بررسی فلور باکتریایی دستگاه گوارش ماهی زینتی و شناسایی باکتریهای با احتمال پروبیوتیک

مهیار زینی وند [۱] محمد دخیلی*[۲] سید سهیل آقایی [۳]

۱- کارشناس ارشد گروه میکروبیولوژی ، دانشکده علوم ، واحد قم ، ایران

۲- گروه علوم آزمایشگاهی دانشگاه آزاد اسلامی ، دانشکده پزشکی ، واحد قم ، ایران DR_Dakhili_Yahoo.com

۳- گروه میکروبیولوژی دانشگاه آزاد اسلامی ، دانشکده علوم ، واحد قم ، ایران

چکیده

هدف از این مطالعه بررسی و شناسایی فلور باکتریایی روده ی ماهی زینتی کوی و بررسی باکتریایی با احتمال پروبیوتیک می باشد . نمونه برداری از تعداد ۶۰ عدد ماهی پرورشی کوی ازمراکز پرورش ماهی های زینتی استان قم توسط تور به صورت تصادفی صورت گرفت ، سپس اقدام به کشت روده بر روی ۳ محیط کشت PCA , EMB , MRS گردید . که روده هر ۲۰ قطعه ماهی کوی به عنوان یک تکرار در نظر گرفته شد ، و پس از ۴۸ – ۲۴ ساعت در دمای ۳۰ درجه سانتی گراد تعداد باکتری ها د بر حسب CFU / ml ارزیابی شد سپس رنگ آمیزی گرم و آزمایشات تکمیلی انجام شد و هم چنین میانگین شمارش باکتری های هوازی و بی هوازی اختیاری روده (Log , CFU /ml) ۰/۷۳ ± ۶/۱۳ ثبت گردید . باکتری های شناسایی شده در روده شامل Vibrio parahaemolyticus ,Vibrio vulnficus ,Vibrio alginolyticus , Vibrio mostichinokovi , Pseudomonas mendocina , Corynebacterium sP. , Enterobacteriaceae , Staphylococcus epidermidis, Strebtococcase (Lactococcus , Loconostoc , Entrococcus) بود. در روده ماهی باکتری ویبریو مستیچینوکووی با فراوانی ۱ / ۱۸ درصد و پس ازآن اشریشیا کلای با فراوانی ۱۷ درصد فراوان ترین باکتری ها در روده ماهی بود . با توجه به یافته ها ، روده ماهی زینتی کوی دارای سه باکتری مهم شامل جنس های Lactococcus , Loconostoc , Entrococcus دارای خاصیت ضد میکروبی علیه باکتری های هدف داشتند لذا از نظر خاصیت پروبیوتیکی قابل بررسی می باشد.

کلید واژه: فلور باکتریایی، روده، ماهی کوی،پروبیوتیک.

مقدمه

توسعه آبزی پروری ماهیان زینتی کشور از جنبه های مختلف بویژه اشتغال و سرگرمی از اهمیت بسزایی برخوردار است. از سوی دیگر افزایش تنوع در گونه های ماهیان پرورشی از اهداف آبزی پروری بشمار می آید. از جمله ماهیان زینتی کوی ها می باشند ، که این ماهیان جز خانواده کپور ماهیان هستند . تجارت ماهی های زینتی یکی از مسائل مهم از لحاظ اقتصادی و سود آوری است . موفقیعت صنایع ماهی های زینتی ، استفاده همه جانبه از آنتی بیوتیک ها و درمان های دارویی را برای بهبود وضعیت سلامت و تغذیه ضروری می کند ، که این کار باعث توسعه آسیب های مقاومت در برابر دارو و میکروارگانیسم های بیماری زا می شود (۱) . از طرف دیگر این مواد شیمیایی موجب ممانعت از رشد فلور باکتریایی دستگاه گوارش ماهی می شوند که خود دارای اثرات مفیدی بر سلامتی موجود هستند (۲) . در سال های اخیر استفاده از پروبیوتیک ها به عنوان جایگزین روش های درمان آنتی بیوتیکی مطرح گردیده و به نظر می رسد استفاده از آ ن ها می تواند بسیاری از مشکلات ناشی از درمان و یا کنترل بیماری را مرتفع سازد. پروبیوتیکها، عبارتند از میکروارگانیزم ها یا فروارده هایی که اثرات مفیدی بر سلامتی میزبان دارند. مطالعات انجام شده در بسیاری از کشورها نشان می دهد . که بعضی از باکتری های استفاده شده به عنوان پروبیوتیک مانند (لاکتوباسیلوسها) قادرند سیستم ایمنی میزبان را تحریک نمایند . (۳). باکتریهای پروبیوتیک نه تنها با ترشح انواع مواد خارج سلولی ، باعث محدود شدن فعالیت باکتریهای بیماریزا ، بهبود کارائی هضم و جذب مواد غذائی توسط آبزی می شوند ، بلکه با بهبود کیفیت آب ، موجب فراهم شدن شرایط مناسب زیستی برای آبزیان پرورشی می گردند (۴) مجموع اثرات استفاده از پروبیوتیک ها، کاهش هزینه های تولید آبزیان می باشد که ضامن توجیه اقتصادی و توسعه پایدار آبزی پروری و آبزی مصرفی است (۵) در طی دو دهه گذشته چندین مطالعه در مورد حضور باکتری های اسید لاکتیک در دستگاه گوارش ماهی صورت گرفت. تعداد گزارشات و تحقیقات در زمینه اهمیت باکتر یهای اسید لاکتیک در جلوگیری از بیماری های ماهیان در حال رشد است (۶). این تحقیق به منظور شناسایی فلور باکتریایی روده ماهی زینتی کوی و شناسایی باکتری هایی با احتمال پروبیوتیک انجام شده است.

مواد و روش ها

تعداد ۶۰ عدد ماهی کوی با میانگین وزن ۰/۰۵ - ۰/۰۳ گرم ، که به مدت ۲۴ ساعت تغذیه آن ها متوقف شده بود ، توسط تور به صورت کاملا تصادفی از آکواریوم های تزئینی مختلف در منطقه ی مبارک آباد قم نمونه برداری شد . (۷)

ماهیان ابتدا زیست سنجی شده و پس از ضدعفونی سطح شکمی با الکل ۷۰ درصد اقدام به باز کردن شکم و جداسازی روده گردید ، محتویات روده ۲۰ قطعه ماهی کوی در شرایط کاملا استریل از روده ی آن ها خارج و بعد از مخلوط کردن کامل نمونه ها به میزان یک گرم توسط ترازو دیجیتال توزین گردید .(۸) . پس از توزین در داخل ظروف شیشه ا ی استریل درب سمباده ای ، نمونه های محتویات هر تیمار (۱،۲و۳) در سری لوله های حاوی سرم فیزیولوژی استریل به صورت متوالی تهیه رقت شد ($۱۰^{-۱}$ ، $۱۰^{-۶}$) و در شرایط کاملا استریل به وسیله ی سمپلر ، ۱۰۰ ماکرولیت از هر رقت بر روی پلیت های حاوی محیط های

,Eosin Methylene Blue(EMB)

Plate Count Agar (PCA) , MRS Agar

به طور جداگانه کشت داده شد (Spread Method) و سپس پلیت های حاوی محیط MRS را در درون جار بی هوازی با گاز پک نوع A در دمای ۳۰ درجه سانتی گراد به مدت ۴۸ – ۲۴ ساعت قرار داده شد و محیط های حاوی EMB و PCA در دمای ۳۰ درجه به مدت ۴۸ – ۲۴ گرماگذاری شد . (۹)

سپس تعداد کلنی ها در هر سه پلیت بر حسب CFU (Colony forming unit) ارزیابی شد .

کلنی های رشد کرده در هر دو محیط PCA , EMB به منظور خالص سازی در محیط TSA کشت داده شد و به مدت ۴۸ – ۲۴ ساعت در در دمای ۳۷ درجه گرماگذاری شد و هم چنین کلنی های رشد کرده در سطح محیط MRS به منظور خالص سازی در محیط MRS کشت داده شد و به مدت ۴۸ – ۲۴ ساعت در دمای ۳۷ درجه درون جار بی هوازی گرماگذاری شد . (۱۰)

پس از اطمینان از خلوص پرگنه ها رنگ آمیزی و آزمایشات تکمیلی انجام شد که شامل اکسیداز ، کاتالاز ، تحرک ، اکسیداسیون ، آزمایشات هیدرولیزکننده و ... بود . به منظور شناسایی باکتری ها تا حد گونه از تست های مختلف بیوشیمیایی بر اساس روش Bergey و Kanomen استفاده گردید . (۱۱و۱۲)

به منظور تجزیه و تحلیل نتایج حاصل از شمارش ، شناسایی باکتری ها از نرم افزارهای SPSSوExcel استفاده گردید .

مرحله ی دوم این تحقیق بررسی و مطالعه ی جدایه ها با احتمال پروبیوتیک بود ، با توجه به اینکه از مهمترین خواص باکتری های پروبیوتیک تولید مواد ضد میکروبی بر علیه پاتوژن ها می باشد بنابراین خاصیت ضد میکروبی مورد مطالعه قرار گرفت . به منظور انجام این آزمایش از سه روش Agar Well Diffusion ,

Agar DiskDifusion و Cross streak استفاده شد .

در روش Agar Well Diffusion ابتدا باکتری های جدا شده از محیط کشت MRS با احتمال پروبیوتیک را به محیط MRS Broth تلقیح کرده و به مدت ۲۴ – ۴۸ ساعت در دمای ۳۷ درجه درون جار بی هوازی گرماگذاری شد و سپس بعد از گرماگذاری با دور ۱۵۰۰۰ به مدت ۱۰ دقیقه سانتریوفوژ انجام شد ، محلول رویی حاصل (سوپرناتانت) که حاوی مواد ضد باکتریایی احتمالی است را از توده سلولی ته نشین شده جدا کرده ، سپس از تعدادی سویه های تست استاندارد با ATCC مشخص (لیستریا مونوسایتوژنز ، استافیلوکوکوس اورئوس ، اشرشیا کلای و سودوموناس آئروژینوزا) به عنوان باکتری شاخص استفاده شد . درمرحله ی بعد از سویه های تست یک سوسپانسیون (10^6 CFU /ml = مشخص) تهیه کرده و به طور یکنواخت در محیط مولر هینتون آگار کشت داده شد و بعد از حفر کردن تعدادی چاهک در سطح محیط کشت مولر هینتون آگار و ۵۰ ماکرولیت سوپر ناتانت فیلتر شده به چاهک ها تلقیح شد و بعد از گرما گذاری در دمای ۳۷ درجه قطر هاله ی عدم رشد اندازه گیری شد .

روش دیسک (Agar Disk Diffusion) : در این روش بعد از این که باکتری تست را در محیط مولر هینتون آگار کشت داده ، سپس تعدادی دیسک خالی را با فاصله قرار داده و روی آن ها ۲۰ ماکرولیت سوپرناتانت فیلتر شده تلقیح و بعد از گرماگذاری در دمای ۳۷ درجه قطر هاله ی عدم رشد اندازه گیری شد .

روش : Cross streak: در این روش ابتدا از هر سویه ی جدا شده از دو محیط EMB , PCA بر روی محیط TSA کشت خطی داده ، سپس پلیت ها به مدت ۲۴ – ۴۸ ساعت در دمای ۳۷ درجه گرماگذاری شدند ، بعد از مشاهده رشد از ۴ باکتری شاخص اشرشیا کلای(ATCC8739)، استافیلوکوکوس اورئوس(ATCC25923) ، سودوموناس آئروژناز(27853 ATCC) و لیستریا سایتومونوژنز(SPTLCG) سوسپانسیون تهیه کرده (مطابق نیم مک فارلند) و سپس با سوآپ استریل از هر سوسپانسیون از بالا به پایین عمود بر باکتری جدا شده کشت داده ، و پلیت ها به صورت وارونه به مدت ۲۴ – ۴۸ ساعت در دمای ۳۷ درجه گرماگذاری شدند تا پس از این زمان با بررسی و مشاهده منطقه یا هاله توقف رشد حد فاصل بین خطوط کشت باکتری های جدا شده و باکتری های مورد تست ، نتایج حاصله ارزیابی شد . (۱۳) . به منظور تجزیه و تحلیل داده ها از آزمون آنالیز واریانس یکطرفه (ANOVA) وبا استفاده از نرم افزارهای Excel و SPSS استفاده شد.

نتایج

شمارش کلنی های رشد یافته در سطح سه محیط کشت MRS , PCA , EMB به وسیله ی دستگاه کلنی کانت ، تعداد کل باکتری های موجود در هر گرم از نمونه روده ی ماهی در سه تکرار درجدول ۱ آمده است.

جدول ۱ – تعداد کل باکتری های شمارش شده در هر تکرار ، میانگین و انحراف معیار تعداد کل باکتری های شمارش شده از روده ی ماهی در محیط های کشت مختلف :

	کل باکتری های شمارش شده در هر تکرار			میانگین لگاریتم تعداد کل باکتری های شمارش شده
	تکرار ۱	تکرار ۲	تکرار۳	
محیط EMB	۷×۱۰^{۵}	۱۶×۱۰^{۵}	۱۹×۱۰^{۵}	۶/۱۱±۱/۲۳
محیط PCA	۸۷×۱۰^{۵}	۷۸×۱۰^{۵}	۹۵×۱۰^{۵}	۶/۹۲±۱/۱۵
محیط MRS	۴×۱۰^{۵}	۲×۱۰^{۵}	۱×۱۰^{۵}	۵/۳۱±۱/۳۱

دربررسی سطح هر سه محیط از سطح محیط EMB باسیل های گرم منفی جدا شد و سپس توسط تست های بیوشیمیایی تعدادی از گونه های آن ها نیز شناسایی شد که شامل Pseudomonas mendocina و Vibrio alginolyticus , Vibrio parahaemolyticus , Vibrio vulnficus , Vibrio mostichinocovi. (جدول ۲و۳) و هم چنین باسیل گرم منفی اکسیداز منفی توسط تست های بیوشیمیایی کانومن (Gelatin , Lactose , Oxidase , Urea, IMVIC , Salicin و ...) که شامل Morganela morgani , Serratia Erwinia , Escherichia coli Liquefaciens Enterobacter intermedius , chrysanthemi شناسایی و جدا شد .

جدول ۲- تست های بیوشیمیایی افتراقی جهت شناسایی گونه های ویبریو

نوع آزمایش	Vibrio alginolyticus	Vibrio vulnficus	Vibrio parahaemolyticus	Vibrio mostichinocovi
اکسیداز	+	+	+	+
لایزین دکربوکسیلاز	+	+	+	+ / −
اورنی تین دکربوکسیلاز	+	−	−	+
تولید اسید از ساکارز	+	−	−	+
احیانیترات	+	+	+	−
Vp	+	−	−	+ / −
رشد در نمک ۶ درصد	+	+	+	+
تولید اسید از لاکتوز	−	+	−	+ / −

جدول ۳ – نتایج حاصل از تست های افتراقی مربوط به شناسایی جدایه های سودوموناس :

Bacteri	Argenin	Maltose	Motility	Oxidase	Glocuse	Lactose	Citrat	Manitol	Urea Hydrolysis	Gelatin
Pseudomonas mendocina	+	–	+	+	+	–	+	–	v	–

در بررسی های کلنی های رشد یافته در سطح محیط PCA کوکسی های گرم مثبت (استافیلوکوکوس اپی درمایدیس) ، باسیل گرم منفی اکسیداز مثبت و منفی Psudomonas mendocina , Vibrio alginolyticus , Vibrio parahaemolyticus ,) هچنین Escherichia coli باسیل گرم مثبت بدون اسپور (جنس کورینه باکتریوم) بر اساس تست های بیوشیمیایی (کانومن) شناسایی و جدا شدند . (جدول ۴) .

جدول ۴ - نتایج حاصل از تست های افتراقی مربوط به شناسایی استافیلوکوکوس

Bacteri	Trehalose	Arabinose	Catalase	Oxidase	Manose	Manitol	Lctose	Sucrose	Maltose	Glocose	Novobiocin
S.epidermidis	–	–	+	+	+	–	v	+	+	+	S

در محیط کشت MRS جنس کورینه باکتریوم ، کوکسی گرم مثبت کاتالاز مثبت (استافیلوکوکوس اپی در مایدیس) و کوکسی گرم مثبت کاتالاز منفی (استرپتوکوکاسه) شناسایی شد که بر اساس تست های بیوشیمیایی (کانومن) جنس های استرپتوکوکاسه شامل Enterococcus) , Leuconostoc و Lactococcus) شناسایی شد (جدول ۵)

جدول ۵ – نتایج حاصل از تست های افتراقی مربوط به شناسایی جدایه های محیط MRS

Genus	Catlase	Growth 35-37 CA	Growth 35-37 SBA	Gram stain Morphology	Hemolysis SBA	Suscep Tibility To novobiocin	Gas MRS Broth	Motility	Growth Nacl Broth	Growth 10 c	Growth 45 c
Enterococcus	–	+	+	Chains	ᵝά	R/S	-	V	+	+	+
Leuconostoc	–	+	+	Chains	ᵝά	R	+	–	V	+	+
Lactococcus	–	+	+	Chains	ᵝά	s	–	–	V	+	V

در محیط کشت EMB و PCA بیشترین فراوانی مربوط به باکتری ویبریو مستیچینوکووی است. و در محیط کشت MRS باکتری های جنس کورینه باکتریوم و استافیلوکوکوس فراوان ترین باکتری ها بودند . به طور کلی در همه ی محیط های کشت و

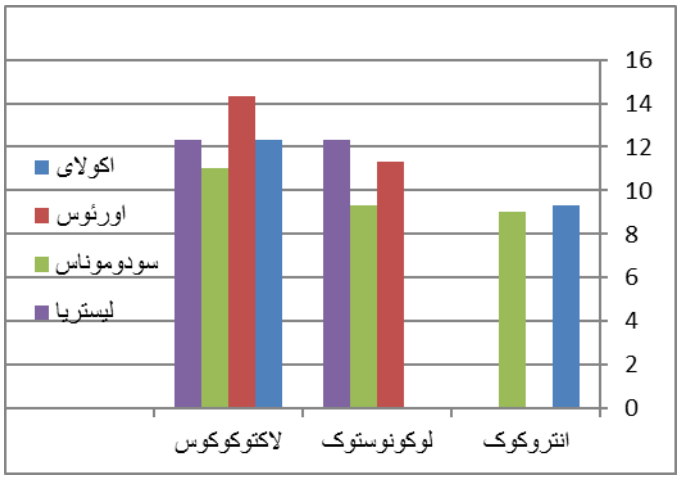
جدول ۵ - بررسی خاصیت ضدمیکروبی جدایه های MRS به روش چاهک (Agar Weel Diffusion)

باکتری شاخص	اکلای			سودوموناس			لیستریا			اورئوس		
جدایه ها	تکرار			تکرار			تکرار			تکرار		
انتروکوک	۱۰	۱۱	۱۲	۱۲	۱۰	۱۰	-	-	-	۷	۹	۱۰
لوکونوستووک	-	-	-	۱۱	۱۲	۱۰	۱۴	۱۳	۱۱	۱۴	۱۲	۱۳
لاکتوکوکوس	۱۴	۱۵	۱۲	۱۴	۱۳	۱۲	۱۷	۱۵	۱۴	۱۸	۱۶	۱۴

نمودار ۱ – میانگین قطر هاله ی عدم رشد در سه تکرار به روش چاهک

جدول ۶ - نتایج حاصل از بررسی خواص ضد میکروبی جدایه های MRS بر علیه باکتری های شاخص به روش دیسک

باکتری شاخص / جدایه ها	اکلای			سودوموناس			لیستریا			اورئوس		
	تکرار			تکرار			تکرار			تکرار		
انتروکوک	۱۱	۱۰	۷	۸	۹	۱۰	–	–	–	–	–	–
لوکونوستووک	–	–	–	۸	۹	۱۱	۱۲	۱۱	۱۴	۱۰	۱۱	۱۳
لاکتوکوکوس	۱۳	۱۰	۱۴	۱۱	۹	۱۳	۱۵	۱۲	۱۰	۱۶	۱۴	۱۳



نمودار ۲ – میانگین قطر هاله ی عدم رشد در هر سه تکرار به روش دیسک

بحث و پیشنهادات

در بین همه باکتری های شناسایی شده در روده ماهی باکتری ویبریو مستیچینوکووی با فراوانی ۱۸/۱ درصد باکتری غالب بوده و بعد از آن اشریشیا کلی با فراوانی ۱۷ درصد فراوان تر از مابقی باکتری ها در روده ماهی بود . نتایج حاصل از بررسی فعالیت ضد میکروبی کل باکتری های جدا شده از محیط EMB , PCA و MRS به این صورت بود که هیچ یک از جدایه ها با روش Cross Streak بر علیه سویه های شاخص خاصیت ضد میکروبی نداشتند . در صورتی که سه باکتری انتروکوکوس

، لوکونوستوک و لاکتوکوکوس باروش دیسک (جدول ۶ – نمودار ۱) و روش چاهک (جدول ۷ – نمودار۲) بر علیه ی باکتری های شاخص خاصیت ضد میکروبی داشتند .

از آنجا که روده بیشترین مسیر آلودگی را در ماهی دارد فلور پایدار روده اهمیت پیدا می کند، به خصوص وقتی که عمل واکسیناسیون هنوز کاملا عملی نشده است تحقیقات نشان داده است که فلور میکروبی در روده ماهی موازی با تغییرات محیط تغییر میکند به عبارت دیگر امکان دستکاری جمعیت میکروبی روده با تغییرات در محتویات غذا امکان پذیر است

اثر ضد میکروبی باکتری ها معمولا به تولید تکی یا الحاقی آنتی بیوتیک ها، باکتریوسین ها، به pH سیدروفورها، لیزوزیم ها و پروتئازها و تغییر وسیله تولید اسیدهای ارگانیک بستگی دارد .

باکتری های گرم مثبت (*Enterococcus* , , *Bacillus* , Lactococcus , *Carnobacterium*, *Streptococcus* , *Lactobacillus*،*Micrococcus*) و گرم منفی(AeromonasPhotorhodobacterium، *Vibrio*و*Pseudomonas Alteromonas*) به عنوان پروبیوتیک های آبزیان ارزیابی شدند .

عسگریان وهمکاران دو گونه باکتری اسید لاکتیک Entrococcus seriolicide و Leuconostoc mesenteroides را از روده قره برون جدا کردند (۱۴). و در این تحقیق هم دو جنس Entrococcus spp و Leuconostoc spp از روده ی ماهی زینتی کوی پرورشی شناسایی و جدا شد که با تحقیق فوق مطابقت دارد . CaiY وهمکاران و دو باکتری Lactococcus garvieae , Enterococcus faecium را به عنوان بیشترین گونه های جدا شده از ماهی کپورگزارش کردند(15)و در تحقیق حاضر Lactococcus spp از روده ی ماهی کوی زینتی جدا شد.

در تحقیقی دیگر ا ز روده .*Enterococcus* spp و L. m *plantaru* از ماهی قزل آلای رنگین کمان جداشد .

Divya وهمکاران درتحقیقات خود از روده ی ماهی زینتی باکتری Bacillus coagulans ، Bifidom bacterium جداسازی شد (۱۶). که با باکتری های جدا شده در تحقیقات ما مطابقت ندارد.

طبق نتایج دیگر توسط (T.jawahar , 2007) گزارش شد که باسیلوس سوبتیلیس و گونه های لاکتوباسیلوس در روده ی ماهی زینتی آب شیرین می تواند به عنوان پروبیوتیک و عوامل بیوکنترلی باشد . (۱۷)

در تحقیقاتی دیگر نشان دادند که مکمل های غذایی باسیلوس سوبتیلیس C-3102 می تواند اثرات مفیدی بر روی رشد ماهی کوی ، ایجاد می کند و بر عملکرد میکروبیوتای روده در مراحل اولیه تاثیر می گذارد . در این تحقیق انجام شده بر روی ماهی زینتی کوی هیچ گونه باسیلوسی جدا نشد . (۱۸)

Ashenafi در سال ۱۹۸۷ پس از بررسی میکروفلور هوازی لوله گوارشی ماهی تیلاپیا نیلوتیکا در دریاچه Awassa گونه هایی از جنس های انتروباکتر ، اشرشیا ، سیتروباکتر ، کلبسیلا و آئروموناس را جداسازی کردند (۱۹)

باکتری هایی از جنس آئروموناس ، سودوموناس ، اشرشیا ، استافیلوکوکوس ، باسیلوس ساکارومیست ، لاکتوباسیلوس ها ، بیفیدوباکتریوم ، باکتروئیدها و کلستریدیوم در آن یافت می شوند ، به طوری که فلور غالب از جنس های باکتروئید ، آئروموناس و ساکرومیست می باشند . در این تحقیق انجام شده باکتری هایی شال اشرشیا ، استافیلوکوکوس و سودوموناس جدا شد با این تفاوت که از روده ی ماهی کوی جدا شدند .

همچنین تغیرات قابل توجهی در تعداد اسافیلوکوکوس ها و سودوموناس ها در روده ها و دماهای مختلف دیده شده است (۲۰)

Ringo , Strøm در سال ۱۹۹۴ اولین بار باکتری لوکونستوک را از مدفوع ماهی جدا کردند ، در مطالعه ی بعدی Ringo این باکتری را از مخاط اپی تلیال معده ، روده ی کوچک و بزرگ ماهیان شمالی که با اسید های چرپ غیر اشباع تغذیه کرده بودند جدا و شناسایی کردند . (۲۱)

باکتری های اسید لاکتیک شامل باکتری های کارنوباکتریوم ، لاکتوباسیلوس ، انتروکوکوس ، استرپتوکوکوس ، لوکونستوک هستند که این باکتری ها جز فلور نرمال دستگاه گوارش ماهیان سالم هستند گزارش شده شده است که برخی از این باکتری ها ی جدا شده از دستگاه گوارش ماهی به عنوان پروبیوتیک عمل می کنند . (22)

در این تحقیق انجام شده مشابه با تحقیق Einar Ringo *etal* , 1997 و Nirunga buntin , 2007 باکتری های اسید لاکتیک جدا شده از دستگاه گوارش ماهی زینتی کوی با دو روش دیسک و چاهک خاصیت پروبیوتیکی داشتند .

طبق تحقیقات انجام شده توسط Carson *et al* در سال ۱۹۹۳ باکتری Enterococcus like از ماهی Rainbow trout جدا شد . (۲۳)

در تحقیقات مشابه توسط Toranzo در سال ۱۹۹۵ از ماهی Turbot باکتری Enterococcus SPP جدا شد و توسط Baya در سال ۱۹۹۱ از ماهی Channel catfish باکتری Carnobacterium شناسایی شد . (۲۵-۲۴)

در تحقیقات دیگری توسط Kusuda در سال ۱۹۹۱ باکتری Lactococcus garvieae از ماهی Yellowtail شناسایی و جدا شد . (۲۶)

یکی از باکتری های اسید لاکتیک تحت عنوان لاکتوباسیل از ماهی Oreo mossambicus chromic جدا شد ، این لاکتوباسیل جدا شده به ماهیان بیمار خورانده شد و در برابر ویبریو ، اکلای ، سودوموناس فعالیت آنتاگونیستی قابل توجهی را از خود نشان دادند و باعث افزایش وزن و اندازه ی ماهیان شدند بنابراین در این تحقیق لاکتوباسیلوس به عنوان یک باکتری پروبیوتیک در آبزی پروری معرفی شد .(۲۷)

لاکتوباسیل های جدا شده از ماهی کفیر توسط A.santos در سال ۲۰۰۳ مورد مطالعه قرار گرفتند این سویه ها برای پایبندی به سلول های انسان enterocyte like caca2 ، مقاومت به PH اسیدی و اسید صفرا مورد آزمایش قرار گرفتند نتایج به این صورت بود که فعالیت های ضد میکروبی در برابر باکتری های روده و مهار از اتصال سالمونلا تیفی موریوم به سلول های caca 2مشاهده شد . در این تحقیق بهترین خواص پروبیوتیکی در l. acidophilus CYC 10051 و l. kefiranofaciens مشاهده شد . (۲۸)

هیچ گونه مطالعه ای در رابطه با بررسی فلور یا بررسی باکتری هایی با احتمال پروبیوتیک در ماهی زینتی کوی انجام نشده است .

منابع

1-Amabile-Cuevas CF, Cárdenas-Garcia M, Ludgar M , 1995 , Antibiotic resistance. Anim Sci , ; 83: 320-329

2-Mesalhy Aly S., Abd-El-Rahman A.M., JohnG. and Mohamed M.F. (2008). Characterization of some bacteria isolated from Oreochromis nilotiand their potential use as probiotics. Aquaculture, 277: 1-6

3-Fuller R. (1989). A review: probiotics in man and animals. Journal of Applied Bacteriology, 66: 365-378

4-Irianto, A., and Austin, B., 2002. Probiotic in aquaculture, Journal of Fish Diseases.25: 1-10

5-Yanbo, W., and Zirong, X., 2006. Effect of probiotic for common carp(Cyprinus carpio) based on growth performance and digestive enzymes activities. Animal feed science and technology, 127:283-292

6-Askarian, F.; Matinfar, A.; Kousha, A Bahmani, M.; Khorshidi, K.; Shenavar, A and Ringo, E., 2008. Diversity of lactic acid bacteria in the gasrero intestinal tracts of reared Beluga (Huso Huso) and Persian sturgeon (Asipenser persicus). Journal of Fisheries and Aquatic Science. 3(5):302 – 311.

7-Verschuere L, Rombaut G, Sorgeloos P, Verstraete W. , 2006 , Probiotic bacteria as biological control agents in aquaculture. Microbiology and Molecular Biol Rev , , 64: 655-671

8-Ringø E, Olsen RE. 1999. The effect of diet on aerobic bacterial flora associated with intestine of Arctic charr (*Salvelinus alpinus* L.). J Applied Microb 86: 22-28.

9-Mair , NS; Sharpe, ME and Holt, JG (Eds.), Bergey's manual of systematic bacteriology. Vol. 2, Baltimore: Williams and Wilkins. PP: 1209-1234.

10- Buller , 2004 , Bacteria from fish and anther aqutic animal , PP: 1-100

11- Miranda JM , Vazques B I , 2008 , Evolution of resistance in poultry intestinal E. Coli during three conminly used antimicrobial therapeutic treatments in poultry . poult . sci . 87 , 1643 – 1648

12- Koneman ,E.W., Stephan D.A., William M., Ph.D. Janda and Schreckenberger, P.C.,1994: Introduction to diagnostic microbiology

13- Kelly WJ, Asmundson RV, Huang CM , 1996 , Characterization of plantaricin KW30, a bacteriocin produced by *Lactobacillu* splantarum. *Appl Bacteriology*, 81: 657-62

14 - Askarian, F.; Matinfar, A.; Kousha, A Bahmani, M.; Khorshidi, K.; Shenavar, A and Ringo, E., 2008. Diversity of lactic acid bacteria in the gastrero intestinal tracts of reared Beluga (Huso Huso) and Persian sturgeon (Asipenser persicus). Journal of Fisheries and Aquatic Science. 3(5):302 - 311

15 - CaiY , Suyanandana P, Saman, P. and Benno, Y , 1999 . Classification and characterization of lactic acid bacteria isolated from the intestines of common carp and freshwater prawns. Journal of General and Applied Microbiology.45:177-184

16- Divya . K ; Isamma . A ; Ramasubramaniam . V ; , 2012 , Colonization of probiotic bacteria and its impact on ornamental fish puntius conchonius

17- T. jawahar Abraham and Tirthankar Banerjee , 2007 , Beneficial antagonistic bacteria from fresh water fishes and culture environment as probiotic in ornamental fish culture

18- Suxu He , Wenshu Liu , Zhigang Zhou , 2012, Evaluation of probiotic strain Bacillus subtilis C -3102as a feed supplement for koi carpio

19- Ashenafi,m.1987 slim and intestinal aerobic micro flora of tilapia nilotica from lake awassa, ethopia , est-afr-aric,j 59(2):171-1

20 - Honcyning .w,1994. study of the intestinal micro flora of carp fresh water culture ponds, acta hydrobial 18 (4):354-35

21 - Ringø, E., Strøm, E., 1994. Microflora of Arctic charr, *SalÍelinus alpinus* _L..; gastrointestinal microflora of free-living fish, and effect of diet and salinity on the intestinal microflora. Aquacult. Fish. Manage. 25, 623–629

22 - Einar Ringø , Francois - Joe¨l Gatesoupe , 1997 , Lactic acid bacteria in fish , 37 , 1 – 27

23 - Carson, J., Gudkovs, N., Austin, B., 1993. Characteristics of an *Enterococcus*-like bacterium from Australia and South Africa, pathogenic for rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* _Walbaum.. J. Fish Dis. 16, 381–388

24- Toranzo, A.E., Cutrin, J.M., Nunez, S., Romalde, J.L., Barja, J.L., 1995a. Antigenic characterization of *Enterococcus* strains pathogenic for turbot and their relationship with other gram-positive bacteria. Dis. Aquatic Org. 21, 187–191

25 - Baya, A.M., Toranzo, A.E., Lupiani, B., Li, T., Roberson, B.S., Hetrick, F.M., 1991. Biochemical and serological characterization of Carnobacterium spp. isolated from farmed and natural populations of stripped bass and catfish. Appl. Environ. Microbiol. 57, 3114–3120

26- Kusuda, K., Kawai, K., Salati, F., Banner, C.R., Freyer, J.L., 1991. Enterococcus seriolicida sp. nov., a fish pathogen. Int. J. Syst. Bacteriol. 41, 406–409

27 - Johndevadoss Gobinath and Ravichandran Ramanibai , 2012 , EFFECT OF PROBIOTIC BACTERIA CULTURE ON PATHOGENIC BACTERIA FROM

FRESHWATER FISH *OREOCHROMIS MOSSAMBICU S* , Journal of modern biotechnology , vol 1 , no 1 , pp 50 – 54

28 - A. Santos, M. San Mauro, A. Sanchez, J. M. Torres, and D. Marquina , 2003 , The Antimicrobial Properties of Different Strains of Lactobacillus spp Isolated from Kefir , Appl. Microbiol. 26, 434–437

Evaluation of the bacterial flora in the gastrointestinal tract of ornamental fish and identify bacteria with probiotic potential

M.Zynivand[1]- M. Dakhili[2]*-S.S.AgaYi[3]

1. M.Sc Student , Department of Microbiology , Islamic Azad University , Qom Branch , Iran
2. Assistant Professor of Microbiology , Faculty of Medical Science ,Islamic Azad University, Qom Branch , Iran
3. Scientific member of Microbiology , Faculty of Science , Islamic Azad University, Qom Branch , Iran

Abstract

The purpose of this study was to investigate and identify ornamental koi fish gut bacterial flora and bacterial evaluation of probiotics is likely . Sample of 60 fish breeding koi fish aquarium Azmrakz Qom province by randomly took a tour , then proceed to the culture medium at the gut on third PCA, EMB, MRS was. Koi fish as a recurring every 20 pieces of intestine were considered , and after 48-24 h at 30 ° C. The number of bacteria in terms of CFU / ml was assessed by Gram stain and then further tests were conducted. the mean counts of aerobic and anaerobic bacteria in the gut (Log, CFU / ml) 73/0 ± 13/6 was recorded . Identification of bacteria in the bowel alginolyticus, Vibrio vulnficus, Vibrio parahaemolyticus Vibrio, Vibrio mostichinokovi, Pseudomonas mendocina, Corynebacterium sP. , Enterobacteriaceae Staphylococcus epidermidis,, Strebtococcase (Lactococcus, Loconostoc, Entrococcus) , respectively. Fish intestinal bacterium Vibrio Mstychynvkvvy frequency 1/18 percent and then 17 percent of most common bacteria Escherichia Clay with abundant fish intestine . According to the findings, ornamental koi fish intestine consists of three important bacterial genus Lactococcus, Loconostoc, Entrococcus have antimicrobial properties against bacteria were targeted probiotics so the property can be verified .

Keywords : bacterial flora , intestinal , koi fish , probiotics .