دانشگاه شهید چمران اهواز

اهواز چمران شهید دانشگاه

دانشکده دامپزشکی

925859
6

PhD دکتری نامه‌پایان

:عنوان

ارزیابی توان پروبیوتیکی و تحریک کنندگی ایمنی برخی لاکتوباسیلوس‌های جدا شده از *Barbus grypus*روده ماهی شیربت

:راهنما اساتید

دکتر مجتبی علیشاه‌ی

دکتر مسعود قربانپور

:مشاور اساتید

دکتر محمدرضا تابنده

دکتر داریوش غریبی

:نگارش

تکاور محمدیان

دی‌ماه ۹۲

بسمه تعالی

دانشگاه شهید چمران اهواز

دانشکده دامپزشکی

(نتیجه ارزشیابی پایان نامه‌ی دکتری PhD)

پایان‌نامه‌ی آقای **تکاور محمدیان** دانشجوی ر شته: **بهداشت آبزیان دامپزشکی** از دانشکده دامپزشکی به شماره دانشجویی : **۸۹۵۸۹۰۲** تحت عنوان: **ارزیابی توان پروبیوتیکی و تحریک کنندگی ایمنی برخی لاکتوباسیلوس های جدا شده از روده ماهی شیربت *Barbus grypus*** جهت اخذ مدرک **دکتری PhD دامپزشکی** در تاریخ: **۱۳۹۲/۱۰/۲۲** توسط هیأت محترم داوران مورد ارزشیابی قرار گرفت و بدرجه: **عالی** به تصویب رسید

۱	**اعضای هیأت داوران**	**مرتبه علمی**	**سمت**	**امضا**
	دکتر مجتبی علیشاهی	دانشیار	استاد راهنمای اول	
	دکتر مسعود قربانپور	استاد	استاد راهنمای دوم	
	دکتر محمدرضا تابنده	استادیار	استاد مشاور	
	دکتر داریوش غریبی	استادیار	استاد مشاور	
	دکتر رحیم پیغان	استاد	استاد داور	
	دکتر شهریاری	دانشیار	استاد داور	
	دکتر ذوالقرنین	دانشیار	استاد داور	
	دکتر خسروی	استاد	استاد داور	
	دکتر مهرزاد مصباح	دانشیار	استاد ناظر	
	دکتر مهرزاد مصباح	دانشیار	مدیر گروه	
	دکتر بابک محمدیان	دانشیار	معاون پژوهشی دانشکده	
	دکتر مسعود قربانپور	استاد	مدیر تحصیلات تکمیلی دانشگاه	

گواهی صحت و اصالت

عنوان پایان‌نامه: **ارزیابی توان پروبیوتیکی و تحریک کنندگی ایمنی برخی لاکتوباسیلوس‌های جدا شده از روده ماهی شیربت *Barbus grypus***

پایان‌نامه‌ی آقای **تکاور محمدیان** دانشجوی رشته **بهداشت آبزیان دامپزشکی** از دانشکده دامپزشکی به شماره دانشجویی **۸۹۵۸۹۰۲** تحت راهنمایی **دکتر مجتبی علیشاهی و دکتر مسعود قربانپور** و مشاوره **دکتر محمدرضا تابنده، دکتر داریوش غریبی** گواهی می‌دهم که:

۱- تحقیقات ارائه شده در این پایان‌نامه حاصل مطالعات علمی و عملی شخص اینجانب بوده و صحت و اصالت تمام مطالب مندرج در آن را تایید می‌کنم.

۲- در صورت استفاده از آثار دیگران، مشخصات کامل آن‌ها را در منابع ذکر نموده‌ام.

۳- تاکنون مطالب درج شده در این پایان نامه، توسط اینجانب یا شخص دیگری بـه منظور اخذ هر نوع مدرک یا امتیازی به هیچ مرجعی تسلیم نشده و بعد از این نیز نخواهد شد.

٤- در تدوین متن پایان نامه، شیوه‌نامه مصوب دانشکده را رعایت نموده‌ام.

۵- کلیه حقوق معنوی این اثر به دانشگاه شهید چمران تعلق داشته و مقالات مستخرج از آن، ذیل نام دانشگاه شهید چمران اهواز (Shahid Chamran University of Ahvaz) به چاپ خواهد رسید.

٦- حقوق معنوی تمامی افرادی که در این پایان نامه تاثیرگذار بوده‌اند (اساتید راهنما و مشاور) در مقالات مستخرج از آن رعایت خواهد شد.

۷- در صورت استفاده از موجودات زنده یا بافت های آن‌ها، کلیه ضوابط و اصول اخلاقی مندرج در منشور موازین و اصول اخلاق پژوهش وزارت علوم، تحقیقات و فناوری رعایت شده است.

در صورت اثبات تخلف از مندرجات فوق، مسئولیت هر گونه پاسخگویی به اشخاص حقیقی و حقوقی و مراجع ذیصلاح بر عهده اینجانب بوده و دانشگاه شهید چمران هیچ مسئولیتی بر عهده نخواهد داشت. همچنین در صورت تضییع حقوق و منافع دانشگاه، حق پیگیری موضوع در مراجع ذیصلاح و اعمال قوانین مربوطه برای دانشگاه شهید چمران در حال و آینده محفوظ بوده و اینجانب مسئول پرداخت کلیه خسارات وارده خواهم بود.

تاریخ ۱۳۹۲/۱۰/۲۲

تکاور محمدیان

سپاس خدای را

تقدیم به

زیباترین واژه‌های هستی من، پدرو مادرعزیزم

که هر چه دارم از آن‌هاست

خانواده مهربان همسرم

که وجود عزیزشان همواره برایم منشا شوق است

تقدیم به

همسر و دخترم (رستا خانم) که پناه خستگی و امیدم بودند.

تقدیم به خواهر و برادران عزیزم

که صدای گرم‌شان مایه آرامش من است

با سپاس از:

اساتید گرامیم جناب آقای دکتر علیشاهی و دکتر قربانپور ، چرا که بدون راهنمایی های ایشان انجام این پایان‌نامه برایم بسیار مشکل می‌نمود

جناب آقای دکتر تابنده و جناب آقای دکتر غریبی به دلیل یاری‌ها و راهنمایی‌هایشان سپاسگذارم که بسیاری از سختی‌ها را برایم آسان‌تر نمود

سپاس فراوان از:

جناب آقای دکتر پیغان، سرکار خانم دکتر خسروی، جناب آقای دکتر شهریاری و جناب آقای دکتر ذوالقرنین به خاطر قبول داوری این پایان‌نامه

تشکر می کنم از:

جناب آقای دکتر مصباح که نظارت بر حسن اجرای این پایان‌نامه را بر عهده گرفتند.

سپاس فراوان از:

جناب آقای دکتر پیغان، جناب آقای دکتر مصباح و جناب آقای دکتر علیشاهی به خاطر زحمات وتلاش‌هایی که در سه سال و نیم تحصیل برای اینجانب کشیدند و بسیار از این بزرگواران، آموختم.

عنوان	فهرست	صفحه

چکیده ۱

فصل اول: مقدمه و هدف ٤

فصل دوم: مروری بر منابع ۸

الف- آشنایی با ماهی شیربت ۸

الف-۱- طبقه‌بندی ماهی شیربت ۸

الف-۲- گونه ماهی شیربت ۱۰

الف-۳- بیولوژی ماهی شیربت ۱۲

الف-٤- پراکندگی جغرافیایی ماهی شیربت ۱۳

ب- مروری بر سیستم ایمنی ماهیان استخوانی ۱۳

ب-۲- مکانیسم های دفاع غیر اختصاصی (ایمنی ذاتی) ١٤

ب-۳- فاکتورهای هومورال دفاع غیر اختصاصی ١٦

ب-۳-۱- تریپسین و لیزوزیم ۱۷

ب-۳-۲- سیستم کمپلمان ۱۷

ب-۳-۳-سیتوکین‌ها ۱۹

ب-۳-۳-۱-سایتوکین‌ها و فعالیت‌های شناخته شده‌ی آن‌ها در ماهی ۲۰

ب-۳-۳-۲- فاکتور نکروز تومور آلفا ۲۱

ب-۳-۳-۳- اینترلوکین‌ها ۲۲

عنوان | فهرست | صفحه

ج- مکانیسم‌های دفاع سلولی غیر اختصاصی ۲۳

د- محرک‌های سیستم ایمنی..... ۲۵

د-۱- روش‌های ارزیابی محرک‌های ایمنی ۲۶

د-۲- خطرات استفاده از محرک‌های ایمنی در پرورش آبزیان ۲۶

د-۲-۱- پاسخ‌های سیستم ایمنی متعاقب تحریک ایمنی ۲۷

س- پروبیوتیک‌ها و انواع آن..... ۲۸

س-۱- میکروارگانیسم‌های دستگاه گوارش ۲۸

س-۱-۱- تعریف پروبیوتیک‌ها..... ۲۹

س-۱-۲- مکانیسم عمل پروبیوتیک‌ها..... ۳۱

س-۱-۲-۱- رقابت اختصاصی..... ۳۲

س-۱-۲-۲- کمک به هضم مواد غذایی..... ۳۲

س-۱-۲-۳- تأثیر بر کیفیت آب..... ۳۳

س-۱-۲-٤- تقویت های پاسخ های ایمنی ۳۳

س-۱-۲-۵- اثرات ضدویروسی..... ۳٤

س-۱-۳- مکانیسم مولکولی تأثیر پروبیوتیک‌ها روی سیستم ایمنی ۳٤

س-۲- خصوصیات لاکتوباسیلوس ها..... ۳۵

ش-۱- عملکرد دستگاه گوارش..... ۳۷

عنوان فهرست صفحه

ش-۱-۱- فرایند هضم توسط آنزیم‌های گوارشی..... ۳۷

ش-۲- تریپسین..... ۳۸

ش-۳- کیموترپسین..... ۳۹

ش-٤- آلفا-آمیلاز..... ۳۹

ش-٥- لیپاز..... ٤۰

ش-٦- آلکالین فسفاتاز..... ٤۰

و- روش‌های ارزیابی بیان ژن..... ٤۱

و-۱- روش RT-PCR..... ٤۲

و-۲- روش PCR در زمان حقیقی..... ٤۲

و-۲-۱- اصول PCR در زمان حقیقی..... ٤۳

و-۲-۲- روش‌های مختلف آزمون PCR در زمان حقیقی..... ٤٦

و-۲-۲-۱- روش مبتنی بر کاربرد رنگ‌های فلئورسنت آزاد..... ٤٦

و-۲-۲-۲- روش‌های مبتنی بر پروب..... ٤۷

و-۲-۲-۲-۱- پروب‌های هیدرولیز شونده یا TaqMan..... ٤۸

و-۲-۲-۲-۲- پروب‌های هیبریدشونده..... ٤۸

و-۲-۳- اصول کاربرد PCR در زمان حقیقی در ارزیابی‌های کمی..... ٤۸

عنوان فهرست صفحه

و-۵-۳-۱- روش عمومی برای محاسبه‌ی نسبت سنجش نسبی بیان ژن..... ۵۰

فصل سوم: مواد و روش کار..... ۵۲

الف- وسایل و مواد..... ۵۲

الف-۱- وسایل مورد استفاده..... ۵۲

الف-۲- مواد مورد استفاده..... ۵۳

ب- روش کار و اجرای آزمایش..... ۵٤

ب-۱- تهیه ماهی..... ۵٤

ب-۲- جداسازی و خالص‌سازی لاکتوباسیل‌ها..... ۵۵

ب-۳- تشخیص جنس لاکتوباسیل..... ۵۵

ب-٤- بررسی توان پروبیوتیکی..... ۵٦

ب-٤-۱- تحمل نسبت به pH..... ۵٦

ب-٤-۲- تحمل نسبت به صفرا..... ۵٦

ب-٤-۳-ارزیابی فعالیت آنتاگونیستی..... ۵۷

ب-٤-٤- عدم بیماری زایی برای ماهی..... ۵۷

ب-٤-۵- تعیین هویت مولکولی لاکتوباسیل‌های با توان پروبیوتیکی بالا ۵۸

عنوان فهرست صفحه

ج- بررسی‌های کارایی پروبیوتیک‌های جدا شده ۵۹

ج-۱- آماده‌سازی سوسپانسیون باکتری‌های انتخاب شده..... ٦۰

ج-۲- اندازه‌گیری شاخص‌های رشد..... ٦۰

ج-۳- ارزیابی تأثیر پروبیوتیک ها بر سیستم ایمنی ٦۲

.....

ج-۳-۱- روش اندازه گیری میزان فعالیت کمپلمان سرم ٦۲

ج-۳-۲- اندازه‌گیری لایزوزیم سرم..... ٦۳

ج-۳-۳- اندازه گیری پروتئین کل و گلوبولین سرم..... ٦٤

ج-۳-۳-۱- غلظت ایمنوگلوبولین کل ٦٤

ج-۳-٤- بررسی قدرت باکتری کشی سرم..... ٦٤

ج-۳-٤- **اندازه‌گیری احیاء** NBT..... ٦٦

د- ارزیابی تأثیر پروبیوتیک‌ها بر فلور باکتریایی و آنزیم‌های گوارشی ٦٦

د-۱- تعیین فعالیت آنزیم‌های پانکراسی..... ٦۷

د-۳- استخراج آنزیم روده‌ای..... ٦۸

د-٤- سنجش غلظت پروتئین محلول ٦۸

د-٤-۱- سنجش فعالیت آنزیم تریپسین..... ٦۸

عنوان فهرست صفحه

د-٤-٢- سنجش فعالیت آنزیم کیموتریپسین ٦٨

د-٤-٣- سنجش فعالیت آنزیم آلفا- آمیلاز ٧٠

د-٤-٤- سنجش فعالیت آنزیم لیپاز ٧١

د-٤-٥- سنجش فعالیت فسفاتاز قلیایی ٧٢

ع- فلور باکتریایی روده ٧٣

غ- چالش باکتریایی ٧٦

.....

غ-١- اندازه‌گیری $LD_{٥٠}$ ٧٦

غ-٢- چالش ٧٧

ف- بررسی بیان ژن‌های مرتیط با پاسخ ایمنی ٧٧

ف-١- استخراج RNA ٧٧

ف-٢- اسپکتروفوتومتری و تعیین غلظت نمونه‌های RNA ٨٠

ف-٣- واکنش سنتز cDNA (RT) ٨٠

ف-٤- واکنش زنجیره‌ای پلیمراز (PCR) ٨١

ف-٥- تهیه‌ی ژل و ارزیابی محصول PCR ٨٢

عنوان | فهرست | صفحه

ف-۵-۱- روش تهیه‌ی محلول TAE ۸۲

ف-۵-۲- ساخت رنگ بارگذاری ۸۲

ف-۵-۳- بارگذاری نمونه‌ها ۸۳

ف-٦- واکنش PCR در زمان حقیقی ۸۳

ف-٦-۱- روش انجام PCR در زمان حقیقی ۸۳

ف-۷- ارزیابی مقایسه کارایی تکثیر ژن کنترل داخلی و ژن‌های هدف ۸٤

ف-۸- بررسی مقایسه‌ای بیان ژن‌ها ۸۵

ف-۹- نرم افزارها ۸۵

ل- آنالیز آماری داده‌ها ۸۵

فصل چهارم: نتایج ۸۷

الف- جداسازی و خالص‌سازی لاکتوباسیل‌ها ۸۷

الف-۱- تحمل نسبت به pH ۸۸

الف-۲- تحمل نسبت به صفرا ۹۰

الف-۳- ارزیابی فعالیت آنتاگونیستی ۹۱

الف-٤- عدم بیماری‌زایی برای ماهی ۹۱

الف-۵- تعیین هویت جدایه‌های واجد توان پروبیوتیکی ۹۱

عنوان فهرست صفحه

ب- نتایج مربوط به ارزیابی رشد و بازماندگی در تیمارها ۹۲

ب-۱- افزایش رشد نسبی ۹۲

ب-۳- ضریب تبدیل غذایی ۹۳

ب-٤- فاکتور وضعیت ۹۳

ب-۵- بازدهی پروتئین ۹۳

ب-٦- نسبت بازده غذایی ۹۵

پ- یافته‌های میکروب شناسی در دوره‌ی آداپتاسیون ۹٦

ج- یافته‌های ایمنی‌شناسی ۹٦

ج-۱- فعالیت کمپلمان ۹٦

ج-۲- فعالیت لیزوزیم ۹۷

ج-۳- میزان پروتئین تام پلاسما ۹۸

ج-٤- میزان گلوبولین پلاسما ۹۹

ج-۵- قدرت باکتری‌کشی سرم ۱۰۰

ج-٦- انفجار تنفسی (NBT) ۱۰۱

چ- آزمایشات باکتریایی روده ۱۰۲

د- آزمایشات ارزیابی آنزیم‌های گوارشی ۱۰٤

عنوان فهرست صفحه

د-۱- بررسی فعالیت آنزیم آلفا-آمیلاز ۱۰٤

د-۲- بررسی فعالیت آنزیم تریپسین ۱۰٤

د-۳- بررسی فعالیت آنزیم کیموتریپسین ۱۰۵

د-٤- بررسی فعالیت آنزیم آلکالین فسفاتاز ۱۰٦

د-۵- بررسی فعالیت آنزیم لیپاز ۱۰٦

ر- تعیین کارایی تکثیر ژن‌های هدف و کنترل ۱۰۸

ز- نتایج مربوط به بررسی محصولات PCR بر روی ژل الکتروفورز ۱۱۱

ل- نتایج حاصل از بررسی بیان ژن IL-۱β نسبت به ژن کنترل (بتا-اکتین) ۱۱٤

ل-۱- بررسی و مقایسه‌ی تغییرات بیان ژن IL-۱β در تیمارهای مختلف ۱۱٤

ل-۱-۱- پیش از چالش ۱۱۵

ل-۱-۲- ٦ ساعت پس از چالش ۱۱۵

ل-۱-۳- ۱۲ ساعت پس از چالش ۱۱۵

ل-۱-٤- ۲٤ ساعت پس از چالش ۱۱۵

ل-۱-۵- ٤۸ ساعت پس از چالش ۱۱٦

ل-۱-٦- ۷ روز پس از چالش ۱۱٦

ک- نتایج حاصل از بررسی بیان ژن TNF-α نسبت به ژن کنترل (بتا-اکتین) ۱۱۷

ک-۱- بررسی و مقایسه‌ی میزان بیان ژن میان تیمارهای مورد آزمایش ۱۱۷

عنوان فهرست صفحه

ک-۱-۱- پیش از چالش ۱۱۷

ک-۱-۲- ٦ ساعت پس از چالش ۱۱۸

ک-۱-۳- ۱۲ ساعت پس از چالش ۱۱۸

ک-۱-٤- ۲٤ ساعت پس از چالش ۱۱۸

ک-۱-٥- ٤۸ ساعت پس از چالش ۱۱۹

ک-۱-٦- ۷ روز پس از چالش ۱۱۹

م- نتایج حاصل از بررسی بیان ژن IL-۸ نسبت به ژن کنترل (بتا-اکتین) ۱۲۰

م-۱- بررسی و مقایسه‌ی تغییرات بیان ژن اینترلوکین-۸ در تیمارهای مختلف ۱۲۰

م-۱-۱- پیش از چالش مختلف نمونه‌گیری ۱۲۱

م-۱-۲- ٦ ساعت پس از چالش ۱۲۱

م-۱-۳- ۱۲ ساعت پس از چالش ۱۲۱

م-۱-٤- ۲٤ ساعت پس از چالش ۱۲۱

م-۱-٥- ٤۸ ساعت پس از چالش ۱۲۲

م-۱-٦- ۷ روز پس از چالش ۱۲۲

ج- نتایج چالش باکتریایی ۱۲۳

عنوان فهرست صفحه

فصل پنجم: بحث و نتیجه‌گیری ۱۲٤

پیشنهادها ۱۵۵

فهرست منابع ۱۵۷

ضمائم ۱۷۸

چکیده ۱۸٤

انگلیسی ....

جدول	فهرست جداول	صفحه

٤-١:تعداد و نسبت‌های باکتری‌های اسید لاکتیک جدا شده ٨٨

٤-٢: تحمل جدایه‌های لاکتوباسیلی (CFU/ml) در غلظت‌های متفاوت pH..... ٨٩

٤-٣: تحمل جدایه‌های لاکتوباسیلی (CFU/ml) در غلظت‌های متفاوت صفرا..... ٩٠

٤-٤: فعالیت ضد میکروبی جدایه‌های لاکتوباسیلی..... ٩١

٤-٥- مقایسه شاخص‌های رشد بین تیمارهای مورد بررسی..... ٩٤

٤-٦: جدول مقایسه Means ±SD پروتئین تام و گلوبولین در ماهی شیربت..... ٩٩

٤-٧: مقایسه Means ±SD تعداد کل باکتری‌ها و باکتری‌های اسید لاکتیک در بافت روده... ١٠٣

٤-٨- مقایسه آنزیم‌های گوارشی بین تیمارهای مورد بررسی در مراحل مختلف نمونه‌گیری ١٠٦

٤-٩: مقایسه Means ±SD بیان ژن IL-١β در بافت کلیه قدامی..... ١١٦

٤-١٠: مقایسه Means ±SD بیان ژن TNF-α در بافت کلیه قدامی ١٢٠

٤-١١: مقایسه Means ±SD بیان ژن IL-٨ در بافت کلیه قدامی ١٢٣

٤-١٢: تلفات ماهی‌های تیمار شده با پروبیوتیک‌های مختلف بعد از چالش با باکتری *آئروموناس هیدروفیلا*..... ١٢٤

نمودار	فهرست نمودارها	صفحه

۲-۱: الگوی کلی تکثیر ژن‌ها در روش PCR در زمان حقیقی..... ٤٥

۲-۲: واکنش RT-PCR زمان حقیقی از ۳ نمونه‌ی نامشخص..... ٥٠

٤-۱: نسبت بازده غذایی در تیمارهای مختلف در روزهای ۳۰ و ٦٠ آزمایش..... ٩٥

٤-۲: مقایسه میانگین (Means ±SD) میزان فعالیت کمپلمان سرم در تیمارهای مختلف..... ٩٧

٤-۳: مقایسه میانگین (Means ±SD) لایزوزیم سرم..... ٩٨

٤-٤: مقایسه میانگین (Means ±SD) میزان باکتری‌کشی سرم در تیمارهای مختلف..... ١٠٠

٤-٥: **مقایسه میانگین** (Means ±SD) میزان NBT سرم در تیمارهای مختلف..... ١٠٢

٤-٦: تغییرات مقادیر Ct در برابر رقت‌های مختلف cDNA ژن IL-۱β..... ١٠٩

٤-۷: تغییرات مقادیر Ct در برابر رقت‌های مختلف cDNA ژن TNF-α ١١٠

٤-۸: تغییرات مقادیر Ct در برابر رقت‌های مختلف cDNA ژن IL-۸ ..... ١١٠

٤-۹: تغییرات مقادیر Ct در برابر رقت‌های مختلف cDNA ژن بتااکتین..... ١١١

٤-۱۰: مقایسه‌ی بیان ژن IL-۱β در بافت کلیه قدامی تیمارهای مختلف ١١٤

٤-۱۱: مقایسه‌ی بیان ژن TNF-α در بافت کلیه قدامی تیمارهای مختلف ١١٧

٤-۱۲: مقایسه‌ی بیان ژن IL-۸ در بافت کلیه قدامی ١٢١

تصویر	فهرست تصاویر	صفحه

۲-۱: ماهی شیربت صید شده از رودخانه کرخه..... ۱۲

۲-۲: PCR در زمان حقیقی با روش SYBR Green..... ٤٧

۳-۱: اضافه نمودن سرم خون به باکتری میکروکوکوس ٦٤

۳-۲: مراحل اندازه‌گیری قدرت باکتری‌کشی سرم ٦٧

۳-۳: جار بی‌هوازی و مراحل کشت فلور باکتریایی ۷۵

۳-٤: محیط کشت MRS آگار و کلنی‌های لاکتوباسیلوس ۷٦

۳-۵: باکتری‌های لاکتوباسیلوس در زیر میکروسکوپ نوری با درشت نمایی۱۰۰برابر ۷٦

٤-۱: الکتروفورز محصولات PCR ژن IL-۱β در ۵ دما و سه غلظت متفاوت $MgCl_2$..... ۱۱۲

٤-۲: الکتروفورز محصولات PCR ژن IL-۸ در ۵ دما و سه غلظت متفاوت $MgCl_2$ ۱۱۲

٤-۳: الکتروفورز محصولات PCR ژن TNF-α در ۵ دما و سه غلظت متفاوت $MgCl_2$ ۱۱۳

٤-٤: الکتروفورز محصولات PCR ژن β-actin در ۵ دما و سه غلظت متفاوت $MgCl_2$. ... ۱۱۳