

## شناسایی گونه های ویبریو پروبیوتیک علیه ویبریوهای بیماری زا در ماهی قزل آلابی رنگین کمان

• مصطفی اخلاقی

دانشیار بخش بهداشت و بیماری های آبزیان، دانشکده دامپزشکی دانشگاه شیراز (نویسنده مسئول)

• محمد جواد نوروزی اصل

دانش آموخته دانشکده دامپزشکی دانشگاه شیراز  
تاریخ دریافت: تیر ماه ۱۳۸۹ تاریخ پذیرش: بهمن ماه ۱۳۸۸  
تلفن تماس نویسنده مسئول: ۰۹۱۷۱۲۰۷۳۱۷

Email: akhlaghi@shirazu.ac.ir

### چکیده

تعداد ۱۱۶ نمونه از ماهی های دریایی و رسوبات ساحلی سواحل خلیج فارس در بوشهر تهیه شد تا با کشت بر روی محیط تی سی بی اس ویبریوهای موجود جداسازی شوند. پس از انجام آزمایش های بیوشیمیایی، ۳۰ گونه ویبریو جدا گردید که در نهایت ۷ گونه *Vibrio* شامل *V. anguillarum*، *V. alginolyticus*، *V. harveyi*، *V. vulnificus*، *V. ordalii*، *V. splendidus* و *Carchariae* شناسایی گردیدند. پاتوژنیستی گونه های جدا شده مورد ارزیابی قرار گرفت و مشخص گردید گونه های *V. ordalii* و *V. vulnificus*، *V. anguillarum* برای ماهی قزل آلابی رنگین کمان برخوردار هستند. خواص آنتاگونیستی این گونه ها بر یکدیگر با روش استفاده از مایع بالایی کشت و همچنین روش آگار دو لایه انجام گرفت و نشان داد تعدادی از این ویبریوها اثر بازدارندگی بر دیگر گونه ها دارند. سه گونه، *V. alginolyticus*، *V. splendidus* و *V. harveyi* بطور جداگانه با غذای ماهی ها به مدت ۱۴ روز به مقدار ۱۰۹-۱۰۷ استفاده شد و ماهی ها با ویبریوهای بیماری زا بروش غوطه ورسازی مورد چالش قرار گرفتند. در حالیکه میزان بقا در گروه کنترل ۵۳/۳-۴۶/۶ درصد بود، ماهی هایی که از پروبیوتیک استفاده نمودند دارای درصد بقا ۹۶/۶-۹۳/۳ بودند که به طور معنی داری با گروه کنترل متفاوت بود ( $P < 0.05$ ). گونه های پروبیوتیکی مورد مطالعه در این تحقیق توانستند باعث تحریک سیستم ایمنی غیراختصاصی ماهی از جمله افزایش فعالیت فاگوسیتوزی و شاخص فاگوسیتوزی ماکروفاژهای کلیه و انفجار تنفسی نوتروفیل های ماهی قزل آلابی رنگین کمان شوند.

کلمات کلیدی: ویبریو، پروبیوتیک، ماهی قزل آلابی رنگین کمان

Veterinary Journal (Pajouhesh & Sazandegi) No 88 pp: 9-18

### Identification of probiotic vibrios against pathogenic vibrios in rainbow trout

By: Akhlaghi M (Corresponding Author; Tel: +989171207317) Associate Professor of Veterinary Faculty of Shiraz University, and Nouroziasl MJ, Graduated of Veterinary Faculty of Shiraz University.

A total of 116 marine fishes and sediments were collected from Persian gulf shore near Bushehr in order to isolate vibrio species. After culturing on thiosulphate- citrate- bile salts- sucrose and with biochemical tests, 30 isolates showed vibrio characteristics which were categorized in 7 vibrio species, *V. anguillarum*, *V. alginolyticus*, *V. harveyi*, *V. vulnificus*, *V. ordalii*, *V. carchariae* and *V. splendidus*. In pathogenicity evaluation of vibrio isolates for rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*, Walbaum), *V. vulnificus*, *V. anguillarum* and *V. ordalii* resembled the most pathogens. Antagonistic effects of the isolates were determined using supernatant assay and double-agar layer method. Three isolates, *V. alginolyticus*, *V. splendidus* and *V. haveyi* were separately incorporated into the feed and fed to rainbow trouts for 14 days at doses equivalent to 107-109 cells g<sup>-1</sup> of feed and fish were challenged with pathogenic vibrios. Whereas the untreated controls experienced survival rate of 46.6-53.3% when challenged by immersion with *V. vulnificus*, *V. anguillarum* and *V. ordalii*, the probiotic treated groups remained healthy with a high survival rate of 93.3-96.6%. The probiotic vibrio species studied in this research reflected stimulation of innate immunity, namely enhanced phagocytic activity and phagocytic index of kidney macrophages and respiratory burst activity of neutrophils.

**Keywords:** Vibrio, Probiotic, Rainbow trout

### مقدمه

با گسترش صنعت پرورش آبزیان، وقوع بیماری های عفونی از جمله بیماری های باکتریایی اجتناب ناپذیر است. توسعه مقاومت باکتریایی علیه آنتی بیوتیک های مورد استفاده روز بروز در حال ازدیاد می باشد (۲۵) که مشکلات بزرگی در راه مبارزه با بیماری های باکتریایی در پیش خواهد گذاشت. بنابراین رفته رفته توجه محققین به استفاده از پروبیوتیک ها افزایش می یابد (۲۶). در آبی پروری، آنتی بیوتیک های مورد استفاده نهایتاً وارد محیط زیست شده و زمینه مقاومت باکتریایی را در مزرعه فراهم می سازند. از جمله این مقاومت می توان به مقاومت باکتری های آزاد ماهیان به اکسی تتراسیکلین اشاره نمود (۱۴). با به اجرا در آوردن مقررات استفاده از آنتی بیوتیک و اعمال قوانین خاص در این ارتباط برای آبی پروران زمینه توجه و استفاده از پروبیوتیک ها آشکارتر می شود (۴). پروبیوتیک ها در حقیقت قسمتی از میکروفلور دستگاه گوارش شده و به سلامت میزبان خود کمک می نماید. این عمل با چسبیدن آنها به مخاط روده و تولید متابولیت های ضد میکروبی و بطور کلی رقابت با میکروارگانیسم های پاتوژن می باشد (۸).

از سال ۱۹۸۰، جنس ویبریو مورد بازبینی دقیق قرار گرفته است و در حال حاضر در این جنس ۴۴ گونه وجود دارد که تعدادی از آنها برای ماهی ها، میگوها، صدف های پرورشی و سایر آبزیان بیمارزا می باشد (۹). بیماری ویبریوز یکی از بیماری های پر اهمیت ماهی های آب شور، لب شور و شیرین ماهی های پرورشی در دنیا محسوب می شود که عمدتاً توسط گونه های انگوفیلاروم، اوردالی، ولنیفیکوس، سالمونیسیدا و ویسکوزوس ایجاد می شود (۳).

تحقیقاتی در خصوص اثر بازدارندگی رشد گونه های بیمارزای ویبریو توسط دیگر ویبریوهای محیطی بعمل آمده است (۲۳) که می تواند بواسطه تولید برخی مواد نظیر آنتی بیوتیک ها، باکتریوسین ها، سیدروفراها، لیزوزیم،

پروتئاز، پراکسید هیدروژن و تغییر دادن اسیدیته محیط بواسطه تولید اسیدهای آلی باشد (۲۲، ۱۰). باکتریوسین تولید شده توسط میکروفلور روده علیه *V. anguillarum* در ماهی کفشک تحت تأثیر محیط رشد باکتری ها قرار دارد و تغییر می یابد (۱۶). گزارشی از نقش پروبیوتیکی یک سبوس از *V. anguillarum* در کاهش بیماری فورونکلوزیز که عامل آن *Aeromonas salmonicida* می باشد و نیز *V. anguillarum* و *V. ordalii* (عامل ویبریوزیز در ماهی) صورت گرفته (۴) و تأکید بر جایگزین نمودن پروبیوتیک ها بجای آنتی بیوتیک ها شده است این پروبیوتیک ها قادر به تولید مواد ضد میکروبی و باکتریوسین هستند (۲۲).

هدف از انجام این تحقیق شناسایی گونه های غیربیماری زای ویبریو علیه گونه های بیمارزای منطقه جنوب کشور در ماهی قزل آلی رنگین کمان با روشی مؤثر، آسان، ارزان و دوستدار محیط زیست می باشد بوده است.

### مواد و روش ها

#### نمونه گیری و جداسازی باکتری ها

تعداد ۴۸ نمونه از بستر دریا و ۶۸ نمونه از ماهی های کوچک خلیج فارس (با وزن متوسط ۳۵ گرم شامل هامور، گوازیوم، شوریده و سنگسر ماهی ها) (جمعاً ۱۱۶ نمونه) در منطقه بوشهر جمع آوری و در کنار یخ به آزمایشگاه آبزیان دانشکده منتقل شد. جهت جدا نمودن گونه های ویبریو بر روی محیط تی سی بی اس<sup>۱</sup> کشت داده شد به این ترتیب که ماهی های کوچک تازه صید شده دریایی خرد شده همچنین نمونه های رسوب با آب دریا (استریل شده) هموزن شده و با رقت یکدهم و یک صدم بر روی محیط بی اس<sup>۲</sup> کشت داده شد و در درجه حرارت ۲۲ درجه سانتی گراد به مدت ۴ روز نگهداری شد. کلنی های رشد یافته سپس بر روی محیط تی سی بی اس انتقال یافته و در درجه حرارت ۲۲ درجه سانتی گراد به مدت ۴۸ ساعت نگهداری شدند. تعداد ۳۰ جدایه با ۳۳ آزمایش فیزیولوژیکی و بیوشیمیایی

انجام شد که مقدار ده میکرولیتر از محیط کشت آبگوشتی پروبیوتیک مورد نظر بر روی محیط آگاربی اچ آی کشت داده شد و پلیت ها در ۲۲ درجه سانتیگراد نگهداری گردیدند. با استفاده از بخار کلروفرم به مدت ۳۰ دقیقه و قرار دادن پلیت در معرض این بخار، باکتری های رشد یافته در پلیت کشته شدند. پس از آن ۱۰۰ میکرولیتر از محیط آبگوشتی کشت داده شده با ویبریوهای بیمارزا با مقدار ۵ میلی لیتر محیط آبگوشتی حاوی ۰/۷ درصد آگار مخلوط شده و در سطح هر پلیت ریخته شد. این پلیت حاوی دو لایه آگار در ۲۲ درجه سانتیگراد به مدت ۴۸ ساعت نگهداری گردید و قطر دایره ایجاد شده توسط کلنی های پروبیوتیکی که توانسته بودند رشد بیمارزا را مهار سازند اندازه گیری شد. اثر آنتاگونیستی در صورتی مثبت قلمداد شد که اثر بازدارندگی رشد بیشتر از قطر ۱ میلی متر مشاهده شود (۷).

### استفاده از پروبیوتیک در غذا

هر یک از پروبیوتیک های مورد نظر (ویبریو الجینولتیکوس، هاروئی و اسپیلندیدوس) پس از کشت در آبگوشتی تی اس بی به مدت ۴۸ ساعت در درجه حرارت ۲۰ درجه سانتی گراد رشد داده شد و تعداد باکتری ها شمارش گردید. مقدار مشخصی از غذای قزل آلابی رنگین کمان با وزن ۴۵ گرم انتخاب و به نحوی با باکتری مخلوط شد که در هر گرم غذا ۱۰<sup>۷</sup>، ۱۰<sup>۸</sup> و یا ۱۰<sup>۹</sup> (بر اساس آزمایش) بدست آید. برای این کار چندین بار آزمایش صورت گرفت و پس از مخلوط نمودن از یک گرم غذا رقت های لازم بدست آمد و با کشت رقت ها از تعداد باکتری های زنده در غذا اطمینان حاصل شد. غذای آماده شده به تعداد ۴۰۰ قزل آلابی رنگین کمان ۴۵ گرمی برای آزمایش اثر استفاده از پروبیوتیک های ویبریو علیه ویبریوهای بیمارزا و ۲۰۰ ماهی قزل آلابی رنگین کمان برای آزمایش تعیین فعالیت و شاخص فاگوسیتوزی به مدت ۱۴ روز روزانه ۳ بار خورانیده شد (تمام غذاهایی که ماهی ها می گرفتند حاوی پروبیوتیک بود) (۱۱). در گروه کنترل غذا بدون استفاده از پروبیوتیک به ماهی ها داده شد.

بررسی اثر پروبیوتیکی ویبریوهای غیر بیمارزا در مواجهه با ویبریوهای بیمارزا محلولی به میزان ۱۰<sup>۸</sup> باکتری در میلی لیتر از باکتری هایی *V. ordalii* و *V. vulnificus*، *V. anguillarum* که در این تحقیق بیماری زا بودند به طور جداگانه تهیه و ماهی هایی که به آنها به صورت خوراکی پروبیوتیک داده شده بود به مدت ۳ دقیقه به صورت غوطه ورسازی در محلول باکتری قرار داده شدند. در طول غوطه ورسازی ماهی ها، از هواده استفاده شد. ماهی ها تا دو هفته زیر نظر گرفته شدند.

### بررسی اثر پروبیوتیکی بر فعالیت فاگوسیتوزی، شاخص فاگوسیتوزی

#### ماکروفاژهای کلیه و فعالیت انفجار تنفسی نوتروفیل ها

از تعداد ۱۰ قطعه ماهی از هر گروه که به مدت ۱۴ روز پروبیوتیک ها را مصرف نموده بودند پس از بیهوشی خونگیری بعمل آمد. خون جمع آوری شده در شیشه های حاوی هپارین ریخته شد. ماهی ها کشته شدند و سپس بافت کلیه ماهی های خونگیری شده در شرایط استریل خارج و به نسبت ده برابر حجم در محلول استریل حاوی یک میکروگرم در یک صد میلی لیتر اکسی تتراسیکلین، ۰/۲ میلی گرم در یکصد میلی لیتر هپارین (Sigma) و ۰/۱ درصد سرم گوساله قرار داده شد. با استفاده از مش پلاستیکی اندازه

مورد شناسایی واقع شدند (۲۷،۶،۳،۲،۱). در تمام محیط های مورد استفاده، به میزان لازم کلروفرم سدیم اضافه گردید. درجه حرارت برای رشد باکتری های مورد آزمایش ۲۲ درجه سانتی گراد در نظر گرفته شد. باکتری های جدا شده روی محیط نیمه جامد تی اس بی ۳ حاوی ۰/۲ درصد آگار خالص در شیشه های کوچک در پیچ دار رشد داده شد و بمیزان ۲۰ درصد حجم گلسیروول استریل اضافه گردیده و در ۷۰- درجه سانتی گراد نگهداری شدند (۱۸).

### آزمایش تعیین بیماریزایی گونه های ویبریو جدا شده

به منظور بررسی بیماریزایی گونه های انگوئیلاروم، الجینتیکوس، کارکاریا، هاروئی، اوردالی، ولنیفیکوس و اسپیلندیدوس این باکتری ها بطور جداگانه به دو ماهی قزل آلابی رنگین کمان با وزن متوسط ۱۰۰ گرم تزریق گردید و پس از دو روز ماهی ها با بیهوشی زیاد کشته شده و با کشت از کلیه آنها در روی آگار خوندار مجدداً همان باکتری ها جدا شدند. سپس باکتری به میزان های ۱۰<sup>۶</sup>، ۱۰<sup>۷</sup> و ۱۰<sup>۸</sup> در هر یکدهم میلی لیتر سرم فیزیولوژی (۱۸) تهیه و مقدار ۰/۱ میلی لیتر از آن به گروه های ۱۰ تایی ماهی های قزل آلابی رنگین کمان (۲۵۰ ماهی با وزن متوسط ۳۵ گرم) بصورت مجزا بشکل داخل صفاقی تزریق گردید. در هر بار آزمایش همان تعداد ماهی در هر گروه به عنوان کنترل فقط با سرم فیزیولوژی استریل بطور صفاقی تزریق شدند و در تانک دیگری نگهداری گردیدند.

در روش غوطه ورسازی، بیماریزایی گونه های انگوئیلاروم، الجینتیکوس، کارکاریا، هاروئی، اوردالی، ولنیفیکوس و اسپیلندیدوس بطور جداگانه تعیین گردید. برای هر گونه باکتری ۱۰ ماهی قزل آلابی رنگین کمان با وزن متوسط ۴۰ گرم در محلول تهیه شده از آب دریا و باکتری که در هر میلی لیتر آن ۱۰<sup>۸</sup> باکتری وجود داشت همراه با هواده به مدت سه دقیقه قرار داده شدند. ماهی ها تا ۲ هفته بعد بطور معمول مورد تغذیه قرار گرفته، آب با درجه حرارت متوسط ۱۶ درجه سانتیگراد و اکسیژن ۸ پی پی ام تنظیم گردید و هر گونه علائم غیر طبیعی ثبت گردید. ماهی هایی که علائم درمانگاهی غیرعادی داشتند با بیهوشی زیاد کشته شده و از بافت کلیه آنها به منظور جداسازی ویبریو تزریق شده بطور استریل کشت می شد.

پس از نمونه گیری و منفی بودن کشت از ماهیهایی که تا ۲ هفته بعد از تزریق و غوطه ورسازی در باکتری همچنان سالم ماندند، عدم بیمارزا بودن باکتری مورد استفاده برای این ماهی ها مشخص شد.

### آزمایش اثر آنتاگونیستی

آزمایش تعیین اثر ضد میکروبی گونه های غیر بیمارزا بر بیمارزا بدین ترتیب انجام گرفت که از مایع بالایی محیط کشت آبگوشتی تی اس بی (مقدار ۱۰۰-۱۰ میکرولیتر) از گونه های غیر بیمارزا در محیط کشت آبگوشتی ویبریوی بیمارزا استفاده شد و سپس کشت ویبریوهای بیمارزا در این محیط انجام شد. برای این کار ابتدا باکتری ها شمارش شده و پس از ۴۸ ساعت نگهداری در درجه حرارت ۲۲ درجه سانتی گراد بر روی محیط جامد کشت داده شد تا مشخص نماید باکتری ها از بین رفته اند و اثر آنتی بیوتیکی حاصل شده است. براساس شمارش پرگنه ها، تعداد باکتری زنده ثبت گردید. برای کنترل در این آزمایش، از یک کشت بروش فوق بدون اضافه نمودن مایع بالایی گونه غیر بیمارزا استفاده شد (۱۷).

همچنین برای ارزیابی آنتاگونیستی به روش آگار دو لایه ۴ به این ترتیب

آزمایش های بیوشیمیایی با استفاده از منابع موجود با ویبریو های جدا شده قبلی مقایسه گردید و گونه های انگوئیلاروم، الجینولیتیکوس، هاروئی، اوردالی، ولنیفیکوس، کارکاریا و اسپلندیدوس تعیین گردیدند (جدول ۱). اکثر گونه های جدا شده ویبریو خصوصیات متغیر را از خود نشان می دادند. در آزمایش های انجام شده سعی بر این شد که پاسخ مثبت بیوشیمیایی ثبت گردد.

تمام ویبریوهای جدا شده مورد مطالعه در این تحقیق کاتالاز و اکسیداز مثبت بوده و همگی در ۳-۶/۵ در صد نمک رشد کردند. این ویبریوها دارای خصوصیت های متفاوت بیوشیمیایی از همدیگر بوده و در تولید آنزیم و تخمیر قند ها تفاوت داشتند (جدول ۱).

نتایج حاصل از قدرت بیماریزایی *V. anguillarum* در مقدار  $10^6$  و  $10^7$  در میلی لیتر ۴۰ در صد ماهی ها و مقدار  $10^8$  باکتری در میلی لیتر ۶۰ درصد ماهی های قزل آلا را پس از تزریق داخل صفاقی بیمار نموده و باعث تلفات آنها شد. همین الگوی تلفات در *V. vulnificus* مشاهده می شود که در صد مجموع تلفات این دو باکتری شبیه به هم و برابر ۴۶/۵ درصد ثبت گردید. در  $10^6$  و  $10^7$  باکتری در میلی لیتر معادل ۴۰ و ۲۰ درصد تلفات و در  $10^8$  باکتری معادل ۴۰ درصد تلفات را نشان داد. در *V. splendidus* در  $10^6$  باکتری در میلی لیتر تلفاتی بجا نگذاشت لیکن در  $10^7$ ، ۴۰ درصد و در  $10^8$ ، سبب ۶۰ درصد تلفات شد. گونه *V. harreyi* و *V. carchariae* هر کدام تلفات کمتری را ایجاد نموده و بطور میانگین فقط ۶/۶ درصد تلفات را باعث شدند. در این آزمایش *V. alginoliticus* در هیچکدام از مقادیر استفاده شده باعث تلفات نگردید (جدول ۲). در گروه کنترل نیز هیچ تلفاتی مشاهده نشد.

نتایج حاصله از روش غوطه ورسازی بیماریزایی گونه های ویبریو برای ماهی قزل آلا رنگین کمان در این تحقیق نشان داد گونه انگوئیلاروم، ولنیفیکوس و اوردالی که با استفاده از  $10^8$  باکتری در هر میلی لیتر آن غوطه ور شده بودند توانستند پترتیب ۶۰، ۶۰ و ۵۰ در صد تلفات ایجاد نمایند. در *V. carchariae* ۲۰ درصد تلفات و گونه الجینولیتیکوس، هاروئی، اسپلندیدوس در این روش باعث بیماری ماهی های قزل آلا رنگین کمان نشدند.

اثر آنتاگونیستی ویبریوها به روش آگار دو لایه در جدول ۳ نشان داده شده است. ویبریو الجینولیتیکوس دارای بیشترین بازدارندگی رشد (قطر بازدارندگی به میلی متر) علیه گونه انگوئیلاروم، ولنیفیکوس و اوردالی بود. این میزان از بازدارندگی از رشد بمیزان کمتری در ویبریو هاروئی و اسپلندیدوس مشاهده گردید (جدول ۳). همچنین نتایج حاصل از آزمایش تعیین اثر ضد میکروبی گونه های غیر بیماریزا بر بیماریزا بروش استفاده از مایع بالایی محیط کشت آبگوشتی نشان داد که بترتیب گونه الجینولیتیکوس، ویبریو هاروئی و ویبریو اسپلندیدوس بیشترین اثر بازدارندگی از رشد را علیه ویبریوهای بیماریزا داشتند.

نتایج حاصله از خوراندن پروبیوتیک های ویبریو که شامل گونه هایی بودند که یا تلفاتی برای ماهی نداشته یا کمترین بیماریزایی را داشتند به این ترتیب بود که پس از خوراندن  $10^7$ ،  $10^8$  و  $10^9$  باکتری در هر گرم غذای ماهی به مدت ۱۴ روز و سپس چالش با گونه ولنیفیکوس، انگوئیلاروم و اوردالی به عنوان بیماری زا برای ماهی ها مورد استفاده قرار گرفتند. *V. alginoliticus* در مقادیر  $10^7$  تا  $10^9$  در مجموع توانست به ترتیب ۹۰، ۸۳/۳ و ۹۶/۶ در صد موجب بقاء ماهی ها در مقابل گونه ولنیفیکوس، انگوئیلاروم و اوردالی

یک صد میکرونی استریل، بافت کلیه از مش رد شده و بافت های پیوندی آن خارج شد. با اضافه نمودن محلول پرکل (Sigma) محتویات بدست آمده به مدت ۲۰ دقیقه با ۲۵۰۰ دور در دقیقه سانتریفوژ شد. سلول ها از لایه سطحی خارج شده و ۳ بار شستشو شدند و تعداد سلول ها در میلی لیتر به تعداد ۱۰۵ در میلی لیتر تنظیم گردیدند. میزان ۱ میلی لیتر از این محلول روی اسلاید میکروسکوپ پخش شد و به مدت یک ساعت در ۱۸ درجه سانتیگراد در شرایط مرطوب گذاشته شده تا سلول ها به اسلاید بچسبند. اسلایدها سپس شستشو شده و سپس ۰/۱ میلی لیتر از محلول حاوی مخمر رنگ شده با رنگ قرمز کنگو حاوی  $10^8$  مخمر در میلی لیتر اضافه گردید و اسلایدها مجدداً در شرایط مرطوب نگهداری شدند. پس از آن اسلایدها شستشو و به مدت ۵ دقیقه در متانول ۹۶ درصد ثابت گردید. سپس اسلایدها با رنگ آمیزی گیمسا رنگ شدند. گروه های ۱۰۰ تا ۲۰۰ تایی سلول ها با میکروسکوپ شمارش شده تا ماکروفاژهایی که مخمرها را بلعیده اند مشخص شوند. فعالیت فاگوسیتوزی بر اساس تقسیم تعداد سلول هایی که فاگوسیتوز کرده اند تقسیم بر کل سلول های شمارش شده ضربدر عدد ۱۰۰ بدست آمد. شاخص فاگوسیتوزی از تقسیم تعداد مخمر های فاگوسیت شده بر تعداد ماکروفاژهای فاگوسیت کننده تعیین گردید (۲۰).

فعالیت انفجار تنفسی نوتروفیل ها بر اساس احیاء نیتروبلوترازولیوم (Sigma) به فرمازان بعنوان شاخص تولید آنیون سوپراکسید  $O_2^-$  بود (۲۱). بدین ترتیب که خون تهیه شده تازه حاوی هپارین به میزان ۵۰ میکرولیتر در میکروپلیت ها (Nunc) با حفره های گرد ریخته شد و به مدت یک ساعت در حرارت ۳۷ درجه سانتیگراد نگهداری شد. محلول فوقانی دور ریخته شد و حفره ها ۳ بار با سرم فیزیولوژی شستشو گردیدند. سپس ۵۰ میکرولیتر از محلول ۰/۲ درصد نیتروبلوترازولیوم اضافه شده و پلیت ها به مدت یک ساعت دیگر و همان شرایط نگهداری شدند. سلول ها سپس با متانول ۱۰۰ درصد به مدت ۳ دقیقه ثابت شده و ۳ بار با محلول ۳۰ درصد متانول شستشو گردیدند. پلیت ها با هوا خشک شده و به مقدار ۶۰ میکرولیتر از هیدروکسید پتاسیم ۲ نرمال و ۷۰۰ میکرولیتر دی متیل سولفوکساید (Sigma) به هر حفره اضافه شد تا فرمازان تشکیل شده آبی رنگ را حل نماید. جذب نوری محلول آبی رنگ ایجاد شده با دستگاه قرائت کننده پلیت الیزا در طول موج ۵۴۰ نانومتر قرائت شد. آزمایش ها برای هر نمونه چهار بار تکرار شد و اعداد بدست آمده بصورت میانگین و انحراف نشان داده شد.

### تجزیه و تحلیل آماری

از آزمون مربع کای (آزمون دقیق فیشر) برای مقایسه درصد تلفات ماهی ها پس از تزریق باکتری های ویبریو و همچنین مقایسه در صد بقاء ماهی ها پس از استفاده از پروبیوتیک ها علیه ویبریو های بیماریزا استفاده گردید. برای مقایسه اثر استفاده از ویبریو پروبیوتیک ها بر فعالیت فاگوسیتوزی و شاخص فاگوسیتوزی ماکروفاژهای کلیه و فعالیت انفجار تنفسی نوتروفیل های ماهی قزل آلا رنگین کمان از آزمون آنوای یک طرفه، من ویتنی در نرم افزار اس پی اس برای مقایسه گروهها استفاده شد.

### نتایج

از ۳۰ گونه باکتری بدست آمده از کشت های انجام شده از ماهی های دریایی و رسوبات، ۷ گونه باکتری ویبریو بدست آمد که بر اساس

جدول ۱- خصوصیات فیزیولوژیکی و بیوشیمیایی گونه های ویبریو در این تحقیق را نشان می دهد.

| خصوصیت*                           | و. آنگوئیلارم | و. آلیجنولنتیکوس | و. کارکاریا | و. هاروئی | و. اوردالی | و. ولتیفیکوس | و. اسپلندیدوس | و. پاراهمولیتیکوس** | و. سالمونیسیدا** | و. کلرا** |
|-----------------------------------|---------------|------------------|-------------|-----------|------------|--------------|---------------|---------------------|------------------|-----------|
| آگارتی سی بی اس                   | زرد           | زرد              | زرد         |           |            |              |               |                     |                  |           |
| کانالاز                           | +             | +                | +           | +         | +          | +            | +             | +                   | +                | +         |
| متیل رد                           |               | +                |             |           |            |              | +             |                     |                  |           |
| واگوس پروسکر                      | +             | +                |             |           |            |              | +             |                     |                  |           |
| اکسیداز                           | +             | +                | +           | +         | +          | +            | +             | +                   | +                | +         |
| حرکت                              | +             | +                | +           | +         | +          | +            | +             | +                   | +                | +         |
| رشد در:                           |               |                  |             |           |            |              |               |                     |                  |           |
| ۰ درصد نمک                        | +             | +                | +           | +         | +          | +            | +             | +                   | +                | +         |
| ۳ درصد نمک                        | +             | +                | +           | +         | +          | +            | +             | +                   | +                | +         |
| ۶/۵ درصد نمک                      |               |                  |             |           |            |              | +             |                     |                  |           |
| ۴ درجه سانتی گراد                 | +             | +                | +           |           |            |              | +             |                     |                  |           |
| ۳۰ درجه سانتی گراد                |               |                  |             |           |            |              |               | +                   |                  | +         |
| تولید:                            |               |                  |             | +         |            |              | +             |                     |                  |           |
| ایندول                            |               |                  |             |           |            | +            | +             |                     |                  | +         |
| آرژنین دی هیدرولیز                |               | +                | +           |           |            | +            |               | +                   |                  |           |
| لیزین دی کربوکسیلاز               |               | +                | +           |           |            | +            |               | +                   |                  |           |
| اورنیتین دی کربوکسیلاز            |               |                  |             | +         |            |              |               |                     |                  |           |
| اوره آز                           | +             | +                |             |           |            |              | +             |                     |                  |           |
| هیدرولیز ژلاتین                   |               |                  |             |           |            | +            |               |                     |                  | +         |
| هیدرولیز نشاسته                   |               |                  |             |           |            | +            | +             |                     |                  | +         |
| احیا نیترات                       |               |                  |             |           |            |              | +             |                     |                  | +         |
| سیترات                            |               |                  |             |           |            |              |               |                     |                  | +         |
| حساسیت به<br>۰/۱۲۹ (۱۵۰ میکروگرم) | +             | +                | +           | +         | +          | +            | +             | +                   | +                | +         |
| مصرف: الفا - دی - گلوکز           | +             | +                | +           | +         | +          | +            | +             | +                   | +                | +         |
| تخمیر مالتوز                      | +             | +                |             |           |            | +            | +             |                     |                  |           |
| مالیت                             |               |                  |             |           |            | +            |               |                     |                  | +         |
| سوکروز                            | +             | +                | +           | +         | +          |              |               |                     |                  |           |
| دی - مانوز                        | +             | +                | +           | +         | +          | +            | +             | +                   | +                | +         |
| آرابینوز                          |               |                  |             |           |            |              |               |                     |                  | +         |
| دی مانیتول                        | +             | +                | +           | +         | +          | +            | +             | +                   | +                | +         |
| دی - فرکتوز                       |               |                  |             |           |            | +            |               |                     |                  | +         |
| دی - گالاکتوز                     |               |                  |             |           |            |              |               |                     |                  | +         |
| دی - ترهالوز                      |               |                  |             |           |            | +            |               |                     |                  | +         |
| دی - سوربیتول                     |               |                  |             |           |            |              |               |                     |                  | +         |
| آمیگدالین                         |               |                  |             |           |            |              |               |                     |                  | +         |

و= ویبریو + = پاسخ مثبت آزمایش

\*در این جدول خصوصیات بارز مشاهده شده ذکر گردیده است.

\*\*در این تحقیق مورد مطالعه قرار نگرفتند فقط خصوصیات آنها برای مقایسه در این جدول ذکر شده است.

جدول ۲- بیماریزایی گونه های مختلف ویبریو مورد آزمایش در این تحقیق پس از تزریق به ماهی های قزل آلابی رنگین کمان را نشان می دهد (حروف مشابه اختلاف معنی داری ندارند). ( $P < 0.05$ )

| باکتری                 | تعداد ماهی | تعداد باکتری در میلی لیتر | درصد تلفات | تعداد ماهی | تعداد باکتری در میلی لیتر | درصد تلفات | تعداد ماهی | درصد تلفات      | درصد مجموع تلفاتی که باکتری ویبریو جدا گردید |
|------------------------|------------|---------------------------|------------|------------|---------------------------|------------|------------|-----------------|----------------------------------------------|
| <i>V. anguillarum</i>  | ۱۰         | ۱۰ <sup>۶</sup>           | ۱۰         | ۱۰         | ۱۰ <sup>۷</sup>           | ۱۰         | ۱۰         | ۱۰ <sup>۸</sup> | ۴۶/۵ <sup>a</sup>                            |
| <i>V. vulnificus</i>   | ۱۰         | ۱۰ <sup>۶</sup>           | ۴۰         | ۱۰         | ۱۰ <sup>۷</sup>           | ۴۰         | ۱۰         | ۱۰ <sup>۸</sup> | ۴۶/۵ <sup>a</sup>                            |
| <i>V. splendidus</i>   | ۱۰         | ۱۰ <sup>۶</sup>           | ۴۰         | ۱۰         | ۱۰ <sup>۷</sup>           | ۶۰         | ۱۰         | ۱۰ <sup>۸</sup> | ۳۳/۳ <sup>a</sup>                            |
| <i>V. harveyi</i>      | ۱۰         | ۱۰ <sup>۶</sup>           | ۰          | ۱۰         | ۱۰ <sup>۷</sup>           | ۴۰         | ۱۰         | ۱۰ <sup>۸</sup> | ۶/۶ <sup>b</sup>                             |
| <i>V. alginolytias</i> | ۱۰         | ۱۰ <sup>۶</sup>           | ۰          | ۱۰         | ۱۰ <sup>۷</sup>           | ۲۰         | ۱۰         | ۱۰ <sup>۸</sup> | ۰ <sup>b</sup>                               |
| <i>V. ordalii</i>      | ۱۰         | ۱۰ <sup>۶</sup>           | ۰          | ۱۰         | ۱۰ <sup>۷</sup>           | ۰          | ۱۰         | ۱۰ <sup>۸</sup> | ۳۳/۳ <sup>a</sup>                            |
| <i>V. carchariae</i>   | ۱۰         | ۱۰ <sup>۶</sup>           | ۴۰         | ۱۰         | ۱۰ <sup>۷</sup>           | ۲۰         | ۱۰         | ۱۰ <sup>۸</sup> | ۶/۶ <sup>b</sup>                             |

جدول ۳- اثر آنتی گونیستی ویبریوهای که در این تحقیق نقش پروبیوتیکی دارند.

| اثر پروبیوتیکی  |                |                |                |                |                |                |                |                |                |                   |                |                  |                |
|-----------------|----------------|----------------|----------------|----------------|----------------|----------------|----------------|----------------|----------------|-------------------|----------------|------------------|----------------|
| گونه اسپلندیدوس |                | گونه ولنیفیکوس |                | گونه اوردالی   |                | گونه هاروئی    |                | گونه کارکاریا  |                | گونه الجینولتیکوس |                | گونه انگوئیلاروم |                |
| بازدارندگی رشد  | بازدارندگی رشد | بازدارندگی رشد | بازدارندگی رشد | بازدارندگی رشد | بازدارندگی رشد | بازدارندگی رشد | بازدارندگی رشد | بازدارندگی رشد | بازدارندگی رشد | بازدارندگی رشد    | بازدارندگی رشد | بازدارندگی رشد   | بازدارندگی رشد |
| ۳               | +              | ۰              | -              | ۰              | -              | ۴              | +              | ۱              | +              | ۶                 | +              | ۰                | -              |
| ۱               | +              | ۰              | -              | ۰              | -              | ۱              | +              | ۰              | -              | ۰                 | -              | ۰                | -              |
| ۱               | +              | ۰              | -              | ۰              | -              | ۲              | +              | ۰              | -              | ۲                 | +              | ۰                | -              |
| ۰               | -              | ۰              | -              | ۰              | -              | ۰              | -              | ۰              | -              | ۳                 | +              | ۰                | -              |
| ۱               | +              | ۰              | -              | ۰              | -              | ۲              | +              | ۰              | -              | ۴                 | +              | ۰                | -              |
| ۲               | +              | ۰              | -              | ۰              | -              | ۳              | +              | ۰              | -              | ۵                 | +              | ۰                | -              |
| ۰               | -              | ۰              | -              | ۰              | -              | ۱              | +              | ۰              | -              | ۱                 | +              | ۰                | -              |

بطور معنی داری در صد فعالیت فاگوسیتوزی را افزایش داده است. شاخص فاگوسیتوزی در استفاده از تمام پروبیوتیک ها نیز بطور معنی داری افزایش یافته بود (جدول ۵).

نتایج بدست آمده از بررسی فعالیت انفجار تنفسی نوتروفیل ها نشان داد *V. alginolyticus* و *V. splendidus* در مقایسه با گروه کنترل بطور معنی داری باعث افزایش فعالیت انفجار تنفسی نوتروفیل ها شده اند ( $P < 0.05$ ). این افزایش در استفاده از ویبریو هاروئی به عنوان پروبیوتیک کمتر بود اگر چه بطور معنی داری با دو ویبریوی پروبیوتیک دیگر تفاوت معنی داری داشت لیکن بطور معنی داری از گروه کنترل بیشتر بود

شود. در حالیکه در گروه کنترل بقای ماهی ها به ترتیب ۴۳/۳، ۵۳/۳ و ۸۶/۶ درصد بود. ویبریو هاروئی بعنوان پروبیوتیک در مقادیر مختلف توانست ۹۰ و ۹۳/۳ در صد موجب بقای ماهی ها و ویبریو اسپلندیدوس ۹۳/۳ و ۹۶/۶ ۹۳/۳ درصد موجب بقای ماهی ها در مواجهه با ویبریوهای بیماریزا شود. نتایج حاصله نشان داد تعداد باکتری از ۱۰۷ تا ۱۰۹ در اثر پروبیوتیکی این باکتری ها تفاوت معنی داری ندارد ( $P < 0.05$ ) (جدول ۴).

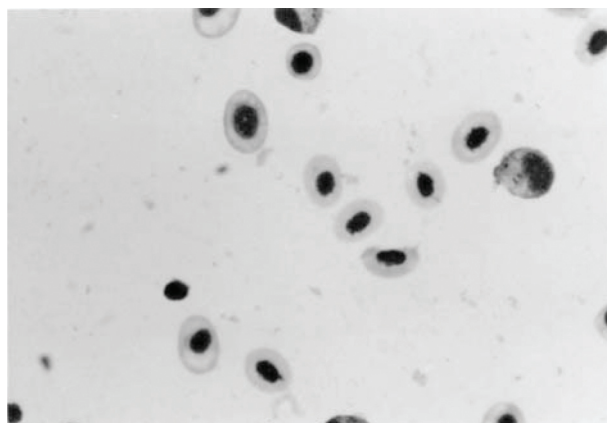
نتایج حاصله از فعالیت فاگوسیتوزی ماکروفاژهای بافت کلیه شکل ۱ ماهی های قزل آلابی که در تغذیه آنها از پروبیوتیک استفاده شده بود نشان داد *V. alginolyticus* در مقایسه با گونه اسپلندیدوس و هاروئی

جدول ۴- مقایسه اثر استفاده از پروبیوتیک های ویبریو علیه ویبریوهای بیماریزا در ماهی قزل آلی رنگین کمان (هر گروه از ماهی ها ۱۰ قطعه) که با تعداد و درصد بقاء نشان داده شده است (حروف مشابه اختلاف معنی داری ندارند ( $P < 0.05$ )).

| سرم فیزبولوژی                    | گونه اسپلندیدوس            |                 |                                  | گونه هاروئی                |                 |                                  | گونه الجینولتیکوس          |                   |                                  | پروبیوتیک<br>بakteriya |                 |                   |           |    |   |                                                                |
|----------------------------------|----------------------------|-----------------|----------------------------------|----------------------------|-----------------|----------------------------------|----------------------------|-------------------|----------------------------------|------------------------|-----------------|-------------------|-----------|----|---|----------------------------------------------------------------|
|                                  | تعداد باکتری در هر گرم غذا |                 |                                  | تعداد باکتری در هر گرم غذا |                 |                                  | تعداد باکتری در هر گرم غذا |                   |                                  |                        |                 |                   |           |    |   |                                                                |
|                                  | ۱۰ <sup>۶</sup>            | ۱۰ <sup>۸</sup> | ۱۰ <sup>۷</sup>                  | درصد بقاء                  | ۱۰ <sup>۶</sup> | ۱۰ <sup>۸</sup>                  | ۱۰ <sup>۷</sup>            | درصد بقاء         | ۱۰ <sup>۶</sup>                  |                        | ۱۰ <sup>۸</sup> | ۱۰ <sup>۷</sup>   | درصد بقاء |    |   |                                                                |
| بقای ماهی ها در گروه های ۱۰ تایی |                            |                 | بقای ماهی ها در گروه های ۱۰ تایی |                            |                 | بقای ماهی ها در گروه های ۱۰ تایی |                            |                   | بقای ماهی ها در گروه های ۱۰ تایی |                        |                 |                   |           |    |   |                                                                |
| ۴۶/۶ <sup>b</sup>                | ۳                          | ۵               | ۶                                | ۹۳/۳ <sup>a</sup>          | ۹               | ۱۰                               | ۹                          | ۸۶/۶ <sup>a</sup> | ۸                                | ۱۰                     | ۸               | ۹۰ <sup>a</sup>   | ۸         | ۱۰ | ۹ | <i>V.algalyticus</i><br>(۱۰ <sup>۸</sup> باکتری در محلول حمام) |
| ۴۳/۳ <sup>b</sup>                | ۳                          | ۵               | ۵                                | ۹۶/۶ <sup>a</sup>          | ۱۰              | ۱۰                               | ۹                          | ۹۰ <sup>a</sup>   | ۹                                | ۱۰                     | ۸               | ۸۳/۳ <sup>a</sup> | ۸         | ۹  | ۸ | <i>V.splendidus</i><br>(۱۰ <sup>۸</sup> باکتری در محلول حمام)  |
| ۵۳/۳ <sup>b</sup>                | ۵                          | ۶               | ۵                                | ۹۳/۳ <sup>a</sup>          | ۹               | ۹                                | ۱۰                         | ۹۳/۳ <sup>a</sup> | ۱۰                               | ۹                      | ۹               | ۹۶/۶ <sup>a</sup> | ۱۰        | ۱۰ | ۹ | <i>V.harveyi</i><br>(۱۰ <sup>۸</sup> باکتری در محلول حمام)     |

جدول ۵- اثر استفاده از پروبیوتیک های ویبریو بر فعالیت فاگوسیتوزی و شاخص فاگوسیتوزی ماکروفاژهای کلیه و فعالیت انفجار تنفسی نوتروفیل های ماهی قزل آلی رنگین کمان (حروف مشابه اختلاف معنی داری ندارند ( $P < 0.05$ )).

| فعالیت انفجار تنفسی (جذب نوری) |                            | شاخص فاگوسیتوزی (ضریب) |                  | میانگین فعالیت فاگوسیتوزی (درصد) |                     |
|--------------------------------|----------------------------|------------------------|------------------|----------------------------------|---------------------|
| کنترل                          | پروبیوتیک                  | کنترل                  | پروبیوتیک        | کنترل                            | پروبیوتیک           |
| ۰/۰۱۶ ± ۰/۰۶۵ <sup>ج</sup>     | ۰/۰۴۴ ± ۰/۱۱۵ <sup>ه</sup> | ۱/۲ <sup>گ</sup>       | ۲/۵ <sup>ع</sup> | ۳ ± ۴۸ <sup>د</sup>              | ۴ ± ۶۳ <sup>ا</sup> |
| ۰/۰۱۲ ± ۰/۰۷۲ <sup>ج</sup>     | ۰/۰۲۲ ± ۰/۱۰۲ <sup>ه</sup> | ۱/۱ <sup>گ</sup>       | ۲/۴ <sup>ع</sup> | ۲ ± ۴۶ <sup>د</sup>              | ۵ ± ۵۶ <sup>ب</sup> |
| ۰/۰۱۸ ± ۰/۰۶۸ <sup>ج</sup>     | ۰/۰۰۹ ± ۰/۰۸۲ <sup>ه</sup> | ۱/۲ <sup>گ</sup>       | ۱/۸ <sup>ف</sup> | ۱ ± ۵۱ <sup>د</sup>              | ۳ ± ۵۵ <sup>ب</sup> |



شکل ۱- یک ماکروفاژ بافت کلیه که سه سلول مخمر را فاگوسیت کرده است (سمت راست تصویر) (رنگ آمیزی گیمسا  $\times 1000$ ).

معنی داری را با توجه به دوز  $10^7$  تا  $10^9$  پروبیوتیک استفاده شده در مقاومت ماهی ها در مقابل بیماری نشان نداد ( $P < 0/05$ ). دلیل این امر را می توان استقرار باکتری پروبیوتیک و تزاید آن در سطح مخاطی روده ماهی قزل آلائی رنگین کمان دانست که بسرعت ازدیاد یافته و توانسته اند در مواجهه با ویبریوهای بیماریزا از استقرار آنها جلوگیری نمایند، مواد آنتی بیوتیکی تولید نموده و رشد آنها را متوقف سازند و همچنین با تحریک سیستم ایمنی غیر اختصاصی میزبان از بیمار شدن میزبان پیشگیری نمایند. استفاده از مقادیر بیشتر از این مقدار پروبیوتیک استفاده شده و احياناً کمتر از آن چنانچه بتواند نتایج را دچار تغییر نمایند احتیاج به بررسی بیشتر دارد. در نتایج بدست آمده از کاربرد *Lactobacillus ramnosus* در تحریک ایمنی ماهی قزل آلائی رنگین کمان نشان داده شده است که افزایش مقدار پروبیوتیک در غذا نتوانست تغییری در اثر پروبیوتیکی این باکتری علیه بیماری نشان دهد (۱۵). همچنین تمام دوزهای  $5 \times 10^5$ ،  $5 \times 10^7$  و  $5 \times 10^9$  باکتری *L. delbrukei* زیر گونه بولگاریکوس بعنوان پروبیوتیک در غذای این ماهی توانستند باعث افزایش فعالیت کمپلمان، لیزوزیم و سطح ایمنوگلوبولین های خون شوند (۲۴).

استفاده از پروبیوتیک می تواند احتمالاً در وضعیت تغذیه ای، تولید ویتامین ها و افزایش رشد تاثیر فراوان و همچنین در بهبود وضعیت ایمنی ماهی علیه میکرواورگانیسم ها موثر باشد (۱۲). مطالعه دیگری که از باکتری های طبیعی محیط تفریخگاه در غذای لارو صدف استفاده نمودند توانست رشد لاروها را بهبود بخشد (۱۹). با استفاده از باکتری گرم مثبت به عنوان پروبیوتیک در غذای لاروهای ماهی های دریایی بقای و هم اندازه بودن اندازه لارو ها و رشد آنها بهبود داده شده است (۱۲).

اخیراً از آئروموناس سوبریای دستگاه گوارش ماهی قزل آلائی رنگین کمان به عنوان پروبیوتیک استفاده گردیده و با تعداد  $10^7$  باکتری در هر گرم غذای این ماهی به مدت ۱۴ روز، ماهی های قزل آلائی رنگین کمانی که از این پروبیوتیک استفاده نکردند در مقابل بیماری استرپتوکوکوزیز و لاکتوکوکوزیس ۱۰۰-۷۵ درصد تلفات دادند در حالی که ماهی هایی که پروبیوتیک برای آنها استفاده گردید فقط ۰-۶ درصد تلفات دادند که نشانگر تاثیر بسزای این باکتری بعنوان پروبیوتیک در پیشگیری و درمان بیماری

(جدول ۵). نمونه گیری از مدفوع ماهی هایی که در غذای آنها پروبیوتیک گونه الجینولیتیکوس، اسپلندیدوس و هاروئی استفاده شده بود نشان داد که امکان جداسازی این ویبریو ها بر روی محیط تی سی بی اس یکروز پس از شروع تغذیه با آنها و برای سه گونه ذکر شده بترتیب تا ۲۲ روز، ۱۸ روز و ۱۵ روز پس از قطع پروبیوتیک وجود داشت.

### بحث

در تحقیق جاری نقش مفید پروبیوتیک ها در کنترل بیماری ویبریوزیز در آبری پروری نشان داده شده است. گونه الجینولیتیکوس، ویبریو هاروئی و ویبریو اسپلندیدوس در غذای ماهی های قزل آلائی رنگین کمان توانستند به میزان های مختلف از بیمار شدن ماهی های مورد چالش پیشگیری نموده و درصد تلفات را کاهش دهند (جدول ۴). نتایج بدست آمده در خصوص نقش پروبیوتیکی *Valginlyticus* در این تحقیق با نتایج بدست آمده توسط محققین دیگر که نقش این پروبیوتیک در کنترل بیماری ناشی از *V. ordalii* و *A. salmonicida*، *V. anguillarum* است مطابقت دارد (۴). پروبیوتیک های ویبریو معرفی شده در این تحقیق می توانستند تحریک ایمنی غیر اختصاصی را از طریق، افزایش فاگوسیتوز ماکروفاژهای کلیه و افزایش فعالیت انفجار تنفسی نوتروفیل ها که همگی نقش افزایش قدرت دفاع بدن ماهی در مقابل بیماری زاها ایجاد می نماید را به عهده بگیرند. چنین افزایش فعالیت ایمنی در مقابل عوامل بیماریزایی همچون آئروموناس سالمونیسیدا در ماهی قزل آلائی رنگین کمان نیز گزارش گردیده است (۱۱). چنانچه ملاحظه بر استفاده از باکتری های زنده در غذای ماهی مطرح باشد و حساسیت برای این که ممکن است گونه های پروبیوتیک معرفی شده بتوانند بیماریزا واقع شوند باید اذعان داشت که براساس تحقیقات انجام شده ویبریوهای پروبیوتیک معرفی شده در این تحقیق یا برای ماهی بیمارزا نبوده و یا کمترین بیماریزایی را داشته اند (۳،۲).

در این تحقیق از باکتری های گونه های الجینولیتیکوس، هاروئی و اسپلندیدوس به عنوان پروبیوتیک در هر گرم غذای ماهی علیه ویبریوهای بیماریزا در ماهی قزل آلائی رنگین کمان استفاده شد که نتایج حاصل اختلاف معنی داری را با گروه کنترل نشان داد لیکن تفاوت



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

6- Buller NB.(2004) *Bacteria from fish and other aquatic animals, a practical identification manual*. CABI publishing, UK.

7- Depazo CP; Lemos ML; Lodeiros C; Bolinches J; Barja JL; Toranzo AE.(1988) Inhibitory activities of antibiotic-producing marine bacteria against fish pathogens. *Journal of Applied Bacteriology*. 65: 97-101.

8- Gatesoupe FJ.(1999) The use of probiotics in aquaculture. *Aquaculture*. 180: 147-165.

9- Garrity GM; Holt JG.(2001) *The road map to the manual*. In; Brgey's manual of systematic bacteriology. 2nd ed, Vol. 1 (eds D.R Boone and R.W Castenbolz). Springer, New York.

10- Gibson LF.(1999) *Bacteriocin activity and probiotic activity of Aeromonas*. *Journal of Applied Microbiology*, Symposium Supplement. 85: 243-248.

11- Irianto A; Austin B.(2002) Use of probiotics to control furunculosis in rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum). *Journal of Fish Diseases*. 25: 333-342.

12- Kennedy SB; Tucker JW; Thoresen M; Sennett DG.(1998) *Current methodology for the use of probiotic bacteria in the culture of marine fish larvae*. *Aquaculture* 98, World Aquaculture Society. Baton Rouge, p. 286.

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

14- Miranda CD; Zemelman R.(2002) Bacterial resistance to oxytetracycline in Chilean farming. *Aquaculture*. 212: 31-47.

15- Nikoskelaineu S; Ouwehand AC; Bulund G; Salminen S; Eas-Matti L.(2003) Immune enhancement of probiotic bacteria (*Lactobacillus rhamnosus*). *Fish and Shellfish Immunology*. 15: 443-452.

16- Olsson JC; Westerdl A; Conway PL; Kjelleberg S.(1992) Intestinal colonization potential of turbot (*Scophthalmus maximus*) of dab (*Limanda limanda*) associated bacteria with inhibitory effects against *Vibrio anguillarum*. *Applied and Environmental Microbiology*. 58: 551-558.

17- Qstergaard A; Embarek PKB; Wedell-Neergaard C; Huss HH; Gram L.(1998) Characterization of anti-Listerial lactic acid bacteria from Thai fermented fish products. *Food Microbiology*. 15: 223-233.

18- Quinn PJ; Carter ME; Markey B; Carter GR.(1994) *Clinical Veterinary Microbiology*. Wolf Publication, London.

19- Riquelme C; Hayashida G; Araya R; Uchida A; Satomi M; Ishida Y.(1996) Isolation of native bacterial strain the scallop *Argopecten*

استریپتوکوکوزیز و لاکتوکوکوزیس می باشد (۵). بطور کلی می توان نتیجه گیری نمود که گونه های الجینولیتیکوس، هاروئی و اسپلندیدوس بکار رفته شده در این تحقیق نسبتاً از نقش پروبیوتیکی برخوردار بوده و توانستند بیماری را کنترل نموده و کاربرد آنها برای ماهی هایی که در معرض بیماریزایی و بیبریه های پاتوژن از جمله گونه های انگوئیلاروم، ولنیفیکوس و اوردالی قرار می گیرند می تواند نقش بازدارندگی بجا بگذارد لذا اهمیت پروبیوتیکی آنها در آبی پروری از جمله در کشور ما در پرورش ماهی های قزل آلائی رنگین کمان در آب لب شور و شور در استان هایی که به صورت فصلی و یا در تمام سال اقدام به پرورش این گونه ماهی می نمایند و همچنین پرورش ماهی در قفس های دریای که در شمال و جنوب کشور ما در حال توسعه می باشد می تواند مورد توجه قرار گیرد. تحقیقات بیشتر در خصوص نقش پروبیوتیک ها در شرایط مزرعه در کنترل و پیشگیری از بیماری و بیبریه های بیماریزا و آزمایشات تکمیلی بیشتر در خصوص شاخص ایمنی غیراختصاصی و اختصاصی از زمینه های تحقیقی برای پژوهش های بعدی می باشند.

### تشکر و قدردانی

این تحقیق در قالب طرح های مصوب معاونت پژوهشی دانشگاه شیراز و حمایت های مالی آن معاونت محترم به انجام رسیده است همچنین کارکنان بخش بهداشت و بیماری های آبزیان، آزمایشگاه مرکزی و بخش پاتوبیولوژی دانشکده دامپزشکی دانشگاه شیراز مساعدت فراوانی را در اجرای این پژوهش نمودند که بدینوسیله سپاسگزاری بعمل می آید. سرکار خانم دکتر انصاری لاری دانشیار محترم دانشکده دامپزشکی دانشگاه شیراز در انجام آزمون های آماری همکاری فراوانی مبذول داشتند.

### پاورقی ها

- 1- Thiosulphate- citrate- bile salts- sucrose (Oxoid)
- 2- Brain hearth infusion agar (Merck)
- 3- Tryptic soy broth (Merck)
- 4- Double-agar layer method

### منابع مورد استفاده

۱- غازی س. و اخلاقی م. (۱۳۷۶). پادتن های ضد باکتری و بیبریه انگوئیلاروم در سرم خون ماهی های قزل آلائی رنگین کمان پرورشی. مجله علمی شیلات ایران. سال ششم صفحات ۴۷-۵۹.

2- Actis LA; Tolmasky ME; Crosa J.H.(1999) *Vibriosis*. In: Fish diseases and disorders, Vol.3, viral, bacterial and fungal infections(eds P.T.K Woo and D.W Bruno). CAB International, London.

3- Austin B; Austin DA.(2007) *Bacterial fish pathogens, disease of farmed and wild fish*, 4rd ed. Springer, Praxis Publishing, UK.

4- Austin B; Stuckey LF; Roubertson PAW; Effend I; Griffith DRW. (1995) A probiotic strain of *Vibrio alginolyticus* effective in reducing disease caused by *Aeromonas salmonicida*, *Vibrio anguillarum* and *Vibrio ordalii*. *Journal of Fish Diseases*. 18: 93-96.

coastal animals. *Journal of Marine Biotechnology*. 4: 220-225.

24- Tukmechi A; Morshedi A; Delirezh N.(2007) Changes in intestinal microflora and humoral immune response following probiotic administration in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Journal of Animal and Veterinary Advances*. 6: 1183-1189.

25- Vander Waaij D; Nord CE.(2000) Development and persistence of multi-resistance to antibiotics in bacteria: an analysis and a new approach to this urgent problem. *International Journal of Antimicrobial Agents*. 16: 191-197.

26- Vine NG; Leukes WD; Kaiser H; Daya S; Baxter J; Hecht T.(2004) Competition for attachment of aquaculture candidate probiotic and pathogenic bacteria on fish intestinal mucus. *Journal of Fish Diseases*. 27: 319-326.

27- West PA; Colwell R. R.(1984) *Identification of vibriaceae. An overview*. In: *Vibrios in the environment* (ed, Colwell). John Wiley Publication, NewYork.

*purpuratus* with inhibitory effects against pathogenic vibrios. *Journal of Shellfish Research*. 15 : 369-374.

20- Sakai M; Kobyashi M; Yoshida T.(1995) Activation of rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*, phagocytic cells by administration of bovine lactoferrin. *Comparative Biochemistry and Physiology*. 110B: 755-759.

21- Stasiack AS; Bauman CP.(1996) Neutrophil activity as a potent indicator for concomitant analysis. *Fish and Shellfish Immunology*. 6: 537-542.

22- Sugita H; Matsuo N; Horose Y; Iwaa M; Deguchi Y.(1997) *Vibrio* sp.. Strain NM 10, isolated from the intestine of a Japanese coastal fish, has an inhibitory effect against *Pasteurella piscicida*. *Applied of Environmental Microbiology*. 63: 4986-4989.

23- Sugita H; Matsuo N; Shibuya K; Deguchi, Y.(1996) Antibacterial substance-producing ability of the intestinal bacteria isolated from

.....

Archive of SID