نشریه فن‌آوری‌های نوین در توسعه آبزی‌پروری دانشگاه آزاد اسلامی، واحد آزادشهر/ ISSN: 2008-0026 سال نهم، شماره چهارم، زمستان ۹٤ / صفحات: ۷۸-۷۱

مطالعه باکتریایی پوسیدگی باله دمی مولدین ماهی آزاد دریای خزر (*Salmo trutta caspius*) به روش PCR/RFLP در مرکز تکثیر و پرورش شهید باهنر کلاردشت

علیرضا گلچین منشادی

گروه بهداشت و بیماری‌های آبزیان، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد کازرون، کازرون، ایران

تاریخ دریافت: ۹۳/۱۰/۲۹ ؛ تاریخ پذیرش: ۹٤/۲/۱۹

چکیده

پوسیدگی باله از جمله معضلات صنعت آبزی پروری خصوصاً در بین مولدین می‌باشد که عوامل عفونی و غیرعفونی زیادی در بروز آن نقش دارند این بررسی به‌منظور مطالعه این عارضه با تأکید بر باکتری سودوموناس در ماهی آزاد دریای خزر مرکز تکثیر و پرورش آزادماهیان شهید باهنر کلاردشت انجام گردید. تعداد ۱۸۰ ماهی مولد دارای علایم ماکروسکوپی ضایعات باله انتخاب و از هر ماهی نمونه باکتریایی بر روی محیط اختصاصی سودوموناس کشت گردید. در مرحله بعد نمونه‌های باکتری خالص‌سازی شدند و در نهایت ۱۷ نمونه خالص سازی و انتخاب شد تا بوسیله آزمایشات مولکولی مورد بررسی گیرد که شامل آزمایش PCR با استفاده از ژن 16S rDNA و آزمایشRFLP بوسیله چهار آنزیم محدودگر *Alu*1I، *Hinf*I، *Rsa*I و *Tru*1I بود. نتایج حاصل از الکتروفوز ژل محصولات PCR به‌دست آمده از نمونه‌های سودوموناس همگی پس از قرار گرفتن در مجاورت اشعه ماوراء بنفش، باند ۹۹۰*bp* را نشان دادند و الکتروفورز ژل نمونه‌های سودوموناس با چهار نوع آنزیم محدودگر تحت تأثیراشعه ماوراء بنفش حداقل ۵ گونه یا بیوتیپ سودوموناس را نشان داد. گونه‌های مختلفی از جنس سودوموناس در پوسیدگی باله دخیل هستند اما بهترین روش در جلوگیری از پوسیدگی باله حذف عوامل اولیه از استخرهای پرورش ماهیان است.

واژه‌های کلیدی: سودوموناس، ماهی آزاد دریای خزر، واکنش پلیمراز، هضم آنزیمی با استفاده از آنزیم‌های محدود گر

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 آنجایی که عوامل مدیریتی و بهداشتی نقش مهم و موثری در بروز یا جلوگیری از وقوع آن دارند، لذا از پوسیدگی باله به‌عنوان 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 (Turnbull و همکاران، ۱۹۹٦). Turnbull و همکاران (۱۹۹٦) در مطالعه‌ای بر روی پوسیدگی باله پشتی مرحله پار ماهی آزاد اقیانوس اطلس گزارش کردند که در ماهیان آسیب دیده، باله پشتی شدیدترین درگیری با ۹۳/۸ درصد از موارد را به خود اختصاص داده بود و مواردی که فقط باله پشتی آنها آسیب‌دیده بود، ۵۲/۳ درصد را شامل می‌شد که ضایعات در این محل به‌صورت یک خط سفید یا خاکستری در زمان بازرسی مشخص بود. آنها همچنین وجود شکاف‌هایی

*نویسنده مسؤول: golchinalireza@yahoo.com

Archive of SID

www.SID.ir

را در سرتاسر اپیتلیوم در مقاطع آسیب‌شناسی مشاهده کردند (Turnbull و همکاران، ۱۹۹٦). Yiagnisis و Athanassopoulou (۲۰۱۱) بیشترین آلودگی باکتریایی را در ماهی سیم دریایی گزارش کردند (Yiagnisis و Athanassopoulou، ۲۰۱۰). Khan و همکاران (۱۹۸۱) نیز در مرگ و میر ایجاد شده در ماهی کاد اقیانوس اطلس بیشترین جدایه‌های باکتریایی را مربوط به سه جنس آئرومونـاس، سودوموناس و ویبریو دانستند (Khan و همکاران، ۱۹۸۱).

عوامل مختلفی در بروز پوسیدگی باله ماهیان نقش دارند به‌طوری‌که از آن به‌عنوان یک سندرم نام می‌برند زیرا عمدتاً به‌علت 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 لحاظ فراگیر بودن در محیط‌های آبی و حضور آنها به‌عنوان بخشی از فلور میکروبی سطوح خارجی ماهیان نقش مهمی دارند، به‌ویژه زمانی‌که شرایط محیطی برای رشد و تکثیر این نوع باکتری‌ها فراهم باشد (Pickering، ۱۹۷۷). Buller در سال ۲۰۰٤ اعلام نمود بسیاری از گونه‌ها به‌ویژه ماهیان پرورشی یا آکواریمی آلوده می‌شوند و با اینکه تعداد زیادی از جنس سودوموناس درگیر بوده‌اند باکتری‌های جدا شده اکثراً شباهت نزدیکی به سودوموناس فلورسنس دارند که در حال حاضر به‌عنوان عامل مولد بیماری تلقی می‌شود (Buller، ۲۰۰٤). بودیلیس (۲۰۰۵) نیز در مطالعه‌ای بر روی پوسیدگی باله در ماهی کپور علفخوار اظهار داشت که بیشترین موارد جداسازی شده از پوسیدگی باله متعلق به جنس آئرومونـاس‌های متحرک (آئرومونـاس‌هایدروفیلا و آئرومونـاس سوبریا) و در مرحله بعد ارگانیسم‌های جنس سودوموناس می‌باشد (Bodilis و همکاران، ۲۰۰٤). مطالعاتی نیز در خصوص شناسایی عوامل پوسیدگی باله به روش مولکولی وجود دارد. Frahm و همکاران (۲۰۰۱) نیز در مطالعه‌ای سودوموناس آئروژینوزا را بوسیله روش مولکولی جداسازی کردند (Farm و همکاران، ۲۰۰۱). Widmer و همکاران (۱۹۹۸) بوسیله روش PCR که آغازگر آن بر اساس ژن S rDNA۱٦ طراحی شده بود، توانستند جهت تشخیص اعضاء جنس سودوموناس بهره گیرند (Widmer و همکاران، ۱۹۹۸). Porteous و همکاران (۲۰۰۲) نیز از این مطالعات بهره گرفتند و با استفاده از ٤ نوع آنزیم به روش RFLP گونه‌های این جنس را شناسایی و در ۵ شاخه جداگانه قرار دادند (Porteous و همکاران، ۲۰۰۲).

از آنجایی که باکتری سودوموناس یکی از عوامل مهم در پوسیدگی باله ماهیان است (Buller، ۲۰۰٤). هدف از انجام این مطالعه پاسخ به این سوال است که چه گونه‌هایی از این باکتری باله دمی ماهی آزاد پرورشی دریای خزر را مورد حمله قرار داده است تا با شناسایی عوامل ایجاد کننده عارضه، درمان به نحو موثرتری قابل انجام باشد.

مواد و روش‌ها

جهت خالص سازی باکتری‌ها ابتدا تعداد ۱۸۰ ماهی مولد دارای علایم ماکروسکوپی ضایعات باله انتخاب و از هر ماهی نمونه باکتریایی بر روی محیط اختصاصی سودوموناس کشت گردید پس از اخذ نمونه‌های باکتری از باله ماهیان، محیط‌های کشت داده شده به آزمایشگاه منتقل و محیط‌ها در دمای ۲۰ درجه سانتی‌گراد به‌مدت ٤۸ ساعت نگهداری گردید. پس از پایان انکوباسیون، تمامی محیط‌ها (۱۸۰ پلیت) مورد بررسی قرار گرفتند. سپس نماینده تمامی کلنی‌های باکتریایی جدا شده، انتخاب و کشت مجدد و خالص سازی آنها روی محیط‌های مغذی مانند برین – هارت

Archive of SID

www.SID.ir

آگار (Brain-Haert Agar) انجام گرفت (Widmer و همکاران، ۱۹۹۸).

به‌منظور انجام آزمایشات بیوشیمیایی با داشتن کلنی‌های خالص باکتری آزمایشات بیوشیمیایی جهت حذف نمونه‌های احتمالی غیر از جنس سودوموناس شامل رنگ‌آمیزی گرم، آزمایش کاتالاز، آزمایش اکسیداز، رشد روی محیط مک کانکی (Mac Conkey Agar) رشد روی محیط (Thiosulfat TCBS (Citrat Bile Sucrose Agar انجام گردید و در نهایت ۱۷ نمونه خالص‌سازی و انتخاب شد تا بوسیله آزمایشات مولکولی مورد بررسی گیرد (Hua-Hong و همکاران، ۲۰۰۹).

جهت طراحی و تهیه آغازگر (پرایمر) جهت واکنش PCR پرایمرهای اختصاصی گونه‌های سودوموناس بر اساس قطعه ۹۹۰ جفت بازی ژن 16S rDNA توسط شرکت ایرانی سیناژن تهیه و جهت این مطالعه مورد استفاده قرار گرفت و توالی نوکلئوتیدهای آنها بدین‌ترتیب می‌باشد (Hua-Hong و همکاران، ۲۰۰۹).

5-GGTCTGAGAGGATGATCAGT-3′ (F)
5′-TTAGCTCCACCTCGCGGC-3′ (R)

بدیهی است پس از تهیه مقدمات و مواد لازم جهت انجام PCR، اولین کار استخراج DNA از باکتری‌های خالص‌سازی شده از محیط کشت اختصاصی سودوموناس است. برای استخراج DNA باید به مقدار کافی از باکتری دراختیار داشت. بدین‌منظور باکتری‌ها در محیط آبگوشت TSA به‌مدت ۴۸ ساعت در ۳۷ درجه سانتی‌گراد بدون حرکت انکوبه گردیدند (Laganowska و Kaznowski، ۲۰۰۴؛ Porteous و همکاران، ۲۰۰۲؛ Widmer و همکاران، ۱۹۹۸).

به‌منظور استخراج DNA با استفاده از کیت استخراج DNA پس از کشت باکتری ۱/۵سی‌سی از سوسپانسیون آن به داخل لوله‌های اپندورف منتقل و سپس سوسپانسیون باکتری به‌مدت ۱۰ دقیقه در ۷۵۰۰g سانتریفوژ گردید و سپس قسمت پلت شده در ۱۰۰ µl بافر پروتئاز مجدداً به‌صورت سوسپانسیون در آورده شد. پس از نگهداری لوله‌ها به‌مدت ۱۰ دقیقه در دمای ۹۵ درجه سانتی‌گراد، مراحل ذیل طبق توصیه شرکت سازنده (سیناژن) انجام پذیرفت:

دستورالعمل PCR جهت نمونه‌های سودوموناس: در مرحله اول باید مخلوط PCR تهیه گردد. اجزاء زیر جهت ساخت ۴۰ µl مخلوط PCR به یک لوله اپندروف ۵۰ µl اضافه گردید (Liu و همکاران، ۲۰۱۱؛ Porteous و همکاران، ۲۰۰۲).

۱. ۵ µl بافر PCR (۱۰X)
۲. ۳ µl پرایمر فوروارد (جلو برنده) رقیق شده
۳. ۳µl پرایمر ریورس (عقب برنده) رقیق شده
٤. ۲ µl DNA الگوی رقیق شده
۵. ۱µl $Mgcl_2$
٦. ۰/۸ µl محلول dNTP
۷. ۲۵/۲ µl آب مقطر (دیونیزه)

واکنش PCR به‌ترتیب دمایی ذیل بر روی مخلوط PCR توسط دستگاه ترموسایکلر (Thermocycler) انجام گرفت (Liu و همکاران، ۲۰۱۱؛ Porteous و همکاران، ۲۰۰۲).

جدول ۱- برنامه دمایی واکنش PCR جهت نمونه‌های سودوموناس

برنامه ۱)	واسرشتگی یا تقلیب اولیه	۹٤ درجه سانتی‌گراد به‌مدت ۵ دقیقه	یک سیکل
برنامه۲)	۲-۱) واسرشتگی(تقلیب)	۹٤ درجه سانتی‌گراد به‌مدت ۳۰ ثانیه	۳۰ سیکل
	۲-۲) جفت شدن (اتصال)	٦۵ درجه سانتی‌گراد به‌مدت ۱ دقیقه	
	۲-۳) گسترش (طویل شدن)	۷۲ درجه سانتی‌گراد به‌مدت ۱ دقیقه	
برنامه ۳)	گسترش نهایی	۷۲ درجه سانتی‌گراد به‌مدت ۱۰ دقیقه	یک سیکل

Archive of SID

www.SID.ir

پس از پایان واکنش PCR نمونه‌ها الکتروفورز انجام گردید و سپس ژل مربوطه به‌مدت ۲۰ دقیقه در داخل رنگ اتیدیوم بروماید (Ethidium bromide) جهت ظهور باندهای DNA قرار داده و در نهایت باندهای مربوطه توسط دستگاه آشکارساز UV رویت شد (حسینی‌سالکده و همکاران، ۱۳۸٤؛ Liu و همکاران، ۲۰۱۱).

هضم آنزیمی محصولات PCR سودوموناس (RFLP): پس از خالص‌سازی محصولات PCR، محصول PCR (با توجه به اینکه چهار آنزیم برشی در این مطالعه استفاده گردید) در ٤ میکروتیوب هر یک به میزان ۵ µl تقسیم گردید. سپس ۱µl آنزیم مربوطه، ۲µl بافر اختصاصی مربوط به آن آنزیم و ۱۲µl آب مقطر به لوله‌ها اضافه گردید تا حجم هر لوله به ۲۰µl برسد. آنزیم‌های مورد استفاده، محل برش و بافر اختصاصی مربوط به آنها در جدول ۲ آمده است. قابل ذکر این که آنزیم‌های مورد استفاده از شرکت آمریکایی فرمنتاز تهیه گردید.

جدول ۲- آنزیم‌های مورد استفاده جهت محصولات PCR سودوموناس و سایر مشخصات مربوط به آنها (شرکت فرمنتاز)

آنزیم برشی	محل برش	بافر اختصاصی	دمای انکوماسیون	غیر فعال شدن آنزیم
*Tru1*I	*T ↓ TAA*	Buffer R	٦٥ درجه سانتی‌گراد	اضافه کردن EDTA µl
*Rsa*I	*GT ↓ AC*	Buffer Tango	۳۷ درجه سانتی‌گراد	دمای ٦٥ درجه سانتی‌گراد به‌مدت ۲۰ دقیقه
*Alu*I	*G ↓ CT*	Buffer Tango	۳۷ درجه سانتی‌گراد	دمای ٦٥ درجه سانتی‌گراد به‌مدت ۲۰ دقیقه
*Hinf*I	*G ↓ ANTC*	Buffer R	۳۷ درجه سانتی‌گراد	دمای ٦٥ درجه سانتی‌گراد به‌مدت ۲۰ دقیقه

پس از آماده سازی تیوپ‌ها طبق جدول فوق *Tru1*I دردمای ٦٥ درجه سانتی‌گراد و سه آنزیم I *Alu* I, *Hinf*I *Rsa* در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد به‌مدت یک شب انکوبه شدند. پس از پایان انکوباسیون با غیرفعال کردن آنزیم محصولات هضم آنزیمی با استفاده از ژل آگاروز ۳ درصد، الکتروفورز شدند (حسینی‌سالکده و همکاران، ۱۳۸٤؛ Liu و همکاران، ۲۰۱۱).

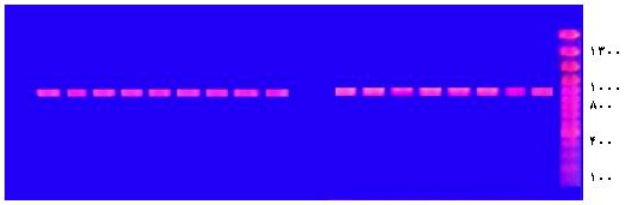
نتایج

نتایج واکنش PCR نمونه‌های سودوموناس: الکتروفوز ژل محصولات PCR به‌دست آمده از نمونه‌های سودوموناس همگی پس از قرار گرفتن در مجاورت اشعه UV (Pickering، ۱۹۷۷؛ Porteous و همکاران، ۲۰۰۲)، باند *۹۹۰bp* را نشان دادند (نگاره ۱). این محصولات شامل ۱۷ نمونه سودوموناس، یک نمونه شاهد سودوموناس فلورسنس و یک کنترل منفی بودند.

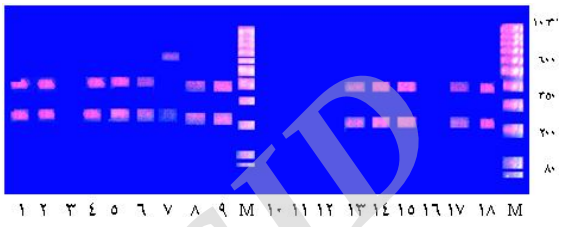
نتایج هضم آنزیمی نمونه‌های سودوموناس بوسیله آنزیم‌های برشی (RFLP): نتایج حاصل پس از الکتروفورز ژل نمونه‌های سودوموناس تحت تاثیر چهار نوع آنزیم محدودگر نشان داد حداقل پنج گونه، زیرگونه یا بیوار *Pseudomonas aeroginosa*، *P.putida*، *P.alcaligenes* و *P.fluorescens(Biovar I & V)* در بین نمونه‌های سودوموناس وجود دارد (Pickering، ۱۹۷۷؛ Porteous و همکاران، ۲۰۰۲). شکل‌های ۲ تا ۵ هضم آنزیمی محصولات PCR را نشان می‌دهد.

Archive of SID

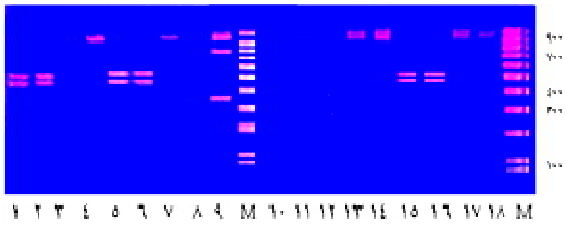
www.SID.ir



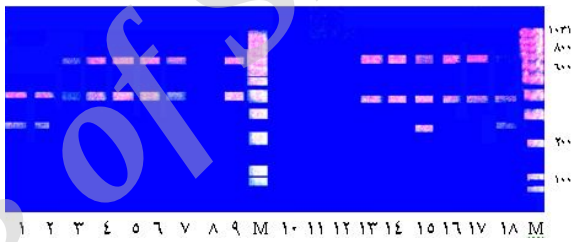
شکل ۱- الکتروفورز ژل نمونه‌های سودوموناس (محصول PCR)



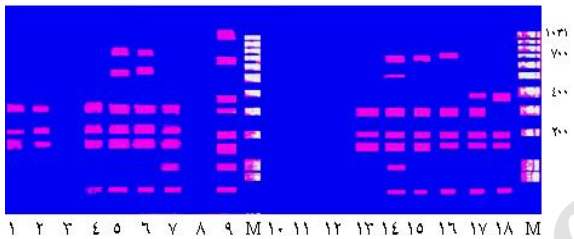
شکل ۲- هضم آنزیمی نمونه‌های سودوموناس با آنزیم AluI



شکل ۳- هضم آنزیمی نمونه‌های سودوموناس با آنزیم HinfI



شکل ٤- هضم آنزیمی نمونه‌های سودوموناس با آنزیم RsaI



شکل ٥- هضم آنزیمی نمونه‌های سودوموناس با آنزیم TruII

نشانگر= N، کنترل منفی=M

بحث و نتیجه‌گیری

نتایج بدست آمده از مطالعات مولکولی حاکی از آن بود که در بین نمونه‌های سودوموناس حداقل ۵ گونه یا بیوتیپ مربوط به آنها مشاهده شد. Xia و همکاران (۲۰۰۳) 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 آئرومونس‌هایدروفیلا جداسازی کردند که در میان آنها گونه‌های بیماریزای آئرومونس‌های دروفیلا، آئرومونس سوبریا و سودوموناس فلورسنس وجود داشت (Xia و همکاران، ۲۰۰۳). در این مطالعه شامل آزمایش PCR با استفاده از ژن 16S rDNA انجام شد. Frahm و همکاران (۲۰۰۱) نیز در مطالعه‌ای سودوموناس آئروژینوزا را به‌وسیله روش مولکولی جداسازی کردند (Farm و همکاران، ۲۰۰۱). 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

Archive of SID
www.SID.ir

نمونه‌های جداسازی شده مربوط به سودوموناس آئروژینوزا می‌باشد (Kimata و همکاران، ۲۰۰٤). در مطالعه‌ای بر روی گونه‌های سودوموناس که از آب و نمونه‌های محیطی بدست آمده و به‌وسیله 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 (Bodilis و همکاران، ۲۰۰٤). Widmer و همکاران (۱۹۹۸) به‌وسیله روش PCR که آغازگر آن بر اساس ژن 16S rDNA طراحی شده بود، توانستند جهت تشخیص اعضاء جنس سودوموناس بهره گیرند. آنها جهت تشخیص گونه‌های مورد نظر از روش هضم آنزیمی با استفاده از آنزیم Hae*III* (تکنیک RFLP) استفاده کردند و توانستند برخی از گونه‌های جنس سودوموناس را شناسایی کنند (Widmer و همکاران، ۱۹۹۸). بنابراین با توجه به اینکه این روش جهت شناسایی تمام گونه‌های این جنس کارآمد نبود، Porteous و همکاران (۲۰۰۲) از این مطالعات بهره گرفتند و با استفاده از ٤ نوع آنزیم به روش RFLP گونه‌های این جنس را شناسایی و در ۵ شاخه جداگانه قرار دادند (Porteous و همکاران، ۲۰۰۲). بر همین اساس Laganowska و همکاران (۲۰۰٤) نیز با استفاده از الگوی هضم آنزیمی نمونه‌های آئروموناس توسط ٤ نوع آنزیم که براساس ژنهای 16S-23S rDNA تکثیر شده بودند (PCR/RFLP) جهت شناسایی گونه‌های آئروموناس استفاده کردند (۹). در این مطالعه آزمایش PCR با استفاده از ژن 16S rDNA و آزمایش RFLP بوسیله چهار آنزیم محدودگر Alu1*I*، Hinf*I*، Rsa*I* و Tru1*I* انجام شد.

باکتری‌هایی که به‌عنوان عوامل پوسیدگی باله‌های ماهیان شناخته شده‌اند چه به‌صورت 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. در بروز این عارضه بعنوان یک سندروم عوامل متعددی دخیلند به‌طوری‌که 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 به‌دلیل طغیان رودخانه‌ها و سایر مشکلات محیطی، مدیریتی و عوامل استرس‌زا نام برد. بنابراین با توجه به اینکه حداقل برخی از این عوامل مذکور مبتلا به استخرهای پرورشی است و باکتری‌های مذکور نیز 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 (سلطانی، ۱۳۸۰). 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.

Archive of SID

www.SID.ir

مطالعات مختلف بیوشیمیایی و مولکولی نشان می‌دهند گونه‌های مختلف سودوموناس در منابع آبی و ماهیان مختلف به‌صورت 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 اما با توجه به اینکه عوامل اولیه متعددی در بروز پوسیدگی باله نقش به نظر می‌رسد بهترین روش در جلوگیری از پوسیدگی باله حذف عوامل اولیه از استخرهای پرورش ماهیان است.

منابع

حسینی‌سالکده، ق.، قره‌ریاضی، ب.، و نقوی، م.ر.، ۱۳۸٤. نشانگرهای مولکولی، چاپ اول، انتشارات دانشگاه تهران، صفحه‌های۳۰ تا ٤٤.

سلطانی، م.، ۱۳۸۰. بیماری‌های آزاد ماهیان، چاپ اول، انتشارات دانشگاه تهران، صفحه‌های ۱۰٤ تا ۱۳٤.

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

Buller, N.B., 2004. Bacteria from fish and other Aquatic animals, A practical identification manual, J. CABI publishing 12, 142-157.

Frahm, E., Heiber, I., Ludwig, W., and Oust U., 2001. Rapid parallel detection of hygienically relevant microorganisms in water samples by PCR and specific hybridization in microtiter plates, pp. 423-429.

Hua-Hong, C., Sheng Q, Jie, L., Yu-Qin, Z., Li-Hua, X., Cheng-Lin, J., Chang-Jin, K., Wen-and Jun, L., 2009. International Journal of Systematic Evolutionary Microbiology 59, 559-563.

Khan, R.A., Campebll, J., and Lear, H., 1981. Mortality in captive Atlantic cod, Godus morhua L. associated with fin rot disease. J. Wild life Dis. 17, 521-527.

Kimata, N., Nishino, T., Suzuki, S., and Kongure, K., 2004. Pseudomonas aeruginosa isolated from marine environments in Tokyo Bay. Microbial Ecology 47, 41-47.

Laganowska, M., and Kaznowski, A., 2004. Restriction fragment length polymorphism of 16S-23S rDNA intergenic spacer of Aeromonas spp. J. Appl. Microbial. 27, 549-557.

Liu, C., Zeng, G.M., and Tang, L., et al. 2011. Electrochemical detection of Pseudomonas aeruginosa 16S rRNA using a biosensor based on immobilized stem-loop structured probe. Enzyme Microb. Technol. 49, 71-266.

Logan, C., Habington, A., Lennon, G., Cronin, F., O'Sullivan, N., 2010. Evaluation of the efficacy of n real-time polymerase chain reaction for the routine early detection of Pseudomonas aeruginosa in cystic fibrosis sputum and throat swab specimens. Diagn Microbiol Infect Dis. 68, 65-358.

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

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

Sae W., Park Sang, T., Park Jung, E., and Lee and Young, M., 2008. International Journal of Systematic Evolutionary Microbiology 58, 2475-2478.

Turnbull, J.F., Richards, R.H., and 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, 415-427.

Widmer, F., Seidler, R.J., and 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.

Archive of SID

www.SID.ir

Xia, C., Zhi-Hong, M., Habibur, R.M., and Zhi-Guang, W., 2003. PCR cloning and identification of the haemolysin gene of Aeromonas hydrophila from fresh water. J. Aquaculture

Yiagnisis, M., and Athanassopoulou, F., 2011. Bacteria Isolated From Diseased Wild and Farmed Marine Fish in Greece. Recent Advances in Fish Farms, Dr. Faruk Aral (Ed.).

Archive of SID

www.SID.ir