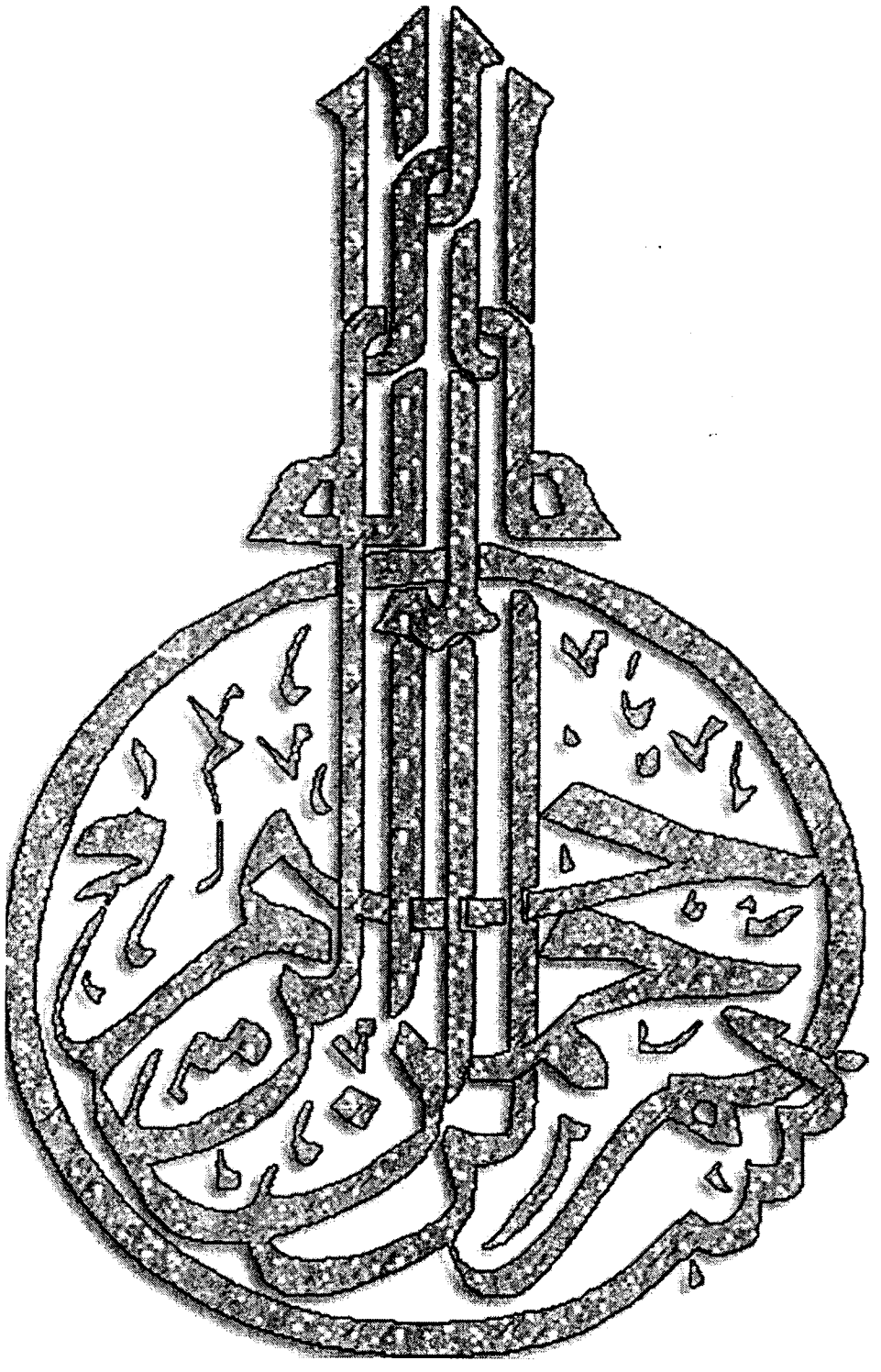

١٤٩٢٤٤

دانشگاه ارومیه

دانشکده منابع طبیعی

گروه شیلات و آبزیان

سال تحصیلی: ۸۹-۱۳۸۸ **شماره پایان نامه: ۱۶۸-۲ک**

پایان نامه

جهت اخذ درجه فوق لیسانس

مهندسی منابع طبیعی-تکثیر وپرورش آبزیان

عنوان:

مطاله اثر آنتاگونیستی باکتری های اسید لاکتیک جدا شده از روده کپورمعمولی علیه تعدادی از عوامل بیماری‌زای آبزیان

نگارنده:

حمیدرضارحمتی

به راهنمایی:

جناب آقای دکترامیرتوکمه چی، استاد راهنمای اول (استادیار، پژوهشکده آرتمیا و جانوران آبزی، دانشگاه ارومیه)

جناب آقای دکتر سعید مشکینی، استاد راهنمای دوم (استادیار،دانشکده دامپزشکی و پژوهشکده آرتمیا و جانوران آبزی، دانشگاه ارومیه)

۱۳۸۹/۹/ ۸

اساتید داور

دکتر ناصر آق (استادیار پژوهشکده آرتمیا و جانوران آبزی دانشگاه ارومیه)

دکتر نوروز دلیرژ (استادیار دانشکده دامپزشکی دانشگاه ارومیه)

مهر ۸۹

۱۴۶۳۶۶

تشکر و قدردانی

سپاس خداوندی را که سخنوران از ستودن او عاجزند، و حسابگران از شمارش نعمت های او ناتوان، و تلاشگران از ادای حق او در مانده اند. خدایی که افکار ژرف اندیش، ذات او را درک نمیکنند و دست غواصان دریای علوم به او نخواهد رسید. پروردگاری که برای صفات او حد و مرزی وجود ندارد، وتعریف کاملی نمیتوان یافت و برای خدا وقت معین و سرآمدی مشخص نمیتوان تعیین کرد. مخلوقات را با قدرت خود آفرید و با رحمت خود بادها را به حرکت درآورد و به وسیله کوه ها اضطراب و لرزش زمین را به آرامش تبدیل مکرد.(نهج البلاغه،خطبه۱).

اکنون که موفق با ارائه پایان نامه خود گردیده ام بر خود واجب میدانم که مراتب سپاس قلبی و تشکر خالصانه خویش را نسبت به تمام عزیزانی که بنده را در این راه یاری کردند ابراز نمایم.

ازاستاد راهنمای فرزانه و راجمندم جناب آقای دکتر امیر تکمه چی که با راهنمایی های عالی و هوشمندانه و علمی خود ، بی دریغ و صادقانه همواره مرا مورد لطف خود قرار دادند، کمال تشکر و سپاس گذاری را دارم.

از دوست عزیز و مهربان خود جناب آقای دکتر هادی ابراهیمی که در تمامی مراحل انجام مطالعه در کنار من بودند ومن را یاری نمودند کمال تشکر و سپاسگذاری را دارم.

از استاد راهنمای گرامی ، مدیرگروه تکثیر و پرورش آبزیان آقای دکتر سعید مشکینی تشکر مینمایم.

از سرکار خانم مریم روحی مسئول آزمایشگاه میکروبیولوژی، مرکز تحقیقات آرتمیا، که در تمامی مراحل همکاری نمودند کمال تشکر و قدر دانی را دارم.

از اساتید گرامی جناب آقای دکتر رامین منافی فر و جناب آقای دکتر ناصر آق که در انجام این مطالعه من را راهنمایی کردند کمال تشکر را داردم.

از جناب آقای دکتر علی احسانی ، ریاست محترم پژوهشکده آرتمیا و جانوران آبزی کمال تشکر را دارم.

از جناب آقای مهندس مرواریدی و جناب آقای دکتر حب نقی ،آزمایشگاه بافت شناسی دانشکده دامپزشکی ، کمال تشکر را دارم.

از جناب آقای فرهاد فرهنگ پژوه، مسئول آزمایشگاه دانشکده دامپزشکی کمال تشکر و قدر دانی را دارم.

از جناب آقای سعید حاجی نژاد، مسئول سالن تکثیر و پرورش آبزیان کمال تشکر و قدر دانی را دارم.

از دوست عزیزم جناب آقای رضا جلیلی، دانشجوی کارشناسسی ارشد تکثیر و پرورش که در تدوین پایان نامه مرا همراهی کردند کمال تشکر را دارم.

تقدیم به یگانه منجی عالم بشریت مهدی موعود (ع)

تقدیم به آنان که علم میجویند تا طریق خداپرستی را نیکوتر بپیمایند

تقدیم به پدرو مادر گرامی تر از جانم

تقدیم به تنها یارصبور و دلسوزم، همسر مهربانم

فهرست مطالب

عنوان	شماره صفحه
چکیده	۱
فصل اول-مقدمه	
مقدمه	۳
فصل دوم- کلیات	
بخش اول پروبیوتیک ها	۵
۱-۲- تعریف و تاریخچه	۵
۲-۲- ویژگی یک پروبیوتیک موثر	۶
۳-۲- اثرات سودمند به کارگیری پروبیوتیک‌ها	۷
۴-۲- کاربرد پروبیوتیک‌ها	۷
۱-۴-۲- کاربرد در هچری‌ها برای حفاظت تخم و لارو ماهی	۷
۲-۴-۲- کاربرد در ماهیان پرورشی و مولد	۷
۳-۴-۲- کاربرد در هچری و مزارع پرورش میگو	۸
۴-۴-۲- کاربرد در زمینه ماهیان زینتی و آکواریومی	۸
۵-۲- انواع پروبیوتیک‌های مورد استفاده در آبزی پروری	۸
۶-۲- مکانیزم عمل پروبیوتیک‌ها	۱۳
۱-۶-۲- تولید ترکیبات باز دارنده	۱۳
۲-۶-۲- تحریک دستگاه ایمنی میزبان	۱۳
۳-۶-۲- رقابت برای بدست آوردن مواد شیمیایی و انرژی قابل دسترس	۱۴
۴-۶-۲- رقابت برای بدست آوردن آهن	۱۴
۵-۶-۲- رقابت برای محل اتصال	۱۵
۶-۶-۲- بهبود کیفیت آب	۱۵
۷-۶-۲- اثر متقابل با فیتوپلانکتون‌ها	۱۶
۷-۲- انتخاب پروبیوتیک	۱۶
۱-۷-۲- معیارهای کلی انتخاب پروبیوتیک‌ها	۱۶
بخش دوم : قزل آلای رنگین کمان	۱۹
بخش سوم : باکتری های بیماری زا	۲۱
۹-۲- آئروموناس هیدروفیلا	۲۱
۱۰-۲- یرسینیا راکری	۲۳

فصل سوم – مواد وروش ها

۳- مواد و روش کار ۲۵
۱-۳- شرایط آزمایشگاهی ۲۵
۱-۱-۳- تهیه باکتری و آماده سازی آنها ۲۵
۲-۱-۱-۳- بررسی اثرات ضد باکتریایی رومایه ۲۵
۳-۱-۱-۳- بررسی اثرات ضد باکتریایی سلول زنده باکتری‌های اسید لاکتیک ۲۶
۴-۱-۱-۳- بررسی اثرات ضد باکتریایی ترکیبات سیتوپلاسمی باکتری‌های اسید لاکتیک ۲۶
۲-۳- شرایط بالینی ۲۷
۱-۲-۳- تهیه ماهی و طراحی آزمایش ۲۷
۲-۲-۳- تعیین احتمال تاثیر ناخواسته باکتری‌های اسید لاکتیک در ماهی قزل آلا ۲۷
۳-۲-۳- تهیه غذا و غذادهی ۲۸
۴-۲-۳- بررسی میزان مقاومت ماهی در برابر بیماری ۲۹
۵-۲-۳- بررسی ها باکتری شناسی ۲۹
۶-۲-۳- بررسی های ایمنی شناسی ۳۰
۱-۶-۲-۳- خون گیری و تهیه سرم ۳۰
۲-۶-۲-۳- ایمنی هومورال ۳۰
۷-۲-۳- آزمایشات بافت شناسی ۳۱
۸-۲-۳- تجزیه و تحلیل آماری ۳۱

فصل چهارم - نتایج

۱-۴- یافته‌های حاصل از بررسی های مرحله آزمایشگاهی ۳۳
۲-۴ یافته های حاصل از مرحله بالینی ۳۳
۱-۲-۴- یافته‌های مربوط به تعیین اثرات ناخواسته *لاکتوباسیلوس*ها ۳۳
۲-۲-۴- یافته های بافت شناسی ۳۳
۳-۲-۴- یافته های باکتری شناسی ۳۴
۴-۲-۴- یافته های ایمنی شناسی ۳۴
۱-۴-۲-۴- یافته های خون شناسی ۳۴
۲-۴-۲-۴- یافته های فعالیت کمپلمان ۳۶
۳-۴-۲-۴- یافته های فعالیت لیزوزیم ۳۷
۵-۲-۴- یافته‌های مقاومت در برابر آلودگی تجربی با باکتری های پاتوژن ۳۸

فصل پنجم – بحث ، نتیجه گیری و پیشنهادات

۵- بحث ۳۹

فصل ششم - منابع

۶- منابع ۴۷

فصل هفتم - ضمیمه

۷- ضمیمه ۵۳
۱-۷-تصاویر ۵۳
تصویر ۱-۱-۷- هاله مهار رشد باکتری‌های بیماری‌زا در اثر باکتری‌های لاکتوباسیلوس در کشت دو لایه ۵۳
تصویر ۲-۱-۷- استخرهای بتنی مورد استفاده جهت پرورش قزل آلای رنگین کمان. ۵۴
تصویر ۳-۱-۷- علائم بالینی و کالبدگشایی ماهیان به دنبال آلودگی تجربی با آئروموناس هیدروفیلا و پرسینیا راکری ۵۴
تصویر ۴-۱-۷- حوضچه‌های پلی اتیلنی مستطیل شکل استفاده شده جهت آلودگی تجربی. ۵۵
تصویر ۵-۱-۷- خون گیری از ورید ساقه دمی. ۵۵
تصویر ۶-۱-۷- تزریق داخل صفاقی ماهیان برای ایجاد آلودگی تجربی. ۵۵
۲-۷- نحوه تهیه بافرها ۵۶
۱-۲-۷- بافر PBS ۵۶
۲-۲-۷- بافر اتیلن گلیکول تترا استیک اسید-منیزیوم-ژلاتین ورونال ۵۶
۳-۲-۷- بافر سیترات فسفات ۵۷
۳-۷- نمودارها ۵۷
نمودار ۱-۳-۷- قطر هاله مهار رشد باکتری های بیماری زا در اثر *لاکتوباسیلوس ها* ۵۷
نمودار۲-۳-۷- تعداد *لاکتوباسیلوس* جدا شده از محتویات روده ماهیان در زمان‌های متفاوت. ۵۷
نمودار ۳-۳-۷- میانگین درصد منوسیت‌های تیمارهای مختلف در زمان‌های متفاوت. ۵۸
نمودار ۴-۳-۷- میانگین درصد لنفوسیت‌های تیمارهای مختلف در زمان‌های متفاوت. ۵۸
نمودار ۵-۳-۷- میانگین درصد هماتوکریت تیمارهای مختلف در زمان‌های متفاوت. ۵۹
نمودار ۶-۳-۷- میانگین درصد نوتروفیل‌های تیمارهای مختلف در زمان‌های متفاوت ۵۹
نمودار ۷-۳-۷- میانگین فعالیت راه میانبر کمپلمان تیمارهای مختلف در زمان‌های متفاوت. ۶۰
نمودار ۸-۳-۷- میانگین فعالیت لیزوزیم تیمارهای مختلف در زمان‌های متفاوت ۶۰
نمودار ۹-۳-۷- درصد بازماندگی تیمارهای مختلف پس از آلودگی با *آئروموناس هیدروفیلا*. ۶۱
نمودار ۱۰-۳-۷- درصد بازماندگی تیمارهای مختلف پس از آلودگی با *آئروموناس هیدروفیلا*. ۶۱
چکیده انگلیسی ۶۲

فهرست جداول

جدول ۱-۲- پروبیوتیک‌های مورد استفاده در ماهی به عنوان عامل کنترل کننده بیولوژیکی در آبزی پروری ۹

جدول ۲-۲- پروبیوتیک‌های مورد استفاده در سخت پوستان به عنوان عامل کنترل کننده ی بیولوژیکی در آبزی پروری ۱۱

جدول ۳-۲- پروبیوتیک‌های مورد استفاده در نرم تنان به عنوان عامل کنترل کننده بیولوژیکی در آبزی پروری ۱۲

جدول ۴-۲- پروبیوتیک‌های مورد استفاده در غذای زنده به عنوان عامل کنترل کننده بیولوژیکی در آبزی پروری ۱۲

جدول ۱-۳. آنالیز غذای تجاری مورد استفاده در این بررسی ۲۹

جدول ۲-۳- جدول استاندارد محاسبه غذای روزانه ماهیان قزل آلای پرورشی ۳۲

جدول ۱-۴- میانگین قطر هاله مهار رشد باکتری‌های بیماری‌زا با روش کشت دو لایه ۳۳

جدول ۲-۴- میانگین تعداد لاکتوباسیلوس‌های جدا شده از محتویات روده ماهیان در زمان‌های مختلف. ۳۴

جدول ۳-۴- میانگین درصد سلول‌های خونی و هموگلوبین تیمارهای مختلف در روز ۱۴. ۳۵

جدول ۴-۴- میانگین درصد سلول‌های خونی و هموگلوبین تیمارهای مختلف در روز ۲۸. ۳۵

جدول ۵-۴- میانگین درصد سلول‌های خونی و هموگلوبین تیمارهای مختلف در روز ۳۵. ۳۶

جدول ۶-۴. میانگین فعالیت راه میانبرکمپلمان تیمارهای مختلف در زمان‌های متفاوت (U/ml). ۳۷

جدول ۷-۴- میزان فعالیت لیزوزیم تیمارهای مختلف در زمان‌های متفاوت (U/ml). ۳۷

جدول ۸-۴- درصد بازماندگی تیمارهای مختلف به دنبال آلودگی با آئروموناس هیدروفیلا و یرسینیا راکری ۳۸

خلاصه فارسی

عنوان: مطاله اثر آنتاگونیستی باکتری های اسید لاکتیک جدا شده از روده کپورمعمولی علیه تعدادی از عوامل بیماریزای آبزیان

خلاصه:

هدف از انجام این مطالعه بررسی اثرات ضد باکتریایی *لاکتوباسیلوس پلانتاروم*، *لاکتوباسیلوس کازئی* و *لاکتوباسیلوس پاراکازئی* علیه باکتری‌های بیماری‌زای *آئروموناس هیدروفیلا*، *یرسینیا راکری* و *استرپتوکوکوس اینیه* و اثر این پروبیوتیک‌ها در افزایش مقاومت ماهی قزل آلای رنگین کمان در برابر عوامل بیماری‌زا می‌باشد. در مرحله اول فعالیت ضد باکتریایی *لاکتوباسیلوس*های فوق علیه باکتری‌های بیماری‌زا در شرایط آزمایشگاهی ارزیابی شد. سپس در مرحله دوم، با استفاده از نتایج مرحله قبل اثر ضد باکتریایی و تحریک کنندگی ایمنی ماهی قزل آلا توسط *لاکتوباسیلوس*های انتخاب شده سنجیده شد. یافته‌های حاصل نشان داد که محلول رویی و پروتئین‌های سیتوپلاسمی هیچکدام از *لاکتوباسیلوس*ها نتوانست رشد عوامل بیماری‌زا را مهار سازد، در حالیکه سلول زنده آنها توانست مانع رشد این باکتری‌ها گردد. بر این اساس قطر هاله مهار رشد *آئروموناس هیدروفیلا* توسط سلول‌های زنده *لاکتوباسیلوس پلانتارم* و *لاکتوباسیلوس کازئی* به ترتیب برابر با ۲±۳۰ و ۱±۲۱ میلی متر بود. همچنین قطر هاله مهار رشد *یرسینیا راکری* توسط سلول‌های زنده *لاکتوباسیلوس پلانتارم* و *لاکتوباسیلوس کازئی* به ترتیب برابر با ۱±۲۱ و ۱±۲۳ میلی متر و سرانجام قطر هاله مهار رشد *استرپتوکوکس اینیه* توسط سلول‌های زنده *لاکتوباسیلوس پلانتارم* و *لاکتوباسیلوس کازئی* به ترتیب برابر با ۲±۳۰ و ۱±۲۰ میلی متر بود. لازم به ذکر است که *لاکتوباسیلوس پاراکازئی* قادر به مهار رشد هیچ کدام از پاتوژن‌ها نشد. در ادامه مطالعه باکتری‌های *لاکتوباسیلوس کازئی* و *لاکتوباسیلوس پلانتاروم* به مقدار 10^7 CFU[1] در هر گرم از غذای تجاری پلت به مدت چهار هفته به ماهی قزل آلای رنگین کمان (با میانگین وزنی ۲±۲۰) داده شد. همچنین تیمار آنتی بیوتیک اکسی تترا سایکلین نیز ۷۲ ساعت قبل از چلنج با پاتوژن های مورد نظر نیز انتخاب شد که ماهیان مورد نظر به میزان ۵۰ میلی گرم در هر کیلوگرم غذا اضافه شد. سپس مطالعه یک هفته دیگر ادامه پیدا کرده بدون آن که ماهیان هیچ گونه لاکتوباسیلوسی را همراه غذا دریافت کنند. در طول مطالعه به منظور بررسی میکروفلور روده، نمونه گیری از محتویات روده ماهیان در هفته دوم، هفته چهارم و همچنین در یک هفته پایانی پس از قطع مصرف *لاکتوباسیلوس*ها صورت گرفت. نمونه‌های خون لازم برای بررسی برخی از پارامترهای هماتولوژی و پارامترهای پاسخ ایمنی هومورال نیز در ماهیان در روزهای صفر، ۱۴ و ۲۸ پس از تغذیه با *لاکتوباسیلوس* و یک هفته پس از قطع مصرف آن (روز ۳۵) از ورید ساقه دمی اخذ شد. بررسی‌ها نشان داد که ، باکتری‌های مذکور از روده ماهیان جدا شدند که در این ارتباط مقدار *لاکتوباسیلوس کازئی* نسبت به *لاکتوباسیلوس پلانتاروم* بطور معنی داری ($p<0/05$) بیشتر بود. پس از قطع جیره غذایی غنی شده با این باکتری‌ها به جیره فاقد آن، *لاکتوباسیلوس*ها به طور ناگهانی از محتویات روده کاهش یافتند. یافته‌های خون شناسی نشان داد که تعداد نوتروفیل‌ها و مونوسیت‌ها در تیمارهای تغذیه شده با *لاکتوباسیلوس کازئی* افزایش یافته و نسبت به تیمار شاهد در روزهای ۲۸ و ۳۵ اختلاف معنی داری ($p<0/05$) دارد. در تیمار *لاکتوباسیلوس پلانتاروم* فقط میزان مونوسیت‌ها در روز ۲۸ نسبت به گروه شاهد در حد معنی داری ($p<0/05$) افزایش نشان داد. میزان لنفوسیت‌ها در تیمارهای تغذیه شده با *لاکتوباسیلوس*های مورد نظر با گروه شاهد در روزهای ۲۸ و ۳۵ اختلاف معنی داری ($p<0/05$) داشته و کمتر بود. فعالیت راه جایگزین کمپلمان سرم در تیمارهای تغذیه شده با *لاکتوباسیلوس کازئی* در روزهای ۱۴ و ۲۸ به طور معنی داری ($p<0/05$) افزایش یافته بود. فعالیت آنزیم لیزوزیم سرم در تیمارهای تغذیه شده با

1- Colony Forming Unit

لاکتوباسیلوس کازئی در روزهای ۱۴، ۲۸ و ۳۵ و در تیمار تغذیه شده با *لاکتوباسیلوس پلانتاروم* در روز ۲۸ به طور معنی داری ($p<0/05$) نسبت به شاهد افزایش یافته بود. در این بررسی میزان مقاومت ماهیان در آلودگی تجربی با *آئروموناس هیدروفیلا* و *یرسینیا راکری* در شرایط میدانی نیز سنجیده شد. نتایج این آزمایش نشان داد که درصد بازماندگی تیمارهای تغذیه شده با *لاکتوباسیلوس کازئی*، *لاکتوباسیلوس پلانتاروم* و اکسی تترا سیکلین به ترتیب ۵۳/۳ ، ۲۶/۶ و ۴۶/۶ در برابر *آئروموناس هیدروفیلا* (درصد بازماندگی شاهد برابر صفر) و به ترتیب ۸۰ ، ۶۰ و ۵۳/۳ در برابر *یرسینیا راکری* (درصد بازماندگی شاهد ۴۶/۶) بود. به دلیل مشکلات زیست محیطی و خطر آلودگی زیاد از پاتوژن *استرپتوکوکس اینیه* در شرایط میدانی استفاده نشد. بر اساس نتایج حاصل از این بررسی می‌توان نتیجه گرفت که *لاکتوباسیلوس کازئی* بر سیستم ایمنی هومورال و سلولی ماهی قزل آلای رنگین کمان موثر بوده و میزان مقاومت ماهی را در آلودگی تجربی با *آیروموناس هیدروفیلا* و *یرسینیا راکری* افزایش می‌دهد.

کلمات کلیدی: قزل آلای رنگین کمان، باکتری‌های اسید لاکتیک، فعالیت ضد باکتریایی، پاسخ ایمنی هورمونی، افزایش مقاومت

فصل اول

مقدمه

Introduction

مقدمه

آبزی پروری یکی از فعالیت‌های مهم تولیدی در بسیاری از کشورها می‌باشد. در سال‌های اخیر صنعت آبزی پروری یکی از بخش‌های سریع الرشد در تولید غذا بوده و کل تولیدات آبزی پروری اعم از صید ماهیان پرورشی و پرورش ماهیان در سال ۲۰۰۴ به ۱۰۴ میلیون تن رسید (FAO, 2007). سهم آبزیان آب شور از این تعداد ۱۸ درصد بوده که میگو به عنوان یک محصول مهم نقش به سزایی دارد (۲/۴ میلیون تن در سال). از سال ۱۹۷۰ در سرتاسر جهان آبزی پروری، در مقایسه با نرخ رشد سالانه ۱/۴ درصدی صیادی و ۲/۸ درصدی تولید دامپروری ، با میانگین ۹/۲ درصد در سال در حال رشد است. در حالیکه یکی از مشکلات عمده در این صنعت بروز بیماری ها می‌باشد. تولید متراکم موجودات آبزی باعث می‌شود که آنها در معرض شرایط استرس‌زا و بیماری قرار بگیرند، لذا این مسئله باعث ضررهای اقتصادی می‌گردد. در چند دهه اخیر به منظور پیشگیری از وقوع بیماری‌ها و نیز درمان آنها، مصرف داروهای ضد میکروبی افزایش پیدا کرده است. از طرف دیگر استفاده مداوم و طولانی مدت داروهای ضد میکروبی به تدریج باعث ایجاد سویه‌های مقاوم عوامل بیماری‌زا نسبت به این آنتی بیوتیک‌ها گردیده است (Balcazar, 2003).

در ایالات متحده آمریکا هرساله حدود ۱۸۰۰۰ تن انواع مختلف آنتی بیوتیک ها برای مقاصد دامپزشکی و دامپروری تولید می‌گردد که ۱۲۶۰۰ تن از آن نه تنها به منظور درمان بلکه برای افزایش رشد در دام‌ها مورد مصرف قرار می‌گیرند (SCAN, 2003). همچنین در اروپا سالیانه مقدار ۱۶۰۰ تن تولید می‌گردد که حدود ۳۰ درصد آن به منظور درمان بیماری‌ها در مزارع پرورش دام‌ها مصرف می‌شوند (SCAN, 2003). گزارش‌ها نشان می‌دهد مصرف این حجم زیاد آنتی بیوتیک می‌تواند منجر به ایجاد مقاومت در باکتری‌ها گردد (SCAN, 2003). ایجاد سویه‌های مقاوم در باکتری‌ها توسط یکی از دو راه زیر می‌باشد: الف) جهش کروموزومی و ب) بدست آوردن پلاسمید جدید. جهش کروموزومی نمی‌تواند به سایر باکتری‌ها انتقال پیدا کند، اما پلاسمید می‌تواند مقاومت را به سرعت انتقال دهد (Lewin, 1992). پلاسمیدها عبارتند از اجزاء ژنتیکی خارج کروموزومی اند که می‌توانند ژن‌های مقاوم به آنتی بیوتیک ها را با خود حمل کنند. برای مثال در جنس *Vibrio* پلاسمیدهایی وجود دارند که حاوی ژن‌های مقاومت می‌باشند. در پرورش متراکم آبزیان، عوامل پلاسمیدی، ویروس ها و حتی DNA موجود در آب و رسوبات ته استخر به راحتی انتقال یافته و می‌توانند تغییرات ژنتیکی را سبب شوند (Moriarty, 1997).

درسال‌های اخیر استفاده از پروبیوتیک‌ها به عنوان جایگزین روش‌های درمان با آنتی بیوتیک ها مطرح گردیده و به نظر می‌رسد استفاده از آنها می‌تواند بسیاری از مشکلات موجود را مرتفع سازد. سابقه استفاده از پروبیوتیک‌ها به عنوان مکمل غذایی در حیوانات پرورشی به دهه ۱۹۷۰ بر می‌گردد. پروبیوتیک‌ها، عبارتند از میکروارگانیزم‌ها یی که اثرات مفیدی در سلامتی میزبان خود دارند. در آبزی پروری پروبیوتیک‌ها به منظور کنترل بیماری، به صورت مکمل غذایی یا حتی در برخی موارد به عنوان جایگزین ترکیبات ضد میکروبی (آنتی بیوتیک‌ها) مورد استفاده قرار می‌گیرد. نتایج بدست آمده از مطالعات انجام شده در بسیاری از کشورها نشان داده است که بعضی از باکتری‌های استفاده شده به عنوان پروبیوتیک (مانند *لاکتوباسیلوس*ها) قادر به تحریک سیستم ایمنی میزبان می‌باشند (Fuller, 1992). استفاده از پروبیوتیک‌ها در آبزی پروری ایده ی جدیدی است و با افزایش تقاضا برای استفاده از باکتری‌های مفید در آبزی پروری، تا به امروز تحقیقات بسیاری در رابطه با اثر آنها بر رشد و بقاء لارو ماهی، سخت پوستان و اویستر انجام شده است (Ali, 2000). بر این اساس هدف از انجام این تحقیق استفاده از

*لاکتوباسیلوس*های جدا شده از ماهی کپور معمولی جهت تقویت رشد، تحریک سیستم ایمنی و افزایش مقاومت ماهی قزل آلا در برابر آلودگی تجربی با *آئرومونا‌س هیدروفیلا* و *یرسینیا راکری* می‌باشد.

فصل دوم

کلیات

Review of literature

☑ بخش اول: پروبیوتیک‌ها

۱-۲- تعریف و تاریخچه

طی چند سال اخیر استفاده از مواد افزودنی (مکمل) در خوراک دام، طیور و آبزیان به فراوانی مورد توجه متخصصین تغذیه علوم دامی و آبزی پروری واقع شده است. یکی از مهمترین این افزودنی‌ها، فرآورده‌های میکروبی است که به طور زنده و مستقیم[1] در جیره به مصرف می‌رسد و از نظر تجاری تحت عنوان پروبیوتیک[2] شناخته شده‌اند. عبارت پروبیوتیک (زیست یار) از کلمه یونانی پروبیوس[3] منشا گرفته و بر خلاف آنتی بیوتیک که به معنی ضد حیات[4] می‌باشد، در لغت به معنی برای حیات[5] است. افزودن باکتری به خوراک، دارای سابقه دیرینه بوده و به آغاز سده گذشته بر می‌گردد که دانشمند معروف

Eli Metchenikoff در انستیتو پاستور پژوهش‌های مهمی را در این زمینه انجام داده است. Metchenikoff متوجه شد که داشتن عمر طولانی در روستاییان کشور بلغارستان ناشی از مصرف فراوان شیر تخمیر شده است. بعدها دانشمندان طی سال‌های ۱۹۲۰ تا۱۹۳۰، میکروارگانیزم‌هایی را به منظور جایگزینی در دستگاه گوارش انسان به کار بردند که فلور طبیعی دستگاه گوارش بیشتر جانوران بودند. شاید توجیه مصرف میکروب یا باکتری کمی تعجب آور باشد، چرا که میکروب‌ها در اکثر مواقع به عنوان عوامل بیماری‌زا و مضر شناخته شده‌اند، در حالیکه این شناخت درست نبوده و اجرام بسیار بیشتری یافت می‌شوند مثل پروبیوتیک‌ها که در زندگی انسان مفید هستند (کریم زاده و همکاران، ۱۳۸۸).

تعریف پروبیوتیک همواره در طول زمان در حال تغییر و تکمیل شدن بوده است. در ابتدا آنها را به عنوان نوعی ماده میکروبی تعریف کردند که سبب تحریک رشد میکروارگانیزم‌ها می‌شوند (Lily and Stillwell,1965) یا عصاره بافتی که سبب بهبود رشد باکتری‌ها (Sparty,1971) می‌گردند، اما این تعریف عمومیت پیدا نکرد.

Parker (۱۹۷۴)،برای اولین بار واژه پروبیوتیک را به صورت مکمل جیره غذایی حیوانات بکار برد و آن را چنین تعریف نمود:

«پروبیوتیک‌ها عبارتند از ارگانیزم‌ها یا موادی که در تعادل میکروبی روده میزبان نقش دارند»

Tannok (۱۹۹۷) ،بیان داشت که تاثیر پروبیوتیک‌ها در «تعادل میکروبی روده» در بسیاری از حالات اثبات نشده است، بنابراین تعریف «سلول‌های میکروبی زنده اند که به عنوان نوعی مکمل غذایی جهت بهبود سلامتی میزبان مصرف می‌گردند» را مطرح کرد. Fuller (۱۹۸۹)، با حذف واژه مواد از تعریف اخیر که ممکن بود شامل آنتی بیوتیک‌ها و مواد محرک رشد باکتریایی شود، تعریف جدیدی از پروبیوتیک‌ها را ارائه کرد: «باکتری‌های مکمل غذایی که با بهبود تعادل میکروبی روده اثرات سودمندی بر سلامت میزبان دارند». Gramو همکاران (۱۹۹۹)، اظهار کردند که پروبیوتیک هر نوع مکمل میکروبی زنده است که از طریق بهبود تعادل میکروبی روده تاثیر سودمندی در میزبان ایجاد می‌کنند.

1- Direct-fed microbial
2- Probiotic
3- Probios
4- Against life
5- For life

Salminen و همکاران (۱۹۹۹)، پروبیوتیک را به عنوان هر نوع ترکیب میکروبی (و نه الزاما زنده) یا سلول‌های میکروبی با تاثیرات مفید در سلامتی میزبان معرفی کردند.

در آبزی پروری اولین بار YasudaوTaga (۱۹۸۰)، پیش بینی کردند که باکتری‌هایی وجود دارند که نه تنها به عنوان غذا بلکه به عنوان کنترل کننده بیولوژیک بیماری‌های آبزیان و فعال کننده چرخه مواد غذایی عمل می‌کنند. بر اساس توانایی میکروارگانیزم‌ها در اصلاح ترکیب باکتریایی آب و رسوبات، Moriartyو همکاران (۱۹۹۸)، پیشنهاد بسط تعریف پروبیوتیک‌ها را به افزودنی‌های تک یاخته‌ای آب بیان داشتند، که با ایده کنترل بیولوژیک ارائه شده توسط Maedaو همکاران (۱۹۹۷)، هماهنگی دارد. Gatesoup (۱۹۹۹)، تعریف دیگری از پروبیوتیک‌ها را در آبزی پروری ارائه نمود: پروبیوتیک‌ها شامل سلول‌های تک یاخته‌ای هستند که از طریق ورود به لوله گوارشی میزبان و قابلیت زنده ماندن و یا با هدف بهبود سلامتی مورد استفاده قرار می‌گیرند. این تعریف بر مصارف خوراکی پروبیوتیک و قابلیت آن در بهبود سلامتی میزبان به حضور در لوله گوارشی تاکید دارد و از جامع‌ترین تعاریف پروبیوتیک در آبزی پروری می‌باشد. در نهایت kaurt و همکاران (۲۰۰۴)، تعریف دیگری از پروبیوتیک‌ها را ارائه کردند: «میکروارگانیزم‌های زنده که بعد از بلع در بعضی افراد، اثرات مفیدی فراتر از خواص پایه‌ای تغذیه‌ای در سلامتی نشان می‌دهند».

طبق نظر Fuller (۱۹۸۹)، پروبیوتیک‌ها باید دارای اثرات سودمند در بدن میزبان بوده و همچنین قادر به زنده ماندن در لوله گوارش میزبان، ازدیاد در مقیاس انبوه و ادامه حیات برای مدت زمان طولانی به هنگام نگهداری باشند. همچنین باید در محدوده وسیع دمایی و شوری کارآیی داشته باشند. امروزه پروبیوتیک‌ها نه تنها به عنوان محرک رشد، بلکه برای تحریک سیستم ایمنی بدن و پیشگیری از ابتلا به بسیاری از بیماری‌های عفونی به کارگرفته می‌شوند (پورامینی وحسینی فر، ۱۳۸۶).

۲-۲- ویژگی یک پروبیوتیک موثر

یک پروبیوتیک موثر باید در شرایط محیطی مختلف خاصیت خود را حفظ نموده و در اشکال مختلف به صورت فعال باقی بماند. بنابراین، باید ویژگی و مشخصات زیر را داشته باشد:

- ✓ به عنوان یک محصول زنده امکان تولید آن در مقیاس صنعتی وجود داشته باشد.
- ✓ به هنگام انبار کردن و در زمان مصرف در مزارع به مدت طولانی قابل نگهداری بوده و ثابت باقی بماند.
- ✓ در محیط روده تاثیر خود را حفظ نماید.
- ✓ در سلامتی میزبان تاثیر مثبت داشته باشد.

یک میکروارگانیزم به منظور داشتن فعالیت مطلوب باید با تراکم مناسب و کافی در جیره غذایی مصرف شود. امروزه ثابت شده میکروارگانیزم‌هایی که با غلظت‌های کمتر از 10^6 CFU/gr تا 10^7 در فلور روده وجود دارند، توانایی ایجاد تعادل بین جمعیت خود و باکتری‌های ساکن روده را نداشته در نتیجه نمی‌توانند یک فعالیت مناسب و همچنین اثر قابل قبولی بر سلامتی میزبان داشته باشند. در ضمن میکروارگانیزم‌های مورد استفاده به عنوان پروبیوتیک نباید بیماری‌زا و مسمویت‌زا بوده و برای سلامتی انسان مشکلاتی را ایجاد نمایند (Atlas *et al.*, 1997).

۳-۲- اثرات سودمند به کارگیری پروبیوتیک‌ها

- ✓ پروبیوتیک‌ها دارای اثرات مثبتی بر عملکرد دام، طیور و آبزیان بوده که به اختصار شامل موارد زیر می باشد:
- ✓ بهبود رشد: این اثر بطور عمده از کاهش عفونت ناشی از فعالیت میکروارگانیزم‌های عامل کاهش رشد حاصل می-گردد.
- ✓ بهبود به کار گیری غذا: این امر از طریق افزایش کارآیی فرآیندهای موجود در هضم مواد غذایی یا بهینه سازی روند هضم حاصل می‌گردد که قبلا غیر قابل هضم بودند.
- ✓ افزایش تولید: باعث افزایش در میزان تولید می‌گردند.

بهبود وضعیت سلامتی: این امر افزایش مقاومت در برابر بیماری‌های عفونی از طریق تضاد مستقیم یا تحریک ایمنی را شامل می‌گردد (Ali, 2000).

۴-۲- کاربرد پروبیوتیک‌ها

امروزه حضور پروبیوتیک‌ها را می‌توان در تمام زمینه‌های تولید کشاورزی، آبزی پروری و محیط زیست مشاهده نمود. در آبزی پروری این صنعت به تازگی جایگاه خود را پیدا کرده است و تقریبا در تمام جنبه‌های آن کاربرد دارد (قشقایی و لایق، ۱۳۸۳).

۱-۴-۲- کاربرد در هچری‌ها برای حفاظت تخم و لارو ماهی

هم اکنون در هچری‌ها به منظور جلوگیری از عفونت و بیماری به مقدار زیادی از آنتی بیوتیک‌ها یا ترکیبات شیمیایی استفاده می‌شود. همانطور که گفته شد استفاده از آنتی بیوتیک‌ها همیشه مفید نبوده و در برخی موارد باعث تغییر غیر مطلوب جمعیت میکروبی آب پرورشی می‌گردد. به عنوان مثال حضور باکتری‌های چسبنده غیر بیماری زا با یک تراکم مناسب بر روی تخم‌ها می‌تواند سد موثری برای تشکیل پرگنه‌های میکروبی و قارچی محسوب شود. با توجه به اینکه فلور باکتریایی روده و موکوس پوست آبزی نقش مهمی در میزان بقا و مقاومت آن دارد، تلاش جهت برقراری یک فلور میکروبی مناسب می‌تواند مد نظر قرار گیرد. فلور میکروبی روده و پوست بواسطه بلعیدن و تماس با باکتری‌های موجود در آب یا بلعیدن باقی مانده-های تخم، که در آب معلق هستند، تشکیل می‌شود (Hansen *et al,* 1992).

۲-۴-۲- کاربرد در ماهیان پرورشی و مولد

پروبیوتیک‌ها در این خصوص کاربرد زیادی دارند و محصولات تجاری و دست ساز بسیاری را در تمام جنبه‌های پرورش ماهیان می‌توان پیدا کرد. در پرورش ماهیان به صورت مدار بسته بخش مهمی از سیستم تصفیه را بیوفیلترها (به خصوص باکتری‌هایی که موجب عمل نیتریت زدایی[1] می‌شوند) تشکیل می‌دهند. در مورد ماهیان گرمابی که محیط آب پرورشی ساکن و مملو از باکتری‌های گوناگون است، توانایی در کنترل جمعیت میکروبی و جلبکی و بهبود کیفیت آب از جمله کاربردهای

1- Denitrification

پروبیوتیک‌ها به شمار می‌رود. در مورد مولدین استفاده از پروبیوتیک‌ها در تشکیل فلور میکروبی تخم‌ها در هنگام تخم ریزی موثر هستند (قشقایی و لایق، ۱۳۸۳).

۳-۴-۲- کاربرد در هچری و مزارع پرورش میگو

در دهه‌های اخیر تولید و پرورش میگو با نرخ رشد سالانه ۱۶/۸ درصد بیشترین رشد را در بخش تولید غذای جهان داشته است. در این میان، طبق گزارش بانک جهانی، خسارات جهانی درنتیجه بیماری‌های میگو حدود ۳ میلیارد دلار آمریکا بوده است (پورامینی و حسینی فر، ۱۳۸۶). حضور پروبیوتیک‌ها در این صنعت به خوبی مشاهده می‌شود. بسیاری از محصولات موجود در بازار برای مصرف در هچری های میگوها عرضه می‌شود (قشقایی و لایق، ۱۳۸۳). علیرغم کاربرد گسترده پروبیوتیک‌ها در محل‌های تخم ریزی میگوی *پنائیده*[1] تجاری (Moriarty, 1998)، مطالعات کمی در این رابطه انجام گرفته است. می‌توان گفت که بیشترین مصرف پروبیوتیک ها در مزارع پرورش میگو بوده و به همین جهت نیز بیشترین میزان تولید غذایی در این زمینه دیده می‌شود. به جهت راکد بودن آب محیط‌های پرورشی پروبیوتیک‌ها می‌توانند کاربردهای زیادی را در بهبود کیفیت آب با تجزیه مواد آلی کف استخر تا کاهش میزان نیتروژن آمونیاکی آب داشته باشند، به علاوه در زمینه سیستم ایمنی ساده و ابتدایی میگو می‌توان تاثیر مثبتی را در مورد فلور میکروبی مناسب روده جاندار با کاهش عوامل استرس-زا انتظار داشت (Moriarty,1998).

۴-۴-۲- کاربرد در زمینه ماهیان زینتی و آکواریومی

محصولاتی را نیز در این زمینه چه برای ماهیان آب شیرین و چه آکواریوم ماهی‌های دریایی آکواریومی می‌توان دید که در بیشتر آنها تکیه اصلی بر کاهش و حذف نیتروژن آمونیاکی آب است (قشقایی و لایق، ۱۳۸۳).

ازجمله سایر کاربردهای پروبیوتیک‌ها در زمینه پرورش خرچنگ، نرمتنان دو کفه‌ای، غذاهای زنده (روتیفر، جلبک، آرتمیا) و حتی تصفیه آب می‌باشد (Douillet and Langdon, 1994; Fukami *et al*, 1997).

۵-۲- انواع پروبیوتیک‌های مورد استفاده در آبزی پروری

پروبیوتیک‌هایی که در پرورش آبزیان مورد توجه قرار گرفته‌اند شامل باکتری‌های گرم مثبت، گرم منفی، باکتریوفاژها، مخمرها و جلبک‌های تک سلولی می‌باشند. اولین پروبیوتیک که در سال‌های پیش کشف شد جنس *لاکتوباسیلوس*[2] (باکتری‌های تولیدکننده اسید لاکتیک) بودند (جدول ۱-۲). از جمله مهمترین پروبیوتیک‌ها، *لاکتوباسیلوس*ها و *کارنوباکتریوم*ها، *استرپتوکوکوس*، *لکونوستوک* و *باسیلوس*ها از گروه باکتری‌های گرم مثبت، *سودوموناس*ها از گروه باکتری‌های گرم منفی را می‌توان نام برد (Balcazar *et al*, 2006).

1- *Penaeidae*
2 - *Lactobacillus* sp.

جدول ۱-۲. پروبیوتیک‌های مورد استفاده در ماهی به عنوان عامل کنترل کننده بیولوژیکی در آبزی پروری (Balcazar *et al.*,2006).

منبع	روش استفاده	استفاده شده در	منبع	سویه پروبیوتیک
Garcia de la Banda *et al.* (1992)	غنی سازی غذای زنده	Turbot larvae (*Scophthalmus maximus*)		*Streptococcus lactis* and *Lactobacillus bulgaricus*
Gatesoupe (1994)	غنی سازی روتیفر	Turbot larvae	Rotifers (*Brachionus plicatilis*)	*Lactobacillus sp.* and *Carnobacterium sp.*
Austin *et al.* (1995)	حمام باکتریایی	Atlantic salmon (*Salmo salar L.*)	Commercial shrimp hatchery	*Vibrio alginolyticus*
Gildberg and Mikkelsen (1998)	تعلیق در آب	Atlantic cod fry	Intestines of Atlantic salmon	*Carnobacterium divergens*
Queiroz and Boyd (1998)	اضافه کردن به جیره غذایی	Channel catfish	Commercial product (Biostart)	*Bacillus megaterium, B. subtilis, B. polymyxa, B. licheniformis*
Ringø and Vadstein (1998)	اضافه کردن به آب استخر	Turbot	Turbot larvae	*Vibrio pelagius*
Naik *et al.* (1999)	اضافه کردن به آب استخر	*Oreochromis niloticus*	Commercial product	G-probiotic
Gram *et al.* (1999)	اضافه کردن به جیره غذایی	Rainbow trout	Iced freshwater fish (*Lates niloticus*)	*Pseudomonas fluorescens*
Robertson *et al.* (2000)	اضافه کردن به آب استخر	Atlantic salmon	Intestines of Atlantic salmon	*Carnobacterium sp.*
Nikoskelainen *et al.* (2001)	اضافه کردن به جیره غذایی	Rainbow trout	Culture collection	*Lactobacillus rhamnosus* ATCC 53103
Irianto and Austin (2002)	اضافه کردن به جیره غذایی	Rainbow trout	Digestive tract of rainbow trout	*Aeromonas hydrophila, Vibrio fluvialis, Carnobacterium sp., Micrococcus luteus*
Chang and Liu (2002)	اضافه کردن به جیره غذایی	*Anguilla anguilla*	Commercial product (Cernivet)	*Enterococcus faecium* SF68
Panigrahi *et al.* (2004)	اضافه کردن به جیره غذایی	Rainbow trout	Culture collection	*L. rhamnosus* JCM 1136
Hjelm *et al.* (2004)	اضافه کردن به آب استخر	Turbot larvae	Turbot larvae, Tetraselmis copepod-fed larvae	*Roseobacter sp.* strain 27-4
Ghosh *et al.*(2004)	اضافه کردن به جیره غذایی	*L. rohita*	Intestines of Labeo rohita	*Bacillus circulans*

در آبزی پروری بطور عمده از مخمرهای صنعتی، به شکل زنده جهت تغذیه ارگانیزم‌های غذایی زنده یا پس از فرآوری به صورت اجزای غذایی، استفاده می‌گردد (Stonea and Mills, 2004). از برخی ترکیبات استخراج شده از مخمرها مانند بتا-گلوکان نیز به عنوان محرک ایمنی استفاده می‌شود و امروزه مخمرهای زنده به عنوان پروبیوتیک استفاده می‌شوند. در مورد میکروآلگ‌ها به عنوان پروبیوتیک مطالعات کمی انجام شده است. مطالعات انجام شده بیشتر بر نقش میکروآلگ‌ها به عنوان کاهش دهنده جمعیت باکتری‌های بیماری زا در ماهیان تاکید داشته است (Stonea and Mills, 2004).

در اینکه باکتریوفاژها جزو پروبیوتیک‌های واجد شرایط هستند یا نه اختلاف نظر وجود دارد. محققین تاثیر باکتریوفاژها را بر جمعیت باکتری‌های بیماری‌زای شایع مارماهی[1] پرورشی بررسی کرده و به این نتیجه رسیده‌اند که تعداد سلول‌های باکتریایی موجود در کلیه‌ها و آب پرورشی کاهش سریعی داشته است (پورامینی وحسینی فر، ۱۳۸۶).

1 - *Anguila*