

## تاثیر باکتری *Lactobacillus* بر شاخص های رشد، بقاء و مقاومت ماهی قزل آلی

### رنگین کمان (*Onchorhynchus mykiss*) در برابر باکتری

#### *Streptococcus iniae*

رضا صفری<sup>۱</sup>، زهرا یعقوبزاده<sup>۲\*</sup>

\* Za\_yaghoub@yahoo.com

۱- پژوهشکده اکولوژی دریای خزر، موسسه تحقیقات علوم شیلاتی کشور، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، ساری، فرح آباد، ایران، صندوق پستی ۹۶۱

تاریخ پذیرش: مرداد ۱۳۹۶

تاریخ دریافت: آبان ۱۳۹۴

#### چکیده

در این مطالعه تاثیر باکتری *Lactobacillus* جدا شده از دستگاه گوارش ماهی قزل آلا بر برخی از فراسنجه های رشد و همچنین مقاومت در برابر باکتری *Streptococcus iniae* مورد ارزیابی قرار گرفت. باکتری مذکور در قالب ۳ تیمار (log 7, 8, 9) به جیره غذایی ماهی اضافه شد و تاثیر آنها به همراه تیمار شاهد بر شاخص های رشد و بقاء در روزهای ۳۰ و ۶۰ مورد بررسی قرار گرفت. در مرحله پایانی، مقاومت ماهیان تیمار شده در برابر استرپتوکوکوزیس مورد ارزیابی قرار گرفت. نتایج نشان داد که *Lactobacillus* قادر به تقویت فراسنجه های رشد (وزن، ضریب تبدیل غذایی، ضریب چاقی، ضریب رشد ویژه و ضریب بازده پروتئینی) و بقاء بوده که در این بین log 8 باکتری دارای اختلاف معنی دار با سایر تیمارها و گروه شاهد بود. نتایج رویارویی ماهیان مورد بررسی در برابر استرپتوکوکوزیس ناشی از گونه *Streptococcus iniae* نشان داد که بیشترین بازماندگی در تیمار دارای log 8 ۹۶/۶۶ درصد بود و تیمار شاهد نیز دارای کمترین بازماندگی (۲۵/۳۸ درصد) بود. نتیجه گیری نهایی مویید آن است که *Lactobacillus* جدا شده از ماهی قزل آلا دارای خواص پروبیوتیکی بوده و قادر به بروز تغییرات مثبت در شاخص های رشد است. همچنین، مقاومت ماهی قزل آلا را در برابر استرپتوکوکوزیس افزایش می دهد.

**کلمات کلیدی:** *Lactobacillus*، قزل آلا، شاخص های رشد، استرپتوکوکوس اینیه

\* نویسنده مسئول

## مقدمه

استرپتوکوکوزیس (Streptococcosis) و لاکتوکوکوزیس (Lactococcosis) از جمله بیماری های باکتریایی ماهیان هستند که انواع مختلف ماهیان وحشی و پرورشی به ویژه قزل آلا ی رنگین کمان را به صورت انفرادی و همه گیر در معرض خطر قرار داده و خسارات اقتصادی قابل توجهی را به دنبال دارند (یاری و همکاران، ۱۳۹۶).

پروبیوتیک ها مکمل های میکروبی هستند که باعث بهینه نمودن فلور دستگاه گوارش شده و از این طریق بر سایر فراسنجه ها تاثیر مثبت نشان می دهند (Gomez-Gill et al., 2000). پروبیوتیک های مورد استفاده در آبی پروری نه تنها باعث متعادل نمودن دستگاه گوارش موجود می گردند بلکه شرایط فیزیکی و شیمیایی آب را نیز بهبود می بخشند (Akrami et al., 2013). *Vibrio* و *pseudomonas* ها رایج ترین گونه های باکتریایی موجود در دستگاه گوارش ماهیان دریایی می باشند (Gatasupe, 1999; Vadstein, 1997). *Aeromonas* و *Pseudomonas* *Enterobacteriaceae* ها نیز در ماهی های آب شیرین غالب هستند (Balcázar et al., 2007; Martínez et al., 2012).

باکتری های تولیدکننده اسید لاکتیک جزء باکتری های گرم مثبت، غیر متحرک و بدون اسپور هستند. تولید اسید لاکتیک در آن ها محصول نهایی حاصل از تخمیر می باشد (Gatesoupe, 2008). گونه های مختلف باکتری های *Lactobacillus* برای رشد در محیط های مختلف سازگار شدند و عمدتاً در دستگاه گوارش موجودات خونگرم، محصولات لبنی (Balcázar et al., 2007) و محصولات دریایی (Gatesoupe, 2008) وجود دارند. Nikoskelainen و همکارانش در سال ۲۰۰۳ تاثیر پروبیوتیک *Lactobacillus rhamnosus* بر سیستم ایمنی ماهی قزل آلا و افزایش مقاومت آن در برابر *Escherichia coli* را مورد بررسی قرار دادند. نتایج نشان داد که این پروبیوتیک باعث تحریک سیستم ایمنی ماهی قزل آلا شده و فراسنجه های غیراختصاصی را به طور معنی داری افزایش داد. از طرف دیگر در رویارویی ماهی با اشرشیاکلی، میزان تلفات در تیمارهای حاوی پروبیوتیک آلوده به اشرشیاکلی به طور معنی داری کاهش می یابد. Vendrell و همکارانش در سال ۲۰۰۸ مقاومت ماهی قزل آلا تغذیه شده با پروبیوتیک در برابر بیماری لاکتوکوکوزیس را مورد ارزیابی قرار دادند. پروبیوتیک

های مورد استفاده شامل *leuconostoc mesenteroides* و *leuconostoc plantarum* بودند. لگاریتم تعداد باکتری ۷ در هر گرم از ماده غذایی بود. نتایج نشان داد که میزان تلفات در گروه های دریافت کننده پروبیوتیک ۴۶-۵۶ درصد بود و این در حالی است که در نمونه های کنترل، میزان تلفات ۷۸ درصد گزارش شد. نتایج مطالعات Gatesoupe در سال ۱۹۹۹ در ارتباط با کاربرد باکتری های لاکتیک در مزارع پرورش ماهی نشان داد که اکثر باکتری های لاکتیک جز باکتری های مفید بوده و میتوانند بعنوان پروبیوتیک در آبی پروری مورد استفاده قرار گیرند. این باکتری ها با تولید متابولیت های مختلف باعث تقویت سیستم ایمنی شده ولی کارایی آن ها در آب شور کمتر از آب شیرین بوده زیرا ماندگاری آن ها در آب شور کمتر می باشد.

Panigrahi و همکارانش در سال ۲۰۰۵ تاثیر پروبیوتیک *Lactobacillus rhamnosus* را بر تقویت سیستم ایمنی ماهی قزل آلا مورد ارزیابی قرار دادند. و نتایج نشان داد که این باکتری باعث تقویت سیستم ایمنی خصوصاً آنتی بادی Igm می گردد.

قلجایی فرد و همکاران در سال ۱۳۹۵ در خصوص تاثیر باکتری لاکتوباسیلوس پلانتاروم *Lactobacillus plantarum* بر شاخص های خونی و ایمنی بچه ماهی قزل آلا ی رنگین کمان بیان کردند که محدوده بکارگیری این باکتری را می توان دوز  $10^9 - 10^7$ /CFU باکتری بر گرم غذا به عنوان تحریک کننده سیستم ایمنی معرفی نمود. توکمه چی و محسنی در ۱۳۹۰ در تاثیر پروبیوتیک های *Saccharomyces cerevisiae* و *Lactobacillus casei* بر رشد، بقا، پاسخ های ایمنی و مقاومت در برابر برخی از استرس های محیطی و مواجهه باکتریایی در ماهی قزل آلا ی رنگین کمان، گزارش دادند که استفاده از پروبیوتیک ها (مخمری یا باکتریایی) و بخصوص ترکیب همزمان پروبیوتیک های باکتریایی و مخمری باعث افزایش رشد و افزایش سیستم ایمنی همورال و مقاومت ماهیان در برابر استرس های محیطی و مواجهه با باکتری *Yersinia ruckeri* در ماهیان قزل آلا ی رنگین کمان می گردد.

هدف از این مطالعه بررسی اثر پروبیوتیکی لاکتوباسیل جدا شده از دستگاه گوارش ماهی قزل آلا بر شاخص های رشد و فلور باکتریایی ماهی قزل آلا و نیز بررسی مقاومت ماهی قزل آلا در برابر استرپتوکوکوزیس در تیمارهای مختلف و مقایسه آن با گروه شاهد بود.

## مواد و روش کار

**تهیه باکتری:** باکتری مورد استفاده در این مطالعه جنس *Lactobacillus* بوده که از دستگاه گوارش ماهی قزل آلا جدا شد. این آزمایش قسمتی از پروژه مصوب بررسی امکان تولید پروبیوتیک بمنظور افزایش سیستم ایمنی ماهی قزل آلا *Oncorhynchus mykiss* در برابر استرپتوکوکوزیس بوده که در پژوهشکده اکولوژی دریای خزر انجام گردید. برای جداسازی این باکتری از محیط کشت MRS و جهت تأیید نهایی جنس لاکتوباسیلوس از تست تخمیر انواع قندها استفاده گردید (Zorriehzahra et al., 2016).

**اضافه کردن لاکتوباسیلوس به جیره:** ابتدا سوسپانسیون اولیه ای از *Lactobacillus* در محیط کشت BHI (Brain Heart Infusion) تهیه شد و به مدت ۲۴ ساعت در ۳۵ درجه سانتی گراد با دور ۱۵۰ دور در دقیقه انکوبه گردید. سلول‌های باکتری از محیط کشت BHI با استفاده از سانتریفیوژ سه گانه در دور ۵۰۰۰ دور در دقیقه به مدت ۱۵ دقیقه جداسازی شدند. این فرآیند دو بار تکرار شده و در هر مرحله مایع رویی دور ریخته شده و به رسوب باقیمانده، سرم فیزیولوژی اضافه شد. شمارش سلول باکتریایی به وسیله روش Optical Density Methods (OD) در ۶۰۰nm صورت گرفت، به طوری که جذب نوری ۰/۰۸ تا ۰/۱ تقریباً معادل  $1 \times 10^8$  باکتری در هر میلی لیتر در نظر گرفته شد. رقت‌های مورد نظر بر اساس رقت اولیه تهیه شدند. باکتری *Lactobacillus* در قالب تیمارهای مختلف (هر کدام ۲ تکرار) درسه (log 7, 8, 9) به غذای کنسانتره ماهی (بیومار) اضافه گردید و یک نمونه نیز بعنوان شاهد در نظر گرفته شد (Lara-Flores & Olvera-Noba, 2013).

## شاخص‌های رشد

فرمول ۱- میانگین وزن بر حسب g

$$WM = \frac{\text{مجموع وزن ماهیهای هر تیمار}}{\text{مجموع ماهیهای توزین شده}}$$

فرمول ۲- ضریب تبدیل غذایی

$$FCR = \frac{\text{مقدار غذای مصرف شده (g)}}{\text{مقدار افزایش وزن (g)}}$$

فرمول ۳- نسبت کارایی پروتئین (PER)

$$PER = \frac{\text{مقدار افزایش وزن بدن (g)}}{\text{مقدار مصرف پروتئین (g)}}$$

فرمول ۴- ضریب رشد ویژه (SGR)

میزان SGR بر حسب درصد از طریق زیر محاسبه گردید؛

$$SGR = \frac{(Inw_2 - Inw_1)}{t_2 - t_1} \times 100$$

در رابطه فوق  $w_1$  وزن اولیه در زمان  $t_1$  و  $w_2$  وزن ثانویه در زمان  $t_2$  می باشند و میزان وزن بر حسب گرم و میزان زمان بر حسب روز در نظر گرفته می‌شود (Kissil et al., 2001).

فرمول ۵- درصد بقاء (SR)

$$SR = \frac{\text{تعداد ماهیان نهایی}}{\text{تعداد ماهیان اولیه}} \times 100$$

درصد بقاء برای روشن شدن این نکته محاسبه می‌شود که چند درصد ماهیانی که به استخر معرفی شده‌اند در پایان دوره هنوز زنده‌اند.

**مواجهه‌سازی:** پس از انجام آزمون‌های میکروبی و اطمینان از عدم آلودگی ماهیان مورد بررسی به باکتری *Streptococcus iniae* جهت انجام آزمایش رویارویی، ابتدا از نمونه اولیه و خالص باکتری استرپتوکوک سوسپانسیون اولیه تهیه و پس از ۱۸ ساعت انکوباسیون در دمای ۳۰ درجه سانتیگراد و رساندن باکتری به رشد لگاریتمی، با لوله ۳ مک فارلند مورد مقایسه قرار گرفت. برای این کار از PBS (بافر فسفات) استفاده گردید تا رقت‌های مورد نیاز تهیه و با لوله ۳ مک فارلند مقایسه گردد (Rodas et al., 2002). پس از یکسان سازی کدورت دو لوله مک فارلند و سوسپانسیون میکروبی، ۰/۱ میلی لیتر از رقت  $\log 7$  باکتری بصورت داخل صفاقی به ماهیان قزل آلا رنگین کمان تزریق گردید و ماهیان مورد آزمایش به مدت ۱۴ روز مورد بررسی قرار گرفتند (غلظت نهایی جهت تزریق  $\log 6$ ).

غذادهی، ۲۴ ساعت قبل از تزریق باکتری قطع شد و پس از آن باکتری مورد نظر در لگاریتم مشخص تزریق گردید. پس از بروز علائم بیماری بین ۱۰-۷ روز، از اندام‌های مختلف نظیر کبد، کلیه و قلب با استفاده از روش Austin (۱۹۸۷) نمونه‌گیری صورت گرفت. کشت در محیط کشت بلاد آگار انجام شد و پس از نگهداری در گرمخانه در دمای ۳۵ درجه سانتیگراد به مدت ۴۸ ساعت، وجود یا عدم وجود پرگنه‌های مشکوک *Streptococcus iniae* مورد ارزیابی قرار گرفت. برای تعیین میزان بازماندگی ماهیان در مواجهه با باکتری بیماری‌زای استرپتوکوک از فرمول زیر استفاده گردید.

## نتایج

براساس جدول ۱، بیشترین افزایش وزن ماهی در تیمار حاوی لوگ ۹ لاکتوباسیلوس بوده (۸۸/۳۱ گرم)، مشاهده شده و تیمارهای حاوی لوگ ۹ (۷۸/۱۲ گرم)، لوگ ۷ (۷۵/۲۴ گرم) و نمونه شاهد (۶۶/۹۸ گرم) قرار داشتند. مطالعات آماری حاکی از وجود اختلاف معنی دار بین تیمارهای مختلف و همچنین تیمار شاهد در روز ۶۰ بود ( $p < 0.05$ ).

بازماندگی = تعداد ماهیان باقیمانده / تعداد کل ماهیان اولیه  $\times 100$

**تجزیه و تحلیل آماری:** برای تجزیه و تحلیل داده‌ها از آزمون آنالیز واریانس یکطرفه و جهت ارتباط معنی دار ما بین داده‌های هر گروه و از آزمون Duncan استفاده گردید. وجود یا عدم وجود اختلاف معنی دار با ضریب اطمینان ۹۵ و ارزش P در محدوده ۰/۰۵ تعیین شد.

جدول ۱: میانگین وزن بچه ماهی قزل آلا در تیمارهای مختلف (لاکتوباسیلوس و کنترل) در ابتدا و انتهای دوره

**Table 1: Mean weight of rainbow trout fry in different treatments (lactobacillus and control) at the first and the end of the trail**

زمان	شاهد	log 7	log 8	log 9
روز اول	۳۸/۳۳ ± ۶/۶۸ <sup>a</sup>	۳۸/۱۳ ± ۶/۹۵ <sup>a</sup>	۳۷/۱۲ ± ۷/۵۱ <sup>a</sup>	۳۷/۷۸ ± ۷/۴۴ <sup>a</sup>
روز ۶۰	۶۶/۹۸ ± ۱۲/۷۷ <sup>d</sup>	۷۵/۲۴ ± ۱۳/۴۱ <sup>c</sup>	۸۸/۳۱ ± ۱۵/۵۴ <sup>a</sup>	۷۸/۱۲ ± ۱۳/۸۴ <sup>bc</sup>

\*حروف متفاوت در هر ردیف نشان از اختلاف معنی دار مابین داده ها می باشد.

(۱/۷۵) و نمونه شاهد (۲/۱۳) قرار داشتند. مطالعات آماری حاکی از وجود اختلاف معنی دار ما بین تیمار دارای log 8 لاکتوباسیلوس با سایر تیمارها و شاهد بوده است ( $p < 0.05$ ).

**تاثیر تیمارهای مختلف بر ضریب تبدیل غذایی (FCR):** نتایج ضریب تبدیل غذایی در تیمارهای مختلف در جدول ۲ نشان داده شده است. بهترین نتیجه مربوط به تیمار حاوی log 8 لاکتوباسیلوس بوده (۱/۳۹)، log 9 لاکتوباسیلوس (۱/۶۵)، تیمار دارای log 7 لاکتوباسیلوس

جدول ۲: میانگین ضریب تبدیل غذایی بچه ماهی قزل آلا در تیمارهای مختلف (لاکتوباسیلوس و کنترل) در ابتدا و انتهای دوره

**Table 2: The mean feed conversion ratio (FCR) of rainbow trout fry in different treatments (lactobacillus and control) at the first and the end of the trail**

تیمار	شاهد	log 7	log 8	log 9
میانگین*	۲/۱۳ ± ۰/۱۲ <sup>c</sup>	۱/۷۵ ± ۰/۲۳ <sup>b</sup>	۱/۳۹ ± ۰/۰۷ <sup>a</sup>	۱/۶۵ ± ۰/۰۱ <sup>b</sup>

\*حروف متفاوت در هر ردیف نشان از اختلاف معنی دار مابین داده ها می باشد

لاکتوباسیلوس (۱/۳۲) و نمونه شاهد (۱/۰۷) قرار داشتند. مطالعات آماری حاکی از وجود اختلاف معنی دار ما بین تیمار دارای log 8 لاکتوباسیلوس با سایر تیمارها و شاهد بود. تیمارهای دیگر نسبت به شاهد اختلاف معنی داری دارند ولی بین خود فاقد اختلاف معنی دار بودند.

**تاثیر تیمارهای مختلف بر بازده مصرف پروتئین (PER):** نتایج بازده مصرف پروتئین در تیمارهای مختلف در جدول ۳ نشان داده شده است. بهترین نتیجه مربوط به تیمار حاوی log 8 لاکتوباسیلوس بوده (۱/۶۴) و پس از آن log 9 لاکتوباسیلوس (۱/۳۹) تیمار دارای log 7

جدول ۳: میانگین بازده مصرف پروتئین بچه ماهی قزل آلا در تیمارهای مختلف (لاکتوباسیلوس و کنترل) در ابتدا و انتهای دوره

**Table 3: The mean protein efficiency ratio (PER) of rainbow trout fry in different treatments (lactobacillus and control) at the first and the end of the trail**

شاهد	log 7	log 8	log 9
۱/۰۷ ± ۰/۰۶ <sup>c</sup>	۱/۳۲ ± ۰/۱۸ <sup>b</sup>	۱/۶۴ ± ۰/۰۸ <sup>a</sup>	۱/۳۹ ± ۰/۰۶ <sup>b</sup>

\*حروف متفاوت در هر ردیف نشان از اختلاف معنی دار مابین داده ها می باشد

تیمار دارای log 8 لاکتوباسیلوس با سایر تیمارها و شاهد بوده است. در خصوص سایر تیمارهای مورد استفاده و شاهد، در برخی از موارد اختلاف معنی دار مشاهده شد ( $p < 0.05$ ).

تأثیر تیمارهای مختلف بر میانگین ضریب رشد ویژه (SGR): با توجه به جدول ۴ بهترین نتیجه مربوط به تیمار حاوی log 8 لاکتوباسیلوس بوده (۱/۵۲) و پس از آن log 9 لاکتوباسیلوس (۱/۲۹)، تیمار دارای log 7 لاکتوباسیلوس (۱/۲۳) و نمونه شاهد (۱) قرار داشتند. مطالعات آماری حاکی از وجود اختلاف معنی دار ما بین

جدول ۴: میانگین ضریب رشد ویژه بچه ماهی قزل آلا در تیمارهای مختلف (لاکتوباسیلوس و کنترل) در ابتدا و انتهای دوره

Table 4: The mean specific growth rate (SGR) of rainbow trout fry in different treatments (lactobacillus and control) at the first and the end of the trail

تیمار	شاهد	log 7	log 8	log 9
میانگین*	۱/۰۱±۰/۰۶ <sup>d</sup>	۱/۲۳±۰/۱۳ <sup>c</sup>	۱/۵۲±۰/۱۱ <sup>a</sup>	۱/۳۹±۰/۰۱ <sup>bc</sup>

\*حروف متفاوت در هر ردیف نشان از اختلاف معنی دار مابین داده ها می باشد

با سایر تیمارها و شاهد بوده ( $p < 0.05$ ) ولی با این وجود بین ۳ تیمار فوق اختلاف معنی وجود نداشته است. در خصوص سایر تیمارهای مورد استفاده و شاهد، در برخی از موارد اختلاف معنی دار مشاهده شد ( $p < 0.05$ ).

میانگین درصد بقاء (بازماندگی): با توجه به جدول ۵ بیشترین میانگین درصد بقاء مربوط به تیمار دارای log 8 و log 9 باکتری لاکتوباسیل بوده (۱۰۰ درصد) و پس از آن log 7 (۹۲/۵ درصد) و تیمار شاهد (۸۵ درصد) قرار داشتند. مطالعات آماری حاکی از وجود اختلاف معنی دار ما بین تیمار دارای log 8 و log 9 لاکتوباسیلوس

جدول ۵: میانگین درصد بقاء بچه ماهی قزل آلا در تیمارهای مختلف (لاکتوباسیلوس و کنترل) در ابتدا و انتهای دوره

Table 5: The mean survival rate of rainbow trout fry in different treatments (lactobacillus and control) at the first and the end of the trail

تیمار	شاهد	log 7 لاکتوباسیل	log 8 لاکتوباسیل	log 9 لاکتوباسیل
میانگین*	۸۵±۰/۰ <sup>c</sup>	۹۲/۵±۳/۵۴ <sup>b</sup>	۱۰۰±۰/۰ <sup>a</sup>	۱۰۰±۰/۰ <sup>a</sup>

\*حروف متفاوت در هر ردیف نشان از اختلاف معنی دار مابین داده ها می باشد

جدول ۶: میانگین درصد بقاء در تیمارهای مختلف (لاکتوباسیلوس و کنترل) در بچه ماهی قزل آلا بعد از مواجهه با

#### *Streptococcus iniae*

Table ۶: The mean survival rate of rainbow trout fry in different treatments (lactobacillus and control) after challenge to *Streptococcus iniae*

تیمار	تعداد تلف شده	تعداد باقیمانده	درصد بقاء
Log 8 لاکتوباسیل	۲	۵۸	۹۶/۶۶±۲/۴۱
Log 7 لاکتوباسیل	۶	۵۴	۹۰/۲۱±۲/۴۹
Log 9 لاکتوباسیل	۵	۵۵	۹۱/۶۶±۲/۶۸
شاهد	۴۵	۱۵	۲۵/۳۸±۳/۴۶

تعداد نمونه = ۶۰

انجام شده نشان داد که بیشترین میانگین وزن مربوط به تیمارهای حاوی باکتری *Lactobacillus* (log 8) بوده است. مطالعات آماری حاکی از وجود اختلاف معنی دار بین تیمارهای مختلف و همچنین تیمار شاهد در روز ۶۰ بوده است ( $p < 0.05$ ). هیچگونه اختلاف معنی داری ما

#### بحث

در تحقیق حاضر تأثیر پروبیوتیکی لاکتوباسیلوس جدا شده از ماهی قزل آلا در سه 7, 8, 9 log بر شاخص های مختلف رشد، درصد بازماندگی و مواجهه سازی با باکتری بیماریزا مورد ارزیابی قرار گرفت. نتایج آزمایشات

کننده باسیلوس، میزان تلفات در بچه ماهیان قزل آلی مواجهه داده 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 نشان از بیماریزایی بالای گونه *S. iniae* می باشد. در مطالعه انجام شده توسط Mesalhy و همکاران در سال ۲۰۰۸ مشخص گردید که در تیمارهای دریافت کننده *Bacillus pumilus*، در مواجهه با *Aeromonas hydrophila* در  $\log 8$  درصد بازماندگی بطور معنی داری افزایش داشته است. لوگی از باکتری که جهت تزریق در نظر گرفته شد  $\log 6$  بوده که باعث بروز تلفات در ماهی در تیمار شاهد شد. در مطالعه انجام شده توسط Son در سال ۲۰۰۹ مشخص گردید هنگامیکه در جیره غذایی ماهی *Catla* از باکتری *Bacillus circulans* استفاده نشود و در معرض *Aeromonas hydrophila* قرار داده شود درصد بازماندگی آن به  $6/66$  درصد رسیده، این در حالیست که در تیمارهای دریافت کننده باسیلوس درصد بازماندگی  $100$  درصد بود. نتایج تحقیق حاضر نیز حاکی از بازماندگی  $96/66$  درصد ماهی قزل آلی مواجهه شده با گونه اینیه در  $\log 8$  باکتری *Lactobacillus* می باشد. بنابراین انتخاب دوز مناسب باکتری بسیار حائز اهمیت می باشد. نتایج مطالعات Al-Dohail و همکاران در سال ۲۰۱۱ نشان داد که استفاده بهنگام از *lactobacillus acidophilus* در جیره غذایی گربه ماهی آفریقایی African catfish مقاومت ماهی در برابر *Staphylococcus Aeromonas hydrophila* و *Streptococcus agalactiae* افزایش می یابد. یکی از گونه های اشاره شده در تحقیق فوق *Streptococcus agalactiae* بوده که یکی از گونه های جدا شده از مزارع ماهیان سردآبی ایران می باشد (پورغلام و همکاران، ۱۳۹۵). مطالعات مختلفی در خصوص استفاده از باکتری-های لاکتوباسیل به منظور افزایش مقاومت ماهیان در برابر بیماریهای شایع صورت گرفته و در اکثر موارد مشخص گردید که این گروه از باکتریها دارای نتایج مثبت بودند. این گروه از باکتریها بواسطه تولید متابولیت های مختلف از جمله باکتریوسین ها، اسیدهای آلی، آب اکسیژنه و سایر متابولیتها دارای خواص ضد میکروبی بوده و مکانیسمهای مذکور آنها را قادر می سازد که براحتی در دستگاه گوارش ماهی جایگزین شوند (Lara-Flores & Olvera-Noba, 2013).

بین وزن داده ها در زمان شروع آزمایش نبوده است. بهترین ضریب تبدیل غذایی، بازده مصرف پروتئین، ضریب رشد ویژه و بازماندگی در تیمارهای حاوی باکتری ( $\log 8$  باکتری *Lactobacillus*) بوده و تیمارهای دیگر در مرحله بعد قرار داشتند.

بر اساس تحقیق انجام شده توسط Akrami و همکاران در سال ۲۰۱۳ بر روی لارو فیل ماهی *Huso Hosu* بیشترین GR مربوط به تیمار دریافت کننده  $9 \times 10^9$  CFU/g لاکتوباسیلوس کورواتوس بوده در صورتیکه در مطالعه حاضر بهترین نتیجه مربوط به  $\log 8$  گزارش شد. همچنین در بررسی دیگر توسط Akrami و همکاران (۲۰۱۳) بر روی لارو قره برون *Acipenser persicus* بیشترین GR مربوط به تیمار دریافت کننده  $2 \times 10^9$  CFU/g *Leuconostoc mesenteroides* بود. نتایج بررسی ایشان نشان داد که مکمل باکتریایی در دوزهای ذکر شده بر سرعت رشد ویژه نیز مؤثر می باشد. به منظور تعیین اثر پروبیوتیکی باکتری لاکتوباسیل در سه  $\log 7, 8, 9$  بر بازماندگی بچه ماهیان قزل آلا در حوضچه های پرورشی، درصد بازماندگی آنها در انتهای دوره آزمایش مورد بررسی قرار گرفت. نتایج نشان داد که بطور کلی درصد بازماندگی بالای  $90$  درصد بوده ولی بیشترین درصد مربوط به  $(8,9)$   $\log$  لاکتوباسیل بوده است ( $100$  درصد). نتایج مطالعه Bagheri و همکاران در سال ۲۰۰۸ در خصوص استفاده از پروبیوتیک در لارو ماهی قزل آلا با نتایج مطالعه حاضر مطابقت داشته و بیشترین درصد بقاء به  $\log 8$  اختصاص داشته است.

نتایج آزمایشات مواجهه سازی ماهی در برابر *Streptococcus iniae* نشان داد که بیشترین درصد بقاء مربوط به تیمارهای دریافت کننده باکتری لاکتوباسیل در  $\log 8$  ( $96/66$ ) و تیمارهای دیگر در مرحله بعد قرار داشتند و تیمار شاهد با کمترین درصد بقاء ( $25/38$ ) در مرحله آخر قرار داشت. استرپتوکوکوزیس بیماری باکتریایی شایع در مزارع پرورش ماهیان سردآبی در ایران می باشد که گونه هایی نظیر *Streptococcus iniae*، *Streptococcus oberois* و *Streptococcus faecium* از استان های مختلف جدا شده اند (پورغلام و همکاران، ۱۳۹۵). بیماریزایی گونه های جدا شده متفاوت بوده و بیشترین درصد مربوط به اینیه بوده و گونه *S.oberois* از بیماریزایی کمتری برخوردار می باشد. نتایج مطالعات کامکار در سال ۱۳۹۰ نشان داد که در تیمارهای دریافت

- stellate sturgeon (*Acipenser stellatus*) juvenile. *Fish & shellfish immunology*, 35(4): 1235-1239.
- Al-Dohail, M. and Ismael, N.E.M., 2011.** Evaluation of commercial live baker, yeast, *Saccharomyces cerevisiae* as a growth and immunity promoter for Fry Nile tilapia *Oreochromis niloticus* challenged in situ with *Aeromonas hydrophila*. *Aquaculture*, 280: 185-189.
- Austin, B. and Austin, D.A., 1987.** Bacterial fish pathogens: disease in farmed and wild fish. Ellis Horwood, Chichester. UK., 364P.
- Bagheri, T., Hedayati, S.A., Yavari, V., Alizade, M. and Farzanfar, A., 2008.** Growth, survival and gut microbial load of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) fry given diet supplemented with probiotic during the two months of first feeding. *Turkish Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, 8(1): 43-48.
- Balcázar, J.L., Vendrell, D., De Blas, I., Ruiz-Zarzuola, I., Gironés, O. and Múzquiz, J.L., 2007.** In vitro competitive adhesion and production of antagonistic compounds by lactic acid bacteria against fish pathogens. *Veterinary microbiology*, 122(3): 373-380. DOI:10.5402/2012/916845.
- Gatesoupe, F.J., 1999.** The use of probiotics in aquaculture. *Aquaculture*, 180: 147-165.
- Gatesoupe, F.J., 2008.** Updating the importance of lactic acid bacteria in fish farming: natural occurrence and probiotic treatments. *Journal of molecular microbiology and biotechnology*, 14(1-3): 107-114.
- Gatlin III, D.M., 2003.** Nutrition and fish health. *Fish nutrition*, 3: 671-702.
- منابع**
- پورغلام، ر.، شریف روحانی، م.، ساسان، ح.، لالویی، ف.، صفری، ر.، سعیدی، ع.ا. و سلطانی، م.، ۱۳۹۵. تولید واکسن (زنده) نو ترکیب علیه بیماری استریپتوکوکوزیس برای ایمن کردن قزل آلاهی رنگین کمان (فاز یک). گزارش نهایی. موسسه تحقیقات علوم شیلاتی کشور. ۷۴ صفحه.
- توکمه‌چی، ا. و محسنی، م.، ۱۳۹۰. مطالعه تاثیر پروبیوتیک‌های *Saccharomyces cerevisiae* و *Lactobacillus casei* بر رشد، بقا، پاسخ‌های ایمنی و مقاومت در برابر برخی از استرس‌های محیطی و مواجهه باکتریایی در ماهی قزل آلاهی رنگین کمان (*Oncorhynchus mykiss*). پایان نامه، دانشگاه ارومیه.
- قلجایی فرد، ا.، خارا، ح. و شناور ماسوله، ع.، ۱۳۹۵. تاثیر باکتری (*Lactobacillus plantarum*) KC426951 جداسازی شده از روده قزل آلاهی رنگین کمان استان گیلان بر شاخص‌های خونی و ایمنی بچه ماهی قزل آلاهی رنگین کمان. فیزیولوژی و تکوین جانوری. ۵(۲): ۱۱۱-۱۲۴.
- کامکار، م.، ۱۳۹۰. بررسی تاثیر باسیلوس سوبتیلیس به عنوان پروبیوتیک در کنترل استریپتوکوکوزیس در ماهی قزل آلاهی رنگین کمان. پایان نامه، دانشگاه تنکابن.
- نظری، ک.، شمسایی مهرجان، م.، ایلا، ن.، شریف پور، ع. و کمالی، ا.، ۱۳۹۶. اثرات سلنیوم آلی و معدنی بر عوامل رشد، پارامترهای خونی و ایمنی شناسی بچه ماهیان رنگین کمان (*Oncorhynchus mykiss*). *مجله علمی شیلات ایران*، ۲۶(۳): ۱۳۸-۱۲۹.
- یاری، ا.، نعمتی، م. و پوراحمد، ف.، ۱۳۹۶. بررسی فنوتیپی و ژنوتیپی مقاومت به آنتی بیوتیک‌های وسیع الطیف در کوکسی‌های گرم مثبت جدا شده از ماهیان قزل آلاهی رنگین کمان در استان ایلام. *مجله علمی شیلات ایران*، ۲۶(۳): ۱-۱۱.
- Akrami, R., Iri, Y., Rostami, H.K. and Mansour, M.R., 2013.** Effect of dietary supplementation of fructooligosaccharide (FOS) on growth performance, survival, lactobacillus bacterial population and hemato-immunological parameters of

- Gomez-Gil, B., Roque, A. and Turnbull, J.F., 2000.** The use and selection of probiotic bacteria for use in the culture of larval aquatic organisms. *Aquaculture*, 191(1): 259-270.
- Irianto, A. and Austin, B., 2002.** Probiotics in aquaculture. *Journal of fish diseases*, 25(11): 633-642. Doi:10.1046/j.1365-2761.2002.00422.x/abstract
- Lara-Flores, M. and Olvera-Novoa, M.A., 2013.** The use of lactic acid bacteria isolated from intestinal tract of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*), as growth promoters in fish fed low protein diets. *Latin American Journal of Aquatic Research*, 41(3): 490-497. DOI: 103856/vol41-issue3-fulltext-12
- Martínez Cruz, P., Ibáñez, A.L., Monroy Hermosillo, O.A. and Ramírez Saad, H.C., 2012.** Use of probiotics in aquaculture. *International Scholarly Research Network*. ISRN microbiology. Article ID 916845, 13P.
- 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. Doi:10.1111/j.1365-2109.2008.01932.x/abstract
- Nikoskelainen, S., Ouwehand, A., Bylund, G., Salminen, S. and Lilius, E.M., 2003.** Immune enhancement in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) by potential probiotic bacteria (*Lactobacillus rhamnosus*) fish and shellfish immunology, 15: 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: 241-254
- Rodas, B.A., Angulo, J.O., Cruz, J. and Garcia, H.S., 2002.** Preparatian of probiotic buttermilk with *Lactobacillus reuteri*. *Milchwissenschaft Milk Science International*. 57: 26-28
- Son, F.J., Fitzyceraid, 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.
- Vadstein, O., 1997.** The use of immunostimulation in marine larviclar: possibilities and challenges. *Aquaculture*. 155: 401-417
- Vendrell, D., Balcazar, J., Blas, I. and Ruiz-Zarzuela, J., 2008.** Protection of rainbow trut (*Oncorhynchus mykiss*) from lactococosis by probiotic bacterial. *Fish and Shellfish Immunology*. 31: 337-345.
- 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: 269-280
- Zorriehzahra, M.J., Delshad, S.T., Adel, M., Tiwari, R., Karthik, K., Dhama, K. and Lazado, C.C., 2016.** Probiotics as beneficial microbes in aquaculture: an update on their multiple modes of action: a review. *Veterinary Quarterly*, 36(4): 228-241.



## Effects of *Lactobacillus* on growth parameters, survival rate and resistance of rainbow trout (*Onchorhynchus mykiss*) to *Streptococcus iniae*

Safari R.<sup>1</sup>; Yaghoubzadeh Z.<sup>1\*</sup>

\* za\_yaghoub@yahoo.com

1- Iranian Fisheries Science Research Institute (IFSRI), Caspian Sea Ecology Research Center (CSERC), Agricultural Research, Education and Extension Organization (AREEO), Sari, P.O. Box 961, Iran

### Abstract

In this study, the effects of *Lactobacillus* which was isolated from the gut of rainbow trout were evaluated on growth parameters, survival rate and resistance of rainbow trout to *Streptococcus iniae*. This bacterium was added to the fish diet in 3 treatments (log 7, 8 and 9) and a control treatment was considered. The effects of various treatments on growth parameters and survival were evaluated in day 30 and day 60. At the final stage, resistance of treated fish to streptococcosis was evaluated. The results showed that *Lactobacillus* was able to improve the growth parameters (weight, feed conversion ratio, protein efficiency ratio, coefficient of obesity, specific growth rate and protein yield coefficient) and survival rate of fish in which the log 8 LAB showed a significant difference compared to the other treatments and the control treatment. The challenge of rainbow trout with *Streptococcus iniae* indicated that the highest survival rate was observed in the treatment with the log 8 LAB (96.66%), whereas the lowest survival rate was observed in the control treatment (25.38%). These results indicated that *Lactobacillus* which was isolated from the gut of rainbow trout showed probiotic properties and improved growth parameters of fish. Moreover, it increased the resistance of rainbow trout to streptococcosis.

**Keywords:** *Lactobacillus*, Rainbow trout, Growth parameters, *Streptococcus iniae*

---

\*Corresponding author