

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*) عرضه شده 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 آلیجینولیتیکوس، ویبریو پاراهمولیتیکوس (کاناگاوا مثبت) و ویبریو فلورولیتیکوس بودند. نتایج بدست آمده و جداسازی هر چند 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 شستشو میگو با آب شلرین حاوی ۲-۷ppm کلر، منجمد کردن محصول در ۴۰- درجه سانتیگراد و پخت کافی محصول مهم می‌باشد.

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

(یکی از استانهای مهم در امر پرورش و صید میگو در خلیج فارس) مورد بررسی قرار گرفتند.

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 (at Critical Control Point Hazard Analysis) در تولید شده است (۵). با این وجود، فرآورده‌های 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 شرایط رشدی مناسب برای این جنس می‌باشد (۱۰۴). 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 ویبریو لیتیفیکوس (*V. vulnificus*) از اهمیت بیشتری برخوردارند (۴). بسته به گونه‌های درگیر در بیماری بروز علائم بالینی از گاستروانتریت 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

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 خریدار تا شهر یور ۱۳۸۴ در استان بوشهر جمع آوری شدند. این نمونه‌ها شامل دو نمونه (پنج تایی) از مرحله پرورش لارو (مشمتمل بر لارو و آب) (A_1 and A_2) از دو استخر پرورش لارو (pond hatchery) (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 در دست 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 از رسوبات 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 (*semisulcatus*) (هرکدام حداقل به میزان ۲۵ گرم) (I_1-I_{14}) نیز از سطح بازار فروش



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

آزمایش	ویبریوزا آلیجینولیتیکوس ^۱	ویبری کلرا	ویبریوزا پاراهمولیتیکوس	ویبریوزا میمیکوس ^۲	ویبریوزا فلووویالیس ^۳	ویبریوزا ولنتیفیکوس
اکسیداز	+	+	+	+	+	+
لیزین دکربوکسیلاز	+	+	+	+	-	+
ارنیتین دکربوکسیلاز	+	+	+	+	-	+
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 ویبریوزا استات ۴ (دیسک ۱۰ میکرو گرم)	-	+	-	+	+	+
حساسیت به ویبریوزا استات (دیسک ۱۵۰ میکرو گرم)	+	+	+	+	+	+

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

تهیه شد.

نتایج

همانگونه که در جدول ۲ نشان داده شده، گونه‌های ویبریوزا شناسایی شده، ویبریوزا آلیجینولیتیکوس، ویبریوزا پاراهمولیتیکوس و ویبریوزا فلووویالیس بودند. آزمون مربع کای نشان داد که اختلاف معنی دار ($p < 0/05$) در بین گروه‌های مورد مطالعه از نظر وجود ویبریوزا آلیجینولیتیکوس و ویبریوزا فلووویالیس وجود داشت ولی این اختلاف در مورد ویبریوزا پاراهمولیتیکوس معنی دار ($p > 0/05$) نبود.

ویبریوزا آلیجینولیتیکوس از ۲/۲ (۱۰۰ درصد) نمونه‌های گرفته شده از دو استخر پرورش لارو، ۱۳/۱۴ (۹۲/۸ درصد) نمونه‌های میگو از ۱۴ استخر پرورش میگو (یک ماه بعد از ریختن لارو)، ۱۳/۱۴ (۹۲/۸ درصد) نمونه‌های میگو از ۱۴ استخر پرورش میگو (سه ماه بعد از ریختن لارو) درست قبل از صید برای بازار فروش، ۱۱/۱۴ (۷۸/۵ درصد) نمونه‌های میگو از ۱۴ استخر پرورش میگو جمع‌آوری شده از سطح بازار فروش، ۱۴/۱۴ (۱۰۰ درصد) نمونه‌های آب از ۱۴ استخر پرورش میگو (یک ماه بعد از ریختن لارو)، ۱۴/۱۴ (۱۰۰ درصد) نمونه‌های آب از ۱۴ استخر پرورش میگو (سه ماه بعد از ریختن لارو)، ۴/۱۴ (۲۸/۶ درصد) نمونه‌های رسوب از ۱۴ استخر پرورش میگو (یک ماه بعد از ریختن لارو)، ۶/۱۴ (۴۲/۸ درصد) نمونه‌های رسوب از ۱۴ استخر پرورش میگو (سه ماه بعد از ریختن لارو) و ۱۰/۱۲ (۸۳/۳ درصد) نمونه‌های میگو دریایی خلیج فارس جمع‌آوری شده از سطح بازار فروش، جدا شد. ویبریوزا پاراهمولیتیکوس از ۵/۱۴ (۳۵/۷ درصد) نمونه‌های میگو از ۱۴ استخر پرورش میگو (یک ماه بعد از ریختن لارو)، ۲/۱۴ (۱۴/۳ درصد)

کلیه نمونه‌ها در دانشکده دامپزشکی تهران بر طبق روش استاندارد جستجو گونه‌های ویبریوزا مواد غذایی ارایه شده توسط انجمن بهداشت عمومی آمریکا (American Public Health Association) مورد آزمایش قرار گرفتند (۲). بدین ترتیب که ۲۵ گرم از هر یک از نمونه‌ها در کیسه‌های پلاستیکی استریل استوماکر (400 W, Interscience company Stomaker; BagMixer) حاوی ۲۲۵ میلی لیتر آب پیتونه قلیایی (QELAB alkaline peptone water; (حاوی ۱ درصد نمک طعام و $pH = 8/6$) یکنواخت شدند و در ۳۷ درجه سانتیگراد به مدت ۸ تا ۹ ساعت قرار گرفتند. بعد از غنی کردن اولیه، از هر یک از این کشت‌ها بوسیله آنس بر روی محیط کشت انتخابی ویبریوزا یعنی تیوسولفات سیترات بایل سالت سوکروز آگار (Thiosulfate citrate bile salt sucrose agar; TCBS, Merck) کشت خطی داده شد و در ۳۷ درجه سانتیگراد به مدت ۲۴ ساعت نگهداری شدند. بر روی کلیه پرگنه‌های مشکوک سبز و زرد رنگ در روی محیط TCBS، آزمایش‌های تأییدی مطابق جدول ۱ انجام شد. و آزمایش پدیده گاناگوا (Kanagawa phenomenon) بر روی ویبریوزا 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.



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

آزمون مربع کای	نمونه (گروهها و تعداد در هر گروه)									گونه‌های ویبریو
	I (۱۴)	H (۱۴)	G (۱۴)	F (۱۴)	E (۱۴)	D (۱۴)	C (۱۴)	B (۱۴)	A (۲)	
۰/۰	۱۰	۶	۴	۱۴	۱۴	۱۱	۱۳	۱۳	۲	ویبریو آلیجینولیتیکوس
۰/۱	۳	۰	۱۱	۶	۴	۵	۲	۵	۰	ویبریو پاراهمولیتیکوس
۰/۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۲	ویبریو فلووویالیس

۱- یک مورد گاناگاو مثبت

shrimp) و غیره توضیح داده شده که تأییدی بر نقش مهم خانواده ویبریوناسه (Vibrionaceae) در چرخه دوباره مواد کربن دار غیر قابل حل بویژه کیتین (chitin) می‌باشد (۴).

فراوانی گونه‌های غیر قابل تشخیص (unspciated) ویبریو در آب، رسوبات و میگوی مورد مطالعه در این بررسی، کارایی 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 ارگانیزم 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 گاستروانتریت توسط برخی از سویه‌های آن می‌باشد (۴). آزمایش‌های گسترده بر روی مدل‌های حیوانی بیان می‌دارد که همولیزین کاناگاو 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 گاناگاو 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) و یا یک 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 کاناگاو منفی جدا شده است (۱۱). بنابراین همان‌گونه که قبلاً هم ذکر شد روش‌های مولکولی به ویژه در مطالعات همه‌گیرشناسی لازم می‌باشد (۴، ۷، ۸).

نتایج بدست آمده و جداسازی هرچند اندک سویه ویبریو پاراهمولیتیکوس کاناگاو 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 شستشو میگو با آب شیرین حاوی ۲-۷ppm کلر، منجمد کردن محصول در ۴۰- درجه سانتیگراد و پخت کافی محصول مهم می‌باشد (۴، ۵).

نمونه‌های میگو از ۱۴ استخر پرورش میگو (سه ماه بعد از ریختن لارو درست قبل از صید برای بازار فروش)، (۵/۱۴) ۳۵/۷ درصد نمونه‌های میگو از ۱۴ استخر پرورش میگو جمع‌آوری شده از سطح بازار فروش، (۳/۱۴) ۲۱/۴ درصد نمونه‌های آب از ۱۴ استخر پرورش میگو (یک ماه بعد از ریختن لارو)، (۶/۱۴) ۴۲/۸ درصد نمونه‌های آب از ۱۴ استخر پرورش میگو (سه ماه بعد از ریختن لارو) (یک نمونه از این شش نمونه کاناگاو مثبت بود)، (۱/۱۴) ۷/۱ درصد نمونه‌های رسوب از ۱۴ استخر پرورش میگو (یک ماه بعد از ریختن لارو) و (۳/۱۲) ۱۲ درصد نمونه‌های میگودریایی خلیج فارس جمع‌آوری 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. ویبریو فلووویالیس فقط از دو نمونه (مشمول بر لارو و آب) گرفته شده از دو استخر پرورش لارو (۱۰۰ درصد) 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 آلیجینولیتیکوس 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 در سال ۲۰۰۵ (۴) و Sharmila و همکاران در سال ۱۹۹۶ (۹) هم خوانی داشت. فراوانی حضور ویبریو آلیجینولیتیکوس و ویبریو پاراهمولیتیکوس بوسیله اهمیت نقش آنها در تجزیه مازاد غذای باقی مانده در استخرها، پوسته‌های میگو (exuviae)



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 safety. *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 Kanagawa 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.

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.

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.



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, Esmaili, H.¹

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

²Department of Aquatic 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 °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

