتباطی که بین گونه‌های باکتریایی جدا شده در این بررسی و گونه‌های شناخته شده در محیط آب وجود دارد، مدیریت بهداشتی از لحاظ تأمین کیفیت مناسب آب و جلوگیری از افزایش بار آلی موجود در آن و جلوگیری از دستکاری بیش از حد و ایجاد آسیب‌های احتمالی که زمینه را برای هجوم عوامل باکتریایی فراهم می‌نماید، ضروری به نظر می‌رسد.

واژه‌های کلیدی: باکتری، شیپ، ضایعات خارجی، گیلان، *Acipenser nudiventris*

مقدمه

دریای خزر بزرگترین دریاچه بسته جهان بوده که در جنوب شرقی قاره اروپا با قاره آسیا هم مرز است، این دریا یک آبگیر لب شور (Brakish Water) بوده که شاخص آن انواع متعدد موجودات آبزی و گونه‌های متنوع ماهیان اقتصادی می‌باشد (٦). از جمله ماهیان دریای خزر خانوادهٔ تاس ماهیان (Acipenseridae) بوده که به علت تولید خاویار گرانبها از مهمترین ماهیان تجاری

*- مسئول مکاتبه: sj_abolghasemi@yahoo.com

Archive of SID
www.SID.ir

جهان محسوب می‌گردند، از این خانواده شش گونه مهم در حوضه دریای خزر حضور داشته که پنج گونه آن در ناحیهٔ جنوب این دریا یافت می‌شوند (۹). یکی از گونه‌های مهم این خانواده، ماهی شیپ با نام علمی *Acipenser nudiventris* است.

شیپ از جمله ماهیانی است که قابلیت تکثیر و پرورش داشته و طول دورهٔ پرورش آن نیز همانند دیگر ماهیان خاویاری طولانی است (۲ و ۸). در طول این دوره نیز عوامل بیماریزا می‌توانند ماهیان را مورد هجوم قرار دهند که استرس ناشی از آن می‌تواند موجب کاهش وزن، کاش بهرهٔ اقتصادی ناشی از آن و حتی تلفات گردد. اندام‌های خارجی ماهیان به‌دلیل اینکه ارتباط مستقیم با محیط آب دارند بیشتر از اندام‌های داخلی در معرض انواع آسیب‌ها و عوامل بیماریزا قرار می‌گیرند. پوست اولین خط دفاعی ماهیان علیه عوامل خارجی بوده و بروز ضایعاتی مانند خراشیدگی، زخم و افزایش بیش از حد موکوس مترشحه، ایجاد زمینه مناسبی برای فعالیت انواع میکروارگانیزم‌ها مانند قارچ‌ها و بخصوص باکتری‌ها و بازشدن راه ورود آنها به بدن می‌گردد (۲٦). در ماهی شیب و دیگر ماهیان خاویاری اگرچه بخش‌هایی از بدن دارای ردیف‌هایی از صفحات استخوانی هستند ولی بقیه بدن فاقد آن بوده و در نتیجه عاری از این نوع سد دفاعی می‌باشند. از جمله مهمترین میکروارگانیزم‌های حاضر در ضایعات سطح خارجی بدن، باکتری‌ها هستند که می‌توانند به‌طور اولیه یا ثانویه در ایجاد یا توسعه اینگونه زخم‌ها نقش ایفا کنند (٤ و ۲۵).

اگر چه مطالعات متعددی در زمینه بروز ضایعات سطح خارجی ناشی از عوامل باکتریایی در سایر گونه‌های ماهیان موجود است (۱، ٤، ۵، ۱۰، ۱۱ و ۲٤)، اما در مورد ماهیان خاویاری به‌دلیل محدود بودن زیستگاه این ماهیان در حوضه‌های آبی جهان، تحقیقات بهداشتی گزارش شده در آنها نیز به همین نسبت اندک می‌باشد.

از جمله تحقیقات به‌عمل آمده در این زمینه می‌توان به بررسی در مورد عوامل باکتریایی جدا شده از عفونت‌های خارجی تاس ماهیان بیمار اشاره نمود که در آن جنس‌های سودوموناس، استرپتوکوکوس، گونه‌های آئروموناس هیدروفیلا، آئروموناس سوبریا، ادواردزیلا تاردا، یرسینیا راکری و فلاوباکتریوم کلومنار گزارش شده است. گزارش‌هایی نیز مبنی بر وجود گونه‌هایی از جنس آئروموناس مانند آئروموناس هیدروفیلا در ضایعات پوستی تاس ماهیان بیمار موجود است (۱۲).

تحقیقات به‌عمل آمده بر روی عوامل باکتریایی ماهیان خاویاری در ایران محدود به فلور طبیعی آنها بوده و تاکنون گزارشی از بررسی باکتریایی بر روی ضایعات بافتی این ماهیان موجود نمی‌باشد. در بررسی که بر روی میکروفلور باکتریایی سطح بدن گونه‌های مختلف تاس‌ماهیان پرورشی در استان گیلان انجام شد گونه‌هایی از جنس آئروموناس، پروتئوس، ادواردزیلا، سالمونلا، سیتروباکتر، مورگانلا، پلزیوموناس، سراتیا، یرسینیا، کلبسیلا، هافنیا، پرووویدنسیا، اشریشیا و ویبریو گزارش شدند (۳).

در بررسی دیگری که بر روی میکروفلور باکتریایی تاس ماهیان پرورشی در مرحله انگشت قد در همین منطقه انجام پذیرفت، باکتری‌هایی از جنس اسینتوباکتر، مورکسلا، آئروموناس، ویبریو، ادواردزیلا، استافیلوکوکوس، پروتئوس، یرسینیا، سودوموناس و پلزیوموناس از سطح پوست، آبشش و باله‌ها جدا گردیدند (۲۷). در گزارشی که راجع به بررسی فلورباکتریایی تاس‌ماهیان رودخانه ولگا در روسیه موجود است، باکتری‌های جنس آئروموناس، انتروباکتر، سودوموناس از آنها جدا شده است (۲۳). در همین راستا Bauer و همکاران (۲۰۰۲)، گزارشی از وجود گونه فلاوباکتریوم جانسونی از نوزاد تاس ماهیان در روسیه ارائه دادند. در مطالعهٔ دیگری که بر روی فلور باکتریای تاس ماهی *Acipenser baeri* در جنوب فرانسه انجام شد، باکتری گونه یرسینیا راکری که عامل بیماری دهان قرمز باکتریایی (Enteric red mouth disease) در ماهیان و به‌ویژه قزل آلای رنگین کمان است، گزارش شده است (۱۹).

همانگونه که یاد شد از آنجایی که تاکنون بررسی بر روی عوامل باکتریایی ضایعات بافتی ماهیان خاویاری در

Archive of SID

www.SID.ir

کشور انجام نپذیرفته و با توجه به لزوم شناخت در مورد چگونگی میزان و نوع آلودگی باکتریایی برای تعیین استراتژی مناسب‌تر در برخورد و مقابله با این عوامل، هدف از تحقیق حاضر تلاشی است جهت آگاهی از فراوانی ضایعات جلدی و نیز نوع عوامل باکتریایی درگیر در این ضایعات که در مسیر روند پرورش ماهی شیپ مشاهده می‌شود.

مواد و روش‌ها

تحقیق حاضر در انستیتو تحقیقات بین‌المللی ماهیان خاویاری دکتر دادمان و کارگاه تکثیر و پرورش ماهیان خاویاری دکتر بهشتی که در مجاور سد سنگر قرار دارند انجام گرفت. نمونه‌برداری جهت بررسی عوامل باکتریایی احتمالی حاضر در ضایعات خارجی ماهی شیپ از تاریخ ۸۶/۳/۲۱ تا تاریخ ۸۶/۷/۱٤ انجام پذیرفت. در این تحقیق تعداد ٦۹۲ عدد تاس ماهی گونه شیب که در شرایط پرورشی بسر می‌بردند از لحاظ وجود زخم بر روی سطح خارجی بدن مورد بررسی قرار گرفتند که از این بین تعداد ۲۳ مورد از آنها دارای ضایعات مشخصی بر روی سطح بدن بودند که مورد نمونه‌برداری قرار گرفتند. دامنهٔ وزنی ماهیان تحت بررسی بین ۵۷۰-۱۹ گرم و دامنهٔ طولی بین ٥٤-۱٦/٥سانتی‌متر قرار داشتند. تاس ماهیان مورد بررسی بسته به مراحل مختلف پرورشی در مخازن نیم تنی و دوتنی از جنس فایبرگلاس نگهداری می‌شدند. حوضچه‌های نیم تنی به ابعاد ۵۰×۱۱۰×۱۰۵ سانتی‌متر و حوضچه‌های دو تنی به ابعاد ۵۰×۱۹۰×۱۹۰ سانتی‌متر است.

تراکم ماهیان در این حوضچه‌ها بسته به دما، میزان آب ورودی، هوادهی و اندازهٔ ماهیان متغییر است. غذای تاس‌ماهیان پرورشی در مجتمع بطور دستی و در فواصل زمانی مشخص به‌صورت پلت در اندازه‌های مختلف آماده شده و ارائه می‌گردد. مراحل مختلف پرورش ماهی شیپ در آب شیرین انجام شده و آب مورد نیاز مراکز نیز عمدتاً از آب رودخانه و به‌طورکمکی نیز از آب چاه تامین می‌گردد.

میزان هوا و آب وارد به هر مخزن نیز قابل تنظیم می‌باشند. در طول دوره نمونه‌برداری، از پارامترهای مختلف آب موجود در حوضچه‌های محل نگهداری ماهیان در فواصل مشخص اندازه‌گیری به‌عمل آمد، در طول مدت نمونه‌برداری به‌طور میانگین میزان دما ۲٦/٥-۲۳ درجه سانتی‌گراد، pH ۷/۲-۸/۷ و اکسیژن ٦/۸-۵/۲ میلی‌گرم در لیتر ثبت شدند. جهت نمونه‌برداری از ماهیان شیب در طول هفته چند نوبت به محل پرورش مراجعه و پس از اندازه‌گیری فاکتورهای فیزیکوشیمیایی آب (اکسیژن، pH و دما) سطح آب تا اندازه‌ای که ماهیان به‌خوبی دیده شده و در دسترس باشند پایین آورده شده و تک تک ماهیان از نظر وجود زخم، علائم خونریزی و ضایعه بر روی نواحی مختلف سطح بدن مورد بررسی قرار می‌گرفتند. در این بین ماهیانی که دارای ضایعات مشخص بودند جهت نمونه‌برداری باکتریایی توسط ظرف‌های مخصوص حمل ماهی به‌همراه آب محل پرورش به آزمایشگاه انستیتو منتقل می‌شدند.

پس از انتقال به آزمایشگاه بدون استفاده از مواد بیهوش کننده ابتدا مبادرت به زیست‌سنجی ماهیان و ثبت مشخصات پرورشی و مشاهده‌ای در فرم‌های مخصوصی که به همین منظور تنظیم شده بود می‌شد. سپس جهت نمونه‌گیری ابتدا محل ضایعه برای رفع فلور میکروبی سطح بدن با آب مقطر و سپس الکل ۷۰ درجه ضدعفونی می‌شد. جهت برداشت نمونه با کمک آنس مستقیم و وارد کردن آن به داخل محل ضایعه اقدام به نمونه‌گیری شده و سپس بلافاصله نمونه مورد نظر به محیط‌های باکتریایی کشت پایه مانند TSA و TSB منتقل می‌شدند. محیط‌های مذکور جهت رشد عوامل باکتریایی احتمالی در گرمخانه (انکوباتور) با دمای ۱±۲۵ درجه سانتی‌گراد به‌مدت ۲٤ تا ۷۲ ساعت نگهداری شدند. لازم به توضیح است که گاه به‌دلیل رعایت موارد پرورشی و بهداشتی و عدم امکان انتقال نمونه‌های ماهی به آزمایشگاه نمونه‌برداری با رعایت اصول بهداشتی در محل پرورش انجام شده و نمونه‌ها بلافاصله به آزمایشگاه منتقل می‌شدند. پس از رشد نمونه‌ها در مرحله بعدی اقدام به خالص‌سازی باکتری‌ها جهت بدست آوردن پرگنه‌های

Archive of SID

www.SID.ir

تک در محیط BHI شده و پس از آن جهت شناسایی اولیه و نیز اطمینان از خالص بودن پرگنه‌ها اقدام به رنگ‌آمیزی گرم و سپس انتقال به محیط‌های بیوشیمیایی مورد نیاز و انجام تست‌های رایج توصیه شده توسط سلطانی (۱۳۷۵)؛ Austin و Austin (۱۹۹۳)؛ Baron و Fiengold (۱۹۹۰)؛ Collee (۱۹۸۹)؛ Holt و Krieg (۱۹۹٤) جهت شناسایی جدایه‌ها می‌شد (جدول ۱). جهت رسم نمودارها از نرم‌افزار Excel 2003 و جهت انجام آنالیز آماری از آزمون مربع-کا ($Ch - Square$) استفاده گردید.

جدول ۱- مشخصات فیزیولوژیکی و بیوشیمیایی گونه‌های مختلف باکتریایی (۱۵، ۱۷ و ۲۰)

آزمایش / باکتری		*Aeromonas sobria*	*A.cavia*	*Acinetobacter lowffii*	*A.calcoaceticus*	*P.fluorescens*	*P.putida*	*Enterobacter*	*Klebsiella oxytoca*
رنگ‌آمیزی گرم		–	–	–	–	–	–	–	–
آزمایش اکسیداز		+	+	–	–	+	+	–	–
آزمایش کاتالاز		+	+	+	+	+	+	+	+
تولید H2S		–	–	–	–	·	·	–	–
تولید ا ندو ل		+	+	–	–	–	–	–	+
حرکت درمحیط کشت		+	+	–	–	+	+	+	–
واکنش متیل رد		–	+	–	–	·	·	·	·
واکنش وژپروسکو ئر		d	–	–	·	·	·	+	+
واکنش O/F		F	F	–	O	O	O	F	F
تولید اوره آز		–	–	–	–	·	·	·	+
لیزین دکربوکسیلاز		+	–	–	–	–	–	·	+
آرژینین دهیدرولاز		+	+	–	·	+	+	·	–
اورنیتین دکربوکسیلاز		–	–	–	–	–	–	+	–
هیدرولیز ژلاتین		+	+	–	–	+	–	–	–
هیدرولیز اسکولین		–	+	·	·	–	–	+	+
هیدرولیز نشاسته		+	+	·	·	–	–	·	·
آزمایش سیمون سیترات		–	d	–	+	·	·	+	+
مصرف گلوکز		+	+	–	–	+	+	+	+
مصرف آرابینوز		–	+	–	–	·	·	+	+
مصرف مانیتول		+	+	–	–	·	·	+	+
مصرف لاکتوز		–	d	–	–	–	–	·	+
مصرف اینوزیتول		–	–	–	–	·	·	·	·
احیاء نیترات		+	+	–	–	–		+	+
حساسیت به ویبریو استاتیک O129(150µg)		–	–	·	·	–	–	·	·
آزمایش ONPG		–	+	·	·	·	·	+	+
رشد در دمای ٤١ درجه سانتی‌گراد		·	·	–	–	–	–	·	·
رشد در دمای ٤٤ درجه سانتی‌گراد		·	·	–	–	·	·	·	·
رشد در محیط پپتون براث حاوی	٪0	+	+	·	·	·	·	·	·
کلرید سدیم :	٪۱	+	+	·	·	·	·	·	·

۱۱ تا ۸۹٪ سویه ها مثبت :d

Archive of SID

www.SID.ir

نتایج

از مجموع ٦٩٢ نمونه تاس ماهی شیپ بررسی شده، تعداد ۲۳ مورد دارای ضایعات خارجی مشخص در نواحی پوست، صفحات استخوانی (پلاک، Scute) و باله بودند. ضایعات موجود به شکل نواحی قرمز به‌صورت هموراژی‌های خفیف تا زخم‌های عمیق قابل مشاهده بود (شکل ۱ و ۲) که نمونه‌برداری از آنها جهت تشخیص عوامل احتمالی باکتریایی حاضر در آنها صورت گرفت. نتایج بدست آمده در جدول‌های ۱ و ۲ و شکل‌های ۳ تا ۷ آورده شده است.

بررسی علائم ظاهری: در بررسی انجام شده بیشترین میزان ضایعات خارجی از صفحات استخوانی با درصد فراوانی ۷۸/۳ درصد (از مجموع کل ماهیان درگیر) و کمترین میزان، در باله با فراوانی ۸/۷ درصد دیده شد (شکل ۳).

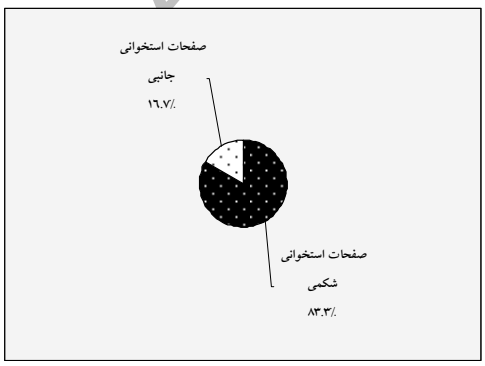
از بین ردیف های مختلف صفحات استخوانی در سطح بدن، صفحات ردیف شکمی با ۸۳/۳ درصد بیشترین درصد فراوانی و صفحات استخوانی جانبی با ١٦/٧ درصد کمترین میزان درگیری رابه خود اختصاص دادند، ضمن اینکه در صفحات ردیف پشتی ضایعه‌ای مشاهده نشد (شکل ٤).

در پوست، بیشترین میزان ضایعه در ناحیه پوست سطح شکمی (بین صفحات استخوانی ردیف‌های شکمی) با درصد فراوانی ۷۷/۸ درصد و کمترین میزان در پوست سطح جانبی (بین صفحات استخوانی جانبی و شکمی) با فراوانی ۲۲/۲ درصد مشاهده شد، ضمن اینکه در پوست سطح پشتی (بین صفحات استخوانی جانبی و پشتی) ضایعه‌ای مشاهده نشد (شکل ۵). در اندام باله نیز تنها دو مورد ضایعه در باله شکمی دیده شد که نمونه‌برداری از آنها صورت گرفت. در مجموع در بررسی که بر روی ۲۳ عدد ماهی شیپ که دارای ضایعات در سطح خارجی بودند، بر اساس آزمون مربع- کا (Ch – Square) فرض صفر رد شده و اختلاف بین فراوانی ضایعات مشاهده شده در بافت‌های سطحی ماهیان مورد بررسی و فراوانی‌های مورد انتظار معنی‌دار بود (ch-Square=٢١/١٣ ،df=٤ ،$P<$ ٠/٠٥) و بر این اساس بیشترین فراوانی ضایعات در صفحات استخوانی ماهیان مورد بررسی مشاهده شد.

شکل ۱- هموراژی شدید در باله شکمی ماهی شیپ

شکل ۲- زخم به همراه هموراژی در صفحات استخوانی و پوست ناحیه شکمی ماهی شیپ

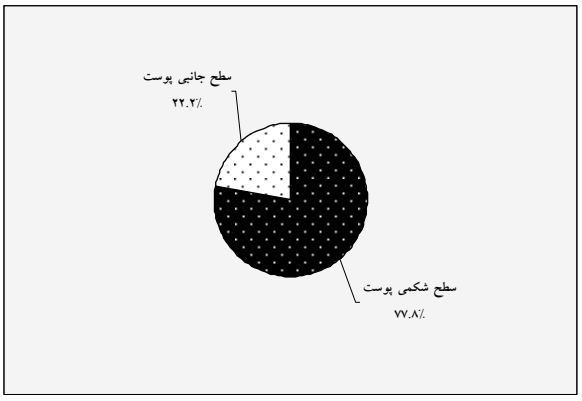
شکل ۳- مقایسه درصد فراوانی ضایعه در قسمت‌های مختلف بدن ماهی



شکل ٤- مقایسه درصد فراوانی ضایعه در قسمت‌های مختلف صفحات استخوانی

Archive of SID

www.SID.ir



شکل ۵- مقایسه درصد فراوانی ضایعه در قسمت‌های مختلف پوست

نتایج آزمایشات بیوشیمیایی: پس از نمونه‌برداری و انجام آزمایشات مقدماتی و تکمیلی لازم، در مجموع ٤ خانواده باکتریایی مشتمل بر ۵ جنس و ۷ گونه جداسازی شدند (جدول ۲ و شکل‌های ٦ و ۷).

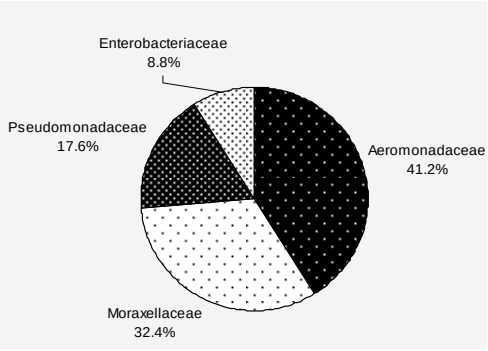
با توجه به نتایج بیان شده در جدول ۲، در اندام پوست بیشترین گونه جداشده، آئروموناس کاویا با درصد فراوانی ۲۵/۱ درصد و کمترین متعلق به گونه‌های آئروموناس سوبریا، اسینتوباکتر کلکواستیکوس، سودوموناس فلوروسنس و گونه‌ای از جنس انتروباکتر هریک با درصد فراوانی ۸/۳ درصد بودند. در صفحات استخوانی نیز بیشترین گونه متعلق به آئروموناس کاویا (۲٦/٤ درصد) و کمترین نیز متعلق به گونه‌ای از جنس آئروموناس (۵/۳ درصد) تعیین شدند. در این بافت، گونه‌های آئروموناس سوبریا، اسینتوباکتر کلکواستیکوس و کلبسیلا اکسیتوکا، هر یک با درصد فراوانی ۱۰/۵ درصد جزو کمترین گونه‌های شناخته شده بودند. در اندام باله نیز دوگونه باکتری یافت شدند که گونه اسینتوباکتر لوفی با فراوانی ۷۵ درصد بیشترین و آئروموناس سوبریا با فراوانی ۲۵ درصد کمترین درصد فراوانی باکتری را در این اندام شامل می‌شدند.

با توجه به نتایج آورده شده در شکل ٦، در مقایسه بین بخش های مختلف ضایعه دیده و باکتری‌های جداشده از آنها، در مجموع، بیشترین درصد فراوانی باکتریایی متعلق به خانواده آئروموناسه (٤۱/۲ درصد) و کمترین از خانواده انتروباکتریاسه (۸/۸ درصد) تعیین شدند، همچنین فراوانترین جنس جدا شده در این تحقیق جنس آئروموناس (٤۱/۲ درصد) و کمترین متعلق به جنس انتروباکتر (۲/۹ درصد) بودند (شکل ۷).

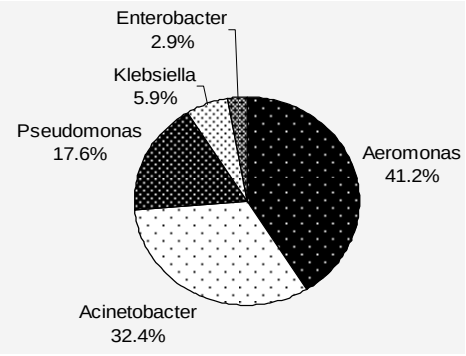
همین‌طور در مجموع در بررسی ۳۸ نمونه باکتری جدا شده از ماهی شیپ و به منظور مقایسه درصد فراوانی گونه‌های باکتریایی جدا سازی شده از ضایعات بافتی بر اساس آزمون Ch – Square فرض صفر رد شده و بین فراوانی گونه‌های باکتریایی مشاهده شده و فراوانی‌های مورد انتظار اختلاف معنی‌دار آماری مشاهده شد ($P<$ ۰/۰۵، df=۸، h–Square =۱۵/۷٦) و بر این اساس بیشترین فراوانی از آن گونه آئروموناس کاویه (۲۳/۵ درصد)، اسینتوباکتر لوفی (۲۳/۵ درصد)، سودوموناس پوتیدا (۱٤/۷ درصد)، آئروموناس سوبریا (۱۱/۸ درصد) بوده است و سایر گونه‌ها در رتبه‌های پایین‌تری قرار داشته‌اند (جدول ۲).

Archive of SID

www.SID.ir



شکل ٦- مقایسه درصد فراوانی خانواده‌های باکتریایی جداسازی شده در تاس ماهی شیپ



شکل ۷- مقایسه درصد فراوانی جنس‌های باکتریایی جداسازی شده در تاس ماهی شیپ

جدول ۲- نوع و تعداد گونه باکتری به تفکیک محل ضایعه

ناحیه / گونه باکتری	پوست		صفحات استخوانی		باله		مجموع	
	تعداد	فراوانی٪	تعداد	فراوانی٪	تعداد	فراوانی٪	تعداد	فراوانی٪
Aeromonas sobria	۱	۸/۳	۲	۱۰/۵	۱	۲۵	٤	۱۱/۸
A.cavia	۳	۲۵/۱	۵	۲٦/٤	۰	۰	۸	۲۳/۵
Aeromonas (sp)	۱	۸/۳	۱	۵/۳	۰	۰	۲	۵/۹
Acinetobacter lowffii	۲	۱٦/۷	٤	۲۱	۲	۷۵	۸	۲۳/۵
A.calcoaceticus	۱	۸/۳	۲	۱۰/۵	۰	۰	۳	۸/۹
Pseudomonas flurescens	۱	۸/۳	۰	۰	۰	۰	۱	۲/۹
P.putida	۲	۱٦/۷	۳	۱۵/۸	۰	۰	۵	۱٤/۷
Enterobacter (sp)	۱	۸/۳	۰	۰	۰	۰	۱	۲/۹
Klebsiella oxytoca	۰	۰	۲	۱۰/۵	۰	۰	۲	۵/۹
مجموع	۱۲	۱۰۰	۱۹	۱۰۰	۳	۱۰۰	۳٤	۱۰۰

بحث و نتیجه‌گیری

بررسی سطح بدن ماهی شیپ بیانگر این نکته است که بخش‌های زیرین بدن ماهی بیشتر در معرض ایجاد زخم و بروز ضایعه هستند که این امر خود می‌تواند در ارتباط با تماس بیشتر ناحیه شکمی با محیط اطراف و ایجاد زمینه مناسب برای ابتلا در اثر تماس فیزیکی با ناحیه مزبور باشد (شکل ۵).

در مطالعه حاضر دو نمونه از ماهیان تحت بررسی در اندام باله دچار ضایعه بوده که هر دو مورد نیز مربوط به باله شکمی بود. در گزارش‌های موجود حاصل از بررسی‌های به‌عمل آمده توسط محققین که برروی تاس‌ماهیان انجام گرفته وضعیت مشابه‌ای دیده شده است، به‌طوری‌که در بررسی دیگری که توسط Hedrick و همکاران (۲۰۰۱) بر روی تاس ماهی سفید پرورشی (*Acipenser transmontanus*) انجام شد، قرمزی ناشی از هموراژی تنها در سطح شکمی و به‌دلیل درگیری باکتریایی تشخیص داده شد. در مطالعه‌ای که توسط Angelica و همکاران (۲۰۰۸) بر روی باکتری‌های بیماریزای فیل ماهی پرورشی در سیستم مدار بسته صورت گرفت، اولین علائم ظاهری وجود هموراژی در قاعده باله‌ها و بخش شکمی بدن گزارش شده و پرخونی و پرولاپس مخرج از دیگر علائم گزارش شده بود. نتیجه بررسی بر روی ماهی شیپ (شکل ٤ و۵) که عمده حضور ضایعات را در سطح شکمی بیان می‌داشت نیز مشابه نتایج بالا بود که از مهمترین دلایل این امر می‌توان به نحوه تغذیه تاس‌ماهیان اشاره نمود. حفره دهانی این ماهیان نیز همچون دیگر اعضای خانواده تاس‌ماهیان در قسمت پایین

Archive of SID

www.SID.ir

سرقرار داشته و این وضعیت شرایط را برای به‌دست آوردن غذا از بستر مهیا می‌کند (۹).

تاس‌ماهیان شیپ مورد بررسی در این تحقیق در حوضچه‌های فایبرگلاس پرورش می‌یافتند در این شرایط ماهیان در اندازه‌ها و تراکم مختلف نگهداری شده و تغذیه آنها بصورت دستی و به شکل غذای پلت صورت می‌گیرد گرچه هنگام غذادهی مقداری از آن در ستون آب توسط ماهیان خورده می‌شوند، ولی میزان زیادی از آن نیز در کف حوضچه ته‌نشین می‌گردند، این امر موجب آن می‌گردد که ماهیان در کف حوضچه در جستجوی غذا بوده و در نتیجه پوست ناحیه شکمی و به‌خصوص صفحات استخوانی آن ناحیه که به‌صورت برآمدگی‌هایی در زیر شکم قرار دارند بطور مداوم در تماس با کف حوضچه باشند که این امر خود شرایط را جهت حساس شدن آن ناحیه و آزردگی بافتی فراهم می‌کند. همچنین در شرایط پرورشی که غالباً تراکم ماهیان بیش از میزان مناسب است، برخورد ماهیان هنگام شنا در مجاور یکدیگر افزایش یافته و دیگر قسمت‌های بدن مانند سطح جانبی نیز دچار آزردگی می‌گردند، چنانکه در این تحقیق میزان درگیری پوست و صفحات استخوانی سطح جانبی بدن بطور بارزی بیش از پوست و صفحات استخوانی سطح پشتی دیده شد.

در صورت حساس شدن پوست بدن، انواع میکروارگانیزم‌ها از جمله عوامل باکتریایی می‌توانند پس از بروز آزردگی بافتی به‌طور ثانویه موجب آلودگی گردند. در این تحقیق با استفاده از آزمایشات بیوشیمیایی مقدماتی و تکمیلی گونه‌های آئروموناس سوبریا و آئروموناس کاویا که همگی ازنوع آئروموناس‌های متحرک می‌باشند از پوست و صفحات استخوانی جدا شد که در این میان گونه آئروموناس سوبریا از اندام باله نیز جدا شد که بیانگر حضور این گونه آئروموناس در تمامی اندام‌های درگیر بود. دیگر گونه‌های جداسازی شده عبارتند از اسینتوباکتر لوفی، اسینتوباکترکلکواستیکوس، سدوموناس فلوروسنس، سدوموناس پوتیدا، کلبسیلا اکسی توکا و گونه‌ای از جنس انتروباکتر.

مطالعات دیگری نیز برای شناسایی عوامل باکتریایی در تاس‌ماهیان پرورشی انجام پذیرفته که در برخی از این گزارش‌ها، باکتری‌های شناسایی شده به‌عنوان دلیل قطعی مرگ و میردر تاس‌ماهیان گزارش شده‌اند (۲۲). در ررسی که بر روی تاس‌ماهیان پرورشی بیمار در خلیج مکزیک انجام گرفت، گونه‌های باکتریایی آئروموناس هیدروفیلا، آئروموناس سوبریا، گونه‌هایی از جنس سودوموناس، ادواردزیلا تاردا، یرسینیا راکری، گونه‌هایی از جنس استرپتوکوکوس و در یک نمونه از ماهی گونه فلاوباکتریوم کلومنار از سطح خارجی بدن جدا شده که در این میان آیروموناس هیدروفیلا، آیروموناس سوبریا و گونه‌های جنس سودوموناس به‌عنوان باکتری‌هایی نام برده شدند که به‌طور معمول از ماهیان بیمار جدا می‌شدند. این باکتری‌ها به‌طور عمده به‌عنوان عوامل فرصت‌طلب در نظر گرفته شده که فاکتورهای استرس‌زا به‌عنوان کلید شیوع آنها می‌باشد (۱۸).

در بررسی دیگری که بر روی تاس‌ماهیان پرورشی در شرایط متراکم در یونان انجام شد باکتری‌های آئروموناس هیدروفیلا، آئروموناس کاویا و گونه‌هایی از میکسوباکتری از پوست و اندام‌های داخلی تاسماهی روسی (*Acipenser guldenstadti*) جدا شدند. در همین بررسی از ضایعات پوستی عوامل قارچی ساپرولگنیا و تک یاخته تریکودینا نیز جزو عوامل آلوده کننده ثانویه معرفی شدند (۱۳).

در بررسی که توسط Hedrick و همکاران (۲۰۰۱) از پوست تاس ماهی سفید پرورشی انجام شد گونه‌هایی از جنس آئروموناس گزارش گردید. همچنین طی تحقیقی که توسط Angelic و همکاران (۲۰۰۸) انجام شد، گونه آئروموناس هیدروفیلا از پوست فیل ماهی پرورشی جدا گردید. نظر به اهمیت سپتی‌سمی‌های باکتریایی ناشی از آئروموناس‌های متحرک به‌خصوص آئروموناس هیدروفیلا مطالعاتی نیز جهت ایمن سازی باکتریایی تاس ماهی

Archive of SID

www.SID.ir

ایرانی (*Acipenser persicus*) انجام گرفت (۲۱ و ۲۸). تحقیقاتی که بر روی تاس‌ماهیان پرورشی کشور انجام گرفته عمدتاً بر روی فلور طبیعی پوست و آبشش ماهیان می‌باشد که از آن جمله می‌توان به بررسی سفلایی (۱۳۸۲) بر روی فلور باکتریایی پوست تاس‌ماهی شیپ پرورشی اشاره نمود که در نتیجه آن گونه‌هایی از جنس یرسینیا نیز شناسایی شد.

در همین راستا طی بررسی که بر روی فلور طبیعی پوست و آبشش تاس‌ماهی شیپ انجام پذیرفت گونه‌هایی از جنس سودوموناس، ویبریو و سراتیانیز گزارش شده است (۷).

در تحقیق دیگری که بر روی فلور طبیعی سطح خارجی گونه‌های مختلف تاس ماهیان پرورشی انجام شد نیز باکتری‌های اسنیتوباکتر، موراکسلا، آئروموناس، ادواردزیلا، استافیلوکوکوس، پروتئوس، یرسینیا و ویبریو شناسایی گردیده است (۲۷).

با توجه به اینکه باکتری‌های فلور سطح بدن ماهیان به‌طور عمده می‌توانند از فلور آب منشأ گرفته و بازتابی از فلور باکتریایی آب پیرامون خود باشند، می‌توان ارتباطی بین بروز و میزان ضایعات پوستی با میزان بار میکروبی و نوع آن قائل شد (۳، ۷ و ۲۷). از آنجایی که منبع عمده تأمین آب مجتمع تکثیر و پرورش از رودخانه بوده و رودخانه‌ها نیز غالباً محل ورود انواع پساب‌ها می‌باشد و دارای بار میکروبی غالباً بالایی هستند، بنابراین لزوم تصحیح آب ورودی به گارگاه با نصب صافی‌های مناسب و در صورت امکان استفاده از اشعه UV می‌تواند تا حد زیادی موجب کاهش بار میکروبی از جمله بار باکتریایی آب ورودی گردد. همچنین کاهش تراکم ماهیان در حوضچه‌های پرورش ماهی تا حد مناسب می‌تواند موجب بهبود وضعیت بهداشتی شود. از طرفی از دیگر راه‌های مقابله با افزایش بار میکروبی، کاهش بار آلی حوضچه‌ها می‌باشد. از آنجایی که کف و دیواره تانک‌های مذکور در مقابل نور طبیعی و شرایط موجود به‌سرعت دچار رشد سریع جلبک می‌گردند و همچنین رسوب مازاد مواد غذایی، تجمع دفعی ماهیان و عدم خروج کامل آنها موجب افزایش بار آلی و در نتیجه بار میکروبی بیش از حد طبیعی خواهد شد، بنابراین شستشوی مرتب این حوضچه‌ها و ضدعفونی کردن آنها با فواصل زمانی مناسب و با رعایت به حداقل رساندن دستکاری ماهیان پرورشی، تاحد زیادی می‌توان موجب کاهش شرایط نامطلوب و افزایش طبیعی مقاومت ماهیان در برابر عوامل استرس‌زای محیطی شد، زیرا بروز اینگونه ضایعات جلدی و پوستی منجر به بروز عدم تعادل اسمزی شده که عمل پلی‌هیدراتاسیون را بدنبال داشته و در نتیجه خود می‌تواند عامل نهایی داخلی مرگ‌ومیر ماهیان دچار ضایعات جلدی و پوستی باشد.

تشکر و قدردانی

بدینوسیله از زحمات جناب آقای مهندس محمد حسین طلوعی ریاست محترم وقت کارگاه تکثیر و پرورش ماهیان خاویاری شهید بهشتی رشت و کارشناسان محترم انستیتو تحقیقات بین‌المللی ماهیان خاویاری دکتر دادمان، آقایان مهندس جلیل جلیل‌پور، مهندس سهیل بازاری مقدم، مهندس مهدی علیزاده، مهندس هوشنگ یگانه، دکتر مهدی معصوم زاده و دکتر مهرداد نصری که در این تحقیق همکاری نمودند کمال سپاسگزاری را داریم.

منابع

۱–اسماعیلی، ف.، ۱۳۷۷. بررسی ضایعات باکتریایی در ماهیان پرورشی استان خوزستان. موسسه تحقیقات و آموزش شیلات ایران. ۸٤ صفحه.
۲–ستاری، م.، شاهسونی، د.، شفیعی، ش.، ۱۳۸۲. ماهی‌شناسی سیستماتیک. نشر حق‌شناس. جلد دوم. ۵۰۲ صفحه.
۳–سفلایی، ن.، ۱۳۷۸. بررسی باکتری‌های گرم منفی غالب در تاس ماهیان سد سنگر. پایان‌نامه دانشجویی. دانشگاه تربیت مدرس. ۸۳ صفحه.
٤–سلطانی، م.، ۱۳۷۵. بیماری‌های باکتریایی ماهی (ترجمه). انتشارات سازمان دامپزشکی کشور با همکاری موسسه نشر جهاد. ٤٥٤ صفحه.

Archive of SID

www.SID.ir

۵–سلطانی، م.، ابـراهیم‌زاده موسـوی، ح.، ۱۳۷۹. جداسـازی آئرومونـاس ورونـی(*Aeromonas veronii*) و آئرومونـاس هیـدروفیلا (*Aeromonas hydrophila*) از تلفات آمور ماهیان پرورشی در دو کارگاه پرورش ماهی واقع در استان‌های گیلان و تهران. مجلـه علمی دانشکده دامپزشکی دانشگاه شهید چمران اهواز. سال سوم شماره چهارم. صفحات ٢٤ تا ٢٩

٦–شریعتی، ا.، ۱۳۸۳. ماهیان دریای خزر. انتشارات نقش مهر. ۲۰۵ صفحه.

۷–شناور، ع.، ۱۳۸۲. بررسی فلور باکتریایی مراحل تخم، لارو، انگشت قد و فون انگلی بچه ماهیان خاویاری در کارگاه تکثیـر و پـرورش شهید بهشتی. گزارش نهایی طرح تحقیقاتی، موسسه تحقیقات شیلات ایران، ۳۷ صفحه.

۸–کیوان، ا.، ۱۳۸۱. مقدمه ای بر بیو تکنولوژی پرورش ماهیان خاویاری. مرکز انتشارات علمی دانشگاه آزاد اسلامی. ۲۷۰ صفحه.

۹– کیوان، ا.، ۱۳۸۲. ماهیان خاویاری ایران. انتشارات نقش مهر. ٤٠٠ صفحه.

۱۰–گلچین منشادی، ع.، ۱۳۸۵. مطالعه باکتریایی و آسیب‌شناسی پوسیدگی باله دمی مولـدین مـاهی آزاد دریـای خـزر در مرکـز تکثیـر و پرورش شهید باهنر کلاردشت. رساله دانشجویی. دانشگاه تربیت مدرس. ۸۳ صفحه.

11. Altinok, I., Kayis, S. and Capkin, E., 2006. *Pseudomonas putida* infection in Rainbow trout. Journal of Aquaculture, 261(3), 850-855.
12. Angelica, D., Iulia G., Lorena S., Vasilean I. and Cristea V., 2008. Studies regarding the presence of the phathogens bacteria into a recirculating system of BELUGA Sturgeon intensive rearing. Lucari stiintifice zootehnnie si Biotehoologii, 41(2), 41-45.
13. Athanassopoulou, F., Billinis, C. and Prapas, Th., 2004. Important disease condition of newly cultured species in intensive fresh water farms in Greece: First incidence of Nod virus infection in *Acipenser* sp. Journal of Diseases of Aquatic organisms, 60: 247-252.
14. Austin, B. and Austin, D.A., 1993. Bacterial Fish pathogens: Disease in Farmed and Wild fish. 2nd Edition, Ellis Horwood Ltd. Chichester, 376 p.
15. Baron, E.J. and Finegold, S.M., 1990. Diagnostic microbiology. 8th Edition, Mosby Comp,:861p.
16. Bauer, O.N., Pugachev, O.N. and Voronin,V.N., 2002. Study of parasites and Disease of Sturgeons in Russia. a review. J. Appl. Ichthyology, 18, 420-429.
17. Collee, J.G., Duguid, J.P., Fraser, A.G. and Marmion, B.P., 1989. Practical Medical Microbiology. 13th Edition, Vol. 2, produced by Longman Singapore Publishers (Pte) Ltd.
18. Francis-Floyd, R., 2000. Proceeding of the Florida Sturgeon culture. Risk Assessment Work shop, pp. 33-34.
19. Hedrick, R.P., Lapattra, S., Mcdowell, T. and Macconnell, B., 2001. Workshop on Sturgeon diseases.4th Symposium on Sturgeon. Oshkosh, Wisconsin, USA. 21p.
20. Holt, J. and Krieg, N., 1994. Bergey's Manual of Determinative Bacteriology. 9th Edition, The Williams comp: 787p
21. Kalbasi, M.R., Soltani, M., Pourbaksh, S.A. and Adams, A., 2000. Humoral Immune Cultured Persian Sturgeon (*Acipenser persicus*) to Four Different *Aeromonas hydrophila* Antigens. Arc. Razi Ins., pp.5-83.
22. Klinger, R., Francis, F. and Riggs, R., 2000. A ten year history Sturgeon diagnostic cases. Proceedings of the American Association of zoo veterinarians and the international Association for aquatic Animal Medicin, Joint conference. 515 p.
23. Lartseva, L.V., 1999. Microbiological monitoring of Sturgeon (Acipenseridae) in the Volga delta. Journal Appl. Ichthyology, 15, 291-292.
24. Nieto, T.P., Lopez, L.R., Santos, Y., Nunez, A. and Toranzo, A.E., 2006. Isolation of *Serratia plymuthica* as an apportunistic pathogen in rainbow trout, Salmo gairdneri Richardson. Journal of Fish Diseases, 13(2): 175-177.
25. Noga, E.J., 2000. Fish Disease, Diagnosis and Treatment. Iowa State university press. Iowa, USA, pp: 367.
26. Sharifpour, I., 1997. Histology of the inflammatory response of carp (*Cyprinus carpio*) to various stimuli. Thesis submitted to the University of Stirling. Stirling Scotland. 377 P.
27. Shenavar, M.A., Sharifpour, I. and Shojaei, A.A., 2006. The aerobic Bacterial flora of hatchery reared Caspian Sea Sturgeon fingerlings. Journal of Ichthyology, 22, 261-264.
28. Soltani, M. and Kalbasi, M.R., 2001. Protection of Persian Sturgeon (*Acipenser persicus*) fingerling against *Aeromonas hydrophila* Septicemia Using three different antigens. Bull. Eur. Ass. Fish Pathol., 21(6): 235-240.

Archive of SID

www.SID.ir

Identification & isolation of bacterial of external lesions on cultured *Acipenser nudiventris* in Shahid Beheshti artificial propagation& breeding center

***S.J. Abolghasemi[1], M. Soltani[2], M. Pourkazemi[3], I. Sharifpour[4], B. Jalali Jafari[5] and A.R. Shenavar Masuleh[6]**

[1]Post graduated of Aquatic Animal Health, College of specialized Veterinary Sciences, Islamic Azad University, Tehran Science and Research branch, [2]Professor, Dept. of Aquatic Animal Health, College of Veterinary Medicine, University of Tehran, [3,6]Dr. Dadman International Sturgeon Research Institute, Rasht, [4]Iranian Fisheries Research Organization, [5]College of specialized Veterinary Sciences, Islamic Azad University, Tehran Science and Research branch

Abstract

This study was done on 692 specimens of Ship Sturgeon (*Acipenser nudiventris)* in International Sturgeon Research Institute Dr Dadman and Sturgeons rearing and propagation Shahid Beheshti hatchery from June to October 2007. A number of 23 specimens were identified from viewpoint of external lesions and samples were studied for bacterial agent's isolations. The observation showed the most content of lesions were related to scutes with abundance of 78.3%, skin (39.1%) and finally fin (8.7%). In bacteriological experiments, *Aeromonas cavia* (23.5%) and *Acipenser lowffii* (23.5%) had the most abundance (from total bacteria) and *Pseudomonas flurescens* and *Enterobacter*(sp) 2.9% had the least frequency. Also, *Pseudomonas putida* (14.7%), *Aeromonas sobria*(11.8%), *Acetinobacter calcoaceticus* (8.9%), *Klebsiella oxytoca* (5.9%) and *Aeromonas*(sp) with abundance 5.9% were come next. *A.cavia* in lesions of skin (25.1%) and scute (26.4%) had the most aboundance.In fin; *A.lowffii* (75%) had the most abundance. In this survey, all isolated bacteria were gram negative. With regard to existence of bacteria in lesions, the reason can be the water source in culture. So, health management is mandatory to keep water in good quality and suitable density and take a good care of it in order to control the bacterial agent.

Keywords: Bacteria; Ship Sturgeon; External lesions; Guilan *Acipenser nudiventris*.

Archive of SID

*Corresponding author; Email: sj_abolghasemi@yahoo.com

www.SID.ir