مقاله تحقیقی
مجله تحقیقات دامپزشکی، ۱۳۹۵، دوره ۷۱، شماره ۳، ۳۱۰-۳۰۳
Journal of Veterinary Research. 71,3:303-310, 2016
Original Article

تأثیر تغذیه‌ای لاکتوکوکوس لاکتیس (*Lactococcus lactis* JF۸۳۱۱۵۰) بر وضعیت فلور باکتریایی روده تاسماهی ایرانی (*Acipenser persicus*) و مواجهه سازی با آئروموناس هیدروفیلا (*Aeromonas hydrophila*)

علیرضا شناور ماسوله[۱،۲*] مهدی سلطانی[۲] محمدرضا احمدی[۲] محمد پورکاظمی[۳] علی طاهری میرقائد[۲]

۱) بخش بهداشت و بیماری‌های آبزیان موسسه تحقیقات بین المللی تاسماهیان دریای خزر، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، رشت- ایران
۲) گروه بهداشت و بیماری‌های آبزیان دانشکده دامپزشکی دانشگاه تهران، تهران- ایران
۳) موسسه تحقیقات علوم شیلاتی کشور، ایران

(دریافت مقاله: ۲۳ اسفند ماه ۱۳۹۴، پذیرش نهایی: ۱۲ اردیبهشت ماه ۱۳۹۵)

چکیده

زمینه مطالعه: لاکتوکوکوس لاکتیس یکی از باکتری‌های تولیدکننده اسید لاکتیک بوده و می‌تواند به عنوان یک پروبیوتیک احتمالی در تاسماهی ایرانی مورد توجه قرار گیرد. **هدف:** هدف از انجام تحقیق حاضر، مقاوم سازی تاسماهی ایرانی در برابر باکتری بیماریزای آئروموناس هیدروفیلا پس از تغذیه با باکتری *Lactococcus lactis* JF۸۳۱۱۵۰ بوده است. **روش کار:** در مطالعه حاضر، ابتدا ۶۰ عدد تاسماهی ایرانی به مدت ۵۶ روز با مقادیر متفاوت از *L. lactis* JF۸۳۱۱۵۰ تغذیه شدند و سپس فلور باکتریایی روده با استفاده از محیط‌های کشت TSA و MRS شمارش شدند در انتها میزان مقاومت آن‌ها در مواجه سازی با آئروموناس هیدروفیلا ارزیابی گردید. **نتایج:** استفاده از *L. lactis* JF۸۳۱۱۵۰ به مدت ۵۶ روز در تغذیه تاس ماهیان بهبود معنی‌داری در کاهش فلور باکتریایی هترتروف بی هوازی اختیاری و افزایش باکتری‌های اسید لاکتیک در روده را نشان داد. همچنین در مواجهه سازی تاسماهیان مورد تغذیه علیه باکتری آئروموناس هیدروفیلا مشخص گردید که در تیمار سوم (CFU/g ۱۰^۸) میزان بازماندگی بطور معنی‌داری نسبت به گروه شاهد و سایر تیمارها بیشتر بوده است. **نتیجه گیری نهایی:** نتایج این مطالعه نشان داد که مصرف *L. lactis* JF۸۳۱۱۵۰ به میزان CFU ۱۰^۸ در هر گرم غذا می‌تواند در بهبود فلور میکروبی روده تاسماهی ایرانی و افزایش مقاومت آن نسبت به بیماریزایی آئروموناس هیدروفیلا مؤثر باشد.

واژه‌های کلیدی: تاسماهی ایرانی، لاکتوکوکوس لاکتیس، پروبیوتیک، مقاومت، بازماندگی

مقدمه

در سال‌های اخیر مطالعات زیادی در آبزی پروری در راستای استفاده از پروبیوتیک‌ها جهت نیل به اهداف گوناگون نظیر کاهش بیماری‌های عفونی و غیر عفونی، کاهش مصرف آنتی بیوتیک، بهبود شاخص گنادی بدنی و لقاح درمولدین ، بهبود تعادل فلور میکروبی دستگاه گوارش ماهی، کنترل تکثیر و فعالیت باکتری‌های بیماریزا، تحریک سیستم ایمنی، کاهش استرس و حساسیت به بیماری‌ها، بهبود رشد و ضریب تبدیل غذایی و همچنین کاهش تلفات انجام گرفته است. در این راستا نتایج خوبی در خصوص کاهش بیماری‌های عفونی انتشار یافته است (۵،۸،۱۰،۱۱،۱۲،۲۱،۲۴،۲۵،۲۶،۲۹،۳۰،۳۲). با توسعه پرورش ماهیان خاویاری در کشور انتظار می‌رود که این ماهیان نیز در روند پرورش با انواع بیماری‌های عفونی و غیر عفونی مواجه شوند. مطالعات نشان داده است که ماهیان خاویاری مستعد ابتلا به انواع بیماری‌های عفونی و غیر عفونی می‌باشند (۱۴،۱۵،۱۶،۱۸،۱۹،۲۷،۳۱،۳۳).

مطالعات مختلف در زمینه عوامل بیماریزا در ماهیان خاویاری نشان داد که آئروموناس‌ها از عوامل بیماریزا در آن‌ها محسوب می‌شوند. در مطالعات Soltani و Kalbassi در سال ۲۰۰۱، Khoshbavar- Rostami و همکاران در سال‌های ۲۰۰۶ ، ۲۰۰۷ مشخص گردید که برخی گونه‌های ماهیان خاویاری از جمله فیل ماهی و تاسماهی ایرانی مستعد سپتی سمی‌های ناشی از *A.hydrophila* هستند و موجب تلفات قابل توجه در آن‌ها می‌شود. مطالعه Meng و همکاران در سال ۲۰۱۱ نشان داد که تاسماهی آمور (*Acipenser schrenckii*) Amur sturgeon به *A.hydrophila* حساس بوده ودر این گونه سپتی سمی هموراژیک ایجادمی کند.

فاکتورهای وابسته به میزبان نظیر دمای بدن، سطح پتانسیل احیا، آنزیم‌ها، مقاومت ژنتیکی و همچنین فاکتورهای وابسته به باکتری مانند اثرات آنتاگونیستیک میکروارگانیسم‌ها، پروتئازها، باکتریوسینها، لیزوزیم‌ها، پراکسید هیدروژن، تشکیل آمونیاک، دی استیل و تغییر pH با تولید اسیدهای آلی از فاکتورهای تأثیر گذار در کلونیزاسیون میکروارگانیسم‌ها در میزبان محسوب می‌شوند (۶). واکنش‌های متقابل میکروبی یک نقش اساسی در تعادل بین رقابت میکروارگانیسم‌های بیماریزا و سودمند در طبیعت دارند، بنابراین می‌توان ترکیب جمعیت میکروبی را با دستکاری (Microbial manipulation) و تغییر شرایط محیطی ناشی از تکثیر باکتری‌های منتخب مورد تغییر قرار داد، همچنین دفع رقابتی باکتری‌های بیماریزا توسط پروبیوتیک‌ها بطور مؤثر می‌تواند مصرف پیشگیرانه آنتی

*) نویسنده مسئول: تلفن: ۰۱۳۳-۴۵۰۶۰۵۳ نمابر: ۰۱۳۳-۴۵۰۶۰۵۳ Email: asmasouleh@alumni.ut.ac.ir

بیوتیک‌ها در سیستم‌های متراکم را کاهش و یا حذف نماید (۶) . امروزه بخوبی مشخص شده است که دستگاه گوارش جانوران آبزی می‌تواند از طریق میکروبی مورد تعدیل قرار گیرد و می‌توان با تکثیر و مصرف میکروب‌های مفید در جهت کاهش و یا حذف باکتری‌های بیماریزای فرصت طلب اقدام نمود(۶). Askarian و همکاران در سال ۲۰۰۹، باکتری‌های اسید لاکتیک را در گونه تاسماهی ایرانی و فیل ماهی مورد مطالعه قراردادند، در مطالعه فوق اشاره گردید که گونه‌های مورد بررسی در اوزان بالای g ۱۰۰ و لاروی از تنوع یکسانی از باکتری‌های اسید لاکتیک به ترتیب با شمارش تقریبی $۱۰^۶$ - $۱۰^۵$ ($CFU\ g^{-1}$) روده و $۱۰^۶$ ($CFU\ Larvae^{-1}$) شامل *L. mesenteroides*، *Enterococcus seriolicida* در گونه تاسماهی ایرانی و باکتری‌های *Lactococcus*، *Lactobacillus curvatus* *L. lactis*، *raffinolactis* و *Streptococcus* sp. در فیل ماهیان برخوردارند که لزوم بررسی دقیق تری در زمینه باکتری‌های اسید لاکتیک بومی ماهیان خاویاری را مشخص می‌سازد. Ghanbary و همکاران در سال ۲۰۰۹ لاکتوباسیل‌های *L.*، *L. oris*، *L. plantarum*، *L. sakei* *L. alimentarius*، *L. coryneformis*، *casei* و *L. brevis* را از روده تاسماهیان و فیل ماهیان صید شده از دریای خزر جداسازی و مورد شناسایی قرار دادند.

باکتری‌های *Pediococcus*، *Lactococcus garvieae*، *L. lactis* *Enterococcus faecalisc*، *pentosaceus* و Weissella cibaria توسط Soltani و همکاران در سال ۲۰۱۳ از روده تاسماهی ایرانی جداسازی و از طریق مولکولی مورد شناسایی قرار گرفتند و شمارش آن‌ها در روده بر حسب لگاریتم در دامنه ۲/۹۳ تا ۵/۶۱ ($CFU\ g^{-1}$) بوده است.

با توجه به موارد فوق بکارگیری پروبیوتیک‌های اختصاصی تاسماهیان دارای اهمیت بوده و در این مطالعه تأثیر تغذیه‌ای باکتری *Lactococcus lactis* JF۸۳۱۱۵۰ جداسازی شده در بررسی Soltani و همکاران در سال ۲۰۱۳ به عنوان باکتری تولید کننده اسید لاکتیک بومی تاسماهی ایرانی و یک پروبیوتیک احتمالی بر فلور روده تاسماهی و مقاومت در برابر آئروموناس هیدورفیلا که یکی از مهمترین باکتری‌های مطرح بیماریزا در ماهیان خاویاری است مورد ارزیابی قرار گرفت.

مواد و روش کار

شرایط پرورشی و تغذیه‌ای: در این مطالعه باکتری *Lactococcus lactis* JF۸۳۱۱۵۰ جداسازی شده در بررسی Soltani و همکاران در سال ۲۰۱۳ مورد استفاده قرار گرفت. در تابستان ۱۳۹۰ تعداد ۶۰ عدد تاسماهی ایرانی حاصل از تکثیر یك جفت مولد نر و ماده طبیعی از مجتمع تکثیر و پرورش ماهیان خاویاری شهید دکتر بهشتی استان گیلان به بخش تکثیر و پرورش موسسه تحقیقات بین المللی تاسماهیان دریای خزر انتقال داده شد. تاسماهیان با تراکم ۵ عدد به ۱۲ وان پرورشی فایبر گلاس ۵۰۰ لیتری با قطر و ارتفاع ۱ متری با منبع تأمین آب مشترک رودخانه سفیدرود و چاه، مجهز به هواده به صورت تیماربندی در قالب طرح کاملاً تصادفی (۴ تیمار، هر کدام با ۳ تکرار) انتقال یافتند. در زمان شروع طرح داده های طولی و وزنی تیمار و تکرار ها با میانگین وزنی (۱۱۴±۵/۴۷g) و میانگین طولی (۳۴/۹۳±۰/۵۱cm) از توزیع نرمال آماری برخوردار بوده‌اند. تیمارهای آزمایشی شامل ۳ وان شاهد (مصرف غذای پایه بدون افزودن *L. lactis*)، ۳ وان تیمار اول (مصرف غذای پایه با افزودن *L. lactis* به میزان $۱۰^۶$ CFU در هر گرم غذا) ، ۳ وان تیمار دوم (مصرف غذای پایه با افزودن *L. lactis* به میزان $۱۰^۷$ CFU در هر گرم غذا) و ۳ وان تیمار سوم (مصرف غذای پایه با افزودن *L. lactis* به میزان $۱۰^۸$ CFU در هر گرم غذا) بود. میانگین فاکتورهای محیطی نظیر دما، اکسیژن و pH طی دوره تغذیه توسط دستگاه water checher (Hana model) مورد ثبت قرارگرفت. در طی این دوره میانگین دمای آب در وانهای پرورشی ۲۰/۴۸ ± ۱/۰۲ °C، میانگین اکسیژن ۶/۶۲±۰/۴۳ mg/l و همچنین محدوده pH بین ۷/۲۵-۶/۸ بوده است. پس از گذشت دو هفته سازگاری ، ماهیان روزانه دو بار به میزان ۳ ٪ وزن بدن طی ۵۶ روز مورد تغذیه قرار گرفتند.

از غذای ساخت شرکت بیومار فرانسه (۳ میلی متری-افیکوسیگما ۸۶۰) عنوان غذای پایه استفاده شد.

غذای مذکور از نظر آنالیز به شرح ذیر بود: پروتئین ۴۷٪، چربی ۱۴ ٪، فیبر ۳/۱ ٪، خاکستر ۸/۱ ٪، فسفر ۰/۸۸ ٪، کلسیم ۲/۳۴ ٪، سدیم ۰/۲۷ ٪، ویتامین A ۷۵۰۰ (Ui/kg)، ویتامین D۳ ۱۵۰۰ (Ui/kg)، مس ۱/۶ (mg/kg)، منگنز ۱۲/۶ (mg/kg)، روی ۷۸/۶ (mg/kg)، ید ۱/۹ (mg/kg)، اتوکسی کوئین ۱/۹ (mg/kg). برای انجام این کار ابتدا نسبت به غنی سازی غذای پایه به شرح زیر اقدام گردید(۱).

- کشت باکتری *L. lactis* شناسایی شده در مطالعات مولکولی در محیط کشت آبگوشت MRS (۴۸ ساعت در دمای ۳۰ °C)
- جمع‌آوری سلول‌های باکتری (سانتریفوژ با دور× g ۳۰۰۰ به مدت ۳۰ دقیقه)
- سه بار شستشوی سلول‌های باکتری با سرم فیزیولوژی
- تعیین تراکم سوسپانسیون سلول‌های باکتری با دستگاه نانومتر
- اضافه کردن سوسپانسیون سلول‌های باکتری به پلت‌های غذایی جهت حصول تراکم‌های $۱۰^۸$ - $۱۰^۶$سلول باکتری در هر گرم غذا

شمارش باکتریایی روده و مدفوع: برای شمارش باکتری‌های روده و مدفوع تاسماهیان در انتهای دوره پرورش از روش توصیه شده توسط Merrifield و همکاران در سال ۲۰۱۱ با کمی اصلاح استفاده شد. در انتهای دوره تعداد ۳ ماهی از هر تیمار بطور تصادفی صید و به آزمایشگاه انتقال یافت. پس از بیهوشی ماهیان توسط MS۲۲۲ (۲۰۰ ppm) و وارد نمودن ضربه فیزیکی به ناحیه سر، با استفاده از پنبه الکل ۷۰ ٪ قسمت شکمی ماهیان ضد عفونی شد. در شرایط استریل ناحیه شکمی ماهیان

با تیغ اسکالپل استریل برش و روده خارج گردید. پس از نمونه برداری از مدفوع، با استفاده از سرم فیزیولوژی استریل رقت‌های 10^{1} تا 10^{8} تهیه گردید. روده نیز پس از تخلیه کامل، سه بار توسط سرم فیزیولوژی استریل شستشو گردید و پس از نمونه برداری با استفاده از سرم فیزیولوژی استریل رقت‌های 10^{1} تا 10^{7} از روده تهیه شد. از رقت‌های تهیه شده مدفوع و روده به میزان ۰/۱ml بر روی محیط‌های کشت TSA (Tryptic Soy Agar) به منظور شمارش باکتری‌ها در روده یا مدفوع و محیط کشت اختصاصی باکتری‌های اسید لاکتیک MRS تلقیح انجام شد. انکوباسیون پلیت‌های TSA در شرایط هوازی و MRS در شرایط بی هوازی به ترتیب در دمای ۲۵°C و ۳۰°C انجام گرفت. پس از انکوباسیون، باکتری‌های هر پلیت برحسب واحد کلنی (CFU) در گرم، مورد شمارش قرار گرفتند.

مواجهه سازی (Challenge): برای انجام آزمایش مواجهه سازی ماهیان پس از دوره تغذیه از روش توصیه شده توسط Abd El-Rhman و همکاران در سال ۲۰۰۹ با کمی تغییر استفاده گردید. در انتهای دوره پرورشی ، دو تکرار ۵ عددی از هر تیمار و گروه کنترل با استفاده از باکتری بیماریزای (۰۴) *Aeromonas hydrophila* گروه بهداشت و بیماری‌های آبزیان دانشکده دامپزشکی دانشگاه تهران، به میزان ۰/۱ml به روش IP و با دوز (cells/fish) 2×10^{6} (LD50) تعیین شده در تاس ماهی ایرانی (۲۷) مورد تزریق قرار گرفتند. ماهیان تزریقی به مدت ۱۰ روز مورد بررسی قرار گرفته و ضمن ثبت تلفات و مشاهدات، از ماهیان تلف شده و در حال مرگ کشت مجدد از اندام‌های داخلی بعمل آمد.

آنالیزهای آماری: به منظور بررسی توزیع نرمال داده‌ها در گروه‌ها و تکرارها جهت تشکیل تیمارها از آزمون Kolmogorov-smirnov استفاده گردید. در صورت نرمال بودن داده‌ها به منظور مقایسه آماری بین گروه‌ها در تیمارها از آزمون آنالیز واریانس یکطرفه (Oneway Anova) و پس از انجام آزمون Test of Homogeneity of Variances جهت مقایسه گروه‌ها با یکدیگر، آزمون دانکن (Duncana) مورد استفاده قرار گرفت. در صورت نرمال نبودن داده‌ها جهت مقایسه تیمارها از آزمون Kruskal Wallis و به منظور مقایسه بین گروه‌ها از آزمون Mann-Whitney استفاده گردید. کلیه آنالیزهای آماری با استفاده از نرم افزار SPSS نسخه ۱۷ و جهت رسم نمودارها، نرم افزار Excel۲۰۰۷ مورد استفاده قرار گرفت.

نتایج

نتایج شمارش باکتری‌های هتروتروف هوازی و باکتری‌های اسید لاکتیک: تعداد باکتری‌های هتروتروف هوازی موکوس روده و مدفوع تاسماهی ایرانی پس از دوره تغذیه در جدول ۱ آمده است. نتایج حاصل از شمارش باکتریایی روده تاسماهی ایرانی براساس آزمون تجزیه واریانس یکطرفه نشان داد که در بین تیمارها اختلاف معنی‌دار آماری وجود دارد

جدول ۱. تعداد باکتری‌های هتروتروف هوازی موکوس روده و مدفوع (Std. Error ± Log CFU g^{-1}) تاسماهی ایرانی در تیمارهای آزمایشی در پایان ۵۶ روز تغذیه با *L. lactis*.

نمونه	تیمار اول (10^{6})	تیمار دوم (10^{7})	تیمار سوم (10^{8})	تیمار شاهد
موکوس روده	۴/۴۴ ± ۰/۰۲^{c}	۴/۰۵ ± ۰/۰۳^{a}	۴/۲۵ ± ۰/۰۲^{b}	۷/۲۱ ± ۰/۰۴ ^{d}
مدفوع	۶/۱۸ ± ۰/۰۲ ^{b}	۵/۶۷ ± ۰/۰۳^{a}	۵/۷۶ ± ۰/۰۳^{a}	۷/۲۶ ± ۰/۰۳ ^{C}

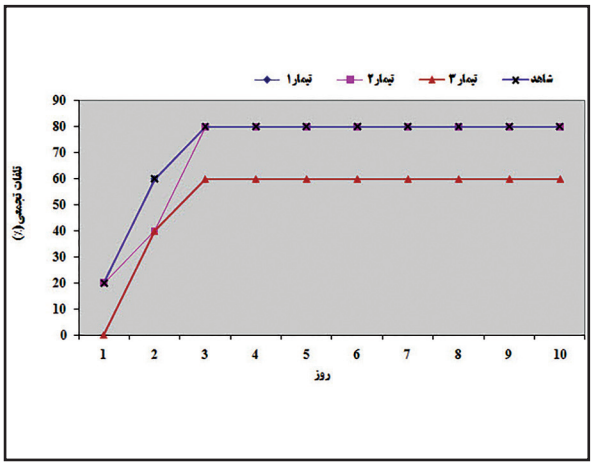
جدول ۲. تعداد باکتری‌های اسید لاکتیک موکوس روده و مدفوع (Std. Error ± Log CFU g^{-1}). تاسماهی ایرانی در تیمارهای آزمایشی در پایان ۵۶ روز تغذیه با *L. lactis*.

نمونه	تیمار اول (10^{6})	تیمار دوم (10^{7})	تیمار سوم (10^{8})	تیمار شاهد
موکوس روده	۳/۳۵ ± ۰/۰۵ ^{b}	۳/۸۸ ± ۰/۰۱ ^{c}	۴/۱۹ ±۰/۰۱ ^{c}	۲/۲۰ ± ۰/۱۸ ^{a}
مدفوع	۵/۲۱ ± ۰/۰۲ ^{b}	۵/۸۵ ± ۰/۰۱ ^{c}	۶/۰۲ ± ۰/۰۱ ^{c}	۲/۰۲ ±۰/۱۵ ^{a}

($p<0/05$) و براساس آزمون دانکن به منظور مقایسه دو به دو گروها با یکدیگر مشاهده گردید که همه تیمارها با همدیگر دارای اختلاف معنی‌دار آماری هستند ($p<0/05$). بیشترین و کمترین میانگین لگاریتم شمارش باکتریایی روده تاسماهیان به ترتیب در تیمار شاهد (۷/۲۱ ± ۰/۰۴) و تیمار ۲ (۴/۰۵ ± ۰/۰۳) مشاهده گردید. همچنین لگاریتم شمارش باکتریایی مدفوع تاسماهی ایرانی در تیمارهای مختلف براساس آزمون تجزیه واریانس یکطرفه مورد بررسی قرار گرفت و در بین آن‌ها اختلاف معنی‌دار آماری مشاهده شد ($p<0/05$). آزمون دانکن نیز نشان داد که تیمار شاهد (۷/۲۶ ± ۰/۰۳) در مقایسه با سایر تیمارها از لحاظ آماری معنی‌دار بوده است ($p<0/05$). همچنین تیمار ۱ (۶/۱۸ ± ۰/۰۲) با تیمار ۲ (۵/۶۷ ± ۰/۰۳) و تیمار ۳ (۵/۷۶ ± ۰/۰۳) دارای اختلاف معنی‌دار آماری است ($p<0/05$).

نتایج شمارش باکتری‌های اسید لاکتیک موکوس روده و مدفوع تاسماهی ایرانی پس از دوره تغذیه در جدول ۲ آورده شده است. آزمون تجزیه واریانس یکطرفه نشان داد که لگاریتم شمارش باکتری‌های اسید لاکتیک روده تاسماهی ایرانی در بین تیمارها دارای اختلاف معنی‌دار آماری است ($p<0/05$). با استفاده از آزمون دانکن مشخص گردید که تیمار شاهد (۲/۲۰ ± ۰/۱۸) با سایر تیمارها اختلاف معنی‌دار آماری دارد ($p<0/05$). نتایج نشان داد که بیشترین و کمترین لگاریتم شمارش باکتری‌های اسید لاکتیک روده تاسماهی ایرانی به ترتیب در تیمار ۳ (۴/۱۹ ± ۰/۰۱) و تیمار شاهد بوده است. همچنین تیمار ۱ (۳/۳۵ ± ۰/۰۵) با تیمار ۲ (۳/۸۸ ± ۰/۰۱) و تیمار ۳ دارای اختلاف معنی‌دار آماری است ($p<0/05$).

بررسی‌های آماری نتایج حاصل از شمارش باکتری‌های اسید لاکتیک مدفوع تاسماهی ایرانی براساس آزمون تجزیه واریانس یکطرفه نشان داد که در بین تیمارها اختلاف معنی‌دار آماری وجود دارد ($p<0/05$) و براساس آزمون دانکن نیز مشخص گردید که تیمار شاهد (۲/۰۲ ± ۰/۱۵) با سایر تیمارها دارای اختلاف معنی‌دار آماری است ($p<0/05$). همچنین تیمار ۱ (۵/۲۱ ± ۰/۰۲) با تیمار ۲ (۵/۸۵ ± ۰/۰۱) و تیمار ۳ (۶/۰۲ ± ۰/۰۲) دارای اختلاف معنی‌دار آماری بوده است ($p<0/05$) بر اساس نتایج



نمودار۱. مقایسه میزان تلفات تاسماهی ایرانی در تیمارهای آزمایشی در پایان ۵۶ روز تغذیه با *L. lactis* درمواجهه سازی با *Aeromonas hydrophila*.

بیشـترین میزان باکتری‌های اسید لاکتیك در روده و مدفوع در تیمار سوم مورد مشاهده قرار گرفت.

نتایج مواجهه سـازی (Challenge): در این بررسـی علائمی نظیر خونریـزی در مخرج، قاعده باله‌های مخرجی و دمـی و اطراف دهان و در اندام‌های داخلی نیز هموراژی در کبد، کیسه شنا، حفره صفاقی و پرخونی در کلیه نیز مورد مشـاهده قرارگرفت. اولین تلفات پس از ۲۴ ساعت مورد ثبت قرار گرفت. میزان بازماندگی طی ۱۰ روز در پاسـخ به مواجه سازی با *Aeromonas hydrophila* از ۲۰ تا ۴۰ ٪ متغیر بوده اسـت (نمودار۱). در این بررسی تفاوت معنی‌داری به همراه بالاترین میزان بازماندگی درتیمار سـوم (۴۰ ٪) نسبت به سایر تیمارها و کنترل مشاهده گردید ($p<0/05$) و دارای نتایج بهتری نسبت به سایر تیمارها بوده است.

بحث

افزایش سطح کلونیزاسیون پروبیوتیک‌ها در دستگاه گوارش می‌تواند میزان رقابت آن‌ها را با عوامل بیماریزا افزایش داده و نقش محافظتی داشته باشد. در راستای جابجایی جمعیت میکروبی روده با پروبیوتیک‌ها، یک توان تأثیر گذار پروبیوتیکی در دستگاه گوارش ایجاد می‌شود (۲۳).

نتایـج مطالعـه حاضر نشـان داد که در سـطوح مختلـف تیمارهای پروبیوتیک، میانگین شـمارش باکتریایی روده و مدفوع (TVC) نسبت به گروه کنترل تفاوت معنی‌دار آماری ($p<0/05$) وجود داشته است و احتمالاً باکتری مـورد مطالعه در کاهش جمعیت‌های معمـول روده نیز مؤثر بوده اسـت. از سوی دیگر نتایج شمارش باکتری‌های اسید لاکتیک در روده نیز نشـان داد که کلونیزاسیون این باکتری‌ها بخوبی در روده تاسماهی ایرانی انجام شـده و با افزایش میزان غنی سـازی، میزان شـمارش آن‌ها نیز در روده بیشـتر شـده اسـت و احتمالاً آداپته بودن باکتری بکارگرفته شده در افزایش میزان کلونیزاسـیون و شـمارش باکتری‌های اسید لاکتیک مؤثر بوده است. تحقیق حاضر نشان داد که مصرف باکتری اسید لاکتیک بومی توانسـته است بطور معنی‌داری در کاهش شـمارش فلور باکتریایی روده و مدفوع مؤثر باشـد که می‌توان از این پتانسیل در ارتقای وضعیت بهداشتی پرورش استفاده نمود. نتایج نشان داد که با بکارگیری 10^8 CFU از باکتری *L. lactis* JF۸۳۱۱۵۰ در هر گرم غذا می‌توان شـاهد شرایط مطلوب‌تری از میزان کلونیزاسـیون در روده و بالطبع آن بهبود شرایط میکروفلور روده و مقاومت در برابر باکتری بیماریزای آئروموناس هیدروفیلا در تاسـماهی ایرانی بود. در مطالعه Askarian و همکاران در سال ۲۰۱۱ که با مصرف باکتری‌های اسـید لاکتیـک *L. mesenteroides* و *Lactobacillus curvatus* جداسـازی شده از تاسماهی ایرانی و فیل ماهی با دوز 10^9 به مـدت ۵۰ روز بر روی نـوزادان ۵۰-۴۰ میلی گرمی انجام گرفت، میانگین لگاریتم شـمارش باکتریایی روده در حدود ۳ بوده است، همچنین شمارش باکتری‌های اسید لاکتیک در این گونه‌ها در روده از ۲/۲۷ تا ۳/۰۲ بر حسب لگاریتم کلنی در هر گرم روده متغیر بوده است. در مطالعه انجام گرفته توسط Merrifield و همکاران در سـال ۲۰۰۹a که بر روی قزل آلای رنگین کمان ۷۰ گرمی با مصرف باکتری‌های اسید لاکتیک طی ۱۰ هفته انجام شد، حداقل میزان شـمارش باکتری‌ها در روده و مدفوع به ترتیب ۲/۹۶ و ۷/۵۳ بوده است. همچنین در مطالعه دیگر توسط Merrifield و همکاران در سـال ۲۰۱۱ که با اسـتفاده از باکتـری *P.acidilactici* در قزل آلای رنگین کمان انجام گرفت حداقل میزان شمارش باکتری‌ها در روده و مدفوع به ترتیب ۳/۲۰ و ۵/۶۴ بوده است. از عوامل تأثیر گذار در ترکیب میکروفلور دستگاه گوارش می‌توان به عوامل مختلفی نظیر نوع تغذیه، مقدار، ترکیب شیمیایی و در دسترس بودن مواد لازم جهت رشد، فراهم بودن مکان‌های کلونیزاسیون، واکنش‌های ایمنولوژیکی، استراتژی‌های تخمیر باکتری‌ها، زمان عبور در دستگاه گوارش، pH روده، پتانسیل اکسیداسیون احیا، فراهم بودن پذیرنده‌هـای الکترونی غیر آلـی (Availability of inorganic electron acceptors)، تولید متابولیت‌های باکتریایی، حضور ترکیبات ضد میکروبی، ترکیبات زنوبیوتیک (Xenobiotic compounds)، سن میزبان و حرکات دودی روده اشـاره نمود (۱۳) که می‌توان با توجه به موارد فوق و تنوع آبزیان به تفاوت‌های کمی و کیفی در جمعیت‌های باکتریایی و پروبیوتیکی دستگاه گوارش پی برد. با توجه به نتایج می‌توان اشاره نمود که کلونیزاسـیون مناسب *L. lactis* در روده گونه تاس ماهی می‌تواند احتمالاً ناشـی از جداسـازی اولیه آن از همین گونه و فراهم بودن شرایط تثبیت، کلونیزاسیون و رشد آن در روده تاسماهیان باشد. بنابراین می‌توان پیش بینی نمود که بکارگیری پروبیوتیک‌های اختصاصی در آبزیان، بازدهی پرورش در آن‌ها را افزایش خواهد داد.

مطالعـه حاضر نشـان داد که میزان تلفات در تیمارسـوم که از غذای حاوی *L. lactis* به میزان 10^8 ($CFU\ g^{-1}$) طی ۵۶ روز استفاده کرده بود در مواجه سازی با *A. hydrophila* نسبت به سایر تیمارها و گروه کنترل از کاهش معنی‌داری ($p<0/05$) برخوردار بوده است. علائم مشاهده شده پس

از تزریق در تاسماهی ایرانی شبیه علائم اشاره شده در بررسی Soltani و Kalbassi در سال ۲۰۰۱ نظیر عدم تعادل و بیحالی در شنا، بدن تیره همراه با نقاط خونریزی در سطوح خارجی و هموراژی در اندام‌های داخلی بوده است. براساس اطلاعات موجود، مطالعات مشابه در خصوص مواجه سازی ماهیان خاویاری با عوامل بیماریزا پس از بکارگیری پروبیوتیک مشاهده نگردید و بنابراین از آزمایش‌های مشابه انجام گرفته بر روی سایر گونه‌ها جهت مقایسه استفاده گردید.

مصرف باکتری‌های اسید لاکتیک *L.lactis* ssp.*lactis* CLFP ۱۰۰، *L. mesenteroides* CLFP ۱۹۶ و *L. sakei* CLFP ۲۰۲ در دوز 10^{6} (CFU g^{-1}) به مدت دو هفته، بطور معنی‌داری ($p<0/05$) میزان بازماندگی در قزل آلای رنگین کمان مواجه شده با *A. salmonicida* را به میزان ۳۴/۲ - ۳۲/۴ ٪ افزایش داد (۷). ماهیان قزل آلای رنگین کمان با مصرف باکتری *L. rhamnosos* با دوز 10^{9} و 10^{12} (CFU g^{-1}) به مدت ۵۱ روز، افزایش بازماندگی به ترتیب برابر با ۳۳/۷ و ۶/۳ ٪ را به دنبال مواجه سازی با *A. salmonicida* به همراه داشته است (۲۵). تفاوت اثرات پروبیوتیک‌ها علیه عوامل بیماریزای ویروسی و باکتریایی ممکن است ناشی از تفاوت در مکانیسم‌های دفاعی ماهیان بر علیه عوامل مختلف بیماریزا و همچنین تفاوت در مکانیسم‌های پاتوژنتیک عوامل بیماریزا باشد (۳۱).

بررسی Brunt و همکاران در سال ۲۰۰۷ نشان داد که در ماهیان قزل آلای رنگین کمان با تغذیه Bacillus JB-۱ و *Aeromonas sobria* GC۲ با تراکم 2×10^{8} (CFU g^{-1}) به مدت دو هفته سبب می‌شود که این گونه ماهی بر علیه *Vibrio ordalii*، *V. anguillarum*، *Streptococcus iniae*، *A. salmonicida*، *L. garvieae*، و *Y. ruckeri* محافظت شود.

در ماهی گروپر، غذای غنی شده با *L. plantarum* به مدت ۲۸ روز (۳۱)، بکارگیری باکتری *Clostridium butyricum* CB۲ در ماهی Chinese drum (*Miichthys miiuy*) طی ۳۰ روز (۲۶) و مصرف *B. subtilis* و *L. acidophilus* یا مخلوطی از آن‌ها در تیلاپیای نیل به مدت ۶۰ روز (۲)، میزان تلفات را در مواجه سازی با *A. hydrophila*، *V. anguillarum*، *Streptococcus Pseudomonas fluorescens* و *Streptococcus iniae* کاهش دادند.

مطالعه Nikoskelainen و همکاران در سال ۲۰۰۱ نشان داد که مصرف *L.rhamnosus* (ATCC ۵۳۱۰۳) در قزل آلای رنگین کمان با دوزهای 10^{9} و 10^{12} (CFU g^{-1}) به مدت ۵۱ روز میزان تلفات را پس از مواجه سازی با *A. salmonicida* به ترتیب به ۱۸/۹ و ۴۶/۳ ٪ نسبت به کنترل ۵۲/۶ ٪ کاهش داده است. همچنین در بررسی Kim و Austin در سال ۲۰۰۶ که با استفاده از *C. maltaromatieum* (B۲۶) و (B۳۳) *C.divergens* با دوز 10^{7} (CFU g^{-1}) در غذا به مدت ۱۴ روز بر روی قزل آلای رنگین کمان انجام گرفت ، افزایش محافظت ایمنی پس از انجام مواجه سازی با *A. salmonicida* و *Y. ruckeri* مشاهده گردید.

نتیجه گیری نهایی: نتایج این مطالعه نشان داد که مصرف *Lactococcus lactis* JF۸۳۱۱۵۰ می‌تواند در بهبود فلور میکروبی روده و افزایش مقاومت نسبت به بیماریزایی باکتری آئروموناس هیدروفیلا مؤثر بوده و به عنوان یک پروبیوتیک احتمالی مطرح باشد.

تشکر و قدردانی

نویسندگان مقاله مراتب تشکر و قدردانی خود را از ریاست و کارشناسان محترم مؤسسه تحقیقات بین المللی تاسماهیان دریای خزر، مؤسسه تحقیقات علوم شیلاتی کشور، دانشکده دامپزشکی دانشگاه تهران و مجتمع تکثیر و پرورش ماهیان خاویاری شهید دکتر بهشتی استان گیلان ابراز می‌دارند.

References

1. Abd El-Rhman, A.M., Khattab, Y.A.E. , Shalaby, A.M.E. (2009) Micrococcus luteus and Pseudomonas species as probiotics for promoting the growth performance and health of Nile tilapia, *Oreochromis niloticus*. Fish Shellfish Immun. 27:175-180.
2. Aly, S.M., Ahmed, YA-G., Ghareeb, AA-A.,Mohamed, M.F. (2008) Studies on *Bacillus subtilis* and *Lactobacillus acidophilus*, as potential probiotics, on the immune response and resistance of Tilapia nilotica (*Oreochromis niloticus*) to challenge infections. Fish Shellfish Immun. 25: 128-136.
3. Askarian, F., Kousha, A., RingØ, E. (2009) Isolation of lactic acid bacteria from the gastrointestinal tract of Beluga (*Huso huso*) and Persian sturgeon (*Acipenser persicus*). J Appl Ichthyol. 25 (Suppl. 2): 91-94.
4. Askarian, F., Kousha, A., Salma,W., Ringø, E.(2011) The effect of lactic acid bacteria administration on growth, digestive enzyme activity and gut microbiota in Persian sturgeon (*Acipenser persicus*) and beluga (*Huso huso*) fry. Aquacult Nutr. 17: 488-497.
5. Babu, S.M., Banerjee, C.S., Abraham, T.J. (2003) Effect of gram positive bacterium, Lactobacillus sp. on the growth performance of gold

fish, Carassius auratus Linnaeus, 1758. Environ Ecol. 21: 17-19.

6. Balcazar, J.L., Blas, I., Ruiz-Zarzuela, I., Cunningham, D., Vendrell, D., Muzquiz, J.L. (2006) Review.The role of probiotics in aquaculture. Vet Microbiol. 114: 173-186.
7. Balcazar, J.L., Blas, I., Ruiz-Zazuela, I., Vandrell, D., Girones, O., Muzquiz, J.L. (2007) Enhancement of the immune response and protection induced by probiotic lactic acid bacteria against furunculosis in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). FEMS Immunol Med Mic. 51: 185-193.
8. Balcázar, J.L., Vendrell, D., Blas, I., Ruiz-Zarzuela, I., Muzquiz, J.L., Girones, O. (2008) Characterization of probiotic properties of lactic acid bacteria isolated from intestinal microbiota of fish. Aquaculture. 278: 188-191.
9. Brunt, J., Newaj-Fyzul, A., Austin, B. (2007) The development of probiotics for the control of multiple bacterial diseases of rainbow trout, Oncorhynchus mykiss (Walbaum). J Fish Dis. 30: 573-579.
10. Castex, M., Lemaire, P., Wabete, N., Chimet, L. (2009) Effect of dietary probiotic Pediococcus acidilactici on antioxidant defences and oxidative stress status of shrimp Litopenaeus stylirostris. Aquaculture. 294: 306-313.
11. Díaz-Rosales, P., Arijo, S., Chabrillón, M., Alarcón, F.J., Tapia-Paniagua, S.T., Martínez-Manzanares, E., Balebona, M.C., Moriñigo, M.A. (2009) Effects of two closely related probiotics on respiratory burst activity of Senegalese sole (Solea senegalensis, Kaup) phagocytes, and protection against Photobacterium damselae subsp. piscicida. Aquaculture. 293: 16-21.
12. Fooks, L.J., Fuller, R., Gibson, G.R. (1999) Prebiotics, probiotics and human gut microbiology. Int Dairy J. 9: 53-61.
13. Ghanbari, M., Rezaei, M., Jami, M., Nazari, R. M. (2009) Isolation and characterization of Lactobacillus species from intestinal contents of beluga (*Huso huso*) and Persian sturgeon (*Acipenser persicus*). Iran J Vet Res Shiraz Uni. 10: 152-157.
14. Hedrick, R.P., McDowell, T.S., Ahne, W., Torhy, C., Kinkelin, P. (1992) Properties of three iridovirus-like agents associated with systemic infections of fish. Dis Aquat Oragan. 13: 203-209.
15. Khoshbavar-Rostami, H.A., Soltani, M., Hassan, H.M.D. (2006) Immune response of great sturgeon (*Huso huso*) subjected to long-term exposure to sublethal concentration of the organophosphate, diazinon. Aquaculture. 256: 88-94.
16. Khoshbavar-Rostami, H.A., Soltani, M., Hassan, H.M.D. (2007) Immune responses of great Sturgeon (*Huso huso*) to *Aeromonas hydrophila*. J Fish Biol. 70: 1931-1938.
17. Kim, D., Austin, B. (2006) Innate immune responses in rainbow trout (Oncorhynchus mykiss, Walbaum) induced by probiotics. Fish Shellfish Immun. 21: 513-524.
18. LaPatra, S.E., Groff, J.M., Jones, G.R., Munn, B., Patterson, T.L., Holt, R.A., Hauck, A.K., Hedrick, R.P. (1994) Occurrence of white sturgeon iridovirus infections among cultured white sturgeon in the Pacific Northwest. Aquaculture. 126: 201-210.
19. Meng,Y., Xiao, H.B., Zeng, L.B. (2011) Isolation and identification of the hemorrhagic septicemia pathogen from Amur sturgeon, Acipenser schrenckii. J Appl Ichthyol. 27: 799-803.
20. Merrifield, D.L., Dimitroglou, A., Bradley, G., Baker, R.T.M., Davies, S.J. (2009a) Probiotic applications for rainbow trout (Oncorhynchus mykiss Walbaum) I. Effects on growth performance, feed utilization, intestinal microbiota and related health criteria. Aquacult Nutr. DOI: 10.1111/j.1365-2095.2009. 00689.x.
21. Merrifield, D.L., Bradley, G., Baker, R.T.M., Davies, S.J. (2009b) Probiotic applications for rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss* Walbaum) II. Effects on growth performance, feed utilization, intestinal microbiota and related health criteria post antibiotic treatment. Aquacult Nutr. DOI: 10.1111/j.1365-2095.2009. 00688.x
22. Merrifield, D.L., Bradley, G., Harper, G.M., Baker, R.T.M., Munn, C.B., Davies S.J. (2011) Assessment of the effects of vegetative and lyophilized Pediococcus acidilactici on growth, feed utilization, intestinal colonization and health pa-

rameters of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss* Walbaum). Aquacult Nutr. 17: 73-79.

23. Nikoskelainen, S., Ouwehand, A., Salminen, S., Bylund, G. (2001) Protection of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) from furunculosis by Lactobacillus rhamnosus. Aquaculture. 198: 229-236.
24. Pan, X., Wu, T., Song, Z., Tang, H., Zhao, Z. (2008) Immune responses and enhanced disease resistance in Chinese drum, Miichthys miiuy (Basilewsky), after oral administration of live or dead cells of Clostridium butyricum CB2. J Fish Dis. 31: 679-686.
25. Rengpipat, S., Rueangruklikhit, T., Piyatiratitivorakul, S. (2008) Evaluations of lactic acid bacteria as probiotics for juvenile seabass Lates calcarifer. Aquac Res. 39: 134-143.
26. Sharifuzzaman, S.M., Austin, B. (2009) Influence of probiotic feeding duration on disease resistance and immune parameters in rainbow trout. Fish Shellfish Immun. 27: 440-445.
27. Soltani, M., Kalbassi, M.R. (2001) Protection of Persian sturgeon (*Acipenser persicus*) fingerling against *Aeromonas hydrophila* septicemia using three different antigens. Bull Eur Assn Fish P. 21: 235- 240.
28. Soltani, M., Pourkazemi, M., Ahmadi, M.R., Taherimirghead, A., Merrifield, D.L., Masouleh, A.S. (2013) Genetic diversity of lactic acid bacteria in the intestine of Persian sturgeon fingerlings. J Appl Ichthyol. 29: 494-498.
29. Son,V.M., Chang, C., Wu, M., Guu, Y., Chiu, C., Cheng, W. (2009) Dietary administration of the probiotic, *Lactobacillus plantarum*, enhanced the growth, innate immune responses, and disease resistance of the grouper Epinephelus coioides. Fish Shellfish Immun. 26: 691-698.
30. Vazquez, J.A., Gonza´lez, M.P., Muradoet, M.A. (2005) Effects of lactic acid bacteria cultures on pathogenic microbiota from fish. Aquaculture. 245: 149- 161.
31. Vuilaume, A., Brun, R., Chene, P., Sochoni, E., Lesel, E. (1986) First isolation of *Yersinia ruckeri* from Sturgeon (Acipenser baeri). Branot. In South West of France, Bult. Eur. Ass. Fish Pathology. Bull Eur Assn Fish P. 7: 18-21.
32. Yanbo, W., Zirong, X. (2006) Effect of probiotics for common carp (*Cyprinus carpio*) based on growth performance and digestive enzyme activities. Anim Feed Sci Tech. 127: 283-292.
33. Yang, W., Li, A. (2009) Isolation and characterization of Streptococcus dysgalactiae from diseased Acipenser schrenckii. Aquaculture. 294: 14-17.

The effect of using *Lactococcus lactis* JF831150 on the status of the intestinal bacterial flora of Persian sturgeon (*Acipenser persicus*) and exposure to *Aeromonas hydrophila*

Shenavar Masouleh, A.[1,2*], Soltani, M.[2], Ahmadi, M.[2], Pourkazemi, M.[3], Taherimirghaed, A.[2]

[1]*Department of Aquatic Animal Health, International Sturgeon Research Institute, Agricultural Research, Education and Extension Organization (AREEO), Rasht- Iran*

[2]*Department of Aquatic Animal Health, Faculty of Veterinary Medicine, University of Tehran, Center of excellence of aquatic animal health, University of Tehran- Iran*

[3]*Iranian Fisheries Science Research Instititue*

(Received 13 March 2016, Accepted 1 May 2016)

Abstract:

BACKGROUND: *Lactococcus lactis* is one of the lactic acid bacteria that can be considered as a probiotic in Persian sturgeon. **OBJECTIVES:** The aim of the present study was to increase the resistance to *Aeromonas hydrophila* after feeding the *L. lactis* JF831150. **METHODS:** In the present study, first 60 fish were fed different doses of *L.lactis* JF831150 for 56 days. The bacterial flora were counted with TSA and MRS. Resistance of fish against *A. hydrophila* were considered after feeding. **RESULTS:** The use of *L. lactis* JF831150 for 56 days in *P. sturgeon* showed significant improvement in decreasing heterotrophic aerobic bacteria flora and increasing the lactic acid bacteria in the intestine. In the face of fish against *A. hydrophila* in third treatment (10^8 CFU/g), the survival rate was shown to be significantly higher than the control and other treatments. **CONCLUSIONS:** The results showed that consumption of *L. lactis* JF831150 (10^8 CFU/g) could improve the intestinal flora and increase resistance to *A. hydrophila*, and therefore has potential for use with P. sturgeon.

Keyword: *Acipenser persicus, Lactococcus lactis*, probiotic, resistance, survival

Figure Legends and Table Captions

Table 1. The number of heterotrophic aerobic bacteria in the intestinal mucosa and digesta in Persian sturgeon treatments at the end of 56 days feeding with *Lactococcus lactis*.

Table 2. The number of lactic acid bacteria in the intestinal mucosa and digesta in Persian sturgeon treatments at the end of 56 days feeding with *Lactococcus lactis*.

Graph 1. Comparison of mortality in the treatments of Persian sturgeon at the end of 56 days feeding with *Lactococcus lactis* challenged with *Aeromonas hydrophila*.

***Corresponding author's email: asmasouleh@alumni.ut.ac.ir, Tel: 0133-4506053, Fax: 0133-4506053**