14(4) 173-180, Winter 2023

Journal of Animal Environment
(AEJ)
Journal homepage: http://www.aejournal.ir

Original Research Paper

Isolation and Identification of Silver Carp (*Hypophthalmichthys molitrix*) brood stock digestive tracts bacterial flora

Mehran Avekh Keysami**, Afshar Zoughi Shalmani, Askar Zahmatkesh, Ali Karimi

Aquatics and Fisheries Research Department, Gilan Agricultural and Natural Resources Research and Education Center, Agricultural Research, Education and Extension Organization, Rasht, Iran

Key Words

Digestive tracts
Bacterial flora
Silver carp
Brood stocks
Bacteria isolation

Abstract

Introduction: Bacterial infectious diseases are one of the important causes of losses in silver carp aquaculture, due to its detritivorous method, that occur due to temperature changes, manipulation and low quality of farmed water.

Materials & Methods: Four fish breeding farms in Sangar area of Rasht, which had silver carp (*Hypophthalmichthys molitrix*) brood stocks (5.76 ±0.99 Kg}, were considered as sampling sites. In order to isolate and identify the bacterial flora of the gastrointestinal tract of silver carp brood stocks fish with apparently healthy appearance, 30 in equal proportions of male and female were selected and samples were prepared individually for culture. The bacterial flora went to culture. After autopsy, the gastrointestinal tract of the fish was removed and preliminary and differential microbial culture was performed from the intestinal contents. The grown samples were purified after replanting and based on the table of chemical tests; their properties were studied and identified as species.

Results: There were observed No significant differences in the study of physicochemical variables of sampled farm water and bacterial count of water in sampling sites ($p > 0.05$). After isolation and determination of morphological and biochemical traits, samples of isolated bacteria of 8 genera from the gastrointestinal tract of silver carp brood stocks were identified, the most common of which were Bacillus, *Aeromonas* and *Pseudomonas*, although samples opportunistic and general gram-positives such as *Micrococcus* sp. And *Staphylococcus* sp. were also observed. Based on the results of this study, there were no significant differences in bacteria count between gram-negative and gram-positive bacteria isolated from the samples ($p > 0.05$).

Conclusion: Although many of the bacteria isolated in this study are known to be pathogenic, they are not primary pathogens and are found in and around aquatic bodies and in seawater, estuaries and environments. Fresh water is considered as a part of the natural microflora of the aquatic body and may become pathogenic in conditions of stress and degradation of the aquatic immune system.

* Corresponding Author's email: dr.keysami@gmail.com
Received: 7 November 2021; Reviewed: 10 December 2021; Revised: 11 February 2022; Accepted: 14 March 2022
(DOI): 10.22034/AEJ.2022.325468.2739

مقاله پژوهشی

جداسازی و شناسایی فلور باکتریایی دستگاه گوارش مولدین ماهی کپور نقره‌ای (*Hypophthalmichthys molitrix*)

مهران آوخ کیسمی*، افشار ذوقی‌شلمانی، عسگر زحمتکش، علی کریمی

بخش تحقیقات شیلات و آبزیان، مرکز تحقیقات و آموزش کشاورزی و منابع طبیعی استان گیلان، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، رشت، ایران

کلمات کلیدی

دستگاه گوارش
فلور باکتریایی
کپور نقره‌ای
مولد
جداسازی باکتری

چکیده

مقدمه: در پرورش ماهی کپور نقره‌ای به‌دلیل روش تغذیه‌ای پوره خواری آن، بیماری‌های عفونی ناشی از باکتری‌ها یکی از عوامل مهم تلفات محسوب می‌گردد که به‌دنبال تغییر دما، دست‌کاری و پایین بودن کیفیت آب پرورشی ایجاد می‌گردد. بنابراین هدف از این مطالعه جداسازی و شناسایی فلور باکتریایی دستگاه گوارش ماهی کپور نقره‌ای پرورشی منطقه سنگر رشت بود.

مواد و روش‌ها: بنابراین چهار مزرعه تکثیر و پرورش ماهیان گرمابی در منطقه سنگر رشت که از مولدین ماهی کپور نقره‌ای (*Hypophthalmichthys molitrix*) با میانگین وزن (۰/۹۹±۵/۷٦) برخوردار بودند به‌عنوان محل‌های نمونه‌برداری درنظر گرفته شد. به منظور جداسازی و شناسایی فلور باکتریایی دستگاه گوارش ماهی‌های مولد به ظاهر سالم به تعداد ۳۰ عدد به نسبت مساوی نر و ماده انتخاب و نمونه‌های تهیه‌شده به‌صورت انفرادی جهت کشت میکروبی استفاده شدند. پس از کالبدشکافی، دستگاه گوارش ماهی خارج و از محتویات روده کشت میکروبی مقدماتی و تفریقی انجام گرفت. نمونه‌های رشد یافته پس از کشت مجدد خالص‌سازی شده و براساس جدول آزمایشات شیمیایی اقدام به بررسی و مطالعه خواص آن‌ها نموده و تا حد گونه شناسایی گردیدند.

نتایج: در بررسی متغیرهای فیزیکوشیمیایی آب مزارع نمونه‌برداری شده و شمارش باکتریایی آب محل‌های نمونه‌برداری مولدین اختلاف معنی‌داری مشاهده نگردید (P>۰/۰۵). بعد از جداسازی و تعیین صفات مورفولوژیکی و بیوشیمیایی، نمونه باکتری‌های جداسازی شده ۸ جنس از دستگاه گوارش ماهی‌های مولد و بالغ شناسایی گردید که فراوان‌ترین آن‌ها باسیلوس، آئرومونا و سودوموناس (*Bacillus*، *Aeromonas* و *Pseuodomonas*) بودند، اگرچه نمونه‌های گرم مثبت فرصت‌طلب وعمومی نیز مانند میکروکوکوس (*Micrococcus* sp.) و استافیلوکوکوس (*Staphylococcus* sp.) مشاهده شد. براساس نتایج این تحقیق، اختلاف تراکم باکتری‌های گرم منفی و گرم مثبت جدا-سازی شده از نمونه‌ها معنی‌دار نبود (P>۰/۰۵).

بحث و نتیجه‌گیری: اگرچه تعداد زیادی از باکتری‌های جداسازی شده در این تحقیق بیماری‌زا شناخته شده‌اند، اما پاتوژن اولیه نبوده و در درون و سطح بدن آبزیان و در آب دریا، مصب‌ها و محیط‌های آب‌شیرین به‌عنوان قسمتی از میکروفلورای طبیعی بدن آبزیان محسوب می‌شوند. البته در شرایط بروز استرس و تحلیل سیستم ایمنی بدن آبزیان می توانند بیماری‌زایی نمایند.

* پست الکترونیکی نویسنده مسئول: dr.keysami@gmail.com

تاریخ دریافت: ۱٦ آبان ۱٤۰۰؛ تاریخ داوری: ۱۹ آذر ۱٤۰۰؛ تاریخ اصلاح: ۲۲ بهمن ۱٤۰۰؛ تاریخ پذیرش: ۲۳ اسفند ۱٤۰۰
(DOI): 10.22034/AEJ.2022.325468.2739

مقدمه

آبزی‌پروری از چندین دهه گذشته به سرعت به یک صنعت پویا و روبه رشد تبدیل شده است (۱). همگام با افزایش روبه رشد آبزی پروری، چالش‌هایی نظیر شیوع بیماری‌های ویروسی، باکتریایی، قارچی و انگلی ناشی از کاهش کیفیت آب پرورش ماهی ناشی از آلودگی‌ها و تراکم بالای ماهی پرورشی به زیان‌های اقتصادی کلانی در این صنعت منجر شده است. بیماری‌های عفونی یکی از عوامل مهم خسارات اقتصادی در صنعت پرورش آبزیان به‌ویژه ماهی کپور نقره‌ای به‌دلیل روش تغذیه‌ای پوره خواری آن، محسوب می‌شوند. در بین عوامل ایجادکننده بیماری‌های عفونی آبزیان باکتری‌ها یکی از عوامل بیماری‌زای مهم بوده که به‌طور اولیه سبب عفونت زخم و به طور ثانویه سبب بروز مشکلات عفونی به‌دنبال تغییر دما، دستکاری و پایین بودن کیفیت آب پرورشی آبزیان می‌گردد فلور میکروبی روده از عوامل دفاعی مهم در برابر باکتری‌های بیماری‌زا است (۲). با توجه به این‌که سرمایه‌گذاری‌های کلانی در بخش آبزی‌پروری صورت می‌گیرد ضرورت شناخت و حل مشکلات و معضلات بهداشتی و بیماری‌های آن هرچه بیش‌تر احساس می‌گردد (۳). در این میان مهم‌ترین معضل بهداشتی و بیماری‌های ماهی پرورشی عوامل عفونی باکتریایی هستند. از طرفی همین باکتری‌ها جزو میکروفلورای دستگاه گوارش ماهی نیز می‌باشند بنابراین شناسایی فلور باکتریایی ماهی از این نظر اهمیت دارد که باکتری‌های فرصت‌طلب ایجادکننده بیماری‌های باکتریایی در ماهی کپور نقره‌ای شناسایی می‌گردد (۴). باکتری‌ها یکی از موجودات ذره‌بینی هستند که درعین‌حال متنوع‌ترین و مهم‌ترین میکروارگانیسم‌ها نیز محسوب می‌شوند. این موجودات ساختار ساده‌ای دارند و به گروه پروکاریوت‌ها تعلق دارند. باکتری‌ها انواع گوناگونی دارند. تعدادی از آن‌ها فلور باکتریایی موجودات هستند و تعداد کمی از آن‌ها در آبزیان و سایر حیوانات، بیماری‌زا می‌باشند (۵). بررسی‌های متعددی از شناسایی و جداسازی باکتری‌ها در جهت به‌کارگیری آن‌ها به‌عنوان پروبیوتیک و هم‌چنین به‌منظور شناسایی عوامل مولد بیماری‌ها جهت درمان سریع‌تر بیماری‌های آبزیان انجام گرفته است (۶، ۳). Tung Pang و همکاران، ۱۶۹ گونه باکتری از روده ماهی حوض (*Carassius auratus*) جداسازی نمودند (۷). Yasemi و همکاران، باکتری‌های پروبیوتیکی در مولدین قزل‌آلای رنگین‌کمان (*Oncorhynchus mykiss*) بررسی کردند (۸). Robertson و همکاران، با جداسازی باکتری‌های دو گونه آزاد ماهی اطلس (*Salmo salar*) و قزل‌آلای رنگین‌کمان (*O. mykiss*) به بررسی استفاده از آن‌ها به‌عنوان پروبیوتیک پرداختند (۹). Phatarpekar و همکاران (۱۰)، Anderson و همکاران (۵)، Colorni (۱۱) و Miyamoto و همکاران (۱۲) باکتری‌های موجود در هچری‌های میگوی آب‌شیرین *Macrobrachium rosenbergii* را جداسازی و شناسایی نمودند. Wu و همکاران (۴) و Ye و همکاران (۶) آئروموناس را به‌عنوان جنس غالب جداسازی شده از ماهی کپور نقره‌ای گزارش نمودند. با مشاهده برخی علائم و نشانه‌های بیماری‌ها و تلفات قابل‌توجه در ماهی‌های کپور نقره‌ای پرورشی منطقه سنگر رشت به‌منظور نیل به پیشگیری و کاهش عفونت‌های میکروبی، شناسایی و تشخیص به‌موقع آن‌ها امری ضروری به‌نظر می‌رسید. از طرف دیگر با توجه به این‌که در خصوص استخراج و شناسایی باکتری‌های بومی دستگاه گوارش ماهی کپور نقره‌ای (*H. molitrix*) استخرهای پرورشی استان گیلان تحقیق چندانی انجام نشده است انجام این تحقیق می‌تواند مطالعات پایه‌ای و زمینه‌ای مناسب برای کنترل بیماری‌ها و افزایش رشد و بازماندگی ماهی در مرحله پرورش در استخرهای پرورشی باشد. بنابراین هدف از این مطالعه نیز ارزیابی و شناسایی فلور باکتریایی ماهی کپور نقره‌ای پرورشی این منطقه بود.

مواد و روش‌ها

نمونه‌برداری از مولدین: چهار مزرعه تکثیر و پرورش ماهیان گرمابی در منطقه سنگر رشت که از مولدین ماهی کپور نقره‌ای با میانگین وزنی (۰/۹۹ ± ۵/۷۶) برخوردار بودند به‌عنوان محل‌های نمونه‌برداری درنظر گرفته شد. به‌منظور صید مولدین از تور سالیک استفاده گردید. قبل از نمونه‌برداری شرایط مدیریتی استخر و فاکتورهای محیطی ازجمله اکسیژن، دما، PH و حتی رنگ آب و وضعیت ظاهر ماهی‌ها بررسی و ثبت گردید. درجه حرارت و PH به‌وسیله یک دستگاه PH متر و درجه حرارت سنج YSI۱ اندازه‌گیری شد. اکسیژن محلول نیز با اکسیژن متر YSI، مدل ۵V (USA) و آمونیاک با استفاده از آمونیاک‌سنج‌هانا، (HI۹۳۷۱۵,Taiwan) اندازه‌گیری گردید. ماهی‌های مولد با ظاهر سالم به‌تعداد ۳۰ عدد به نسبت مساوی نر و ماده به صورت زنده با کیسه‌های پلاستیکی محتوی آب و هوا به آزمایشگاه بهداشت و بیماری‌های آبزیان مرکز آموزش عالی علوم و صنایع شیلاتی میرزا کوچک خان منتقل گردیدند. میانگین وزن بدن و طول کل و سن ماهیان مولد به‌ترتیب ۰/۹۹±۵/۷۶ کیلوگرم و طول کل ۴/۶۸±۶۷/۳۳ سانتی‌متر و سن ۰/۳۸±۴/۹۹ سال بودند.

کشت میکروبی: نمونه‌های ماهی مولد کپور نقره‌ای تهیه شده به‌صورت انفرادی جهت کشت میکروبی به‌کار رفتند. برای این منظور سطح بدنِ ماهی با پنبه آغشته به الکل ۷۰ درصد ضدعفونی گردیدند و سپس برای برداشتن دستگاه گوارش ماهی‌های مولد مذکور اقدام به تشریح ماهیان گردید (۱۳). همه نمونه‌های جداسازی شده دستگاه

گوارش وزن شده و با آب مقطر استریل یک‌دست شدند و تا ۱۰ برابر رقیق‌سازی صورت گرفت. ۰/۱ میلی‌لیتر از هر رقیق‌سازی در سه تکرار روی پلیت‌های محیط کشت پخش شدند (۱۳). چند نوع محیط باکتری‌شناسی برای جداسازی اولیه و شمارش کلی باکتری‌های دستگاه گوارش و شمارش باکتریایی آب مخازن پرورشی محل نمونه‌برداری (تعیین TPC) شامل TCBS (Thiosulfate Citrate Bile Salts Sucrose Agar), TSA(Tryptic Soy Agar) , TSB , Tryptic) MC (Mac conkey agar) NA (Nutrient agar) , TSI (Soy Broth NB(Nutrient broth)و PW (Pepton Water) در این تحقیق استفاده شد. محیط کشت‌های NA و TSA برای شمارش باکتری‌های هتروتروفیک هوازی، TSA برای جداسازی باکتری‌های هتروتروفیک غیرانتخابی، MCبرای آنتروباکتریاسه *(Enterobacteriaceae)*، TCBS برای جنس ویبریو و آئروموناس و محیط جداکننده سودوموناس (PA) برای جداسازی سودوموناس، آب پپتومه و NB وTSB برای کشت‌اولیه باکتری‌ها و انبوه‌سازی آماده‌شدند (۵). همه پلیت‌ها برای ۲۴ تا ۴۸ ساعت در دمای ۲۷ الی ۳۰ درجه سانتی‌گراد در گرم‌خانه پرورش داده شد، به‌جز پلیت مک‌کانکی که در ۳۷ درجه سانتی‌گراد پرورش یافت. بعد از اتمام مدت زمان مذکور پلیت‌هایی که از ۳۰ تا ۳۰۰ پرگنه روی آن‌ها تشکیل شده بود شمارش شدند (۱۴). رشد باکتری با کدر نمودن محیط مایع و ظهور پرگنه بر روی محیط کشت جامد مشخص گردید.

شناسایی گونه‌های جداسازی شده: نمونه‌های رشد یافته پس از کشت مجدد خالص‌سازی شده و براساس جدول آزمایشات شیمیایی و بیوشیمیایی اقدام به بررسی و مطالعه خواص آن‌ها نموده و تا حد گونه شناسایی گردیدند (۱۵). مطالعه خواص این ارگانیزم‌ها براساس روش‌های میکروبیولوژی توصیه‌شده (۱۳، ۱۶) انجام شد. پس‌از کشت‌باکتریایی و جداسازی‌وخالص‌سازی نمونه‌های باکتریایی رشد یافته، ابتدا به‌منظور بررسی وضع ظاهری آن‌ها اقدام به تهیه گسترش و رنگ‌آمیزی گرم گردید و پس از مشاهده مورفولوژی باکتری‌هابا انجام آزمایشات اکسیداز (Oxidase) و کاتالاز(Catalase)، سایر آزمایشات بیوشیمیایی به‌روش Kolb و همکاران، انجام شد (۱۷). پس از انجام آزمایش‌های بیوشیمیایی، نتایج حاصله با روش ارائه شده توسط Keysami و همکاران (۱۸)، سلطانی (۱۳)، Alsina و Blanch (۱۶) مقایسه گردید. سپس از هر جنس حداقل یک نمونه به‌منظور بررسی صحت و سقم شناسایی بیوشیمیایی در دانشگاه پوترای مالزی با استفاده از نرم‌افزار Biolog, microlog, soft ware تا حد گونه شناسایی شد (۱۸).

تجزیه و تحلیل داده‌ها: میانگین داده‌های متغییرهای کیفیت آب، میانگین تعداد‌باکتری‌های گرم مثبت و منفی در نمونه‌ها و تکرارها با استفاده از آزمون آنالیز واریانس یک‌طرفه و آزمون دانکن در سطح معنی‌داری α=۰/۰۵ با استفاده از نرم‌افزار SPSS 20 انجام شد (۱۹).

نتایج

در بررسی متغیرهای فیزیکوشیمیایی آب مزارع نمونه‌برداری شده و شمارش باکتریایی آب محل‌های نمونه‌برداری مولدین اختلاف معنی‌داری مشاهده نگردید (p>۰/۰۵).

جدول ۱: ویژگی‌های فیزیکی و شیمیایی آب مخازن پرورش محل‌های نمونه‌برداری، داده‌ها میانگین ۳ تکرار در هر تیمار می‌باشند (میانگین± Sd)

متغیر	مزرعه ۱	مزرعه ۲	مزرعه ۳	مزرعه ۴
دما (درجه سانتی‌گراد)				
صبح	۰/۲۵±۲۶/۵۷	۰/۲۵±۲۶/۸۷	۰/۲۱±۲۶/۷۳	۰/۳۱±۲۷/۲۳
عصر	۰/۳۲±۲۹/۶۷	۰/۳۵±۳۰/۸	۰/۰۶±۲۸/۶۳	۰/۵±۲۹/۱
اکسیژن محلول (لیتر/ میلی‌گرم)				
صبح	۰/۲۹±۵/۷	۰/۳۶±۵/۷	۰/۴±۵/۴	۰/۱۵±۵/۶
عصر	۰/۰۶±۷/۱	۰/۴±۶/۹	۰/۲۶±۷/۱	۰/۳۱±۷/۱
pH				
صبح	۰/۱±۷/۲	۰/۳۱±۷/۲۲	۰/۳۲±۷/۲۳	۰/۳۵±۷/۲۱
عصر	۰/۰۶±۸/۰۷	۰/۳۸±۸	۰/۴±۷/۹	۰/۴۹±۸/۳
آمونیاک (لیتر/ میلی‌گرم)				
صبح	۰/۰۰۴±۰/۰۱۲	۰/۰۰۴±۰/۰۱۲	۰/۰۰۸±۰/۰۲	۰/۰۰۸±۰/۰۲
عصر	۰/۰۰۵±۰/۰۱	۰/۰۰۱±۰/۰۱۳	۰/۰۰۲±۰/۰۱۴	۰/۰۰۳±۰/۰۱۲

میانگین تعداد کل باکتری‌های هتروتروفیک غیرانتخابی روی محیط کشت TSA، ۱۶۹±۳۱۰۰ (CFU×10^4 /ml) و ۳/۷±۱۶۰۰۰ (CFU×10^4 /gr) بود. میانگین تعداد کل باکتری‌های آنتروباکتریاسه (*Enterobacteriaceae*) روی محیط MC، میانگین تعداد کل باکتری‌های جنس ویبریو و آئروموناس روی TCBS و میانگین تعداد کل باکتری‌های سودوموناس روی محیط جداکننده سودوموناس (PA)، در آب مخازن پرورشی و دستگاه گوارش مولدین کپور نقره‌ای در جدول ۲ نشان داده شد. براساس نتایج مذکور در جدول ۲، اختلاف تراکم میانگین تعداد کل باکتری‌های جداسازی شده بین آب مخازن پرورشی و دستگاه گوارش مولدین کپور نقره‌ای روی محیط کشت‌های مختلف معنی‌دار بود (P<۰/۰۵).

جدول۲: میانگین تعداد کل باکتری‌های دستگاه گوارش و آب مخازن پرورشی محل‌های نمونه‌برداری مولدین کپور نقره‌ای روی محیط‌های انتخابی TSA، MC، TCBS، PA (میانگین± Sd)، CFU×104 /gr و CFU×104 /ml, n=3)

محیط انتخابی	تعداد کل باکتری‌های آب (CFU×104 /ml)	تعداد کل باکتری‌های دستگاه گوارش (CFU×104 /gr)
TSA	۳۱۰۰±۱۶۹^a	۱۶۰۰۰±۳/۷ ^{b}
MacConkey agar	۷۶۰۰۰±۱۹۶/۰^a	۶۲۰۰±۱۶۲ ^{b}
TCBS agar	۲/۱±۰/۱^a	۸۱±۳/۸ ^{b}
Pseudomonas Isolating agar	۰/۰۰۳±۰/۰۰۱^a	۳/۳±۱/۱ ^{b}

حروف غیرهمسان در هر ردیف نشانه اختلاف معنی‌دار است (P<۰/۰۵)

براساس نتایج آزمایشات بررسی ویژگی‌های مورفولوژیکی و بیوشیمیایی پرگنه‌های جداسازی شده، باکتری‌های جداسازی شده در ۸ گروه مختلف قرار گرفتند (جدول ۳، جدول۴). این دسته‌بندی براساس نتایج تست‌های ریخت‌شناسی و بیوشیمیایی بود (جدول۴). در این تحقیق ۸ جنس از دستگاه گوارش ماهی‌های مولد و بالغ شناسایی گردید که فراوان‌ترین آن‌ها باسیلوس، آئروموناسو سودوموناس بودند، اگرچه نمونه‌های گرم‌مثبت فرصت‌طلب و عمومی نیز مانند میکروکوکوس و استافیلوکوکوس مشاهده شد.. براساس نتایج مذکور در جدول ۵، اختلاف تراکم باکتری‌های گرم منفی و گرم مثبت جداسازی شده از نمونه‌ها معنی‌دار نبود (p>۰/۰۵).

جدول۳: گروه‌های اصلی جداسازی شده براساس نتایج تست‌های بیوشیمیایی

Groups	Id of isolated colony's
Aermonas	23.3-2-12-16-17-20-22-23-24--25-26-16.2-3.9-12.1-23.8-25.6-16.1-24.6-17.8-23.2-20.8-12.6-24.3
Enterobacteraceae	7.3-18-7-18.3-08-p1-18.6
Micricoccus	12.1-9-9.8-13.1-8.9-8.1-9.1-13.3-13.2-9.4
Corynbacterium	4.4--19-19.5-3.8-11-8-8.7-11.2-11.3-11.5-8.6-8.8-8.3-11.6-06
Staphylococcus	3-21-9-13-4-2—10.1-10.2-19.3-19.6-6.6-19.5
Psudomonas	21.1-P2-2.11-2.1-2.3-2.5-2.6-2.8-2.9-2.7- pa-pb-pc-pd-pe-pf-pg-pk-pl-pm-pn
Bacillus	27-B1-b9-00b-27.3-27.6-27.5-b8-be-bt-b5-b5-b0-000b –b01-bt1
Unidentified	3.9-P3-uc

جدول ۴: نتایج بررسی ویژگی‌های بیوشیمیایی گروه‌های اصلی باکتری‌های جداسازی شده از دستگاه گوارش مولدین کپور نقره‌ای

8	7	6	5	4	3	2	1	Main Groups
—	+	—	+	+	+	—	—	Gram
rod	rod	rod	cocci	rod	cocci	rod	short rod	Cell shape
+	+	+	—	—	+	—	+	Oxidase
+	+	+	+	+	+	+	+	Catalase
+	+	+	—	—	+	+	+	Motility
—	+	+	+	+	+	—	—	Urease
—	+	—	—	—	—	—	+	Gelatinase (35°C)
+	+	—	—	+	d	+	+	ONPG
—	+	+	+	+	—	—	+	Lysine
—	+	+	—		+	+	—	Arginine
+	+	—	d	+	+	+	+	Esculin
+	+	—	—	d	—	+	—	Ornithine
—	d	+	—	d	d	+	+	Lipase
+	+	+	—	—	—	+	+	Citrate
+	—	+	+	—	+	+	+	Indole
—	+	d	—	+	d	—	+	Voges-Proskaur
—	—	+	—	+	—	—	—	H2S production
—	+	+	+	+	—	+	+	Acid from Glucose
+	—	+	+	+	—	—	—	Acid from Inositol
—	—	+	+	—	—	—	+	Acid from Mannitol
—	—	—	—	—	—	—	—	Na required for growth

جدول ۵: فراوانی نسبی باکتری‌های گرم مثبت و گرم منفی جداسازی شده از دستگاه گوارش ماهی کپور نقره‌ای

گروه	جنس باکتری	رنگ‌آمیزی گرم	تعداد	%
۱	*Aeromonas*	–	۲۳	۲۱/۶۷
۲	*Entrobacteriaceae*	–	۷	۶/۶۰
۳	*Micrococcus*	+	۱۰	۹/۴۳
۴	*Corynebacterium*	+	۱۵	۱۴/۱۵
۵	*Staphylococcus*	+	۱۱	۱۰/۳۸
۶	*Psudomonas*	–	۲۱	۱۹/۸۱
۷	*Bacillus*	+	۱۶	۱۵/۰۹
۸	Unidentified	–	۳	۲/۸۳
	جمع		۱۰۶	۱۰۰

بحث

نتایج بررسی ویژگی‌های فیزیکوشیمیایی آب استخرهای نمونه‌برداری شده نشان داد که اختلاف معنی‌دار آماری بین متغیرهای فیزیکی و شیمیایی استخرهای نمونه‌برداری شده وجود ندارد ($p>0/05$). شرایط فیزیکوشیمیایی به‌دست‌آمده از مزارع در حدود شرایط فیزیکوشیمیایی مطلوب مورد نیاز برای کشت و پرورش ماهی کپور نقره‌ای بود (۳). تعداد کل باکتری‌های دستگاه گوارش مولدین روی محیط کشت TSA، ۳/۷±۱۶۰۰۰ ($CFU\times10^4/gr$) بود. دستگاه گوارش به‌ویژه روده آبزیان، از باکتری‌های متنوعی تشکیل شده است که با استقرار در محیط روده، مانع فعالیت میکرواورگانیسم‌های غیرمفید و پاتوژن و یا بر عکس، باعث حذف باکتری‌های مفید و سودمند می‌شود (۲۰). باکتری‌های گرم مثبت غالباً مهم‌ترین میکرواورگانیسم‌های پروبیوتیک بوده که شامل باکتری‌های متنوعی مانند *Lactobacillus acidioplilus* و .sp *Bifidobacterium* و .sp *Bacillus* می‌باشد(۲۱).اکثر باکتری‌ها بی‌خطر بوده و ممکن است آنتاگونیست باکتری‌های پاتوژن باشد و در این صورت با استقرار در محیط روده می‌توانند تعادل میکروبی را در جهت سلامت و سودمندی آن‌ها افزایش دهند. علاوه بر این پروبیوتیک‌ها با سنتز برخی مواد ضروری، نقش مهمی در حفظ سلامتی فرد مصرف‌کننده ایفا می‌کنند (۳،۶). باکتری‌های جداسازی شده از نمونه‌ها در این تحقیق شامل باکتری‌های گرم منفی و گرم مثبت بودند. اما نتایج تحقیقات جداسازی باکتریایی در پرورش کپور ماهیان چینی (۲۲)، در کشت لارو تیلاپیا (*Oreochromis mossambica*) (۲۱)، در بررسی فلور باکتریایی ماهی علف‌خوار (*Ctenpharhyngoden idella*) و در پرورش ماهی کپور نقره‌ای توسط Khan و همکاران، باکتری‌های غالب جداسازی شده گرم منفی بودند (۱۴). هم‌چنین Hosseinzadeh و Tukmechi، تعداد ۶ سویه باکتری *Aeromonas hydrophila* که گرم منفی است از ماهی کپورمعمولی بیمار از ده مزرعه پرورشی آذربایجان‌غربی جداسازی نمودند (۲۳). این مهم می‌تواند به کیفیت آب محیط پرورش آبزی مربوط باشد. بدین ترتیب که در صورت تراکم بالای پرورش آبزی و در شرایط pH بالاتر و کیفیت نامناسب آب محیط پرورش، تراکم باکتری‌های گرم منفی بالاتر می‌رود (۲۴). باکتری‌های گرم مثبت جداسازی شده در این تحقیق از انواع گونه‌های باسیلوس،کورینه‌باکتریوم، میکروکوکوس و استافیلوکوکوس بودند که باسیلوس و کورینه‌باکتریوم در مطالعات سایرین در لارو کپورمعمولی (۴)، در لارو *M. rosenbergii* (۱۲) و در ماهی کپور نقره‌ای (*H. molitrix*) (۲۵) گزارش گردیده بود، اما وجود باکتری‌های گرم مثبت در تحقیق دیگری که روی لارو کپور معمولی (*Cyprinus carpio*)(۲۶) و در تحقیق روی *M. rosenbergii* انجام شده بود (۱۱)، گزارش نشد. هم‌چنین باسیلوس در تحقیق Phatarpekar و همکاران، که بر روی *M. rosenbergii* در آب‌شیرین انجام شده بود (۱۰)، گزارش نگردید. جنس‌های اصلی جداسازی شده در این تحقیق شامل باکتری‌های گرم مثبت و گرم منفی، مشابه جنس‌هایی بود که به‌وسیله Hagi و همکاران، در ماهی کپور نقره‌ای (*H. molitrix*) گزارش گردید (۲۷). باکتری‌های *Aeromonas*، *Cytophaga*، *Photobacterium*، *Xanthomonas* و *Streptococcus* که قبلاً در *M. rosenbergii* در آب‌شیرین توسط Miyamoto و همکاران (۱۲) و Phatarpekar و همکاران (۱۰) گزارش شده بود، در این مطالعه شناسایی نشد. مشابه مطالعه Phatarpekar و همکاران (۱۰)،در این مطالعه گونه *Pseudomonas* به‌عنوان گونه غالب گزارش شد. این نتایج با گزارش‌های قبلی به‌وسیله Hagi و همکاران (۲۷)، Miyamoto و همکاران (۱۲)، Anderson و همکاران (۵)، Sahul Hameed (۲۸)، Singh (۲۹) و Colorni (۱۱) مطابقت داشت، اما Basti و همکاران (۳۰) و Mandal و Ghosh (۳۱) آئرومونا‌س را به عنوان جنس غالب جداسازی شده از ماهی کپور نقره‌ای گزارش نمودند. Yasuda و Kiato (۳۲)، Yasemi و همکاران (۸) با بررسی باکتری‌های پروبیوتیکی در قزل‌آلای رنگین‌کمان (*O. mykiss*) گونه‌های *Bacillus* را با فراوانی بیش‌تر نسبت به دیگر باکتری‌ها شامل (*Lactobacillus* sp.)، (*Aeromonas* sp.)، (*Streptococcus* sp.)، (*Leuconostoc* sp.) و (*Carnobacterium* sp.) گزارش نمودند. Tung و Pang و همکاران، ۱۶۹ گونه باکتری عمدتاً ترکیبی از باسیل‌های گرم مثبت را در ماهی حوض (*Carassius auratus*) گزارش کردند. آن‌ها با بررسی پنج گونه از باکتری‌های جداسازی شده که فعالیت آنتاگونیست بالا داشتند گونه *Bacillus thuringiensis* را به‌عنوان پروبیوتیک مطلوب در مبارزه با طیف گسترده‌ای از عوامل آسیب‌زای

ماهی و مقاوم به عوامل زیست‌محیطی نامناسب از قبیل pH پایین و دمای بالا گزارش نمودند (۷). براساس نظر Ye و همکاران، ترکیب فلور میکروبی لوله گوارش ماهی به نوع غذا، مورفولوژی لوله گوارش، ظرفیت هضم و رفتارهای فیزیولوژیکی ماهی بستگی دارد (۶). در این تحقیق ۷ جنس از دستگاه گوارش ماهی کپور نقره‌ای بالغ شناسایی شد ولی Anderson و همکاران، ۱۹ جنس را گزارش داده بودند(۵)، Phatarpekar و همکاران، ۱۶ جنس از فلور باکتریایی مزرعه پرورش ماهیان گرمابی گزارش نمودند (۱۰). Hanol و همکاران، ۲۵ نوع باکتری تولیدکننده اسیدلاکتیک جهت تولید پروبیوتیک را از ماهیان آب‌شیرین دریاچه Egirdir ترکیه جداسازی نمودند (۳۳). شاید دلیل جداسازی تنوع کم‌تری از باکتری‌ها در این تحقیق، تعداد کم‌تر نمونه‌های مولدین جمع‌آوری شده به‌دلایل محدویت تحقیق بر روی طیف سنی مولدین و محدودیت تعداد نمونه‌های مولدین ارزشمند ماهی کپور نقره‌ای در فصل تکثیر و در نتیجه تعداد کم‌تر پرگنه‌های جداسازی شده در این مطالعه باشد. غالبیت *Aeromonas* و *Pseudomonas* در این مطالعه هم‌چنین در تحقیقات دیگر روی ماهی کپور معمولی (*C. carpio*)، کپور نقره‌ای (*H. molitrix*) و کپور علف‌خوار (*Ctenopharhyngoden idella*) و تیلاپیا (Tilapia) و لارو ماکروبراکیوم (*M. rosenbergii*) گزارش شده است (۵، ۳۴) در این تحقیق جمعیت غالب فلور باکتریایی دستگاه گوارش، قبلاً در تحقیق Mohammadpour، از آب همین استخرهای پرورشی جداسازی شده بود و شامل آئروموناس، سودوموناس و باسیلوس بوده است (۳۵). باکتری‌های روده‌ای آبزیان با فلور باکتریایی محیط زیست‌شان به واسطه تغذیه آن‌ها تحت‌تأثیر قرار می‌گیرد (۱۸، ۵، ۲۲). از آن‌جایی که زیستگاه ماهی در آب و رسوبات استخر است، جمعیت غالب باکتری‌های دستگاه گوارش ماهی فلور باکتریایی آب و رسوبات استخر پرورش ماهی است (۲۴، ۲۰، ۴، ۳۶، ۳). به‌عبارت دیگر، انواع مشابه باکتری‌هایی که از دستگاه گوارش ماهی و آب محیط پرورش آن‌ها جداسازی گردیده و فلور میکروبی ماهی را تشکیل می‌دهد از طریق تغذیه وارد دستگاه گوارش ماهی شده‌اند و جریان آب تأثیر محیط اطراف را روی فلور میکروبی آبزیان افزایش می‌دهد (۱۷، ۳۷). گرچه تعداد زیادی از باکتری‌های جداسازی شده در این تحقیق بیماری‌زا نشان دادند (۳۸) اما آن‌ها پاتوژن اولیه نیستند (۵، ۳۹) و در درون و سطح بدن آبزیان و در آب دریا، مصب‌ها و محیط‌های آب‌شیرین به‌عنوان قسمتی از میکروفلورای طبیعی بدن آبزیان محسوب می‌شوند (۲۴) و شاید در شرایط بروز استرس و تحلیل سیستم ایمنی بدن آبزیان بیماری‌زایی نمایند (۵، ۳۲، ۴۰).

تشکر و قدردانی

بدین‌وسیله از همکاری و مساعدت کارکنان آزمایشگاه مرکز آموزش‌علوم و صنایع‌شیلاتی میرزاکوچک خان و کارگاه تکثیر ماهی آقای فاضلی، مزرعه شالیزار نوین و آزمایشگاه پروفسور قمر سیجام دانشگاه پوترای مالزی قدردانی می‌گردد.

منابع

1. **Cahill, M.M., 1990.** Bacterial flora of fishes: a review. Microbial ecology. 19: 21-41.
2. **Behera, B.K., Bera, A.K., Paria, P., Das, A. and Parida, P.K., 2018.** Identification and pathogenicity of *Plesiomonas shigelloides* in Silver Carp. Aquaculture. Elsevier. 493(1): 314-318.
3. **Cecilia, B., Daniela, R. and Mioara, C., 2018.** Research on bacterial disease in silver carp (*Hypophthalmichthys molitrix* Val.), farmed in pond. International Multidisciplinary Scientific GeoConference: SGEM; Sofia. 18(6.2). DOI:10.5593/sgem2018/6.2/S25.067.
4. **Wu, S., Wang, G., Angert, E.R., Wang, W., Li, W. and Zou, H., 2012.** Composition, diversity and origin of the bacterial community in grass carp intestine. journals. Actions. PLoS One. 7(2): e30440. DOI: 10.1371/journal. pone.0030440.
5. **Anderson, I.G., Shmsudin, M.N. and Nash, G., 1989.** A preliminary study on the aerobic heterophic bacterial flora in giant freshwater prawn, *Macrobrachium rosenbergii*, hatcheries in Malaysia. Aquaculture. 81: 213-223.
6. **Ye, L., Amberg, J., Chapman, D., Gaikowski, M. and Liu, W.T., 2014.** Fish gut microbiota analysis differentiates physiology and behavior of invasive Asian carp and indigenous American fish. The ISME Journal. 8: 541-551.
7. **Tung Pang, S., Ransangan, J. and Hatai, K., 2020.** Isolation, Identification and Preliminary Characterization of Candidate Probiotic Bacteria from the Intestine of Domesticated Goldfish (*Carassius auratus*). Journal of fisheries and environment. 44(2).
8. **Yasemi, M., Esmaeili, A.H., Feizei, Z., Ghaemmaghami, S. and Alinejad, S., 2012.** Identifying Bacterial flora of rainbow trout brood stocks (*Oncorhynchus mykiss*) and its assumed importance from probiotical view. Journal of Animal Environment. 4(2): 45-50. (In Persian)
9. **Robertson, P.A.W., Dowd, C.O., Burrells, C., Williams, P. and Austin, B., 2000.** Use of Carnobacterium sp. as a probiotic for Atlantic salmon (*Salmo salar*) and rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*, Walbaum). Aquaculture. 185: 235-243.
10. **Phatarpekar, P.V., Kenkre, V.D., Sreepada, R.A., Desai, U. and Achuthankutty, C.T., 2002.** Bacterial flora

24. **Li, X., Yu, Y., Feng, W., Yan, Q. and Gong, Y., 2012.** Host species as a strong determinant of the intestinal microbiota of fish larvae. The Journal of Microbiology. 50(1): 29-37.

25. **Razavilar, V., Khani, M.R. and Motallebi, A.A., 2013**. Bacteriological study of cultured silver carp (*Hypophthalmichthys molitrix*) in Gilan province, Iran. Iranian Journal of Fisheries Sciences. 12(3): 689- 701.

26. **Al-Harbi, A.H. and Uddin, M.N., 2008.** Aerobic Bacterial Flora of Common Carp (*Cyprinus carpio* L.) Cultured in Earthen Ponds in Saudi Arabia. Journal of Applied Aquaculture. Taylor & Francis. 20(2): 108-119.

27. **Hagi, T., Tanaka, D., Iwamura, Y. and Hoshino, T., 2004.** Diversity and seasonal changes in lactic acid bacteria in the intestinal tract of cultured freshwater fish. Aquaculture. 234(1-4): 335-346.

28. **Sahul Hameed, A., 1993.** A study of the aerobic heterophic bacterial flora of hatchery-reared eggs, larvae and post larvae of *Penaeus indicus*. Aquaculture. 117: 195-204.

29. **Singh, B.I., 1997.** Studies on the bacteria associated with *Penaeus indicus in* a cultre system. PHD Thesis, Cochin University of Science and Technology, Cochin, india. 230 p.

30. **Basti, A.A., Zahrae Salehi, T. and Bokaie, S., 2004**. Some bacterial pathogens in the intestine of cultivated silver carp and common carp. Developments in Food Science. 42: 447-451.

31. **Mandal, S. and Ghosh, K., 2013.** Isolation of tannase-producing microbiota from the gastrointestinal tracts of some freshwater fish. Journal of Applied Ichthyology, Vol. 29, pp:145-153

32. **Yasuda, K. and Kitao, T., 1980.** Bacterial flora in the digestive tract of prawn *Penaeus japonicas* Bate. Aquaculture. 19: 229-234.

33. **Hanol Bektas Z., Ucar F.B. and Giray B., 2020.** Identification and probiotic properties of lactic acid bacterial isolated from freshwater fish. Iranian Journal of Fisheries Sciences. 19(4): 1795-1807. DOI: 10.22092/ijfs.2018. 118938.

34. **Talukdar, S., Ringø, E. and Ghosh, K., 2016.** Extracellular tannase-producing bacteria detected in the digestive tracts of freshwater fishes (Actinopterygii: Cyprinidae and Cichlidae). Acta Ichthyologica Et Piscatoria. 46(3): 201-210. DOI:10.3750/AIP2016.46.3.04.

35. **Mohammadpour, A., 2016.** Isolation and identification of bacterial flora of water and sediment of silver carp breeding pond (*Hypophthalmichthys molitrix*) and its screening as probiotic. Master's thesis, Mirzakochek Khan Gilan Higher Education Center for Fisheries Sciences and Industries. 142 p. (In Persian)

36. **Punom, N.J., 2017.** 16S rRNA sequence based identification of pathogenic gut microbiota of Rohu, *(Labeo rohita*, Hamilton-Buchanan 1822) and Silver carp *(Hypophthalmichthys molitrix*) repository.library.du.ac.bd.

associated with larval rearing of the giant freshwater prawn, *Macrobrachium rosenbergii*. Aquaculture. 203: 279-291.

11. **Colorni, A., 1985.** A study on the bacterial flora of giant prawn, *Macrobrachium rosenbergii*, larvae fed with *Artemia salina*nauplii. Aquaculture. 49: 1-10.

12. **Miyamoto, G., Brock, J., Nakamura, R., Nakagawal, l., Shimojo, R., Sato, V. and Akito, G., 1983.** A Preliminary microbiological and water quality survey of two Hawaiian prawn (*Macrobrachium rosenbergii*) hatcheries. In: Rogers, G.L., Day R. and Lim, A., (Editors), Proc. First Int. Conf. Warm Water Aquaculture-Crustacea. Brigtham Young University Hawaii Campus, Laie, Hi. 429-458.

13. **Soltani, M., 1997.** Bacterial diseases of fish. Published by the Veterinary Medicine Organization in cooperation with the Academic Jihad Publishing Institute of Tehran University. 454 p. (In Persian)

14. **Khan, A., Mandal, S., Samanta, D. and Chatterjee, S., 2011.** Phytase-producing *Rhodococcus* sp. (MTCC 9508) from fish gut: a preliminary study. Proceedings of the Zoological Society. 64(1): 29-34.

15. **Berg, F., 1995.** Bacteria associated with early life stages of halibut, *Hippoglossu* L., inhibit growth of a pathogenic Vibrio Sp. Journal of fish Diseases. 18: 31-40.

16. **Alsina, M. and Blanch, M., 1994.** A set of keys biochemical identification of environmental *Vibrio* sp. Journal of Applied Bacteriology. 76: 79-85.

17. **Kolb, S.A., O'Loughlin, E.J. and Gsell, T.C., 2019.** Characterization of phthalate-degrading bacteria from Asian carp microbiomes and riverine sediments. International Biodeterioration and Data. 143: 104727.

18. **Keysami, M.A., Saad, C.R., Daud, H.M., Sijam, K. and Alimon, A.R., 2005.** Comparison probiotic ability of three putative bacteria in juvenile *Macrobrachium rosenbergii* based on in vitro bacteria growth characteristics. Malaysian journal of Animal Science. 11(1): 61-71.

19. **Sokal, R.R. and Rohlf, F.J., 1995.** Biometry. The Principles and Practice of Statistics in Biological Research. Freeman, New York.

20. **Ray, A.K., Ghosh, K. and Ringø, E., 2012.** Enzyme producing bacteria isolated from fish gut: a review. Aquaculture Nutrition, Wiley Online Library.

21. **Khan, A. and Ghosh, K., 2012.** Characterization and identification of gut-associated phytase-producing bacteria in some freshwater fish cultured in ponds. Acta Ichthyologica et Piscatoria. 42(1): 37-45.

22. **Banerjee, S., Mukherjee, A. and Dutta, D., 2016.** Non Starch Polysaccharide Degrading Gut Bacteria in Indian Major Carps and Exotic Carps. Jordan Journal of Biological Sciences (JJBS). 9(1): 69-78

23. **Hosseinzadeh, M. and Tukmechi**, **A., 2016.** Isolation and identification of enterotoxin producing Aeromonas hydrophila from common carp (*Cyprinus carpio*). Journal of Animal Environment. 7(4): 173-178. (In Persian)

37. **Pękala Safińska, A., 2018.** Contemporary threats of bacterial infections in freshwater fish. Journal of veterinary research. 62(3): 261-267.

38. **Bairagi, A., Ghosh, K.S., Sen, S.K. and Ray, AK., 2002.** Enzyme producing bacterial flora isolated from fish digestive tracts. Aquaculture International. 10: 109-121.

39. **Luo, C., Yi, C., Ni, L. and Guo, L., 2017.** Characterization of dominant and cellulolytic bacterial communities along the gut of silver carp (*Hypophthalmichthys molitrix*) during cyanobacterial blooms. Chinese Journal of Oceanology and Limnology. 35: 624-633.

40. **Lightner, D.V. and Lewis, D.H., 1975.** A septicemic bacterial disease syndrome of penaeid shrimp. Marine Fisheries Review. 37: 25-28.