

## جداسازی و شناسایی گونه‌های غالب ویبریو در میگوهای پرورشی تعدادی از کارگاههای پرورش میگوی حله بوشهر

دکتر مهدی سلطانی<sup>۱</sup>، دکتر شاپور کاکولکی<sup>۲</sup>، دکتر مهران اوخ کیسی<sup>۲</sup>

مجله دانشکده دامپزشکی دانشگاه تهران، دوره ۵۵، شماره ۲، ۳۲ - ۲۹، (۱۳۷۹)

۲ - کشت و جداسازی: میگوها را پس از جمع‌آوری، بلافاصله در کاغذ آلومینیوم فویل استریل قرار داده و در کنار یخ همراه با نمونه آب استخرها به آزمایشگاه مرکز آموزش عالی شیلاتی بوشهر منتقل، پس از ضدعفونی کردن سطح بدن میگوها با الکل ۷۰ درصد یا یدوفور یک درصد از اندامهای هپاتوپانکراس، همولنف (با قطع آنتن)، آبششها و جراحات پوسته (در صورت وجود) و عضله شکمی بر روی TCBS حاوی ۲ درصد آب دریا و یا TSA حاوی ۵۰ درصد آب دریا در ۲۵ - ۲۲ درجه سانتیگراد تا ۲۲ ساعت کشت باکتریایی داده می‌شد.

۳ - شناسایی نمونه‌های باکتریایی: از نمونه‌های باکتریایی به‌دست آمده ابتدا اقدام به تهیه گسترش و رنگ‌آمیزی گرم نموده تا ضمن اطمینان از خلوص پرگنه‌ها، نمونه‌های گرم مثبت حذف و از پرگنه‌های خالص و گرم منفی کشت ثانویه بعمل می‌آمد. سپس با انجام آزمایش اکسیداز و ویبریوستاتیک کشت (۱۵۰ μg / disk)، کلیه نمونه‌های اکسیداز منفی و مقاوم به ویبریوستاتیک نیز حذف شده و تنها نسبت به شناسایی نمونه‌های گرم منفی میله‌ای، اکسیداز مثبت و حساس به ویبریوستاتیک اقدام می‌شد (۴ و ۷) (جدول ۱). به‌علاوه به‌منظور اطلاع از شرایط فیزیولوژیک ارگانیس‌های باکتریایی به‌دست آمده، نسبت به تأثیر درجه حرارت شوری و PH بر روی رشد آنها و با استفاده از محیط‌های TSB حاوی آب دریا اقدام گردید. همچنین با استفاده از آنستی‌بیوتیک‌های سفالوتین، آمپی‌سیلین، پنی‌سیلین، کلرامفنیکل و اکسی‌تراسایکلین نسبت به تعیین میزان حساسیت گونه‌های باکتریایی به‌دست آمده به روش دیسک اقدام شد (جدول ۱).

۴ - کیفیت آب: در زمان نمونه‌برداری نسبت به تعیین میزان اکسیژن محلول، آمونیاک، درجه حرارت، pH و درجه شوری آب استخرهای محل نمونه‌برداری اقدام می‌گردید.

### نتایج

۱ - مشاهدات بالینی: از نظر بالینی میگوهای بیمار یا در حال مرگ حاوی علائمی از قبیل لکه‌های تیره، قرمز و قهوه‌ای در روی پوسته بوده و به‌صورت بیحال در کناره‌های استخر و یا به‌صورت وارونه و یا خمیده در سطح آب قابل مشاهده بودند (تصویر ۱). ضمایم حرکتی این گونه میگوها بعضاً از بین رفته بود.

به‌طورکلی فاکتورهای آب در تمامی استخرهای محل نمونه‌برداری و در زمان نمونه‌برداری شامل pH، درجه حرارت، درجه شوری و اکسیژن بترتیب در دامنه ۸/۹ - ۸/۲، ۴۲ ppt - ۳۰، ۳۳ - ۲۶/۵ درجه سانتیگراد و ۸ mg/l - ۵ بوده است.

۲ - باکتری‌شناسی: نتایج باکتری‌شناسی در جدول ۱ آمده است. به‌طورکلی ۱۶۴ نمونه باکتریایی اکسیداز مثبت، میله‌ای، گرم منفی و حساس به ویبریوستاتیک از همولنف (۵۲ نمونه باکتریایی)، هپاتوپانکراس (۵۰ نمونه باکتریایی)، آبششها (۴۱ نمونه باکتریایی) و عضله شکمی یا جراحات سطحی (۲۱ نمونه باکتریایی) جداسازی گردید که می‌توان آنها را در چهار گونه از جنس

به‌منظور مطالعه علل احتمالی باکتریایی (ویبریوها) تلفات در کارگاههای میگو حله بوشهر، طی ایام مرداد تا آذر ۱۳۷۶ از تعداد ۲۱۵ نمونه میگوی سفید هندی (*Penaeus indicus*) و ببری سبز (*Penaeus semisulcatus*) بیمار یا تازه تلف شده نمونه‌برداری، کشت باکتریایی و شناسایی باکتریهای جداسازی شده بعمل آمد. از ۱۶۴ نمونه باکتریایی به‌دست آمده و متعلق به جنس ویبریو، تعداد ۴۸ نمونه (۲۹/۲۰ درصد) آن را ویبریو پاراهمولیتیکوس (*Vibrio parahaemolyticus*) نمونه (۲۱/۹ درصد) ویبریو هاروی (*Vibrio harveyi*)، ۳۶ نمونه (۲۱/۹ درصد) ویبریو آلجینولیتیکوس (*Vibrio alginolyticus*) ۲۶ نمونه (۹/۷۵ درصد) ویبریو آنگوئیلاروم (*Vibrio anguillarum*)، ۲۸ نمونه (۱۷ درصد) دیگر متعلق به گونه‌های ناشناخته‌ای از این جنس بوده است. در آزمایش آنتی‌بیوگرام به روش دیسک، اکثر ارگانیس‌های باکتریایی مذکور به کلرامفنیکل، سفالوتین و اکسی‌تراسایکلین حساس، اما به پنی‌سیلین و آمپی‌سیلین مقاوم بودند.

واژه‌های کلیدی: ویبریو، میگوی سفید هندی، میگوی ببری سبز، باکتری‌شناسی.

ویبریوزیس یکی از جدی‌ترین و مهم‌ترین عفونتهای باکتریایی در کارگاههای تکثیر و پرورش میگو بوده که می‌تواند خسارات قابل توجهی را موجب شود. بیماری تاکنون از مزارع پرورش میگو در مناطق متعدد جهان گزارش و در بعضی مناطق مانند تایلند، تایوان، چین و اندونزی موجب خسارات سنگینی بر این صنعت شده است (۱، ۲، ۳، ۴، ۵، ۶، ۷، ۸، ۹، ۱۰، ۱۱، ۱۲).

نتایج مطالعات انجام شده در بعضی مناطق نشان می‌دهد که برخی گونه‌های باکتریایی جنس ویبریو از جمله ویبریو آلجینولیتیکوس، ویبریو پاراهمولیتیکوس، ویبریو هاروی، ویبریو اسپلندیدوس (*V. splendidus*) و ویبریو والنیفیکوس (*V. vulnificus*) از جمله گونه‌های غالب و بیماریزا در میگوهای پرورشی است (۱۰، ۹، ۶، ۵).

در ایران علی‌رغم توسعه سریع و وسیع صنعت پرورش میگو، مطالعات اندکی در خصوص ارزیابی فون میکروبی غالب محیط‌های آبی محل پرورش و بویژه گونه‌های ویبریویی بیماریزا صورت گرفته است (۱ و ۲). بنابراین هدف از این مطالعه شناسایی گونه‌های غالب ویبریو در میگوهای پرورشی بیمار و تازه تلف شده تعدادی از کارگاههای پرورش میگو حله بوشهر بوده است.

### مواد و روش کار

۱ - میگو: از تعداد ۲۱۵ قطعه میگوی سفید هندی (۹۴ قطعه) و ببری سبز (۷۰ قطعه) به‌ترتیب با میانگین طولی و وزنی ۷/۵ سانتیمتر و ۶/۵ گرم نمونه‌برداری به عمل آمد. میگوهای مذکور از ۱۰ استخر پرورشی واقع در چهار مزرعه پرورشی که از کانال آبرسانی مشترکی برخوردار بودند، به‌دست آمد. به علاوه میگوهای مذکور یا بیمار بوده و دارای علائمی از قبیل بی‌اشتهایی، بیحالی، تیرگی یا قرمز شدن ضمامم حرکتی و پوسته، خوردگی ضمایم حرکتی و بعضاً وجود لکه‌های سیاه روی پوسته بودند.

۱ گروه بهداشت و بیماریهای آبزیان دانشکده دامپزشکی دانشگاه تهران، تهران - ایران.

۲ مرکز آموزش عالی شیلاتی خلیج فارس، بوشهر - ایران.



جدول ۱- مشخصات فیزیولوژیک و بیوشیمیایی گونه‌های ویبریو به دست آمده از میگوهای پرورشی ببری سبز و سفید هندی کارگاههای حله بوشهر

نتیجه				مشخصه
D	C	B	A	
-	-	-	-	رنگ آمیزی گرم
+	+	+	+	حرکت
+	+	+	+	اکسیداز
+	+	+	+	کانالاز
+	+	+	+	اندل
+	-	-	-	متیل رد
+	-	-	+	VP
+	+	+	+	O/F
d	+	+	+	سیترات
+	+	+	+	نیترات
-	+	-	-	SH2
+	+	+	+	ژلاتین
-	-	-	-	اوره
-	-	-	+	هیدرولیز آرژنین
				دکربوکسیلاسیون:
+	+	+	-	ارنیتین
+	+	+	-	لیزین
				مصرف:
+	+	+	+	گلوکز
-	-	-	-	اینوزیتول
+	d	-	+	سوکروز
+	+	+	+	مانیتول
-	d	d	+	آرابینوز
-	-	-	-	تولید گاز از گلوکز
-	d	-	+	ONPG
				ویبریوستاتیک:
R	d	R	S	۱۰ µg / disk
S	S	S	S	۱۵۰ µg / disk
Y	Y / G	G	Y	رنگ پرگنه روی TCBS
				رشد در:
-	-	-	-	۴° C
+	+	+	+	۱۵° C
+	+	+	+	۳۰° C
+	+	+	+	۳۶° C
+	+	+	+	۴۰° C
				رشد در (% NaCl):
-	-	-	-	۰
-	-	-	-	۰/۵
+	+	+	+	۱
+	+	+	+	۴
+	+	+	+	۵
				رشد در آب دریا (PPT):
+	+	+	+	۱۲
+	+	+	+	۲۴
+	+	+	+	۳۶
				رشد pH:
-	-	-	-	۵
+	+	+	+	۹
+	+	+	+	۱۰
-	-	-	-	۱۱
				حساسیت به:
R / S	R / S	R / S	R / S	اکسی تتراسایکلین
S	S	S	S	۳۰ µg
S	S	S	S	۶۰ µg
R / S	R / S	R / S	R / S	کلرامفنیکل (۳۰ / µg)
R	R	R	R	سفالوتین (۳۰ / µg)
R	R	R	R	پنی سیلین (۱۰ / µg)
R	R	R	R	آمپی سیلین (۱۰ / µg)

A = ویبریو آنکوئیلاروم ، B = ویبریو پاراهمولیتیکوس ، C = ویبریو هاروی ، D = ویبریو آلجینولیتیکوس ، d = واکنشهای متغیر ، R = مقاوم ، S = حساس ، Y = پرگنه زرد ، G = پرگنه سبز.



می‌تواند متغیر باشد.

طی مطالعه‌ای توسط Hanna, Chan (۱۹۹۴) مهمترین گونه‌های عامل ویبریوزیس در میگوی منودون را ویبریوالجینولیتیکوس، پاراهمولیتیکوس و آنگوئیلاروم معرفی نموده است (۵) همچنین Tungmadi, Nash (۱۹۹۲)، Kitao, Runngpan (۱۹۹۱) گونه‌های آلیجینولیتیکوس، پاراهمولیتیکوس و آنگوئیلاروم را به عنوان گونه‌های عمده عامل بیماری ویبریوزیس در میگوها گزارش نموده‌اند. از ۳۵۷ نمونه باکتریایی به دست آمده از هپاتوپانکراس میگوی منودون پرورشی در تایوان چهار گونه پاراهمولیتیکوس، آلیجینولیتیکوس، والنفییکوس و آنگوئیلاروم گونه‌های غالب را تشکیل می‌دادند (۹). در مطالعه حاضر گونه‌های پاراهمولیتیکوس، هاروی، آلیجینولیتیکوس و آنگوئیلاروم به ترتیب گونه‌های غالب ویبریو به دست آمده از میگوهای ببری سبز و سفید هندی بوده است. با توجه به جداسازی تعدادی از این ارگانیسمها از همولنف ۵۲ میگوی بیمار و نیز از هپاتوپانکراس ۵۰ میگو می‌توان آنها را به عنوان عامل بخشی از تلفات در کارگاههای پرورشی میگو و حله بوشهر معرفی کرد. علاوه با توجه به بیشترین موارد جداسازی ویبریو پاراهمولیتیکوس و هاروی از همولنف و هپاتوپانکراس میگوها، می‌توان به نقش احتمالی بیشتر آنها در بروز ویبریوزیس در میگوهای پرورشی این منطقه توجه نمود. از آنجایی که عوامل استرس‌زا در بروز عفونت‌های ناشی از این باکتریها تعیین کننده است لذا توجه پرورش دهندگان را به رعایت اصول بهداشتی و روشهای پیشگیری از ایجاد هر گونه شرایط استرس‌زا جلب می‌نماید.

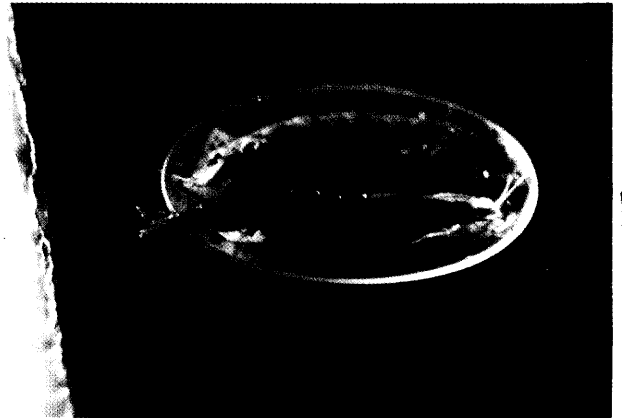
### تشکر و قدردانی

این مطالعه با حمایت گروه بهداشت و بیماریهای آبزیان دانشکده دامپزشکی دانشگاه تهران، گروه شیلات دانشکده منابع طبیعی و علوم دریایی نور دانشگاه تربیت مدرس و مرکز آموزش عالی شیلاتی بوشهر صورت گرفته است.

### منابع

۱. تمجدی، ب.، اسماعیلی، ف.، مرزعاوی، م.، جهانشاهی، ع.ا.، و گرن، ن. م. پروژه بررسی بیماری باکتریایی پوسته و ویبریوزیس در میگوهای پرورشی منطقه قفاس آبادان، مؤسسه تحقیقات و آموزش شیلات ایران، (۱۳۷۷).
۲. مجیدی نسب، ا. مروری بر بیماریهای میگوهای پرورشی با تأکید بر باکتریهای جدا شده از آن. پایان‌نامه دانشکده دامپزشکی دانشگاه تهران. صفحه: ۲۸۴. (۱۳۷۴).

3. Baticados, M. L. and Lavilla - Pitogo, C. Disease of penaeid shrimp in the philippines Aquaculture Extension Manual No. 16 SEAFDEC, (1990).



تصویر ۱ - میگوی سفید هندی بیمار و حاوی لکه‌های تیره و قرمز بر روی پوسته

ویبریو شامل ویبریو پاراهمولیتیکوس (۴۸ نمونه)، ویبریو آلیجینولیتیکوس (۳۶ نمونه)، ویبریو هاروی (۳۶ نمونه)، ویبریو آنگوئیلاروم (۲۶ نمونه) طبقه‌بندی نمود.

تعداد ۲۸ نمونه باکتریایی باقیمانده را می‌توان در جنس ویبریو ولی گونه‌های ناشناخته آن طبقه‌بندی نمود. گونه و تعداد نمونه‌های باکتریایی به دست آمده از هر کدام از گونه‌های میگو و اندامهای مربوطه در جدول ۲ آمده است. به طوری که گونه‌های ویبریو هاروی و آلیجینولیتیکوس بیشترین موارد جداسازی از میگوی سفید هندی بوده‌اند، در حالی که گونه‌های آنگوئیلاروم و پاراهمولیتیکوس گونه‌های غالب به دست آمده از میگوی ببری سبز را تشکیل می‌دهند. اکثر گونه‌های باکتریایی مذکور نسبت به آنتی‌بیوتیک‌های اکسی‌تتراسایکلین، سفالوتین و کلرامفنیکل حساس اما نسبت به پنی‌سیلین و آمپی‌سیلین مقاوم بودند (جدول ۱).

### بحث

مطالعه‌های متعددی در خصوص جداسازی و شناسایی فلور باکتریایی و بویژه گونه‌های ویبریو به عنوان عوامل ثانویه بیماری‌زا در کارگاههای پرورش میگو از مناطق مختلف جهان گزارش شده است (۱۱، ۱۰، ۹، ۵). ویبریوها بیشتر در مناطق ساحلی آرام، حاوی اکسیژن کم و سرشار از مواد آلی یافت می‌شوند (۷) و گونه‌های زیادی از آنها به عنوان بخشی از فلور میکروبی جانوران آبی از جمله ماهیان می‌باشند. به هر حال بسته به شرایط محیطی و اکولوژیکی مناطق مختلف، تنوع و فراوانی گونه‌های این جنس باکتریایی

جدول ۲ - گونه و تعداد باکتریهای ویبریو جداسازی شده از اندامهای مختلف میگوهای پرورشی سفید هندی و ببری سبز منطقه حله بوشهر

گونه ویبریو	گونه میگو		همولنف	هپاتوپانکراس	آبشش	عضله شکمی یا جراحات پوستی
	سفید هندی	ببری سبز				
پاراهمولیتیکوس	۱۷	۳۱	۱۷	۱۴	۱۰	۷
آلیجینولیتیکوس	۲۳	۱۳	۱۱	۱۱	۱۰	۳
هاروی	۲۴	۱۲	۱۵	۱۴	۵	۲
آنگوئیلاروم	۱۲	۴	۴	۶	۳	۳
گونه‌های ناشناخته ویبریو	۱۸	۱۰	۵	۵	۱۲	۶
جمع کل	۹۴	۷۰	۵۲	۵۰	۴۱	۲۱



4. Baumann, P. and Schubert, R. H. W. Family Vibrionaceae In : Krieg, N. R. and Holt, J. G. (eds) *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology* Vol. 1, Williams and Wilkins, USA , 516 - 570 pp, (1984).
5. Chen, S. N. and Hanna, P. *Vibrio* bacteria attaching to tissue of the penaeus monodon. *Dis. Aquat. Org.* 20 : 159 - 162, (1994).
6. Chen, S. N. Huang, S. L. and Kou, G. H. Studies on the epizootiology and pathogenicity of bacterial infections in cultured giant tiger prawn (*penaeus monodon*) in Taiwan. In : Fulks W. & Main K. L. (eds) *Disease of Cultured Penaeid Shrimp in Asia and the United States*. The Oceanic Institute Hawaii, pp : 195 - 205, (1992).
7. Hjeltnes, B. and Roberts, R. J. *Vibriosis*. In : Inglis, V. Roberts, R. J. and Bromage (eds) *Bacterial Disease of Fish*. Blackwell scientific Publications pp : 109 - 122, (1993).
8. Lightner, D. V. Diseases of cultured penaeid shrimp. In : J. Mcvey (Ed.) *CRC Handbook of mariculture Volume 1 , crustacea Aquaculture* CRC Press, Inc. Boca Raton F. L. pp : 289 - 320, (1983).
9. Liu, P. C. Lee K. K. and Chen, S. W. Pathogenicity of different isolates of *Vibrio harveyi* in tiger prawn (*P. monodon*). *Letters in Applied Microbiology* 22 : 413 - 416, (1996).
10. Nash, N. and Tungmandi, C. *Vibriosis and its control in pond reared penaeus monodon in Thailand*. Asian Fisheries society. Manila pp : 143 - 155, (1992).
11. Ruagpan, L. and Kitao, T. *Vibrio* bacteria isolated from black tiger shrimp (*penaeus monodon*) Fabricius. *J. Fish Dis.* 14 : 383 - 8, (1991).
12. Shariff, M. and Sabasinghe, R. P. Major diseases of cultured shrimp in Asia. An overview In : W. Fulks and Main, K. L. (eds) *Diseases of cultured Penaeid shrimp in Asia and the United States the oceanic Institute Hawaii*, pp : 37 - 46, (1992).

(94 samples) and *P. semisulcatus* (70 samples) were obtained from 10 reared ponds. The bacteriological examination resulted in isolation and identification of 164 isolates of *Vibrio* consisting of *V. parahaemolyticus* (29.2 %), *V. harveyi* (21.9 %), *V. alginolyticus* (21.9 %), *V. anguillarum* (9.75 %) and *Vibrio* sp, (17 %). These bacterial isolates were sensitive to chloramphenicol , cephalotin and oxytetracycline but not to ampicillin and penicillin.

**Key words** : *Vibrio*, *Peneaus indicus*, *P. semisulcatus*, Bacteriology.

### **Isolation and identification of dominant *Vibrio* species in farmed prawn of Heleh station, Bushehr**

Soltani, M.<sup>1</sup>, Kakoolaki, Sh.<sup>2</sup>, Kisami, M.<sup>2</sup>

<sup>1</sup>*Department of Aquatic Animal Health, Faculty of Veterinary Medicine, Tehran University, Tehran - Iran.* <sup>2</sup>*Higher Education Fishery Centre of Bushehr, Iran.*

To study the role of *Vibrio* bacteria as probable agents associated with currently occurrence of mortality in farmed prawn of Heleh station in Bushehr, 215 moribund or freshly dead *Peneaus indicus*