جهت تهیه فایل WORD این مقاله به سایت DaneshResan.com مراجعه نمایید و عنوان مقاله را جستجو کنید
بیش از ۲ میلیون مقاله فارسی در این سایت موجود میباشد

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

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

۱ـ دانشگاه آزاد اسلامی، واحد کازرون، دانشکده دامپزشکی، گروه بهداشت و بیماری‌های آبزیان، کازرون، ایران
۲ـ گروه آموزشی بهداشت و بیماری‌های آبزیان، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه تهران، تهران، ایران
۳ـ دانشگاه آزاد اسلامی، واحد علوم و تحقیقات تهران، دانشکده علوم تخصصی دامپزشکی، تهران، ایران
مسئول مکاتبات: golchinalireza@yahoo.com

تاریخ دریافت: ۹۱/۹/۲۳ تاریخ پذیرش: ۹۲/۳/۲۶

چکیده

به منظور مطالعه پوسیدگی باله دمی با تأکید بر عوامل باکتریایی *آئروموناس* و *سودوموناس* در ماهی آزاد دریای خزر مرکز تکثیر و پرورش آزادماهیان شهید باهنر کلاردشت، تعداد ۱۸۰ 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 گونه‌های *آئروموناس کاویا* و *آئروموناس هایدروفیلا* (زیرگونه‌ای که تولید گاز نمی‌کند) به ترتیب با فراوانی ۷۵ و ۲۵ درصد و باکتری‌های جنس *سودوموناس* از گونه‌های *سودوموناس فلورسنس*، *سودوموناس پوتیدا* و *سودوموناس آلکالیژنز* به ترتیب با فراوانی ۴۸/۱، ۴۲/۳۶ و ۲۱/۰۵ بودند.

کلمات کلیدی: ماهی آزاد دریای خزر، پوسیدگی باله، *آئروموناس*، *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 آنجائی که عوامل مدیریتی و بهداشتی نقش مهم و مؤثری در بروز یا جلوگیری از وقوع آن دارند، لذا از پوسیدگی باله بعنوان 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 مسأله شاخص مناسبی برای تفکیک ماهیان وحشی و پرورشی از یکدیگر محسوب می شود [۲٤]. عوامل مختلفی در بروز پوسیدگی باله ماهیان نقش دارند بطوری که 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 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 [۱۹]. 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 [۲٤]. مطالعات نشان می‌دهد آنتی‌بیوتیک‌های موثری علیه باکتری‌های دو جنس *آئروموناس* و *سودوموناس* وجود دارد اما اخیراًبرخی از آنها نسبت به این باکتری‌ها مقاوم شده اند و تعداد آنها رو به افزایش است. بنابراین عصاره گیاهان مناطق ساحلی، عصاره نوعی مرجان و جلبک بعنوان منابع بالقوه و غنی از داروهای جدید بعنوان جانشین آنتی‌بیوتیک‌های رایج در آبزی-

جهت تهیه فایل WORD این مقاله به سایت DaneshResan.com مراجعه نمایید و عنوان مقاله را جستجو کنید
بیش از ۲ میلیون مقاله فارسی در این سایت موجود میباشد

پروری پیشنهاد می گردد [۱۲]. از آنجائی که عوامل مختلفی مانند عوامل مدیریتی ،تغذیه ای و عفونی در بروز پوسیدگی باله ماهیان نقش دارند،این مطالعه برآن است تا نقش عوامل باکتریایی مهم در بروز این سندروم را بررسی نماید.

مواد و روش کار

نمونه‌گیری: جهت نمونه‌گیری از باله‌های پوسیده ماهیان مولد، تعداد ۱۸۰ عدد ماهی مولد بر اساس ارزیابی آماری انتخاب و پس از صید بوسیله ساچوک به چان برزنتی منتقل گردید. سپس با استفاده از داروی MS_{222} 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 نمونه گیری، محیط‌های کشت جهت انجام آزمایشات تکمیلی به آزمایشگاه منتقل گردید [۳].

آزمایشات بیوشیمیایی

۱ـ خالص‌سازی باکتری‌ها: محیط‌های کشت داده شده به آزمایشگاه منتقل و محیط‌ها در دمای ۲۰ درجه سانتی‌گراد بمدت ٤٨ ساعت نگهداری گردید. پس از پایان انکوباسیون، تمامی محیط‌ها (٣٦٠ پلیت) مورد بررسی قرار گرفتند .سپس نماینده تمامی کلنی‌های باکتریایی جدا شده، انتخاب و کشت مجدد و خالص‌سازی آنها روی محیط‌های مغذی مانند برین ـ هارت آگار (Brain-Haert Agar) انجام گرفت [۳].

۲ـ 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 [٦].رنگ‌آمیزی گرم که در این رنگ‌آمیزی باکتری‌های گرم منفی به رنگ صورتی تا قرمز و باکتری‌های گرم مثبت برنگ بنفش دیده می‌شوند.

آزمایش کاتالاز: ۱ـ آزمایش اکسیداز ۲ـ رشد روی محیط مک کانکی (Mac Conkey Agar). ۳ـ تمام باکتری‌های دو جنس *آئروموناس* و *سودوموناس* قادر به رشد روی این محیط می‌باشند. ٤ـ رشد روی محیط (TCBS Thiosulfat Citrat Bile Sucrose Agar). ٥ـ هیچ یک از باکتری‌های دو جنس *آئروموناس* و *سودوموناس* قادر به رشد روی این محیط نمی‌باشند. این محیط، محیط اختصاصی باکتری‌های جنس ویبریو می‌باشد.

۳ـ آزمایشات بیوشیمیایی تکمیلی: جهت توصیف بیشتر دو جنس *آئروموناس* و *سودوموناس* و تفکیک گونه‌های آنها، آزمایشات بیوشیمیایی تکمیلی انجام گرفت [۲، ٦، ۷ و ۱۰].

نتایج

پس از انجام آزمایشات مقدماتی و حذف نمونه‌های غیرمرتبط با دو جنس مورد بررسی، طبق آزمایشات مندرج در جداول ۱ و ۲ باکتری‌های مورد بررسی در دو جنس *آئروموناس* و *سودوموناس* قرار گرفتند. فراوانی نمونه‌های جداسازی شده به تفکیک گونه‌های مورد بررسی بوسیله نرم افزار SPSS 18 محاسبه گردید.۱- 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 H_2S تولید نمی‌کردند. تولید اندول برای همگی مثبت بود. همگی در محلول نمکی یک و ۳ درصد رشد کردند و برخی قادر به رشد در محلول نمکی ۷ 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

جهت تهیه فایل WORD این مقاله به سایت DaneshResan.com مراجعه نمایید و عنوان مقاله را جستجو کنید
بیش از ۲ میلیون مقاله فارسی در این سایت موجود میباشد

آرژینین دهیدروژناز مثبت بودند. اکثر نمونه‌ها واکنش *VP* منفی نشان دادند و برخی مثبت بودند. واکنش *MR* همگی مثبت بوده با توجه به نتایج بدست آمده از ۱۵ کلنی خالص‌سازی شده، ٤ نمونه به جنس سودموناس منتقل و ۳ نمونه حذف شدند. از ۸ نمونه باقیمانده ۲ نمونه (*۱A* و *۲A*) با توجه به مثبت بودن واکنش *VP*، *آئروموناس هایدروفیلا* (زیرگونه‌ای که تولید گاز نمی‌کند (*Aeromonas hydrophila anaerogenes*) تشخیص داده شد و نمونه‌های باقیمانده با توجه به منفی بودن واکنش *VP* آنها بعنوان *آئروموناس کاویا* (*A. caviae*) شناخته شدند (نمودار۱) [۷].

۲- 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 H_2S نیز نبودند. همگی در محلول نمکی یک و سه درصد رشد کردند و برخی قادر به رشد در محلول نمکی ۷ 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 ۱۵ نمونه خالص شده از محیط کشت اختصاصی سودوموناس ٤ 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 [٦ ، ۷ و ۱۰]. 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.

۱) *سودوموناس آلکالیژنز* (*Pseudomonas alcaligenes*): باکتری‌های این گروه نیتریت مثبت بوده و قادر به تخمیر گلوکز نیستند. البته این‌گونه شباهت‌های زیادی به *سودموناس آئروژینوزا* دارد [۹]. نمونه‌های این گروه شامل *۱P*، *۳P*، *٦P* و *١٤P* بودند.

۲) *سودوموناس فلورسنس* (*Pseudomonas fluoresens*): باکتری‌های این گروه قادر به احیای نیترات نیستند، گلوکز را تخمیر و ژلاتین را هیدرولیز می‌کنند. این گونه دارای ۵ بیووار است. نمونه‌های شناسایی شده همخوانی بیشتری با بیوارهای *I* و *V* دارند [٦]. این نمونه‌ها شامل *۲P*، *٤P*، *۷P*، *۹P*، *۱۲P*، *۱۵P*، *١٦P* و *۱۷P* بودند.

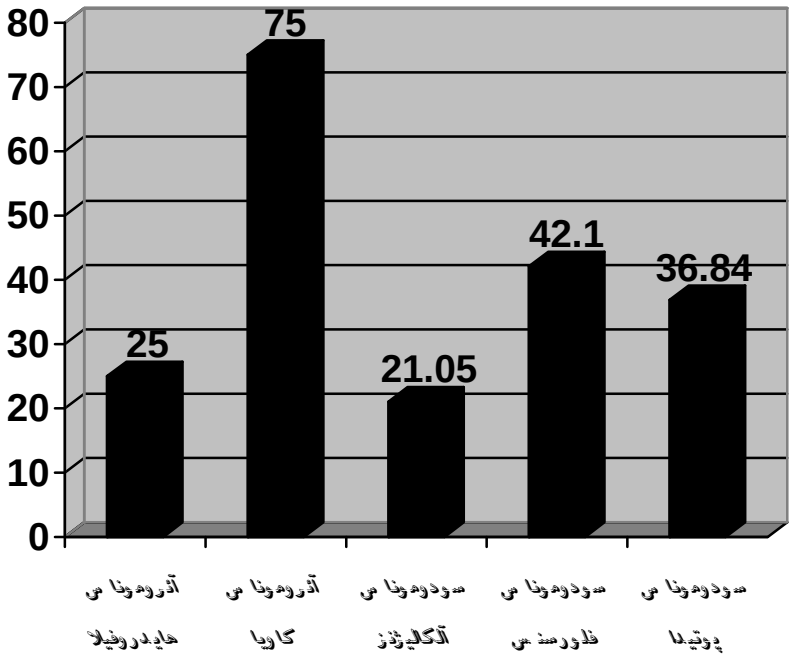
۳) *سودوموناس پوتیدا* (*Pseudomonas putida*): باکتری‌های این گروه نیز گلوکز را تخمیر می‌کنند اما قادر به احیای نیترات و هیدرولیز ژلاتین نیستند. منفی بودن آزمایش هیدرولیز ژلاتین وجه تمایز مناسبی جهت تفکیک این گروه با گونهٔ *سودوموناس فلوسنس* می‌باشد [٦]. نمونه‌های *۵P*، *۸P*، *۱۰P*، *۱۱P*، *۱۳P*، *۱۸P*،*۱۹P* در این گروه قرار گرفتند. فراوانی باکتری های جداسازی شده جنس *سودوموناس* در نمودار۱ نشان داده شده است.

جدول ۱ـ 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
۱*A*	+	+	−	+	+	−	−	+	+	+	−	+
۲*A*	+	+	−	+	+	−	−	+	+	+	−	+
۳*A*	+	+	−	+	+	−	−	+	+	−	−	+
٤*A*	+	+	−	+	+	−	−	+	+	−	−	+
٥*A*	+	+	−	+	+	−	−	+	+	−	−	+
٦*A*	+	+	−	+	+	−	−	+	+	−	−	+
۷*A*	+	+	−	+	+	−	−	+	+	−	−	+
۸*A*	+	+	−	+	+	−	−	+	+	−	−	+
۱*P*	−	−	−	−	−	−	+				−	+
۲*P*	+	−	−	+	−	−	−				−	+
۳*P*	−	−	−	−	−	−	+				−	+
٤*P*	+	−	−	+	−	−	−				−	+
٥*P*	+	−	−	+	−	−	−				−	+
٦*P*	−	−	−	+	−	−	+				−	+
۷*P*	+	−	−	+	−	−	−				−	+
۸*P*	+	−	−	−	−	−	−				−	+
۹*P*	−	−	−	+	−	−	−				−	+
۱۰*P*	+	−	−	−	−	−	−				−	+
۱۱*P*	−	−	−	−	−	−	−				−	+
۱۲*P*	+	−	−	+	−	−	−				−	+
۱۳*P*	+	−	−	−	−	−	+				−	+
۱۴*P*	−	−	−	−	−	−	+				−	+
۱۵*P*	−	−	−	+	−	−	−				−	+
۱۶*P*	+	−	−	+	−	−	−				−	+
۱۷*P*	+	−	−	+	−	−	−				−	+
۱۸*P*	+	−	−	−	−	−	−				−	+
۱۹*P*	+	−	−	−	−	−	−				−	+

جدول۲ـ نتایج آزمایشات بیوشیمیایی دو جنس *آئروموناس* و *سودوموناس*

ردیف	لیزین دکربوکسیلاز	اورنیتین دکربوکسیلاز	آرژینین دهیدروژناز	رشد در نمک ۱%	رشد در نمک ۳%	رشد در نمک ۷%	رشد در M.C	رشد در TCBS	رشد در SS	رشد در ۵°C	رشد در ۴۲°C	OF
۱A	−	−	+	+	+	−	+	−	−			F
۲A	−	−	+	+	+	−	+	−	−			F
۳A	−	−	+	+	+	−	+	−	−			F
۴A	−	−	+	+	+	+	+	−	−			F
۵A	−	−	+	+	+	−	+	−	−			F
۶A	−	−	+	+	+	−	+	−	−			F
۷A	−	−	+	+	+	−	+	−	−			F
۸A	−	−	+	+	+	+	+	−	−			F
۱P	−	−	+	+	+	−	+	−	−	+	−	O
۲P	−	−	+	+	+	+	+	−	−	+	+	O
۳P	−	−	+	+	+	−	+	−	−	+	−	O
۴P	−	−	+	+	+	+	+	−	−	+	−	O
۵P	−	−	+	+	+	−	+	−	−	+	+	O
۶P	−	−	+	+	+	+	+	−	−	+	+	O
۷P	−	−	+	+	+	+	+	−	−	+	−	O
۸P	−	−	+	+	+	−	+	−	−	+	+	O
۹P	−	−	+	+	+	−	+	−	−	+	+	O
۱۰P	−	−	+	+	+	−	+	−	−	+	+	O
۱۱P	−	−	+	+	+	−	+	−	−	+	−	O
۱۲P	−	−	+	+	+	−	+	−	−	+	−	O
۱۳P	−	−	+	+	+	−	+	−	−	+	−	O
۱۴P	−	−	+	+	+	−	+	−	−	+	−	O
۱۵P	−	−	+	+	+	−	+	−	−	+	−	O
۱۶P	−	−	+	+	+	−	+	−	−	+	+	O
۱۷P	−	−	+	+	+	+	+	−	−	+	−	O
۱۸P	−	−	+	+	+	−	+	−	−	+	+	O
۱۹P	−	−	+	+	+	+	+	−	−	+	+	O



نمودار۱ـ فراوانی دو جنس *آئروموناس* و *سودوموناس* به روش آزمایشات بیوشیمیایی

بحث

در این مطالعه، با استفاده از روش‌های بیوشیمیایی دو گونه *آئروموناس کاویا* و *آئروموناس هایدروفیلا* (زیرگونه‌ای که تولیدگاز نمی‌کند) از آئروموناس‌های متحرک و سه گونه *سودموناس فلورسنس*، *سودوموناس آلکالیژنز* و *سودوموناس پوتیدا* شناسایی گردید [٦ ، ٧ و١٠]؛ گرچه به اعتقاد برخی *آئروموناس کاویا* با زیرگونه‌ای از *آئروموناس هایدروفیلا* که تولید گاز نمی‌کند مترادف است و اختلافی بین آنها وجود ندارد [٣]. مطالعات نشان می‌دهد که در اکثر نمونه‌های اخذ شده از آب یا پوست ماهیان، باکتریهای *آئروموناس* و *سودوموناس* قابل جداسازی است. Taylor (٢٠٠٣) در مطالعه‌ای ٣٠ باکتری از ماهی کپور معمولی جدا کرد که از این تعداد، ١٣ جدایه بعنوان *آئروموناس هایدروفیلا*، ١١ جدایه بعنوان *آئروموناس سوبریا* و دو جدایه بعنوان *آئروموناس کاویا* معرفی شدند [٢٣]. Neuman و Ploger (١٩٧٠) نیز در مطالعه‌ای *آئروموناس هایدروفیلا* را از مزارع پرورش ماهی شمال غربی آلمان جدا کردند [١٨]. در بررسی دیگری Miranda و Zemelman (٢٠٠٢) توانستند *آئروموناس هایدروفیلا* و *سودموناس فلورسنس* را از مزارع ماهی آزاد شمال آلمان جدا کنند [١٧]. Saha و pal نیز در مطالعه‌ای ١٦ جدایه باکتری را از زخمهای سطحی ماهی مبتلا به سندرم EUS جدا کردند که در میان آنها گونه‌های *آئروموناس* و *سودوموناس* وجود داشت [٢٢]. در مطالعه دیگری که توسط Plumb و همکاران (١٩٩٥) انجام شد، ٢٠٠ نمونه باکتری جداسازی گردید که شامل جنس‌های *ادواردزیلا*، *سودوموناس* و گونه‌های *آئروموناس هایدروفیلا* و *آئروموناس سوبریا* بود [٢٠]. گرچه باکتری‌های مذکور غالباً بصورت فلور پوست یافت می‌شوند، اما آنها را از عفونت‌های داخلی نیز می‌توان جداسازی کرد. برای مثال Lipton(١٩٩١) *آئروموناس هایدروفیلا* را از زخم‌های خونریزی دهنده یک نوع ماهی و *سودوموناس آئروژینوزا*

را از استخری با شرایط پرورش متراکم جداسازی کرد [۱٦].

در این زمینه معدود مطالعاتی در داخل کشور نیز وجود دارد. رفیعی‌پور (۱۳۷٦) در مطالعه سرولوژیک نمونه‌های ماهی و میگو مناطق مختلف ایران با استفاده از روشهای آگلوتیناسیون روی لام و آنتی‌بادی 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 [۱].

نادری مایوان (۱۳۸۳) 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 [٤]. Aguilera-Arreola و همکاران (۲۰۰۵) 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 نحوه‌ی توزیع و پراکنش ژن‌های وابسته به حدت تأیید کرد که *آئروموناس هایدروفیلا* از نظر ژنتیکی ناهمگون است [۵]. در مطالعه دیگری Castro-Escarpulli و همکاران (۲۰۰۳)،۸۲ جدایه از گونه‌های *آئروموناس* را از ۲۵۰ 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 [۱۱]. بدین ترتیب این مطالعه نشان می‌دهد که تمام نتایج بیوشیمیایی بوسیله مطالعه مولکولی تأیید نگردید. 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 *آئروموناس هایدروفیلا* جداسازی کردند که در میان آنها گونه‌های بیماریزای *آئروموناس هایدروفیلا*، *آئروموناس سوبریا* و *سودوموناس فلورسنس* وجود داشت [۲٦]. همچنین Biscardi و همکاران (۲۰۰۱) جدایه‌های *آئروموناس هایدروفیلا* را به روش PCR براساس ژن آئرولیزین از نمونه‌های بطری‌های آب معدنی و منابع آب گرم جداسازی کردند [۸]. 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، ۲۰۰٤)[۹]. Kong و همکاران (۱۹۹۹) نیز ۷ 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* بودند [۱٤]. Frahm و همکاران (۲۰۰۱) نیز در مطالعه‌ای *سودوموناس آئروژینوزا* را بوسیله روش مولکولی جداسازی کردند [۱۳]. 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 [۹]. وایدمر و همکاران (۱۹۹۸) 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 مورد نظر از روش هضم آنزیمی با استفاده از آنزیم HaeIII (تکنیک RFLP) استفاده کردند و توانستند برخی از گونه‌های جنس *سودوموناس* را شناسایی کنند [۲۵]. بنابراین با توجه به اینکه این روش جهت شناسایی تمام گونه‌های این جنس کارآمد نبود، Porteus و همکاران (۲۰۰۲) از این مطالعات بهره گرفتند و با استفاده از چهار نوع آنزیم به روش RFLP گونه‌های این جنس را شناسایی و در ۵ شاخه جداگانه قرار دادند [۲۱]. 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 [۱۵]. 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.

نتیجه‌گیری

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 بطوری که 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 تولیدمثل، 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 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 (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

۱- رفیعی‌پور، ع. ۱۳۷٦. 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، تهران، شماره ۲۵۵٦، صفحه ٤۹-۲٦

۲- سلطانی، م. ۱۳۸۰. بیماری‌های آزاد ماهیان. چاپ اول، انتشارات دانشگاه تهران، تهران،صفحه ۱۳٤-۱۰٤.

۳- سلطانی، م. ۱۳۷٦. بیماری‌های باکتریایی ماهی (ترجمه). چاپ اول، انتشارات سازمان دامپزشکی کشور با

همکاری نشر جهاد دانشگاهی دانشگاه تهران، صفحات ۲۴۳-۲۳۰، ۲۶۹-۲۶۳ ، ۴۰۵-۴۰۱.

٤- نادری مایوان، ق. ۱۳۸۳. بررسی موارد پوسیدگی باله از آئروموناس‌های متحرک ماهی کپور علفخوار در برخی کارگاه‌های استان مازندران. پایان‌نامه دانشکده دامپزشکی دانشگاه تهران، شماره ۲۹۳۹، صفحه ۲۷-۱.

5- Aguilera-Arreola, M.G., C.H. Rodriguez, G. Zuniga, M.J. Figueras, G. Castro-Escarpulli (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., S.M. Finegold (1990), Bailery and Scott's diagnostic microbiology, 8th. Edition, Mosby Company, pp: 386-402 & 435-438.

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

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

9- Bodilis, J., R. Calbrix, J. Guerillon, A. Merieau, B. Pawlak, N. Orang, S. Barray (2004), Phylogenetic relationships between environmental and clinical isolates of *Pseudomonas fluorescens* and related species deduced from 16S rRNA Gene and Opr protein sequence. *Journal of Systematic and Applied Microbiology*, 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., M.J. Figueras, G. Castro-Escarpulli, L. Soler, E. Fernandez-Rendon, G.O. Aparicio, J. Guarro, M.R. Chacon (2003), Characterization of *Aeromonas spp*. Isolated from frozen fish intended for human consumption in Mexico. *Journal of Food Microbiology*, pp: 41-49.

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

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

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

15- Laganowska, M., A. Kaznowski (2004), Restriction fragment length polymorphism of 16S-23S rDNA intergenic spacer of *Aeromonas spp*. *Journal of Applied Microbiology*, 27: 549-557.

16- Lipton, A.P. (1991), Control of *Aeromonas* and *Pseudomonas* infections in fresh water aquaculture system. *Journal of Fresh Water Aquaculture*, Bhubaneswar (India) pp: 171-173.

17- Miranda, C.D., R. Zemelman (2002), Bacterial resistance to Oxytetracyclin in Chilean salmon farming. *Journal of Aquaculture*, 212(1-4): 23.

18- Neumann, W., W. Ploger (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.), *Journal of Fish Biology*, 100: 561-566.

20- Pulmb, J.A., C.C. Sheifinger, T.R. Shryock, T. Goldsby (1995), Susceptibility of six bacterial pathogens of channel cat fish to six antibiotics. *Journal of*

Aquaculture Animal Health, 7(3): 211-217.
21- Porteous, L.A., F. Widmer, R.J. Seidler (2002), Multiple enzyme restriction fragment length polymorphism analysis for high resolution distinction of *Pseudomonas* 16S rRNA genes. *Journal of Microbiological Methods*, pp: 337-348.
22- Saha, D., J. Pal (2002), In vitro antibiotic susceptibility of bacteria isolated from EUS affected fishes in India. *Letter Applied Microbiology*, 34(5): 311-316.
23- Taylor, P.W. (2003), Multiple antimicrobial resistance in chronic bacterial infection of Koi carp. *North American Journal of Aquaculture*, 65(2): 120-125.
24- Turnbull, J.F., R.H. Richards, D.A. Robertson (1996), Gross, histological and scanning electron microscopic appearance of dorsal fin rot in farmed Atlantic salmon, *Salmo salar* L. Parr. *Journal of fish disease*, (19): 415-427.
25- Widmer, F., R.J. Seidler, L.S. Watrud (1998), A highly selective PCR protocol for detecting 16S rRNA Genes of the Genus *Pseudomonas* in Environmental samples. *Journal of Environmental Microbiology*, 64(7): 2545-2553.
26- Xia, C., M. Zhi-Hong, R.M. Habibur, W. Zhi-Guang (2003), PCR cloning and identification of the β- haemolysin gene of *Aeromonas hydrophila* from fresh water. *Journal of Aquaculture*, 229(1-4): 45-53.