فیزیولوژی و بیوتکنولوژی آبزیان
سال ششم، شماره سوم، پاییز ۱۳۹۷

جداسازی و شناسایی باکتری‌های *Vibrio* موجود در صدف مرواریدساز لب‌سیاه و بررسی حساسیت و مقاومت آنتی‌بیوتیک‌ها نسبت به آن در غرب خلیج فارس

مهدی شاهمرادی[۱]*، محمد مهدی متقی[۲]، حسین رامشی[۳]، محمد حسن تدین[۴]

تاریخ دریافت: مهر ۹۶ تاریخ پذیرش: بهمن ۹۶

چکیده

صدف‌های مرواریدساز لب‌سیاه (*Pinctada margaritifera*) یکی از گونه‌های مهم نرم‌تنان است که برای تولید مروارید پرورشی از آن استفاده می‌شود. تلفات در تمامی مراحل صدفچه و مولدین صدف مشاهده شده است که تاکنون به دلایل آن پرداخته نشده است. این مطالعه با هدف بررسی عوامل بیماری‌زا در صدفچه و مولدین صدف مرواریدساز لب‌سیاه و همچنین تعیین مقاومت و حساسیت دارویی باکتریایی، در کارگاه تکثیر و پرورش تحقیقات بندرلنگه انجام شد. نمونه‌ها به صورت تازه و برای بررسی‌های باکتریایی مورداستفاده قرار گرفتند. بررسی باکتریایی طبق روش‌های بیوشیمیایی و رنگ‌آمیزی گرم و با استفاده از محیط کشت‌های TSA و TCBS انجام شد. نمونه‌ها برای بررسی مقاومت و حساسیت دارویی باکتری‌ها با استفاده از محیط کشت مولر هینتون آگار مورد مطالعه قرار گرفتند. ۴ گونه باکتری از جنس *Vibrio* یافت شد که *V. harveyi*، *V. alginolyticus*، *V. splendidus* و *V. anguillarum* در اندام آبشش مولد صدف لب‌سیاه شناسایی شد. باکتری‌ها به آنتی‌بیوتیک‌های آمپی‌سیلین، اریترومایسین، استرپتومایسین و اگزاسیلین مقاوم و به آنتی‌بیوتیک نووبیوسین حساس و به آنتی‌بیوتیک اکسی‌تتراسایکلین نیمه حساس بودند.

واژگان کلیدی: *صدف لب‌سیاه، مولدین صدف، باکتری ویبریو، نووبیوسین.*

۱- کارشناس ارشد میکروبیولوژی، گروه میکروبیولوژی، دانشکده علوم پایه، واحد کرمان، دانشگاه آزاد اسلامی، کرمان، ایران.
۲- استادیار گروه میکروبیولوژی، دانشکده علوم پایه، واحد کرمان، دانشگاه آزاد اسلامی، کرمان، ایران.
۳- کارشناس ارشد شیلات، گروه شیلات، دانشکده منابع طبیعی، واحد بندرعباس، دانشگاه آزاد اسلامی، بندرعباس، ایران.
۴- مربی گروه میکروبیولوژی، دانشکده علوم پایه، واحد کرمان، دانشگاه آزاد اسلامی، کرمان، ایران.
* نویسنده مسئول: Mehdishahmoradi68@yahoo.com

مقدمه

فعالیت‌های صیادی و صنایع وابسته به تکثیر و پرورش آبزیان نه تنها از جنبه‌های اقتصادی و تامین پروتئین مورد نیاز کشور بلکه از بعد اجتماعی و اشتغال‌زایی خصوصا در نوار ساحلی از اهمیت به سزایی برخوردار است. نرم‌تنان گروه بزرگی از بی‌مهرگان هستند که دارای ارزش اقتصادی و تجاری هستند و استفاده‌های گوناگونی دارند. از پوسته صدف‌های مرواریدساز لب‌سیاه (*Pinctada margaritifera*) در صنایع منبت‌کاری، دکمه‌سازی، تزئینات، خوراک دام و طیور و از عضله بزرگ آن‌ها برای خوراک انسان استفاده می‌شود و مهم‌ترین هدف پرورش آن‌ها استحصال مروارید طبیعی و پرورشی است (احتشامی و همکاران، ۱۳۷۳). صید صدف و استحصال مروارید طبیعی از دیرباز در خلیج فارس و در غرب هرمزگان در جزایر لاوان، هندورابی و کیش که از زیستگاه‌های اصلی این صدف به شمار می‌رود رواج داشته است و یکی از بهترین و سودمندترین ثروت‌های طبیعی خلیج فارس محسوب می‌شود. مراحل رشد لارو صدف مرواریدساز لب‌سیاه شامل مرحله لارو چرخشی (Trochophore)، لارو دی‌شکل (D-shaped)، لارو پیش‌قوزدار (Early Umbo)، لارو قوزدار (Umbo)، لارو چشم‌زده (Eye Spot)، لارو پادار (Pediveliger)، لارو ریشه‌دار (Plantigrade) و صدفچه (Spat) است (درخشش و همکاران، ۱۳۹۰).

هجوم عوامل بیماری‌زا در مخازن پرورش و حتی در محیط طبیعی زندگی صدف مرواریدساز لب‌سیاه مشاهده شده است. سیستم ایمنی صدف‌ها ساده است و در برابر کوچک‌ترین عوامل بیماری‌زا مقاومت چندانی از خود نشان نمی‌دهند، در نتیجه این عوامل به سرعت درون صدف انتشار می‌یابند. عوامل بیماری‌زا بر اساس نوع عامل بیماری تقسیم‌بندی می‌شوند که مهم‌ترین آن‌ها، در درجه اول مربوط به عوامل بیماری‌زای باکتریایی است. در میان باکتری‌های بیماری‌زا در صدف‌های پرورشی، باکتری‌های جنس *Vibrio* سبب بیماری باکتریایی به نام ویبریوزیس می‌شود و همچنین به عنوان مهم‌ترین باکتری‌های بیماری‌زا در نرم‌تنان گزارش شده‌اند (Pass et al., 1987). ویبریوزیس در ایران در نقاط مختلف تلفات متفاوتی برای آبزیان داشته است و بین ۱۰ تا ۱۵ درصد تلفات ایجاد می‌کند. این میزان

تلفات در جهان به دلیل نوع سیستم پرورشی مورد استفاده ۱۵ الی ۲۰ درصد است (James, 2002). بیماری ویبریوزیس ممکن است با تعدادی سندرم مانند ویبریوزیس روده‌ای، ویبریوزیس کوتیکولی و اندام ثانویه، ویبریوزیس سیستمیک و عفونت هپاتوپانکراس بروز کند (OIE, 2008). گونه‌هایی از جنس *Vibrio* که در سیستم پرورش آبزیان مشاهده می‌شوند، شامل *V. harveyi*، *V. splendidus*، *V. parahaemolyticus*، *V. alginolyticus*، *V. anguillarum*، *V. campbellii*، *V. fischeri*، *V. plagiocus*، *V. orientalis*، *V. logei*، *V. penaeicida* و *V. cholerae* هستند (Lightner, 1996). با توجه به پتانسیل ایجاد جهش در ژنوم باکتری، مصرف مداوم آنتی‌بیوتیک در مدت زمان طولانی باعث ایجاد سویه‌های مقاوم باکتریایی در مقابل آنتی‌بیوتیک می‌شود و حساسیت باکتری بیماری‌زا در برابر آنتی‌بیوتیک از بین می‌رود (Brock and Lightner, 1990). مصرف آنتی‌بیوتیک خارج از دستور از سویی باعث مصرف بیشتر آنتی‌بیوتیک و ضرر اقتصادی و از سوی دیگر منجر به مضرات زیستی می‌شود (Ishimaru et al., 1995). با وجود موفقیت‌هایی که در زمینه تکثیر و پرورش صدف‌های مرواریدساز لب‌سیاه در کشور ایران به دست آمده است، تلفات در تمامی مراحل لاروی، صدفچه و مولدین این صدف مشاهده می‌شود. تمام مراحل رشد و نمو صدف مرواریدساز لب‌سیاه در کارگاه تکثیر و درون مخازن پرورش طی می‌شود، در نتیجه در معرض عوامل بیماری‌زای مختلفی از جمله باکتری‌ها قرار دارند (Minaur, 1969; Sindermann, 1990; Bower, 1992).

در پروژه‌های انجام شده در زمینه تکثیر و پرورش صدف و سایر آبزیان، گزارش‌های متعددی از مرگ و میر در مرحله تکثیر و یا پرورش لارو و مولدین ارائه شده است که دلایل آن مورد بررسی قرار نگرفت. بر این اساس، پژوهش حاضر به منظور بررسی عوامل بیماری‌زا در صدفچه و مولدین صدف مرواریدساز لب‌سیاه و همچنین تعیین مقاومت و حساسیت دارویی باکتریایی این صدف‌ها انجام شده است. از این رو، پژوهش حاضر به عنوان اولین مطالعه گسترده در زمینه عوامل بیماری‌زا برای صدف‌های مرواریدساز لب‌سیاه می‌تواند بسیاری از ابهامات موجود در زمینه مرگ و میر صدف‌ها را روشن سازد.

مواد و روش‌ها

زمان و محل نمونه‌برداری

صدفچه‌ها و مولدین صدف مرواریدساز لب‌سیاه (*Pinctada margaritifera*) با عملیات غواصی در محل زیست صدف‌ها در عمق ۱۰ تا ۱۲ متری دریا در جزایر هندورابی و لاوان جمع‌آوری شدند. سپس نمونه‌ها برای انجام مطالعات دیگر به کارگاه تکثیر مرکز تحقیقات نرم‌تنان شیلات بندرلنگه انتقال یافت. به منظور مطالعه عوامل آلوده کننده باکتریایی از اندام‌های داخلی (آبشش، هپاتوپانکراس و روده) ۳۰ صدف مرواریدساز لب‌سیاه شامل ۲۰ صدفچه و ۱۰ مولد (به علت کمبود مولدین) نمونه‌برداری شد. نمونه‌ها برای انجام آزمایش‌های مختلف مورد استفاده قرار گرفتند (Melba et al., 2007; OIE, 2008).

کشت نمونه‌ها به منظور جداسازی باکتری‌های *Vibrio*

در این پژوهش نمونه‌هایی شامل بافت‌های هپاتوپانکراس، آبشش و روده صدف‌های مرواریدساز لب‌سیاه مورداستفاده قرار گرفت. برای نمونه‌برداری ابتدا مولدها با آب استریل کاملا شسته شدند و سپس با اتانول ۷۰ درصد ضدعفونی شدند. پس از تشریح توسط تیغ جراحی استریل، بافت‌های مورد نظر به طور جداگانه خارج شدند و بعد از تهیه سوسپانسیون عمل رقت‌سازی انجام شد. به این صورت که ۱ میلی‌لیتر از نمونه به ۹ میلی‌لیتر آب دریای استریل شده (۲/۵ درصد نمک) افزوده شد و عمل رقت‌سازی تا رقت $۱۰^{-۸}$ انجام شد و از لوله آخر ۱ میلی‌لیتر به درون ظرف حاوی گندزدا[1] ریخته شد (Lammert, 2006; Watts et al., 2008).

از رقت‌های به دست آمده در سطح محیط‌های ترپتیکاز سوی آگار (TSA) و تیوسولفات سیترات بایل سالت سوکورز آگار (TCBS) که از قبل در پتری‌دیش‌های استریل ریخته و سطح آن‌ها خشک شده بود با رعایت اصول ایمنی و زیر هود (ClassII BSC120، فرا گستر تجهیز، ایران) کشت سطحی انجام شد. سپس نمونه‌ها در انکوباتور (ICP400، Memert، آلمان) به مدت ۲۴ ساعت قرار داده شدند و از لحاظ رشد و عدم رشد بررسی شدند (Lammert, 2006; OIE, 2008; Watts et al., 2008).

رنگ‌آمیزی گرم

برای بررسی شکل ظاهری و آرایشی از

1- Discard Jar

کلنی‌ها، اسمیر جداگانه تهیه و رنگ‌آمیزی گرم انجام گرفت. سپس اسمیرها با میکروسکوپ (CX21، Olympus، ژاپن) مورد ارزیابی قرار گرفتند.

آزمون‌های بیوشیمیایی برای تعیین هویت کلنی‌های به دست آمده

آزمون‌های بیوشیمیایی مورد نیاز برای شناسایی باکتری‌های گرم منفی و باکتری *Vibrio* شامل حرکت، اکسیداز، کاتالاز، سیترات، ایندول، اوره‌آز، متیل رد، ژلاتیناز، انجام شد (Lammert, 2006).

ارزیابی حساسیت کلنی‌های *Vibrio* به دست آمده به آنتی‌بیوتیک در مرحله غربالگری

برای بررسی حساسیت کلنی نسبت به آنتی‌بیوتیک‌های به کار گرفته شده از روش دیسک دیفیوژن مطابق با پروتکل CLSI[1] استفاده شد. نمونه‌ها مطابق با محلول ۰/۵ مک‌فارلند تهیه شدند. باکتری‌های جداسازی شده بر روی محیط کشت مولر هینتون آگار کشت داده شدند و دیسک‌های حاوی آنتی‌بیوتیک در شرایط استریل بر روی سطح محیط کشت قرار داده شدند (Satish et al., 2008). دیسک‌های آنتی‌بیوتیکی انتخاب شده شامل آمپی‌سیلین[2]، اریترومایسین[3]، اکسی‌تتراسایکلین[4]، نووبیوسین[5]، اگزاسیلین[6] و استرپتومایسین[7] بودند. پس از انکوبه کردن پلیت‌ها حساسیت و مقاومت باکتری‌ها نسبت به آنتی‌بیوتیک‌ها مورد بررسی قرار گرفت. ایجاد هاله در اطراف دیسک آنتی‌بیوتیک نشان دهنده حساسیت باکتری و عدم ایجاد هاله نشان دهنده مقاوم بودن باکتری نسبت به آن آنتی‌بیوتیک است. اندازه‌گیری قطر هاله با خط‌کش (بر حسب میلی‌متر) انجام شد.

نتایج

بررسی کشت نمونه‌ها با هدف جداسازی باکتری‌های *Vibrio*

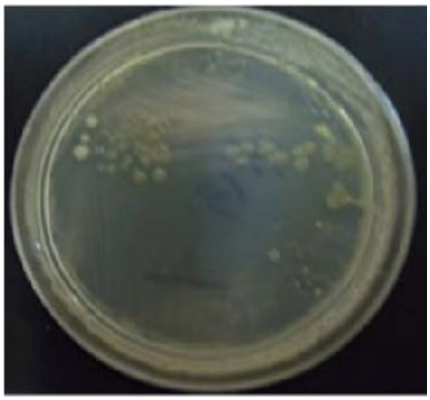
نتایج به دست آمده از کشت باکتری در سطح محیط‌های TCBS و TSA نشان دهنده رشد کلنی بود. با رنگ‌آمیزی گرم کلنی‌های مشکوک به *Vibrio* باسیل‌های خمیده و گرم منفی مشاهده شدند. نتایج آزمون‌های بیوشیمیایی در شکل‌های ۱ و ۲ و جدول ۲

1- Clinical Laboratory Standard Institute

2- Ampicillin
3- Erythromycin
4- Oxytetracycline
5- Novobiocin
6- Oxacillin
7- Streptomycin

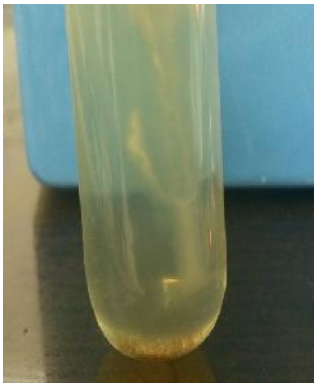
آورده شده است. بر اساس بررسی‌های صورت گرفته، در مجموع ۵۵ کلنی از جنس *Vibrio*رشد کرد. در مجموع ۲۲ کلنی متعلق به گونه *V. harveyi*، ۱۴ کلنی متعلق به *V. alginolyticus*، ۹ کلنی متعلق به *V. splendidus* و ۱۰ کلنی متعلق به *V. anguillarum* تنها در اندام آبشش مولدین صدف لب‌سیاه مشاهده شدند اما در اندام‌های دیگر مولدین و در صدفچه‌ها مشاهده نشدند.

در شکل ۱ رشد باکتری *Vibrio* بر روی محیط کشت TSA و ایجاد کلنی‌های آن مشاهده می‌شود.



شکل ۱: نمونه‌ای از باکتری جداسازی شده در محیط کشت TSA

شکل ۲ نتیجه آزمون حرکت را نشان می‌دهد. همان‌گونه که در شکل مشاهده می‌شود با تلقیح نمونه باکتری، رشد و ابری شکل شدن مسیر حرکت باکتری رویت شد. نتیجه این آزمون برای تمامی باکتری‌ها مثبت بود.



شکل ۲: آزمون حرکت مثبت

بررسی آزمون آنتی‌بیوگرام

مقاومت و حساسیت کلنی‌ها به آنتی‌بیوتیک‌های اگزاسیلین، نووبیوسین، اکسی‌تتراسایکلین، اریترومایسین، آمپی‌سیلین و استرپتومایسین بررسی شد. نتایج آزمون آنتی‌بیوگرام در جدول ۳ نشان داده شده است. نتایج بیان‌گر آن است که تمامی کلنی‌ها به آنتی‌بیوتیک‌های نووبیوسین حساس و به آنتی‌بیوتیک اکسی‌تتراسایکلین نیمه حساس بودند. همچنین نتایج نشان داد که تمامی کلنی‌ها به آنتی‌بیوتیک‌های آمپی‌سیلین، اریترومایسین، اگزاسیلین و استرپتومایسین مقاوم بودند.

جدول ۲: ویژگی‌های بیوشیمیایی و فیزیولوژیکی گونه‌های *Vibrio* جدا شده

آزمون	گونه‌های *Vibrio* جدا شده			
	V. anguillarum	***V. splendidus***	***V. alginolyticus***	***V. harveyi***
رنگ‌آمیزی گرم	-	-	-	-
حرکت	+	+	+	+
اکسیداز	+	+	+	+
کاتالاز	+	+	+	+
اندول	+	+	+	+
رنگ قرمز متیل	-	-	+	-
Voges-proskauer	+	-	+	-
اکسایش- تخمیر گلوکز	+	+	+	+
سیترات	+	-	+	-
ژلاتیناز	+	+	+	+
اوره‌آز	-	-	-	+
رشد در نمک ٪۰	-	-	-	-
رشد در نمک ٪۳	+	+	+	+

جدول ۳: نتایج حاصل از آزمون آنتی‌بیوگرام

آنتی‌بیوتیک	گونه‌های *Vibrio* جدا شده			
	V. anguillarum	***V. splendidus***	***V. alginolyticus***	***V. harveyi***
نووبیوسین	حساس	حساس	حساس	حساس
اکسی‌تتراسایکلین	نیمه حساس	نیمه حساس	نیمه حساس	نیمه حساس
آمپی‌سیلین	مقاوم	مقاوم	مقاوم	مقاوم
اریترومایسین	مقاوم	مقاوم	مقاوم	مقاوم
اگزاسیلین	مقاوم	مقاوم	مقاوم	مقاوم
استرپتومایسین	مقاوم	مقاوم	مقاوم	مقاوم

بحث

مطالعات بوم‌شناختی، زیست‌شناختی و بالینی موجودات زنده از مسایل بسیار با اهمیت است. این مطالعات باید پیرامون هر موجودی انجام شود. صدف مرواریدساز لب‌سیاه (*Pinctada margaritifera*) یکی از آبزیان پرورشی با ارزش است که مطالعات میکروسکوپی و ماکروسکوپی بر اندام‌های داخلی و سطح بیرونی آن انجام شده است. در مطالعه حاضر نیز به بررسی باکتری‌های جنس *Vibrio* در اندام‌های داخلی این صدف پرداخته شده است.

بررسی باکتری‌های جدا شده از مرواریدساز لب‌سیاه در این مطالعه نشان داد که جنس غالب، باکتری *Vibrio* بود، ولی در این بررسی مرگ و میر ناشی از باکتری *Vibrio* در مخازن پرورش صدف مشاهده نشد.

باکتری‌ها یکی از عواملی هستند که باعث بروز بیماری و مرگ و میر موجودات آبزی به ویژه صدف‌های مرواریدساز لب‌سیاه می‌شوند. باکتری‌های جدا شده در این مطالعه تماما گرم منفی بوده و ۵۵ کلنی در محیط کشت رشد کرد و ۴ گونه باکتری شناسایی شد که تمام آن‌ها تنها در اندام آبشش صدف مولد مشاهده شدند و در صدفچه‌ها هیچ موردی یافت نشد. تمامی کلنی‌ها بر روی محیط کشت TCBS و TSA رشد کردند.

گزارش‌هایی مبنی بر وجود برخی گونه‌های *Vibrio* که عامل اولیه و اصلی بیماری هستند، در برخی از مناطق در صدف‌ها گزارش شده‌اند که از آن جمله می‌توان به *Vibrio tapetis* (*Vibrio* P1) اشاره کرد که در منطقه Manihiki در اقیانوس آرام موجب تلفات بالا در صدف‌های گونه *P. margaritifera* در این منطقه شد (Paillard et al., 2004).

باکتری *Vibrio* باعث بروز بیماری Brong Ring Disease (BRD) در صدف‌ها می‌شود. از مشخصات این بیماری نازک شدن پوسته صدف‌ها است. بر اساس گزارش Perkins در سال ۱۹۹۸ این حالت در استرالیا ناشی از باکتری *Vibrio harveyi* در صدف‌ها ایجاد شده است (Perkins, 1998).

از مهم‌ترین عوامل تحریک کننده و استرس‌زا در محیط که می‌توانند موجب بروز بیماری‌های باکتریایی شوند می‌توان به تراکم بالای صدف‌ها در محیط، تغییرات درجه حرارت و کیفیت بد آب اشاره کرد. بنابراین اصلاح موارد ذکر شده می‌تواند تا حدود زیادی از بروز بیماری‌های باکتریایی در صدف‌ها جلوگیری کند.

آنتی‌بیوتیک به عنوان عامل موثر در کنترل و کاهش تلفات ناشی از گونه‌های *Vibrio* در آبزیان به کار می‌رود. به طور معمول از بین آنتی‌بیوتیک‌هایی که برای آبزیان استفاده می‌شوند، می‌توان از استرپتومایسین، کلرامفنیکل، آمپی‌سیلین، اکسی‌تتراسایکلین، نووبیوسین، اریترومایسین و تری‌متوپریم به عنوان داروهای موثر بر *Vibrio* نام برد (Lightner, 1988). آنتی‌بیوتیک تری‌متوپریم باکتریواستاتیک، با دامنه وسیع و عامل ضد فولیک اسید است که مهار کننده قدرتمند و انتخابی دی‌هیدروفولات ردوکتاز باکتری‌ها است. آنتی‌بیوتیک استرپتومایسین از آمینوگلیکوزیدها است که با اتصال به ریبوزوم مانع تولید پروتئین در باکتری می‌شود در نتیجه اثر ضدباکتریایی دارد. اکسی‌تتراسایکلین مانند تمامی اعضای گروه تتراسایکلین‌ها با اتصال به زیرواحد ۳۰S ریبوزوم و از طریق مهار تولید پروتئین باکتری اثر می‌گذارد و متعلق به گروه باکتریواستاتیک‌ها است (Brunton et al., 2005; Le et al., 2006). در ایران آنتی‌بیوتیک اکسی‌تتراسایکلین در آبزی‌پروری بیشترین استفاده را دارد (James, 2002). آنتی‌بیوتیک اریترومایسین در مواقعی باعث کاهش رشد باکتری می‌شود. این عمل از طریق کاهش تولید پروتئین‌های مهم مورد نیاز باکتری برای ادامه بقا انجام می‌شود (Brunton et al., 2005; Le et al., 2006).

در مطالعه‌ای که مقیمی و همکارانش (۱۳۹۲) در ۳ ایستگاه استخرهای پرورشی آبزیان در استان بوشهر انجام دادند، باکتری‌های *V. harveyi* و *V. alginolyticus* جداسازی شده نسبت به آنتی‌بیوتیک اکسی‌تتراسایکلین در ۲ ایستگاه حساس و در یک ایستگاه نیمه حساس بودند. این باکتری‌ها در ۲ ایستگاه نسبت به آنتی‌بیوتیک اریترومایسین مقاوم و فقط در یک ایستگاه نیمه حساس گزارش شد. در حالی که نسبت به آنتی‌بیوتیک استرپتومایسین در هر ۳ ایستگاه مقاوم بودند (مقیمی و همکاران، ۱۳۹۲). نتایج مطالعه مقیمی و همکارانش (۱۳۹۲) در مورد مقاومت باکتری‌ها با نتایج مطالعه حاضر مشابه است.

در مطالعه‌ای که Tendencia و De La Pena (۲۰۰۱) انجام دادند باکتری‌ها نسبت به استرپتومایسین و اریترومایسین مقاوم بودند. همچنین مشاهده شد که باکتری‌های *V. harveyi*، *V. alginolyticus* و *V. anguillarum* جداسازی شده از میگوهای بیمار، در برابر آنتی‌بیوتیک‌های آمپی‌سیلین،

کلروتتراسایکلین، اسپروفلوکساسین، اریترومایسین، جنتامایسین، نالیدیکسیک اسید، نیتروفورانشن، اکسی‌تتراسایکلین و ریفامپین مقاوم بودند (Tendencia and De La Pena, 2001). اما *Vibrio*های جداسازی شده در این مطالعه به استرپتومایسین، آمپی‌سیلین، اریترومایسین و اگزاسیلین مقاوم و تنها به اکسی‌تتراسایکلین نیمه حساس بوده‌اند.

اکسی‌تتراسایکلین با توجه به دسترسی آسان جزء پرمصرف‌ترین آنتی‌بیوتیک کاربردی در مراکز تکثیر و پرورش آبزیان است. مشکل عمده اکسی‌تتراسایکلین این است که باکتری‌های بیماری‌زا در صورت استفاده مستمر به راحتی در برابر آن مقاوم می‌شوند و این مقاومت را توسعه می‌دهند (Leano et al., 1998). همچنین اکسی‌تتراسایکلین می‌تواند مقاومت آنتی‌بیوتیکی را در بین باکتری‌های مختلف در مراکز و کارگاه‌های تکثیر و پرورش آبزیان رواج و افزایش دهد (Anderson et al., 1989).

Manjusha و همکارانش (۲۰۰۵) در مطالعه دیگر نشان دادند که سطح مقاومت در برابر آنتی‌بیوتیک‌ها در آب‌های شور مزارع پرورش آبزیان در نزدیکی سواحل کمتر از آب‌های مناطق ساحلی در نزدیکی شهرها است. آن‌ها اعلام کردند که این موضوع ممکن است به علت ورود روان آب‌های حاوی باکتری‌ها با پلاسمیدهای حامل ژن مقاومت در برابر آنتی‌بیوتیک از خشکی به دریا رخ داده باشد و با انتقال پلاسمیدی بین باکتری‌های خشکی‌زی و دریایی با پلاسمید، مقاومت نسبت به آنتی‌بیوتیک ایجاد می‌شود (Manjusha et al., 2005). بر این اساس مقاومت به آنتی‌بیوتیک‌های استرپتومایسین، آمپی‌سیلین، اریترومایسین و اگزاسیلین را می‌توان به انتقال پلاسمید از باکتری‌های خشکی به باکتری‌های دریایی مربوط دانست. زیرا این آنتی‌بیوتیک‌ها در موارد انسانی بسیار مورد استفاده قرار می‌گیرند و ممکن است که فاضلاب‌ها و آلاینده‌های با منشا انسانی وارد آب دریا شود.

همچنین نتایج نشان می‌دهد که بالاترین مقاومت نسبت به آنتی‌بیوتیک‌ها در برابر آموکسی‌سیلین، آمپی‌سیلین، کربنسیلین، سفوروکسیم، ریفامپین و استرپتومایسین است. این آنتی‌بیوتیک‌ها معمولا برای درمان جانداران خشکی‌زی مختلف و از جمله انسان استفاده می‌شود (Manjusha et al., 2005).

Hameed و همکارانش (۲۰۰۳) باکتری *V. mimicus* را از محیط جداسازی کردند که

در برابر آنتی‌بیوتیک‌های مورد مصرف انسانی مقاوم بود (Hameed et al., 2003).

در مطالعه افشارنسب و همکارانش (۱۳۹۰) که بر روی صدف‌های مرواریدساز لب‌سیاه انجام دادند باکتری‌های *V. harveyi*، *V. anguillarum* و *V. splendidus* جداسازی شد و مشخص شد که این باکتری‌ها نسبت به آنتی‌بیوتیک‌های نووبیوسین و باسیتراسین حساس و نسبت به آمپی‌سیلین مقاوم هستند که این نتایج مشابه با نتایج مطالعه حاضر است (افشارنسب و همکاران، ۱۳۹۰). در این مطالعه نیز مقاومت نسبت به آمپی‌سیلین مشاهده شد و باکتری‌ها نسبت به آنتی‌بیوتیک‌های نووبیوسین و باسیتراسین حساس بودند.

در این مطالعه اگرچه گونه بیماری‌زای *Vibrio* در محیط زندگی صدف‌ها مشاهده شد ولی این باکتری به تنهایی نمی‌تواند ایجاد بیماری کند و نیازمند یک عامل ایجاد کننده استرس در محیط است تا باکتری بتواند به صورت ثانویه ایجاد بیماری کند. البته در این مطالعه هیچ‌گونه مرگ و میری در صدف‌های مرواریدساز لب‌سیاه مشاهده نشد که به نظر می‌رسد باکتری‌ها تنها عامل ایجاد کننده استرس در مخازن پرورش صدفچه و مولد صدف نبودند. در مکان‌های مختلف در آبزی‌پروری‌ها از آنتی‌بیوتیک برای بقای موجودات استفاده می‌شود. ولی مقاومت باکتریایی باعث می‌شود که درمان بیماری‌ها با مشکل مواجه شود و پرورش‌دهندگان دچار زیان‌های اقتصادی شوند. به طور کلی در این بررسی ۴ گونه *Vibrio* یافت شد که برای درمان و استفاده آبزی‌پروران توصیه می‌شود از آنتی‌بیوتیک‌هایی مانند نووبیوسین استفاده کنند. زیرا این گونه‌ها نسبت به آنتی‌بیوتیک‌های نام برده حساس هستند و همچنین می‌توان از اکسی‌تتراسایکلین نیز استفاده کرد. با استفاده مناسب و صحیح از آنتی‌بیوتیک‌ها می‌توان عوامل باکتریایی مشاهده شده را مهار کرد.

با توجه به نتایج به دست آمده در مطالعه حاضر گونه غالب و بیماری‌زای صدف‌های مرواریدساز لب‌سیاه باکتری‌هایی از جنس *Vibrio* هستند و با استفاده از آنتی‌بیوتیک نووبیوسین و همچنین با رعایت کردن اصول بهداشتی و ایجاد محیطی استریل می‌توان از مرگ و میر این صدف‌ها جلوگیری کرد.

تشکر و قدردانی

نویسندگان این مقاله از تمامی کارکنان و جناب آقای مهندس غلامرضا ارگنجی ریاست

محترم ایستگاه تحقیقات نرم‌تنان خلیج فارس (بندرلنگه) و همچنین از آقای مهندس مرزوق دریایی‌لنگه به دلیل همکاری صمیمانه در اجرای این پژوهش کمال امتنان را دارند.

منابع

احتشامی ف.، ساوه درودی م. و بینایی م. ۱۳۷۳. تکثیر صدف لب‌سیاه و پرورش لارو حاصله تا مرحله آمبو. ایستگاه تحقیقات شیلاتی نرم‌تنان خلیج فارس. ۳۵ص.

افشارنسب م.، دشتیان‌نسب ع.، عابدیان آ. ۱۳۹۰. بررسی وضعیت سلامت و بیماری‌ها حوضچه‌های پرورش میگو و مزارع در ایران. گزارش نهایی پروژه. مرکز تحقیقات میگوی ایران، بوشهر. ۳۱ص.

درخشش ب.، یوسف‌زادی م.، افشارنسب م.، یگانه و. و دشتیان‌نسب ع. ۱۳۹۰. بررسی اثرات ضدباکتریایی جلبک‌های دریایی *Laurencia snyderiae* و *Sargassum angustifolium* علیه پاتوژن‌های انسانی. طب جنوب، ۱۴(۱): ۲۲-۱۷.

مقیمی ا.، افشارنسب م.، دشتیان‌نسب ع.، مصباح م. و یگانه و. ۱۳۹۲. بررسی مقاومت آنتی‌بیوتیکی باکتری‌های بیماری‌زای جداسازی شده از مراکز تکثیر میگو در استان بوشهر. طب جنوب، ۱۶(۶): ۴۷۸-۴۶۷.

Anderson I.G., Shamsudin M.N. and Nash G. 1989. A preliminary study on the aerobic heterotrophic bacterial flora in giant freshwater prawn, *Macrobrachium rosenbergii*, hatcheries in Malaysia. Aquaculture, 81: 213–223.

Bower S.M. 1992. Diseases of cultured Japanese scallops (*Patinopecten yessoensis*) in British Columbia, Canada. Aquaculture, 107: 201–210.

Brock J. and Lightner D.V. 1990. diseases of crustacean. P: 245–349. In: Kinne O. (Ed.). Diseases of Marine Animals. Anstalt Helgoland, Hamburg.

Brunton L.L., Lazo J.S. and Parker K.L. 2005. Goodman and Gilman's the Pharmacological Basis of Therapeutics. McGraw-Hill, USA. 579P.

Hameed A.S., Rahaman K.H., Alagan A. and Yoganandhan K. 2003. Antibiotic resistance in bacteria isolated from hatchery reared larvae and post larvae of *Macrobrachium rosenbergii*. Aquaculture, 217: 39–48.

Ishimaru K., Akarawa M. and Muroga K. 1995. *Vibrio penaeicida*. A pathogen of kuruma prawns (*Penaeus japonicus*). International Bulletin of Bacteriological Nomenclature and Taxonomy, 45(1): 134–138.

James P.S.B.R. 2002. Pearl Oyster Farming and Pearl Culture Training Manual 8. Network of Aquaculture Centers in Asia Pacific. 103P.

Lammert J.M. 2006. Techniques in Microbiology: A Student Handbook. Pearson, USA. 226P.

Le T.X., Munekage Y. and Kato S. 2006. Antibiotic resistance in bacteria from shrimp farming in mangrove areas. Science of the Total Environment, 349: 95–105.

Leano E.M., Inglis V.B.M. and Macrae I.H. 1998. Resistance to antibiotics of *Vibrio* spp. and *Aeromonas* spp. isolated from fish and shrimp tissues and rearing water in Panay Island, Philippines. UPV Journal of Natural Science, 3(1): 1–8.

Lightner D.V. 1988. Diseases of cultured penaeid shrimp and prawns. P: 8–127. In: Sindermann C.J. and Lightner D.V. (Eds.). Disease Diagnosis and Control in North American Marine Aquaculture. Elsevier, USA.

Lightner D.V. 1996. Handbook of Shrimp Pathology and Diagnostic Procedures for Diseases of Cultured Penaeid Shrimp. World Aquaculture Society, USA. 127P.

Manjusha S., Sarita G.B., Elyas K.K. and Chandrasekaran M. 2005. Multiple antibiotic resistances of *Vibrio* isolates from coastal and brackish water areas. American Journal of Biochemistry and Biotechnology, 1(4): 193–198.

Melba G.B., Sharon E.M. and Franck C.J. 2007. Pearl Oyster Health Management. A Manual. Food and Agriculture Organization of the United Nation, Rome. 120P.

Minaur J. 1969. Experiments on the artificial rearing of the larvae of *Pinctada maxima* (Jameson) (Lamellibranchia). Marine and Freshwater Research, 20(2): 175–187.

OIE. 2008. Manual for Diagnostic and Laboratory Standard. OIE Publication, France. 140P.

Paillard C.H., Roux F.L. and Borrego J.J. 2004. Bacterial disease in marine bivalves, a review of recent studies: Trends and evolution. Aquatic Living Resources, 17(4): 477–498.

Pass D.A., Dybdal R. and Mannion M.M. 1987. Investigations into the causes of mortality of the pearl oyster, *Pinctada maxima* (Jamson), in Western Australia. Aquaculture, 65(2): 149–169.

Perkins F.O. 1998. Shell disease in the gold lip pearl oyster, *Pinctata maxima* and the European oyster, *Grassoctera virginica*. Aquatic Living Resources, 9: 155–163.

Satish S., Raghavendra M. and Raveesha K. 2008. Evaluation of the antibacterial potential of some plants against human pathogenic bacteria. Advances in Biological Research, 2: 44–48.

Sindermann C.J. 1990. Diseases of Marine Shellfish. Principal Diseases of Marine Fish and

Shellfish. Academic Press, USA. 521P.

Tendencia E.A. and De La Pena L.D. 2001. Antibiotic resistance of bacteria from shrimp ponds. Aquaculture, 195: 193–204.

Watts J.L., Shryock T.R. and Apley M. 2008. Performance standards for antimicrobial disk and dilution susceptibility tests for bacteria isolated from animals, approved standard. NCCLS, 222: 103–107.

Aquatic Physiology and Biotechnology
Vol. 6, No. 3, Autumn 2018

Isolation and identification of *Vibrio* bacteria in the black-lip pearl oyster and their sensitivity and resistance to antibiotics in the West Persian Gulf

Mehdi Shahmoradi[1]*, Mohammad Mehdi Motaghi[2], Hossein Rameshi[3], Mohammad Hassan Tadayon[4]

Received: October 2017 Accepted: February 2018

Abstract

The black-lip pearl oyster, *Pinctada margaritifera*, is one of the important species of Mollusca which has been cultured to produce pearl. Mortality occurs in all stage of black-lip pearl rearing, but few studies have been conducted on this issue. The aim of this study is to investigate the pathogens of black-lip pearl oyster rearing site on Lengeh Port and also determine bacterial resistance and antibiotic sensitivity of the identified bacteria. Fresh samples were used for bacterial analysis. The bacterial analysis was done according to biochemical methods and bacterial Gram staining and using TSA and TCBS culture medium. Bacterial isolates were studied using Mueller Hinton Agar medium for the investigation of the resistance and antibiotic sensitivity of bacteria. Four different species of the genus *Vibrio* bacteria were found that *Vibrio harveyi*, *Vibrio alginolyticus*, *Vibrio splendidus*, *Vibrio anguillarum* were in the gills of black-lip oyster. Bacteria were resistant to ampicillin, erythromycin, streptomycin and oxacillin, sensitive to novobiocin, and intermediate to oxytetracycline.

Key words: *Black-lip Oyster*, *Broodstock Oyster*, Vibrio *Bacteria*, *Novobiocin*.

1- M.Sc. in Microbiology, Department of Microbiology, Faculty of Sciences, Kerman Branch, Islamic Azad University, Kerman, Iran.
2- Assistant Professor, Department of Microbiology, Faculty of Sciences, Kerman Branch, Islamic Azad University, Kerman, Iran.
3- M.Sc. in Fisheries, Department of Fisheries, Faculty of Natural Resources, Bandar Abbas Branch, Islamic Azad University, Bandar Abbas, Iran.
4- Scientific Member in Department of Microbiology, Faculty of Sciences, Kerman Branch, Islamic Azad University, Kerman, Iran.
*Corresponding Author: Mehdishahmoradi68@yahoo.com