مجله شیلات، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد آزادشهر / ISSN: 2008-0026 سال هشتم، شماره سوم، پاییز ۹۳ / صفحات: ۹۲-۸۳

بررسی برخی شاخص‌های ایمنی و فلور باکتریایی روده در بچه‌ماهیان قزل‌آلای رنگین‌کمان (*Oncorhynchus mykiss*) تغذیه شده با پری‌بیوتیک دیواره سلولی مخمر (*Saccharomyces cerevisia*)

*محمد اعتصامی‌پور[1]، عباسعلی زمینی[2] و مسعود فرخ‌روز[3]

[1]دانش‌آموخته کارشناسی‌ارشد گروه شیلات، واحد لاهیجان، دانشگاه آزاد اسلامی، لاهیجان، ایران،

[2و3]استادیار و عضو هیأت علمی، گروه شیلات، دانشکده منابع طبیعی، واحد لاهیجان، دانشگاه آزاد اسلامی، لاهیجان، ایران

تاریخ دریافت: ۹۲/٤/۱۸ ؛ تاریخ پذیرش: ۹۲/۹/٤

چکیده

ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان یکی از باارزش‌ترین ماهیان پرورشی بوده که در مراحل ابتدایی رشد شرایطی ویژه و بحرانی دارد. در این پژوهش از پری‌بیوتیک دیواره سلولی مخمر *Saccharomyces cerevisia* اضافه شده در جیره غذایی در سطوح مختلف برای بررسی فاکتورهای ایمنی و فلور باکتریایی روده استفاده شد. در این پژوهش ۱۲۰ قطعه بچه‌ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان با میانگین وزنی ۰/۱۲±۳/٦۱ گرم به‌صورت تصادفی در ۱۲ وان فایبرگلاس با حجم آبگیری ۱۰۰ لیتر توزیع و پرورش داده شدند. این آزمایش تغذیه‌ای برای بررسی اثر و تعیین سطح مطلوب پری‌بیوتیک دیواره سلولی مخمر در جیره غذایی بچه‌ماهیان قزل‌آلای رنگین‌کمان در ۳ تیمار ۱ درصد پری‌بیوتیک، ۱/۵ درصد پری‌بیوتیک، ۲ درصد پری‌بیوتیک و شاهد بدون پری‌بیوتیک، هر یک با ۳ تکرار در یک طرح متعادل مورد بررسی قرار گرفت. نتایج نشان داد که شاخص‌های ایمنی غیراختصاصی در خون مانند لیزوزیم و ایمنی اختصاصی مانند IgM و Ig اختلاف معنی‌دار آماری بین گروه تیماری تغذیه شده با ۲ درصد پری‌بیوتیک دیواره سلولی مخمر با سایر تیمارها و گروه شاهد داشتند (P<۰/۰۵). در بررسی فلور باکتریایی روده بچه‌ماهیان بر روی محیط کشت TSA و MRS بین تیمارها اختلاف معنی‌دار آماری مشاهده نشد (P>۰/۰۵). اما میانگین شمارش باکتریایی در تیمار ۲ درصد بیش‌تر از شاهد و سایر تیمارها بوده است. براساس نتایج نام‌برده می‌توان بیان نمود که پری‌بیوتیک دیواره سلولی مخمر در سطح ۲ درصد به‌کار رفته در جیره غذایی به‌دلیل افزایش قابل‌توجه در شاخص‌های ایمنی و فلور باکتریایی مورد بررسی، می‌تواند نقش مهمی در عملکرد ایمنی بچه‌ماهیان قزل‌آلای رنگین‌کمان ایفا نماید.

واژه‌های کلیدی: قزل‌آلای رنگین‌کمان (*Oncorhynchus mykiss*)، پری‌بیوتیک، دیواره سلولی مخمر (*Saccharomyces cerevisia*)، شاخص ایمنی، فلور باکتریایی روده

مقدمه

کسب اطلاعات در خصوص تغذیه مطلوب در ماهیان برای پرورش‌دهندگان ماهی بسیار مهم می‌باشد. تغذیه نامناسب منجر به کاهش کیفیت آب، افزایش بیماری و مرگ و میر ماهیان، پایین آمدن ظرفیت و کارایی تولید و تغذیه می‌شود (Gang و همکاران، ۲۰۰۸). در همین رابطه، ترکیباتی که مورد استفاده قرار می‌گیرند، پری‌بیوتیک‌ها هستند. پری‌بیوتیک دیواره سلولی مخمر در واقع دیواره

*مسئول مکاتبه: mohammadeatisamipour@gmail.com

www.SID.ir

سلولی استخراج شده از مخمر *Saccharomyces cerevisia* می‌باشد. دیواره سلولی مخمر، منشأ دو ماده‌ای Immunostimulant (محرک ایمنی) مهم به‌نام بتا گلوکان β-Glucan (۳-۱) و مانان الیگوساکارید Mannan oligosaccharide یا (MOS) می‌باشند (EL-Boshy و همکاران، ۲۰۱۰). ترکیب بتاگلوکان استخراج شده از دیواره سلولی مخمر آبجو (*Saccharomyces cerevisiae*) باعث افزایش فعالیت لیزوزیم، کمپلمان، بیگانه‌خواری و افزایش IgM می‌شود که بالا رفتن ایمنی اختصاصی و غیراختصاصی و مقاومت در برابر عوامل بیماری‌زا می‌گردد. پژوهش‌ها نشان داده است که بتاگلوکان باعث افزایش فعالیت سلول‌های بیگانه‌خوار مانند نوتروفیل‌ها، ماکروفاژها، اینترفرون‌ها و لیزوزیم‌ها و در نهایت افزایش سطح ایمنی سلول‌های بدن می‌شود (Cuesta و همکاران، ۲۰۰٤).

استفاده از مخمر *Saccharomyces cerevisiae* به‌عنوان پری‌بیوتیک در ۳ سطح ۱، ۵ و ۱۰ درصد در جیره غذایی بچه‌ماهیان نورس قزل‌آلای رنگین‌کمان مورد مطالعه قرار گرفت و مشاهده شد که تیمارهای شامل مخمر ۱۰ درصد از مقاومت بالاتری در برابر شوری‌های ۱۰ppt و ۱۵، پس از ۲٤ ساعت نسبت به گروه شاهد برخوردار بودند ($P>0/05$) (پورامینی، ۱۳۸۷). در یک بررسی سطوح ۱، ۲ و ۳ درصد پری‌بیوتیک اینولین در جیره غذایی قزل‌آلای رنگین‌کمان مورد سنجش قرار گرفت. پس از ۸ هفته تغذیه نتایج بیانگر اختلاف غیرمعنی‌دار در میزان فعالیت آنزیم‌های سرم خون در تیمارها با گروه شاهد بود ($P>0/05$). استفاده از سطوح پایین‌تر این پری‌بیوتیک توصیه شد (اکرمی و همکاران، ۱۳۸۷).

همچنین طی پژوهشی تأثیر پری‌بیوتیک دیواره سلولی مخمر بر شاخص‌های ایمنی و فلور میکروبی روده بچه‌ماهیان انگشت‌قد کپور معمولی (*Cyprinus carpio*) بررسی گردید. این پری‌بیوتیک در ۳ سطح ۱، ۲ و ۳ درصد به جیره غذایی بچه‌ماهیان در ۸ هفته اضافه شد. در انتهای دوره فاکتورهای رشد، خون، ایمنی و فلور میکروبی رشد قابل‌ملاحظه‌ای را در تیمار ۳ درصد نشان دادند (میزانی، ۱۳۹۱).

در مطالعه دیگری اثرات سطوح ۱، ۵ و ۱۰ درصد گرم در کیلوگرم مخمر آبجو (*S. cerevisiae*) را در جیره غذایی ماهی سیم دریایی (*Sparus aurata*) بر میزان IgM سرم خون آزمایش کردند و مشاهده کردند که مخمر به‌دلیل داشتن بتاگلوکان باعث افزایش سیستم ایمنی اختصاصی و IgM در این ماهی می‌شود (Cuesta و همکاران، ۲۰۰٤). همچنین بچه‌ماهیان (Rohu) به‌مدت ۸ هفته با جیره شامل ۰، ۵، ۷/۵ و ۱۰ درصد مخمر نانوایی آزمایش شدند و نتایج نشان داد که نه تنها رشد بهتری نسبت به گروه شاهد داشتند بلکه به‌عنوان یک شبیه‌ساز ایمنی (Immunostimulant) به خوبی واکنش‌های ایمنی را پشتیبانی می‌کند (Tewary و Patra، ۲۰۱۱).

بنابراین هدف از انجام این مطالعه ایجاد یک ایمنی بالاتر و نیز تعیین سطح مؤثر پری‌بیوتیک دیواره سلولی مخمر اضافه شده به جیره غذایی بچه‌ماهیان قزل‌آلای رنگین‌کمان در روند ایمنی و سلامت آن‌ها می‌باشد.

مواد و روش‌ها

این مطالعه به‌مدت ۸ هفته در کارگاه تکثیر و پرورش قزل‌آلا متعلق به شرکت شفق داروی پارسیان واقع در شهرستان صومعه‌سرا در تابستان ۱۳۹۱ صورت پذیرفت. بچه‌ماهیان قزل‌آلای رنگین‌کمان پس از مدت ۱ هفته سازگاری به شرایط کارگاهی، به تعداد ۱۲۰ قطعه بچه‌ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان با میانگین وزنی ۰/۱۲±۳/٦۱ گرم و با تراکم ۱۰ قطعه (در هر وان) در ۱۲ وان فایبرگلاس به حجم ۱۰۰ لیتر شامل آب تازه نگهداری شدند. در مدت پژوهش به‌طور

Archive of SID
www.SID.ir

روزانه نسبت به برداشت فضولات و پس‌مانده‌های غذایی از هر یک از مخازن نگهداری اقدام می‌شد. در این بررسی، تیمارها شامل جیره غذایی حاوی ۱، ۱/۵ و ۲ درصد پری‌بیوتیک دیواره سلولی مخمر و تیمار شاهد (بدون افزودن پری‌بیوتیک به جیره) و هر یک در ۳ تکرار مورد آزمایش قرار گرفتند. انتخاب دوزها در این پژوهش براساس رفرانس‌های موجود صورت گرفته است. برای تهیه جیره‌های مورد نظر ابتدا غذا را با آسیاب به‌صورت پودر در آورده و بعد از محاسبه و اضافه نمودن پری‌بیوتیک مورد نظر با دستگاه میکسر (هم‌زن) براساس مقدار مصرف همراه با مقداری آب به‌صورت خمیر در آورده و بعد آن را از یک چرخ گوشت عبور داده تا به شکل رشته‌های شبیه به ماکارونی در آمد و در نهایت پلت‌ها را در آون (Binder, Germany) قرار داده تا در دمای ۳۰ درجه سانتی‌گراد به‌مدت ۲٤ ساعت خشک شده و سپس از آن رشته‌ها، پلت‌هایی با قطر متناسب با دهان بچه‌ماهیان درآورده و در کیسه‌های مناسب و غیرقابل نفوذ در دمای ۱۵- درجه سانتی‌گراد نگه‌داری شدند. یک ساعت قبل از توزیع غذا در وان‌ها، جیره‌های ساخته شده از فریزر خارج و در دمای اتاق نگه‌داری شدند و پس از متعادل شدن درجه حرارت پلت‌ها، با استفاده از ترازوی دیجیتال با دقت ۰/۰۱ گرم (Shinko Radwag مدل WTB ساخت کشور ژاپن) توزین شده و با توجه به تیمارهای مورد نظر، بچه‌ماهیان قزل‌آلا به‌میزان ۵-۳ درصد وزن زنده آن‌ها روزانه در ۳ نوبت (ساعت‌های ۸، ۱٤ و ۲۰) تغذیه شدند، این عمل در طول شبانه‌روز، در دفعات منظم براساس دمای آب، وزن ماهیان و بیوماس و زیست‌سنجی هر تکرار در هر ۲ هفته یک‌بار انجام شد. ساخت غذا به‌منظور جلوگیری از افت کیفیت آن به‌طور ماهیانه انجام گرفت. در حقیقت بچه‌ماهیان به‌مدت ۸ هفته تغذیه شدند و عملیات محاسبه میزان و درصد غذا براساس اندازه‌گیری بیوماس به‌ترتیب در ابتدای دوره با ۵ درصد توده زنده در هر تیمار و در انتهای دوره با ۳ درصد توده زنده به‌طور کاملاً دستی انجام پذیرفت (پورامینی، ۱۳۸۷؛ سلطانی، ۱۳۸۷؛ Misra، ۲۰۰٦).

پارامترهای کیفی آب نیز مانند اکسیژن محلول توسط اکسیژن‌متر WTW مدل 330i ساخت شرکت Weilheim آلمان با دقت ۰/۰۱، درجه حرارت توسط دماسنج دیجیتال 300 ساخت شرکت HM کره‌جنوبی به‌صورت روزانه اندازه‌گیری شد. پس از اتمام طول دوره پرورش به‌منظور بررسی تأثیر پری‌بیوتیک استفاده شده در بهبود پارامترهای ایمنی پس از ٢٤ ساعت و اطمینان از تخلیه کامل محتویات شکمی ماهیان، از هر تیمار و تکرار، ۳ عدد به‌صورت تصادفی انتخاب شده و خون‌گیری از ورید ساقه دمی به‌وسیله سرنگ ۲ سی‌سی انجام گرفت و نمونه‌ها به آزمایشگاه تشخیص طبی برای تعیین سطوح ایمنی بچه‌ماهیان منتقل گردید. حجم خون برداشت شده به‌ازای هر تکرار ۱ سی‌سی که ۰/۵ سی‌سی در اپندورف‌های بدون هپارین برای جداسازی سرم خون و ۰/۵ سی‌سی شامل ماده هپارین ریخته شد (Tewary و Patra، ۲۰۱۱).

به‌منظور اندازه‌گیری Ig از روش Elisa استفاده شد. دستگاه مورد استفاده (Awareness, USA) مدل Stat Fax-2100 بود. مقدار ایمنوگلوبولین کل با پروتئین به‌دست آمده از سرم خون که با پلی‌اتیلن گلیکول سانتریفوژ شده بر حسب (میلی‌گرم بر میلی‌لیتر) به‌دست آمد (Torrecillas و همکاران، ۲۰۱۰؛ Huang و همکاران، ۱۹۸۹).

روش مورد استفاده برای اندازه‌گیری ایمنوگلوبولین M روش Immunoturbidimetric می‌باشد. در این روش IgM موجود در سرم با آنتی‌بادی پلی‌کلونال موجود در محلول‌های تامپون تشکیل کمپلکس داده و باعث کدر شدن محلول می‌شود. شدت کدورت ایجاد شده با مقدار IgM رابطه مستقیم داشته و توسط دستگاه اسپکتوفتومتر Minineph

Archive of SID
www.SID.ir

ساخت (Binding site, UK) در طول موج ۳٤۰nm خوانده شد. در واقع نفلومتر نور تک‌رنگ موازی در طول موج‌های بین ۸۰۰-٤۰۰ نانومتر به این محلول تابانده که پس از برخورد به کمپلکس آنتی‌بادی و آنتی‌ژن متفرق شده که میزان تفرق با مقدار IgM نسبت مستقیم دارد (Zilva، ۱۹۸٤؛ سقا و سروش‌نیا، ۱۳۸۲؛ Khoshbavar-Rostami و همکاران، ۲۰۰۳).

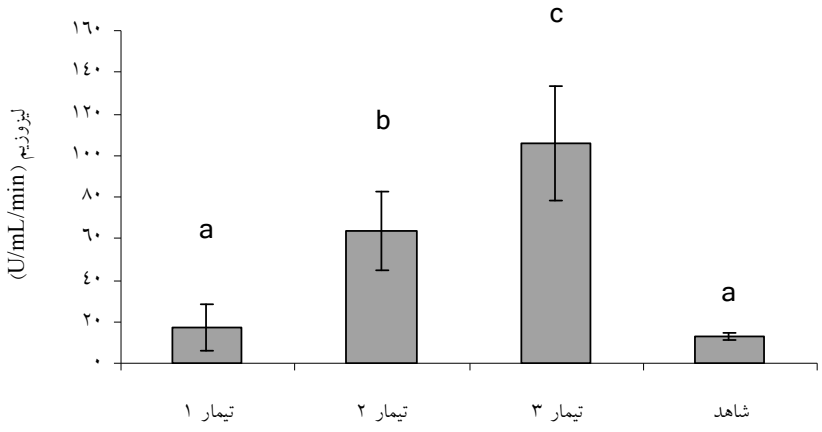
برای اندازه گیری میزان فعالیت لیزوزیم از دستگاه Elisa Reader (Awareness, USA) مدل Stat Fax-2100 و به روش Turbidimetric (کدورت‌سنجی) استفاده شد. نتایج از طریق تحلیل باکتری‌های گرم مثبت به‌دست آمد و بر حسب (میلی‌گرم در میلی‌لیتر) محاسبه گردید (Malin و همکاران، ۱۹۹٦).

به‌منظور بررسی تعداد باکتری‌های اسید لاکتیک و نیز تعیین فلور باکتریایی روده بچه‌ماهیان در انتهای دوره تعداد ۳ ماهی از هر تکرار انتخاب شده که بعد از برداشت روده و تهیه رقت از روده و مدفوع آن‌ها، حجمی معادل ۰/۱ میلی‌لیتر برداشته و به محیط‌های کشت TSA و MRS طبق دستور شرکت سازنده (Merck, Germany) منتقل شدند، در نهایت بعد از طی شدن زمان انکوباسیون باکتری‌های هر پلیت بر حسب واحد Cfu در گرم براساس مشخصات فنوتیپی شناسایی و شمارش شدند (Mohseni و همکاران، ۲۰۰٦).

در پایان همه داده‌های خام به‌منظور بررسی توزیع نرمال داده‌ها در گروه‌ها و تکرارها برای تشکیل تیمارها از آزمون Shapiro-Wilk و رسم نمودار هیستوگرام استفاده شد و برای مقایسه میانگین گروه‌ها با یکدیگر از آزمون دانکن استفاده شد. همه آنالیزهای آماری با استفاده از نرم‌افزار SPSS نسخه ۱۷ و برای رسم نمودارها از نرم‌افزار Excel 2003 استفاده شد.

نتایج

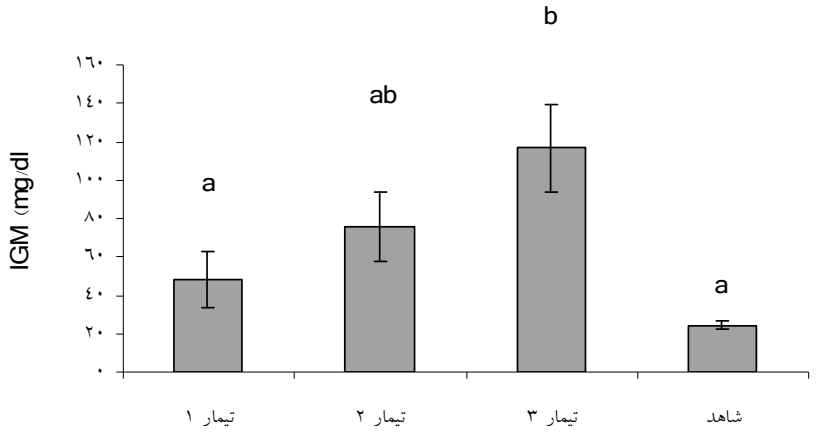
در بررسی نتایج به‌دست آمده از آنالیزهای آماری، بین تیمارها و گروه شاهد از نظر میزان لیزوزیم اختلاف معنی‌دار آماری وجود دارد (شکل ۱) به‌طوری‌که بیش‌ترین میزان لیزوزیم در تیمار ۲ درصد با ۱۰٦ ± ۱۵/۸۲ U/ml/min و کم‌ترین میزان در گروه شاهد با ۱ ± ۱۳ U/ml/min بوده است و از نظر آماری اختلاف معنی‌دار بین شاهد با تیمار ۱/۵ و ۲ درصد مشاهده گردید (P<۰/۰۵).



شکل ۱- مقایسه میانگین میزان لیزوزیم در بچه‌ماهیان قزل‌آلای تغذیه شده با پری‌بیوتیک دیواره سلولی مخمر (تیمار ۱: ۱ درصد پری‌بیوتیک، تیمار ۲: ۱/۵ درصد پری‌بیوتیک، تیمار ۳: ۲ درصد پری‌بیوتیک، شاهد: بدون پری‌بیوتیک) به‌مدت ۸ هفته (حروف لاتین غیرمشترک نشان‌دهنده اختلاف معنی‌دار آماری در آزمون دانکن در سطح ۵ درصد است).

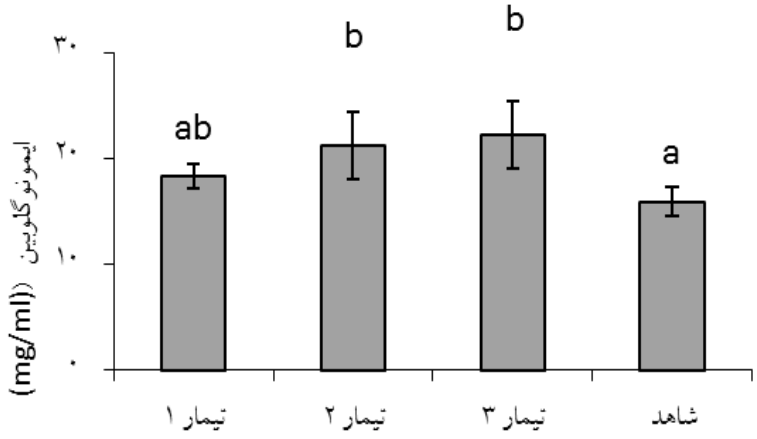
www.SID.ir

در بررسی ایمنوگلوبولین M (IgM) اختلاف معنی‌دار آماری بین تیمارها و گروه شاهد مشاهده گردید (شکل ۲). بیش‌ترین میزان IgM در تیمار ۲ درصد با ۱۹/۰۶±۱۱۶/۶۷ میلی‌گرم بر دسی‌لیتر و کم‌ترین میزان آن در تیمار شاهد با ۲٤/۵ میلی‌گرم بر دسی‌لیتر بوده است.



شکل ۲- مقایسه میانگین میزان IgM در بچه‌ماهیان قزل‌آلای تغذیه شده با پری‌بیوتیک دیواره سلولی مخمر (تیمار ۱: ۱ درصد پری‌بیوتیک، تیمار ۲: ۱/۵ درصد پری‌بیوتیک، تیمار ۳: ۲ درصد پری‌بیوتیک، شاهد: بدون پری‌بیوتیک) به‌مدت ۸ هفته (حروف لاتین غیرمشترک نشان‌دهنده اختلاف معنی‌دار آماری در آزمون دانکن در سطح ۵ درصد است).

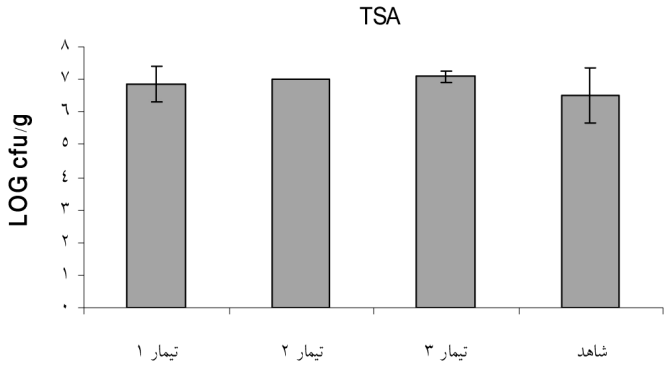
براساس آنالیزهای آماری میزان ایمنوگلوبولین کل (Ig) اختلاف معنی‌دار آماری بین تیمارها و گروه شاهد وجود دارد (شکل ۳). بیش‌ترین میزان Ig در تیمار ۲ درصد با ۱/۸۵±۲۲/۳۳ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر و کم‌ترین میزان آن در تیمار شاهد با ۱٦ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر بوده است.



شکل ۳- مقایسه میانگین میزان Ig در بچه‌ماهیان قزل‌آلای تغذیه شده با پری‌بیوتیک دیواره سلولی مخمر (تیمار ۱: ۱ درصد پری‌بیوتیک، تیمار ۲: ۱/۵ درصد پری‌بیوتیک، تیمار ۳: ۲ درصد پری‌بیوتیک، شاهد: بدون پری‌بیوتیک) به‌مدت ۸ هفته (حروف لاتین غیرمشترک نشان‌دهنده اختلاف معنی‌دار آماری در آزمون دانکن در سطح ۵ درصد است).

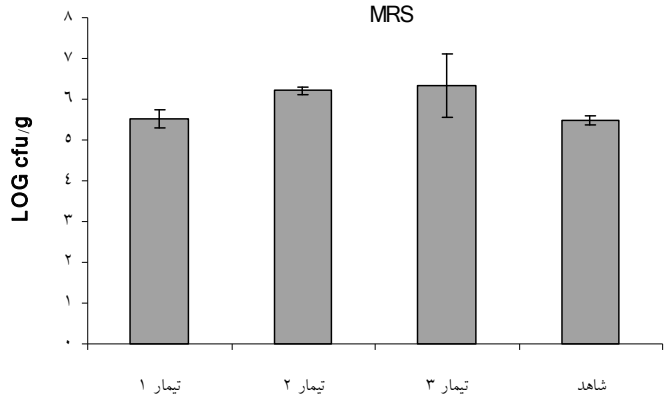
www.SID.ir

براساس آنالیزهای آماری میزان کل باکتری‌های موجود در روده بچه‌ماهیان بر روی محیط کشت TSA بین تیمارها اختلاف معنی‌دار آماری دیده نشد (P>۰/۰۵). میانگین شمارش کل باکتریایی تیمار ۲ درصد با ۷/۱ Cfu/g بیش‌تر از شاهد و سایر تیمارها بوده است (شکل ٤).

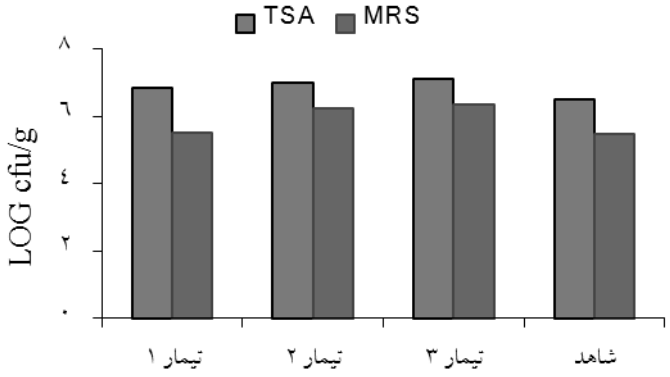


شکل ٤- مقایسه میانگین میزان کل باکتری‌های موجود در روده شاهد با تیمارهای مختلف در پایان هفته هشتم.

در بررسی میزان کل باکتری‌های اسید لاکتیک تجمع‌یافته در روده بچه‌ماهیان بر روی محیط کشت MRS بین تیمارها اختلاف معنی‌دار آماری وجود نداشت (P>۰/۰۵). اما میانگین کل باکتری‌های اسید لاکتیک در تیمار ۲ درصد با ٦/۳۳ Cfu/g بیش‌تر از شاهد و سایر تیمارها بوده است.



شکل ٥- مقایسه میانگین میزان توتال باکتریایی اسید لاکتیک در مدفوع شاهد با تیمارهای مختلف در پایان هفته هشتم.



شکل ٦- مقایسه میانگین میزان کل باکتریایی و کل باکتری‌های اسید لاکتیک در روده شاهد با تیمارهای مختلف.

www.SID.ir

بحث

در پژوهشی Misra و همکاران (۲۰۰۶) اثرات سطوح ۱۰۰، ۲۵۰ و ۵۰۰ میلی‌گرم در کیلوگرم بتاگلوکان را بر سیستم ایمنی، رشد و بقای بچه‌ماهیان انگشت‌قد روهو (*Labeo rohita*) مورد مطالعه قرار دادند و ثابت کردند که ۳ بار تزریق، ۱ میلی‌گرم در وزن بدن، بتاگلوکان باعث ارتقا سیستم ایمنی و افزایش مقاومت در باکتری‌های آئوروموناس هیدروفیلا و ادواردزیلاتاردا می‌شود (Merrifield و همکاران، ۲۰۰۹).

طی بررسی ٤ هفته‌ای تغذیه با جیره شامل ۱، ۵ و ۱۰ گرم بر کیلوگرم مخمر آبجو در ماهی سیم دریایی (*Sparus aurata*) ۲۰۰-۱۰۰ گرمی، میزان IgM خون بالا رفت. اعلام داشت که در تیمار ۱۰ گرم بر کیلوگرم مخمر در جیره غذایی این ماهی به‌دلیل دارا بودن بتاگلوکان، باعث افزایش سیستم ایمنی اختصاصی در این ماهی شده است (Bahmani و همکاران، ۲۰۰۱).

مهمترین Ig در ماهی‌ها IgM می‌باشد که توانایی ایمنی اختصاصی در برابر آنتی‌ژن‌های خاص را دارد (کاظمی و همکاران، ۱۳۸۹). در یک بررسی انجام شده توسط عاشورپور (۱۳۹۰) بر روی شاخص‌های ایمنی و فراوانی باکتری‌های اسید لاکتیک بچه‌ماهیان انگشت‌قد شیپ (*Acipenser nudiventris*) تغذیه شده با دیواره سلولی مخمر در سطح ۱ درصد مخمر میزان IgM بیش‌تر از شاهد بوده ولی اختلاف معنی‌دار آماری مشاهده نگردید ($P>0/05$)، همچنین بیان نمود که در مقایسه میزان کل باکتری‌های موجود در روده و نیز مقایسه کل باکتری‌های اسید لاکتیک روده بین گروه‌های تیماری و شاهد اختلاف معنی‌دار آماری وجود دارد ($P<0/05$) (سوداگر، ۱۳۸۳). که این افزایش به‌دلیل باکتری‌های اسید لاکتیک، از جمله لاکتوباسیلوس‌ها می‌باشد که تولید آنتی‌بادی را تحریک و باعث بالارفتن IgM نسبت به شاهد شده است (Magnadottir و همکاران، ۱۹۹۹). همچنین با توجه به نتایج، در تیمار ۰/۵ درصد مخمر تولید باکتری‌های اسید لاکتیک به‌طور معنی‌دار نسبت به شاهد بیش‌تر بوده است که نشان‌دهنده تأثیر مثبت این باکتری‌ها بر جلوگیری از رشد پاتوژن‌های فرصت‌طلب شده و در نهایت با تولید اسیدهای چرب کوتاه زنجیره، سیستم ایمنی را تحریک می‌کنند (Khoshbavar و Rostami، ۲۰۰۳؛ Dalmo و Bogwald، ۲۰۰۸).

در حقیقت نتایج بررسی بالا با نتایج به‌دست آمده از پژوهش مطابقت دارد و این مسأله بیانگر آن است که افزایش میزان پری‌بیوتیک دیواره سلولی مخمر در جیره غذایی می‌تواند باعث افزایش سطوح ایمنی گردد. میزان فعالیت لیزوزیم سرم به‌عنوان یک معرف با اهمیت ایمنی غیراختصاصی در ماهی می‌باشد (Peter و Sneath، ۱۹۸٦) و افزایش آن پس از مصرف مواد محرک ایمنی مانند گلوکان‌ها و تحریک آنتی‌ژنی افزایش می‌یابد (سقا و سروش‌نیا، ۱۳۸۲). حتی در پژوهش دیگری توسط El-Boshy و همکاران (۲۰۱۰) تأثیر مخمر *S. cerevisiae* و بتاگلوکان β-Glucan را بر روی فاکتورهای ایمنی تیلاپیاهای ۱۰۰-۸۰۰ گرمی به‌مدت ۲۱ روز مورد بررسی قرار دادند و به‌دست آوردند که اختلاف معنی‌داری در میزان لیزوزیم سرم خون وجود ندارد ($P>0/05$) (David و همکاران، ۱۹۹۹).

در آزمایش دیگری توسط میزانی (۱۳۹۰) تأثیر سطوح ۱، ۲ و ۳ درصد پری‌بیوتیک دیواره سلولی مخمر *S. cerevisiae* اضافه شده در جیره غذایی بچه‌ماهیان انگشت‌قد کپور معمولی بر روی شاخص‌های ایمنی مانند لیزوزیم، Ig و IgM بررسی نموده و نتایج نشان داد که افزایش این پری‌بیوتیک در

Archive of SID
www.SID.ir

سطح ۳ درصد جیره غذایی می‌تواند باعث افزایش سطوح ایمنی در بچه‌ماهیان کپور معمولی گردد و نیز در تیمارها اختلاف معنی‌دار آماری را با شاهد مشاهده نمودند (P<۰/۰۵) همچنین مشاهده کرد که اختلاف معنی‌دار آماری در باکتری‌های اسید لاکتیک ایجاد شده اما در باکتری‌های زیست‌پذیر روده ضمن افزایش در سطوح تیماری، اختلاف معنی‌داری با گروه شاهد مشاهده نگردید که نتایج این مطالعه نیز با نتایج به‌دست آمده از پژوهش مطابقت دارد (میزانی، ۱۳۹۱). Tewary و Potra (۲۰۱۱) بچه‌ماهیان (Rohu) به‌مدت ۸ هفته با جیره شامل ۰، ۵، ۷/۵ و ۱۰ درصد مخمر نانوایی آزمایش شدند و نتایج نشان داد که جیره شامل مخمر نسبت به گروه شاهد به‌عنوان یک شبیه‌ساز ایمنی (Immunostimulant) عمل کرده و به خوبی واکنش‌های ایمنی را پشتیبانی می‌کند (Sakai، ۱۹۹۹). حسینی‌فر و همکاران (۱۳۸۹) بچه فیل‌ماهیان پرورشی با میانگین ۱۱/٤ گرم را به‌مدت ٦ هفته با سطوح ۰، ۱، ۲ و ۵ درصد پری‌بیوتیک *Saccharomyces cerevisiae* تغذیه نمود و مشاهده کرد که تراکم کل باکتری‌ها و لاکتوباسیلوس‌ها در جیره غذایی شامل ۵ درصد مخمر دارای افزایش معنی‌داری با تیمار شاهد بوده است (P<۰/۰۵) (پورعلی و همکاران، ۱۳۸۲).

نتایج به‌دست آمده از پژوهش نشان می‌دهد که افزایش پری‌بیوتیک دیواره سلولی مخمر در سطح ۲ درصد جیره غذایی بچه‌ماهیان انگشت‌قد قزل‌آلای رنگین‌کمان می‌تواند باعث بالا رفتن شاخص‌های ایمنی مانند لیزوزیم، Ig و IgM و همچنین افزایش باکتری‌های اسید لاکتیک گردد که خود سیستم ایمنی این ماهیان را تحریک می‌کند. در واقع تولید باکتری‌های اسید لاکتیک بومی در دستگاه گوارش به تحریک پری‌بیوتیک دیواره سلولی مخمر از اصلی‌ترین اهداف این پژوهش بود که با توجه به نتایج حاصله میسر گردید. افزایش باکتری‌های اسید لاکتیک در تیمار ۲ درصد دیواره سلولی مخمر، به‌علت وجود مانان‌الیگوساکارید موجود در این پری‌بیوتیک است چون مانان‌الیگوساکارید منبع تغذیه‌ای مناسبی برای رشد و فعالیت باکتری‌های فلور دستگاه گوارش مانند باکتری‌های اسید لاکتیک و لاکتوباسیلوس می‌باشد (Ringo و همکاران، ۱۹۹۸؛ Andrews و همکاران، ۲۰۰۹). در مجموع اختلافات موجود در نتایج این پژوهش را با یافته‌های دیگر پژوهشگران را می‌توان به عوامل محیطی به‌خصوص به‌علت خونسرد بودن ماهی مانند (فصول، سال، شوری، دوره نوری، درجه حرارت و تراکم)، عوامل فیزیولوژیکی (گونه آبزی، سیکل تولیدمثلی و وضعیت بلوغ، سن، جنس و شرایط تغذیه‌ای) و ژنتیکی، زمان نمونه‌گیری، فرمولاسیون جیره‌های غذایی، نوع پری‌بیوتیک، درجه خلوص آن و میزان استفاده از آن در جیره، روش‌های مختلف اضافه کردن به جیره، دقت و حساسیت روش‌های اندازه‌گیری، نوع محیط کشت در بررسی فلور میکروبی دستگاه گوارش، دمای انکوباسیون و طول مدت انکوباسیون و احتمالاً فلور میکروبی ویژه‌ای که قادر به استفاده از آن به‌عنوان سوبسترا هستند، ربط داد. این عوامل خود می‌تواند بر فعالیت پارامترهای رشد و شاخص‌های خونی، بیوشیمیایی و ایمنی و نیز فلور باکتریایی روده تأثیر گذاشته و باعث اختلاف در تفسیر نتایج پژوهشگران شوند (Verdegem و همکاران، ۱۹۹۷؛ اکرمی و همکاران، ۱۳۸۹). بنابراین هر چند در برخی از پارامترها اختلاف معنی‌دار آماری مشاهده نشد اما مشاهده‌ها نشان می‌دهد که کاربرد پری‌بیوتیک دیواره سلولی مخمر در جیره غذایی بچه‌ماهیان انگشت‌قد قزل‌آلای رنگین‌کمان تأثیر مثبت بر شاخص‌های ایمنی

Archive of SID
www.SID.ir

و فلور باکتریایی روده گذاشته که با توجه به روند افزایشی پارامترهای بررسی شده در تیمار ۳ پژوهش می‌توان دوز دیواره سلولی مخمر در جیره غذایی بچه‌ماهیان انگشت‌قد قزل‌آلای رنگین‌کمان را ۲ درصد پیشنهاد نمود و با توجه به بهبود قابل‌ملاحظه این شاخص‌ها می‌توان استفاده از این ترکیب را از نظر اقتصادی توجیه نمود.

سپاسگزاری

از همکاری آقایان دکتر علیرضا شناور ماسوله، دکتر جوادی و مهندس جلیل‌پور قدردانی می‌نمایم. از شرکت شفق داروی پارسیان بابت در اختیار گذاشتن فضای کارگاهی و پری‌بیوتیک مصرفی نیز سپاسگزاری می‌نمایم.

منابع

۱- اکرمی، ر.، حاجی‌مرادلو، ع.، متین‌فر، ع.، عابدیان، ع.، و مازندرانی، ر.، ۱۳۸۷. تأثیر پربیوتیک اینولین بر شاخص تولید و تراکم باکتریایی دستگاه گوارش فیل‌ماهیان جوان پرورشی. مجله شیلات، سال دوم، ۱۱ صفحه.

۲- پورامینی، م.، ۱۳۸٦. بررسی اثر تغذیه با مخمر ساکارومایسس سروزیا بر رشد و بازماندگی لارو ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان، پایان‌نامه کارشناسی‌ارشد، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان، ۱۰۱ صفحه.

۳- پورعلی، ح.ر.، محسنی، م.، آق‌تومان، و.، و توکلیف م.، ۱۳۸۲. پرورش بچه‌ماهیان با درصدهای مختلف غذای کنسانتره فرموله شده، مجله علمی شیلات ایران، ویژه‌نامه اولین سمپوزیوم ملی ماهیان خاویاری، صفحات ۳۷ تا ٤۸.

٤- سقا، ح.ر.، و سروش‌نیا، م.، ۱۳۸۲. تجهیزات و فرآورده‌های آزمایشگاهی، انتشارات کتاب میر، ۲٦۸ صفحه.

۵- سلطانی، م.، ۱۳۸۷. ایمنی‌شناسی ماهیان و سخت‌پوستان، انتشارات دانشگاه تهران، ۲٦٤ صفحه.

٦- سوداگر، م.، ایمان‌پور، م.، و حسینی‌فر، ح.، ۱۳۸۳. تأثیر محرک رشد اپتیمون بر عوامل رشد و بازماندگی بچه فیل‌ماهیان، مجله علوم و فنون دریایی ایران ۳ (۲-۳)، ص ۳۸-۳۳.

۷- عاشورپور، ع.، ۱۳۹۰. تأثیر پری‌بیوتیک دیواره سلولی مخمر (*Saccharomyces cerevisiae*) بر شاخص‌های رشد، فاکتورهای خونی و فراوانی باکتری‌های اسید لاکتیک روده ماهیان انگشت‌قد شیپ (*Acipenser nudiventris*)، پایان‌نامه کارشناسی‌ارشد، دانشگاه آزاد لاهیجان، ۱۰۰ صفحه.

۸- میزانی، ف.، ۱۳۹۰. تعیین اثرات پری‌بیوتیکی دیواره سلولی مخمر بر شاخص‌های رشد، فاکتورهای خونی و فلور میکروبی روده ماهیان انگشت‌قد کپور معمولی (*Cyprinus carpio*). پایان‌نامه کارشناسی‌ارشد، دانشگاه آزاد لاهیجان، ۹۰ صفحه.

9. Andrews, S.R., Sahu, N.P., Pal, A.K., and Kumar, S., 2009. Hematological modulation and growth of *Labeo rohita* fingerlings: Effect of dietary mannan oligosaccharide, yeast extract, protein hydrolysate and chlorella. Aquaculture Research, 41, 61-69.
10. Bahmani, M., Kazemi, R., and Donskaya, P., 2001. Acomparative study of somehematological features in young reared sturgeons (*Acipenser persicus* and *Huso huso*). Fish Physiology and Biochemistry. 24, 135-140.
11. Cuesta, A., Meseguer, J., and Esteban, M.A., 2004. Total serum immunologlobulin M levels are affected by immunomodulators in seabream (*Sparus auratea*). Veterinary Immunology and Immunopathology. 101, 203-210.
12. Dalmo, A.R., and Bogwald, J., 2008. β-glucans as conductors of immune symphonies. Fish and Sellfish Immunology. 25, 384-396.
13. David, J.A., Cyrill, J., Kendall, W.C., and Vuksan, V., 1999. Inuline, Oligofructose and intestinal function. J. Nutr. 129, 1431-1433.

Archive of SID
www.SID.ir

14. EL-Boshy, M.E., El-Ashramb, A.M., Abdel Hamid, F.M., and Gadalla, H.A., 2010. Immunomodulatory effect of dietary *Saccharomyces cerevisiae*, β-Glucan and laminaran in mercuric chloride treated Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) and experimentally infected with *Aeromonas hydrophila*. Fish and Sell fish Immunology. 28, 802-808.
15. Gang, L., and Huang, G.L., 2008. Extraction of Two Active Polysaccharides from the Yeast Cell Wall. Z. Naturforsch. 63, 919-921.
16. Huang, S.S.O., Lutes, P.B., and Storebakken, T., 1989. Growth and feed efficiency of white sturgeon (*Acipenser transmontanus*) suboyearling at different feeding f\rates. Aquacultuer. 80, 147-153.
17. Khoshbavar-Rostami, H.A., Soltani, M., Kazemi, B., and Hassan, M.D., 2003. Immune responses of great sturgeon (*Huso huso*) to *Aeromonas hydrophial bacterin*. J. Fish Biol. 70, 931-938.
18. Magnadottir, B., Jonsdottir, H., Helgason, S., Bjornsson, B., Jorgensen, T.O., and Pilstrom, L., 1999. Humoral immune parameters of Atlantic cod (*Gadus morhue*). Vomparative Biochemistry and Physiology. 122, 173-188.
19. Malin, M., Suomalainen, H., Saxelin, M., and Isolauri, E., 1996. Promotion of IgA immune response in patients with Crohns disease by oral bacteriotherapy with lactobacillus GC. Annual nutrition and metabolism. 40, 137-45.
20. Merrifield, D.L., Bradley, G., Baker, R.T.M., Dimitroglou, A., and Davies, S.J., 2009. Probiotic applications for Rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss Walbaum*) I. Effects on growth performance, feed utilization, intestinal microbiota and related health criteria. Aqua. Nutr., Doi: 10.1111/j.1365-2095.2009.00689.x.Accepted.
21. Misra, C.K., Das, B.K., Mukherjee, S.C., and Pattnaik, P., 2006. Effect of long term administration of dietary β-Glucan on immunity. Growth and survival of *Labeo rohita* fingerling. Aquaculture. 255, 82-4.
22. Mohseni, M., Pourkazemi, M., Bahmani, M., Falahatkar, B., Pourali, H.R., and Salehpour, M., 2006. Effects of feeing rate and frequency on growth performance of yearling great sturgeon, *Huso huso*. J. Appl. Ichthyol. 22, 278-282.
23. Peter, H., and Sneath, A., 1986. Bergeys manual of systematic Bacteriology. 2, 1104-1154.
24. Ringo, E., and Gatesoupe, F.J., 1998. Lactic acid bacteria in fish: A review. Aquaculture. 160, 177-203.
25. Sakai, M., 1999. Vurent reaserch status of fish immunostimultans. Aquaculture. 172, 63-92.
26. Tewary, A., and Patra, B.C., 2011. Oral administration of baker's yeast (*Saccharomyces cerevisiae*) acts as a growth prometer and immunodulator in *Labeo rohita* (Ham). J. Aqua. Res. Dev. 2:109.7 p.doi:10.4172/2155-9546.1000109.
27. Torrecillas, S., Makol, A., Caballero, M.J., Montero, D., Gines, R., Sweetman, J., and Izquierdo, M.S., 2010. Improved feed utilization, intestinal micus production and immune parameters in sea bass (*Dicentrachus labrax*) fed mannan oligosaccharides (MOS). Aquaculture Nutrition. (In Press)
28. Verdegem, M.C.J., Hilbrands, A.D., and Boon, J.H., 1997. Influence of salinity and dietary composition on blood parameter values of hybrid red tilapia (*Oreochromis niloticus*) and (*Oreochromis mosambicus*). Aquaculture. Res. 28, 453-459.
29. Zilva, J.F., and Pannall, P.R., 1984. Clinical chemistry in diagnosis and treatment. Publ. Lioyd-Luke (medical Books) Ltd. London. pp. 348-352.

Archive of SID
www.SID.ir

Journal of Fisheries, Islamic Azad University, Azadshahr Branch
Vol. 8, No. 3, November 2014

Deliberation some of indicators of immunity and intestinal bacterial flora of rainbow trout fry (*Oncorhynchus mykiss*) fed with prebiotic yeast cell wall (*Saccharomyces cerevisia*)

***M. Eatisamipour[1], A.A. Zamini[2] and M. Farokhroz[3]**
[1]M.Sc. Graduate, Dept. of Fisheries, Lahijan Branch, Islamic Azad University, Lahijan, Iran,
[2,3]Assistant Prof. and Faculty Member, Dept. of Fisheries, Faculty of Natural Resources, Lahijan Branch, Islamic Azad University, Lahijan, Iran

Abstract

Rainbow trout farmed fish is one of the most critical situation is in the early stages of growth. In this study, the cell wall of yeast *Saccharomyces cerevisia* added prebiotic dietary factors at different levels of immunity and intestinal bacterial flora were used. In the study, 120 rainbow trout fry with the average weight of 3.61±0.12 gr containing 100 liters volume fiberglass tub were randomly distributed into 12 tanks and were reared. An experiment to determine the optimum level of prebiotic effect of dietary yeast cell wall in the diet of rainbow trout fry in 1% prebiotic treatments, 1.5% prebiotic, 2% prebiotic prebiotic-free control, in a balanced design with three replications each were studied. The results showed that non-specific immune parameters in blood, such as lysozyme and specific immune such as IgM and Ig had statistically significant difference between treatment groups fed with 2% prebiotic yeast cell wall with other treatments and controls ($P<0.05$). The intestinal bacterial flora of fishes on MRS agar and TSA were no significant differences between treatment ($P>0.05$). But in the mean bacterial count was treated with 2% higher than the control and other treatments. Therefore, based on these results it can be stated that the level of 2% prebiotic cell wall of yeast used in the diet caused a significant increase in bacterial flora and immune parameters studied, an important role in the safety of rainbow trout fry plays.

Keywords: Rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*); Prebiotic; Yeast cell wall (*Saccharomyces cerevisia*); Immunological index; The intestinal bacterial flora

Archive of SID

* Corresponding Authors; Email: mohammadeatisamipour@gmail.com

www.SID.ir