مجله علوم و فنون شیلات
دوره ۱۱ شماره ۳، تابستان ۱۴۰۱، صفحات ۲۶۵-۲۵۵

اولین گزارش بیماری‌زایی باکتری (*Aeromonas veronii* Hickman-Brenner, 1987) غیر متحرک در بچه‌ماهی خاویاری استرلیاد پرورشی (*Acipenser ruthenus* Linnaeus, 1758) در ساری

امیرحسین اسماعیلی تمندگانی*[۱] ، نازیلا یگانه[۱]

[۱*] گروه علوم و مهندسی شیلات، دانشکده منابع طبیعی و علوم دریایی، دانشگاه تربیت مدرس، نور، ایران

چکـــیده

این مطالعه در پی دریافت گزارشی از تلفات در بچه‌ماهی خاویاری گونه استرلیاد (*Acipenser ruthenus*) یک مزرعه‌ی پرورش ماهی واقع در شهرستان ساری-مازندران در فروردین ماه سال ۱۴۰۰، به منظور جداسازی و شناسایی عامل بیماری‌زا در بچه ماهی خاویاری استرلیاد (*A. ruthenus*) پرورشی بیمار صورت پذیرفت. نمونه برداری از ۲۰ قطعه بچه ماهی گونه‌ی استرلیاد (*A. ruthenus*) بیمار انجام شد. علائم بالینی ثبت شد و به دنبال آن، کالبدشکافی، نمونه‌برداری از بافت‌های کلیه و کبد، کشت باکتریایی، تست بیوشیمیایی،آزمون حساسیت دارویی، جداسازی ژنوم و توالی‌یابی ژن ۱۶Sr RNA انجام شد. جدایه‌ی مورد آزمون با ۱۴۱۸ جفت باز (bp) به عنوان سویه‌ای غیرمتحرک از باکتری *A. veronii* *شناسایی* شد و در بانک جهانی ژن (NCBI) با نام *Aeromonas veronii* TMU000126 ثبت گردید. این سویه از باکتری نسبت به آنتی‌بیوتیک فلورفنیکل حساسیت و نسبت به آنتی‌بیوتیک‌های تری متوپرایم-سولفامتوکسازول، اکسی‌تتراسیکلین، داکسی‌سیکلین و فسفومایسین مقاومت نشان داد. نتایج نشان دادند که سویه‌ی غیرمتحرک این باکتری نیز همانند سویه‌ی متحرک آن، عامل بیماری و ایجاد تلفات در ماهی خاویاری استرلیاد (*A. ruthenus*) شد. طبق مطالعات در دسترس، ممکن است این مطالعه را بتوان اولین مطالعه بر روی بیماری ماهی خاویاری گونه‌ی استرلیاد (*A. ruthenus*) با در نظر گرفتن بیماری-زایی سویه‌ی غیرمتحرک گونه‌ی *A. veronii* در نظر گرفت.

کـــلید واژه‌ها: آزمون حساسیت داروئی، ژن ۱۶Sr RNA، باکتری غیر متحرک، ماهیان خاویاری

نوع مقـاله

مقاله پژوهشی اصیل

تاریخ دریافت: ۱۴۰۰/۱۱/۲۰

تاریخ پذیرش: ۱۴۰۱/۰۶/۱۵

تاریخ چاپ الکترونیکی: ۱۴۰۱/۰۶/۲۰

***نویسنده مسول:**
amir.h.smiley@modares.ac.ir

مقدمه

آبزی پروری در دهه های اخیر به سرعت به بخش عمده اقتصادی و تولید غذا در جهان تبدیل شده است. در عین حال، به دلیل گسترش مقیاس پرورش و افزایش تراکم مزرعه، بیماری‌ها به عنوان عامل محدودکننده‌ی اصلی، منجر به خسارات اقتصادی هنگفتی در این صنعت شدند[۱]. پرورش متراکم، ماهی را در معرض چندین منبع استرس قرار می‌دهد مانند تراکم بالا و دستکاری که در نهایت منجر به کاهش عملکرد سیستم ایمنی می‌شود و ماهی را مستعد ابتلا به بیماری‌های عفونی مرتبط با پاتوژن‌های ویروسی یا باکتریایی می‌کند [۲]. در بین ماهیان مهم پرورشی، می‌توان از ماهیان خاویاری نام برد که یکی از قدیمی‌ترین گروه ماهیان هستند. بیشینه‌ی تکاملی این ماهیان به بیش از ۲۵۰ میلیون سال پیش باز می‌گردد [۳]. پرورش ماهیان خاویاری در بسیاری از کشورها از نظر اقتصادی هم برای تولید گوشت و هم برای خاویار اهمیت دارد [۴]. اما امروزه به دلیل ارزش تجاری (تولید خاویار)، دست‌کاری‌های انسانی و تغییرات محیطی و آلودگی، بسیاری از گونه‌های ماهیان خاویاری در معرض خطر انقراض قرار گرفته اند [۵]؛ از جمله ماهی استرلیاد (*A. ruthenus*) که در میان گونه‌های IUCN (International Union for Conservation of Nature)، جزء گونه‌های آسیب‌پذیر محسوب می‌شود. در میان ماهیان خاویاری، تنها استرلیاد (*A. ruthenus*) و سیبری (*Acipenser baerii*) چرخه حیات را در آب شیرین کامل می‌کنند [۴]. بنابراین می‌توانند گزینه‌های مناسبی برای پرورش در مزارع باشند.

[Downloaded from jfst.modares.ac.ir on 2024-04-26]

شایان ذکر است که کنترل بیماری در پرورش ماهیان خاویاری به دلیل فقدان دانش در مورد اپیدمیولوژی و روش‌های کنترل بیماری دشوار است [6]و تاکنون نیز واکسن تجاری با هدف پیشگیری از بیماری‌ها در ماهیان خاویاری بویژه در کشور ایران تولید نشده‌است.

باکتری *Aeromonas veronii* Hickman-Brenner et al. 1988 یک باکتری گرم منفی، میله‌ای شکل، بی‌هوازی اختیاری، فاقد اسپور، متحرک و یا غیر متحرک است [۷– ۸] که به طور گسترده در خاک، آب و محیط‌های مرتبط با انسان/حیوان توزیع شده‌است [۹] با افزایش عفونت‌های ناشی از این باکتری، سال به سال میزان حدت و مقاومت دارویی آن نیز افزایش می‌یابد. بنابراین تعداد قابل توجهی از کشورها *A. veronii* را به عنوان یک شاخص مهم کیفیت آب (به دلیل خطرات آن) در نظر گرفته‌اند. در نتیجه عفونت های مختلط ناشی از A. veronii و سایر عوامل بیماری زا، سپتی سمی در سال های اخیر یک مشکل عمده در آبزی پروری بوده است. بدین ترتیب، باکتری *A. veronii* نه تنها یک تهدید جدی برای صنعت آبزی‌پروری در سراسر جهان محسوب می‌شود بلکه یک تهدید ایمنی زیستی نیز به شمار می‌رود [۱۰، ۱۱]. چنان‌چه در نقاط مختلف، باعث شیوع مرگ‌ومیر در انواع ماهی‌ها از جمله ماهی تیلاپیا (*Oreochromis niloticus* L) [۱۲]، باس اروپایی (*Dicentrarchus labrax*) [۱۳]، گربه ماهی (*Ictalurus punctatus* و Gunther *Leiocassis longirostris*) [۱۴– ۱۵– ۱۶] و لوچ (*Misgurnus anguillicaudatus*) [۱۷] شد.

اگرچه مطالعاتی در زمینه‌ی بیماری ناشی از باکتری *A. veronii* در گونه‌های مختلفی از ماهیان انجام شده است، اطلاعات کافی برای عفونت ناشی از این باکتری در ماهی خاویاری استرلیاد (*A. ruthenus*) در دسترس نیست. با توجه به افزایش نرخ پرورش این گونه از ماهی خاویاری در مزارع ایران، در سال‌های اخیر و اهمیت این گونه، مطالعات بیشتر، مرتبط با امنیت زیستی، بیماری‌ها و همچنین پیشگیری از آن‌ها در اولویت است .عفونت‌های حاصل از *A. veronii* و اهمیت آن‌ها در مزارع پرورش ماهی و همچنین اثرات احتمالی آن‌ها بر سلامت عمومی، شناسایی و مطالعه‌ی عوامل بیماری‌زایی این باکتری ضروری به نظر می‌رسد. این مطالعه با رویکرد ذکر شده، به بررسی و تشخیص عفونت ناشی از این باکتری در ماهی استرلیاد (*A. ruthenus*) پرورشی پرداخته است.

مواد و روش‌ها

سنجش پارامترهای فیزیکی-شیمیایی آب

به دنبال تلفات بچه‌ماهیان استرلیاد (*A. ruthenus*) در یکی از مزارع تکثیر و پرورش در شهرستان ساری، دمای آب با دماسنج دیجیتالی، اکسیژن محلول با اکسی متر (HANNA HI9146, America) ، pH با دستگاه pH متر (EZDO 6011, Taiwan)، آمونیاک، نیتریت و نیترات با دستگاه فتومتر (Parspeyvand DA-4500, Iran) سنجیده‌شدند [۱۸]. حد مجاز پارامترها طبق استاندارد در نظر گرفته شد [۱۹].

آزمایش‌های بیوشیمیایی شناسایی باکتری

در ابتدا، با مراجعه به مزرعه‌ی پرورشی ماهی استرلیاد (*A. ruthenus*) بیمار، تعداد ۲۰ قطعه ماهی بیمار در حال مرگ، دارای علائم بالینی بیماری از قبیل، بی حالی و شنای وارونه، انتخاب و به آزمایشگاه منتقل شدند. پس از شستشوی نمونه ها با سرم فیزیولوژی ۸۵/. ٪، با حفظ شرایط استریل کالبدشکافی صورت گرفت و از بافت‌های کبد و کلیه، کشت هایی بر روی محیط بلاد آگار (حاوی ۵٪ خون گوسفند) تهیه شدند. انکوباسیون در دستگاه انکوباتور (Jaltajhiz JTSL20, Iran) بمدت ۴۸ ساعت در دمای ۲۲ درجه سانتی‌گراد انجام شد. جهت شناسایی عامل بیماری‌زا در سطح جنس، از پرگنه‌های رشد یافته بر روی پلیت محیط کشت، تست‌های بیوشیمیایی، از جمله؛ رنگ‌آمیزی گرم (کیت رنگ‌آمیزی بهارافشان، ایران)، اکسیداز/کاتالاز، تحرک، اندول، تولید گاز، دی هیدروژن سولفید، تخمیر قندهای ساکارز، لاکتوز و گلوکز، اوره، سیمون سیترات، همولیز ، MR/VP (متیل رد/ ووگس پروسگوئر) و TCBS (Thiosulfate Citrate Bile Salts Sucrose Agar) مورد بررسی قرار گرفتند [۲۰].

آزمایش استخراج ژنوم و توالی باکتری

در ابتدا DNA ژنومی جدایه‌ها در بافر هضم کننده حاوی SDS (Sodium Dodecyl Sulfate)، (sodium Chloride-Tris-EDTA) STEو آنزیم پروتئیناز K قرار گرفتند. استخراج DNA با استفاده از کیت (Sinagen, Iran) بر پایه‌ی ژن انجام شد. فرایند جداسازی با فنول، کلروفرم، ایزوآمیل الکل (۲۵،۲۴،۱) در دو مرحله و عملیات رسوب DNA با اتانول مطلق صورت گرفت. در نهایت DNA در ۵۰ میکرولیتر آب مقطر عاری از هرگونه الودگی محلول گردید. نمونه برای آنالیز PCR ژن 16Sr RNA با آغازگرهای (-'5

[Downloaded from jfst.modares.ac.ir on 2024-04-26]

'3 – AGAGTTTGATCCTGGCTCAG) 27F و ('5-TACGGYTACCTTGTTACGACTT-3') 1492R توالی‌یابی شد [۲۱] . طول محصول ۱۵۰۰ جفت باز بود. فرایند تکثیر در دستگاه ترموسایکلر (peqSTAR 2X Gradient, PeQlab Biotechnology, Germany) انجام شد [۲۲]. شرایط دمایی PCR شامل دمای اولیه ۹۵ درجه سانتی گراد به مدت ۱۵ دقیقه، ۳۵ سیکل شامل ۹۵ درجه سانتی گراد به مدت ۳۰ ثانیه، ۷۲ درجه سانتی‌گراد به مدت ۲۵ ثانیه و ۷۲ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱۰ دقیقه بود. ۵ میکرولیتر از محصول بر روی ژل آگارز ۱ درصد در بافر TBE 1X (Tris/Borate/EDTA) در حضور رنگ فلورسنت Greenview رنگ‌آمیزی شد. محصول PCR به روش کیت ستونی شستشو شد و توسط دستگاه ژل داک مدل GD3 عکس‌برداری شد. محصول برای تعیین توالی به شرکت BJI (China) منتقل شد.

آزمایش‌های حساسیت دارویی

به منظور آگاهی از چگونگی عملکرد جدایه‌ی مورد نظر نسبت به آنتی‌بیوتیک‌ها، تست‌های آنتی بیوگرام با استفاده از روش انتشار دیسک Kirby-Bauer، شرح داده شده [۲۳] انجام شد. در شرایط کاملا استریل با قرار دادن سواب آغشته به سوسپانسیون باکتریایی بر روی صفحه تمیز مولر هینتون آگار (Ibresco, Iran) کشت‌های چمنی انجام شدند. پس از ۵ دقیقه دیسک‌های کاغذی (حدودا ۷ میلی‌متر) آغشته به آنتی‌بیوتیک (Padtan teb, Iran) به‌صورت استریل روی آگار قرار داده و در دمای ۲۲ درجه سانتی‌گراد به مدت ۲۴ ساعت در دستگاه انکوباتور (Jaltajhiz JTSL20, Iran) انکوبه شدند. تعداد دیسک‌ها در هر صفحه آگار (با قطر ۱۰ سانتیمتر) حداکثر ۵ عدد بود. نواحی بازدارندگی اندازه‌گیری و ثبت شد. آنتی بیوتیک‌های بکار رفته در آزمایش‌های آنتی‌بیوگرام شامل: فلورفنیکول (۳۰FF میکروگرم)، انروفلوکساسین (۵ NFX میکروگرم)، اکسی تتراسایکلین (۳۰T میکروگرم)، داکسی‌سایکلین (۳۰D میکروگرم)، سولفامتوکسازول/*تری* متوپریم (۱/۲۵ SXT / ۲۳ میکروگرم)، اریترومایسین (۱۵ E میکروگرم)، جنتامایسین (۱۰GM میکروگرم)، کانامایسین (۳۰K میکروگرم) و فسفومایسین (۲۰Fos میکروگرم) بودند.

نتایج

آب مزرعه از نظر خصوصیات فیزیکی–شیمیایی مورد بررسی قرار گرفت (جدول ۱). تمامی پارامترها در محدوده‌ی مجاز و استاندارد قرار داشتند و فاقد تاثیر بر بیماری مورد نظر بودند.

جدول ۱. نتایج بررسی پارامترهای فیزیکی–شیمیایی آب شیرین مزرعه پرورشی ماهی خاویاری استرلیاد (*A. ruthenus*)

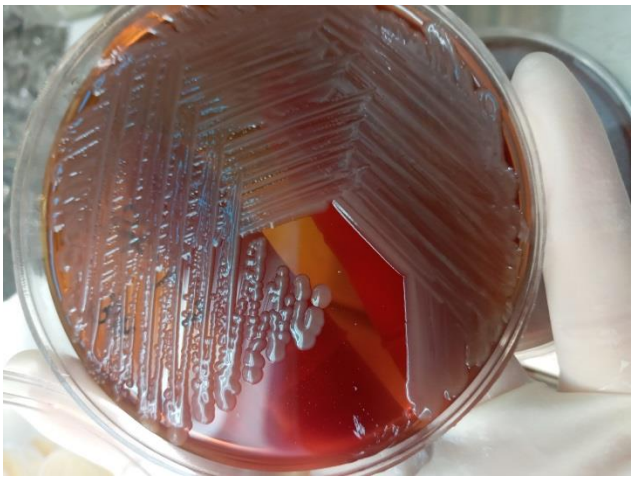
فاکتورهای مورد بررسی	حد مجاز	نتایج
دمای آب (درجه سانتی‌گراد)	۱۶–۲۱	۱۷/۸
اکسیژن محلول در آب (میلی‌گرم/لیتر)	۶–۱۴	۷/۷
pH آب	۷/۶–۸/۵	۷/۸
آمونیاک کل (میلی‌گرم/لیتر)	کمتر از ۰/۰۲	۰/۰۱۱
نیترات کل (میلی‌گرم/لیتر)	۱–۲	۰/۵
نیتریت کل (میلی‌گرم/لیتر)	۰/۰۰۹–۰/۱	۰/۰۵
آهن (میلی‌گرم/لیتر)	۰/۳–۰/۲	۰/۲۵
H2S (میلی‌گرم/لیتر)	۰	۰

علائم بالینی ماهیان شامل بی حالی، شنای وارونه، التهاب و خونریزی نقطه‌ای بر روی بدن بود . همچنین روده‌ها حاوی زردآب بودند. علاوه براین کبد، دچار رنگ‌پریدگی بود، و کلیه در تمامی نمونه‌ها دارای رنگی تیره‌تر از حد معمول بودند. بعلاوه، بزرگ شدن طحال و پرخونی در آبشش‌ها مشهود بود (شکل ۱).

[Downloaded from jfst.modares.ac.ir on 2024-04-26]

شکل ۱. کبد و طحال رنگ پریده به‌علاوه‌ی وجود غذای هضم نشده و زردآب در روده‌ی بچه‌ماهیان استرلیاد (*A. ruthenus*) پرورشی بیمار

آنچه از کشت بافت نمونه‌های بیمار بر محیط بلاد آگار مشاهده‌شد پرگنه‌های مدور، محدب با حاشیه‌ی صاف، سفید رنگ و موکوئید بودند (شکل ۲).



شکل ۲. پرگنه‌های جداسازی شده از کلیه و کبد بچه ماهی استرلیاد (*A. ruthenus*) بیمار

[Downloaded from jfst.modares.ac.ir on 2024-04-26]

نتایج تست‌های بیوشیمایی در (جدول ۲) ثبت شده‌است. بر اساس تجزیه و تحلیل نتایج حاصل از تست‌های بیوشیمیایی و توالی‌یابی ژن Sr ۱۶RNA بر جدایه‌های موردنظر، سویه‌ای از باکتری *A. veroni*، شناسایی و نام این سویه با ۱۴۱۸جفت باز در بانک جهانی ژن (NCBI) به نام *Aeromonas veronii* TMU000126 ثبت شد. اطلاعات بیشتر این سویه با شماره دسترسی MZ853773 در آدرس زیر قابل مشاهده می‌باشد:

https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/MZ853773.1

جدول ۲. نتایج بررسی تست‌های بیوشیمیایی پرگنه‌های حاصل از کشت بافت‌های کبد و کلیه بچه‌ماهی استرلیاد (*A. ruthenus*) بیمار

تست‌های بیوشیمیایی	نتایج تست‌های جدایه‌ی هدف	راهنمای شناسایی باکتری (Buller، ۲۰۰۴)
رنگ آمیزی گرم	باسیل –	باسیل –
اکسیداز	+	+
کاتالاز	+	+
تحرک	–	+
اندول	–	+
گلوگز	–	+
سوکروز	–	+
لاکتوز	–	+
TCBS	+ (ضعیف)	+
گاز	–	+
H2S	–	–
اوره	–	–
سیمون سیترات	–	+
همولیز	β+	β +
MR/VP	–	+

نتایج حاصل از انجام تست‌های آنتی‌بیوگرام در (جدول۳) گزارش شده‌است. بر این اساس، باکتری *A. veronii* جدا شده در مطالعه‌ی ما نسبت به فلورفنیکل با ۳۵ میلی‌متر قطر هاله‌ی مهاری از بین سایر آنتی‌بیوتیک‌های مورد آزمون، دارای بیشترین حساسیت بود. قابل ذکر است این سویه از باکتری، نسبت به آنتی بیوتیک‌های تری متوپرایم–سولفامتوکسازول، اکسی‌تتراسیکلین، داکسی‌سیکلین و فسفومایسین مقاومت نشان داد.

جدول ۱. نتایج حاصل از تست‌های حساسیت داروئی سویه‌ی مورد مطالعه *A. veronii* TMU000126

آنتی‌بیوتیک‌های مورد آزمایش	محتوای آنتی بیوتیک در هر دیسک (µg)	قطر مهارکنندگی رشد (mm)
فلورفنیکل	۳۰	۳۵- S
تری متوپرایم سولفامتوکسازول	۱/۲۵-۲۳/۷۵	- R
جنتامایسین	۱۰	۲۳- S
کانامایسین	۳۰	۱۷- I
اکسی تتراسیکلین	۳۰	-R
داکسی سیکلین	۳۰	-R
فسفومایسین	۲۰	۱۲ R
انروفلوکساسین	۵	۱۷- I
اریترومایسین	۱۵	۱۳- I

S: Sensitive (حساس) - I: Intermediate (میانه) - R: Resistant (مقاوم) طبق استاندارد CLSI

[Downloaded from jfst.modares.ac.ir on 2024-04-26]

بحث

اعضای جنس Aeromonas به طور گسترده در محیط های آبی و زیستگاه های خاکی پراکنده‌شده‌اند و همچنین اغلب از مواد غذایی خام و فرآوری شده جدا می‌شوند [۲۴-۲۵-۲۶]. سویه‌های Aeromonas که به‌عنوان اعضای میکرو فلور روده در ماهی‌ها و سایر حیوانات آبزی (دوزیستان، خزندگان) شناسایی شده‌اند، ممکن است در شرایط استرس محیطی (ازدحام بیش از حد، کیفیت پایین آب، آلودگی مواد آلی و هیپوکسی) باعث بیماری‌هایی شوند [۲۷- ۲۸]. گونه *A. veronii* به عنوان یک عضو جدید از این جنس، به عنوان یکی دیگر از پاتوژن‌های ماهی شناخته شده‌است که بویژه با سندرم اولسراتیو همراه می‌باشد [۱۴، ۱۶]. باکتری*A. veronii* (سویه X106909) برای اولین بار به عنوان عامل بیماری‌زا و مرگ و میر در ماهی خاویاری سیبری (*Acipenser baerii*) در چین گزارش شد [۲۹]. همچنین عامل شدید سندرم زخم در گربه ماهی زرد (*Pelteobagrus fulvidraco*) بود [۳۰]. علائم ماهیان مبتلا به طور معمول شامل اگزوفتالمی، زخم و سپتی‌سمی هموراژیک بود. شیوع عفونت ناشی از این باکتری در ماهی خاویاری سیبری (*Acipenser baerii*) [۲۹]، بلوگا (*Huso huso*) و ازون برون (*Acipenser stellatus*) پرورشی در جنوب فارس [۳۱]، ماهی خاویاری چینی (*Acipenser sinensis*) [۳۲] نیز گزارش شده‌است. مکانیسم دقیقی از چگونگی بیماری‌زایی باکتری‌ها در دسترس نیست اما همانند سایر باکتری‌های گرم منفی، چندین محصول خارج سلولی Aeromonas از جمله همولیزین‌ها، انتروتوکسین‌های سیتوتونیک و سیتوتوکسیک، پروتئازها، لیپازها و لوکوسیدین‌ها به عنوان عوامل احتمالی کمک‌کننده در پاتوژنز این باکتری‌ها ارائه شده‌اند [۳۳]. بعلاوه، اجزای سطح سلولی مانند پروتئین‌های غشای بیرونی، لیپوپلی ساکارید (LPS)، لایه S، تاژک های قطبی و پیلی (نوع IV) به عنوان فاکتورهای حدت احتمالی Aeromonas شناسایی شده‌اند [۷]. شایان ذکر است از جمله فاکتورهای چسبندگی غیر فیبریالی که در پاتوژنز گونه‌های Aeromonas نقش دارند لایه‌های S و LPS هستند. لایه S ویژگی‌های فیزیکی خاصی از باکتری، از جمله افزایش آب‌گریزی سلولی، تجمع سلولی و چسبندگی سلول به بافت میزبان را افزایش می‌دهد [۳۴]. همچنین آدهزین و فسفولیپاز علاوه بر نقش مهم در چسبندگی و ادغام، در پاتوژنز گونه‌های Aeromonas نیز دخیل هستند [۱۲، ۳۵-۳۶]. برای اتصال اولیه باکتری به بافت میزبان، LPS (S فرم) در باکتری، در طول رویدادهای عفونت، به عنوان یک چسب، عمل کرده و باکتری‌ها را از نابود شدن به واسطه مکمل و پپتیدهای ضد میکروبی محافظت می‌کند [۷]. برخی از مطالعات پیشین دریافتند که تولید سیتوتوکسین و همولیزین در بیش از ۵۰ درصد از سویه‌های Aeromonas از گونه‌های مختلف شایع بوده‌است [۱۴، ۳۷]. این محصولات خارجی می‌توانند با اثر بر سلول‌های بافت میزبان ایجاد زخم کنند و سایر علائم را منجر شوند. التهاب سلول‌های آبششی موجب پرخونی در آبشش‌ها می‌گردد. علاوه بر این، سرین پروتئیناز a با تاثیر بر آنزیم‌های خارج سلولی مانند آئرولیزین به شدت بر حدت سویه‌های باکتریایی اثرگذار است. علائم بالینی در هر گونه می‌تواند متفاوت باشد اما بی‌حالی، شنای وارونه، پتشیال نقطه ای روی بدن با مطالعه‌ی [۳۱] هم‌خوانی دارد. مطالعات زیادی در مورد وسعت و شدت آلودگی گونه‌های مختلفی از ماهیان با آئروموناس‌های متحرک در دسترس می‌باشند. چنان که بیان می‌کنند آن‌ها باعث بیماری مزمن با زخم‌های باز پوستی و سایر ضایعات پاتولوژیک یا عفونت سیستمیک حاد به نام سپتی سمی آئروموناد متحرک (MAS; Motile Aeromonas Septicaemia) می‌شوند [۱۴،۲۳، ۲۷، ۳۵، ۳۸].

تست حساسیت ضد میکروبی نشان داد که سویه‌ی مورد مطالعه به آنتی‌بیوتیک فلورفنیکل حساس و به آنتی‌بیوتیک‌های تری متوپریم-سولفامتوکسازول، اکسی‌تتراسیکلین، داکسی‌سیکلین و فسفومایسین مقاوم بود. نتایج ما مشابه با نتایج سویه‌ی جدا شده از ماهی باس (*Micropterus salmoides*) بود [۱]. اگرچه که با نتایج سویه‌های جدا شده از ماهی گوپی و گربه‌ماهی بطور کامل مطابقت نداشت. سویه‌ی جداشده از گربه‌ماهی به جنتامایسین، استرپتومایسین و نالیدیکسیک اسید حساس بود [۱۶]، درحالی‌که سویه‌ی جدا شده از گوپی به فلورفنیکول و تری متوپریم-سولفامتوکسازول حساس بود [۳۹]. نتایج این مطالعات نشان داد که سویه‌های A. veronii از ماهی‌های مختلف ویژگی‌های مقاوم به دارو متفاوتی را نشان دادند، اگرچه بیان شد همه آن‌ها به طور مشترک به پنی‌سیلین و آمپی‌سیلین مقاوم بودند [۱].

[Downloaded from jfst.modares.ac.ir on 2024-04-26]

اگرچه جدایه مورد مطالعه ما یک Aeromonas بی تحرک است که بیماری در بچه‌ماهیان خاویاری استرلیاد (*A. ruthenus*) را منجر شده‌است. در مطالعات پیشین بیماری زایی باکتری‌هایی همچون *A. veronii* در ماهی ازون برون، بلوگا [۳۱] و سیبری (*A. baerii*) [۲۹]، *A. veronii* و *Aeromonas hydrophila* در ماهی خاویاری چینی (*Asipenser sinensis*) [۳۲]، *A. hydrophila* در ماهی خاویاری آمور (*Acipenser schrenckii*) [۴۰]، *Vibrio metschnikovii* در ماهی خاویاری هیبرید (× *Acipenser baerii* *Acipenser schrenckii*) [۴۱] و ... گزارش شده‌اند. آن‌چه احتمال می‌رود این است که تا کنون گزارشی در مورد بیماری در ماهی خاویاری استرلیاد (*A. ruthenus*) ثبت نشده‌است. مطالعه‌ی حاضر با تمرکز بر شناسایی علل مرگ و میر در ماهی استرلیاد (*A. ruthenus*) و به جهت حفظ ایمنی و سلامت ماهی و همینطور پیشگیری از بیماری و درمان ماهی بیمار در مزارع پرورشی صورت گرفته‌است.

نتیجه‌گیری

مطالعه‌ی حاضر به وضوح نشان می‌دهد که تنها ائروموناس‌های متحرک در ماهیان خاویاری ایجاد بیماری نمی‌کنند، بلکه سویه‌ی غیرمتحرک آن نیز می‌تواند عامل بیماری‌زا و ایجاد تلفات در بچه ماهیان استرلیاد (*A. ruthenus*) باشد. بنابراین، می‌توان آن را به عنوان یک تهدید برای صنعت آبزی‌پروری تلقی کرد.

منابع

1- Pei C, Song H, Zhu L, Qiao D, Yan Y, Li L, Zhao X, Zhang J, Jiang X, Kong X. Identification of Aeromonas veronii isolated from largemouth bass Micropterus salmoides and histopathological analysis. Aquaculture. 2021 Jul 15;540:736707.

2- Georgiadis MP, Hedrick RP, Johnson WO, Yun S, Gardner IA. Risk factors for outbreaks of disease attributable to white sturgeon iridovirus and white sturgeon herpesvirus-2 at a commercial sturgeon farm. American Journal of Veterinary Research. 2000 Oct 1;61(10):1232-40.

3- Bemis WE, Kynard B. Sturgeon rivers: an introduction to acipenseriform biogeography and life history. Environmental Biology of Fishes. 1997 Mar;48(1):167-83.

4- Radosavljevic V, Milicevic V, Maksimovic-Zoric J, Veljovic L, Nesic K, Pavlovic M, Pelic DL, Markovic Z. Sturgeon diseases in aquaculture. Archives of Veterinary Medicine. 2019 Sep 12;12(1):5-20.

5- Lahnsteiner F, Berger B, Horvath A, Urbanyi B. Studies on the semen biology and sperm cryopreservation in the sterlet, Acipenser ruthenus L. Aquaculture Research. 2004 May;35(6):519-28.

6- Ciulli S, Volpe E, Sirri R, Passalacqua PL, Bianchi FC, Serratore P, Mandrioli L. Outbreak of mortality in Russian (Acipenser gueldenstaedtii) and Siberian (Acipenser baerii) sturgeons associated with sturgeon nucleo-cytoplasmatic large DNA virus. Veterinary Microbiology. 2016 Aug 15;191:27-34.

7- Turska-Szewczuk A, Duda KA, Schwudke D, Pekala A, Kozinska A, Holst O. Structural studies of the lipopolysaccharide from the fish pathogen Aeromonas veronii strain Bs19, serotype O16. Marine Drugs. 2014 Mar;12(3):1298-316.

8- Percival, S.L., Williams, D.W. Chapter three—Aeromonas-A2. In: Percival, S.L.,Yates, M.V. (Eds.), Microbiology of Waterborne Diseases. , second edition.Academic Press, London, 2014, pp. 49–64.

[Downloaded from jfst.modares.ac.ir on 2024-04-26]

9- Martino, M.E., Fasolato, L., Cardazzo, B. Aeromonas A2. In: Finglas, P.M.,Toldrá, F. (Eds.), Encyclopedia of Food and Health. Academic Press, Oxford, 2016, pp.61–67.

10- Islam SI, Mou MJ, Sanjida S. Application of reverse vaccinology to design a multi-epitope subunit vaccine against a new strain of Aeromonas veronii. Journal of Genetic Engineering and Biotechnology. 2022 Dec;20(1):1-8.

11- Mandalakis M, Anastasiou TI, Martou N, Keisaris S, Greveniotis V, Katharios P, Lazari D, Krigas N, Antonopoulou E. Antibacterial Effects of Essential Oils of Seven Medicinal-Aromatic Plants Against the Fish Pathogen Aeromonas veronii bv. sobria: To Blend or Not to Blend?. Molecules. 2021 May 6;26(9):2731.

12- Dong, H.T.; Techatanakitarnan, C.; Jindakittikul, P.; Thaiprayoon, A. Aeromonas jandaei and Aeromonas veronii caused disease and mortality in Nile tilapia, Oreochromis niloticus (L.). J. Fish Dis. 2017, 40, 1395–1403.

13- Smyrli M, Prapas A, Rigos G, Kokkari C, Pavlidis M, Katharios P. Aeromonas veronii infection associated with high morbidity and mortality in farmed European seabass Dicentrarchus labrax in the Aegean Sea, Greece. Fish Pathology. 2017;52(2):68-81.

14- Rahman M, Colque-Navarro P, Kühn I, Huys G, Swings J, Möllby R. Identification and characterization of pathogenic Aeromonas veronii biovar sobria associated with epizootic ulcerative syndrome in fish in Bangladesh. Applied and environmental microbiology. 2002 Feb;68(2):650-5.

15- Hoai TD, Trang TT, Van Tuyen N, Giang NT, Van Van K. Aeromonas veronii caused disease and mortality in channel catfish in Vietnam. Aquaculture. 2019 Nov 15;513:734425.

16- Cai SH, Wu ZH, Jian JC, Lu YS, Tang JF. Characterization of pathogenic Aeromonas veronii bv. veronii associated with ulcerative syndrome from Chinese longsnout catfish (Leiocassis longirostris Günther). Brazilian Journal of Microbiology. 2012 Mar;43(1):382-8.

17- Zhu M, Wang XR, Li J, Li GY, Liu ZP, Mo ZL. Identification and virulence properties of Aeromonas veronii bv. sobria isolates causing an ulcerative syndrome of loach Misgurnus anguillicaudatus. Journal of Fish Diseases. 2016 Jun;39(6):777-81.

18- Rafatnezhad S, Falahatkar B, Tolouei Gilani MH. Effects of stocking density on haematological parameters, growth and fin erosion of great sturgeon (Huso huso) juveniles. Aquaculture Research. 2008 Oct;39(14):1506-13.

19- APHA (2005) Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater. 21st Edition, American Public Health Association/American Water Works Association/Water Environment Federation, Washington DC.

20- Buller, N.B. Bacteria from fish and other aquatic animals: A practical identification manual. 2004 CABI publishing.

21- Sanger, F., Nicklen, S., & Coulson, A. R.. Protein, Nucleotide DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. 1977 Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 74, 5463-5467.

[Downloaded from jfst.modares.ac.ir on 2024-04-26]

22- Legario FS, Choresca CH Jr, Turnbull JF, Crumlish M. Isolation and molecular characterization of streptococcal species recovered from clinical infections in farmed Nile tilapia (Oreochromis niloticus) in the Philippines. J Fish Dis. 2020 Nov;43(11):1431-1442. doi: 10.1111/jfd.13247. Epub 2020 Sep 14. PMID: 32929781.

23- CLSI. Performance Standards for Antimicrobial susceptibility Testing. 29th ed. CLSI supplement M100. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards; 2019

24- Noga EJ. Fish disease: diagnosis and treatment. John Wiley & Sons; 2010 Jul 7.

25- Sakazaki R, Simada T. O-serogrouping scheme for mesophilic Aeromonas strains. Japanese Journal of Medical Science and Biology. 1984; 37(5-6):247-55.

26- Janda JM. Recent advances in the study of the taxonomy, pathogenicity, and infectious syndromes associated with the genus Aeromonas. Clinical microbiology reviews. 1991 Oct;4(4):397-410.

27- Janda JM, Abbott SL. The genus Aeromonas: taxonomy, pathogenicity, and infection. Clinical microbiology reviews. 2010 Jan;23(1):35-73.

28- Araujo RM, Arribas RM, Pares R. Distribution of Aeromonas species in waters with different levels of pollution. Journal of Applied Bacteriology. 1991 Aug;71(2):182-6.

29- Ma Z, Yang H, Li T, Luo L, Gao J. Isolation and identification of pathogenic Aeromonas veronii isolated from infected Siberian sturgeon (*Acipenser baerii*). Wei sheng wu xue bao= Acta microbiologica Sinica. 2009 Oct 1;49(10):1289-94.

30- Dan C, Mei J, Da Wang JF. Genetic differentiation and efficient sex-specific marker development of a pair of Y-and X-linked markers in yellow catfish. International Journal of Biological Sciences. 2013;9(10):1043.

31- Gholamhosseini A, Taghadosi V, Shiry N, Akhlaghi M, Sharifiyazdi H, Soltanian S, Ahmadi N. First isolation and identification of Aeromonas veronii and Chryseobacterium joostei from reared sturgeons in Fars province, Iran. InVeterinary research forum 2018 (Vol. 9, No. 2, p. 113). Faculty of Veterinary Medicine, Urmia University, Urmia, Iran.

32- Di J, Zhang S, Huang J, Du H, Zhou Y, Zhou Q, Wei Q. Isolation and identification of pathogens causing haemorrhagic septicaemia in cultured Chinese sturgeon (Acipenser sinensis). Aquaculture Research. 2018 Nov;49(11):3624-33.

33- Martínez-Murcia AJ, Borrell N, Figueras MJ. Typing of clinical and environmental Aeromonas veronii strains based on the 16S–23S Rdna spacers. FEMS Immunology & Medical Microbiology. 2000 Jul 1;28(3):225-32.

34- Garduno, R.A.; Moore, A.R.; Oliver, G.; Lizama, A.L.; Garduno, E.; Kay, W.W. Host cell invasion and intracellular resistance by *Aeromonas salmonicida*: role of the S-layer. *J. Clin. Microbiol.* 2000, *46*, 660–668.

35- Abu-Elala, N.; Abdelsalam, M.; Marouf, S.; Setta, A. Comparative analysis of virulence genes, antibiotic resistance and gyrB-based phylogeny of motile Aeromonas species isolates from Nile tilapia and domestic fowl. Lett. J. Appl. Microbiol. 2015, 61, 429–436.

[Downloaded from jfst.modares.ac.ir on 2024-04-26]

36- Seppola, M.; Mikkelsen, H.; Johansen, A.; Steiro, K.; Myrnes, B.; Nilsen, I. Ultrapure LPS induces inflammatory and antibacterial responses attenuated in vitro by exogenous sera in Atlantic cod and Atlantic salmon. Fish Shellfish Immunol. 2015, 44, 66–78.

37- Krovacek K, Pasquale V, Baloda SB, Soprano V, Conte M, Dumontet S. Comparison of putative virulence factors in Aeromonas hydrophila strains isolated from the marine environment and human diarrheal cases in southern Italy. Applied and environmental microbiology. 1994 Apr;60(4):1379-82.

38- Sreedharan K, Philip R, Singh IB. Isolation and characterization of virulent Aeromonas veronii from ascitic fluid of oscar Astronotus ocellatus showing signs of infectious dropsy. Diseases of aquatic organisms. 2011 Mar 16;94(1):29-39.

39- Lazado CC, Zilberg D. Pathogenic characteristics of Aeromonas veronii isolated from the liver of a diseased guppy (Poecilia reticulata). Letters in applied microbiology. 2018 Nov;67(5):476-83.

40- Meng Y, Xiao HB, Zeng LB. Isolation and identification of the hemorrhagic septicemia pathogen from Amur sturgeon, Acipenser schrenckii. Journal of Applied Ichthyology. 2011 Apr;27(2):799-803.

41- Xiao Z, Li X, Xue M, Zhang M, Liu W, Fan Y, Chen X, Chu Z, Gong F, Zeng L, Zhou Y. Vibrio metschnikovii, a Potential Pathogen in Freshwater-Cultured Hybrid Sturgeon. Animals. 2022 Apr 24;12(9):1101.

[Downloaded from jfst.modares.ac.ir on 2024-04-26]

Journal of Fisheries Science and Technology
Volume11, Issue 3, Summer 2022
Pages: 255-265

The first report of bacterial pathogenesis of non-motile (*Aeromonas veronii* Hickman-Brenner, 1987) in Sterlet juveniles (*Acipenser ruthenus* Linnaeus, 1758) in Sari

Amirhossein Smiley[*1] ,Nazila Yeganeh[1]

*,[1] Department of fisheries engineering and science, Faculty of Naturel resource and Marine Sciences, University of Tarbiat Modares, Nur,Iran

A B S T R A C T

This study was carried out after receiving a report of the mortality of Sterlet sturgeon (*Acipenser ruthenus*) juveniles from a fish farm in Sari-Mazandaran in April 2021 to isolate and identify the pathogen in the ill Sterlet sturgeon (*A. ruthenus*) juveniles. Sampling was performed from 20 ill Sterlet (*A. ruthenus*) juveniles. Clinical symptoms were recorded, followed by autopsy, kidney, and liver tissue sampling, bacterial culture, biochemical tests, anti-biogram test, DNA isolation, and 16Sr RNA gene sequencing. The tested isolate with 1418 base pairs (bp) was identified as a non-motile strain of *A. veronii* bacteria. It was registered in the World Gene Bank (NCBI) under the name *Aeromonas veronii* TMU000126. This strain of bacterium showed sensitivity to the Florfenicol as well as, resistance to Trimethoprim-sulfamethoxazole, Oxytetracycline, Doxycycline, and Fosfomycin antibiotics. The results revealed that the non-motile strain of *A. veronii*, like its motile strain, was the cause of disease and mortality in Sterlet sturgeon (*A. ruthenus*). According to the available studies, this study might be considered the first study on the disease of the sturgeon species of Sterlet (*A. ruthenus*), and the pathogenicity of the non-motile strain of *A. veronii* species.

KEYWORDS: Anti-biogram test, 16Sr RNA gene, Non-motile bacteria, Sturgeons.

ARTICLE TYPE

Original Research

ARTICLE HISTORY

Received: 9 Feburary 2021

Accepted: 6 September 2022

ePublished: 11 September 2022

* Corresponding Author:
Email address: amir.h.smiley@modares.ac.ir
Tel: 01144998000
© Published by Tarbiat Modares University

[Downloaded from jfst.modares.ac.ir on 2024-04-26]