

وزارت جهاد کشاورزی
سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی
موسسه تحقیقات علوم شیلاتی کشور - مرکز تحقیقات و آموزش کشاورزی و منابع طبیعی
استان کرمان

عنوان:

شناسایی و بررسی اثر باکتریوفازهای
جدا شده از استخرهای پرورش ماهیان
قزل آرای رنگین کمان استان کرمان بر باکتری‌های
استرپتوکوک اینیایی، یرسینیا راکری و آئروموناس هیدروفیلا

مجری:

لاله یزدانپناه گوهرریزی

شماره ثبت

۵۵۲۱۹

وزارت جهاد کشاورزی
سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی
موسسه تحقیقات علوم شیلاتی کشور - مرکز تحقیقات و آموزش کشاورزی و منابع طبیعی استان
کرمان

عنوان طرح/ پروژه: شناسایی و بررسی اثر باکتریوفاژهای جدا شده از استخرهای پرورش ماهیان قزل آلا
رنگین کمان استان کرمان بر باکتری‌های استرپتوکوک اینیایی، یرسینیا راکری و آنروموناتس هیدروفیلا
کد مصوب: ۹۶۰۲۵۷-۹۶۰۰۱-۱۲-۵۴-۲

نام و نام خانوادگی نگارنده/ نگارندگان: لاله یزدانپناه گوهرریزی

نام و نام خانوادگی مجری مسئول (اختصاص به پروژه‌ها و طرح‌های ملی و مشترک دارد): -

نام و نام خانوادگی مجری: لاله یزدانپناه گوهرریزی

نام و نام خانوادگی همکار(ان): سید محمد ابراهیم جلیل ذریه‌زهره، فرخ رخ بخش زمین، محسن امامی‌فر،
محمدرضا آذرزمزم، پیروز شاکری

نام و نام خانوادگی مشاور(ان): بابک خیرخواه، مسعود حقیقی

نام و نام خانوادگی ناظر(ان): -

محل اجرا: استان کرمان

تاریخ شروع: ۱۳۹۶/۲/۱

مدت اجرا: ۲ سال

ناشر: موسسه تحقیقات علوم شیلاتی کشور

تاریخ انتشار: سال ۱۳۹۹

حق چاپ برای مؤلف محفوظ است. نقل مطالب، تصاویر، جداول، منحنی‌ها و نمودارها با ذکر مأخذ
بلامانع است.

«سوابق طرح یا پروژه و مجری مسئول / مجری»

طرح/پروژه : شناسایی و بررسی اثر باکتریوفاژهای جدا شده از
استخرهای پرورش ماهیان قزل آلاي رنگين کمان استان کرمان بر
باکتری های استریتوکوک اینیایی، یرسینیا راکری و آئروموناس
هیدروفیلا

کد مصوب : ۹۶۰۲۵۷-۰۰۱-۱۲-۵۴-۲

شماره ثبت (فروست) : ۵۵۲۱۹ تاریخ : ۱۳۹۹/۱/۱۸

با مسئولیت اجرایی سرکار خانم لاله یزدانپناه گوهرریزی دارای
مدرک تحصیلی کارشناسی ارشد در رشته میکروبیولوژی می باشد.
پروژه توسط داوران منتخب بخش بهداشت و بیماری های آبزیان در
تاریخ ۱۳۹۸/۱۲/۲۰ مورد ارزیابی و با رتبه عالی تأیید گردید.

در زمان اجرای پروژه، مجری در :

ستاد □ پژوهشکده □ مرکز ■ ایستگاه □

با سمت عضو هیئت علمی در مرکز تحقیقات و آموزش کشاورزی و

منابع طبیعی استان کرمان مشغول بوده است.

صفحه	عنوان	فهرست مندرجات
۱	چکیده	۱
۲	۱- مقدمه	۲
۴	۱-۱- پرورش ماهی قزل آلالی رنگین کمان در ایران و استان کرمان	۴
۵	۱-۲- انواع باکتری‌های مولد عفونت در ماهی قزل آلالی رنگین کمان	۵
۶	۱-۲-۱- آنتریموناس هیدروفیلا	۶
۸	۱-۲-۲- استرپتوکوکوس اینیایی	۸
۱۳	۱-۳- روش‌های مبارزه با عفونت‌های باکتریایی مربوط به ماهی قزل آلالی رنگین کمان	۱۳
۱۳	۱-۳-۱- آنتی‌بیوتیک	۱۳
۱۵	۱-۴- ساختار باکتریوفاژ	۱۵
۱۵	۱-۴-۱- مورفولوژی باکتریوفاژها	۱۵
۱۶	۱-۴-۲- انواع باکتریوفاژ	۱۶
۱۶	۱-۴-۳- چرخه حیات باکتریوفاژها	۱۶
۱۸	۱-۴-۴- مراحل آلودگی سلول میزبان	۱۸
۱۹	۱-۴-۵- کاربرد باکتریوفاژها	۱۹
۲۰	۱-۴-۶- مزایای باکتریوفاژها	۲۰
۲۱	۱-۴-۷- معایب باکتریوفاژها	۲۱
۲۳	۲- پیشینه تحقیق	۲۳
۲۳	۲-۱- پیشینه تحقیقات انجام شده در ایران	۲۳
۲۳	۲-۱-۱- تحقیقات انجام شده بر باکتریهای بیماری‌زای آبزیان	۲۳
۲۵	۲-۱-۲- تحقیقات انجام شده بر باکتریوفاژها	۲۵
۲۶	۲-۲- پیشینه تحقیق در خارج از کشور	۲۶
۲۶	۲-۲-۱- تحقیقات انجام شده بر روی باکتریهای بیماری‌زا	۲۶
۲۶	۲-۲-۲- باکتریوفاژ	۲۶
۳۰	۳- مواد و روش‌ها	۳۰
۳۰	۳-۱- روش پژوهش	۳۰
۳۰	۳-۱-۱- محل و زمان نمونه‌برداری	۳۰
۳۰	۳-۱-۲- نمونه‌گیری و آماده‌سازی نمونه‌های آب	۳۰
۳۰	۳-۱-۳- نمونه‌گیری و آماده‌سازی نمونه‌های ماهی	۳۰

۴-۱-۳- جداسازی باکتری‌های آئروموناس هیدروفیلا، استرپتوکوکوس اینیایی و یرسینیا راکری از

- ۳۱ نمونه‌های آب و ماهی‌های بیمار
- ۳۱ ۴-۱-۳- کشت سویه‌های استاندارد
- ۳۲ ۴-۱-۳- آزمایشات فیزیکوشیمیایی آب
- ۳۳ ۴-۱-۳- جداسازی باکتریوفاژ
- ۳۵ ۲-۳- شناسایی باکتری‌ها به روش تعیین ترادف 16S rDNA
- ۳۵ ۱-۲-۳- استخراج DNA باکتری
- ۳۹ ۳-۳- الکتروفورز
- ۳۹ ۱-۳-۳- تهیه ژل آگارز
- ۴۰ ۲-۳-۳- تهیه بافر TBE
- ۴۰ ۴-۳- آماده‌سازی نمونه‌ها جهت تعیین توالی نوکلئوتیدی
- ۴۰ ۵-۳- رویت باکتریوفاژ با میکروسکوپ الکترونی
- ۴۰ ۶-۳- تجزیه و تحلیل بیوانفورماتیک
- ۴۰ ۷-۳- افزودن باکتریوفاژ به آب حاوی ماهی آلوده
- ۴۱ ۸-۳- تست آنتی‌بیوگرام
- ۴۲ ۴- نتایج
- ۴۲ ۱-۴- نتایج جداسازی باکتری‌های بومی از آب و ماهیان بیمار استخرهای پرورش
- ۴۴ ۲-۴- نتایج بررسی فاکتورهای فیزیکی شیمیایی آب استخرهای پرورش ماهی
- ۴۵ ۳-۴- نتایج جداسازی باکتریوفاژ در محیط کشت
- ۴۶ ۴-۴- نتایج تعیین حداقل غلظت ممانعت از رشد باکتریوفاژ
- ۴۶ ۵-۴- پی‌سی‌آر و ژل الکتروفورز
- ۴۶ ۱-۴-۵- نتایج آئروموناس هیدروفیلا
- ۴۷ ۲-۴-۵- نتایج باکتریوفاژ
- ۴۷ ۶-۴- درخت فیلوژنی
- ۴۸ ۷-۴- نتایج تزریق باکتری آئروموناس هیدروفیلا در شرایط درون تنی
- ۵۱ ۸-۴- نتایج تست آنتی‌بیوگرام
- ۵۳ ۵- بحث
- ۵۳ ۱-۵- بیماری‌های آبزیان
- ۵۳ ۱-۱-۵- جداسازی باکتری‌های بیماری‌زای آبزیان
- ۵۶ ۲-۱-۵- اندازه‌گیری معیارهای کیفی مهم آب و ارتباط با بیماری آبزیان

۵۷	۵-۲- باکتریوفاژ
۵۷	۵-۲-۱- جداسازی باکتریوفاژ
۵۸	۵-۲-۲- تأثیر باکتریوفاژ در شرایط درون تنی
۵۹	۵-۲-۳- مقایسه فاژ و آنتی-بیوتیک
۶۱	۶- نتیجه گیری
۶۲	پیشنهادها
۶۴	منابع
۶۸	چکیده انگلیسی

چکیده

فاز درمانی، اخیراً بعنوان یک جایگزین برای آنتی‌بیوتیک‌ها جهت غیرفعال کردن باکتری‌های بیماری‌زای آبزیان پیشنهاد گردیده است، اما یافته‌های موجود هنوز ناکافی به نظر می‌رسد. لذا هدف تحقیق حاضر، جداسازی باکتریوفازی مؤثر بر باکتری‌های بیماری‌زای ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان بدون تأثیر نامطلوب بر ساختار طبیعی آبزی است. بر این اساس، به منظور جداسازی باکتری‌های بیماری‌زا ابتدا از بافت‌های کلیه، کبد و طحال ماهیان بیمار و همچنین آب تعدادی از استخرهای پرورش ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان استان کرمان نمونه‌برداری و با انجام آزمایشات میکروبیشناسی، بیوشیمیایی، افتراقی تشخیصی، پی‌سی‌آر و تعیین توالی ژن 16S rRNA و مقایسه با باکتری‌های استاندارد، شناسایی انجام شد. همزمان فاکتورهای مهم شیمیایی آب مانند اکسیژن، پی‌اچ، نیتريت، نترات و آمونیاک نیز اندازه‌گیری و ثبت گردیدند و رابطه آنها با رایج‌ترین عامل بیماری‌زا بررسی گردید. همچنین نمونه‌های آب استخرهای پرورش ماهی با استفاده از روش کلروفرم برای جداسازی باکتریوفاز اختصاصی مورد استفاده قرار گرفتند و تأثیر مهارتی باکتریوفاز جداسازی شده بر باکتری‌های مورد نظر در شرایط برون‌تنی و درون‌تنی انجام شد که از رقت‌های 10^{-4} و 10^{-8} باکتری *آئروموناس هیدروفیلا* به صورت داخل صفاقی و غوطه‌وری و مواجهه با غلظت 10^{-3} PFU/ml باکتریوفاز استفاده گردید. تجزیه و تحلیل داده‌ها به کمک نرم‌افزار SPSS ۲۱ به روش آنالیز واریانس یکطرفه انجام شد. میانگین داده‌ها به کمک آزمون دانکن با یکدیگر مقایسه شدند. همچنین در رسم نمودارها و جداول از نرم‌افزار اکسل ۲۰۰۷ استفاده شد. پس از کشت نمونه‌ها، باکتریهای بیماری‌زای *آئروموناس هیدروفیلا*، *استرپتوکوکوس اینیایی* و *یرسینیا راکری* جداسازی گردیدند. همچنین باکتریوفاز AH3Φ جداسازی شده توسط میکروسکوپ الکترونی و پی‌سی‌آر شناسایی شد. نتایج بدست آمده از بررسی فاکتورهای شیمیایی آب نیز نشان داد که با افزایش دما و کاهش اکسیژن میزان نیتريت و آمونیاک افزایش یافته و با بالا رفتن این فاکتورها ماهیان مبتلا به بیماری *آئرومونازیس* نیز افزایش یافت. همچنین نتایج آزمون درون‌تنی نشان داد بیشترین تأثیر باکتریوفاز در میزان بازماندگی ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان زمانی بود که از رقت 10^{-8} باکتری و 10^{-3} PFU/ml باکتریوفاز AH3Φ به صورت غوطه‌وری استفاده گردید. در آزمون آماری، وجود یا فقدان اختلاف معنی‌دار در سطح اطمینان ۹۵ درصد ($P \leq 0/05$) تعیین شد. باکتریوفازها به علت خاصیت‌های فراوانی که در تخریب انواع مختلف باکتری‌ها دارند، می‌توانند به عنوان هدف‌های درمانی در ساخت و توسعه داروهای جدید در درمان عفونت‌های باکتریایی آبزیان مورد استفاده قرار گیرند. هر چند که در مطالعات مختلف استفاده از فازها به عنوان داروهای جدید در محدود کردن رشد باکتری‌های عفونی از اولویت و اهمیت بالایی برخوردار است، اما به نظر می‌رسد در این زمینه بایستی تحقیقات بیشتری صورت گیرد و تکنیک‌های توسعه‌یافته‌تری برای ارزیابی و طراحی فازهای جدید مورد استفاده قرار گیرد.

واژه‌های کلیدی: آزمون‌های برون‌تنی و درون‌تنی، *آئرومونازیس*، باکتریوفاز AH3Φ، کنترل زیستی، ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان.