Archive of SID

مجله علمی شیلات ایران (DOI): 10.22092/ISFJ.2019.121007 سال بیست و نه/ شماره ۱

بررسی اثرات استفاده از باکتریوفاژ AHϕ3 در میزان بازماندگی ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان (*Oncorhynchus mykiss*) آلوده به باکتری *آئروموناس هیدروفیلا* (*Aeromonas hydrophila*) در شرایط درون‌تنی (*in vivo*)

لاله یزدانپناه گوهرریزی[۱]، فرخ رخ‌بخش‌زمین*[۱]، سیدمحمدجلیل ذریه‌زهرا[۲]، نادیا کاظمی‌پور[۱]، بابک خیرخواه[۳]

*rokhbakhsh@gmail.com

۱- گروه میکروبیولوژی، واحد کرمان، دانشگاه آزاد اسلامی، کرمان، ایران.

۲- مؤسسه تحقیقات علوم شیلاتی کشور، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج وزارت جهاد کشاورزی، تهران، ایران.

۳- گروه دامپزشکی، واحد بافت، دانشگاه آزاد اسلامی، بافت، ایران.

تاریخ دریافت: شهریور ۱۳۹۸ تاریخ پذیرش: دی ۱۳۹۸

چکیده

باکتری *آئروموناس هیدروفیلا* عامل بروز سپتی‌سمی در ماهیان آبهای شیرین و شور است. در حال حاضر، یکی از مهمترین مشکلات در زمینه مدیریت بهداشتی برخی از مزارع تکثیر و پرورش ماهیان، کنترل و پیشگیری از سندرم سپتی‌سمی باکتریایی ناشی از این باکتری می‌باشد. تحقیق حاضر با هدف بررسی یافتن راهی برای کنترل و از بین بردن باکتری مزبور با استفاده از باکتریوفاژ جهت افزایش میزان بازماندگی ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان آلوده به باکتری *آئروموناس هیدروفیلا* صورت گرفته است. در این تحقیق که طی سال‌های ۹۸-۱۳۹۷ انجام شد و ۳۶۰ عدد ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان با وزن حدود ۲±۱۵ گرم در ۲۴ آکواریوم، در گروه‌های ۱۵ تایی با ۳ تکرار انتخاب و با رقت‌های 10^{-4} و 10^{-8} باکتری *آئروموناس هیدروفیلا* (تهیه شده از استوک حاوی $1/5\times10^{8}$ CFU/ mL) به صورت داخل صفاقی و غوطه‌وری در آب آلوده گردیدند و سپس در معرض غلظت 10^{-3} Pfu/mL باکتریوفاژ AHϕ3 جداسازی شده از آب استخرهای پرورش ماهی استان کرمان قرار گرفتند. بیشترین تأثیر باکتریوفاژ در میزان بازماندگی ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان زمانی بود که از رقت 10^{-8} باکتری و 10^{-3} Pfu/mL باکتریوفاژ AHϕ3 به صورت غوطه‌وری استفاده گردید. سایر عوامل محیطی مانند اکسیژن، pH، دما، شوری برای تمامی تیمارها یکسان بود. بین گروه شاهد و تیمارها در هر دو حالت (تزریق درون صفاقی و غوطه‌وری) تفاوت معنی‌دار بود ($P\leq0/05$). داده‌های حاصله با استفاده از نرم افزار SPSS ۲۱ آنالیز و با استفاده از آزمون آماری دانکن تجزیه و تحلیل شدند. نتایج بررسی حاضر نشان داد که یکی از راههای مناسب و کاربردی جهت افزایش میزان زنده مانی ماهیان قزل‌آلای رنگین کمان در مقابل بیماری‌های باکتریائی، استفاده از باکتریوفاژها می‌باشد. این بررسی با تاکید بر نیاز به تحقیقات بیشتر در زمینه استفاده از فاژ درمانی در حوزه آبزیان به عنوان یک استراتژی ضد میکروبی می‌باشد که جنبه‌های مختلف را از دیدگاه‌های محیط زیستی و بهداشتی ارائه می‌دهد.

واژگان کلیدی: *آئروموناس هیدروفیلا*، زنده‌مانی، باکتریوفاژ، قزل‌آلای رنگین‌کمان، درون تنی

*نویسنده مسئول

www.SID.ir

Downloaded from isfj.ir at 10:26 +0430 on Sunday May 17th 2020

Archive of SID

Downloaded from isfj.ir at 10:26 +0430 on Sunday May 17th 2020

مقدمه

آئروموناس هیدروفیلا (*Aeromonas hydrophila*) یکی از معمول‌ترین باکتری‌های بیماری‌زا در آبزیان است و شیوع آن باعث کاهش محصولات آبزی‌پروری می‌شود. یک باکتری فرصت طلب بوده و تحت شرایط استرس‌زا از قبیل تغییرات دمایی، دستکاری یا کاهش کیفیت آب، تبدیل به یک پاتوژن (عامل بیماری‌زا) می‌شود و ایجاد بیماری می‌کند (Zorriehzahra *et al.*, 2008; Yazdanpanah *et al.*, 2020). این باکتری گرم منفی، بی‌هوازی اختیاری، هتروتروف، میله‌ای شکل و متحرک است و بوسیله یک تاژک قطبی حرکت می‌کند. در آبهای شیرین و لب‌شور و نیز در محیط‌های هوازی و غیرهوازی قادر به زندگی می‌باشد (Samal *et al.*, 2014). این باکتری، عامل اصلی سپتی‌سمی خونریزی‌دهنده در ماهیان آب شیرین و شور است. جهت درمان و از بین بردن این باکتری و افزایش میزان زنده مانی ماهیان، محققان به دنبال راههای جدیدی می‌باشند (Rahmani *et al.*, 2015). شایع‌ترین درمان برای جلوگیری از عفونت‌ها و کاهش تلفات سنگین اقتصادی، استفاده مکرر از آنتی‌بیوتیک‌هاست (Haq *et al.*, 2012). به رغم این واقعیت که مقامات بهداشتی استفاده مسئولانه از آنتی‌بیوتیک‌ها را خواستار شده‌اند، ولی استفاده طولانی‌مدت در حوزه آبزی‌پروری منجر به رشد باکتری‌های مقاوم گردیده است (Moori Bakhtiari *et al.*, 2017). معضل دیگر استفاده از آنتی‌بیوتیک‌ها، غیر اختصاصی عمل کردن آنتی‌بیوتیک‌هاست و نه تنها عوامل بیماری‌زا را از بین نبرده بلکه سایر باکتری‌های مفیدی که به طور طبیعی در محیط وجود دارند را نیز معدوم می‌کنند (Mariem and Jamalludeen., 2015; Penades *et al.*, 2015). جهت کاهش تلفات و افزایش میزان بازماندگی ماهیان در برابر باکتری‌های بیماری‌زا روش‌های متفاوتی وجود دارد. یکی از این روش‌ها استفاده از باکتریوفاژ است (Drulis *et al.*, 2015; Seed, 2015). باکتریوفاژها ویروس‌هایی هستند که باکتری‌ها را مورد هدف قرار می‌دهند. جایگزینی فاژها به جای آنتی‌بیوتیک‌ها گزینه‌ای جدید در دنیای آبزیان است تا از انتقال ژن مقاومت آنتی‌بیوتیکی به ماهی و مصرف‌کنندگان جلوگیری بعمل آید (Meaden and Koskella., 2013). پس از کشف باکتریوفاژها در آغاز قرن بیستم بود که استفاده از آنها در درمان بیماری‌های عفونی توسعه یافت (Addy *et al.*, 2016; Salmond and Fineran, 2015). توجه به توسعه باکتریوفاژ درمانی در حال حاضر فزونی یافته است. لذا، استفاده از ارگانیسم‌هایی که با تأثیر مستقیم بر باکتری‌های بیماری‌زا، آنها را آلوده و نابود می‌کنند، علاوه بر اینکه تأثیرات سوء زیست محیطی مزارع پرورش ماهی را به میزان قابل توجهی کاهش می‌دهند، سبب افزایش سودآوری از طریق کاهش مرگ و میر در مراحل اولیه فرآیند پرورش نیز می‌شوند (Oliveira *et al.*, 2012; Sanmukh *et al.*, 2012). استفاده از باکتریوفاژهای طبیعی که سلامت ماهی و مصرف‌کنندگان را بخطر نمی‌اندازند، یکی از بهترین جایگزین‌ها برای عدم استفاده از آنتی‌بیوتیک‌ها در حوضچه‌های پرورش ماهی است. در حال حاضر، مطالعات متعددی در این زمینه صورت گرفته است (Chaikeeratisak *et al.*, 2017). هدف از انجام این تحقیق استفاده از باکتریوفاژها جهت افزایش میزان بازماندگی ماهیان در برابر باکتری بیماریزای *آئروموناس هیدروفیلا* در شرایط درون تنی بود.

مواد و روش‌ها

محل نمونه برداری

استان کرمان در جنوب شرقی ایران و بین ۵۳ درجه و ۲۶ دقیقه تا ۵۹ درجه و ۲۹ دقیقه طول شرقی و ۲۵درجه و۵۵ دقیقه تا ۳۲ درجه عرض شمالی قرار دارد و با ۱۸۳۱۹۳ کیلومترمربع وسعت، ۱۱ درصد از خاک کشورمان را بخود اختصاص داده و دومین استان کشور از نظر وسعت می‌باشد. این تحقیق طی سال‌های ۹۸-۱۳۹۷ و از مناطق سیرچ و کوهپایه انجام گردید. نمونه‌برداری در فصول مختلف و زمان ماهی‌دار بودن استخرها انجام شد. سیرچ از توابع بخش شهداد بوده و در فاصله ۶۰ کیلومتری شهرستان کرمان و کوهپایه در فاصله ۳۳ کیلومتری شهرستان کرمان واقع شده است (شکل ۱).

www.SID.ir

Archive of SID

Downloaded from isfj.ir at 10:26 +0430 on Sunday May 17th 2020

شکل ۱: الف: استخر پرورش ماهی منطقه سیرچ ب: استخر پرورش ماهی منطقه کوهپایه
Figure 1: A: Sirch area fisheries pool B: Kouhpayeh area fisheries pool

جداسازی باکتریوفاژ

جهت جداسازی باکتریوفاژ، میزان ۵۰ میلی‌لیتر آب استخرهای پرورش ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان استان کرمان که از عمق ۳۰ سانتی‌متری تهیه شده بود را از صافی میکروپور ۰/۲۲ میکرون عبور داده و در لوله‌های فالکون استریل میزان ۵ میلی‌لیتر کلروفرم به آنها افزوده و در دمای۴ درجه سانتی‌گراد قرار گرفت. پس از سانتریفوژ با دور ۳۵۰۰ در دقیقه و زمان ۳۰-۲۵ دقیقه مایع رویی حاصل به لوله‌های فالکون استریل منتقل گردیدند. مرحله افزودن کلروفرم چندین بار تکرار گردید و سوسپانسیون نسبتاً خالصی بدست آمد. پس از کنترل سوسپانسیون از نظر عدم آلودگی، در ۴ درجه سانتی‌گراد و در تاریکی نگهداری شد. همزمان سویه *آئروموناس هیدروفیلا* (American Type Culture Collection (ATCC 7965) را به محیط کشت مایع تلقیح کرده و چگالی نوری آن بر طبق جذب استاندارد نیم مک فارلند (معادل $۱/۵ \times ۱۰^{۸}$ باکتری) در طول موج ۶۰۰ نانومتر قرائت شد ($OD^{۱}_{600}$~0.3). مقدار ۱۰ میلی‌لیتر از محلول مایع رویی جدا شده با ۱۰۰ میلی‌لیتر محلول حاوی باکتری دارای چگالی نوری ۰/۳ مخلوط و به مدت ۱ ساعت در انکوباتور با دمای ۲۸±۲ درجه سانتی‌گراد قرار گرفت و یک شب در دمای ۲۸±۲ درجه سانتی‌گراد در انکوباتور شیکردار با حداقل دور بر دقیقه انکوبه گردید. سپس به ازای ۱۰۰ میلی‌لیتر محلول مجدداً ۱۰ میلی‌لیتر کلروفرم به نمونه افزوده شد. پس از ۱ ساعت نگهداری در ۴ درجه سانتی‌گراد، ۵۰۰۰ دور در دقیقه به‌مدت ۷-۶ دقیقه سانتریفوژ و مایع رویی بدست آمده به ظروف استریل درب پیچ‌دار منتقل گردید (Jun *et al*., 2018). جهت انجام کشت دو لایه ابتدا محیط‌های کشت نوترینت آگار ۲ درصد و ۰/۷ درصد تهیه گردیدند. محیط کشت ۲ درصد به پلیت‌های استریل منتقل و پس از انجماد میزان ۴ میلی‌لیتر از محیط ۰/۷درصد به لوله‌های فالکون استریل منتقل و ۱۰۰ میکرولیتر باکتری *آئروموناس هیدروفیلا* با چگالی نوری ۰/۳ با ۱۰۰ میکرولیتر فاژ در میکروتیوپ‌های استریل به مدت ۱۰ دقیقه با هم مجاور و به ۴ میلی‌لیتر محیط ۰/۷ درصد افزوده و مخلوط گردیدند و به محیط کشت نوترینت آگار ۲ درصد اضافه شدند (Hoang and Ngalep, 2019). پلیت‌ها در دمای ۲۸±۲ درجه سانتی‌گراد قرار گرفتند و پس از ۸-۷ ساعت در پلیت‌های حاوی فاژ، پلاک‌هایی به‌صورت نقاط شفاف مشاهده گردید. جهت بدست آوردن تک پرگنه خالص از باکتریوفاژ پس از تهیه سوسپانسیون باکتریوفاژ، عیار آن تعیین گردید. بدین منظور، ابتدا سریال‌های $۱۰^{-۱}$-$۱۰^{-۱۰}$ از محلول حاوی باکتریوفاژ تهیه و پس از افزودن ۱۰۰ میکرولیتر از هر رقت به ۱۰۰ میکرولیتر سوسپانسیون باکتری با چگالی ۰/۳ و ۴ میلی‌لیتر نوترینت آگار ۰/۷ درصد، این محلول به پلیت حاوی نوترینت آگار ۲ درصد منتقل گردید. پس از گرمخانه‌گذاری از رقت‌های مختلف باکتریوفاژ تک پرگنه بدست آمد. مجدداً ۱۰۰ میکرولیتر

1. Optical Density

www.SID.ir

Archive of SID

Downloaded from isfj.ir at 10:26 +0430 on Sunday May 17th 2020

نوترینت براث حاوی باکتری با چگالی نوری ۰/۲-۰/۳ به ۴ میلی‌لیتر نوترینت آگار ۰/۷ درصد افزوده و یک پرگنه از باکتریوفاژ به آنها اضافه گردید. ۲۴ ساعت انکوباسیون و سپس روش کلروفرم تکرار و تک پلاک خالص باکتریوفاژ بدست آمد (Easwaran *et al.*, 2017). پلاک حاوی باکتریوفاژ با سرم فیزیولوژی شسته شد و از محیط جدا گردید و در بافر SM قرار گرفت. از کلروفرم رقیق شده ۱ درصد جهت حذف باکتری‌ها استفاده گردید (Panos *et al.*, 2016). مجدداً عمل سانتریفوژ و جداسازی مایع رویی انجام شد. پس از جداسازی و انجام PCR[۲]، باکتریوفاژ AHϕ3 با استفاده از جفت پرایمرهای عمومی[۳] ۱۴۹۲R با طول باز ۲۲ (DNA-5' -TACGGYTACCTTGTTACGACTT-3' و وزن ملکولی ۶۶۸۳/۷) و F ۲۷ با طول باز ۲۰ (DNA-5'AGAGTTTGATCMTGGCTCAG-3' و وزن ملکولی ۶۱۵۹/۹) شناسایی گردید.

تعیین حداقل غلظت ممانعت از رشد باکتری توسط باکتریوفاژ AHϕ3

حداقل غلظت ممانعت از رشد باکتری توسط فاژ با استفاده از روش میکروبراث دلوشن[۴] در یک میکروپلیت ۹۶ خانه‌ای برای باکتری *آئروموناس هیدروفیلا* تعیین گردید. ۱۰۰ میکرولیتر از رقت‌های تهیه شده (10^{-3} الی 10^{-9}) از فاژ جداسازی شده به چاهک‌های حاوی باکتری اضافه گردید. برای هر نمونه گروه کنترل مثبت و منفی نیز در نظر گرفته شد و پس از انکوباسیون در دمای ۲±۲۸ درجه سانتی‌گراد کمترین غلظت فاژی که در آن هیچ کدورتی دال بر رشد باکتری مزبور مشاهده نشد، به عنوان حداقل غلظت ممانعت از رشد باکتری توسط باکتریوفاژ تعریف گردید (Wang *et al.*, 2017).

افزودن باکتریوفاژ به آب حاوی ماهی آلوده

در این تحقیق تعداد ۳۶۰ ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان پرورشی در اوزان تقریباً یکسان۲±۱۵ گرم و با شرایط مشابه (منبع آبی، اکسیژن، pH، شوری، حجم آب، و دما) و در دمای ۲±۱۶ درجه سانتی‌گراد و در ۲۴ آکواریوم قرار گرفتند. هر آکواریوم شامل ۱۵ عدد ماهی و ۴ تیمار و برای هر تیمار ۳ تکرار در نظر گرفته شد. سپس از رقت 10^{-4} و 10^{-8} (تهیه شده از استوک باکتری *آئروموناس هیدروفیلا*[۵] حاوی $۱/۵ \times 10^{8}$ CFU/ mL) به میزان ۰/۱ میلی‌لیتر به ماهیانی که توسط عصاره میخک بیهوش شده بودند تزریق داخل صفاقی انجام شد (Tuan *et al.*, 2018) (شکل ۲). همچنین از این ۲ رقت باکتریایی به‌صورت غوطه‌وری نیز استفاده گردید. برای هر تکرار، یک کنترل مثبت (فقط حاوی باکتریوفاژ AHϕ3)، یک کنترل منفی (فقط حاوی باکتری) و یک شاهد (فاقد باکتری و باکتریوفاژ) در نظر گرفته شد (Panos *et al.*, 2018; Gary, 2014). سپس از باکتریوفاژ AHϕ3 جداسازی شده به میزان مساوی 10^{-3} Pfu/mL به آکواریوم‌های تیمار افزوده گردید و میزان بازماندگی و میزان تلفات محاسبه و با گروه کنترل مثبت و منفی مقایسه شدند. برای تعیین حجم نمونه از فرمول ذیل استفاده شد:

$$\phi 2= D^2 n/2\alpha\ \delta^2$$

D = حداقل تفاوت بین نسبت مرگ و میر هر گروه است که به ازاء مشاهده آن مقدار تفاوت، اختلاف میزان مرگ دو گروه را معنی‌دار تلقی می‌شود. n = تعداد تکرار، α = تعداد گروههای آزمایش، δ۲ = واریانس هر کدام از گروه‌های آزمایشی است که در اینجا برابر گرفته شده‌اند.

2. Polymerase chain reaction
3. Universal primers
4. Micro broth dilution
5. *Aeromonas hydrophila* (ATCC7965)

www.SID.ir

Archive of SID

شکل ۲: الف و ب: تزریق میزان ۰/۱ میلی‌لیتر باکتری *آئروموناس هیدروفیلا* از رقت 10^{-4} و 10^{-8} درون صفاق ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان
Figure 2: A and B: intraperitoneal injection of 0.1 ml Aeromonas hydrophila from 10^{-4} and 10^{-8} dilution to Rainbow Trout

روش آماری

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 که وجود یا فقدان اختلاف معنی‌دار در سطح اطمینان ۹۵ درصد ($P\leq 0.05$) تعیین گردید. همچنین دررسم نمودارها و جداول از نرم‌افزار اکسل ۲۰۰۷ استفاده شد.

نتایج

طبق تجزیه و تحلیل آماری داده‌ها، بین گروه شاهد و تیمارها در هر دو حالت (تزریق درون صفاقی و روش غوطه‌وری) تفاوت معنی‌دار مشاهده گردید. همچنین تحلیل داده‌ها بیانگر این موضوع است که میزان رقت 10^{-8} باکتری *آئروموناس هیدروفیلا برای* گروه تیمار در روش غوطه‌وری (باکتری و باکتریوفاژ) بیشترین تاثیر را در بازماندگی ماهیان قزل‌آلا و میزان کاهش تلفات داشته است (جدول ۱). در تیمار با رقت 10^{-4} در تزریق درون صفاقی، کمترین میزان بازماندگی مشاهده شد (جدول ۱) و می‌توان نتیجه گرفت که باکتری قبل از این‌که توسط باکتریوفاژ از بین رود تأثیرات خود را بر میزان تلفات گذاشته و توانایی باکتریوفاژ جهت از بین بردن باکتری به حداقل رسیده است. اما در حالتی که رقت 10^{-8} باکتری و 10^{-3} Pfu/mL باکتریوفاژ در محیط آب قرار گرفته بودند، باکتریوفاژ میزان زیادی باکتری‌ها را از بین برده و میزان بازماندگی بیشتر و تلفات کمتر شد (شکل ۳).

نتایج نشان داد بیشترین میزان بازماندگی به‌ترتیب مربوط به تیمارهای با رقت 10^{-8} باکتری و 10^{-3} Pfu/mL باکتریوفاژ در روش غوطه‌وری، 10^{-8} تزریق درون صفاقی، 10^{-4} غوطه‌وری و نهایتاً 10^{-4} درون صفاقی بود. لذا، بین درصد بروز مرگ و میر در گروه‌های مختلف به طور کلی اختلاف معنی‌داری وجود داشت ($P\leq$ ۰/۰۰۱). شایان ذکر است، سطح معنی‌داری معادل ۰/۰۵ در نظر گرفته شده است. همچنین بین گروه شاهد با گروه کنترل مثبت که فقط حاوی باکتریوفاژ بود، اختلاف معنی‌داری مشاهده نشد (جدول ۱). همچنین طی ۱۸ روز میزان تلفات نیز محاسبه گردید که در شکل ۴ قابل رؤیت می‌باشد.

www.SID.ir

Downloaded from isfj.ir at 10:26 +0430 on Sunday May 17th 2020

Archive of SID

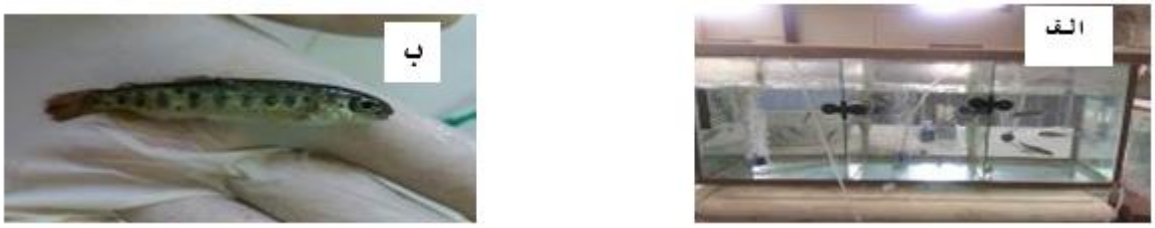
Downloaded from isfj.ir at 10:26 +0430 on Sunday May 17th 2020

جدول ۱: اثر Pfu /ml 10^{-3} باکتریوفاژ AHϕ3 بر میزان بازماندگی ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان آلوده به باکتری *آئروموناس هیدروفیلا* با رقت 10^{-4} و 10^{-8} تزریق داخل صفاقی و روش غوطه‌وری (میانگین± انحراف معیار)

Table 1: The effect of bacteriophage on the survival rate of rainbow trout contaminated with the *Aeromonas hydrophila* bacteria to concentration of 10^{-4} and 10^{-8} intraperitoneal injection and inoculation in water (Mean±SD)

گروه های آزمایشی	توصیف تیمار	میزان بازماندگی
تیمار ۱ (شاهد)	بچه ماهیان قزل‌آلای رنگین‌کمان بدون تزریق باکتری *آئروموناس هیدروفیلا* و بدون افزودن باکتریوفاژ برای تیمار ۴	۹۷/۷۸ ^{a}± ۳/۸۵
	بچه ماهیان قزل آلای رنگین کمان بدون تزریق باکتری *آئروموناس هیدروفیلا* و بدون افزودن باکتریوفاژ برای تیمار ۵	۹۷/۷۸ ^{a}±۲/۲۲
	بچه ماهیان قزل آلای رنگین کمان بدون تزریق باکتری *آئروموناس هیدروفیلا* و بدون افزودن باکتریوفاژ برای تیمار ۶	۹۷/۷۸ ^{a} ± ۳/۸۵
	بچه ماهیان قزل آلای رنگین کمان بدون تزریق باکتری *آئروموناس هیدروفیلا* و بدون افزودن باکتریوفاژ برای تیمار ۷	۹۷/۷۸ ^{a} ± ۲/۲۲
تیمار ۲ (کنترل منفی)	حاوی باکتری با رقت 10^{-4} باکتری *آئروموناس هیدروفیلا* در حالت غوطه وری برای تیمار ۴	۰/۰۰ ^{C}
	حاوی باکتری با رقت 10^{-4} باکتری *آئروموناس هیدروفیلا* در حالت تزریق برای تیمار ۵	۰/۰۰ ^{C}
	حاوی باکتری با رقت 10^{-8} باکتری *آئروموناس هیدروفیلا* در حالت غوطه وری برای تیمار ۶	۰/۰۰ ^{C}
	حاوی باکتری با رقت 10^{-8} باکتری *آئروموناس هیدروفیلا* در حالت تزریق برای تیمار ۷	۰/۰۰ ^{C}
تیمار ۳ (کنترل مثبت)	فقط حاوی Pfu /ml 10^{-3} باکتریوفاژ AHϕ3 برای تیمار ۴	۹۷/۵۵ ^{a} ± ۳/۸۵
	فقط حاوی Pfu /ml 10^{-3} باکتریوفاژ AHϕ3 برای تیمار ۵	۹۷/۵۵ ^{a}± ۲/۲۲
	فقط حاوی Pfu /ml 10^{-3} باکتریوفاژ AHϕ3 برای تیمار ۶	۹۷/۵۵ ^{a} ± ۳/۸۵
	فقط حاوی Pfu /ml 10^{-3} باکتریوفاژ AHϕ3 برای تیمار ۷	۹۷/۵۵ ^{a} ± ۲/۲۲
تیمار ۴	رقت 10^{-4} باکتری *آئروموناس هیدروفیلا* و Pfu /ml 10^{-3} باکتریوفاژ AHϕ3 در حالت غوطه وری	۶۴/۴۴ ^{b} ± ۲/۲۲
تیمار ۵	رقت 10^{-4} باکتری *آئروموناس هیدروفیلا* و Pfu /ml 10^{-3} باکتریوفاژ AHϕ3 در حالت تزریق	۳۲/۲۲ ^{c} ± ۴/۸۴
تیمار ۶	رقت 10^{-8} باکتری *آئروموناس هیدروفیلا* و Pfu /ml 10^{-3} باکتریوفاژ AHϕ3 در حالت غوطه وری	۷۷/۷۳ ^{b} ± ۷/۶۹
تیمار ۷	رقت 10^{-8} باکتری *آئروموناس هیدروفیلا* و Pfu /ml 10^{-3} باکتریوفاژ AHϕ3 در حالت تزریق	۶۸/۸۸ ^{b} ± ۲/۲۲

در هر سطر عدم وجود یک حرف مشترک از حروف نشان‌دهنده اختلاف معنی‌دار بین تیمارها می‌باشد ($p<۰/۰۱$).



شکل ۳: الف: آکواریوم حاوی ماهیان قزل‌آلای مورد آزمایش (نمونه های تیمار) ب: ماهی قزل‌آلا (۱۵ گرمی)

Figure 3: A: Aquarium containing Trout (Treatment Specimens) B: Rainbow trout (15g)

www.SID.ir

Archive of SID

Downloaded from isfj.ir at 10:26 +0430 on Sunday May 17th 2020

شکل ۴: مقایسه تعداد تلفات طی ۱۸ روز با ۲ رقت $۱۰^{-۴}$ و $۱۰^{-۸}$ باکتری *آئروموناس هیدروفیلا* و Pfu/ml $۱۰^{۳}$ باکتریوفاژ AHϕ3 در دو حالت غوطه‌وری و تزریق درون صفاقی

Figure 4: Comparison of rainbow trout mortality rate in intraperitoneal injection and immersion with 10^{-4} and 10^{-8} *Aeromonas hydrophila* and 10^{-3} PFU/ ml bacteriophage AHϕ3.

بحث

آئروموناس هیدروفیلا باکتری گرم منفی است که ساکن آبهای شور و شیرین بوده و می‌تواند عامل ایجاد بیماری در موجودات آبزی، خشکی‌زی و حتی انسان باشد (Austin and Austin., 2012). این باکتری یکی از عوامل مهم بیماری‌زا در سیستم‌های پرورشی ماهیان سردآبی وگرم آبی بوده و باعث ایجاد سپتی‌سمی خونریزی دهنده می‌گردد (Cheng *et al.*, 2015). همچنین ضعف و بی‌اشتهایی، اگزوفتالمی، تیرگی رنگ بدن، خون‌ریزی در اطراف دهان و سرپوش آبششی، شنای نامتعادل، تورم ناحیه شکمی و خوردگی سرپوش آبششی و باله‌های پشتی و دمی از جمله علائم ظاهری بود که در طول دوره آزمایش در ماهیان آلوده شده به باکتری *آئروموناس هیدروفیلا* مشاهده شد که در راستای نتایج تحقیقات نم نبات و همکاران (۱۳۹۳)، Seyit و Abdolkadir (۲۰۰۴) و همچنین نتایج Rohit Kumar و همکاران (۲۰۱۶) بود. همچنین باکتریوفاژ AHϕ3 جدا شده از استخرهای پرورش ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان در این تحقیق طبق بررسی‌های انجام شده و مطالعات و یافته‌های محققین در خانواده میوویریده قرار داشت که شواهد نشان می‌دهد اعضاء خانواده میوویریده به احتمال زیاد در محیط‌های طبیعی فراوان یافت می‌شوند و از آنها می‌توان به عنوان فاکتورهای کنترل کننده عوامل بیماری‌زا استفاده نمود که نتایج با تحقیقات Kim و همکاران (۲۰۱۲) مطابقت داشت. محققان جهت کنترل و نابودی باکتری‌های بیماری‌زا به دنبال راههای مختلفی هستند که یکی از این راهها استفاده از آنتی‌بیوتیک‌هاست، اما در قرن بیست و یکم مقاومت باکتری‌ها نسبت به اکثر آنتی‌بیوتیک‌های موجود تبدیل به یک معضل بزرگ جهانی در درمان عفونت‌های باکتریایی شده است بگونه‌ای که موجب بروز مشکلات عدیده‌ای نیز در جوامع انسانی و مقوله بهداشت عمومی شده است. با توجه به استفاده مکرر و بی‌رویه از آنتی‌بیوتیک‌ها جهت درمان توسط آبزی‌پروران، محققان به‌دنبال راههای مناسبی جهت یافتن جایگزینی مناسب و دوستدار طبیعت با آنتی‌بیوتیک‌ها هستند که یکی از این راهها استفاده از باکتریوفاژهاست. تحقیقات نشان داده است فاژهای لیتیک از این نظر که فعالیت ضدباکتریایی قابل توجهی دارند، مشابه آنتی‌بیوتیک‌ها عمل می‌کنند (Erez *et al.*, 2017).لذا، فاژ درمانی یک رهیافت پژوهشی جدید است که به یقین منافع بی‌شماری را برای شیلات، کشاورزی، دامپزشکی، پزشکی و ... فراهم می‌کند و با ارائه یک راه‌حل ممکن از افزایش شیوع عوامل بیماری‌زای مقاوم به آنتی‌بیوتیک جلوگیری بعمل می‌آورد (Golkar *et al.*, 2014; Cruzpapa *et al.*, 2014; Schmelcher and Loessner., 2014). بنظر می‌رسد استفاده از فاژها برای کنترل عفونت‌ها و بیماری‌های آبزیان در محیط‌های آبی بسیار امیدوار کننده باشد (Nobrega *et al.*, 2015). همان‌طوریکه عوامل بیماری‌زای ماهی در محیط‌های آبی زندگی می‌کنند، باکتریوفاژها نیز می‌توانند تماس فیزیولوژیکی پیوسته و نزدیک با عوامل بیماری‌زا را در یک نظم طبیعی داشته باشند و به عنوان یک روش پیشگیرانه در برابر عفونت‌های باکتریایی در روند تولید از مرحله لاروی تا بلوغ و قبل از انتشار باکتری در مخازن آبزی‌پروری و استخرهای پرورش ماهی ایفاء نمایند که نتایج این تحقیق با نتایج Elbreki و همکاران (۲۰۱۴) در این زمینه مطابقت داشت. Richard (۲۰۱۴) بر درمان‌های فاژی بر عوامل بیماری‌زای آبزیان شامل

www.SID.ir

Archive of SID

Downloaded from isfj.ir at 10:26 +0430 on Sunday May 17th 2020

آئروموناس سالمونیسیدا (در ماهی قزل‌آلا)، *فلاووباکتریوم سایکروفیلوم* (در ماهی قزل‌آلا و سالمون)، *استرپتوکوکوس اینیایی* (درخرچنگ)، *آئروموناس هیدروفیلا* (در موش) و *ویبریو هاروی* (در میگو) تحقیق نمودند و از باکتریوفاژها در درمان بیماری‌های ایجاد شده توسط این باکتری‌ها استفاده و به نتایج بسیار چشمگیری دست یافتند. محققین باکتریوفاژهایی را علیه باکتری *آئروموناس هیدروفیلا* جداسازی و شناسایی نمودند و نشان دادند که با وجود این باکتریوفاژها، مرگ و میر در میان ماهیان آلوده شده ایجاد نمی‌شود و نتایج بدست آمده شبیه به استفاده از آنتی‌بیوتیک تتراسایکلین است (Doss *et al.*, 2017). در تحقیقاتی که Jun و همکاران (۲۰۱۸) بر گربه ماهی و با استفاده از چندین فاژ شناسایی شده آئروموناس مانندAeh1، Aeh2 انجام دادند، نشان‌دهنده استفاده موفقیت‌آمیز از فاژها برای درمان عفونت آئروموناسی در گربه ماهی بود. در این تحقیق درمان گربه ماهی با تزریق داخل صفاقی (IP) اثرات محافظتی قابل توجهی نشان داد که باعث افزایش درصد نسبی میزان بقاء ماهیان در مقایسه با گروه کنترل بود که تحقیق اخیر مطابقت داشتند. همچنین استفاده از فاژها به عنوان ترکیبات طبیعی جدید در محدودکردن رشد باکتری‌های عفونی از اولویت و اهمیت بالایی برخوردار هستند (Penades *et al.*, 2015). تولید پادتن علیه پادگن‌های فاژی نیز به اثبات رسیده است که احتمالاً در بروز ایمنی علیه آنها و خنثی‌سازی آنها و نیز بیماری‌های خودایمنی ممکن است، نقش موثری داشته باشند (Abedon, 2017). محققان با افزودن غلظت 10^{10} PFU باکتریوفاژ به خوراک آبزیان نشان دادند که علاوه بر اینکه مخاطراتی برای آبزی ایجاد نمی‌شود بلکه در میزان بازماندگی و کاهش مرگ و میر نیز موثر است (Richards, 2014). این یافته‌ها نشان می‌دهد که انتخاب و میزان مناسب باکتریوفاژ می‌تواند با استفاده از دانش‌های جدید و بهره‌گیری از استراتژی‌های منحصربفرد باکتریوفاژها جهت دستیابی به فرآیندهای حیاتی باکتری موثر و کارساز باشد (Danish *et al.*, 2017) که در تحقیقات بعدی استفاده از باکتریوفاژ در خوراک ماهی قزل‌آلا نیز مورد بررسی قرار خواهد گرفت.

همچنین محققین با جداسازی دو فاژ TG25P و CT45P از گربه ماهی راه راه جهت غیرفعال کردن باکتری *آئروموناس هیدروفیلا* استفاده نمودند و به عنوان اولین گزارش در فاژ درمانی جهت کنترل *آئروموناس هیدروفیلای* جدا شده از گربه ماهی اعلام گردید (Hoang and Ngalep, 2019). در تحقیق دیگری که Le و همکاران (۲۰۱۸) بر باکتری *آئروموناس هیدروفیلا* و باکتریوفاژ انجام دادند، به این نتیجه رسیدند که درمان با استفاده از فاژ در گربه ماهی منجر به بهبود قابل توجهی در میزان بقاء ماهیان آزمایش شده (میزان بقاء ۱۰۰ درصد) در مقایسه با میزان بقاء در ماهیان شاهد (میزان بقاء ۱۸/۳ درصد) گردید که نتایج اخیر نیز با این یافته‌ها مطابقت داشت که با استفاده از باکتریوفاژ AHϕ3 انجام گردید و نشان داد که رقت 10^{-8} باکتری *آئروموناس هیدروفیلا* استفاده شده در گروه تماس مستقیم باکتری و 10^{-3} Pfu/mL باکتریوفاژ AHϕ3 (غوطه‌وری)، بیشترین تأثیر را در میزان بازماندگی ماهیان قزل‌آلای رنگین‌کمان و در نهایت کاهش تلفات داشت. این یافته‌ها پتانسیل استفاده از فاژها را به عنوان یک روش درمانی مؤثر برای کنترل سپتی سمی توسط باکتری آئروموناس در مزارع ماهیان نشان می‌دهد. این مطالعه شواهد بیشتری در مورد استفاده از باکتریوفاژها برای کنترل مؤثر بیماری در عملیات آبزی‌پروری ارائه می‌دهد (Le *et al.*, 2018). لذا، با توجه به کاربردهای مختلف فاژ درمانی و ضرورت استمرار آن در عرصه‌های آبزی‌پروری، ادامه پژوهش‌های تکمیلی و بهره‌گیری از تجارب موفق کشورهای پیشرو در عرصه‌های آبزی‌پروری، در این مقوله ضرورتی اجتناب ناپذیر است. بنابراین، مطالعات بیشتری در این زمینه که آیا فاژ درمانی به صورت یک روش خوراکی در مزرعه مؤثر است، باید انجام شود. علاوه بر این، بقاء مداوم فاژها و همچنین آماده سازی خوراک آغشته به فاژ باید تحت فاکتورهای مختلف محیطی (دما، و غلظت نمک) مورد بررسی قرار گیرد تا مشخص شود آیا فاژها قادر به ادامه زندگی و تاثیرگذاری مؤثر خواهند بود.

www.SID.ir

Archive of SID

Downloaded from isfj.ir at 10:26 +0430 on Sunday May 17th 2020

منابع

نم نبات، ر.، فیروزبخش، ف.، مقدس، م. و نوراشرف‌الدین، س. ن.، ۱۳۹۳. بررسی میزان آلودگی باکتری *آئروموناس هیدروفیلا* در بافت کبد ماهیان قزل‌آلای رنگین‌کمان مزارع پرورشی استان اصفهان. کنفرانس بین المللی توسعه پایدار، راهکارها و چالش‌ها با محوریت کشاورزی، منابع طبیعی، محیط زیست و گردشگری، ۱۲-۱.

Abedon, S.T., 2017. Information phage therapy research should report. *Pharmaceuticals*, 10, 43. 1-17, Doi: 10.3390/ph10020043.

Addy, H.S., Azizi, N.F. and Mihardjo, P.A., 2016. Detection of bacterial wilt pathogen and isolation of its bacteriophage from banana in lumajang area, Indonesia. *International Journal of Agronomy*, 1-7. Doi: 10.1155/2016/5164846.

Austin, B. and Austin, D.A., 2012. Bacterial fish pathogens. *Springer*: 652P.

Chaikeeratisak, V., Nguyen, K., Khanna, K., Brilot, A.F., Erb, M.L., Coker, J.K., Vavilina, A., Newton, G.L., Buschauer, R. and Pogliano, K., 2017. Assembly of a nucleus like structure during viral replication in bacteria. *Science*, 355, 194–197, Doi: 10.1126/science.aal2130.

Cheng, K., Zhang, D., Deng, J. and Zhao, Y., 2015. Isolation and characterization of an *Aeromonas puncatata* bacteriophage. *Journal of Biomedical Engineering*, 9: 185-187, Doi: 10.2174/1874120701509010185.

Cruzpapa, D.M.A.D., Candare, C.M.G., Cometa, G.L.S., Gudez, D.E.G. and Guevara, A.M.I.T., 2014. *Aeromonas hydrophila* Bacteriophage UP87: An Alternative to Antibiotic Treatment for Motile Aeromonas Septicemia in Nile Tilapia (*Oreochromis niloticus*). *Philippines Agricultural Scientist Journal*, 97: 96-101.

Danish, J., Malika, J., Sokolova, K., Vinnera, F., Mancusoa, S., Cinquerruia, G.T., Vladisavljevica, R.J., Clokieb, J., Gartonb, A., Stapleya, G.F. and Kirpichnikova, A., 2017. Formulation, stabilisation and encapsulation of bacteriophage for phage therapy. *Advances in Colloid and Interface Science*, 249, 100-133.

Doss, J., Culbertson, K., Hahn, D., Camacho, J. and Barekzi, N., 2017. A review of phage therapy against bacterial pathogens of aquatic and terrestrial organisms. *Viruses*, 9: 50, Doi: 10.3390/v9030050.

Drulis-Kawa, Z., Majkowska-Skrobek, G., Maciejewska, B., Delattre, A.S. and Lavigne, R., 2015. Learning from bacteriophages Advantages and limitations of phage and phage encoded protein applications. *Current Protein and Peptide Science*, 13(8), 699–722, Doi: 10.2174/138920312804871193.

Easwaran, M., Dananjaya, S.H.S. and Park, S.C., 2017. Characterization of bacteriophage pAh-1 and its protective effects on experimental infection of *Aeromonas hydrophila* in Zebrafish (*Danio rerio*). *Journal of Fish Diseases*. 40, 6, 841, Doi. 10.1111/jfd.12536.

www.SID.ir

Archive of SID

Downloaded from isfj.ir at 10:26 +0430 on Sunday May 17th 2020

Elbreki, M., Ross, R.P., Hill, C., Omahony, J., McAuliffe, O. and Coffey, A., 2014. Bacteriophages and their derivatives as biotherapeutic agents in disease prevention and treatment. *Journal of Viruses*, 1–2, Doi. 10.1155/2014/382539

Erez, Z., Steinberger-Levy, I., Shamir, M., Doron, S., Stokar-Avihail, A., Peleg, Y., Melamed, S., Leavitt, A., Savidor, A. and Albeck, S., 2017. Communication between viruses' guides lysis–lysogeny decisions. *Nature Journal*, 541:488–493, Doi: 10.1038/nature21049.

Gary, R., 2014. Bacteriophage remediation of bacterial pathogens in aquaculture: a review of the technology. *Bacteriophage*, 4:4, DOI: 10.4161/21597081.

Golkar, Z., Bagasra, O. and Pace, D.G., 2014. Bacteriophage therapy: A potential solution for the antibiotic resistance crisis. The *Journal of Infection in Developing Countries*, 8:129–136, Doi: 10.3855/jidc.3573.

Haq, I.U., Chaudhry, W.N., Akhtar, M.N., Andleeb, S. and Qadri, I., 2012. Bacteriophages and their implications on future biotechnology: A review. *Virology Journal*, 9:9, Doi: 10.1186/1743-422X-9.

Hoang, H.A. and Ngalep, X.T.T., 2019. Selection of phages to control *Aeromonas hydrophila*, an infectious agent in striped catfish. *Biocontrol Science*, 24(1):23-28, Doi: 10.4265/bio.24.23.

Jun, J.W., Kim, J.H., Shin, S.P., Han, J.E., Chai, J.Y. and Park, S.C., 2018. Protective effects of the *Aeromonas* phages pAh1-C and pAh6-C against mass mortality of the cyprinid loach (*Misgurnus anguillicaudatus*) caused by *Aeromonas hydrophila*. *Aquaculture*, 416: 289–295, Doi: 10.3390/antibiotics7010016.

Kim, J., Son, J., Choi, Y., Choresca, C., Shin, S., Han, J., Jun, J., Kang, D., Oh, C. and Heo, S., 2012. Isolation and characterization of a lytic *Myoviridae* bacteriophage pas-1 with broad infectivity in *Aeromonas salmonicida*. *Current Microbiology*. 64:418–426, Doi: 10.1007/s00284-012-0091-x.

Le, T.S., Nguyen, T.H., Vo. H.P., Doan, V.C., Nguyen, H.L., Tran, M.T., Tran, T.T., Southgate, P.C. and Kurtboke, D.I., 2018. Protective Effects of Bacteriophages against *Aeromonas hydrophila* Species Causing Motile Aeromonas Septicemia (MAS) in Striped Catfish. *Antibiotics*. 25, 7(1). 16, Doi: 10.3390/antibiotics7010016.

Mariem, M.A. and Jamalludeen, N.M., 2015. Isolation and characterization of bacteriophage against methicillin resistant *Staphylococcus aureus. Journal of Medical Microbiology and Diagnosis*, 5: 213, Doi: 10.4172/2161-0703.1000213.

Meaden, S. and Koskella, B., 2013. Exploring the risks of phage application in the environment. *Frontiers in Microbiology*, 4:358, Doi: 10.3389/fmicb.

Moori Bakhtiari, N., Peyghan, R., and Monzavi, S.F., 2017. Determination of isolated *Aeromonas hydrophila* antibiotic resistance profile from farmed common carp (*Cyprinus carpio*) in khuzestan

www.SID.ir

Archive of SID

Downloaded from isfj.ir at 10:26 +0430 on Sunday May 17th 2020

province. *Iranian Scientific Fisheries Journal*, 25, 5, DOI: 10.22092/ISFJ. 110313

Nobrega, F.L., Costa, A.R., Kluskens, L.D. and Azeredo, J., 2015. Revisiting phage therapy: New applications for old resources. *Trends in Microbiology*, 23:185–191, Doi: 10.1016/j.tim.

Oliveira, J., Castilho, F., Cunha, A. and Pereira, M.J., 2012. Bacteriophage therapy as a bacterial control strategy in aquaculture. *Aquaculture International*, 20:879-910, Doi: 10.1007/s10499-012-9515-7.

Panos, G., Kalatzis, I.D., Danie, C., Pantelis, K. and Mathias, M., 2018. Bacteriophage Interactions with Marine Pathogenic Vibrios: Implications for Phage Therapy. *Antibiotics*, 7, 15, Doi: 10.3390/antibiotics7010015.

Panos, G., Roberto, B., Constantina, K. and Pantelis, K., 2016. Isolation and Characterization of Two Lytic Bacteriophages, φSt2 and φGrn1; Phage Therapy Application for Biological Control of Vibrio alginolyticus in Aquaculture Live Feeds. *PLoS ONE*, 11 (3), Doi:10.1371/journal.pone.

Penades, J.R., Chen, J., Quiles-Puchalt, N., Carpena, N. and Novick, R.P., 2015. Bacteriophage mediated spread of bacterial virulence genes. *Current Opinion in Microbiology*, 23:171–178, Doi: 10.1016/j.mib.

Rahmani, R., Zarrini, G., Sheikhzadeh, F. and Aghamohammadzadeh, N., 2015. Effective phages as green antimicrobial agents against antibiotic-resistant hospital *Escherichia coli*. *Jundishapur Journal Microbiology*, 8. Doi: 10.5812/jjm.17744.

Richards, G.P., 2014. Bacteriophage remediation of bacterial pathogens in aquaculture. A review of the technology. Bacteriophage: 4.

Rohit, K., Veena, P., Lalit, S., Lata, S., Neha, S., Dimpal, T., Atul, K., Singh and Prabhati, K. Sahoo. 2016. Pathological Findings of Experimental *Aeromonas hydrophila* Infection in Golden Mahseer (Tor putitora). *Fisheries and Aquaculture Journal*, 7(1): 1-6.

Salmond, G.P. and Fineran, P.C., 2015. A century of the phage: Past, present and future. *Nature Reviews Microbiology*, 13:777–786, Doi: 10.1038/nrmicro3564.

Samal, K.S., Das, K.B. and Pal, B.B., 2014. Isolation, biochemical characterization, antibiotic susceptibility study of *Aeromonas hydrophila* isolated from freshwater fish. *International journal of current microbiology and applied sciences*, 3: 259-267.

Sanmukh, S.G., Meshram, D.B., Paunikar, W.N. and Swaminathan, S., 2012. Interactions of fishes with pathogenic micro-organisms and application of phages for their control: a review. *Reviews in Fish Biology and Fisheries*, 22:567-74, Doi.org/10.1007/s11160-012-9257-7.

Schmelcher, M. and Loessner, M.J., 2014. Application of bacteriophages for detection

www.SID.ir

Archive of SID

of foodborne pathogens. *Bacteriophage*, 4:e28137, Doi: 10.4161/bact.28137.

Seed, K.D., 2015. Battling Phages: How bacteria defend against viral attack. *PLoS Pathogens*; 11, Doi: 10.1371/journal.ppat.

Seyit, A. and Abdolkadir. C., 2004. Systemic infection of *Aeromonas hydrophila* in Rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*): Gross pathology, Bacteriology, Clinical Pathology, Histopathology and Chemotherapy. *Journal of Animal and Veterinary Advances*, 3(12): 810-819.

Tuan, S., Le, T.h., Hien, N., Hong, P., Van, C.D., Hong, L., Nguyen, M., Minh, P., Southgate, C. and Ipek, K.D., 2018. Protective effects of bacteriophages against *Aeromonas hydrophila* causing motile *Aeromonas septicemia* (MAS) in striped catfish. *Antibiotics*, 7, 16, Doi: 10.3390/antibiotics7010016.

Wang, Y., Barton, M., Elliott, L., Li, X., Abraham, S., Odea, M. and Munro, J., 2017. Bacteriophage therapy for the control of *Vibrio harveyi* in greenlip abalone (*Haliotis laevigata*). *Aquaculture*, 473:251–258, Doi: 10.1016/j.aquaculture.

Yazdanpanah-Goharrizi, L., Rokhbakhsh-Zamin, F., Zorriehzahra, J., Kazemipour, N. and Kheirkhah, B., 2020. Effect of using AHϕ3 bacteriophage in the survival rate of Rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) contaminated with *Aeromonas hydrophila* in in vivo condition**.** *Iranian Journal Fisheries Science*, 29, 1.

Zorriehzahra, S.M.E.J., 2008. Aetiology agents of fry mortality syndrome in the rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) in Iran. University Putra Malaysia, Ph.D Thesis, 280P.

Downloaded from isfj.ir at 10:26 +0430 on Sunday May 17th 2020

www.SID.ir

Archive of SID

Effect of using AHϕ3 bacteriophage in the survival rate of Rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) contaminated with *Aeromonas hydrophila* in *in vivo* condition

Yazdanpanah-Goharrizi L.[1]; Rokhbakhsh-Zamin F. [1]; Zorriehzahra M.J.[2*]; Kazemipour N.[1]; Kheirkhah B.[3]

[*]rokhbakhsh@gmail.com

1- Department of Microbiology, Kerman Branch, Islamic Azad University, Kerman, Iran.
2- Iranian Fisheries Science Research Institute (IFSRI), Agricultural Research Education and Extension Organization (AREEO), Tehran, Iran.
3- Department of Veterinary Medicine, Baft Branch, Islamic Azad University, Baft, Iran.

Downloaded from isfj.ir at 10:26 +0430 on Sunday May 17th 2020

Abstract:
Aeromonas hydrophila bacterium causes septicemia in saline and fresh water fishes. One of the most important problems in the field of health management in some fish farming centers is controlling the bacterial septicemia syndrome caused by this bacterium. The purpose of this study was to find a way to control and eliminate the bacteria using bacteriophage to increase the survival rate of rainbow trout, infected with *Aeromonas hydrophila* bacteria. 360 rainbow trout with 15±2 gr weight were selected among 15 groups with 3 replicates during 2018-19. They were contaminated with a concentration of 10^{-4} and 10^{-8} *Aeromonas hydrophila* (prepared from stock containing 1.5×10^{8} CFU / mL, both intraperitoneally and immersed in water. Then they were exposed to 10^{-3} PFU/ mL AHϕ3 bacteriophage isolated from rainbow trout farming pools of Kerman province. Temperature, pH, Oxygen, Salinity was controlled for all treatments. There was a significant difference between the control group and the treatments in both cases (intraperitoneal injection and immersion) ($P \leq 0.05$). The results indicated that the highest effect of bacteriophage on survival rate and reduction of rainbow trout losses was observed when the concentration of 10^{-8} bacteria and 10^{-3} PFU/ mL bacteriophage AHϕ3 were immersed. The data were analyzed using SPSS 21 software and Duncan statistical test. Suitable and applied to increase the survival rate of rainbow trout against disease bacteria is the use of bacteriophages. This study emphasizes the need for further research into the use of phage therapies in the aquatic environment as an antimicrobial strategy that presents various aspects from an environmental and health perspective.

Keywords: *Aeromonas hydrophila*, Survival rate, Bacteriophage, Rainbow trout, *In vivo*

[*]Corresponding author

www.SID.ir