جداسازی و شناسایی باکتری *آئرومونـاس هیدروفیلا* مولد انتروتوکسین از ماهی کپورمعمولی (*Cyprinus carpio*)

- **مسعود حسین‌زاده:** گروه زیست‌شناسی، دانشکدهٔ علوم پایه، دانشگاه آزاد اسلامی واحد ارومیه ، صندوق پستی: 969
- **امیر توکمه‌چی*:** گروه پاتوبیولوژی و کنترل کیفی آبزیان، پژوهشکده مطالعات دریاچه ارومیه، دانشگاه ارومیه، صندوق پستی: 165

تاریخ دریافت: آذر 1393 تاریخ پذیرش: اسفند 1393

چکیده

بیماری‌های عفونی یکی از عوامل مهم خسارات اقتصادی در صنعت پرورش آبزیان محسوب می‌شوند. در بین بیماری‌های عفونی آبزیان باکتری *آئرومونـاس هیدروفیلا* یکی از عوامل بیماری‌زای مهم بوده که به‌طور اولیه سبب عفونت زخم و به‌طور ثانویه سبب بروز مشکلات عفونی به‌دنبال تغییر دما، دستکاری و پائین بودن کیفیت آب پرورشی آبزیان می‌گردد. در این بررسی تعداد شش سویه باکتری *آئرومونـاس هیدروفیلا* از ماهی کپورمعمولی بیمار از ده مزرعه پرورشی آذربایجان‌غربی جداسازی و براساس خواص فیزیولوژیک و بیوشیمیایی، الگوی مقاومت آنتی بیوتیکی و وجود ژن مولد انتروتوکسین با سویه استاندارد مقایسه شدند. نتایج به‌دست آمده نشان داد که هیچ‌گونه تفاوت فنوتیپی و ژنتیکی بین این شش سویه با یکدیگر و با سویه استاندارد وجود ندارد. نتایج آزمون آنتی بیوگرام نشان داد که این شش سویه از نظر الگوی مقاومت آنتی‌بیوتیکی با یکدیگر متفاوت بوده و بیش‌ترین و کم‌ترین مقاومت به‌ترتیب نسبت به انروفلوکساسین و سولفامتوکسازول وجود دارد. براساس اطلاعات به‌دست آمده می‌توان نتیجه گرفت که سویه‌های *آئرومونـاس هیدروفیلا* جدا شده از ماهی کپورمعمولی آذربایجان‌غربی دارای ژن مولد انتروتوکسین و مقاومت در برابر برخی از آنتی‌بیوتیک‌های رایج می‌باشد.

کلمات کلیدی: *آئرومونـاس هیدروفیلا*، ژن مولد انتروتوکسین، کپور معمولی

مقدمه

در ایران فراورده‌های شیلاتی یکی از محصولات مهم غذایی برای انسان به‌شمار می‌روند. فراورده‌های شیلاتی به سادگی و به راحتی می‌توانند به انواع مختلفی از عوامل بیماری‌زا آلوده شوند. توزیع و فراوانی باکتری *آئرومونـاس هیدروفیلا* در اکوسیستم آبی به‌خوبی اثبات شده و مشخص شده است این باکتری بخشی از فلور روده آبزیان می‌باشد که می‌تواند به هنگام ایجاد تنش بیماری‌زا گردد (Yogananth و همکاران، 2009).

آئرومونـاس هیدروفیلا یک باکتری همه‌جایی، فرصت‌طلب، گرم منفی، میله‌ای شکل، به‌طور عمده متحرک، بی‌هوازی اختیاری، اکسیداز مثبت و تخمیر کننده گلوکز است (Yousr و همکاران، 2007). این باکتری سبب آلودگی زخم‌ها، عفونت خون و گاستروانتریت با منشاء آب و غذا در انسان می‌گردد (Ormen و همکاران، 2005). هم‌چنین انواعی از عوامل حدت و توکسین‌ها در این باکتری‌ها شناسایی شده‌اند. مطالعات نشان داده است که برخی از سویه‌ها با

* پست الکترونیکی نویسنده مسئول: atokmachi@gmail.com

هجوم به لایه مخاطی روده‌ها سبب گاستروانتریت می‌شوند درحالی‌که سایر سویه‌ها از طریق تولید آئرولیزین باعث به‌وجود آمدن این عارضه در انسان می‌گردند (Chu و Lu، 2005). به‌طورکلی باکتری‌های جنس *آئرومونـاس* از طریق تولید سموم خارجی نظیر انتروتوکسین، همولیزین (آئرولیزین)، لیپاز و پروتئاز سبب بروز بیماری می‌گردند (Yogananth و همکاران، 2009).

بررسی‌ها نشان می‌دهد که امروزه باکتری *آئرومونـاس هیدروفیلا* را می‌توان از ماهیان مختلفی جدا کرد، برای مثال Noor Al Deen و همکاران (2014) توانستند 1از 40 نمونه ماهی پرورشی تیلاپیای نیل (*Oreochromis niloticus*) تعداد 10 سویه *آئرومونـاس هیدروفیلا* را در منطقه کفرالشیخ جدا نمایند. این محققان میزان شیوع سپتی سمی ناشی از این باکتری را 25 درصد ارزیابی کرده و عمده‌ترین علائم بالینی را که توصیف کردند شامل از دست رفتن هوشیاری، آب آوردگی شکم، تیرگی پوست، بیرون زدگی چشم و زخم‌های پوستی بود. هم‌چنین Jayavignesh و همکاران (2011) توانستند این باکتری را از گربه‌ماهی دارای علائم بالینی سپتی‌سمی جدا نمایند، بررسی‌های تعیین حساسیت میکروبی سویه جدا شده توسط این محققان، نشان‌دهنده وجود مقاومت دارویی چند گانه در *آئرومونـاس هیدروفیلا* بود، طوری‌که بیشترین مقاومت دارویی مربوط به آنتی‌بیوتیک‌های آموکسی‌سیلین، کلیندامایسین، اریترومایسین، اکسی‌تتراسایکلین و استرپتومایسین بود. Ahmad و همکاران (2013) توانستند در یک همه‌گیری باکتری *آئرومونـاس هیدروفیلا* را از تعدادی کپورماهیان آب‌شیرین شامل کپور علفخوار (*Ctenopharyngodon idella*)، کپور کاتلا (*Catla catla*)، کپور روهو (*Labeo rohita*) و مریگال (*Cirrhinus mriqala*) جدا نمایند. در مطالعه دیگری Cuma و همکاران (2010) نیز توانستند در یک سپتی‌سمی باکتری *آئرومونـاس هیدروفیلا* را از ماهی کپور معمولی (*Cyprinus carpio*) جدا نمایند. این پژوهشگران توانستند وجود ژن‌های عامل حدت آئرولیزین و همولیزین را در سویه جداسازی شده به‌کمک واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز مشخص نمایند.

آلوده شدن ماهی کپورمعمولی به این باکتری علاوه بر ایجاد خسارات اقتصادی در صنعت آبزی‌پروری می‌تواند سبب بروز مشکلات بهداشتی در جامعه گردد. با توجه به همه‌جایی بودن باکتری *آئرومونـاس هیدروفیلا* و نیز توانایی آن در سازگاری با شرایط نامساعد به‌نظر می‌رسد باید بین سویه‌هایی که از موارد بالینی جدا می‌شوند تفاوت فنوتیپی، ژنتیکی و الگوی مقاومت آنتی‌بیوتیکی وجود داشته باشد (Yousr و همکاران، 2007). در ادامه برای تولید واکسن یا طراحی کیت‌های تشخیصی بیماری‌های با منشاء آب و غذا لازم است اطلاعات پایه‌ای از سویه‌های موجود در نقاط مختلف کشور وجود داشته باشد.

هدف اصلی این بررسی عبارت بود از شناسایی سویه‌های جدا شده از ماهی کپورمعمولی که توانایی تولید سم انتروتوکسین را دارند. هم‌چنین در این مطالعه خواص فیزیکی، بیوشیمیایی و الگوی مقاومت آنتی‌بیوتیکی تمامی جدایه‌ها با یکدیگر و با سویه استاندارد مورد بررسی قرار گرفت.

مواد و روش‌ها

تهیه جداسازی و شناسایی *آئرومونـاس هیدروفیلا* از ماهی کپورمعمولی: در خرداد تا شهریور ماه سال 1392 تعداد 50 نمونه ماهی از ده مزرعه پرورشی آذربایجان‌غربی جمع‌آوری و در کنار یخ و در اسرع وقت به آزمایشگاه میکروب شناسی پژوهشکده آرتمیا و آبزیان، دانشگاه ارومیه منتقل شدند. بلافاصله سطح بدن ماهیان با اتانل 70 درجه شستشو شده و کبد، طحال و کلیه آن‌ها در شرایط استریل از محوطه شکمی جداسازی و دو مرتبه با سرم فیزیولوژی استریل شستشو داده شدند. سپس به‌کمک دستگاه هموژنیزاتور بافتی اندام‌ها هموژن

شده و بخش همگن شده بر روی محیط BHIA (آگار مغز و قلب) کشت و در دمای 28 درجه سانتی‌گراد گرم‌خانه گذاری شدند. پس از دو روز پرگنه‌های رشد یافته مجدداً بر روی محیط کشت BHIA پاساژ داده شدند. سپس باکتری‌های اکسیداز مثبت، متحرک و تخمیرکننده گلوکز به‌عنوان *آئرومونـاس* انتخاب و مورد شناسایی دقیق‌تر قرار گرفتند.

شناسایی جدایه‌ها براساس تست‌های بیوشیمیایی و فیزیولوژیکی: در این بررسی برای شناسایی باکتری‌های جدا شده تست‌های تولید H_2S، اوره‌آز، تولید گاز اندول، ذوب ژلاتین، احیای سیترات، رشد بر روی محیط مک کانکی، تحرک، احیای نیترات و تخمیر کربوهیدرات‌هایی نظیر گلوکز، مانیتول، اینوزیتول، سوربیتول، رامنوز، سوکرز، ملیبیوز و آرابینوز استفاده شد (Yousr و همکاران، 2007).

تائید جنس و گونه جدایه‌ها به کمک PCR و شناسایی ژن مولد انتروتوکسین: در این تحقیق از واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز براساس آغازگرهای ژن هدف 16s rRNA برای شناسایی جدایه‌ها استفاده شد. هم‌چنین با این تکنیک وجود ژن مولد انتروتوکسین براساس روش Balsalobre و همکاران (2009) در جدایه‌های تائید شده مورد بررسی قرار گرفتند. لازم به توضیح است که پرایمرهای رفت و برگشت برای ژن‌های 16s rRNA و انتروتوکسین در جدول 1 اشاره شده است.

جدول 1: توالی پرایمرهای مورد استفاده در این مطالعه برای تکثیر ژن‌های 16 S rRNA و انتروتوکسین

نام پرایمر	آغازگر	توالی	طول (جفت باز)	منبع
انتروتوکسین	رفت	5’-CGCCAACGGCGATCTCATT -3’	1911	کد دسترسی AF419157 از بانک ژنی
	برگشت	5’ -TTTCACCGCAGCGGGTTTG- 3’		
16 S rRNA	رفت	5’-AGAGTT TGA TCC TGG CTC AG-3’	1200	Sakar و همکاران (2007)
	برگشت	5’-GGTTAC CTT GTT ACG ACT T- 3’		

به‌طور خلاصه، ابتدا کلنی خالص و 24 ساعته هر سویه به‌طور جداگانه به 100 میکرولیتر آب مقطر افزوده شده و به مدت 10 جوشانده شدند. سپس تمامی لوله‌ها با دور g 1000 به‌مدت 10 دقیقه سانتریفیوژ شدند تا اجزاء سلولی رسوب کنند، سپس محلول رویی که حاوی DNA ژنومی بود به میکروتیوب تازه منتقل شد. مخلوط واکنش PCR به حجم 25 میکرولیتر شامل 2/5 میلی‌مولار کلرید منیزیم، 2/5 میکرولیتر بافر 10 برابر واکنش، 10 نانومول از dNTP ها، 10 نانومول از هر پرایمر، 2/5 واحد پلی‌مراز (فرمنتاز) و 20 نانوگرم DNA مکمل بود. PCR به‌کمک ترمال سایکلر (اپندرف، آلمان) شامل سیکل‌های زیر انجام گرفت: گرمایش اولیه 95 درجه به‌مدت 5 دقیقه به‌دنبال آن 35 دوره شامل 95 درجه به‌مدت دو دقیقه، 55 درجه به‌مدت 1 دقیقه و 72 درجه به‌مدت 1 دقیقه در خاتمه 72 درجه به‌مدت 7 دقیقه محصولات PCR به‌کمک الکتروفورز ژل 1/5 و 1/8 درصدی آگارز در بافر TBE مورد بررسی قرار گرفتند. ژل الکتروفورز به‌کمک رنگ سیف DNA (رد سیف، ژن راد) و نور فرابنفش مشاهده گردید.

تعیین حساسیت میکروبی: در این بررسی برای تعیین حساسیت میکروبی جدایه‌ها از روش انتشار دیسک استفاده شد (Bauer و هکاران، 1966). برای این منظور ابتدا از کشت تازه همه جدایه‌ها به‌همراه سویه استاندارد به‌صورت کشت چمنی بر روی محیط کشت مولر آگار (مرک، آلمان) کشت داده شدند. هم‌چنین دیسک‌های آنتی‌بیوتیکی شامل انروفلوکساسین، فلورفنیکول، جنتامایسین، اکسی‌تتراسیکلین، استرپتومایسین، سیپروفلوکساسین،

اریترومایسین، تریمتوپریم و سلفامتوکسازول از شرکت پادتن طب (ایران) تهیه و مورد استفاده قرار گرفتند. در نهایت تفسیر حساسیت، مقاومت و منطقه مهار رشد همه سویه‌ها براساس روش استاندارد CSLI (Clinical and Laboratory Standards Institute) قضاوت شد (CLSI، 2009).

نتایج

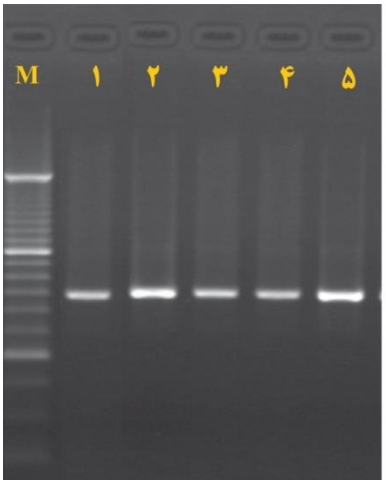
بررسی‌های باکتری‌شناسی نشان داد که باکتری‌های جدا شده به‌صورت گرم منفی و میله‌ای شکل بوده و نتایج مربوط به تست‌های بیوشیمیایی آن‌ها در جدول 2 اشاره شده است.

جدول 2: نتایج آزمون‌های بیوشیمیایی تائید *آئروموناس هیدروفیلا* جدا شده از ماهی کپور معمولی

رنگ آمیزی گرم	مورفولوژی	حرکت	اکسیداز	کاتالاز	اکسیداسیون و تخمیر	احیاء نیترات	تولید گاز اندول	تولید دی سولفیدهیدروژن	ذوب ژلاتین	تخمیر گلوکز
گرم منفی	میله‌ای	مثبت	مثبت	مثبت	تخمیر	مثبت	منفی	منفی	مثبت	مثبت

یافته‌های مربوط به تائید گونه‌ها براساس تقویت ژن 16s rRNA در واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز پس از انجام الکتروفورز در ژل 1/5 درصد آگارز در شکل 1 نشان داده شده است.

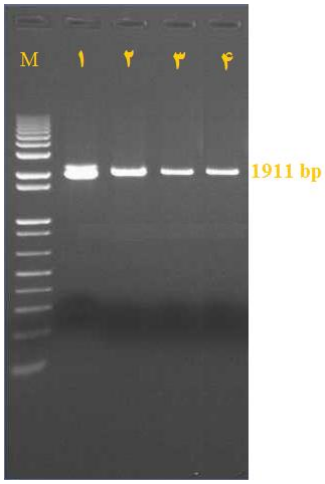
همان‌طورکه مشاهده می‌شود تمامی جدایه‌ها به‌طور مثبتی



شکل 1: تصویر الکتروفورز ژن 16s rRNA باکتری *آئروموناس هیدروفیلا* با استفاده از ژل 1/5 درصد آگارز. M: مارکر مولکولی به وزن یک کیلو جفت باز، 1 تا 4 سویه *آئروموناس هیدروفیلا* جدا شده از ماهی کپور معمولی و 5: سویه استاندارد *آئروموناس هیدروفیلا*

نتایج مربوط به بررسی تعین حساسیت میکروبی نیز در جدول 3 آورده شده است. براساس این یافته‌ها می‌توان نتیجه گرفت که

آئروموناس هیدروفیلا تشخیص داده شده‌اند. هم‌چنین نتایج مربوط به بررسی وجود ژن انتروتوکسین در هر شش جدایه نشان داد که این ژن در همه آن‌ها وجود داشته و محصول واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز آن باندی با اندازه 1911 جفت باز می‌باشد (شکل 2).



شکل 2: تصویر الکتروفورز ژن انتروتوکسین باکتری *آئروموناس هیدروفیلا* با استفاده از ژل 1/8 درصد آگارز. M: مارکر مولکولی به وزن یک کیلو جفت باز، 1 تا 4 سویه‌های *آئروموناس هیدروفیلا* جدا شده از ماهی کپور معمولی دارای ژن انتروتوکسین

تفاوت مشخصی از نظر الگوی مقاومت آنتی‌بیوتیکی بین این شش سویه وجود دارد. بررسی تعیین حساسیت میکروبی ثابت کرد که بیش-

ترین میزان مقاومت در برابر انروفلوکساسین و کم‌ترین آن نسبت به سولفامتوکسازول وجود دارد.

جدول 3: نتایج مربوط به بررسی تعین حساسیت میکروبی سویه‌های جدا شده *آئرومونـاس هیدروفیلا*

آنتی‌بیوتیک	حساسیت (درصد)
انروفلوکساسین	93/22
فلورفنیکول	89/12
استرپتومایسین	43/06
سیپروفلوکساسین	84/11
جنتامایسین	59/21
اکسی تتراسیکلین	59/44
اریترومایسین	34/71
تریمتوپریم	24/12
سولفامتوکسازول	21/34

بحث

آئرومونـاس هیدروفیلا به‌طور معمول ساکن آب‌های شور بوده و می‌تواند سبب ایجاد بیماری در موجودات آبزی، خشکزی و حتی انسان گردد. این باکتری یکی از عوامل مهم بیماری‌زا در سیستم‌های پرورشی ماهیان گرم آبی به‌شمار می‌رود و می‌تواند سبب سپتی‌سمی خونریزی دهنده مشابه سایر باکتری‌های گرم منفی شود. در مطالعه حاضر نیز علائم خونریزی در اطراف پوزه، باله‌های سینه‌ای و سوراخ دفعی ماهیان کپور مشاهده گردید. بررسی‌های کالبد گشایی وجود خونریزی در محوطه شکمی، کم رنگ شدن کبد و تورم آن را ثابت کرد. بررسی‌های انجام شده نشان می‌دهد که مواجه شدن آبزیان با شرایط تنش‌زا می‌تواند آن‌ها را در برابر *آئرومونـاس هیدروفیلا* مستعدساز، که در این حالت زخم‌های جلدی توام با مرگ و میر مشاهده می‌شود. مطالعات نشان می‌دهد تغییرات اسیدیته، دما و کیفیت آب، هم‌چنین تراکم، دستکاری و میزان اکسیژن محلول آب می‌تواند شرایط را برای شیوع بیماری مستعد نمایند (Casiano و همکاران، 2010).

یکی از روش‌های مطمئن و قابل اعتماد جهت تائید جنس و گونه باکتری‌ها واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز می‌باشد. در بررسی حاضر نیز پس از شناسایی اولیه سویه‌های جدا شده از ماهی کپورمعمولی از روش PCR برای تائید جنس و گونه جدایه‌های *آئرومونـاس هیدروفیلا* استفاده شد. در این راستا با تقویت ژن 16s rRNA در واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز سویه‌های جدا شده شناسایی شدند چون این ژن به شدت محافظت شده طوری‌که در طول زمان جهش در آن اتفاق نمی‌افتد. به‌طور مشابه نیز Sarkar و همکاران (2012) از ژن 16s rRNA برای تائید جنس و گونه *آئرومونـاس هیدروفیلا* استفاده کردند، نتایج به‌دست آمده از تحقیقات این محققان موافق یافته‌های به‌دست آمده در این بررسی بود. در واقع الکتروفورز محصولات پلی‌مراز این ژن در ژل آگارز 1/5 درصد باندی به اندازه 1200 جفت باز تولید کرد.

در بررسی حاضر تعداد شش جدایه از باکتری *آئرومونـاس هیدروفیلا* از 10 مزرعه پرورشی ماهی کپورمعمولی جدا شد. سویه‌های جدا شده نسبت به تعدادی از آنتی‌بیوتیک‌های رایج مقاوم بوده طوری‌که اریترومایسین، تریمتوپریم و سولفاکتوکسازول از جمله آنتی‌بیوتیک‌هایی بوده که مقاومت در مورد آن‌ها مشاده شد. به‌طور مشابه Laith و Najiah (2013) وجود مقاومت دارویی را در *آئرومونـاس هیدروفیلا* جدا شده از گربه‌ماهی (*Clarias gariepinus*) را ثابت کردند. نتایج بررسی این دو محقق نشان داد که آمپی‌سیلین و کلستین داروهایی هستند که مقاومت در مورد آن‌ها در سویه جدا شده وجود دارد. هم‌چنین نتایج هر دو بررسی نشان داد که انروفلوکساسین دارویی است که مقاومت در برابر آن در مقایسه با سایر آنتی‌بیوتیک‌ها کم‌تر است. بررسی انجام شده توسط Sha و همکاران (2002) رابطه اسهال ناشی از *آئرومونـاس هیدروفیلا* دارای ژن انتروتوکسین در انسان را ثابت

کرد. هم‌چنین این پژوهشگران توانستند ثابت کنند که سویه‌های مولد این ژن عامل اصلی اسهال خونی در انسان محسوب می‌شوند. مطالعاتی که توسط Asao و همکاران (1984) انجام شد نشان می‌دهد انتروتوکسین سیتوتوکسیک عامل اصلی اسهال خونی بوده و در تحقیقات جدیدتر چندین نوع از این سم در *آئرومونـاس هیدروفیلا* مشخص نمود که هرکدام توسط ژن‌های جداگانه‌ای بیان می‌شوند. از جمله این ژن‌ها باید به act، alt و ast اشاره نمود که در بین این سه نوع، ژن act مهم‌تر از بقیه می‌باشد. انتروتوکسین‌های *آئرومونـاس هیدروفیلا* مشابه همولیزین سبب ایجاد منفافذی در سلول‌های پوششی روده انسان و سایر موجودات می‌شوند. علاوه بر این انتروتوکسین‌ها سبب فعال شدن سیتوکین‌های پیش التهابی و آبشار ایکوزانوئیدی در ماکروفاژها و سلول‌های پوششی دیواره روده می‌شوند، نتیجه این اتفاق آسیب سلولی و افزایش تراوش سلولی خواهد بود (Chopra و همکاران، 2000). در بررسی حاضر پرایمرهای رفت و برگشت طراحی شده، اختصاص به ژن act داشته و این نشان می‌دهد که ژن مورد نظر در هر شش جدایه *آئرومونـاس هیدروفیلا* وجود دارد. همان‌طورکه ذکر شد با توجه به نقشی که انتروتوکسین بیان شده توسط ژن act در ایجاد اسهال انسان خونی دارد، می‌تواند زنگ خطری برای سلامت و بهداشت جامعه محسوب شود.

Yousr و همکاران (2007) اظهار داشتند که جستجوی توکسین‌های سلول کش و همولیزین به‌عنوان عوامل حدت یکی از مفیدترین روش‌های تشخیص و شناسایی *آئرومونـاس هیدروفیلا* محسوب می‌شوند. مطالعات بسیاری ثابت کردند که این باکتری دارای چهره‌های بالینی مختلف بوده که از التهاب معده و روده گرفته تا عفونت زخم را شامل می‌شود، در همه موارد نیز سویه‌های درگیر دارای انتروتوکسین بودند. در مطالعه حاضر نیز سویه‌هایی که از کپورمعمولی جدا شدند دارای ژن انتروتوکسین بودند. نتایج الکتروفورز محصولات این ژن بر روی ژل آگارز 1/8 درصد نشان‌دهنده وجود باندی به اندازه 1911 جفت باز بود که با یافته‌های به‌دست آمده توسط Yousr و همکاران (2007) هم‌خوانی دارد. با توجه به نقش مهمی که آبزیان در سبد غذایی انسان دارند، بدون شک ایجاد اسهال خونی ناشی از *آئرومونـاس هیدروفیلا* دور از انتظار نمی‌باشد. بر این اساس افرادی که در تماس آبزیان هستند به‌خصوص ماهیانی که در سیستم‌های گرم آبی پرورش داده می‌شوند نظیر ماهی کپورمعمولی، پرورش دهندگان، دامپزشکان و در نهایت مصرف کنندگان در معرض خطر ابتلا به اسهال خونی ناشی از این باکتری قرار دارند. در این راستا رسالت اصلی این پژوهش ارتقاء سطح آگاهی شهروندان و متولیان بهداشتی بوده تا هرچه بیشتر با خطرات و عواقب این عامل بیماری‌زا آشنا شوند.

بنابراین لازم است تلاش‌های چشمگیری در جهت کاهش میزان آلودگی با این باکتری به عمل آید. در این زمینه توصیه می‌شود نظارت بهداشتی دقیق‌تری بر تولید و عرضه ماهیان به خصوص ماهیان گرم آبی صورت گیرد. امروزه استفاده از روش‌های نوین در پرورش آبزیان در بسیاری از نقاط دنیا مرسوم شده که همگی در راستای افزایش تولید و بهبود سطح سلامتی آبزیان هستند، از جمله این روش‌ها می‌توان به استفاده از پروبیوتیک‌ها و پریبیوتیک‌ها اشاره کرد. در واقع پروبیوتیک‌ها موجوداتی هستند نظیر باکتری‌ها و قارچ‌ها یا فراورده‌های آن‌ها که از طریق ایجاد تعادل در محیط روده اثرات مفیدی بر سلامتی مصرف کننده دارند. پریبیوتیک‌ها نیز به نوبه خود ترکیباتی هستند از دسته کربوهیدرات‌ها که تاثیر مشابهی بر سلامتی دارند. از روش‌های نوین دیگری که می‌توان به محدود نمودن جمعیت باکتری در آب کمک نماید باکتریوفاژها هستند.

خوشبختانه در حال حاضر مطالعات بسیاری پیرامون استفاده درمانی و پیشگیرانه از باکتریوفاژها برای عوامل بیماری‌زای باکتریایی وجود دارد. همه این روش‌ها علاوه بر کمک در جهت پیشگیری و درمان می‌توانند به نوبه خود مصرف داروهای ضد میکروبی را کاهش دهند. همان‌طورکه جدول 3 نشان می‌دهد سویه‌های جدا شده *آئرومونـاس هیدروفیلا* درجات متفاوتی از مقاومت را نسبت به آنتی‌بیوتیک‌های رایج را نشان می‌دهند. این می‌تواند ناشی از مصرف بی رویه آنتی‌بیوتیک‌ها توسط پرورش‌دهندگان و عدم انجام آزمایش‌های تعیین حساسیت میکروبی باشد. مصرف طولانی مدت و بی رویه آنتی‌بیوتیک‌ها علی‌رغم ایجاد مشکلات بهداشتی و زیست محیطی نظیر باقی مانده‌های دارویی می‌تواند در به‌وجود آمدن سویه‌های نوظهور مقاوم به آنتی بیوتیک در باکتری‌ها موثر باشد.

براساس یافته‌های به‌دست آمده از این تحقیق نتیجه‌گیری می‌شود که باکتری *آئرومونـاس هیدروفیلا* عامل ایجاد سپتی سمی کشنده در ماهیان کپور بوده و این جدایه‌ها دارای ژن انتروتوکسین می‌باشند. هم‌چنین می‌توان گفت در صورت ورود باکتری با زنجیره غذایی انسان از طریق ماهیان آلوده خطر ابتلا انسان به اسهال خونی ناشی از این باکتری وجود دارد. از طرف دیگر می‌توان نتیجه گرفت که مصرف بدون ضوابط آنتی‌بیوتیک‌ها در آبزیان پرورشی سبب به‌وجود آمدن سویه‌های مقاوم در *آئرومونـاس هیدروفیلا* شده است.

منابع

1. **Ahamad, B.; Punniamurthy, D.; Senthil Kumar, N.; Malmarugan, V.; Suresh, S.; Ranganathan, R.V and Purushothaman, V., 2013.** Outbreak of Bacterial Haemorrhagic Septicaemia in Fresh Water Carps in
2. **Asao, T.; Kinoshita, Y.; Kozaki, S.; Uemura, T. and Sakaguchi, G., 1984.** Purification and some properties of *Aeromonas hydrophilia* hemolysine. Infection and Immunity. Vol. 46, pp: 122-127.
3. **Balsalobre, L.C.; Dropa, M.; Matte, G.R. and Matte, M.H., 2009.** Molecular detection of enterotoxin in environmental strains of *Aeromonas hydrophila* and *Aeromonas jandaei*. Journal of Water and Health. Vol. 7 pp: 685-691.
4. **Basheer Ahamad, D.; Punniamurthy, N.; Senthil Kumar, V.; Malmarugan, S.; Suresh, R.; Ranganathan, V. and Purushothaman, V., 2013.** Outbreak of Bacterial Haemorrhagic Septicaemia in Fresh Water Carps in Thanjavur Region of Tamil Nadu. Supplement to Advanced Biological Technique. Vol. 12, No. 7, pp: 12-15.
5. **Bauer, A.W.; Kirby, M.M.; Sherris, J.C. and Truck, M., 1966.** Antibiotic susceptibility testing by a standardized single disk method. American Journal of Clinical Pathology. Vol. 45, pp: 493-6.
6. **Casiano, H.; Choresca, J.R.; Dennis, K.; Jee-Eun Han, G.; Sang-Phil, S.; Ji-Hyung, K.; Jin-Woo, J. and Se-Chang, P., 2010.** Molecular detection of *Aeromonas hydrophila* isolated from albino catfish, *Clarias sp*. reared in an indoor commercial aquarium. Korean J. of Veterinary Research. Vol. 50, No. 4, pp: 331-333.
7. **Chopra, A.K.; Xu, D.; Ribardo, M.; Gonzalez, K.; Kuhl, J.; Peterson, W. and Houston, C.W., 2000.** The cytotoxic enterotoxin of *Aeromonas hydrophila* induces proinflammatory cytokine production and activates arachidonic acid metabolism in macrophages. Infection and Immunity. Vol. 68, pp: 2808-2818.
8. **Chu, W.H. and Lu, C.P., 2005.** Multiplex PCR assay for the detection of pathogenic Aeromonas hydrophila. Journal of Fish Diseases. Vol. 28, pp: 437-441.
9. **Clinical and laboratory standards institute (CLSI), 2009.** Document M39-A3. Analysis and Presentation of Cumulative Antimicrobial Susceptibility Test Data; Approved Guideline. 3th Edition. CLSI, 940 p.
10. **Jayavignesh, V.; Sendesh Kannan, K. and Bhat, A.D., 2011.** Biochemical characterization and cytotoxicity of the *Aeromonas hydrophila* isolated from Catfish. Arch. Appl. Sci. Res. Vol. 3, No. 3, pp: 85-93.
11. **Laith, A.R. and Najiah, M. 2013.** *Aeromonas hydrophila*: Antimicrobial Susceptibility and Histopathology of Isolates from Diseased Catfish, *Clarias gariepinus* (Burchell). Aquaculture Research and Development. Vol. 5, No. 2, pp: 215-222.
12. **Noor El Deen, A.E.; Dorgham, S.M.; Hassan A.H.M. and Hakim, A.S., 2014.** Studies on Aeromonas hydrophila in Cultured *Oreochromis niloticus* at Kafr El Sheikh Governorate, Egypt with Reference to Histopathological Alterations in Some Vital Organs. World Journal of Fish and Marine Sciences. Vol. 6, No. 3, pp: 233-240.
13. **Ormen, O.; Granum, P.E.; Lassen, J. and Figueras, M.J., 2005.** Lack of agreement between biochemical and genetic identification of *Aeromonas* spp. APMIS. Vol. 113, pp: 203-207.
14. **Sarkar, A.; Saha, M. and Roy, P., 2012**. Identification and Typing of *Aeromonas hydrophila* through 16S rDNA-PCR Fingerprinting. Aquaculture Research and Development. Vol. 3, No. 6, pp: 146-149.
15. **Sha, J.; Koslova, E. and Chopra, A., 2002.** Role of various enterotoxins in *Aeromonas hydrophila* induced gastroenteritis: generation of enterotoxin gene-deficient mutants and evaluation of their enterotoxic activity. Infection and Immunity. Vol. 70, pp: 1924-1935.
16. **Uma, A.; Rebecca, G.; Meena, S. and Saravanabava, K., 2010.** PCR Detection of putative aerolysin and hemolysin genes in an Aeromonas hydrophila isolate from infected Koi carp (*Cyprinus carpo*). Tamilnadu Journal Veterinary and Animal Sciences. Vol. 6, No. 1, pp: 31-33.
17. **Yogananth, N.; Bhakyaraj, R.; Chanthuru, A.; Anbalagan, T. and Nila, K.M., 2009.** Detection of virulence gene in *Aeromonas hydrophila* isolated from

fish samples using PCR technique. Global Journal of Biotechnology and Biochemistry. Vol., 4, pp: 51-53.

18. **Yousr, A.H.; Napis, S.; Rusul, G.R.A. and Son, R., 2007.** Detection of Aerolysin and Hemolysin Genes in *Aeromonas* spp. Isolated from Environmental and Shellfish Sources by Polymerase Chain Reaction. ASEAN Food Journal. Vol. 14, No. 2, pp: 115-122.