تأثیر *Bacillus subtilis* به عنوان پروبیوتیک بر فاکتورهای هماتولوژی و بیوشیمیایی خون ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان (*Oncorhynchus mykiss*) به دنبال عفونت تجربی با *Streptococcus iniae*

مریم کامگار*[1]، مسعود قانع[2]، رضا پورغلام[3]، مریم قیاسی[4]

۱و۲- دانشگاه آزاد اسلامی واحد تنکابن، گروه میکروبیولوژی، تنکابن، ایران، صندوق پستی: ۱۱۶۷-۴۶۸۴۱۶

۳ و ۴- پژوهشکده اکولوژی دریای خزر، ساری، ایران، صندوق پستی: ۹۶۱

تاریخ دریافت: ۲۹ فروردین ۱۳۹۱ تاریخ پذیرش: ۲۲ مرداد ۱۳۹۱

چکیده

در این تحقیق جهت کنترل Streptococcosis با عامل *Streptococcus iniae* در ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان از *Bacillus subtilis* استفاده گردید. به طوری که از ۲ گروه شامل کنترل و تیمار و سه تکرار برای هر گروه استفاده شد. درگروه کنترل، پروبیوتیک تجویز نشد اما در گروه تیمار، *Bacillus subtilis* با دوز 10^7 سلول به ازای هر گرم غذا تجویز گردید. در روز چهل و پنجم تزریق داخل صفاقی *Streptococcus iniae* با دوز 2×10^7 سلول در هر میلی لیتر به میزان ۰/۱ سی‌سی برای هر دو گروه انجام شد. سپس به مدت دو هفته ماهی ها تحت نظر گرفته شدند. در پایان ۶۰ روز، از هر تکرار ۵ نمونه خون جهت انجام آزمایشات هماتولوژی و بیوشیمیایی گرفته شد تا تأثیر *Bacillus subtilis* بر مقاومت ماهی در برابر عفونت ناشی از *Streptococcus iniae* بررسی گردد. تجزیه و تحلیل یافته‌ها نشان داد که پس از تزریق باکتری *Streptococcus iniae* به ماهی، گروه تیمار از تعداد کل گلبول‌های سفید، درصد لنفوسیت، میزان پروتئین تام سرم، آلبومین سرم، IgM و لیزوزیم بیشتر و درصد نوتروفیل کمتری نسبت به گروه کنترل برخوردار بودند ($P<0/05$).

کلمات کلیدی: قزل‌آلای رنگین‌کمان، پروبیوتیک، *Bacillus subtilis*، Streptococcosis ، فاکتورهای هماتولوژی و بیوشیمیایی.

* عهده دار مکاتبات (✉). maryam_kmr@yahoo.com

[Downloaded from aqudev.liau.ac.ir on 2024-10-12]

[DOR: 20.1001.1.23223545.1391.6.1.8.0]

مقدمه

از جمله بیماری‌های مهم در آبزی‌پروری، استرپتوکوکوزیس می‌باشد که یک بیماری عفونی سیستمیک در ماهیان آب‌های شور و شیرین است و در صورت وقوع می‌تواند خسارت‌های جبران ناپذیری را به صنعت پرورش ماهی وارد نماید. از جمله عوامل ایجادکننده Streptococcosis عبارتند از: *Streptococcus difficilis* که از ماهیان پرورشی در فلسطین اشغالی، *Streptococcus imilleri* که از کلیه ماهی کوی به همراه زخم‌های جلدی و *Streptococcus parauberis* که از ماهی توربوت پرورشی در شمال اسپانیا جدا شده‌اند (Austin and Austin, 2007). با این حال شایع‌ترین عامل Streptococcosis ، *S. iniae* است که اولین بار در سال ۱۹۷۲ از آبسه‌های زیر جلدی یک نمونه دلفین رودخانه آمازون که به یک عفونت تحت عنوان "*golf ball disease*" مبتلا بود جدا گردید. سایر کوکسی‌های گرم مثبت که بیماری مشابه ایجاد می‌نمایند شامل *Lactococcus garvieae* که از مارماهی مهاجر وگیش دم زرد در ژاپن، *Lactococcus piscium* و *Vagococcus salmoninarum* که از ماهیان قزل‌آلای رنگین کمان جدا شده‌اند می‌باشد (Austin and Austin, 2007). Streptococcosis به لحاظ ضایعات شدید و مرگ و میر بالا در جمعیت ماهیان به مهمترین بیماری باکتریایی مزارع پرورش ماهی تبدیل شده که با توجه به انتقال آن به انسان از اهمیت بهداشتی خاصی برخوردار است. لذا کنترل آن امری ضروری می‌باشد و در سال‌های اخیر جهت کنترل و درمان عفونت ناشی از *S. iniae* اقدامات زیادی صورت گرفته که از آن جمله می‌توان به استفاده از آنتی بیوتیک‌هایی چون *Oxytetracycline* ، *Furazolidone* ، *Erythromycin* و *Amoxicillin* اشاره کرد که پس از سال‌ها خود این داروها مشکلات عدیده‌ای از جمله مقاوم شدن عوامل بیماریزا، مسایل زیست محیطی و... را به وجود آورده‌اند. با توجه به این که آنتی‌بیوتیک‌ها به تعادل باکتری‌های موجود در روده آسیب وارد می‌کنند و اکثر باکتری‌های مفید را از بین برده و منجر به پیدایش باکتری‌های مقاوم به دارو می‌گردند و همچنین فقط ۲۰ تا ۳۰ درصد آنتی‌بیوتیک‌ها به وسیله ماهی هضم می‌شوند و بقیه وارد محیط زیست می‌شوند، لذا استفاده از پروبیوتیک‌ها به عنوان جایگزینی برای روش‌های سابق مطرح شده است که به نظر می‌رسد بسیاری از مشکلات را می‌تواند مرتفع سازد. استفاده از پروبیوتیک‌ها در واقع تکنولوژی جدید آبزی‌پروری همگام با محیط زیست به شمار می‌رود. با استفاده از این مواد هم می‌توان تولید را افزایش داد، هم کیفیت آب را اصلاح کرد و هم این که آن‌ها را به عنوان مبارزه بیولوژیک مدنظر قرار داد (حسینی‌فر و پورامینی، ۱۳۸۶). تأثیر پروبیوتیک‌ها در تغذیه، مقاومت در برابر بیماری‌ها و دیگر فعالیت‌های مفید به اثبات رسیده است که از جمله اثرات مفیدی که بر روی سلامتی دارند تأثیر بر روی سیستم ایمنی و تحریک سیستم ایمنی است. از جمله این پروبیوتیک‌ها می‌توان به گونه‌های *باسیلوس* اشاره کرد. گونه‌های *باسیلوس* کمتر از ۵۰ سال است که به عنوان پروبیوتیک مورد استفاده قرار می‌گیرند. از آن جایی که جنس *باسیلوس* در ارگانیسم‌های آبی به عنوان پاتوژن گزارش نشده (Brunt, *et al*., 2007) بنابراین در بعد وسیعی در آبزی‌پروری استفاده می‌شود و در این تحقیق اثر *Bacillus subtilis* بر فاکتورهای هماتولوژی و

[Downloaded from aqudev.liau.ac.ir on 2024-10-12]

[DOR: 20.1001.1.23223545.1391.6.1.8.0]

بیوشیمیایی خون ماهی قزل آلای رنگین کمان به دنبال عفونت تجربی با *S. iniae* بررسی گردید.

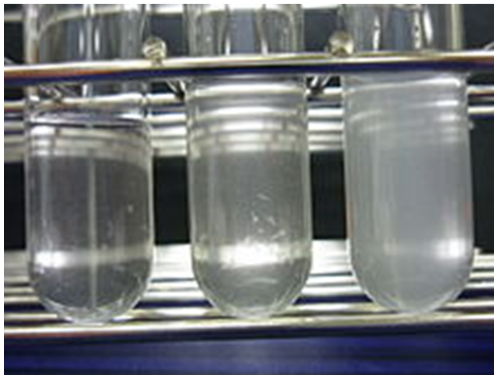
مواد و روش‌ها

این تحقیق در زمستان ۱۳۸۹ در یک مزرعه پرورش ماهی واقع در روستای چلک در ۱۰ کیلومتری شهرستان نوشهر انجام شد. جهت انجام کار از ۶ حوضچه فایبرگلاس به ابعاد ۰/۵×۲×۲ متر استفاده گردید. حجم آب هر حوضچه ۱/۲ متر مکعب بود که از آب چاه تأمین می‌گردید. نمونه‌های مورد استفاده، ماهی قزل‌آلای رنگین کمان با میانگین وزن اولیه ۶۰ گرم و به تعداد ۱۲۰ عدد بود که از ۲ گروه شامل کنترل و تیمار و سه تکرار برای هر گروه استفاده شد. به طوری که در هر حوضچه ۲۰ عدد ماهی رهاسازی و به مدت ۶۰ روز مورد بررسی قرار گرفت. با توجه به وزن ماهی که در ابتدا حدود ۶۰ گرم و همچنین دمای آب که ۱۴/۵ درجه سانتی‌گراد بود، غذا دهی روزانه به میزان ۲/۴ درصد وزن توده زنده در نظر گرفته شد که به صورت غذای خشک یا پلت در ۳ وعده مصرف می‌کردند (NRC, 1993). در گروه کنترل، پروبیوتیک تجویز نشد اما در گروه تیمار، روزانه *Bacillus subtilis* با دوز $۱۰^{۷}$ سلول به ازای هر گرم غذا تجویز شد (Newaj-Fyzul, *et al*., 2007). در این تحقیق از *Bacillus subtilis* PTCC 1720 که از سازمان پژوهش‌های علمی و صنعتی ایران به صورت آمپول لیوفیلیزه تهیه شده بود استفاده گردید. پس از خارج کردن باکتری از حالت لیوفیلیزه، بر روی محیط کشت بلادآگار کشت داده شد و برای تهیه سوسپانسیون باکتریایی جهت مخلوط کردن با غذا مورد استفاده قرار گرفت. سوسپانسیون باکتریایی با دوز ۱×۱۰^{۷} سلول در هر میلی‌لیتر به روش مک فارلند تهیه گردید (MacFarland, 2000). جهت آماده‌سازی *S. iniae* از ایزوله باکتری لیوفیلیزه استفاده شد. ایزوله مذکور قبلاً از ماهیان قزل‌آلای رنگین‌کمان جداسازی و شناسایی گردیده بود (سعیدی و همکاران، ۱۳۸۸). پس از خارج کردن باکتری از حالت لیوفیلیزه، به محیط کشت بلادآگار منتقل گردید و به مدت۲۰ تا ۲۴ ساعت در دمای ۲۸ درجه سانتی‌گراد قرار گرفت (Klesius, *et al*., 2006). سپس از پرگنه‌های رشد یافته سوسپانسیون باکتریایی با دوز ۲×۱۰^{۷} سلول در هر میلی‌لیتر به روش مک فارلند تهیه گردید (MacFarland, 2000). در روز چهل و پنجم پس از اتمام دوره قطع غذا به مدت ۴۸ ساعت و بیهوش کردن ماهی با تریکائین متان سولفانات، محل تزریق با اتانول ضدعفونی شد و سپس با سرنگ انسولین، ۰/۱ سی‌سی از سوسپانسیون باکتریایی با دوز۲×۱۰^{۷} سلول در هر میلی لیتر کشیده و از خط میانی شکمی به داخل محوطه شکمی تزریق شد (Brunt, *et al*., 2007). پس از آن به مدت دو هفته ماهی‌ها تحت نظر گرفته شدند و در این مدت علایم Streptococcosis شامل شنای نامتعادل، اگزوفتالمی، خونریزی و مرگ و میر شدید (اینگلیس و همکاران، ۱۳۷۶) مورد بررسی قرار گرفت و ماهیان بیمار پس از ضدعفونی کردن سطح شکمی با گاز استریل آغشته به الکل ۷۰ درجه، کالبد شکافی شدند و در شرایط آسپتیک از بافت‌های کلیه، کبد و مغز نمونه‌برداری و به محیط‌های کشت بلادآگار و تریپتیک سوی‌آگار منتقل گردیدند. پس از ۲۰ تا ۲۴ ساعت انکوباسیون در دمای ۲۸ درجه (Klesius, *et al*., 2006)، کلنی‌های ریز سفید همراه با همولیز بتا مشاهده گردید که بعد از رنگ‌آمیزی گرم، کوکسی‌های گرم مثبت که عمدتاً به

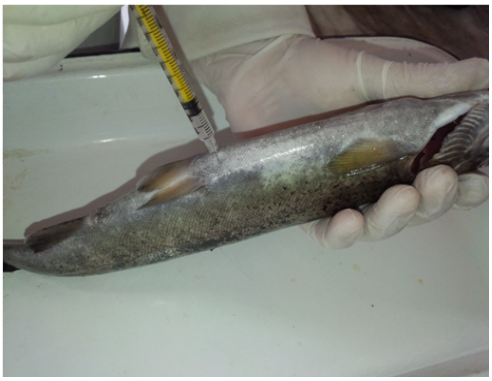
[Downloaded from aqudev.liau.ac.ir on 2024-10-12]

[DOR: 20.1001.1.23223545.1391.6.1.8.0]

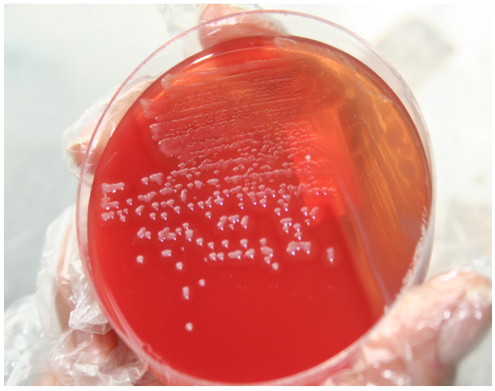
صورت زنجیرهای کوتاه بودند مشاهده شد که با انجام تست‌های بیوشیمیایی و مقایسه آن با باکتری تزریقی، وجود *S. iniae* قطعی شد.



شکل ۱: تهیه سوسپانسیون باکتریایی به روش مک فارلند



شکل ۲: تزریق داخل صفاقی *S. iniae*

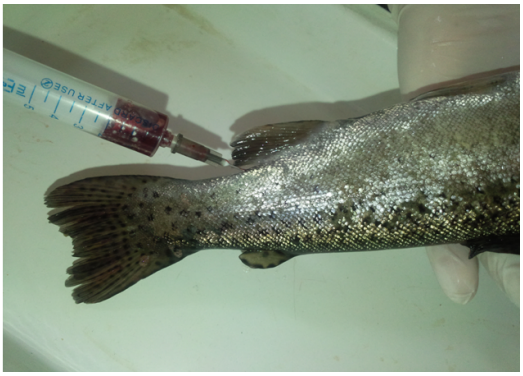


شکل ۳: کلنی *S. iniae* بر روی محیط کشت بلادآگار

شکل ۴: سلول‌های *S. iniae* در رنگ آمیزی گرم

پس از بیهوش کردن ماهی با ماده بیهوشی تریکائین متان سولفانات، ۳ سی‌سی خون با سرنگ از سیاهرگ ساقه دمی گرفته شد که ۰/۵ سی‌سی آن در لوله‌های اپندورف محتوی ۱۵ میکرولیتر ضد انعقاد هپارین (۱۰۰ واحد در میلی لیتر) (Larsen, 1964) و مابقی در لوله همولیز ریخته شد. از خون هپارینه جهت انجام آزمایشات هماتولوژی شامل: شمارش گلبول‌های سفید و قرمز، تعیین هموگلوبین و هماتوکریت، مشخصه‌های گلبول‌های قرمز از جمله متوسط حجم گلبول‌های قرمز، متوسط هموگلوبین گلبول‌های قرمز و متوسط غلظت هموگلوبین سلولی و شمارش افتراقی گلبول‌های سفید استفاده شد. از خون موجود در لوله همولیز هم پس ازجدا سازی سرم با سانتریفوژ با دور ۳۰۰۰ در دقیقه برای انجام آزمایشات بیوشیمیایی شامل آنزیم لیزوزیم، IgM، پروتئین تام و آلبومین استفاده گردید.

[Downloaded from aqudev.liau.ac.ir on 2024-10-12]
[DOR: 20.1001.1.23223545.1391.6.1.8.0]



شکل ۵: خونگیری از ساقه دمی ماهی

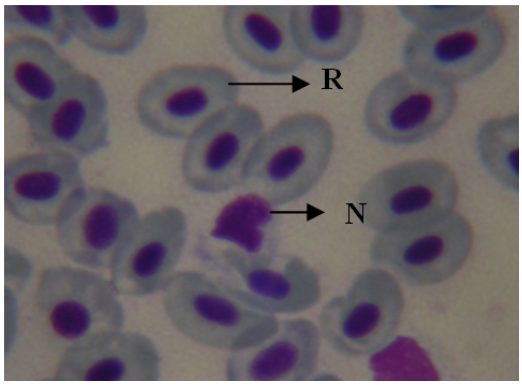
اندازه‌گیری هماتوکریت به روش میکرو-هماتوکریت با سانتریفوژ هماتوکریت با دور ۱۳۵۰۰ در دقیقه به مدت ۵ دقیقه و خط‌کش مخصوص هماتوکریت بر حسب درصد انجام شد (Goldenfarb, *et al*., 1971). میزان هموگلوبین به روش سیانومت هموگلوبین، با اسپکتروفتومتر در طول موج ۵۴۰ نانومتر بر حسب گرم در دسی‌لیتر تعیین شد (Larsen, 1964). برای شمارش گلبول‌های قرمز، خون به نسبت ۲۰۰ برابر با سرم فیزیولوژی در پیپت ملانژور قرمز رقیق شد و به وسیله لام هموسیتومتر در ۵ خانه مربوط به شمارش گلبول‌های قرمز شمارش گردید و در عدد ثابت ۱۰۰۰۰ ضرب و تعداد گلبول‌ها در واحد حجم تعیین شد (Leonard and Cormick, 2005). جهت شمارش گلبول‌های سفید، خون به نسبت ۲۰ برابر با محلول داسیس در پیپت ملانژور سفید رقیق شد و به وسیله لام هموسیتومتر در ۴ خانه مربوط به شمارش گلبول‌های سفید شمارش گردید و در عدد ثابت ۵۰ ضرب و تعداد گلبول‌ها در واحد حجم تعیین شد (Leonard and Cormick, 2005). مشخصه‌های گلبول‌های قرمز شامل میانگین حجم گلبول‌های قرمز (MCV)، میانگین هموگلوبین گلبول‌های قرمز (MCH) و میانگین غلظت هموگلوبین گلبول‌های قرمز (MCHC) با استفاده از روابط ریاضی تعیین شد (Benfey and Sutterlin, 1984). برای شمارش افتراقی گلبول‌های سفید پس از تهیه گسترش از خون، بلافاصله اسلاید در هوای آزمایشگاه خشک و با متانول فیکس گردید. سپس اسلاید با رنگ گیمسا با رقت یک دهم به مدت ۱۵ دقیقه رنگ‌آمیزی و با درشت نمایی ۱۰۰۰ میکرو-سکوپ، شمارش افتراقی و بررسی مرفولوژی گلبول‌ها انجام شد (Rosenfeld, 1947).

اندازه‌گیری میزان پروتئین تام و آلبومین سرم بر حسب گرم در دسی لیتر به وسیله دستگاه بیوشیمی اتوآنالایزر (هیتاچی- ژاپن) و با استفاده از کیت آزمایشگاهی پارس آزمون به روش فتومتریک انجام شد. IgM سرم بر حسب میلی‌گرم در دسی‌لیتر به وسیله دستگاه نفلومتری Minineph (Binding site– انگلستان) و با استفاده از کیت آزمایشگاهی Binding site به روش نفلومتری اندازه‌گیری گردید. سنجش میزان لیزوزیم در نمونه‌های سرم بر اساس روش توصیه شده توسط Ellis در سال ۱۹۹۰ (Ellis Anthony, 1990) صورت گرفت.

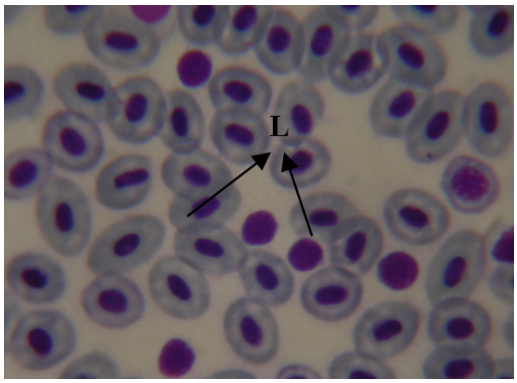
اطلاعات جمع‌آوری شده از بررسی‌ها و مطالعات میدانی و آزمایشگاهی با استفاده از نرم‌افزار SPSS مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفتند. برای آنالیز داده‌ها از آنالیز واریانس یک طرفه Anova و آزمون مقایسه میانگین Duncan استفاده شد و در نهایت یافته‌ها به صورت S.E ± میانگین گزارش گردید.

[Downloaded from aqudev.liau.ac.ir on 2024-10-12]

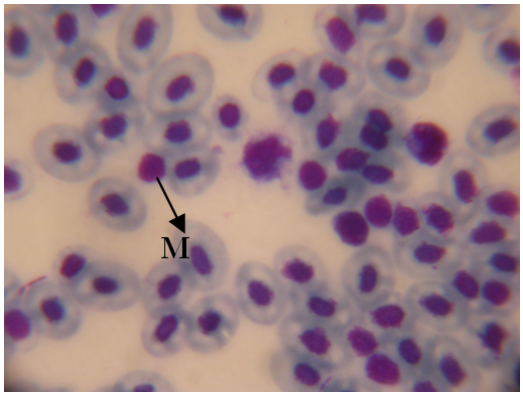
[DOR: 20.1001.1.23223545.1391.6.1.8.0]



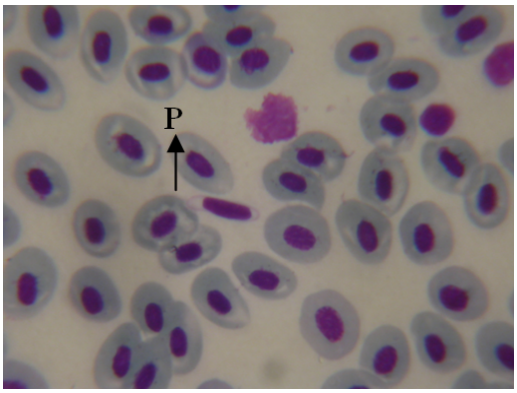
شکل ۶: سلول نوتروفیل و گلبول‌های قرمز بزرگنمایی ۱۰۰ ×



شکل ۷: سلول‌های لنفوسیت بزرگنمایی ۱۰۰ ×



شکل ۸: سلول منوسیت بزرگنمایی ۱۰۰ ×



شکل ۹: سلول پلاکت بزرگنمایی ۱۰۰ ×

نتایج

پس از تجویز خوراکی *Bacillus subtilis* به مدت ۴۵ روز و سپس تزریق باکتری *S. iniae* به ماهیان گروه تیمار و کنترل مشاهده گردید که علائم بالینی پس از ۳ تا ۴ روز ظاهر شد. علائم شامل شنای عمودی، تیره شدن رنگ بدن، بیرون زدگی چشم یک طرفه یا دو طرفه، کدورت قرنیه، خونریزی روی سرپوش آبششی و قاعده باله‌ها و زخم سطحی بدن بودند (اینگلیس و همکاران، ۱۳۷۶). در طول ۱۴ روز، میزان تلفات در گروه کنترل که پروبیوتیک دریافت نکرده بودند ۵۴ تا ۶۰ درصد در حالی که در گروه تیمار ۲۵ تا ۳۱ درصد بود.

[Downloaded from aqudev.liau.ac.ir on 2024-10-12]

[DOR: 20.1001.1.23223545.1391.6.1.8.0]

جدول ۱: میانگین فاکتورهای هماتولوژی ماهی قزل‌آلا پس از تزریق باکتری *S. iniae* در دو گروه کنترل و تیمار

فاکتورهای هماتولوژی	کنترل	تیمار
تعداد گلبول‌های قرمز($۱۰^{۶}$× /تعداد در میلی متر مکعب)	۰/۴۸ ± ۰/۰۵[b]	۰/۵۶ ± ۰/۰۶[b]
هماتوکریت (درصد)	۲۴/۹۰ ± ۲/۵۵[b]	۲۵/۸۳ ± ۲/۲۵[b]
هموگلوبین (گرم در دسی لیتر)	۴/۱۰ ± ۰/۴۱[b]	۴/۳۷ ± ۰/۴۴[b]
میانگین حجم گلبول‌های قرمز (فمتولیتر)	۵۳۹/۱۶ ± ۳۰/۹۹[a]	۴۸۰/۰۶ ± ۲۴/۱۲[a]
میانگین هموگلوبین گلبول‌های قرمز (پیکوگرم)	۸۹/۷۵ ± ۵/۹۱[a]	۷۹/۵۱ ± ۳/۷۵[ab]
میانگین غلظت هموگلوبین گلبول‌های قرمز(گرم در دسی‌لیتر)	۱۶/۶۱ ± ۰/۳۴[b]	۱۶/۶۶ ± ۰/۳۹[b]
تعداد گلبول‌های سفید ($۱۰^{۳}$×/ تعداد در میلی متر مکعب)	۱۶/۳۶۷ ± ۲/۱۰[b]	۳۶/۸۶۷ ± ۴/۲۲[a]
لنفوسیت (درصد)	۹۱/۹۳ ± ۱/۲۸[b]	۹۵/۳ ± ۰/۹۸[a]
نوتروفیل (درصد)	۷/۴۷ ± ۱/۱۸[a]	۴/۰۷ ± ۰/۹۲[b]
منوسیت (درصد)	۰/۶۰ ± ۰/۱۹[a]	۰/۴۰ ± ۰/۱۳[ab]

با توجه به مقادیر مندرج در جدول ۱، میزان هماتوکریت، هموگلوبین و تعداد گلبول‌های قرمز در گروه تیمار که پروبیوتیک دریافت کرده بودند از لحاظ عددی بیشتر از گروه کنترل بود لیکن از لحاظ آماری اختلاف معنی‌دار مشاهده نشد (P>۰/۰۵). میزان متوسط حجم گلبول‌های قرمز و متوسط هموگلوبین گلبول‌های قرمز اگرچه در گروه تیمار از لحاظ عددی کمتر از گروه کنترل بود اما از لحاظ آماری اختلاف معنی‌دار نداشت (P>۰/۰۵). بین متوسط غلظت هموگلوبین سلولی دو گروه تیمار و کنترل اختلافی مشاهده نشد. تعداد گلبول‌های سفید در گروه دریافت کننده پروبیوتیک بیشتر از گروه کنترل بود و از لحاظ آماری هم این اختلاف معنی‌دار بود (P<۰/۰۵). نتایج حاصل از شمارش افتراقی گلبول‌های سفید نشان داد که بعد از تزریق باکتری در هر دو گروه بیشترین درصد انواع گلبول‌های سفید به ترتیب مربوط به لنفوسیت، نوتروفیل و منوسیت بود به طوری که درصد لنفوسیت درگروه دریافت کننده پروبیوتیک بیشتر از گروه کنترل بود و از لحاظ آماری هم این اختلاف معنی‌دار بود (P<۰/۰۵). در بررسی درصد نوتروفیل مشاهده گردید که در گروه کنترل بیشتر از گروه دریافت کننده پروبیوتیک بود و از لحاظ آماری هم این اختلاف معنی‌دار بود (P<۰/۰۵). ضمناً میزان منوسیت در گروه تیمار از لحاظ عددی کمتر از گروه کنترل بود لیکن از لحاظ آماری اختلاف معنی‌دار مشاهده نشد (P>۰/۰۵).

[Downloaded from aqudev.liau.ac.ir on 2024-10-12]

[DOR: 20.1001.1.23223545.1391.6.1.8.0]

جدول ۲: میانگین فاکتورهای بیوشیمیایی ماهی قزل آلا پس از تزریق باکتری *S. iniae* در دو گروه کنترل و تیمار

فاکتورهای بیوشیمیایی	کنترل	تیمار
پروتئین تام(گرم در دسی لیتر)	۲/۵۵ ± ۰/۲۰[b]	۳/۳۱ ± ۰/۲۲[a]
آلبومین (گرم در دسی لیتر)	۱/۵۵ ± ۱/۱۰[b]	۱/۹۲ ± ۰/۰۳[a]
IgM (میلی‌گرم در دسی لیتر)	۲۲/۷۸ ± ۲/۱۸[b]	۳۸/۰۵ ± ۴/۵۷[a]
لیزوزیم (میلی‌گرم در میلی لیتر)	۱/۷۲ ± ۰/۲۶[b]	۲/۹۲ ± ۰/۳۱[a]

با توجه به مقادیر مندرج در جدول ۲، میزان پروتئین تام، آلبومین، IgM و لیزوزیم در گروه دریافت کننده پروبیوتیک بیشتر از گروه کنترل بود و از لحاظ آماری هم این اختلاف معنی دار بود (P<۰/۰۵).

بحث

با توجه به وجود شرایط مطلوب در استان مازندران جهت پرورش ماهی قزل‌آلا، طی سالیان اخیر پرورش این ماهی با شتاب زیادی توسعه یافته است، مزارع جدید ساخته شده‌اند و میزان تولید در واحد سطح افزایش چشمگیری پیدا نموده است. با این حال انواع بیماری‌های عفونی با سرعت هر چه تمامتر در جمعیت ماهیان گسترش می‌یابد که یکی از مهمترین بیماری‌های عفونی، Streptococcosis می‌باشد که در صورت شیوع می‌تواند خسارت‌های جبران ناپذیری را به صنعت پرورش ماهی وارد نماید (اخلاقی و کشاورز، ۱۳۸۱). با توجه به این واقعیت که عامل مولد بیماری در تمام سال در محیط‌های آبزی وجود دارد، به نظر می‌رسد که محافظت از ماهی در برابر عوامل بیماریزا، مهمترین، آسانترین و کم هزینه‌ترین روش جلوگیری از صدمات و ضایعات ناشی از بروز بیماری‌ها در مراکز تکثیر و پرورش آبزیان باشد. لذا در این تحقیق سعی شد که با تجویز پروبیوتیک همراه با جیره غذایی ضمن بالا بردن فاکتورهای ایمنی، ماهی را در برابر عامل بیماری مقاوم نموده و آسیب‌های ناشی از عفونت مذکور را به حداقل رسانید که نتایج بدست آمده تأیید کننده این موضوع است به طوری که پس از تجویز خوراکی *Bacillus subtilis* به مدت ۴۵ روز و سپس تزریق باکتری *S. iniae* به ماهیان گروه تیمار و کنترل مشاهده گردید که در طول ۱۴ روز، میزان تلفات در گروه کنترل که پروبیوتیک دریافت نکرده بودند ۵۴ تا ۶۰ درصد در حالی که در گروه تیمار ۲۵ تا ۳۱ درصد بود که این نتیجه با نتایج دیگر محققین از جمله Raida و همکاران (۲۰۰۳)، Brunt و همکاران (۲۰۰۵)، Kumar و همکاران (۲۰۰۶)، Newaj و همکاران (۲۰۰۸)، Salah Mesalhy و همکاران (۲۰۰۸)، Vendrell و همکاران (۲۰۰۸) و Abbass و همکاران (۲۰۰۹) مطابقت داشت.

تجزیه و تحلیل یافته‌ها نشان داد که افزودن پروبیوتیک *Bacillus subtilis* در جیره غذایی ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان تأثیری بر میزان هماتوکریت، هموگلوبین، تعداد گلبول‌های قرمز، متوسط حجم

[Downloaded from aqudev.liau.ac.ir on 2024-10-12]

[DOR: 20.1001.1.23223545.1391.6.1.8.0]

گلبول‌های قرمز، متوسط هموگلوبین گلبول‌های قرمز و متوسط غلظت هموگلوبین نداشت که نتایج مشابهی نیز توسط Raida و همکاران (۲۰۰۳)، Brunt و همکاران (۲۰۰۵)، Newaj و همکاران (۲۰۰۷) و Danielle و همکاران (۲۰۱۰) به دست آمد. همچنین افزودن پروبیوتیک *Bacillus subtilis* در جیره غذایی ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان موجب افزایش گلبول‌های سفید گردید که همسوی با این نتایج، Brunt و همکاران (۲۰۰۵)، Newaj و همکاران (۲۰۰۷)، توکلی و اخلاقی (۱۳۸۸) و Ali و همکاران (۲۰۱۰) نیز نشان دادند که استفاده از پروبیوتیک در جیره غذایی ماهی باعث افزایش گلبول‌های سفید می‌شود. نتایج فوق الذکر نشان می‌دهد که *Bacillus subtilis* باعث افزایش درصد لنفوسیت گردیده ضمن این که درصد نوتروفیل و منوسیت را کاهش داده است که علت این امر تأثیر پروبیوتیک‌ها بر روی سیستم ایمنی و تحریک آن می‌باشد به طوری که می‌توانند موجب افزایش لنفوسیت‌های B در ماهی شوند (Nayak, 2010). لنفوسیت‌ها یکی از مهمترین فاکتورهای حفاظتی ماهی در برابر عوامل میکروبی می‌باشند به طوری که سلول‌های Th_2 زمانیکه تحریک می‌شوند، سایتوکاین‌هایی مانند اینترلوکین-۴ ترشح می‌کنند که باعث تقویت رشد سلول‌های پیش‌ساز هماتوپویتیک و تمایز بیشتر تیره‌های سلولی میلوئید می‌گردد و به طور چشمگیری فعالیت کشندگی ماکروفاژها را تشدید می‌نماید (وجگانی، ۱۳۸۰). افزایش درصد لنفوسیت با افزایش سیستم دفاعی، موجب افزایش مقاومت در برابر عوامل بیماریزا، تحریکات محیطی و استرس‌ها گردیده که این امر می‌تواند با افزایش فعالیت سوخت و ساز موجب بهبود رشد، کاهش میزان مرگ و میر و افزایش میزان بازماندگی شود (Nayak, 2010).

با توجه به افزایش پروتئین تام و آلبومین در گروه تیمار می‌توان نتیجه گرفت که استفاده از *Bacillus subtilis* موجب افزایش فاکتورهای مذکور گردیده است. زیرا برخی پروتئین‌های سرم همچون لکتین، ترانسفرین، کامپلمان، CRP و ... اجزای سیستم ایمنی ذاتی هستند و همچنین ایمونوگلوبولین‌ها ساختار پروتئینی دارند (وجگانی، ۱۳۸۰)، لذا تحریک سیستم ایمنی توسط پروبیوتیک، موجب افزایش اجزای فوق و در نتیجه افزایش میزان پروتئین تام سرم شده است. در تأیید یافته‌های فوق، نتایج مشابهی را دیگر محققین از جمله Brunt و همکاران (۲۰۰۷)، Newaj و همکاران (۲۰۰۷)، Austin (۲۰۰۹)، Partha و همکاران (۲۰۰۹) و فرزانفر و همکاران (۱۳۸۸) به دست آوردند. میزان IgM نیز در گروه تیمار بیشتر از کنترل بود که نتایج به دست آمده با نتایج Panigrahi و همکاران (۲۰۰۵) و Al-Dohail و همکاران (۲۰۰۹) مطابقت داشت. تأثیر پروبیوتیک‌ها در تغذیه، مقاومت در برابر بیماری‌ها و دیگر فعالیت‌های مفید به اثبات رسیده است. پروبیوتیک‌های مختلف یا یک گونه یا چند گونه با هم می‌توانند باعث افزایش فاگوسیتوز، لیزوزیم، انفجار تنفسی و همچنین تولید سیتوکاین‌های مختلف در ماهی شوند و همچنین می‌توانند سیستم ایمنی معده ماهی را با افزایش سلول‌های ایمونوگلوبولین و گرانولوسیت‌های اسیدوفیل تحریک نمایند (حسینی‌فر و پورامینی، ۱۳۸۶). روند تولید ایمونوگلوبولین‌ها در ماهی وقوع مجموعه‌ای از واکنش‌ها بین سلول‌های ارایه دهنده آنتی ژن، سلول‌های T کمک کننده فعال شده و اینترلوکین-هاست که سبب تحریک لنفوسیت‌های B می‌شوند. این

[Downloaded from aqudev.liau.ac.ir on 2024-10-12]

[DOR: 20.1001.1.23223545.1391.6.1.8.0]

لنفوسیت‌ها در اثر تحریک، پلاسما سل‌ها را تولید می‌کنند که قادر به ترشح ایمونوگلوبولین می‌باشند (توکلی و اخلاقی، ۱۳۸۸). نتایج به دست آمده از میزان لیزوزیم سرم حاکی از آن است که لیزوزیم سرم در گروه دریافت کننده پروبیوتیک بیشتر از گروه کنترل بود که در همین خصوص دیگر محققین از جمله Brunt و همکاران (۲۰۰۷)، Newaj و همکاران (۲۰۰۷)، Salah Mesalhy (۲۰۰۸)، توکلی و اخلاقی (۱۳۸۸)، Austin (۲۰۰۹) و Panigrahi و همکاران (۲۰۰۵) نیز به نتایج مشابهی دست یافتند. لیزوزیم یک پروتئین کاتیونیک با وزن مولکولی کم می‌باشد که بخشی از مکانیزم دفاع غیر اختصاصی ماهیان را تشکیل می‌دهد. در آزادماهیان لیزوزیم در بافت‌های لنفومیلو-ئیدی مانند کبد، کلیه، طحال، ترشحات موکوسی، سرم، لکوسیت‌ها، روده، مثانه و لوله گوارش یافت شده است. لیزوزیم در این بافت‌ها توسط سلول‌های ویژه‌ای به نام ائوزینوفیلیک گرانول سل تولید و ترشح می‌شود. ابتدا این سلول‌ها در بافت روده ماهی قزل‌آلای رنگین کمان شناسایی و گزارش شدند، سپس وجود آن‌ها در بافت پیوندی، پوست، آبشش، مثانه و قلب به اثبات رسید. لیزوزیم همچنین توسط لکوسیت‌ها که در بافت‌های مختلف و خون توزیع شده‌اند ترشح می‌شود. با توجه به نتایج فوق ملاحظه می‌گردد که *Bacillus subtilis* باعث افزایش لیزوزیم گردیده که این افزایش به مقاومت ماهی در هنگام مواجهه با پاتوژن کمک می‌کند. نقش لیزوزیم در عفونت به عنوان آنتی باکتریال، حمله به دیواره سلولی باکتری‌های گرم مثبت و گرم منفی و تجزیه آن‌ها و همچنین تحریک فاگوسیتوز می‌باشد (Newaj-Fyzul, *et al*., 2007).

سپاسگزاری

از حمایت‌های جناب آقای مهندس سالاروند، ریاست محترم ایستگاه تحقیقات شیلات خیرود، راهنمایی‌های جناب آقای دکتر قمی و همکاری‌های سرکار خانم رضوانی تشکر و قدردانی می‌نماییم.

منابع

۱. اخلاقی، م.، کشاورز، م.، ۱۳۸۱. وقوع استرپتوکوکوزیس در مزارع پرورش قزل آلای استان فارس، مجله تحقیقات دامپزشکی ایران، دوره ۳، شماره ۲، صفحات ۱۸۹-۱۸۳.

۲. اینگلیس، و.، روبرت، ر.ج.، برومیج، ن.ر.، ۱۳۷۶. بیماری‌های باکتریایی ماهی. ترجمه دکتر مهدی سلطانی. چاپ اول. تهران، انتشارات سازمان دامپزشکی کشور با همکاری موسسه نشر جهاد، صفحات ۱۲۰-۱۲۳.

۳. توکلی، ه.، اخلاقی، م.، ۱۳۸۸. بررسی میزان تغییرات لیزوزیم، ایمونوگلوبولین، گلبول‌ها و هماتوکریت خون در ماهی قزل آلای رنگین کمان به دنبال عفونت تجربی با *آئروموناس هیدروفیلای* بیماریزا، مجله تحقیقات دامپزشکی، شماره ۲، صفحات ۱۶۲-۱۵۷.

۴. حسینی فر، س. ح.، پورامینی، م.، ۱۳۸۶. کاربرد پروبیوتیک‌ها و پری بیوتیک‌ها در آبزی پروری. چاپ اول. تهران، انتشارات موج سبز، صفحات ۸۴-۸۵

۵. سعیدی، ع. ا.، پورغلام، ر.، زاهدی، آ.، قیاسی، م.، ۱۳۸۸. استرپتوکوکوزیس در مزارع پرورش ماهیان قزل آلای استان های مازندران، لرستان، کرمانشاه، کهکیلویه و بویراحمد و فارس. نخستین همایش ملی بیماری‌های اقتصادی صنعت پرورش قزل آلای رنگین کمان ، شهرکرد، صفحه ۳۳.

۶. فرزانفر، ع.، لشتوآقایی، غ.، علیزاده، م.، بیاتی، م.، قربانی، ر.، ۱۳۸۸. بررسی تأثیر باکتری‌های *Bacillus*

[Downloaded from aqudev.liau.ac.ir on 2024-10-12]

[DOR: 20.1001.1.23223545.1391.6.1.8.0]

subtilis و *Bacillus licheniformis* به عنوان باکتری‌های پروبیوتیکی بر وضعیت رشد و بازماندگی لارو ماهی قزل آلا طی دوره انکوباسیون. نخستین همایش ملی ماهیان سردآبی، تنکابن، صفحه ۱۵۴.

۷. قیاسی، م.، زاهدی، آ.، خوشباور رستمی، ح.، ۱۳۷۹. بروز اپیدمی استرپتوکوکوزیس در ماهیان قزل آلای رنگین کمان در استان مازندران. اولین همایش بهداشت و بیماری‌های آبزیان ایران، اهواز، صفحه ۵۹.

۸. وجگانی، م.، ۱۳۸۰. ایمونولوژی. چاپ چهارم. تهران، مؤسسه نشر جهاد، صفحه ۱۹۶.

9. Abbass, A., Sharifuzzaman, S. M., Austin, B., 2009. Cellular components of probiotics control *Yersinia ruckeri* infection in rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum). Fish diseases, Vol. 33, pp. 31-37.
10. Ali, H. M., Ghazalah, A. A., Gehad, E. A., 2010. Practical Aspects and Immune response of Probiotics Preparations Supplemented to Nile Tilapia (*Oreochromis niloticus*) Diets. Nature and Science, Vol. 8, pp. 39-45.
11. Al-Dohail, M. A., Hashim, R., Aliyu-Paiko, M., 2009. Effects of the probiotic, Lactobacillus acidophilus, on the growth performance, haematology parameters and immunoglobulin concentration in African Catfish *(Clarias gariepinus*, Burchell 1822) fingerling. Aquac Res, Vol. 40, pp. 1642-1652.
12. Austin, B., Austin, D. A., 2007. Bacterial fish pathogens. Disease in farmed and wild fish. Ellis Horwood, Chichester. pp. 56-63.
13. Austin, B., Sharifuzzaman, S. M., 2009. Influence of probiotic feeding duration on disease resistance and immune parameters in rainbow trout. Fish & Shellfish Immunology, Vol. 27, pp. 440–445.
14. Benfey, T. J., Sutterlin, A. M., 1984. The haematology of triploid landlocked Atlantic salmon, *Salmo salar*. Journal of Fish Biology, Vol. 24, pp. 333-338.
15. Brunt, B., Austin, B., 2005. Use of a probiotic to control lactococcosis and streptococcosis in rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum). Fish Diseases, Vol. 28, pp. 693-701.
16. Brunt, J., Newaj-Fyzul, A., Austin, B., 2007. The development of probiotics for the control of multiple bacterial diseases of rainbow trout, Oncorhynchus mykiss (Walbaum). Fish Diseases, Vol. 30, pp. 573–579.
17. Danielle, C., *et al*., 2010. Haematologic and immunologic parameters of bullfrogs, Lithobates catesbeianus, fed probiotics. Aquaculture Research, Vol. 41, No. 7., pp. 1064-1071
18. Ellis Anthony, E., 1990. Lysozyme Assays: In Stolen Aal;SOS. Tech. Fish Immunol. pp. 101-103.
19. Goldenfarb, P. B., Bowyer, F. P., Hall, E., Brosious, E., 1971. Reproductibility in the hematology laboratory: the microhematocrit determination. Am J Clin Pathol, Vol. 56, pp. 35-39.
20. Klesius, P., Evans, J., Shoemaker, C., Yeha, H., Goodwin, A. E., Thompson, K., 2006. Rapid detection and identification of *Streptococcus iniae* using a monoclonal antibody-based indirect fluorescent antibody technique. Aquaculture, Vol. 258, pp. 180-186.
21. Kumar, R., Mukherjee, S. C., Prasad, K. P., Pal, A. K., 2006. Evaluation of *Bacillus subtilis* as a probiotic to Indian major carp *Labeo rohita* (Ham.). Aquaculture Research, Vol. 37, pp. 1215-1221.
22. Larsen, H. N., 1964. Comparison of various methods of hemoglobin detection of channel catfish blood. The Progressive Fish-Culturist, Vol. 26, pp. 11–15.
23. Leonard, J. B. K., Cormick, S. D. Mc., 2005. Changes in haematology during upstream migration to American shad. Journal of Fish Biology, Vol. 54, pp. 1218-1230.
24. MacFarland, J. F., 2000. Biochemical testes for identification of medical bacteria. Williams and Wilkins. 912P.
25. Nayak, S. K., 2010. Probiotics and immunity: A fish perspective. Fish & Shellfish Immunology, Vol. 29, pp. 2-14.
26. Newaj-Fyzul, A., Adesiyun, A. A., Mutani, A., Ramsubhag, A., Brunt, J., Austin, B., 2007. *Bacillus subtilis* AB1

[Downloaded from aqudev.liau.ac.ir on 2024-10-12]

[DOR: 20.1001.1.23223545.1391.6.1.8.0]

controls *Aeromonas* infection in rainbow trout (Oncorhynchus mykiss, Walbaum). Applied Microbiology, Vol. 103, pp. 1699-1706.

27. NRC (National Research Council)., 1993. Nutrient Requirement of Fish. National Academic Press, Washington, DC, USA. P. 114.
28. Panigrahi, A., Kiron, V., Puangkaew, J., Kobayashi, T., Satoh, S., Sugita, H., 2005. The viability of probiotic bacteria as a factor influencing the immune response in rainbow trout. Aquaculture, Vol. 243, pp. 241-254.
29. Partha, B., Pradeep, B., 2009. Effect of a probiotic bacterium Bacillus circulans PB7 in the formulated diets: on growth, nutritional quality and immunity of Catla catla (Ham.). Fish Physiol Biochem, Vol. 35, pp. 467–478.
30. Raida, M. K., Larsen, J. L., Nielsen, M. E., Buchmann, K., 2003. Enhanced resistance of rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum), against *Yersinia ruckeri* challenge following oral administration of *Bacillus subtilis* and *B. licheniformis* (BioPlus2B). Fish Diseases, Vol. 26, pp. 495-498.
31. Rosenfeld, G., 1947. Corante pancrômico para hematologia e citologia clínica. Nova combinação dos componentes do May-Grünwald e do Giemsa num só corante de emprego rápido. Mem Inst Butantan, Vol. 20, pp. 329-334.
32. Salah Mesalhy, A., Mohamed Fathi M. and George J., 2008. Effect of probiotics on the survival, growth and challenge infection in Tilapia nilotica (*Oreochromis niloticus*). Aquaculture research, Vol. 39, pp. 647 – 656.
33. Salah Mesalhy, A., Yousef, A., Ahlam, A., Moahmed Fathi, M., 2008. Studies on *Bacillus subtilis* and *Lactobacillus acidophilus*, as potential probiotics, on the immune response and resistance of Tilapia nilotica (Oreochromis niloticus) to challenge infections. Fish & Shellfish Immunology, Vol. 25, pp. 128-136.
34. Vendrell, D., Balcázar, J., Blas, I., Ruiz-Zarzuela, I., Gironés, O., Luis Múzquiz, J., 2008. Protection of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) from lactococcosis by probiotic bacteria. Fish & Shellfish Immunology, Vol. 31, pp. 337-345.

[Downloaded from aqudev.liau.ac.ir on 2024-10-12]

[DOR: 20.1001.1.23223545.1391.6.1.8.0]