چکیده

در این مطالعه که برای اولین بار در ایران انجام گرفت پس از جداسازی و خالص سازی باکتریهای جدا شده از دستگاه گوارش ماهی قزل آلا (*Oncorhynchus mykiss*) ، خواص پروبیوتیکی آنهادر شرایط آزمایشگاهی با تزریق به ماهی سالم و رویارویی با باکتری استرپتوکوکوس اینیه در محیط آزمایشگاهی مورد ارزیابی قرار گرفت. در مرحله بعد تاثیر باکتریهای جدا شده در قالب ۵ تیمار (لوگهای ۷ ، ۸ و ۹ باکتری لاکتیک، ویبریو و سودوموناس) و یک تیمار شاهد بر شاخص های رشد و بقاء ، برخی شاخص های هماتولوژی ، ایمونولوژی و فیزیولوژی در روزهای ۳۰ و ۶۰ روز مورد آزمایش قرار گرفته و در نهایت در مرحله پایانی، مقاومت ماهیان در برابر استرپتوکوکوزیس مورد ارزیابی نهایی قرار گرفت. نتایج نشان داد که باکتریهای جدا شده قادر به تقویت شاخص های رشد (وزن، ضریب تبدیل غذایی، ضریب چاقی، ضریب رشد ویژه و ضریب بازده پروتئینی) و بقاء بوده و تیمار لوگ ۸ باکتری لاکتیک دارای اختلاف معنی دار با سایر تیمارها و شاهد بود. در ارزیابی شاخصهای هماتولوژی مشخص شد که در اکثر تیمارها افزایش هماتوکریت، هموگلوبین وتعداد گلبول قرمز وجود دارد ولی اختلاف معنی دار نبود . به هنگام استفاده از لوگ ۸ باکتریهای لاکتیک و ویبریو ، میزانMCV ، MCH و MCHC کاهش داشت ولی فاقد اختلاف معنی دار بود. استفاده از لوگ ۸ باکتری لاکتیک دارای بیشترین اثر بر میزان آنزیمAST ، IgM و کمپلمانC3 بوده و دارای اختلاف معنی دار با بقیه تیمارها بود . در اکثر موارد تیمار حاوی ویبریو در رتبه دوم قرار داشته و در خصوص سایر تیمارها نیز نتایج ضد و نقیض بود . در برخی از شاخصها افزایش و در برخی از موارد نیز کاهش دیده شد. نتایج رویارویی ماهیان مورد بررسی با استرپتوکوکوس اینیه نشان داد که بیشترین بازماندگی در تیمارهای دارای لوگ ۸ (۹۶/۶۶ درصد) و ویبریو(۹۳/۳۳ درصد) بوده و و سایر تیمارها در مرحله بعد قرار داشته و تیمار شاهد نیز دارای کمترین بازماندگی (۲۵/۳۸ درصد) بوده است. نتیجه گیری که از تحقیق حاضر حاصل میشود آنست که اولا باکتریهای جدا شده از ماهی قزل آلا دارای خواص پروبیوتیک بوده و قادر به بروز تغییرات مختلف در شاخصهای کیفی ماهی قزل آلا میشوند ثانیا" باکتریهای گروه لاکتیک خصوصا" با لوگ ۸ باعث بروز تغییرات مثبت معنی دار در شاخصهای رشد و ایمنی شده و ماهی را در برابر استرپتوکوکوزیس ایمن می کند.

کلمات کلیدی: باکتری لاکتیک ، قزل آلا، شاخصهای رشد، سیستم ایمنی، استرپتوکوکوس اینیه

۱- مقدمه

۱-۱- مضرات استفاده از آنتی بیوتیک ها و مواد شیمیایی

یکی از عمده ترین عواملی که صنعت آبزی پروری را تهدید می کند، بیماریهای عفونی به خصوص با منشا باکتریایی است . در تمامی زمینه های صنعت آبزی پروری اعم از ماهیان سردابی ، گرمابی و پرورش میگو این موضوع اهمیت دارد. اگرچه این امر در زمینه پرورش میگو مصداق بیشتری پیدا می کند به عنوان مثال در فیلیپین بیماری ناشی ازویبریوی درخشان باعث کاهش شدید تولید میگوی این کشور درسال ۱۹۹۶ شده و بسیاری مزارع تولید خود را از دست دادند. گونه های بیماری زای این مزارع به هرنوع آنتی بیوتیک استفاده شده مقاوم بودند. در تایلند پرورش دهندگان با وجود این که از آنتی بیوتیکها در تمام غذاها استفاده می کردند باز هم شاهد افزایش مرگ و میر بعلت بیماری ویبریوزیس بودند(Colorni *et al.*, 2002; Sealy and Gatlin, 2001).

با توجه به این که بیماریهای آبزیان به دلیل شرایط زیستی اغلب دیر تشخیص داده می شوند و معمولاً به دلیل تراکم بالا احتمال سرایت بیماری بیشتراست، هنگامی که یک بیماری در مزرعه شایع شد معمولاً تلفات سنگین و اجتناب ناپذیر است. به همین دلیل در زمینه پیشگیری از بیماری باید دقت کرد (قشقایی و لایق ، ۱۳۸۳).

متأسفانه این موضوع در کشور ما آن چنان مورد توجه قرار نمی گیرد و یا اگر کسی به آن توجه کند راه آن را در استفاده از آنتی بیوتیک و به طور کلی مواد شیمیایی می داند. هنگامی که از آنتی بیوتیک ها و مواد شیمیایی استفاده می شوند، بخصوص درهنگام عدم رعایت مقدار دوز مجاز، تمامی سویه های یک گونه از بین نرفته و با گذشت زمان مقاومت نسبت به آنتی بیوتیک ایجاد شده و به سرعت به رشد و تکثیر خود ادامه داده و به گونه غالب تبدیل می شوند (قشقایی و لایق، ۱۳۸۳).

این عمل نه تنها دراستخر های پرورشی خطرناک است بلکه ممکن است به مرور زمان باعث آلودگی اکوسیستم شود و آبهای ساحلی را نیز تحت تاثیر قرار دهد.

۱-۲- رابطه عوامل محیطی و میکرو فلور دستگاه گوارش

در اکثر موارد، زمانی که صحبت از میکروارگانیسم ها می شود، آنها موجوداتی مضر و زیانبار تصور می شوند. چنین تصوری نمی تواند صحیح باشد، چرا که تعداد باکتری های غیر بیماری زا بمراتب بیش از باکتریهای بیماریزا است و بسیاری از گونه های غیربیماریزای باکتریها نه تنها مفیدند، بلکه برای ادامه حیات ضروری هستند. یک دسته از این باکتریهای سودمند، آنهایی هستند که در دستگاه گوارش حیوانات زندگی می کنند. این میکروارگانیسم ها تحت تاثیر عوامل مختلفی قرار می گیرند.تنشهای محیطی، نوع جیره غذایی، داروها، سموم شیمیایی و همچنین شرایط آب و هوایی از جمله عواملی هستند که بر رشد میکرو فلور روده تاثیر گذارند (فولر، ۱۳۸۰).

طی سالهای اخیر استفاده از مواد افزودنی در خوراک دام و طیور بشدت مورد توجه متخصصین تغذیه واقع شده است، یکی از مهمترین افزودنی ها محصولاتی است که به طور زنده و مستقیم در جیره به مصرف می رسند و در تجارت به نام پروبیوتیک شناخته شده اند.

۳-۱- تعریف پروبیوتیک

واژه پروبیوتیک واژه ای یونانی است که به معنای «برای زندگی» می باشد. طی سالیان متمادی بکارگیری این واژه، معنای آن همواره در حال تغییر بوده است . این واژه برای نخستین بار در سال ۱۹۶۰ توسط Lilly و Stillwell برای مواد مترشحه بوسیله میکرو ارگانیسم ها بکار گرفته شد که موجب تحریک رشد در میکروارگانیسم های دیگر می شدند. این کلمه توسط Parker درسال (1974) معرفی شد. مطابق این تعریف، پروبیوتیکها میکروارگانیسم ها و موادی بودند که در تعادل میکروبی روده شرکت داشتند (قشقایی و لایق، ۱۳۸۳).

براساس تعریف Fuller (1987) پروبیوتیک مکمل غذایی میکروبی زنده است که با بهبود تعادل میکروارگانیسم های روده،اثرات سودمندی بر میزبان دارد. دیگر محققان تعریف گسترده تری را بکار می برند. برای مثال Gram و همکاران (1999) پیشنهاد کردند که پروبیوتیک مکمل میکروبی زنده است که اثرات مفیدی را بر میزبان به وسیله بهبود توان میکروبی، می گذارد. دراین تعریف، تاثیر مثبت به تغذیه منحصر نشده است. Salminen و همکاران ۱۹۹۹ پروبیوتیک را به عنوان هر گونه مواد میکروبی (اما نه لزوماً زنده) یا اجزای این سلول ها با اثر سودمند بر سلامت میزبان، تعریف کردند. دراین تعریف نیاز برای زنده بودن میکروارگانیسم در ارتباط با تغذیه نادیده گرفته شده است. Moriar و همکاران ۱۹۹۹ پیشنهاد کردند که افزایش پروبیوتیک ها به محیط آبی سبب بهبود شرایط پرورش آبزی مورد نظر می شود. براساس بررسی های صورت گرفته ، پروبیوتیکها نمی توانند جزء عوامل کنترل کننده بیولوژیک محسوب گردند زیرا کنترل بیولوژیک عبارت است از استفاده از دشمنان طبیعی یک جاندار مضر، به منظور کاهش آسیب های ایجاد شده بوسیله آن، این درحالی است که پروبیوتیکها میکروارگانیسم های مضر و یا عوامل بیماریزا را مورد حمله قرار نداده و تنها منجر به کاهش آسیب های ایجاد شده توسط این عوامل در میزبان از طریق رقابت، تولید سوبسترا به منظور ممانعت از رشد و یا اتصال به آنها می گردند. بنابراین تعریف، پروبیوتیکها یک فاکتور بهبود دهنده وضعیت سلامت آبزی محسوب شده و از این طریق باعث تقویت رشد و سیستم ایمنی بدن موجود می گردند(Gomez-Gill *etal.*, 2000).

پروبیوتیکها نخستین بار در مزارع پرورش آبزیان بوسیله Kozasa (1986) مورد استفاده قرار گرفتند وکاربرد آن ها درمزارع پرورش ماهی در سالهای اخیر افزایش چشمگیری پیدا کرده است. پروبیوتیکهای مورد استفاده در آبزی پروری نه تنها باعث متعادل نمودن دستگاه گوارش موجود میگردند بلکه شرایط فیزیکو شیمیایی آب را نیز بهبود می بخشند (عسگریان،۱۳۸۶). موجودات آبزی با موجودات خاکزی برای قبول پروبیوتیک ها جهت رشد کاملاً متفاوت می باشند. انسان و موجودات خشکی زی در کیسه جنینی در داخل آمنیون رشد می کنند در

صورتی که اشکال لاروی اکثر ماهی ها و نرم تنان در مراحل اولیه رشد در محیط خارج رها می شوند. این لاروها به میزان زیادی در معرض اختلالات مربوط به میکروبیوتای معده – روده ای قرار می گیرند، زیرا اگرچه محیط گوارش و نیز سیستم ایمنی آنها هنوز کامل نشده ولی در تماس مستقیم با میکروبهای مختلف آبی می باشند، بنابراین تیمار پروبیوتیکی خصوصاً در مراحل لاروی مطلوب می باشد(Vadstein, 1997). ویبریوها و سودوموناس ها رایج ترین گونه های باکتریایی موجود در دستگاه گوارش ماهی های دریایی می باشند (Gatasupe, 1999).آئروموناسها ، سودوموناس ها و انتروباکترسه ها در ماهیان آب شیرین غالب هستند (Gatesoupe, 1999).

۱-۳-۱- تقسیم بندی پروبیوتیک ها

پروبیوتیک ها را براساس معیارهای مختلفی تقسیم بندی می نمایند. پروبیوتیک ها به طور عمده به سه گروه تقسیم می شوند. ۱) باکتریایی ۲) قارچی ۳) مخمری

در بین این گروهها پروبیوتیک های باکتریایی عمده ترین گروهی هستند که در آبزی پروری مورد استفاده قرار میگیرند.

۲-۳-۱- معیارهای انتخاب پروبیوتیک ها

هدف اولیه و اصلی از بکارگیری پروبیوتیکها ایجاد و برقراری رابطه و تناسبی مطلوب بین میکروارگانیسم های مفید و میکروارگانیسم های بیماریزای تشکیل دهنده فلور دستگاه گوارش می باشد.

ویزگی های اختصاصی پروبیوتیکها شامل:

۱)بیماریزا و مسمومیت زا نباشد.

۲)هدف اختصاصی و مشخص داشته باشد.

۳)تأثیر مشخص و واقعی داشته باشد.

۴)پایداری داشته باشد.

۵)قابلیت تکثیر و تولید در مقیاس تجاری را داشته باشد.

۶)توانایی اتصال به سلول های پوششی روده را دارا باشد.

- شیوه های عمل پروبیوتیکها

با توجه به سابقه اندک استفاده از پروبیوتیکها در آبزی پروری، مکانیسم های فعالیت آنها هنوز به وضوح مشخص نشده است. اما با توجه به تحقیقات صورت گرفته بر روی پروبیوتیکهای مورد استفاده در زمینه انسانی و کشاورزی چندین شیوه عمل مشخص شده است. اگر چه که هر یک از شیوه ها، ویژگی های اختصاصی خود را دارند ولی مکانیسم های اکولوژیک میکروبی در آنها یکسان بوده و همین موضوع امکان تعمیم مدارک

آزمایشات به دست آمده را تا اندازه ای بوجود می آورد. موضوعی که در این جا اهمیت دارد این است که ممکن است سویه ای دارای توانایی ذاتی در تولید ترکیبات بازدارنده به میزان کافی و حتی تحت شرایط حاکم بر روده باشد، اما با این وجود اگر سویه مورد نظر بوسیله میزبان بلع شود این توانایی بروز نمی کند (قشقایی و لایق، ۱۳۸۳)، همچنین اگر پس از بلع، پروبیوتیکها قادر به تکثیر در روده نباشند بعید است که اثرات قابل توجهی اعمال نمایند مگر آنکه به طور منظم به جیره غذایی اضافه شوند.

۳-۳-۱- مکانیسم عملکرد پروبیوتیکها

نحوه عمل پروبیوتیکها بر آبزیان به دو صورت مستقیم و غیر مستقیم می باشد. در حالت اول با تغییر در تعادل میکروبی روده جاندار و تغییر فلور میکروبی موکوس روده، پوست و آبشش موجود آبزی، باعث ایجاد مقاومت در برابر بیماری شده و با ترشح ویتامین و مواد مغذی و کمک به جذب مواد غذایی سبب رشد می گردند (قشقایی و لایق، ۱۳۸۳).

در حالت دوم با بهبود کیفیت آب و محیط زیست آبزی (غیر مستقیم) باعث کاهش استرس شده که خود باعث کاهش احتمال بروز بیماری می شود. ما بین سه پارامتر مقاومت میزبان، عوامل بیماری زا و محیط پرورش رابطه ای سه گانه برقرار بوده که هر یک دیگری را تحت تاثیر قرار می دهد.

به طور کلی روش عمل پروبیوتیکها شامل :

۱) حفظ جمعیت میکروبی مفید در دستگاه گوارش

الف- رقابت برای اتصال به جایگاههای موجود در سلولهای بافت پوششی روده

ب- رقابت برای دریافت مواد مغذی یا سوبسترا (کربن، ازت، عناصر معدنی)

ج- چسبیدن به میکروارگانیسم های بیماریزا و کمک به حذف آنها از بدن میزبان

د- تولید ترکیبات ضد باکتریایی

۲) افزایش میزان دریافت غذا و بهبود هضم آن

الف- متابولیسم مواد مغذی از قبیل کربوهیدرات ها، پروتئین ها و چربی ها

ب- افزایش ماندگاری مواد مغذی (چربی، ازت، کلسیم، فسفر، مس، منگنز)

ج- ساخت ویتامین ها

د- تحریک اشتها

۳) تغییر در متابولیسم باکتریایی

الف- فعالیت آنزیمهای گوارشی

ب- فعالیت آنزیم های باکتریایی

ج- کاهش تولید آمونیاک

۴) تحریک سیستم ایمنی

الف- تحریک تولید پادتنها

ب- افزایش سطوح پروتئین سرم و بالا رفتن نسبت گلبولین ها به آلبومین ها

د- افزایش تعداد گلبولهای سفید

ه- افزایش فعالیت گرانولوسیتهایT

۵) خنثی نمودن انتروتوکسین ها

بعضی از سمومی که بوسیله باکتریها تولید می شوند، تحت تاثیر مواد تولید شده پروبیوتیکها خنثی می گردند (Verschuere, 2000).

متأسفانه، اطلاعات درباره روش عمل پروبیوتیکهای استفاده شده در آبزی پروری، ناقص است. مکانیسم عمل شامل بهبود تغذیه به وسیله مسمومیت زدایی ترکیبات مضر در غذا و دناتوره کردن مواد غیر قابل هضم در رژیم غذایی بوسیله آنزیم های تجزیه کننده شامل آمیلازها و پروتئازها و تولید ویتامین هایی نظیر بیوتین و ویتامین B_{12} (Roach *et al.*, 1980)، تولید ترکیبات مهاری و تحریک سیستم ایمنی میزبان (Fuller, 1999) می باشد. بر طبق مطالعات Iranto در سال 2002 مشخص شد که تغذیه با پروبیوتیکهای گرم مثبت و گرم منفی منجر به تحریک ایمنی سلولی بیشتر از ایمنی هومورال می شود. همچنین افزایش در تعداد گلبولهای قرمز، ماکروفاژها ولنفوسیتها دیده شده و فعالیت لیزوزیم در ۲ هفته تغذیه با پروبیوتیک، افزایش یافته و پروبیوتیک مانند واکسن خوراکی عمل می کند.

۴-۱- معرفی پروبیوتیک ها

اثرات مثبت استفاده از پروبیوتیکها موجب شده است که شرکت های تجاری بزرگی به تهیه و ساخت پروبیوتیک ها بپردازند. به طوری که امروزه بسته های تجاری این محصولات توسط شرکت های بزرگ تهیه می شود. گونه های خاصی از باکتری ها برای این صنعت قابل استفاده می باشند که از آن جمله میتوان به جنس های لاکتو باسیلوس (Lactobacillus sp.)، بیفید و باکتر(Bifidobacterium sp.)، استرپتوکوکوس (Streptococcus sp.) و ... اشاره کرد (قشقایی و لایق، ۱۳۸۳).

۵-۱- اشکال و روش تجویز پروبیوتیک ها

پروبیوتیکها را می توان به طرق مختلف برای حیوانات مورد استفاده قرار داد.

۱) افزودن به رژیم غذایی دستی ۲) حمام دادن

۳) افزودن به آب محیط پرورش ۴) افزودن از طریق غذای زنده

تجویز خوراکی به اشکال قرص، کپسول، فراورده های تخمیری شیر و به صورت پودر مخلوط با جیره غذایی می باشد. هر روش تجویز به روش ساخت فراورده ها، مصرف کننده خاص و ویژگی های میکروارگانیسم های پروبیوتیکی بستگی دارد. پس از تجویز پروبیوتیک، میکروارگانیسم ها باید در برابر شرایط موجود در قسمت مورد نظر در بدن مقاوم باشند، به طور مثال میکروارگانیسم های موجود در یک پروبیوتیک با مصرف خوراکی، بایستی در برابر آنزیم های موجود در محوطه دهانی (آمیلاز و لیزوزیم)، آنزیمهای معده (پپسین و لیپاز) و pH پایین و آنزیم های موجود در صفرا، شیره لوزالمعده و مخاط روده کوچک مقاوم باشند. بنابراین برای سویه های بکار گرفته شده در فراورده های پروبیوتیک با مصرف خوراکی، مقاومت در برابر آنزیم های دستگاه گوارش و دهان از مهمترین معیارهای انتخاب و گزینش می باشد (تقوی، ۱۳۸۴).

ساده ترین و متداولترین روش استفاده، کاربرد پروبیوتیکها به صورت مخلوط با غذا یا آب استخر می باشد. این پروبیوتیکها به صورت تک گونه ای یا ترکیبی از چند گونه عرضه می شوند (قشقایی و لایق، ۱۳۸۳).

۶-۱- اهمیت کاربرد پروبیوتیک ها در پرورش آبزیان

به منظور مبارزه با مشکلات موجود در آبزی پروری از جمله جلوگیری از تغییرات کیفیت آب، کنترل بیماریها و افزایش فعالیت آنزیم های موجود در ماهی و میگو، استفاده از پروبیوتیکها به عنوان راه حل کارآمدتری در مقایسه با سایر راهکارها انتخاب شده است (فاضلی، ۱۳۸۴).

فلور میکروبی موجود در دستگاه گوارش موجودات خشکی زی و انسانها تقریبا ثابت می باشد (Moriary, 1999)، میکرو فلور دستگاه گوارش موجودات آبزی شامل تعداد زیادی از میکروارگانیسم های مختلف می باشد، حضور این جمعیت به دلایل زیر قابل توجه است (Verschuere, 2000).

۱) کمک به هضم مواد غذایی

۲) کمک به ساخت و جذب ویتامینها

۳) تحریک سیستم ایمنی

۴) تجزیه سلولز و سایر پلی ساکارید ها

این فلور میکروبی به علت خونسرد بودن و تبعیت دمای بدن از دمای آب محیط اطراف، دائماً در حال تغییر می باشد (Fuler, 1999). تغییرات دما و شوری نیز باعث تغییر فلور میکروبی موجود در دستگاه گوارش آبزیان می گردند. در کنار شرایط زیست محیطی، نوع غذای دریافتی توسط آبزیان نیز قادر به تغییر فلور میکروبی دستگاه گوارش آنها میشود (Gatesoupe, 1999). بنابراین استفاده از میکروارگانیسم های آنتاگونیسم با عوامل بیماریزا، باعث بروز تغییرات مناسب فلور میکروبی دستگاه گوارش ماهی میگردد. این امر در نهایت منجر به افزایش تولید و افزایش مقاومت ماهیان و سایر آبزیان در برابر استرسهای رایج در آبزی پروری می گردد (Gatesoupe, 1999).

۱-۶-۱- کاربرد پروبیوتیکها در آبزی پروری

در آبزی پروری این صنعت به تازگی جایگاه خود را پیدا کرده و تقریباً در تمامی جنبه های آن کاربرد دارد (قشقایی و لایقی، ۱۳۸۳).

۱) کاربرد در هچریها برای حفاظت تخم و لارو ماهیها

۲) کاربرد در مورد ماهیان پرورشی و مولدین

۳) کاربرد در هچریهای میگو

۴) کاربرد در مزارع پرورش میگو

۵) کاربرد در زمینه ماهیان زینتی و آکواریومی

۶) کاربرد در زمینه پرورش دیگر سخت پوستان از جمله خرچنگها

۷) کاربرد در زمینه پرورش دو کفه ای ها

۸) کاربرد در تولید غذای زنده از جمله جلبکهای تک سلولی، آرتمیا و روتیفر

۲-۶-۱- پروبیوتیک های ارزیابی شده برای استفاده در آبزی پروری

دامنه ای از پروبیوتیکها برای استفاده در آبزی پروری مورد آزمایش قرار گرفته اند که شامل باکتریهای گرم مثبت و گرم منفی، باکتریو فاژها، مخمرها و جلبک های تک سلولی می باشند. امروزه پروبیوتیکها در غذای دستی (Robertson *et al.,* 2000)، غذای زنده آرتمیا و روتیفر (Haizevilli *et al.,* 1999)و در بهبودکیفیت آب (Austin, 1990) استفاده می شوند.

- باکتری های گرم مثبت

باکتری های گرم مثبت هوازی تشکیل دهنده اندوسپور، یعنی باسیلوسها، به عنوان پروبیوتیک مورد ارزیابی قرار گرفتند و نتایج نشان داد که این باکتریها باعث بهبود کیفیت آب شده و جمعیت های میکروبهای آب را بهینه می کنند(Wang *et al.,* 1999).

Moriary و همکارانش در سال1999 از پروبیوتیکهای تجاری حاوی باسیلوس در حوضچه های حاوی گربه ماهی و میگو استفاده کردند. Hirata و همکارانش در سال 1998 از کشت مخلوط حاوی باسیلوس، به منظور بهبود عملکرد روتیفرBrachionus plicatilis در آب استفاده کردند. باسیلوس مورد استفاده، ماندگاری لارو را بهبود بخشیده و جذب غذا را با بالا بردن سطوح پروتئاز افزایش داده و در نتیجه باعث افزایش رشد موجود میگردد.

Chang,Liu در سال 2002 *از Enterococcous faecium , Bacillus toyai*(SF68)در محصولات تجاری به منظور کاهش بیماری Edward siellosis در مارماهی اروپایی *Anguilla anguilla* استفاده کردند. نتایج نشان داد که(SF68) E.faecium مرگ و میر را در مار ماهی کاهش می دهد. *E.faecium* همچنین هنگامی که در تغذیه گربه ماهی

استفاده می شود باعث بهبود رشد می گردد. باکتری مورد استفاده، میکروفلور روده را تحت تأثیر قرار داده و شیوع اشرشیاکلی (*Esherichia coli*)و استافیلوکوکوس اورئوس(*Staphylococcus auerous*) و گونه های کلستریدیوم(Clostridium sp.) را کاهش می دهد.

Micrococcus luteus باعث عفونت ایجاد شده توسط *A.salmonicida* در قزل آلای رنگین کمان میگردد.(Austin *et al.*, 1993).

همچنین استفاده *از Lactococcus lactis باعث* تحریک رشد روتیفرها و مهار V.anguillum میشود(Harzevili, Joborn(1998. و همکارانش در سال 1997 گزارش کردند که *Carnobacterium inhbenski* جدا شده از مجرای معده ای – روده ای ماهی آتلانتیک *Salmo salar باعث* مهار رشد پاتوژن های باکتریایی ماهی در شرایط آزمایشگاه میگردد.

- باکتری های گرم منفی

از انواع باکتری های گرم منفی که به عنوان پروبیوتیک استفاده می شوند:

Aeromonas hydrophilic, Aeromonas media, Pseudomonas sp, Pseudomonas flurescens, Photorhodobacterium sp, Alteromona Roseobacter sp, Vibrio anginolyticus , Vibrio fluvialis, Pseudomonas flurscens برای مهار *A.salmonicida* در پرورش ماهیان باله دار استفاده می شود (Smith *et al.*, 1993).

برای مبارزه با *V.anguillarum* تحقیقات زیادی توسط Gram و همکارانش در سال 2001 صورت گرفته و ۱۰۱۸ گونه ی مخمری و باکتریایی از پوست، آبشش و روده قزل آلای رنگین کمان *Oncorhyncus mykiss* جدا شده که ۴۵ گونه باعث مهار *V.anguillarum* شدند. Langdon, Douillet در سال 1994 نشان دادند که *Alteromonas* بقای صدف *Crassostrea gigas* را در آب افزایش می دهد.

۷-۱- باکتری های تولید کننده اسید لاکتیک

باکتریهای تولیدکننده اسید لاکتیک جزء باکتریهای گرم مثبت، غیر متحرک و بدون اسپور هستند. تولید اسید لاکتیک در آنها محصول نهایی حاصل از تخمیر می‌باشد (Ringo and Gatesoupe, 1998). این باکتریها دارای نیازهای تغذیه‌ای اختصاصی بوده و نیازمند به انواع کربوهیدراتها، اسیدهای امینه، پپتیدها ، مشتقات اسید نوکلنیک و ویتامین می‌باشند. گونه‌های مختلف باکتری‌های لاکتیک برای رشد در محیط‌های مختلف سازگار گردیده و عمدتاً در دستگاه گوارش موجودات خونگرم، محصولات لبنی (Sharp, 1981)محصولات دریایی (Mouguin and Noval, 1994) وجوددارند.

به رغم وجود اطلاعات ارزشمندی که در زمینه نقش و اهمیت این باکتری‌ها در موجودات خونگرم وجود دارد، تنها در مطالعات اندکی به حضور طبیعی این باکتریها در دستگاه گوارش و بویژه روده ماهیان اشاره گردیده

است. مطالعه فاکتورهای تأثیرگذار بر جمعیت باکتریهای تولیدکننده اسیدلاکتیک در دستگاه گوارش آبزیان از اهمیت بسیاری برخوردار است.

۱-۷-۱- کاهش حضور باکتریهای تولید کننده اسید لاکتیک در زمان استرس

پرورش ماهیان در سیستم‌های متراکم و محیط‌های مصنوعی منجر به قرار گرفتن آنها در معرض فاکتورهای استرس‌زا و بیماری‌های مختلف شده که در شرایط طبیعی، این وضعیت مشاهده نمی شود (Nolan *et al.,* 1999; Weil *et al.,* 2001). بروز استرسهای مختلف فیزیکی، شیمیایی، مدیریتی و بیولوژیک منجر به تغییر و به هم خوردن تعادل و فلور طبیعی باکتریایی دستگاه گوارش ماهیان شده و متعاقب آن نیز جمعیت باکتریهای تولیدکننده اسیدلاکتیک کاهش می یابد.

وجود پروبیوتیکها در اندمهای گوارشی بویژه روده به عنوان فاکتوری ارزشمند، منجر به ایجاد تعادل میکروبی مناسب در این اندام می گردد (Ringo *et al.,* 1997).

۱-۸- سیستم ایمنی در ماهیان

در بین گروههای مختلف ماهیان، مطالعه بر روی ایمونولوژی ماهیان استخوانی به دلیل اهمیت اقتصادی و منبع غذایی بودن آنها از اهمیت بالایی برخوردار می‌باشد (Scapigliati *et al* 2002). ایمنی در ماهیان همانند سایر مهره داران به دو صورت ایمنی ذاتی (غیر اختصاصی) و ایمنی اختصاصی ظاهر می‌شود.

سیستم ایمنی اختصاصی شامل لنفوسیت‌ها و فراورده‌های آنها مانند آنتی‌بادی می‌باشد. پاسخ‌های ایمنی اختصاصی بر اساس اجزاء شرکت‌کننده در پاسخ به دو گروه زیر تقسیم بندی می‌شوند

۱) پاسخ‌های ایمنی همورال که با واسطه مولکول‌هایی در خون شکل می‌گیرند که مسئول شناسائی اختصاصی آنتی‌ژن ها و انهدام آنها می‌باشند و آنتی‌بادی نام دارند که لنفوسیت B مسئول تولید آنتی بادی می باشد.

۲) پاسخ‌های ایمنی سلولار یا با واسطه سلولی که با واسطه لنفوسیتهای T ایجاد می‌شود.

ایمنی ذاتی دارای دو خصوصیت مهم می‌باشد که شامل توانایی محدود آن در کاهش عفونت های میکروبی و دیگر ماهیت تکراری و بدون تنوع آن می‌باشد. بدین معنا که در برابر اکثر عوامل عفونی به شکل واحد و یکنواختی رفتار می کند (Abbas *et al.,* 2000).

اجزاء اصلی سیستم ایمنی ذاتی در ماهیان شامل سدهای فیزیکی و شیمیایی، پروتئینهای خون (سیستم کمپلمان) و ماکروفاژها می‌باشند.

۱-۸-۱- سیستم کمپلمان

سیستم کمپلمان یک سیستم بیوشیمیایی پیچیده و چند جزئی است که پروتئین‌های اختصاصی را به سطح میکروبی متصل می‌کند. این پروتئینها می‌توانند ارگانیسم‌های مهاجم را منهدم کنند. این سیستم نیز نقش ایمنی

ذاتی را به عهده دارد. سیستم کمپلمان یا با حضور آنتی بادی روی سطح ارگانیسم و یا توسط ساختمان‌های کربوهیدراتی روی سطح ارگانیسم‌ها فعال می‌شود. سیستم کمپلمان جزء اساسی دفاع بدن است. پروتئین‌هایی که سیستم کمپلمان را تشکیل می‌دهند، با عدد و پیشوند C مشخص می شوند البته بعضی از اجزاء را با حروف الفبا نامگذاری می کنند. سیستم کمپلمان دست کم ۱۹ جزء دارد که همگی پروتئین های سرمی هستند. اجزاء کمپلمان در سراسر بدن در اندام های مختلف ساخته می‌شوند.

از بین اجزای سیستم کمپلمان C_3 و C_4 از بقیه مهمترند. فعال‌شدن C_3 یا C_4 نه تنها باعث جداشدن پپتید از این آنتی‌بادی می‌شود، بلکه پیوند استری بین سیستئین و گلوتامین را می‌شکند. این امر موجب اتصال آنتی‌بادی به سطح سلول هدف می گردد

C_3. توسط سلولهای کبدی و ماکروفاژها ساخته شده و بیشترین غلظت سرمی را در میان اجزای کمپلمان دارد. برای راه کلاسیک کمپلمان، فعال‌شدن C_3 ضروری است.

C_4 نیز توسط ماکروفاژها ساخته می‌شود و دومین میزان غلظت مربوط به این جزء، از سیستم کمپلمان می‌باشد (تیرزاد، ۱۳۸۳).

۲-۸-۱- ایمونوگلوبولین

مولکول های آنتی‌بادی، گلیکوپروتئین هایی هستند که ایمونوگلوبولین نامیده می‌شوند (علامت اختصاری آنها Ig است).

IgM -

IgM توسط طحال، عقده های لنفاوی و مغز استخوان ساخته و ترشح می‌شود و ایمونوگلوبولین غالب در پاسخ ایمنی اولیه می‌باشد. مولکولهای IgM جزء ایمنی اختصاصی محسوب می‌شوند و به دلیل اندازه بزرگشان معمولاً در جریان خون محصورند. احتمالاً اهمیت مولکولهای IgM در مایعات و ترشحات بدن حتی در محل التهاب حاد، جزئی است (تیرزاد، ۱۳۸۳).

در سالهای اخیر با توجه به شدت بروز پاسخ ماهیان نسبت به عوامل استرس‌زا اقدام به، بهگزینی ماهیان منظور اهلی سازی و استفاده از انواع محرک‌های سیستم ایمنی و پروبیوتیکهای طبیعی می‌شود.

۹-۱- قزل آلای رنگین کمان

قزل آلای رنگین کمان ، نخستین گونه از خانواده آزاد ماهیان است که به عنوان غذای اصلی انسان پرورش یافت. در حال حاضر این ماهی سهم با ارزشی در تامین غذای انسان دارد. علت این امر فقط ارزش غذایی بالای این ماهی و کمیاب و گران شدن ماهیان وحشی که از طبیعت صید می شوند نیست، بلکه به این دلیل است که

این ماهی غنی از چربی های اشباع نشده ای است که وجودشان برای داشتن تغذیه سالم ضروری است (سامانی۱۳۸۶).

نظر به اینکه ماهی قزل آلا یک ماهی گوشت خوار بوده و دستگاه گوارش آن برای هضم و جذب پروتئین حیوانی طراحی شده و این ماهی قادر به هضم و استفاده از تعداد بسیار محدودی از انواع فراورده های گیاهی است (سامانی۱۳۸۶) ، اغلب، مواد اولیه با منشا جانوری نظیر پودر خون، پودر ماهی، پودر امعاء و احشاء و روغن ماهی برای تغذیه این ماهی مورد استفاده قرار می گیرد(صادقی ۱۳۸۰). بنابراین پرورش ماهی قزل آلا ، فرایند تبدیل مواد کم ارزش به مواد با ارزش بالا است.

قزل آلای رنگین کمان یک ماهی سازگار است، چرا که به آسانی تخم گذاری می کند، سریع رشد می کند، به طیف وسیعی از محیط ها و حمل و نقل مقاومت می کند و نوزادان آن معمولاً از زئوپلانکتون ها (جانور ریز شناور در سطح دریا) تغذیه می کنند.

۱۰-۱- استرپتوکوکوس(Streptococcus)

باکتریهای کروی یا تخم مرغی شکل گرم مثبت که به صورت جفت یا زنجیره ای دیده می شوند. قطر آنها ۰/۵ تا ۲ میکرو متر بوده و بدون تحرک ،بدون تشکیل اسپور ،اکسیداز و کاتالاز منفی،هوازی اختیاری،شیمیوارگانو تروف ،و نیازمند به محیط غذایی غنی جهت رشد و گاه CO2٪۵ هستند. متابولیسم تخمیر کننده دارند و تولید لاکتوز می کنند اما گاز تولید نمی کنند.معمولا به گلبولهای قرمز حمله میکنند و هر دو همولیز αوβدر آنها دیده می شود . در دمای ۲۵-۴۵ درجه سانتی گراد رشد کرده اما حرارت بهینه ۳۷ درجه سانتی گراد است.از لحاظ F,O/F/glucose (Fermentative) هستند و از لحاظ تبدیل و کاهش نیترات،منفی هستند.

این ارگانیسم ها غیر اسید – فست اند و درصد سیتوزین + گوانین در DNA آنها برابر ۴۶- ۳۴ مول می باشد(سلطانی ، ۱۳۸۰).

برخی گونه های استرپتوکوک محتوی انتی ژنهای پلی ساکارید ویژه ای اند که به گروهی های مشخص (گروه های لانسفلید) ، بر اساس حضور این گروه های آنتی ژنی مخصوص (گروه های L, K, H, G, F, E, D, C, B, A, O, N, M,) طبقه بندی می شوند. کد گروه های B و D لانسفیلد در ماهیهای بیمار گزارش شده است . گروه استرپتوکوکوسی D ، کلنی هایی شبیه استافیلوکوکسی تولید می کنند (Austin and Austin , 1993).

مورداستفاده ترین مشخصه برای تشخیص استرپتوکوکسی فعالیت تجزیه گلبولهای قرمز خون (Hemolytic) است . بطوریکه سویه های مختلف می تواند β- hemolytic , α- hemolytic و یا غیر همولیز باشند این اطلاعات نیز اشاره به یکسان نبودن عوامل بیماریزا می کند . اگر چه برخی مانند*streptococcus agalactiae* می تواند هم سویه β- hemolytic , a- hemolitic را داشته باشند .و با این حال مشخصه های زیادی در اکثر عوامل بیماریزای ماهی به صورت یکسان است اگر چه تفاوتهایی نیز در گروه های مختلف وجود دارد (Austin and Astin,1993).

گونه های زیادی از استرپتوکوکوس می تواند در ماهی بیماریزا باشند اما اطلاعات کافی برای تعیین اینکه کدام استرپتوکوکوس بیماریزایی بیشتری دارد وجود ندارد . (Floyd, 2002).

در زمان های مختلف ، استرپتوکوکوس عامل بیماریزای ماهی میتواند متفاوت باشد پس می توان فرض کرد که استرپتوکوکوزیس سندرمی است که به وسله بیش از یک گونه باکتری بوجود می آید . البته تفاوتهای جغرافیایی نیز در آن موثرند که در نقاط مختلف جهان گونه ای متفاوتی عامل ایجاد بیماری اند (Eldar *et al.,* 1999).

۱-۱۱ -استرپتوکوکوزیس

۱-۱۱-۱- پراکنش جهانی استرپتوکوکوزیس

آلودگی استرپتو کوکی در سطح وسیعی از جهان گزارش شده است و به عنوان یکی از مهمترین بیماریها در آبزی پروری در آفریقای جنوبی،ایتالیا،اسرائیل (Elder *et al,* 1999)است که سبب مرگ و میر بالا (حتی بیش از ۷۵٪)می شود(1999Elder et al.,,). همچنین گزارشهایی از بروز این بیماری در کشورهای ژاپن،تایوان،کانادا،بحرین،استرالیا و چین نیز وجود دارد,(Agnew and Barnes,2007).

استرپتوکوکوزیس در ابتدا در تعداد زیادی از مزارع پروش قزل آلای رنگین کمان در ژاپن گزارش شد.سپس این بیماری گسترش یافت و در Yelowtailها بروز پیدا کرد و در آزاد ماهی کوهو،Jacopever(Sebastes schlegeli)،مار ماهی ژاپنی،ماهی آیو و تیلاپیا نیز شناسایی شد(1993Austin and Austin,).

این بیماری همچنین با نام چشم برآمده (pop-eye) در مزارع پرورش قزل آلای رنگین کمان در استرالیا،اسرائیل،ایتالیا و آفریقای جنوبی دیده شده است(Austin and Austin،1993,).

یک همه گیری از این بیماری در کشور کویت در بین ماهیان Red Sea bream و کفال (Liza) گزارش شده است (2000Evans *et al.*) در ایران نیز این بیماری در بین مولدین ماهی قزل آلای رنگین کمان در استان مازندران وماهی هامور در استان خوزستان(مظلومی ،۱۳۸۲)بروز یافته است.

۱-۱۱-۲- ماهیان حساس به استرپتوکوکوزیس

استرپتوکوکوزیس در بسیاری از گونه های ماهیان دریایی(1999Eldar *et al.,,* ؛ (Colorni etal., 2002) و ماهیان آب شیرین (Floyed , 2002) هم در ماهیان پرورشی و هم ماهیان وحشیگزارش شده است . اسامی این ماهیان در جدول ۱-۱ آمده است

جدول ۱-۱- ماهیان حساس به استرپتوکوکوزیس

نام ماهی	نام علمی ماهی	باکتری	منبع
Wild mullet	Liza klunzingeri	*Streptococcus agalactia*	Evans et al,2002
Sea bream	Sparus auratus	*Streptococcus agalactia*	Evans et al,2002
Red-Tail Black shark	Epalzeorhynchos bicolor	*Streptococcus iniae*	Russo et al,2006
Rainbow shark	Epalzeorhynchos erythrurus	*Streptococcus iniae*	Russo et al,2006
Rainbow trout	Oncorhynchus mykiss	*Vagococcos salmoninaru*	Ruela et al.2005
ماهیان تترا	Hyphessobrycon sp	*Streptococcus iniae*	Yanong and FFloyd,2002
سیچلیدهای آفریقایی	Ninbochromis sp	*Streptococcus iniae*	Yanong and Floyd,2002
تیلاپیای نیل	Oreochromis nilloticus	*Streptococcus iniae*	Bowser et al,1998
Yellow tail	Seriola quinqueradiata	*Streptococcus dysgalactiae*	Nomoto et al,2004; Kusuda et al,1976
Amberjack	Seriola dumerili	*Streptococcus dysgalactiae*	Nomoto et al,2004
Red drum	Sciaenops occellatus	*Streptococcus iniae*	Baya et al.2005
کروکر آتلانتیک	Micropogon undulates	*Streptococcus SP.*	Baya et al.1990
Blue fish	Pomatomus saltatrix	*Streptococcus SP.*	Baya et al.1990
Golden shiner	Notemigonous chrysoleuca	*Streptococcus SP.*	Baya et al.1990
گربه ماهی دریایی	Arius felis	*Streptococcus SP.*	Baya et al.1990
منهادن	Brevoortia patronus	*Streptococcus SP.*	Baya et al.1990
Pin fish	Lagodon rhomboids	*Streptococcus SP.*	Baya et al.1990
Stingray	Dasyatis sp	*Streptococcus SP.*	Baya et al.1990
باس راه راه	Moron saxatilis	*Streptococcus SP.*	Baya et al.1990
هیبرید باس راه راه	Moron chrysops X Morone saxatilis	*Streptococcus SP.*	Bemaker etal.2001
Spot	Leiostomus xanthurus	*Streptococcus SP.*	Baya et al.1990
قزل آلای دریایی	Cynoscion regalis	*Streptococcus SP.*	Baya et al.1990
قزل آلای نقره ای	Cynoscion nothus	*Streptococcus SP.*	Baya et al.1990
کفال راه راه	Mugil cephalus	*Streptococcus SP.*	Baya et al.1990
دلفین آب شیرین آمازون	Inia geoffrensis	*Streptococcus SP.*	Yunrarti ,2005;George et al., 1999
مارماهی ژاپنی	Anguilla japonica	*Streptococcus SP.*	Russo et al.2006
ماهی آیو	Plecoglossus altivelis	*Streptococcus iniae*	Agnew and Barnes,2007
ماهی آزاد آماگو	Oncorhynchus rhodurus	*Streptococcus iniae*	Agnew and Barnes,2007
Barramundi	Lates calcarifer	*Streptococcus iniae*	Agnew and Barnes,2007
Black marget	Anisotrenus sp	*Streptococcus iniae*	Agnew and Barnes,2007
Puffer fish	Arothron hispidus	*Streptococcus iniae*	Agnew and Barnes,2007
Snapper	Ocyunus chrysurs	*Streptococcus iniae*	Agnew and Barnes,2007
Parrot fish	Sparisoma aurofrenatum S.viridae	*Streptococcus iniae*	Agnew and Barnes,2007
کفشک ژاپنی	Paralichthys olivaceus	*Streptococcus iniae*	Agnew and Barnes,2007
Zebra danio	Danio rerio	*Streptococcus SP.*	Russo et al.2006
Pearl danio	Danio albolineatus	*Streptococcus SP.*	Russo et al.2006

ادامه جدول ۱-۱- ماهیان حساس به استرپتوکوکوزیس

نام ماهی	نام علمی ماهی	باکتری	منبع
دلقک ماهی	Botia macracanthus	*Streptococcus SP.*	Russo et al.2006
Rosy barb	Barbus conchonius	*Streptococcus SP.*	Russo et al.2006
Brramundi cod	Cromileptes altivelis	*Streptococcus iniae*	Agnew and Barnes,2007
Gold spot cod	Epinephalis tauvina	*Streptococcus iniae*	Agnew and Barnes,2007
Rabbit fish	Siganus sp	*Streptococcus iniae*	Agnew and Barnes,2007
قزل آلای رنگین کمان	Oncorhynchus mykiss	*Streptococcus SP.*	Agnew and Barnes,2007 Rauela et al,2005

۳-۱۱-۱- عوامل باکتریایی بیماری استرپتوکوکوزیس در ماهیان :

گونه های مختلف باکتریها از جنس های lactococcus , vagococcus , Entrococcus و streptococcus می توانند عامل بروز استرپتوکوکوزیس می باشد (Floyd, 2002).

جدول ۱-۲- مهمترین باکتریهای عامل استرپتوکوکوزیس

-Enterococcus faecalis	(Austin and Austin ,1993)
-Enterococcus faecium	(Austin and Austin ,1993)
Streptococcus agalactiae–	Pasnike et al,2006
Streptococcus dysgalactia–	(Austin and Austin ,1993)
Streptococcus equi–	(Austin and Austin ,1993)
Streptococcus equisimilis–	(Austin and Austin ,1993)
Streptococcus pyogenes–	(Austin and Austin ,1993)
Streptococcus zooepidermicus–	(Austin and Austin ,1993)
Streptococcus iniae–	(Austin and Austin ,1999)
Lactococcus piscium–	(Yanong and Floyd,2002)
Lactococcus garvieae=Enterococcus seriolicida	(Austin and Austin ,1999)
Streptococcus milleri–	(Austin and Austin ,1999)
Streptococcus parauberis–	(Austin and Austin ,1999)
Streptococcus difficilis–	(Austin and Austin ,1999)
Vagiciccus salmoninarum–	(Yanong and Floyd,2002)

۱۲-۱- علائم کلینیکی و آسیب شناسی ناشی از استرپتوکوکوزیس

ماهیان مبتلا ممکن است یک یا بیشتر از یک علامت را نشان دهند ، با توجه به گونه ماهی این علائم شامل : شنای نامنظم (چرخش یا مارپیچی) از دست دادن تعادل ، بیحالی ، تیرگی پوست ، بیرون زگی یا دو طرفه چشم، کدورت قرنیه ، خون ریزی داخل یا اطراف چشم ها ، صفحه آبششی ، پایه باله های شکمی و مخرجی ، بالای سر و یا جاهای دیگر بدن ، آب آوردگی شکم .و زخم ، در برخی موارد ممکن است که ماهی قبل از مرگ علائم آشکاری را نشان ندهد (Floyd , 2002).

معمولاً جراحات همراه خونریزی به تدریج بزرگ و زخمی شده و مواد نکروتیک ترشح می نمایند . این نوع جراحات دارای یک ناحیه تیره در اطراف خود می باشند این گونه جراحات در مقایسه با جراحات ناشی از فرونکلوزیس و ویبرویوزیس سطحی تر هستند (سلطانی ، ۱۳۸۰).

ناحیه قدامی ساقه دمی در قسمت پشتی ، سرپوش آبششی ، اطراف دهان و نواحی زیر سرپوش آبشش از جمله مناطقی است که به طور متداول مبتلا به زخم های مذکور می شوند . بعلاوه جراحات ناحیه مخرجی نیز متداول است که باله مخرجی را نیز در بر می گیرد .

در بسیاری از گونه های ماهی ، چشم ها به میزان زیادی مبتلا می شوند .و جراحات اولیه چشم محدود به اگزوفتالمی است که ناشی از پر خونی در پشت کره چشم و ادمای ناحیه است و این وضعیت معمولاً منجر به آماس همراه با نفوذ سلولی و نکروز مشخص شده و عصب بینایی و مشیمیه را نیز در بر گرفته و به داخل حدقه چشم نیز گسترش می یابد . بتدریج پرخونی و خونریزی عروق شبکه ای اتفاق افتاده ، نکروز عدسی چشم و حتی خروج مواد نکروتیک بواسطه زخم قرنیه ادامه می یابد (فولر، ۱۳۸۰).

آبشش ها دچار خونریزی همراه با نفوذ ماکروفاژ ها ، نکروز بافت آبششی و خونریزی وسیع شده که منجر به مرگ می شود (سلطانی ، ۱۳۸۰).

علائم داخلی ممکن است حضور مایع خونی کم رنگی را در محوطه شکمی نشان دهد ، بزرگ و قرمز شدن طحال ، رنگ پریدگی کبد و تا اندازه ای التهاب در اطراف قلب و کلیه از دیگر علائم داخلی است . بسیاری از استرپتوکوکها ، مغز و سیستم عصبی ماهی را نیز آلوده نمی کند به این صورت که شنای نامنظم مکرر در ماهیهای آلوده به استرپتوکوکوس مشاهده می شوند (Floyd , 2002).

دستگاه روده ای نیز ممکن است پر خون شده و همراه با کنده شدن میزان قابل توجهی از بافت مخاطی باشد . اندامهای اصلی احشایی مبتلا به ترتیب عبارتند از طحال و کبد و با درجه کمتر قلب و کلیه ، کبد معمولاً کمرنگ و حاوی مناطق فراوانی از نکروز کانونی است در حالی که طحال بزرگ و دارای لبه های گرد و به رنگ قرمز گیلاسی می باشد . بیشترین قسمت بافت خونساز طحالی منهدم شده و دیوارهای مویرگی طحال (Ellipsoids) کاملاً مشخص ، متورم و معمولاً حاوی تعدادی سلولهای باکتریایی است . اغلب قلب پریکاردیت

واضحی را نشانم می دهد . حفره صفاقی قلب متسع همراه با اکسودای سروزی خونی کم رنگ بوده که به ندرت دارای ترکیبات فیبرینی و در نتیجه چسبندگی هایی می باشند (سلطانی ، ۱۳۸۰).

در کوسه سیاه دم قرمز مبتلا به این بیماری علائمی نظیر سیاه شدن پوست و بی حالی و سستی جزء اولین علائم بیماری است . خونریزی در پهلوی های شکمی بدن ، روی سر و پاه باله سینه ای و شکمی مشاهده می شود . بیرون زدگی چشم در تعداد کمی از این نوع کوسه ها (در حدود ۱۰٪) مشاهده می شود . کوسه های در حال مرگ حالت شنای چرخشی را نشان می دهند . مشاهدات بافت شناسی در این ماهی ، نفوذ گلبولهای سفید به منطقه روده ای ، طحال و قسمتهای ابتدایی کلیه و مغز را نشان می دهد . انعقاد و نکروز بافتها در همان اندامها و نیز تخریب لوله های کلیه ای نیز مشاهده می شود (Russo etal, 2006).

Russoو همکاران (2006) ، تیلاپیای نیل (*Oreochromis niloticus*) و گربه ماهی کانالی (*Ictalurus punctatus*) را در شرایطی آزمایشگاهی به صورت غوطه وری به streptococcusآلوده می کردند و برای افزایش آلودگی ، سطح جانبی بدن ماهیان را از قبل برای اینکه در معرض باکتری قرار بگیرند ، پاره کردند که کدورت چشم و خونریزی چشم را در برخی تیپلاپیا ها دیده شد .

بافت شناسی این ماهیان،منتژیت،التهاب قلب،کبد،طحال،تخمدان وکلیه را نشان می دهد. و گرانولوم کمی در طحال ،کلیه و تخمدان برخی از تیلاپیا ها دیده شد.

در گربه ماهی کانالی آلوده همان مشکلات چشم تیلاپیا دیده شد. مشکلات بافت شناسی ایجاد شده در گربه ماهی کانالی شاملMeningoencophalitis،تورم کم قلب،تورم طحال و تورم تخمدانها بوده اما خیلی سخت و طاقت فرسا نبودند.

در Red drumمبتلا به استرپتو کوکوزیس بی حالی،بیرون زدگی چشم،آسیب دیدگی پوست ونکروز تارهای عضلانی،مشخص ترین علائم ابتلا به این بیماری است(Elder etal, 1999).

Yellow tailها نیز جراحاتی در کبد ،کلیه،طحال،روده و نیز تجمع مایعات شکمی در حفره صفاقی را نشان می دهند.

۱۳-۱- تلفات و ضرر اقتصادی ناشی از استرپتوکوکوزیس

عفونتهای استرپتوکوکی می تواند سبب مرگ و میر بالایی (بیش از ۵۰٪)طی یک دوره ۳ تا ۷ روزه (2002, Floyd)،و گاه حتی بیش از ۷۵ ٪ شود(Elder etal،1999).

ضرر اقتصادی حاصله از تنها گونه Streptococcus iniae در آبزی پروری بیش از ۱۰۰ میلیون دلار در سال تخمین زده شده است(Xu et al ،2009).

۱-۱۴- اهداف تحقیق

۱) تعین اثرات پروبیوتیک های استخراج شده از دستگاه گوار ش ماهی قزل آلا بر شاخصهای رشد ۲) تعین تأثیر پروبیوتیک های استحصالی بر سیستم ایمنی هومورال و سلولی

۳) بررسی درصد بازماندگی گروه های تیمار شده با پروبیوتیک در مقابله با استرپتوکوکوزیس و مقایسهٔ آن با گروه شاهد

۱-۱۵- سوالات تحقیق

۱) آیا مصرف پروبیوتیک های استخراج شده بر شاخصهای رشد و فلورباکتریایی ماهی قزل آلای رنگین کمان تاثیرداردیاخیر؟

۲) آیا مصرف پروبیوتیک های استحصالی بر سیستم ایمنی هومورال و سلولی ماهی قزل آلای رنگین کمان تاثیرداردیاخیر؟

۳)درصد تلفات یا درصد بازماندگی گروه های تیمار شده با پروبیوتیک در مقابله با استرپتوکوکوس چگونه است؟

۲-پیشینه تحقیق

۲-۱- مطالعات انجام شده در داخل کشور

در طی دو دهه گذشته مطالعات زیادی در مورد حضور باکتری های اسید لاکتیک در دستگاه گوارش ماهی صورت گرفت. تحقیقات مختلفی در زمینه اهمیت باکتری های اسید لاکتیک در جلوگیری از بیماری های ماهیان انجام گرفته است.

در ارتباط با استفاده از پروبیوتیک باکتریایی مطالعات متعددی در ایران انجام گرفته است نظیر، تولید پروبیوتیک باکتریایی به منظور کاربرد آن در پرورش ماهیان گرمابی با تاکید بر کاهش آمونیاک و نیتریت در پژوهشکده اکولوژی دریای خزر (صفری و همکاران ۱۳۸۳)

– Askaria و همکاران (۲۰۰۷) حضور باکتری های اسید لاکتیک را به عنوان پروبیوتیک در دستگاه گوارش فیل ماهی و تاس ماهی ایرانی مورد بررسی قرار دادند. نتایج باکتریایی نشان داد که Lactobacillus sp از مری، معده و روده بزرگ فیل ماهی تحت شرایط هوازی و همچنین تحت شرایط بی هوازی علاوه بر بر بخش های مذکور از روده کوچک نیز جدا سازی شد. در بین گونه های مختلف باکتری های اسید لاکتیک، سویه .Enterococcus sp را فقط از روده بزرگ تحت شرایط هوازی جداسازی کرده و یک فراورده باکتریایی را تحت عنوان ® Belugatexبه عنوان پروبیوتیک معرفی کردند. همچنین این محققین طی بررسی روی باکتری های اسید لاکتیک در فیل ماهی و تاس ماهی ایرانی نتیجه گیری کردند که کلنی قابل شمارش باکتریایی در دو گونه مذکور مشابه نیستند و در فیل ماهی نسبت به تاس ماهی ایران شمارش کلنی به طور معنی داری بیشتر بوده است. در این مطالعه*Lactobacillus curvatus*، *Lactococcus lactis* ، *raffino lactis* و *Streptococcus sp.* از دستگاه گوارش فیل ماهی جدا شد. بیشترین کلنی متعلق به *Lactobacillus curvatus* بود.

اسماعیلی و همکاران در سال ۱۳۸۸ به شناسایی باکتری های اسید لاکتیک موجود روده تاس ماهیان ایرانی پرداختند. Entrococcus sp جنس غالب شناسایی شده در روده این ماهیان بود. همچنین *L.plantarum* لاکتو باسیل برجسته جداسازی شده از این ماهیان در این تحقیق بوده است. علاوه بر آن *L. fermentum* و Pediococcus spp نیز در این مطالعه جداسازی شدند.

Ghanbari و همکاران در سال ۲۰۰۹ به جداسازی گونه های باکتری های لاکتوباسیلوس در روده فیل ماهی و قره برون پرداختند. در این پژوهش میانگین تعداد کلی لاکتو باسیلوس ها در روده فیل ماهی و قره برون به ترتیب $10^{5.3}$ CFU/gr و $10^{6.4}$CFU/gr بود. گونه های غالب لاکتوباسیل جداسازی شده از روده این ماهیان*Lactobacillus sakei* و *Lactobacillus plantarum* بودند.

در بررسی صورت گرفته توسط دهقان و همکاران (۱۳۹۰) بر روی دستگاه گوارش بچه ماهیان انگشت قد فیل ماهی، باکتری های *Bacillus lichenniformis*، *Bacillus subtilis* و مخمر *Saccharomyces cerevisiae* به عنوان کاندید برای تولید پروبیوتیک جدا و خالص سازی شدند.

در بررسی صورت گرفته توسط بینایی و همکاران (۱۳۹۰) ۲۴۰ عدد فیل ماهی یک ساله در یک دوره ۱۲ هفته با دوزهای ۱۰۰،۲۰۰ و ۳۰۰ میلی گرمی به ازای هر کیلوگرم وزن جیره با پروبیوتیک تجاری باکتوسل تغذیه شده و فاکتورهای خونی، بیوشیمیایی و ایمنی فیل ماهی پرورشی مورد بررسی قرار گرفتند. نتایج نشان داد که تعداد کل گلبولهای قرمز، میزان هموگلوبین و هماتوکریت در دوزهای ۱۰۰ و ۲۰۰ میلی گرم در مقایسه با شاهد از افزایش معنی داری برخوردار بوده است، لیکن میزان گلبولهای سفید در دوز ۲۰۰ و ۳۰۰ میلی گرم افزایش معنی داری در مقایسه با شاهد داشت. همچنین میزان پروتئین تام سرم، آلبومین، IGM تام سرم و نیز انفجار تنفسی در سه دوز مصرفی افزایش معنی داری با گروه شاهد داشت. در ارزیابی آنزیمی میزان دو آنزیم ALT و AST فقط در دوز ۳۰۰ میلی گرم افزایش معنی داری نسبت به سایر گروه ها داشت.

در بررسی صورت گرفته توسط Faramarzi و همکاران (۲۰۱۱) گونه های باسیلوس در دافنی ماگنا غنی سازی شدند و به لارو ماهی قره برون خورانده شدند. نتایج نشان دادند که در لاروهای تغذیه شده با باسیلوس های پروبیوتیکی وزن نهایی و نرخ رشد ویژه در مقایسه با گروه کنترل افزایش یافت.همچنین باسیلوس های پروبیوتیکی تاثیرات مثبت معنی داری روی نرخ رشد روزانه، ضریب رشد روزانه، میانگین وزن بدست آمده و بازماندگی در مقایسه با گروه کنترل داشتند. ضریب تبدیل غذایی در تیمارهای آزمایشی در مقایسه با گروه کنترل به طور معنی داری کاهش یافت. در این مطالعه مشخص شد که اگر لارو خاویاری از پروبیوتیک تغذیه کند دارای رشد و بازماندگی بیشتری است.

Askarian و همکاران (۲۰۱۱) اثرات *Lactobacillus curvatus* و *Mesenteroide Leuconostoc* را که به ترتیب از دستگاه گوارش بچه ماهیان انگشت قد فیل ماهی و تاس ماهی ایرانی جداسازی شده بود را بر روی رشد، بازماندگی و فعالیت آنزیم های گوارشی (آمیلاز، لیپاز و پروتئاز) مورد بررسی قرار داده و به اندازه گیری باکتری های اسید لاکتیک دستگاه گوارش آنها پرداختند. در این مطالعه در فیل ماهی بیشترین میزان رشد، بازماندگی و فعالیت آنزیم های گوارشی مربوط به گروهی بود که ۹×۱۰^{۹} *L. curvatus* را در هر گرم غذا دریافت کرده بود. در حالتی که این عمل را در تاس ماهی ایرانی میزان ۲×۱۰^{۹} *Leu. Mesenteroides* در هر گرم غذا ایفا می کند.

جعفریان و همکاران (۱۳۸۵،۱۳۸۶) به ارزیابی اثرات مخلوط ۵ سویه از باسیلوس های پروبیوتیکی غنی سازی شده به وسیله آرتمیا ارومیانا، بر روی رشد و بقاء لارو تاس ماهی ایرانی و لارو فیل ماهی پرداختند. این مطالعات نشان داد که پروبیوتیک های باسیلی قابلیت تأثیرگذاری بسیار بالایی بر ارتقاء عملکرد رشد در تاس ماهی ایرانی و فیل ماهی در دوره پرورش لاروی دارند.

حسینی فر و همکاران (۱۳۸۹) به بررسی اثرات پروبیوتیکی مخمر*Saccharomyces cerevisiae var. ellipsoides* غیر فعال بر شاخص های رشد، بازماندگی و میکروبیوتای روده بچه فیل ماهی پرداختند. نتایج به دست آمده نشان داد که بچه ماهی های تغذیه شده با جیره حاوی ۵ درصد مخمر، به طور معنی داری وزن نهایی، نرخ رشد ویژه

بیشتر، فاکتور وضعیت بهتر و ضریب تبدیل غذایی کمتری در مقایسه با تیمار شاهد و مخمر ۱ درصد داشته اند. بررسی تراکم کل باکتری ها و لاکتوباسیلوس ها موید افزایش معنی دار تیمار ۵ درصد مخمر و تیمار ۱ درصد شاهد بود.

جعفریان و همکارانش در سال ۱۳۸۷ تاثیر *Saccharomyces cerevisiae* و *Bacillus licheniformis* بر تقویت رشد مرحله لاروی ماهی قزل آلا را مورد ارزیابی قرار دادند. نتایج نشان داد که استفاده ترکیبی پروبیوتیک های مذکور باعث افزایش معنی دار رشد لارو می گردد.

جعفریان و همکارانش در سال ۱۳۸۷ از دو نوع پروبیوتیک و *Bacillus licheniformis* و *B. subtilis* به منظور افزایش مقاومت ماهی قزل آلا در برابر یرسینیا روکری (*Yersinia rukeri*)استفاده نمودند. نتایج نشان داد که به هنگام استفاده از پروبیوتیک های مذکور تلفات به طور معنی داری کاهش می یابد که دلیل آن تشابه آنتی ژنی یرسینیا و باسیلوس های مورد استفاده بوده که باعث افزایش تعداد لنفوسیت های T و B میشود.

Bagheri و همکارانش در سال ۲۰۰۸ تاثیر یک نوع باسیلوس تجاری را بر رشد، بقاء و تغییرات فلور میکروبی ماهی قزل آلا مورد ارزیابی قرار دادند. لوگ مورد استفاده باکتری ضریبی از $۱۰^{۸}$ و ضریبی هایی از $۱۰^{۹}$ (۴ دوز) بوده است. نتایج نشان داد که بازماندگی ماهی در نمونه های دارای پروبیوتیک بیشتر از نمونه کنترل بوده است. میزان شمارش کلی باکتری ها در روده ماهیان مورد بررسی نشان داد که نمونه های گیرنده پروبیوتیک دارای شمارش بیشتری از باکتری بوده که این حاکی از کلونیزه شده باسیلوس در دستگاه گوارش ماهی قزل آلا بوده است. شاخص های رشد در نمونه گیرنده پروبیوتیک بیشتر از گروه کنترل بوده و ضریب تبدیل غذایی در تیمارهای حاوی پروبیوتیک کمتر از نمونه کنترل بوده است. نتایج همچنین نشان داد که سطح $۳/۸*۱۰^{۹}$ باکتری در هر گرم از جیره غذایی بهترین پاسخ را به همراه داشته و باعث تحریک فعالیت آنزیمی در دستگاه گوارش ماهی قزل آلا می گردد.

۲-۲- مطالعات انجام شده در خارج از کشور

حضور باکتری های اسید لاکتیک به عنوان باکتری های دائم در اکوسیستم روده ماهیان از جمله ماهی کاد اقیانوس اطلس (*Gadus morhua*)، قزل آلای رنگین کمان (*Oncorhynchus mykiss*) و چار قطبی (*Salvelinus aplimus*) ثابت شده است هر چند که جز فلور غالب روده نمی باشند.

نتایج مطالعات Gatesoupeو همکاران در سالهای ۱۹۹۱ و ۱۹۹۴ در ارتباط با کاربرد باکتریهای لاکتیک در مزارع پرورش ماهی نشان داد که اکثر باکتریهای لاکتیک جز باکتریهای مفید بوده و میتوانند بعنوان پروبیوتیک در آبزی پروری مورد استفاده قرار گیرند. این باکتریها با تولید متابولیتهای مختلف باعث تقویت سیستم ایمنی شده ولی کارآیی آنها در آب شور کمتر از آب شیرین بوده زیرا ماندگاری آنها در آب شور کمتر می باشد.

برخی از باکتریهای گروه لاکتیک مثل استرپتوکوکوس iniaeو لاکتوکوکوس garvieae جز باکتریهای بیماریزا می باشند.

Mahious و همکاران (۲۰۰۵) طی بررسی روی تنوع تاکسونومیک فلور میکروبی روده تاس ماهی سیبری و کشت محتویات روده در دو محیط کشت NA و MRS و انکوباسیون در دمای اتاق، ۴۵۰ گروه باکتریایی را جدا نمودند که از این تعداد اکثریت باکتری های جدا شده به گروه Bacillus subtilis (۱۹/۷۸٪) و اعضای خانواده Entrobacteriaceae شامل Plesimonas shigelliode (۱۱/۷٪) و Hafnia alvei (۱۲٪) تعلق داشت.

نتایج مطالعه Chang و همکارانش در ارتباط با ارزیابی دو باکتری انتروکوکوس و باسیلوس به منظور کاهش ادواردسیلوز در مار ماهی اروپایی نشان داد که باکتریهای مورد استفاده باعث مهار ادواردسیلوز شده ولی کارآیی باسیلوس بهتر می باشد.

نتایج مطالعات Tovar و همکاران در سال ۲۰۰۸ در ارتباط با مخمر دباریومایسیس (Debaryomyces)در ماهیMyeteroperea rosacea نشان داد که این مخمر باعث افزایش آنتی بادی IgM و فعالیت سوپر اکسید دیسموتاز شده و همچنین باعث افزایش مقاومت ماهی به دینوفلاژل *Amyloodinium ocellatum* میشود.

Mesalhy و همکارانش در سال ۲۰۰۸ تاثیر دو نوع پروبیوتیک باسیلوس پومی لیس (*Bacillus pumilis*)و پروبیوتیک تجاری Organic Green را بر شاخص های رشد ، بقاء هماتولوژی و مقاومت در برابر آئروموناس هیدروفیلا ماهی تیلاپیا مورد ارزیابی قرار دارند. باسیلوس پومی لیس در دوز 10^6 و 10^{12} در هر گرم از ماده غذایی و پروبیوتیک Organic Green در دوز ۱ و ۲ گرم بر کیلوگرم از جیره مورد استفاده قرار گرفتند. نتایج نشان داد که میزان فعالیت ترازولیوم نیتروبلو در تمام تیمارهای دارای هر دو پروبیوتیک نسبت به نمونه کنترل افزایش داشته است. میزان لنفوسیت و مونوسیت در تیمارهای حاوی پروبیوتیک نیز افزایش داشته است. میزان مقاومت ماهی نسبت آئروموناس هیدروفیلا متفاوت بوده و متوسط بقاء پس از یک ماه رویارویی (۶۲/۵٪) بوده است. اثرات دو پروبیوتیک مورد استفاده در مقایسه با نمونه کنترل دارای اختلاف معنی داری بوده ولی نسبت به یکدیگر اختلاف چندانی نداشته اند.

Sonو همکارانش در سال ۲۰۰۹ تاثیر پروبیوتیک باکتریایی باسیلوس سیرکولانس PB_7را بر رشد، کیفیت تغذیه ای و سیستم ایمنی ماهی Catla catla مورد بررسی قرار دادند. باکتری مذکور از دستگاه گوارش ماهی Catla جدا شده و در سه دوز 10^4، 10^5 و 10^6 در هر ۱۰۰ گرم از غذای ماهی مورد استفاده قرار گرفت. ماهیان مورد بررسی به صورت انگشت قدی بوده و طول دوره آزمایش نیز ۶۰ روز بوده است. نتایج نشان داد که بهترین پاسخ مربوط به دوز 10^5 بوده که باعث کاهش ضریب تبدیل غذایی (FCR) و افزایش نسبت کارآیی پروتئین (PER) شده است. در تیمار حاوی 10^5 باکتری، شاخص های فیزیولوژیکی نظیرآلکالین فسفاتاز (ALP) ، اسپارتات آمینو نراسفراز (AST) و آنزیم پروتئاز به طور معنی داری افزایش داشته است. بیشترین میزان آلبومین و گلوبولین و کمترین میزان گلوکز نیز در این تیمار مشاهده شد. در خصوص شاخص های ایمونولوژی مشخص گردید که نسبت

فاگوسیتوزی، ایندکس فاگوسیتوزی و لوکوکریت در تیمار حاوی $۱۰^{۵}$ باکتری در مقایسه با دو تیمار دیگر افزایش بیشتری داشته است. همچنین نتایج نشان داد که پروبیوتیک باکتریایی باعث افزایش مقاومت ماهی در برابر آئروموناس هیدروفیلا شده و مرگ و میر در تیمارهای مذکور به طور معنی داری کمتر از نمونه کنترل بوده است. به طوری که میزان بازماندگی نمونه کنترل ۶/۶۶ درصد گزارش شده است.

Gopalakannan و همکارانش در سال ۲۰۱۱ فعالیت مهارکننده پروبیوتیک انتروکوکوس فسیوم در برابر آئروموناس هیدروفیلا در ماهی کپور معمولی را مورد ارزیابی قرار دادند. این باکتری از دستگاه گوارش مارماهی جدا گردید. در ابتدا اثر مهارکننده انتروکوکوس بر آئروموناس در شرایط آزمایشگاهی اثبات گردید. به منظور جایگزین شدن باکتری در دستگاه گوارش، بچه ماهی کپور معمولی به مدت ۲ ماه از پروبیوتیک مذکور استفاده نموده و در زمان های ۳۰ و ۶۰ روز از نظر رویارویی با آئروموناس هیدروفیلا مورد آزمایش قرار گرفتند. نتایج نشان داد که میزان بازماندگی ماهی علیه آئروموناس به ترتیب ۷۵ و ۷۷/۸ درصد در روزهای ۳۰ و ۶۰ بوده است.

Al-dohail و همکارانش در سال ۲۰۱۱ استفاده از لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس (*Lactobacillus acjdophillus*) به عنوان یک عامل کنترل کننده بیولوژیک در برابر باکتری های بیماریزا متداول و اثرات آن بر پارامترهای هماتولوژی و هیستوپاتولوژی در گربه ماهی آفریقایی را مورد ارزیابی قرار دادند. باکتری های بیماریزا مورد بررسی شامل استافیلوکوکوس، آئروموناس هیدروفیلا (*Aeromonas hydrophyla*)و استرپتوکوکوس اگالاکتیه(*Streptococcus agalactiae*) بودند. میزان مورد استفاده لاکتوباسیلوس $۳/۰۱*۱۰^{۷}$ در هر گرم از جیره غذایی بوده است. نتایج نشان داد که پارامترهای هماتولوژیکی و هیستوپاتولوژیکی نظیر هموگلوبولین ، نسبت رسوب اریتروسیتی ، شمارش گلبولهای سفید ، شمارش گلبولهای قرمز ، پروتئین سرم، منیزیم ، کلسیم ، کلر ، گلوگز ، کلسترول – توتال ایمونوگلوبولین و آنزیم های کبدی در نمونه های دارای پروبیوتیک بهتر بوده است. همچنین نتایج نشان داد که لاکتوباسیلوس باعث افزایش مقاومت ماهی در برابر باکتری های بیماری زای ذکر شده می گردد.

Xu و همکارانش در سال ۲۰۰۹ تاثیر پروبیوتیک های مختلف بر شاخص های رشد و سیستم ایمنی ماهی تیلاپیا را مورد بررسی قرار دادند. آنها در مطالعه خود از باکتری هایی نظیر باسیلوس سوبتی لیس ، باسیلوس کوآولانس، رودوسودوموناس پالوستروس (*Rhodopseudomonas palustris*)استفاده نموده و دوز نهایی باکتری ها در آب حاوی ماهی ، $۱۰^{۷}$ در هر میلی لیتر بوده است. اضافه نمودن باکتری هر دو روز انجام می گرفت. نتایج نشان داد که تیمارهای حاوی کوآگولانس و رودوسوددموناس اثرات بهتری نشان داده و شاخص های رشد در گروه های مذکور به طور معنی داری بهتر از نمونه کنترل و سوبتی لیس بوده است. میزان پروتئین سرم در نمونه حاوی کوآگولانس بهتر از سایر تیمارها بوده است. غلظت آلبومین و نسبت آلبومین به گلوبولین در تیمارهای مورد استفاده تغییرات خاصی را نشان ندادند. فعالیت سوپراکسیددیسموتاز و کاتالاز در نمونه های دارای

پروبیوتیک بیشتر از نمونه کنترل بوده است. میزان انفجار تنفسی در نمونه های دارای پروبیوتیک خصوصاً کوآگوانس بیشتر از سایر تیمارها بوده ولی میزان لیزوزیم فاقد تغییرات معنی داری در نمونه های دارای پروبیوتیک و کنترل بوده است. نتیجه گیری کلی آن که باسیلوس کوآگولانس و رودوسودوموناس می توانند به عنوان پروبیوتیک های شاخص مورد استفاده قرار گیرند.

Taoka و همکارانش در سال ۲۰۰۶ از پروبیوتیک زنده و مرده در ماهی تیلاپیا استفاده نمودند. آن ها تاثیر پروبیوتیک مرده و زنده را بر شاخص های غیر اختصاصی سیستم ایمنی مورد ارزیابی قرار دادند. پروبیوتیک های مذکور به جیره غذایی ماهی اضافه شده و در خصوص پروبیوتیک زنده علاوه بر افزودن به ماده غذایی به آب پرورشی نیز اضافه می گردید. نتایج نشان داد که پروبیوتیک های مورد استفاده باعث افزایش پارامترهای غیر اختصاصی سیستم ایمنی نظیر لیزوزیم، مهاجرت نوتروفیل ها و فعالیت باکتری کشی پلاسما شده و همچنین باعث افزایش مقاومت ماهی در برابر باکتری بیماریزا ادوارسیلا تاردا می گردد. بهترین نتیجه مربوط به افزودن پروبیوتیک زنده به جیره غذایی بوده است.

Brunt و همکارانش در سال ۲۰۰۷ تاثیر باسیلوس به عنوان پروبیوتیک باکتریایی بر مقاومت ماهی قزل آلا در برابر باکتری های بیماریزایی نظیر آئروموناس سالمونیسیدا ، لاکتوکوکوس گارویه ، ویبریوآنگوئیلاروم، استرپتوکوکوس اینیه و یرسینیا روکری را مورد ارزیابی قرار دادند. دوز مورد استفاده باسیلوس $۲*۱۰^{۸}$ در هر گرم از جیره غذایی ماهی بود. نتایج نشان داد که باسیلوس باعث کاهش تلفات به هنگام رویارویی ماهی با باکتری های مذکور می شود.

Bruntو همکارانش در سال ۲۰۰۷ اثر مهارکننده باسیلوس سوبتی لیس AB_1 بر عفونت آئروموناس را در ماهی قزل آلا مورد بررسی قرار دادند. نتایج نشان داد که این باکتری باعث کاهش تلفات ناشی از آئروموناس شده و درصد بقاء در ماهیان رویارو شده با آئروموناس را افزایش داده و باعث تقویت سیستم ایمنی ماهی نیزمی شود.

Abbas و همکارانش در سال ۲۰۰۹ تاثیر پروبیوتیک های تجاری و پروبیوتیک های جدا شده از دستگاه گوارش ماهی را بر شاخص های رشد و مقاومت به بیماری را در ماهیان زینتی و ماهی دم شمشیری مورد بررسی قرار دادند. نتایج نشان داد که اولاً باکتری های جدا شده از دستگاه گوارش دارای تاثیر بیشتری نسبت به پروبیوتیک های تجاری بوده و در این بین باکتری های جنس لاکتوباسیلوس و باسیلوس بیشترین تاثیر را نشان داده اند. همچنین باکتری های مذکور مقاومت هر دو گونه ماهی را در برابر بیماری های متداول افزایش می دهند.

Brunt و همکارانش در سال ۲۰۰۵ تاثیر پروبیوتیک بر افزایش مقاومت ماهی قزل آلا در برابر بیماری لاکتوکوکوس گاروپه و استرپتوکوکوس اینیه را مورد ارزیابی قرار دادند. آنها در مطالعه خود از آئروموناس سوبریا سوش GC_2 استفاده نمودند. نتایج نشان داد که در نمونه های کنترل میزان تلفات بین ۱۰۰-۷۵ درصد بوده در صورتی که در تیمارهای دریافت کننده پروبیوتیک این میزان بین ۶-۰ درصد بوده است. پروبیوتیک مورد

استفاده باعث تحریک سیستم ایمنی غیر اختصاصی ، افزایش تعداد لوکوسیت ها، افزایش فعالیت فاگوسیتوز و همچنین انفجار تنفسی می گرد.

Salinas و همکارانش در سال ۲۰۰۵ تاثیر رژیم غذایی حاوی پروبیوتیک لاکتوباسیلوس دلبروکی (*Lactobacillus delbrueckii*) و باسیلوس سوبتی لیس به صورت منفرد و ترکیبی را بر تقویت سیستم ایمنی غیر اختصاصی ماهی سیم سر طلایی مورد ارزیابی قرار دادند. نتایج نشان داد که استفاده ترکیبی از پروبیوتیک های مذکور باعث تقویت سیستم ایمنی غیر اختصاصی نظیر لیزوزیم، شمارش مونوسیت و نوتروفیل می گردد.

Nikoskelainen و همکارانش در سال ۲۰۰۳ تاثیر پروبیوتیک لاکتوباسیلوس رامنوسوس (*Lactobacillus ramnosus*) بر سیستم ایمنی ماهی قزل آلا و افزایش مقاومت آن در برابر اشرشیا کلی را مورد بررسی قرار دادند. نتایج نشان داد که این پروبیوتیک باعث تحریک سیستم ایمنی ماهی قزل آلا شده و پارامترهای غیراختصاصی را به طور معنی داری افزایش می دهد. از طرف دیگر در رویارویی ماهی با اشرشیاکلی ، میزان تلفات در تیمارهای حاوی پروبیوتیک آلوده به اشرشیاکلی به طور معنی داری کاهش می یابد.

Mesalhy و همکارانش در سال ۲۰۰۸ تاثیر دو پروبیوتیک باسیلوس سوبتی لیس و لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس بر تقویت سیستم ایمنی و مقاومت به بیماری را در ماهی تیلاپیا مورد بررسی قرار دادند. نتایج نشان داد که باکتری های مذکور قادر به تقویت سیستم ایمنی ، افزایش شاخص های رشد و بازماندگی ماهی تیلاپیا شده و مقاومت آن را در برابر باکتری های بیماریزایی نظیر سودوموناس فلورسانس و آئروموناس هیدروفیلا به طور معنی داری افزایش می دهند. مقاومت در برابر باکتری های مذکور زمانیست که دو نوع پروبیوتیک به صورت ترکیبی مورد استفاده قرار گیرند.

Vendrell و همکارانش در سال ۲۰۰۸ مقاومت ماهی قزل آلا تغذیه شده با پروبیوتیک در برابر بیماری لاکتوکوکوزیس را مورد ارزیابی قرار دادند. پروبیوتیک های مورد استفاده شامل لوکونوستوک مزونتروئیدس و لاکتوباسیلوس پلانتاروم بودند. لوگ مورد استفاده این باکتر یها 10^{7} در هر گرم از ماده غذایی بود. نتایج نشان داد که میزان تلفات در گروه های دریافت کننده پروبیوتیک ۵۶-۴۶ درصد بوده این درحالیست که در نمونه های کنترل، میزان تلفات ۷۸ درصد بوده است.

Austin در سال ۱۹۹۳ تاثیر پروبیوتیک تجاری Kocuria را در ماهی قزل آلا و مقاومت آن در برابر ویبریوآنگوئیلاروم مورد ارزیابی قرار داد. نتایج نشان داد که پروبیوتیک مورد استفاده باعث تقویت سیستم ایمنی ماهی قزل آلا و همچنین افزایش میزان پروتئین سرم و لیزوزیم شده و باعث کاهش تلفات در ماهیان رویارو شده با ویبریو شده است.

Abbass و همکارانش در سال ۲۰۰۹ تاثیر پروبیوتیک آئروموناس سوبریا سویه GC_2 و باسیلوس سوبتی لیس سویه JB_1 به منظور کنترل باکتری بیماریزا یرسینیا روکری در ماهی قزل آلا مورد ارزیابی قرار دادند. نتایج نشان

داد که میزان بهبودی ماهیان مبتلا به هنگام دریافت پروبیوتیک ۱۰۰-۸۰ درصد بوده این درحالیست که در نمونه فاقد پروبیوتیک میزان بهبودی ۱۰ درصد بوده است.

Panigrahi و همکارانش در سال ۲۰۰۵ تاثیر پروبیوتیک لاکتوباسیلوس را منوسوس را بر تقویت سیستم ایمنی ماهی قزل آلا مورد ارزیابی قرار داده و نتایج نشان داد که این باکتری باعث تقویت سیستم ایمنی خصوصاً آنتی بادی IgM می گردد.

۳-مواد و روش کار

۳-۱- مکان انجام تحقیق

این تحقیق در پژوهشکده اکولوژی دریای خزر واقع در ساری انجام شد. جهت انجام کار از ۱۲ ونیرو به ابعاد ۲×۲×۰/۵ متر استفاده گردید. آب مورد استفاده از چاه تامین گردید.

۳-۲- مواد

۳-۲-۱- مواد مصرفی

ماهی قزل آلای رنگین کمان، غذای ماهی، باکتری استرپتوکوکوس اینیه، محیط کشت های بلاد آگار، اوره آگار،نیترات براث، محلول تترامتیل پارافنیلن دآمین هیدروکلراید، آب مقطر، اسید سولفوریک، سرم فیزیولوژی، لام هموسیتومتر،لامل، کریستال ویوله، محلول ید، استون، محلول هپارین، اتانول، رنگ گیمسا، روغن ایمرسیون، سرنگ ۵ میلی لیتر، کیت آلبومین (شرکت پارس آزمون). تمامی مواد شیمیایی و محیط های کشت مورد استفاده از شرکت مرک آلمان تهیه گردید.

۳-۲-۲- تجهیزات و مواد غیر مصرفی

ترمومتر جیوه ای، حوضچه فایبرگلاس، روپوش، ساچوک، دستکش، ارلن، پیپت، قیچی، پنس، اسکالپ، اتوکلاو، انکوباتور، فور، سانتریفوژ، اتوآنالایزر، یخچال.

۳-۳- جداسازی باکتریهای دارای خواص پروبیوتیک

پس از بیهوش کردن ماهی، نسبت به خارج کردن روده اقدام کرده و از محتویات درونی آن نمونه گیری شده و به سرم فیزیولوژی انتقال داده شد. به منظور جداسازی باکتریهای بالقوه پروبیوتیک، پس از تهیه رقتهای متوالی ، کشت در محیط های مختلف عمومی و اختصاصی انجام گرفته و نمونه ها به مدت ۴۸ ساعت در انکوباتور ۳۵ درجه (بصورت هوازی و بی هوازی)گرمخانه گذاری شدند. کلنی های رشد یافته بر روی محیط ابتدا خالص سازی شده و سپس از نظر ماکروسکوپی و میکروسکوپی و تستهای اولیه مثل کاتالاز، اکسیداز و پتاس مورد بررسی قرار گرفتند(Chill 1990).

۳-۴- ارزیابی تائید خواص پروبیوتیکی باکتریهای جدا شده

به منظور تایید یا عدم تایید باکتریهای جداشده از نظر خواص پروبیوتیکی ، ابتدا لوگ مشخصی از باکتریهای جدا شده (لوگ ۷) بصورت داخل صفاقی به بچه ماهی قزل آلا تزریق شده و میزان بیماریزایی و تلفات احتمالی تا ۱۴ روز مورد بررسی قرار گرفت. در کنار آزمایش مذکور، خواص ضدمیکروبی باکتریهای جدا شده بر برخی از باکتریهای بیماریزای شایع در آبزی پروری در شرایط آزمایشگاهی نیز مورد بررسی قرار گرفته که در

این مرحله از روش لوله ای استفاده شد. بدین ترتیب که لوگ خاصی از هر یک از باکتریهای جدا شده و باکتریهای بیماریزا نظیر استرپتوکوکوس اینیه در محیط کشت تریپتیک سوی براث تهیه شده و پس از انکوباسیون در دمای ۳۵ درجه و شیک کردن در دور ۱۵۰ دور در دقیقه، تغییرات رشد باکتریها با کشت در محیط آگار دار (TSA (Tryptic Soy agar برای مدت ۴۸ ساعت مورد ارزیابی قرار گرفت. کاهش باکتری بیماریزا نشاندهنده اثرات ضد میکروبی باکتریهای جدا شده از دستگاه گوارش ماهی بود (Ringo et al., 1997). بعد از انجام دو مرحله مذکور، باکتریهای جدا شده از تستهای بیوشیمیایی و مولکولی مورد بررسی نهایی قرار گرفته و تعیین جنس و گونه شدند.

۵-۳-آماده سازی استوک باکتریایی جهت تلقیح به جیره

ابتدا سوسپانسیونی از باکتریهای جدا شده در محیط کشت تریپتیک سوی براث تهیه کرده و پس از انکوباسیون در دمای ۳۰ درجه برای مدت ۱۸ ساعت ، عمل سانتریفوژ انجام شده و نمونه مورد نظر ۳ مرتبه با سرم فیزیولوژی شستشو داده میشود. پس از دستیابی به رسوب حاصل از سانتریفوژ، مقداری سرم فیزیولوژی به آن اضافه کرده و با استفاده از دستگاه اسپکتوفتومتر و طول موج ۵۴۰ نانومتر ، جذب نوری سوسپانسیون مذکور قرائت شده و بر اساس عدد OD، تعداد باکتری در یک میلی لیتر تخمین زده شد.

۶-۳- اضافه کردن نمونه های پروبیوتیک به جیره

باکتریهای جدا شده در قالب تیمارهای مختلف (هر کدام ۲ تکرار) در لوگهای ۷ ، ۸ و ۹ به غذای مورد نظر اضافه شده و یک نمونه نیز بعنوان شاهد (پروبیوتیک تجاری آکوالاز) در نظر گرفته شد. با توجه به اینکه نمونه باکتری بصورت سوسپانسیون تهیه شده بود نیازی به اضافه کردن روغن جهت مخلوط کردن غذابا نمونه پروبیوتیک نبود.

وزن ماهیان موردآزمایش ۳۰ تا ۳۵ گرم بوده و تعداد آنها در هر ونیرو ۳۰ قطعه و در مجموع ۳۶۰ قطعه ماهی در ۱۲ ونیرو مورد بررسی قرار گرفتند. طول دوره آزمایش ۶۰ روز بوده و نمونه برداری جهت اندازه گیری پارامترهای هماتولوژی (هماتوکریت، هموگلوبین، تعداد گلبولهای قرمز، MCV ، MCH ، MCHC، لمفوسیت، نوتروفیل، مونوسیت، شاخصهای فیزیولوژی شامل AST و ALT و ایمونولوژی شامل توتال پروتئین ، آلبومین، ، رادیکال اکسیژن آزاد، IgM C3 ,C4 و شاخصهای رشد (وزن، FCR، PER، ضریب چاقی، سرعت رشد روزانه، ضریب رشد ویژه و بازماندگی در هر ۳۰ روز انجام گرفت.

۷-۳- غذا دهی

به منظور تغذیه ماهی قزل آلا از غذای کنسانتره تجاری استفاده شد . در این تحقیق از خوراک اکسترود قزل آلای پرواری استفاده گردید که آنالیز این خوراک در جدول زیر آمده است :

جدول۳-۱- آنالیز خوراک اکسترودقزل آلا ی پرواری

خوراک اکسترود قزل آلای پرواری ۲ 150-300gr	EXG2 trout
بهترین تاریخ مصرف	۶ ماه پس از تولید
پروتئین خام	۴۰±۱
انرژی قابل هضم(کیلو کالری بر کیلوگرم)	۴۳۰۰
فیبر خام	۳>
رطوبت	۱۰ >
خاکستر	۱۲ >

این غذا حاوی پودر ماهی ، کنجاله سویا ، گندم ، روغن ماهی ، روغن گیاهی ، گلوتن گندم ، پرمیکس ویتامی ، پرمیکس مواد معدنی و مکمل ها بوده است. میزان غذادهی با توجه به دمای آب و وزن ماهی ۲-۱/۵ درصد وزن ماهی می باشد که میزان دقیق غذادهی براساس فاکتورهای ذکر شده ، از روی جدول زیر تعیین گردید .

جدول ۳-۲- میزان غذادهی با توجه به دمای آب و وزن ماهی

وزن ماهی	زیر۰.۱۸	۰.۱۸	۱.۰	۵	۱۲	۲۳	۴۰	۶۲	۹۱	۱۴۳	بیش از
		تا۱.۵	تا۵	تا ۱۲	تا ۲۳	تا ۴۰	تا ۶۲	تا ۹۱	تا ۱۴۳	تا ۲۰۰	۲۰۰ گرم
دمای آب / ساقی گراد	زیر ۲.۵ cm	۲.۵-۵	۵-۷.۵	۷.۵-۱۰	۱۰-۱۲.۵	۱۲.۵-۱۵	۱۵-۱۷.۵	۱۷.۵-۲۰	۲۰-۲۲.۵	۲۲.۵-۲۵	۲۵ cm
۵	۳.۳	۲.۸	۲.۲	۱.۸	۱.۴	۱.۱	۰.۹	۰.۸	۰.۷	۰.۶	۰.۵
۵.۵۵	۳.۵	۲.۸	۲.۴	۱.۸	۱.۴	۱.۲	۰.۹	۰.۸	۰.۷	۰.۶	۰.۵
۶.۱۱	۳.۶	۳	۲.۵	۱.۹	۱.۴	۱.۲	۱	۰.۹	۰.۸	۰.۷	۰.۶
۶.۶۶	۳.۸	۳.۱	۲.۵	۲	۱.۵	۱.۳	۱	۰.۹	۰.۸	۰.۸	۰.۶
۷.۲۲	۴	۳.۳	۲.۷	۲.۱	۱.۶	۱.۳	۱.۱	۱	۰.۹	۰.۸	۰.۷
۷.۷۷	۴.۱	۳.۴	۲.۸	۲.۲	۱.۷	۱.۴	۱.۲	۱	۰.۹	۰.۸	۰.۷
۸.۳۳	۴.۳	۳.۶	۳	۲.۳	۱.۷	۱.۴	۱.۲	۱	۰.۹	۰.۸	۰.۷
۸.۸۸	۴.۵	۳.۸	۳	۲.۴	۱.۸	۱.۵	۱.۳	۱.۱	۱	۰.۹	۰.۸
۹.۴۴	۴.۷	۳.۹	۳.۲	۲.۵	۱.۹	۱.۵	۱.۳	۱.۱	۱	۰.۹	۰.۸
۱۰	۵.۲	۴.۳	۳.۴	۲.۷	۲	۱.۷	۱.۴	۱.۲	۱.۱	۱	۰.۹
۱۰.۵۵	۵.۴	۴.۵	۳.۵	۲.۸	۲.۱	۱.۷	۱.۵	۱.۳	۱.۱	۱	۰.۹
۱۱.۱۱	۵.۴	۴.۵	۳.۶	۲.۸	۲.۱	۱.۷	۱.۵	۱.۳	۱.۱	۱	۰.۹
۱۱.۶۶	۵.۶	۴.۷	۳.۸	۲.۹	۲.۲	۱.۸	۱.۵	۱.۳	۱.۱	۱.۱	۱
۱۲.۲۲	۵.۸	۴.۹	۳.۹	۳	۲.۳	۱.۹	۱.۶	۱.۴	۱.۳	۱.۱	۱
۱۲.۷۷	۶.۱	۵.۱	۴.۲	۳.۲	۲.۴	۲	۱.۶	۱.۴	۱.۳	۱.۱	۱
۱۳.۲۲	۶.۳	۵.۳	۴.۳	۳.۳	۲.۵	۲	۱.۷	۱.۵	۱.۳	۱.۲	۱
۱۳.۸۸	۶.۷	۵.۵	۴.۵	۳.۵	۲.۶	۲.۱	۱.۸	۱.۵	۱.۴	۱.۲	۱.۱
۱۴.۴۴	۷	۵.۸	۴.۸	۳.۶	۲.۷	۲.۲	۱.۹	۱.۶	۱.۴	۱.۳	۱.۲
۱۵	۷.۳	۶	۵	۳.۷	۲.۸	۲.۳	۱.۹	۱.۷	۱.۵	۱.۳	۱.۲
۱۵.۵۵	۷.۵	۶.۳	۵.۱	۳.۹	۳	۲.۴	۲	۱.۷	۱.۵	۱.۴	۱.۳
۱۶.۱۱	۷.۸	۶.۵	۵.۳	۴.۱	۳.۱	۲.۵	۲	۱.۸	۱.۶	۱.۴	۱.۳
۱۶.۶۶	۸.۱	۶.۷	۵.۵	۴.۳	۳.۲	۲.۶	۲.۱	۱.۸	۱.۶	۱.۵	۱.۴
۱۷.۳۲	۸.۴	۷	۵.۷	۴.۵	۳.۴	۲.۷	۲.۱	۱.۹	۱.۷	۱.۵	۱.۴
۱۷.۷۷	۸.۷	۷.۲	۵.۹	۴.۷	۳.۵	۲.۸	۲.۲	۱.۹	۱.۷	۱.۶	۱.۵
۱۸.۳۳	۹	۷.۵	۶.۱	۴.۹	۳.۶	۲.۹	۲.۲	۲	۱.۸	۱.۶	۱.۵
۱۸.۸۸	۹.۳	۷.۸	۶.۳	۵.۱	۳.۸	۳	۲.۳	۲	۱.۸	۱.۶	۱.۶

۸-۳- شاخص های رشد

زیست سنجی در طول دوره ۳۰ روز یکبار انجام گرفت . در هر زیست سنجی از هر یک از ۱۲ ونیرو به طور تصادفی ۱۰ عدد ماهی نمونه برداری شده و با ترازوی دیجیتال با دقت 1g وزن شدند . علاوه بر آن در آخرین زیست سنجی وزن کل تعیین شده و تلفات روزانه نیز یادداشت گردید . برای کاهش استرس قبل از بیومتری ماهیها در آب محتوی عصاره گل میخک قرار داده می شدند و بعد از بیومتری نیز در مجاورت هواده قرار می گرفتند و سپس به ونیروها برگردانده می شدند (Rodas ,.et al,2002).

فرمول ۳-۸-۱- میانگین وزن بر حسب g

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

فرمول ۳-۸-۲- ضریب تبدیل غذایی

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

PERعبارت است از نسبت مقدار افزایش وزن بدن به مقدار پروتئین مصرفی بر کیلوگرم سنجش هر دو پارامتر بر حسب گرم می باشد .

فرمول ۳-۸-۳- سرعت رشد (GR)

رشد روزانه هر تیمار بر حسب گرم مطابق روش زیر محاسبه شد:

$$GR = \frac{W_2 - W_1}{t_2 - t_1}$$

W_1 میزان وزن اولیه بر حسب گرم در زمان t_1 بر حسب روز و W_2 میزان وزن ثانویه بر حسب گرم در زمان t_2 بر حسب روز است . به عبارت دیگر سرعت رشد نسبت میزان وزن اضافه شده به تعداد روزهای پرورش می باشد

فرمول ۳-۸-۴- ضریب رشد ویژه (SGR)

میزان SGR بر حسب درصد از طریق زیر محاسبه گردید :

$$SGR = \frac{(lnw_2 - lnw_1)}{t_2 - t_1} \times 100$$

در رابطه فوق W_1 وزن اولیه در زمانt_1 و W_2 وزن ثانویه در زمان t_2 می باشند و میزان وزن بر حسب گرم و میزان زمان بر حسب روز در نظر گرفته می شود(Kissil et al, 2oo1).

فرمول ۳-۸-۵- درصد بقاء (SR)

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

درصد بقاء برای روشن شدن این نکته محاسبه می شود که چند درصد ماهیانی که به استخر معرفی شده اند در پایان دوره هنوز زنده اند .

۳-۹- نحوه بررسی های ایمونولوژی

۳-۹-۱- نحوه اندازه گیری کمپلمان

- اندازه گیری C_3

در این آزمایش، C_3 با آنتی بادی های پلی کلونال موجود در محلول تشکیل کمپلکس داده و باعث کدر شدن محلول می گردد . میزان کدورت ایجاد شده با مقدار C_3 رابطه مستقیم دارد (Whicher , 1996)

در این تحقیق از دستگاه اتولایزر (Eurolyser) ساخت شرکت هوشمند فناور تهران استفاده گردید .

- اندازه گیری C_4

در این آزمایش، C_4 با آنتی بادی های پل کلونال موجود در محلول تشکیل کمپلکس داده و باعث کدر شدن محلول می گردد . میزان کدورت ایجاد شده با مقدار C_4رابطه مستقیم دارد (Labor, 1996).

در این تحقیق از دستگاه اتولایزر (Eurolyser) ساخت شرکت هوشمند فناور تهران استفاده گردید .

۲-۹-۳- اندازه گیری ایمونوگلوبولین IgM

IgM نیز همانند C_4 , C_3 با آنتی بادهای پلی کلونال موجود در محلول تشکیل کمپلکس داده و باعث کدر شدن محلول می شود . میزان کدورت ایجاد شده با مقدار IgMرابطه مستقیم دارد (Johnson etal ., 1999) در این تحقیق از دستگاه اتولایزر (Eurolyser) ساخت شرکت هوشمند فناور تهران استفاده گردید .

۳-۹-۳- ارزیابی انفجار تنفسی(اندازه گیری میزان رادیکال آزاد اکسیژن)

برای سنجش رادیکال های آزاد اکسیژن مراحل به شرح ذیل بود:

الف - آماده سازی نمونه

۱ – ۰/۵ میلی لیتر از خون هپارینه با محلول هنکس تا ۰/۱ حجم اولیه رقیق گردید

I - تهیه محلول هنکس

(Merck, Germany) Nacl	۸۰ گرم/لیتر
(Merck, Germany) Kcl	۴ گرم/لیتر
(Merck, Germany) Glucose	۱۰ گرم/لیتر
(Merck, Germany) KH_2PO_4	۶۰۰ میلی گرم/لیتر
(Merck, Germany) $Na_2HPO_4 . H_2O$	۹۰۰ میلی گرم/ لیتر

بعد از تهیه محلول، pH محلول با استفاده از محلول هیدرواکسید سدیم (NaOH) ۰/۱ نرمال در ۷/۶ تنظیم شد. محلول فوق بعنوان نمونه اولیه بوده و در زمان استفاده با آب مقطر استریل به میزان ۰/۱ رقیق شد.

II – تهیه محلول لومینول با فرمول زیر

(Germany ,Merck) KOH	۰/۷۸ گرم
(Germany ,Merck) Boric acid	۰/۶۱۸ گرم
(Sigma,USA) (5-amino-2, 3-dihydro-1, 4-pathalazinedione) Luminol	۱۴ میلی گرم
آب مقطر	۱۰ میلی لیتر

III – تهیه محلول ردامین با غلظت 10^{-4} مول با فرمول زیر

(Germany ,Merck)(C28H31ClN2O3) Rhodamin	۰/۰۰۴۷ گرم
آب مقطر	۱۰۰ میلی لیتر

ب - انجام آزمایش

هر چاهک میکرو پلیت مورد استفاده برای هر نمونه در آزمایش حاوی µ L ۲۰۰ خون رقیق شده، µL ۱۰۰ محلول لومینول و µL ۱۰۰ محلول ردامین بود. پس از قرار دادن نمونه ها در چاهک میکروپلیت بلافاصله در محل خود در دستگاه Luminoscan Ascent (Thermo, Finland) قرار گرفته و دستگاه روشن گردید. مدت زمان آزمایش هر مرحله برای ۶۳ نمونه های قزل آلا ۶۴/۲۶ دقیقه بود(Mathews, 1990)

۱۰-۳- ارزیابی فاکتورهای بیوشیمیایی

ارزیابی شاخص های بیوشیمیایی خون شامل پروتئین تام سرم، آنزیمهای کبدی و آلبومین با استفاده از کیت تجاری (کیت تجاری شرکت پارس آزمون، ایران) و دستگاه اتوآنالایزر(اتریش، Eurolyser)انجام گردید (Shahsavani ; Whicher, 1996 و همکاران ۲۰۱۰) .

۱۱-۳- شاخصهای هماتولوژی

۱-۱۱-۳- خونگیری به روش برش ساقه اصلی دمی

این روش برای جمع آوری خون از ماهیان کوچک تر (با طول کمتر از ۱۰ گرم) مناسب است. زیرا ماهیان کوچک با طول یاد شده دارای رگ های خونی نازک می باشند و مقدار خون در بدن آنها بسیار کم است . باید توجه داشت که گاهی اوقات بکار بردن این روش برای جمع آوری مقدار خون مورد نیاز از یک ماهی کاملاً مشکل می باشد .

برای جمع آوری خون در این روش ، برش از قسمت پشتی- جانبی ساقه اصلی دمی (بخش نازک عقب تر بدن ماهی جایی که باله دمی به آن چسبیده است یا ناحیه بین قاعده باله و قاعده آخرین شعاع باله مخرجی) ماهی صورت گرفت.به دلیل اتعقاد سریع خون ، جمع آوری نمونه های خونی بلافاصله پس از بریدن دم انجام شد .

برای اجتناب از آلوده شدن خون با موکوس و آب ، ناحیه دمی با یک تنظیف جاذب خشک، سپس یک لوله جمع کننده آغشته شده به ماده ضد انعقاد خون (مانند هپارین) و یا یک لوله مویینه در انتهای رگ دمی ، جایی که بریده شده است ، قرار داده شد تا مقدار خون مورد نظر جمع آوری گردد. در انتخاب لوله مویینه دقت شد تا براساس فنون خون شناسی ، خون جمع آوری شده بطور صحیح به خارج از کارگاه حمل گردد .

-محاسبه تعداد گلبولهای قرمز

پس از قرار دادن لامل روی لام هموسیتومتر، سه تا چهار قطره از مایع درون پیپت را تخلیه کرده، نوک پیپت به سطح مشترک بین لام و لامل تماس داده شد تا خون رقیق شده در فاصله بین آن دو جریان پیدا کند.. پس از تثبیت یاخته های خونی درون حفره لام نئوبار و زیر لامل، لام هموسیتومتر در زیر میکروسکوپ نوری قرار داه

شد. یاخته های قرمز موجود در ۵ مربع کوچک مرکزی و مجموعاً به وسعت ۰/۰۲ میلی متر مکعب (یک پنجاهم از ۱ میلی متر مکعب در صورتی که رقت یک پنجاهم باشد) با لنز ۴۰ میکروسکوپ نوری شمارش شدند. برای محاسبه و مطالعه آماری دقیق تعداد یاخته های قرمز ، دست کم ۲۰۰ و ترجیحاً ۵۰۰-۴۰۰ یاخته قرمز باید شمارش گردد . برای محاسبه تعداد یاخته های قرمز در هر میلی متر مکعب خون با رقت یک دویستم به شرح ذیل عمل گردید :

$$N = n \times s \times h \times d$$
$$N = n \times 5 \times 10 \times 200 = n \times 10000$$

N = شمارش تعداد یاخته های قرمز شمارش شده در ۱ میلی متر مکعب

رقت خون در محلول رقیق کننده = d (یک دیستم)، مساحت ۵ مربع = s (یک پنجم میلی متر مربع)

ارتفاع هر مربع = h (۱ /۰ میلی متر) ، مجموع تعداد یاخته های قرمز شمارش شده در۵ مربع کوچک = n

در صورتی که رقت یک پنجاهم باشد ، $N = n \times 2500$ عدد یاخته قرمز در هر میلی متر مکعب خون وجود خواهد داشت.

- محاسبه گلبولهای سفید خون

مجموع اعداد ۴ خانه دو طرف لام هموسیتومتر با هم جمع شده ، میانگین آنها در عدد ۵۰ ضرب و تعداد گلبول های سفید محاسبه شد . برای محاسبه تعداد محاسبه تعداد یاخته های سفید خون در هر میلی متر مکعب خون با رقت یک بیستم به شرح ذیل عمل گردید :

$$N = n \times s \times h \times d$$

$$N = n50$$

N = مجموع تعداد یاخته های سفید شمارش شده در ۱ میلی متر مکعب خون

رقت خون در محلول رقیق کننده = d (یک بیستم)، مساحت ۴ مربع = s (۴ میلی متر مربع)

ارتفاع هر مربع = h (۰/۱ میلی متر مربع) ، مجموع تعداد یاخته های سفید شمارش شده در ۴ مربع = n

- اندازه گیری هماتوکریت(PCV)

برای تعیین درصد هماتوکریت از روش میکروهماتوکریت استفاده شد . در این روش لوله های میکروهماتوکریت را با خون حاوی هپارین پر نموده و انتهای لوله با استفاده از خمیر هماتوکریت مسدود شد . سپس لوله ها به داخل میکروسانتریفوژ انتقال داده شده و به مدت ۵ دقیقه با دور ۷۰۰۰ سانتریفوژ شدند. پس از اتمام ، گلبولهای سفید و پلاکتها بعلت برخورداری از وزن مخصوص کمتر نسبت به گلبول قرمز بصورت لایه نازک روی آنها قرار گرفته و با استفاده از خط کش مربوطه میزان هماتوکریت را بر حسب درصد اندازه گیری شدند.

- اندازه گیری هموگلوبین

اندازه گیری آن به روش سیان مت هموگلوبین یا سیانید هموگلوبین به علت دقت ، راحتی انجام کار و سهولت دسترسی به محلول استاندارد پایدار انجام گرفت . برای هر نمونه یک لوله آزمایش انتخاب و به آن ۵ سی سی معرف درایکین اضافه شد . مقدار ۰/۰۲ میلی گرم خون کاملاً مخلوط شده را در هر لوله به معرف اضافه نموده و پیپت را ۳ تا ۵ دقیقه با معرف شستشو داده تا همه خون از پیپت وارد آن شود . آنگاه محلول را خوب مخلوط کرده و سپس به مدت ۳ تا ۱۵ دقیقه در حرارت آزمایشگاه قرار داده تاسیان مت هموگلوبین تشکیل شود . جذب نور مخلوط را در اسپکتروفتومتر با طول موج ۵۴۰ نانومتر قرائت کرده و با استفاده از فرمول، غلظت هموگلوبین بر حسب گرم در دسی لیتر محاسبه شد(طبرستانی ۱۳۹۰).

۱۲-۳- مواجهه سازی

پس از انجام آزمایشات میکروبی و اطمینان از عدم آلودگی ماهیان مورد بررسی (با نمونه برداری تصادفی و کشت از ارگانهای داخلی مثل کبد، کلیه و طحال در محیط کشت آگار خوندار یا Blood agar)به باکتری استرپتوکوکوس اینیایی، جهت انجام این فرآیند ابتدا از نمونه اولیه و خالص باکتری استرپتوکوک سوسپانسیون اولیه تهیه و پس از ۱۸ ساعت انکوباسیون در دمای ۳۰ درجه و رساندن باکتری به رشد لگاریتمی، با لوله ۳ مک فارلند مورد مقایسه قرار گرفت. برای این کار PBS (بافر فسفات) استفاده گردید تا رقت های مورد نیاز تهیه و با لوله ۳ مک فارلند مورد مقایسه قرار گیرد (Rodas et al.,2002). پس از یکسان شدن کدورت دو لوله مک فارلند و سوسپانسیون میکروبی، رقت ۰/۱ از آن تهیه و تزریق به ماهیان قزل آلای رنگین کمان ۰/۱ میلی لیتر به صورت داخل صفاقی انجام شد و ماهیان مورد آزمایش (دریافت کننده پروبیوتیک) به مدت ۱۴ روز مورد بررسی قرار گرفتند. غلظت باکتری جهت تزریق به داخل صفاق ماهیان، 10^{6} در نظر گرفته شد.

غذادهی ۲۴ ساعت قبل از تزریق باکتری قطع شده و پس از آن باکتری مورد نظر در لگاریتم مشخص تزریق گردید. پس از بروز علائم بیماری (انحناء در ستون فقرات، بیرون زدن چشم، حرکت آهسته ماهی) بین ۱۰-۷ روز، از ارگانهای مختلف نظیر کبد، کلیه و قلب با استفاده از روش Austin(۱۹۸۷) نمونه گیری شده و کشت در محیطهای تخصصی انجام و پس از انکوباسیون در دمای ۳۵ درجه به مدت ۴۸ ساعت، وجود یا عدم وجود کلنی های مشکوک استرپتوکوکوس اینیایی مورد ارزیابی قرار گرفت.

برای تعیین میزان بازماندگی ماهیان در مواجهه با باکتری بیماریزای استرپتوکوک از فرمول زیر استفاده گردید:

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

۱۳-۳- تجزیه و تحلیل آماری

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

۴-نتایج

۴-۱- ارزیابی خواص پروبیوتیکی باکتریهای جدا شده

پس از خالص سازی باکتریهای جدا شده، ۱۰ ایزوله خالص جدا گردید. به منظور ارزیابی خواص بیماریزایی و یا عدم بیماریزایی باکتریهای جدا شده، پس از رساندن باکتریها به فاز رشد لگاریتمی، سانتریفوژ، شستشو با بافر فسفات و مقایسه با لوله ۰/۵ مک فارلند، لوگ ۷ هر یک از کلنی های جدا شده، بصورت منفرد، بصورت داخل صفاقی به بچه ماهیان ۳۵ گرمی از ماهیان قزل آلا(۲۰ قطعه ماهی در هر وان) تزریق شده و ماهیان به مدت ۱۴ روز از نظر علائم بیماری و مورد بررسی قرار گرفتند. نتایج نشان که هیچکدام از ۱۰ کلنی مورد بررسی قادر به ایجاد بیماری در ماهی قزل آلا نبودند. در مرحله بعد خواص ضد باکتریایی ۱۰ کلنی جدا شده بر علیه سوش بیماریزای اجباری ماهی قزل آلا (استرپتوکوکوس اینیه) مورد ارزیابی قرار گرفته بدین ترتیب که ابتدا کشت تازه ای از باکتریهای مذکور درمحیط کشت TSB تهیه شده و پس از رساندن باکتریها به فاز رشد لگاریتمی ، لوگ ۷ استرپتوکوکوس اینیه بهمراه سوشهای جدا شده از روده (هر کدام بطور مجزا) (log 7 cfu/ml) به محیط کشت TSB اضافه شده و بمدت ۴۸ ساعت در دمای ۳۰ درجه قرار داده شدند. نتایج نشان داد که از ۱۰ سوش مورد بررسی، ۳ سوش پتانسیل کاهش استرپتوکوکوس اینیه به زیر لوگ ۲ را داشته و توانایی ضدمیکروبی بسیار قوی را در محیط کشت آزمایشگاهی نشان دادند. در نهایت ۳ سوش از باکتریهای جدا شده پس از خالص سازی مجدد، بصورت انبوه کشت داده شده و در گلیسرول ۳۰ درصد و در دمای ۲۰- درجه قرار داده شده و در زمان اضافه نمودن به جیره غذایی، مجددا آماده سازی شدند. نتایج نشان داد که سه جنس لاکتوباسیلوس، ویبریو و سودوموناس جدا شده از روده قزل آلا دارای خواص پروبیوتیک بوده و بعنوان تیمار در نظر گرفته شدند. مطابق مطالعات انجام گرفته ، دوز مورد استفاده برای سودوموناس و ویبریو لوگ ۸ و برای لاکتوباسیلوس لوگهای ۷، ۸ و ۹ بوده که در قالب ۲ تکرار برای هر تیمار و در کنار نمونه شاهد مورد ارزیابی قرار گرفتند.

۴-۲- تاثیر تیمارهای مورد استفاده بر شاخصهای رشد بچه ماهی قزل آلا

۴-۲-۱- تاثیر جیره حاوی باکتری لاکتیک برمیانگین افزایش وزن

براساس جدول ۴-۱ حداکثر وزن افزوده شده در طول دوره پرورش مربوط به تیمار حاوی لوگ ۸ لاکتوباسیلوس بوده (۸۸/۳۱ گرم) و پس ازآن به ترتیب تیمارهای حاوی ویبریو (۸۲/۰۴ گرم) ، لوگ ۹ لاکتوباسیلوس(۷۸/۱۲ گرم) ، تیمار دارای سودوموناس (۷۷/۰۱ گرم)، تیمار دارای لوگ ۷ لاکتوباسیلوس (۷۵/۲۴ گرم) و نمونه شاهد(۶۶/۹۸ گرم)قرار داشتند. مطالعات آماری حاکی از وجود اختلاف معنی دار بین تیمارهای مختلف و همچنین تیمار شاهد در روز ۶۰ بوده است ($P<0/05$) . هیچگونه اختلاف معنی داری ما بین وزن داده ها در زمان شروع آزمایش نبوده است.

جدول ۴-۱: میانگین وزن بچه ماهی قزل آلا در تیمارهای مختلف دارای باکتریهای پروبیونت و مقایسه با تیمار شاهد در ابتدا و انتهای دوره

زمان		شاهد	لوگ ۷ لاکتیک	لوگ ۸ لاکتیک	لوگ ۹ لاکتیک	ویبریو	سودوموناس
روز اول	میانگین	۳۸/۳۳a	۳۸/۱۳a	۳۷/۱۲a	۳۷/۷۸a	۳۷/۸۸a	۳۸/۱۶a
	انحراف معیار	۶/۶۸	۶/۹۵	۷/۵۱	۷/۴۴	۷/۱۳	۷/۲۴
۶۰ روز	میانگین *	۶۶/۹۸d	۷۵/۲۴c	۸۸/۳۱a	۷۸/۱۲bc	۸۲/۰۴b	۷۷/۰۱c
	انحراف معیار	۱۲/۷۷	۱۳/۴۱	۱۵/۵۴	۱۳/۸۴	۱۳/۵۷	۱۵/۷۲

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

۴-۲-۲- تاثیر تیمارهای مختلف بر ضریب تبدیل غذایی (FCR)

نتایج ضریب تبدیل غذایی در تیمارهای مختلف در جدول ۴-۲ نشان داده شده است. بهترین نتیجه مربوط به تیمار حاوی لوگ ۸ لاکتوباسیلوس بوده (۱/۳۹) و پس ازآن به ترتیب تیمارهای حاوی ویبریو (۱/۶۲) ، لوگ ۹ لاکتوباسیلوس(۱/۶۵) ، تیمار دارای سودوموناس (۱/۷۲)، تیمار دارای لوگ ۷ لاکتوباسیلوس (۱/۷۵) و نمونه شاهد(۲/۱۳)قرار داشتند. مطالعات آماری حاکی از وجود اختلاف معنی دار ما بین تیمار دارای لوگ ۸ لاکتوباسیلوس با سایر تیمارها و شاهد بوده است (P<۰/۰۵). تیمارهای دیگر نسبت به شاهد معنی دار ولی بین خود فاقد اختلاف معنی دار بودند.

جدول ۴-۲: میانگین ضریب تبدیل غذایی بچه ماهی قزل آلا در تیمارهای مختلف دارای باکتریهای پروبیونت و مقایسه با تیمار شاهد

تیمار	شاهد	لوگ ۷ لاکتیک	لوگ ۸ لاکتیک	لوگ ۹ لاکتیک	ویبریو	سودوموناس
میانگین	۲/۱۳c	۱/۷۵b	۱/۳۹a	۱/۶۵b	۱/۶۲b	۱/۷۲b
انحراف معیار	۰/۱۲	۰/۲۳	۰/۰۷	۰/۰۱	۰/۲۵	۰/۰۹

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

۴-۲-۳- تاثیر تیمارهای مختلف بر بازده مصرف پروتئین (PER)

نتایج بازده مصرف پروتئین در تیمارهای مختلف در جدول ۴-۳ نشان داده شده است. بهترین نتیجه مربوط به تیمار حاوی لوگ ۸ لاکتوباسیلوس بوده (۱/۶۴) و پس ازآن به ترتیب تیمارهای حاوی ویبریو (۱/۴۳) ، لوگ ۹ لاکتوباسیلوس(۱/۳۹) ، تیمار دارای سودوموناس (۱/۳۳)، تیمار دارای لوگ ۷ لاکتوباسیلوس (۱/۳۲) و نمونه شاهد(۱/۰۷)قرار داشتند. مطالعات آماری حاکی از وجود اختلاف معنی دار ما بین تیمار دارای لوگ ۸ لاکتوباسیلوس با سایر تیمارها و شاهد بوده است. تیمارهای دیگر نسبت به شاهد معنی دار ولی بین خود فاقد اختلاف معنی دار بودند.

جدول ۴-۳: میانگین بازده مصرف پروتئین بچه ماهی قزل آلا در تیمارهای مختلف دارای باکتریهای پروبیونت و مقایسه با تیمار شاهد

تیمار	شاهد	لوگ ۷ لاکتیک	لوگ ۸ لاکتیک	لوگ ۹ لاکتیک	ویبریو	سودوموناس
میانگین	۱/۰۷c	۱/۳۲b	۱/۶۴a	۱/۳۹b	۱/۴۳b	۱/۳۳b
انحراف معیار	۰/۰۶	۰/۱۸	۰/۰۸	۰/۰۶	۰/۲۲	۰/۰۷

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

۴-۲-۴- تاثیر تیمارهای مختلف بر میانگین ضریب رشد ویژه (SGR)

با توجه به جدول ۴-۴ بهترین نتیجه مربوط به تیمار حاوی لوگ ۸ لاکتوباسیلوس بوده (۱/۵۲) و پس ازآن به ترتیب تیمارهای حاوی ویبریو (۱/۳۹) ، لوگ ۹ لاکتوباسیلوس(۱/۲۹) ، تیمار دارای سودوموناس (۱/۲۶)، تیمار دارای لوگ ۷ لاکتوباسیلوس (۱/۲۳) و نمونه شاهد(۱)قرار داشتند. مطالعات آماری حاکی از وجود اختلاف معنی دار ما بین تیمار دارای لوگ ۸ لاکتوباسیلوس با سایر تیمارها و شاهد بوده است. تیمارهای دیگر نسبت به شاهد معنی دار بوده و در برخی موارد نیز بین خود واجد اختلاف معنی دار بودند.

جدول ۴-۴: میانگین ضریب رشد ویژه بچه ماهی قزل آلا در تیمارهای مختلف دارای باکتریهای پروبیونت و مقایسه با تیمار شاهد

تیمار	شاهد	لوگ ۷ لاکتیک	لوگ ۸ لاکتیک	لوگ ۹ لاکتیک	ویبریو	سودوموناس
میانگین	۱/۰۱d	۱/۲۳c	۱/۵۲a	۱/۲۹bc	۱/۳۹b	۱/۲۶bc
انحراف معیار	۰/۰۶	۰/۱۳	۰/۱۱	۰/۰۱	۰/۰۹	۰/۰۵

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

۴-۲-۵- میانگین درصد بقاء (بازماندگی)SR

با توجه به جدول ۴-۵ ، بیشترین میانگین درصد بقاءمربوط به تیمار دارای لوگ ۸ و ۹ باکتری لاکتیک بوده (۱۰۰ درصد) و پس از آن به ترتیب ویبریو(۹۷/۵ درصد)، لوگ ۷ و سودوموناس (۹۲/۵ درصد) و تیمار شاهد (۸۵ درصد) قرار داشتند. مطالعات آماری حاکی از وجود اختلاف معنی دار ما بین تیمار دارای لوگ ۸ ، ۹ لاکتوباسیلوس و ویبریو با سایر تیمارها و شاهد بوده ($P<۰/۰۵$) ولی با این وجود بین ۳ تیمار فوق اختلاف معنی داری وجود نداشته است. تیمارهای دیگر نسبت به شاهد معنی دار بوده و در برخی موارد نیز بین خود واجد اختلاف معنی دار بودند ($P<۰/۰۵$).

جدول ۴-۵: میانگین درصد بقاء بچه ماهی قزل آلا در تیمارهای مختلف دارای باکتریهای پروبیونت و مقایسه با تیمار شاهد

تیمار	شاهد	لوگ ۷ لاکتیک	لوگ ۸ لاکتیک	لوگ ۹ لاکتیک	ویبریو	سودوموناس
میانگین	۸۵c	۹۲/۵b	۱۰۰a	۱۰۰a	۹۷/۵a	۹۲/۵b
انحراف معیار	۰/۰	۳/۵۴	۰/۰	۰/۰	۳/۵۴	۳/۵۴

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

۳-۴- نتایج آزمایشات هماتولوژی

۱-۳-۴- نتایج فاکتورهای خونی مربوط به گلبول قرمز

نتایج آنالیز پارامترهای هماتولوژی مربوط به گلبول قرمز در جدول ۴-۶ نشان داده شده است. میزان هماتوکریت ، هموگلوبین، تعداد گلبول های قرمز، متوسط حجم گلبول های قرمز(MCV) ، متوسط هموگلوبین گلبول های قرمز(MCH) و متوسط غلظت هموگلوبین سلولی (MCHC) در ماه اول برای تیمار ویبریو به ترتیب ۲۹/۵ درصد، ۴/۶ گرم در دسی لیتر، $۰/۸۶۵\times۱۰^{۶}$ عدد در میلی متر مکعب، ۳۵۱/۸۱ فمتو لیتر، ۵۴/۵۱ پیکو گرم، ۱۵/۵۵ گرم در دسی لیتر بوده که در ماه دوم به ۳۱ درصد، ۵/۰۷ گرم در دسی لیتر، $۱/۰۱\times۱۰^{۶}$ عدد در میلی متر مکعب، ۳۱۴ فمتو لیتر، ۵۱/۳۶ پیکو گرم، ۱۴/۴۳ درصد رسیده که نشان دهنده آن است که برخی از پارامترها افزایش نسبی داشته و پارامترهای دیگر مثل MCV ، MCH و MCHC نیز کاهش داشته اند ولی با این وجود اختلاف مشاهده شده بجز MCV معنی دار نبوده است ($P>۰/۰۵$).

برای تیمار حاوی لوگ ۸ لاکتوباسیلوس، در ماه اول به ترتیب ۳۰/۳ درصد، ۴/۵ گرم در دسی لیتر، $۰/۸۳\times۱۰^{۶}$ عدد در میلی متر مکعب، ۲۹۶/۲۳ فمتو لیتر، ۵۸/۴۴ پیکو گرم، ۱۴/۹۳ گرم در دسی لیتر بوده که در ماه دوم به ۳۵ درصد، ۵/۰۶ گرم در دسی لیتر، $۱/۱۵\times۱۰^{۶}$ عدد در میلی متر مکعب، ۳۰۵/۶۷ فمتو لیتر، ۴۴/۲ پیکو گرم، ۱۴/۵۷ درصد رسیده که نشان دهنده آن است که برخی از پارامترها افزایش نسبی داشته و پارامترهای دیگر مثل MCH و MCHC نیز کاهش داشته اند ولی با این وجود اختلاف مشاهده شده معنی دار نبوده است ($P>۰/۰۵$).

برای تیمار سودوموناس، در ماه اول به ترتیب ۳۰/۳ درصد، ۴/۹ گرم در دسی لیتر، $۱/۰۳\times۱۰^{۶}$ عدد در میلی متر مکعب، ۲۹۸/۶۶ فمتو لیتر، ۴۷/۷۸ پیکو گرم، ۱۶ گرم در دسی لیتر بوده که در ماه دوم به ۳۶/۶۷ درصد، ۸/۶۶ گرم در دسی لیتر، $۱/۱۶\times۱۰^{۶}$ عدد در میلی متر مکعب، ۳۱۷/۹۱ فمتو لیتر، ۷۵/۱۲۳ پیکو گرم، ۲۳/۷۷ درصد رسیده که نشان دهنده آن است که تمامی پارامترها دارای روند صعودی بوده و اختلاف در بین برخی از پارامترها نیز معنی دار بوده است ($P<۰/۰۵$).

برای تیمار حاوی لوگ ۷ لاکتوباسیلوس، تغییرات در ماه اول به ترتیب ۳۰/۵ درصد، ۵/۷ گرم در دسی لیتر، $۱/۰۴\times۱۰^{۶}$ عدد در میلی متر مکعب، ۲۹۱/۰۲ فمتو لیتر، ۵۷/۹۷ پیکو گرم، ۱۸/۶۸ گرم در دسی لیتر بوده که در ماه دوم به ۳۲/۶۷ درصد، ۸/۰۸ گرم در دسی لیتر، $۱/۱۲\times۱۰^{۶}$ عدد در میلی متر مکعب، ۲۹۵/۷۵ فمتو لیتر،

۷۲/۰۶ پیکو گرم، ۲۵/۰۸ درصد رسیده که نشان دهنده آن است که تمامی پارامترها دارای روند صعودی بوده ولی با این وجود اختلاف موجود معنی دار نبوده است (P>۰/۰۵).

برای تیمار حاوی لوگ ۹ لاکتوباسیلوس، تغییرات در ماه اول به ترتیب ۳۳/۳ درصد، ۴/۷ گرم در دسی لیتر، $۱/۰۵\times۱۰^{۶}$ عدد در میلی متر مکعب، ۳۲۰/۳۶ فمتو لیتر، ۴۴/۵۲ پیکو گرم، ۱۳/۹۵ گرم در دسی لیتر بوده که در ماه دوم به ۳۴/۶۷ درصد، ۵/۷۴ گرم در دسی لیتر، $۰/۹۶\times۱۰^{۶}$ عدد در میلی متر مکعب، ۳۶۳/۳۸ فمتو لیتر، ۶۰/۲۹ پیکو گرم، ۱۶/۶۰ درصد رسیده که نشان دهنده آن است که تمامی پارامترها بجز شمارش گلبول قرمز دارای روند صعودی بوده و اختلاف ما بین MCV ، MCH و MCHC در ماههای اول و دوم معنی دار بوده است (P<۰/۰۵).

این روند برای تیمار شاهد به ترتیب ۳۰/۷ درصد، ۴/۲ گرم در دسی لیتر، $۰/۹۵\times۱۰^{۶}$ عدد در میلی متر مکعب، ۳۲۷/۷۵ فمتو لیتر، ۴۵/۴۷ پیکو گرم، ۱۳/۸۱ گرم در دسی لیتر بوده که در ماه دوم به ۳۴/۶۷ درصد، ۴/۷۵ گرم در دسی لیتر، $۱/۰۱\times۱۰^{۶}$ عدد در میلی متر مکعب، ۳۵۲/۳۳ فمتو لیتر، ۴۸/۳۵ پیکو گرم، ۱۳/۷۱ درصد رسیده که نشان دهنده آن است که تمامی پارامترها روند بطور جزء افزایش داشته ولی اختلاف معنی داری مابین داده های مورد بررسی در ماههای اول و دوم وجود نداشته است (P>۰/۰۵).

جدول ۴-۶: تغییرات پارامترهای مربوط به گلبول قرمز در تیمارهای مختلف ماهی قزل آلا در زمانهای ۳۰ و ۶۰ روز

تیمار			ویبریو	لوگ ۸ لاکتیک	سودوموناس	لوگ ۷ لاکتیک	لوگ ۹ لاکتیک	شاهد
HCT(gdl^{-1})	۳۰ روز	Mean	۲۹/۵	۳۰/۳	۳۰/۳	۳۰/۵	۳۳/۳	۳۰/۷
		SD	۲/۴۳	۲/۱۶	۳/۸۸	۴/۳۲	۲/۹۴	۲/۳۴
	۶۰ روز	Mean	۳۱/۶	۳۵	۳۶/۶۷	۳۲/۶۷	۳۴/۶۷	۳۴/۶۷
		SD	۲/۶۴	۲/۶۴	۶/۴۹	۵/۱۳	۳/۵۱	۲/۳
HB(gdl^{-1})	۳۰ روز	Mean	۴/۶	۴/۵	۴/۹	۵/۷	۴/۷	۴/۲
		SD	۰/۴	۰/۴	۰/۷	۰/۵	۰/۶	۰/۵
	۶۰ روز	Mean	۵/۰۷	۵/۰۶	۸/۶۶	۸/۰۸	۵/۷۴	۴/۷۵
		SD	۰/۰۷	۰/۴۱	۱/۱۱	۰/۳۱۵	۰/۴۶	۰/۳۷
RBC $10^{6}\times$	۳۰ روز	Mean	۰/۸۶۵	۰/۸۳	۱/۰۳	۱/۰۴	۱/۰۵	۰/۹۵
		SD	۰/۱۲	۰/۲۶	۰/۲۱	۰/۲	۰/۱۶	۰/۱۶
	۶۰ روز	Mean	۱/۰۱	۱/۱۵	۱/۱۶	۱/۱۲	۰/۹۶	۱/۰۱
		SD	۰/۱۸	۰/۱۵	۰/۱۳	۰/۰۵	۰/۱۷	۰/۲۱
MCV(fL)	۳۰ روز	Mean	۳۵۱/۸۱	۲۹۶/۲۳	۲۹۸/۶۶	۲۹۱/۰۲	۳۲۰/۳۶	۳۲۷/۷۵
		SD	۸۸/۵۹	۲۹/۲۳	۳۴/۰۲	۲۹/۸۸	۳۸/۲۷	۵۳/۶۹

ادامه جدول ۴-۶ :

تیمار	ویبریو	لوگ ۸ لاکتیک	سودوموناس	لوگ ۷ لاکتیک	لوگ ۹ لاکتیک	شاهد	تیمار	ویبریو
	۶۰ روز	Mean	۳۱۴/۷۵	۳۰۵/۶۷	۳۱۷/۹۱	۲۹۵/۷۵	۳۶۳/۳۸	۳۵۲/۳۳
		SD	۷۲/۰۴	۳۴/۴۵	۵۴/۳۴	۵۱/۰۹	۴۱/۰۲	۷۱/۰۳
MCH(pg)	۳۰ روز	Mean	۵۴/۵۱	۵۸/۴۴	۴۷/۷۸	۵۷/۹۷	۴۴/۵۲	۴۵/۴۷
		SD	۱۲/۸	۱۷/۷۰	۵/۵۹	۶/۱۲	۵/۳۹	۹/۳۱
	۶۰ روز	Mean	۵۱/۳۶	۴۴/۲	۷۵/۱۲۳	۷۲/۰۶	۶۰/۲۹	۴۸/۳۵
		SD	۹/۴	۴/۳۴	۹/۴۸	۴/۳۳	۷/۱۳	۱۰/۰۸
MCHC(%)	۳۰ روز	Mean	۱۵/۵۵	۱۴/۹۳	۱۶	۱۸/۶۸	۱۳/۹۵	۱۳/۸۱
		SD	۰/۹	۰/۸۳	۰/۳۸	۰/۹۶	۱/۲۶	۰/۸۶
	۶۰ روز	Mean	۱۴/۴۳	۱۴/۵۷	۲۳/۷۷	۲۵/۰۸	۱۶/۶۰	۱۳/۷۱
		SD	۱/۲۱	۰/۱۱	۱/۲۲	۳/۳۲	۰/۷۹	۰/۱۶

n=6، میانگین (Mean) ، انحراف معیار (SD) ، میزان هماتوکریت (HCT)، هموگلوبین(HB)، تعداد گلبول های قرمز(RBC)، متوسط حجم گلبول های قرمز(MCV) ، متوسط هموگلوبین گلبول های قرمز(MCH) و متوسط غلظت هموگلوبین سلولی (MCHC)

۲-۳-۴- نتایج شاخص های خونی مربوط به گلبول سفید

نتایج آنالیز پارامترهای هماتولوژی مربوط به گلبول سفید در جدول ۴-۷ نشان داده شده است. تعداد گلبول های سفید (عدد در میلی متر مکعب)، تعداد لنفوسیت(درصد)، تعداد نوتروفیل(درصد) و رادیکال آزاد اکسیژن در ماه اول برای تیمار ویبریو به ترتیب ۱۹۰۰۰، ۹۹، ۱ و ۱۶۴۰/۳ و در ماه دوم ۱۱۷۶۷، ۹۶/۶۶ ، ۳/۳۳، ۱۸۰۷/۱ بوده است. میزان رادیکال اکسیژن و نوتروفیل روند صعودی داشته($P<۰/۰۵$) ولی سایر پارامترها کاهش نشان دادند. این مقادیر برای لوگ ۸ باکتری لاکتیک در ماه اول به ترتیب ۲۲۷۱۷، ۹۹/۲ ، ۰/۸۳ و ۱۴۵۰/۷ و در ماه دوم ۱۵۰۶۷، ۹۵، ۵ و ۲۶۸۰/۴ بوده است. تعداد نوتروفیل و رادیکال آزاد اکسیژن بطور معنی داری افزایش داشته است. در تیمار سودوموناس در ماه اول، این مقادیر به ترتیب ۲۳۷۰۰، ۹۹/۵، ۰/۵ و ۱۲۹۱ بوده که در ماه دوم به ۱۰۹۳۳، ۹۸، ۲ و ۲۳۱۰/۲ رسیده بود. مشابه نتایج دو تیمار قبل ، میزان نوتروفیل و رادیکل آزاد اکسیژن افزایش داشته است. در تیمار دارای لوگ ۷ باکتری لاکتیک، شاخصهای مربوط به سلولهای لوکوسیتی در ماه اول به ترتیب ۲۱۹۱۷، ۹۸، ۲ و ۱۸۰۹/۳ بوده که در ماه دوم به ۱۵۰۶۷، ۹۸، ۲ و ۲۹۱۴/۲ رسیده بود. تعداد گلبول سفید روند کاهشی داشته ولی میزان رادیکال آزاد افزایش معنی دار داشته است($P<۰/۰۵$). در تیمار دارای لوگ ۹ باکتری لاکتیک در ماه اول مقادیر پارامترهای شاخص به ترتیب ۱۷۴۳۳، ۹۸/۸، ۱/۱۷ و ۱۲۷۰/۵ بوده که در ماه دوم به ۱۲۷۳۳، ۹۶/۳۳، ۳/۶۶ و ۱۹۶۵/۲ رسیده بود. نتایج حاکی از افزایش معنی دار نوتروفیل و رادیکال آزاد اکسیژن بوده است($P<۰/۰۵$). در تیمار شاهد نیز این روند در ماه اول به ترتیب ۱۵۶۰۰، ۹۸/۸، ۱/۱۷ و

۱۳۷۱/۳ بوده که در ماه دوم به ۱۰۲۶۷، ۹۸/۶۶، ۱/۳۳ و ۱۲۹۲/۹ رسیده بود. کاهش و یا افزایش نسبی برخی از پارامترها در ماه دوم معنی دار نبوده است.

جدول ۴-۷: تغییرات پارامترهای مربوط به گلبول سفید در تیمارهای مختلف ماهی قزل آلا در زمانهای ۳۰ و ۶۰ روز

تیمار			ویبریو	لوگ ۸ لاکتیک	سودوموناس	لوگ ۷ لاکتیک	لوگ ۹ لاکتیک	شاهد
WBC Cellml $^{-1}$	۳۰ روز	Mean	۱۹۰۰۰	۲۲۷۱۷	۲۳۷۰۰	۲۱۹۱۷	۱۷۴۳۳	۱۵۶۰۰
		SD	۳۰۰۰	۲۶۴۱	۷۷۳۷	۳۹۶۸	۳۹۲۱	۲۱۰۰/۲
	۶۰ روز	Mean	۱۱۷۶۷	۱۵۰۶۷	۱۰۹۳۳	۱۵۰۶۷	۱۲۷۳۳	۱۰۲۶۷
		SD	۳۸۷/۵	۶۹۴/۳	۵۰۳۱۵۶	۳۰۴۲۲۱	۱۰۳۷۱۰	۵۰۳/۳۲
Lym(%)	۳۰ روز	Mean	۹۹	۹۸	۹۹/۵	۹۸	۹۸/۸	۹۸/۸
		SD	۰/۸۹	۱/۱۷	۰/۸۴	۲/۱	۱/۶	۱/۱۷
	۶۰ روز	Mean	۹۹/۶۶	۹۵	۹۸	۹۸	۹۶/۳۳	۹۸/۶۶
		SD	۴/۰۴	۵/۱۹	۱۰/۴۴	۴/۱۶	۵/۵	۲/۴
Neut (%)	۳۰ روز	Mean	۱	۰/۸۳	۰/۵	۲	۱/۱۷	۱/۱۷
		SD	۰/۰۹	۰/۰۱	۰/۰۱	۰/۱	۰/۰۶	۰/۰۳
	۶۰ روز	Mean	۳/۳۳	۵	۲	۲	۳/۶۶	۱/۳۳
		SD	۰/۳	۰/۹۱	۰/۲۷	۱/۴۴	۱/۰۶	۰/۰۵
Mono(%)	۳۰ روز	Mean	۰	۰	۰	۰	۰	۰
		SD	۰	۰	۰	۰	۰	۰
	۶۰ روز	Mean	۰	۰	۰	۰	۰	۰
		SD	۰	۰	۰	۰	۰	۰
O^{-}RLUS $^{-}$ ^{1}	۳۰ روز	Mean	۱۶۴۰/۳	۱۴۵۰/۷	۱۲۹۱	۱۸۰۹/۳	۱۲۷۰/۵	۱۳۷۱/۳
		SD	۳۸۳/۵۴	۴۷۵/۵۵	۳۷۱/۰۱	۲۰۶/۶۶	۳۷۴/۰۶	۲۵۲/۰۶
	۶۰ روز	Mean	۱۸۰۷/۱	۲۶۸۰/۴	۲۳۱۰/۲	۲۹۱۴/۲	۱۹۶۵/۲	۱۲۹۲/۹
		SD	۵۲۶/۹۴	۲۶۷/۷۱	۱۷۱/۹۲	۱۶۱/۱۳	۷۲۸/۶۵	۱۸۷/۵۱

n=6

میانگین (Mean)، انحراف معیار (SD)، تعداد گلبول های قرمز(WBC)، لمفوسیت(Lym)، نوتروفیل (Neut)، مونوسیت (Mono) ، رادیکال آزاد اکسیژن (O^{-})

۴-۴- نتایج آزمایشات ایمنی و فیزیولوژی

نتایج آزمایشات انجام شده در خصوص آلبومین، پروتئین توتال (گرم بر دسی لیتر)، آنزیمهای کبدی ALT وAST (واحد بین اللملی بر میلی لیتر)و C_3 ، C_4 ، IgM ، (برحسب گرم بر دسی لیتر) در جدول ۴-۸ نشان داده

شده است. نتایج نشان می دهد که میزان پارامترهای مذکور ماه اول برای تیمار حاوی ویبریو به ترتیب ۱/۷، ۳/۳۳، ۲/۹۶، ۲۷/۴، ۴۳/۷۶، ۸/۶۳، ۱۶۴/۴۶ بوده که در ماه دوم ۲، ۳/۶۶، ۲/۲۳، ۱۰۴/۴۶، ۵۰/۳، ۷/۱، ۱۳۳/۳۷ رسیده بود. میزان AST در ماه دوم افزایش چشمگیری داشته($P<۰/۰۵$) ولی میزان IgM کاهش داشته و سایر پارامترها نیز تغییر محسوسی نداشته اند. نتایج پارامترها در تیمار حاوی لوگ ۸ باکتری لاکتیک به ترتیب ۲/۳۳، ۳/۶۶، ۳/۳۶، ۳۸/۲۶، ۲۹/۱۱، ۱۳/۷۳ و ۱۶۷/۷۳ بوده که در ماه دوم به ۲/۴، ۳/۷۳، ۲/۰۶، ۱۲۱/۲۱، ۵۴/۱۶۷، ۱۸/۳۶ و ۱۸۵/۲۵ بوده است. نتایج AST ، C3 و IgM افزایش معنی دار داشته ولی سایر پارامترها تغییر چندانی نداشته اند. نتایج پارامترها در تیمار حاوی سودوموناس در ماه اول به ترتیب ۲/۳۳، ۳/۶، ۱/۲۶، ۳۰/۵۶، ۲۴/۱، ۱۱/۳ و ۱۵۰/۲۳ بوده که در ماه دوم به ۲/۱، ۳/۵۶، ۱/۹، ۸۱/۳۶، ۳۸/۲، ۷/۶۳ و ۱۵۷/۴۳ رسیده بود. نتایج مشابه تیمار لوگ ۸ باکتری لاکتیک بوده با این تفاوت که فقط مقدار AST معنی دار بوده است. نتایج تیمار دارای لوگ ۷ باکتری لاکتیک نشان میدهد که مقادیر فاکتورهای مورد بررسی در ماه اول به ترتیب ۳/۱۶، ۵/۱، ۳/۱۶، ۳۸/۳، ۲۹/۹، ۱۲/۱۶، ۱۲۴/۱۶ بوده که در ماه دوم به ۲/۴۳، ۳/۶۳، ۳/۷، ۹۷/۸۶، ۲۲/۵، ۱۰/۳ و ۱۱۲/۰۳ رسیده بود. افزایش یا کاهش پارامترها در ماه دوم، بجز AST ، معنی دار نبوده است. نتایج تغییرات فوق در تیمار حاوی لوگ ۹ باکتری لاکتیک در ماه اول نشان داد که میزان فاکتورهای مورد بررسی به ترتیب ۱/۸، ۳/۵۶، ۳/۴۳، ۲۲، ۳۲/۵۳، ۱۴/۶۶، ۱۳۴/۴۳ بوده که در ماه دوم به ۲/۷۶، ۳/۷، ۴/۳۶، ۱۰۱/۷۶، ۲۲/۵۳، ۱۳/۰۳ و ۱۲۱/۳ رسیده بود. افزایش یا کاهش پارامترها در ماه دوم، بجز AST ، معنی دار نبوده است. در تیمار شاهد، روند تیمارهای مورد بررسی در ماه اول به ترتیب ۲/۴، ۳/۹۶، ۲/۹۳، ۱۶/۰۳، ۳۲/۵۶، ۱۳/۱۳، ۱۳۲/۷ بوده که در ماه دوم به ۱/۹۳، ۳/۳، ۵/۲، ۲۵/۴۳، ۱۹/۲۶، ۱۰/۷ و ۱۲۸/۶ رسیده بود. افزایش یا کاهش پارامترها در ماه دوم معنی دار نبوده است.

جدول ۴-۸: تغییرات پارامترهای ایمنی و فیزیولوژی در تیمارهای مختلف ماهی قزل آلا در زمانهای ۳۰ و ۶۰ روز

تیمار			ویبریو	لوگ ۸ لاکتیک	سودوموناس	لوگ ۷ لاکتیک	لوگ ۹ لاکتیک	شاهد
Alb(gdl $^{-1}$)	۳۰ روز	Mean	۱/۷	۲/۳۳	۲/۳۳	۳/۱۶	۱/۸	۲/۴
		SD	۰/۴	۰/۸۹	۰/۴۹	۰/۶	۰/۳۴	۰/۳۴
	۶۰ روز	Mean	۲	۲/۴	۲/۱	۲/۴۳	۲/۷۶	۱/۹۳
		SD	۰/۴۵	۰/۲۶	۰/۵۵	۰/۲	۰/۵۵	۰/۶۴
TP(gdl $^{-1}$)	۳۰ روز	Mean	۳/۳۳	۳/۶۶	۳/۶	۵/۱	۳/۵۶	۳/۹۶
		SD	۰/۸۶	۰/۵	۰/۱۵	۰/۶	۰/۵۵	۰/۰۵
	۶۰ روز	Mean	۳/۶۶	۳/۷۳	۳/۵۶	۳/۶۳	۳/۷	۳/۳
		SD	۰/۳۵	۰/۰۵	۰/۰۵	۰/۱	۰/۳۶	۰/۴
ALT(IUml^{-1})	۳۰ روز	Mean	۲/۹۶	۳/۳۶	۱/۲۶	۳/۱۶	۳/۴۳	۲/۹۳
		SD	۰/۳	۰/۳۲	۰/۱۶	۰/۴	۱/۶	۰/۸
	۶۰ روز	Mean	۲/۲۳	۲/۰۶	۱/۹	۳/۷	۴/۳۶	۵/۲
		SD	۰/۷۱	۰/۹	۰/۱	۰/۱	۱/۵۶	۱/۷۵
AST(IUml^{-1})	۳۰ روز	Mean	۲۷/۴	۳۸/۲۶	۳۰/۵۶	۳۸/۳	۲۲	۱۶/۰۳
		SD	۹/۳۷	۹/۱۱	۱۴/۳۲	۷/۲۱	۸/۵	۳/۶۵
	۶۰ روز	Mean	۱۰۴/۴۶	۱۲۱/۲۱	۸۱/۳۶	۹۷/۸۶	۱۰۱/۷۶	۲۵/۴۳
		SD	۱۳/۵۱	۸/۲۴	۱۷/۴۵	۲۸/۰۱	۲۱/۶۹	۱۲/۶
C3(gdl $^{-1}$)	۳۰ روز	Mean	۴۳/۷۶	۲۹/۱	۲۴/۱	۲۹/۹	۵۳/۳۲	۳۲/۵۶
		SD	۹/۸۶	۹/۳	۳/۲۹	۵/۹۸	۷/۵	۴/۶
	۶۰ روز	Mean	۵۰/۳	۵۴/۱۶	۳۸/۲	۲۲/۵	۲۲/۵۳	۱۹/۲۶
		SD	۴/۷۳	۳/۶۵	۴/۱۱	۳/۱	۷/۴۳	۳/۷۷
C4(gdl $^{-1}$)	۳۰ روز	Mean	۸/۶۳	۱۳/۷۳	۱۱/۳	۱۲/۶	۱۴/۶۶	۱۳/۱۳
		SD	۱/۱۵	۰/۳	۲/۲۶	۱/۲۵	۱/۵۱	۱/۲۱
	۶۰ روز	Mean	۷/۱	۱۸/۳۶	۷/۶۳	۱۰/۳	۱۳/۰۳	۱۰/۷
		SD	۱/۲۹	۶/۵۸	۱/۶۱	۱/۷۹	۱/۹۳	۱/۵۱
IgM(gdl $^{-1}$)	۳۰ روز	Mean	۱۶۴/۴۶	۱۶۷/۷۳	۱۵۰/۲۳	۱۲۴/۱۶	۱۳۴/۴۳	۱۳۲/۷
		SD	۱۷/۲۸	۱۷/۲۱	۲۱/۸۶	۲۶/۵۶	۳۵/۶۱	۲۹/۱۱
	۶۰ روز	Mean	۱۳۳/۳۷	۱۸۲/۰۲	۱۵۷/۴۳	۱۱۲/۰۳	۱۲۱/۲	۱۲۸/۶
		SD	۲۶/۱۱	۱۱/۵۵	۳۵/۱۷	۱۵/۶۳	۱۷/۲۱	۱۳/۹۷

n=6

میانگین (Mean)، انحراف معیار (SD)، آلبومین(Alb)، آلکالین آمینوترانسفراز (ALT)، اسپارتات آمینوترانسفراز (AST)، پروتئین توتال(TP)، کمپلمان جزء ۳ (C3)، کمپلمان جزء ۴(C4)، ایمونوگلوبولین M (IgM)

۵-۴- رویارویی (Challenge)

نتایج رویارویی ماهی پس از پایان دوره (پس از ۶۰ روز) با باکتری بیماریزا استرپتوکوکوس اینیه نشان داد که بیشترین میزان بقاء ماهی در تیمار دریافت کننده لوگ ۸ لاکتیک بوده و تیمارهای ویبریو ، سودوموناس، لوگ ۹ لاکتیک و لوگ ۷ لاکتیک در مرحله بعد قرار داشتند (جدول ۴-۹). نتایج آماری حاکی از وجود اختلاف معنی دار بین تیمارهای دریافت کننده باکتریها خصوصا لوگ ۸ با تیمار شاهد بوده است($P<۰/۰۵$). برای انجام آزمایشات رویارویی با باکتری استرپتوکوکوس اینیه، از هر تیمار و تکرار آن جمعا ۲۰ ماهی، به وان های فایبر گلاس انتقال داده شده و در مجموع ۱۲۰ قطعه ماهی در قالب ۶ تیمار مورد ارزیابی قرار گرفتند.

جدول۴-۹ : میانگین درصد بقاء در تیمارهای مختلف دارای باکتری و تیمار شاهد در بچه ماهی قزل آلا بعد از رویارویی با استرپتوکوکوس اینیه (میانگین ± SD)

تیمار	تعداد تلف شده	تعداد باقیمانده	درصد بقاء
ویبریو	۴	۵۶	۹۳/۳۳±۳/۱۱
لوگ ۸ لاکتیک	۲	۵۸	۹۶/۶۶±۲/۴۱
سودوموناس	۵	۵۵	۹۱/۶۶±۲/۲۹
لوگ ۷ لاکتیک	۶	۵۴	۹۰/۲۱±۲/۴۹
لوگ ۹ لاکتیک	۵	۵۵	۹۱/۶۶±۲/۶۸
شاهد	۴۵	۱۵	۲۵/۳۸±۳/۴۶

تعداد ماهی برای هر تیمار و تکرار آن = ۲۰ قطعه

۵-بحث

مطالعات مختلفی در خصوص استفاده از باکتریها خصوص باکتری لاکتیک بعنوان باکتریهای پروبیونت در جیره غذایی آبزیان صورت گرفته است. گونه های مختلفی از این باکتریها نظیر لاکتوباسیلوسها، لوکونوستوک(Leuconostoc sp.)، استرپتوکوکوس، کارنوباکتریوم(Carnobacterium sp.)، لاکتوکوکوس(Lactococcus sp.)، پدیوکوکوسها(Pediococcus sp.) ، کلستریدیومها(Clostridium sp.)، شوانلا (Shewanella sp.)و باسیلوسها(Bacillus sp.) دارای خواص پروبیوتیکی بوده جایگزین شدن در دستگاه گوارش ماهی و تولید متابولیتهای مختلف نظیر انواع باکتریوسینها و اسیدهای آلی این عمل را انجام می دهند (Fuller, 1992) (Irianto,2002).

در تحقیق حاضر تأثیر پروبیوتیکی سه جنس جدا شده از ماهی قزل آلا شامل باکتری لاکتیک (در لوگهای ۷، ۸ و ۹) و ویبریو و سودوموناس هر کدام در یک دوز(لوگ ۸) مورد ارزیابی قرار گرفته و با اضافه نمودن باکتریهای جدا شده به جیره غذایی بچه ماهی قزل آلا، در طول ۶۰ روز بهمراه تیمار شاهد (مصرف جیره فاقد باکتری) مورد ارزیابی قرار گرفته و تغییرات شاخصهای رشد، پارامترهای هماتولوژی، ایمونولوژی و فیزیولوژی مورد بررسی قرار گرفته و در نهایت نیز مقاومت ماهی در برابر استرپتوکوکوزیس (رویارویی با استرپتوکوکوس اینیه) مورد ارزیابی قرار گرفت.

۵-۱- شاخصهای رشد و بقاء

نتایج آزمایشات انجام شده نشان داد که بیشترین میانگین وزن مربوط به تیمارهای حاوی باکتری لاکتیک بوده که در این میان لوگ ۸ نتایج بهتری را بهمراه داشته و تیمارهای حاوی ویبریو، لوگ ۹ باکتری لاکتیک، سودوموناس و لوگ ۷ لاکتیک در مرحله بعد قرار داشتند. مطالعات آماری حاکی از وجود اختلاف معنی دار بین تیمارهای مختلف و همچنین تیمار شاهد در روز ۶۰ بوده است ($P<۰/۰۵$) . هیچگونه اختلاف معنی داری ما بین وزن داده ها در زمان شروع آزمایش نبوده است. بهترین ضریب تبدیل غذایی ، بازده مصرف پروتئین، سرعت رشد روزانه، ضریب رشد ویژه و بازماندگی در تیمارهای حاوی باکتری (لوگ ۸ باکتری لاکتیک) بوده و مشابه نتایج وزن، تیمارهای دیگر در مرحله بعد قرار داشتند. نتایج آنالیز آماری پارامترهای اخیر حاکی از اختلاف معنی دار لوگ ۸ باکتری لاکتیک با سایر تیمارها و شاهد بوده ولی سایر تیمارها دارای اختلاف معنی دار با شاهد و فاقد اختلاف ما بین گروه خود بوده اند. در مطالعه انجام گرفته توسط Mesalhy و همکاران در سال ۲۰۰۸ مشخص گردید که تیمار حاوی باسیلوس پومی لیس و تیمار حاوی Organic Green باعث رشد ماهی تیلاپیا شده ولی این روند در دوزهای بالاتر باکتری و ماده پلی ساکاریدی مشاهده شده و در مقادیر پائین تر فاقد اختلاف معنی دار با نمونه شاهد بوده است. در مطالعه انجام شده توسط Mesalhy و همکارش در سال۲۰۰۸ مشخص گردید که میزان وزن نهایی، FCR ، PER و SGR در ماهی کپور کاتلا(Catla catla)در لوگهای ۴ و ۵

باسیلوس سیرکولانس (*Bacillus circulans*))مشاهده شده (وزن اولیه ماهیان مورد بررسی = ۶/۴۸ گرم) ودر لوگ ۶ باکتری ، نتایج رضایت بخش نبوده و در برخی از موارد نسبت به نمونه شاهد کمتر بوده است. نتایج مطالعه مذکور با نتایج این تحقیق که حاکی از موثر بودن لوگ ۸ نسبت به سایر تیمارها می باشد مطابقت دارد. با توجه به بالا بودن وزن اولیه ماهی قزل آلا مورد بررسی(بالای ۳۰ گرم) لوگهای انتخاب شده منطقی به نظر می رسد. در مطالعه انجام شده توسط Xu و همکاران در سال ۲۰۰۹ مشخص گردید که دو باکتری رودوسودوموناس و باسیلوس کواگولانس نسبت به باسیلوس سوبتی لیس تاثیر بیشتری بر میزان وزن نهایی، FCR ، PER و SGR ماهی داشته است. بنابراین انتخاب نوع باکتری یکی از پارامترهای اصلی در استفاده از پروبیوتیک بوده که در اکثر مقالات به خواص باسیلوسها و باکتریهای لاکتیک بعنوان باکتریهای مفید اشاره شده است. در مطالعه حاضر نیز باکتری سودوموناس دارای تاثیرات مثبت بر شاخصهای رشد ماهی قزل آلا داشته است. در تحقیق انجام شده توسط Bagheri و همکاران در سال ۲۰۰۸ مشخص گردید که با افزایش ضریب لوگ ۹ باسیلوس (۳/۸)در جیره غذایی ماهی قزل آلا ، شاخصهای رشد ماهی (وزن و طول نهایی، FCR ، PER و SGR) نسبت به تیمار شاهد و سایر تیمارهای دارای مقادیر کمتر باسیلوس افزایش یافته ولی بدنبال افزایش بیشتر ضریب لوگ ۹ ، پارامترهای مذکور کاهش می یابد (۶/۱). در تحقیق انجام شده توسط Son و همکاران در سال ۲۰۰۹ مشخص شد که استفاده از رژیم غذایی حاوی ترکیبS.cerevisiae وLactobacillus coagulans ضریب تبدیل غذایی بچه ماهی کپور مریگال Cirrhinus marigal را بهبود می بخشد.

Jafarian و همکاران (2007) گزارش کردند که لارو قزل آلای تغذیه شده با دافنی غنی شده از پروبیوتیک باکتریایی Baccilus باعث افزایش میزان PER و FCR میشود. بر اساس تحقیق انجام شده توسط عسگریان در سال ۱۳۸۶ بر روی لارو فیل ماهیHuso huso بیشترین GR مربوط به تیمار دریافت کننده (۹×۱۰^{۹} CFU/g) *Lactobacillus curvatus* بوده در صورتیکه در مطالعه حاضر بهترین نتیجه مربوط به لوگ ۸ بوده است. همچنین در بررسی دیگر توسط عسگریان (۱۳۸۶) بر روی لارو قره برون Acipenser persicus بیشترین GR مربوط به تیمار دریافت کننده (۲×۱۰^{۹}CFU/g) Leuconostoc mesenteroides بود. نتایج بررسی وی نشان داد که مکمل باکتریایی در دوزهای ذکر شده بر سرعت رشد ویژه نیز مؤثر بوده است.

مرگ و میر بالا در آبزی پروری که در اثر استرس و افزایش عفونت بوجود می آید ضرر اقتصادی جدی بدنبال دارد (Lovell, 1996; Amar et al., 2009). در شرایط استرس زای حاصل از عفونتهای باکتریایی که باعث به خطر افتادن سیستم ایمنی آبزیان می شود، یکی از معمولترین روشهای درمانی استفاده از آنتی بیوتیکها می باشد (Burr et al., 2005)،اما به عللی از جمله هزینه بالا و عوارض جانبی بر موجودات آبزی (Gatlin et al., 2006) و سرکوب سیستم ایمنی توسط برخی آنتی بیوتیکها و مستعد نمودن موجودات آبزی برای پذیرش بیماریهای انگلی و ویروسی (Burr et al., 2005) استفاده از آنها مورد انتقاد قرار گرفته است. امروزه استفاده از مکمل غذایی (پروبیوتیک و پری بیوتیک)که در بالا بردن سیستم ایمنی و قدرت دفاعی بدن نقش دارند از جمله راه کارهایی

می باشد که علاوه بر تأمین مواد مغذی لازم در جهت بهبود رشد، می توانند در افزایش سلامت، مقاومت به استرس و عوامل بیماریزا مفید واقع شوند (Gatlin, 2006)

به منظور تعیین اثر پروبیوتیکی باکتریهای لاکتیک در سه لوگ ۷، ۸ و ۹ و سودوموناس و ویبریو بر بازماندگی بچه ماهیان قزل آلا در حوضچه های پرورشی، درصد بازماندگی آنها در انتهای دوره آزمایش مورد بررسی قرارگرفت. نتایج نشان داد که بطور کلی درصد بازماندگی بالای ۹۰ درصد بوده ولی بیشترین درصد مربوط به لوگ ۸ و ۹ باکتری لاکتیک بوده است(۱۰۰ درصد). در مطالعه انجام شده توسط Xu و همکاران در سال ۲۰۰۹ مشخص گردید میزان بقاء در هر ۴ تیمار (۳ باکتری باسیلوس سوبتی لیس، باسیلوس کواکولانس و رودوسودوموناس و نمونه شاهد) ۱۰۰ درصد بوده است. در تحقیق انجام شده توسط Bagheri و همکاران در سال ۲۰۰۸ مشخص گردید که با افزایش ضریب لوگ ۹ باسیلوس (۳/۸)در جیره غذایی ماهی قزل آلا ، درصد بقای ماهی نیز افزایش می یابد ولی با افزایش ضریب از درصد بقاء کاسته میشود.نتایج مطالعه Bagheri و همکاران با نتایج مطالعه حاضر مطابقت داشته و بیشترین درصد بقاء به لوگ ۸ اختصاص دارد.

۲-۵- شاخص های هماتولوژی

نتایج پارامترهای مربوط به گلبول قرمز در زمان ۳۰ و ۶۰ روز نشان داد که اکثر فاکتورهای مورد بررسی روند صعودی داشته ولی این روند همیشگی نبوده است. تغییرات در تیمارهای حاوی سودوموناس ، لوگ ۷ و ۹ باکتری لاکتیک روند صعودی داشته ولی در تیمارهای دارای ویبریو و لوگ ۸ تغییرات خاصی مشاهده نشده است. نتایج آنالیز آماری حاکی از اختلاف معنی دار مابین تیمارهای مورد بررسی با نمونه شاهد بوده است. هر چند که تیمار شاهد روند صعودی جزئی مشاهد شد. افزایش پارامترهایی نظیرMCH و MCHC در خون نشاندهنده افزایش هموگلوبین بوده که افزایش این فاکتور باعث انتقال بهتر و بیشتر اکسیژن به اندامهای مختلف شده و در نتیجه متابولیسم سلولی با کارآیی بهتری صورت میگیرد. بنابراین افزودن پروبیوتیک میتواند باعث افزایش نسبی پارامترهای مذکور در خون شده و در نتیجه اثرات مفیدی برای ماهی داشته باشد. در مطالعه انجام گرفته توسط کامکار در سال ۱۳۹۰ در ارتباط با تاثیرات باسیلوس سوبتی لیس بر مقاومت ماهی قزل آلا نسبت به استرپتوکوکوزیس مشخص گردید که در تیمارهایی که دریافت کننده پروبیوتیک باسیلوس سوبتی لیس بودند هماتوکریت، هموگلوبین و تعداد گلبولهای قرمز بطور معنی داری افزایش داشته که با نتایج این مطالعه مطابقت دارد. در تیمارهای شاهد انجام گرفته توسط کامکار روند کاهشی در پارامترهای مذکور مشاهده شده که با تیمار شاهد در این مطالعه مطابقت دارد(کامکار،۱۳۹۰). متوسط MCH ، MCV و MCHC در تحقیق انجام گرفته توسط کامکار در تیمارهای دریافت کننده پروبیوتیک نسبت به نمونه شاهد روند نزولی داشته که با نتایج لوگ ۸ لاکتیک و ویبریو مطابقت داشته ولی با نتایج سایر تیمارها مغایرت دارد. با توجه به نتایج متناقص در تیمارهای انتخاب شده در این مطالعه نتیجه گیری میگردد که پروبیوتیک حاوی باکتری لاکتیک تاثیری معنی داری بر

تغییرات گلبول قرمز نداشته و فقط در لوگ ۹ این تغییرات معنی دار بوده است. مطالعات Mesalhy و همکاران در سال ۲۰۰۸ نشان داد که استفاده از باسیلوس پومی لیس و مادهOrganic Green در ماهی تیلاپیا باعث افزایش تعداد هماتوکریت شده و به ترتیب ۳۱ برای باسیلوس و ۳۲/۱ برای Organic Green بوده که نسبت به نمونه شاهد (۳۰/۶) افزایش نسبی داشته ولی اختلاف مذکور معنی دار نبوده است. در مطالعه حاضر میزان هماتوکریت در تیمارهای حاوی باکتریها نسبت به نمونه شاهد نیز دارای افزایش بوده است.البته ممکن است تغییرات دیده شده مربوط به دماوتغیرات فیزیولوژیکی ماهی باشدوارتباط معنی داری با پروبیوتیک اضافه شده وجود نداشته باشد.

در مطالعه انجام گرفته توسط Al-Dohail و همکاران در خصوص تاثیرات پروبیوتیکی لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس بر تغییرات هماتولوژیکی گربه ماهی آفریقایی و همچنین رویارویی با چند باکتری بیماریزا از جمله استرپتوکوکوس آگالاکتیه، استافیلوکوکوس گزیلوسوس و آئروموناس هیدروفیلا مشخص گردید که هر چند برخی از پارامترهای هماتولوژی در تیمارهای دارای پروبیوتیک روند افزایشی داشتند ولی با این وجود روند مذکور معنی دار نبوده است. در مطالعه حاضر نیز مشابه نتایج فوق مشاهد شده و روند صعودی در برخی از تیمارهای حاوی باکتری لاکتیک مشهود نبوده است. درخصوص پارامترهای هماتولوژی خصوصا تغییرات گلبول قرمز نمی توان همیشه به تاثیر ماده افزودنی اشاره نمود.ممکن است تغییرات دیده شده مربوط به دماوتغیرات فیزیولوژیکی ماهی باشد وارتباط معنی داری با پروبیوتیک اضافه شده وجود نداشته باشد.

نتایج تغییرات مربوط به گلبولهای سفید در تمامی تیمارها، بجز تعداد نوتروفیل ، در ماه دوم روند نزولی داشته اند. بطور کلی میزان گلبولهای سفید در تیمار حاوی لوگ ۸ باکتری لاکتیک خصوصا تعداد نوتروفیل و رادیکال آزاد اکسیژن نسبت به سایر تیمارها بیشتر بوده و تیمارهای دیگر شامل ویبریو، سودوموناس، لوگ ۷ و ۹ در مرحله بعد قرار داشتند. مطالعه انجام شده توسط کامکار در سال ۱۳۹۰ نشان داد که با افزودن باسیلوس سوبتی لیس در جیره غذایی ماهی قزل آلا ، پارامترهای مربوط به گلبول سفید از جمله شمارش گلبول سفید ، لنفوسیت، نوتروفیل افزایش می یابد. در مطالعه حاضر نیز تعداد سلولهای مذکور نسبت به تیمار شاهد افزایش داشته ولی از زمان ۳۰ تا ۶۰ روز بجز نوتروفیل روند نزولی داشته اند($P<0.05$). مطالعات انجام گرفته توسط Brunt و همکاران در سال ۲۰۰۷ ، نشان داد که با افزودن پروبیوتیک باعث افزایش گلبولهای سفید میشود. در مطالعه انجام گرفته توسط Mesalhy و همکاران مشخص گردید که باسیلوس پومی لیس در لوگ ۱۲ باعث افزایش معنی دار نوتروفیل(۱۲/۲۳)، لمفوسیت(۲۶/۱۱) و مونوسیت(۱/۴۱) نسبت به شاهد به ترتیب ۱۱/۸۵ ، ۲۳/۴ و ۰/۹ شده ولی تغییرات در Organic Green فاقد اختلاف معنی دار با تیمار شاهد بوده است. نتایج مطالعه فوق حاکی از آن است که لوگهای بالاتر باکتری باعث افزایش تعداد گلبولهای سفید خون میشود ولی مطالعه حاضر نشان دهنده آنست که لوگ ۸ باکتری بهتر از لوگ ۹ باکتری لاکتیک بوده است. بنابراین نوع باکتری مورد استفاده و ویژگیهای آن تاثیر متفاوتی بر تعداد گلبولهای سفید خواهند داشت.

تیمارهای حاوی لوگهای مختلف باکتری لاکتیک باعث افزایش رادیکال آزاد اکسیژن نسبت به تیمار شاهد شدند. رادیکال آزاد اکسیژن در ارتباط مستقیم با انفجار تنفسی در نوتروفیل ها می باشد. بنابراین متعاقب افزایش نوتروفیل ها رادیکال آزاد اکسیژن نیز افزایش می باشد. در مطالعه مروری که توسط Nayak ارائه شده گزارش شد که پروبیوتیکهای مختلف که بصورت ترکیبی و یا منفرد مورد استفاده قرار میگیرند باعث افزایش انفجار تنفسی تونروفیلها، فاگوسیتوزیس شده و در حقیقت سیستم ایمنی ذاتی را تحت تاثیر قرار میدهد. مطالعات مختلف نشان داد که بدنبال استفاده از باکتریهای دارای خواص پروبیوتیک نظیر باسیلوسها و باکتریهای گروه لاکتیک، فعالیت انفجار تنفسی افزایش می یابد(Nikoskelainen et al 2003; Salinas et al 2005; Xu et al 2009) . مطالعه Salinas و همکاران در سال ۲۰۰۶ نشان داد که استفاده از لاکتوباسیلوس دلبروکی زیر گونه لاکتیس باعث تحریک سیستم ایمنی ذاتی ماهیان استخوانی خصوصا فعالیت انفجار تنفسی میگردد.

۳-۵- سیستم ایمنی

دامنه تغییرات ایمنی هموورال در تیمارهای حاوی باکتریها نسبت به شاهد حاکی از افزایش معنی دار AST بوده و در برخی از تیمارها خصوصا لوگ ۸ باکتری ، IgM و C3 نیز افزایش نشان دادند. نتایج مطالعه کامکار در سال۱۳۹۰نشان داد که پروبیوتیک باسیلوس سوبتی لیس باعث افزایش معنی دار IgM شده که با نتایج لوگ ۸ لاکتیک مطابقت دارد. نتایج مطالعات Panigrahi و همکاران در سال ۲۰۰۵ در خصوص استفاده از لاکتوباسیلوس رامنوسوس در ماهی قزل آلا و Al-Dohail در ارتباط با استفاده از لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس در گربه ماهی آفریقایی نشان داد که پروبیوتیکهای مورد استفاده باعث تحریک تولید ایمونوگلوبین میشود. در کنار تولید ایمونوگلوبین کمپلمان C3 افزایش و C4 کاهش می یابد. کمپلمان C3 یکی از اجزای اصلی تحریک کننده سیستم ایمنی هموورال و سلولی می باشد. این جزء هم از راه کلاسیک و هم از راه آلترناتیو باعث تحریک تولید سایر اجزاء کپلمان میگردد. به هنگامیکه کمپلمان از راه کلاسیک فعال شود باعث تولید آنتی بادی نیز شده و بطور اختصاصی عمل می کند و در حقیقت بعنوان یکی از پارامترهای سیستم ایمنی هموورال در نظر گرفته میشود. زمانیکه از راه آلترناتیو وارد شود بصورت ایمنی ذاتی عمل کرده و غیر اختصاصی می باشد. مطالعه Barnes و همکاران در سال ۲۰۰۷ در خصوص استفاده از لوکونوستوک مزانتروئیدس و لاکتوباسیلوس کازئی در ماهی قزل آلا و ارزیابی مقاومت آن در برابر بیماری فرونکولوزیس نشان داد که استفاده از باکتریهای مذکور باعث افزایش اجزاء کمپلمان شده و سیستم ایمنی ذاتی و هموورال را فعال می کند. مطالعه Hobsو همکاران در سال ۲۰۰۵ در ارتباط با استفاده از باکتری شوانلا غیر فعال شده با حرارت در جیره غذایی ماهی نشان داد که استفاده از آن باعث افزایش کمپلمان میگردد. مطالعه انجام شده توسط Brunt– Newaj و همکاران در سال ۲۰۰۷ در خصوص استفاده از

باسیلوس سوبتی لیس در جیره غذایی قزل آلا و افزایش مقاومت آن در برابر آئروموناس نشان داد که باکتری مورد استفاده فاقد اثر معنی دار در اجزاء کمپلمان خون بوده است. مطالعه Nikoskelainen و همکاران در سال ۲۰۰۳ در خصوص استفاده از لاکتوباسیلوس رامنوسوس مشخص گردید که باکتری مورد استفاده باعث افزایش معنی دار در اجزاء کمپلمان میگردد. مطالعات Panighari و همکاران در سال ۲۰۰۵ نشان داد که استفاده لاکتوباسیلوس رامنوسوس و برخی دیگر از باکتریهای پروبیوتیک در ماهی قزل آلا باعث افزایش اجزاء کمپلمان میشود. مطالعه Son و همکاران در سال ۲۰۰۹ نشان داد که استفاده از لاکتوباسیلوس پلانتاروم باعث افزایش ترشح اجزاء کمپلمان در ماهی قزل آلا میگردد. نتایج مطالعات اشاره شده حاکی از افزایش اجزاء کمپلمان در تیمارهای دریافت کننده پروبیوتیک بوده که با نتایج لوگ ۸ باکتری لاکتیک این مطالعه همخوانی دارد.

۴-۵- رویارویی با عامل استرپتوکوکوزیس

نتایج آزمایشات رویارویی ماهی در برابر استرپتوکوکوس اینیه نشان داد که بیشترین درصد بقاء مربوط به تیمارهای دریافت کننده باکتری لاکتیک در لوگ ۸ (۹۶/۶۶ درصد) و ویبریو(۳۳/ درصد۹۳) بوده و تیمارهای دیگر در مرحله بعد قرار داشته و تیمار شاهد با کمترین درصد بقاء(۲۵/۳۸) در مرحله آخر قرار داشته است. استرپتوکوکوزیس بیماری باکتریایی شایع در مزارع پرورش ماهیان سردآبی در ایران بوده که گونه هایی نظیر اینیه، اوبریس (*S. uberis*)، آگالاکتیه و فسیوم(*S. faceium*) از استانهای مختلف جدا شدند. بیماریزایی گونه های جدا شده متفاوت بوده و بیشترین درصد مربوط به اینیه بوده و گونه اوبریس از بیماریزایی کمتری برخوردار می باشد. نتایج مطالعات کامکار در سال ۱۳۹۰ نشان داد که در تیمارهای دریافت کننده باسیلوس، میزان تلفات در بچه ماهیان قزل آلای رویارو شده با استرپتوکوکوس اینیه کمتر از تیمار شاهد بوده است. در مقایسه مطالعه کامکار و مطالعه حاضر مشخص میگردد که دامنه تلفات در مطالعه حاضر بیشتر بوده و نشان از بیماریزایی بالای گونه اینیه می باشد. در مطالعه انجام شده توسط Mesalhy و همکاران در سال ۲۰۰۸ مشخص گردید که در تیمارهای دریافت کننده باسیلوس پومی لیس ، درررویارویی با آئروموناس هیدروفیلا در لوگ ۸، درصد بازماندگی بطور معنی داری افزایش داشته است. لوگی که برای تزریق اینیه در نظر گرفته شد لوگ ۶ بوده که باعث بروز تلفات در ماهی در تیمار شاهد شده است. در مطالعه انجام شده توسط Son در سال ۲۰۰۹ مشخص گردید که بهنگامیکه در جیره غذایی ماهی کپور Catla از باکتری باسیلوس سیرکولانس استفاده نشود و در معرض آئروموناس هیدروفیلا قرار داده شود درصد بازماندگی آن به ۶/۶۶ درصد رسیده این در حالیست که در تیمارهای دریافت کننده باسیلوس درصد بازماندگی ۱۰۰ درصد بود. نتایج تحقیق حاضر نیز حاکی از بازماندگی ۱۰۰ درصد ماهی قزل آلای رویارو شده با گونه اینیه در دو تیمار لوگ ۸ باکتری لاکتیک و ویبریو می باشد. بنابراین انتخاب دوز مناسب باکتری بسیار حائز اهمیت می باشد. نتایج مطالعات Al-Dohail و همکاران در سال

۲۰۱۱ نشان داد که بهنگام استفاده از لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس در جیره غذایی گربه ماهی آفریقایی، مقاومت ماهی در برابر آئروموناس هیدروفیلا، استافیلوکوکوس و استرپتوکوکوس آگالاکتیه افزایش می یابد. یکی از گونه های اشاره شده در تحقیق فوق استرپتوکوکوس آگالاکتیه بوده که یکی از گونه های جدا شده از مزارع ماهیان سردآبی ایران می باشد. مطالعات مختلفی در خصوص استفاده از باکتریهای لاکتیک به منظور افزایش مقاومت ماهیان در برابر بیماریهای شایع صورت گرفته و در اکثر موارد مشخص گردید که این گروه از باکتریها دارای نتایج مثبت بودند.این گروه از باکتریها بواسطه تولید متابولیتهای مختلف از جمله باکتریوسین ها، اسیدهای آلی، آب اکسیژنه و سایر متابولیتها دارای خواص ضد میکروبی بوده و مکانیسمهای مذکور آنها را قادر می سازد که در براحتی در دستگاه گوارش ماهی جایگزین شوند.

۶- نتیجه گیری

نتیجه گیری که از این مطالعه حاصل میشود آنکه اولا باکتریهای جدا شده از دستگاه گوارش ماهی قزل آلا دارای خواص پروبیوتیک بوده و بر پارامترهای مختلف نظیر رشد، بقاء ، هماتولوژی ، ایمونولوژی و فیزیولوژی تاثیر مثبت دارند اما بهترین پروبیوتیک مورد استفاده لوگ ۸ باکتری لاکتیک بوده که علاوه بر اثرات مثبت بر رشد و بقاء توانسته شاخص ها خونی و ایمنی مثل نوتروفیل و رادیکال آزاد اکسیژن و همچنین AST ، IgM و C3 را افزایش داده و با تیمارهای دیگر و همچنین نمونه شاهد دارای اختلاف معنی دار بوده است. همچنین این تیمار توانسته مقاومت ماهی قزل آلا را در برابر استرپتوکوکوزیس افزایش داده و از بروز تلفات احتمالی جلوگیری نماید.

پیشنهادها

- با توجه به دستاوردهای این بررسی پیشنهاد می شود رژیم حاوی باکتری لاکتیک در ارتباط با سایر ماهیان نیز مورد بررسی قرار گیرد.
- پیشنهاد میگردد که استفاده از باکتری لاکتیک در مراحل لاروی ماهی مورد استفاده قرار گرفته تا مرحله جایگزین شدن باکتری در کوتاهترین زمان انجام گرفته و تاثیرات مثبت در زمان کوتاهتر نمایان گردد.
- پیشنهاد میگردد که تمامی شاخصهای فیزیولوژیکی، ایمنی غیر اختصاصی و اختصاصی به هنگام استفاده از باکتریهای جدا شده مورد بررسی قرار گیرد تا نتایج بصورت جامع و کامل مورد بررسی قرار گیرد.
- با توجه به نقش باکتری جدا شده خصوصا باکتریهای لاکتیک در کنترل بیماری حاصل باکتری استرپتوکوک پیشنهاد می شود اثر آن در برابر سایر گونه های استرپتوکوک و همچنین بیماریهای شایع میکروبی مورد بررسی قرار گیرد.
- پیشنهاد میگردد که همزمان پروبیوتیک جدا شده با پروبیوتیکهای تجاری مرسوم مورد مقایسه قرار گرفته و نتایج مورد تجزیه و تحلیل قرار گیرد.
- با توجه به اینکه باکتریهای جدا شده برای اولین بار از ماهی قزل آلا در ایران مورد بررسی قرار گرفته اند، پیشنهاد میگردد که محصول فوق بصورت یک patent در فرمولاسیون بسته های پروبیوتیک مورد استفاده قرار گیرد.

منابع

- بروشور تپاکس تهیه شده در شرکت آزمایشگاههای تولیدی داروسازی، ۱۳۸۴،ص ۴- ۱
- عسگریان، ف.، ۱۳۸۶، اثرات کاربرد پروبایوتیک بر روند رشد، بقاء و روند رشد دستگاه گوارش در فیل ماهی *Huso Huso* تاس ماهی ایرانی *Acipenser persicus*، پایان نامه کارشناسی ارشد، دانشگاه آزاد اسلامی واحد علوم تحقیقات، ص ۱۲- ۶ و ۱۸۳- ۱۶۷
- فاضلی، ز.، ۱۳۸۴، غنی سازی گونه آرتمیا ارومیانا با پروبیوتیک مخمری (تپاکس) و بررسی پایداری آرتمیا غنی سازی شده در دوره های مختلف غنی سازی و انکوباسیون سرد، پایان نامه کارشناسی ارشد، دانشگاه آزاد اسلامی واحد علوم وتحقیقات، ص ۱۸۳
- تقوی، س.، ۱۳۸۴، بررسی مقایسه ای فاکتورهای رشد و بازماندگی بر اثر افزودن پروبیوتیک تپاکس(Thepax) در جیره غذایی ماهی قزل آلای رنگین کمان در مرحله رشد، پایان نامه کارشناسی ارشد، دانشگاه آزاد اسلامی واحد علوم و تحقیقات، ص ۱۶- ۴
- تیرزاد، ا.، ترجمه: ربانی، م.، محزونیه، م.، ۱۳۸۳، ایمنی شناسی دامپزشکی، انتشارات دانشگاه تهران، ص ۷۰۶- ۱۵۰
- جعفریان، ا.، ۱۳۸۷، بررسی اثرات بازدارندگی لاکتوباسیلوس بر علیه هلیکو پیلوری در شرایط گرادیان گلوکز و اکسیژن در سیستم ژلی تثبیت شده، مجله علمی دانشگاه علوم پزشکی رفسنجان، جلد ۵، شماره ۱۹، ص ۱۰۲- ۹۷
- سالنامه شیلات ایران، ۱۳۸۹, انتشارات سازمان شیلات ایران. صفحه ۱۸-۱۵
- سامانی، م.، ۱۳۸۶، جداسازی، شناسایی و انتخاب باکتری های اسید لاکتیک مناسب برای تولید پروبیوتیک در تغذیه جوجه های گوشتی، پایان نامه دکتری تخصصی، دانشگاه تربیت مدرس، ص ۲۱۷
- ستاری، م.، ۱۳۸۱، ماهی شناسی ۱، انتشارات نقش مهر با همکاری دانشگاه گیلان، ص ۳۵
- سلطانی، س.، ۱۳۸۰، بررسی اثرات سمی کبالت بر برخی فاکتورهای خونی و بافت آبشش در ماهی کپور نقره ای، پایان نامه کارشناسی ارشد، دانشگاه آزاد اسلامی واحد علوم و تحقیقات، ص ۴- ۲.
- صادقی م.، ۱۳۸۰، تغذیه کپور ماهیان، پایان نامه کارشناسی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد تهران شمال، ص ۱۴.
- ضیایی نژاد، س.، ۱۳۸۲، تکثیر باکتریهای باسیلوس به عنوان پروبیوتیک بر رشد،بازماندگی و تغییرات آنزیم های گوارشی مراحل لاروی میگوی سفید هندی *Penaeus inidicus*، پایان نامه کارشناسی ارشد، دانشگاه تهران دانشکد منابع طبیعی ص ۱۸۸
- طبرستانی، مجتبی،۱۳۹۰،خونشناسی پزشکی، سازمان چاپ و نشر مشهد،ص ۱۴۳، ص ۹۵۰.

- عسگریان، ف.، ۱۳۸۶، اثرات کاربرد پروبایوتیک بر روند رشد، بقاء و روند رشد دستگاه گوارش در فیل ماهی *Huso huso* و تاس ماهی ایرانی *Acipenser persicus*، پایان نامه کارشناسی ارشد، دانشگاه آزاد اسلامی واحد علوم تحقیقات، ص ۱۲- ۶ و ۱۸۳- ۱۶۷
- عمادی، ح.، ۱۳۸۴ تکنولوژی فراورده های دریایی (اصول نگهداری و عمل آوری)، انتشارات مؤلف، ص ۳۸- ۳۱
- فاضلی، ز.، ۱۳۸۴، غنی سازی گونه آرتمیا ارومیانا با پروبیوتیک مخمری (تپاکس) و بررسی پایداری آرتمیا غنی سازی شده در دوره های مختلف غنی سازی و انکوباسیون سرد، پایان نامه کارشناسی ارشد، دانشگاه آزاد اسلامی واحد علوم وتحقیقات، ص ۱۸۳
- فقانی، ا.، ۱۳۸۵، کپسوله کردن مخمر ساکارومیسس سرویزیه، پایان نامه کارشناسی ارشد، دانشگاه آزاد اسلامی واحد علوم و تحقیقات.
- فقانی، ط.، ۱۳۸۵، اثر ارگوسان و واکسن بر فاکتورهای رشد، بازماندگی، تحریک سیستم ایمنی و رویارویی با باکتری استرپتوکوک در قزل آلای رنگین کمان،ص ۱۱۱.
- فولر، ر.، ترجمه افشار مازندران، ن.، رجب، ا.، ۱۳۸۰، پروبیوتیکها و کاربرد آنها در تغذیه دام و طیور، انتشارات نوربخش، ص ۳۹۰- ۳۵۴.
- قشقایی، ر.، لایق، م.، ۱۳۸۳، پروبیوتیکها تکنولوژی نوین در آبزی پروری، انتشارات نقش مهر.ص ۲۵- ۳.
- کامکار، م.، ۱۳۹۰، بزرسی تاثیر باسیلوس سوبتیلیس به عنوان پروبیوتیک در کنترل استرپتوکوکوزیس در ماهی قزل آلای رنگین کمان، پایان نامه کارشناسی ارشد،دانشگاه تنکابن، ص ۸۷.
- محمدی آذری،ح.، ۱۳۴۸، تأثیر پروبیوتیک پروتکسین بر رشد و زنده مانی مرحله لاروی قزل آلای رنگین کمان، پایان نامه کارشناسی ارشد،دانشگاه تربیت مدرس، ص ۱۱۰.
- مظلومی، م.، ۱۳۸۲، استرپتوکوکوزیس، آنتروکوکوز، بیماری های مهم اقتصادی در پرورش ماهی، انتشارات نوید، ص۹۴.
- وثوقی، غ.، مستجیر،ب.، ۱۳۷۶، ماهیان آب شیرین، انتشارات دانشگاه تهران، ص ۳۱۷- ۴.
- وحیدی، م.، ۱۳۷۸، بررسی تکثیر و پرورش کپور ماهیان، پایان نامه کارشناسی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد تهران شمال، ص ۲۰

- Abbas, A.K., Licht, A.H., Pober, J.S., 2000,Cellular and Molcular immunology.W.B.Sounders,U.S.A.,p:545.
- Abbas, A.K., Licht, A.H., Pober, J.S., 2009,Cellular and Molcularimmunology. W.B. Sounders, U.S.A., p: 545.
- Agnew ,W.and Barnes,A.c,.(2007). Sterptococos iniae: An aquatic pathogen of global veterinary significans and challenging candidate for reliable vaccination. Journal of Microbiology ,122,1-15
- Al-Dohail, M., Ismael, N.E.M., 2011, Evaluation of commertial live baker's yeast, Saccharomyces cerevisiae as a growth and immunity promoter for Fry Nile tilapia Oreochromis niloticus challenged in situ with Aeromonas htdrophila. Aquaculture. 280, pp:185-189.

- Amar, C.F., Kiron, V., Satoh, S., Okamoto, N., Watabane, T., 2009, Effect of dietary β- caroten on theimmune response of rainbow trout Oncorhynchus mykiss. Fish. Sci. 66, pp: 1068-1075.
- Austin, B., Austin, D.A., 1987, Bacterial Fish Pathogens: Desease in Farmed and Wild Fish .Ellis Horwood, Chichester. UK., p: 364.
- Austin, B., Day, J.G., 1990, Inhibition of prown pathogenic Vibrio spp. By a commercial spray-dried preparation of Tetraselmeis ecica. Aquaculture. 90, pp: 389-392
- Austin, B., Day, J.G., 1993, Inhibition of prown pathogenic Vibrio spp. By a commercial spray-dried preparation of Tetraselmeis ecica. Aquaculture. 90, pp: 389-392
- Bagheri, T., Alizadeh, M., Yavari, V., Farzanfar, A., Hedayati, A., 2007, Proceeding of international training cours and work shop on fish nutrition and disease. Islamic Azad university, Ghaemshahr branch. P:30.
- Bagheri, T., Alizadeh, M., Yavari, V., Farzanfar, A., Hedayati, A.,(2008). Growth, survival and Gut microbial load of rainbow trout (Oncorhynchus mykiss), Fry Given diet supplemented with probotic during the two mounts of first feeding. Fisheries and Aqutic Sciences,8,43-48
- Barnes, T.D., 2007, Beta glucan as a biological defense modulayor. PP:1-6.
- Baya, J., Blankeship, L., Cox, N., 1990, Effect of fructooligos a ccharide on salmonella colonization of the chicken intestine. Poult Sci. 70, pp: 2433-2438.
- Brunt,J.,Newaj-Fyzul,A. and Austin ,B.,(2007). The development of probiotics for the control of multiple bacterial diseases of rainbow trout, Oncorhynchus mykiss (Walbaum).Fish diseases,30,573-579
- BruntB. and Austin,B.,(2005). Use of probiotic to control lactoccosis and streptoccoccosis in rainbow trout , Oncorhynchus mysis (Walbaum) . Fish dieseas , 28,693-701
- Burr, G., Gatlin, D.,Ricke, S.,2005, Microbial ecology of the gastrointestinal tract of fish and the potential application of prebiotics and probiotics hn fin fish aquaculture. J world. Aquacalture. Soc. 36, pp: 425-436.
- Chang, C.I., Liu, W.Y., 2002, An evaluation of tow probiotic bacterial strain, Enterococcus faecium and Bacillus toyoi, for reducingedwardsiellosis in cultured eel, Anguella anguella. European Journal of Fish Disease. 25, pp:311-315.Cahill, M.M. 1990. Bacterial flora of fishes: A review. Microbial Ecology. 19, 1, 21-41.
- Colorni, A., Diamant, D., Eldar, A., Kvitt, H., Zlotkin, A., 2002, Streptococcus iniae infection in red sea cage culture and wild fishes. Dis. Aquat.Org.49, pp: 165-170.
- Douillet, P.A., Longdon, C.J., 1994, Use of a probiotic for the culture of pacific oyster (Crassostera gigas). Aquaculture. 199, pp: 25-40.
- Elder, A.,1999, Lactococcus garvieae and Streptococus iniae infections in rainbow trout(Oncorhynchus mykiss).pp:227-231
- Evans, A.E., Lysozyme assaye. In: stolen., J.S., Fletcher, T., Anderson, D.P., Roberson, B.S., W.B., editors, 2000, Techniques in fish immunology. Fair Haven, NJ: SOS Publication, pp: 101-103.
- Floyd M.D., Sims, D.E., Burka, G.F., Mustafa, A., Ross, N.W., 2002, Skin morphology and humoral non-specific defence parameters of mucus and plasma in rainbow trout, coho and atlantic salmon. Comp. Biochem. Physiol. 132(A), pp: 645-657.
- Fuller, R,. Turvy, A., 1971, Bacteria associated with the intestinal wall of the Fowl (Gallusdomesticus). Journal of Applied Bacteriology. 34, pp: 617-622.8.
- Fuller, R., 1992, History and development of probiotics. In: Fuller, R.(Ed)., Probiotics: The Scientific Basis. Chapman & Hall, New York, pp: 1-8.
- Fuller, R., 1999, A review, probiotic in man and animals. Journal of Applied Bacteriology. 66, pp:365-378.
- Gatesoup,F.J., Ringo, E., 1994, Lactic acid bacteria in fish: a review Aguaculture culture. 160, pp 177-203
- Gatesoupe, F.J., 1991,sidecrophore production and probiotics effect of vibrio sp . associated with rurbor larvae, Scophthalmus mazimus. Aquatic Living Resources.10,pp:239-246.
- Gatesupe, F.J., 1994, Laecic acid bacteria inctease the resistance of turbot larvae , Scophthalmlls maximus against pathogenic vibrio.Aquatic Lillillg Resourse. 7, pp: 277-282.
- Gatlin, D.M., 2006, Nutrition and Fish health, In: Halver, J.E., Hardy, R.W.,(Eds), Fish Nutrition., Academic press, Sandig. California.USA., pp: 671-702.
- Gatsupe, F.J., 1999, The use of probiotics in aquaculture. Aquaculture. 180, pp:147-165.
- Gild berg, A., Mikkelsen, H., sandaker, E., Ringo, E., 1997, Probiotic effect of Lactic acid bacteria in the feed on growth and survival of fry of Atlantic Cod (Gadus morhua). Hydbiologia. 325, pp: 279-285
- Gomez-Gill, B., Rougue, A., Turnbull, I.F., 2000, The use and selection of probiotic bacteri for use in the culture of larva aquatic organisms. Aquaculture. 298, pp:229-230
- Gopalakannan, A., 2011, Inhibitory activity of probiotic Enterococcus faecium MC13 against Aeromonas hydrophila confers protection against hemorrhagic septicemia in comon carp (Cyprinus carpio).pp:71-78

- Gram, l., lovold, T., Nielsen, J., Melchiorsen, J., Spanggaard, B., 2001, In vitro antagonism of the probiont pseudomans fluorescens strain AH_2 against Aeromonas salmonicida does not confer protection of salmon against furunculosis .Aguaculture, 199, pp: 1-11
- Gram, L., Melchiorsen. j,. Spanggaard. B., Huber, I., Nielsen, T.F., 1999, In hibition of vibrio anguillarum by pseudomonas flurescens AH_2, a possible and Environmental Microbiology. 65, pp:965-973
- Hagi, T., Tanaka, D., Twamura, y., Hoshino, T., 2004, Diversity and seasonal changes in lactic acid bocteria in the intestinal tract of cultured freshwafer fish.Aquaculture. 234, pp: 335- 346
- Harzevili, A.R.S., VaeDuffel, H., Dherf, P., Swings, j., sorgeloos , p., 1999 , Use of a potential probiotic lactococcus lactis AR21 strain for the enhancement of growth in the rotifer Brachionus placatilis (muller). Aqua culture Research. 29, pp: 411-417
- Hirata, H., Murata, O., Yamada, s., T Shitani, H., Wachi, m., 1998, Probiotic culture of the rotiter Branchionus platicatilis. Hydrobiologia. 387/388, pp: 495–498.
- Hobbs, T., Tanaka, D., Twamura, y., Hoshino, T., 2005, Diversity and seasonal changes in lactic acid bocteria in the intestinal tract of cultured freshwafer fish.Aquaculture. 234,
- Irianto, A., Austin, B., 2002, Probiotics in aquaculture. Journal of Fish Diseases. 25, pp: 633 – 642.
- Jafarian, H., Makhtomii, M., Mahdavii, M ., Shahii, G., 2007, The effect of Saccharomyces cerevisae for beter utilize of nutrient composition sturgeon. Internattional Training course & workshop Fish Notrition & Diseases. pp: 39.
- Joborn, A., Olsson, J.C., Westerdahl. A., Conway, P.L., Kjellebery, S., 1997, Colonization in the fish intestinal tract and production of inhibitory substances in intestinal mucus and faecal eatrac ts by carnobacterium sp. k1. Joral of Fish Diseases. 20, pp: 383-392.
- Johnson, A.M., Rohlfs, E.M., Silverman, L.M., 1999, In: Burtis, C.A., Ashwood, E.K., es itrs. Tietz taxtbook of clinical chemistry 3 ed Philadelphia: W.B. Saunders company. pp: 12-507
- Jonsson, W., Conway, P., 1999. Probiotics for pigs. In: fuller, R., (Ed) Probiotics. The Scientific Basis. Chapman & Hall, Landon. pp: 256-316.
- Kissil, G.Wm,. Lupatsch,. I. Elizur, A., Zohar, Y., 2001, Long photoperiod delayed spawing and increased samotic growth in gilthed seabream (sparus aurata). Aquacalture. 200, pp: 363-379
- Klesius,P.,Evans,J.,Shoemaker,C.,Yeha,H., Goodwin, A.E. and Thompson , K.,(2006).Rapid decetion and Identification of Stretococcus iniae using a monoclonal anitibody-based indirect fluorescent anitibady technique. Aquaculture,258,180-186
- klin, Z., 1972, Biochem. 10, pp: 182
- Kozasa, M., 1986, Toycerin Bacillus toyoi as growth promoter for animal feeding. Micro boil. Aliment. Nutr. 4, pp: 121- 135
- Kusoda, M., 1976, Toycerin Bacillus toyoi as growth promoter for animal feeding. Micro boil. Aliment. Nutr. 4, pp: 121- 135
- Labor, T., 1996, In Clinical Laboratory Diagnistics, use and assessment of Clinical Laboratory Rosults, edition, pp: 696
- Lau, R.T., 2003, Feed deprivation increases resistance of channel catfish to bacterial infection. Aquuac. Mag.6, pp: 65-67
- Lovell, R.T., 1996, Feed deprivation increases resistance of channel catfish to bacterial infection.Aquuac. Mag.6, pp: 65-67
- Mathews, E.S., Warinner, J.E., Weeks, B.A., 1990. Assay of immune function in fish macrophages. In: Stolen, J.S., Fletcher, T.C., Anderson, D.P., Roberson, B.S., van Muiswinkel, W.B. (Eds.), Techniques in Fish Immunology, vol.2. SOS publications, pp. 155-163.
- Mesalhy Aly, S. Mohamed, M.F, and John, G. 2008. Effect of probiotics on the survival, growth and challenge infection in Tilapia nilotica (Oreochromis niloticus), Aquaculture Research, 39, 647-656.
- Moriary, D.J.W, 1999, Diseases contvol in shrimp aquaculture with probiotic bacteria. In: Microbial Biosystem: New Fron tiers- Proceeding of the 8 th Internatianal symposium on Microbial Ecology Atlantic Canada Society for Microbial Ecology, Halifaa , canada.
- Mouguin, S., Novel, G., 1994, Characterization of lactic acid Bactria isolated from sea. . 76, pp: 616-625
- Nayak, S., 2010, Probiotics and immunity: A fish perspective. Fish and shellfish Immunology, pp:21-32
- Nikoskelainen. S., Ouwehand, A., Bylund, G., Salminen, S., Lilius, E.M., 2003, Immune enhancement in rainbow trout (Oncoehinchus mykiss) by potential probioticbacteria(Lactobacillus rhamrosus) fish and shellfish immunology, 15, pp: 443-452.
- Nolan, D.T., Veld, R.l.J.M., Balm, P.H.M., Bonga, S.E, 1999, Ambient salinity modulates the response of the tilapia, Orechromis mossambicus, to net confinement. Aquaculture. 177, pp: 297–309.

- Ojolick E.J., Cusack, R., Benfey, T.J. Kerr, S.R., 1995, Survival and growth of all- female diploid and triploid rainbow trout (Oncorhyrchus mykiss) reared of chronic high temperature. Aquacultre. 131, pp: 177-187
- Panigrahi, A., Kiron, V., Puahqkaew., J., Kabayashi, T., Satoh, S., Sugita, H., 2005, The viability of probiotic bacteria as a factor influencing the immune response in rainbow trout Oncorhynchus mykiss. Aquaculture. 243, pp:241-254
- Parker, R.B., 1974, probiotics , the other half of the antimicrobial story. Anim. Nutr. Health. 29,. pp: 4-8.
- Pollock, R.A., Findlay,L ., Mandschein, W., Modesto, R.R., 2002, Laboratory exerecises in Microbiology. John wiley & sons, INC. pp: 232.
- Received: 9 May 2002 Accepted: 10 August, 2002
- Ringo, E., Gatesoupe, F.J., 1998, Lactic acid bacteria in fish:a review.Aquaculture. 160, PP: 177-203
- Ringo, E., Olsen, R.E., Overli, O., Lovik, F., 1997, Effect of dominance hierarchy formation on aerobic microbiota associated with the epithelial mucosa of subordinate and dominant individuals of Arctic charr, salvelinus alpinus. Aquaculture. 28, pp: 901-904
- Roach, S., Tannock, G.W., 1980, Indigenous bacteria that influence the number of salmonellatyphimurium in the spleen of intravenously challeny mice. Canadian Journal of Microbiology. 26,pp:408-411
- Roach,G.C.M.,Levent,P.N.and Lavoie,M.C.,(2006).Identification of streptococcus iniae by commertial bactrria identification systems Jornul of microbiological methods,67,20-26
- Robertson, P.A.W., Dowd, C., Burrells, C., William, P., Austfin, B., 2000, Use of Carnobacterium Sp. as a probiotic for Atlantic salmon (Salmo salar)and rainbow trout (Oncorhynchus) Aquaculture. 185, pp: 235-243
- Rodas, B.A., Angulo, J.O., Cruz, J., Garcia, H.S., 2002, Proparatian of probiotic buttermilk with Lactobacillus reuteri. Milchwissenschoff Milk Sclence International. 57,pp: 26-28
- Roy, P., 2010, Streptococal Infections of fish. Institute of Food and Agricultural Sciences, pp:1-5Russo, R.J., 2006, Fish pathology.Sounders. London. pp: 472.. 91
- Salinas,I.,Cuesta,A,Esteban,M.A., and mesegure,J.(2005).Dietary administration of Lactobasilusdelbrrieckii and Bacillusbstilis , single or combint, on gilthead seabream cellular immune responses.Fish and Shelfish Immunology , 19,67-77
- Salminen, S., Ouwehand, A., Benno, Y., Lee, Y.K., 1999, Probiotics:how should they be defined.Trends in Food Science Technology. 10, pp: 107-110.
- Samaei MR, Mortazavi SB.(2013). ISOLATION, GENETIC IDENTIFICATION, AND DEGRADATION CHARACTERISTICS OF N-HEXADECANE DEGRADING BACTERIA FROM TROPICAL AREAS IN IRAN.22(4):1304-12.
- Scapigliati, G., Romano, N.,Bulocore, F., Picchietti, S., Baldassini, M.R., Prugboly, D., Galia, A., Meloni, S., Secombes, X.J., Mazzini, M., Abelli, L., 2002, The immune system of seabass, DicetrarchusLabrax, reared in aquacultyre. Developmenfal and Comparative Immunology. 26, pp: 151-160
- Sealy, W.M., Gatlin, D.M., 2001, Overview of nutritional strategies affecting the health of marine fish. In:Lim, C., Webster,C.D., (Ed). Nutrition and Fish health.Howorth press,Binghomton,U S A., pp:103-112
- Shaofeng, L., Rombaut, G., Sorgelloos, P., Verstraete,W., 2010, Probiotic bacteria as biological and molecular biology reviws.Aquaculture. 84, pp: 651-655.
- Shahsavani, D., Mohri, M., Gholipour Kanani, H. 2010. Determination of normal values of some blood serum enzymes in Acipenser stellatus Pallas. Fish. Physiol. Biochem.36: 39–43
- Sharp, M.E., 1981, The genus lactobacillus. In: Storr, M.P., Stolp, H., Truper, H.G., (Eds). The Prokaryotes. A Hand Book on Habitat,Isolation and Identification of Bacferia, Vol.I. Springer,Berlin. pp: 1653-1679.
- Shelby, A.R., Lim, C.,Yildiri, M., Delaneg, M.A., 2006, Effect of probiotic diet Supplemerts on Disease resistance and immune response of young Nile tilapia, Oreochromis niloticus.Aquaculture. 18, pp: 23-24.
- Smith, P., Davey, S., 1993, Evidence for the competitive exclusion of Aeromonas salmonicida fom fish with stress inducible furunculosis by a fluorescentpseudomonas. Jourhal of Fish Diseases. 16 pp:521-524
- Smorgieewicz, W., Bielecka, M., Babuchowski, A., Boutard, A., Dubeau, H., 1993, Les probiotigues. Canadian Journal of Microbiology. 39,pp: 1089-1095
- Son, F.J., Fitzyeraid, G.F., Stanton, C., Ross, R.P., 2009, The evaluation of a mupiricin,based selective Medium for the enumeration for bifidobacteri from probiotic animal food. pp: 22-890.
- Sugita, H., Hirose, Y., Matsuo, N., Deguchi, Y., 1998, Production of the antibacterial substance by Bacillus sp.Strain NM12,an intestinal bacterium of Japanese coastal fish.Aquaculture. 168, pp: 269-280.
- Taoka, Y., Muroga, K., Nippon, S.G., 2006, Intestistinal microflora of rock fish tiger puffer,taki fuga rubripes and grouper Epinephlus skarat their larval and juvenile staye. Pp: 55-65

- Tovar-Rami reza, D., Zambiano, J., Cahub, C., Gatesoupeb, F,J., 2004, Influenc of dietary Live yeast on European sea bass (Dicentrarchus Labroa)Larve develoment. Aguaculture. 234, pp: 415-427
- Vadstein, O., 1997, The use of immunostimulation in marine larvicular: possibilities and challenges. Aquaculture. 155,pp: 401-417
- Vendrell,D,Balcazar,J.,Blas,I.,Ruiz-Zarzuela.,J.,(2008).Protection of rainbow trut (Oncorhynchus mykiss) from lactococosis by probiotic bacterial. FISH and SHELLFISH Immunology,31,337-345.
- Verschuere, L., Rombaut, G., Sorgelloos, P., Verstraete,W., 2000, Probiotic bacteria as biological and molecular biology reviws.Aquaculture. 84, pp: 651-655.
- Wang, X.H., Ji. W. S., Xu, H.S., 1999, Application of Probiotic in AqnawltllreAiken Murray Corp. (Internet)
- Weil, L.S.,Barry, T.P., Malison, J. A., 2001, Fast growth in rainbow trout is corrected whit arapid decrease in post-stress cortisol concentration. Aquaculture. 139, pp: 373-380.
- Whicher, J., 1996, Complement Component C Foundation for Blood Research 10, pp: 1-7
- Xu., Z., Tian, Z., 2009, Production of the antibacterial substance by Bacillus sp.Strain NM12,an intestinal bacterium of Japanese coastal fish.Aquaculture. 168, pp: 269-280
- Yousefian, M., 2010, Evaluation of aqualase as Proiotic on Wild Carp (Cyprinius Carpio) Growth, Immunity Characteristics and Resistance to Streptococosis, Research Journal of Fisheries and Hydrobiology, 5(2): 173-178

Abstract:

This study was conducted for the first time and the effects of probiotic bacteria isolated from the gut of Rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). In the first step, after the purification of the isolated bacteria, probiotic properties in vitro was assessed with injection to healthy fish and challenge with three species of pathogenic bacteria in culture media. The second phase of the bacteria isolated in 5 treatments (log 7, 8 and 9 of the lactic bacteria (LAB), Vibrio sp and Pseudomonas sp) and a control treatment on growth and survival, hematological parameters (RBC and WBC cells), immunology and physiology parameters tested during the 60 days of the above parameters after 30 and 60 days and finally at the end, the final assessment was Streptococcosis resistance in fish. The results showed that the isolated bacteria were able to enhance the growth parameters (weight, feed conversion, feed fat, protein efficiency ratio and specific growth rate) and survival. The results showed that log 8 LAB was significant difference with other treatments and control. When using log 8 LAB and Vibrio, the MCV, MCH and MCHC were decreased with no significant difference. The log 8 has the greatest effect on the amount of liver enzyme (AST), IgM and complement component C3, and had significant difference with other treatments. The challenge examination to Streptococcus iniae showed the highest survival in treatments with log 8 (96.66%), and Vibrio (93.33%) and then subjected to other treatments and control are also the least survival (25.38%). The conclusion of that study is the first probiotic properties of bacteria isolated from trout to changes in quality indicators are in particular the LAB bacteria and the second log 8 of LAB had significant positive of changes development and safety, and the fish are resistanted against Streptococcosis.

Key words: LAB, Rainbow trout, Growth performances, Immune systems, Streptococcosis

Ministry of Jihad – e – Agriculture
AGRICULTURAL RESEARCH, EDUCATION & EXTENSION ORGANIZATION
IRANIAN FISHERIES SCIENCE RESEARCH INSTITUTE – Caspian Sea Ecology Research Center

---

Project Title : Production of bacterial probiotic from trout (*Oncorhynchus mykiss*) for improvment of immune system and challenge to streptococcusis Apprpved
Number: 4-76-12-89007
Author: Reza Safari
Project Researcher : Reza Safari
Collaborator(s) : H. Nasrolahzadeh, A.A. Saeidi, M.V. Farabi, A. Mokarami, Z. Yaghobzadeh, H. Molaei, F., Vahedi, A., Zahedi, A., Ghoroghi, F., Laloei, M. J. Taghavi, M., Ghiasi, M., Tahmasebi, Gh.R. Razeghian, M., Binaei, R. Pourgholam
Advisor(s): -
Supervisor: -
Location of execution : Mazandaran province
Date of Beginning : 2010
Years & 6 Months Period of execution : 2
Publisher : Iranian Fisheries Science Research Institute
Date of publishing : 2016

All Right Reserved . No Part of this Publication May be Reproduced or Transmitted without indicating the Original Reference

MINISTRY OF JIHAD - E - AGRICULTURE
AGRICULTURAL RESEARCH, EDUCATION & EXTENSION ORGANIZATION
IRANIAN FISHERIES RESEARCH ORGANIZATION - Caspian Sea Ecology Research Center

Title:

Production of bacterial probiotic from trout (*Oncorhynchus mykiss*) for improvment of immune system and challenge to streptococcusis

Executor:

Reza Safari

Registeration Number

48609