2025, 1(2): 77-86

JAER

*Journal of Animal Environmental Reaserch*

Journal homepage: http://www.journalaer.com

***Research Article***

# Studying the effect of feeding *Lactobacillus bulgaricus* and *Lactobacillus plantarum* probiotics on the immune system and protection against the pathogen *Aeromonas hydrophila* in Zebrafish model

***Sheida Ehsannia [1], Hamed Ahari [1*], Shapour Kakolaki [2], Seyed Amir Ali Anvar [3], Seyedeh Shima Yousefi [1]***

*[1] Department of Food Science and Engineering, Faculty of Agricultural Sciences and Food Technology, Science and Research Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran*

*[2] Iranian Fisheries Science Research Institute, Agricultural Research Education and Extension Organization, Tehran, Iran*

*[3] Department of Food Hygiene and Quality Control, Faculty of Veterinary Medicine, Science and Research Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran*

**Key Words**

Zebra fish
Probiotic
*Lactobacillus bulgaricus*
*Lactobacillus plantarum*
*Aeromonas hydrophila*

## Abstract

**Introduction:** Zebrafish is very similar to mammals in terms of physiology of digestive system, pharmacological and genetics. Also, the remarkable similarity of zebrafish immune system to mammals is as an alternative model for studying innate immunity and adaptive immunity as well as malignancies caused by immune cells. Therefore, this fish is an attractive model for investigating the basic inflammatory processes and damage to the intestine, which was used in this research and the results obtained can be generalized to humans. The purpose of this study is to investigate the effect of feeding with two probiotic strains of *Lactobacillus bulgaricus* and *Lactobacillus plantarum* separately and in combination on the immune system, the presence of bacteria in the intestine and protection against the pathogen *Aeromonas hydrophila* in the zebrafish model, which is a successful model for studies on vertebrate developmental biology, physical and biomedical research, intestinal bacterial colonization and immune responses have been introduced.

**Materials & Methods:** RT-PCR test was performed to prove the presence of probiotic bacteria in the intestine and quantitative evaluation of the expression of immune genes, and the mortality of fish after exposure to pathogenic bacteria was investigated. After preparation, probiotic bacteria were added to the feed at a concentration of 108 cfu/g at the rate of 3% of the body weight of the fish and were fed to 240 pieces of fish twice a day and the tests were evaluated for 60 (0, 28, 56 and 60) days.

**Results:** According to the results, the highest gene expression of *Lactobacillus plantarum* bacteria in the intestine in LA.pba treatment was on day 28, and the highest gene expression of *Lactobacillus bulgaricus* bacteria in LA.ba treatment was on day 60. The highest level of expression of immune genes IL1β and TNFα as inflammatory cytokines was in the normal group and even after exposure to the pathogen on day 60, the lowest level of expression of these genes was in the LA.pba group. Also, the highest survival rate was seen in the LA.pba group.

**Conclusion:** The obtained results indicate the appropriate effect of using two types of probiotics *Lactobacillus plantarum* and *Lactobacillus bulgaricus* in creating protection against the pathogen *Aeromonas hydrophila*. Also, it seems that the use of these two probiotics in combination has more beneficial effects in the zebrafish model.

**Article info**

* Corresponding Author's email: h.ahari@srbiau.ac.ir

Received: 5 February 2024
Reviewed: 8 March 2024
Revised: 11 May 2024
Accepted: 15 June 2024

[ Downloaded from journalaer.com on 2026-06-14 ]

## مقاله علمی - پژوهشی

# مطالعه تأثیر خوراک‌دهی با پروبیوتیک‌های لاکتوباسیلوس بولگاریکوس و لاکتوباسیلوس پلانتاروم بر روی سیستم ایمنی و محافظت در برابر پاتوژن آئروموناس هیدروفیلا در مدل ماهی زبرا

شیدا احسان‌نیا[۱]، حامد اهری*[۱]، شاپور کاکولکی[۲]، سیدامیرعلی انوار[۳]، سیده‌شیما یوسفی[۱]

[۱] گروه علوم و مهندسی صنایع غذایی، دانشکده علوم کشاورزی و صنایع غذایی، واحد علوم و تحقیقات، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران

[۲] موسسه تحقیقات علوم شیلاتی کشور، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، تهران، ایران

[۳] گروه بهداشت و کنترل کیفی مواد غذایی، دانشکده دامپزشکی، واحد علوم و تحقیقات، دانشگاه آزاداسلامی، تهران، ایران

**کلمات کلیدی**

ماهی زبرا
پروبیوتیک
لاکتوباسیلوس بولگاریکوس
لاکتوباسیلوس پلانتاروم
آئروموناس هیدروفیلا

## چکیده

**مقدمه:** ماهی زبرا از نظر فیزیولوژی دستگاه گوارش، فارماکولوژیکی و ژنتیکی بسیار به پستانداران شبیه است. هم‌چنین شباهت قابل توجه سیستم ایمنی ماهی زبرا به پستانداران به‌عنوان یک مدل جایگزین برای مطالعه ایمنی ذاتی و ایمنی تطبیقی و هم‌چنین بدخیمی‌های ناشی از سلول‌های ایمنی می‌باشد. بنابراین این ماهی مدلی جذاب برای بررسی فرایندهای اساسی التهابی و آسیب به روده است که در این پژوهش از آن استفاده شده و نتایج به‌دست آمده، برای انسان قابل تعمیم می‌باشد. هدف از این مطالعه بررسی اثر خوراک‌دهی با دو سویه پروبیوتیبک لاکتوباسیلوس بولگاریکوس و لاکتوباسیلوس پلانتاروم به‌صورت جدا و در ترکیب با هم بر روی سیستم ایمنی، حضور باکتری‌ها در روده و محافظت بر علیه پاتوژن آئروموناس هیدروفیلا در مدل ماهی زبرا که یک مدل موفق برای مطالعات بیولوژی رشد مهره‌داران، تحقیقات فیزیکی و زیست پزشکی، کلونیزاسیون باکتریایی روده و پاسخ‌های ایمنی معرفی شده است، انجام گرفت.

**مواد و روش‌ها:** تست RT-PCR برای اثبات حضور باکتری‌های پروبیوتیک در روده و ارزیابی کمی بیان ژن‌های ایمنی انجام شد و بررسی مرگ و میر ماهی‌ها بعد از مواجهه با باکتری پاتوژن صورت گرفت. باکتری‌های پروبیوتیکی بعد از آماده‌سازی با غلظت $10^8$ cfu/g به‌میزان ۳ درصد وزن بدن ماهی‌ها به خوراک افزوده شدند و ۲ بار در روز به ۲۴۰ قطعه ماهی خورانده شد و بررسی آزمون‌ها به‌مدت ۶۰ روز (روزهای ۰ ، ۲۸، ۵۶ و ۶۰) انجام گرفت.

**نتایج:** بر اساس نتایج بالاترین بیان ژن باکتری لاکتوباسیلوس پلانتاروم در روده در تیمار LA.pba در روز ۲۸ بود و بالاترین بیان ژن باکتری لاکتوباسیلوس بولگاریکوس در تیمار LA.ba در روز ۶۰ بود. بالاترین میزان بیان ژن‌های ایمنی IL1β و TNFα به‌عنوان سیتوکین‌های التهابی در گروه نرمال بود و حتی پس از مواجهه با پاتوژن در روز ۶۰، کم‌ترین میزان بیان این ژن‌ها در گروه LA.pba بود. هم‌چنین بالاترین نرخ زنده‌مانی در گروه LA.pba دیده شد.

**بحث و نتیجه گیری:** نتایج به‌دست آمده نشان‌دهنده تاثیر مناسب استفاده از دو نوع پروبیوتیبک لاکتوباسیلوس پلانتاروم و لاکتوباسیلوس بولگاریکوس در ایجاد محافظت در برابر عامل بیماری‌زای آئروموناس هیدروفیلا است. هم‌چنین به‌نظر می‌رسد که استفاده از این دو پروبیوتیک در ترکیب با هم اثرات مفیدتری را در مدل ماهی زبرا به همراه دارد.

* پست الکترونیکی نویسنده مسئول:
h.ahari@srbiau.ac.ir

تاریخ دریافت: ۱۶ بهمن ۱۴۰۲
تاریخ داوری: ۱۸ اسفند ۱۴۰۲
تاریخ اصلاح: ۲۲ اردیبهشت ۱۴۰۳
تاریخ پذیرش: ۲۶ خرداد ۱۴۰۳



[ Downloaded from journalaer.com on 2026-06-14 ]

## مقدمه

پروبیوتیک ها با استفاده از مکانیسم های متعددی می توانند اثرات سودمند و درمانی را در میزبان مصرف کننده القا نمایند. یکی از ویژگی های مهم آن ها اعمال تاثیر سودمند خود در هنگام حضور پاتوژن ها است به طوری که با ایجاد رقابت با میکروارگانیسم های پاتوژن و ایجاد محیط آنتاگونیستی بر علیه آن ها می توانند اثرات محافظتی خود را اعمال نمایند. یک ویژگی دیگر آن‌ها تاثیرشان در رشد بهتر و مناسب تر میزبان است. پروبیوتیک ها در حفظ عملکردهای مناسب در روده و تحریک ایمنی گوارشی نقش مهمی دارند (۱). اثبات شده است لاکتوباسیلوس ها در میان میکروارگانیسم های پروبیوتیکی و باکتری های اسید لاکتیک به عنوان مهم ترین گروه هستند که امکان زنده‌مانی و توان ایجاد کلونی در سیستم گوارش میزبان را دارند. این باکتری‌ها در حفظ و ارتقای سیستم ایمنی در روده و گوارش نقش داشته و می‌توانند از شدت بیماری‌های التهابی روده بکاهند (۲). با مصرف باکتری‌های پروبیوتیک، بعد از طی کردن مسیر گوارشی و رسیدن به معده، در درجه اول کلونیزه شدن و استقرار آن‌ها در روده و سپس رفتار آنتاگونیستی آن‌ها با باکتری‌های پاتوژن برای کاهش یا از بین بردن اثرات آن ها پراهمیت می باشد. بنابراین مطالعات بالینی با استفاده از مدل‌های پستانداران می‌تواند در این راستا ما را در فهم این موضوع کمک کند و از آن‌جاکه مدل‌های پستانداران اغلب پیچیده هستند، اخیراً از مدل های جدیدی مانند ماهی زبرا که از نظر فیزیولوژی دستگاه گوارش، سیستم ایمنی، بیولوژی، فارماکولوژیکی و ژنتیکی خیلی شبیه به انسان می باشد، استفاده می گردد (۳، ۴). ماهی زبرا دانیو (*Danio rerio*) از ماهیان زینتی بسیار زیبا در آب شیرین و مناطق گرمسیری است که زیستگاه آن شرق هند، بنگلادش، پاکستان، میانمار و نپال و از خانواده کپور ماهیان است (۵). طول عمر آن حدود ۵ سال است و در دمای ۱۸ تا ۲۵ درجه سانتی گراد به‌راحتی زندگی می کند و pH مورد نیاز برای آن ۶/۶-۷/۲ می باشد (۶). این ماهی دارای رژیم غذایی همه چیز خواری است و با حداکثر طول ۶ سانتی‌متر، وجود خطوط افقی رنگی در بدن، دارای جثه کوچک و باریک و فاقد هرگونه اندام دفاعی است. این ماهی به‌دلیل هم آوری بالا، اندازه کوچک، دوره جنینی شفاف و دوره زندگی کوتاه در مطالعات زیست پزشکی کاربرد زیادی برای مطالعه بیماری‌های مختلف دارد (۷). باکتری‌های اسیدلاکتیک (LAB) بخش بزرگی از میکروبیوتازی مهره‌داران و ماهیان را تشکیل می دهند و اثرات مفید آن ها بر تولیدمثل ماهی زبرا گزارش شده است (۸). پرورش آبزیان به‌عنوان یکی از فعالیت‌های مهم تولیدی، در بسیاری از کشورهای جهان محسوب می شود (۹). استفاده از مکمل ها در جیره غذایی آبزیان به‌منظور تامین نیازهای تغذیه‌ای و نیز مقاومت در برابر بیماری‌ها همواره مورد توجه بوده‌است. مکمل‌های غذایی طیف گسترده‌ای از ترکیبات را در برمی گیرند که هریک دارای ویژگی های مخصوص به‌خود می باشند. از جمله مکمل های غذایی که تاثیرات سودمند آن ها در صنایع مختلف از جمله صنعت آبزی پروری مشاهده شده‌است، مکمل های غذایی میکروبی یا پروبیوتیک ها هستند. تحقیقات و آزمایشات صورت گرفته در این خصوص عمدتاً متمرکز بر تعیین اثرات و مکانیسم اثر پروبیوتیک‌ها بر شاخص‌های رشد (۱۰)، مهار پاتوژن ها (۱۱) و نیز کنترل استرس (۱۲) بوده است. نتایج تحقیقات انجام شده نشان داده است که در بسیاری از گونه های ماهی و میگو، پروبیوتیک ها باعث بهبود ترکیب شیمیایی لاشه و افزایش مقاومت در برابر بیماری‌ها می گردند (۹). از طرف دیگر، در بعضی کشورها با مصرف این میکروارگانسیم‌های مفید، مقدار مصرف آنتی‌بیوتیک‌ها به‌طور قابل توجهی کاهش یافته است. در این میان، باکتری‌ها شایع‌ترین نوع پروبیوتیک‌ها هستند که سویه‌های مختلفی از آن‌ها در آبزی‌پروری مورد بررسی قرار گرفته است (۱۳). در واقع، استفاده از پروبیوتیک‌ها به‌دلیل تخمیر گزینشی توسط باکتری‌های مفید روده، سبب افزایش تعداد و غالبیت آن‌ها می‌شوند (۱۴). ماهی‌ها ممکن است در تمامی مراحل زندگی در معرض باکتری‌های موجود در محیط قرار گیرند که بعضی از آن ها مضر و برخی دیگر مفید می باشند. برای کنترل عوامل بیماری‌زا باید از باکتری‌هایی همانند لاکتوباسیل ها که دارای اثرات بهداشتی مفیدی می باشند، استفاده کرد (۱۵). در بسیاری از تحقیقات اهمیت استفاده از این باکتری ها بالاخص در آبزی پروری نشان داده شده است. به‌عنوان نمونه، تاثیر مثبت استفاده از باکتری *Lactobacillus plantarum* بر روی ماهی تیلاپیای نیل *Oreochromis niloticus* گزارش شد (۱۶). هم‌چنین این باکتری برای محافظت ماهی در برابر عفونت آئروموناس هیدروفیلا که باعث شیوع بیماری های بزرگ و ضررهای اقتصادی شدید برای آبزی پروری می‌شود، مفید شناخته شده‌است. با این حال، مکانیسم‌ها هم چنان نامشخص است (۱۷). خوراک دهی با باکتری پروبیوتیک لاکتوباسیلوس بولگاریکوس نیز باعث افزایش رشد و نرخ زنده‌مانی در هنگام مواجهه با پاتوژن شده و باعث تعدیل بیان ژن‌های ایمنی می‌شود (۱۱). طی تحقیق انجام شده بر ماهی زبرا مشخص شد که لاکتوباسیلوس پالنتاروم باعث کاهش مرگ و میر و آسیب بافتی ناشی از کلونیزاسیون پاتوژن و التهاب در روده ماهی زبرا در چالش با پاتوژن آئروموناس هیدروفیلا می شود و هم چنین اثر سرکوب کنندگی لاکتوباسیلوس پالنتاروم بر روی بیان ژن های پیش التهابی (TNF α و β1IL) نیز نشان داده شد (۱۷). هم‌چنین اثر دو باکتری لاکتوباسیلوس پلانتاروم و لاکتوباسبیلوس بولگباریکوس بر۳



[ Downloaded from journalaer.com on 2026-06-14 ]

روی پاسخ ایمنی و مقاومت آن بر علیه پاتوژن را در ماهی شیر بت بررسی شد و نتایج نشان داد که بیش‌ترین فعالیت ضدمیکروبی در گروه لاکتوباسیلوس بولگاریکوس بوده و ماهی‌هایی که از ترکیب هر دو باکتری پروبیوتیک تغذیه کرده بودند، افزایش قابل توجهی در نرخ زنده‌مانی بعد از مواجهه با پاتوژن داشتند و پارامترهای ایمنی را نیز برانگیخته کردند (۱۸). Nobakht و همکاران، اثر لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس و لاکتوباسیلوس پلانتاروم به‌عنوان پروبیوتیک به‌صورت مجزا و در ترکیب با هم بر روی سیستم ایمنی و مقاومت به بیماری در ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان بررسی کردند و نتایج نشان داد که پروبیوتیبک لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس اثر بهتری بر روی رشد و سیستم ایمنی ماهی داشته و کاهش تعداد کلونی‌های پاتوژن هیدروفیلا را به بیش‌تر از ۹۰ درصد نشان داد (۱۹). تجویز پروبیوتیک‌ها در آکوافید به دلیل ظرفیت آزادسازی طیف گسترده‌ای از آنزیم‌ها و مواد مغذی گوارشی که می‌توانند در فرآیند هضم و استفاده از خوراک مشارکت داشته باشند، مصرف و جذب خوراک را همراه با جذب اجزای رژیم غذایی که منجر به افزایش سلامت میزبان می‌شود، افزایش می‌دهد (۲۰). با توجه به توضیحات ارائه شده در بالا و اهمیت استفاده از پروبیوتیک‌ها در جیره غذایی انسان و ویژگی‌های مطلوبی که ایجاد می‌کنند، هدف از این پژوهش مطالعه تاثیر ضدمیکروبی باکتری‌های پروبیوتیک لاکتوباسیلوس پلانتاروم و لاکتوباسیلوس بولگاریکوس برعلیه باکتری پاتوژن آئروموناس هیدروفیلا و بررسی اثر آن‌ها بر روی بیان ژن‌های ایمنی و حضور این باکتری‌ها در روده مدل ماهی زبرا می‌باشد.

## مواد و روش‌ها

**آماده‌سازی نمونه و محل انجام تحقیق:** این تحقیق در مجموعه تحقیقاتی هیستوژنوتک (شرکت دانش بنیان بافت و ژن پاسارگاد) انجام گرفت. ۱۲ عدد آکواریوم خریداری و شست و شو و سپس آبگیری شدند و آب کلرزدایی شد. هوادهی توسط پمپ هوا که دارای ۱۲ انشعاب مجهز به سنگ هوا بود انجام گرفت. ۲۴۰ قطعه ماهی زبرا به صورت تصادفی در ۱۲ آکواریوم، به تعداد ۲۰ قطعه ماهی در هر آکواریوم تقسیم‌بندی شده و با شرایط نوری ۱۲:۱۲ در دمای ۲۶±۲ درجه سانتی گراد و در pH=۷-۷/۵ به‌مدت ۶۰ روز نگه‌داری شدند. در این آزمون ۴ گروه با ۳ تکرار وجود داشت که گروه‌ها عبارتند از: گروه صفر (گروه شاهد در روز صفر، عدم دریافت پروبیوتیک و عدم مواجهه با پاتوژن آئروموناس هیدروفیلا)، گروه نرمال (گروه شاهد، عدم دریافت پروبیوتیک و مواجهه با پاتوژن آئروموناس هیدروفیلا)، گروه pba.LA (گروه دریافت کننده ترکیب باکتری پروبیوتیک لاکتوباسیلوس پلانتاروم و لاکتوباسیلوس دلبروکی زیرگونه بولگاریکوس و مواجهه با باکتری پاتوژن آئروموناس هیدروفیلا)، گروه pa.LA گروه دریافت کننده باکتری پروبیوتیک لاکتوباسیلوس پلانتاروم و مواجهه با باکتری پاتوژن آئروموناس هیدروفیلا) و گروه ba.LA گروه دریافت کننده باکتری پروبیوتیک لاکتوباسیلوس دلبروکی زیرگونه بولگاریکوس و مواجهه با باکتری پاتوژن آئروموناس هیدروفیلا). خوراک‌دهی با استفاده از خوراک تجاری GOLDFISH & KOI به شکل دانه‌ای و به‌صورت دو مرتبه در روز در ساعات ۵ و ۱۱ انجام گرفت. خوراک دهی به میزان ۳٪ وزن بدن ماهی‌ها در گروه نرمال که بدون مکمل پروبیوتیکی بود و نیز در گروه‌های حاوی مکمل پروبیوتیکی صورت گرفت. پروبیوتیک در هر وعده غذایی معادل ۱ تا ۲٪ هر پلیت غذا، افزوده شد (۲۱). برای اثبات نقش ضدالتهابی استفاده از پروبیوتیک‌ها در قبل و بعد از حضور پاتوژن سنجش بیان سیتوکین‌های β-1IL و α-TNF با استفاده از pcr time Real، در بازه‌های زمانی ۰، ۲۸، ۵۶ و ۶۰ روز، به‌طور تصادفی از هر گروه تیمار سه نمونه برای هر آزمون انجام گرفت. هم چنین نقش استفاده از پروبیوتیک‌ها در تغییرات میزان مرگ و میر ماهی‌ها و میزان حضور پروبیوتیک‌ها در روده نیز در بازه‌های زمانی مختلف مشخص گردید.

**تهیه باکتری‌های پروبیوتیک لاکتوباسیلوس پلانتاروم و لاکتوباسیلوس بولگاریکوس:** در این پژوهش از باکتری‌های پروبیوتیک لاکتوباسیلوس پلانتاروم ATCC ۱۴۹۱۷ و لاکتوباسیلوس دلبروکیزیرگونه بولگاریکوس ATCC ۱۱۸۴۲ که از بانک میکروبی مرکز ذخایر ژنتیکی ایران تهیه شد، استفاده گردید. برای ر سیدن به غلظت مورد نظر از باکتری‌ها در ابتدا سوسپانسیون اولیه‌ای از باکتری‌ها تهیه شد و باکتری‌ها هر کدام به محیط حاوی محیط کشت ( broth MRS شرکت مرک آلمان) تزریق و تا رسیدن به مقدار مورد نظر در شرایط بی‌هوازی به‌مدت ۲۴ ساعت در انکوباتور شیکردار ۳۷ درجه سانتی گراد و دور rpm ۱۸۰ انکوبه گردیدند. سپس کدورت رشد برابر با نیم مک فارلند تهیه شد و در دستگاه اسپکتروفتومتر OD آن با غلظت nm ۰/۱ که معادل با $10^8$ CFU می‌باشد خوانده شد. سپس محیط را با دور rpm ۴۰۰۰ در دمای $4^{°C}$ به‌مدت ۱۵ دقیقه سانتریفوژ کرده و رسوب باکتری و با cc ۱ نرمال سالین ترکیب شد.

**تهیه باکتری پاتوژن آئروموناس هیدروفیلا:** سویه پاتوژن آئروموناس هیدروفیلا ATCC ۷۹۶۶ به‌صورت پلیت از بانک میکروبی مرکز ذخایر ژنتیکی ایران تهیه شبد و سپس باکتری تحت شرایط استریل و زیر هود در محیط broth LB کشت داده شد. سپس از محیط مایع رقت‌های سریالی گرفته شد و در ادامه در محیط نوترینت آگار کشت داده شد. کلنی کانت انجام و غلظت $1/3\times10^8$ CFU به دست آمد.



[ Downloaded from journalaer.com on 2026-06-14 ]

**آزمون حضور پروبیوتیک ها در روده ماهی:** نمونه برداری برای بررسی حضور پروبیوتیک ها در روده، بعد از انتخاب تصادفی ماهی ها و بی هوش کردن آن ها با پودر گل میخک، تحت شرایط استریل و زیر هود توسط ذره‌بین یا میکروسکوپ به‌وسیله انبر استریل شکم ماهی باز شد و نمونه روده استخراج گردید. به منظور بررسی میزان بیان ژن‌های اختصاصی هر یک از پروبیوتیک‌های استفاده شده از PCR با وجود پرایمرهای اختصاصی برای نمونه های بافت روده استفاده شد. توالی پرایمرهای مورد استفاده در آزمون سنجش حضور پروبیوتیک‌ها در روده و طول قطعه ساخته شده در جدول ۱ اشاره شده است. نتایج به‌دست‌آمده از این آزمایش بیان ژن‌های اختصاصی هر یک از پروبیوتیک‌ها را نشان می‌دهد. بدیهی است افزایش بیان هر یک از ژن‌های اختصاصی پروبیوتیک نشان از حضور بیش‌تر آن باکتری در محل خواهد بود. نمونه های روده استخراج شده در ۸۰- درجه سانتی‌گراد نگه‌داری شده تا PCR انجام شود.

**جدول ۱: پرایمرهای مورد استفاده در آزمون سنجش حضور پروبیوتیک‌ها در روده**

**Table 1: Primers used in the test to measure the presence of probiotics in the intestine**

| Primer name | Sequence | Length (Amplicon) |
|---|---|---|
| Forward primer *L. plantarum* | GCCGCCTAAGGTGGGACAGAT | 200 bp |
| Reverse primer *L. plantarum* | TTACCTAACGGTAAATGCGA | |
| Forward primer *L. delbrueckii* | CACTTGTACGTTGAAAACTGAATATCTTAA | 94 bp |
| Reverse primer *L. delbrueckii* | CGAACTCTCTCGGTCGCTTT | |

**آزمون بیان ژن سایتوکین‌های β-1IL و TNFα:** از هر گروه، ۳ نمونه ماهی به‌طور تصادفی انتخاب و توسط پودر گل میخک بی‌هوش و کشته شدند و سپس در ظرف اپندورف قرار گرفتند و در دمای ۸۰- درجه سانتی گراد تا زمان انجام آزمون نگه داری شدند. به منظور بررسی میزان بیان ژن سایتوکین های β-1IL و TNFα نمونه‌برداری‌های انجام شده از گروه های آزمایش در میکروتیوپ های Free RNase قرار داده شده و تا زمان انجام آزمایشات مربوطه در فریزر ۸۰- درجه سانتی گراد نگه داری شدند تا PCR انجام شود. پرایمرهای F و R مورد استفاده به‌منظور سنجش بیان سیتوکین‌های β-1IL و TNFα و هم‌چنین ژن GAPDH به‌عنوان ژن مرجع، از ماهی زبرا با استفاده از نرم‌افزار Runner Gene طراحی و توسط شرکت SINACOLON سنتز گردید. فهرست پرایمرها به‌همراه اندازه قطعات تکثیر شده در جدول ۲ اشاره شده است.

**جدول ۲: پرایمرهای مورد استفاده در آزمون سنجش بیان ژن‌ها**

**Table 2: Primers used in gene expression assay**

| Primer name | Sequence | Length (Amplicon) |
|---|---|---|
| Forward primer d-GAPDH | CAGAACATCATCCCAGCCTCC | 152 bp |
| Reverse primer d-GAPDH | TTGGCAGGTTTCTCAAGACGG | |
| Forward primer d-IL-1β | ACAGCACACACACTGATGCAC | 218 bp |
| Reverse primer d-IL-1β | AGAATAAGCAGCACTTGGGGA | |
| Forward primer d-TNF-α | TGGATTGTGAACGAAAGTGAG | 108 bp |
| Reverse primer d-TNF-α | AGCAATGTTCAGATGTGTTGG | |

**مواجهه با پاتوژن آئروموناس هیدروفیلا:** در روز ۵۶ بعد از ۲۴ ساعت گرسنگی، پاتوژن آئروموناس هیدروفیلا با غلظت $۱/۳\times۱۰^{۸}$ به آب آکواریوم با حجم ۵/۳ لیتر تزریق شد.

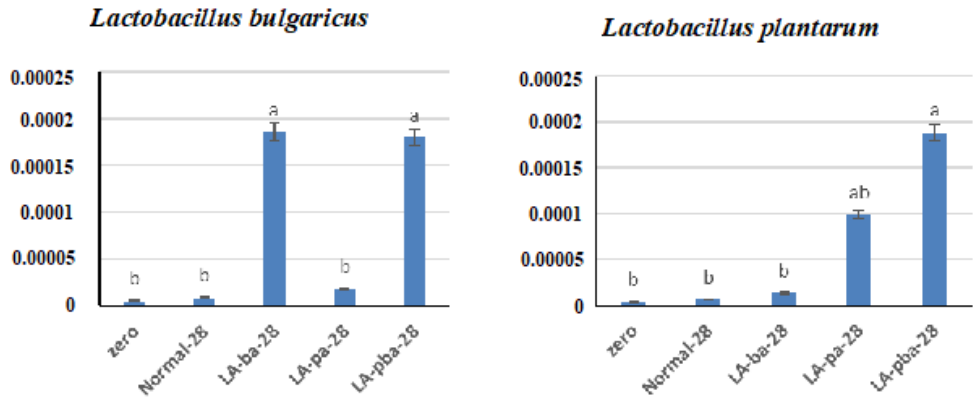
**تجزیه و تحلیل داده‌های آماری:** برای تجزیه و تحلیل نتایج به‌دست‌آمده از نرم‌افزار SPSS ورژن ۲۶ و آزمون‌های آماری ANOVA و دانکن استفاده شد. همه آزمون ها در سه تکرار انجام شد و نتایج به صورت میانگین±انحراف معیار بیان شد. سطح اختلاف آماری کلی به صورت $p<۰/۰۵$ در نظر گرفته شد.

## نتایج

**نتایج حضور پروبیوتیک در روده ماهی:** نتایج به‌دست آمده از بررسی میزان حضور پروبیوتیک در روده ماهی (فرآیند pcr time Real) در روز ۲۸ در مورد لاکتوباسیلوس پلانتاروم و لاکتوباسیلوس بولگاریکوس در شکل ۱ ارائه شده است. بررسی نتایج به‌دست آمده مربوط به پروبیوتیک لاکتوباسیلوس پلانتاروم (شکل ۱) نشان می‌دهد که در گروه صفر بیان ژن بسیار پایین است که نشان از عدم حضور و یا کمبود این باکتری در این گروه است. از سوی دیگر در گروه pba-LA بیش‌ترین میزان بیان ژن اختصاصی این نوع پروبیوتیک به دست آمده است که نشان‌دهنده حضور این پروبیوتیک و تکثیر بالای آن است. هم‌چنین با توجه به تحلیل نتایج به‌دست آمده مربوط به آنالیز بیان ژن پروبیوتیک لاکتوباسیلوس بولگاریکوس (شکل ۱) در روز ۲۸، مشخص گردید که در گروه‌های صفر، نرمال و pa-LA بیان ژن بسیار پایین است و میزان بیان ژن در این سه گروه با یکدیگر اختلاف معنی‌دار ندارد ($p>۰/۰۵$).



[ Downloaded from journalaer.com on 2026-06-14 ]



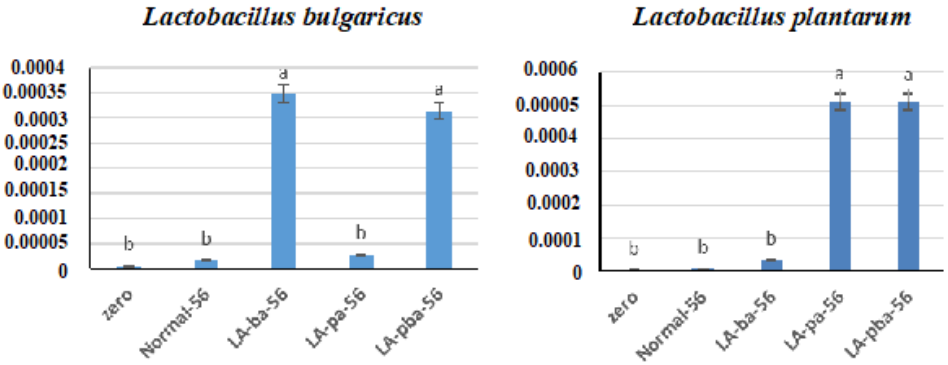

**شکل ۱: نتایج بررسی حضور لاکتوباسیلوس‌ها در روده ماهی در روز ۲۸**

**Figure 1: Results of the study of the presence of *Lactobacilli* in the fish intestine on day 28**

حروف هم‌نام انگلیسی بالای هر ستون نشان از عدم تفاوت معنی‌دار (p>۰/۰۵) و حروف غیر هم‌نام نشان از وجود تفاوت معنی‌دار (p<۰/۰۵) بین آن دو گروه می‌باشد

The same English letters above each column indicate no significant difference (p<0.05) and the non-same letters indicate a significant difference (p<0.05) between the two groups

بررسی نتایج به دست آمده مربوط به پروبیوتیک لاکتوباسیلوس پلانتاروم و لاکتوباسیلوس بولگاریکوس در روز ۵۶، در شکل ۲ ارائه شده است. بررسی نتایج به دست آمده مربوط به پروبیوتیک لاکتوباسیلوس پلانتاروم (شکل ۲) نشان می دهد که در گروه های صفر، نرمال و LA-ba بیان‌ژن بسیار پایین است و این نتیجه نشان از عدم حضور و یا کمبود این باکتری در این گروه‌ها است. البته میزان بیان در گروه LA-ba نسبت به دو گروه دیگر بیش‌تر است اما نتایج به دست آمده در مقایسه آماری اختلاف معنی دار نشان نمی دهد (p>۰/۰۵). با بررسی نتایج به دست آمده از آنالیز بیان ژن پروبیوتیک لاکتوباسبلوس بولگاریکوس در روز ۵۶ (شکل ۲) مشخص گردید گروه های صفر، نرمال و LA-pa دارای کم ترین میزان بیان ژن اختصاصی این پروبیوتیک هستند و میزان بیان ژن در گروه LA-pa نسبت به دو گروه نامبرده دیگر بیش‌تر است اما این اختلاف معنی‌دار نیست (p>۰/۰۵). این نتیجه نشان‌دهنده کمبود یا عدم حضور پروبیوتیک بولگاریکوس در این گروه‌ها است.




**شکل ۲: نتایج بررسی حضور لاکتوباسیلوس‌ها در روده ماهی در روز ۵۶**

**Figure 2: Results of the study of the presence of *Lactobacilli* in the fish intestine on day 56**

حروف هم‌نام انگلیسی بالای هر ستون نشان از عدم تفاوت معنی‌دار (p>۰/۰۵) و حروف غیر هم‌نام نشان از وجود تفاوت معنی‌دار (p<۰/۰۵) بین آن دو گروه می‌باشد

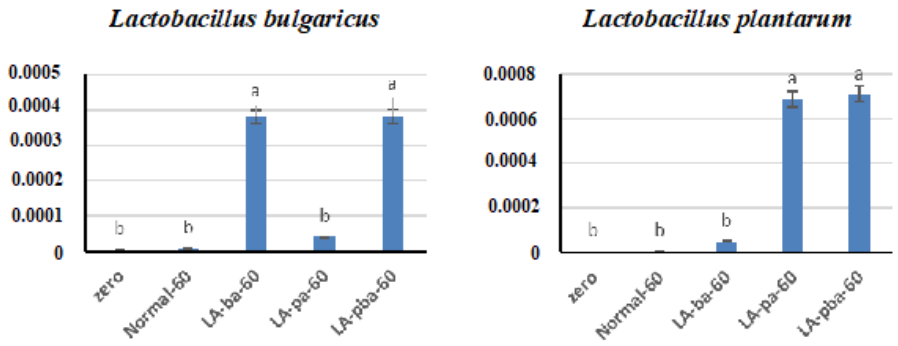
The same English letters above each column indicate no significant difference (p<0.05) and the non-same letters indicate a significant difference (p<0.05) between the two groups

نتایج به دست آمده از آنالیز بیان ژن پروبیوتیک لاکتوباسیلوس پلانتاروم و لاکتوباسیلوس بولگاریکوس در روز ۶۰، در شکل ۳ ارائه شده است. با توجه به نتایج آنالیز بیان ژن پروبیوتیک لاکتوباسیلوس پلانتاروم (شکل ۳) مشخص گردید که میزان بیان ژن در گروه های صفر، نرمال و LA-ba بسیار پایین است و نتیجه به‌دست آمده نشان دهنده عدم حضور و یا کمبود این باکتری در این گروه‌ها است. میزان بیان ژن اختصاصی در این سه گروه نامبرده به یکدیگر نزدیک است و اختلاف معنی‌دار با یکدیگر ندارند (p>۰/۰۵). هم‌چنین با توجه به نتایج به دست آمده از آنالیز بیان ژن پروبیوتیک لاکتوباسبیلوس بولگاریکوس در روده ماهی‌های گروه‌های مختلف در روز ۶۰ (شکل ۳) مشخص گردید که گروه های صفر، نرمال و LA-pa کم ترین میزان بیان‌ژن اختصاصی این پروبیوتیک را دارند و میزان بیان ژن



[ Downloaded from journalaer.com on 2026-06-14 ]

در گروه LA-pa نسبت به دو گروه نامبرده دیگر بیش‌تر بوده که این اختلاف معنی‌دار نیست (p>۰/۰۵) و نتایج به دست آمده در این گروه‌ها نشان دهنده کمبود یا عدم حضور پروبیوتیک بولگاریکوس در روده ماهی‌های این گروه‌ها است.




**شکل ۳: نتایج بررسی حضور لاکتوباسیلوس‌ها در روده ماهی در روز ۶۰**

**Figure 3: Results of the study of the presence of *lactobacilli* in the fish intestine on day 60**

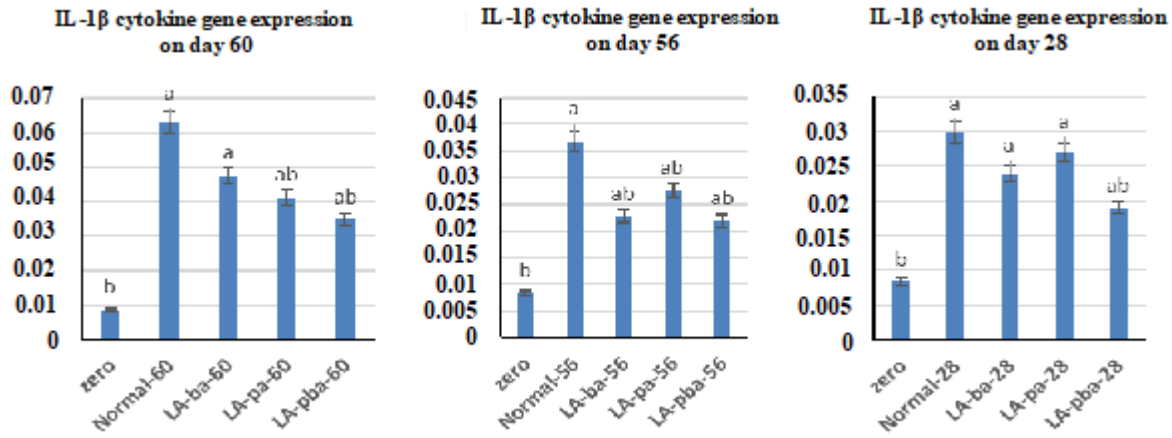
حروف هم‌نام انگلیسی بالای هر ستون نشان از عدم تفاوت معنی‌دار (p>۰/۰۵) و حروف غیر هم‌نام نشان از وجود تفاوت معنی‌دار (p<۰/۰۵) بین آن دو گروه می‌باشد

The same English letters above each column indicate no significant difference (p<0.05) and the non-same letters indicate a significant difference (p<0.05) between the two groups

**نتایج میزان بیان ژن سیتوکین‌های IL-1β و TNFα:** تحلیل نتایج به‌دست آمده مربوط به آنالیز بیان ژن IL-1β (شکل ۴) نشان می‌دهد که در روز ۲۸، میزان بیان ژن در گروه‌های صفر و LA-pba نسبت به سه گروه دیگر نرمال، LA-ba و LA-pa پایین‌تر است. کم ترین میزان بیان ژن در گروه های آزمایش مربوط به گروه صفر و بیش‌ترین میزان بیان ژن مربوط به گروه نرمال است. نتایج به‌دست آمده نشان می‌دهد که میزان بیان ژن IL-1β در چهار گروه نرمال، LA-pba، LA-ba و LA-pa با یکدیگر اختلاف معنی دار ندارند (p>۰/۰۵). همان‌طورکه در شکل ۴ آمده است بررسی نتایج بیان ژن IL-1β در روز ۵۶ در گروه های مختلف آزمایشی نشان داد که بیش‌ترین میزان بیان ژن مربوط به گروه نرمال است و در بین گروه های دریافت‌کننده پروبیوتیک گروه LA-pa میزان بیان ژن IL-1β آن از دو گروه دیگر بیش‌تر است اما این افزایش بیان ژن معنی‌دار نیست (p>۰/۰۵). نتایج به‌دست آمده از بررسی میزان تغییرات بیان ژن IL-1β در گروه های مختلف آزمایشی در روز ۶۰ در شکل ۴ ارائه شده است و تحلیل نتایج به‌دست آمده از گروه های مختلف نشان داد که میزان بیان ژن مورد نظر در گروه نرمال از سایر گروه های آزمایشی بیش تر است. در بین گروه های دریافت کننده پروبیوتیک یعنی گروه‌های LA-pba، LA-pa و LA-ba میزان بیان ژن IL-1β در گروه LA-ba بیش‌تر است هر چند این سه گروه با یکدیگر و با گروه نرمال در میزان ژن اختلاف معنی دار نداشتند (p>۰/۰۵). تحلیل نتایج به دست آمده در مورد آنالیز بیان ژن سیتوکین TNFα در روز ۲۸ (شکل ۵) نشان داد که در گروه نرمال نسبت به سایر گروه‌ها بیش‌ترین میزان بیان ژن وجود دارد و در میان گروه های دریافت کننده پروبیوتیک گروه LA-pa بالاترین میزان تکثیر ژن TNFα را دارد اما اختلاف معنی‌داری بین نتایج به‌دست آمده در بین این سه گروه و هم‌چنین با گروه نرمال و صفر وجود ندارد (p>۰/۰۵). همان‌طورکه در شکل ۵ (نتایج روز ۵۶) مشخص شد، بیش‌ترین میزان بیان ژن سیتوکین TNFα در این زمان مربوط به گروه نرمال است و در میان گروه‌های دریافت کننده پروبیوتیک گروه LA-pa بیان ژن بالاتری نسبت به دو گروه دیگر LA-ba و LA-pba دارد. بین میزان بیان ژن در ۳ گروه دریافت کننده پروبیوتیک و گروه صفر اختلاف معنی‌دار وجود ندارد (p>۰/۰۵). آنالیز نتایج بیان ژن سیتوکین TNFα در گروه های مختلف در روز ۶۰ ام، نشان داد که گروه نرمال نسبت به سایر گروه‌ها بیش‌ترین میزان بیان ژن را دارد. میزان افزایش بیان مشاهده شده در گروه نرمال فقط با گروه صفر معنی‌دار بود (p≤۰/۰۵) و با سه گروه دیگر LA-pa، LA-ba و LAC-pba معنی‌دار نبود (p>۰/۰۵). تحلیل نتایج به‌دست آمده در مورد آنالیز بیان ژن سیتوکین TNFα در روز ۲۸ (شکل ۵) نشان داد که در گروه نرمال نسبت به سایر گروه‌ها بیش‌ترین میزان بیان ژن وجود دارد و در میان گروه‌های دریافت کننده پروبیوتیک گروه LA-pa بالاترین میزان تکثیر ژن TNFα را دارد اما اختلاف معنی‌داری بین نتایج به‌دست آمده در بین این سه گروه و هم‌چنین با گروه نرمال و صفر وجود ندارد (p>۰/۰۵).



[ Downloaded from journalaer.com on 2026-06-14 ]

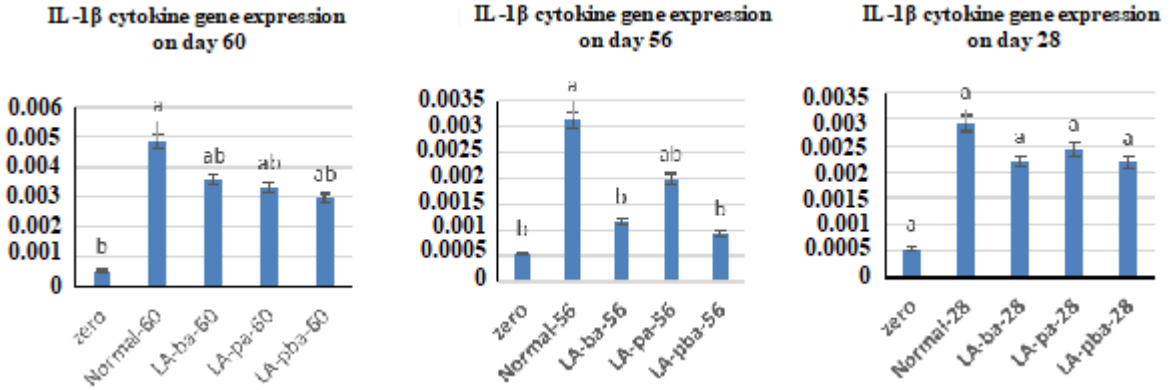



**شکل ۴: نتایج بررسی میزان بیان ژن سیتوکین IL-1β گروه‌های مختلف در روز ۲۸، ۵۶ و ۶۰**

**Figure 4: Results of examining the expression level of the IL-1β cytokine gene in different groups on days 28, 56, and 60**

حروف هم‌نام انگلیسی بالای هر ستون نشان از عدم تفاوت معنی‌دار (p>۰/۰۵) و حروف غیر هم‌نام نشان از وجود تفاوت معنی‌دار (p<۰/۰۵) بین آن دو گروه می‌باشد

The same English letters above each column indicate no significant difference (p<0.05) and the non-same letters indicate a significant difference (p<0.05) between the two groups




**شکل ۵: نتایج بررسی میزان بیان ژن سیتوکین TNFα گروه‌های مختلف در روز ۲۸، ۵۶ و ۶۰**

**Figure 5: Results of examining the expression level of the TNFα cytokine gene in different groups on days 28, 56, and 60**

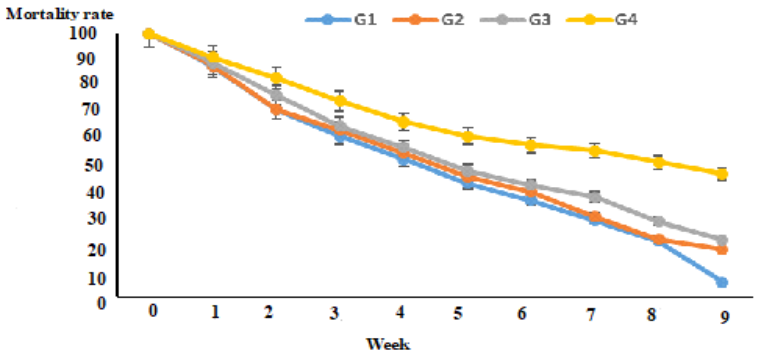
حروف هم‌نام انگلیسی بالای هر ستون نشان از عدم تفاوت معنی‌دار (p>۰/۰۵) و حروف غیر هم‌نام نشان از وجود تفاوت معنی‌دار (p<۰/۰۵) بین آن دو گروه می‌باشد

The same English letters above each column indicate no significant difference (p<0.05) and the non-same letters indicate a significant difference (p<0.05) between the two groups

**نتایج میزان مرگ و میر:** بررسی میزان مرگ و میر ماهی‌ها در گروه‌های مختلف در طی ۹ هفته و هر هفته ثبت گردید که نتایج آن در شکل ۶ نشان داده شده است. با توجه به این‌که تا قبل از روز ۵۶ که پروبیوتیک دهی انجام شده است میزان مرگ و میرها با مرگ‌طبیعی بوده است که تعداد آن‌ها اهمیت زیادی در این پروژه ندارد و آن چه که اهمیت دارد نتایج به‌دست آمده پس از روز ۵۶ است. در روز ۵۶ چالش با عامل پاتوژن آئروموناس هیدروفیلا انجام شده‌است. سنجش میزان مرگ و میر تا روز ۶۰ و پایان دوره آزمایش ثبت گردید تا مشخص شود استفاده از پروبیوتیک‌ها در مقابل ورود پاتوژن‌ها تاثیر داشته‌اند. نتایج به‌دست آمده از این بررسی (شکل ۶) نشان‌داد که بیش‌ترین میزان بقا در هفته نهم مربوط به گروه دریافت کننده باکتری پروبیوتیک لاکتوباسیلوس بولگاریکوس و مواجهه با باکتری پاتوژن آئروموناس هیدروفیلا بوده و کم‌ترین میزبان بقا مربوط به گروه نرمال است که دریافت پروبیوتیک نداشته و مواجهه با پاتوژن آئروموناس هیدروفیلا داشته است. ضمناً در طی کل دوره آزمایش با افزایش زمان در هر ۴ گروه آزمایش میزان بقا روند کاهشی داشته است.



[ Downloaded from journalaer.com on 2026-06-14 ]




**شکل ۶: نتایج بررسی میزان مرگ و میر گروه‌های مختلف در ۹ هفته**

**Figure 6: Results of the mortality rate study of different groups in 9 weeks**

۱G)گروه نرمال: گروه شاهد، عدم دریافت پروبیوتیک و مواجهه با پاتوژن آئروموناس هیدروفیلا، 2G)گروه LA.pba: گروه دریافت‌کننده ترکیب باکتری پروبیوتیک لاکتوباسیلوس پلانتاروم و لاکتوباسیلوس دلبروکی زیرگونه بولگاریکوس و مواجهه با باکتری پاتوژن آئروموناس هیدروفیلا، 3G)گروه LA.pa: گروه دریافت‌کننده باکتری پروبیوتیک لاکتوباسیلوس پلانتاروم و مواجهه با باکتری پاتوژن آئروموناس هیدروفیلا، 4G)گروه LA.ba: گروه دریافت‌کننده باکتری پروبیوتیک لاکتوباسیلوس دلبروکی زیرگونه بولگاریکوس و مواجهه با باکتری پاتوژن آئروموناس هیدروفیلا

۱G) Normal group: control group, no probiotic intake and exposure to the pathogen *Aeromonas hydrophila*, 2G) LA.pba group: group receiving a combination of probiotic bacteria *Lactobacillus plantarum* and *Lactobacillus delbrueckii* subspecies *bulgaricus* and exposure to the pathogenic bacteria *Aeromonas hydrophila*, 3G) LA.pa group: group receiving probiotic bacteria *Lactobacillus plantarum* and exposure to the pathogenic bacteria *Aeromonas hydrophila*, 4G) LA.ba group: group receiving probiotic bacteria *Lactobacillus delbrueckii* subspecies *bulgaricus* and exposure to the pathogenic bacteria *Aeromonas hydrophila*

# بحث

**بررسی حضور پروبیوتیک در روده ماهی:** با تحلیل نتایج به دست آمده در مورد این نوع پروبیوتیک به‌نظر می‌رسد در هر سه بازه زمانی، بیش‌ترین میزان توزیع مربوط به گروه LA-pba است. نتایج به‌دست آمده در مورد پروبیوتیک لاکتوباسیلوس بولگاریکوس نشان‌دهنده بیش‌ترین میزان تکثیر در گروه LA-ba و به‌ویژه بعد از القای آلودگی با پاتوژن مورد نظر در روده ماهی‌های مورد بررسی است. در مطالعات دیگر اثبات شده است پروبیوتیک‌ها می‌توانند با استفاده از مکانیسم‌های مختلف و به‌روش رقابتی برای ایجاد جمعیت مورد نظر و رقابت با میکروب‌های درونی در روده عمل کنند. از جمله این مکانیسم‌ها تولید ترکیبات مهارکننده، رقابت برای مواد شیمیایی یا انرژی، رقابت برسر محل‌های چسبندگی است (۱۶). پروبیوتیک‌ها با ایجاد کلنی بر روی سطح مخاط و افزایش جمعیت باکتری‌های مفید در دستگاه گوارش میزبان و تغییر فلور باکتریایی توان مقابله با انواع باکتری‌های پاتوژن را به‌دست می‌آورند (۲۰). در یک تحقیق بیان شد که باکتری‌های پروبیوتیک لاکتوباسیلوس بولگاریکوس و لاکتوباسیلوس پلانتاروم به شدت در روده ماهی *T. grypus* چسبنده هستند زیرا این باکتری‌ها بومی (autochthonous) خود ماهی هستند و انتخاب مناسبی به‌عنوان خوراک پروبیوتیکی می‌باشند (۱۸). هم‌چنین در مطالعه‌ای دیگر نشان داده شد که باکتری‌های پروبیوتیک باسیلوس کواگولانس و لاکتوباسیلوس پلانتاروم چسبندگی زیادی به روده ماهی زبرا دارند و افزایش کلونیزاسیون پروبیوتیک‌ها منجر به حذف پاتوژن‌ها می‌شود (۳). در گزارشی نشان داده شده است که لاکتوباسیلوس بولگاریکوس، سویه چسبنده به روده ماهی خاردار اروپایی (*Diicentrarchus labrar*) می‌باشد (۲۲).

**بررسی میزان بیان ژن سیتوکین‌های IL-1β و TNFα:** با تحلیل نتایج به دست آمده از بررسی‌ها، به‌ویژه در مورد روز ۶۰، مشخص گردید که حتی پس از مواجه شدن با پاتوژن بیماری‌زا میزان هردو نوع این سیتوکین‌ها در گروه LA-pba نسبت به‌دو گروه دیگر دریافت‌کننده پروبیوتیک و هم‌چنین گروه‌های نرمال پایین‌تر است. این نتایج اثبات می‌کند استفاده از پروبیوتیک‌ها حتی در صورت مواجهه با پاتوژن در طی ۴ روز بررسی (روز ۵۶ تا ۶۰) تاثیر زیادی در افزایش میزان سیتوکین‌های التهابی نداشته است. اما به‌طورکلی استفاده از پروبیوتیک‌ها میزان بیان سیتوکین‌های التهابی را تغییر می‌دهد. با توجه به‌در نظر گرفتن ماهی زبرا به‌عنوان مدل می‌توان این نتایج را در مورد انسان نیز تعمیم‌داد. تعدیل ایمنی یکی از رایج‌ترین مزایای در ارتباط با پروبیوتیک‌ها می‌باشد و این نقش آن‌ها در حیوانات آبزی به‌طور گسترده گزارش شده است. اثرات محافظتی پروبیوتیک‌ها شامل: حذف رقابتی پاتوژن‌ها، تولید ترکیبات ضدباکتریایی مانند آنتی‌بیوتیک‌ها و باکتریوسین‌ها و یا تقویت سد اپیتلیال روده. علاوه بر این، پروبیوتیک‌ها می‌توانند تعامل داشته باشند با سلول‌های اپیتلیال از طریق گیرنده‌های تشخیص الگو که می‌توانند پاسخ‌های ایمنی و فیزلولوژیکی را در میزبان تنظیم کنند مانند تولید سیتوکین‌ها، ارائه آنتی‌ژن‌ها و تمایز سلول‌های T و تنظیم عملکرد آن‌ها و این فرایندها برای دفاع از میزبان در برابر بیماری‌ها بسیار مهم می‌باشد. مطالعات گذشته نشان داده است که پروبیوتیک‌ها (مانند باکتری‌های اسیدلاکتیک) که می‌توانند بیان ژن‌های سیتوکین التهابی و ضد التهابی را به‌طور موثری تنظیم کنند (۲۳). سلول‌های ایمنی مخاطی ساکن روده ممکن است با ترشح انواع مختلف سیتوکین و مواد تنظیم کننده سیستم ایمنی، محل ایمنی موضعی را تنظیم و تعدیل کنند، بنابراین اپیتلیوم روده ممکن است که نقش کلیدی در شروع و



[ Downloaded from journalaer.com on 2026-06-14 ]

تنظیم ایمنی مخاطی در برابر باکتری‌ها از طریق تعامل با سلول‌های ایمنی بافت لنفوئیدی مرتبط با روده، لنفوسیت‌های زیر غشای مخاطی و لنفوسیت های داخل اپیتلیال داشته باشد. در مطالعه‌ای بیان شده است که باکتری‌های چسبنده به روده (لاکتوباسیلوس بولگاریکوس) ممکن است بیان سیتوکین‌های روده میزبان را کاهش دهند و یا این که بر بیان آن‌ها تاثیری نگذارند، اما سویه‌های غیرچسبنده (باسیلوس سوبتیلیس) تمایل به افزایش بیان سیتوکین‌ها دارند (۲۴). محققین دیگری گزارش دادند که مصرف این پروبیوتیک با تاثیر بر سلول‌های اپیتلیال روده باعث کاهش شدید در بیان ژن‌های دخیل در بیماری‌زایی این باکتری شده و با ترشح موکوس های مخاطی و افزایش ایمنی ذاتی سطح حفاظتی خوبی را ایجاد می‌نماید (۲۵). در مطالعه‌ای دیگر خوراک دهی با پروبیوتیک لاکتوباسیلوس بولگاریکوس سطح بیان ژن‌های سیتوکین پیش التهابی را در روده ماهی کپور کاهش و میزان بیان ژن‌های سیتوکین ضدالتهابی را افزایش داد. تغذیه با لاکتوباسیلوس بولگاریکوس در ماهی کپور باعث کاهش سطح سیتوکین‌های پیش التهابی IL1β و TNFα در روده شد (۱۱). در نتایج تحقیقی در سال ۲۰۱۶، هنگام تغذیه ماهی تیپلاپیا با چندگونه پروبیوتیک، افزایش هم‌زمان از سیتوکین‌های التهابی (TNF-α و IL-1β) را مشاهده کردند (۲۶). مشابه با نتایج این تحقیق، محققین دیگری بیان کردند بیان ژن TNFα هیچ تفاوت قابل توجهی را بین گروه های پروبیوتیکی لاکتوباسیلوس کازئی و گروه کنترل بعد از گذشت ۷۲ ساعت از چالش با پاتوژن آئروموناس هیدروفیلا نداشت، با این حال سطح بالای بیان IL1β در گروه پروبیوتیکی نسبت به گروه کنترل در ۸ ساعت پس از عفونت مشاهده شد (۲۳). هم‌چنین Wang و همکاران، با بررسی اثر باسیلوس کواگولانس و لاکتوباسیلوس پلانتاروم در ماهی زبرا به این نتیجه رسیدند که بیان ژن های سیتوکین در گروه‌های پروبیوتیکی به‌تدریج در طی زمان‌های مورد بررسی تا ۲۸ روز بعد از خوراک‌دهی کاهش یافت و بعد از مواجهه با پاتوژن در روز اول افزایش و به مرور زمان تا روز سوم کاهش یافت (۳).

**بررسی میزان مرگ و میر:** یکی از مواردی که در این پژوهش بسیار اهمیت دارد تاثیر استفاده از پروبیوتیک‌ها در کاهش میزان مرگ و میر ماهی‌ها و به‌ویژه پس از مواجهه با عامل پاتوژن بوده است. همان‌طورکه قبلاً بیان شد، میزان بقا در هفته نهم (روز ۶۰) آزمایش که آخرین روز سنجش های متوالی هفتگی میزان مرگ و میر بوده است گروه دریافت کننده باکتری پروبیوتیک لاکتوباسیلوس بولگاریکوس مواجه‌شده با پاتوژن دارای بیش‌ترین میزان بقا در این زمان نسبت به سایر گروه‌ها بوده است. این نتایج تاثیر مطلوب استفاده از پروبیوتیک در کاهش میزان مرگ و میر ماهی‌ها و به‌ویژه پس از القای پاتوژن اثبات می نماید. مکانیسم های متعددی پیشنهاد شده است که پروبیوتیک‌ها باعث افزایش راندمان تبدیل و افزایش وزن و در نتیجه بهبود عملکرد رشد و نهایتاً بهبود سیستم ایمنی بدن در برخی آبزیان می‌شوند. پروبیوتیک‌ها با تولید ترکیبات مسمومیت‌زدا، تجزیه ذرات غیرقابل هضم، افزایش اشتها، افزایش قابلیت جذب مواد معدنی و عناصرکمیاب، تولید آنزیم های گوارشی مهم و تحریک اشتها می‌شوند (۱۷). مشابه با نتایج به‌دست‌آمده از تحقیق حاضر، محققین در سال ۲۰۱۴ که بیان نمودند لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس در افزایش میزان زنده‌مانی ماهی‌های مواجه شده با عامل بیماری‌زا آئروموناس هیدروفیلا نقش دارد (۲۷). هم‌چنین محققین دیگری بیان نمودند مکمل غذایی با لاکتوباسیلوس پلانتاروم باعث کاهش مرگ و میر و کلونیزاسیون آئروموناس هیدروفیلا در ماهی زبرا شد (۱۷). هم‌چنین مرگ و میر در ماهی‌های زبرا که خوراک پروبیوتیکی لاکتوباسیلوس پلانتاروم و باسیلوس کواگولانس مصرف کرده بودند نسبت به گروه کنترل، کاهش داشت (به‌ترتیب ۵۳/۱ و ۲۴/۴ درصد) و این باکتری‌ها می‌توانند در روده کلونیزه شوند و اثر محافظتی بر علیه پاتوژن داشته باشند (۳). در مطالعه ای دیگر نرخ زنده مانی در ماهی های کپور خوراک‌دهی شده با لاکتوباسیلوس دلبروکی زیرگونه بولگاریکوس بعد از چالش با پاتوژن آئروموناس هیدروفیلا به‌طور معنی‌داری نسبت به گروه کنترل، بیش‌تر بود (۱۱). اثرات سودمند و درمانی انواع پروبیوتیک‌ها در مطالعات متعددی موردبررسی قرار گرفته و به نتایج آن اشاره شده است. در برخی از بررسی ها استفاده از مدل های غیرانسانی مانند استفاده از ماهی زبرا به‌عنوان یک مدل موفق برای مطالعات بیولوژیکی در این زمینه مورد توجه بوده است. این ماهی از نظر فیزیولوژی دستگاه گوارش، فارماکولوژیکی و ژنتیکی بسیار به پستانداران شبیه است. هم چنین شباهت قابل توجه سیستم ایمنی ماهی زبرا به پستانداران به‌عنوان یک مدل جایگزین برای مطالعه ایمنی ذاتی و ایمنی تطبیقی و هم‌چنین بدخیمی‌های ناشی از سلول‌های ایمنی می باشد. بنابراین این ماهی مدلی جذاب برای بررسی فرایندهای اساسی التهابی و آسیب به روده است که در این پژوهش از آن استفاده شده و نتایج به‌دست آمده، برای انسان قابل تعمیم می‌باشد. به‌نظر می‌رسد نتایجی که در این مطالعه به‌دست آمده، نشان‌دهنده تاثیر مناسب استفاده از دو نوع پروبیوتیک لاکتوباسیلوس پلانتاروم و لاکتوباسیلوس بولگاریکوس در ایجاد محافظت در برابر عامل بیماری‌زای آئروموناس هیدروفیلا داشته است. اما نکته‌ای که باید به آن توجه گردد این است که نتایج مطالعات دیگر محققین در برخی موارد با نتایج به‌دست آمده از مطالعه حاضر، تفاوت‌هایی داشت که به‌دلیل نوع ماهی، پروبیوتیک و عامل پاتوژن متغیر بودند. بنابراین لازم است به فاکتورهای موثر دیگر مانند شرایط رشد ماهی، محیط جغرافیایی، شرایط پرورش و عواملی مشابه بیش‌تر توجه گردد.

## منابع


1. **Agh, N., Irani, A., Noori, F. and Tookmehchi, A., 2019.** Survey of *Lactobacillus delbrueckii* effects on Persian sturgeon in different life stages. *Journal of Fisheries Science and Technology*. 8(1): 1-8. https://doi.org/10.22113/jmst.2019.156745.22 27 (In Persian)
2. **Foo, H.L., Loh, T.C., Mutalib, N.E.A. and Rahim, R.A., 2019.** The myth and therapeutic potentials of postbiotics.




[ Downloaded from journalaer.com on 2026-06-14 ]

Primalac probiotic. *Animal Physiology and Development Scientific Research*. 14(2): 63-76. (In Persian)

16. **NguyenVan, N., Satoru Onodab, T., Van Khanh, T., Duy Hai, P., Thanh Trung, N., Hoang, L. and Koshio, Sh., 2019.** Evaluation of dietary heat-killed *Lactobacillus plantarum* strain L-137 supplementation on growth performance, immunity and stress resistance of nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). *Aquaculture*. 498: 371-379. https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2018.08.081
17. **Li, S., Guo, L., Si, X., Dai, Z., Zhou, Z. and Wu, Z., 2022.** *Lactobacillus plantarum* WCFS1 alleviates *Aeromonas hydrophila* NJ-1induced inflammation and muscle loss in zebrafish (*Danio rerio*). *Aquaculture*. 548(1). https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2021.737603
18. **Mohammadian, T., Alishahi, M., Tabandeh, M.R., Ghorbanpoor, M., Gharibi, D., Tollabi, D. and Rohanizade, S., 2016.** Probiotic effects of *Lactobacillus plantarum* and *L. delbrueckii* ssp. *bulguricus* on some immune-related parameters in *Barbus grypus*. *Aquacult International*. 24: 225-242. https://doi.org/10.1007/s10499-015-9921-8
19. **Nobakht, F., Mohabatkar, H. and Behbahani, M., 2022.** An Experimental Study of the Effects of *Lactobacillus Acidophilus* and *Lactobacillus Plantarum* Probiotic Bacteria on the Immune System, Growth Factors, and Disease Resistance in the Rainbow Trout. *Biological Journal of Microorganism*. 10(40): 115-126
20. **Ringo, E., Van Doan, H., Lee, S.H., Soltani, M., Hoseinifar, S.H., Harikrishnan, R. and Song, S.K., 2020.** Probiotics, lactic acid bacteria and *bacilli*: interesting supplementation for aquaculture. *Journal of Applied Microbiology*. 129(1): 116-136. https://doi.org/10.1111/jam.14628
21. **Ehsannia, Sh., Ahari, H., Kakoolaki, Sh., Anvar, S.A. and Yousefi, Sh., 2023.** Effects of probiotics on Zebrafish model infected with *Aeromonas hydrophila*: spatial distribution, antimicrobial, and histopathological investigation. BMC Microbiology. 22(1): 167. https://doi.org/10.1186/s12866-022-02491-4
22. **Picchietti, S., Fausto, A.M., Randelli, E., Carnevali, O., Taddei, A.R. and Buonocore, F., 2009.** Early treatment with *Lactobacillus delbrueckii* strain induces an increase in intestinal T-cells and granulocytes and modulates immune-related genes of larval *Dicentrarchus labrax* (L.) *Fish Shellfish Immunol*. 26: 368-376.
23. **Qin, C., Xie, Y., Wang, Y., Li, S., Ran, C., He, S. and Zhou, Z., 2018.** Impact of *Lactobacillus casei* BL23 on the host transcriptome, growth and disease resistance in larval zebrafish. *Frontiers in Physiology*. 9: 1245. https://doi.org/10.3389/fphys.2018.01245
24. **Liu, W., Ren, P., He, S., Xu, L., Yang, Y., Gu, Z. and Zhou, Z., 2013.** Comparison of adhesive gut bacteria composition, immunity, and disease resistance in juvenile hybrid tilapia fed two different *Lactobacillus* strains. *Fish & Shellfish Immunology*. 35(1): 54-62. https://doi.org/10.1016/j.fsi.2013.04.010
25. **Zivkovic, M., Hidalgo-Cantabrana, C., Kojic, M., Gueimonde, M., Golic, N. and Ruas-Madiedo, P., 2017.** Capability of exopolysaccharide-producing *Lactobacillus paraplantarum* BGCG11 and its non producing isogenic strain NB1, to counteract the effect of enteropathogens upon the epithelial cell line HT29-MTX. *Food Research International*. 74: 199-207. https://doi.org/10.1016/j.foodres.2015.05.012
26. **Standen, B.T., Peggs, D.L., Rawling, M.D., Foey, A., Davies, S.J., Santos, G.A. and Merrifield, D.L., 2016.** Dietary administration of a commercial mixed-species probiotic improves growth performance and modulates the intestinal immunity of tilapia, *Oreochromis niloticus*. *Fish & Shellfish Immunology*. 49: 427-435. https://doi.org/10.1016/j.fsi.2015.11.037
27. **Villamil, L., Reyes, C. and Martínez‐Silva, M.A., 2014.** In vivo and in vitro assessment of *Lactobacillus acidophilus* as probiotic for tilapia (*Oreochromis* niloticus, Perciformes: Cichlidae) culture improvement. *Aquaculture Research*. 45(7): 1116-1125. https://doi.org/10.1111/are.12051

microbiome and metabolome in diagnosis, therapy and other strategic applications, 8th ed. Elsevier. 201-211.

3. **Wang, Y., Ren, Z., Fu, L. and Su, X., 2016.** Two highly adhesive lactic acid bacteria strains are protective in zebrafish infected with *Aeromonas hydrophila* by evocation of gut mucosal immunity. *Journal of Applied Microbiology*. 120(2): 441-451. https://doi.org/10.1111/jam.13002
4. **Brugman, S., 2016.** The zebrafish as a model to study intestinal inflammation. *Develoment & comparative immunology*. 46: 82-92. https://doi.org/10.1016/j.dci.20 16.02.020
5. **Saddhe, A.A., Banerjee, G., Jamdadeh, R.A. and Thete, K.D., 2013.** Zebrafish the reliable vertebrate model organism. *DCSI*. 91: 172-128.
6. **Fadai Raini, M., Ahmadifar, A. and Inayat Gholampour, T., 2017.** Study of changing of chemical muscle content during maturation in Zebrafish (*Danio rerio* Hamilton, 1822) fed with prebiotic inulin. *Journal of Animal Environment*. 9(3): 245-252. https://doi.org/20.1001.1.27171388.1396.9.3.32.2 (In Persian)
7. **Ali Azizi, R. and Ghaeni, M., 2016.** The effect on the color supplement *Chlorella* sp. Algae of *Danio rerio*. *Journal of Animal Environment*. 8(2): 241-248. https://doi.org/20.1001.1.27171388.1395.8.2.32.3 (In Persian)
8. **Saeedi, Z., Mirvaqefi, A.R., Abed Alam Dost, A.R., Farahmand, H. and Safari, R., 2020.** Investigating sexual maturation and gonad morphohistology in *Danio rerio* zebrafish offspring under the influence of *Lactobacillus plantarum* probiotic. *Scientific Journal of Iranian Fisheries*. 29(2): 103-114. https://sid.ir/paper/4331/fa (In Persian)
9. **Morshedi, V., Agh, N., Marmazi, J., Nouri, F. and Mohammadiyan, T., 2018.** Effects of Single and Combined Supplementation of *Lactobacillus plantarum* with dietary xylooligosaccharide on growth performance, body composition and physiological responses of sobaity (*Sparidentex hasta*) fingerling. *Journal of Marine Science and Technology*. 17(2): 44-57. https://doi.org/10.22113/jmst.2016.40995 (In persian)
10. **Lin, Sh., Mao, Sh., Guan, Y., Luo, L. and Pan, Y., 2012.** Effect of dietary chitosan oligosaccharides and *Bacillus coagulans* on the growth, innate immunity and resistanse of koi. *Aquaculture*. 342-343: 36-41. https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.20 12.02.009
11. **Zhang, C.H.N., Zhang, J.L., Guan, W.Ch., Zhang, Z.F., Guan, S.H., Zeng, Q.H., Cheng, G.F. and Cui, W., 2017.** Effects of *Lactobacillus delbrueckii* on immune response, disease resistance against *Aeromonas hydrophila*, antioxidant capability and growth performance of *Cyprinus carpio* Huanghe var. *Fish & Shellfish Immunology*. 68: 84-91. https://doi.org/10.1016/j.fsi.2017.07.012
12. **Tapia, P.A., Diaz, R.P. and Leon, R.J., 2012.** Use or the probiotic Shewanella putrefaciens Pdp11on the culture of Senegalenses sole (*Solea senegalensis*, Kaup 1858) and gilthead seabream (*Sparaus aurata*), *Aquaculture International*. 21: 1-15. https://doi.org/10.1007/s10499-012-9509-5
13. **Sepehrfar, D., Hoseinifar, S.H. and Jafarnodeh, A., 2019.** The effects of singular or combined administration of *Pediococcus acidlactii* and Rafinose as prebiotic on mucosal immune parameters and intestinal histomorphology of Common Carp (*Carassius auratus*). *Journal of Physiology and Animal Development*. 13(4): 69-79. http://aqudev.liau.ac.ir/article-1547-en.html (In persian)
14. **Zakariaei, H., Sudagar, M., Hoseini, S.S., Paknejad, H. and Baruah, K., 2022.** The effect of using synbiotics containing button mushroom (*Agaricus bisporus*) extract in combination with two species of lactic acid bacteria on digestive enzyme activities, body composition, growth and intestinal microbial flora in zebrafish. *Journal of Marine Science and Technology*. 21(2): 63-75. https://doi.org/10.22113/jmst.2020.23318 3.2375 (In Persian)
15. **Rameshgar, M., Qomi Marzdashti, M.R., Hashemi Karoi, M., Hosseinifard, M. and Tabaripour, S.R., 2021.** The effect of *Lactobacillus plantarum* and Bruis isolated from the digestive system of black fish (*Capoeta razii*) and its effect on the growth and safety indicators of common carp (*Cyprinus carpio*) in comparison with



[ Downloaded from journalaer.com on 2026-06-14 ]