

## 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<sup>۱\*</sup>، نازیلا یگانه<sup>۱</sup>

<sup>۱\*</sup> گروه علوم و مهندسی شیلات، دانشکده منابع طبیعی و علوم دریایی، دانشگاه تربیت مدرس، نور، ایران

### چکیده

### نوع مقاله

#### 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

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 بچه‌ماهی خاویاری استرلیاد (*A. ruthenus*) پرورشی بیمار صورت پذیرفت. نمونه برداری از ۲۰ قطعه بچه‌ماهی 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 *Sr RNA* ۱۶ انجام شد. جدایی‌ی مورد آزمون با ۱۴۱۸ جفت باز (bp) به عنوان سویه‌ی 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 متوپریم-سولفامتو کسازول، اکسی‌تتراسیکلین، داکسی‌سیکلین و فسفوماپسین 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 بیماری‌زایی سویه‌ی غیرمتحرک گونه‌ی *A. veronii* در نظر گرفت.

**کلید واژه‌ها:** آزمون حساسیت دارویی، ژن *Sr RNA* ۱۶، باکتری غیر متحرک، ماهیان خاویاری

### مقدمه

آبزی پروری در دهه‌های 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 گرفته‌اند [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.

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 نشده است. 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 شده است [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 عفونت‌های مختلط ناشی از *A. veronii* و سایر عوامل بیماری‌زا، سپتی سمی در سال‌های اخیر یک مشکل عمده در آبی‌پروری بوده است. بدین ترتیب، باکتری *A. veronii* نه تنها یک تهدید جدی برای صنعت آبی‌پروری 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 (*Leiocassis longirostris* Gunther) [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 بجه‌ماهیان 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، نیتريت و نیترات با دستگاه فتومتر (Parspeyvand DA-4500, Iran) سنجیده شدند [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 نمونه‌ها با سرم فیزیولوژی ۰/۸۵٪، با حفظ شرایط استریل کالبدشکافی صورت گرفت و از بافت‌های کبد و کلیه، کشت‌هایی 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، دی‌هیدروژن سولفید، تخمیر قندهای ساکارز، لاکتوز و گلوکز، اوره، سیمون سیترات، همولیز، MR/VP (متیل رد/ووکس پروسکوئر) 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)، STE و 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 (۱،۲۴،۲۵) 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'

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 سانتی گراد به مدت ۲۵ ثانیه و ۷۲ درجه سانتی گراد 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 رنگ آمیزی شد. محصول PCR به روش کیت ستونی شستشو شد و توسط دستگاه ژل داگ مدل GD3 عکس برداری شد. محصول برای تعیین توالی به شرکت BJI (China) منتقل شد.

### آزمایش های حساسیت دارویی

به منظور آگاهی از چگونگی عملکرد جدایه‌ی مورد نظر نسبت به آنتی بیوتیک‌ها، 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 (حدوداً ۷ میلی‌متر) آغشته به آنتی بیوتیک (Padtan teb, Iran) به صورت استریل روی آگار قرار داده و در دمای ۲۲ درجه سانتی گراد 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 آنتی بیوگرام شامل: فلورفنیکول (۳۰FF میکروگرم)، انروفلوکساسین (۵NFX میکروگرم)، اکسی تتراسایکلین (۳۰T میکروگرم)، داکسی سایکلین (۳۰D میکروگرم)، سولفامتوکسازول/تری متوپریم (SXT ۱/۲۵ / ۲۳ میکروگرم)، اریترومايسين (۱۵E میکروگرم)، جنتامایسین (۱۰GM میکروگرم)، کانامایسین (۳۰K میکروگرم) و فسفومايسين (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*)

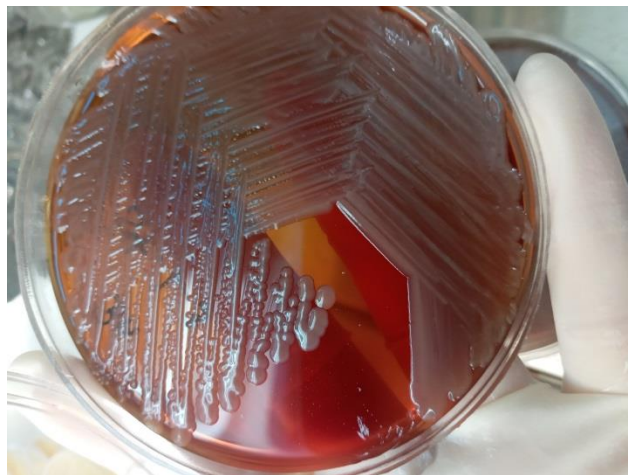
فاکتورهای مورد بررسی	حد مجاز	نتایج
دمای آب (درجه سانتی‌گراد)	۱۶-۲۱	۱۷/۸
اکسیژن محلول در آب (میلی‌گرم/لیتر)	۶-۱۴	۷/۷
pH آب	۷/۶-۸/۵	۷/۸
آمونیاک کل (میلی‌گرم/لیتر)	کمتر از ۰/۰۲	۰/۰۱۱
نیترات کل (میلی‌گرم/لیتر)	۱-۲	۰/۵
نیتریت کل (میلی‌گرم/لیتر)	۰/۰۹-۰/۱	۰/۰۵
آهن (میلی‌گرم/لیتر)	۰/۳-۰/۲	۰/۲۵
H2S (میلی‌گرم/لیتر)	۰	۰

علائم بالینی ماهیان شامل بی حالی، شنای وارونه، التهاب و خونریزی نقطه‌ای بر روی بدن بود. همچنین روده‌ها حاوی زردآب بودند. علاوه بر این 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).



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

نتایج تست‌های بیوشیمیایی 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. veronii* شناسایی و نام این سویه با ۱۴۱۸ جفت 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/nucleotide/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	+	+
تحریک	-	+
اندول	-	+
گلوکز	-	+
سوکروز	-	+
لاکتوز	-	+
TCBS	+ (ضعیف)	+
گاز	-	+
H <sub>2</sub> S	-	-
اوره	-	-
سیمون سترات	-	+
همولیز	β+	β+
MR/VP	-	+

نتایج حاصل از انجام تست‌های آنتی‌بیوگرام در (جدول ۳) گزارش شده‌است. بر این اساس، باکتری *A. veronii* جدا شده در مطالعه‌ی ما نسبت به فلورفینیکل 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 آنتی‌بیوتیک‌های تری متوپرایم-سولفامتوکسازول، اکسی‌تتراسیکلین، داکسی‌سیکلین و فسفومايسين مقاومت نشان داد.

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

آنتی‌بیوتیک‌های مورد آزمایش	محتوای آنتی‌بیوتیک در هر دیسک (μg)	قطر مهارکنندگی رشد (mm)
فلورفینیکل	۳۰	۳۵- S
تری متوپرایم سولفامتوکسازول	۱/۲۵-۲۳/۷۵	- R
جنتامایسین	۱۰	۲۳- S
کانامایسین	۳۰	۱۷- I
اکسی‌تتراسیکلین	۳۰	-R
داکسی‌سیکلین	۳۰	-R
فسفومايسين	۲۰	۱۲ R
انروفلوکساسین	۵	۱۷- I
اریترومایسین	۱۵	۱۳- I

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

## بحث

اعضای جنس *Aeromonas* به طور گسترده در محیط‌های آبی و زیستگاه‌های خاکی پراکنده شده‌اند 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 آبی (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* به‌عنوان یک عضو جدید از این جنس، به‌عنوان یکی دیگر از پاتوژن‌های ماهی شناخته شده‌است که بویژه با سندرم اولسراتیو همراه می‌باشد [۱۴، ۱۶]. باکتری *A. veronii* (سویه X106909) برای اولین بار به‌عنوان 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، آنروتوکسین‌های سیتوتونیک و سیتوتوکسیک، پروتازها، لیپازها و لوکوسیدین‌ها به‌عنوان عوامل احتمالی کمک‌کننده در پاتوژن‌ها این باکتری‌ها ارائه شده‌اند [۳۳]. علاوه بر این، اجزای سطح سلولی مانند پروتئین‌های غشای بیرونی، لیپوپلی ساکارید (LPS)، لایه S، تازک‌های قطبی و پیلی (نوع IV) به‌عنوان فاکتورهای حدت احتمالی *Aeromonas* شناسایی شده‌اند [۷]. شایان ذکر است از جمله فاکتورهای چسبندگی غیر فیبریالی که در پاتوژن‌ها 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 پاتوژن‌ها گونه‌های *Aeromonas* نیز دخیل هستند [۱۲، ۳۵-۳۶]. برای اتصال اولیه باکتری به بافت میزبان، LPS (فرم S) در باکتری، در طول رویدادهای عفونت، به‌عنوان یک چسب، عمل کرده و باکتری‌ها را از نابود شدن به واسطه مکمل و پپتیدهای ضد میکروبی محافظت می‌کند [۷]. برخی از مطالعات پیشین دریافته‌اند 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 آنرولیزین 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. چنان‌که بیان می‌کنند آن‌ها باعث بیماری مزمن با زخم‌های باز پوستی و سایر ضایعات پاتولوژیک یا عفونت سیستمیک حاد به نام سپتی‌سمی آئروموناد متحرک (MAS; Motile *Aeromonas* Septicaemia) می‌شوند [۲۳، ۲۷، ۳۵، ۳۸].

تست حساسیت ضد میکروبی نشان داد که سویه‌ی مورد مطالعه به آنتی‌بیوتیک فلورفنیکل حساس و به آنتی‌بیوتیک‌های تری متوپریم-سولفامتوکسازول، اکسی‌تراسیکلین، داکسی‌سیکلین و فسفومايسين 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 جدا شده از گربه‌ماهی به جنتامایسین، استرپتومايسين 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 به‌طور مشترک به پنی‌سیلین و آمپی‌سیلین مقاوم بودند [۱].

اگرچه جدایه مورد مطالعه ما یک *Aeromonas* بی تحرک است که بیماری در بچه ماهیان خاویاری استرلیاد (*A. ruthenus*) را منجر شده است. 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* ×) و *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 نشده است. 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 گرفته است.

### 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, Nestic 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-cytoplasmic 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.

- 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.



- 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. 29<sup>th</sup> 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. In *Veterinary 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.

- 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.

## 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\*<sup>1</sup>, Nazila Yeganeh<sup>1</sup>

\*<sup>1</sup> Department of fisheries engineering and science, Faculty of Naturel resource and Marine Sciences, University of Tarbiat Modares, Nur, Iran

### ABSTRACT

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 February 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