مقاله تحقیقی
مجله تحقیقات دامپزشکی، ۱۳۹۷، دوره ۷۳، شماره ۳، ۲۸۹-۲۸۳
Original Article
DOI: 10.22059/jvr.2018.141919.2427

شناسایی برخی آلودگی‌های باکتریایی موجود در ماهیان تیلاپیای نیل (*Oreochromis niloticus*) پرورش یافته در ایران

فیروز فدایی فرد[1*] علی حاجیان[2] فاطمه امید[2] امیرحسین شاهینی تیران[2] آرمان چراغی[2]
۱) گروه بهداشت و بیماری‌های آبزیان، دانشکده دامپزشکی دانشگاه آزاد اسلامی شهر کرد، شهر کرد، ایران
۲) دانشکده دامپزشکی، دانشگاه آزاد اسلامی شهر کرد، شهر کرد، ایران

(دریافت مقاله: ۳ بهمن ماه ۱۳۹۶، پذیرش نهایی: ۲۵ اردیبهشت ماه ۱۳۹۷)

چکیده

زمینه مطالعه: ماهی تیلاپیا از جمله ماهیان مهم پرورشی دنیا محسوب می‌شود. در سال‌های اخیر جهت بررسی امکان سنجی رشد این ماهی در شرایط اقلیمی ایران اقدام به نگهداری وپرورش آن در منطقه بافق استان یزد گردید. **هدف:** هدف از اجرای تحقیق حاضر شناسایی برخی باکتری‌های مهم بیماری‌زای ماهیان تیلاپیای نیل پرورش یافته در مرکز تحقیقات آبزیان بافق بوده است. **روش کار:** در این مطالعه ابتدا ۳۰ عدد تیلاپیا به صورت تصادفی، با وزن متوسط ۱۵۳/۴ g و طول ۲۰/۱۳ cm از استخرهای پرورشی برداشت گردید. پس از نمونه برداری باکتریایی از کلیه و کبد ماهیان اقدام به انجام برخی آزمون‌های بیوشیمیایی همچون رنگ‌آمیزی گرم، کاتالاز، تولید گاز سولفید هیدروژن، اندول و تست حرکت استفاده شد. درشناسایی قطعی باکتری‌ها نیز با استفاده از جفت پرایمرهای اختصاصی برای هر باکتری، آزمون PCR (Polymerase chain reaction) انجام شد. بدین منظور در هر باکتری یک ژن هدف مورد ردیابی قرار گرفت. **نتایج:** در این مطالعه از هر دو گروه باکتری گرم مثبت و گرم منفی شش گونه مختلف شناسایی شد. در گروه گرم مثبت، گونه لاکتو کوکوس گاروبیه و در گروه گرم منفی گونه‌های یرسینیا رکری، آئروموناس هیدروفیلا، ویبریو آژینولیتیکوس، ویبریو ولنیفیکوس و ویبریو پارا هموليتيكوس مورد شناسایی قرار گرفت. **نتیجه گیری نهایی:** برای پرورش ماهی تیلاپیا شناخت عوامل مختلف باکتریایی در محیط اطراف آن‌ها امری ضروری است هر کدام از این باکتری‌ها می‌توانند تهدیدی برای شرایط زیستی ماهیان به شمار روند. که توجه به مدیریت بهداشتی به حفظ سلامتی ماهیان و بقاء آن‌ها در شرایط پرورشی کمک خواهد نمود.

واژه‌های کلیدی: تیلاپیای نیل، بافق، پرورش، آلودگی باکتریایی، PCR

مقدمه

تیلاپیا بعد از ماهی کپور علف‌خوار دومین گونه ماهی مهم پرورشی دنیا محسوب می‌شود. در بین تمام گونه‌های معرفی شده این جنس، تیلاپیای نیل (*Oreochromis niloticus* (Linnaeus, ۱۷۵۸) بیشترین تولید را در دنیا دارد. تیلاپیای نیل از جمله ماهیان پرورشی است که در آبهای کم‌عمق زندگی می‌کند. دامنه دمایی لازم برای رشد این ماهی ۳۶-۳۱ °C است. از نظر تغذیه‌ای این ماهی، همه چیزخوار چرنده (Omnivorous grazer) است. در شرایط پرورشی، ماهیان در طول پنج تا شش ماه به بلوغ جنسی می‌رسند. ماهی تیلاپیا نسبتاً به شرایط کیفیت ضعیف آب و بیماری‌ها مقاوم است. با استفاده از تکنیک‌های خاص توانسته‌اند تیلاپیا را به صورت تک جنس نر در آورند (۸).

اکثر باکتری‌های بیماری‌زای ماهی به صورت طبیعی در محیط اطراف ماهیان چه آب شیرین و چه شور حضور دارند. پاتوژن‌های باکتریایی به عنوان جدی‌ترین مشکل ماهیان پرورشی به شمار می‌روند که تلفات ناشی از آن‌ها تا ۸۰٪ نیز می‌رسد (۳). کارهای زیادی در زمینه بررسی عفونت‌های باکتریایی تیلاپیا در دنیا صورت گرفته است که نتیجه آن جداسازی و شناسایی انواع باکتری‌های بیماری‌زای گرم مثبت و گرم منفی بوده است. در بین گرم مثبت‌ها استرپتو کوکوس اینیه و لاکتو کوکوس گاروبیه بیشترین موارد جداسازی را داشته‌اند و در بین گرم منفی‌ها نیز آئروموناس هیدروفیلا (*Aeromonas hydrophila*)، یرسینیا رکری (*Yersinia ruckeri*)، ادوارديلا تارد (Edwardsiella tarda)، ویبریو ولنیفیکوس (*Vibrio vulnificus*) و ویبریو پارا هموليتيكوس (*V. parahemoliticus*) بیشتر از سایر باکتری‌ها جداسازی شده است (۷،۲۴). در بین کل عفونت‌های باکتریایی بیشترین موارد شناسایی شده در تیلاپیا را می‌توان به عفونت‌های استرپتوکوکی نسبت داد چنانچه کارهای انجام شده بر روی تیلاپیای نیل و تیلاپیای قرمز در تایلند (۱۶) و تیلاپیای نیل و تیلاپیای هیبرید در آمریکا و عربستان سعودی (۲۳،۲۴) مصداق این ادعا است. در گزارشی که از شیوع استرپتو کوکوس اینیه در مزارع پرورش تیلاپیای نیل در آمریکای جنوبی صورت گرفت هفت جدایه از این باکتری با تست‌های بیوشیمیایی، سرولوژیکی و مولکولی تشخیص داده شد. که نشان از شباهت ۱۰۰ درصدی توالی ژن ۱۶S rRNA این باکتری با استرپتو کوکوس اینیه ATCC ۲۹۱۷۸ جدایه‌های برزیلی داشته است (۱۲). در مقایسه میزان حضور انواع گونه‌های آئروموناس در سطح بدن و داخل مجاری گوارشی ماهیان مختلف، آئروموناس کاویه (*Aeromonas caviae*) بیشترین فراوانی را در تیلاپیا و آئروموناس سوبریا (*Aeromonas sobria*) و آئروموناس هیدروفیلا بیشترین فراوانی را در گربه ماهی داشته اند(۲).

۷۷۵ ماهی نسبتاً سالم و بیمار شده در شرایط تجربی، از گونه‌های مختلف ماهی تیلاپیای نیل، گربه ماهی (*Clarias gariepinus*) و ماهی

* نویسنده مسئول، تلفن: ۰۳۸۱-۳۳۳۶۱۰۴۵، نمابر: ۰۳۸۱-۳۳۳۶۱۰۴۵ Email: fadaeifard@gmail.com

Archive of SID
www.SID.ir

کفال که از مناطق مختلف مصر صید شده بود مورد بررسی بالینی، باکتریایی و هیستوپاتولوژیکی قرار گرفت. در این بین انواع باکتری‌ها اعم از آئروموناس هیدروفیلا، سودوموناس فلورسنس (*Pseudomonas fluorescens*)، فلاووباکتریوم کلومناریس (*Flexibacter columnaris*)، استرپتو کوکوس فکالیس (*Streptococcus faecalis*)، یرسینیا راکری، ادواردزیلا تاردا و ای کولای (*E. coli*) جدا گردید(۷).

هدف از اجرای مطالعه حاضر بررسی باکتری‌شناسی ماهیان تیلاپیای نگه‌داری شده در ایستگاه تحقیقاتی بافق بوده است. یقیناً برای امکان سنجی وضعیت رشد این گونه ماهی در ایران، علاوه بر شاخص‌های رشد آگاهی از وضعیت بیماری‌های عفونی و غیر عفونی آن‌ها نیز کمک زیادی به تصمیم‌گیری مدیران بخش اجرایی خواهد نمود.

مواد و روش کار

جمع آوری نمونه: در تابستان ۱۳۹۴ اقدام به جمع آوری نمونه‌های ماهی تیلاپیا گردید. بچه ماهی اولیه این ماهیان به صورت تک جنس نر از کشور چین وارد شده و در مرکز تحقیقات آبزیان شهرستان بافق استان یزد پرورش داده می‌شود. آب این مرکز از چاه تأمین می‌گردد که دمای آن بین ۲۸-۲۵°C، میزان آمونیای کل آن ۲-۱/۵ mg/l ، اکسیژن محلول ۸/۵ - ۵/۵ mg/l و شوری آن نیز ۹ g/l می‌باشد. از آنجائی که در تحقیق حاضر بیماری خاصی مورد هدف نبوده و بیشتر با انگیزه دسترسی به عوامل باکتریایی بالقوه بیماری‌زا در ماهیان صورت گرفته است لذا جمع آوری ماهی به صورت تصادفی و عموماً از نمونه‌های درشت صورت گرفته است. از این رو ۳۰ عدد ماهی از گونه تیلاپیای نیل با وزن متوسط ۱۵۳/۴ g و طول متوسط ۲۰/۱۳ cm از درون حوضچه‌های پرورش برداشت شد. برخی از این ماهیان علائم پوسیدگی باله و زخم‌های پوستی داشتند که نشان از آلودگی احتمالی آن‌ها با عوامل بیماری‌زای خارجی داشت ولی علامت خاص دیگری اعم از بیرون زدگی چشم، تیرگی پوست یا تورم شکم که نشان از درگیری آن‌ها با عفونت‌های داخلی دارد مشاهده نگردید. این ماهیان پس از برداشت درون جعبه یونولیتی قرار داده شده و در کنار پوشش یخ به آزمایشگاه ارسال شدند.

اقدامات آزمایشگاهی: در آزمایشگاه از تمام ماهیان نمونه‌برداری باکتریایی صورت گرفت چنانچه در شرایط کاملاً استریل و با ضد عفونی سطح خارجی هر ماهی با الکل اتیلیک، بخش شکمی آن‌ها برش داده شده و با آنس استریل از اندام‌های کبد و کلیه نمونه برداری شد. در اولین اقدام نمونه‌ها در محیط‌های آگار قلب و مغز (brain heart infusion agar) و آگار خوندار(blood agar) کشت داده شده و پس از انکوباسیون در دمای ۲۵°C به مدت ۴۸ ساعت، از پرگنه‌های رشد یافته رنگ آمیزی گرم صورت گرفت. بعد از مشخص شدن رنگ گرم، باکتری‌ها را به دو گروه گرم مثبت و گرم منفی تقسیم نموده و بر روی هر کدام از آن‌ها برخی آزمایش‌های بیوشیمیایی شاخص که در تشخیص اولیه باکتری‌ها نقش دارند انجام پذیرفت. چنانچه برای هر باکتری جدا شده تست‌های کاتالاز، تولید گاز سولفید هیدروژن، اندول و تست حرکت استفاده شد و نتایج هر کدام به طور جداگانه ثبت گردید. پس از تشخیص باکتری‌ها در حد جنس اقدام به تعیین گونه آن‌ها با استفاده از آزمون PCR شد. البته در این خصوص سعی شد از پرایمرهایی باکتری‌هایی استفاده شود که عموماً در پرورش تیلاپیا منجر به تلفات گسترده شده و ردیابی آن‌ها در شرایط تحقیق حاضر از نظر آگاهی‌های اپیدمیولوزیک لازم و ضروری است. به طوری که برای باکتری‌های گرم مثبت استرپتو کوکوس اینیه و لاکتو کوکوس گارویه و برای باکتری‌های گرم منفی یرسینیا راکری، آئروموناس هیدروفیلا، ویبریو آلژینولیتیکوس، ویبریو وولنیفیکوس، ویبریو کلرا و ویبریو پارا هموليتیکوس استفاده شد.

استخراج DNA: استخراج DNA از تمام نمونه‌های باکتریایی بر اساس دستورالعمل کیت استخراج DNA ساخت شرکت سیناژن انجام شد.

مراحل PCR: جهت تشخیص انواع باکتری‌های گرم منفی و گرم مثبت جدا شده از ماهیان تیلاپیا و بعد از انجام آزمون‌های باکتری‌شناسی و بیوشیمیایی، از تست PCR استفاده گردید. بدین منظور با استفاده از جفت

جدول ۱. جفت پرایمرهای مورد استفاده برای ردیابی ژن هدف در هر کدام از باکتری‌های جدا شده از ماهی تیلاپیا.

نام باکتری	ژن مورد هدف	پرایمر	اندازه باند(جفت باز)	منبع
یرسینیا راکری	۱۶S rRNA	Yer۳,۵' CGAGGAGGAAGGGTTAAGT ۳' '۳ AAGGCACCAAGGCATCTCT'۵ ,Yer۴	۵۳۷	۵
آئروموناس هیدروفیلا	lip	F:۵´AACCTGGTTCCGCTCAAGCCGTTG ۳´ ´TTGCTCGCCTCGGCCCAGCAGCT۳ ´۵:R	۷۶۰	۴
لاکتوکوکوس گارویه	۱۶S rRNA	PLG-F۵´CATAACAATGAGAATCGC- ۳´ ۳ -GCACCCTCGCGGGTTG´PLG- R۵	۱۱۰۰	۲۰
ویبریو پاراهموليتیکوس	کلاژناز	F: GAAAGTTGAACATCATCAGCACGA R: GGTCAGAATCAAACGCCG	۲۷۱	۶
ویبریو آلژینولیتیکوس	gyrB	F: GAGAACCCGACAGAAGCGAAG R: CCTAGTGCGGTGATCAGTGTTG	۳۳۷	۲۶
ویبریو وولنیفیکوس	vvhA	F: TTCCAACTTCAAACCGAACTATGA R: ATTCCAGTCGATGCGAATACGTTG	۲۰۵	۲۲

Archive of SID
www.SID.ir

جدول ۲. برنامه حرارتی به کار برده شده برای هر کدام از باکتری‌های مورد ردیابی در ماهی تیلاپیا.

باکتری	واسرشته سازی	اتصال	توسعه	توسعه نهایی	تکرار سه مرحله واسرشته سازی، اتصال و توسعه
آئرومونا‌س هیدروفیلا	۹۴ درجه/ ۶۰ ثانیه	۶۲ درجه/۶۰ ثانیه	۷۲ درجه/۹۰ ثانیه	۷۲ درجه/۵ دقیقه	۴۰ بار
یرسینیا راکری	۹۴ درجه/ ۴۰ ثانیه	۶۲ درجه/۴۰ ثانیه	۷۲ درجه/۴۰ ثانیه	۷۲ درجه/۵ دقیقه	۳۵ بار
لاکتوکوکوس گارویه	۹۴ درجه / ۶۰ ثانیه	۶۲ درجه/۶۰ ثانیه	۷۲ درجه/۶۰ ثانیه	۷۲ درجه/۵ دقیقه	۳۵ بار
ویبریو آلژینولیتیکوس	۹۴ درجه / ۶۰ ثانیه	۶۲ درجه/۶۰ ثانیه	۷۲ درجه/۶۰ ثانیه	۷۲ درجه/۵ دقیقه	۴۰ بار
ویبریوپارا‌همولیتیکوس	۹۴ درجه/۳۰ ثانیه	۶۳ درجه/۳۰ ثانیه	۷۲ درجه/۳۰ ثانیه	۷۲ درجه/۷ دقیقه	۳۵ بار
ویبریوولنیفیکوس	۹۴ درجه/ ۱۵ ثانیه	۵۸ درجه/۱۵ ثانیه	۷۲ درجه/۲۰ ثانیه	۷۲ درجه/۱۰ دقیقه	۴۰ بار

جدول ۳. انواع نمونه‌های باکتریایی شناسایی شده در ماهیان تیلاپیای پرورشی ایران.

نام باکتری	Yersinia hruckeri	Lactococcus gravidae	*Aeromonas hydrophila*	V.alginoliticus	V.parahemoliticus	V.vulnificus
تعداد	۲	۸	۱	۴	۲	۴
درصد	۹/۵۲	۳۸/۰۹	۴/۷۶	۱۹/۰۴	۹/۵۲	۱۹/۰۴

پرایمرهای مربوط که توالی هر کدام در جدول ۱ آورده شده است نسبت به انجـام تکنیک PCRاقدام گردید. هر جفت پرایمر ردیابی ژن هدف خاص هر باکتری را بر عهده دارد. فرآیند تکثیر PCR با اسـتفاده از یک دسـتگاه ترمال سـایکلر DNAمدل (Ependorf) (Master cycler termal) صـورت گرفت. در این واکنـش از ml ۵ نمونه حاوی DNA ، ۱/۲۵ واحد Taq DNA polymerase ، ml ۵ بافر تکثیر PCR شـامل ([pH ۸/۳ ۱ mM ،(۱۰۰ mMTris–HCl, ۲۰ mM MgCl۲, ۵۰۰ mM KCl, از هر پرایمر، ۰/۴ mM از دئوکسی نوکلئوتید تری فسفات و آب مقطر دو بار تقطیر شده تا حجم ml ۵۰ استفاده گردید. به منظور جلوگیری از تبخیر نیز ml ۵۰ روغن معدنی به مخلوط فوق اضافه شـد. برنامه حرارتی انجام شده برای هر باکتری با توجه به دستورالعمل توصیه شده برای هر باکتری که در جدول ۱ منابع آن ذکر شـده است صورت گرفت. مشخصات برنامه حرارتی هر باکتری نیز به تفکیک در جدول ۲ آورده شده است. جهت تائید وجود قطعـات تکثیر یافته، µl ۲۰ از محصـول PCR روی ژل ۱٪ آگاروز واجد اتیدیوم بروماید در حضور مارکر ۱۰۰ جفت بازی DNA درولتاژ ثابت ۸۰ ولت الکتروفورز گردید.

نتایج

به منظور شناسـایی عوامل باکتریایی مهم بیماری‌زای ماهی تیلاپیا اقدام به انجام آزمایش‌های خاص باکتری‌شناسی، بیوشیمیایی و مولکولی گردید. در بررسـی اولیه، باکتری‌های جدا شـده به دو گـروه گرم مثبت و گرم منفی تقسیم شدند. در مرحله بعد با انجام آزمایش‌های خاص از قبیل کاتالاز، تولید گاز سولفید هیدروژن، اندول و تست حرکت برخی ویژگی‌های بیوشـیمیایی آن‌ها مشـخص گردید. که با توجه به نتایج به دسـت آمده باکتری شناسـی و بیوشیمیایی، جدایه‌های گرم مثبت، مشکوک به جنس استرپتوکوکوس و جدایه‌های گرم منفی نیز مشکوک به جنس آئروموناس، جنس ویبریو و یرسـینیا راکری تشخیص داده شـد. از این رو جهت تأیید نهایی این جدایه‌ها از تسـت مولکولی PCR اسـتفاده گردید. در نهایت در گـروه گرم مثبت‌ها باکتری لاکتو کوکوس گارویه و در گروه گرم منفی‌ها باکتری‌های یرسینیا راکری، آئروموناس هیدروفیلا، ویبریو آلژینولیتیکوس (Vibrio alginoliticus)، ویبریو ولنیفیکوس و ویبریو پارا‌همولیتیکوس مورد تأیید قرار گرفت. که به ترتیب تعداد و درصد جدایه‌ها در جدول ۳ آورده شده است. با توجه به نتایج جدول تنوع باکتری‌های گرم منفی خیلی بیشتر از باکتری‌های گرم مثبت بوده است. همچنین باکتری استرپتوکوکوس اینیه نیز ردیابی نشد.

بحث

ماهـی تیلاپیا برای اولین بار در ایران، و در ایسـتگاه تحقیقاتی بافق وابسته به مؤسسه تحقیقات شیلات ایران از نظر امکان پرورش و نگه‌داری آن در شـرایط خاص جغرافیایی و اقلیمی منطقه مورد بررسـی قرارگرفت. در نهایت این نتیجه حاصل شـد که منطقه از نظر تمام شرایط اعم از آب و خـاک زمینه لازم در پرورش این گونه ماهـی را دارد (۱). در ادامه امکان سـنجی وضعیت پرورش این ماهی در شرایط ایران اقدام به انجام تحقیق حاضر و به منظور تکمیل کردن اطلاعات بهداشـتی و آگاهی از اسـتعداد درگیـری این ماهی با بیماری‌هـای خاص باکتریایی شـد. چنانچه نتایج حاصل از بررسـی‌های باکتری‌شناسی منجر به شناسایی گونه‌های مهم و بیماری‌زای لاکتو کوکوس گارویه، یرسینیا راکری، آئروموناس هیدروفیلا، ویبریو آلژینولیتیکوس، ویبریو ولنیفیکوس و ویبریو پارا‌همولیتیکوس در این ماهی گردید که در شرایط خاص مدیریتی اعم از بروز استرس‌های مختلف می‌توانـد بـه عفونت‌های شـدید و همراه با تلفات منجر گردد و شـناخت محققین و مسؤلین بخش‌های اجرایی از نقطه نظر همه گیر شناسی بسیار حائز اهمیت اسـت چرا که ردیابی چنین عواملی در خصوص بررسی‌های بیشتر در زمینه احتمال درگیری قبلی آن‌ها از طریق بچه ماهیان وارد شده یا آلوده بودن خود محیط پرورشی نیاز به آگاهی بیشتر دارد.

Archive of SID

www.SID.ir

در تحقیـق حاضر لاکتو کوکوس گاروبه تنها گونه باکتری گرم مثبت شناسایی شده در ماهی تیلاپیا است هر چند مهمترین باکتری گرم مثبتی که در تحقیقات قبلی موجب تلفات شـدید در ماهی تیلاپیا گشـته اسـت باکتری استرپتوکوکوس اینیه بوده اسـت. اما این دو باکتری از بسـیاری ویژگی‌های ساختاری، فیزیولوژیکی و بیماری‌زایی شبیه هم هستند. چنانچه تحقیقات صورت گرفته بر روی ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان در کشورمان نیز نشان از شیوع اولیه استرپتوکوکوزیس با عامل استرپتوکوکوس اینیه و غالب شـدن بعدی لاکتوکوکوس گاروبه در سال‌های اخیر بوده است (۱۱). همچنیـن با اسـتفاده از آزمون مولتی پلکس PCR به طور همزمان سـه باکتری استرپتوکوکوس آگالاکتیه، استرپتوکوکوس اینیه و لاکتوکوکوس گاروبه در تیلاپیای نیل و تیلاپیای قرمز(هیبرید) ردیابی شـدند شناسـایی این سـه باکتری نشان از آلودگی این ماهی به سه باکتری کوکسی شکل و بیمـاری‌زای مهم تیلاپیا دارد (۱۶). در خصوص عوامل محیطی مختلفی که در تلفات ناشی از بیماری‌های استرپتوکوکی پیشنهاد شده است. دمای بالای ۲۰°C از عوامل مهم در بروز تلفات این بیماری در تیلاپیای هیبرید بیمار شده در شرایط تجربی ذکر شده است (۱۳،۲۳).

از جمله باکتری‌های گرم منفی جداسازی شده در این تحقیق یرسینیا راکری بـود که دامنه میزبانی آن نه تنها شـامل آزاد ماهیان به ویژه قزل آلای رنگین کمان اسـت بلکه غیر آزاد ماهیانی همچون قنات سـرچربی (*Pimephales promelas*)، ماهی طلایی (*Carassius auratus*) و تیلاپیا نیز حسـاس به بیماری ناشـی از آن هسـتند. به طوری که در سال ۲۰۰۷ عفونت با یرسـینیا راکری از مزارع خاکی پرورش تیلاپیای مصر که به صورت نیمه متراکم ماهی نگه‌داری می‌شدند گزارش شده است. در این درگیری ۶۶/۶٪ ماهیان به بیماری مبتلا شدند. بروز خونریزی‌های گسترده در لب‌ها، دهان، باله‌ها و پوست و همچنین گاسترآنتریت خونریزی دهنده از علائم مهم بالینی بیماری به شمار می‌رفت. نوسانات دمای آب و تراکم بالای ماهیان داخل استخر از عوامل مهم تلفات بوده است (۹).

از دیگـر باکتری‌های شناسـایی شـده در مطالعه حاضـر آئروموناس هیدروفیلا بوده اسـت این باکتری از جمله باکتری‌های شـایع محیط‌های آب شـیرین به شمار می‌رود. در این گونه اکوسیستم‌ها آئروموناس‌ها نقش بیوفیلتـر طبیعی را بازی می‌کننـد و موجب پدیده خود تصفیـه‌ای در آن می‌شـوند. این باکتری‌ها در ماهیان پرورشـی و وحشی نیز تلفات گسترده به همراه داشته‌اند. که استرس‌هایی همچون تغییرات دمای آب، تغییرات فصلـی و میزان تراکم ماهیـان در بروز بیماری و تلفات مؤثر بوده اسـت. چنانچه تلفات تا ۸۰٪ نیز گزارش شـده اسـت. در سیسـتم‌های پرورشی متراکم این ماهی، بیشترین تلفات را در انتهای فصل بهار و در طول فصل تابستان می‌توان مشاهده نمود. نتایج حاصل از تحقیق بر روی شیوع بیماری ناشی از آئروموناس هیدروفیلا در ماهیان پرورشی و وحشی تیلاپیا در مصر، نشان از افزایش میزان عفونت ماهیان پرورشی در فصل تابستان در مقایسه با ماهیان وحشی بوده است (۱۷).

ویبریوها نیز از جمله باکتری‌های گرم منفی شناسایی شده در تحقیق حاضر بوده اندکه با توجه به شناسـایی سـه گونه متفاوت از این جنس در تحقیق حاضر اهمیت و ویژگی بیشـتری نسبت به بقیه پیدا کرده‌اند البته گزارشات قبلی نیز صحت این ادعا را ثابت می‌کند چراکه موارد متعددی از تلفات ناشـی از عوامل ویبریویی در تیلاپیای پرورشی از نقاط مختلف دنیا گزارش شده است. همچنین اهمیت ویبریوها در آلودگی غذای خام یا نپخته به اثبات رسیده است (۱۸). که منجر به گاستروآنتریت حاد در انسان می‌شود. لذا امنیت غذایی یک خواسته جهانی مهم است که مصرف کنندگان مواد غذایی به دنبال آن هستند. ویبریوها قادر به رشد در محیط‌های لب شور و اکوسیسـتم‌های مصب‌ها با شـرایط دمایی و شوری مناسب هستند از این رو ویبریوزیس از بیماری‌های مهم و شـایع در ماهیان، سـخت پوستان و نـرم تنان اسـت (۱۰). ویبریو ولنیفیکـوس یکـی از باکتری‌های مهاجم و بیماری‌زای انسـان است که قدرت کشندگی سـریعی دارد. این باکتری بـه طـور آزاد در محیط‌های مصب‌ها و آب‌های شـور زندگی می‌کند و در بدن دوکفه‌ای‌های فیلترکننده‌ای همچون صدف‌ها سـاکن است. مناطق گرمسـیری و نیمه گرمسـیری را ترجیح داده که دمای آبی بین ۳۱-۹ °C دارند. این باکتری در شـرایطی که دمای آب بالای ۲۲ °C باشـد شروع به تکثیر می‌کند. عفونت‌های ناشی از این باکتری عموماً از ماه‌های گرم سال گزارش شـده است. شـوری کم و متوسط آب برای رشد آن مناسب بوده و شوری بالا عوارض نامطلوب در آن دارد (۱۴). حضور ویبریو ولنیفیکوس در تیلاپیای نیل از اندام‌های آبشـش، روده و عضلات و همچنین آب مزارع پرورشی تیلاپیای کشـور بنگلادش گزارش گردیده است (۱۹). همچنین با بررسـی ماهیان تیلاپیای جمع آوری شـده از فروشگاه‌ها در مالزی انواع گونه‌هـای ویبریو را بـا اسـتفاده از آزمـون (MPN-PCR) the Most Probable Number-Polymerase Chain Reaction مـورد شناسـایی قرار گرفت. نتایج حاصل از این مطالعه منجر به جداسازی گونه ویبریـو (*Vibrio* sp.) و ویبریـو پاراهمولیتیکوس از اندام‌های ذکر شـده گردید (۲۱).

در نحوه بروز بیماری‌های باکتریایی در ماهیان عوامل مختلفی عنوان شده است چنانچه گفته شده که تعداد ویبریوها با افزایش دمای محیط نیز بـالا می‌رود. همچنین گونه‌های بیماری‌زای ویبریو از طریق مصرف غذا و آب آلوده شده با فاضلاب یا مدفوع انسان و ماهی خام و یا در معرض قرار گرفتن جراحات پوستی همچون زخم‌های باز موجب عفونت ویبریویی در محیط‌هـای آبزی پروری و ماهیان دریایی می‌گردند (۱۵). در رابطه با بروز استرپتوکوکوزیس در ماهیان بیشترین علل مرگ و میر را به استرسورهای متعددی نسبت می‌دهند که زمینه ساز بروز بیماری در محیط‌های پرورشی هسـتند. در این میـان انواع فاکتورهای محیطی که بر روی تلفات ناشـی از اسـترپتوکوکوزیس در تیلاپیا تأثیر دارند. چنانچه دمـای بالای ۲۰°C،

Archive of SID
www.SID.ir

مقادیر پائین اکسیژن محلول و سطوح بالای نیتریت محلول آب تلفات ناشی از عفونت استرپتوکوکوسی را افزایش می‌دهد. البته یک عامل مهم دیگر، تراکم بالای ماهیان است که در تمام ماهیان خوراکی باعث تشدید بیماری‌های عفونی می‌گردد.

سیاست‌های مدیریتی و شرایط محیطی در بین انواع مختلف سیستم‌های پرورشی ماهیان با هم تفاوت دارد. یکی از مواردی که در سیستم‌های پرورش ماهی به شیوه مدار بسته و باز به چشم می‌خورد افزایش تراکم ماهیان در واحد سطح است که این شرایط عامل مهم تشدید کننده بروز استرپتوکوکوزیس در آن‌ها به شمار می‌رود چنانچه در سیستم‌های مدار بسته باعث تا ۷۵٪ و در سیستم‌های مدار باز تا ۵۰ ٪ تلفات به همراه دارد. البته بیماری‌های باکتریایی در ماهیان صرفاً با در معرض قرار گرفتن ماهی با عامل بیماری‌زا ایجاد نمی‌شود و بیماری در نتیجه تعامل پیچیده بین پاتوژن، ماهی و استرس‌های محیطی است که اثر روی استعداد ابتلای میزبان به بیماری می‌گذارد. استرس‌های محیطی قادر به اثرگذاری در مکانیسم هوموستازی ماهی هستند لذا مقاومت آن‌ها را به عوامل بیماری زا کاهش می‌دهند. ماهیانی که در سیستم‌های متراکم پرورش داده می‌شوند در معرض نوسانات گسترده محیطی هستند که احتمالاً حساسیت آن‌ها را به انواع استرس‌ها در مقایسه با جمعیت‌های وحشی بیشتر خواهد نمود(۲۵).

نتیجه گیری: نتایج حاصل از مطالعه حاضر منتج به شناسایی باکتری‌های مهم و بیماری‌زای ماهی تیلاپیای نیل پرورش یافته در ایران به ویژه لاکتوکوکوس گاوریه و ویبریو ولنیفیکوس گردید که نشان از حضور این عوامل در محیط پرورشی ماهی دارد هر گونه رویداد نامساعد محیطی که وضعیت سلامت ماهی را به خطر اندازد و یا بروز هر گونه استرسی می‌تواند زمینه ساز تکثیر باکتری در بدن ماهی و ایجاد عوارض آسیب‌شناسی در آن می‌شود که در صورت تشدید ضایعات و عدم اصلاح شرایط محیطی، تلفات ماهیان را به دنبال خواهد داشت. شیوع بیماری‌ها دریک اکوسیستم تحت تأثیر عوامل محیطی مختلفی اعم از ارگانیسم‌های عفونی و عوامل استرس زا می‌باشد که بدین وسیله انتظار می‌رود مزرعه داران اطلاعات کافی از این عوامل تهدید کننده داشته و با کاهش هر گونه عامل استرس زا در مزرعه زمینه بروز بیماری‌های باکتریایی را کاهش دهند از این رو توجه به فاکتورهای شیمیایی و فیزیکی آب از جمله دما، اکسیژن محلول، میزان آمونیاک و نیتریت محلول و تراکم ماهیان درون استخرها کمک شایانی به حفظ گونه پرورشی خواهد نمود.

تشکروقدردانی

نویسندگان این مقاله بر خود لازم می‌دانند تا از کلیه افراد به ویژه مدیریت محترم مرکز آبزیان شهرستان بافق که در انجام این تحقیق مشارکت داشته و همکاری‌های لازم را مبذول داشته‌اند تشکر نمایند.

References

1. Alizadeh, M., Bemani, A. (2012) Environmental impact assessment of Tilapia (*Tilapia nilotica*) farming project in brackish water of Bafgh, Yazd. Arid Biome Scientific and Research Journal. 2(2): 40-53.
2. Ashiru, A.W., Uaboi-Egbeni, P.O., Oguntowo, J.E., Idika, C.N. (2011) Isolation and antibiotic profile of Aeromonas species from tilapia fish (*Tilapia nilotica*) and catfish (*Clarias betrachus*). Pak J Nutr. 10 (10): 982-986.
3. Austin, B., Austin, D.A. (2007) Bacterial Fish Pathogens: Disease of Farmed and Wild Fish, Springer Science & Business Media, (4th ed.). 552 pp.
4. Cascon, A., Anguita, J., Hernanz, C., Sanchez, M., Fernandez, M. and Navarro, G. (1996) Identification of *Aeromonas hydrophila* hybridization group1 by PCR assays. Appl Environ Microbiol. 62(4): 1167-1170. PMID: 8919777.
5. DelCero, A., Marquez, I., Guijarro, J.A. (2002) Simultaneous detection of *Aeromonas salmonicida*, *Flavobacterium psychrophilum*, and *Yersinia ruckeri*, Three major Fish Pathogen by Multiplex PCR, Appl Environ Microbiol. 68(10):5177-5180. PMID: 12324372.
6. Di Pinto, A., Ciccarese, G. De Carota, R., Novello, L., Terio, V. (2008) Detection of pathogenic Vibrio parahaemolyticus in southern Italian shellfish, Food Control. 19: 1037-1041.
7. El-Refaey, A.M.E. (2013) Studies on major bacterial diseases affecting fish; Tilapia *Oreochromis niloticus*, Catfish, *Clarias gariepinus* and mullets in Port Said, Egypt with special references to its pathological alterations. Researcher. 5(2): 5-14.
8. El-Sayed, AM. (2006) Tilapia culture. Edited by CABI Publishing, Cambridge, USA.
9. Eissa, A.E., Moustafa, Abdelaziz, M., Ezzeldeen, N.A. (2008) *Yersinia ruckeri* infection in cultured Nile tilapia, *Oreochromis niloticus*, at a semi-intensive fish farm in lower Egypt, Afr. J. Aquat. Sci. 33(3): 283-286.
10. Espeneira, M., Atanassova, M., Vieites, J.M., Santaclara, F.J. (2010) Validation of a method for the detection of five species, serogroup, biotypes

Archive of SID
www.SID.ir

and virulence factors by multiplex PCR in fish and seafood. Food Microbiol, 27: 122-131.

11. Fadaeifard, F., Momtaz, H., Rahimi, E., Mirzakhani, A. (2012) Detection of Streptococcus iniae and *Lactococcus garvieae* by multiplex polymerase chain reaction (PCR) in some rainbow trout farms of Iran, Afr. J. Biotechnol. 11(2):260-263.
12. Figueiredo, HCP., Nobrega Netto, L., Leal, CAG., Pereira UP., Mian, GF. (2012) Streptococcus iniae outbreaks in brazilian nile tilapia (*Oreochromis niloticus* L.) farms. Braz J Microbiol: 576-580. PMID: 24031866.
13. Gibello, A.I., Casamayor, A., Blanco, A., Domnguez, M.M.L.., Fernndez-Garayzbal, J.F. (2004b) Multiplex PCR assay for detection of bacterial pathogens associated with warm-water streptococcosis in fish. Appl Environ Microbiol. 70,3183-3187. PMID: 15128589.
14. Hoi, L., Larsen, J.L., Dalsgaard, I., Dalsgaard, A. (1998) Occurrence of *Vibrio vulnificus* biotypes in Danish marine environments. Appl Environ Microbiol; 64:7-13. PMID: 9435055.
15. Igbinosa, E.O., Okoh, A. I. (2008) Emerging Vibrio species: an unending threat to public health indeveloping countries. Res Microbiol. 159:495-506. PMID: 18692131.
16. Itsaro, A., Suanyuk, N., Tantikitti, C. (2012) Multiplex PCR for simultaneous detection of Streptococcus agalactiae, *Streptococcus iniae* and *Lactococcus garvieae*: a case of *S. agalactiae* infection in cultured Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) and red tilapia (*Oreochromis niloticus* x *Oreochromis mossambicus*), Songklanakarin J Sci Technol. 34 (5): 495-500.
17. Karunasagar, I., Karunasagar, I., Ott, S.K. (2003) Disease problems affecting fish in tropical environments. J Appl Aquac. 13(3/4): 231-249.
18. Luan, X., Chen, J., Liu, Y., Li, Y., Jia, J., Liu, R., Zhang, X.H. (2008) Rapid quantitative detection of *Vibrio parahaemolyticus* in seafood by MPN-PCR. Curr Microbiol. 57: 218-221. PMID: 18612685.
19. Mandal, S.C., Hasan, M., Rahman, M.S, Manik, M.H., Mahmud, Z.H., Islam, M.S. (2012) Prevalence and characterization of *Vibrio vulnificus* in nile Tilapia, *oreochromis niloticus* (linnaeus), Int J Ecotoxic Agric Technol. (2): 101-112.
20. Mata, A.I., Gibello, A., Casamyor, A., Blanco, M.M., Domínguez, L., Ferna´ndez-Garayza´bal, J.F. (2004) Multiplex PCR assay for detection of bacterial pathogens associated with warm water sterptococcosis in fish. Appl Environ Microbiol. 70(5): 3183-3187. PMID: 15128589.
21. Noorlis, A., Ponniah, J., Ghazali, F.M., Tunung, R., Cheah, Y., Tang, K., Tuan J.Y. H., Zainazor, T.C., Nishibuchi, M., Nakaguchi, Y., Son, R. (2011) Prevalence and quantification of Vibrio species and *Vibrio parahaemolyticus* in freshwater fish at hypermarket level. Int Food Res J. 18: 689-695.
22. Panicker, G., Myers, ML., Bej, A.K. (2004) Rapid Detection of *Vibrio vulnificus* in shellfish and Gulf of Mexico water by real-time PCR, Appl Environ Microbiol. 70 :498-507. PMID: 14711681.
23. Perera, R.P., Johnson, S.K., Lewis, D.H. (1997) Epizootiological aspects of *Streptococcus iniae* affecting tilapia in Texas, Aquaculture. 152: 25-33.
24. Shoemaker, C.A., Evans J.J., Klesius, P.H. (2000) Density and dose: factors affecting mortality of Streptococcus iniae infected tilapia (*Oreochromis niloticus*), Aquaculture. 188: 229-235.
25. Small, B., Bilodeau, A. (2005) Effects of cortisol and stress on channel catfish (*Ictalurus punctatus*) pathogen susceptibility and lysozyme activity following exposure to *Edwardsiella ictaluri*. Gen Comp Endocrinol. 142(1-2):256-62. PMID: 15862571.
26. Zhou, S., Hou, Z., Li, N and Qin, Q. (2007) Development of a SYBR Green I real-time PCR for quantitative detection of *Vibrio alginolyticus* in seawater and seafood, J Appl Microbiol. 103:1897-1906. PMID: 17953599.

Archive of SID
www.SID.ir

Identification of Some Bacterial Infections in Nile Tilapia (*Oreochromis niloticus*) Cultured in Bafgh Fishery Research Center

Fadaeifard, F.[1], Hajian, A.[2], Omid, F.[2], Shahini Tiran, A.H.[2], Cheraghi, A.[2]

[1]*Department of Aquatic Animal Health and Disease, Faculty of Veterinary Medicine, Shahrekord Branch, Islamic Azad University, Shahrekord, Iran*

[2]*Faculty of Veterinary Medicine, Shahrekord Branch, Islamic Azad University, Shahrekord, Iran*

(Received 23 January 2018, Accepted 15 May 2018)

Abstract:

BACKGROUND: Tilapia is one of the important farmed fish in the world. In the recent years this fish has been grown for evaluating the possibility of farming in climate status of Bafgh region. **OBJECTIVES:** The aim of this study was identification of some important bacterial pathogens in farmed tilapia. **METHODS:** In this study thirty fish with 153.4 g (average weight) and 20.12 cm (average length) were randomly collected from ponds. Some bacteriological and biochemical tests such as gram staining, Catalase, H2S production, Indole and motility were used. For definitive identification of isolates, PCR test was done by use of special paired primers. For each bacterium a target gene is detected. **RESULTS:** From two bacterial groups, gram positive and gram negative, six species were identified. In the gram positive group, Lactococcus graviaea and in the gram negative group, *Yersinia ruckeri*, *Aeromonas hydrophila*, *Vibrio alginoliticus*, *V. parahemoliticus* and *V. vulnificus* were identified. **CONCLUSIONS:** Understanding of different bacterial agents in the fish farm environments is essential for cultivation of tilapia. There are different bacterial agents, each of which can be considered to threaten the living conditions of fish. Respecting the health management leads to increasing fish immunity and helps their survival in the cultivation status.

Keyword: Nile tilapia, Bafgh, Culture, Bacterial infection, PCR

Archive of SID

Figure Legends and Table Captions

Table 1. Paired primers that were used for detection of target gene in each bacterial isolates.

Table 2. Temperature programs were run for each detected bacteria.

Table 3. Types of identified bacteria in the Iranian farmed tilapia.

***Corresponding author's email: fadaeifard@gmail.com, Tel: 0381-33361045, Fax: 0381-33361045**

www.SID.ir