Isolation of *Pseudmonas flurecences* and *Aeromonas hydrophila* from *Siganus rivulatus* and *Siganus luridus* in the water coastal of Latakia

Dr. Mouina Badran*
Dr. Issa Kbibou**
Taemaa Nassour***

(Received 15 / 4 / 2023. Accepted 5 / 6 /2023)

□ ABSTRACT □

This research was conducted to isolate *Pseudmonas flurecences* and *Aeromonas hydrophila* bacteria from some Siganus fishes. Where 20 fish samples were collected from marine waters at the Assaid and Annozha port site (which is considered a polluted area) during the summer and winter seasons of 2022/2023. Some morphometric and biological measurements (height, weight, and sex) were carried out, in addition to a microbiological study of intestines, gills, and liver

The results showed that the isolates of *Pseudmonas flurecences* were round in shape, shiny, medium to large in size, with a smooth edge, ranging in color from pale white to yellow, while the *Aeromonas hydrophila* isolates were round in shape, medium and small, with a domed edge, and their color ranged from pale white to yellow

The results also showed increased mucus secretion, bleeding and congestion in the gills and skin, in addition to ascites in the abdominal area**.**

Keywords:, Siganus, *Pseudmonas flurecence* ، *Aeromonas hydrophila*, Assaid and Annozha port, Syrian coastal.

Copyright **:**Tishreen University journal-Syria, The authors retain the copyright under a CC BY-NC-SA 04

* **Associate Professor, Department of Marine biology at HIMR, Tishreen University, Lattakia, Syria.**
** **Professor, Department of Soil and Water Sciences, Faculty of Agriculture, Tishreen University, Lattakia, Syria.**
*** **PhD Student , Department of Marine biology at HIMR, Tishreen University, Lattakia, Syria.**

عزل بكتريا *Pseudmonas flurecences* و*Aeromonas hydrophila* من أسماك الغريبة الرملية(*Siganus rivulatus*) والغريبة الصخرية(*Siganus luridus*) في شاطئ مدينة اللاذقية

د. معينة بدران*

د. عيسى كبيبو**

تيماء نصور***

(تاريخ الإيداع 15 / 4 / 2023. قبل للنشر في 5 / 6 / 2023)

□ ملخّص □

أجري هذا البحث لعزل بكتريا *Pseudmonas flurecences* و*Aeromonas hydrophila* من بعض أسماك الغريبة Siganus . حيث جمعت 20عينة سمكية من المياه البحرية في منطقة ميناء الصيد والنزهة (والتي تعتبر منطقة ملوثة) وذلك خلال فصلي الصيف والشتاء لعام 2023/2022. أجريت بعض القياسات المورفومترية والبيولوجية (الطول، الوزن، والجنس) بالإضافة إلى الدراسة الميكروبيولوجية للأمعاء والغلاصم والكبد .

بينت النتائج أن عزلات *Pseudmonas flurecences* كانت مستديرة الشكل، لامعه، متوسطة الى كبيرة الحجم، ذات حافة ملساء، تراوح لونها بين الأبيض الباهت والأصفر .بينما عزلات *Aeromonas hydrophila* كانت كانت مستديرة الشكل متوسطة وصغيرة ذات حافة مقببة و يتراوح لونها بين الأبيض الباهت والأصفر.

كما بينت النتائج زيادة إفراز المخاط ونزيف واحتقان في منطقة الغلاصم والجلد بالإضافة الى استسقاء في منطقة البطن.

الكلمات المفتاحية: Siganus، *Pseudmonas flurecence* ، *Aeromonas hydrophila*، ميناء الصيد والنزهة، الساحل السوري.

حقوق النشر : مجلة جامعة تشرين- سورية، يحتفظ المؤلفون بحقوق النشر بموجب الترخيص CC BY-NC-SA 04

*أستاذ مساعد، قسم الثروة السمكية ، المعهد العالي للبحوث البحرية ، جامعة تشرين، اللاذقية، سورية

**أستاذ، قسم علوم التربة والمياه، كلية الزراعة، جامعة تشرين، اللاذقية، سورية

***طالبة دكتوراه ،قسم البيولوجيا البحرية ،المعهدالعالي للبحوث البحرية، جامعة تشرين ، اللاذقية، سورية

مقدمة:

تعتبر الأسماك من أهم المكونات الحية للبيئة البحرية، وتشمل عدداً كبيراً من الأنواع وتمتاز الأسماك بارتفاع نسبة البروتين الحيواني فيها، كما تعتبر لحوم الأسماك مفيدة في معالجة العديد من الأمراض، كما أن الأهمية الاقتصادية للأسماك كبيرة، وهي تعد من أوائل الأغذية التي عرفها الإنسان على مر العصور، وقد كانت الغذاء الأساسي للإنسان البدائي إلى جانب الفواكه والنباتات، وتمثل الأسماك 20% من البروتين المستهلك على المستوى العالمي.

تعتبر امراض الأسماك الناتجة عن العدوى البكتيرية من المشاكل الرئيسية في تربية الأحياء المائية، حيث توجد بشكل طبيعي في بيئة الأسماك وتحت ظروف اجهاد معينه تسبب خسائر اقتصادية فادحة لمزارع الأسماك (Khalil *et al,* 2010).

يعتبر جنس Pseudomonas ذو انتشار واسع في الأحواض المائية والمزارع السمكية، يضم هذا الجنس خمسة أنواع تم وصفها بأنها مسببة للأمراض التي تصيب الأسماك، وهي مسببة للأمراض عند الانسان والحيوانات والكائنات المائية، وقد تم وصف أنواع هذا الجنس بأنها واحدة من أكثر العوامل البكتيرية المعدية في الأسماك المستزرعة حيث تسبب أمراض عديدة للأسماك منها التقرحات، تسمم الدم، سقوط الحراشف، استسقاء البطن وجحوظ العينين (Darak, 2015).

يمكن أن يعزل جنس Aeromonas من كافة البيئات الميكروبية، ويمتاز بأنه واسع الانتشار، يمكن أن يعزى هذا الانتشار الواسع لـ Aeromonas *sp* كونه يشكل جزءاً هاماً من الفلورا المعوية الطبيعية للأسماك (Sarder, 2015).

كما تعد بكتريا *Aeromonas hydrophila* العامل المسبب الرئيسي لمرض تسمم الدم النزفي الذي يظهر على شكل تقرحات جلدية حمراء، كما يتميز هذا المرض بتورم البطن والفم يكون أحمر، وقد يحدث تسمم الدم كعدوى حادة أو مزمنة أو كامنة (sarder, 2015).

فصيلة Siganidae هي مجموعة صغيرة نسبياً من الأسماك التي تتغذى على الطحالب البحرية، كما أن أفراد هذه الفصيلة من أشهر الأنواع التي هاجرت واستوطنت الموائل الجديدة بنجاح ومن هنا انطلقت تسميتها المحلية بالغريبة نسبة الى هجرتها من موائلها الأساسية الى أماكن جديدة والاستقرار فيها، تضم هذه الفصيلة جنس واحد Siganus و30 نوع (Badran, 2013) يوجد خمس أنواع من هذه الفصيلة في البحر الأحمر هاجر منها أربعة أنواع الى شرق المتوسط (*Siganus fuscescens*,*Siganus rivulatus*, *Siganus javus*, *Siganus luridus*).

أهمية البحث وأهدافه:

أهمية البحث:

تعتبر أسماك فصيلة Siganidae ذات أهمية اقتصادية وغذائية كبيرة لشريحة واسعة من مستهلكي الأسماك في سورية ومعظم بلدان العالم، وذات انتشار كبير نظراً لتحملها أشكال عديدة من التلوث. لذا وجب الإلمام بعدة جوانب متعلقة بأنواع هذه الفصيلة سواء في المياه الطبيعية أو في المزارع ومنها النوعان الغريبة الرملية *Siganus rivulatus* والغريبة الصخرية ***Siganus luridus*** المصطادان من ميناء الصيد والنزهة ومن هنا تأتي أهمية هذا البحث.

أهداف البحث:

- الكشف الحسي للأفراد المدروسة.
- عزل بكتيريا *Pseudomonas fluorescence* و *Aeromonas hydrophila*.

وصف النوع السمكي المدروس:

الغريبة الرملية:(Forsskål & Niebuhr, 1775) *Siganus rivulatus*:

الوصف المورفولوجي:

الجسم بيضوي مضغوط جانبيا، اللون بني أو أخضر زيتوني، تحتوي الزعنفة البطنية على شوكتين منفصلتين بوساطة ثلاث أشعه زعنفية طرية، الزعنفة الظهرية ذات 12 شوكة و 10 من الأشعة الطرية، الحافة الخلفية للزعنفة الذيلية مقعرة قليلاً مما يعطيها شكل زعنفة متفرعة، الحراشف صغيرة جداً ومنغرسة في الجسم الشكل (1).

تعيش أفراد هذا النوع فوق القيعان الرملية والصخرية على أعماق لا تتجاوز 30 متر، تتغذى على الأعشاب والنباتات البحرية (Badran, 2013).

الشكل (1): عينة سمكية من نوع الغريبة الرملية *Siganus rivulatus* مصطادة من منطقة الدراسة بتاريخ 2022/8/23

الغريبة الصخرية *Siganus luridus* (Rüppel, 1829):

الوصف المورفولوجي:

الجسم بيضوي الشكل، مضغوط من الجانبين، عريض، الحراشف صغيرة ومغروسة في الجسم، الزعنفة الظهرية ذات 13 شوكة 10 أشعة طرية، الحافة الخلفية للزعنفة الذيلية مستقيمة (مبتورة)، لون الجسم أخضر زيتوني مائل للبني قاتم، يعد هذا النوع من الأنواع المهاجرة من المحيط الهندي الى شرق المتوسط عبر قناة سويس الشكل (2) (*Sabour et al*, 2004).

الشكل (2): عينة سمكية من نوع الغريبة الصخرية *Siganus luridus* مصطادة من منطقة الدراسة بتاريخ 2022/8/23

طرائق البحث ومواده

- **<u>موقع الدراسة:</u>**

صيدت الأسماك من منطقة ميناء الصيد والنزهة، الواقعة في مدينة اللاذقية (الساحل السوري) ,"20 ´46°35E" N35°32´15" وقد تم اعتماد هذا الموقع الذي تصب فيه قناة الصرف الصحي وهو ما يسمى بفنار البحر، حيث توجد الشاخصات الدّالة على مرور أنابيب النفط. تبلغ مساحته حوالي 2كم2 تقريباً ويتراوح عمق العمود المائي ما بين 3.5-16م. يوجد في هذه المنطقة ثلاثة مصبات لمجاري الصرف الصحي موزعة على امتداد 1كم. من أهم ميزات هذا الموقع أنه يعد المدخل إلى ميناء مدينة اللاذقية، وهو محدود تماماً من جميع الجهات (الشكل3) وفي دراسة و Keali,*et al,*2018 بينت أن تلوث مياه ميناء الصيد والنزهة ناتج عن الملوثات النفطية في منطقة أفاميا الناتجة عن ملوثات السفن وحركتها داخل وخارج الميناء ،اذ تنتقل الملوثات عبر السلسلة الغذائية الى الأحياء المائية، بالإضافة الى تأثره بالمخلفات المنزلية المنقولة عبر مياه الصرف الصحي لمدينة اللاذقية ومن ثم فهو يعد منطقة ملوثة .(Halloul, 2015)

الشكل(3): صورة توضح موقع الدراسة (ميناء الصيد والنزهة) ومنطقة أفاميا

- **العمل الحقلي:**

جمع 20 فرد من نوعي الغريبة(عشرة افراد من النوع ***Siganus luridus*** وعشرة أفراد من النوع ***Siganus rivulatu***) بوساطة الصنارة خلال الفترة من 7-1-2022الى 17 -1- 2023 وكانت متباينة الحجم، ثم نقلت الأسماك حية مباشرة بواسطة أوعية بلاستيكية مجهزة بفتحة تهوية إلى المخبر لإجراء الدراسة المخبرية.

العمل المخبري:

-الدراسة البيومورفومترية:

غسلت العينات السمكية بالمحلول الملحي الفيزيولوجي المعقم لإزالة الرمل والأوساخ والأحياء الدقيقة أيضاً. بعد ذلك فحصت الأسماك خارجياً بدقة بالعين المجردة للكشف عن المظاهر المرضية وشمل الفحص الجلد، والغلاصم وذلك حسب (Sarder, 2015).

-الدراسة الميكروبولوجية:

أخذت عينات من الأعضاء الخارجية والداخلية (الغلاصم، الأمعاء، الكبد) وتمت مجانستها بالمحلول الملحي الفيزيولوجي المعقم (El-Enany *et al.*, 2011).

استخدمت تقنية التخفيف المتسلسل للدراسة البكتيرية وذلك حسب طريقة الباحث Sarder (2015)، أخذ 1 غرام من كل من الغلاصم والأمعاء والكبد وخففت في 9 مل من محلول فيزيولوجي، تم التخفيف 3 مرات. أخذ 100 ميكرولتر من العينات الممددة بوساطة ماصة دقيقة Micropipette وفرشت على أطباق Aeromonas agar وPseudomonas agar، ثم حضنت الأطباق بدرجة حرارة 37 مْ لمدة 48 ساعة (Moustafa *et al.*, 2010).

-التعداد الكلي للبكتريا:

بعد 48 ساعة من الحضن جمعت الأطباق التي نمت عليها مستعمرات منفصلة من أجل أجراء عملية العد. وقدر تعداد البكتريا بعدد المستعمرات البكتيرية النامية في واحد غرام (CFU/g).

- تنميط العزلات:

تم تنميط العزلات البكتيرية البحرية المعزولة من خلال دراسة الصفات الزرعية والشكلية للمستعمرات والفحص المجهري والاختبارات الكيمياحيوية.

النتائج والمناقشة:

الكشف الحسي:

لوحظ زيادة إفراز المخاط ونزيف واحتقان في منطقة الغلاصم والرأس (الشكل 4) بالإضافة إلى استسقاء في منطقة البطن (الشكل5) وهذا يتوافق مع دراسة Ashraf,A واخرون 2016 و يعود ذلك إلى السموم والأنزيمات المحللة للبروتينات التي تفرزها البكتريا الممرضة (El-Enany *et al.*, 2011).

أظهرت نتائج ما بعد النفوق أن الكبد كان متضخماً وشاحباً عند بعض الأفراد (ثلاثة أفراد من الغريبة الرمليةو)(الشكل 6) وهذا يتوافق مع دراسة Eisa 2010 خلال دراسته على أسماك البلطي لاحظ وجود تضخم واحتقان في الطحال والكلى وكان لون الكبد ما بين البني الداكن إلى الأصفر الباهت. وأظهرت نتائج التشريح وجود سائل دموي في جوف البطن وكان الكبد شاحب في بعض الأفراد ومتضخم في أفراد أخرى (Moustafa *et al.*, 2010).

الشكل(4): وجود مادة مخاطية في منطقة الرأس عند الغريبة الرملية.

الشكل(5): استسقاء البطن عند سمك الغريبة الرملية.

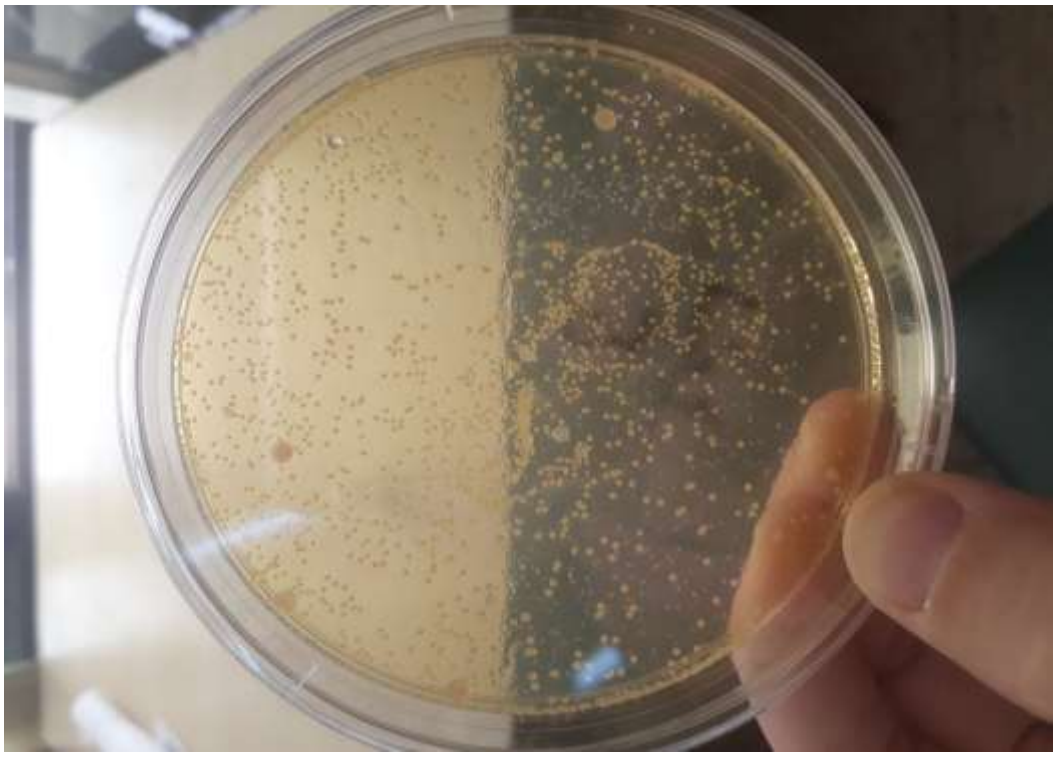
الشكل(6): تضخم الكبد عند سمك الغريبة الصخرية.

- تنميط عزلات البكتريا:

أجريت الدراسة المخبرية والمجهرية والاختبارات الكيمياحيوية لتحديد هوية عزلات بكتريا *A. hydrophila* و *P. fluorescence* المعزولة من عينات سمك الغريبة.

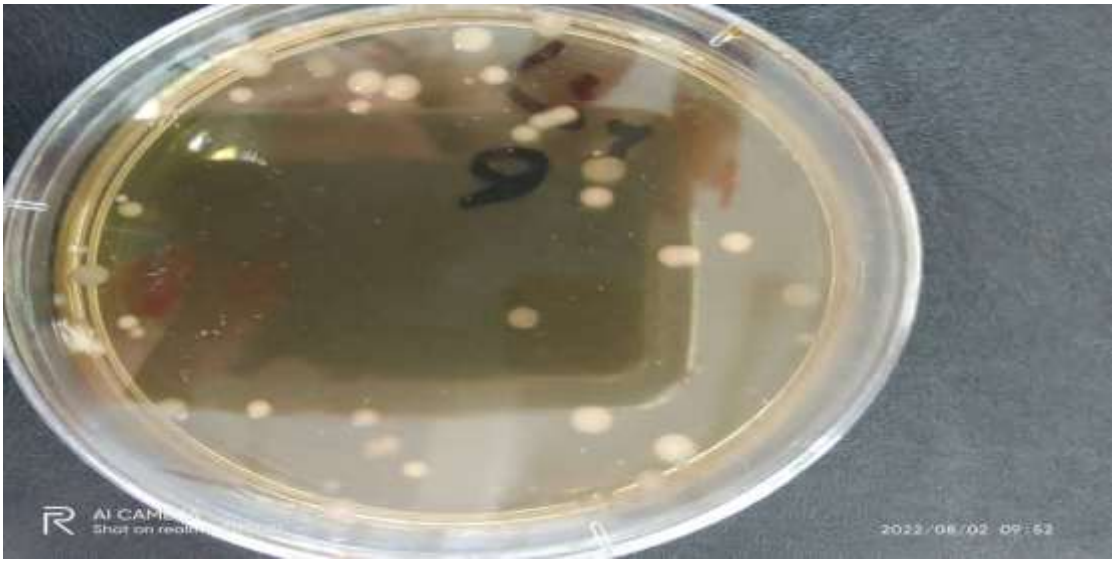
الصفات المزرعية والشكلية للعزلات الجرثومية:

أظهرت النتائج أن المستعمرات النامية على وسط Aeromonas Agar كانت مستديرة الشكل، متوسطة، صغيرة ذات حافة مقببة و يتراوح لونها بين الأبيض الباهت والأصفر الشكل (7). توافقت هذه النتيجة مع الدراسات السابقة من حيث شكل ولون وحجم المستعمرات (Sarder, 2015; Ali *et al.*, 2016; Ahmed *et al.*, 2018).



الشكل (7): المستعمرات النامية على وسط Aeromonas Agar.

كما أظهرت النتائج أن المستعمرات النامية على وسط Pseudomonas agar كانت مستديرة الشكل، لامعه، متوسطة الى كبيرة الحجم، ذات حافة ملساء، تراوح لونها بين الأبيض الباهت و الأصفر الشكل (8) . توافقت هذه النتيجة مع الدراسات السابقة من حيث شكل وحجم ولون المستعمرات (Ashraf,A*et al.*2019) .



الشكل(8): المستعمرات النامية على وسط Pseudomonas agar.

الفحص المجهري:

أظهر الفحص المجهري للعزلات الجرثومية أن خلايا عزلات Aeromonas عصوية الشكل ذات نهايات مدورة، إما مفردة أو بشكل خلايا مزدوجة. بدت الخلايا حمراء اللون لعدم تلونها بصبغة غرام (سالبة صبغة غرام) عند فحصها بالمجهر الضوئي بالتكبير 100X، تبدو خلايا الـ *Aeromonas hydrophila* على شكل عصيات ذات نهاية مدورة، سلبية صبغة الغرام ولكن في بعض الأحيان يمكن أن تظهر على شكل عصيات مكورة. تعد من البكتريا اللاهوائية، كيميائية التغذية، درجة الحرارة المثلى لنمو أنواع هذا الجنس بين 22–37 درجة مئوية، درجة الحموضة بين 4.5 – 9 ودرجة الملوحة بين 0 – 4 ‰ (Sarder, 2015).

كما أظهر الفحص المجهري أن خلايا عزلات Pseudomonas عصوية الشكل ذات نهاية مدورة مفردة. بدت الخلايا حمراء اللون عند فحصها بالمجهر الضوئي بالتكبير 100X، يعتبر النوع البكتيري *Pseudomonas fluorescence* عصيات سالبة غرام متحركة بواسطة زوجين من السياط ، تفرز صبغة مضيئة (فلورسيسين)، تنمو عند الدرجة 25–30 درجة مئوية (Darak, 2015).

نتائج الاختبارات الكيمياحيوية:

أجريت للعزلات الجرثومية البحرية التي تم عزلها على وسط *A. hydrophila* و وسط *P. fluorescence* الصلب عدد من الاختبارات الكيمياحيوية للتأكد من هويتها. بينت نتائج اختبارات الكيمياحيوية أن عزلات الـ *Aeromoans sp.* كانت إيجابية الأندول والكاتلاز والأوكسيداز، وقادرة على إرجاع النترات إلى نتريت. بمقارنة هذه النتائج بالمفاتيح التصنيفية للـ*A. hydrophila* وبالرجوع إلى دليل بيرجي (Bergey.s Manual of Systematic bacteriology) عام 1974 لوحظ أن هذه العزلات الجرثومية هي (*A. hydrophila* Buchanan, R, 1974) . توافقت هذه النتيجة مع دراسات سابقة (Sarder, 2015; Ali *et al*., 2016; Ahmed *et al*, 2018).

كما بينت نتائج اختبارات الكيمياحيوية أن عزلات *Pseudomonas. Sp* كانت إيجابية الكاتلاز والأوكسيداز، متحركة. وبالرجوع إلى دليل بيرجي (Bergey.s Manual of Systematic bacteriology) عام 1974 لوحظ أن هذه العزلات الجرثومية هي *P.fluorescence* (Buchanan, R, 1974) توافقت هذه النتيجة مع دراسة (Ashraf,A *et al.*2019).

الاستنتاجات والتوصيات:

1-تم عزل النوعين *A. hydrophila* و *P.fluorescence* من أفراد كل من نوعي الغريبة الصخرية *Siganus luridus* والغريبة الرملية *Siganus rivulatus*.

2-تبين من خلال الفحص السريري أن بعض الأفراد السمكية كانت مصابة بنزوفات مختلفة بالإضافة الى تضخم في الكبد.

3- نظراً لأهمية الغذاء البحري بالنسبة للإنسان لذا من الضروري متابعة الدراسات حول تقييم التلوث البكتيري للأسماك البحرية.

References:

Ashraf, A;. Maarouf,A;. Ahmed,G (2016). Detection of Virulence factors of Pseudomonas species isolated from fresh water fish by PCR. BENHA VETERINARY MEDICAL JOURNAL. 30, 199-207.

Ashraf,A; El Hofy, F; Aya,A, (2019). Bacteriological studies on Aeromonas and pseudomonas species in Nile tilapia (Oreochromis niloticus). Benha Veterinary Medical Journal. 37, 144-148.

Ahmed, H.; Mohamed, M.; Rezk, M.; Gharieb, R. and Abed EL- Maksoud, S. (2018). *Aeromonas hydrophila* in Fish and Humans; Prevalence, Virulotyping and Antimicrobial Resistance. Original Research Article. 20, 113 -124.

Ali, S.; Akhter, S.; MuhammadD, A.; Khan, I.; Khan, W.; Iqbal, M.; Umar, S.; Ahmed, H. and Ali, Q. (2016). *Identification, Characterization and Antibiotic Sensitivity of Aeromonas hydrophila, a Causative Agent of Epizootic Ulcerative Syndrome in Wild and Farmed Fish from Potohar*, Pakistan. Pakistan Journal of Zoology. 3, 899-901.

Azzuro, Ernesto; Tiralongo, Francesco (2020). First record of the mottled spinefoot Siganus fuscescens (Houttuyn, 1782) in Mediterranean waters: a Facebook based detection. Mediterranean Marine Science. 448-451.

Badran, Mouina (2013). Nutritional requirements (protein-fat) of young *Liza aurata* fish in different degrees of salinity. Department of Marine Agriculture. PhD thesis at the Higher Institute for Marine Research, Tishreen University: Syria

Buchanan, R& Gibbons, N (1974). Bergey manual of determinative bacteriology. Eight Edition, William& Wilkins, Baltimore, USA. 22, 1-573.

Darak, Omprakash; Barde, Ravi (2015). Pseudomonas fluorescens associated with Bacterial Disease in Catla catla in Marathwada Region of Maharashtra. International Journal of Advanced Biotechnology and Research. 6, 189-195.

Eissa, N.; *Abou El-Ghiet*, E.; *Shaheen*, A.; *Abbass*, A. (2010). Characterization of Pseudomonas Species Isolated from Tilapia*"Oreochromis niloticus*" in Qaroun and Wadi-El-Rayan Lakes, Egypt. Global Veterinaria. 2, 116-121.

El- Enany, M. M.; Ibrahim. H. E.; Abou El-atta, M. and El-Adawy, M. (2011). Bacteriological and Histopathological Studies on Some Bacterial Pathogens Causing diseases in Cultured Mugil capito. S. C.V. M. J, XVI. 1, 1-12.

Halloul, Rasha (2015). A quantitative and qualitative study of fecal contamination microbes and their relationship with chemical properties For coastal waters opposite the city of Latakia. Master Thesis. Department of Marine Biology. High institute for Marine Research, Tishreen University, Syria

Keali, N; Tarboush, A; Ghadeer, S. Marine water pollution in the Assaid and Annozha port and in the commercial port of Latakia city on the coasal Syrian (2018). https://www.researchgate.net/publication/332414120.

Khalil S.A.; Khalil R.H.; Saad,T.T. and Safaa M. H. (2010). Studies on Pseudomonas Septicemia among Cultured Oreochromus niloticus. Journal of The Arabian Aquaculture Society. 5, 55-64.

Moustafa, M.; Mohamed, L. A.; Mahmoud, M. A.; Soliman, W. S. and Gendy, M. Y. (2010). Bacterial Infection Affecting Marine Fishes in Egypt. Journal of American Science. 6, 603-612.

Sabour, W; Saad, A ; AL-smman ; A(2004). A morphological and histological study of the development of gonads in female *Siganus luridus* (Rüppell,1828) of the Siganidi family in Syrian marine waters.26. 103-116.

SARDER, H. (2015). Prevalence and Antibiotic Susceptibility of Aeromonas hydrophila Isolated from Fresh Water Fishes. Department of Fisheries University of Dhaka.