(DOI): 10.22034/AEJ.2020.130450

مقاله پژوهشی

بررسی مولکولی و بیوشیمیایی جنس *آئرومونا*س جدا شده از ماهیان آکواریومی مشکوک به سپتی‌سمی در شهرستان اهواز

- **طاهره عبیاوی***: گروه بهداشت آبزیان، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه شهید چمران اهواز، اهواز، ایران
- **رحیم پیغان**: گروه علوم درمانگاهی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه شهید چمران اهواز، اهواز، ایران
- **نغمه موری بختیاری**: گروه پاتوبیولوژی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه شهید چمران اهواز، اهواز، ایران
- **مسعود قربانپور**: گروه پاتوبیولوژی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه شهید چمران اهواز، اهواز، ایران
- **مینا آهنگرزاده**: پژوهشکده آبزی پروری جنوب کشور، مؤسسه تحقیقات علوم شیلاتی کشور، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، اهواز، ایران

تاریخ دریافت: آذر ١٣٩٨ تاریخ پذیرش: اسفند ١٣٩٨

چکیده

بیماری باکتریایی شایع‌ترین مشکل عفونی ماهیان زینتی است. اکثر عفونت‌های باکتریایی توسط ارگانیسم‌های گرم منفی از جنس آئرومونا‌س، ادواردوزیلا، فلاکسی‌باکتر، سودوموناس، ویبریو و سیتروباکتر ایجاد می‌شوند. باکتری‌های جنس آئرومونا‌س، بی‌هوازی اختیاری، گرم منفی، اکسیداز و کاتالاز مثبت هستند ودر خانواده آئرومونادا‌سه قرار داشته و به دو دسته متحرک و غیرمتحرک تقسیم می‌شوند. در این مطالعه در مجموع از تعداد ٢٥٠ قطعه ماهی زینتی شامل مولی، گوپی، آنجل، پرت، اسکار، گلدفیش، پلاتی، دم‌شمشیری، فایتر جمع آوری شده از مراکز فروش ماهیان آکواریومی در سطح شهر اهواز و یا مراجعه‌کننده به بیمارستان دامپزشکی، مورد بررسی قرار گرفت. پس از بررسی ماهیان مشکوک به عفونت باکتریایی، نمونه‌برداری از زخم‌های پوستی، آبشش، کلیه‌ها و مغز انجام و کشت باکتریایی تهیه گردید. بعد از جداسازی و خالص‌سازی جدایه‌های مشکوک به جنس آئرومونا‌س با تست‌های بیوشیمیایی، با روش مولکولی (با پرایمرهای اختصاصی ژن 16s rRNA) جدایه های مشکوک به جنس آئرومونا‌س مورد تایید قطعی قرار گرفت. نتایج تست‌های بیوشیمیایی و PCR نشان‌دهنده میزان شیوع بالای آئرومونا‌س در ماهیان زینتی سطح شهر اهواز است به‌طوری‌که ٤٩/٤ درصد از نمونه‌های مشکوک کشت شده مربوط به جنس‌های آئرومونا‌س بود. بنابراین لازم است اقدامات مناسب در جهت پیشگیری و کنترل عفونت‌های ناشی از جنس آئرومونا‌س در ماهیان زینتی انجام گیرد.

کلمات کلیدی: *آئرومونا*س، ماهیان زینتی، تست‌های بیوشیمیایی، PCR

* پست الکترونیکی نویسنده مسئول: tahereabyavi@gmail.com

(DOI): 10.22034/AEJ.2020.130450

مقدمه

در عفونت‌های باکتریایی آبزیان، باکتری‌ها ممکن است عامل اصلی ایجاد بیماری و یا عامل ثانویه باشند و به پوست، آبشش ماهی حمله کرده و یا با اختلال در سیستم ایمنی زمینه بروز بیماری را فراهم می‌کنند. اکثر پاتوژن‌های ماهی ساکنان طبیعی محیط‌های دریایی و آب شیرین بوده و قادر به زندگی مستقل از میزبان می‌باشند. تقریباً استرس‌های خارجی مانند تراکم بالا، حمل و نقل، کیفیت پائین آب و تغذیه نامناسب زمینه‌ساز بروز بیماری در ماهیان زینتی می‌باشند (Roberts و همکاران، ۲۰۰۹؛ Trust و Bartlett، ۱۹۷۴). آئروموناس‌ها، باکتری‌های بی‌هوازی اختیاری، گرم منفی، اکسیداز و کاتالاز مثبتی هستند که در خانواده *آئروموناداسه* قرار داشته و به دو دسته متحرک و غیرمتحرک تقسیم می‌شوند(سلطانی،۱۳۷۵؛Kingombeو همکاران، ۱۹۹۹). آئروموناس‌های متحرک معمول‌ترین باکتری‌های آب شیرین در جهان بوده و باعث بیماری‌های مختلفی در ماهیان و سایر میزبان‌های خون‌سرد و خونگرم می‌شوند(Cipriano و همکاران ۲۰۰۱). تاکسونومی این جنس پیچیده است و در بین گونه‌های مختلف آئروموناس‌های متحرک، *A. hydrophila*، *A. caviea* و *A. veronii biovar sobria* شناخته شده‌تر هستند (Ottaviani و همکاران، ۲۰۱۱). در ماهی این باکتری‌ها باعث سپتی‌سمی هموراژیک، پوسیدیگی باله، پوسیدگی بافت نرم و فرونکلوزیس می‌شوند (Nayak و همکاران، ۱۹۹۹). در سال ۲۰۰۷، همه‌گیری سندرم اولسراتیو (EUS) ناشی از *آئروموناس سوبریا* در مزارع پرورش ماهی کشورهای آسیای جنوب‌شرقی مانند بنگلادش و هند گزارش شده است (Nam و Joh، ۲۰۰۷). اگرچه آئروموناس‌ها به‌عنوان پاتوژن ماهی معروف شده‌اند، اما جزء میکروفلور روده ماهیان سالم نیز می‌باشند، بنابراین حضور این باکتری‌ها بدون وجود علایم پاتولوژیک به خودی خود نشان‌دهنده بیماری نیست. به‌طور معمول شیوع سپتی‌سمی آئروموناسی متعاقب تغییرات شرایط محیطی و استرس‌هایی مانند: افزایش تراکم، افزایش دما، تغییر ناگهانی دما، دستکاری، نقل و انتقال ماهی، کمبود اکسیژن، کاهش مواد غذایی، تخریشات ناشی از قارچ‌ها و انگل‌های پوستی، تغییرات فیزیولوژیکی و ... اتفاق می‌افتد (Toranzo و همکاران، ۲۰۰۹). در ایران در سال ۱۳۷۲ در بررسی علل تلفات ماهی آمور، جداسازی آئروموناس‌های متحرک از آبشش و کلیه و کبد این ماهی صورت گرفته است (پیغان و اسماعیلی، ۱۳۷۲). ائروموناس‌ها از کپور ماهیان پرورشی خصوصا کپورمعمولی در استان فارس نیز جداسازی شده است(اخلاقی، ۱۳۷۹). *آئروموناس هیدروفیلا* به‌عنوان یک پاتوژن برای بسیاری از گونه‌های مختلف ماهیان آب شیرین و گاهی شور محسوب می‌شود (Austin و Austin، ۱۹۹۳). این باکتری عامل سپتی‌سمی خونریزی‌دهنده در ماهیان آب‌شیرین بوده و خسارات جبران‌ناپذیری در جمعیت‌های پرورشی و وحشی ایجاد می‌نماید (سلطانی، ۱۳۷۵). بیماری‌های ایجاد شده به‌وسیله *آئروموناس هیدروفیلا* از فرم حاد سریعاً کشنده تا عفونت پنهان‌متغیر هستند (Ismail و همکاران، ۲۰۱۰). این باکتری در چین، از سال ۱۹۸۹ تا ۱۹۹۳ هر تابستان، به‌عنوان عامل عفونی سپتی‌سمی‌های ماهی در سیستم پرورش آب‌شیرین و خانواده کپور ماهیان خصوصاً گونه کاراس (*Crucian carp*) و فیتوفاگ بوده، ضرر اقتصادی شدیدی را باعث گردیده است(Nielsen و همکاران، ۲۰۰۱). بخش ماهیان زینتی جزئی از تجارت جهانی بین‌المللی می‌باشد و یکی از مهم‌ترین عرصه‌های اقتصادی و سودآور فعالیت پرورش ماهی است. صنعت تکثیر و پرورش ماهیان زینتی یکی از زیر بخش‌های مهم صنعت آبزی‌پروری است که در سال‌های اخیر باعث اشتغال‌زایی و افزایش درآمد در کشور شده است. میزان تولید ماهیان زینتی با تولید ۶۳۳ گونه پرورشی در سال ۱۳۹۱ به حدود ۱۳۰ میلیون قطعه در کل کشور رسیده است. ارائه راهکارهای نوین در راستای افزایش تولید و بهره‌وری می‌تواند نقش مهمی در توسعه پایدار و توسعه بیش‌تر این صنعت نو پا داشته باشند (روزبهانی و نظری،۱۳۹۴). ابتلا به بیماری‌ها می‌تواند باعث کاهش وزن، لاغری، کاهش بازده تولیدمثلی یا عقیمی، کوری، رفتارهای غیرطبیعی، زخم‌های جلدی، نارسایی آبششی و علایمی از این قبیل در ماهی‌ها شوند که به‌نوبه خود می‌تواند ضرر و زیان اقتصادی زیادی به‌دنبال داشته باشد (پیغان و عبدا... مشائی، ۱۳۸۸). بیماری باکتریایی شایع‌ترین مشکل عفونی ماهیان زینتی است. در مجموع تنها مشکل در ماهیان آکواریومی که منجر به مرگ و میر ماهیان می‌شود کاهش کیفیت آب می‌باشد. اکثر عفونت‌های باکتریایی توسط ارگانیسم‌های گرم منفی ازجمله *آئروموناس‌ها*، *ادواردوزیلا*، *فلاکسی‌باکترها*، *سودوموناس*، *ویبریو* و *سیتروباکتر* ایجاد می‌شوند. البته باکتری‌های گرم مثبت مانند استرپتوکوکوس نیز در ایجاد بیماری ماهیان زینتی گزارش شده است.

مواد و روش‌ها

از مهر سال ۱۳۹۷ تا مهرماه سال۱۳۹۸، به‌مدت یک‌سال و به‌طور مداوم، نمونه‌گیری از ماهیان بیمار دارای علایم اختصاصی (شکل‌های ۱، ۲، ۳ و ۴) و غیراختصاصی در مراکز فروش ماهیان زینتی در سطح شهر اهواز به‌طور مداوم و در مواردی نیز از نمونه‌های ارجاعی به بخش بهداشت و بیماری آبزیان دانشکده دامپزشکی دانشگاه شهید چمران اهواز، اقدام به نمونه‌گیری و جداسازی باکتری گردید. گونه‌های مختلف و تعداد ماهیان زینتی در هر گونه و اطلاعات مربوط به هر گونه، در جدول ۱ آورده شده است. پس از کالبدگشایی ماهیان دارای علایم و ماهیان به ظاهر سالم در شرایط تمیز و با استفاده از وسایل استریل، از اندام‌های داخلی (کلیه، کبد و طحال) و در صورت وجود

(DOI): 10.22034/AEJ.2020.130450

ضایعات جلدی از قسمت عمقی این ضایعات، پس از تمیز کردن آلودگی‌های سطحی، با استفاده از لوپ استریل بر روی محیط مغذی TSA کشت داده می‌شد و در دمای ۲۸-۲۵ درجه سانتی‌گراد به‌مدت ۲۴ تا ۴۸ ساعت گرمخانه‌گذاری می‌شد. پس از اتمام زمان انکوباسیون، کلونی‌های مشکوک به جنس *آئرموناس* خالص‌سازی شده و پس از انجام بررسی‌های اولیه شامل رنگ‌آمیزی گرم، تست اکسیداز و کاتالاز، جدایه‌های مشکوک، جهت ادامه مطالعه در محیط Skim milk کشت و در دمای ۸۰- درجه سانتی‌گراد نگه‌داری شدند (ابولقاسمی و همکاران، ۱۳۸۸؛ Buller، ۲۰۰۴). پس از اطمینان از خالص بودن جدایه‌های مشکوک، با انجام تست‌های رایج بیوشیمیایی جهت شناسایی جنس *آئرموناس*، از تست‌های اکسیداز، تخمیر قند گلوکز، رشد در محیط نوترینت براث فاقد و حاوی ۶ درصد نمک استفاده شد. هم‌چنین جهت تعیین گونه‌های احتمالی از تست‌های سیمون سیترات، تولید گاز در تخمیرگلوکز، تعیین نوع تخمیر (VP)، هیدرولیز آسکولین و توئین ۸۰ (لیپاز)، تولید دزاکسی ریبونوکلئاز، ژلاتیناز، ایندول، تخمیر قند ساکارز، آرابینوز و سالیسین، دکربوکسیلاسیون لیزین و اورنیتین و هیدرولیز ارژینین استفاده گردید (Kralova و همکاران، ۲۰۱۶). برای تایید مولکولی جنس *آئرموناس* باکتری‌های جداسازی شده، ابتدا DNA آن‌ها با روش جوشاندن استخراج گردید. بدین‌منظور، از باکتری خالص در محیط کشت یک‌روزه، دو تا سه کلنی برداشت و در بافر Tris-EDTA استریل سوسپانسیون گردید، سپس به‌مدت ۱۰ دقیقه با حرارت ۱۰۰ درجه سانتی‌گراد در دستگاه ترموبلاک (کیاژن، ایران) حرارت داده شد. سپس ۲ دقیقه سانتریفوژ با دور ۱۴۰۰۰ rpm صورت گرفت و مایع رویی به‌عنوان منبع DNA در میکروتیوب استریل جمع‌آوری و در منفی ۲۰ درجه سانتی‌گراد تا انجام PCR ذخیره گردید. برای شناسایی جدایه‌های *آئرموناس* از پرایمرهای اختصاصی جنس *آئرموناس* طراحی‌شده توسط Porteen و همکاران (۲۰۰۶) استفاده شد. مشخصات مربوط به پرایمرهای استفاده شده در جدول ۲ آورده شده است.

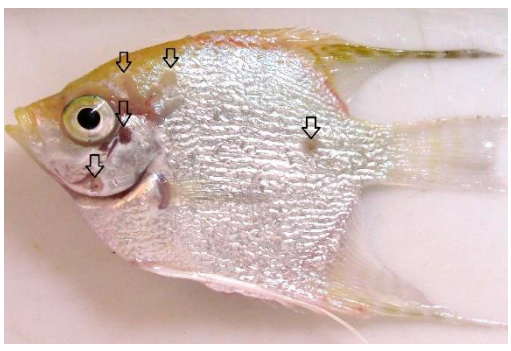
جدول ۱: مشخصات ماهیان مورد بررسی

نام ماهی	تعداد	میانگین وزن ± انحراف معیار (گرم)	علائم غالب ماهیان بیمار
آنجل (*Pterophyllum scalare*)	۲۵	۲/۵±۲/۲	لاغری، زخم‌های جلدی
گلدفیش (*Carassius auratus*)	۲۳	۵/۵±۲/۱	برآمدگی فلس‌ها، زخم‌های پوستی، تلفات
اسکار آلبینو (*Astronotus ocellatus*)	۱۸	۸±۵/۲	خوردگی باله‌ها، زخم‌های جلدی
پرت زرد (*Amphilophus citrinellus*)	۱۳	۶/۲±۴/۵	التهاب مخرج، تغییر رنگ پوست
مولی سیاه (*Poecilia ephenops*)	۲۵	۳±۲/۶	اتساع شکم، بیرون زدگی چشم‌ها
پلاتی(*Xiphophorus maculatus*)	۴۳	۳/۴±۳/۲	بیرون زدگی چشم‌ها، خونریزی و زخم‌های جلدی
دم‌شمشیری (*Xiphophorus helleri*)	۲۵	۲/۴±۱/۲	زخم‌های جلدی و برآمدگی فلس‌ها
گوپی (*Poecilia reticulata*)	۳۱	۳/۶±۲/۱	التهاب مخرج و بیرون زدگی چشم‌ها
فایتر (*Betta spelndens*)	۲۳	۵±۳/۲	بیرون‌زدگی چشم‌ها، لاغری و تلفات
گورامی (*Trichogaster leeri*)	۱۰	۱/۲±۰/۸	خونریزی و زخم‌های جلدی
سوروم (*Heros Severus*)	۱۴	۴۵±۲۳/۲	زخم‌های جلدی، خونریزی و بیرون زدگی چشم‌ها

جدول شماره ۲: اطلاعات پرایمر استفاده شده

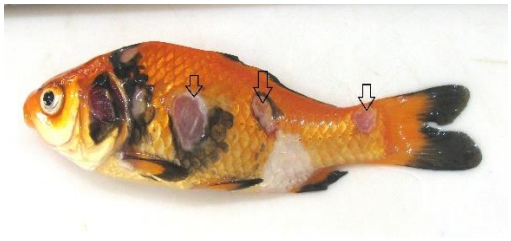
پرایمر	توالی('3 -'5)	ژن هدف	اندازه آمپلیکون	رفرنس
16 S rRNA F	TCATGGCTCAGATTGAAC GCT	16S rRNA	۵۹۹	Porteen و همکاران (۲۰۰۶)
16 S rRNA R	CGGGGCTTTCACATCTAACTT ATC			

شکل۱: ماهی اسکار با علائم خوردگی



شکل۲: ماهی آنجل با زخم‌های جلدید باله‌ها و زخم‌های جلدی

(DOI): 10.22034/AEJ.2020.130450



شکل۳: ماهی گلدفیش با علائم زخم‌های جلدی

شکل۴: ماهی گورامی با علائم خونریزی و زخم‌های جلدی

مراحل PCR برای این کار، در هر واکنش از ۱۲/۵ میکرولیتر مسترمیکس (سیناژن، ایران)، ۶/۵ میکرولیتر آب مخصوص PCR، ۱ میکرولیتر از هر یک از پرایمرها (۱۰ پیکومول، سیناژن، ایران) و ۴ میکرولیتر (۱۰ پیکومول) از DNA استخراج شده برای رسیدن به حجم نهایی ۲۵ میکرولیتر استفاده گردید. PCR با استفاده از دستگاه ترموسایکلر (اپندورف آلمان) و با برنامه واسرشته‌سازی اولیه به‌مدت ۵ دقیقه(۹۴ درجه‌سانتی‌گراد)، وارشته‌سازی به‌مدت ۳۰ ثانیه (۹۴ درجه سانتی‌گراد)، اتصال به‌مدت۳۰ ثانیه (۵۵ درجه سانتی‌گراد)، طویل شدن به‌مدت ۴۵ ثانیه (۷۲ درجه سانتی‌گراد)، سپس تکرار مراحل ۲ الی ۴ به تعداد ۳۰ چرخه و در نهایت مرحله طویل شدن نهایی به‌مدت ۵ دقیقه (۷۲ درجه سانتی‌گراد) انجام شد. پس ازطی شدن چرخه‌های دمایی و تکثیر ژن هدف، در نهایت ۵ میکرولیتر از محصول PCR در کنار نردبان ژنی ۱۰۰ bp (سیناژن، ایران) در ژل آگارز ۱٪ حاوی رنگ Safe Stain(سیناژن، ایران)در ولتاژ ۱۰۰ به‌مدت ۳۵ دقیقه الکتروفورز گردید. لازم به ذکر است که در این تست ازسویه استاندارد *آئروموناس هیدروفیلا* (ATCC 7966) به‌عنوان کنترل مثبت و از آب مقطر استریل به‌عنوان کنترل منفی استفاده گردید.

نتایج

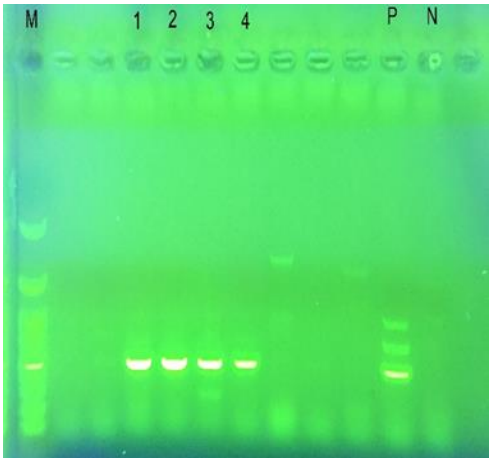
از ۱۸۰ قطعه ماهی واجد علائم جمع‌آوری شده از سطح شهر و ارجاعی به بخش که عمدتاً دارای علائمی مانند زخم‌های جلدی قرمز، بیرون‌زدگی فلس‌ها، اتساع شکم، بیرون‌زدگی چشم‌ها و التهاب مخرج بودندو ۷۰ قطعه ماهی به ظاهر سالم در مجموع ۱۴۵ جدایه باکتریایی جمع‌آوری گردید که از این تعداد ۱۲۵ جدایه مظنون به جنس‌های *آئروموناس* (گرم منفی، اکسیداز و کاتالاز مثبت با فرم کلنی مشابه آئروموناس‌ها)درنظر گرفته شدند(جدول۲).نتایج مطالعات بیوشیمیایی بر روی جدایه‌های تایید شده از نظرجنس *آئروموناس* در جدول ۳ آورده شده است. با بررسی ژنومی و انجام تست PCR از ۱۲۵جدایه، تعداد ۸۵ جدایه حامل باند ۵۹۹bp بودند و از نظر جنس *آئروموناس* مثبت تشخیص داده‌شدند.نتایج الکتروفورز محصولات حاصل از تست PCR اختصاصی جنس در شکل ۵ نشان داده شده است.

جدول شماره۲: نسبت ابتلا در ماهیان سالم و بیمار نمونه‌گیری شده

کل ماهی‌های نمونه گیری شده	باکتری‌های جدا شده از ماهیان به ظاهر سالم		باکتری‌های جدا شده از ماهیان بیمار		*Aeromonas* sp.			
					ماهیان ظاهراً سالم		ماهیان بیمار	
	تعداد	درصد	تعداد	درصد	تعداد	درصد	تعداد	درصد
۱۵۰	۱۸	۲۵/۷	۱۴۵	۸۰/۵	۴	۲۲/۲	۸۵	۵۸/۶

جدول۳: نتایج آزمایش‌های بیوشیمیایی جدایه‌هایی جنس *آئروموناس* تایید شده با PCR

تست بیوشیمیائی	نتایج	تست بیوشیمیائی	نتایج
رنگ‌آمیزی گرم	–	MR	±
اکسیداز	+	VP	±
کاتالاز	+	OD	±
همولیز	+	%6 Nacl	+
اندول	±	DNase	±
تخمیر گلوکز	±	LD	±
تحرک	+	Tween80	+
سالیسین	±	Gelatin	±
سیترات	±	ساکاروز	+
سولفید هیدروژن	±	آسکولین	±



شکل۵: ژل آگاروز مربوط به PCR محصولDNA ، ۱ تا ۴) جدایه‌های جنس آئروموناس، M) مارکر ، N) کنترل منفی و P) کنترل مثبت

(DOI): 10.22034/AEJ.2020.130450

بحث

گونه‌های جنس *آئروموناس* جز فلور طبیعی آب‌های شیرین محسوب می‌شود و همراه با سایر میکروارگانیسم‌ها به‌عنوان پالایشگر آب عمل می‌کنند. از آن‌جایی‌که این باکتری‌ها جز فلور طبیعی آب هستند زمانی ایجاد بیماری می‌کنند که ماهیان دچار افت در سیستم ایمنی‌شوند و متعاقباً ضرر اقتصادی فراوانی به صنعت آبزی‌پروری وارد می‌کند. آئروموناس‌ها در ۷۲/۶ درصد از موارد تلفات ماهی گرمابی و خرچنگ و *آئروموناس هیدروفیلا* در ۳۰/۵ درصد از مواردعامل شناخته شده‌اند نقش آئروموناس‌ها و آئروموناس هیدروفیلا در ماهیان دارای علائم کاملاً هم‌خوانی دارد (Nielsen و همکاران، ۲۰۰۱). رضویلر و همکاران (۱۳۶۰) برای اولین‌بار در ایران آئروموناس‌ها را از ماهیان حوض، ماهیان آکواریومی،ماهی علفخوار پرورشی جدا کردند. پیغان و همکاران (۱۳۷۲) در بررسی علل تلفات ماهی آمور موفق به جداسازی آئروموناس‌های متحرک از آبشش،کلیه و کبد این ماهی‌شدند. سلطانی و موسوی (۱۳۷۹) از کارگاه‌های پرورش آمور در دو استان گیلان و تهران باکتری *آئروموناس هیدروفیلا* را جداسازی نمودند. علیشاهی و همکاران(۱۳۸۸)توانستند این‌باکتری را از ماهی‌آمور استان خوزستان جداکنند.درمطالعه‌ای‌که در ایالات متحده‌آمریکا بر روی آئروموناس‌ها به‌عنوان پاتوژن اولیه در عفونت‌های روده‌ای و در موارد کم‌تر عفونت خارج روده‌ای نظیر عفونت‌های سیستمیک، اندوکاردیت و غیره انجام شد، جنس *آئروموناس* را به‌عنوان عامل ایجاد ۱۳ درصد از عفونت‌ها در انسان اعلام کردند (Cesar،۱۹۹۹). هم‌چنین مطالعات متعددی در خصوص تشخیص جنس و گونه با PCR صورت گرفته ازجمله مطالعه Sen و Rodges(۲۰۰۴) که در آن به بررسی پراکندگی ۶ فاکتور حدت در گونه‌های *آئروموناس* در آب آشامیدنی به‌وسیله PCR در ایالات متحده آمریکا پرداخته شد. Nielsen و همکاران (۲۰۰۱) عنوان کردند که شیوع بیماری ناشی از آئروموناس‌های متحرک، بیش‌تر در تابستان به‌علت وجود استرس‌هایی از قبیل عفونت‌های بالای انگلی، دمای بالا و اکسیژن پایین آب است. در تحقیقی که توسط Eissa و همکاران (۱۹۹۴) انجام گردید، نشان داده‌شد که شیوع سپتی‌سمی ناشی از آئروموناس‌های متحرک در بین تیلاپیاهای پرورشی و وحشی به‌ترتیب ۱۰ و ۲/۵ درصد و در گربه ماهیان پرورشی و وحشی به‌ترتیب ۱۸/۷۵ و ۶/۲۵ درصد می‌باشد که این، نشان دهنده تأثیر استرس در بروز این بیماری می‌باشد.در تحقیق حاضر که به‌منظور بررسی‌نقش باکتری‌هایی از جنس *آئروموناس* در آلودگی ماهیان زینتی با روش بیوشیمیایی و PCR صورت گرفت، نقش ۸۰/۵ درصدی را برای جنس *آئروموناس* در ایجاد سپتی‌سمی باکتریایی ماهیان آکواریومی نشان داد و در مجموع، نقش آئروموناس‌ها در سپتی‌سمی‌ها در مطالعه حاضر ۶۲/۵ درصد (۱۶۳ از ۲۵۰) برآورد گردید. مطالعات بسیاری براساس تست‌های بیوشیمیایی بر روی آئروموناس‌ها صورت گرفته و با مقایسه نتایج حاصل از این تحقیقات، علاوه بر زمان‌بر بودن روش کشت، تنوع بسیاری درتوانایی دکربوکسیله کردن لیزین، تولید H2S، استفاده از سیترات، تحمل نمک در جدایه‌های مختلف آئروموناس مورد بررسی در این مطالعات، مشاهده گردید. علیشاهی و همکاران (۱۳۸۸) در مطالعه خود، برروی بررسی علل تلفات ماهی آمور در استان خوزستان، به‌این‌نتیجه‌رسیدند که ۱۱درصد تلفات، ناشی از*آئروموناس هیدروفیلا* ودرمجموع ۱۷/۶درصد تلفات، ناشی از آئروموناس‌ها می‌باشد. تشخیص سریع باکتری‌های بیماری‌زا در پیشگیری‌و درمان به‌موقع بیماری‌ها اهمیت‌فراوان داردو روش‌های‌معمول‌جداسازی‌وشناسایی‌در تشخیص باکتری‌ها خسته‌کننده و وقت‌گیر است، تکثیر ردیف نوکلئوتیدی اختصاصی DNA به‌وسیله آزمایش PCR یک روش دقیق و اختصاصی برای تشخیص میکروارگانیسم‌ها فراهم آورده است (Swaminathan و همکارن، ۲۰۰۴). در تحقیق حاضر با استفاده از PCR و به‌کارگیری پرایمرهای اختصاصی ژن 16s RNA، در حداقل ۵۸/۶ درصد از ماهیان بیمار (دارای علائم)، سپتی‌سمی باکتریایی آئروموناسی مورد تائید قرار گرفت و در مجموع، نقش آئروموناس‌ها در ابتلای ماهیان آکواریومی ۴۹/۴ درصد (۸۹ از ۱۸۰) برآورد گردید. نتایج تست‌های بیوشیمیایی در تحقیق حاضر با منابع معتبر (Buller، ۲۰۰۴؛ Austin و Austin، ۲۰۰۷) ازنظر خصوصیات‌بیوشیمیایی جنس آئروموناس‌ها تطبیق داده شدونتایج حاصله نشان از صحت فرآیند انجام تست‌ها دارد. در مجموع مطالعه حاضر مشخص کرد که باکتری‌های جنس آئروموناس توانایی بالقوه‌ای در آلودگی ماهیان آکواریومی با توجه به حضور میکروفلوری این باکتری در آب شیرین دارند و از آن‌جایی‌که معمولاً ماهیان زینتی ارزش اقتصادی بالایی برای تولید کنندگان این صنعت دارد توصیه می‌شود، تراکم مناسب در هر مترمکعب رعایت گردد تا باکتری به عنوان‌عامل فرصت‌طلب در ماهیان ظهور بیماری نکند هم‌چنین اصول و روش‌های مدیریتی آب از قبیل استفاده از لامپ‌های UV و ازوناتور برای تولید O_3 حتماً مورد توجه قرار گیرد و غذایی که استفاده می‌شود هم از جایی‌که‌تهیه می‌گرددو هم‌نحوه نگه‌داری از آن‌کاملاً دقت شود.

منابع

۱. **ابوالقاسمی، س.ج.؛ سلطانی، م.؛ پورکاظمی، م.؛ شریف‌پور، ع.؛ جلالی‌جعفری، ب. و شناور ماسوله، ع.، ۱۳۸۸**. شناسایی و جداسازی باکتری‌های موجود در ضایعات خارجی ماهی پرورشی شیپ در مجتمع تکثیر و پرورش ماهیان خاویاری شهید بهشتی. مجله علمی شیلات ایران. سال ۳، شماره ۴، صفحات ۸۹ تا ۹۸.

(DOI): 10.22034/AEJ.2020.130450

۲. **اخلاقی، م.، ۱۳۷۹.** ایمنی‌زایی باکتری *آئروموناس هیدروفیلا* در ماهی کپور معمولی. مجله دانشکده دامپزشکی دانشگاه تهران. دوره ۵۵، شماره ۱، صفحات ۵۷ تا ۶۲.

۳. **پیغان، ر. و اسماعیلی، ف.، ۱۳۷۲.** آلودگی ماهی کپور علفخوار به ارگانیسم‌های شبیه آئروموناس‌های متحرک. مجله علمی شیلات ایران. سال ۶، شماره ۲، صفحات ۱ تا ۸.

۴. **پیغان، ر.** و **عبداللهمشایی، م.، ۱۳۸۸.** پرورش و بیماری‌های ماهی و میگو. انتشارات دانشگاه شهید چمران. چاپ اول. ۵۲۷ صفحه.

5. **Austin, B. and Austin, D., 1993.** Bacterial Fish Pathogen. Second edition, Ellis horwood, New york. pp: 172-182.

6. **Bailonea, R.L.; Martinsa, M.L.; Mouriñoa, J.L.P.; Vieiraa, F.N.; Pedrottia, F.S.; Nunesa, G.C. and Silva, B.C., 2010.** Hematology and Agglutination Titer After Polyvalent Immunization and Subsequent Challenge with *Aeromonas hydrophila* in Nile Tilapia (*Oreochromis Niloticus*). Arch Med Vet. Vol. 42, pp: 221-227.

7. **Buller, N.B., 2004.** Bacteria From Fish and other Aquatic Animals:a practical Identification Manual. CABI publishing. pp: 75-125.

8. **Cesar, I.; Geert, H.; Mauro, T.; Albert, M.J.; Swings, J.; Raffaele, P. and Jemmi, T., 1999.** PCR Detection, Characterization, and Distribution of Virulence Genes in Aeromonas spp. Applied and Environmental Microbiology. pp: 5293- 5302. PMCID: PMC91719.

9. **Cipriano, R.C.; Bullock, G.L. and Pyle, S.W., 2001.** *Aeromonas hydrophila* and Motile Aeromonad Septicemias of Fish. United State Department Of The Interior Fish and Wildlife Service Division of Fishery Research Washington, D.C. 20240.

10. **Fang, H.M.; Ge, R. and Sin, Y.M., 2004.** Cloning, Characterisation and Expression of *Aeromonas hydrophila* Major Adhesion. Fish & Shellfish Immunology. Vol. 16, pp: 645-658.

11. **Fang, H.M.; Ling, K.C.; Ge, R. and Sin, Y.M., 2000.** Enhancement of Protective Immunity In Blue Gourami, Trichogaster Trichopterus (Pallas), Against *Aeromonas hydrophila* And *Vibrio Aanguillarum* by *A. hydrophila* Major Adhesion. Journal of Fish Disease. Vol. 23, pp: 137-146.

12. **Ibrahem, M.D.; Arab, R.M.H.; Mostafa, M.M. And Rezk, M.A., 2008.** Evaluation of Different Vaccination Strategies For Control of (Mas) In Nile Tilapia (*O. Niloticus*) In Egypt. 8th International Symposium on Tilapia in Aquaculture. pp:1157-1174.

13. **Imani, P. and Akhlaghi, M., 2004.** Immunogenicity of Hemolysin, Protease and Lipopolysaccharide Extracted from *Aeromonas hydrophila* in Common Carp (*Cyprinus carpio* L.). Arch. Razi Ins. Vol. 57, pp: 55-66.

14. **Ismail, N.E.D.A.; Sad, N.; Atta, I., Aziz, A.E. and Ahmed, M., 2010.** Oral Vaccination of Nile Tilapia (*Orechromis niloticus*) Against Motile Aeromonas Septicaemia. Nature and Science. pp: 21-26.

15. **Kalbassi, M.R.; Soltani, M.; Pourbakhsh, S.A. and Adams, A., 2000.** Humoral Immune Response of Cultured Persian Sturgeon to Four Different *Aeromonas hydrophila* Antigens. Arch. Razi Ins. No. 51, pp: 75-84

16. **Khushiramani, R.; Girisha, S.K. and Karunasagar, I., 2007.** Cloning and Expression of an Outer Membrane Protein OmpTS of *Aeromonas hydrophila* and Study of Immunogenicity in Fish. Protein Expression and Purification. No. 51, pp: 303-307.

17. **Kingombe, C.I.B.; Huys, G.; Tonolla, M.; Albert, M.J.; Swings, J.; Peduzzi, R. and Jemmi, T., 1999.** PCR Detection, Characterization, and Distribution of Virulence Genes in Aeromonas spp. Applied And Enviromental Microbiology. Vol. 65, No. 12, pp: 5293-5302.

18. **Králová, S.; Staňková, E. and Sedláček, I., 2016.** Classification of Aeromonas spp. isolated from water and clinical sources and distribution of virulence genes. Folia microbiologica. Vol. 61, No. 6, pp: 513-521.

19. **Maji, S.; Mali, P. and Joardar, S.N., 2006.** Immunoreactive Antigens of the Outer Membrane Protein of *Aeromonas hydrophila*, Isolated from Goldfish, *Carassius auratus* (Linn.) Fish & Shellfish Immunology. Vol. 20, pp: 462-473.

20. **Nam, I.Y. and Joh, K., 2007.** Rapid Detection of Virulence Factors of Aeromonas Isolated from a Trout Farm by Hexaplex-PCR. The Journal of Microbiology. Vol. 45, No. 4, pp: 297-304.

21. **Nayak, K.K.; Mukherjee, S.C. and Das, B.K., 1999.** Observation on Different Strains of *Aeromonas hydrophila* from Various Diseased Fishes. Indian J. Fish. Vol. 3, No. 46, pp: 245-250.

22. **Nielsen, M.E.; Høi, L.; Schmidt, A.S.; Qian, D.; Shimada, T.; Shen, J.Y. and Larsen, J.L., 2001.** Is *Aeromonas hydrophila* the Dominant Motile Aeromonas Species that Causes Disease Outbreaks in Aquaculture Production in the Zhejiang Province of China? Disease Of Aquatic Organism. Vol. 46, pp: 23-29.

23. **Osman, K.M.; Mohamed, L.A.; Abdel Rahman, E.H. and Soliman, W.S., 2009.** Trials for Vaccination of Tilapia Fish Against Aeromonas and Pseudomonas Infections Using Monovalent, Bivalent and Polyvalent Vaccines. World J of Fish and Marine Sciences. Vol. 1, No. 4, pp: 297-304.

24. **Ottaviani, D.; Parlani, C.; Citterio, B.; Masini, L.; Leoni, F.; Canonico, C.; Sabatini, L.; Bruscolini, F. and Pianetti, A., 2011.** Putative Virulence Properties of Aeromonas Strains Isolated from Food, Environmental and Clinical Sources in Italy: A comparative study. International Journal of Food Microbiology,No.44,Vol.1 :538–545.

25. **Peyghan, R.; Khadjeh, G.H.; Mozarmnia, N. and Dadar, M., 2010.** Effect of Intraperitoneal and Intramuscular Injection of Killed *Aeromonas hydrophila* on Lymphocytes and Serum Proteins of Common Carp, *Cyprinus carpio*. Advances in bioscience and biotechnology. Vol. 1, pp: 26-29.

26. **Porteen, K.; Agarwal, R.K. and Bhilegaonkar, K.N., 2006.** PCR Based Detection of Aeromonas from Milk Samples. Journal of Food Technology. Vol. 4, No. 2, pp: 111-115.

27. **Roberts, H.E.; Palmeiro, B. and Weber, E.S., 2009.** Bacterial and Parasitic Diseases of Pet Fish. Veterinary Clinic of North America. Viol. 12, No. 3, pp: 610- 638

28. **Sen, K. and Rodgers, M., 2004.** Distribution of six virulence factors in Aeromonas species isolated from US drinking water utilities: a PCR identification. U.S. Environmental Protection Agency Paper. 153 p.

29. **Shome, R.; Shome, B.R.; Mazumder, Y.; Das, A.; Kumar, A.; Rahman, H. and Bujarbaruah, K.M., 2005.** Abdominal Dropsy Disease in Major Carps of Meghalaya: Isolation and Characterization of *Aeromonas hydrophila*. Current Science. Vol. 88, No. 12, pp: 1897-1900.

30. **Tarr, C.L.; Patel, J.S.; Puher, N.D.; Sowers, E.G.; Bopp, C.A. and Strockbine, N.aA., 2007.** Identification of Vibrio isolates by a multiplex PCR assay and rpoB sequence determination. J. Clin. Microbiol. Vol. 45, No. 1, pp: 145-140.

31. **Toranzo, A.E.; Romalde, J.L.; Magariños, B. and Barja, J.L., 2009.** Present and future of aquaculture vaccines against fish bacterial diseases. The use of veterinary drugs and vaccines in Mediterranean aquaculture, No. 86, pp: 155-176.

32. **Trust, T.J. and Bartlett, K.H., 1974.** Occurrence of potential pathogens in water containing ornamental fishes. Appl Microbiol. Vol. 28, No. 1, pp: 35-40.

(DOI): 10.22034/AEJ.2020.130450

Molecular and biochemical study of *Aeromonas* spp. Isolated from aquarium fish suspected of septicemia in Ahvaz

- **Tahereh Abyavi*:** Department of Aquatic Animal Health, Faculty of Veterinary, Shahid Chamran University of Ahvaz, Ahvaz, Iran
- **Rahim Payghan:** Department of Clinical Sciences, Faculty of Veterinary, Shahid Chamran University of Ahvaz, Ahvaz, Iran
- **Naghmeh Moori Bakhtiyari:** Department of Pathobiology, Faculty of Veterinary, Shahid Chamran University of Ahvaz, Ahvaz, Iran
- **Masoud Ghorbanpour:** Department of Pathobiology, Faculty of Veterinary, Shahid Chamran University of Ahvaz, Ahvaz, Iran
- **Mina Ahangarzadeh:** South of Iran Aquaculture Research Institute, Iranian Fisheries Science Research Institute, Agricultural Research, Education and Extension Organization (AREEO), Ahvaz, Iran

Received: December 2019 Accepted: March 2020

Key words: *Aeromonas*, Ornamental fish, Biochemical tests, PCR

Abstract

Bacterial disease is the most common infectious problem of ornamental fish. Most bacterial infections are caused by gram-negative organisms from *Aeromonas*, *Eduardozilla*, *Felaxibacter*, *Pseudomonas*, *Vibrio* and *Citrobacter*. *Aeromonas* bacteria are facultative anaerobe, gram-negative, oxidase and catalase positive and belong to the Aeromonadsaceae family and are divided into two motile and non-motile groups. In this study, a total of 250 ornamental fish including Molly, Guppy, Angel, Parrot, Oscar, Goldfish, Platy, Swordfish, Fighter collected from aquarium fish sales centers in Ahvaz city or referred to the Veterinary Hospital Was investigated. After examination of fish suspected of bacterial infection, samples were taken from skin wounds, gills, kidneys and brain and bacterial culture was performed. After isolation and purification of *Aeromonas* susceptible was evaluated and confirmed via biochemical tests and molecular methods (with 16s rRNA specific primers). Results of biochemical and PCR tests showed high prevalence of Aeromonas in ornamental fish in Ahvaz city, with 49.4% of suspected specimens being *Aeromonas* genera. Therefore, appropriate measures should be taken to prevent and control *Aeromonas* infections in ornamental fish.

* Corresponding Author's email: tahereabyavi@gmail.com