Study on effect feedings with probiotics in increasing resistance to *Aeromonas hydrophila* and Changes in gut bacterial communities *Sander lucioperca*

Monireh Faeed *
PhD of Microbiology, In land waters Aquaculture research center, Iranian Fisheries Sciences Research Institute (*IFSRI*), Agriculture Research Education and Extension Organization (*AREEO*) Anzali, Iran, m_faeed@yahoo.com
Rouha KasraKermanshahi
Professor of Microbiology, Department of Microbiology, Faculty of biological Sciences, AlzahraUniversity, Tehran, Iran, rkasra@yahoo.com
Mohamad PourKazemi
Professor of Genetic of aquatic, Iranian Fisheries Science Research Institute (*IFSRI*), Agriculture Research Education and Extension Organization (*AREEO*) Tehran, Iran, mpourkazemi17@yahoo.com
Mojtaba Darboee
Professor of Microbiology**,** Department of Microbiology, Faculty of Basic Sciences,Islamic Azad University, Shiraz, Iran, m.darbouy@lycos.com
Somayeh Haghighi karsidani
Assistant professor of Health aquatic diseases, Department of Fisheries, Islamic Azad University, Bandar-Anzali Branch, Guilan, Iran, haghighikarsidani@yahoo.com

Abstract

Introduction: This study evaluated the effect of dietary administration *Lactobacillus brevis* MF01 on survival rate of total bacteria, lactic acid bacteria intestinal tract fish and changes in gut bacterial communities *Sander lucioperca*.

Materials and methods: *Lactobacillus brevis* was isolated and identified from intestine of *Sander lucioperca*by biochemical and molecular tests**.**Fish were fed with dietary administration containing A1 (*L.brevis* MF01 10^{10} CFU / g), A2 (*L. brevis* MF01 10^{8}CFU / g) and the control group (without *Lactobacillus*) for 45 days. At the end of the feeding period, fish were challenged with 4.5×10^{8}CFU /ml *Aeromonas hydrophila*. The intestinal micro biota includes lactic acid bacteria and total bacteria at different times (15,30, 45 days) and 15 days after stopping feedings with probiotics were performed by using MRS agar, Plate count agar media.

Results: The lactic acid bacteria levels were significantly increased compared to the control group following probiotics administration in diet (P,< 0.05). The highest number of intestinal micro biota was observed in *Lactobacillus brevis* 10^{10}Cfu /g treatment (A1)(P < 0.05). Any lactic acid bacteria of the intestine, was not detected in the control group after 15 days. After the end of feeding, the number of total bacteria and Lactic acid bacteria in all groups was decreased. The highest and lowest survival rate, respectively were treatments A1 (86%) and the control group (60%).

Discussion and conclusion: The results showed that addition of *Lactobacillusbrevis* as an additive in feeding of *sander lucioperca*, significantly increased the lactic acid bacteria, the intestinal bacteria and the survival rate was compared to the control group (injected).

Key words: *Lactobacillus brevis*, Probiotic, *Aeromonas hydrophila*, Intestinal micro biota, *Sander lucioperca*

* Corresponding author
Received: July 13, 2016 / **Accepted:** November 25, 2017

فصلنامه علمی- پژوهشی زیست‌شناسی میکروارگانیسم‌ها
سال هفتم، شماره ۲۷، پاییز ۱۳۹۷، صفحه ۱۲- ۱
تاریخ دریافت: ۱۳۹۵/۰۴/۲۳ – تاریخ پذیرش: ۱۳۹۶/۰۹/۰۴

بررسی تأثیر غذادهی با پروبیوتیک بر افزایش مقاومت در برابر *آئروموناس هیدروفیلا* و تغییر جوامع باکتریایی دستگاه گوارش ماهی سوف سفید

منیره فئید*: دکترای میکروبیولوژی، سازمان تحقیقات آموزش و ترویج کشاورزی، انزلی، ایران، m_faeed@yahoo.com
روحا کسری کرمانشاهی: استاد میکروبیولوژی، گروه میکروبیولوژی، دانشکدهٔ علوم زیستی، دانشگاه الزهرا، تهران، ایران، rkasra@yahoo.com
محمد پورکاظمی: استاد ژنتیک آبزیان، سازمان تحقیقات آموزش و ترویج کشاورزی، تهران، ایران، mpourkazemi17@yahoo.com
مجتبی داربویی: استاد میکروبیولوژی، گروه میکروبیولوژی، دانشکدهٔ علوم پایه، دانشگاه آزاد شیراز، ایران، m.darbouy@lycos.com
سمیه حقیقی کارسیدانی: استادیار بهداشت و بیماری‌های آبزیان، گروه شیلات، دانشگاه آزاد انزلی، ایران، haghighikarsidani@yahoo.com

چکیده

مقدمه: در پژوهش حاضر، اثر غذادهی *لاکتوباسیلوس برویس* MF01 بر میزان بقای باکتری‌های کل و باکتری‌های لاکتیک‌اسید روده ماهی و تغییر جوامع باکتریایی دستگاه گوارش ماهی سوف سفید بررسی شد.

مواد و روش‌ها: باکتری *لاکتوباسیلوس برویس* از روده ماهی سوف سفید جداسازی و با آزمایش‌های بیوشیمیایی و مولکولی تأیید شد. ماهیان شش هفته با *لاکتوباسیلوس برویس* در دوزهای $۱۰^{۸}$ و $۱۰^{۱۰}$ (تعداد کل فلور باکتریایی بر گرم) و شاهد غذادهی و خون‌گیری در پایان دوره غذادهی انجام و سپس با $۴/۵ \times ۱۰^{۸}$ (تعداد کل فلور باکتریایی بر میلی‌لیتر) باکتری *آئروموناس هیدروفیلا* مواجهه‌سازی شدند. نرخ بقای ماهیان به‌طور روزانه طی دوره هفت روزه ارزیابی شد. باکتری‌های روده‌ای شامل لاکتیک‌اسید باکتری‌ها و باکتری‌های کل روده در زمان‌های مختلف (دو، چهار و شش هفته) و دو هفته پس از توقف غذادهی با پروبیوتیک روی محیط پلیت‌کانت آگار و محیط لاکتوباسیلوس آگار (ام‌آراس آگار) بررسی شد.

نتایج: تعداد باکتری‌های لاکتیک‌اسید و تعداد کل باکتری‌های میکروبیوتای روده‌ای در تیمارهای پروبیوتیک به‌طور معناداری بیشتر از گروه شاهد بودند ($P<۰/۰۵$). بیشترین تعداد باکتری‌های لاکتیک‌اسید در تیمار $۱۰^{۱۰}$ (تعداد کل فلور باکتریایی بر گرم) *لاکتو باسیلوس برویس* مشاهده شدند. در دو هفته اول، باکتری‌های لاکتیک‌اسید از روده گروه شاهد جداسازی شدند و پس از آن، هیچ باکتری لاکتیک‌اسیدی از روده شاهد جداسازی نشد. پس از قطع غذادهی با پروبیوتیک، تعداد باکتری‌های کل و پروبیوتیک در تمام تیمارها کاهش یافتند و بیشترین و کمترین میزان بقا به‌ترتیب در تیمارهای **A1** (۸۶ درصد) و شاهد (۶۰ درصد) دیده شد.

بحث و نتیجه‌گیری: نتایج بررسی حاضر نشان دادند افزودن *لاکتوباسیلوس برویس* به جیره ماهی سوف سفید سبب افزایش معنادار میزان باکتری‌های لاکتیک‌اسید، باکتری‌های کل روده‌ای ماهی و میزان بقای آن نسبت به گروه شاهد (تزریق) می‌شود.

واژه‌های کلیدی: *لاکتوباسیلوس برویس*، *آئروموناس هیدروفیلا*، میکروبیوتای روده‌ای، سوف سفید

* نویسندهٔ مسئول مکاتبات

Copyright©2018, University of Isfahan. This is an Open Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (http://creativecommons.org/licenses/BY-NC-ND/4.0/), which permits others to download this work and share it with others as long as they credit it, but they cannot change it in any way or use it commercially.

مقدمه

آبزی‌پروری از فعالیت‌های مهم در زمینه تولید غذا در دنیاست. تقاضای جهانی برای غذای دریایی در حال افزایش و این صنعت با تولید پروتئین حیوانی معادل ۳۲/۴ میلیون تن در سال ۲۰۰۰ به میزان ۶۶/۶ میلیون تن در سال ۲۰۱۲ رسیده است (۱). به علت کمبود منابع آبی در ایران، پرورش انبوه و متراکم آبزیان جایگزین روش‌های نیمه‌متراکم و غیرمتراکم شده و ماهیان پرورشی را در معرض بیماری و تلفات متعاقب آن قرار داده است (۲). باتوجه به محدودیت استفاده از آنتی‌بیوتیک‌ها و کارایی کم واکسن‌ها در مزارع پرورش ماهی، استفاده از محرک‌های ایمنی مانند پروبیوتیک‌ها، پری‌بیوتیک‌ها و سین‌بیوتیک‌ها جایگزین مناسب داروها شده است. پروبیوتیک‌ها میکروب‌های زنده‌ای هستند که به علت تنظیم و تعادل میکروب‌های ناحیه گوارشی (روده‌ای)، به‌شکل افزودنی غذایی استفاده می‌شوند. تأثیر مفید پروبیوتیک‌ها در آبزیان شامل ایجاد شرایط مناسب در دستگاه گوارش برای افزایش جذب و هضم مواد غذایی و بهینه‌سازی میزان غذادهی، افزایش قابلیت‌های سیستم ایمنی ماهی در مواجهه با بیماری‌های عفونی، تعدیل اسیدیته دستگاه گوارش برای رشد و تکثیر گونه‌های مفید نظیر باکتری‌های لاکتیک‌اسید و ابتلای کمتر به بیماری‌ها، افزایش رشد، بقا و بهبود وضعیت آب است. *لاکتوباسیل‌ها*، میله‌ای‌شکل، گرم مثبت و از باکتری‌های تولیدکننده لاکتیک‌اسید هستند که با تولید ترکیبات ضدمیکروبی مانند آب‌اکسیژنه، باکتریوسین‌ها و غیره در محیط روده از تهاجم عوامل بیماری‌زای واردشده به روده ماهی ممانعت می‌کنند (۳). عفونت‌های باکتریایی یکی از عوامل تلفات در مزارع پرورش ماهی محسوب می‌شوند و *آئروموناس هیدروفیلا* یکی از باکتری‌های مهم و عامل بیماری‌زا در ماهیان گرمابی است (۴). این باکتری، متحرک و عامل بیماری‌زا در ماهیان آب شیرین و شور است و در کپور، مارماهی، شیرماهی، گربه‌ماهی، تیلاپیا و قزل‌آلای رنگین‌کمان، سپتی‌سمی هموراژیک ایجاد می‌کند (۵ و ۶). ماهی سوف سفید[1] یکی دیگر از ماهیانی است که طبق گزارش‌های فائو[2] نسبت به این باکتری حساس است (۷). ماهی سوف سفید از ماهیان باارزش و اقتصادی دریای خزر است که در تالاب انزلی و سد ارس زندگی می‌کند. مطالعه‌های اندکی در زمینه این ماهی وجود دارند و بیشتر مطالعه‌ها در زمینه زیست‌شناسی و ژنتیک آن هستند (۸). یکی از کاربردهای پروبیوتیک‌ها، افزایش قابلیت‌های سیستم ایمنی در مواجهه با بیماری عفونی است و از این رو، افزودن پروبیوتیک‌ها به‌شکل مکمل غذایی سبب افزایش رشد و بقای آبزیان می‌شود. هدف پژوهش حاضر، بررسی تأثیر پروبیوتیک جداشده از ماهی سوف سفید و افزودن آن به‌شکل مکمل غذایی برای افزایش مقاومت و بقای این ماهی در مواجهه‌سازی با باکتری *آئروموناس هیدروفیلا*ست.

مواد و روش‌ها

جداسازی و شناسایی *لاکتوباسیلوس برویس*: تعداد ۵۵ قطعه ماهی سوف سفید با میانگین وزن ۲۵ تا ۱۰۰گرم از استخرهای پرورشی استان گیلان طی تابستان و پاییز ۱۳۹۳ به‌طور زنده به آزمایشگاه باکتری‌شناسی پژوهشکده آبزی‌پروری آب‌های داخلی انتقال داده شدند. پس از بی‌هوش‌کردن ماهی‌ها در شرایط استریل، محوطه شکمی آنها برش داده شد و محتویات روده

خارج و هموژن شدند. سپس محتویات روده روی محیط‌کشت ام‌آراس آگار[۳] به‌شکل پورپلیت و جار بی‌هوازی به مدت ۴۸ تا ۷۲ ساعت در دمای ۳۰ درجه سانتی‌گراد گرمخانه‌گذاری شدند. سپس از کلنی‌های رشدیافته، کشت مجدد تهیه شد و باکتری‌های ایزوله‌شده با آزمایش‌های بیوشیمیایی نظیر کاتالاز، اکسیداز، احیای نیترات، تولید گاز از گلوکز، حرکت و تخمیر قندها بررسی شدند و سویه *لاکتوباسیلوس برویس*[۴] با کلید شناسایی برجی شناسایی شد (۹). سویه از نظر مولکولی نیز تأیید و با پرایمرهای عمومی باکتری‌ها ردیابی و با پرایمرهای رفت پرایمر (*CTCAAA ACT AAACAA AGT*) و برگشت (*TTCCTTGTA CAC ACCGCC CGT CA*) ویژه جنس *لاکتوباسیلوس*، تأیید جنس شد. واکنش زنجیره پلیمرازی برای لاکتوباسیل‌ها شامل چرخه‌های واسرشت‌سازی اولیه در ۹۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۵ دقیقه، ۳۹ چرخه با مرحله واسرشت‌سازی در ۹۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱ دقیقه، مرحله اتصال آغازگر در دمای ۵۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۳۰ ثانیه، بسط در ۷۲ درجه سانتی‌گراد به مدت ۲ دقیقه و در نهایت، چرخه بسط نهایی در ۷۲ درجه سانتی‌گراد به مدت ۵ دقیقه انجام شد. توالی‌ها برای تأیید نهایی به کشور دانمارک فرستاده شدند و در نهایت، با نام *لاکتوباسیلوس برویس* (*KR021404.1* MF01) در پایگاه بانک جهانی ژنوم ثبت شد (۹-۱۱). سپس با استفاده از نرم‌افزار Mega6 با نتایج سایر پژوهشگران مقایسه شد و نمونه‌های توالی‌یابی‌شده برای بررسی آماری، تعیین میزان درجه خویشاوندی و بررسی روابط فیلوژنی با نرم‌افزار Clustal W مقایسه و درخت‌های فیلوژنی با روش UPGMA ترسیم و مقایسه شدند.

کشت باکتری *آئروموناس هیدروفیلا*: *آئروموناس هیدروفیلا*[۵] (ATCC7966) در محیط برین‌هرت‌اینفیوزیون آگار کشت و به مدت ۱۸ تا ۲۴ ساعت در دمای ۳۰ درجه سانتی‌گراد گرمخانه‌گذاری و سپس با آزمون‌های بیوشیمیایی تأیید شد. همچنین در محیط آب‌گوشتی انفیوزیون مغز و قلب حاوی ۴۰ درصد گلیسیرین استریل در فریزر منفی ۸۰ برای استفاده طولانی‌مدت نگهداری شد.

بررسی فعالیت آنتاگونیستی: از روش کشت دولایه برای انجام این آزمایش استفاده شد. ۵۰ میکرولیتر سوسپانسیون *لاکتوباسیلوس برویس* به ۲۰ میلی‌لیتر محیط ام‌آراس مایع افزوده و به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۳۰ درجه سانتی‌گراد گرمخانه‌گذاری شد. ۱۰ میلی‌لیتر محیط باکتریایی به مدت ۱۰ دقیقه در ۳۰۰۰Rpm سانتریفیوژ شد و رسوب حاصل با سرم فیزیولوژی استریل به‌شکل سوسپانسیون درآمد و با استاندارد نیم مک فارلند مقایسه و در دستگاه اسپکتوفتومتر با طول موج ۶۲۵ نانومتر برابر با $۱/۵\times۱۰^{۸}$ (تعداد کل فلور باکتریایی بر گرم)[۶] تنظیم شد. رقت‌های $۱۰^{-۶}$ تا $۱۰^{-۱۰}$ تهیه و روی محیط ام‌آراس آگار،کشت نقطه‌ای داده شدند و به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۳۰ درجه سانتی‌گراد به‌شکل بی‌هوازی گرمخانه‌گذاری شدند. سپس ۱۰ میلی‌لیتر باکتری *آئروموناس هیدروفیلا* رشدیافته در محیط تریپتیکازسویا آگار[۷] در دمای ۳۰ درجه سانتی‌گراد به ۸ میلی‌لیتر محیط‌کشت مولرهینتون آگار با دمای ۴۵ تا ۵۰ درجه سانتی‌گراد منتقل و روی پلیت حاوی *لاکتوباسیلوس برویس* ریخته شد. پلیت‌ها دوباره به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۳۰ درجه سانتی‌گراد گرمخانه‌گذاری شدند و سپس، قطر منطقه مهار رشد *آئروموناس* اندازه‌گیری شد (۱۲).

آماده‌سازی سوسپانسیون باکتری *لاکتوباسیلوس*: ۵۰ میکرولیتر سوسپانسیون *لاکتوباسیلوس برویس* در ۲۰ میلی‌لیتر محیط ام‌آراس مایع تلقیح و به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۳۰ درجه سانتی‌گراد گرمخانه‌گذاری شد. این کشت به ۵۰۰ میلی‌لیتر محیط ام‌آراس مایع اضافه و به مدت ۴۸ ساعت در دمای ۳۰ درجه سانتی‌گراد گرمخانه‌گذاری شد. پس از رشد باکتری، به مدت ۱۰ دقیقه در دور ۳۰۰۰Rpm سانتریفیوژ و رسوب حاصل با سرم فیزیولوژی استریل سوسپانسیون و تراکم باکتری با استاندارد نیم مک فارلند تنظیم شد. سپس دو رقت که بیشترین تأثیر را روی باکتری *آئروموناس هیدروفیلا* داشتند به غذای پایه ماهی اسپری شدند و مدت ۱ ساعت در دمای ۳۰ درجه سانتی‌گراد درون انکوباتور قرار گرفتند تا خشک شوند. در این مدت از بخش‌های مختلف غذا نمونه‌برداری و شمارش باکتریایی روی محیط ام‌آراس آگار انجام شد (۱۳).

بررسی آثار جانبی *لاکتوباسیلوس برویس* روی ماهی سوف سفید: آثار احتمالی باکتری *لاکتوباسیلوس برویس* روی ماهی سوف سفید بررسی شدند. مقدار ۱۰۰ میکرولیتر سوسپانسیون حاوی 10^{10} (تعداد کل فلور باکتریایی بر گرم) باکتری به‌شکل عضلانی و داخل صفاقی به ۱۰ ماهی تزریق و آثار بیماری و میزان تلفات ماهی به مدت یک هفته بررسی شدند. پس از این مدت، از بافت‌های کلیه، خون، کبد و طحال ماهی نمونه‌برداری انجام و روی محیط تریپتیکازسویا آگار کشت باکتریایی داده شد تا تأثیرنداشتن باکتری روی بافت‌های مختلف مشخص شود (۱۳).

طراحی آزمایش: پس از دو هفته نگهداری و سازگاری ماهی سوف سفید با محیط، ماهیان به سه تیمار غذایی تقسیم شدند: تیمار A1. 10^{8} (تعداد کل فلور باکتریایی بر گرم) *لاکتوباسیلوس برویس*+ غذای پایه ماهی؛ تیمار A2. 10^{10} (تعداد کل فلور باکتریایی بر گرم) *لاکتوباسیلوس برویس*+ غذای پایه ماهی؛ تیمار Cیا شاهد. غذای پایه ماهی

هر تیمار با سه تکرار آزمایش شد و هر تکرار شامل ۱۰ قطعه ماهی با میانگین وزنی ۱۴ گرم بود که از کارگاه تکثیر و پرورش سیاهکل تهیه شده بودند و در وان‌های ۱۵۰ لیتری با دستگاه‌های هواده اکسیژن‌دهی می‌شدند. ماهیان پیش از شروع غذادهی با پروبیوتیک، از نظر آلودگی انگلی، باکتریایی و قارچی ارزیابی شدند. دمای آب طی دوره ۲±۲۱ درجه سانتی‌گراد بود و هر روز حدود ۴۰ درصد آب سیفون می‌شد. غذادهی دو بار در روز، ۳ تا ۵ درصد وزن بدن ماهی انجام و هر هفته، تمام عوامل فیزیکوشیمیایی آب بررسی می‌شدند. شمارش باکتری‌های لاکتیک‌اسید در روده ماهیان، هر دو هفته یک‌بار و همچنین دو هفته پس از قطع افزودن *لاکتوباسیلوس برویس* مصرفی به غذا انجام شد (۱۳).

مواجهه‌سازی با باکتری *آئروموناس هیدروفیلا*: پس از ۴۵ روز از شروع غذادهی، LD_{50} (میانگین دوز کشندگی ۵۰ درصد) *آئروموناس هیدروفیلا* محاسبه شد که میزان آن $4/5\times10^{8}$ (تعداد کل فلور باکتریایی بر میلی‌لیتر) بود. ابتدا رقت‌های 10^{1} تا 10^{8} (تعداد کل فلور باکتریایی بر گرم) *آئروموناس هیدروفیلا* به‌شکل جداگانه در سرم فیزیولوژی استریل تهیه شدند. سپس، مقدار ۰/۱ میلی‌لیتر از هر رقت به‌شکل داخل صفاقی به پنج ماهی تلقیح و جداگانه داخل آکواریوم ۷۰ لیتری تا هفت روز نگهداری شد. مقدار دوز کشنده[۸] باکتری *آئروموناس هیدروفیلا* طبق روشرد و میونچ[۹]، $4/5\times10^{8}$ (تعداد کل فلور باکتریایی بر میلی‌لیتر) تعیین و به میزان ۱۰۰ میکرولیتر به هر ماهی در تکرارهای پروبیوتیک و

شاهد تزریق شد. ماهیان به مدت ۱۰ روز از نظر نشانه‌های بی‌حالی، کاهش اشتها، بیرون‌زدگی چشم و تیرگی پوست ارزیابی و تلفات روزانه ثبت شدند (۱۳).

تجزیه و تحلیل آماری: تجزیه و تحلیل داده‌ها با روش تحلیل واریانس یک‌طرفه انجام و سطح معناداری آزمون‌ها در تمام بررسی‌ها ۵ درصد نرم‌افزار SPSS (ANOVA) در نظر گرفته شد ($P<0/05$).

نتایج

نمونه‌برداری از روده ۵۵ قطعه ماهی سوف سفید استخرهای پرورش ماهی استان گیلان در تابستان و پاییز ۱۳۹۳ انجام و باکتری *لاکتوباسیلوس برویس* بر اساس آزمایش‌های بیوشیمیایی و تخمیر قندهای مختلف شناسایی شد (جدول ۱).

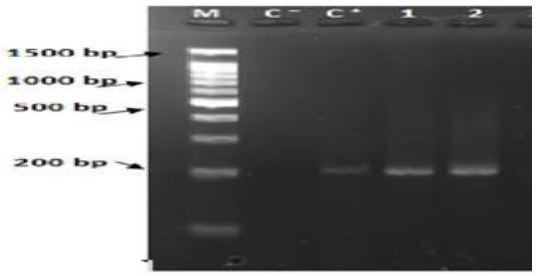
از ۱۷ نمونه جداسازی‌شده که با آزمایش‌های بیوشیمیایی، *لاکتوباسیلوس* تشخیص داده شدند، *لاکتوباسیلوس برویس* از نظر مولکولی تأیید شد (شکل ۱).

توالی‌های استفاده‌شده برای رسم درخت فیلوژنی *لاکتوباسیلوس* به کشورهای آمریکا، هند، چین، کره جنوبی و ایران و تمام توالی‌ها به ماهی و فرآورده‌های ماهی تعلق دارند. دو نمونه *لاکتوباسیلوس برویس* و یک نمونه *لاکتوباسیلوس پلانتاروم* از سایر ماهیان ایران جداسازی شده‌اند. سه نمونه از جدایه‌های مطالعه‌شده، *لاکتوباسیلوس برویس* ماهی سوف سفید هستند که با علامت مربع نشان داده شده‌اند. *لاکتوباسیلوس برویس* جداسازی‌شده بیش از ۹۷ درصد به *لاکتوباسیلوس برویس*های موجود در پایگاه اطلاعاتی NCBI شباهت دارد (شکل ۲).

جدول ۱- شناسایی بیوشیمیایی *لاکتوباسیلوس برویس* جداشده از روده ماهی سوف سفید

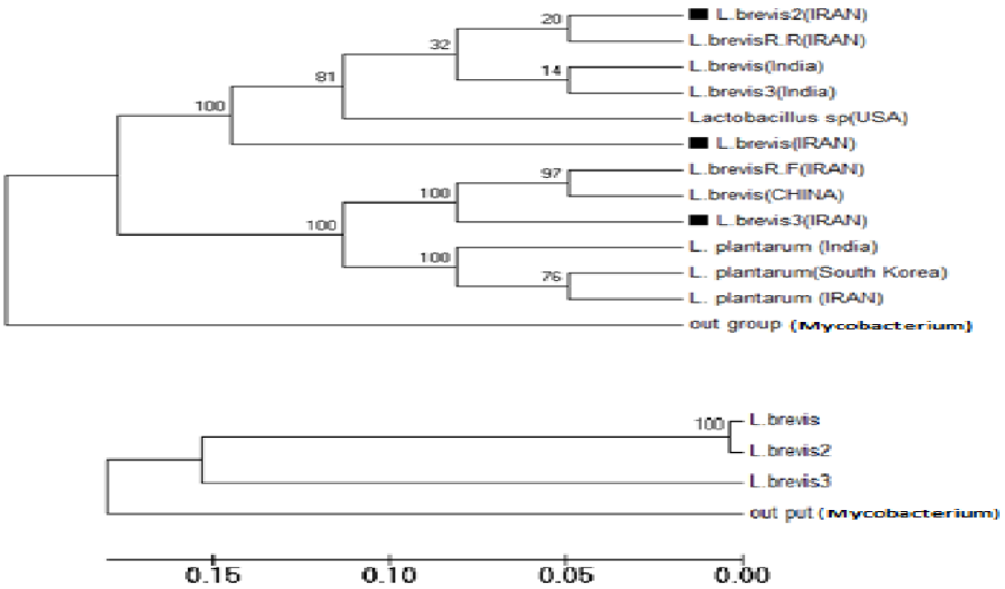
ویژگی‌های بیوشیمیایی	*لاکتوباسیلوس برویس*
تولید آمونیاک از آرژنین	+
تولید گاز از گلوکز	V
کاتالاز	V
تخمیر از:	
D – آرابینوز	+
فروکتوز	+
D – لاکتوز	+
D – مانیتول	+
D – مالتوز	+
D– ملزیتوز	–
D – ریبوز	+
D– ساکارز	V
D – ترهالوز	-
D – گزیلوز	V
D – سلوبیوز	+
D – گلوکز	+
D – سوربیتول	+
اسکولین	+
D – ملیبوز	–
D– رافینوز	+
D –گالاکتوز	+

+. ۹۰ درصد موارد مثبت، –. ۹۰ درصد موارد منفی، V. متغیر

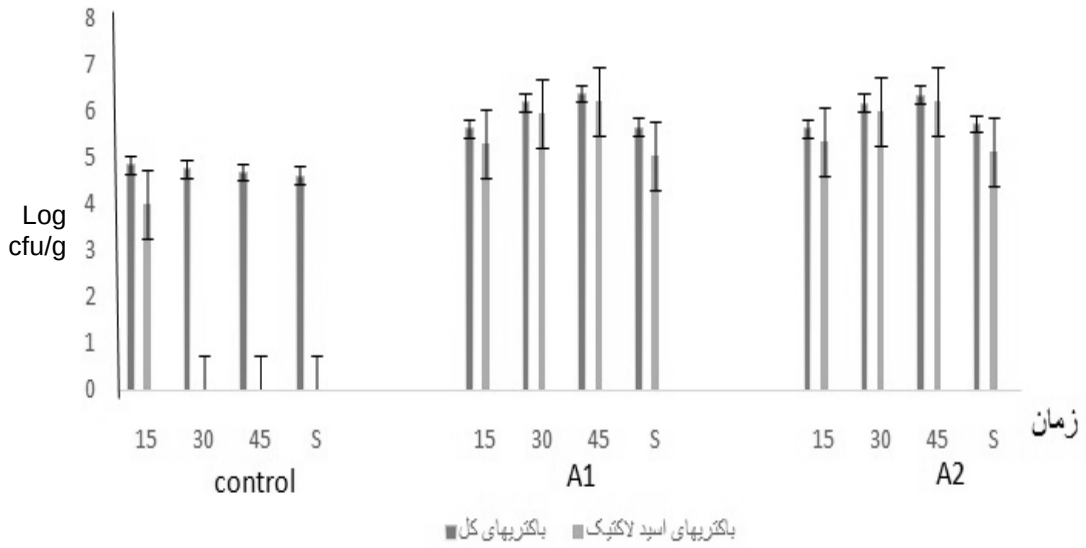


شکل ۱- الکتروفورز ژل آگارز ۱/۵ درصد مربوط به محصول PCR نمونه‌های آزمایش‌شده از پرایمر اختصاصی جنس *لاکتوباسیلوس* ۲۰۰bp. M. باندهای نشانگر ۱۰۰bp، C^-. شاهد منفی، C^+. شاهد مثبت (*لاکتوباسیلوس پلانتاروم*)، ۱ و ۲ نمونه‌های مثبت (*لاکتوباسیلوس برویس*)

شکل ۳ نشان می‌دهد باکتری‌های لاکتیک‌اسید پس از دو، چهار و شش هفته مصرف و دو هفته پس از قطع مصرف مکمل *لاکتوباسیلوس برویس* در غذای پایه، از محتویات روده ماهی سوف سفید در تیمارهای پروبیوتیک جداسازی شده‌اند. بجز در هفته دوم، باکتری لاکتیک‌اسیدی از روده ماهی تیمار شاهد جداسازی نشد.



شکل ۲- دندروم UPGMA بین جدایه‌های *لاکتوباسیلوس برویس*. جدایه‌های مطالعه‌شده با شکل مربع مشخص‌شده‌اند و توالی‌های مرجع از جنس *لاکتوباسیلوس‌های* جداشده از ماهی در GenBank هستند. عددهای قرارگرفته در گره کلادها، ارزش Bootstrap (درصد) را نشان می‌دهند و از باکتری *مایکوباکتریوم* برای out group استفاده شده است.



شکل ۳- میانگین لگاریتمی تعداد باکتری‌های لاکتیک‌اسید و باکتری‌های کل موجود در هر گرم محتویات روده در تیمارهای آزمایشی در زمان‌های مختلف؛ S= دو هفته پس از توقف غذادهی با پروبیوتیک (برحسب لگاریتم واحد جدایه در گرم وزن روده)

لاکتوباسیلوس با دوزهای مختلف $۱۰^{۶}$ تا $۱۰^{۱۰}$ (تعداد کل فلور باکتریایی بر میلی‌لیتر) روی *آئروموناس هیدروفیلا* تأثیر داده شد و بیشترین تأثیر را دوزهای $۱۰^{۸}$، $۱۰^{۹}$ و $۱۰^{۱۰}$ (تعداد کل فلور باکتریایی بر میلی‌لیتر) روی ممانعت از رشد باکتری *آئروموناس هیدروفیلا* داشتند؛ دو دوز $۱۰^{۸}$ و $۱۰^{۱۰}$ (تعداد کل فلور باکتریایی بر میلی‌لیتر) در مطالعه حاضر بررسی شدند (جدول ۲).

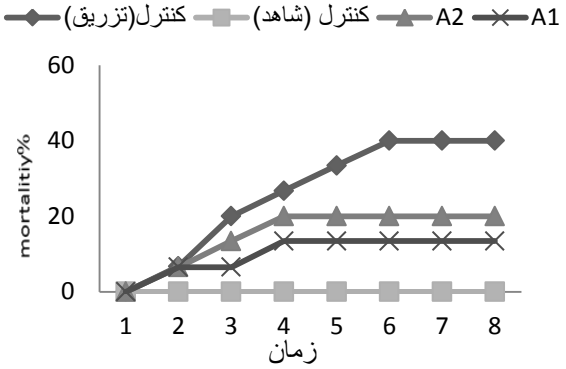
جدول ۲- فعالیت آنتاگونیستیکی *لاکتوباسیلوس برویس* در برابر *آئروموناس هیدروفیلا*

فعالیت آنتاگونیستیکی باکتری‌ها	قطر هاله ممانعت از رشد (برحسب میلی‌متر)در برابر آئروموناس هیدروفیلا
لاکتوباسیلوس برویس($۱۰^{۶}$cfu/ml)	۹±۰/۰۲
لاکتوباسیلوس برویس($۱۰^{۷}$cfu/ml)	۱۰±۰/۰۲
لاکتوباسیلوس برویس($۱۰^{۸}$cfu/ml)	۱۶±./۰۳
لاکتوباسیلوس برویس($۱۰^{۹}$cfu/ml)	۱۶±۰/۰۲
لاکتوباسیلوس برویس($۱۰^{۱۰}$cfu/ml)	۱۸±۰/۰۵

نتایج نشان دادند *لاکتوباسیلوس* تأثیر مخربی روی بافت و اندام‌های داخلی ماهی سوف سفید ایجاد نمی‌کند. در شکل ۴، تزریق باکتری *آئروموناس هیدروفیلا* به ماهیان تغذیه‌شده با پروبیوتیک و شاهد (تزریق) نشان داده شده است.

شکل ۴- تزریق باکتری *آئروموناس هیدروفیلا* به ماهی سوف سفید

درصد تلفات ماهی سوف سفید در تیمارهای تغذیه‌شده با *لاکتوباسیلوس برویس* و دو شاهد (تزریق و سرم) در شکل ۵ دیده می‌شود. میزان بقا در تیمارهای $۱۰^{۱۰}$ و $۱۰^{۸}$ (تعداد کل فلور باکتریایی بر گرم) *لاکتوباسیلوس برویس* به‌ترتیب برابر ۸۶/۶ و ۸۰ درصد در مقایسه با گروه شاهد تزریق ۶۰ درصد و شاهد سرم ۱۰۰ درصد بوده است.



A1. $۱۰^{۸}$ تعداد کل فلور باکتریایی بر گرم

A2. $۱۰^{۱۰}$ تعداد کل فلور باکتریایی بر گرم

شکل ۵- درصد تلفات ماهی سوف سفید مواجه‌شده با *آئروموناس هیدروفیلا*پس از شش هفته غذادهی با دوزهای مختلف *لاکتوباسیلوس برویس* و گروه‌های شاهد سرم و تزریق

بحث

استفاده از مکمل‌های غذایی در صنعت آبزی‌پروری سبب افزایش رشد، ایمنی و مقاومت آبزیان در برابر بیماری‌ها شده و از این رو، آزمایش‌های وسیعی در آبزیان انجام شده است (۱۳-۱۷). استفاده از باکتری‌های پروبیوتیک در آبزی‌پروری راه حل مؤثری برای کنترل و پیشگیری باکتری‌های بیماری‌زا در آبزیان است (۱۸ و ۱۹). اگرچه در مطالعه حاضر، شناسایی برخی باکتری‌ها از روش بیوشیمیایی به علت نبود برخی صفات باکتری مبهم بود، تعیین توالی و مقایسه با توالی دیگر باکتری‌های گزارش‌شده در پایگاه اطلاعات جهانی ژنوم، شباهت بیش از ۹۷ درصد را در گونه *لاکتوباسیلوس برویس* نشان داد. اختلاف این باکتری‌ها در مصرف قندها و منطبق‌نبودن با جدول ۱ ممکن است از جهش در یک یا تعدادی از ژن‌های آنزیم‌های حدواسط تخمیر قندها ناشی باشد و شاید این باکتری در طول تکامل و با توجه به شرایط محیطی به تخمیر این قند نیاز نداشته و بنابراین ژن مربوط به آن دچار جهش یا حذف شده است (۹ و ۱۱). در شکل ۲، ارتباط فیلوژنی جدایه‌های *لاکتوباسیلوس برویس* با سایر *لاکتوباسیلوس‌های* جداسازی‌شده از ماهیان در بانک اطلاعاتی ژن نشان داده شده است. نتایج پژوهش حاضر نشان دادند سویه *لاکتوباسیلوس برویس* نزدیکی ژنتیکی زیادی با سویه‌های جداسازی‌شده از ماهیان در چین و ایران دارد (۲۰). باکتری‌های لاکتیک‌اسید روده دارای فعالیت ضدمیکروبی در برابر بیماری‌های عفونی هستند و دستکاری جمعیت فلور میکروبی روده از راه تغییر محتویات غذای آبزیان امکان‌پذیر است. پژوهش‌های بسیاری در این زمینه با پروبیوتیک انجام شده است. شاخص‌های بسیاری ازجمله شکل دستگاه گوارش آبزیان، دمای آب، روش پرورش، نوع جیره غذایی، نوسان‌های فصلی و طول روز بر ترکیب میکروبیوتای دستگاه گوارش اثر می‌کنند (۲۱ و ۲۲). اندانی و همکاران[۱۰] (۱۳۸۹) گزارش کردند تراکم باکتری‌های پروبیوتیکی در محتویات روده ماهی قزل‌آلای تغذیه‌شده با *لاکتوباسیلوس کازئی*[۱۱] و *پلانتاروم*[۱۲] در مقایسه با تیمار شاهد بیشتر بوده و میزان آنها با استمرار مصرف این پروبیوتیک‌ها در روده ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان افزایش بیشتری یافته است. پژوهشگران مختلف در زمینه آثار مثبت غذادهی طولانی‌مدت با پروبیوتیک بر رشد و تراکم باکتری‌های پروبیوتیک روده ماهیان گزارش‌هایی داده‌اند (۵، ۶، ۱۳ و ۲۰). نتایج پژوهش حاضر نشان دادند تراکم نهایی باکتری‌های لاکتیک‌اسید در محتویات دستگاه گوارش سوف سفید غذادهی‌شده با *لاکتوباسیلوس برویس* بیشتر از تیمار شاهد است (شکل ۲) مطالعه حاضر با مطالعه‌های چند پژوهشگر دیگر مطابقت دارد (۱۷، ۲۲ و ۲۳). همچنین با مصرف مستمر باکتری‌های پروبیوتیک، تراکم این باکتری‌ها در روده افزایش می‌یابد (۲۴ و ۲۵). شناخت میکروبیوتای دستگاه گوارش آبزیان، شاخصی کاربردی برای جلوگیری از بروز بیماری‌های باکتریایی و کاهش مصرف آنتی‌بیوتیک است (۲۵ و ۲۶). اسماعیلی و همکاران[۱۳] (۱۳۸۸) گزارش کردند *لاکتوباسیلوس پلانتاروم* جداسازی‌شده از روده ماهی خاویاری دارای ویژگی آنتاگونیستی در برابر *آئروموناس هیدروفیلا* است (۲۲). بالکازار و همکاران[۱۴] (۲۰۰۸) گزارش کردند *لاکتوباسیلوس لاکتیس*[۱۵]، *لاکتوباسیلوس پلانتاروم* و *لاکتوباسیلوس فرمانتوم*[۱۶] جداسازی‌شده از ماهی قزل‌آلا در مواجهه‌سازی با باکتری *آئروموناس هیدروفیلا* تأثیر بسزایی داشته‌اند (۲۷).

باکتری‌های *لوکونوستوک مزانتروئیدس*[۱۷]، *لاکتوکوکوس لاکتیس*، *لاکتوباسیلوس کورواتوس*[۱۸] و *لاکتوباسیلوس ساکی*[۱۹]جداسازی‌شده از ماهی آزاد روی چندگونه *آئروموناس* ویژگی مهارکنندگی داشته‌اند (۲۷). اندانی و همکاران (۱۳۸۹) گزارش کردند *لاکتوباسیلوس کازئی* تلفات ناشی از *آئروموناس هیدروفیلا* و *یرسینیا روکری* را کاهش می‌دهد. میزان تلفات در مواجهه با *آئروموناس هیدروفیلا* و *یرسینیا روکری*[۲۰]تقریباً دو برابر کمتر از تیمار شاهد بود و همچنین تأثیر *لاکتوباسیلوس پلانتاروم* بر میزان تلفات در برابر هر دو باکتری بیماری‌زا کمتر از تیمار شاهد بود، هرچند این کاهش معنادار نبود (۱۳).

مطالعه حاضر با مطالعه‌های پیشین در زمینه تیلاپیا[۲۱] (۲۸-۳۰)، قزل‌آلای رنگین‌کمان[۲۲] (۲۳ و ۳۱-۳۳)، گربه‌ماهی[۲۳] (۳۴) و روهو (کپور ماهی هندی)[۲۴] (۳۵) مطابقت دارد. گیری و همکاران[۲۵] گزارش کردند آثار استفاده از *لاکتوباسیلوس پلانتاروم* روی نرخ بقا پس از مواجهه‌سازی با *آئروموناس هیدروفیلا* در دوز کمتر بیشتر از دوز بیشتر است و اگرچه علت آن مشخص نیست، شاید با گونه ماهی، نوع پروبیوتیک، دوره غذادهی و میزان دوز باکتری مرتبط باشد. مکمل *لاکتوباسیلوس برویس* در مطالعه حاضر، مقاومت ماهی سوف را در برابر عفونت *آئروموناس هیدروفیلا* افزایش داد (۲۰ و ۳۶).

شناخت میکروبیوتای دستگاه گوارش آبزیان، راهکاری برای جلوگیری از بروز بیماری‌های باکتریایی و کاهش مصرف آنتی‌بیوتیک است (۳۵ و ۳۶).

سپاسگزاری

از ریاست محترم پژوهشکده آبزی‌پروری انزلی، جناب آقای دکتر خانی‌پور و همکاران بخش بهداشت و بیماری‌های پژوهشکده آبزی‌پروری جناب آقایان دکتر قاسمی، مهندس امیدوار، مهندس رمضانی و همکاران ایستگاه غذای زنده، جناب آقایان دکتر حاجی‌زاده، دکتر صلواتیان و مهندس مقصودی‌کهن برای همکاری در اجرای پژوهش حاضر قدردانی و تشکر می‌شود.

References

(1) Food and Agriculture organization of the United Nations (FAO). Statistics and information service of the fisheries and aquaculture. *Fishery and aquaculture statistics* 2014; 4: 37-68.

(2) Mesalhy Aly S., Abd-El-Rahman AM., John G., Mohamed MF. Characterization of some bacteria isolated from *Oreochromis niloticus* and their potential use as probiotics. *Aquaculture* 2008; 277(1): 1-6.

(3) Ringo E., Olsen RE., Gifstad T., Dalmo RA., Amlund H., Hemre GI. Prebiotics in aquaculture: a review. *Aquaculture Nutrition* 2010; 16: 117-136.

(4) Tavakoli H., Akhlaghi M. Evaluation of changes in lysozyme, immunoglobulins, cells and blood hematocrit cultivated rainbow trout after experimental infection with pathogenic *Aeromonas hydrophila*. *Biological Journal of Microorganism* 2015; 4(13): 93-104.

(5) Vijavabaskar P., Somasundaram S. Isolation of bacteriocin producing lactic acid bacteria from fish gut and probiotic against common fresh water fish pathogen. *Aeromonas hydrophila. Biotechnology* 2008; 7(1): 124-128.

(6) Tokmechi A., Shamci H., Meshkini S., Delshad R., Ghasemimaghanjoghi A. Dietary administration of vitamin C and *Lactobacillus rhamnosus* in combination enhanced the growth and innate immune response of the *rainbow trout*, *Oncorhynchus mykiss*. *Journal of Fisheries Iran* 2012; 21(2): 13-22.

(7) Food and Agriculture organization of the United Nations (FAO). Statistics and information service of the fisheries and aquaculture. *Fishery and aquaculture statistics* 2009; 30-40.

(8) Gharibkhani1 M., Pourkazemi M., RezvaniGilkolai S., Tatina M., Azizzadeh L. Genetic analysis of pike-perch, *Sander lucioperca* . populations showed by microsatellite DNA markers in Iran. *Caspian Journal of Environmental Sciences* 2014; 12(1): 99-108.

(9) Cai Y., Okada H., Mori H., Benno Y., Nakase T. *Lactobacillus paralimentarius* sp. Nov, isolated from sourdough. *International Journal of Systematic Bacteriology* 1999; 49: 1451-1455.

(10) Nair P., Surendran P. Biochemical characterization of lactic acid bacteria isolated from fish and prawn. *Journal of Culture Collections* 2004; 4: 48-52.

(11) Garrity GM., Boone DR., Castenholz RW. *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology.* 2nd ed., vol. 1. New York, NY: Springer-Verlag; 2001.

(12) Jayanth K., Jeyasekaran G., JeyaShakila R. Biocontrol of fish bacterial pathogens by the antagonistic bacteria isolated from the coastal waters of Gulf of Mannar, India. *Bulletin of European Association of Fish Pathologist* 2001; 21(1): 12-18.

(13) Andani H., Tokmechi A., Meshkini S., Ebrahimi H. Rainbow trout raised resistance against infection with *Aeromonas hydrophila* and *Yersinia Rocker* using *Lactobacilli* from intestines Carp. *Iran Veterinary Journal* 2011; 7(2): 26-35.

(14) Brunt B., Austin B. Use of a probiotic to control *lactococcosis* and *streptococcosis* in rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum). *Journal Fish Disease* 2005; 28(12): 693-701.

(15) Panigrahi A., Azad IS. Microbial intervention for better fish health in aquaculture: the Indian scenario. *Fish Physiology and Biochemistry* 2007; 33: 429-440.

(16) Movahed R., Khara H., SayadBorani M., Hayat bakhsh MR., Ahmadnezhad M., Rahbar M. Hematological parameters of *Sander lucioperca* in the Caspian Sea (off the coast of Bandar Anzali). *Journal of Fisheries* (Islamic Azad University of Azadshahr) 2010; 4(4): 93-100.

(17) Panigrahi A., Kiron V., Satoh S., Watanabe T. Probiotic bacteria *Lactobacillus rhamnosus* influences the blood profile in rainbow trout *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum). *Fish Physiology and Biochemistry* 2010; 36(4): 969-977.

(18) Kim DH., Austin B. Innate immune responses in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss, Walbaum*) induced by probiotics. *Fish Shellfish Immunology* 2006; 21(5): 513-524.

(19) Tavakoli H., Akhlaghi M. Study of lysozyme,immunoglobulins and hematocrit blood cells in rainbow trout after experimental infection with the pathogen *Aeromonas hydrophila*. *Journal of Veterinary Research* 2009; 2(1): 157-162.

(20) Faeed M., Biochemical and Molecular identification of gasterointestinal *Lactobacillus* and *Enterococcus* in white perch fish (*sander lucioperca*) and evaluation of their probiotic properties [Dissertation] .Tehran: Science and Research Univ; 2015.

(21) smaeeli P., Amirmozafari N., Shenavarmasouleh A. Isolation and identification of lactic acid bacteria in the intestinal tract Persian sturgeon. *Journal of Biological sciences* 2009; 3(3): 13-18.

(22) Nikoskelainen S., Ouwehand A., Salminen S., Bylund G. Protection of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) from furunculosis by *Lactobacillus rhamnosus. Aquaculture* 2001; 198(3): 229-236.

(23) Seetharaman S., Arunsingh SV. Effects of probiotics and spirulina on survival and growth of juvenile common carp (*Cyprinus carpio*). *The Israeli Journal of Aquaculture* 2008; 60(2): 128-133.

(24) Roberson BS. Bacterial agglutination In: Stolen JS., Fletcher TC., Anderson DP., Roberson BS., Van Muiswinkel WB., *Techniques in fish* immunology. Fair Haven, Newjersey: Sos publications; 1990: 81-86.

(25) Rufcahei Hoseinifar SH., Faeed M. Study of modulation guts microbiota of Caspian white fish (*Rutilus frisii* kutum) through administration of yeast based prebiotic. *Biological Journal of Microorganism* 2015; 4(13): 93-103.

(26) Hoseinifar SH., Mirvaghefi A., MojaziAmiri B., Rostami HK., Merrifield DL. The effects of oligofructose on growth performance, survival and autochthonous intestinal microbiota ofbeluga (*Husohuso*) juveniles. *Aquaculture Nutrition* 2011; 17(4): 498-504.

(27) Balcázar J., Vendrell D., Blas I., Ruiz-Zarzuela I., Muzquiz J., Girones O. Characterization of probiotic properties of lactic acid bacteria isolated from intestinal microbiota of fish. *Aquaculture* 2008; 278: 188-191.

(28) Balcazar JL., Blas ID., Ruiz-Zarzuela I., Cunningham D., Vendrell D., Muzquiz JL. The role of probiotics in aquaculture. *Veterinary Microbiology* 2006; 114(2): 173-186.

(29) Aly SM., Ahmed YAG., Ghareeb AAA., Mohamed MF. Studies on *Bacillus subtilis* and *Lactobacillus acidophilus*, as potential probiotics, on the immune responseand resistance of *Tilapia nilotica (Oreochromisniloticus)* to challenge infections. *Fish & Shellfish Immunology* 2008; 25(1): 128-36.

(30) Pirarat N., Kobayashi T., Katagiri T., Maita M., Endo M. Protective effects and mechanisms of a probiotic bacterium *Lactobacillus rhamnosus* against experimental *Edward siellatarda* infection in tilapia (*Oreochromis niloticus). Veterinary Immunology pathology* 2006; 113(3): 339-347.

(31) Ngamkala S., Futami K., Endo M., Maita M., Katagiri T. Immunological effects of glucan and *Lactobacillus rhamnosus GG*, a probiotic bacterium, on *nile tilapia Oreochromis niloticus* intestine with *Aeromonas* challenges. *Fish Sciences* 2010; 76(4): 833-840.

(32) Panigrahi A., Kiron V., Kobayashi T., Puangkaew J., Satoh S., Sugita H. Immune responses in *rainbow trout Oncorhynchus mykiss* induced by a potential probioticbacteria *Lactobacillus rhamnosus* JCM 1136. *Veterinary Immunopathology* 2004; 102(4): 379-388.

(33) Balcàzar JL, Blas ID., Ruiz-Zarzuela I., Vendrel D., Gironés O., Muzquiz, JL. Enhancement of the immune response and protection induced by probiotic lactic acid bacteria against urunculosis in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *FEMS Immunology Medical Microbiol*ogy 2007; 51(1):185-93.

(34) Al-Dohail MA., Hasim R., Aliyu-Paiko M. Effects of the probiotic, *Lactobacillus acidophilus*, on growth performance, haematology parameters and immunoglobulin concentration in African Catfish (*Clariusgariepinus,Burchell* 1882) fingerlings. *Aquacultre* 2009; 40(1): 1642-1652.

(35) Giri SS., Sukumaran V., Oviya M., Potential probiotic *Lactobacillus plantarum* VSG3 improves the growth,immunity, and disease resistance of tropical freshwater fish, *Labeo Rohita. Fish & Shellfish Immunology* 2013: 34(2): 660-666.

(36) Faeed M., Kasra kermanshahi R., Pourkazemi M., Darboee M., Haghighi karsidani S., Determination of blood indicators in *Sander lucioperca* (Linnaeus 1758,)At feeding with probiotics (*Lactobacillus brevis* MF01) and exposure to bacteria *Aeromonas hydrophila. Journal of Applied Ichthyological Research* 2016; 1(4):75-85.

[1]- *Sander lucioperca*
[2]- FAO
[3]-MRSAgar
[4]- *Lactobacillus brevis*
[5]-*A.hydrophila*(ATCC7966)
[6]- cfu/ml
[7]-TSA
[8]- LD50
[9]- *Reed and muench*
[10]-*Andani et al*
[11]- *L. casei*
[12]-*L. plantarum*
[13]-*Esmaeiliet al*
[14]-*Balcàzar et al*
[15]-*L.lactis*
[16]- *L.fermentum*
[17]- *mesenteroides*
[18]-*L.curavatus*
[19]- *L.sakei*
[20]-*Yersinia Rockeri*
[21]- *Tilapia*
[22]-*Oncorhynchus mykiss*
[23]- *Cat fish*
[24]-*Labeorohita*
[25]-*Giri et al*