بررسی مقایسه ای اثرات لوامیزول بر فلور باکتریایی دستگاه گوارش قزل آلای رنگین کمان (*Oncorhynchus mykiss*) در سنین مختلف

سعید مشکینی*[1]، امیر توکمه چی[2]

۱- استادیار دانشکده دامپزشکی و پژوهشکده آرتمیا و آبزیان دانشگاه ارومیه

۲- استادیار پژوهشکده آرتمیا و آبزیان دانشگاه ارومیه

* Email: s.meshkiniy@urmia.ac.ir

چکیده

به منظور ارزیابی اثر لوامیزول بر تغییرات فلور باکتریایی روده‌ی ماهی قزل آلای رنگین کمان، ۱۵۰۰ عدد بچه ماهی ۵۰ گرمی و ۱۱۲۵ عدد ماهی قزل آلای ۱۵۰ گرمی پرواری به‌صورت جداگانه به مدت ۶۰ روز تحت پرورش قرار گرفتند. کلیه ماهی ها در هر دو آزمایش با پنج جیره غذایی حاوی صفر (گروه شاهد)، ۱۰۰ ، ۲۵۰ ، ۵۰۰ و ۱۰۰۰ میلی‌گرم لوامیزول در کیلوگرم غذا تغذیه شدند و به منظور بررسی فلور باکتریایی روده در ابتدای دوره‌ی آزمایش (روز صفر) و نیز هر ۱۵ روز یکبار تا پایان آزمایش از دستگاه گوارش ماهیان نمونه برداری صورت گرفته و تحت بررسیهای باکتریایی قرار گرفت. نتایج نشان داد که لوامیزول عامل اصلی تثبیت باکتری های گرم مثبت فلور روده در بچه ماهیان ۵۰ گرمی می باشد در حالیکه در ماهیان گروه ۱۵۰ گرمی، لوامیزول نقشی در تعیین جمعیت باکتریایی روده نداشت. صرف نظر از تاثیر لوامیزول، در پایان دوره پرورش، در ماهیان گروه ۱۵۰ گرمی باکتری های فلور طبیعی روده از تنوع جمعیتی بیشتری برخوردار بودند.

کلمات کلیدی: قزل آلای رنگین کمان، محرک ایمنی، لوامیزول، فلور باکتریایی روده

مقدمه

از عمده ترین مسائلی که پرورش دهندگان ماهی در امر پرورش با آن مواجه هستند، بالا بردن میزان ماندگاری و بهبود شرایط ایمنی و تغذیه‌ای ماهیان خصوصا در مراحل اولیه زندگی می باشد. لذا ارتقای سیستم ایمنی و دفاعی بدن ماهیان با استفاده از محرک های ایمنی و پروبیوتیک‌ها به ویژه در گونه های با ارزش اقتصادی از اصلی‌ترین نیازهای پرورش‌دهندگان و مهم‌ترین رویکردهای محققان در این راستا می باشد. علاوه بر این، بروز و شیوع بیماری ها در کنار پیشرفت و توسعه‌ی صنعت آبزی پروری، از لحاظ اقتصادی این صنعت را تحت تأثیر قرار داده، به نحوی که امروزه کنترل برخی از بیماری ها به امری دشوار تبدیل شده است(Roberts and Shepherd 1997).

استفاده از محرک های ایمنی یکی از روش‌هایی است که برای کنترل بیماری ها و بهبود سیستم ایمنی و تغذیه و رشد در آبزی پروری به کار می‌رود. تاثیر بهبود بخشی محرک‌هایی مانند گلوکان[5]، لاکتوفرین[6]، کیتین[7] و لوامیزول[8] بر سیستم ایمنی ماهیان و میگوها گزارش شده است (Kakuta and Kurokura,1995).

5- Glucan
6- Lactoferin
7- Chitin
8- Levamisole

استفاده از محرک های ایمنی می تواند از ابتلای ماهی به چندین بیماری جلوگیری کند و میزان مرگ و میر آن را پایین آورد. ماهیان و میگوهایی که محرک ایمنی دریافت نموده اند مقاومت بالایی در برابر بیماری های باکتریایی نظیر *Vibrio anguillarum*، *Vibrio salmanicida*، *Aeromonas salmanicida* و *Streptococcus sp* و آلودگی ویروسی مانند IHN و باکولوویروس سر زرد[9] و آلودگی انگلی مثل بیماری لکه سفید نشان داده‌اند (Nelson et al., 1989، Gutenberger et al., 1997، Baldwin and Newton, 1996).

سیستم فیزیولوژیکی و فلور باکتریایی روده در بچه ماهیان با افزایش سن آنها روندی تکاملی داشته که در سنین پایین و قبل از شکل‌گیری کامل این فلور باکتریایی روده، می توان دستکاری های راحت تری را در آنها اعمال نمود. از جمله راه های اعمال این دستکاری‌ها استفاده از پروبیوتیک ها و نیز محرک های ایمنی می باشد. تا کنون روش خوراکی برای محرک های ایمنی همچون گلوکان ها، EF203، لاکتوفرین، لوامیزول و کیتوزان گزارش شده است. این روش بدون استرس بوده و استفاده از محرک را (Jorgensen et al., 1993a، Kitao and Yoshida, 1986) بدون توجه به اندازه ماهی مقدور می سازد.

لوامیزول اساسا یک داروی ضد کرم بوده که برای مبارزه با آلودگی با نماتودها در انسان و حیوانات مورد استفاده قرار می‌گیرد. مشاهدات ضمنی نشان داده‌اند که لوامیزول باعث بهبود شاخص های رشد، افزایش مقاومت و بازماندگی در برابر آلودگی های مختلف و بهبود فلور باکتریایی روده ماهیان هم می شود (Taraschewski et al., 1988 ، Suchanit et al., ،Symoens and Rosenthall, 1977 2010، Sanford, 2007).

لذا با توجه به نقش مهم و استفاده رو به رشد محرک های ایمنی در آبزی‌پروری، در تحقیق پیش رو بررسی نقش محرک ایمنی لوامیزول در بهبود بخشی به فلور باکتریایی روده ماهی مهم و اقتصادی قزل آلای رنگین کمان (*Oncorhynchus mykiss*) در مقطع‌های وزنی مختلف صورت پذیرفت تا چگونگی تغییرات فلور باکتریایی این ماهی در سنین مختلف، هرچند دقیق تر آشکار گردد و گامی در جهت بهبود شرایط ایمنی این ماهی در مراکز پرورش ماهی برداشته شود.

مواد و روش ها

۱-تهیه و قرنطینه ماهیان

تعداد ۲۶۲۵ عدد ماهی قزل آلای رنگین کمان ۵۰ گرمی (۱۵۰۰ عدد) و ۱۵۰ گرمی (۱۱۲۵ عدد) از یکی از مزارع پرورش ماهی قزل آلای رنگین کمان تهیه شده و توسط تانکر مخصوص حمل ماهی مجهز به کپسول اکسیژن به پژوهشکده آرتمیا و آبزیان دانشگاه ارومیه منتقل گردید. بعد از یک هفته دورهٔ سازگاری ماهیان جهت رفع استرس حمل و نقل، عادت به شرایط جدید پرورشی و قرنطینه آنها برای اطمینان از سلامتی ظاهری ماهیان مورد آزمایش، ماهیان مورد نظر به تعداد مساوی در ۱۵ وان ۳۰۰ لیتری پلی اتیلنی استوانه‌ای شکل با حجم آبگیری ۱۵۰ لیتر (۱۰۰ عدد در هر وان در وزن ۵۰ گرمی و ۷۵ عدد در هر وان در وزن ۱۵۰ گرمی) تقسیم شدند.

ماهیان در پنج تیمار غذایی (یک گروه شاهد و چهار گروه تیماری) با مقادیر ۰ ، ۱۰۰، ۲۵۰، ۵۰۰ و ۱۰۰۰ میلی‌گرم داروی لوامیزول[10] در هر کیلوگرم غذا و با سه تکرار به مدت دو ماه (۴۵ روز تحت تیمار با لوامیزول و ۱۵ روز بدون لوامیزول) تحت پرورش قرار گرفتند. طی دوره‌ی پرورش اندازه‌گیری اکسیژن (به طور روزانه بوسیلهٔ دستگاه دیجیتالی اکسی متر ساخت شرکت CRISON اسپانیا مدل P 45)، pH و دمای آب (به طور روزانه بوسیلهٔ دستگاه دیجیتالی pH متر شرکت Elmetron با مدل CP-411)، نیتریت، نیترات و آمونیاک آب (به صورت هفتگی و با دستگاه فتومتر 7500 ساخت شرکت پالین

9- Yellow Head Baculovirus

10- ((S)-6-Phenyl2,3,5,6tetrahydroimidazo[2,1-b][1,3]thiazole)

انگلستان) صورت گرفت. آب مورد نیاز برای پرورش ماهیان قزل آلا از یک حلقه چاه عمیق تامین گردید.

۲- تهیه جیره غذایی و غذادهی

غذای ماهیان ۵۰ و ۱۵۰ گرمی قزل آلا به ترتیب از نوع تجارتی (Growth food trout) GFT-1 و GFT-2 با ترکیب ۴۰ درصد پروتئین خام، ۱۴ درصد چربی، ۱۰ درصد خاکستر، ۴ درصد فیبر، ۱/۱ درصد فسفر و ۱۱ درصد رطوبت از شرکت چینه تهران تهیه گردید. مقدار غذای مورد نیاز هر گروه از ماهیان با توجه به میانگین وزن، دمای آب و با استفاده از جدول استاندارد غذادهی تعیین گردید (Hardy, 2002).

برای تهیه جیره حاوی لوامیزول، روزانه غذای هر تیمار با ترازوی دیجیتالی (با دقت ۰/۰۰۱ گرم) وزن شده و سپس مقدار لوامیزول لازم برای هر تیمار با توجه به مقادیر ۱۰۰ ، ۲۵۰ ، ۵۰۰ و ۱۰۰۰ میلی گرم در هر کیلوگرم غذا، با ترازوی دیجیتالی (با دقت ۰/۰۰۱ گرم) وزن و در ۱۵ سی سی آب مقطر حل گردید و با آب پاش مخصوص هر تیمار، روی غذای آن تیمار اسپری گردید. پس از ۲ ساعت خشک شدن غذا در دمای اتاق، تا زمان استفاده در یخچال ۴ درجه سانتیگراد (Meshkini et al., 2012) نگهداری شدند. در گروه شاهد، فقط ۱۵ میلی لیتر آب مقطر روی غذا اسپری شد تا تفاوت غذای آن با سایر گروه ها تنها در مقدار لوامیزول غذا باشد.

۳- نمونه برداری و انجام آزمایش های باکتریایی

برای تعیین اثر لوامیزول بر فلور باکتریایی روده در روزهای نمونه برداری صفر (قبل از شروع آزمایش)، ۱۵، ۳۰، ۴۵ و ۶۰ دوره تیماری، از هر تیمار غذایی تعداد ۲۷ عدد ماهی به صورت کاملا تصادفی انتخاب و بلافاصله در آزمایشگاه باکتری شناسی پژوهشکده آرتمیا مورد بررسی باکتری شناسی قرار گرفتند. جهت انجام این کار در شرایط استریل و به کمک اسکالپل و قیچی در کنار شعله اقدام به کالبدگشایی گردید. سپس روده ماهیان با دقت از جلوی زواید باب‌المعده‌ای تا یک سانتیمتر جلوتر از مخرج به کمک نخ استریل لیگاتور زده شد. پس از قطع اتصال روده ها از محل‌های بسته شده، کل روده ها از بدن ماهی خارج و با سرم فیزیولوژی شست و شو داده شد و پس از باز کردن دیواره روده محتویات روده در داخل لوله آزمایش استریل حاوی سرم فیزیولوژی جمع آوری گردید.

به منظور شمارش باکتریایی محتویات روده (در صورتیکه وزن محتویات کمتر از ۵۰۰ میلی گرم نباشد)، نسبت مشخصی از محتویات روده به حجم ثابتی از سرم فیزیولوژی (۵۰۰ میلی گرم به ۴/۵ میلی لیتر یا ۱ گرم به ۹ میلی لیتر سرم فیزیولوژی استریل) افزوده شده و پس از یکنواخت کردن نمونه، رقت سریال از 10^{1} تا 10^{8} تهیه و شمارش زنده باکتریایی (Viable count) محتویات روده روی محیط کشت باکتریایی TSA (تهیه شده از شرکت مرک آلمان) انجام شد (Cuesta et al., 2004).

همچنین به منظور تعیین فلور باکتریایی غالب روده ماهیان پس از جمع آوری محتویات روده در شرایط استریل، محتویات روده روی محیط های TSA، آگار خون دار، MRS آگار و سودوموناس آگار کشت داده شد. پلیت های کشت داده شده مدت ۲۴ تا ۴۸ ساعت در دمای ۲۲ درجه سانتیگراد و در شرایط هوازی و بی هوازی انکوبه شدند. سپس در صورت رشد کلنی های مشاهده شده ابتدا خالص سازی کلنی ها و در مرحله بعد، پس از تهیه‌ی لام گرم و انجام تست های بیوشیمیایی شناسایی باکتری های جدا شده انجام گرفت. در این بررسی به منظور تشخیص جنس و گونه‌ی باکتری ها از تست های بیوشیمیایی و افتراقی کاتالاز، اکسیداز، اوره آز، ذوب ژلاتین، احیای نیترات، حرکت، اندول، تولید گاز H2S، سیمون سیترات، همولیز و نیز آزمایش های مربوط به تخمیر قندها از جمله لاکتوز، سالین، گلوکز، تره هالوز، رافینوز، رامنوز، فروکتوز، گالاکتوز و سوربیتول استفاده شد (Cuesta et al., 2004).

نتایج

بر اساس نتایج اندازه گیری های پارامترهای فیزیکوشیمیایی بدست آمده، تغییرات دمایی در کلیه موارد

در محدوده ۱۴ درجه سانتی گراد می باشدکه به ترتیب حداکثر میانگین دما ۱۴/۲۴±۰/۱۴ درجه سانتی گراد و حداقل آن ۱۴/۰۳±۰/۱ درجه سانتی گراد مشاهده شد.
بیشترین میانگین غلظت اکسیژن در آب ورودی معادل ۷/۶۳ ±۰/۴۲ میلی گرم در لیتر و کمترین میانگین آن در آب خروجی (۷/۱۷±۰/۳۴ میلی گرم در لیتر) مشاهده شد.
pH آب در کلیه موارد در محدوده قلیایی قرار داشته، بطوریکه حد پایین آن ۷/۲۱±۰/۲۲ (آب ورودی) و حد بالای آن ۷/۳۷±۰/۱ (آب خروجی) می باشد.
حداکثر غلظت یون نیتریت در محدوده ۰/۰۲ میلی گرم در لیتر می باشد. کمترین و بیشترین غلظت یون نیترات متعلق به آب خروجی تیمارهای مختلف بترتیب با غلظت ۲/۷۳±۰/۷۹ میلی گرم در لیتر و ۳/۶۱±۱/۳۵ است.
ماکزیمم و مینیمم تغییرات غلظت یون آمونیوم نیز به ترتیب ۰/۵۷±۰/۱۴ میلی گرم در لیتر در آب ورودی و ۰/۳۳±۰/۱۸ میلی گرم در لیتر در آب خروجی مشاهده گردید.
گونه های باکتری های موجود در دستگاه گوارشی ماهیان مطالعه شده از نظر گرم منفی/ مثبت، طبیعی (فلور)/ غیر طبیعی (غیر فلور) و نیز درصد فراوانی هر کدام برای ماهیان گروه ۵۰ و ۱۵۰ گرم به تفکیک تیمار بترتیب در جدول ۱ و ۲ نشان داده شده است.
بر اساس جداول ۱ و ۲ باکتری های *Arcantobacter* sp.، *Citrobacter* sp.، *Citrobacter divergens* و *Pseudomonas teromonas* گونه هایی هستند که هیچ گزارشی از آنها در گروه ماهیان ۵۰ گرم وجود ندارد، از طرفی گونه های *Xanthobacter* sp.، *Aeromonas* sp.، *Entrobacter cloacae*، *Eikenella cloacae*، *Aeromonas veronill*، *Pseudomonas* sp.، *Basilus* sp.، *Lactobacillus planarumt* در گروه ۱۵۰ گرم مشاهده نشدند.
روند افزایشی درصد فراوانی باکتر های گرم مثبت در گروه ماهیان ۵۰ گرم در تیمارهای مربوط به غلظت های مختلف لوامیزول مشاهده می شود. در گروه ماهیان ۱۵۰ گرمی هم در کلیه تیمارها باکتری گرم مثبت در روز اول با ۵۵/۵۸ درصد از غالبیت برخوردار می باشند که تا روز ۶۰، غالببودن باکتری‌های گرم مثبت حالت افزایشی نشان می-دهند. هم‌چنین در ماهیان ۵۰ گرمی از روز ۴۵ علی‌رغم حفظ غالب بودن باکتری‌های طبیعی روده درصد فراوانی باکتری های غیر طبیعی دستخوش تغییرات افزایشی نسبت به قبل می شود اما در ماهیان ۱۵۰ گرمی غالبیت مطلق باکتری های طبیعی روده در تمام طول تحقیق ثابت مانده است.

بحث و نتیجه گیری

McNeely و Neimanis در سال ۱۹۷۹ محدوده استاندارد شاخص های فیزیکوشیمیایی آب پرورشی قزل آلا را بیان نموده اند که با توجه به این محدوده های استاندارد و با در نظر گرفتن میانگین پارامترهای فیزیکوشیمیایی آب مورد استفاده برای پرورش ماهیان قزل آلا مشخص می شود کلیه مقادیر این شاخص ها در تحقیق حاضر در محدوده استاندارد برای ماهی قزل آلا بوده و از این رو نتایج بدست آمده در این مطالعه تحت تاثیر فاکتورهای فیزیکوشیمیایی نبوده است. آئروموناس ها، پزودوموناس ها و انتروباکتریاسه‌ها گونه‌های غالب در فلور روده ای ماهی های آب شیرین می‌باشند. پایداری بیشتر میکروب ها در بدن حیوانات آبزی ناچیز است و بدلیل اینکه این حیوانات خونسرد هستند میکروب‌های همزیست با آنها نسبت به تغییر درجه حرارت متفاوت خواهند بود، ضمن اینکه تغییر شوری آب نیز احتمالا میکروب ها را تحت تاثیر قرار خواهد داد. بنابراین استفاده از موادی مانند پروبیوتیک ها و خصوصا محرک های ایمنی که قادر به تثبیت فلور مناسب روده ای یا ایجاد یک فلور روده ای مناسب و مفید در سنین پایین ماهیان باشد، می تواند بسیار حائز اهمیت باشد (Jobron et al., 1997، Steiner, 2006، Pasteiner, 2006).

جدول ۱- درصد فراوانی و انواع گونه های باکتری های جدا شده از دستگاه گوارش بچه ماهیان قزل آلای ۵۰ گرمی

نوع تیمارها (شاهد و تیمارهای لوامیزول)				شاهد				لوامیزول ۱۰۰ میلی گرم				لوامیزول ۲۵۰ میلی گرم				لوامیزول ۵۰۰ میلی گرم				لوامیزول ۱۰۰۰ میلی گرم			
روز های نمونه برداری	گرم مثبت/منفی	غیر طبیعی (U)/ طبیعی (N)	روز صفر	روز ۱۵	روز ۳۰	روز ۴۵	روز ۶۰	روز ۱۵	روز ۳۰	روز ۴۵	روز ۶۰	روز ۱۵	روز ۳۰	روز ۴۵	روز ۶۰	روز ۱۵	روز ۳۰	روز ۴۵	روز ۶۰	روز ۱۵	روز ۳۰	روز ۴۵	روز ۶۰
نوع باکتری ها																							
Aeromonas sp.	-	N	۴۰	۵۰	-	-		۳۳,۳۴	۵۰	-		۶۶,۶۶	۵۰	-		-	-	-		-	-	-	
Xanthobacter sp.	-	N	۱۰	-	-	-		-	-	-		-	-	-		-	-	-		-	-	-	
Eikenella cloacae	-	N	۱۰	-	-	-		-	-	-		-	-	-		-	-	-		-	-	-	
Aeromonas media	-	N	۲۰	-	۵۰	۲۰		۶۶,۶۶	۵۰	-		-	-	۲۰		۳۳,۳۳	۲۵	۲۰		-	۱۶,۶۶	-	
Entrobacter cloacae	-	N	۱۰	-	-	-		-	-	-		-	-	-		-	-	-		-	-	-	
Pseudomonas sp.	-	N	۱۰	-	-	-		-	-	-		-	-	-		-	-	-		-	-	-	
Aeromonas veronill	-	U	-	۵۰	-	-		-	-	-		-	-	-		-	-	-		--	-	-	
Basilus cereus	+	N	-	-	-	۲۰		-	-	۳۳,۳۳		۳۳,۳۴	۵۰	۲۰		۳۳,۳۳	۲۵	۴۰		۱۰۰	۵۰	۲۵	
Basilus sp.	+	U	-	-	-	-		-	-	۳۳,۳۳		-	-	۲۰		۳۳,۳۳	۲۵	-		-	-	۲۵	
Basilus sabtilis	+	N	-	-	۵۰	۲۰		-	-	۳۳,۳۳		-	۵۰	۲۰		-	۲۵	۴۰		-	۳۳,۳۴	۵۰	
Lactobacillus plantarum	+	N	-	-	-	۲۰		-	-	-		-	-	۲۰		-	-	-		-	-	-	
Lactobacillus sp.	+	N	-	-	-	۲۰		-	-	-		-	-	-		-	-	-		-	-	-	
Arcantobacter sp.	+	U	-	-	-	-		-	-	-		-	-	-		-	-	-		-	-	-	
Citrobacter sp.	-	N	-	-	-	-		-	-	-		-	-	-		-	-	-		-	-	-	
Citrobacter divergens	-	N	-	-	-	-		-	-	-		-	-	-		-	-	-		-	-	-	
Pseudomonas teromonas	-	U	-	-	-	-		-	-	-		-	-	-		-	-	-		-	-	-	

جدول ۲- درصد فراوانی و انواع گونه های باکتری های جدا شده از دستگاه گوارش ماهیان قزل آلای پرواری ۱۵۰ گرمی

نوع تیمارها (شاهد و تیمارهای لوامیزول)				شاهد				لوامیزول ۱۰۰ میلی گرم				لوامیزول ۲۵۰ میلی گرم				لوامیزول ۵۰۰ میلی گرم				لوامیزول ۱۰۰۰ میلی گرم			
روز های نمونه برداری / نوع باکتری ها	گرم مثبت/منفی	طبیعی (N) / غیر طبیعی (U)	روز صفر	روز ۱۵	روز ۳۰	روز ۴۵	روز ۶۰	روز ۱۵	روز ۳۰	روز ۴۵	روز ۶۰	روز ۱۵	روز ۳۰	روز ۴۵	روز ۶۰	روز ۱۵	روز ۳۰	روز ۴۵	روز ۶۰	روز ۱۵	روز ۳۰	روز ۴۵	روز ۶۰
***Aeromonas* sp.**	-	N	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
***Xanthobacter* sp.**	-	N	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Eikenella cloacae	-	N	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Aeromonas media	-	N	۳۳,۳۴	-	-	-	-	۶۰	۲۰	-	-	۵۰	-	۳۳, ۳۴	۲۰	۲۰	۲۵	۲۸, ۵۷	-	۵۰	۳۳, ۳۴	-	۷۵
Entrobacter cloacae	-	N	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
***Pseuda* sp.**	-	N	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Aeromonas veronill	-	U	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Basilus cereus	+	N	۱۱,۱۲	۱۰۰	۵۰	۶۶, ۶۶	۱۰۰	۴۰	۲۰	۷۵	۱۰۰	۵۰	۶۶, ۶۶	۶۶, ۶۶	۴۰	۴۰	۷۵	۲۸, ۵۷	۷۵	۳۳, ۳۴	۶۶, ۶۶	۱۰۰	۲۵
***Basilus* sp.**	+	U	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Basilus sabtilis	+	N	۱۱,۱۲	-	۵۰	۳۳, ۳۴			۶۰	۲۵	-	-	-	-	۴۰	-	-	۱۴, ۲۹	-	-	-	-	-
Lactobacillus plantarum	+	N		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
***Lactobacillus* sp.**	+	N	۱۱,۱۲	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
***Arcanotobacter* sp.**	+	U	۲۲,۲۲	-	-	-	-	-	-	-	-	-	۳۳, ۳۴	-	-	۲۰	-	-	۲۵	-	-	-	-
***Citrobacter* sp.**	-	N	۱۱,۱۲	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-		-	-	-	-	-	-	-
Citrobabacter divergens	-	N	-	-		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	۲۰		۲۸, ۵۷	-	-	-	-	-
Pseuda teromonas	-	U	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	۱۶, ۶۶	-	-	-

در تحقیق حاضر بررسی نتایج مربوط به فلور باکتریایی دستگاه گوارشی در دو گروه ماهیان ۵۰ و ۱۵۰ گرمی نشان می دهد که صرف نظر از تاثیر لوامیزول، ترکیب گونه های باکتری می تواند در طول دوره زندگی تغییر و یا جایگزین شود. به طوری‌که باکتری های *Arcanobacter* spp، *Citrobacter divergens* و *Pseudomonas teromonas* گونه هایی هستند که هیچ گزارشی از آنها در گروه ماهیان ۵۰ گرمی وجود ندارد ولی از طرفی گونه های *Xanthobacter* spp. ،*Aeromonas* spp ،*Enterobacter cloacae* ،*Eikenella cloacae* ،*Pseudomonas* spp ،*Aeromonas veronill* ،*Basilus* spp ،*Lactobacillus plantarum* نیز در گروه ۱۵۰ گرم مشاهده نشدند. در گروه ۵۰ گرم کلیه گونه های مشاهده شده در تیمارهای تحت تاثیر لوامیزول در تیمار شاهد نیز گزارش شده اند. گونه باسیلوس سروس *Basilus cereus* تنها باکتری در گروه ۱۵۰ گرم می باشد که در کلیه تیمارها و روزهای مطالعه شده گزارش شده است. از طرفی دو گونه *Citrobacter divergens* و *Pseudomonas teromonas* در این گروه تنها در تیمارهای لوامیزول ۵۰۰ و ۱۰۰۰ میلیگرم در کیلوگرم غذا مشاهده شده اند (جداول ۱ و ۲).

Cuesta و همکارانش در سال ۲۰۰۴ تاثیر چندین محرک ایمنی از جمله ویتامین A، کیتین، مخمر و لوامیزول را بر روی سیستم ایمنی ماهی سی بریم (*Sparus aurata*) بررسی نموده و گزارش کرده اند که از بین این محرک های ایمنی لوامیزول با مقدار ۰/۱۵ گرم در کیلوگرم غذا بیشترین تأثیر را بر ارتقای سیستم ایمنی این ماهی از طریق تأثیر مطلوب بر فلور باکتریایی روده داشته و تاثیر آن تا ۱۰ روز پس از قطع تغذیه با این محرک ایمنی همچنان در بدن ماهی باقی بوده است (Garrity et al., 2004).

همچنین محققان تأثیر طولانی تری از لوامیزول را بر سیستم ایمنی گونه (*Sparus aurata*) به مدت ۵ الی ۱۰ هفته را هم گزارش نموده اند (Garrity et al., 2004 ، Mulero et al., 1998).

در تحقیق پیش رو هم لوامیزول تاثیر مطلوب خود را بر فلور باکتریایی روده قزل آلا به گونه ای بجا می گذارد که در گروه ماهیان ۵۰ گرمی در کلیه تیمارها تحت تاثیر لوامیزول در روز اول درصد فراوانی باکتری های گرم منفی همانند نمونه شاهد صد درصد می باشد که در روز ۴۵ به ترتیب در تیمار لوامیزول ۱۰۰ میلی گرم در کیلوگرم غذا به صد درصد باکتری گرم مثبت، در تیمار لوامیزول ۲۵۰ و ۵۰۰ میلی گرم در کیلوگرم غذا به هشتاد درصد باکتری گرم مثبت و در تیمار لوامیزول ۱۰۰۰ میلی گرم در کیلوگرم غذا به صد درصد باکتری گرم مثبت تغییر می کند.

بطورکلی در این تحقیق در گروه ماهیان ۵۰ گرمی، لوامیزول سبب تثبیت باکتری های گرم مثبت در طول دوره‌ی پرورش می گردد (جدول ۱) ولی در گروه ماهیان ۱۵۰ گرمی علی‌رغم آنکه درصد فراوانی باکتری های گرم مثبت با گذشت زمان افزایش می یابد (جدول ۲ بخش نتایج) ولی با توجه به نمونه شاهد، می توان نتیجه گرفت که افزایش درصد فراوانی باکتری های گرم مثبت مستقل از تاثیر لوامیزول بوده و مربوط به تکوین دستگاه گوارشی می‌باشد.

تاثیر محرک های ایمنی دیگر هم بر فلور باکتریایی ماهیان مورد مطالعه قرار گرفته است و نتایج بیانگر مفید واقع شدن استفاده از این مواد در جیره‌ی غذایی ماهیان است به طوری که Xuemei و همکاران در سال ۲۰۱۱ تاثیر کیتوزان به عنوان محرک ایمنی بر فلور باکتریایی روده بچه ماهیان ماهی طلائی (*Carassius auratus*) که با غذای پوشش داده شده با کیتوزان مورد تغذیه قرار گرفته بودند را بررسی

نمودند. به گفته ایشان فلور باکتریایی غالب روده این ماهی از رده های باکتریایی Proteobacteria و Fusobacteria می باشد که کیتوزان با مقادیر ۰/۵ و ۰/۷۵ درصد در جیره غذایی مطلوبترین تاثیر را بر آن داشته است به گونه ای که استفاده از این مقادیر کیتوزان باعث عدم مشاهده یا کاهش باکتری های بیماریزا در روده *Carassius auratus* گردید. ایشان در نتایج تحقیق خود به مشاهده‌ی برخی باکتری های آئروموناس مشابه در تمام تیمارهای مورد آزمایش خود اشاره کرده‌اند و نتیجه گرفتند که آئروموناس ها از باکتری هایی هستند که به طور نسبی در روده بچه ماهیان *Carassius auratus* ماندگار بوده و وجود دارد.

در تحقیق حاضر ماهیان ۵۰ گرم در اکثر تیمارها از جمله تیمار لوامیزول ۱۰۰، ۲۵۰ و ۱۰۰۰ میلیگرم در کیلوگرم غذا فراوانی باکتری‌های طبیعی در روده تا روز ۳۰ بصورت صد درصد تثبیت شده است اما در روز ۴۵ علی‌رغم حفظ غالبیت باکتری‌های طبیعی، درصد فراوانی باکتری‌های غیر طبیعی به ترتیب ۳۳/۳۴ درصد، ۲۰ درصد و ۲۵ درصد می رسد. در تیمار لوامیزول ۵۰۰ میلیگرم در کیلوگرم غذا هم در طی روز ۱۵ و ۳۰ به ترتیب ۳۳/۳۳ درصد و ۲۵ درصد فراوانی باکتری ها متعلق به باکتری های غیر طبیعی می باشد. اما در گروه ماهیان ۱۵۰ گرمی در کلیه تیمارها و تمامی روزهای مطالعه شده، غالب بودن ۱۰۰ درصدی باکتری‌های طبیعی روده حفظ شده است (جداول ۱ و ۲).

با توجه به نتایج تحقیق حاضر و مطالعات اخیر دیگر محققان محرک های ایمنی از جمله لوامیزول می-توانند در تغییرات فلور باکتریایی روده ماهیان خصوصا در سنین پایین تأثیر گذار باشند. در تحقیق انجام شده لوامیزول عامل اصلی تثبیت باکتری های گرم مثبت فلور روده در ماهیان قزل آلای ۵۰ گرمی می-باشد در حالیکه در ماهیان گروه ۱۵۰ گرمی، لوامیزول نقشی در تعیین جمعیت باکتریایی روده ندارد و افزایش وزن ماهیان از ۵۰ گرم به ۱۵۰ گرم که توام با تکوین سیستم گوارشی می‌باشد، عامل اصلی حذف باکتری‌های غیر طبیعی (غیر فلور) می‌باشد. در مجموع ماهیان قزل آلای گروه ۵۰ گرمی از نظر فلور باکتریایی دستگاه گوارش خود تأثیرپذیری شدیدتری نسبت به ماهیان گروه ۱۵۰ گرمی نشان می‌دهد، این موضوع می‌تواند ناشی از عدم تکوین سیستم های فیزیولوژیکی در گروه ماهیان ۵۰ گرمی باشد.

منابع:

Baldwin, T. J., Newton, J.C. (1996) Pathogenesis of enteric septicemia of channel catfish, caused by *Edwardsiella ictaluri*: bacteriological and light and electron microscope findings. *Journal of Aquatic Animals Health.* 5:189–198.

Cuesta, A., Meseguer, J., Esteban, M., A. (2004) Total serum immunoglobulin M levels are affected by immunomodulators in seabream (*Sparus aurata*). Vet. *Immunol. Immunopathol*. 101:203-210.

Garrity, G. M., Bell, J. A. and Lilburn, T. G. (2004) Taxonomic outline of the prokaryotes Bergey's manual of systematic bacteriology, springer, P. 399.

Gutenberger, S. K., Duimstra, J. R., Rohovec, J. S., Fryer, J. L. (1997) Intracellular survival of *Renibacterium salmoninarum* in trout mononuclear phagocytes. *Dis. Aquat. Org*. 28:93–106.

Hardy, R.W., (2002) Rainbow Trout, *Oncorrhynchus mykiss* In: Nutrient requirements and feeding of finfish for aquaculture. Eds., Carl D. Webster, Chorn Lim, London, CABI publishing. pp: 184-202.

Jobron, J. C., Westerdahl, A., Conwey, P. L., Ejelleberg, S. K. (1997) Colonization in the fish intestinal tract and production of

Pasteiner, S. (2006) New natural concept for poultry gut health. *International Poultry Production.* 14:1-17.

Roberts, R. J., Shepherd, C. J. (1997) Handbook of trout and salmon diseases. Third edition, Fishing News Books.

Sanford, S. (2007) "Levamisole Hydrochloride: Its application and usage in freshwater aquariums". Loaches Online. Retrieved 2009-02-27.

Steiner, T. (2006) The potential benefits of Natural Growth Promoters. *Feed Tech.* 10 (2):26–28.

Suchanit, N., Kunihiko, F., Masato, E., Masashi, M., Takayuki, K., (2010) Immunological effects of glucan and Lactobacillus rhamnosus GG, a probiotic bacterium, on nile tilapia *Oreochromis niloticus* intestine with oral Aeromonas challenges. *Fisheries Sci*. 76(5) :833-840.

Symoens, I., Rosenthall, M. (1977) Levamisole in the modulation of the immune responses. The current experimental and clinical state. *Reticuloendothelial Soc*. 21:175–221.

Taraschewski, H., Renner, C., Mehlhorn, H. (1988) Effects of levamisole HCl, metrifonate, fenbendazole, mebendazole, and ivermectin on *Anguillicola crassus* (nematodes) pathogenic in the air bladder of eels. *Parasitol Res*.74(3):281-289.

Xuemei, L., Yuhe, Y., Shouqi, X., Qingyun, Y., Yuhang, C. (2011) Effect of Chitosan on Intestinal Bacteria of Allogynogenetic Crucian Carp, *Carassius auratus* gibelio, as Depicted by polymerase chain reaction-denaturing Gradient Gel Electrophoresis. *World Aquaculture Society*. 42(4):539–548.

inhibitory substances intestinal mucus and fecal extracts by *Carnobacterium sp*. strain K1. *J. Fish Dis*. 20:383-392.

Jorgensen, J. B., Lunde, H., Robertsen, B. (1993a) Peritoneal and head kidney cell response to intraperitoneally injected yeast glucan in Atlantic salmon, *Salmo salar* L. *J. Fish Dis.* 16:313–325.

Kakuta, I., Kurokura, H. (1995) Defensive effect of orally administered bovine lactoferrin against *Cryptocaryon irritans* infection of red sea bream. *Fish Pathol.* 30:289–290.

Kitao, T., Yoshida, T. (1986) Effect of an immunopotentiator on *Aeromonas salmonicida* infection in rainbow trout (*Salmo gairdneri). Vet. Immunol. Immunopathol.* 12:287–291.

McNeely, R. N., Neimanis, V. P. (1979) Water quality sourcebook, A guide to water quality parameter, water quality branch. OTAWA, Canada. 225-253P.

Meshkini, S., Tafy, A. A., Tokmechi, A., Farhangpajo, F. (2012) Effect of Chitosan on hematological parameters and stress resistance in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Veterinary Research Forum* (VRF). 3(1): 49-54.

Mulero, V., Esteban, M. A., Munoz, J., Meseguer, J. (1998) Dietary intake of levamisole enhances the immune response and disease resistance of the marine teleost gilthead seabream (*Sparus aurata* L.*). Fish Shellfish Immunol.* 8:49–62.

Nelson, J., Kawahara, E., Kawai, K., Kusuda, R. (1989) Macrophage infiltration in pseudotuberculosis of yellowtail *Seriola quinqueradiata*. Bull. *Marine Science Fish Kochi University.* 11:17–22.

Comparative survey on the effect of Levamisole on Intestinal bacterial flora in different ages of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*)

Saeid Meshkini[1*], Amir Tukmechi[2]

[1] Assistant professor, Faculty of Veterinary medicine and Artemia and Aquatic Research Institute, Urmia University
[2] Assistant professor, Artemia and Aquatic Institute, Urmia University
Email: s.meshkiniy@urmia.ac.ir

Abstract
For evaluate the effect of Levamisole on intestinal bacterial flora in rainbow trout, 1500 (50 g) and 1125 (150 g) fry and adult fish, respectively cultured for 60 day. All fish were fed with different concentrations of levamisole (0 as control, 100, 250, 500 and 1000 mg/kg) in diet and every 15 days intestinal samples were taken for bacterial analysis. Results showed levamisole strongly colonized gram positive bacteria in the fry intestine but there was not seen any effect in adult rainbow trout intestinal flora. At the end of the trial adult fish had more diversity of bacterial flora in their intestine.

Keywords: rainbow trout, immune stimulator, intestine bacterial flora