Archive of SID

مطالعه باکتریائی پوسیدگی باله دمی مولدین ماهی آزاد دریای خزر (*Salmo trutta caspius*) مرکز تکثیر و پرورش آزاد ماهیان شهید باهنر کلاردشت با تأکید بردو جنس آئروموناس و سودوموناس

علیرضا گلچین منشادی[1*]، مهدی سلطانی[2]، عیسی شریف‌پور[3]، رضا عصاره[4]

تاریخ دریافت: 91/3/2 تاریخ پذیرش: 91/7/18

چکیده

به منظور مطالعه پوسیدگی باله دمی با تأکید بر عوامل باکتریایی آئروموناس و سودوموناس درماهی آزاد دریای خزر مرکز تکثیر و پرورش آزادماهیان شهید باهنر کلاردشت ، تعداد 180 ماهی مولد دارای علائم ماکروسکوپی ضایعات باله انتخاب و از هر ماهی دو نمونه باکتریایی بر روی محیط‌های اختصاصی آئروموناس و سودوموناس کشت گردید. بعد از انکوباسیون، آزمایشات بیوشیمیایی جهت شناسایی کلنی‌های جداسازی شده دو جنس آئروموناس و سودوموناس انجام گرفت. نتایج آزمایشات بیوشیمیایی نشان داد که باکتریهای جنس آئروموناس جداسازی شده از گونه های آئروموناس کاویا و آئروموناس هایدروفیلا (زیرگونه‌ای که تولید گاز نمی‌کند) به ترتیب با فراوانی 75 و 25 درصد و باکتریهای جنس سودوموناس از گونه های سودوموناس فلورسنس، سودوموناس پوتیدا و سودوموناس آلکالیژنز به ترتیب با فراوانی 42/1، 36/48و 21/05 بودند

واژگان کلیدی: ماهی آزاد دریای خزر، پوسیدگی باله، آئروموناس و سودوموناس.

مقدمه

پوسیدگی باله در ماهیان پرورشی از جمله معضلاتی است که صنعت آبزی‌پروری با آن درگیر است. این مهم خصوصاً در بین مولدین آزادماهیان بخوبی مشهود است. از آنجائیکه عوامل مدیریتی و بهداشتی نقش مهم و موثری در بروز یا جلوگیری از وقوع آن دارند، لذا از پوسیدگی باله به عنوان یک عامل تعیین کننده در ارزیابی سطح بهداشتی مزارع پرورش ماهی یاد می‌شود. در آزادماهیان پرورشی نیز پوسیدگی باله به شکل وسیعی وجود دارد و این مسئله شاخص مناسبی برای تفکیک ماهیان وحشی و پرورشی از یکدیگر محسوب می‌شود کرایک (Craik) و همکاران (1987) (24).

عوامل مختلفی در بروز پوسیدگی باله ماهیان نقش دارند بطوریکه از آن بعنوان یک سندرم نام می‌برند زیرا عمدتاً بعلت شرایط خاص پرورش، بیش از یک عامل در بروز آن نقش دارد. در بین عوامل متعدد عفونی و غیرعفونی در بروز پوسیدگی باله، عوامل باکتریایی به

1- مربی، دانش‌آموخته دکتری تخصصی بهداشت و بیماریهای آبزیان دانشکده علوم تخصصی دامپزشکی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد علوم و تحقیقات تهران، ایران
2- استاد، گروه آموزشی بهداشت و بیماریهای آبزیان، دانشکده دامپزشکی دانشگاه تهران، تهران، ایران
3- دانشیار، موسسه تحقیقات شیلات ایران، تهران، ایران
4- کارشناس، دانشکده علوم تخصصی دامپزشکی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد علوم و تحقیقات تهران، ایران
*- پست الکترونیکی نویسنده مسئول: golchinalireza@yahoo.com

www.SID.ir

Archive of SID

لحاظ فراگیر بودن در محیطهای آبی و حضور آنها بعنوان بخشی از فلور میکروبی سطوح خارجی ماهیان نقش مهمی دارند، بویژه زمانی که شرایط محیطی برای رشد و تکثیر این نوع باکتریها فراهم باشد (پیکرینگ Pickering (1977) (19).

در برخی ماهیان صدمه به بالهها منجر به اختلال در شنای آنها و یا دستیابی به شکار می‌گردد با این حال این مسئله را هم باید در نظر داشت که پوسیدگی باله ممکن است امکان ابتلا به عفونت‌های سیستمیک مانند فورونکلوزیس را افزایش دهد (هوراک Horak) (1969) و (ماهش کومار Maheshkumar) (1985) (24).

مطالعات نشان می‌دهد آنتی بیوتیک‌های موثری علیه باکتری‌های دو جنس آئروموناس و سودوموناس وجود دارد اما اخیراًبرخی از آن ها نسبت به این باکتری ها مقاوم شده اند و تعداد آن ها رو به افزایش است. بنابراین عصاره گیاهان مناطق ساحلی، عصاره نوعی مرجان وجلبک بعنوان منابع بالقوه و غنی از داروهای جدید بعنوان جانشین آنتی‌بیوتیکهای رایج در آبزی پروری پیشنهاد می‌گردد (چودهری Choudhury) و همکاران (2002) (12) .

مواد و روش کار

- نمونه گیری

جهت نمونه گیری از باله های پوسیده ماهیان مولد، تعداد 180 عدد ماهی مولد بر اساس ارزیابی آماری انتخاب و پس از صید بوسیله ساچوک به چان برزنتی منتقل گردید. سپس با استفاده از داروی MS222 ماهیان آرام شده و به داخل آزمایشگاه مرکز تکثیر و پرورش آزادماهیان شهید باهنر کلاردشت منتقل شدند. درداخل آزمایشگاه نمونه گیری ازمحل باله های دمی پوسیده هر ماهی با عمل کشیدن لبه تیغه جراحی استریل در نواحی باله های پوسیده و انتقال آن به محیط کشت اختصاصی آئروموناس و سودوموناس انجام گردید. پس از پایان نمونه‌گیری، محیطهای کشت جهت انجام آزمایشات تکمیلی به آزمایشگاه منتقل گردید.

- خالص سازی باکتریها

محیط‌های کشت داده شده به آزمایشگاه منتقل و محیطها در دمای 20 درجه سانتی‌گراد بمدت 48 ساعت نگهداری گردید. پس از پایان انکوباسیون، تمامی محیطها (360 پلیت) مورد بررسی قرار گرفتند. سپس نماینده تمامی کلنی‌های باکتریایی جدا شده، انتخاب و کشت مجدد وخالص سازی آنها روی محیطهای مغذی مانند برین- هارت آگار(Brain-Haert Agar) انجام گرفت.

- آزمایشات بیوشیمیایی مقدماتی

با داشتن کلنی‌های خالص باکتری ابتدا آزمایشات بیوشیمیایی مقدماتی جهت حذف نمونه های احتمالی غیر از دو جنس آئروموناس و سودوموناس بدین شرح انجام شد(6).

1- رنگ آمیزی گرم در این رنگ آمیزی باکتریهای گرم منفی برنگ صورتی تا قرمز و باکتریهای گرم مثبت برنگ بنفش دیده می شوند.

2- آزمایش کاتالاز

3- آزمایش اکسیداز

4- رشد روی محیط مک کانکی (Mac Conkey Agar)

5- تمام باکتریهای دو جنس آئروموناس و سودوموناس قادر به رشد روی این محیط می‌باشند.

6- رشد روی محیط TCBS (Thiosulfat Citrat Bile Sucrose Agar)

هیچ یک از باکتریهای دو جنس آئروموناس و سودوموناس قادر به رشد روی این محیط نمی‌باشند. این محیط، محیط اختصاصی باکتریهای جنس ویبریو می‌باشد.

- آزمایشات بیوشیمیایی تکمیلی

جهت توصیف بیشتر دو جنس آئروموناس و سودوموناس و تفکیک گونه‌های آنها، آزمایشات

www.SID.ir

Archive of SID

بیوشیمیایی تکمیلی انجام گرفت (2، 6 ، 7و 10).

نتایج

پس از انجام آزمایشات مقدماتی و حذف نمونه‌های غیرمرتبط با دو جنس مورد بررسی، طبق آزمایشات مندرج در جداول1-الف و 1-ب باکتریهای مورد بررسی در دو جنس آئروموناس و سودوموناس قرار گرفتند.

- نتایج آزمایشات بیوشیمیایی جنس آئروموناس

باکتریهایی که در این گروه قرار گرفتند گرم منفی، میله‌ای کوتاه، اکسیداز و کاتالاز مثبت بودند. قادر به تخمیر مانیتول و گلوکز بودند اما قادر به تولید گاز در زمان تخمیر گلوکز نبودند و اینوزیتول را تخمیر نمی‌کردند. متحرک بوده و ژلاتین را هیدرولیز می‌کردند اما گاز H2S تولید نمی‌کردند. تولید اندول برای همگی مثبت بود. همگی در محلول نمکی یک و 3 درصد رشد کردند و برخی قادر به رشد در محلول نمکی 7 درصد نبودند. فرمنتاتیو بوده و قادر به هیدرولیز اسکولین بودند، نیترات را احیاء نمی‌کردند و واکنش اوره آز آنها منفی بود. واکنش لیزین و اورنیتین دکربوکسیلاز آنها منفی اما آرژینین دهیدروژناز مثبت بودند. اکثر نمونه‌ها واکنش VP منفی نشان دادند و برخی مثبت بودند. واکنشMR همگی مثبت بوده با توجه به نتایج بدست آمده از 15 کلنی خالص‌سازی شده، 4 نمونه به جنس سودوموناس منتقل و 3 نمونه حذف شدند. از 8 نمونه باقیمانده 2 نمونه (1A و 2A) با توجه به مثبت بودن واکنش VP، آئروموناس هایدروفیلا (زیرگونه‌ای که تولید گاز نمی‌کند (Aeromonas hydrophila, subsp. anaerogenes تشخیص داده شد و نمونه‌های باقیمانده با توجه به منفی بودن واکنش VP آنها بعنوان آئروموناس کاویا(A.caviae) شناخته شدند(نمودار1) (7) .

- نتایج آزمایشات بیوشیمیایی جنس سودوموناس

باکتریهایی که در این جنس قرار گرفتند نیز گرم منفی، میله‌ای کوتاه، اکسیداز و کاتالاز مثبت بودند. قادر به تخمیر قندهای مانیتول و اینوزیتول نبودند. اما برخی گلوکز را تخمیز می‌کردند. متحرک بودند و برخی ژلاتین را هیدرولیز کرده و برخی دیگر قادر به هیدرولیز ژلاتین نبودند. قادر به تولید اندول و گاز H2S نیز نبودند. همگی در محلول نمکی یک و سه درصد رشد کردند و برخی قادر به رشد در محلول نمکی 7 درصد نبودند. اکسیداتیو بودند. اکثر آنها قادر به احیای نیترات نبودند و واکنش اوره آز آنها منفی بود. قادر به دکربوکسیله کردن لیزین و اورنیتین نبودند اما واکنش آرژینین دهیدروژناز آنها مثبت بود.

نتایج بدست آمده نشان داد علاوه بر 15 نمونه خالص شده از محیط کشت اختصاصی سودوموناس 4 نمونه که در ابتدا از محیط کشت اختصاصی آئروموناس جداسازی و خالص گردیده بود، نهایتاً بعنوان جنس سودوموناس شناسایی و به این گروه منتقل شدند، بنابراین مجموعاً نتایج آزمایشات بیوشیمیایی بوسیله منابع مختلف تجزیه و تحلیل گردید (6 و 7 و 10). این نتایج نشان داد که نمونه‌ها تنها در بعضی آزمایشات با هم اختلاف دارند. مثلاً آزمایش احیاء نیترات، هیدرولیز ژلاتین و تخمیر گلوکز برخی مثبت و برخی منفی است. بر این اساس گونه‌های زیر شناسایی شدند.

1) سودوموناس آلکالیژنز (Pseudomonas alcaligenes)

باکتریهای این گروه نیتریت مثبت بوده و قادر به تخمیر گلوکز نیستند. البته این‌گونه شباهتهای زیادی به سودموناس آئروژینوزا دارد (9). نمونه‌های این گروه شامل 1P، 3P، 6P و 14P بودند.

2) سودوموناس فلورسنس (Pseudomonas fluoresens)

باکتریهای این گروه قادر به احیای نیترات نیستند، گلوکز را تخمیر و ژلاتین را هیدرولیز می‌کنند. این گونه دارای 5 بیووار است. نمونه‌های شناسایی شده

www.SID.ir

Archive of SID

همخوانی بیشتری با بیووارهای I و V دارند (6). این نمونه‌ها شامل 2P، 4P، 7P، 9P، 12P، 15P، 16P و 17P بودند.

3) سودوموناس پوتیدا (Pseudomonas putida)

باکتریهای این گروه نیز گلوکز را تخمیر می‌کنند اما قادر به احیای نیترات و هیدرولیز ژلاتین نیستند. منفی بودن آزمایش هیدرولیز ژلاتین وجه تمایز مناسبی جهت تفکیک این گروه با گونهٔ سودوموناس فلوسنس می‌باشد (6). نمونه‌های 5P، 8P، 10P، 11P، 13P، 18P،19P در این گروه قرار گرفتند. فراوانی باکتری های جداسازی شده جنس سودوموناس درنمودار1 نشان داده شده است.

جدول 1- الف: نتایج آزمایشات بیوشیمیایی دو جنس آئرومونا‌س و سودوموناس

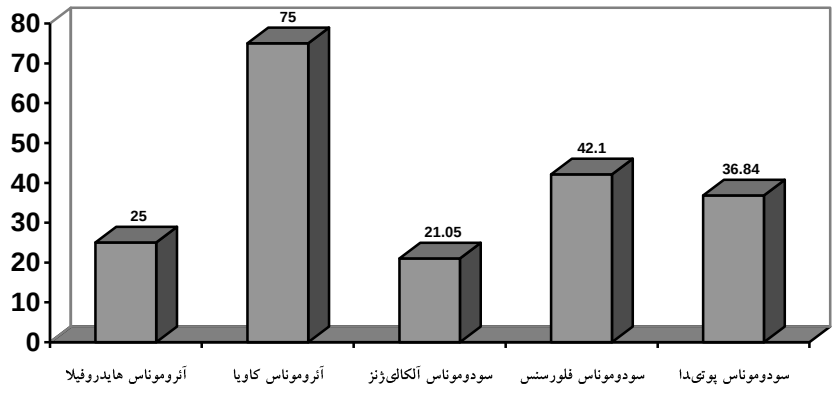
ردیف	تخمیر گلوکز	تخمیر مانیتول	تخمیر اینوزیتول	هیدرولیز ژلاتین	تولید اندول	تولید H_2S	احیاء نیترات	هیدرولیز اسکولین	واکنش *MR*	واکنش *VP*	اوره آز	تحرک
1*A*	+	+	−	+	+	−	−	+	+	+	−	+
2*A*	+	+	−	+	+	−	−	+	+	+	−	+
3*A*	+	+	−	+	+	−	−	+	+	−	−	+
4*A*	+	+	−	+	+	−	−	+	+	−	−	+
5*A*	+	+	−	+	+	−	−	+	+	−	−	+
6*A*	+	+	−	+	+	−	−	+	+	−	−	+
7*A*	+	+	−	+	+	−	−	+	+	−	−	+
8*A*	+	+	−	+	+	−	−	+	+	−	−	+
1*P*	−	−	−	−	−	−	+				−	+
2*P*	+	−	−	+	−	−	−				−	+
3*P*	−	−	−	−	−	−	+				−	+
4*P*	+	−	−	+	−	−	−				−	+
5*P*	+	−	−	+	−	−	−				−	+
6*P*	−	−	−	+	−	−	+				−	+
7*P*	+	−	−	+	−	−	−				−	+
8*P*	+	−	−	−	−	−	−				−	+
9*P*	−	−	−	+	−	−	−				−	+
10*P*	+	−	−	−	−	−	−				−	+
11*P*	−	−	−	−	−	−	−				−	+
12*P*	+	−	−	+	−	−	−				−	+
13*P*	+	−	−	−	−	−	+				−	+
14*P*	−	−	−	−	−	−	+				−	+
15*P*	−	−	−	+	−	−	−				−	+
16*P*	+	−	−	+	−	−	−				−	+
17*P*	+	−	−	+	−	−	−				−	+
18*P*	+	−	−	−	−	−	−				−	+
19*P*	+	−	−	−	−	−	−				−	+

www.SID.ir

Archive of SID

جدول 1- ب: نتایج آزمایشات بیوشیمیایی دو جنس آئروموناس و سودوموناس

ردیف	لیزین دکربوکسیلاز	اورنیتین دکربوکسیلاز	آرژینین دهیدروژناز	رشد در نمک 1٪	رشد در نمک 3٪	رشد در نمک 7٪	رشد در *M.C*	رشد در *TCBS*	رشد در *SS*	رشد در 5^oC	رشد در 42^oC	*OF*
1*A*	−	−	+	+	+	−	+	−	−			*F*
2*A*	−	−	+	+	+	−	+	−	−			*F*
3*A*	−	−	+	+	+	−	+	−	−			*F*
4*A*	−	−	+	+	+	+	+	−	−			*F*
5*A*	−	−	+	+	+	−	+	−	−			*F*
6*A*	−	−	+	+	+	−	+	−	−			*F*
7*A*	−	−	+	+	+	−	+	−	−			*F*
8*A*	−	−	+	+	+	+	+	−	−			*F*
1*P*	−	−	+	+	+	−	+	−	−	+	−	*O*
2*P*	−	−	+	+	+	+	+	−	−	+	+	*O*
3*P*	−	−	+	+	+	−	+	−	−	+	−	*O*
4*P*	−	−	+	+	+	+	+	−	−	+	−	*O*
5*P*	−	−	+	+	+	−	+	−	−	+	+	*O*
6*P*	−	−	+	+	+	+	+	−	−	+	+	*O*
7*P*	−	−	+	+	+	+	+	−	−	+	−	*O*
8*P*	−	−	+	+	+	−	+	−	−	+	+	*O*
9*P*	−	−	+	+	+	−	+	−	−	+	+	*O*
10*P*	−	−	+	+	+	−	+	−	−	+	+	*O*
11*P*	−	−	+	+	+	−	+	−	−	+	−	*O*
12*P*	−	−	+	+	+	−	+	−	−	+	−	*O*
13*P*	−	−	+	+	+	−	+	−	−	+	−	*O*
14*P*	−	−	+	+	+	−	+	−	−	+	−	*O*
15*P*	−	−	+	+	+	−	+	−	−	+	−	*O*
16*P*	−	−	+	+	+	−	+	−	−	+	+	*O*
17*P*	−	−	+	+	+	+	+	−	−	+	−	*O*
18*P*	−	−	+	+	+	−	+	−	−	+	+	*O*
19*P*	−	−	+	+	+	+	+	−	−	+	+	*O*



نمودار1: فراوانی دو جنس آئروموناس و سودوموناس به روش آزمایشات روتین بیو شیمیایی

www.SID.ir

Archive of SID

بحث

در این مطالعه، با استفاده از روش‌های بیوشیمیایی دوگونه آئروموناس کاویا و آئروموناس هایدروفیلا (زیرگونه‌ای که تولیدگاز نمی‌کند) از آئروموناس‌های متحرک و سه گونه سودوموناس فلورسنس، سودوموناس آلکالیژنز و سودوموناس پوتیدا شناسایی گردی (6، 7 و10)؛ گرچه به اعتقاد برخی آئروموناس کاویا با زیرگونه‌ای از آئروموناس هایدروفیلا که تولید گاز نمی‌کند مترادف است و اختلافی بین آنها وجود ندارد (3).

مطالعات نشان می‌دهد که در اکثر نمونه‌های اخذ شده از آب یا پوست ماهیان، باکتریهای آئروموناس و سودوموناس قابل جداسازی است. تیلور (Taylor) (2003) در مطالعه‌ای 30 باکتری از ماهی کپور معمولی جدا کرد که از این تعداد، 13 جدایه بعنوان آئروموناس هایدروفیلا، 11 جدایه بعنوان آئروموناس سوبریا و دو جدایه بعنوان آئروموناس کاویا معرفی شدند (23). نیومن و پلوگر (Neuman & Ploger) (1970) نیز در مطالعه‌ای آئروموناس هایدروفیلا را از مزارع پرورش ماهی شمال غربی آلمان جدا کردند (18).

در بررسی دیگری میراندا و زملمن(Miranda & Zemelman)(2002) توانستند آئروموناس هایدروفیلا و سودوموناس فلورسنس را از مزارع ماهی آزاد شمال آلمان جدا کنند (17).

ساها و پال(Saha & pal) نیز در مطالعه‌ای 16 جدایه باکتری را از زخمهای سطحی ماهی مبتلا به سندرم EUS جدا کردند که در میان آنها گونه‌های آئروموناس و سودوموناس وجود داشت (22).

در مطالعه دیگری که توسط پلامب (Plumb) و همکاران (1995) انجام شد، 200 نمونه باکتری جداسازی گردید که شامل جنس‌های ادواردزیلا، سودوموناس و گونه‌های آئروموناس هایدروفیلا، و آئروموناس سوبریا بود (20).

گرچه باکتریهای مذکور غالباً بصورت فلور پوست یافت می‌شوند، اما آنها را از عفونتهای داخلی نیز می‌توان جداسازی کرد. برای مثال لیپتون (Lipton) (1991) آئروموناس هایدروفیلا را از زخمهای خونریزی دهنده یک نوع ماهی و سودوموناس آئروژینوزا را از استخری با شرایط پرورش متراکم جداسازی کرد (16).

در این زمینه معدود مطالعاتی در داخل کشور نیز وجود دارد. رفیعی‌پور (1376) در مطالعه سرولوژیک نمونه‌های ماهی و میگو مناطق مختلف ایران با استفاده از روشهای آگلوتیناسیون روی لام و آنتی بادی درخشان توانست ویبریو آنگوئیلاروم (Vibrio anguillarum)و آئروموناس هایدروفیلا را جداسازی کند. همچنین در بررسی خواص مرفولوژیک، فیزیولوژیک و بیوشیمیایی این ارگانیسم‌ها، گونه‌هایی از ویبریو، آئروموناس سالمونیسیدا، آئروموناس هایدروفیلا و آئروموناس کاویا را شناسایی نمود (1).

نادری مایوان (1383) نیز در مطالعه‌ای بر روی پوسیدگی باله در ماهی کپور علفخوار اظهار داشت که بیشترین موارد جداسازی شده از پوسیدگی باله متعلق به جنس آئروموناس‌های متحرک (آئروموناس هایدروفیلا و آئروموناس سوبریا) و در مرحله بعد ارگانیسم‌های جنس سودوموناس می‌باشد (4).

آگوئیلرا ـ آرئولا (Aguilera-Arreola) و همکاران (2005) جهت بررسی تنوع ژنتیکی جدایه‌های آئروموناس هایدروفیلا که از نمونه‌های مختلفی از جمله آب و ماهی بدست آمده بود از تکنیک RAPD (Random Amplification of Polymorphism) استفاده نمودند که نتایج حاکی از تنوع ژنتیکی بالایی بود. همچنین نحوهٔ توزیع و پراکنش ژنهای وابسته به حدت تأیید کرد که آئروموناس هایدروفیلا از نظر ژنتیکی ناهمگون است (5).

در مطالعه دیگری کاسترو ـ اسکارپولی (Castro-Escarpulli)و همکاران (2003)،82 جدایه از

www.SID.ir

Archive of SID

گونه‌های آئروموناس را از 250 ماهی منجمد جداسازی کردند که شامل آئروموناس سالمونیسیدا، آئروموناس هایدروفیلا، آئروموناس کاویا و آئروموناس ورونی بیووار سوبریا بودند که آئروموناس سالمونیسیدا از همه بیشتر و به ترتیب از تعداد آنها کاسته می‌شد. این در حالیست که بررسی ژنتیکی بوسیله تکنیک PCR/RFLP براساس ژن 16SrDNA نشان داد که این جدایه‌ها به ترتیب مذکور شامل آئروموناس سالمونیسیدا، آئروموناس بستاریوم(A.bestarium)، آئروموناس ورونی بیووار سوبریا، آئروموناس انچلئیا (A.encheleia) و آئروموناس هایدروفیلا بود (11). بدین ترتیب این مطالعه نشان می‌دهد که تمام نتایج بیوشیمیایی بوسیله مطالعه مولکولی تأیید نگردید.

زیا (Xia) و همکاران (2003) در یک مطالعه، جدایه‌های مربوط به ماهیان بیمار که غالباً کپور نقره‌ای بودند را بوسیله روش PCR بر پایه توالی‌های ژن بتا همولیزین کلون شده آئروموناس هایدروفیلا جداسازی کردند که در میان آنها گونه‌های بیماریزای آئروموناس هایدروفیلا، آئروموناس سوبریا و سودوموناس فلورسنس وجود داشت (26).

همچنین بیسکاردی(Biscardi) و همکاران (2001) جدایه‌های آئروموناس هایدروفیلا را به روش PCR براساس ژن آئرولیزین از نمونه‌های بطری‌های آب معدنی و منابع آب گرم جداسازی کردند (8).

در مطالعه‌ای بر روی گونه‌های سودوموناس که از آب و نمونه‌های محیطی بدست آمده و بوسیله API20NE شناسایی شده بود، به روش مولکولی مورد بررسی قرار گرفتند که در میان آنها نمونه سودوموناس فلورسنس که از آب رودخانه جداسازی شده بود نیز وجود داشت (بودیلیس و همکاران، 2004)(9).

کانگ(Kong) و همکاران (1999) نیز 7 گونه آئروموناس را به روش مولکولی از منابع آبی جدا کردند که اینها شامل آئروموناس هایدروفیلا، آئروموناس کاویا، آئروموناس ورونی، آئروموناس تروتا، آئروموناس جاندائی، آئروموناس اسکوبرتی و آئروموناس انتروپلوژنز (A.entropelogenes) بودند (14).

فرام (Frahm) و همکاران (2001) نیز در مطالعه‌ای سودوموناس آئروژینوزا را بوسیله روش مولکولی جداسازی کردند (13).

در یک مطالعه نمونه‌هایی از آب دریا مربوط به خلیج توکیو اخذ گردید و پس از جداسازی با محیط‌های اختصاصی به سه روش بررسی شد: کیت API20NE، بررسی ژنتیکی براساس دو ژن لیپوپروتئینی در غشاء خارجی سودوموناس آئروژینوزا و توالی ژن 16S rDNA. نتایج نشان داد که اکثر نمونه‌های جداسازی شده مربوط به سودوموناس آئروژینوزا می‌باشد کیماتا(Kimata)و همکاران 2003) (13).

وایدمر(Widmer)و همکاران (1998) بوسیله روش PCR که آغازگر آن براساس ژن 16S rDNA طراحی شده بود، توانستند جهت تشخیص اعضاء جنس سودوموناس بهره گیرند. آنها جهت تشخیص گونه‌های موردنظر از روش هضم آنزیمی با استفاده از آنزیم HaeIII (تکنیک RFLP) استفاده کردند و توانستند برخی از گونه‌های جنس سودوموناس را شناسایی کنند (25). بنابراین با توجه به اینکه این روش جهت شناسایی تمام گونه‌های این جنس کارآمد نبود، پورتئوس(Porteus) و همکاران (2002) از این مطالعات بهره گرفتند و با استفاده از 4 نوع آنزیم به روش RFLP گونه‌های این جنس را شناسایی و در 5 شاخه جداگانه قرار دادند (21).

بر همین اساس لاگانوسکا(Laganowska) و همکاران (2004) نیز با استفاده از الگوی هضم آنزیمی نمونه‌های آئروموناس توسط 4 نوع آنزیم که براساس ژنهای 16S-23S rDNA تکثیر شده بودند (PCR/RFLP) جهت شناسایی گونه‌های آئروموناس

www.SID.ir

Archive of SID

استفاده کردند (15).

مطالعات مختلف بیوشیمیایی و مولکولی نشان می‌دهند گونه‌های مختلف آئروموناس و سودوموناس در منابع آبی و ماهیان مختلف بصورت عامل بیماریزا یا فلور طبیعی وجود دارد. این مطالعه نیز وجود برخی از این عوامل میکروبی را که ارتباط بیشتری با پوسیدگی باله دارند نشان داد.حال باید گفت نقش این عوامل میکروبی در بروز پوسیدگی باله چقدر است. به نظر می‌رسد تکرار این مهم ضروری است که در بروز این عارضه بعنوان یک سندروم عوامل متعددی دخیلند بطوریکه می‌توان از عوامل اولیه‌ای چون کمبود برخی از مواد غذایی ضروری از جمله ویتامین‌ها و اسیدهای چرب ضروری، آلودگیهای انگلی، تغییرات فیزیولوژیکی و رفتاری در زمان تولید مثل، صدمات فیزیکی ایجاد شده بر اثر تراکم بالای ماهیان، وجود مواد معلق زیاد و حتی گل و لای خصوصاً در اوایل بهار بدلیل طغیان رودخانه‌ها و سایر مشکلات محیطی ، مدیریتی وعوامل استرس زا نام برد. بنابراین با توجه به اینکه حداقل برخی از این عوامل مذکور مبتلا به استخرهای پرورشی است و باکتریهای مذکور نیز (با توجه به اینکه مطالعات متعدد نشان می‌دهد) معمولاً فلور طبیعی آب و پوست ماهیان می‌باشند، به نظر می‌رسد پس از صدمات وارد بر اپیتلیوم پوست و باله بوسیله عوامل اولیه، این باکتریها در این محل استقرار یافته و پس از تکثیر با توجه به اینکه قابلیت ترشح توکسین‌ها و آنزیم‌های خارج سلولی از جمله همولیزین، سیتوتوکسین و پروتئازها را دارا هستند، موجبات تخریب و انهدام بافت اپیتلیال و پوسیدگی باله را فراهم می‌آورند. ذکر این فرضیه با توجه به این مسئله است که در زمان اخذ نمونه‌ها از باله‌های پوسیده، ماهیان علائم بالینی یک سپتی سمی آئروموناسی یا سودوموناسی را از خود نشان ندهند که در صورت وجود چنین فرضی اولیه بودن عوامل باکتریایی از اعتبار بیشتری برخوردار خواهد بود. بهر ترتیب این باکتریها چه بصورت اولیه یا ثانویه در پوسیدگی باله حضور دارند و نقش آنها در بروز آن به عوامل متعددی از جمله حدت آنها و شرایط محیط پرورش وابسته است. با توجه به آنچه گفته شد بنظر می‌رسد بهترین روش در جلوگیری از پوسیدگی باله حذف عوامل اولیه از استخرهای پرورش ماهیان است.

منابع

1- رفیعی‌پور، ع. (1376): تشخیص عفونتهای ناشی از ویبریو آنگوئیلاروم و آئروموناس هایدروفیلا در ماهی و میگو با استفاده از آزمایشهای آگلوتیناسیون و آنتی بادی درخشان، پایان‌نامه دانشکده دامپزشکی دانشگاه تهران، شماره 2556، ص 26 تا 49.

2- سلطانی، م. (1380): بیماریهای آزاد ماهیان، چاپ اول، انتشارات دانشگاه تهران، ص 104 تا 134.

3- سلطانی، م. (1376): بیماریهای باکتریایی ماهی (ترجمه)، چاپ اول، انتشارات سازمان دامپزشکی کشور با همکاری نشر جهاد دانشگاهی دانشگاه تهران، ص 230 تا 243، 263 تا 269، 401 تا 405.

4- نادری، م. قربان م. (1383): بررسی موارد پوسیدگی باله از آئروموناس‌های متحرک ماهی کپور علفخوار در برخی کارگاههای استان مازندران، پایان‌نامه دانشکده دامپزشکی دانشگاه تهران، شماره 2939، ص 1 تا 27

5- Aguilera-Arreola, M.G; Rodriguez,C.H ; Zuniga G; Figueras M.J. & Castro-Escarpulli, G. (2005): Aeromonas hydrophila clinical and environmental ecotypes as revealed by genetic diversity and virulence genes. FEMS Microbiology letter, pp. 231-240.

6- Baron, E.J. & finegold, S.M. (1990):

www.SID.ir

Archive of SID

comp; pp. 386-402 & 435-438.

7- Bergey, D.H; Buchanan, R.E; Gibbons, N.E. (1974): Bergey's manual of determinative bacteriology, 8 th. Edition,The Williams & Wikins company, pp.217-223 & 345-348.

8- Biscardi, D; castaldo, A; Guallilo, O. & Defusco, R. (2001): The occurrence of cytotoxic Aeromonas hydrophila strain in mineral and thermal waters, J; The science of the total environment pp. 255-263.

9- Bodilis, J; Calbrix,R; Guerillon,J; Merieau,A; Pawlak,B; Orang,N. & Barray,S. (2004): Phylogenetic relationships between environmental and clinical isolates of Pseudomonas fluorescens and related species deduced from 16S rRNA Gene and Opr protein sequence, J. Sys.& Appli.Microb. pp. 93-108.

10- Buller, N.B. (2004): Bacteria from fish and other Aquatic animals, A practical identification manual, J. CABI publishing,.pp.142, 143, 153, 154&157.

11- Castro-Escarpulli, G; Figueras, M.J; Castro-Escarpulli, G;Soler,L; Fernandez-Rendon,E; Aparicio,G.O; Guarro,J. & Chacon,M.R. (2003): Characteristion of Aeromonas spp. Isolated from frozen fish intended for human consumption in mexico J.Food Microbiology pp. 41-49.

12- Choudhury, S; Sree, A; Mukherijee, SC; Bapuji, M. & Pattnaik, P. (2002): Antibacterials from marine organism. Potential for fish disease control, NATCUB, Regional research laboratory, Bhubaneswar, pp. 129-139.

13- Frahm, E; Heiber, I; Ludwig, W. & Obst U. (2001): Rapid parallel detection of hygienically relevant microorganisms in water samples by PCR and specific hybridization in microtiter plates, pp. 423-429.

Bailery & Scott's diagnostic microbiology, 8th. Edition , Mosby

14- Kong, R.Y.C; Pelling, A; SO, C.L. & WU, S.S. (1999): Identification of oligonucleotide primers targeted at the 16S-23S rDNA Intergenic spacer for Genus-and species-specific detection of Aeromonads, Marine Pollution Bulletin, vol. 38, (9) pp. 802-808.

15- Laganowska, M; Kaznowski, A. (2004): Restriction fragment length polymorphism of 16S-23S rDNA intergenic spacer of Aeromonas spp.J. Appl. Microbial, (27), pp. 549-557.

16- Lipton, A.P. (1991): Control of Aeromonas and Pseudomonas infections in fresh water aquaculture system, j. ICAR/CIFA, BHUBANESWAR (INDIA) PP.171-173.

17- Miranda, C.D; Zemelman, R.(2002): Bacterial resistance to Oxytetracyclin in Chilean salmon farming, j. Aquaculture, vol. 212, No. 1-4, PP. 23.

18- Neumann, W. and ploger. W. (1979): Examination in resistance tests of some strain of Aeromonas hydrophila punctata group isolated from carp, J. fish disease, third edition, Munich, COPRA Q-session.

19- Pickering, A.D. (1977): Seasonal changes in the epidermis of the brown trout Salmo trutta (L.), J. Fish biol. (10), pp. 561-566.

20- Pulmb, J.A; sheifinger.C.C; shryock, T.R; Goldsby, T. (1995): Susceptibility of six bacterial pathogens of channel cat fish to six antibiotics, J. AQUAT. ANIM. HEALTH. Vol.7, No.3. pp. 211-217.

21- Porteous, L.A; Widmer, F. and Seidler, R.J. (2002): Multiple enzyme restriction fragment length polymorphism analysis for high resolutsion distinction of Pseudomonas 16S rRNA genes, J. Microbiological Methods pp.337-348.

www.SID.ir

Archive of SID

22- Saha, D.& Pal, J. (2002): Invitro antibiotic susceptibility of bacteria isolated from EUS affected fishes in India, Lett. Appl. Microbiol. Vol.34,No. 5, pp. 311-316.

23- Taylor. P.W (2003): Multiple antimicrobial resistance in chronic bacterial infection of koi carp, North American Journal of Aquaculture, Vol. 65, no.2, pp. 120-125.

24- Turnbull, J.F. ;Richards, R.H. & Robertson, D.A. (1996): Gross, histological and scanning electron microscopic appearance of dorsal fin rot in farmed Atlantic salmon, Salmo salar L.Parr, J.fish disease, (19) pp: 415-427.

25- Widmer, F; Seidler, R.J.& Watrud, L.S. (1998): A highly selective PCR protocol for detecting 16S rRNA Genes of the Genus Pseudomonas in Environmental samples, J.Environmental Microbiology, pp. 2545-2553.

26- Xia, C; Zhi-Hong, M; Habibur, R.M. & Zhi-Guang, W.(2003): PCR cloning and identification of the β - haemolysin gene of Aeromonas hydrophila from fresh water.J. Aquaculture, pp. 45-53.

www.SID.ir