



## شناسایی دو باکتری بیماری زای انسان در روده ماهی کپور معمولی پرورشی (*cyprinus carpio*) در تعدادی از استخرهای پرورشی استان خراسان رضوی

امیر صفاری<sup>۱\*</sup> و محمد حسین غفوریان<sup>۲</sup>

### چکیده:

مصرف ماهی به عنوان یک منبع پروتئینی ارزان و قابل دسترس در حال گسترش می باشد از طرفی گزارش های روزافزون در مورد بیماری های ناشی از مصرف مواد غذایی آلوده از جمله ماهی و فراورده های دریایی وجود دارد. هدف از این مطالعه بررسی میزان آلودگی دستگاه گوارش کپور معمولی پرورشی در استان خراسان رضوی به اشرفیا کولی و لیستریا مونوسیتوجنز می باشد تا با مشخص نمودن درصد آلودگی سعی در کاهش آن داشته باشیم. تعداد ۴۰ ماهی کپور معمولی (*cyprinus carpio*) از مجموع ۱۰ استخر پرورش ماهی در استان خراسان رضوی صید گردید و سپس در کنار یخ با رعایت شرایط بهداشتی به آزمایشگاه منتقل شد. جهت جداسازی لیستریا نمونه ها بمدت ۷ روز در دمای ۴ درجه سانتی گراد در محیط L.E.B غنی سازی شده و سپس به محیط کشت انتخابی لیستریا آکسفورد آگار انتقال یافتند. تشخیص اولیه باکتریها با بهره گیری از آزمونهای مورفولوژیک و بیوشیمیایی مورد تایید قرار گرفت که در این بررسی ۵٪ نمونه ها به لحاظ وجود باکتری مورد نظر، مثبت ارزیابی شدند. همزمان با این بررسی، جداسازی و تشخیص اشرفیا کولی O157H7 انجام شد. برای کشت اشرفیا کولی از محیط آبگوشت قلب و مغز به محیط مک کانکی آگار برده

و سپس از این محیط روی دو محیط VRBA و E.M.B کشت داده شد و بعد از رشد اشرفیا کولی روی محیط E.M.B از پرگنه های تیپیک آن روی محیط های T.S.I کشت داده و نتایج بررسی گردید. از بین کلونی های مشکوک میزان ۷۵٪ نمونه ها از لحاظ آلودگی به اشرفیا کولی مثبت شد و در هیچ یک از نمونه ها سروتیپ O157H7 مشاهده نشد. میزان بالای آلودگی در این استان را می توان بوجود عوامل آلوده کننده استخرهای پرورش ماهی مانند استفاده زیاد از کود های حیوانی جهت غنی سازی دانست و عدم رسیدگی کافی به محیط پرورش ماهی از نظر بار میکروبی آب استخرها و... را به آن مرتبط دانست.

**کلمات کلیدی:** اشرفیا کولی، خراسان رضوی، کپور معمولی، لیستریا مونوسیتوجنز

### مقدمه:

مصرف ماهی به عنوان یک منبع پروتئینی ارزان و قابل دسترس در حال گسترش می باشد از طرفی گزارش های روزافزون در مورد بیماری های ناشی از مصرف مواد غذایی آلوده از جمله ماهی و فراورده های دریایی وجود دارد. از جمله این باکتری های بیماری زا اشرفیا کولی می باشد. اشرفیا کولی اغلب نشانه بهداشتی برای آلودگی مدفوعی است و به دلیل طبیعت ماندگار و همه جایی بودنش در نواحی گرمسیری این ارتباط از آنجا قابل بحث است. برخی از سویه های اشرفیا کولی قادر به ایجاد بیماری قابل انتقال از راه مواد غذایی هستند و به آنتریت خفیف تا بیماری جدی و مرگ می انجامد. زمانی که از کود حیوانات به ویژه کود گاوها برای باروری استخرهای پرورشی ماهی استفاده می شود، خطر وجود سویه های بیماری زا اشرفیا کولی در آب استخر مطرح خواهد شد.

۱- دانشجوی دکترای دامپزشکی و عضو باشگاه پژوهشگران جوان دانشگاه آزاد اسلامی واحد گرمسار  
۲- دانشجوی دکترای دامپزشکی و عضو باشگاه پژوهشگران جوان دانشگاه آزاد اسلامی واحد گرمسار



استخرها متعاقباً در ارگان های مختلف (کبد، عضلات و روده) ماهی های پرورش در این استخرها بالا می رود (۶). هدف از این مطالعه بررسی میزان آلودگی دستگاه گوارش کپور معمولی پرورشی در استان خراسان رضوی به اشرشیا کولی و لیستریا مونوسیتوجنز می باشد تا با مشخص نمودن درصد آلودگی سعی در کاهش آن داشته باشیم.

### مواد و روش ها :

تعداد ۴۰ عدد ماهی کپور معمولی (*Cyprinus carpio*) با وزن متوسط ۴ کیلوگرم از ۱۰ استخر پرورشی در استان خراسان رضوی صید گردید. نمونه ها در کنار یخ با رعایت شرایط بهداشتی به آزمایشگاه منتقل شدند. محتویات شکمی ماهی ها در شرایط استریل خارج گردید و با محیط آبگوشت قلب و مغز در میکسر آزمایشگاهی مخلوط شده و در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد به مدت ۲۴ ساعت گرمخانه گذاری شد. جهت جداسازی اشرشیا کولی از نمونه ها، پس از غنی سازی در محیط آبگوشت قلب و مغز از محیط مک کانکی استفاده شد. کولنی های مشکوک به اشرشیا کولی را که بعد از ۲۴ ساعت گرمخانه گذاری محیط مک کانکی در ۳۷ درجه سانتی گراد ظاهر گردید، به محیط های اختصاصی VRBA<sup>1</sup> و E.M.B<sup>2</sup> انتقال داده شد. بعد از رشد اشرشیا کولی روی محیط E.M.B از پرگنه های تیبیک آن روی محیط های T.S.I<sup>3</sup> برده و پس از گرمخانه در ۳۵ درجه سانتی گراد به مدت ۲۴ ساعت قرار دادیم که پس از گذشت این مدت زمان، نتایج قرائت شد. در صورت رشد اشرشیا کولی بر روی محیط T.S.I، چون لاکتوز مثبت است سراسر لوله آزمایش به رنگ زرد در آمده و تولید گاز و اسید کرده و محیط از ته لوله کنده می شود. جهت شناسایی لیستریا محتویات شکمی ماهی ها به طور کامل به محیط آبگوشت غنی کننده لیستریا (L.E.B)<sup>4</sup> منتقل شد و با میکسر آزمایشگاهی به طور کامل مخلوط و به مدت ۷ روز در ۴ درجه سانتی گراد نگهداری شد و سپس

برای مثال شواهد خوبی در مورد عفونت های قابل انتقال از راه آب با اشرشیا کولی O157:H7 وجود دارد (۱). از دیگر باکتری های بیماری زا لیستریا مونوسیتوجنز می باشد که اطلاعات اندکی در مورد بیماری ناشی از آن در مواد غذایی دریایی وجود دارد. لیستریا مونوسیتوجنز بیماری ناشی از لیستریا را ایجاد میکند و به ویژه در گروه هایی که در معرض خطر قرار دارند باید مورد توجه باشد. گروه در معرض خطر شامل زنان باردار، افراد سرطانی، افراد دیابتی، مبتلایان به سیروز کبدی و نیز افراد مسن هستند. لیستریا مونوسیتوجنز بارها از محصولات پرورشی در مناطق معتدل جدا شده، اما به ندرت در محصولات شبلاتی از آب های گرمسیری جدا شده است (۱).

در مطالعه ای که توسط Niemi در سال ۱۹۸۲ انجام شد بیان گردید که آبها هرز و جاری که به مزارع پرورش ماهی می ریزند، حاوی مقادیر زیادی از باکتری های آنروباکتر، ستیروباکتر، آنروموناس، کلی فرمهای مدفوعی، اشرشیاکولی و استرپتوکوک مدفوعی بوده که بدین ترتیب سبب آلودگی مزارع پرورش ماهی می گردد (۸). در بررسی انجام شده توسط Berg در سال ۱۹۷۲ از مدفوع مرغان دریایی انواع سالمونلا از جمله سالمونلا تیفی موریم، سالمونلا ردینگ، سالمونلا انتریتیدیس جدا گردید و مدفوع این مرغها دریایی به عنوان یکی از راههای آلودگی آبها پرورش ماهی بیان گردید (۴). در بررسی که توسط pal و همکاران در سال ۱۹۹۲ انجام شد نشان داده شد که استخرهای پرورش ماهی که آبهای جاری سطحی و فاضلاب های آلوده به آنها راه داشته است همبستگی معنی داری بین جدا شدن اشرشیاکولی، از آبهای پرورشی که به این طرق آلوده شده بودند و آلودگی ارگانهای مختلف ماهی که در این آبها پرورش یافته بودند، وجود داشت (۱۰). در بررسی که توسط Fattal و همکاران در سال ۱۹۹۳ شد، نشان داد که متعاقب آلودگی استخرها با مدفوع حیوانات و یا تامین آب استخرهای پرورشی با آبهای هرز که اغلب حاوی باکتری های نشانگر بهداشتی از قبیل اشرشیاکولی هستند میزان این شاخص های بهداشتی در آب

1- Violet Red Bile Agar  
2- Eosin Methylene Blue Agar  
3- Triple Sugar Iron Agar  
4- Listeria Enrichment Broth Base



استرپتوکوک مدفوعی بوده که بدین ترتیب سبب آلودگی مزارع پرورش ماهی می‌گردد (۸). Heykai آمریکایی در سال ۱۹۸۳ و Clote در ۱۹۸۴ راه‌های دیگر آلودگی استخرهای پرورش ماهی را به باکتری بیماری‌زا، با منشا خشکی استفاده از سیستم تغذیه‌ای آب استخر با استفاده از آب‌های هرز دوباره مصرف قرار گرفته بیان گردید و نشان دادند که این گونه آبهای هرز اغلب حاوی مقادیر زیادی از باکتری‌های هوازی و بی‌هوازی و بالقوه بیماری‌زا از قبیل گونه‌های سالمونلا بوده و بیان کردند که پوست، آبشش و روده ماهیان پرورش یافته در این استخرها حاوی مقادیر زیادی باکتری‌ها از جمله باکتری‌های بالقوه بیماری‌زا بوده‌اند آنها بیان نمودند که تیمار این آب‌های هرز در این سیستم سبب کاهش آلودگی به مقدار قابل توجه می‌گردد (۷). در سال ۱۹۸۴ یک مورد شیوع مادر زادی بیماری ناشی از لیستریا مونوسیتوجنز ناشی از مصرف مواد غذایی دریایی، از سه زایشگاه در اوکلند نیوزلند گزارش شد سویه b مسئول بیشتر موارد از میان ۲۲ مورد بیماری بود علت شیوع به طور دقیق مشخص نشد ولی به نظر میرسد مصرف صدف و ماهی خام نقش داشت. بررسی مواد غذایی از نظر لیستریا مونوسیتوجنز بعد از جداسازی لیستریا مونوسیتوجنز از خرچنگ منجمد و نگهداری شده در یخچال در سال ۱۹۸۷ گسترش پیدا کرد گزارش رسمی بیماری ناشی از لیستریا در جدول ۱ نشان داده شده است. لیستریا مونوسیتوجنز بارها از محصولات پرورشی در مناطق معتدل جدا شده است اما به ندرت در محصولات شیلاتی از آب‌های گرمسیری جدا شده است در سیستم پرورشی ماهی در نواحی معتدل ممکن است به لیستریا آلوده باشند. بنابراین مصرف این محصولات به صورت خام یا بدون حرارت دادن در این مناطق خطر احتمالی به شمار می‌رود (۱). با توجه به نتایج به دست آمده در این مطالعه آلودگی به اشرشیا کولی در استخرهایی مشاهده گردید که از کودهای حیوانی جهت باروری استخر و آبها هرز استفاده شده است که با مطالعات گذشته هم خوانی دارد و هم چنین الودگی به لیستریا مونوسیتوجنز فقط در استخری مشاهده شد

روی آگارانتخابی لیستریا (حاوی نالیدیسیک) کشت داده شد. در انتها نیز بر روی پرگنه‌های مشکوک هر یک از پلیت‌های مورد نظر آزمایشات بیوشیمیایی و تفریقی انجام شد (۳ و ۱).

## نتایج :

در این بررسی فقط دو نمونه (۵٪) از نظر لیستریا مونوسیتوجنز مثبت شد که این دو نمونه از یک استخر پرورشی صید شده بودند که مکان این استخر از نظر آب و هوا نسبت به سایر استخرها سرد تر بود که می‌تواند به این علت باشد که لیستریا یک باکتری سرما دوست می‌باشد. همچنین تعداد ۳۰ نمونه (۷۵٪) از لحاظ آلودگی به اشرشیا کولی مثبت شد که نشان داد تمامی استخرهای مورد بررسی آلوده به اشرشیا کولی هستند که می‌تواند به علت باروری استخرها با کود حیوانی باشد و از هیچ یک از نمونه‌ها سروتیپ O157:H7 جدا نشد. (شکل ۱)

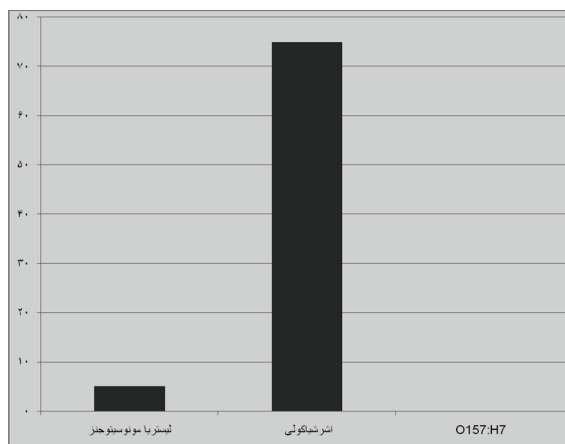
## بحث :

در مطالعه‌ای که توسط Niewolak و همکاران در سال ۱۹۹۵ انجام شد نشان داد که در استخرهای پرورشی که آب‌های هرز مزارع به آنها راه پیدا کرده است برخی باکتری‌ها از اشرشیا کولی، کلی‌فرم، استرپتوکوک مدفوعی و کلستریدیوم پرفرینجنس از نواحی مختلف (عضله، کبد، روده) ماهیان پرورشی یافت شده در این آب‌ها جدا گردید (۹). Din و همکاران در سال ۱۹۹۰ در ژاپن، یکی از راه‌های مهم آلودگی آب استخرهای پرورشی ماهی را تغذیه دستی هین استخرها با مدفوع حیوانات مختلف بیان نمود و نشان داد که احتمال جدا شدن انواع باکتری‌های بیماری‌زا از جمله سالمونلوز در آب وجود دارد و متعاقباً در ماهیان پرورشی در این آب‌ها از جمله در روده این ماهیان وجود دارد. در مطالعه‌ای دیگر توسط Niemi در سال ۱۹۸۲ انجام شد بیان گردید که آب‌های هرز و جاری که به مزارع پرورشی میریزند حاوی مقادیر زیادی از باکتری آنتروباکتر، سیتروباکتر، آئروموناس، کلی‌فرم مدفوعی، اشرشیاکولی و

صورت احشا تخلیه شده به بازار فروش عرضه گردد و در حین تخلیه احشا دقت صورت گیرد تا از انتقال آلودگی از راه روده به قسمت های دیگر تا حد ممکن جلوگیری شده و در نهایت شستشو به طور کامل صورت گیرد و حمل و نقل از محل صید تا محل عرضه باید کاملاً در شرایط بهداشتی صورت گیرد. در هنگام طبخ ماهی باید توجه گردد که درجه حرارت مناسب در مدت زمان کافی به تمام قسمت ها برسد چون با در نظر گرفتن درجه حرارت مناسب در مدت زمان کافی می توان به از بین رفتن باکتری ها در اثر حرارت اطمینان حاصل کرد.

که در منطقه با آب و هوای سرد تر بوده که این مورد نیز در راستای مطالعات انجام شده مشابه می باشد. حال برای جلوگیری از گسترش این آلودگی ها ما باید به سمت استفاده از روش های بهداشتی حرکت کنیم که این امر موجب کاهش استفاده از فاضلاب حیوانی و انسانی به عنوان بارور کننده می باشد. در این استخر ها باید کنترل کافی از نظر عدم ورود آب های آلوده، پساب های صنعتی و فاضلاب ها به استخر عمل آید. آب استخرها مرتب از لحاظ شمارش باکتریایی کنترل کیفی گردند و از نظر وجود اشرشیاکولی در آب و حد استاندارد آن اطمینان حاصل نمود. ماهی پرورشی باید به

شکل ۱- نمودار درصد آلودگی روده کپور ماهیان به لیستریا مونوسیتوجنز، اشرشیاکولی و سویه O157:H7





جدول ۱ - موارد گزارش رسمی بیماری ناشی از لیستریا مونوسیتوجنز از مصرف ماهی و دیگر آبزیان خوراکی

محل وقوع (سال)	تعداد موارد بیماری	اشکال بالینی	تعداد وقوع مرگ	نوع غذا	تعداد باکتری شمارش شده (cfu/g)	سویه سومی
امریکا (۱۹۸۹)	۲	?/۲	۰	میگو	نامشخص	۴b
ایتالیا (۱۹۸۹)	۱	۱/۰	۰	ماهی	نامشخص	۴b
استرالیا (۱۹۹۱)	۲	۲/۰	۰	فیله ماهی دودی	۱*۱۰۷	نامشخص
زلاند نو (۱۹۹۲)	۴	۴/۰	۰	فیله ماهی دودی	نامشخص	۱/۲b
کانادا (۱۹۹۶)	۲	۲/۰	نامشخص	گوشت خرچنگ	۱*۱۰۹	۱/۲b
سوئد (۱۹۹۴)	۹-۶	۶/۳	۲	خوراک قزل الا	۱۰۶*۲/۵- >۱۰۰	۴b
فنلاند (نامشخص)	۵	۵/۰	۰	قزل الای دودی (به روش سرد)	۱۰۵*۱/۹	۱/۲a

#### منابع:

6-Fattal, B.A, Dotan, V.J. 1993. Microbiological purification of fish grown in facally contaminated commercial fish pond. *enviromental-quality-and-Ecosystem - Stability*. 27(78):303,311

7-Heykai T.W.C.P, Henderson.S, and Freeze, M. 1983. Bacteriological virological and chemical evaluation of an waste water-aquaculture system. 17(12), 1749, 1755.

8-Niemi, M.O and Tapidaliness, I.T. 1982. Faecal indicator bacteria at fish farms *hydrobiologia*. 49.64. 171.175

9-Niewolk, S. Tucholski, S. 1995. Sanitary and bacteriological study of common carp cared in ponds supplied with biologically pretreated sewage. 203.215

10-Pal, D. Gupta. C. 1992. Microbial Pullution in water and its effect on fish. *Aout-Anim. Health*. 32, 39.

۱- آخوند زاده، افشین. ابراهیم زاده موسوی، حسینعلی. ۱۳۸۷. بهداشت مواد غذایی با منشا آبزیان چاپ اول. انتشارات دانشگاه تهران. ص ۶، ۷، ۵۳، ۵۴، ۵۵، ۵۷ و ۶۶.

۲- رضویلر، ودود. ۱۳۸۷. میکروبیهای بیماریزا در مواد غذایی و اپیدمیولوژی مسمومیت های غذایی. چاپ سوم. انتشارات دانشگاه تهران. ص ۸۹، ۹۰، ۹۱، ۹۳، ۹۶، ۱۴۷، ۱۴۸، ۱۴۹ و ۱۵۰.

۳- کریم، گیتی. ۱۳۷۸. آزمون های میکروبی مواد غذایی چاپ سوم انتشارات دانشگاه تهران. ۷۷-۸۶، ۲۰۵، ۲۰۶، ۲۰۷.

4- Berg. R.w and Anderson . A.W. 1972. Salmonella and Edward sillatara in gulrecess of contamination. 1-10

5-Cloete, T.E. 1995. Seafood micro organism and safety. *J.Food. Drug. Anal*, 3, (39), 1334

