ارزیابی تجویز جیره‌ای تاثیرلاکتوباسیلوس بر برخی فاکتورهای خونی ، ایمنی و بازماندگی قزل آلای رنگین کمان(*Oncorhynchus mykiss*) در مواجهه با باکتری استرپتوکوکوس اینیایی (*Streptococcus iniae*

رضا صفری[۱]، زهرا یعقوب زاده*[۲]

۱و۲ - پژوهشکده اکولوژی دریای خزر، موسسه تحقیقات علوم شیلاتی کشور، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی

*۲ نویسنده مسئول: تلفن : ۳۳۴۶۲۴۹۹- ۰۱۱ ، E-mail: za_yaghoub@yahoo.com

Journal of Aquatic Caspian Sea (J.A.C.S)

چکیده

در این مطالعه اثر لاکتوباسیوس جدا شده از دستگاه گوارش ماهی قزل آلا بر برخی از شاخصهای خونی ، سرمی و بازماندگی مورد بررسی قرار گرفت. تیمارهای مورد استفاده شامل سه لوگ۷ ۱۰ ،۸ ۱۰ و۹ ۱۰ از لاکتوباسیلوس و تیمار شاهد بوده و برخی از شاخص های خونی و سرمی در روزهای ۳۰ و ۶۰ ازمایش مورد بررسی قرار گرفتند. در انتهای دوره نیز رویارویی تیمارهای مورد بررسی با باکتری استرپتوکوکوس اینیه ای انجام گرفته و میزان بازماندگی مشخص گردید. نتایج نشان داد که مقادیر برخی از فاکتورها نظیر MCH و MCHC افزایش نسبی داشته ولی با این وجود اختلاف معنی داری مشاهده نشد. مقایر نوتروفیل و رادیکال آزاد اکسیژن بطور معنی داری در تیمارهای حاوی لاکتوباسیلوس خصوصا لوگ ۸ افزایش داشته که با تیمار شاهد نیز اختلاف معنی دار داشته است. لوگ ۸ لاکتوباسیلوس قادر به افزایش معنی دار IgM و کمپلمان C3 بوده و با سایر تیمارها و شاهد نیز دارای اختلاف معنی دار داشته است. نتایج رویارویی ماهیان مورد بررسی در برابر باکتری استرپتوکوکوس اینیه ای نشان داد که بیشترین بازماندگی در تیمارهای دارای لوگ ۸ (۹۶/۶۶) بوده و لوگ های ۹ و ۷ در مرحله بعد قرار داشته و تیمار شاهد نیز دارای کمترین بازماندگی (۲۵/۳۸ درصد) بوده است. نتایج این بررسی نشان داد که اگرلاکتوباسیلوس جدا شده از ماهی قزل آلا در لوگ مناسب مورد استفاده قرار گیرد قادر به بهبود پارامترهای خونی و سرمی شده و مقاومت آن را در برابر استرپتوکوکوس اینیه افزایش می دهد.

کلمات کلیدی: لاکتوباسیلوس ، قزل آلا، سیستم ایمنی، استرپتوکوکوس اینیه

مقدمه

به منظور مبارزه با مشکلات موجود در آبزی پروری از جمله جلوگیری از تغییرات کیفیت آب، کنترل بیماری‌ها و افزایش فعالیت آنزیم های موجود در ماهی و میگو، استفاده از پروبیوتیک‌ها به عنوان راه حل کارآمدتری در مقایسه با سایر راهکارها انتخاب شده است (فاضلی، ۱۳۸۴). میکرو فلور دستگاه گوارش موجودات آبزی شامل تعداد زیادی از میکروارگانیسم های مختلف می باشد، حضور این جمعیت به دلایلی نظیر کمک به هضم مواد غذایی ، کمک به ساخت و جذب ویتامین‌ها، تحریک سیستم ایمنی و تجزیه سلولز و سایر پلی ساکارید ها قابل توجه است(Mesalhy Aly, et al, 2008, Verschuere, et al, 2000). این فلور میکروبی به علت خونسرد بودن و تبعیت دمای بدن از دمای آب محیط اطراف، دائماً در حال تغییر می باشد (Fuller, 1999). تغییرات دما و شوری نیز باعث تغییر فلور میکروبی موجود در دستگاه گوارش آبزیان می گردند. در کنار شرایط زیست محیطی، نوع غذای دریافتی توسط آبزیان نیز قادر به تغییر فلور میکروبی دستگاه گوارش آنها می‌شود (Gatsupe, 1999). باکتری‌های تولیدکننده اسید لاکتیک جزء باکتری‌های گرم مثبت، غیر متحرک و بدون اسپور هستند. تولید اسید لاکتیک در آنها محصول نهایی حاصل از تخمیر می‌باشد (Ringo and Gatesoupe, 1998).

در بین گروه‌های مختلف ماهیان، مطالعه بر روی ایمونولوژی ماهیان استخوانی به دلیل اهمیت اقتصادی و منبع غذایی بودن آنها از اهمیت بالایی برخوردار می‌باشد (Scapigliati, 2002. هدف از این مطالعه بررسی تاثیر باکتری لاکتیک بر پارامترهای خونی و ایمنی و همچنین مقاومت ماهی در برابر استرپتوکوکوس اینیایی می باشد.

مواد و روش ها

باکتری مورد استفاده: باکتری مورد استفاده در این مطالعه از دستگاه گوارش ماهی قزل آلا جدا شده که پس از جداسازی، خالص سازی و انجام آزمایشات اولیه و اختصاصی ، لاکتوباسیلوس تشخیص داده شده و خواص پروبیوتیکی آن نیز با تزریق به ماهی سالم (مشاهده عدم ضایعات بالینی در نمونه های مورد آزمایش) و در نهایت خواص ضد باکتریایی آن در شرایط آزمایشگاهی (دارای تاثیر مهار کننده بر برخی باکتریهای بیماریزا رایج در آبزی پروری) مورد تائید قرار گرفت.

اضافه کردن نمونه های لاکتوباسیلوس به جیره: باکتری جدا شده در قالب تیمارهای مختلف (هر کدام ۲ تکرار) در لوگ‌های ۷ ، ۸ و ۹ به غذای کنسانتره ماهی قزل آلا (غذای اکسترود GFT شرکت به دانه شمال) افزوده شده و یک نمونه نیز بعنوان شاهد در نظر گرفته شد. با توجه به اینکه نمونه باکتری بصورت سوسپانسیون تهیه شده بود نیازی به اضافه کردن روغن جهت مخلوط کردن غذا با نمونه پروبیوتیک نبود. وزن ماهیان موردآزمایش ۳۰ تا ۳۵ گرم بوده و تعداد آنها در هر ونیرو ۲۰ قطعه و در مجموع ۲۴۰ قطعه ماهی در ۱۲ ونیرو مورد بررسی قرار گرفتند. طول دوره آزمایش۶۰ روز بوده و نمونه برداری جهت اندازه گیری پارامترهای

Journal of Aquatic Caspian Sea (J.A.C.S)

هماتولوژی (هماتوکریت، هموگلوبین، تعداد گلبولهای قرمز، متوسط حجم گلبول قرمز(MCV)، متوسط هموگلوبین گلبول قرمز(MCH) ، میزان غلظت متوسط هموگلوبین سلولی MCHC، درصد لمفوسیت، نوتروفیل، مونوسیت، رادیکال آزاد و سرمی شامل توتال پروتئین ، آلبومین ، C3 ,C4 و IgM در هر ۳۰ روز انجام گرفت(Johnson,et al, 1999, Labor, 1999, Whicher, 1996). فاکتورهای مورد بررسی: برای اندازه گیری IgM و اجزاء کمپلمان از دستگاه اتوآنالیز (مدلEurolyser اتریش)، برای اندازه گیری پروتئین تام سرم و آلبومین از کیت تجاری (کیت تجاری شرکت پارس آزمون، ایران)، هموگلوبین با استفاده از روش سیانومت هموگلوبین هموگلوبین یا سیانید هموگلوبین ، برای تعیین درصد هماتوکریت از روش میکروهماتوکریت استفاده گردید (Mathews, 1990, Shahsavani, 2010, Whicher, 1996).

رویارویی : پس از تهیه استوک فریز درایر شده استرپتوکوکوس اینیه ای از پژوهشکده اکولوژی دریای خزر، ابتدا سوسپانسیونی از باکتری در محیط کشت MRS برات تهیه شده و پس از ۱۸ ساعت انکوباسیون در دمای ۳۰ درجه و رساندن باکتری به رشد لگاریتمی، عمل سانتریفوژ در دور ۵۰۰۰ دور در دقیقه برای مدت ۵ دقیقه و متعاقب آن شستشو با سرم فیزیولوژی (۳ مرتبه) انجام شده و در مرحله آخر، به رسوب حاصله مقداری سرم فیزیولوژی اضافه شده و با لوله ۳ مک فارلند مورد مقایسه قرار گرفت(Rodas, et al, 2002). پس از تزریق ۰/۱ میلی لیتر از سوسپانسیون رقیق شده بصورت داخل صفاقی ،ماهیان مورد (تعداد ماهی در وان ۱۰ عدد بوده که برای هر وان ۳ تکرار در نظر گرفته شد) آزمایش به مدت ۱۴ روز مورد بررسی قرار گرفتند. غلظت باکتری جهت تزریق به ماهیان، لوگ ۶ در نظر گرفته شد.پس از بروز علائم بیماری بین ۱۰-۷ روز، از ارگان‌های مختلف نظیر کبد، کلیه و قلب نمونه گیری شده و کشت در محیط آگار خوندار انجام و پس از انکوباسیون در دمای ۳۵ درجه به مدت ۴۸ ساعت، وجود یا عدم وجود کلنی استرپتوکوکوس اینیایی مورد ارزیابی قرار گرفت. برای تعیین میزان بازماندگی ماهیان در مواجهه با باکتری بیماریزای استرپتوکوک از فرمول زیر استفاده گردید:

بازماندگی = تعداد ماهیان باقیمانده / تعداد کل ماهیان اولیه × ۱۰۰

تجزیه و تحلیل آماری

برای تجزیه و تحلیل داده ها ابتدا از آزمون شاپیرو ویک Shapirowilk به منظور آزمون نرمال بودن داده ها استفاده شده و در صورت نرمال بودن داده ها، از آزمون آنالیز واریانس یکطرفه Anova جهت ارتباط معنی داری ما بین داده های هر گروه و از آزمون Duncan جهت تائید نهایی تست آنالیز واریانس یک طرفه استفاده گردید. وجود یا عدم وجود اختلاف معنی دار با ضریب اطمینان ۹۵ و ۹۹ درصد و ارزش P در محدوده ۰/۰۵ و ۰/۰۱ تعیین گردید.

نتایج و بحث

Journal of Aquatic Caspian Sea (J.A.C.S)

نتایج فاکتور خونی: نتایج آنالیز پارامترهای هماتولوژی(میزان هماتوکریت ، هموگلوبین، تعداد گلبول های قرمز، متوسط حجم گلبول های قرمز(MCV) ، متوسط هموگلوبین گلبول های قرمز(MCH) و متوسط غلظت هموگلوبین سلولی (MCHC)) مربوط به گلبول قرمز برای تیمار حاوی لوگ ۸ لاکتوباسیلوس، تغییرات در ماه اول در جدول ۱ نشان داده شده است. این نتایج نشان دهنده آن است که برخی از پارامترها افزایش نسبی داشته و پارامترهای دیگر مثل MCH و MCHC نیز کاهش داشته اند ولی با این وجود اختلاف مشاهده شده معنی دار نبوده است (P>۰/۰۵). نتایج برای تیمار حاوی لوگ ۷ لاکتوباسیلوس، نشان دهنده آن است که تمامی پارامترها دارای روند صعودی بوده ولی با این وجود اختلاف موجود معنی دار نبوده است (P>۰/۰۵).

و برای تیمار حاوی لوگ ۹ لاکتوباسیلوس، تغییرات در ماه اول نشان دهنده آن است که تمامی پارامترها بجز میزان گلبول قرمز دارای روند صعودی بوده و اختلاف ما بین MCV ، MCH و MCHC در ماه‌های اول و دوم معنی دار بوده است (P<۰/۰۵). این روند برای تیمار شاهد هم در جدول ۱ نشان داده شده است که نشان دهنده آن است که تمامی پارامترها بطور جزءیی افزایش داشته ولی اختلاف معنی داری مابین داده های مورد بررسی در ماه‌های اول و دوم وجود نداشته است (P>۰/۰۵).

جدول ۱ :میانگین و انحراف معیار پارامترهای مربوط به پارامترهای خونی (گلبول های قرمز) در تیمارهای مختلف ماهی قزل آلا در زمانهای ۳۰ و ۶۰ روز

تیمار		لوگ ۸ لاکتیک	لوگ ۷ لاکتیک	لوگ ۹ لاکتیک	شاهد
هماتوکریت	۳۰ روز	۳۰/۳±۲/۱۶	۳۰/۵±۴/۳۲	۳۳/۳±۲/۹۴	۳۰/۷±۲/۳۴
(gdl^{-1})	۶۰ روز	۳۵±۲/۶۴	۳۲/۶۷±۵/۱۳	۳۴/۶۷±۳/۵۱	۳۴/۶۷±۲/۳
هموگلوبین	۳۰ روز	۴/۵±۰/۴	۵/۷±۰/۵	۴/۷±۰/۶	۴/۲±۰/۵
(gdl^{-1})	۶۰ روز	۵/۰۶±۰/۴۱	۸/۰۸±/۳۱۵	۵/۷۴±۰/۴۶	۴/۷۵±۰/۳۷
شمارش گلبول قرمز	۳۰ روز	۰/۸۳±۰/۲۶	۱/۰۴±۰/۲	۱/۰۵±۰/۱۶	۰/۹۵±۰/۱۶
$10^6 \times$	۶۰ روز	۱/۱۵±۰/۱۵	۱/۱۲±۰/۰۵	۰/۹۶±۰/۱۷	۱/۰۱±۰/۲۱
متوسط حجم گلبول	۳۰ روز	۲۹۶/۲۳±۲۹/۲۳	۲۹۱/۰۲±۲۹/۸۸	۳۲۰/۳۶±۳۸/۲۷	۳۲۷/۷۵±۵۳/۶۹
قرمز(fL)	۶۰ روز	۳۰۵/۶۷±۳۴/۴۵	۲۹۵/۷۵±۵۱/۰۹	۳۶۳/۳۸±۴۱/۰۲	۳۵۲/۳۳±۷۱/۰۳
متوسط هموگلوبین	۳۰ روز	۵۸/۴۴ ±۱۷/۷۰	۵۷/۹۷±۶/۱۲	۴۴/۵۲±۵/۳۹	۴۵/۴۷±۹/۳۱
گلبول قرمز(pg)	۶۰ روز	۴۴/۲±۴/۳۴	۷۲/۰۶±۴/۳۳	۶۰/۲۹±۷/۱۳	۴۸/۳۵±۱۰/۰۸
میزان غلظت متوسط	۳۰ روز	۱۴/۹۳±۰/۸۳	۱۸/۶۸±۰/۹۶	۱۳/۹۵±۱/۲۶	۱۳/۸۱±۰/۸۶
هموگلوبین سلولی (%)	۶۰ روز	۱۴/۵۷±۰/۱۱	۲۵/۰۸±۳/۳۲	۱۶/۶۰±۰/۷۹	۱۳/۷۱±۰/۱۶

Journal of Aquatic Caspian Sea (J.A.C.S)

n=6

نتایج آنالیز تعداد گلبول های سفید ، درصد لنفوسیت، تعداد نوتروفیلو مونوسیترادیکال آزاد اکسیژن) مربوط به گلبول سفید در جدول ۲ نشان داده شده است. در ماه اول برای تیمار لوگ ۸ باکتری لاکتیک درصد نوتروفیل و رادیکال آزاد اکسیژن بطور معنی داری افزایش داشته است. درماه اول تیمار دارای لوگ ۷ باکتری لاکتیک، تعداد گلبول سفید روند کاهشی داشته ولی میزان رادیکال آزاد افزایش معنی دار داشته است(P<۰/۰۵). در تیمار دارای لوگ ۹ باکتری لاکتیک در ماه اول نتایج حاکی از افزایش معنی دار نوتروفیل و رادیکال آزاد اکسیژن بوده است(P<۰/۰۵). در تیمار شاهد ،کاهش و یا افزایش نسبی برخی از پارامترها در ماه دوم معنی دار نبوده است.

جدول۲ :میانگین و انحراف معیار پارامترهای خونی (گلبولهای سفید) در تیمارهای مختلف ماهی قزل آلا در زمانهای ۳۰ و ۶۰ روز

تیمار		لوگ ۸ لاکتیک	لوگ ۷ لاکتیک	لوگ ۹ لاکتیک	شاهد
شمارش گلبول سفید	۳۰ روز	۲/۲۷±۰/۲	۲/۱۹±۰/۳	۱/۷۴±۰/۳	۱/۵۶±۰/۲
10 4 ×	۶۰ روز	۱/۵۰±۰/۰۶	۱/۵۰±۰/۳	۱/۲۷±۰/۱۲	۱/۰۲ ±۰/۰۵
لمفوسیت	۳۰ روز	۹۸ ±۱/۱۷	۹۸ ±۲/۱	۹۸/۸ ±۱ /۶	۹۸/۸ ±۱/۱۷
(%)	۶۰ روز	۹۵ ±۵/۱۹	۹۸ ±۴/۱۶	۹۶/۳۳ ± ۵/۵	۹۸/۶۶ ±۲/۴
نوتروفیل	۳۰ روز	۰/۸۳ ±۰/۰۱	۲±۰/۱	۱/۱۷ ±۰/۰۶	۱/۱۷ ±۰/۰۳
(%)	۶۰ روز	۵±۰/۹۱	۲±۱/۴۴	۳/۶۶ ±۱ /۰۶	۱/۳۳ ±۰/۰۵
مونوسیت	۳۰ روز	۰	۰	۰	۰
(%)	۶۰ روز	۰	۰	۰	۰
رادیکال آزاد اکسیژن	۳۰ روز	۱۴۵۰/۷ ± ۴۷۵/۵۵	۱۸۰۹/ ۳ ±۲۰۶/۶۶	± ۳۷۴/۰۶ ۱۲۷۰/۵	۱۳۷۱/۳ ±۲۵۲ /۰۶
	۶۰ روز	۲۶۸۰/۴ ± ۲۶۷/۷۱	±۱۶۱/۱۳ ۲۹۱۴/۲	۱۹۶۵/۲ ±۷۲۸ /۶۵	۱۲۹۲/۹ ±۱۸۷ /۵۱

نتایج آزمایشات سرمی: نتایج آزمایشات انجام شده در خصوص آلبومین، پروتئین تام سرم (گرم بر دسی لیتر)، آنزیمهای کبدی ALT وAST (واحد بین اللملی بر میلی لیتر)و C3 ، C4 ، IgM ، (برحسب گرم دسی لیتر) در جدول ۳ نشان داده شده است. نتایج نشان می دهد که میزان پارامترهای مذکور ماه اول برای تیمار حاوی لوگ ۸ باکتری لاکتیک در ارتباط با AST ، C3 و IgM افزایش معنی دار داشته ولی سایر پارامترها تغییر چندانی نداشته اند. نتایج تیمار دارای لوگ ۷ باکتری لاکتیک نشان میدهد

Journal of Aquatic Caspian Sea (J.A.C.S)

که افزایش یا کاهش پارامترها در ماه دوم، بجز AST ، معنی دار نبوده است. و تغییرات فوق در تیمار حاوی لوگ ۹ باکتری لاکتیک در ماه اول نشان داد که افزایش یا کاهش پارامترها در ماه دوم، بجز AST ، معنی دار نبوده است. در تیمار شاهد، افزایش یا کاهش پارامترها در ماه دوم معنی دار نبوده است.

جدول۳ : میانگین و انحراف معیار پارامترهای فیزیولوژی و ایمنی در تیمارهای مختلف ماهی قزل آلا در زمانهای ۳۰ و ۶۰ روز

تیمار		لوگ ۸ لاکتیک	لوگ ۷ لاکتیک	لوگ ۹ لاکتیک	شاهد
آلبومین	۳۰ روز	۲/۳۳±۰/۸۹	۳/۱۶±۰/۶	۱/۸±۰/۳۴	۲/۴±۰/۳۴
($mgdl^{-1}$)	۶۰ روز	۲/۴±۰/۲۶	۲/۴۳±۰/۲	۲/۷۶±۰/۵۵	۱/۹۳±۰/۶۴
پروتئین تام	۳۰ روز	۳/۶۶±۰/۵	۵/۱±۰/۶	۳/۵۶±۰/۵۵	۳/۹۶±۰/۰۵
($mgdl^{-1}$)	۶۰ روز	۳/۷۳±۰/۰۵	۳/۶۳±۰/۱	۳/۷±۰/۳۶	۳/۳±۰/۴
C3	۳۰ روز	۲۹/۱±۹/۳	۲۹/۹±۵/۹۸	۵۳/۳۲ ±۷/۵	۳۲/۵۶±۴/۶
($mgdl^{-1}$)	۶۰ روز	۵۴/۱۶±۳/۶۵	۲۲/۵±۳/۱	۲۲/۵۳±۷/۴۳	۱۹/۲۶±۳/۷۷
		۱۳/۷۳±۰/۳	۱۲/۶±۱/۲۵	۱۴/۶۶±۱/۵۱	۱۳/۱۳±۱/۲۱
	۶۰ روز	۱۸/۳۶±۶/۵۸	۱۰/۳±۱/۷۹	۱۳/۰۳±۱/۹۳	۱۰/۷±۱/۵۱
IgM	۳۰ روز	۱۶۷/۷۳±۱۷/۲۱	۱۲۴/۱۶± ۲۶/۵۶	۱۳۴/۴۳±۳۵/۶۱	۱۳۲/۷±۲۹/۱۱
($mgdl^{-1}$)	۶۰ روز	۱۸۲/۰۲±۱۱/۵۵	۱۱۲/۰۳±۱۵/۶۳	۱۲۱/۲±۱۷/۲۱	۳۸/۶±۶/۹۷

مواجهه با باکتری: نتایج رویارویی ماهی پس از پایان دوره (پس از ۶۰ روز) با باکتری بیماریزا استرپتوکوکوس اینیه نشان داد که بیشترین میزان بقاء ماهی در تیمار دریافت کننده لوگ ۸ باکتری لاکتیک بوده و تیمارهای لوگ ۹ باکتری لاکتیک و لوگ ۷ باکتری لاکتیک در مرحله بعد قرار داشتند (جدول ۴). نتایج آماری حاکی از وجود اختلاف معنی دار بین تیمارهای دریافت کننده باکتری‌ها خصوصا لوگ ۸ با تیمار شاهد بوده است($P<۰/۰۵$).

جدول۴ : میانگین درصد بقاء در تیمارهای مختلف دارای باکتری و تیمار شاهد در بچه ماهی قزل آلا بعد از رویارویی با استرپتوکوکوس اینیه (میانگین ± SD)

Journal of Aquatic Caspian Sea (J.A.C.S)

تیمار	تعداد تلف شده	تعداد باقیمانده	درصد بقاء
لوگ ۸ لاکتیک	۲	۵۸	۹۶/۶۶±۲/۴۱
لوگ ۷ لاکتیک	۶	۵۴	۹۰/۲۱±۲/۴۹
لوگ ۹ لاکتیک	۵	۵۵	۹۱/۶۶±۲/۶۸
شاهد	۴۵	۱۵	۲۵/۳۸±۳/۴۶

نتایج پارامترهای مربوط به گلبول قرمز در زمان ۳۰ و ۶۰ روز نشان داد که اکثر فاکتورهای مورد بررسی روند صعودی داشته ولی این روند همیشگی نبوده است. تغییرات در تیمارهای حاوی لوگ ۷ و ۹ باکتری لاکتیک روند صعودی داشته ولی در تیمارهای دارای لوگ ۸ تغییرات خاصی مشاهده نشده است. نتایج آنالیز آماری حاکی از اختلاف معنی دار مابین تیمارهای مورد بررسی با نمونه شاهد بوده است افزایش پارامترهایی نظیر MCH و MCHC در خون نشان دهنده افزایش هموگلوبین بوده که افزایش این فاکتور باعث انتقال بهتر و بیشتر اکسیژن به اندام‌های مختلف شده و در نتیجه متابولیسم سلولی با کارآیی بهتری صورت می-گیرد(Mesalhy Aly, 2008) بنابراین افزودن پروبیوتیک میتواند باعث افزایش نسبی پارامترهای مذکور در خون شده و در نتیجه اثرات مفیدی برای ماهی داشته باشد. در مطالعه انجام گرفته توسط کامکار در سال ۱۳۹۰ در ارتباط با تاثیرات باسیلوس سوبتی لیس بر مقاومت ماهی قزل آلا نسبت به استرپتوکوکوزیس مشخص گردید که در تیمارهایی که دریافت کننده پروبیوتیک باسیلوس سوبتی لیس بودند هماتوکریت، هموگلوبین و تعداد گلبول‌های قرمز بطور معنی داری افزایش داشته که با نتایج این مطالعه مطابقت دارد. در تیمارهای شاهد انجام گرفته توسط کامکار روند کاهشی در پارامترهای مذکور مشاهده شده که با تیمار شاهد در این مطالعه مطابقت دارد(کامکار، ۱۳۹۰). مطالعات Mesalhy و همکاران در سال ۲۰۰۸ نشان داد که استفاده از باسیلوس پومی لیس و ماده Organic Green در ماهی تیلاپیا باعث افزایش تعداد هماتوکریت شده و به ترتیب ۳۱ برای باسیلوس و ۳۲/۱ برای Organic Green بوده که نسبت به نمونه کنترل (۳۰/۶) افزایش نسبی داشته ولی اختلاف مذکور معنی دار نبوده است. در مطالعه حاضر میزان هماتوکریت در تیمارهای حاوی باکتری‌ها نسبت به نمونه شاهد نیز دارای افزایش بوده که ممکن است بدلیل تغییر pH روده توسط این باکتری و تغییر در جذب آهن و متعاقب آن افزایش هموگلوبین و هماتوکریت باشد. البته ممکن است تغییرات دیده شده مربوط به دما و تغیرات فیزیولوژیکی ماهی باشد و ارتباط معنی داری با پروبیوتیک اضافه شده وجود نداشته باشد. در مطالعه انجام گرفته توسط Al-Dohail و همکاران در خصوص تاثیرات پروبیوتیکی لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس بر تغییرات هماتولوژیکی گربه ماهی آفریقایی و همچنین رویارویی با چند باکتری بیماریزا از جمله استرپتوکوکوس آگالاکتیه، استافیلوکوکوس گزیلوسوس و آئروموناس هیدروفیلا مشخص گردید که هر چند برخی از پارامترهای هماتولوژی در تیمارهای دارای پروبیوتیک روند افزایشی

Journal of Aquatic Caspian Sea (J A C S)

داشتند ولی با این وجود روند مذکور معنی دار نبوده است. در مطالعه حاضر نیز مشابه نتایج فوق مشاهد شـده و رونـد صـعودی در برخی از تیمارهای حاوی باکتری لاکتیک مشهود نبوده است.

نتایج تغییرات مربوط به گلبول‌های سفید در تمامی تیمارها، بجز تعداد نوتروفیل ، در ماه دوم روند نزولی داشته اند. بطور کلی میزان گلبول‌های سفید در تیمار حاوی لوگ ۸ باکتری لاکتیک خصوصا تعداد نوتروفیل و رادیکال آزاد اکسیژن نسبت به سایر تیمارها بیشتر بوده و تیمارهای دیگر شامل ، لوگ ۷ و ۹ باکتری لاکتیک در مرحله بعد قرار داشتند. مطالعه انجام توسط کامکار در سال ۱۳۹۰ نشان داد که با افزودن باسیلوس سوبتی لیس در جیره غذایی ماهی قزل آلا ، پارامترهای مربوط به گلبول سفید از جمله شمارش گلبول سفید ، لنفوسیت، نوتروفیل افزایش می یابد. در مطالعه حاضر نیز تعداد سلولهای مذکور نسبت به تیمار شاهد افزایش داشته ولی از زمان ۳۰ تا ۶۰ روز بجز نوتروفیل روند نزولی داشته اند. مطالعات انجام گرفته توسط Brunt و همکاران در سال ۲۰۰۷ ، نشان داد که با افزودن پروبیوتیک باعث افزایش گلبول‌های سفید میشود. در مطالعه انجام گرفته توسط Mesalhy و همکاران در سال ۲۰۰۸ مشخص گردید که باسیلوس پومی لیس در لوگ ۱۲ باعث افزایش معنی دار نوتروفیل، لمفوسیت و مونوسیتنسبت به شاهد به ترتیب ، و شده ولی تغییرات در Organic Green فاقد اختلاف معنی دار با تیمار شاهد بوده است. نتایج مطالعه فوق حاکی از آن است که لوگ‌های بالاتر باکتری باعث افزایش تعداد گلبول‌های سفید خون میشود ولی مطالعه حاضر نشان دهنده آنست که لوگ ۸ باکتری بهتر از لوگ ۹ باکتری لاکتیک بوده است. تیمارهای حاوی لوگ‌های مختلف باکتری لاکتیک باعث افزایش رادیکال آزاد اکسیژن نسبت به تیمار شاهد شدند. رادیکال آزاد اکسیژن در ارتباط مستقیم با انفجار تنفسی در نوتروفیل ها می باشد. بنابراین متعاقب افزایش نوتروفیل ها رادیکال آزاد اکسیژن نیز افزایش می باشد. در مطالعات Nayak در سال ۲۰۱۰ گزارش شد که پروبیوتیک‌های مختلف که بصورت ترکیبی و یا منفرد مورد استفاده قرار می‌گیرند باعث افزایش انفجار تنفسی خصوصا در سلول های نوتروفیل شده و متعاقب آن فاگوسیتوزیس افزایش یافته و در حقیقت سیستم ایمنی ذاتی را تحت تاثیر قرار میدهد. مطالعات مختلف نشان داد که بدنبال استفاده از باکتری‌های دارای خواص پروبیوتیک نظیر باسیلوس‌ها و باکتری-های گروه لاکتیک، فعالیت انفجار تنفسی افزایش می یابد. مطالعه Salinas و همکاران در سال ۲۰۰۶ نشان داد که استفاده از لاکتوباسیلوس دلبروکی زیر گونه لاکتیس باعث تحریک سیستم ایمنی ذاتی ماهیان استخوانی خصوصا فعالیت انفجار تنفسی میگردد (Nikoskelainen, 2003, Salinas, 2005, Xu. And Tian, 2009).

نتایج ارزیابی های سرمی نشان داد که دامنه تغییرات ایمنی همورال در تیمارهای حاوی باکتری‌ها نسبت به شاهد حاکی از افزایش معنی دار آنتی بادی IgM و کمپلمان C3 خصوصا لوگ ۸ باکتری بوده است. نتـایج مطالعـه کامکـار در سـال۱۳۹۰نـشان داد کـه پروبیوتیک باسیلوس سوبتی لیس باعث افزایش معنی دار IgM شده که با نتـایج لـوگ ۸ لاکتیـک مطابقـت دارد. نتـایج مطالعـات

Journal of Aquatic Caspian Sea (J.A.C.S)

Panigrahi و همکاران در سال ۲۰۰۵ در خصوص استفاده از لاکتوباسیلوس رامنوسوس در ماهی قزل آلا و Al-Dohail در ارتباط با استفاده از لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس در گربه ماهی آفریقایی نشان داد که پروبیوتیک‌های مورد استفاده باعث تحریک تولید ایمونوگلوبین می‌شود. در کنار تولید ایمونوگلوبین کمپلمان C3 افزایش و C4 کاهش می یابد. کمپلمان C3 یکی از اجزای اصلی تحریک کننده سیستم ایمنی همورال و سلولی می باشد. این جزء هم از راه کلاسیک و هم از راه آلترناتیو باعث تحریک تولید سایر اجزاء کپلمان میگردد. به هنگامیکه کمپلمان از راه کلاسیک فعال شود باعث تولید آنتی بادی نیز شده و بطور اختصاصی عملمی کند و در حقیقت بعنوان یکی از پارامترهای سیستم ایمنی همورال در نظر گرفته میشود. زمانیکه از راه آلترناتیو وارد شود بصورت ایمنی ذاتی عمل کرده و غیر اختصاصی می باشد (Al-Dohail and Ismael, 2011). مطالعه Barnes و همکاران در سال ۲۰۰۷ در خصوص استفاده از لوکونوستوک مزانتروئیدس و لاکتوباسیلوس کازئی در ماهی قزل آلا و ارزیابی مقاومت آن در برابر بیماری فرونکولوزیس نشان داد که استفاده از باکتری‌های مذکور باعث افزایش اجزاء کمپلمان شده و سیستم ایمنی ذاتی و همورال را فعال می کند. مطالعه Hobs و همکاران در سال ۲۰۰۵ در ارتباط با استفاده از باکتری شوانلا غیر فعال شده با حرارت در جیره غذایی ماهی نشان داد که استفاده از آن باعث افزایش کمپلمان می‌گردد. مطالعه انجام شده توسط Brunt- Newaj و همکاران در سال ۲۰۰۷ در خصوص استفاده از باسیلوس سوبتی لیس در جیره غذایی قزل آلا و افزایش مقاومت آن در برابر آئروموناس نشان داد که باکتری مورد استفاده فاقد اثر معنی دار در اجزاء کمپلمان خون بوده است. مطالعه Nikoskelainen و همکاران در سال ۲۰۰۳ در خصوص استفاده از لاکتوباسیلوس رامنوسوس مشخص گردید که باکتری مورد استفاده باعث افزایش معنی دار در اجزاء کمپلمان می‌گردد. مطالعات Panighari و همکاران در سال ۲۰۰۵ نشان داد که استفاده لاکتوباسیلوس رامنوسوس و برخی دیگر از باکتری-های پروبیوتیک در ماهی قزل آلا باعث افزایش اجزاء کمپلمان میشود.. نتایج مطالعات اشاره شده حاکی از افزایش اجزاء کمپلمان در تیمارهای دریافت کننده پروبیوتیک بوده که با نتایج لوگ ۸ باکتری لاکتیک این مطالعه همخوانی دارد.

نتایج آزمایشات رویارویی ماهی در برابر استرپتوکوکوس اینیه نشان داد که بیشترین درصد بقاء مربوط به تیمارهای دریافت کننده باکتری لاکتیک در لوگ ۸ (۹۶/۶۶) بوده و تیمارهای دیگر در مرحله بعد قرار داشته و تیمار شاهد با کمترین درصد بقاء(۲۵/۳۸) در مرحله آخر قرار داشته است. استرپتوکوکوزیس بیماری باکتریایی شایع در مزارع پرورش ماهیان سردآبی در ایران بوده که گونه هایی نظیر اینیه، اوبریس، آگالاکتیه و فسیوم از استان‌های مختلف جدا شدند. بیماریزایی گونه های جدا شده متفاوت بوده و بیشترین درصد مربوط به اینیه بوده و گونه اوبریس از بیماریزایی کمتری برخوردار می باشد. نتایج مطالعات کامکار در سال ۱۳۹۰ نشان داد که در تیمارهای دریافت کننده باسیلوس، میزان تلفات در بچه ماهیان قزل آلای رویارو شده با استرپتوکوکوس اینیه کمتر از تیمار شاهد بوده است. در مقایسه مطالعه کامکار و مطالعه حاضر مشخص میگردد که دامنه تلفات در مطالعه حاضر بیشتر بوده و

Journal of Aquatic Caspian Sea (J.A.C.S)

نشان از بیماریزایی بالای گونه اینیه می باشد. در مطالعه انجام شده توسط Mesalhy و همکاران در سال ۲۰۰۸ مشخص گردید که در تیمارهای دریافت کننده باسیلوس پومی لیس ، درروياروبی با آئروموناس هیدروفیلا در لوگ ۸، درصد بازماندگی بطور معنی داری افزایش داشته است. لوگی که برای تزریق اینیه در نظر گرفته شد لوگ ۶ بوده که باعث بروز تلفات در ماهی در تیمار شاهد شده است. در مطالعه انجام شده توسط Son در سال ۲۰۰۹ مشخص گردید که هنگامیکه در جیره غذایی ماهی Catla از باکتری باسیلوس سیرکولانس استفاده نشود و در معرض آئروموناس هیدروفیلا قرار داده شود درصد بازماندگی آن به ۶/۶۶ درصد رسیده این در حالیست که در تیمارهای دریافت کننده باسیلوس درصد بازماندگی ۱۰۰ درصد بود. نتایج تحقیق حاضر نیز حاکی از بازماندگی ۹۶ درصد ماهی قزل آلای رویارو شده با گونه اینیه در دو تیمار لوگ ۸ باکتری لاکتیک می باشد. بنابراین انتخاب دوز مناسب باکتری بسیار حائز اهمیت می باشد. نتایج مطالعات Al-Dohail و همکاران در سال ۲۰۱۱ نشان داد که بهنگام استفاده از لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس در جیره غذایی گربه ماهی آفریقایی، مقاومت ماهی در برابر آئروموناس هیدروفیلا، استافیلوکوکوس و استرپتوکوکوس آگالاکتیه افزایش می یابد. نتیجه ای که از این مطالعه حاصل میشود آنکه اولا باکتری‌های جدا شده از دستگاه گوارش ماهی قزل آلا دارای خواص پروبیوتیک بوده و بر پارامترهای مختلف نظیر بقاء ، هماتولوژی و سرمی تاثیر مثبت دارند اما بهترین پروبیوتیک مورد استفاده لوگ ۸ باکتری لاکتیک بوده که بر پارامترهای خونی و ایمنی مثل نوتروفیل و رادیکال آزاد اکسیژن و همچنین IgM و C3 را افزایش داده و با تیمارهای دیگر و همچنین نمونه شاهد دارای اختلاف معنی دار بوده است. همچنین این تیمار توانسته مقاومت ماهی قزل آلا را در برابر بیماری استرپتوکوکوزیس افزایش داده و از بروز تلفات احتمالی جلوگیری نماید.

منابع

تیرزاد.، ا. ربانی.، م و محزونیه.، م.۱۳۸۳. ترجمه: ایمنی شناسی دامپزشکی، انتشارات دانشگاه تهران، ص ۷۰۶- ۱۵۰ .

طبرستانی.، م. ۱۳۹۰. خونشناسی پزشکی، سازمان چاپ و نشر مشهد،ص ۱۴۳، ص ۹۵۰.

فاضلی.، ز. ۱۳۸۴. غنی سازی گونه آرتمیا ارومیانا با پروبیوتیک مخمری (تپاکس) و بررسی پایداری آرتمیا غنی سازی شده در دوره های مختلف غنی سازی و انکوباسیون سرد، پایان نامه کارشناسی ارشد، دانشگاه آزاد اسلامی واحد علوم وتحقیقات، ص ۱۸۳.

کامکار.، م. ۱۳۹۰. بررسی تاثیر باسیلوس سوبتیلیس به عنوان پروبیوتیک در کنترل استرپتوکوکوزیس در ماهی قزل آلای رنگین کمان، پایان نامه کارشناسی ارشد،دانشگاه تنکابن، ص ۸۷.

Journal of Aquatic Caspian Sea (J.A.C.S)

Al-Dohail, M.and Ismael, N.E.M., 2011. Evaluation of commertial live baker,s yeast, *Saccharomyces cerevisiae* as a growth and immunity promoter for Fry Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) challenged in situ with Aeromonas htdrophila. Aquaculture. 280, pp: 185-189.

Austin, B. and Austin, D.A., 1987. Bacterial Fish Pathogens: Desease in Farmed and Wild Fish .Ellis Horwood, Chichester. UK, p: 364.

Barnes, T.D., 2007. Betaglucan as a biological defense modulayor. PP: 1-6.

Brunt, J., Newaj-Fyzul, A., Austin, B. 2007. The development of probiotics for the control of multiple bacterial diseases of rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum).Fish diseases, 30,573-579.

Fuller, R., 1999. A review, probiotic in man and animals. Journal of Applied Bacteriology. 66, pp: 365-378.

Hobbs, T., Tanaka, D., Twamura, y. and Hoshino, T., 2005. Diversity and seasonal changes in lactic acid bocteria in the intestinal tract of cultured freshwafer fish.Aquaculture. 234.

Johnson, A.M., Rohlfs, E.M. and Silverman, L.M., 1999, In: Burtis, C.A., Ashwood, E.K., es itrs. Tietz textbook of clinical chemistry 3 ed Philadelphia: W.B. Saunders company. pp: 12-507.

Labor, T., 1996. In Clinical Laboratory Diagnistics, use and assessment of Clinical Laboratory Rosults, edition, pp: 696.

Mathews, E.S., Warinner, J.E. and Weeks, B.A., 1990. Assay of immune function in fish macrophages. In: Stolen, J.S., Fletcher, T.C., Anderson, D.P., Roberson, B.S., van Muiswinkel, W.B. (Eds.), Techniques in Fish Immunology, vol.2. SOS publications, pp. 155-163.

Mesalhy Aly, S. Mohamed, M.F. and John, G., 2008. Effect of probiotics on the survival, growth and challenge infection in Tilapia nilotica (*Oreochromis niloticus*), Aquaculture Research, 39, 647-656.

Moriary, D.J.W., 1999. Diseases control in shrimp aquaculture with probiotic bacteria. In: Microbial Biosystem: New Fron tiers- Proceeding of the 8 th Internationals symposium on Microbial Ecology Atlantic Canada Society for Microbial Ecology, Halifaa, Canada.

Maugin, S. and Novel, G. 1994. Characterization of lactic acid Bactria isolated from sea. Journal Applied Bacteriology, 76, pp: 616-625.

Nayak, S., 2010, Probiotics and immunity: A fish perspective. Fish and shellfish Immunology, pp: 21-32.

Journal of Aquatic Caspian Sea (J.A.C.S)

Nikoskelainen. S., Ouwehand, A., Bylund, G., Salminen, S. and Lilius, E.M., 2003, Immune enhancement in rainbow trout (*Oncoehinchus mykiss*) by potential probioticbacteria (*Lactobacillus rhamrosus*). Fish and shellfish immunology, 15, pp: 443-452.

Panigrahi, A., Kiron, V., Puahqkaew. J., Kabayashi, T., Satoh, S. and Sugita, H., 2005. The viability of probiotic bacteria as a factor influencing the immune response in rainbow trout *Oncorhynchus mykiss*. Aquaculture. 243, pp: 241-254.

Panigrahi, A., Kiron, V., Puahqkaew. J., Kabayashi, T., Satoh, S. and Sugita, H., 2005. The viability of probiotic bacteria as a factor influencing the immune response in rainbow trout *Oncorhynchus mykiss*. Aquaculture. 243, pp: 241-254.

Ringo, E. and Gatesoupe, F.J., 1998. Lactic acid bacteria in fish:a review.Aquaculture. 160, PP: 177-203.

Rodas, B.A., Angulo, J.O., Cruz, J. and Garcia, H.S., 2002, Proparatian of probiotic buttermilk with *Lactobacillus reuteri*. Milchwissenschoff Milk Sclence International. 57, pp: 26-28.

Salinas,I.,Cuesta,A,Esteban,M.A., and mesegure,J., 2005. Dietary administration of *Lactobasilus delbrrieckii* and *Bacillus subtilis* , single or combint, on gilthead seabream cellular immune responses. Fish and Shellfish Immunology , 19,67-77.

Scapigliati, G., Romano, N., Bulocore, F., Picchietti, S., Baldassini, M.R., Prugboly, D., Galia, A., Meloni, S., Secombes, X.J., Mazzini, M. and Abelli, L. 2002. The immune system of seabass, Dicetrarchus Labrax, reared in aquaculture. Developmenfal and Comparative Immunology. 26, pp: 151-160.

Shahsavani, D., Mohri, M. and Gholipour Kanani, H. 2010. Determination of normal values of some blood serum enzymes in Acipenser stellatus Pallas. Fish. Physiol. Biochem.36: 39–43.

Smith, J., Jones, M. and Houghton, L., 1999. Future of health insurance. The New England Journal of Medicine, 965:325-329.

Son, F.J., Fitzyeraid, G.F., Stanton, C. and Ross, R.P., 2009, The evaluation of a mupiricin, based selective Medium for the enumeration for bifidobacteri from probiotic animal food. pp: 22-890.

Verschuere, L., Rombaut, G., Sorgelloos, P. and Verstraete,W., 2000. Probiotic bacteria as biological and molecular biology reviews Aquaculture, 84, pp: 651-655.

Whicher, J., 1996. Complement Component C Foundation for Blood Research 10, pp: 1-7.

Xu. Z. and Tian, Z., 2009. Production of the antibacterial substance by Bacillus sp.Strain NM12, an intestinal bacterium of Japanese coastal fish. Aquaculture, 168, pp: 269-280.

Journal of Aquatic Caspian Sea (J.A.C.S)