مجله دنیای میکروب‌ها
سال دهم شماره دوم (پیاپی ۳۱) تابستان ۱۳۹۶
صفحات ۱۶۳-۱۵۷

Short Communication

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

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. *آئرومونـاس 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 بـا هـدف جـداسـازی بـاکـتـری *آئرومونـاس هیدروفیلا* از خرچنگ دراز چنگال باریک و تعیین ژن های حدت آن انجام شد. دراین مطالعه توصـیـفـی، ۱۰ نـمـونـه خرچنگ دراز چنگال باریک بیمار مورد بررسی قرار گرفت. کشت نمونه ها در محیط برین هارت آگار انجام شد. به منظور شناسایی باکتری جداشده از آزمون های بیوشیمیایی و مولکولی استفاده گردید. همچنین وجود سه ژن حدت شامل لیپاز، الاستاز و آئرولیزیـن در جدایه ها مورد بررسی قرار گرفت. در مجموع از ۱۰ خرچنگ دراز چنگال باریک دارای علایم پلاک های سیاه رنگ، آبسه، نرمی پوسته، خوردگی ضمایم و بی حالی، تعداد ۲ باکتری *آئرومونـاس هیدروفیلا* جداسازی گردید. سویه اول دارای ژن های حدت لیپـاز و الاستاز و سویه دوم ژن های لیپاز، الاستاز و آئرولیزین را داشت. اطلاعات به دست آمده از این پژوهش نشان داد که سویـه هـای مختلف *آئرومونـاس هیدروفیلا* جدا شده از خرچنگ دراز چنگال باریک دارای ژن های حدت متفاوتی هستند. از ایـن رو، انـجـام پژوهش های گسترده تر به منظور ارزیابی نقش این ژن ها در بیماری زایی و علایم مربوط به حدت در گونه های آبزی پیـشـنـهـاد می گردد.

واژگان کلیدی: آئرومونـاس هیدروفیلا، خرچنگ دراز، عوامل حدت.

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

مقدمه

خـرچـنـگ دراز چـنـگـال بـاریـک بـا نـام عـلـمـی (*Astacus leptodactylus*) یکی از گونه های مـهـم خـانـواده خرچنگ دراز آب شیرین می باشد. خرچنـگ دراز چـنـگـال باریک یک گونه گسترده در سطح جهان است که در سـراسـر اروپا و خاورمیانه پراکندگی دارد (۱). در ایران، این خـرچـنـگ علاوه بر سواحل ایرانی دریایی خزر در برخی از دریاچه هـا و آب بندان های داخلی نیز وجود دارد (۲). عوامل بـیـمـاریـزای مختلفی می توانند این گونه را در زیستگاه های طبیعی تـحـت تاثیر قرار دهند. در این میان عوامل بیماری زای باکتریایی مانند *آئرومونـاس هیدروفیلا* (*Aeromonas hydrophila*)، گونه هـای *سیتوباکتر* (Citrobacter) و *فلاوباکتـریـوم* (Flavobacterium) نقش مهمی در مستعد کردن خرچنگ دراز آب شـیـریـن بـه بیماری دارند. بنابراین اثرات قابل ملاحظـه ای بـر کـاهـش محصولات آبزی پروری دارند (۱). *آئرومونـاس* هـا مسـئـول ایجاد طیف وسیعی از بیماری ها در جانوران خونسرد هستنـد. این باکتری ها گرم منفی و میله ای شـکـل هسـتـنـد. بـیـان پروتئین های خارج سلولی، وجود لایه S و فیمبریه و تـولـیـد

*) آدرس بـرای مـکـاتـبـه: شـیـراز، دانشـگـاه شـیـراز، گـروه عـلـوم درمـانـگـاهـی.
تلفن: ۰۹۱۶۶۲۲۳۷۱۹ پست الکترونیک: Rezasalighehzadeh@yahoo.com

کپسول پلی ساکاریدی و اندوتوکسین هایی مانند انتروتوکسین سیتولیتیک، آئرولیزین، لیپاز و پروتئاز عوامل حدت اصلی گونه های *آئرومونـاس* هستند که باعث بیماری زای می شوند (۳). در میان گونه های *آئرومونـاس*، مهمترین عامل بیماری زای باکتری *آئرومونـاس 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 (٤). این گونه باعث بروز سپتی سمی خونریزی دهنده در ماهی می شود (۵).

مطالعات مختلفی تنوع گسترده ای از بیماری زای *آئرومونـاس 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 (٦). در شرایط نامناسب محیطی مانند تراکم بالای نگهداری، کمبود غذا یا کیفیت پایین آب، آئرومونیاسیس در خرچنگ دراز آب شیرین پدیدار می گردد (۱). هدف از این مطالعه جداسازی باکتری *آئرومونـاس 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 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، آبسه، نرمی پوسته، خوردگی ضمائم و بی حالی داشتند انتخاب گردیدند (شکل ۱). پس از شستشوی سطح بدن با سرم فیزیولوژی با استفاده از سرنگ استریل از مایع درون آبسه 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 ٤٨ 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 مراز (PCR): در ابتدا به منظور استخراج ژنوم باکتریایی پرگنه خالص و ٢٤ 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 g ۱۰۰۰ به مدت ۱۰ دقیقه سانتریفیوژ شدند تا اجزا سلولی رسوب داده شوند. سپس محلول روماند که حاوی DNA ژنومی است به میکروتیوب تازه منتقل گردید. در این پژوهش از آغازگرهای ژن

شکل ۱: نمونه های خرچنگ دراز چنگال باریک با علایم پلاک های سیاه رنگ و آبسه.

جدول ۱: توالی پرایمرهای مورد استفاده در مطالعه.

نام پرایمر	آغازگر	توالی (´3-5´)	طول (جفت باز)	منبع
16S rDNA	رفت برگشت	GAAAGGTTGATGCCTAATACGTA CGTGCTGGCAACAAAGGACAG	٦٨٥	٨
لیپاز	رفت برگشت	ATCTTCTCCGACTGGTTCGG CCGTGCCAGGACTGGGTCTT	٣٨٣-٣٨٩	٩
الاستاز	رفت برگشت	ACACGGTCAAGGAGATCAAC CGCTGGTGTTGGCCAGCAGG	٥٤٠	٩
آئرولیزین	رفت برگشت	CAAGGAGGTCTGTGGCGACA VTTTCACCGGTAGCAGGATTG	٢٠٩	١٠

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 آئرولیزن در جدایه های تائید 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 (فرمنتاز) 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 ٦٠ ثانیه، گسترش در دمای ۷۲ درجه سلیسیوس به مدت ٦٠ 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

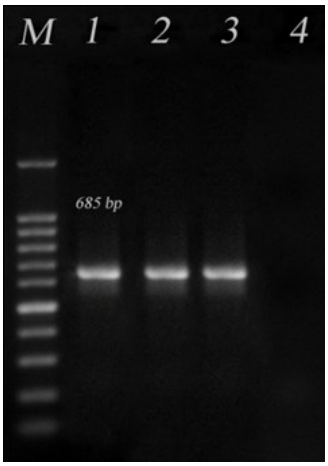
از ۱۰ خرچنگ دراز چنگال باریک دارای علایم پلاک های سیاه رنگ، آبسه، نرمی پوسته، خوردگی ضمائم و بی حالی، ۲ جدایه ی مشکوک به جنس آئروموناس (باکتری های گرم منفی، اکسیداز مثبت و کاتالاز مثبت) جداسازی شد (جدول ۲). با توجه به نتایج PCR دو باکتری جدا شده به عنوان *آئرومونـاس هیدروفیلا* تشخیص داده شدند (شکل ۲).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

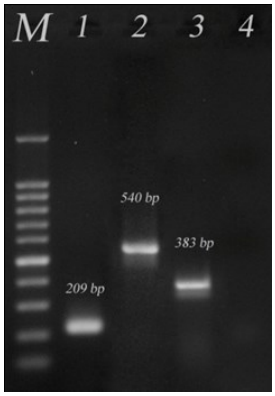
آئرومونـاس هیدروفیلا یک باکتری همیشه حاضر و فرصت

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	مالتوز	مثبت



شکل ۲: الکتروفورز حاصل از تکثیر ناحیه 16S rDNA باکتری *آئرومونـاس هیدروفیلا*. M) مارکر ۱۰۰ جفت بازی، ستون ۱) کنترل مثبت، ستون های ۲ و ۳) نمونه های مثبت، ستون ٤) کنترل منفی.



شکل ۳: الکتروفورز ژن های حدت در باکتری *آئرومونـاس هیدروفیـلا*. M) مارکر ۱۰۰ جفت بازی، ستون ۱) ژن آئرولیزین، ستون ۲) ژن الاستاز، ستـون ۳) ژن لیپاز، ستون ٤) کنترل منفی.

طلب است که می تواند سبب ایجاد بیمـاری در مـوجـودات آبزی گردد. این باکتری یکی از عوامل مهم بـیـمـاری زا در سیستم های پرورشی ماهیان گرم آبی به شـمـار مـی رود و می تواند سبب سپتی سـمـی خـون ریـزی دهـنـده شـود (۱۲ و ۱۳). در بررسی حاضر پس از شناسایی اولیه سویه های جدا شده از خرچنگ دراز چنگال باریک از روش واکـنـش زنجیره ای پلی مراز و پرایمرهای *16S rRNA* برای تایید جنس و گونه های جدایه های *آئرومونـاس هیدروفیلا* استفاده شد.

آهنگرزاده (Ahangarzadeh) و همکاران در سال ۲۰۱۵ از این ژن برای تایید جنس و گونه *آئرومونـاس هیدروفیلا* اسـتـفـاده کردند. نتایج به دست آمده از تحقیقات ایـن مـحـقـقـان بـا یافته های به دست آمده در این بررسی هم خـوانـی داشـت. به نحوی که الکتروفورز محصولات پلی مراز این ژن در ژل آگاروز ۱/۵ درصد باندی به اندازه ٦٨٥ جفت باز ایجاد نـمـود (١٤). در بررسی حاضر دو جدایه از باکـتـری *آئـرومـونـاس هیدروفیلا* جداسازی و مورد تایید نهایی قرار گرفت. ویـژگـی های بیماری زایی و حدت *آئرومونـاس هیدروفیلا* بـا گسـتـره وسیعی از اگزوتوکسین ها و اگزوآنزیم ها مرتبط است (۳). در این مطالعه دو سویه جدا شده به ترتیب دارای ژن های حـدت لیپاز و الاستاز و لیپاز، الاستاز و آئرولیزین بودند. وجود عوامل حدت، به ویژه عوامل مربوط به تولیدات خارج سلولی، نقـش مهمی در انتقال گونه های *آئرومونـاس* دارند. وجود آئرولیزیـن نشانه قوی از حدت بیماری زایی در سویه های *آئـرومـونـاس* می باشد (۱۵). نام (Nam) و جو (Joh) در سال ۲۰۰۷ شـیـوع بالاتر ژن آئرولیزین را در سویه های بیماری زا برای آزاد ماهیان نشان دادند (١٦). همچنین آئرولیزین به عنوان عـامـل اصـلـی حدت در سویه *آئرومـونـاس ورونـی* (*Aeromonas veronii*) برای گربه ماهی در نظر گرفته شده است (۱۷).

ژن های کد کننده الاستاز و لیپاز در سویه هـای *آئـرومـونـاس هیدروفیلا* جدا شده از رودخانه سائو فرانسیسکو نیز شناسـایـی شده اند. این ژن ها به معمول در سویه های *آئرومونـاس* یـافـت می شوند (۹). لیپاز و هیدرولیپاز نیز به عوامل اصلی حدت در گونه های *آئرومونـاس* در نظر گرفته می شوند. زیـرا مـوجـب تغییر ساختار غشای سیتوپلاسمی میزبان و در نتیجـه تشـدیـد بیماری زایی آن می شوند. به ویژه اگر ژن *آئرولیـزیـن* وجـود داشته باشد (۱۷). همچنین این ژن ها از عوامل مـهـم خـارج سلولی استقرار در بافت های میزبان و نکروز آنها محسوب مـی شوند (۱۵). سانگ (Song) و همکاران در سال ۲۰۰٤ ارتـبـاط آسیب های ایجاد شده در کشت سلولی توسط آئرولیزین همراه با الاستاز را نشان دادند (۱۸). ظرفیت آنزیم های خارج سلولـی به دلیل لیز سلولی و فراهم سازی غذا در زمان تکثیر گونه هـای *آئرومونـاس*، می تواند اهمیت قابل توجهی داشته باشد (۱۵). ژن لیپاز به عنوان یک عامل مهم حدت در سویه های *آئـرمـونـاس* جدا شده از آزاد ماهیان در نظر گرفته شده است (١٦).

نتیجه گیری

براساس یافته های این تحقیق می توان نتـیـجـه گـرفـت کـه سویه های مختلف *آئرومونـاس هیدروفیلا* جدا شده از خرچنگ دراز چنگال باریک دارای ژن های حدت متفاوتی هستند. ایـن امر می تواند بر حدت بیماری زایی و علایم ناشی از آن در این گونه آبزی اثر گذار باشد.

تشکر و قدردانی

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

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, Harliogˇlu 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 Shelfish 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.

Journal of Microbial World
Volume 10, No. 2, June 2017

Short Communication

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

Mahtab Khalafiyan[1], Reza Saligheh Zadeh[1], Mostafa Akhlaghi[2], Hassan Sharifiyazdi[3]

[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.