

تعیین شیوع استافیلوکوکوزیس و میکروکوکوزیس در مزارع منتخب تکثیر و پرورش قزل‌آلای رنگین‌کمان استان مازندران

*سیده‌سمانه موسوی^۱، حسین خارا^۲، علی‌اصغر سعیدی^۳، مریم قیاسی^۳ و آذین زاهدی^۳

^۱دانش‌آموخته کارشناسی‌ارشد شیلات، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد لاهیجان و عضو باشگاه پژوهشگران جوان، ^۲استادیار گروه شیلات، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد لاهیجان، ^۳پژوهشکده اکولوژی دریای خزر

چکیده

هدف از این تحقیق تعیین شیوع استافیلوکوکوزیس و میکروکوکوزیس و نیز شناسایی گونه‌های باکتریایی عامل این بیماری‌ها در مزارع منتخب تکثیر و پرورش ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان استان مازندران است. امروزه ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان به‌عنوان ماهی شماره یک اکثر کارگاه‌های تکثیر و پرورش ماهیان سردآبی در بیشتر نقاط جهان محسوب می‌شود. بیماری‌های باکتریایی مانند استریپتوکوکوزیس، استافیلوکوکوزیس و میکروکوکوزیس که توسط گونه‌های مختلفی از باکتری‌های کوکسی‌شکل گرم مثبت ایجاد می‌شوند، سبب ایجاد تلفات در ماهیان مختلف، بخصوص گونه‌های پرورشی می‌گردند. طی این تحقیق از ۱۲ مزرعه پرورش ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان نمونه‌برداری به‌عمل آمد و از هر مزرعه تعداد ۱۰ عدد ماهی دارای علائم ظاهری بیماری مانند: بی‌حالی، تیرگی پوست، بیرون‌زدگی چشم و خونریزی در چشم و پایه باله انتخاب گردید. باکتری‌های کوکسی‌شکل گرم مثبت از بافت‌های کلیه، کبد و طحال جداسازی و در محیط کشت Blood agar یا TSA agar کشت داده شدند. تشخیص باکتری بوسیله رنگ‌آمیزی و انجام تست‌های تفریقی بیوشیمیایی صورت گرفت. گونه‌های جداسازی شده به‌عنوان عامل استافیلوکوکوزیس شامل *Staphylococcus epidermidis*، *Staphylococcus warneri*، *Staphylococcus chromogens* و *Staphylococcus cohnii* بودند که در فصول بهار و تابستان شناسایی گردیدند. گونه *Micrococcus luteus* نیز به‌عنوان عامل میکروکوکوزیس در فصول پاییز، بهار و تابستان از برخی مزارع جداسازی گردید. نتایج نشان می‌دهد که ۴۴ درصد نمونه‌های بیمار، مبتلا به استافیلوکوکوزیس و ۲۲/۲۲ درصد مبتلا به میکروکوکوزیس بوده‌اند.

واژه‌های کلیدی: استافیلوکوکوزیس، باکتری، قزل‌آلای رنگین‌کمان، مازندران، میکروکوکوزیس

مقدمه

مثبت *Staphylococcus aureus* تشخیص داده شد

(۹).

گزارشاتی از بروز استافیلوکوکوزیس در گونه‌های مختلفی از ماهیان از جمله: گیش دم زرد

Red sea bream, (*Seriola quinqueradiata*)

Sea bream, (*Chrysophrus major*)

Sea bass, (*auratus*)

(۵)، سیم دریایی پوزه دراز (*Puntazzo puntazzo*),

کفال (*Mugil cephalus*) (۹)، تیلایپا (۶) و قزل‌آلای

رنگین‌کمان (۵) وجود دارد.

استافیلوکوکوزیس در میان گونه‌های مختلف ماهیان

آب شور و شیرین و همچنین ماهیان پرورشی و وحشی مشاهده شده است (۴).

این بیماری برای اولین بار در میان کپورهای نقره‌ای

(*Hypophthalmichthys molitrix*) در یک مزرعه

در هندوستان رخ داد. این مرگ و میر همراه با ضایعات

چشمی بود که عامل آن کوکسی گرم

ماهیان بیمار علائمی از جمله سستی و بی حالی، تیرگی رنگ، بیرون زدگی چشم، شنای نامتعادل در نزدیک سطح آب یا در کف استخر، جراحات در پوست و زخم در ناحیه دم را نشان می‌دهند (۹). از علائم داخلی مشاهده شده در برخی از ماهیان بیمار می‌توان به طحال بزرگ و کیسه صفرای متورم، کبد معمولاً رنگ پریده و ملتهب و خون مردگی و خونریزی در مغز اشاره نمود (۹).

گونه‌های مختلفی از جنس استافیلوکوکوس به عنوان عامل بیماری در ماهی شناسایی شده‌اند که از آن جمله می‌توان به *Staphylococcus epidermidis* و *Staphylococcus aureus* اشاره کرد (۴ و ۹).

میکروکوکوس‌ها نیز باکتری‌های کروی شکل گرم مثبت‌اند که به صورت جفت، چهارتایی یا خوشه‌های نامنظم دیده می‌شوند و به صورت زنجیره‌ای نیستند (۷). گزارش‌هایی از بروز بیماری میکروکوکوزیس در یک مزرعه پرورش قزل‌آلای رنگین‌کمان در آرژانتین و در بین بچه‌ماهیان قزل‌آلای رنگین‌کمان در آمریکا وجود دارد که عامل مسبب آن، گونه *Micrococcus luteus* معرفی گردیده است. وجود این عوامل بیماریزا در قزل‌آلای جوان نیز تایید شده است (۴).

بنابراین با توجه به اهمیت ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان از دید آبی‌پروری، میزان شیوع باکتری‌های استافیلوکوکوزیس و میکروکوکوزیس در برخی از مزارع بررسی ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان استان مازندران مورد بررسی قرار گرفت.

مواد و روش کار

طی پاییز و زمستان ۱۳۸۵ و بهار و تابستان ۱۳۸۶ از ۱۲ مزرعه استان مازندران (۳ مزرعه در تنکابن (منطقه دوهزار)، ۱ مزرعه در چالوس (مرزن‌آباد)، ۱ مزرعه در نوشهر (کجور)، ۶ مزرعه در آمل (هراز) و مزرعه در ساری (دودانگه)) نمونه‌برداری به عمل آمد. از هر مزرعه تعداد ۱۰ عدد ماهی همراه با علائم ظاهری بیماری از

جمله تیرگی پوست، شنای نامتعادل و بیرون‌زدگی و خونریزی در چشم انتخاب گردید و در شرایط استریل، پس از شکافتن شکم ماهیان از کلیه قدامی و گاه کبد و طحال نمونه‌برداری شد و در محیط کشت TSA و یا Blood agar کشت داده شد و به مدت ۲۴-۴۸ ساعت در انکوباتور با دمای ۲۵-۳۰ درجه سانتی‌گراد قرار گرفت (۱ و ۴). پس از رشد باکتری در محیط کشت، به روش کشت خطی در محیط کشت TSA و یا Blood agar خالص‌سازی صورت گرفت (۳) و رنگ آمیزی گرم انجام شد (۲).

باکتری‌های مورد نظر ما در این تحقیق کوکسی‌های گرم مثبت هستند. جهت شناسایی بهتر گونه‌های باکتری مسبب بیماری، از تست‌های بیوشیمیایی استفاده گردید. این تست‌ها شامل: تست اکسیداز، تست کاتالاز، تست KOH ۳ درصد، تست O-Fglucose، هیدرولیز اسکولین، تست نترات، اوره، تست حرکت، هیدرولیز ژلاتین، رشد در آگار سیمون سترات، رشد در NaCl ۶/۵، ۱۰ و ۱۵ درصد، رشد در حرارت‌های ۱۵ و ۴۵ درجه سانتی‌گراد، تست کواگولاز و تخمیر انواع قندها از جمله: گلوکز، رافینوز، ترهالوز، مانوز، مانیتول، ریبوز، گالاکتوز، سالیسین، لاکتوز و D-xylose بوده است (۷). پس از انجام کلیه تست‌های مورد نیاز، با استفاده از کتاب تست‌های بیوشیمیایی برای تشخیص باکتری‌ها (Jean F. MacFaddin, ۲۰۰۰) گونه‌های یافت شده با استفاده از نتایج بدست آمده در هر تست شناسایی گردیدند (۷).

نتایج

نتایج به‌دست آمده طی این تحقیق و گونه‌های باکتریایی شناسایی شده به شرح زیر است: در پاییز و زمستان ۱۳۸۵، استافیلوکوکوزیس مشاهده نشد. در بهار ۱۳۸۶، از مزارع شهرهای ساری و آمل گونه‌های *Staphylococcus epidermidis* و *Staphylococcus cohnii* و در تابستان نیز گونه‌های *Staphylococcus warneri* و *Staphylococcus*

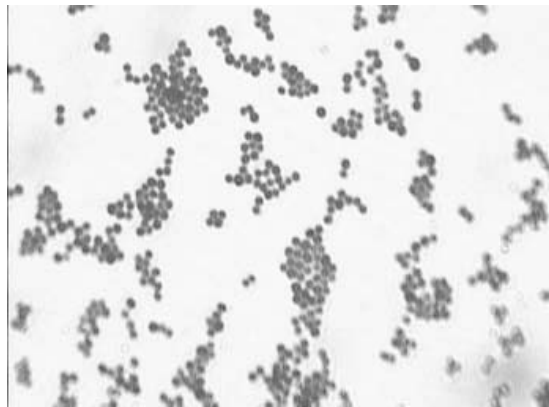
شهر آمل و در فصل بهار از مزرعه شهر ساری شناسایی شد و از بین نمونه‌های بیمار، ۲۲/۲۲ درصد مبتلا به میکروکوکوزیس بوده‌اند.

میزان فراوانی باکتری‌های جداسازی شده طی این تحقیق در شکل ۳ نشان داده شده و نتایج تست‌های بیوشیمیایی به عمل آمده جهت شناسایی گونه‌های باکتری در جدول ۱ آمده است.

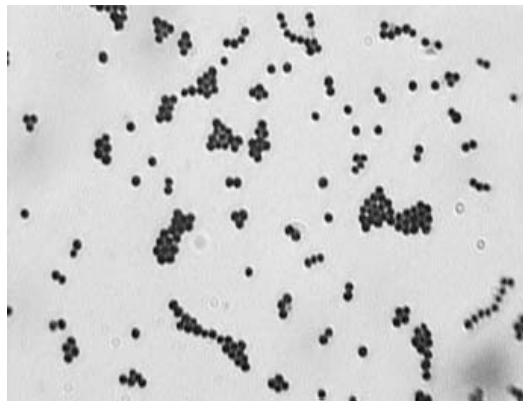
از *Staphylococcus chromogens* و *epidermidis*

مزارع همین شهرها جداسازی شد. به‌طور کل طی یک سال ۴ گونه باکتری گرم مثبت کوکسی شکل عامل استافیلوکوکوزیس (شکل ۱) از مزارع جداسازی شدند. از مجموع نمونه ماهیان بیمار، ۴۴ درصد آلوده به استافیلوکوکوزیس بودند.

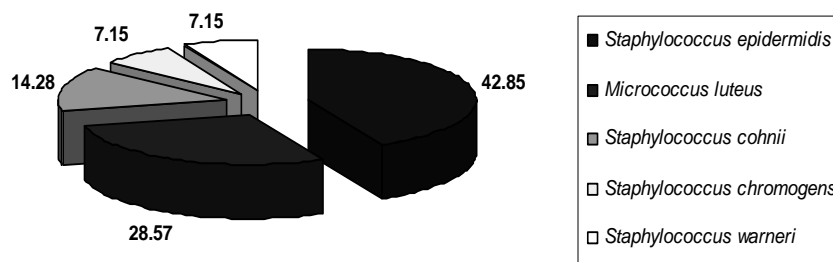
گونه *Micrococcus luteus* (شکل ۲) به‌عنوان عامل میکروکوکوزیس در فصول پاییز و تابستان از مزارع



شکل ۱ - شمایی از باکتری‌های جنس استافیلوکوکوس



شکل ۲- شمایی از باکتری‌های جنس میکروکوکوس



شکل ۳- درصد فراوانی هر گونه باکتری به کل باکتری‌های جداسازی شده

جدول ۱- نتایج تست‌های انجام شده جهت شناسایی گونه‌های باکتری یافت شده طی این تحقیق

<i>Micrococcus luteus</i>	<i>Staphylococcus Chromogens</i>	<i>Staphylococcus cohnii</i>	<i>Staphylococcus warneri</i>	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	تست
کروی - خوشه‌ای	کروی - خوشه‌ای	کروی - خوشه‌ای	کروی - خوشه‌ای	کروی - خوشه‌ای	شکل سلول و مرفولوژی
+	+	+	+	+	رنگ آمیزی گرم
+	+	+	+	+	KOH 3%
O	F	F	F	F	تست O-F glucose
+	+	+	+	+	کاتالاز
+	-	-	-	-	اکسیداز
-	+	-	-	+	کاهش نیتрат به نیتريت
NG	ND	ND	ND	ND	رشد در ۶/۵٪ NaCl
ND	G	G	G	G	رشد در ۱۰٪ NaCl
ND	NG	NG	NG	NG	رشد در ۱۵٪ NaCl
ND	G	G	G	-	رشد در ۱۵ درجه سانتی‌گراد
ND	NG	NG	G	-	رشد در ۴۵ درجه سانتی‌گراد
ND	-	-	-	-	کواگولاز
ND	A	-	-	-	تولید اسید از قندهای ریبوز
-	A	-	-	-	لاکتوز
A	A	-	-	-	مانیتول
-	A	A	-	A	مانوز
ND	-	-	-	-	رافینوز
ND	A	-	-	-	گالاکتوز
-	ND	ND	ND	ND	گلوکز
ND	-	-	-	-	سالیسین
ND	A	A	A	-	تری‌هالوز
ND	-	-	-	-	D-xylose
-	-	-	-	-	هیدرولیز اسکولین
ND	-	-	+	+	اوره
-	ND	ND	ND	ND	حرکت
+	ND	ND	ND	ND	هیدرولیز ژلاتین
-	ND	ND	ND	ND	رشد در آگارسیمون سیترات

تعیین نشده = ND غیرقابل رشد = NG رشد می‌کند = G تولید اسید از قند = A اکسیدکننده = O تخمیرکننده = F

بحث و نتیجه‌گیری

استافیلوکوکوزیس می‌تواند به‌عنوان یکی از معضلات مهم مراکز تکثیر و پرورش ماهیان سردآبی در ایران باشد. راجع به بروز این بیماری در ایران هیچ گزارشی وجود ندارد. اما گزارش‌هایی از بروز این بیماری در ماهیان مختلف به‌خصوص قزل‌آلای رنگین‌کمان در دیگر نقاط دنیا وجود دارد (۴، ۵ و ۶).

علائم اصلی مشاهده شده در ماهیان بیمار شامل اگزوفتالمی و جراحاتی روی باله‌ها و دم است (۵ و ۶) و علاوه بر آن کدورت چشم و تخریب بافت چشم، تیرگی پوست و بیحالی و تورم شکم نیز دیده می‌شود (۵).
علائم داخلی شامل رنگ پریدگی کبد، بزرگ شدگی طحال، تورم کیسه صفرا، خون‌مردگی و خونریزی در مغز است (۹). طی این تحقیق، علائم فوق در تمام ماهیانی که کشت از کلیه آنها مثبت بوده، مشاهده گردید.

عوامل میکروبی جداسازی شده در این بررسی که شامل *Staphylococcus epidermidis* *Staphylococcus chromogens* بوده است، به عنوان عامل بیماری از نواحی دیگر دنیا نیز گزارش شده است (۴، ۵، ۶ و ۹).

متداولترین روش جهت تشخیص گونه‌های مسبب بیماری استافیلوکوکوزیس، استفاده از تست‌های بیوشیمیایی است (۶)، با این وجود از سیستم میکرواسکن (۵) نیز استفاده می‌شود. همچنین روشی به نام FISH (Fluorescence in situ hybridization) برای تشخیص سریع استافیلوکوکوس اورئوس استفاده می‌گردد (۸).

در این بررسی، کلیه مراحل تشخیص و شناسایی باکتری با استفاده از روش‌های متداول میکروبیولوژی (رنگ‌آمیزی، تست‌های عمومی و تست‌های بیوشیمیایی تفریقی) انجام شد.

گزارشی از بیماری میکروکوکوزیس نیز در ایران وجود ندارد، اما بروز این بیماری در بین بچه‌ماهیان قزل‌آلای رنگین‌کمان در آرژانتین و نیز قزل‌آلای جوان گزارش شده است (۴).

طی این بررسی گونه *Micrococcus luteus* از چندین ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان بیمار، جداسازی و شناسایی گردید. علائم مشاهده شده در ماهیان مبتلا به

میکروکوکوزیس مشابه علائم ماهیان مبتلا به استافیلوکوکوزیس بوده است.

برای تشخیص و شناسایی گونه باکتری مسبب میکروکوکوزیس از روش‌های متداول میکروبیولوژی (رنگ‌آمیزی، تست‌های عمومی و تست‌های افتراقی بیوشیمیایی) استفاده گردید.

در زمان بروز میکروکوکوزیس درجه حرارت آب بین ۲۲-۱۴ درجه سانتی‌گراد بوده است و انتظار می‌رود که از اواخر بهار تا اواخر تابستان، با افزایش درجه حرارت آب این بیماری بروز نماید. لیکن آلودگی در گله تا اواخر آبان ماه قابل ردیابی بوده است. بنابراین می‌توان نتیجه گرفت که بیماری میکروکوکوزیس در استان مازندران یک بیماری فصلی است که با افزایش درجه حرارت آب، احتمال بروز آن افزایش می‌یابد.

استافیلوکوکوزیس، تنها در فصول بهار و تابستان مشاهده شده است که درجه حرارت آب بین ۲۲-۱۷ درجه سانتی‌گراد بوده است و این نشان می‌دهد که این بیماری با افزایش درجه حرارت آب، بروز می‌نماید.

در این بررسی متوسط وزن ماهیان مبتلا به استافیلوکوکوزیس ۴۲ گرم و میکروکوکوزیس ۸۰ گرم بوده است. اگرچه این بیماری‌ها در تعداد کمی از نمونه‌های دارای وزن بیشتر (تا حدود ۲۰۰ گرم) هم مشاهده شده بود، اما به نظر می‌رسد ماهیان کوچکتر نسبت به این بیماری‌ها حساس‌تر می‌باشند.

منابع

- ۱- اینگلیس، ر.ج، روبرت، ن.ر.، و برومیج. بیماری‌های باکتریایی ماهی. ترجمه: سلطانی، م. ۱۳۷۵. انتشارات سازمان دامپزشکی کشور. ۵۳۱ صفحه.
- ۲- فرریکس، ن.، و میلر، الف. جداسازی و شناسایی عوامل بیماری‌زای باکتریایی در ماهی. ترجمه: سلطانی، م. شریف‌پور، ع. و قیاسی، م. ۱۳۸۳. انتشارات بین‌الملل شمس. ۹۴ صفحه.
- ۳- لیف، م.، و پیرس، ب.، اطلس رنگی میکروشناسی عملی. ترجمه: سعیدی اصل، م. صفری، ر.، و میرزایی، ح. ۱۳۸۱. انتشارات نشر جهانکده. ۱۴۷ صفحه.

4. Austin, B. and Austin, D., 1993. Bacterial fish pathogens diseases in farmed and wild fish. Ellis Horwood limited. Pp. 27-37 and 7.

5. Gill, P., Vivas, J., Gallardo, C.S. and Rodriguez, L.A., 2000. First isolation of *Staphylococcus warneri*, from diseased rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum), in Northwest Spain., journal of fish diseases 23, 295-298.
6. Huang, Sh., Chen, W., Shei, M., Liao, L., and Chen, Sh., 1999. Studies on Epizootiology and pathogenicity of *Staphylococcus epidermidis* in Tilapia (*aeochromis* sp.) Cultured in Taiwan. Journal of Zoological studies 38, 178-188.
7. MacFaddin, J.F., 2000. Biochemical Testes for Identification of medical Bacteria. Williams and Wilkins. 912p.
8. Oliver, K., Procop, G.W., Wilson, D., Coull, J. and Stender, H., 2002. Rapid identification of *Staphylococcus aureus* Directly from Blood Culture by Fluorescence In: Situ Hybridization with Peptide Nucleic Acid Probes. Journal of Clinical Microbiology 40, 247-251.
9. Varvarigos, P., 2001. Gram positive cocco- bacteria (*Micrococcaceae*, *Streptococcaceae*) causing systemic disease in intensively farmed fish. Veterinary services to aquaculture and distribution of fish health production.

Determination of Staphylococcosis and Micrococcosis outbreak on elected rainbow trout farms in Mazandaran province

***S.S. Mousavi¹, H. Khara², A.A. Saeidi³, M. Ghiasi³ and A. Zahedi³**

¹Fisheries MS Graduated, Islamic Azad University, Lahijan Branch and Member of Young Researches,

²Assistant Prof., Dept. of Fisheries, Islamic Azad University, Lahijan Branch, ³Research Center Ecology of Caspian Sea

Abstract

The aim of the study is to determine Staphylococcus's & Micrococcus's outbreak and to identify gram positive bacteria pathogen on elected rainbow trout farms in Mazandaran province. Today, Rainbow trout is the number one cold-water fish in the world. Bacterial diseases such as Streptococcus's, Staphylococcus's and Micrococcus's that are created by Gram positive coccid-shape bacteria are one of the most important diseases that cause high mortality in farmed fishes. In this study, 12 farms were selected. For sampling purposes 10 fishes were selected from each farm with clinical signs such as lethargy, darkening, exophthalmia, hemorrhages around the eye and base of the fins. Gram positive coccid bacteria were isolated from the cultures of kidney and liver. The Bacteria isolated from kidney, liver and spleen were cultured in Blood agar or TSA agar plates. Identification of bacteria was conducted by staining and biochemical tests. Staphylococcus was caused by: *Staphylococcus epidermidis*, *Staphylococcus warneri*, *Staphylococcus chromogens* and *Staphylococcus cohnii* that were identified in spring and summer. *Micrococcus luteus* was also isolated as causing Micrococcus in fall, spring and summer. Results showed that 44 % of infected fish were suffering from Staphylococcus and 22/22% was suffering from Micrococcus.

Keywords: Staphylococcosis; Bacteria; Rainbow trout; Mazandaran; Micrococcosis