وزارت جهاد کشاورزی
سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی
مؤسسه تحقیقات علوم شیلاتی کشور- پژوهشکده آبزی پروری آبهای جنوب کشور

عنوان :

جداسازی و شناسایی گونه‌های دخیل در سپتی‌سمی باکتریایی ماهیان دریایی (باس دریایی، صبیتی و هامور) با تأکید بر سه گونه *ویبریو هارویی*، *ویبریو آلجینولیتیکوس* و *استرپتوکوکوس اینیایی* و تعیین حدت و بیماری‌زایی آنها در ماهی باس دریایی آسیایی

مجری:
حسین هوشمند

شماره ثبت
٦١٨٦٤

وزارت جهاد کشاورزی
سازمان تحقیقات آموزش و ترویج کشاورزی
مؤسسه تحقیقات علوم شیلاتی کشور – پژوهشکده آبزی پروری آبهای جنوب کشور

عنوان پروژه/طرح: جداسازی و شناسایی گونه‌های دخیل در سپتی‌سمی باکتریایی ماهیان دریایی (باس دریایی، صبیتی و هامور) با تأکید بر سه گونه *ویبریو هارویی*، *ویبریو آلجینولیتیکوس* و *استرپتوکوکوس اینیایی* و تعیین حدت و بیماری زایی آنها در ماهی
کد مصوب: ۹۸۱۱۶۳-۰۲۸-۱۲-۷٤-۲٤
نام و نام خانوادگی نگارنده/نگارندگان: حسین هوشمند
نام و نام خانوادگی مجری مسئول (اختصاص به پروژه‌ها و طرحهای ملی و مشترک دارد): -
نام و نام خانوادگی مجری/ مجریان: حسین هوشمند
نام و نام خانوادگی همکار(ان): مینا آهنگرزاده، محمدرضا مهرابی، اشکان اژدری، سمیرا ناظم رعایا، لفته محسنی نژاد، مهرداد محمدی دوست، رحیم پیغان، ابوالفضل سپهداری، شاپور کاکولکی، سیدرضا سیدمرتضائی، آیه سادات صدر،جمال اسماعیلی فر، یاسمن مهرنیا، حمید سقاوی، حمید بچای زاده
نام و نام خانوادگی مشاور(ان): مسعود قربانپور نجف آبادی
نام و نام خانوادگی ناظر: -
محل اجرا: استان خوزستان
تاریخ شروع: ۱۳۹۸/۰۷/۱
مدت اجرا: ۲ سال
ناشر: موسسه تحقیقات علوم شیلاتی کشور
تاریخ انتشار: سال ۱٤۰۱
حق چاپ برای مؤلف محفوظ است . نقل مطالب ، تصاویر ، جداول ، منحنی ها و نمودارها با ذکر مأخذ بلامانع است .

«سوابق طرح یا پروژه و مجری مسئول / مجری»

طرح/پروژه: جداسازی و شناسایی گونه‌های دخیل در سپتی‌سمی باکتریایی ماهیان دریایی (باس دریایی، صبیتی و هامور) با تأکید بر سه گونه *ویبریو هارویی*، *ویبریو آلجینولیتیکوس* و *استرپتوکوکوس اینیایی* و تعیین حدت و بیماری‌زایی آنها در ماهی

کد مصوب : ۹۸۱۱۶۳-۰۲۸-۱۲-۷٤-۲٤

شماره ثبت (فروست) : ٦١٨٦٤ تاریخ : ١٤٠١/٤/٢١

با مسئولیت اجرایی جناب آقای حسین هوشمند دارای مدرک تحصیلی دکتری تخصصی در رشته بهداشت آبزیان می‌باشد.

پروژه توسط داوران منتخب بخش بهداشت و بیماری‌های آبزیان در تاریخ ۱۴۰۱/۴/۶ مورد ارزیابی و با رتبه عالی تأیید گردید.

در زمان اجرای پروژه، مجری در :

ستاد ☐ پژوهشکده ■ مرکز ☐ ایستگاه ☐

با سمت عضو هیئت علمی در پژوهشکده آبزی‌پروری جنوب کشور مشغول بوده است.

عنوان	«فهرست مندرجات»	صفحه

چکیده ۱
۱. مقدمه ۲
۱. ۱. آبزی‌پروری ماهیان دریایی ۲
۱. ۲. تولید جهانی پرورش ماهی در قفس ۲
۱. ۳. آبزی پروری و پرورش در قفس ماهیان دریایی در ایران ۳
۱. ۴. بیماری‌های عفونی در ماهیان دریایی گرمابی ۴
۱. ۴. ۱. بیماریهای باکتریایی ۴
۱. ۴. ۱. ۱. بیماری ویبریوزیس ۶
۱. ۵. گونه های مهم و بیماریزای خانواده *ویبریوناسه* ۱۴
۱. ۵. ۱. ویبریو هاروی ۱۴
۱. ۵. ۱. ۱. ویژگی‌های باکتریشناسی و بیوشیمیایی *ویبریو هارویی* ۱۵
۱. ۵. ۱. ۲. بیماریزایی و عوامل حدت *ویبریو هارویی* ۱۶
۱. ۵. ۲. ویبریو آلجینولیتیکوس ۱۹
۱. ۵. ۲. ۱. عوامل حدت *ویبریو آلجینولیتیکوس* ۱۹
۱. ۶. استرپتوکوکوزیس ۲۱
۱. ۶. ۱. علائم بالینی بیماری ۲۲
۱. ۶. ۲. راههای ابتلا و تشخیص ۲۳
۱. ۶. ۳. مکانیسم حدت در استرپتوکوکوس اینیایی ۲۵
۲. مواد و روش کار ۲۶
۲. ۱. روش تهیه بافرها و محلول‌های مورد استفاده ۲۶
۲. ۱. ۱. ۱. بافرTAE ۲۶
۲. ۱. ۲. روش تهیه آب DEPC ۲۶
۲. ۱. ۳. روش تهیه(1X) PBS ۲۶
۲. ۱. ۴. ژل آگارز ۱/۵% ۲۶
۲. ۲. روش تهیه محیط‌های کشت باکتری ۲۷
۲. ۲. ۱. روش تهیه محیط آگار خون ۲۷

۲. ۲. ۲. روش تهیه Skim milk ده درصد برای نگهداری باکتری در فریزر ۲۷
۲. ۲. ۳. روش تهیه گلیسرول ۳۰٪ برای نگهداری باکتری ۲۷
۲. ۲. ۴. محیط کشت EYA ۲۷
۲. ۳. روش کار ۲۸
۲. ۳. ۱. نمونه‌برداری و تهیه ماهی ۲۸
۲. ۳. ۲. جداسازی و خالص‌سازی ۲۸
۲. ۳. ۳. تعیین هویت بیوشیمیایی جدایهها ۲۸
۲. ۳. ۴. شناسایی مولکولی جدایه‌ها ۲۹
۲. ۳. ۴. ۱. استخراج DNA از باکتری ۲۹
۲. ۳. ۴. ۲. شناسایی ویبریو هاروی و ویبریو آلجینولیتیکوس به روش مولکولی ۲۹
۲. ۳. ۴. ۳. شناسایی *استرپتوکوکوس اینیایی* به روش مولکولی ۳۰
۲. ۳. ۴. ۴. ارزیابی محصول PCR با الکتروفورز در ژل آگارز ۳۱
۲. ۳. ۴. ۵. بررسی فنوتیپی عوامل حدت ۳۱
۲. ۳. ۴. ۶. تعیین تولید همولیزین ۳۲
۲. ۳. ۴. ۷. تعیین تولید پروتئاز (کازئیناز و ژلاتیناز) ۳۲
۲. ۳. ۴. ۸. تعیین تولید لسیتیناز ۳۳
۲. ۴. بررسی ژنوتیپی عوامل حدت بهوسیله ردیابی مولکولی ژن‌های حدت ۳۳
۲. ۴. ۱. ویبریو هاروی ۳۳
۲. ۴. ۲. ویبریو آلجینولینیکوس ۳۴
۲. ۴. ۳. استرپتوکوکوس اینیایی ۳۵
۲. ۵. تعیین LD_{50} جدایههای واجد بیش‌ترین عوامل حدت ۳۶
۲. ۵. ۱. کشت جدایه‌های حاد جهت تعیین LD_{50} ۳۶
۳. نتایج ۳۸
۳. ۱. علائم ماهیان بیمار ۳۸
۳. ۲. جداسازی و خالص‌سازی باکتری ۳۸
۳. ۳. تشخیص اولیه به روش بیوشیمیایی ۳۹
۳. ۴. شناسایی مولکولی جدایه های گرم منفی ۳۹

۳. ۵. شناسایی مولکولی جدایه های گرم مثبت..... ۴۲
۳. ۶. عوامل حدت باکتری‌های جداشده..... ۴۳
۳. ۶. ۱. نتایج ردیابی مولکولی ژن‌های حدت *ویبریو هاروی*..... ۴۳
۳. ۶. ۲. نتایج ردیابی مولکولی ژن‌های حدت *ویبریو آلجینولیتیکوس*..... ۴۵
۳. ۶. ۳. نتایج ردیابی مولکولی ژن‌های حدت *استرپتوکوکوس اینیایی*..... ۴۵
۳. ۷. ردیابی فاکتورهای حدت به روش فنوتیپی..... ۴۷
۳. ۸. جدایه‌های واجد بیشترین عوامل حدت..... ۴۹
۳. ۹. میزان LD50 جدایه‌های حاد..... ۵۰
۳. ۱۰. نتایج ثبت باکتریها در بانک جهانی ژن:..... ۵۱
۴. بحث..... ۵۳
۴. ۱. فاکتورهای حدت ۵۷
۵. نتیجه گیری نهایی..... ۶۴
منابع ۶۵
چکیده انگلیسی..... ۷۳

چکیده

در حال حاضر آبزی پروری سریع‌ترین رشد را در صنعت تولید غذا داشته و تقریباً نیمی از غذاهای دریایی مورد نیاز انسان در دنیا را تأمین می‌کند. افزایش بروز بیماری‌ها، تلفات و درنتیجه خسارت اقتصادی ناشی از آن در آبزی‌پروری ماهیان دریایی، نشان می‌دهد که بیماری‌ها به ویژه بیماری‌های باکتریایی چالش بزرگی پیش روی توسعه آبزی‌پروری در بیشتر کشورهای پیشگام این صنعت بوده و به‌عنوان یک هشدار برای پرورش دهندگان و برنامه‌ریزان شیلاتی در این کشورها محسوب می‌شوند. باکتری‌ها از جمله پاتوژن‌های بیماری‌زای جدی آبزی-پروری دریایی می باشند که از آن‌جمله، می توان به بیماری ویبریوزیسیس ناشی از باکتری‌های جنس *ویبریو* به‌ویژه *ویبریو هاروی* *ویبریو آلجینولیتیکوس* در مناطق گرم و معتدله و استرپتوکوکوزیس ناشی از باکتری گرم مثبت *استرپتوکوکوس اینیایی* اشاره کرد که هر ساله خسارت سنگینی به اقتصاد تولید ماهیان دریایی وارد می‌کنند. این پروژه با هدف شناسایی عوامل دخیل در بروز سپتی‌سمی‌های باکتریایی در ماهیان دریایی پرورشی و تعیین حدت و بیماری‌زایی آنها و در آخر معرفی جدایه‌های حاد منطقه برای اقدامات پیشگیرانه طراحی شده است. بدین منظور در این مطالعه از ۱۳۰ عدد ماهی دریایی پرورشی که مظنون به بیماری بودند، نمونه برداری و در مجموع ۱۵۷ جدایه باکتری گرم منفی و مثبت جداسازی و خالص سازی شد. شناسایی مولکولی جدایه‌ها با استفاده از پرایمرهای اختصاصی نشان داد، تعداد ۴۸ جدایه *ویبریو آلجینولیتیکوس*، ۳۹ جدایه *ویبریو هارویی* و ۱۰ جدایه *استرپتوکوکوس اینیایی* بودند. نتایج ردیابی ژن‌های حدت و فاکتورهای حدت فنوتیپی در این جدایه-ها با استفاده از پرایمرهای اختصاصی ژن‌های حدت برای هر جدایه، نشان داد که تعداد ۲ جدایه *ویبریو هاروی*، ۳ جدایه از *ویبریو آلجینولیتیکوس* و ۳ جدایه *استرپتوکوکوس اینیایی* دارای بیشترین حدت بودند که جهت تعیین میزان دقیق LD50 مورد استفاده قرار گرفته و در بانک ژن جهانی نیز ثبت شدند. در این مطالعه نقش *ویبریو*ها در بروز سپتی‌سمی باکتریایی معادل ۸۴/۸۳٪ و نقش *استرپتوکوکوس*، بیش از ۲۰٪ برآورد شد.

کلمات کلیدی: ماهیان دریایی، سپتی سمی باکتریایی، *ویبریو هاروی*، *ویبریو آلجینولیتیکوس*، *استرپتوکوکوس اینیایی*، فاکتور حدت