مجله تحقیقات دامپزشکی، ۱۳۸۶، دوره ۶۲، شماره ۵، ۳۱۰-۳۰۷

بررسی گونه‌های ویبریو در میگوهای پرورشی (*Paeneus indicus*) و دریایی (*Paeneus semisulcatus*) صید شده در استان بوشهر

افشین آخوندزاده بستی[۱]* حسینعلی ابراهیم زاده موسوی[۲] علی میثاقی[۱] مهدی سلطانی[۲] حسین اسماعیلی[۳]

۱) گروه بهداشت و کنترل مواد غذایی دانشکده دامپزشکی دانشگاه تهران - ایران.
۲) گروه بهداشت و بیماریهای آبزیان دانشکده دامپزشکی دانشگاه تهران - ایران.
۳) دانشجو دکترای عمومی دانشکده دامپزشکی دانشگاه تهران - ایران.

(دریافت مقاله: ۱۲ مهرماه ۱۳۸۴، پذیرش نهایی: ۱ اردیبهشت ماه ۱۳۸۵)

چکیده

در این مطالعه گونه‌های ویبریو در مراحل مختلف پرورش (پرورش لارو و پرورش میگو) و عرضه در بازار میگو پرورشی (*Paeneus indicus*)، آب ورسوبات محل پرورش آن و در میگوی دریایی (*Paeneus semisulcatus*) عرضه‌شده در بازار فروش در استان بوشهر، بر طبق روش استاندارد جستجوی گونه‌های ویبریو در مواد غذایی ارایه شده توسط انجمن بهداشت عمومی آمریکا، مورد آزمایش قرار گرفتند. گونه‌های ویبریو شناسایی شده، ویبریو آلجینولیتیکوس، ویبریو پاراهمولیتیکوس (کاناگاوا مثبت) و ویبریو فلوویالیس بودند. نتایج بدست آمده و جداسازی هرچند اندک سویه ویبریو پاراهمولیتیکوس کاناگاوا مثبت از اکوسیستم آب محل پرورش میگو در این بررسی، احتمال خطر انسانی حاصل از مصرف فرآورده‌های خام، نیمه پخته و یا خوب سرخ نشده میگو را نمایان می‌سازد. بنابراین توجه به رعایت اصول بهداشتی بعد از صید یعنی شتسشو میگو با آب شیرین حاوی ۷ppm-۲ کلر، منجمد کردن محصول در ۴۰- درجه سانتیگراد و پخت کافی محصول مهم می‌باشد.

واژه‌های کلیدی: میگو پرورشی و دریایی، گونه‌های ویبریو، استان بوشهر.

مقدمه

میگو یکی از مهمترین محصولات شیلاتی استانهای واقع در خلیج فارس می‌باشد. پرورش و صید میگو یک رکن اقتصادی و اشتغال زای مهم در این استان‌ها به شمار آمده و بخش قابل توجهی از این محصول به دیگر کشورها به خصوص کشورهای اتحادیه اروپا صادر می‌شود. رعایت و اجرای اصول صحیح بهداشتی کارخانجات و صنایع شیلاتی در سالهای اخیر موجب برقراری و اخذ گواهینامه بین المللی HACCP (Hazard Analysis at Critical Control Point) در تولید شده است (۵). با این وجود، فرآوردهای دریایی ممکن است ناقلی برای بیشتر باکتری‌های بیماریزا باشند (۶). باکتری‌های جنس ویبریو (*Vibrio*) ساکنین اکوسیستم‌های آبی دریایی، خلیج‌ها و آبهای محل پرورش میگو و ماهی است و جداسازی آن از مزارع پرورش میگو و ماهی نشانه‌ای از احتمال تبخیر آب و افزایش میزان درصد نمک آب و ایجاد شراط رشدی مناسب برای این جنس می‌باشد (۱،۴). تعدادی از گونه‌های ویبریو جزء فلور طبیعی ماهی و میگو هستند (۴). در بین بیش از ۲۰ گونه بیماریزای شناخته شده برای انسان، ویبریو کلرا (*V. cholerae*)، ویبریو پاراهمولیتیکوس (*V. parahaemolyticus*) و ویبریوولنیفیکوس (*V. vulnificus*) از اهمیت بیشتری برخوردارند (۴). بسته به گونه‌های درگیر در بیماری بروز علائم بالینی از گاستروآنتریت گرفته تا سپتی سمی و عفونت‌های زخم متفاوت می‌باشد (۱۰). در این مطالعه گونه‌های ویبریو در مراحل مختلف پرورش و عرضه در بازار میگو پرورشی و آب ورسوبات محل پرورش آن و در میگوی دریایی عرضه شده در بازار فروش در استان بوشهر (یکی از استانهای مهم در امر پرورش و صید میگو درخلیج فارس) مورد بررسی قرار گرفتند.

مواد و روش کار

نمونه‌های میگو پرورشی (*Paeneus indicus*) (هرکدام حداقل به میزان ۲۵ گرم) طی مراحل مختلف پرورش لارو، پرورش میگو و عرضه شدن در بازار فروش در طی چهار ماه متوالی خرداد تا شهریور ۱۳۸۴ در استان بوشهر جمع آوری شدند. این نمونه‌ها شامل دو نمونه (پنج تایی) از مرحله پرورش لارو (مشتمل بر لارو و آب) (A_1 and A_2) از دو استخر پرورش لارو (hatchery pond) (یعنی از هر استخر هم زمان پنج نمونه بطور تصادفی برداشته شد)، ۱۴ نمونه (پنج تایی) میگو از ۱۴ استخر پرورش میگو (Rearing farm) که لاروهای آن از دو استخر پرورش لارو مورد مطالعه در این بررسی تأمین شده بود (یک ماه بعد از ریختن لارو) (B_1-B_{14})، ۱۴ نمونه (پنج تایی) میگو (سه ماه بعد از ریختن لارو درست قبل از صید برای بازار فروش) (C_1-C_{14}) و ۱۴ نمونه (پنج تایی) میگو بلافاصله بعد از صید و جمع آوری شده از سطح بازار فروش بود (D_1-D_{14}). از آب ۱۴ استخر مورد مطالعه نیز هم زمان یعنی طی یک ماه (E_1-E_{14}) و سه ماه بعد از ریختن لارو (F_1-F_{14}) و همچنین ازرسوبات استخرهای مورد مطالعه طی یک ماه (G_1-G_{14}) و سه ماه بعد از ریختن لارو (H_1-H_{14}) نمونه گرفته شد (نمونه گیری با تکرار پنج تایی، یعنی از هر استخر پنج نمونه آب و پنج نمونه رسوب هرکدام حداقل به میزان ۲۵ گرم، هم زمان بطور تصادفی بود). دوازده نمونه میگو دریایی خلیج فارس (*Paeneus semisulcatus*) (هرکدام حداقل به میزان ۲۵ گرم) (I_1-I_{14}) نیز از سطح بازار فروش

*) نویسنده مسؤول: تلفن: ۶۱۱۱۷۰۴۷-۰۲۱ نمابر: ۶۶۹۳۳۲۲۲-۰۲۱ Email:aakhond@ut.ac.ir

جدول ۱- تفریق گونه‌های اصلی بیماریزای روده‌ای جنس ویبریو از یکدیگر و از گونه‌های غیر بیماریزای روده‌ای.

آزمایش	ویبریو آلجینولیتیکوس[1]	ویبری کلرا	ویبریوپاراهمولیتیکوس	ویبریومیمیکوس[2]	ویبریو فلوویالیس[3]	ویبریوولنیفیکوس
اکسیداز	+	+	+	+	+	+
لیزین دکربوکسیلاز	+	+	+	+	-	+
ارنیتین دکربکسیلاز	+	+	+	+	-	+
وژپروسکار	+	+/-	-	-	-	+
تخمیر لاکتوز	-	-	-	-	-	+
تخمیر سوکروز	+	+	-	-	+	-
تخمیر مانیتول	+	+	+	+	+	+/-
تخمیر آرابینوز	-	-	+	-	+	-
رشد در آبگوشت حاوی صفر درصد نمک	-	-	-	-	-	-
رشد در آبگوشت حاوی ۶ درصد نمک	+	-	+	-	+	+
رشد در آبگوشت حاوی ۸ درصد نمک	+	-	+	-	+	-
رشد در ۴۳ درجه سانتیگراد	+	+	+	+	+/-	+
حساسیت به ویبریواستات۴ (دیسک ۱۰ میکروگرم)	-	+	-	+	+	+
حساسیت به ویبریواستات (دیسک ۱۵۰ میکروگرم)	+	+	+	+	+	+

۱- *V. alginolyticus* ۲- *V. mimicus* ۳- *V. fluvialis* ۴- (vibriostat; 0/129, 2,4-diamino-6-7-diisopropylpteridine phosphate, Sigma).

تهیه شد.

کلیه نمونه‌ها در دانشکده دامپزشکی تهران بر طبق روش استاندارد جستجو گونه‌های ویبریو در مواد غذایی ارایه شده توسط انجمن بهداشت عمومی آمریکا (American Public Health Association) مورد آزمایش قرار گرفتند(۲). بدین ترتیب که ۲۵ گرم از هریک از نمونه‌ها در کیسه‌های پلاستیکی استریل استوماکر (400 W, Interscience company Stomaker; BagMixer) حاوی ۲۲۵ میلی لیتر آب پپتونه قلیایی (QELAB alkaline peptone water; (حاوی ۱درصد نمک طعام و pH=۸/۶) یکنواخت شدند و در ۳۷ درجه سانتیگراد به مدت ۸ تا ۹ ساعت قرار گرفتند. بعد از غنی کردن اولیه، از هریک از این کشت‌ها بوسیله آنس بر روی محیط کشت انتخابی ویبریوها یعنی تیوسولفات سیترات بایل سالت سوکروز آگار (Thiosulfate citrate bile salt sucrose agar; TCBS, Merck) کشت خطی داده شد و در ۳۷ درجه سانتیگرد به مدت ۲۴ ساعت نگهداری شدند. بر روی کلپه پرگنه‌های مشکوک سبز و زرد رنگ در روی محیط TCBS، آزمایش‌های تأییدی مطابق جدول۱ انجام شد. وآزمایش پدیده گاناگاوا (Kanagawa phenomenon) بر روی ویبریو پاراهمولیتیکوس‌های جدا شده و کشت داده شده (۱۶ تا ۱۸ ساعت در ۳۵ درجه سانتیگراد) در آبگوشت سویای حاوی ۳ درصد کلرید سدیم (Soy Broth; Merck + %3 NaCl Triptic) انجام شد (۲،۱۱).

با استفاده از نرم افزار آماری SPSS (SPSS 11, for Windows) و انجام آزمون مربع کای (Chi-square test) نتایج بدست آمده مورد بررسی آماری قرار گرفتند.

نتایج

همانگونه که در جدول ۲ نشان داده شده، گونه‌های ویبریو شناسایی شده، ویبریو آلجینولیتیکوس، ویبریوپاراهمولیتیکوس و ویبریوفلوویالیس بودند. آزمون مربع کای نشان داد که اختلاف معنی‌دار (p<۰/۰۵) در بین گروه‌های مورد مطالعه از نظر وجود ویبریو آلجینولیتیکوس و ویبریو فلوویالیس وجود داشت ولی این اختلاف در مورد ویبریوپاراهمولیتیکوس معنی‌دار (p>۰/۰۵) نبود.

ویبریو آلجینولیتیکوس از (۲/۲) ۱۰۰درصد نمونه‌های گرفته شده از دو استخر پرورش لارو، (۱۳/۱۴) ۹۲/۸درصد نمونه‌های میگو از ۱۴ استخر پرورش میگو (یک ماه بعد از ریختن لارو)، (۱۳/۱۴) ۹۲/۸درصد نمونه‌های میگو از ۱۴ استخر پرورش میگو (سه ماه بعد از ریختن لارو درست قبل از صید برای بازار فروش)، (۱۱/۱۴) ۷۸/۵درصد ن مونه‌های میگو از ۱۴ استخر پرورش میگو جمع‌آوری شده از سطح بازار فروش، (۱۴/۱۴) ۱۰۰درصد نمونه‌های آب از ۱۴ استخر پرورش میگو (یک ماه بعد از ریختن لارو)، (۱۴/۱۴) ۱۰۰درصد نمونه‌های آب از ۱۴ استخر پرورش میگو (سه ماه بعد از ریختن لارو)، (۴/۱۴) ۲۸/۶درصد نمونه‌های رسوب از ۱۴ استخر پرورش میگو (یک ماه بعد از ریختن لارو)، (۶/۱۴) ۴۲/۸درصد نمونه‌های رسوب از ۱۴ استخر پرورش میگو (سه ماه بعد از ریختن لارو) و (۱۰/۱۲) ۸۳/۳درصد نمونه‌های میگو دریایی خلیج فارس جمع‌آوری شده از سطح بازار فروش، جدا شد.

ویبریو پاراهمولیتیکوس از، (۵/۱۴) ۳۵/۷درصد نمونه‌های میگو از ۱۴ استخر پرورش میگو (یک ماه بعد از ریختن لارو)، (۲/۱۴) ۱۴/۳درصد

جدول ۲- گونه‌های ویبریو شناسایی شده در نمونه‌های مورد مطالعه.

گونه‌های ویبریو	نمونه (گروهها و تعداد در هر گروه)									آزمون مربع کای
	A (۲)	*B* (۱۴)	*C* (۱۴)	*D* (۱۴)	*E* (۱۴)	*F* (۱۴)	*G* (۱۴)	*H* (۱۴)	*I* (۱۴)	(p value)
ویبریوآلجینولیتیکوس	۲	۱۳	۱۳	۱۱	۱۴	۱۴	۴	۶	۱۰	۰/۰
ویبریوپاراهمولیتیکوس	۰	۵	۲	۵	۴	۶	۱۱	۰	۳	۰/۱
ویبریوفلوویالیس	۲	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰/۰

۱- یک مورد گاناگاوا مثبت

نمونه‌های میگو از ۱۴ استخر پرورش میگو (سه ماه بعد از ریختن لارو درست قبل از صید برای بازار فروش)، (۵/۱۴) ۳۵/۷درصد نمونه‌های میگو از ۱۴ استخر پرورش میگو جمع آوری شده از سطح بازار فروش، (۳/۱۴) ۲۱/۴درصد نمونه‌های آب از ۱۴ استخر پرورش میگو (یک ماه بعد از ریختن لارو)، (۶/۱۴) ۴۲/۸درصد نمونه‌های آب از ۱۴ استخر پرورش میگو (سه ماه بعد از ریختن لارو) (یک نمونه از این شش نمونه کاناگاوا مثبت بود)، (۱/۱۴) ۷/۱درصد نمونه‌های رسوب از ۱۴ استخر پرورش میگو (یک ماه بعد از ریختن لارو) و (۳/۱۲) ۱۲درصد نمونه‌های میگو دریایی خلیج فارس جمع آوری شده از سطح بازار فروش جدا شد ولی از نمونه‌های گرفته شده از دو استخر پرورش لارو و نمونه‌های رسوب از ۱۴ استخر پرورش میگو (سه ماه بعد از ریختن لارو) نشد.

ویبریوفلوویالیس فقط از دو نمونه (مشتمل بر لارو و آب) گرفته شده از دو استخر پرورش لارو (۱۰۰درصد) جدا شد.

قابل ذکر است که ویبریو کلرا از هیچ یک از نمونه‌های مورد مطالعه جدا نشد و گونه‌های غیر قابل تشخیص (ویبریو) بوسیله روشهای مورد استفاده در این بررسی، در کلیه نمونه‌های مورد مطالعه جدا شدند.

بحث

ویبریوها بخش قابل توجهی از میکروفلور طبیعی اکوسیستم آبهای لب شور و استخرهای پرورش میگو و ماهی را به خود اختصاص داده‌اند(۴). در برخی از کشورها از جمله کشورهای آسیایی گونه‌های ویبریو ۸۱-۳۸ درصد از این میکروفلور طبیعی را در بر می‌گیرند(۴).

امکان جداسازی گونه‌های مختلف جنس ویبریو در این تحقیق با توجه به فصل مطالعه و گرمای هوا و بنابراین تبخیر بیشتر آب و افزایش میزان شوری و در نتیجه ایجاد شرایط رشدی مناسبتر برای این جنس از باکتری‌ها قابل توضیح می‌باشد. این مطلب در گزارش‌ها و نتایج محققین دیگر هم آورده شده است(۱،۴،۱۲).

نتایج جداسازی ویبریو آلجینولیتیکوس و ویبریو پاراهمولیتیکوس از آب و رسوبات محل پرورش و خود میگو (در مراحل مختلف رشد) در این مطالعه، با نتایج بدست آمده توسط Gopal و همکاران درسال ۲۰۰۵(۴) و Sharmila و همکاران درسال ۱۹۹۶ (۹) هم خوانی داشت. فراوانی حضور ویبریو آلجینولیتیکوس و ویبریو پاراهمولیتیکوس بوسیله اهمیت نقش آنها در تجزیه مازاد غذای باقی مانده در استخرها، پوسته‌های میگو (exuviae shrimp) و غیره توضیح داده شده که تأییدی بر نقش مهم خانواده ویبریوناسه (Vibrionaceae) در چرخه دوباره موادکربن‌دار غیر قابل حل بویژه کیتین (chitin) می‌باشد(۴).

فراوانی گونه‌های غیرقابل تشخیص (unspeciated) ویبریو در آب، رسوبات و میگوی مورد مطالعه در این بررسی، کارآیی ناکامل روش‌های بیوشیمیایی متداول و مورد استفاده در این تحقیق را نیز بیان نموده و لزوم بکارگیری روش‌های مولکولی جهت تشخیص و تعیین گونه و حدت گونه‌ها (به ویژه در مطالعات همه‌گیرشناسی) را آشکار می‌سازد (۴).

ویبریو پاراهمولیتیکوس یک ارگانیسم مورد توجه در پرورش میگو نه تنها از جنبه ایجاد بیماری در میگو توسط بعضی از سویه‌های آن(۱۲) بلکه همچنین از نظر بیماریزا بودن برای انسان و ایجاد گاستروآنتریت توسط برخی از سویه‌های آن می‌باشد(۴). آزمایش‌های گسترده بر روی مدل‌های حیوانی بیان می‌دارد که همولیزین کاناگاوا فاکتور حدت اولیه در بیماریزایی ویبریو پاراهمولیتیکوس به حساب می‌آید. این مسئله بخوبی ثابت شده که سویه‌های ویبریو پاراهمولیتیکوس که سبب بیماری در انسان می‌شوند تقریباً همیشه گاناگاوا مثبت می‌باشند(۲). البته بررسی‌های مولکولی نشان داده که اغلب سویه‌های ویبریو پاراهمولیتیکوس مسبب بیماری در انسان دارای یک همولیزین مستقیم مقاوم به حرارت (direct haemolysin, TDH thermostable direct haemolysin thermostable) و یا یک TDH - مربوط به همولیزین (TDH-related haemolysin, TRH) می‌باشند (۳،۱۱). در بررسی‌های انجام شده، TRH از سویه‌های ویبریو پاراهمولیتیکوس کاناگاوا منفی جدا شده است(۱۱). بنابراین همان‌گونه که قبلاً هم ذکر شد روشهای ملکولی به ویژه در مطالعات همه‌گیرشناسی لازم می‌باشد (۴،۷،۸).

نتایج بدست آمده و جداسازی هرچند اندک سویه ویبریو پاراهمولیتیکوس کاناگاوا مثبت از اکوسیستم آب محل پرورش میگو در این بررسی، احتمال خطر انسانی حاصل از مصرف فرآورده‌های خام، نیمه پخته ویا خوب سرخ نشده میگو را نمایان می‌سازد. بنابراین توجه به رعایت اصول بهداشتی بعد از صید یعنی شتشو میگو با آب شیرین حاوی ۷ppm-۲ کلر، منجمد کردن محصول در ۴۰- درجه سانتیگراد و پخت کافی محصول مهم می‌باشد (۴،۵).

تشکر و قدردانی

با تشکر و قدردانی از معاونت محترم پژوهشی دانشگاه تهران و معاونت محترم پژوهشی دانشکده دامپزشکی تهران به منظور تأمین هزینه انجام این تحقیق، همکاری صمیمانه گروه میکروبیولوژی دانشکده دامپزشکی دانشگاه تهران و جناب آقای محمد علی حیدری جهت همکاری در تهیه نمونه.

References

1. Basti, A.A., Misaghi, A., Zahraei Salehi, T., Kamkar, A. (2006) Bacterial pathogens in fresh, smoked and salted Iranian fish. Food Control. 17: 183-188.
2. APH,A.(1997) Compendium of methods for the Microbiological Examination, 3rdEd. M. L. Speak. American Public Health Association, Washington.
3. DePaola, A., Ulaszek, J., Kaysner, C.A., Tnge, B.J. Nordstrom, J.L., Wells, J., Puhr, N. and Gendel, S.M. (2003) Molecular, serological, and virulence characteristics of Vibrio parahaemolyticus isolated from environmental, food, and clinical sources in North America and Asia. Appl. Environ. Microbiol. 69: 3999-4005.
4. Gopal, S., Otta, S.K., Kumar, S., Karunasagar, I., Nishibuchi, M. and Karunasagar, I. (2005) The occurrence of Vibrio species in tropical shrimp culture environments; implication for food sfety. Int. J. Food Microbiol. 102: 151-159.
5. Hosseini, H., Cherahali, A.M., Yalfani, R., Razavilar, V. (2004) Incidence of Vibrio spp. In shrimp caught off the south coast of Iran. Food Control. 15: 187-190.
6. Huss, H.H. (1997) Control of indigenous pathogenic bacteria in seafood. Food Control. 8: 91-98.
7. Karunasagar, I., Sugumar, G., Karunasagar, R.I., Reilly, P.J.K. (1996) Rapid polymerase chain reaction method for Kanagava positive V. parahaemolyticus in seafoods. Inte. J. Food Microbio. 31: 317-323.
8. Lee, C., Pan, S.F., Chen, C.H. (1993) Rapid and specific detection of thermostable direct hemolysin in Vibrio parahaemolyticus by polymerase chain reaction. J. General Microbiol. 139: 3225-3231.
9. Sharmila, R., Abraham, T.J., Sundararaji, V. (1996) Bacterioflora of semi intensive pond reared Penaeus indicus (H. Milne Edward) and the environment. J. Aqua. Tropics. 11: 193-203.
10. Uusarac, O., Carter, E. (2004) Varied clinical presentations of Vibrio vulnificus infections: a report of four unusual cases and review of the literature. South East Asian Med. J. 97: 163-168.
11. Varnam, A.H., Evans, M. G. (1991) Foodborne Pathogens. Wolf Science Book. The Netherlands, pp. 174-177.
12. Vaseeharan, B., Ramasamy, P. (2003) Abundance of potentially pathogenic microorganism in Penaeus monodon larvae rearing systems. India Microbiol. Res. 158: 299-308.

J.Vet.Res. 62,5:307-310,2007

THE STUDY OF VIBRIO SPP. IN CULTIVATED (*PAENEUS INDICUS*) AND MARINE (*PAENEUS SEMISULCATUS*) SHRIMP OBTAINED FROM BOUSHEHR A SOUTHERN PROVINCE OF IRAN

Akhondzadeh Basti, A.[1]*, Ebrahimzadeh Mousavi, H.A.[2], Misaghi, A.[1], Soltani,M.[2], Esmaeili, H.[1]

[1]*Department of Food Hygiene, Faculty of Veterinary Medicine, University of Tehran, Tehran-Iran.*

[2]*Department of Auatic Animal Health, Faculty of Veterinary Medicine, University of Tehran, Tehran-Iran.*

(Received 4 October 2005 , Accepted 21 April 2006)

Abstract:

In this study, samples of farm shrimp species *Paeneus indicus* obtained from different stages of hatchery and rearing period and subsequent marketing, water and sediments of rearing farms and marine shrimp species *Paeneus semisulcatus* were analysed for Vibrio spp. according to the methods described by American Public Health Association. The identified *Vibrio* species were *Vibrio alginolyticus*, *V. parahaemolyticus* (Kanagawa positive) and *V. fluvialis*. The results and detection of *V. parahaemolyticus* Kanagawa positive (even in low proportion) in this study suggest a probable risk for health of people consuming raw or under cooked shrimp. Therefore it is recommended to pay attention to post harvest handling e.g. washing the shrimp with fresh water containing 2-7 ppm chlorine and freezing at -40 $^{\circ}$C and adequate cooking to safeguard public health.

Key words: cultivated and marine shrimp, *Vibrio* spp., Iran.

***Corresponding author's email: aakhond@ut.ac.ir, Tel: 021- 61117047, Fax: 021-66933222**