DOI: 10.22092/VJ.2020.127649.1614
شماره ۱۳۲ پاییز ۱۴۰۰
تحقیقات دامپزشکی و فرآورده‌های بیولوژیک

تأثیر پروبیوتیک پدیوکوکوس اسیدلاکتیک و پری‌بیوتیک مانان‌الیگوساکارید و بتاگلوکان بر پارامترهای ایمنی قزل‌آلا و بقا در برابر استرپتوکوکوس اینائی

• **محمد هادی نخعی راد (نویسنده مسئول)**
گروه بهداشت و بیماریهای آبزیان، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه آزد اسلامی، واحد علوم و تحقیقات، تهران، ایران
• **عادل حقیقی خیابانیان اصل**
گروه بهداشت و بیماریهای آبزیان، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه آزد اسلامی، واحد علوم و تحقیقات، تهران، ایران
• **قباد آذری تاکامی**
گروه میکروبیولوژی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه آزد اسلامی، واحد علوم و تحقیقات، تهران، ایران
• **وودود رضویلر**
گروه میکروبیولوژی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه آزد اسلامی، واحد علوم و تحقیقات، تهران، ایران
• **میثم تهرانی شریفی**
گروه کلینیکال پاتولوژی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه آزد اسلامی، واحد گرمسار، گرمسار، ایران

تاریخ دریافت: ۱۶-۰۶-۱۳۹۸ تاریخ پذیرش: ۲۰-۰۳-۱۳۹۹
Email: nakhaeirad_hadi@yahoo.com

چکیده
پروبیوتیک‌ها سلول‌هاي میکروبي هستند که به طریقي وارد دستگاه گوارش مي‌شوند و زنده مي‌مانند تا سلامتي را در میزبان ایجاد نمایند. در این پژوهش با بهره‌گیری از پروبیوتیک‌ها و پری‌پروبیوتیک‌ها و نقش آن در تغذیه آبزیان، اثرات باکتری *Pediococcus acidilactic* و پری‌پروبیوتیک مانان‌الیگوساکارید و بتاگلوکان را بر روی برخی فاکتورهای ایمونولوژی ماهیان قزل‌آلای رنگین کمان مورد ارزیابی قرار گرفت. جهت انجام تحقیق، تعداد ۷۲۰ قطعه ماهی قزل‌آلای رنگین کمان سالم در چهار گروه شاهد، تحت درمان با پروبیوتیک، تحت درمان با پری‌پروبیوتیک و تحت درمان با پروبیوتیک + پری پروبیوتیک تقسیم شدند. پس از طی دوره آزمایش ایمونوگلوبولین تام، کمپلمان، IgM و لیزوزیم به عنوان فراسنج‌های ایمنی مورد بررسی قرار گرفتند. در این پژوهش با مقایسه آماری بین گروه‌های درمان و گروه شاهد، فاکتورهای ایمونولوژیک لیزوزیم و ایمونوگلوبولین تام فقط در گروه ۴ اختلاف معنی‌دار مشاهده شد. در رویارویی با باکتری *Streptococcus inaei* نیز فقط گروه ۴ کاهش تلفات معنی‌داری با دیگر گروه‌ها نشان داد. از نظر مقدار کمپلمان نیز هر سه گروه درمان فقط در روز ۶۰ با گروه شاهد اختلاف معنی‌دار داشتند. نتایج حاصل از این پژوهش حاکی از تاثیر پروبیوتیک و پری‌بیوتیک از طریق تحریک سیستم ایمنی و کاهش اثر پاتوژن‌ها و افزایش تولید ایمونوگلوبین‌ها، همچنین باعث افزایش ماندگاری ماهیان قزل‌آلای رنگین‌کمان و جلوگیری از تلفات ناشی از رویارویی با باکتری *Streptococcus inaei* در ماهیان قزل‌آلا می‌شود.

کلمات کلیدی: پروبیوتیک، مانان الیگوساکارید، بتاگلوکان، *Streptococcus inaei*

Veterinary Researches & Biological Products No 132 pp: 40-47

Effect of probiotic Pediococcus acidilactic and manioligosaccharide and beta-glucan prebiotic on immune salmon and survival parameters against Streptococcus inaei

By:Nakhaei Rad, M. H., (Corresponding Author) College of veterinary Medicine, Islamic Azad University Science and Research Branch, Tehran, Iran. Haghighi Khiabanian Asl, A., Department of aquatic animal health and diseases, College of Veterinary Medicine, Islamic Azad University Science and Research Branch, Tehran, Iran. Azari Takami, Gh., Department of Microbiology, College of Veterinary Medicine, Islamic Azad University Science and Research Branch, Tehran, Iran. Razavilar, V., Department of Microbiology, College of Veterinary Medicine, Islamic Azad University Science and Research Branch, Tehran, Iran and Tehrani Sharifi, M., Department of Clinical Pathology, College of Veterinary Medicine, Islamic Azad University Garmsar Branch, Garmsar, Iran.

Received: 2019-09-07 Accepted: 2020-06-09

Email: nakhaeirad_hadi@yahoo.com

Probiotics are microbial cells that enter the gastrointestinal tract in some way and live to provide health to the host. In this study, we investigated the effects of *Pediococcus acidilactic* and peri-probiotic *Mannan-oligosaccharide* and beta-glucan on some salmon fish immunological factors using probiotics and per probiotics and their role in aquatic nutrition. In this study, 720 healthy rainbow trout were divided into four groups of control, probiotic-treated, prebiotic-treated and probiotic + prebiotic-treated. After treatment, total immunoglobulin, complement, IgM and lysozyme were evaluated as immunological parameters. In this study, statistically significant differences in lysozyme size and total immunoglobulin levels were observed in group 4 alone. Only group 4 showed a significant reduction in mortality compared to other groups in the treatment of Streptococcus inaei. There was a significant difference in the amount of complement in all three treatment groups only on day 60 with the control group. The results of this study indicated the beneficial and effective effects of combined probiotic and prebiotic use on immunologic factors and prevention of mortality from exposure to Streptococcus inaei in salmon.

Keywords: Probiotic, *Mann oligosaccharide*, Beta-glucan, *Streptococcus inaei*

مقدمه

پروبيوتيک‌ها سلول‌هاي ميکروبي هستند که به طريقي وارد دستگاه گوارش مي‌شوند و زنده مي‌مانند تا سلامتي را در ميزبان ايجاد نمايند (۲۰). سالمينن و همکاران (۱۹۹۹) تعريف پروبيوتيک را اينگونه ارائه کردند: "پروبيوتيک‌ها فرآورده‌هايي از سلول‌هاي ميکروبي يا اجزايي از سلول‌هاي ميکروبي هستند که اثرات مفيدي روي سلامت ميزبان دارند". در اين تعريف لزوم زنده بودن سلول‌هاي مرتبط با تغذيه نادیده گرفته شد (۱۵). موجودات پروبيوتيکي براي مکان‌هاي اتصال و غذا در سطح مخاطی روده رقابت مي‌کنند و در نتيجه از تشکيل کلوني باکتري‌هاي بيماري‌زا پيشگيري مي‌کنند (۱۴). مطالعه سيستم ايمني در ماهيان به صورت قابل توجهي در سال‌هاي اخير افزايش يافته است. بررسي‌ها نشان مي‌دهند که سيستم ايمني در ماهيان استخواني شباهت زيادي با پستانداران دارد. بعلاوه پرورش ماهيان بصورت متراکم منجر به افزايش احتمال ابتلا به بيماري‌هاي عفوني در تمام مراحل پرورش مي‌شود (۵). از اين رو مطالعه سيستم ايمني در ماهيان به حفظ سلامت آن‌ها در طول دوره پرورش کمك مي‌کند. محرک‌های سیستم ایمنی ترکیبات شیمیایی هستند که سيستم ايمني جانوران را فعال نموده و باعث مي‌شوند که در برابر عفونت‌هاي ويروسي، باکتريايي، قارچي و انگلي مقاوم‌تر شوند (۳). در واقع، محرک‌های سیستم ایمنی مقاومت در برابر بیماری عفونی را نه تنها از طريق افزايش پاسخ ايمني، بلکه از طريق افزايش اوليه مکانيسم دفاع داخل و خارج سلولي، افزايش مي‌دهند (۳). لارو ماهي، ميگو و ساير بي‌مهرگانِ سيستم ايمني کمتر تکامل يافته‌تري نسبت به ماهيان بالغ دارند و اصولاً وابسته به پاسخ‌هاي ايمني غيراختصاصي هستند. همچنين ماهي نسبت به پستانداران بيشتر وابسته به مکانيسم دفاع غيراختصاصي است (۱۳). در ميان مکانيسم‌هاي دفاعي غيراختصاصي مهم در ماهي مي‌توان به سدهاي دفاعي از قبيل پوست، فلس، آنزيم‌هاي لاکتيکی موکوس و سرم اشاره نمود. مکانيسم دفاع غيراختصاصي سلولي شامل مونوسيت‌ها، ماکروفاژها، نوتروفيل‌ها و سلول‌هاي سيتوتاکسيك هستند.

آزمایشات انجام شده بر روي جانوران خون‌گرم نشان مي‌دهد که اضافه کردن پروبیوتیک به غذا مي‌تواند در برابر عفونت‌هاي روده‌اي مقاومت بیشتري را ایجاد نماید و ایمني اختصاصي و غیراختصاصي میزبان را افزایش دهد (۶). هر چند، امروزه مکانیسمي که موجب تحریک سیستم ایمني می‌شود، کاملاً شناخته نشده است. اما ممکن است اجزاء خاص دیواره سلولي یا لایه‌هاي سلولي بعنوان یك یاور، عمل نموده و موجب فزایش میزان پاسخ سیستم ایمنی هومورال خارج سلولی گردد. شواهد زیادي در دست است که نشان مي‌دهد ترکیبات باکتریایي به عنوان عامل محرك ایمني در ماهي و میگو نقش دارند (۱۳). پروبیوتیک‌ها از طریق افزایش فعالیت ماکروفاژی، افزایش تولید پادتن‌ها، ایمونوگلبولین‌ها و اینترفرون، افزایش پادتن‌های موضعی سطح موکوس سیستم ایمنی را تقویت می‌کنند (۶). امروزه جهت پیشگیری از بروز بیماری از مواد محرک سیستم ایمنی نیز جهت کنترل بیماری در صنعت آبزی پروری استفاده می‌شود. محرک‌های سیستم ایمنی نسبت به مواد شیمیایی ایمن‌تر و مطمئن‌تر می‌باشند و تأثیر آن‌ها در مقایسه با واکسیناسیون از دامنه وسیع‌تری برخوردار است (۹). عملکرد پروبیوتیک‌ها را می‌توان به صورت مواد مغذی موثر بر سیستم ایمنی و محرک سیستم ایمنی طبقه‌بندی کرد. تفاوت این مواد در مکانیسم عمل آنها است. مواد ایمنونوترینت به عنوان یک ماده مغذی برای سیستم ایمنی عمل می‌کند، در حالی‌که مواد ایمنواستیمولنت با تاثیر بر محور عصبی- ایمنی – درون‌ریز جانور سیستم ایمنی را تحت تاثیر قرار می‌دهد. پروبیوتیک‌ها و پری‌پروبیوتیک‌ها به صورت مکمل غذایی به جیره‌های تولیدی اضافه می‌شوند و اثرات مثبتی در تحریک رشد و فعالیت باکتری‌های مفید مجرای معدی - روده‌ای دارند (۱۰). هدف از انجام پژوهش حاضر افزودن پروبیوتیک باکتوسل و پری‌پروبیوتیک مانان الیگوساکارید به جیره غذایی ماهی قزل‌آلا و بررسی پارامترهای ایمنی این گونه اقتصادی در مواجهه با باکتری Streptococcus inaei می‌باشد.

مواد و روش‌ها

در این بررسی از ۱۲ تانک بتونی مکعبی شکل به ابعاد ۰/۶ m-۶۰ cm سانتی‌متر کار استفاده شد. ابتدا تانک‌های بتونی شستشو و با آهک زنده ضدعفونی شد. سپس جریان آب مورد استفاده به طور یک طرفه و بصورت افشان از بالای حوضچه وارد شده و از خروجی کف و وسط هر تانک خارج می‌شد. مقدار آب ورودی در هر کانال برابر ۱/۵-۱ لیتر در ثانیه بود. فاکتورهای فیزیک و شیمیایی آب چاه مورد آزمایش توسط دستگاه مولتی‌پارامتر اندازه‌گیری شد. این مطالعه در قالب طرح کاملاً تصادفی صورت گرفت. بدین‌صورت که پروبیوتیک باکتریایی *Pediococus acidilactici* و همچنین پری‌پروبیوتیک مانان‌الیگوساکارید و بتاگلوکان از نمایندگی کمپانی Lallemand فرانسه، تهیه شد. تعداد۷۲۰ قطعه بچه ماهی قزل‌آلای رنگین کمان با وزن ۲± ۱۵ گرم که از نظر بالینی سالم، از مزارع پرورش ماهی قزل‌آلای دارای مجوز و تائیده‌ی دامپزشکی که پیشینه بیماری ندارند تهیه شد. پس از هفت روز سازگاري, بصورت تصادفی بین ۱۲ حوضچه پرورشی توزیع شدند. تغذیه بر اساس بیوماس، درجه حرارت آب و سه وعده خوراک در روز صورت گرفت. تهیه غذا به صورت هفتگی بوده و مقادیر انتخاب شده از هر پروبیوتیک را به همراه روغن مایع آفتابگردان (۱٪ وزن غذا) با غذا در ظروف جداگانه مخلوط گردید. و گروه‌های آزمایش به شرح ذیل صورت گرفت: تیمار یک (شاهد): مصرف خوراک تجاری (FFT۱ شرکت فرادانه)؛ تیمار دو: پروبیوتیک در دوز ۳۰۰ ppm؛ تیمار سه: پری‌پروبیوتیک در دوز ۲ ppm؛ تیمار چهار: پروبیوتیک + پری پروبیوتیک به ترتیب ۱۵۰ ppm و ۱ ppm (کلیه گروه‌ها با سه تکرار) بمدت شصت روز تیمار صورت گرفت. جهت ارزیابي تأثیر مصرف پروبیوتیک و پری‌پروبیوتیک در این بررسی فعالیت لیزوزیم، ایمنوگلبولین M (IgM) و فعالیت سیستم کمپلمان سرم به عنوان پارامترهای پاسخ ایمنی ماهیان و مقایسه بین تیمارها و نمونه شاهد، سه مرتبه در روز صفر، سی و شصت نمونه‌برداری و خون‌گیری از سیاهرگ ناحیه دمی واقع در پشت باله مخرجی بچه ماهیان صورت گرفت. پس از پایان دوره، نسبت به رویارویی ماهیان با باکتری بیماری‌زای استرپتوکوکوس اینایی اقدام شد.

بررسی میزان فلور میکروبی

به منظور بررسی میزان فلور میکروبی دو ماهی از هر تیمار در روزهای صفر و ۶۰ به صورت تصادفی از نمونه‌هایی که خون‌گیری شده بودند، روده هر ماهی از محوطه شکمی خارج و از ۱ سانتی‌متر به انتها توسط یک قیچی استریل بریده شد. ۱ گرم از هر روده در ۰/۹ میلی‌لیتر سرم فیزیولوژی استریل جداگانه هموژن گردید. رقت نمونه توسط سرم فیزیولوژی استریل به ۱۰۶ CFU/mL رسانده شد. سپس ۱۰ میکرولیتر از آن بر روی محیط کشت TSA (tryptic soya agar) (Merck, Germany) داخل پلیت یکبار مصرف استریل به منظور شمار کل باکتری‌های قابل رشد و ۱۰۰ میکرولیتر بر روی پلیت حاوی MRS آگار برای شمارش تعداد باکتری‌های قابل رشد گروه اسیدلاتیک اسپری شد. کلنی‌های باکتریایی بعد از گرمخانه‌گذاری در دمای ۳۶ درجه سانتی‌گراد به مدت ۴۸ ساعت شمرده شدند (۱۱).

بررسی میزان مقاومت ماهی در مقابل رویارویی با استرپتوکوکوزیس

پس از ۶۰ روز تغذیه ماهیان با پروبیوتیک و پری‌پروبیوتیک، از هر تیمار ۳۰ ماهی به صورت تصادفی انتخاب شد (از هر تکرار ۱۰ قطعه) که در مجموع ۱۲۰ قطعه ماهی انتخاب و در تانک‌های جداگانه‌ای توزیع شدند. باکتری مورد نظر از یک مزرعه آلوده به بیماری استرپتوکوکوس (inaei Streptococcus) جداسازی شد. سلول‌های باکتری inaei Streptococcus جدا شده بعد از سانتریفیوژ با دور ۸۶۸۲ دور در دقیقه در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد برای ۱۵ دقیقه، توسط PBS (بافر فسفات) سه بار شستشو و سپس در یک لوله آزمایش جمع‌آوری شدند. نمونه توسط دستگاه اسپکتروفتومتر با طول موج ۶۰۰ نانومتر در مقابل شاهد بلانک (بافر فسفات) خوانده شد. پس از مقایسه عدد خوانده شده با نمودار استاندارد رفت $۱۰^{۸}$ CFU/mL × ۱/۲ از باکتری در آزمایشگاه رقت $۱۰^{۸}$ CFU/mL برای القأ بیماری انتخاب شد. در مجموع ۱۲۰ قطعه ماهی به وسیله دنتول حاوی ۱۰٪ کارواکرول بیهوش شدند و در شرایط استریل با سرنگ انسولین تیمار به صورت تزریق داخل صفاقی صورت گرفت و به مدت ۱۵ روز نگهداری شدند. در طول این مدت وضعیت آبرسانی، هوادهی، غذادهی و جمع‌آوری تلفات و آزمایش آب مانند درجه حرارت و pH و اکسیژن به طور دقیق انجام گرفت (۱۶). جهت تجزیه و تحلیل داده‌ها از

روش آنالیز واریانس یک طرفه (ANOVA)، نرم‌افزار SPSS (نسخه ۱۵) و آزمون توکی استفاده شد. در تمام بررسی‌ها سطح معنی‌دار آزمون‌ها $p<۰/۰۵$ در نظر گرفته شد. همچنین جهت ترسیم نمودارها از نرم‌افزار Excel (نسخه ۲۰۱۳) استفاده شد.

نتایج

نتایج بررسی فلور میکروبی روده

در روز صفر هیچ باکتری دیده نشد ولی در روز ۶۰ شمار باکتری‌ها در روده تمامی گروه‌ها افزایش یافته بود که این افزایش در گروه شماره چهار بیشتر و مشهودتر بود (جدول۱).

نتایج پارامترهاي ايمني

ایمونوگلبولین تام

مقایسه گروه کنترل با گروه‌های درمان در روز صفر اختلاف معنی‌داري از لحاظ میزان ایمونوگلبولین تام بین تیمارهاي مختلف وجود نداشت. میانگین ایمونوگلبولین کل در همه تیمارها در روز صفر در حدود ۲/۹۸ میلی‌گرم در میلی‌لیتر می‌باشد. در روز ۳۰ و ۶۰ میزان میانگین ایمونوگلبولین تام تیمار چهار دارای اختلاف معنی‌داری نسبت به سایر تیمارها می‌باشد (جدول۲).

جدول۲: مقایسه میزان آنتی‌بادی سرم کل گروه کنترل با گروه‌های درمان اختلاف آماری مشاهده نگردید. حروف یکسان نشان‌دهنده عدم مشاهده اختلاف معنی‌دار می‌باشد. ($p\geq۰/۰۵$) بر اساس (Mean±SE=۳).

کمپلمان

مقایسه گروه کنترل با گروه‌های درمان در روز صفر و ۳۰ اختلاف معني داري از لحاظ میزان کمپلمان بین تیمارهاي مختلف وجود نداشت. در روز ۶۰ میزان کمپلمان تیمار های ۲و ۳و ۴ به شکل معنی داری از گروه شاهد بیشتر بود (جدول۳).

جدول۱- نتایج شمارش باکتریولوژیک محتویات روده ماهیان در طول مطالعه (CFU/g).

به تفکیک تیمارها: تیماریک(شاهد)، تیمار دو پروبیوتیک در دوز ppm ۳۰۰؛ تیمار سه: پری پروبیوتیک در دوز ppm ۲ ؛ تیمار چهار: پروبیوتیک +پری پروبیوتیک به ترتیب ppm ۱۵۰ و ppm ۱.

تیمار	روزهای نمونه گیری	
	روز صفر	روز ۶۰
تیمار یک (شاهد)	دیده نشد	کمتر از ۱۰۰
تیمار دو	دیده نشد	$۷/۸ \times ۱۰^{۴}$
تیمار سه	دیده نشد	$۳/۵ \times ۱۰^{۴}$
تیمار چهار	دیده نشد	$۴/۹ \times ۱۰^{۶}$

جدول۲- مقایسه میزان آنتی بادی سرم کل (میکروگرم در میلی لیتر) در گروه‌های مورد مطالعه.

به تفکیک تیمارها: تیماریک(شاهد)، تیمار دو پروبیوتیک در دوز ppm ۳۰۰؛ تیمار سه: پری پروبیوتیک در دوز ppm ۲ ؛ تیمار چهار: پروبیوتیک +پری پروبیوتیک به ترتیب ppm ۱۵۰ و ppm ۱.

تیمار	روز صفر	روز سی	روز ۶۰
تیمار یک	۲/۹۷ ^{a}	۶/۹۷ ^{a}	۷/۱۵ ^{a}
تیمار دو	۲/۹۷ ^{a}	۷/۰۳ ^{a}	۷/۳۵ ^{a}
تیمار سه	۲/۹۸ ^{a}	۷/۸۴ ^{a}	۷/۹۱ ^{a}
تیمار چهار	۲/۹۸ ^{a}	۸/۹۱ ^{b}	۹/۹۲ ^{b}

جدول۳: مقایسه میزان فعالیت کمپلمان گروه کنترل با گروه‌های درمان اختلاف آماری مشاهده نگردید. حروف یکسان نشان‌دهنده عدم مشاهده اختلاف معنی‌دار می‌باشد. (p≥۰،۰۵) براساس (n=۳ Mean±SE).

سنجش میزان ایمنوگلوبولین M

پس از سنجش میزان ایمنوگلوبولین M در روز های صفر و سی و شصت ، مشخص شد که با افزایش سن میزان ایمنوگلوبولین Mهم افزایش یافته است. اگرچه میزان این ایمنوگلوبولین در گروه چهار از دیگر گروه‌ها در روز سی و شصت بیشتر بود، ولی این تفاوت از نظر آماری اختلاف معنی دار نداشت (جدول۴).

جدول۴: مقایسه میزان IgM گروه کنترل با گروه‌های درمان اختلاف آماری مشاهده نگردید. حروف یکسان نشان‌دهنده عدم مشاهده اختلاف

جدول۳- مقایسه میزان فعالیت کمپلمان(میکروگرم در میلی لیتر) در گروه‌های مورد مطالعه.

به تفکیک تیمارها: تیماریک(شاهد)، تیمار دو پروبیوتیک در دوز ppm ۳۰۰؛ تیمار سه: پری پروبیوتیک در دوز ppm ۲ ؛ تیمار چهار: پروبیوتیک +پری پروبیوتیک به ترتیب ppm ۱۵۰ و ppm ۱.

تیمار	روز صفر	روز سی	روز ۶۰
تیمار یک	۱۹/۹۵ [a]	۴۳/۱۳ [a]	۴۵/۱۱ [a]
تیمار دو	۱۸/۹۱ [a]	۴۳/۴۵ [a]	۵۶/۳۴ [b]
تیمار سه	۱۹/۷۶ [a]	۴۳/۷۸ [a]	۵۷/۷۹ [b]
تیمار چهار	۱۹/۴۳ [a]	۴۴/۰۸ [a]	۵۸/۱۴ [b]

جدول۴- مقایسه میزان IgM در گروه‌های مورد مطالعه.

تیمار	روز صفر	روز سی	روز شصت
تیمار یک	۸۸/۶ [a]	۹۱/۸ [a]	۹۵/۴ [a]
تیمار دو	۸۷/۱ [a]	۹۲/۱ [a]	۹۵/۶ [a]
تیمار سه	۸۹/۳ [a]	۹۱/۶ [a]	۹۴/۶ [a]
تیمار چهار	۸۷/۴ [a]	۹۳ [a]	۹۷/۳ [a]

جدول۵- میانگین فعالیت لیزوزیم (میکروگرم در میلی لیتر).

تیمار	روز صفر	روز سی	روز شصت
تیمار یک	۲۳/۰۳ [a]	۲۴/۹۸ [a]	۲۹/۰۲ [a]
تیمار دو	۲۳/۴۹ [a]	۲۵/۱۴ [a]	۲۹/۷۵ [a]
تیمار سه	۲۴/۰۶ [a]	۲۶/۱۳ [a]	۳۱/۱۱ [a]
تیمار چهار	۲۵/۸۳ [a]	۲۷/۱ [a]	۳۴/۹۱ [b]

معنی‌دار می‌باشد. (p≥۰,۰۵) براساس (n=۳Mean±SE).

لیزوزیم

در روز صفر اختلاف مشهودی در میزان لیزوزیم گروه‌های درمان مشاهده نگردید ولی در روز ۳۰ تیمارهای ۳ و ۴ دارای میانگین بیشتری از نظر افزایش لیزوزیم به ترتیب ۲۶/۱۳ و ۲۷/۱ (میکروگرم در میلی لیتر) بوده ولی در مقایسه آماری با سایر تیمارها اختلاف معني دار مشاهده نشد. در روز ۶۰ افزایش میانگین لیزوزیم در همه تیمارها مشاهده گردید که تیمار چهار به طور معنی داری نسبت به سایر گروه‌ها بیشتر بود (جدول۵).

جدول ۵: مقایسه میزان لیزوزیم گروه کنترل با گروه‌های درمان. حروف یکسان نشان‌دهنده عدم مشاهده اختلاف معنی‌دار می‌باشد. (p≥۰,۰۵) براساس (n=۳Mean±SE).

نتایج آزمایش رویارویی با باکتری Streptococcus inaei

پس از ۱۵ روز مواجهه در گروه های درمان اطراف دهان و باله‌ها پرخونی دیده شدند و برخی از ماهیان دارای زخم جلدی و اگزوفتالمی بودند. در تمامی گروه ها تلفات از روز سوم آغاز شد اما یافته‌های حاصل از این بررسی نشان داد که تیمار یک (شاهد) از دیگر گروه‌ها تلفات بیشتری داشت و تلفات مشاهده شده در گروه چهارم از دیگر گروه‌ها کمتر بود (جدول۶).

جدول ۶: مقایسه تلفات ناشی از رویارویی با باکتری *Streptococcus inaei* گروه کنترل با گروه‌های درمان. حروف یکسان نشان‌دهنده عدم مشاهده اختلاف معنی‌دار می‌باشد. ($p \leq ۰/۰۵$) بر اساس Mean±SE (n =۳).

بحث

شاید بتوان مهم‌ترین ویژگي پروبیوتیک‌ها را در این دانست که ضمن کاهش بیماري و بهبود ضریب تبدیل غذایي در دام و طیور، هیچ باقیمانده‌ای در بافت‌ها نداشته و بر خلاف آنتی‌بیوتیک‌ها مقاومت میکروبي ایجاد نمي‌نمایند (۱۳, ۱۷). آنها غیربیماري‌زا و غیرسمي بوده و می‌توانند موجب پیشگیری از بروز اثرات جانبی نامناسب باشند (۱۴). یک پروبیوتیک موثر باید در شرایط محیطی مختلف و متفاوت خاصیت خود را حفظ نموده و در اشکال مختلف به صورت فعال باقی بماند. بنابر این باید به عنوان یک محصول زنده امکان تولید آن در سطح صنعتی موجود باشد؛ در انبار و محل مصرف در مزارع به مدت طولانی ثابت و قابل نگهداری باشد؛ در روده تاثیر خود را حفظ نماید و در آخر بر سلامتی میزبان تاثیر مثبت داشته باشد (۲, ۴, ۷, ۸, ۱۲, ۱۵-۱۸). سیستم کمپلمان یکی از مهم‌ترین فاکتورهای سرم به دلیل اثر فعال‌کنندگی آن روی دفاع سلولی محسوب می‌شود (۱۹). لیزوزیم یکی دیگر از اجزاء اصلی سیستم دفاعی ایمنی بی‌مهرگان و مهره‌داران محسوب می‌شود. اگرچه نقش فیزیولوژی آن هنوز مشخص نیست، اما در دفاع علیه میکروارگانیسم‌های مهاجم شرکت می‌کند. میزان این آنزیم در سرم خون و موکوس پوست ماهیان به طور چشمگیری بالا می‌باشد. همچنین این آنزیم به دنبال تزریق فرآورده‌های میکروبی، در پاسخ به عفونت‌های باکتریایی و جیره غنی شده با پروبیوتیک در سرم ماهیان افزایش می‌یابد (۱). در این پژوهش نیز پس از ۶۰ روز تیمار با پروبیوتیک و پری‌بیوتیک در گروه ۴ افزایش معنی‌داری مشاهده گردید. اختلال در سیستم ایمني ماهیان به واسطه عوامل استرس‌زاي محیطي، منجر به حساسیت بیشتر به انواع بیماري‌ها مي‌شود که توسعه اقتصادي آبزي‌پروري را محدود مي‌نماید. آذری تاکامی و دیگر همکاران (۲۰۱۱) با بررسی تاثیر سطوح مختلف *Pediococcus acidilactici* در جیره غذایی بر فاکتورهاي ایمنی خون بچه ماهی قزل‌آلاي رنگین کمان، پس از بررسی تعداد ۳۶۰۰ عدد بچه ماهی با وزن ۳-۵ گرم در ۴ تیمار با ترکیب غذایی پروبیوتیک باکتوسل به مدت ۸ هفته، گزارش نمودند که افزودن پروبیوتیک باکتوسل منجر به افزایش شاخص‌های ایمونولوژیک می‌گردد (۴). در پژوهش حاضر در روز صفر هیچ اختلاف معني‌داري از لحاظ اختلاف میزان لیزوزیم بین تیمارهاي مورد آزمایش وجود نداشت. همچنین در پژوهش اخیر در روز سی‌ام تیمارهای ۳ و ۴ دارای بیشترین میانگین لیزوزیم به ترتیب ۲۶/۱۳ و ۲۷/۱ (میکروگرم در میلی‌لیتر) بوده ولی در مجموع با

جدول ۶- تلفات ناشی از رویارویی با باکتری *Streptococcus. inaei*

به تفکیک تیمارها: تیماریک(شاهد)، تیمار دو پروبیوتیک در دوز ppm ۳۰۰؛ تیمار سه: پری پروبیوتیک در دوز ppm ۲ ؛ تیمار چهار: پروبیوتیک +پری پروبیوتیک به ترتیب ppm ۱۵۰ و ppm ۱.

تیمار	تعداد ماهی	تعداد تلفات	باقی مانده	درصد تلفات
تیمار یک	۳۰	۲۳	۷	۷۶/۶۶ [a]
تیمار دو	۳۰	۱۸	۱۲	۶۰ [a]
تیمار سه	۳۰	۱۹	۱۱	۶۳/۳۳ [a]
تیمار چهار	۳۰	۱۴	۱۶	۴۶/۶۶ [b]

سایر تیمارها اختلاف معناداری مشاهده نگردید. این امر می‌تواند به دلیل عدم تطابق کامل با شرایط محیطی و موضعی شدن باکتری‌های پروبیوتیک در روده باشد. اما در روز ۶۰ این مطالعه، با افزایش سن ماهی‌ها شاهد افزایش میزان میانگین لیزوزیم در همه تیمارها روبرو بودیم که تیمار چهار به طور معنی‌داری نسبت به دیگر گروه‌های تیمار افزایش چشمگیری نشان داد. این نکته حائز اهمیت است که بالا بودن میزان سطح فعالیت لیزوزیم سرم در تیمارها ناشی از بالا بودن مقدار مانان الیگوساکارید پری پروبیوتیک و پروبیوتیک دانست. در روز صفر و ۳۰ هیچ اختلاف معني‌داري از لحاظ میزان سطح کمپلمان بین تیمارهاي مختلف وجود نداشت. ولی در در روز ۶۰ میزان سطح کمپلمان تیمارهای ۲، ۳ و ۴ به شکل معنی‌داری از گروه شاهد بیشتر بود. این امر می‌تواند موید این مطلب باشد که اثرات تجمیعی پروبیوتیک + پری‌پروبیوتیک در گروه‌های مورد بررسی مفید بوده است. همچنین در روز صفر هیچ اختلاف معني‌داري از لحاظ میزان ایمونوگلبولین تام بین تیمارهاي مختلف وجود نداشت. میانگین ایمونوگلبولین کل در همه تیمارها در روز صفر در حدود (۲/۹۸ میکروگرم در میلی‌لیتر) بوده است. در روز۳۰ و ۶۰ میزان میانگین ایمونوگلبولین تام تیمار ۴ دارای اختلاف معنی‌داری ($P<0/05$) نسبت به سایر تیمارها بود. پس از سنجش میزان ایمنوگلوبولین M در روزهای صفر و سی و شصت، مشخص گردید که با توجه به افزایش سن نمونه ماهیان مورد مطالعه، میزان ایمنوگلوبولین M هم به تبع آن افزایش یافته است. اگرچه میزان این ایمنوگلوبولین در گروه چهار از دیگر گروه‌ها در روز سی و شصت بیشتر بود، لیکن این تفاوت معنی‌دار نبوده است.

نتیجه‌گیری

در این پژوهش گزارش شد پروبیوتیک و پریبیوتیک از طریق تحریک سیستم ایمنی و کاهش اثر پاتوژن‌ها و افزایش تولید ایمونوگلوبین‌ها، باعث افزایش ماندگاری ماهیان قزل‌آلای رنگین‌کمان شد. استفاده از مکمل‌هاي غذايي پريبيروبيوتيكي در جيره آبزيان پرورشي منجر به كاهش فعاليت باكتري‌هاي نامطلوب و بهينه‌سازي تعادل جمعيت ميكروبي دستگاه گوارش شده و تأثير مطلوبي بر رشد و بقاء آن‌ها ايجاد شد. تاثیر پروبیوتیک و پری‌پروبیوتیک بر میزان مقاومت در برابر عوامل بیماری‌زای عفونی از جمله *Streptococcus inaei* در ماهی قزل‌آلا؛ نشان داد که افزایش میزان مقاومت نسبت به بیماری اسرپتوکوکوزیس در گروه تیمار ۴ که شامل ترکیب پروبیوتیک و پری‌پروبیوتیک در جیره غذایی بوده است، نسبت به گروه شاهد (بدون پروبیوتیک و پری پروبیوتیک) و گروه‌هایی که به تنهایی با پروبیوتیک و پری‌پروبیوتیک تغذیه شدند افزایش چشمگیری داشته است.

تشکر و قدردانی

بدین وسیله نگارندگان این مقاله از کلیه عزیزانی که در انجام این پروژه تحقیقاتی ما را یاری نمودند کمال تشکر و قدردانی را دارد.

منابع مورد استفاده

1.Akhter N, Wu B, Memon AM, Mohsin M. 2015. Probiotics and prebiotics associated with aquaculture: a review. *Fish & shellfish immunology* 45(2):733-41.

2.Arian S, Kaboosi H, Heshmatipour Z, Khazaei-Koohpar Z, Peyravii Ghadikolaii F. 2019. Molecular Analysis of Seven Lactobacillus Strains Isolated From Human Origin in West of Mazandaran to Identify Isolates With Probiotic Potential. *Iran Journal Medicine Microbiology* 13(1):56-68.

3.Ashraf R, Shah NP. 2014. Immune system stimulation by probiotic microorganisms. *Critical reviews in food science and nutrition* 54(7):938-56.

4.Azari A, Hashim R, Habibi Rezaei M, Sharifzadeh Baei M, Najafpour S, Roohi A, et al. 2011. The effects of commercial probiotic and prebiotic usage on growth performance, body composition and digestive enzyme activities in juvenile rainbow trout (Oncorhynchus mykiss). *World Apply Science Journal* 14:26-35.

5.Brandt K, Barrangou R. 2019. Applications of CRISPR Technologies Across the Food Supply Chain. *Annual review of food science and technology* 10:133-50.

6.Dawood MA, Koshio S, Esteban MÁ. 2018. Beneficial roles of feed additives as immunostimulants in aquaculture: a review. *Reviews in Aquaculture* 10(4):950-74.

7.Fuller R. 1989. Probiotic in man and animals. *Journal Apply Bacteriology* 6:131-9.

8.Gatesoupe F. 1999. The use of probiotics in aquaculture. *Aquaculture* 180(1-2):147-65.

9.Geney R. 1994. Successful diffused aeration of lakes/reservoirs using the Lorenzen/Fast 1977 sizing criteria. *Lake and Reservoir Management* 9(2):76.

10.Gibson GR, Roberfroid MB. 1995. Dietary modulation of the human colonic microbiota: introducing the concept of prebiotics. *The Journal of nutrition* 125(6):1401-12.

11.Guimaraes MC, de Carla Dias D, de Araujo FvAP, Ishikawa CM, Tachibana L. 2019. PROBIOTIC Bacillus subtilis AND Lactobacillus plantarum IN DIET OF NILE TILAPIA. *Boletim do Instituto de Pesca* 45(1).

12.Hillman ET, Lu H, Yao T, Nakatsu CH. 2017. Microbial ecology along the gastrointestinal tract. Microbes and environments ME17017.

13.Hoseinifar SH, Sun Y, Wang A, Zhou Z. 2018. Probiotics as means of diseases control in aquaculture, a review of current knowledge and future perspectives. *Frontiers in microbiology* 9:2429.

14.Jahangiri L, Esteban M. 2018. Administration of probiotics in the water in finfish aquaculture systems: a review. *Fishes* 3(3):33.

15.Salminen S, Ouwehand A, Benno Y, Lee Y. 1999. Probiotics: how should they be defined. *Trends in food science & technology*

10(3):107-10.
16.Soltani M, Jamshidi S, Sharifpour I. 2005. Streptococcosis caused by Streptococcus iniae in farmed rainbow trout (Oncorhynchys mykiss) in Iran: biophysical characteristics and pathogenesis. *Bulletin of the European Association of Fish Pathologists* 25(3):95-106.
17.Tahmourespour A, Rouha KK, Salehi R, Nabipour A. 2008. The Probiotic Effect of Lactobacillus fermentum on Oral Streptococcus Binding in Laboratory Conditions. *Iran Journal Medicine Microbiology* 2(1):45-51.
18.Tonekabon I. 2013. Studies on Bacillus subtilis, as potential probiotics, on the biochemical parameters of rainbow trout, Oncorhynchus mykiss (Walbaum) to challenge infections. *Advanced Studies in Biology* 5(1):37-50.
19.van Hai N, Fotedar R. 2010. A review of probiotics in shrimp aquaculture. *Journal of applied aquaculture* 22(3):251-66.
20.Wang A, Ran C, Wang Y, Zhang Z, Ding Q, Yang Y, et al. 2018. Use of probiotics in aquaculture of China—a review of the past decade. *Fish & shellfish immunology*.