Isolation and identification of Aeromonas hydrophila from Liza aurata and study the effect of antibiotics.

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

(Received 4 / 3 / 2024. Accepted 2 / 4 /2024)

□ ABSTRACT □

This research was conducted to isolate *Aeromonas hydrophila* from *Liza aurata* . Where 20 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 2019/2020. Height and weight were measured and sex was determined, in addition to microbiological study of the intestines, gills and liver

The results showed that the *Aeromonas hydrophila* isolates were round in shape, medium and small, with a domed edge, and their color ranged from pale white to pink.

The results showed that the *A.hydrophila* isolates showed the highest sensitivity to Chloramphenicol, While it showed moderate sensitivity to the antibiotics tetracycline and meropenem, while they were resistant to ampicillin.

Keywords: Aeromonas hydrophila, Assaid and Annozha port, Liza aurata, chloramphenicol, Tetracycline, Meropenem, Ampicillin.

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 Agricultural Engineering, Tishreen University. lattakia- Syria**
*****Postgraduate Student(PhD), Department of Marine biology at HIMR, Tishreen University. lattakia- Syria.**

عزل وتحديد جراثيم Aeromonas hydrophila من سمك البوري دهبان Liza aurata ودراسة تأثير الصادات الحيوية:

د. معينة بدران*

د. عيسى كبيبو**

تيماء نصور***

(تاريخ الإيداع 4 / 3 / 2024. قبل للنشر في 2 / 4 / 2024)

□ ملخّص □

أجري هذا البحث لعزل بكتريا *Aeromonas hydrophila* من سمك *Liza aurata*. حيث جمعت 20عينة سمكية من المياه البحرية في منطقة ميناء الصيد والنزهة (والتي تعتبر منطقة ملوثة) وذلك خلال فصلي الصيف والشتاء لعام2020/2019. تم قياس الطول والوزن وحدد الجنس بالإضافة إلى الدراسة الميكروبيولوجية للأمعاء والغلاصم والكبد .

بينت النتائج أن عزلات *Aeromonas hydrophila* كانت كانت مستديرة الشكل متوسطة وصغيرة ذات حافة مقببة و يتراوح لونها بين الأبيض الباهت والوردي.

كما بينت النتائج أن العزلات أبدت أعلى حساسية للصاد الحيوي الكلورامفينكول، بينما أبدت حساسية متوسطة للصادين الحيويين التتراسكلين والميروبينم، في حين كانت مقاومة للأمبيسلين.

الكلمات المفتاحية: *Liza aurata*، *Aeromonas hydrophila*، ميناء الصيد والنزهة، الكلورامفينكول، التتراسكلين، الميروبينيم، الأمبسلين.

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 الهندسة الزراعية، جامعة تشرين، اللاذقية، سورية.**

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

مقدمة:

تعد الثروة السمكية إحدى أهم المكونات الحية في البيئة المائية، التي تتمتع بخصائص فيزيائية وكيميائية وحيوية تؤثر على حجم وتركيب المخزونات الحيوية لهذه الثروة (FAO, 2008). وتمتاز الأسماك بارتفاع نسبة البروتين الحيواني فيها وسهولة هضمه.

من هذه الأسماك تعد فصيلة البوريات Mugilidae من الفصائل المنتشرة في جميع أنحاء العالم في المياه الساحلية المعتدلة والمدارية، ويعد النوع بوري دهبان *Liza aurata* من الأنواع المتوافرة في المياه الشاطئية، كما يتميز بسهولة الحصول عليه وتحمله لتغيرات العوامل الهيدرولوجية (Ibrahim, 2011).

تتعرض الأسماك للعديد من المسببات المرضية التي تؤثر سلباً على حياتها(Daboul, 2008). تتدرج المسببات الحيوية لهذه الأمراض بين فيروسية، بكتيرية، فطرية أو طفيلية.

ويعد النوع *Aeromonas hydrophila* أهم المسببات المرضية المثيرة للقلق، قد يتسبب في أمراض معوية وخارج معوية عند البشر، كما تسبب التسمم الدموي وتقرحات ونزف دموي للأسماك ينتج عنها نسبة نفوق مرتفعة (Sabbagh, 2017).

أهمية البحث وأهدافه:

أهمية البحث:

نتيجة تزايد الطلب على الأسماك البحرية كمصدر غذائي غني بالبروتين الحيواني والأحماض الدسمة الغير المشبعة من جهة وقلة الموارد البحرية من الأسماك من جهة أخرى تعتبر أسماك البوري ذات أهمية اقتصادية وغذائية كبيرة لشريحة واسعة من مستهلكي الأسماك في سورية ومعظم بلدان العالم وذات انتشار كبير في معظم البحار نظراً لتحملها أشكالاً عديدة من التلوث.

أهداف البحث:

- عزل وتحديد هوية بكتريا *Aeromonas hydrophila*.
- تحديد أنواع الصادات الحيوية المؤثرة على هذه الجراثيم.

وصف النوع السمكي المدروس:

الوصف المورفولوجي:

يمتلك هذا النوع السمكي جسما متطاولا مضغوطا قليلا من جانب الى جانب، رأس قصير ومسطح منتهي بفم عريض، الأسنان صغيرة جدا يمكن رؤيتها بصعوبة، العين غير مغطاة بغطاء دهني سميك، الحراشف تمتد نحو الأمام الى قمة الرأس حتى فتحتي الأنف الأماميتين، الزعنفة الشرجية عادة لها تسع أشعه لينة، الظهر رمادي مزرق، والبطن أبيض فضي اللون غالبا مع وجود خطوط طولانية رمادية (الشكل1).

توجد الأفراد الصغيرة لهذا النوع في المناطق الساحلية غير العميقة عند قنوات الصرف الصحي، ومصبات الأنهار الغنية بالمواد العضوية.

تعد أسماك هذا النوع متنوعة التغذية، اذ تتغذى على اللافقاريات الصغيرة القاعية والهائمة والسطحية المنجرفة من اليابسة، وعلى المواد العضوية المترسبة على القاع، كما يمكن للأفراد البالغة التغذي من خلال كشط الحشف البحري (Badran, 2013).

الشكل(1): البوري دهبان *Liza aurata*

طرائق البحث ومواده:

موقع الدراسة:

صيدت الأسماك من منطقة ميناء الصيد والنزهة، الواقعة في مدينة اللاذقية "N35°32´15 ,"20 ´E35°46 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 مصب 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 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.

الشكل (2): موقع الدراسة

جمع وإعداد العينات:

أجريت الدراسة في مختبرات المعهد العالي للبحوث البحرية في جامعة تشرين خلال العام 2020/2019، تم فيها جمع 20 فرد من البوري دهبان *Liza aurata* خلال فصلي الصيف والشتاء من موقع الدراسة باستخدام الصنارة ووضعت في أكياس لنقلها إلى المختبر مباشرة، نقلت الأسماك حية مباشرة إلى المخبر بواسطة أوعية بلاستيكية مجهزة بفتحة تهوية لإجراء الدراسة المخبرية حيث أخذت قياسات الطول والوزن وتم تحديد الجنس.

الدراسة الميكروبيولوجية:

أخذت عينات من الأعضاء الخارجية والداخلية (الغلاصم، الأمعاء، الكبد) وتمت مجانستها بالمحلول الملحي الفيزيولوجي المعقم (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 ووضعت في 9 مل من ماء الببتون، تم التخفيف 3 مرات. أخذ 100 ميكرولتر من العينات الممددة بوساطة ماصة دقيقة Micropipette وفرشت على أطباق Aeromonas agar ثم حضنت الأطباق بدرجة حرارة 37 مْ لمدة 48 ساعة (Moustafa *et al*., 2010).

تنميط العزلات البكتيرية:

تم تنميط العزلات البكتيرية من خلال الصفات الزرعية للمستعمرات والفحص المجهري والاختبارات الكيمياحيوية.

اختبار حساسية عزلات الـ Aeromonas للصادات الحيوية:

تم اجراء اختبارات تحسس عزلات *A.hydrophila* لأربعة صادات حيوية (Tetracycline, Ampicllin, Chloramphenicol, Meropenem) تنتمي الى أربعة زمر مختلفة من الصادات الحيوية الأكثر استخداما في المشافي، وذلك للوقوف على الصاد الحيوي الأكثر تأثيرا في معالجة النوع الجرثومي المدروس.

أجريت اختبارات حساسية االعزلات الجرثومية البحرية باستخدام وسط مولر هنتون، وبطريقة انتشار الأقراص لبعض الصادات الحيوية الجدول(1)، اذ حضر معلق من كل عزلة بكتيرية، وأخذ 0.1 مل من المعلق وفرش على الوسط بشكل منتظم. بعد ربع ساعة وضعت أقراص الصادات الحيوية المعتمدة في الدراسة على سطح الوسط المزروع، وحضنت الأطباق بدرجة حرارة (37) درجة مئوية لمدة 24 ساعة، وحدد بعد ذلك مقدار الحساسية البكتيرية عن طريق قياس قطر هالات تثبيط النمو البكتيري وفقا لمعايير NCCLS (2004) ومقدرة بال mm (Kabore *et al*, 2016).

الجدول(1): أقطار هالات تثبيط النمو البكتيري وفقا لمعايير NCCLS لعام 2004 الناتجة عن التحسس للصادات الحيوية على وسط مولر – هنتون الصلب ومقدره بال mm

الصادات الحيوية			قطر هالات التثبيط (mm)		
الصاد الحيوي	الرمز	تركيز القرص(ug)	مقاوم(R)	متوسط الحساسية(I)	حساس(S)
Ampicillin	AMP	10	13	16-14	17
Chloramphenicol	CHL	30	12	17-15	18
Tetracycline	TET	30	12	18-13	18
Meropenem	MER	10	12	18-14	18

مقاوم Resistant : R ، متوسط الحساسية Intermediate : I ، حساس Sensitive : S

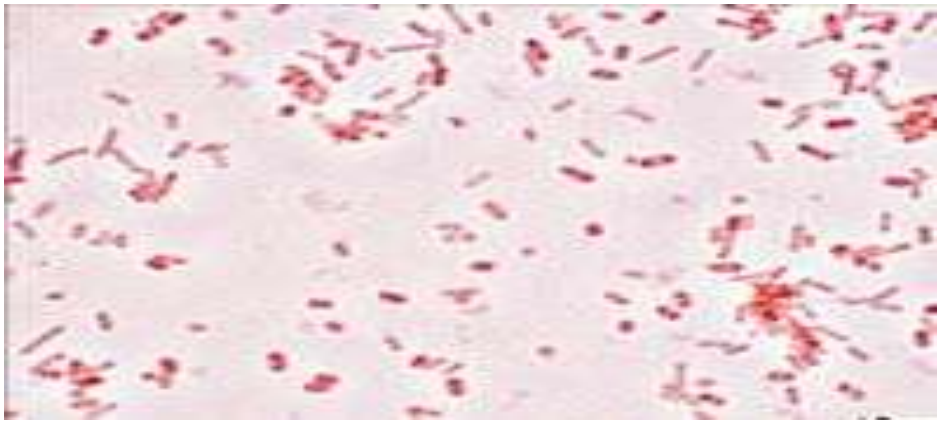
النتائج والمناقشة:

- **تنميط عزلات البكتريا:**

الصفات الزرعية: كانت المستعمرات النامية على وسط Aeromonas agar مستديرة متوسطة وصغيرة ذات حافة مقببة ولون يتراوح بين الأبيض الباهت والوردي الشكل(3). توافقت هذه النتيجة مع دراسة Sarder(2015).

الشكل(3): نمو مستعمرات ال Aeromonas على وسط Aeromonas agar

الدراسة المجهرية: أظهر الفحص المجهري للعزلات الجرثومية أن خلايا عزلات الايروموناس عصوية الشكل ذات نهاية مدورة، مفردة اوبشكل خلايا مزدوجة. بدت الخلايا حمراء اللون لعدم تلونها بصبغة غرام (سالبة صبغة غرام) عند فحصها بالمجهر الضوئي الشكل(4).



الشكل(4): شكل جراثيم *A. hydrophil* تحت المجهر الالكتروني

- **نتائج الاختبارات الكيميائية:**

أجريت للعزلات الجرثومية البحرية التي تم عزلها على وسط *A. hydrophila* 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. الجدول (2) بمقارنة هذه النتائج بالمفاتيح التصنيفية لل*A. hydrophila* وبالرجوع إلى دليل بيرجي (Bergey.s Manual of Systematic bacteriology) عام 1984 لوحظ أن هذه العزلات الجرثومية هي *A. hydrophila*. توافقت هذه النتيجة مع دراسات سابقة (Sarder, 2015; Ali *et al.*, 2016; Ahmed, 2018).

الجدول (2): الاختبارات الكيمياحيوية للعزلات البكتيرية Aeromonas sp المعزولة من أسماك البوري دهبان المصابة.

الاختبار	النتيجة
الاندول	+
الكاتلاز	+
الأوكسيداز	+
NIT	+

+: التفاعل ايجابي

- اختبارات حساسية عزلات *A. hydrophila* للصادات الحيوية:

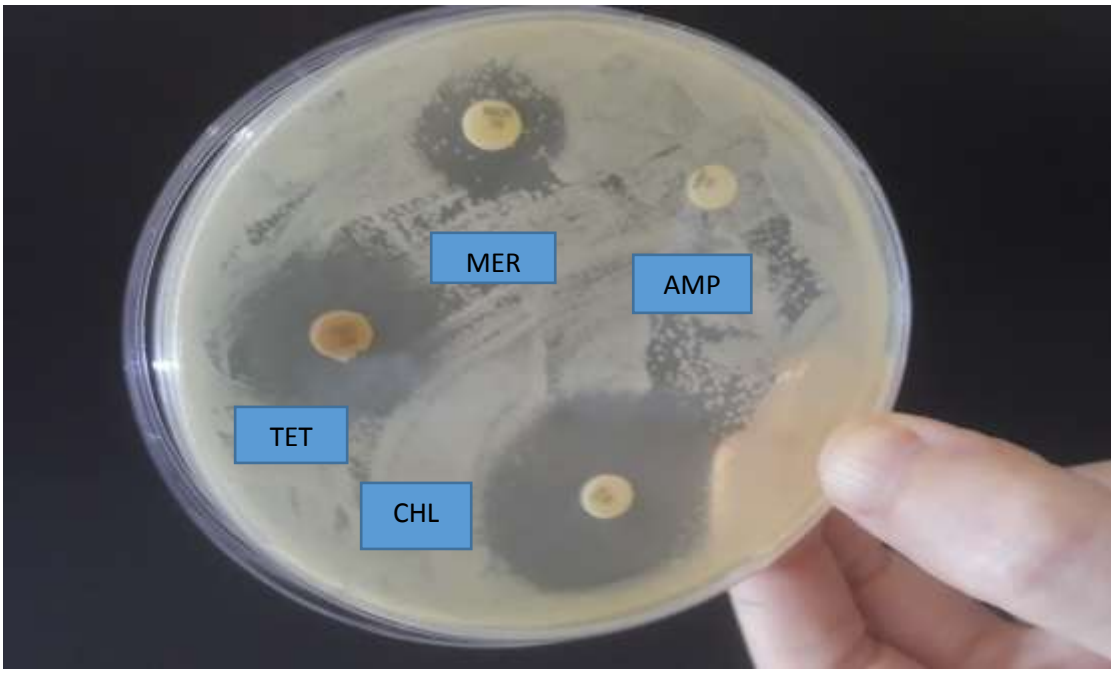
أظهرت نتائج اختبار حساسية عزلات *A. hydrophila* المعزولة للصادات الحيوية المسجلة في الجدول(3) أن حساسية هذه العزلات كانت مختلفة باختلاف الصادات الحيوية وتراوح قطر هالات التثبيط بين (0–30) مم، اثبتت الدراسات السابقة أن *A. hydrophila* أظهرت اختلافات في حساسيتها ومقاومتها للصادات الحيوية (Hussein& Salman، 2014).

الجدول (3): اختبار تحسس جراثيم عزلات *A. hydrophila* للصادات الحيوية المستخدمة في الدراسة.

اسم الصاد	التركيز(ug)	قطر هالة التثبيط (مم)	الحساسية
Tetracycline	30	22	S
Ampicllin	10	0	R
Chloramphenicol	30	30	S
Meropenem	10	15	I

مقاوم R : Resistant ، متوسط الحساسية I : Intermediate ، حساس S : Sensitive .

أظهرت النتائج أن عزلات *A. hydrophila* لم تبد أي حساسية اتجاه الـ Ampicllin، وتدرج ارتفاع حساسيتها تجاه ال Meropenem ثم Tetracycline وأبدت أعلى حساسية تجاه ال Chloramphenicol الشكل (5). تتوافق هذه النتائج مع نتائج دراسة Daoud (2012) التي أجريت على جراثيم *A. hydrophila* في أسماك الكارب نوع *Cyprinus carpio* المصطادة من سد 16 تشرين، اذ لوحظ أن جميع العزلات كانت مقاومة للـ Ampicllin، كما أبدت العزلات حساسية عالية للـ Chloramphenicol بنسبة 87.2%، وحساسية متوسطة لل Tetracycline بنسبة 46.87 %. كما تتفق هذه النتيجة مع نتائج Sarder (2015) في دراسة أجرتها على خمس أنواع سمكية، والتي بينت أن عزلات جراثيم *A. hydrophila* كانت مقاومة للـ Ampicllin وحساسة لكل من Chloramphenicol و Tetracycline.



الشكل(5): اختبار حساسية عزلات *A.hydrophila* لأربعة صادات حيوية باستخدام طريقة الأقراص.
.CHL: Chloramphenicol ،TET: Tetracycline ،MER: Meropenem ،AMP: Ampicllin

الاستنتاجات والتوصيات:

1- تم عزل النوع *A. hydrophila* من أفراد سمك *Liza aurata* المصابة المصطادة من منطقة ميناء الصيد والنزهة.

2- أظهرت العزلات الجرثومية حساسية أكبر اتجاه الكلورامفينكول، بينما أظهرت مقاومة اتجاه الامبيسلين في حين كانت ذات حساسية متوسطة للتتراسكلين والميروبينيم.

3- كانت العزلات إيجابية الكاتلاز والإندول والأوكسيداز وقادره على تحويل النترات الى نتريت.

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

References:

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.; MUHAMMAD, 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.

Badran, M (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.

Daboul, A (2008). *Investigation of pathogenic infections in common carp caused by aerobic bacilli*. Master Thesis. Department of Public Health and Preventive Medicine. Faculty of Veterinary Medicine, Al-Baath University- Syria.

Daoud, N (2012). *Isolating Aeromonas species and testing their sensitivity to antibiotics from water and carp fish in a freshwater fish farm (16 Tishreen Dam - Latakia)*. Damascus Journal of Basic Sciences,**1**, 27 – 39.

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.

FAO. (Food and Agriculture Organization of the United Nations). (2008). *The State of World fisheries and Aquaculture 2008.* FAO Fisheries and Aquaculture Department. Food and Agriculture Organization of the United Nations. Rome, Italy, 227.

Ibrahim, Amir (2011): *A field study of the sensitivity of Syrian marine and coastal habitats and vertebrates and the required adaptations to climate change*. Tishreen University + Higher Commission for Scientific Research, Syria.

KABORE, W. A. D.; BAGRE, T. S.; KONATE, A.; TRAORE, R. G.; BAKO, E.; KONSEM, T.; BOISRAME, S.; TRAORE, A. S.; BARRO, N. and SANGARE, L. (2016). *Characteristics of Streptococcus and Staphylococcus Strains Isolated from Acute Cellulitis of Dental Origin in Ouagadougou, Burkina Faso*. African Journal of Microbiology Research. 9, 292- 300.

KEALI, N; TARBOUSH, A; GHADEER, S. *Marine water pollution in the Assid and Annozha port and in the commercial port of Latakia city on the coasal Syrian* (2018). https: //researchgate. Net/publication/33414120.

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.

Sabbagh, A (2018). *Study of erythrodermatitis disease caused by bacteria of the genus Aeromonas in common carp in productive fish farms*. Master Thesis. Department of Public Health and Preventive Medicine. College of Veterinary Medicine, University of Hama- Syria.

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

Salman, S & Hussein, A (2014*). Isolating and diagnosing bacteria from clinical and environmental sources (water) and studying their sensitivity to antibiotics*. Al-Qadisiyah Journal of Pure Sciences, **3**, 17 – 31.

NCCLS. (2004). *Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing*. Fourteenth informational supplement. **1.**