



پایش ژن های حدت جدایه های *آئروموناس هیدروفیلا* در نمونه های خرچنگ (*Astacus leptodactylus*) دراز چنگال باریک

مهتاب خلفیان^۱، رضا سلیقه زاده^{۱*}، مصطفی اخلاقی^۲، حسن شریفی یزدی^۳

^۱ دانشجوی دکترای تخصصی، گروه علوم درمانگاهی، دانشگاه شیراز، شیراز، ^۲ استاد، گروه علوم درمانگاهی، دانشگاه شیراز، شیراز، ^۳ دانشیار، گروه علوم درمانگاهی، دانشگاه شیراز، شیراز.

چکیده

بیماری های عفونی یکی از عوامل مهم خسارات اقتصادی در صنعت پرورش آبزیان محسوب می شوند. *آئروموناس هیدروفیلا* یکی از عوامل بیماری زای مهم آبزیان است که به صورت اولیه سبب عفونت زخم و به دنبال تنش های ناشی از تغییرات دما، دستکاری و کیفیت پایین آب پرورشی به صورت ثانویه سبب بروز مشکلات عفونی می گردد. این مطالعه با هدف جداسازی باکتری *آئروموناس هیدروفیلا* از خرچنگ دراز چنگال باریک و تعیین ژن های حدت آن انجام شد. در این مطالعه توصیفی، ۱۰ نمونه خرچنگ دراز چنگال باریک بیمار مورد بررسی قرار گرفت. کشت نمونه ها در محیط برین هارت آگار انجام شد. به منظور شناسایی باکتری جدا شده از آزمون های بیوشیمیایی و مولکولی استفاده گردید. همچنین وجود سه ژن حدت شامل لیپاز، الاستاز و آئرولیزین در جدایه ها مورد بررسی قرار گرفت. در مجموع از ۱۰ خرچنگ دراز چنگال باریک دارای علائم پلاک های سیاه رنگ، آسه، نرمی پوسته، خوردگی ضمایم و بی حالی، تعداد ۲ باکتری *آئروموناس هیدروفیلا* جداسازی گردید. سویه اول دارای ژن های حدت لیپاز و الاستاز و سویه دوم ژن های لیپاز، الاستاز و آئرولیزین را داشت. اطلاعات به دست آمده از این پژوهش نشان داد که سویه های مختلف *آئروموناس هیدروفیلا* جدا شده از خرچنگ دراز چنگال باریک دارای ژن های حدت متفاوتی هستند. از این رو، انجام پژوهش های گسترده تر به منظور ارزیابی نقش این ژن ها در بیماری زایی و علائم مربوط به حدت در گونه های آبی پیشنهاد می گردد.

واژگان کلیدی: *آئروموناس هیدروفیلا*، خرچنگ دراز، عوامل حدت.

دریافت مقاله: آذر ماه ۹۵ پذیرش برای چاپ: دی ماه ۹۵

مقدمه

مختلفی می توانند این گونه را در زیستگاه های طبیعی تحت تاثیر قرار دهند. در این میان عوامل بیماری زای باکتریایی مانند *آئروموناس هیدروفیلا* (*Aeromonas hydrophila*)، گونه های سیتوباکتر (*Citrobacter*) و فلاوباکتریوم (*Flavobacterium*) نقش مهمی در مستعد کردن خرچنگ دراز آب شیرین به بیماری دارند. بنابراین اثرات قابل ملاحظه ای بر کاهش محصولات آبی پروری دارند (۱). *آئروموناس* ها مسئول ایجاد طیف وسیعی از بیماری ها در جانوران خونسرد هستند. این باکتری ها گرم منفی و میله ای شکل هستند. بیان پروتئین های خارج سلولی، وجود لایه S و فیمبریه و تولید

خرچنگ دراز چنگال باریک با نام علمی (*Astacus leptodactylus*) یکی از گونه های مهم خانواده خرچنگ دراز آب شیرین می باشد. خرچنگ دراز چنگال باریک یک گونه گسترده در سطح جهان است که در سراسر اروپا و خاورمیانه پراکندگی دارد (۱). در ایران، این خرچنگ علاوه بر سواحل ایرانی دریایی خزر در برخی از دریاچه ها و آب بندان های داخلی نیز وجود دارد (۲). عوامل بیماریزای

(* آدرس برای مکاتبه: شیراز، دانشگاه شیراز، گروه علوم درمانگاهی.
تلفن: ۰۹۱۶۶۲۲۳۳۷۱۹ پست الکترونیک: Rezasalighehzadeh@yahoo.com

شده در آکواریوم شخصی، درون ظرف حاوی آب به بخش بهداشت و بیماری های آبزیان دانشکده دامپزشکی دانشگاه شیراز آورده شد. نمونه های که در سطح بدنشان علائمی مانند پلاک های سیاه رنگ، آبه، نرمی پوسته، خوردگی ضمام و بی حالی داشتند انتخاب گردیدند (شکل ۱). پس از شستشوی سطح بدن با سرم فیزیولوژی با استفاده از سرنگ استریل از مایع درون آبه و همچنین با استفاده از لوپ استریل از محتویات زیر پلاک های سیاه رنگ موجود در سطح بدن نمونه گیری به عمل آمد. نمونه های گرفته شده به محیط برین هارت آگار (مرک، آلمان) منتقل شدند. پس از ۴۸ ساعت نگهداری در دمای ۲۵ درجه سلیسیوس، به منظور خالص سازی مجدد پرگنه های رشد یافته بر روی محیط کشت BHI کشت داده شدند.

ب) شناسایی اولیه جدایه ها: در این مطالعه به منظور شناسایی باکتری های جدا شده از آزمون های بیوشیمیایی مانند اکسیداز، کاتالاز، حرکت، اسکولین، احیا نیترات، اندول، ژلاتین، نشاسته، گلوکز، گالاکتوز، مالتوز، فروکتوز و ... استفاده گردید (۷).

ج) واکنش زنجیره ای پلی مرز (PCR): در ابتدا به منظور استخراج ژنوم باکتریایی پرگنه خالص و ۲۴ ساعته هر سویه به طور جداگانه به ۱۰۰ میکرولیتر آب مقطر افزوده شده و به مدت ۷ دقیقه جوشانده شدند. سپس تمامی لوله ها با دور ۱۰۰۰ g به مدت ۱۰ دقیقه سانتریفیوژ شدند تا اجزا سلولی رسوب داده شوند. سپس محلول روماندا که حاوی DNA ژنومی است به میکروتیوب تازه منتقل گردید. در این پژوهش از آغازگرهای ژن

کپسول پلی ساکاریدی و اندوتوکسین هایی مانند انتروتوکسین سیتولیتیک، آنرولیزین، لپاز و پروتئاز عوامل حدت اصلی گونه های *آئروموناس* هستند که باعث بیماری زای می شوند (۳). در میان گونه های *آئروموناس*، مهمترین عامل بیماری زای باکتری *آئروموناس هیدروفیلا* می باشد که قابلیت ایجاد بیماری در آبزیان را دارد. وجود این باکتری در ماهیان کشورهای آسیایی منجر به کاهش محصول تولیدی و خسارات اقتصادی در آبزیان پرورشی شده است (۴). این گونه باعث بروز سپتی سمی خونریزی دهنده در ماهی می شود (۵).

مطالعات مختلفی تنوع گسترده ای از بیماری زای *آئروموناس هیدروفیلا* را در گونه های مختلف ماهی بیان کرده اند. این پدیده به طور عمده به دلیل ناهمگن بودن سویه ها و تفاوت در چسبندگی و مکانیسم های انتروتوکسیک مسئول ایجاد عفونت در ماهی می باشد (۶). در شرایط نامناسب محیطی مانند تراکم بالای نگهداری، کمبود غذا یا کیفیت پایین آب، *آئروموناس* در خرچنگ دراز آب شیرین پدیدار می گردد (۱). هدف از این مطالعه جداسازی باکتری *آئروموناس هیدروفیلا* از خرچنگ دراز چنگال باریک و تعیین ژن های حدت آن بود.

مواد و روش ها

الف) جمع آوری نمونه و جداسازی باکتری: در این مطالعه تعداد ۱۰ نمونه بیمار خرچنگ دراز چنگال باریک، نگهداری



شکل ۱: نمونه های خرچنگ دراز چنگال باریک با علائم پلاک های سیاه رنگ و آبه.

جدول ۱: توالی پرایمرهای مورد استفاده در مطالعه.

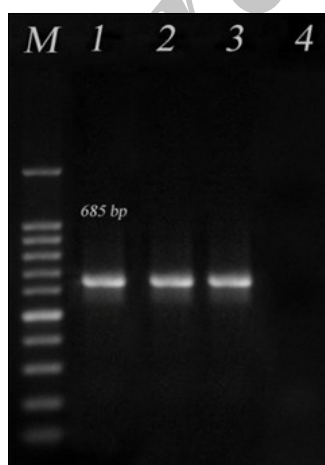
نام پرایمر	آغازگر	توالی (5'-3')	طول (جفت باز)	منبع
16S rDNA	رفت برگشت	GAAAGGTTGATGCCTAATACGTA CGTGCTGGCAACAAAGGACAG	۶۸۵	۸
لیپاز	رفت برگشت	ATCTTCTCCGACTGGTTCGG CCGTGCCAGGACTGGGTCTT	۳۸۳-۳۸۹	۹
الاستاز	رفت برگشت	ACACGGTCAAGGAGATCAAC CGCTGGTGTGGCCAGCAGG	۵۴۰	۹
آئرولیزین	رفت برگشت	CAAGGAGGTCTGTGGCGACA VTTTACCAGGTAGCAGGATTG	۲۰۹	۱۰

که نمونه اول حاوی ژن های حدت الاستاز و لیپاز بوده و در نمونه دوم ژن های حدت لیپاز، الاستاز و آئرولیزین مشاهده گردید (شکل ۳).

بحث

آئروموناس هیدروفیلا یک باکتری همیشه حاضر و فرصت **جدول ۲:** نتایج آزمون های بیوشیمیایی باکتری های جدا شده از خرچنگ دراز چنگال باریک.

آزمایش	نتیجه	آزمایش	نتیجه
رنگ آمیزی	گرم منفی	VP	منفی
مورفولوژی	میله ای	MR	مثبت
اکسیداز و کاتالاز	مثبت	احیا نیترات	مثبت
حرکت	منفی	گلوکز	مثبت
اندول	منفی	فروکتوز	مثبت
O/F	F	گالاکتوز	منفی
SIM	منفی	مانوز	مثبت



شکل ۲: الکتروفورز حاصل از تکثیر ناحیه 16S rDNA باکتری *آئروموناس هیدروفیلا*. (M مارکر ۱۰۰ جفت بازی، ستون ۱) کنترل مثبت، ستون های ۲ و ۳) نمونه های مثبت، ستون ۴) کنترل منفی.

هدف *16S rDNA* برای تایید جنس و گونه جدایه ها استفاده گردید. همچنین با این روش و به کمک پرایمرهای اختصاصی وجود ژن های بیماری زایی شامل لیپاز، الاستاز و آئرولیزین در جدایه های تایید شده مورد بررسی قرار گرفت (جدول ۱). واکنش PCR در حجم ۲۵ میکرولیتر شامل ۲/۵ میلی مولار کلرید منیزیم، ۲/۵ میکرولیتر بافر PCR (10X)، ۱۰ نانومول از dNTPs، ۱۰ نانومول از هر پرایمر، ۲/۵ واحد آنزیم Taq پلی مراز (فرمتاز) و ۲۰ نانوگرم DNA مکمل انجام شد. واکنش زنجیره ای پلی مراز در دستگاه ترموسایکلر (اپندرف، آلمان) با شرایط واسرشت شدن اولیه در ۹۵ درجه سلیسیوس به مدت ۵ دقیقه در ادامه ۳۵ چرخه شامل واسرشت شدن در دمای ۹۵ درجه سلیسیوس به مدت ۲ دقیقه، اتصال در دمای ۵۵ درجه سلیسیوس به مدت ۶۰ ثانیه، گسترش در دمای ۷۲ درجه سلیسیوس به مدت ۶۰ ثانیه و در نهایت گسترش نهایی در دمای ۷۲ درجه سلیسیوس به مدت ۷ دقیقه انجام شد (۱۱). محصولات PCR بر روی ژل آگاروز ۱/۵ و ۱/۸ درصد الکتروفورز شدند و در زیر نور فرابنفش مشاهده گردیدند.

یافته ها

از ۱۰ خرچنگ دراز چنگال باریک دارای علایم پلاک های سیاه رنگ، آبسه، نرمی پوسته، خوردگی ضمامم و بی حالی، ۲ جدایه ی مشکوک به جنس *آئروموناس* (باکتری های گرم منفی، اکسیداز مثبت و کاتالاز مثبت) جداسازی شد (جدول ۲). با توجه به نتایج PCR دو باکتری جدا شده به عنوان *آئروموناس هیدروفیلا* تشخیص داده شدند (شکل ۲). همچنین نتایج مربوط به بررسی وجود ژن های حدت نشان داد

نشانه قوی از حدت بیماری زایی در سویه های *آئروموناس* می باشد (۱۵). نام (Nam) و جو (Joh) در سال ۲۰۰۷ شیوع بالاتر ژن *آئرولیزین* را در سویه های بیماری زا برای آزاد ماهیان نشان دادند (۱۶). همچنین *آئرولیزین* به عنوان عامل اصلی حدت در سویه *آئروموناس ورونی* (*Aeromonas veronii*) برای گربه ماهی در نظر گرفته شده است (۱۷).

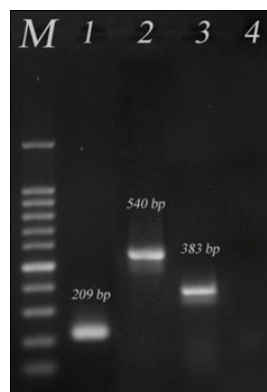
ژن های کد کننده الاستاز و لیپاز در سویه های *آئروموناس هیدروفیلا* جدا شده از رودخانه سائو فرانسیسکو نیز شناسایی شده اند. این ژن ها به معمول در سویه های *آئروموناس* یافت می شوند (۹). لیپاز و هیدرولیزین نیز به عوامل اصلی حدت در گونه های *آئروموناس* در نظر گرفته می شوند. زیرا موجب تغییر ساختار غشای سیتوپلاسمی میزبان و در نتیجه تشدید بیماری زایی آن می شوند. به ویژه اگر ژن *آئرولیزین* وجود داشته باشد (۱۷). همچنین این ژن ها از عوامل مهم خارج سلولی استقرار در بافت های میزبان و نکروز آنها محسوب می شوند (۱۵). سانگ (Song) و همکاران در سال ۲۰۰۴ ارتباط آسیب های ایجاد شده در کشت سلولی توسط *آئرولیزین* همراه با الاستاز را نشان دادند (۱۸). ظرفیت آنزیم های خارج سلولی به دلیل لیز سلولی و فراهم سازی غذا در زمان تکثیر گونه های *آئروموناس*، می تواند اهمیت قابل توجهی داشته باشد (۱۵). ژن لیپاز به عنوان یک عامل مهم حدت در سویه های *آئروموناس* جدا شده از آزاد ماهیان در نظر گرفته شده است (۱۶).

نتیجه گیری

براساس یافته های این تحقیق می توان نتیجه گرفت که سویه های مختلف *آئروموناس هیدروفیلا* جدا شده از خرچنگ دراز چنگال باریک دارای ژن های حدت متفاوتی هستند. این امر می تواند بر حدت بیماری زایی و علائم ناشی از آن در این گونه آبی اثر گذار باشد.

تشکر و قدردانی

نویسندگان این مقاله از جناب آقای فریدونی به دلیل همکاری صمیمانه در اجرای این پژوهش کمال امتنان را دارند.



شکل ۳: الکتروفورز ژن های حدت در باکتری *آئروموناس هیدروفیلا*. (M) مارکر ۱۰۰ جفت بازی، ستون (۱) ژن *آئرولیزین*، ستون (۲) ژن الاستاز، ستون (۳) ژن لیپاز، ستون (۴) کنترل منفی.

طلب است که می تواند سبب ایجاد بیماری در موجودات آبی گردد. این باکتری یکی از عوامل مهم بیماری زا در سیستم های پرورشی ماهیان گرم آبی به شمار می رود و می تواند سبب سپتی سمی خون ریزی دهنده شود (۱۲ و ۱۳). در بررسی حاضر پس از شناسایی اولیه سویه های جدا شده از خرچنگ دراز چنگال باریک از روش واکنش زنجیره ای پلی مرز و پرایمرهای *16S rRNA* برای تایید جنس و گونه های جدایه های *آئروموناس هیدروفیلا* استفاده شد.

آهانگرزاده (Ahangarzadeh) و همکاران در سال ۲۰۱۵ از این ژن برای تایید جنس و گونه *آئروموناس هیدروفیلا* استفاده کردند. نتایج به دست آمده از تحقیقات این محققان با یافته های به دست آمده در این بررسی هم خوانی داشت. به نحوی که الکتروفورز محصولات پلی مرز این ژن در ژل آگاروز ۱/۵ درصد بانندی به اندازه ۶۸۵ جفت باز ایجاد نمود (۱۴). در بررسی حاضر دو جدایه از باکتری *آئروموناس هیدروفیلا* جداسازی و مورد تایید نهایی قرار گرفت. ویژگی های بیماری زایی و حدت *آئروموناس هیدروفیلا* با گستره وسیعی از آگزوتوکسین ها و آگزوانزیم ها مرتبط است (۳). در این مطالعه دو سویه جدا شده به ترتیب دارای ژن های حدت لیپاز و الاستاز و لیپاز، الاستاز و *آئرولیزین* بودند. وجود عوامل حدت، به ویژه عوامل مربوط به تولیدات خارج سلولی، نقش مهمی در انتقال گونه های *آئروموناس* دارند. وجود *آئرولیزین*

References

1. SamCookiyaei A, Afsharnasab M, Razavilar V, Motalebi AA, Kakoolaki S, Asadpor Y, Yahyazade MY, NekuieFard A. Experimentally pathogenesis of *Aeromonas hydrophila* in freshwater Crayfish (*Astacus leptodactylus*) in iran. Iran J Fish Sci. 2012; 11(3): 644-656.
2. Karimpour M, Harliog˘lu MM, Aksu Ö. Review Status of freshwater crayfish (*Astacus leptodactylus*) in Iran. Know Managt Aquatic Ecosyst. 2011; 401(18): 1-15.
3. Yogananth N, Bhakyaraj R, Chanthuru A. Anbalagan T, Nila KM. Detection of virulence gene in *Aeromonas hydrophila* isolated from fish samples using PCR technique. Global J Biotech Biochemist. 2009; 4(1): 51-53.
4. Ebanks RO, Dacancy A, Goguen M, Pinto DM, Ross NW. Differential proteomic analysis of *Aeromonas hydrophila* outer membrane proteins in response to low iron and in vivo growth conditions. Proteomics. 2004; 4(4): 1047-1083.
5. Asha A, Nayak DK, Shanker KM, Mohan CV. Antigen expression in biofilm cells of *Aeromonas hydrophila* employed in oral vaccination of fish. Fish Shellfish Immun. 2004; 16(3): 429-436.
6. Fang HM, Ge R, Sin YM. Cloning, characterization and expression of *Aeromonas hydrophila* major adhesin. Fish Shellfish Immun. 2004; 16(5): 645-658.
7. Yousr AH, Napis S, Rusul GRA, Son R. Detection of aerolysin and hemolysin genes in *Aeromonas* spp. isolated from environmental and shellfish sources by polymerase chain reaction. Asean Food J. 2007; 14(2): 115-122.
8. Dorsch M, Ashbolt NJ, Cox PT, Goodman AE. Rapid identification of *Aeromonas* species using 16s rDNA targeted oligonucleotide primers: a molecular approach based on screening of environmental isolates. J Appl Bacteriol. 1994; 77(6): 722-726.
9. Sen K. Development of a rapid identification method for *Aeromonas* species by multiplex-PCR. Can J Microbiol. 2005; 51(11): 957-966.
10. Xia C, Ma ZH, Habibur Rahman M, Wu ZG. PCR cloning and identification of the h-haemolysin gene of *Aeromonas hydrophila* from freshwater fishes in China. Aquaculture. 1994; 229(1-4): 45-53.
11. Hosseinzadeh M, Tukmechi A. Isolation and identification of enterotoxin producing *Aeromonas hydrophila* from common carp (*Cyprinus carpio*). J Anim Environ. 2016; 7(4): 173-178. [In Persian]
12. Casiano H, Choresca JR, Dennis K, Jee-Eun Han G, Sang-Phil S, Ji-Hyung K, Jin-Woo J, Se-Chang P. Molecular detection of *Aeromonas hydrophila* isolated from albino catfish, *Clarias* sp. reared in an indoor commercial aquarium. Korean J Vete Res. 2010; 50(4): 331-333.
13. Sarkar A, Saha M, Roy, P. Identification and typing of *Aeromonas hydrophila* through 16S rDNA-PCR fingerprinting. J Aqua Res Devel. 2012; 3(6): 146-149.

14. Ahangarzadeh M, Ghorbanpour M, Peyghan R, Sharif rohani M, Soltani M. Role of *Aeromonas hydrophila* in bacterial septicemia of cultured carps in Khouzestan province. Iran Vete J. 2015; 11(3): 5-16. [In Persian]
15. Oliveira STL, Veneroni-Gouveia G, Costa MM. Molecular characterization of virulence factors in *Aeromonas hydrophila* obtained from fish. Pesq Vet Bras. 2012; 32(8): 701-706.
16. Nam IY, Joh K. Rapid detection of virulence of *Aeromonas* isolated from a trout by hexaplex-PCR. J Bacteriol. 2007; 45(4): 297-304.
17. Nawaz M, Khan SA, Khan AA, Sung K, Tran Q, Kerdahi K, Steele R. Detection and characterization of virulence and integrons in *Aero-monas veronii* isolated from catfish. Food Microbiol. 2010; 27(3): 327-331.
18. Song T, Toma C, Nakasone N, Iwanaga M. Aerolysin is activated by metalloprotease in *Aeromonas veronii* biovar sobria. J Medical Microbiol. 2004; 53(6): 477-482.

Archive of SID



The evaluation of virulence genes in *Aeromonas hydrophila* isolated from crayfish *Astacus Leptodactylus*

Mahtab Khalafiyani¹, Reza Saligheh Zadeh¹, Mostafa Akhlaghi², Hassan Sharifiyazdi³

¹ Ph.D. student, Department of Clinical Sciences, Shiraz University, Shiraz, Iran.

² Professor, Department of Clinical Sciences, Shiraz University, Shiraz, Iran.

³ Associate Professor, Department of Clinical Sciences, Shiraz University, Shiraz, Iran.

Abstract

Infectious diseases are major economic losses in fish production facilities. *Aeromonas hydrophila* is considered as an important pathogen causing primary infection in wounds or the secondary problem following stress raised from temperature changes, handling, or poor water quality. This study was aimed to isolate *A. hydrophila* from crayfish *Astacus Leptodactylus* and to determine its virulence genes. Ten infected crayfish were investigated in this descriptive study. Samples were cultivated on Brain Heart Infusion (BHI) Agar medium. Bacterial identification was performed using both biochemical and molecular tests. Also, the presence of three virulence genes (*lipase*, *elastase*, and *aerolysin*) was investigated in the isolates. Two *A. hydrophila* strains were isolated from 10 infected crayfish with symptoms including black plaque, abscess, soft shell, corrosion appendages, and lethargy. One of the isolated strains had *lipase* and *elastase* genes, and the other one contained *lipase*, *elastase*, and *aerolysin* virulence genes. Our results showed the presence of different virulence genes in different *A. hydrophila* strains isolated from infected crayfish. Further studies are required to clarify the role of these genes in pathogenicity and virulence-related symptoms in the aquatic species.

Keywords: *Aeromonas hydrophila*, Crayfish, Virulence factors.

Correspondence to: Reza Saligheh Zadeh

Tel: +989166223719

E-mail: Rezasalighehzadeh@yahoo.com

Journal of Microbial World 2017, 10(2): 157-163.