بررسی تأثیر باکتریهای *Bacillus subtilis* و *B. licheniformis* به عنوان باکتریهای پروبیوتیکی و ترکیب آهن فروسولفات بر برخی فاکتورهای خونی لارو ماهی قزل آلا *Oncorhynchus mykiss* طی دوره انکوباسیون

سمیرا ناصری*[۱]، حسین خارا[۱] و متین شکوری[۲]

[۱] لاهیجان، دانشگاه آزاد اسلامی واحد لاهیجان، دانشکده منابع طبیعی، گروه شیلات

[۲] قائمشهر، باشگاه پژوهشگران جوان دانشگاه آزاد اسلامی واحد قائمشهر

تاریخ دریافت: ۸۸/۵/۲۱ تاریخ پذیرش: ۸۹/۱۰/۲۸

چکیده

تأثیر محصول پروبیوتیکی بیوپلاس ۲- ب (BioPlus 2B) (حاوی باکتریهای *Bacillus subtilis* و *B. licheniformis*) و ترکیب آهن $Fe(So_4)_2(7H_2O)$ بر برخی فاکتورهای خونی لارو قزل آلای رنگین‌کمان (میانگین وزنی ۰/۰۱±۰/۱۳۵ گرم) در ۹ تیمار با سه تکرار به مدت ۶۰ روز بررسی شد. تیمارهای آزمایشی شامل: T_1: پروبیوتیک: $۱/۶\times۱۰^۹$ CFU/g، T_2: پروبیوتیک: $۱/۲\times۱۰^۹$ CFU/g، T_3: آهن: 7 mg/kg، T_4: آهن: ۵ mg/kg، T_5: پروبیوتیک: $۱/۶\times۱۰^۹$ CFU/g و آهن: 7 mg/kg، T_6: پروبیوتیک: $۱/۶\times۱۰^۹$ CFU/g و آهن: ۵ mg/kg، T_7: پروبیوتیک: $۱/۲\times۱۰^۹$ CFU/g و آهن: 7 mg/kg، T_8: پروبیوتیک: $۱/۲\times۱۰^۹$ CFU/g و آهن: ۵ mg/kg و T_9: جیره شاهد (بدون مکمل سازی با پروبیوتیک و آهن) بود. در انتهای دوره آزمایش تعداد کل گلبولهای سفید خون و میزان ایمونوگلبولین M در T_1 و T_2 بیشترین مقدار را دارا بود ($P\leq۰/۰۵$)، T_8 و T_7 بیشترین مقدار آهن، فریتین و ترانسفرین را به خود اختصاص دادند ($P\leq۰/۰۵$). یافته های این تحقیق نشان می‌دهد که اگر غذا فقط با پروبیوتیک آغشته گردد تعداد کل گلبولهای سفید و ایمونوگلبولین M بالاتری را موجب می‌شود؛ در حالی که وجود آهن به همراه پروبیوتیک در غذا باعث افزایش میزان آهن، فریتین و ترانسفرین سرم می‌شود.

واژه های کلیدی: پروبیوتیک، بیوپلاس ۲-ب، قزل‌آلای رنگین‌کمان، ایمونوگلبولین M، ترانسفرین

* نویسنده مسئول، تلفن : 0911-1144562 پست الکترونیکی: samiranaseri@hotmail.com

مقدمه

ماهی قزل آلای رنگین کمان گونه ای با ارزش تجاری بالا می باشد و بیماری های عفونی باکتریایی در بسیاری از مزارع پرورشی یکی از دلایل عمده کاهش میزان تولید می-باشد. شرایط پرورش ماهی در مرحله لاروی در موفقیت یا عدم موفقیت امر پرورش تأثیر به سزایی دارد (۱۴). به منظور ایجاد مقاومت و کاهش چنین نتایج نامطلوبی در مرحله لاروی، بسیاری از افزودنیهای غذایی جهت بهبود شرایط رشد و راندمان مصرف غذا استفاده می‌شود (۲). آنتی بیوتیکها یکی از این افزودنیهای غذایی هستند که به طور وسیعی از اوایل دهه ۱۹۵۰ استفاده می‌شوند (۲)، اما به واسطه استفاده ناآگاهانه از آنتی بیوتیکها در درمانهای انسانی و دامپزشکی و همچنین به عنوان تقویت کننده رشد در حیوانات، مقاومت به آنتی بیوتیکها در میکروارگانیسم ها ایجاد شده است (۴ و ۵۰)، از اینرو مشکلات جدی در درمان عفونتهای میکروبی به وجود آمد (۵۲). روش جدیدی که پذیرش قابل قبولی را در صنعت به دست آورده، استفاده از باکتریهای پروبیوتیک برای کنترل عوامل بیماریزا می‌باشد (۱۵ و ۴۹). نحوه عمل باکتریهای

Archive of SID
www.SID.ir

پروبیوتیکی شامل تولید مواد جلوگیرنده، رقابت جهت مواد و انرژی موجود، رقابت برای جایگاه اتصال، افزایش پاسخ ایمنی، بهبود کیفیت آب، میان کنش با فیتوپلانکتون ها، منبع ریز مغذیها و درشت مغذیها و مشارکت آنزیمی در هضم می‌باشد (۵۷)، همچنین باکتریهای پروبیوتیکی با عوامل بیماریزا در جذب مواد مغذی در لوله گوارش به رقابت می‌پردازند (۱۳) و با تحریک سیستم ایمنی به واسطه فعال کردن ماکروفاژها، به میزبان سود می رسانند (۴۴). گزارشهایی جهت ارزیابی پتانسیل رقابت انحصاری پروبیوتیکها در قزل آلای رنگین کمان انجام شده است (۱۹، ۲۰، ۴۸ و ۳۷). تحریک سیستم ایمنی در قزل آلای رنگین کمان نیز همچنین توسط تنی چند از محققین انجام مورد ارزیابی قرار گرفته است (۲۳، ۳۷ و ۴۲).

از آنجا که جنس باسیلوس به عنوان پاتوژن ارگانیسم های آبزی تا به حال گزارش نشده است (۳۴)، کاربرد آن به طور وسیعی در صنعت آبزی پروری پذیرفته شده است (۱۷). گونه های باسیلوس قادر به تولید آنتی بیوتیکها، آمینو اسیدها و آنزیمها می‌باشند (۵۳). از این رو پروبیوتیکهای باسیلوس ممکن است اثرات تغذیه ای مثبتی روی ماهیها داشته باشند (۵). گزارشهایی مبنی بر تأثیر مثبت استفاده از افزودنی غذایی بیوپلاس ۲–ب بر رشد و بازماندگی خوک، ماکیان (۲۵) و ماهی از جمله قزل‌آلای رنگین کمان (۵ و ۱۰) وجود دارد.

اکثر میکروارگانیسم ها برای رشد به آهن نیاز دارند (۴۶) و باکتریهای بیماریزای موفق آنهایی هستند که در رقابت برای جذب آهن مخصوصاً در شرایط کمبود آهن در بافتها و مایعات بدن میزبان، بتوانند بر رقبای خود غالب شوند.

(۵۹). نیاز برخی از عوامل بیماریزا به آهن زیاد است، مثلاً ویبریو آنگوئیلارم *Vibrio anguillarum* نیاز زیادی به آهن دارد به طوری که در آزمایشی که به همین منظور صورت گرفت، مرگ و میر آزاد ماهیان مورد مطالعه با افزایش سطح آهن در جیره غذایی به صورت خطی افزایش یافت (۱۲ و ۵۱). این قبیل نتایج نشان دهنده اهمیت و نقش ترکیبات آهن دار در رشد باکتریها و میکروارگانیسم ها در بدن آبزیان است (۵۷).

در تحقیق حاضر اثر باسیلوس و آهن از طریق اضافه شدن به غذا، بر برخی پارامترهای خونی لارو قزل‌آلای رنگین کمان مورد بررسی قرار گرفته است.

مواد و روشها

ماهیها: در این تحقیق تعداد ۲۷۰۰ قطعه لارو ماهی قزل آلای رنگین‌کمان با میانگین وزنی ۰/۰۱±۰/۱۳۵ گرم در ۲۷ تراف کالیفرنیایی (با ابعاد ۲۲۰×۳۵×۲۰)، با تراکم ۱۰۰ عدد در هر تراف به مدت ۶۰ روز در فصل بهار (۱۴/۴۸±۰/۰۸ºC) در مرکز تحقیقات ماهیان سردآبی تنکابن (مختصات جغرافیایی "۳۳ '۴۱ ۳۶ شمالی و "۱۱ '۵۰ ۵۰ شرقی) نگهداری شد. تحقیق مورد بررسی شامل ۹ تیمار آزمایشی (T_1: پروبیوتیک: $1/6\times10^9$ CFU/g، T_2: پروبیوتیک: $1/2\times10^9$ CFU/g، T_3: آهن: 7 mg/kg، T_4: آهن: ۵ mg/kg، T_5: پروبیوتیک: $1/6\times10^9$ CFU/g و آهن: 7 mg/kg، T_6: پروبیوتیک: $1/6\times10^9$ CFU/g و آهن: ۵ mg/kg، T_7: پروبیوتیک: $1/2\times10^9$ CFU/g و آهن: 7 mg/kg، T_8: پروبیوتیک: $1/2\times10^9$ CFU/g و آهن: ۵ mg/kg و T_9: جیره شاهد (بدون مکمل سازی با پروبیوتیک و آهن)) بود. کلیه تیمارهای آزمایشی با ۳ تکرار انجام شد (جدول ۱).

پروبیوتیک و آهن مصرفی: پروبیوتیک تجاری بیوپلاس ۲–ب، از شرکت کریستین هنسن دانمارک تهیه گردید. فرآورده میکروبی مورد استفاده، یک نوع پروبیوتیک تجاری شامل دو گونه باکتری باسیلوس لیشنی فرمیس *Bacillus licheniformis* و باسیلوس سوبتیلیس *B. subtilis* (به تعداد 4×10^4 باکتری در هر گرم از پودر این فرآورده و با نسبت ۱:۱ از هر دو سویه باکتری مذکور) بود. آهن مورد استفاده نیز از محلول آهن فریرون (هر یک میلی

Archive of SID
www.SID.ir

لیتر محتوی: ۱۲۵ میلی گرم فروس سولفات هپتا هیدرات معادل ۲۵ میلی گرم آهن) (۳۶) تأمین شد.

جدول ۱- جیره های آزمایشی مورد استفاده جهت لاروهای ماهی در تیمارهای مختلف

تیمار	جیره های مورد استفاده جهت تغذیه ماهیان
T_1	غذای استاندارد همراه مکمل غذایی پروبیوتیک به نسبت (غذا $1/6\times10^9$ CFU/g)
T_2	غذای استاندارد همراه مکمل غذایی پروبیوتیک به نسبت (غذا $1/2\times10^9$ CFU/g)
T_3	غذای استاندارد همراه محلول آهن به نسبت (غذا ۷ mg Fe/kg)
T_4	غذای استاندارد همراه محلول آهن به نسبت (غذا ۵ mg Fe/kg)
T_5	غذای استاندارد همراه مکمل غذایی پروبیوتیک به نسبت (غذا $1/6\times10^9$ CFU/g) و محلول آهن به نسبت (غذا ۷ mg Fe/kg)
T_6	غذای استاندارد همراه مکمل غذایی پروبیوتیک به نسبت (غذا $1/6\times10^9$ CFU/g) و محلول آهن به نسبت (غذا ۵ mg Fe/kg)
T_7	غذای استاندارد همراه مکمل غذایی پروبیوتیک به نسبت (غذا $1/2\times10^9$ CFU/g) و محلول آهن به نسبت (غذا ۷ mg Fe/kg)
T_8	غذای استاندارد همراه مکمل غذایی پروبیوتیک به نسبت (غذا $1/2\times10^9$ CFU/g) و محلول آهن به نسبت (غذا ۵ mg Fe/kg)
T_9	غذای استاندارد (تیمار شاهد: بدون مکمل سازی با پروبیوتیک و آهن)

غذا و غذادهی: به منظور تغذیه لاروها یک نوع غذای خشک پلت از شرکت کوپنس با سایز ۱ (تا وزن ۲۰۰ میلی گرم)، سایز ۲ (۲۰۰ تا ۵۰۰ میلی گرم)، سایز ۳ (۵۰۰ میلی گرم تا ۲ گرم) و سایز ۴ (۲ تا ۴ گرم) انتخاب گردید. قابل ذکر است که پیش از اجرای آزمایش، ارزش غذایی جیره خشک فوق از لحاظ سطوح چربی، پروتئین و رطوبت مورد سنجش قرار گرفت که به ترتیب شامل مقادیر ۱۵/۴، ۵۳ و ۹/۸ درصد بود.

برای آماده سازی جیره های T_1 و T_2، به مقدار پروبیوتیک مورد نیاز برای هر تیمار، مطابق روش مورد استفاده توسط Chang و Liu (۲۰۰۲)، آب مقطر اضافه شد، سپس محلول به دست آمده روی غذا اسپری گردید(۷). جهت آماده سازی جیره های T_3 و T_4، به مقدار آهن مصرفی آب مقطر اضافه شد و روی غذا اسپری گردید. در خصوص تیمارهای T_5، T_6، T_7 و T_8، ابتدا پروبیوتیک و سپس آهن روی غذا اسپری شد. در ضمن به لاروهای سه تراف نیز به عنوان تیمار شاهد (T_9)، غذای پلت اسپری شده با آب مقطر خورانده شد. کلیه غذاهای تهیه شده در معرض جریان هوا قرار داده شد تا آب مخلوط شده با غذا، تبخیر گردد. پس از تبخیر، غذا را دوباره وزن نموده تا به وزن اولیه برسد، در نهایت روغن مایع با نسبت مشخص و یکسانی روی همه غذاها اسپری شد و برای غذادهی استفاده گردید.

اخذ و فرآوری نمونه های خون: در پایان دوره ۶۰ روزه، پس از گذشت ۲۴ ساعت از زمان قطع تغذیه، ۳۰ عدد از ماهیهای هر تکرار به طور تصادفی صید گردید، مراحل بیهوشی توسط تریکائین متان سولفونات (MS_{222}) (pH:۷)، با غلظت ۱۰۰ میلی گرم در لیتر (۴۵) انجام شد، با روش قطع ساقه دمی (۴۵)، ۱ سی سی خون از هر تکرار درون لوله ویال (Eppendorf) آغشته به ماده ضد انعقاد خون (هپارین) ریخته شد و بلافاصله تعداد کل گلبولهای سفید (۱۸) شمارش شد. جهت تهیه سرم ۱ میلی لیتر خون از هر تکرار به مدت دو ساعت در دمای معمولی اتاق قرار گرفت تا منعقد گردد. سپس با سرعت ۱۵۰۰ دور در ۵ دقیقه سانتریفیوژ گردید (سانتریفوژ Multi speed مدل ALC PK-131) (۴۳). جهت اندازه گیری آهن از روش رنگ سنجی و کیت زیست شیمی؛ فریتین با روش IRMA و کیت Radim؛ و برای اندازه گیری میزان ترانسفرین و IgM سرم، روش نفلومتریک و نفلومتر Binding Site مورد استفاده قرارگرفت.

Archive of SID
www.SID.ir

پردازش آماری داده ها: طرح کلی این تحقیق در قالب طرح کاملاً تصادفی (Completery Randomyzed Design) و کلیه اطلاعات ثبت شده در انتهای آزمایش به وسیله آنالیز واریانس یکطرفه (one-way ANOVA) و تست دانکن به عنوان Post Hoc، جهت مقایسه میانگینها مورد تجزیه و تحلیل قرارگرفت. اختلافات بین میانگینها در تیمارهای مختلف با سطح اطمینان P<۰/۰۵ تعیین گردید. کلیه عملیات مربوطه به وسیله نرم افزار SPSS ۱۴ مورد سنجش قرار گرفت.

نتایج

۱ – تعداد کل گلبولهای سفید خون: همان طور که مشاهده می‌شود T_1 بیشترین تعداد گلبولهای سفید را به خود اختصاص داد که با سایر تیمارها دارای اختلاف معنی دار بود (P≤۰/۰۵). T_9 و T_3 کمترین تعداد گلبولها را به خود اختصاص دادند، که بین تیمارهای مزبور با T_4 اختلاف معنی دار مشاهده نشد (P≥۰/۰۵) (نمودار ۱–a).

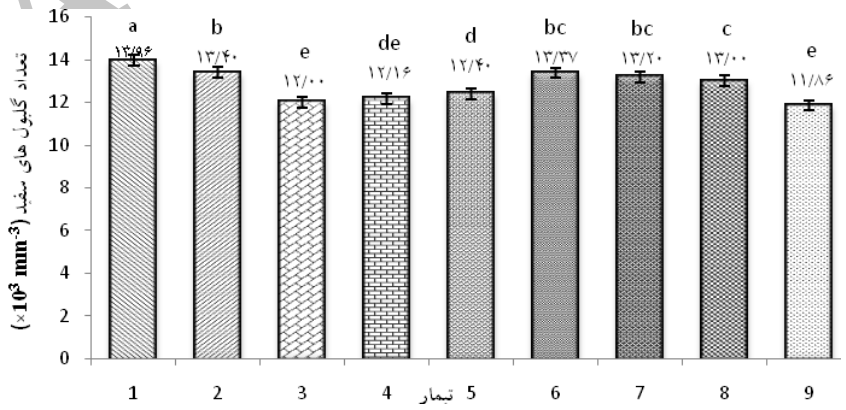
۲ – ایمونوگلبولین M سرم: یافته ها حاکی از آن است که با افزایش پروبیوتیک و آهن به غذا، بیشترین میزان IgM در T_1 و کمترین مقدار آن در T_3 و T_4 مشاهده شد. در بین سایر تیمارها بین T_5 و T_7، همچنین T_6 و T_8 اختلاف معنی دار مشاهده نگردید (P≥۰/۰۵) (نمودار ۱–b).

۳ – ترانسفرین سرم: میانگین مربوط به ترانسفرین سرم در نمودار ۱–c ذکر شده است، که بیشترین میزان آن مربوط به T_7 و T_8 می‌باشد (P≤۰/۰۵)، بین T_1، T_5 و T_6 با T_9 اختلاف معنی داری مشاهده نشد (P≥۰/۰۵).

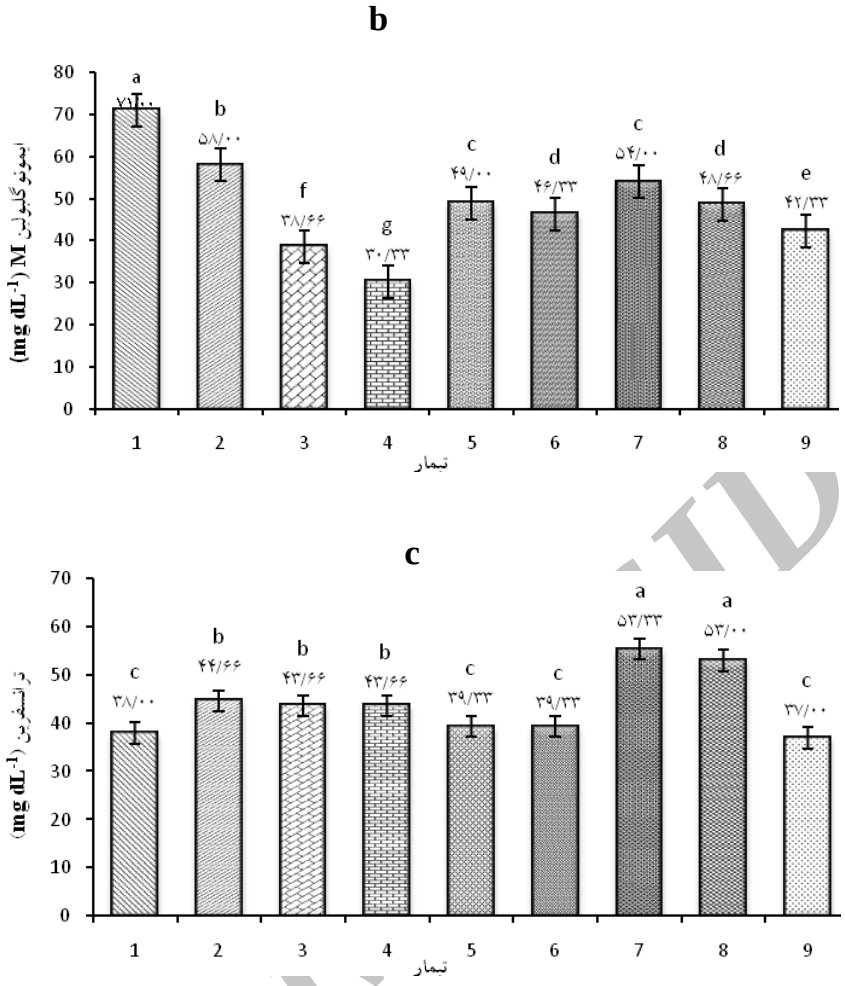
۴ – آهن سرم: در نمودار ۲–a سطح آهن سرم بچه ماهیان پس از ۶۰ روز تغذیه با تیمارهای آزمایشی گزارش شده است. افزودن آهن به همراه پروبیوتیک در تیمارهای آزمایشی منجر به افزایش آهن سرم در کلیه نسبت به تیمارهای T_5، T_6 **و** T_9 شد. همچنین بیشترین میزان آن در T_7 **و** T_8 مشاهده شد که با سایر تیمارها دارای اختلاف معنی دار بود (P≤۰/۰۵).

۵ – فریتین سرم: همانطور که در نمودار ۲–b مشاهده می شود افزودن سطوح متفاوت پروبیوتیک و آهن به غذای تیمارهای آزمایشی منجر به افزایش میانگین فریتین T_2، T_7 و T_8 نسبت به سایر تیمارها شد (P≤۰/۰۵) و بین سایر تیمارها با T_9 اختلاف معنی داری مشاهده نشد (P≥۰/۰۵).

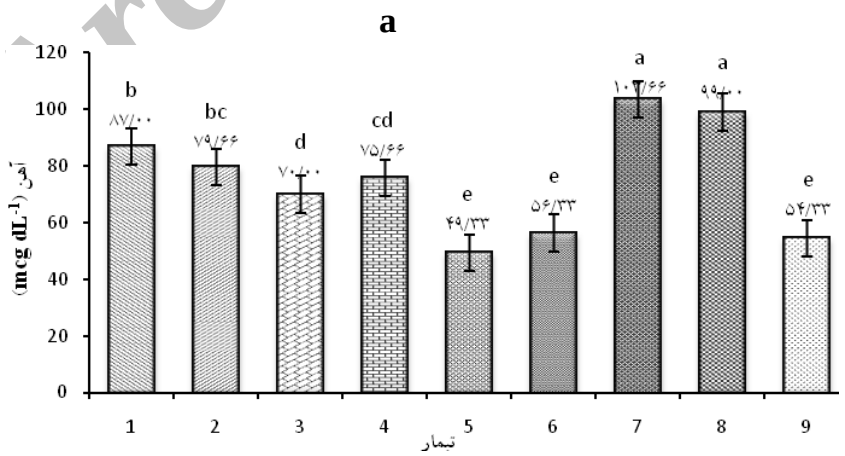
a



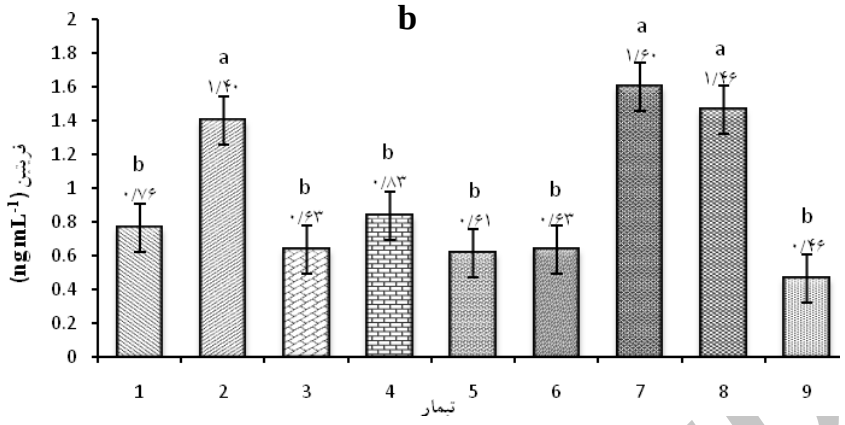
Archive of SID
www.SID.ir



نمودار ۱- میانگین نتایج (a: تعداد گلبولهای سفید، b: ایمونوگلبولین M و c: ترانسفرین) خون بچه ماهی ها در انتهای دوره آزمایش ۶۰ روزه (وجود حروف مشابه نشانه عدم وجود اختلاف معنی دار می باشد ($P\geq ۰/۰۵$)).



www.SID.ir



نمودار ۲- میانگین نتایج (a: آهن و b: فریتین) خون بچه ماهی ها در انتهای دوره آزمایش ۶۰ روزه (وجود حروف مشابه نشانه عدم وجود اختلاف معنی دار می باشد ($P\geq ۰/۰۵$)).

بحث

در این تحقیق افزودن سطوح متفاوت پروبیوتیک و آهن به غذای تیمارهای آزمایشی باعث شد که تعداد کل گلبولهای سفید خون در تیمارهای آزمایشی نسبت به تیمار شاهد بیشتر گردد. بیشترین تعداد کل گلبولهای سفید در T_1، سپس T_2 و کمترین تعداد نیز به ترتیب در T_3 و شاهد مشاهده گردید. تا کنون در خصوص تأثیر پروبیوتیکها بر تعداد گلبولهای سفید در این نوع باکتریها مطالعه‌ای انجام نشده است، با اینکه بیان شده که تحریک ایمنی با افزایش سطح آنتی بادیها در ارتباط است (۲۰). برخی عوامل سلولی از قبیل فاگوسیتوزیس گلبولهای سفید (۲۲) و فعالیت لنفوسیت ها (۳، ۲۲ و ۵۵)، نقش مهمی را در سیستم ایمنی ماهیها ایفا می‌نمایند. در این ارتباط گزارشی پیرامون تنظیم ایمنی گلبولهای سفید انسان توسط باکتریهای اسید لاکتیک موجود است (۴۱ و ۵۴)، به علاوه Aattouri و همکاران (۲۰۰۱) گزارش کردند که الحاق باکتریهای اسید لاکتیک به موش موجب افزایش لنفوسیت ها می‌شود(۱). آنها مطرح کردند که آثار مفید این عمل منجر به افزایش مقاومت موش در برابر عفونتها می گردد. در این تحقیق از پروبیوتیک حاوی باکتریهای باسیلوس استفاده گردید، که دیواره سلولی گلیکو پپتیدی باسیلوس ها قادر است از طریق فعال سازی لنفوسیت‌ها به افزایش پاسخ ایمنی موجود آبزی منجر گردد (۲۱). در مطالعه‌ای که Rengpipat و همکاران (۲۰۰۳) بر روی میگو انجام دادند، و از *Bacillus* S11 به عنوان پروبیوتیک استفاده نمودند، نتایج امیدوار کننده‌ای در مورد تحریک پاسخ ایمنی در میگوی *P. monodon* گزارش کردند (۴۷). در تحقیق مزبور شاخصهای ایمنی مانند فاگوسیتوزیس و فعالیت ضد باکتریایی در تیمار های پروبیوتیکی افزایش یافت (۴۷). در تحقیق حاضر نیز تعداد کل گلبولهای سفید در تیمارهایی که غذایشان فقط به پروبیوتیک آغشته شده بود، افزایش یافت. T_5، T_6، T_7 و T_8 دارای تعداد گلبولهای سفید حد واسطی بودند، از این رو می‌توان گفت که وجود آهن اضافی در غذا تاثیر چندانی بر تعداد کل گلبولهای سفید خون ندارد، به طوری که در صورت فقدان آهن اضافی همراه با پروبیوتیک در جیره غذایی، تعداد گلبولهای سفید بالاتری در تیمارهای شامل تنها پروبیوتیک به دست خواهد آمد. T_3 و T_4 نسبت به سایر تیمارها دارای کمترین تعداد کل گلبول سفید بودند. Lim & Klesius (۲۰۰۱) نشان دادند که اضافه نمودن آهن به غذا، تأثیری بر تعداد گلبولهای سفید گربه ماهی کانالی "*Ictalurus punctatus*"

Archive of SID
www.SID.ir

در برابر *Edwardsiella ictaluri* ندارد؛ که با نتایج تحقیق حاضر در مورد تیمارهای شامل آهن مطابقت دارد(۲۷).

پروبیوتیک مورد استفاده در این تحقیق شامل دوگونه باکتری"*B. licheniformis*" و "*B. subtilis*" است، گونه های باسیلوس چندین آنتی بیوتیک پپتیدی شامل باسیتراسین و سابتیلین که به ترتیب توسط باکتریهای مذکور ترشح می‌شود، را تولید می‌کنند. سایر مواد دارای فعالیت کنترل زیستی همچنین از گونه های باسیلوس جدا شده‌اند (۵ و ۱۰). ایتورین ها و لیپوپروتئین های حلقوی جدا شده از *B. subtilis* برای انواع قارچها و مخمرهای بیماریزا سمی می‌باشند (۲۸). آنتی ژنهای سطح باسیلوس، یا متابولیت هایشان ممکن است نقش ایمونوژن را برای دفاع و ایمنی بدن ایفا نمایند. از آنجا که باکتریهای پروبیوتیکی تولید آنتی بادی را در انسان تحریک می‌کنند (۲۲)، پس می‌توان انتظارداشت که سطح IgM در تیمارهای پروبیوتیکی نسبت به سایر تیمارها و تیمار شاهد بالاتر باشد که با نتایج تحقیق حاضر مطابقت دارد. در مطالعه ای که توسط Panigrahi و همکاران (۲۰۰۵) روی سیستم ایمنی ماهی قزل آلای رنگین کمان انجام گرفت(۴۳)، سطح ایمونوگلبولین کل (Ig) در تیمارهای تغذیه شده با پروبیوتیک نسبت به تیمار شاهد بیشتر بود، که با تحقیق حاضر مطابقت دارد. همچنین Nikoskelainen و همکاران (۲۰۰۳) بیان کردند که باکتریهای پروبیوتیکی روی سیستم ایمنی اختصاصی و ذاتی ماهی تأثیر می‌گذارند، آنها همچنین گزارش کردند که سطح Ig به طور چشمگیری در تیمارهای پروبیوتیکی نسبت به سایر تیمارها افزایش یافت (۳۷). تحقیقات صورت گرفته حاکی از این مطلب می باشد که مقدار IgM با توجه به اندازه/سن ماهی (۲۴، ۳۰ و ۳۲)، شرایط محیطی (۳۱ و ۳۸) و یا وجود بیماری (۲۹) تغییر می‌کند. از این رو بایستی تأثیر عوامل محیطی را بر سیستم ایمنی ماهیها و نتایج به دست آمده، درنظر داشت. اما از آنجایی که بررسی فاکتورهای محیطی در تحقیق حاضر مد نظر نبوده است، به بحث در این مقوله پرداخته نمی‌شود.

ترانسفرین مهم ترین پروتئین انتقال آهن در خون می‌باشد، و نقش مهمی را در متابولیسم آهن و عفونتهای باکتریایی ایفا می‌نماید (۱۱). بعضی محققان عقیده دارند که باکتریهای پاتوژن توسط سایدروفورشان در برابر ترانسفرین سرم برای آهن رقابت می‌کنند (۵۶). پاتوژنهای بدخیم (مسری) معمولاً سایدروفورهای قوی تولید می‌کنند که قادر به برداشت آهن از ترانسفرین می‌باشند (۳۹ و ۴۰). در واقع ترانسفرین، آهن در دسترس پاتوژنها را کنترل می‌کند (۵۸). Tang و همکاران (۱۹۹۸) نشان دادند که آلوده سازی ماهی طلایی "*Carassius auratus*" و کپور سرگنده "*Aristichthys nobilis*" با *Aeromonas hydrophila* منجر به کاهش میزان ترانسفرین متصل به آهن می گردد (۵۴). Carriquiriborde و همکاران (۲۰۰۴) گزارش کردند وجود آهن اضافی در غذای تیمارها، منجر به افزایش ترانسفرین سرم گردید(۶). Lim & Klesius (۱۹۹۷) نیز گزارش کردند که در گربه ماهی کانالی، میزان ترانسفرین در تیمارهای تغذیه شده بدون آهن نسبت به تیمارهای دارای آهن، کمتر می‌باشد که با نتایج تحقیق حاضر مطابقت دارد(۲۶).

وجود آهن در سرم ماهیان، مانند پستانداران، نقش مهمی را در سلامت ماهی ایفا می‌نماید، هنگامی که در سرم خون یک ماهی مقادیر بالای آهن وجود داشته باشد، احتمال ایجاد عفونت توسط *V. anguillarum* اغلب بیشتر خواهد شد (۱۶ و ۳۵) (زیرا *V. anguillarum* از مولکول "هم" و هموگلوبین به عنوان منبع آهن استفاده می‌کند (۹ و ۳۳))، در نتایج به دست آمده از این آزمایش با افزایش تعداد باکتری در غذا و متعاقباً افزایش آنها در فلور روده، میزان آهن سرم کاهش یافت. در مقابل، تیمارهایی که تعداد باکتری کمتری در غذای خود داشتند، میزان آهن سرم شان بیشتر از سایر تیمارها بود. تیمارهای شامل تنها پروبیوتیک

Archive of SID
www.SID.ir

مقدار حدواسط را دارا بودند و بین آنها نیز اختلاف معنی داری مشاهده نشد. در تحقیق حاضر T_3 و T_4 نسبت به تیمار شاهد آهن بیشتری در سرم داشتند. نتایج حاصله با نتایج تحقیق برخی محققین همخوانی دارد. Carriquiriborde و همکاران (۲۰۰۴) گزارش کردند وجود آهن اضافی در غذای تیمارها، منجر به افزایش ذخیره آهن خون نسبت به تیمار شاهد می گردد (۶)، همچنین در بررسی Chen & Shiau (۲۰۰۵)، که به منظور تعیین مقدار آهن مورد نیاز در بچه ماهی هامور "*Epinephelus malabaricus*" انجام شد، ماهیهای تغذیه شده با سطوح بالای آهن، بیشترین مقدار آهن سرم را به خود اختصاص دادند(۸). در تحقیق حاضر تیمارهایی که غذایشان فقط با محلول آهن آغشته شده بود فریتین سرم شان دارای مقدار حدواسطی بود و اختلاف معنی داری بین آنها مشاهده نشد. نتایج به دست آمده از اندازه گیری فریتین با نتایج به دست آمده از میزان آهن سرم همخوانی دارد. به دلیل آنکه تاکنون در هیچ تحقیقی میزان فریتین سرم ماهی مورد بررسی قرار نگرفته است، لذا مقیاسی جهت مقایسه نتایج حاصله از این آزمایش با سایر تحقیقات وجود ندارد. یافته های این تحقیق نشان می‌دهد که اگر حضور بیوپلاس ۲-ب به تنهایی در غذای لارو قزل‌آلای رنگین کمان منجر به افزایش تعداد کل گلبول‌های سفید خون و ایمونوگلبولین M می‌گردد؛ در حالی که اگر آهن به همراه بیوپلاس ۲-ب به غذا مکمل سازی شود، میزان آهن، فریتین و ترانسفرین سرم را افزایش می‌یابد.

منابع

1. Aattouri, N., Bouras, M., Tome, D., Marcos, A., and Lemonnier, D., 2001. Oral ingestion of lactic acid bacteria by rats increases lymphocyte proliferation and interferon production. *British Journal*. **87**: 367–373.
2. Ahilan, B., Shine, G., and Santhanam, R., 2004. Influence of probiotics on the growth and gut microflora load of juvenile Gold fish (*Carassius auratus*). *Asian Fisheries Science*. **17**: 271-278.
3. Anderson, D.P., Roberson, B.S., and Dixon, O.W., 1979b. Plaqueforming cells and humoral antibody in rainbow trout (Salmo gairdneri) induced by immersion in a Yersinia ruckeri O-antigen preparation. *Journal of the Fisheries Research Board of Canada*. **36**: 636–639.
4. Austin, D.J., Kristinsson, K.G., and Anderson, R.M., 1999. The relationship between the volume of antimicrobial consumption in human communities and the frequency of resistance. PNAS **96**: 1152–1156.
5. Bagheri, T., Hedayati, S.A., Yavari, V., Alizade, M., and Farzanfar, A., 2008. Growth, Survival and Gut Microbial Load of Rainbow Trout (*Onchorhynchus mykiss*) Fry Given Diet Supplemented with Probiotic During the Two Months of First Feeding. *Turkish Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*. **8**: 43-48.
6. Carriquiriborde, P., Handy, R.D., and Davies, S.J., 2004. Physiological modulation of iron metabolism in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) fed low and high iron diets. *The Journal of Experimental Biology*. **207**: 75-86.
7. Chang, C.I.W., and Liu, W.Y., 2002. An evaluation of two bacterial strains, *Enterococcus faecium* SF68 and *Bacillus toyoi*, for reducing edwardsiellosis in cultured European eel, *Anguilla anguilla* L.. *Journal of Fish Disseases*. **25**: 311-315.
8. Chen, C.C., and Shiau, S.Y., 2005. Iron Requirements and its Effect on Immune Response of Juvenile Grouper *Epinephelus malabaricus*. *Journal of the Fisheries Society of Taiwan*. Vol: 32. No: 1, Pp: 24-25.
9. Croxatto, A., 2006. a central regulator of quorum sensing signalling in *Vibrio anguillarum*. ISBN 91-7264-022-7.
10. Farzanfar, A., Lashto Aghaei, G., Alizadeh, M., Bayati, M., and Ghorban, R., 2007. Study on growth performance of Rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*, larvae with different concentration of probiotic in diet. In: proceedings of Aquaculture 2007, SAN ANTONIO, TEXAS, USA.
11. Ford, M.J., Thornton, P.J., and Park, L.K., 1999. Natural selection promotes divergence of transferrin among salmonid species. *Molecular Ecology*. Vol: 8. No:6. Pp: 1055-1061.
12. Gatesoupe, F.J., 1997. Siderophore production and probiotic effect of Vibrio sp. associated with turbot larvae, *Scophthalmus maximus*. *Aquatic Living Resource*. **10**: 239–246.

Archive of SID
www.SID.ir

13. Gatesoupe, F.J., 1999. The use of probiotics in aquaculture: a review. *Aquaculture.* **180**: 147-165.
14. Ghosh, K., Sen, S.K., and Ray, A.K., 2002. Growth and survival of Rohu,*Labeo rohita*(Hamilton) spawn fed diets supplemented with fish intestinal microflora. *Acta. Icthology Piscatorial*. **32(1)**: 83-92.
15. Gomez-Gil, B., Roque, A., and Turnbull, J.F., 2000. The use and selection of probiotic bacteria for use in the culture of larval aquatic organisms. *Aquaculture*. **191**: 259-270.
16. Gram, L., Melchiorsen, J., Spanggaard, B., Huber, I., and Nielsen, T.F., 1999. Inhibition of *Vibrio anguillarum* by *Pseudomonas fluorescens* AH2, a possible probiotic treatment of fish. *Applied and Environmental Microbiology*. Vol: 65, No: 3, Pp: 969–973.
17. Gullian, M., Thompson, F., and Rodriguez, J., 2004. Selection of probiotic bacteria and study of their immunostimulatory effect in *Penaeus vannamei*. *Aquaculture.* **233**: 1-14.
18. Handy, R.D., and Depledge, M.H., 1999. Physiological responses: Their measurement and use as environmental biomarkers in ecotoxicology. *Ecotoxicology.* **8**: 329-349.
19. Ibrahim, F., Quwehand, A.C., and Salminen, S.J., 2004. Effect of temperature on *in vitro* adhesion of potential fish probiotics. *Microbial Ecology in Health and Disease*. **16**: 222- 227.
20. Irianto, A., and Austin, B., 2003. A short communication: use of dead probiotic cells to control furunculosis rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum). *Journal of Fish Diseases*. **26**: 59- 62.
21. Itami, T., Asano, M., Tokushige, K., Kubono, K., Nakagawa, A., Takeno, N., Nishimura, H., Maeda, M., Kondo, M., and Takahashi, Y., 1998. Enhancement of disease resistance of Kuruma shrimp, *Penaeus japonicas*, after oral administration of peptidoglycan derived from *Bifidobacterium thermophilum*. *Aquaculture*. **164**: 277-288.
22. Jones, S.R.M., Stevenson, R.M.W., and Paterson, W.D., 1993. Proliferation of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) lymphocytes in response to the bacterial pathogen *Yersinia ruckeri. Bulletin of the Aquaculture Association of Canada*. **4**: 93–95.
23. Kim, D.H., and Austin, B., 2006. Innate immune responses in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*, Walbaum) induced by probiotics. *Fish and Shelfish Immunology*. **21**: 513-524.
24. Klesius, P.H., 1990. Effect of size and temperature on the quantity of immunoglobulin in Channel catfish, *Ictalurus punctatus*. *Veterinary Immunology and Immunopathology*. **24**: 187–195.
25. Kurti, P., 2000. Microbial balance and optimal digestion in pigs. *International Pig Topics*. **16**: 17- 19.
26. Lim, C., and Klesius, P.H., 1997. Responses of channel catfish (*Ictalurus punctatus*) fed iron-deficient and replete diets to *Edwardsiella ictaluri* challenge. *Aquaculture*. Vol: 157, No: 1-2. Pp: 83-93.
27. Lim, C., and Klesius, P.H., 2001. Growth response and resistance to *Edwardsiella ictaluri* challenge of channel catfish *Ictalurus punctatus* fed practical diets supplemented with various levels of iron. *Aquaculture.* Book of Abstracts. P: 376.
28. Maget-Dana, R., and Peypoux, F., 1994. Iturins, a special class of pore-forming lipopeptides: biological and physicochemical properties. *Toxicology*. **87**: 151-174.
29. Magnadottir, B., Guomundsdottir, S., and Guomundsdottir, B.K., 1995. Study of the humoral response of Atlantic salmon (*Salmo salar* L.), naturally infected with *Aeromonas salmonicida* ssp. *achromogenes. Veterinary Immunology and Immunopathology*. **49**: 127–142.
30. Magnadottir, B., Jonsdottir, H., Helgason, S., Bjornsson, B., Jorgensen, T.O., and Pilstrom, L., 1999b. Humoral immune parameters in Atlantic cod (*Gadus morhua* L.). II: The effects of size and gender under different environmental conditions. *Comparative Biochemistry and Physiology*. **122B**: 181–188.
31. Magnadottir, B., Jonsdottir, H., Helgason, S., Bjornsson, B., Jorgensen, T.O., and Pilstrom, L., 1999a. Humoral immune parameters of Atlantic cod (*Gadus morhua* L.). I: The effects environmental temperature. *Comparative Biochemistry and Physiology*. **122B**: 173–180.
32. Matsubara, A., Mihara, S., and Kusuda, R., 1985. Quantitation of Yellowtail Immunoglobulin by Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA). *Bulletin of the Japanese Society of Scientific Fisheries.* **51**: 921–925.
33. Mazoy, R., and Lemos, M.L., 1996. Identification of heme-binding proteins in the cell membranes of Vibrio anguillarum. *FEMS Microbiology Letters*. Vol: 135. Pp: 265-270.
34. Moriarty, D.J.W., 1998. Control of luminous Vibrio species in penaeid aquaculture ponds. *Aquaculture*. **164**: 351–358.
35. Nakai, T.T., Kanno, T., Cruz, E.R., and Muroga, K., 1987. The effects of iron compounds on the virulence of *Vibrio*

Archive of SID
www.SID.ir

anguillarum in Japanese eels and ayu. *Fish Pathology*. **22**: 185–189.

36. Naser, N., Lall, S.P., Brown, L., and Olivier, G., 1998. Role of dietary iron in immune response and disease resistance in Atlantic salmon, *Salmo salar* L.. *Aquaculture*. 98, Las Vegas, NV (USA).
37. Nikoskelainen, S., Ouwehand, A.C., Bylund, G., Salminen, S., and Lilius, E.M., 2003. Immune enhancement in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) by potential probiotic bacteria (*Lactobacillus rhamnosus*). *Fish and Shellfish Immunology*. **15(5)**: 443-452.
38. Olesen, N.J., and Vestergard-Jorgensen, P.E., 1986. Quantification of serum immunoglobulin in rainbow trout *Salmo gairdneri* under various environmental conditions. *Diseases of Aquatic Organisms*. **1**: 183–189.
39. Oppenheimer, S.J., 2001. Iron and Its Relation to Immunity and Infectious Disease. *Journal of Nutrition*. **131**: 616S- 635S.
40. Oppenheimer, S.J., and Hendrickse, R.G., 1983. The clinical effects of iron deficiency and iron supplementation. *Nutrition Abstracts Reviews*. **53**: 585-598.
41. Oyetayo, V.O., and Oyetayo, F.L., 2005. Potential of probiotics as biotherapeutic agents targeting the innate immune system. *African Journal of Biotechnology*. Vol: 4(2). Pp: 123-127.
42. Panigrahi, A., Kiron, V., Kobayashi, T., Puangkaew, J., Satoh, S., and Sugita, H., 2004. Immune responses in rainbow trout, *Onchorhynchus mykiss*, induced by a potential probiotic,*Lactobacilus rhamnosus* JCM 1136. *Veterinary Immunology and Immunopathology*. **102**: 379-388.
43. Panigrahi, A., Kiron, V., Puangkaew, J., Kobayashi, T., Statoh, S., and Sugita. H., 2005. The Viability of probiotic bacteria as a factor influencing the immune response in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Aquaculture*. **243**: 241-254.
44. Perdigon, G., Alvarez, S., Nader de Macias, M.E., Roux, M.E., and Ruiz Holgado, A.P., 1990. The oral administration of lactic acid bacteria increase the mucosal intestinal immunity in response of enteropathogens. *Journal of food Protection*. **53**: 404-410.
45. Raida, M.K., Larsen, J.L., Nielsen, M.E., and Buchmann, K., 2003. Enhanced resistance of rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum), against *Yersinia ruckeri* challenge following oral administration of *Bacillus subtilis* and *B. licheniformis* (BioPlus2B). *Journal of Fish Diseases*. **26**: 495–498.
46. Reid, R.T., Live, D.H., Faulkner, D.J., and Butler, A., 1993. A siderophore from a marine bacterium with an exceptional ferric ion affinity constant. *Nature*. **366**: 455–458.
47. Rengpipat, S., Tunyamum, A., Fast, A.W., Piyatiratitivoraku, S., and Menasveta, P., 2003. Enhanced growth and resistance to vibrio challenge in pond-reared black tiger shrimp *penaeus monodon* fed a Bacillus probiotic. *Diseases of Aquatic Organisms*. **55**: 169-173.
48. Robertson, P.A.W., O'Dowd, C., Burrells, C., Williams, P., and Austin, B., 2000. Use carnobacterium sp. as probiotic for Atlantic salmon (*Salmo salar L*) and rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*, Walbaum). *Aquaculture*. **185**: 235-243.
49. Robredo, B., Singh, K.V., Baquero, R., Murray, B.E., and Torres, C., 2000. Vancomycin-resistant enterococci isolated from animals and food. *International Journal of Food Microbiology*. **54**: 197–204.
50. Rorvik, K.A. Salte, R. Bentsen, H.B. and Thomassen, M. 1991. Effects of dietary iron and n-3 unsaturated fatty acids (omega-3) on health and immunological parameters in farmed salmon. *In* Proceedings of the Fifth International Conference of the European Association of Fish Pathologists. European Association of Fish Pathologists, Budapest, Hungary. P: 86.
51. Saarela, M., Mogensen, G., Fonden, R., Matto, J., and Mattila-Sadholm, T., 2000. Probiotics bacteria: safety, functional and technological properties. *Journal of Biotechnology*. **84**: 197-215.
52. Sanders, M.E., Morelli, L., and Tompkins, T.A., 2003. Sporeformers as Human Probiotics: Bacillus, Sporolactobacillus, and Brevobacillus. *Comprehensive reviews in food science and food safety*. Vol: 2, Pp: 101-110
53. Schiffrin, E.J., Brassart, D., Servin, A.L., Rochat, F., and Donnet-Hughes, A., 1997. Immune modulation of blood leucocytes in humans by lactic acid bacteria: Criteria for strain selection. *American Journal of Clinical Nutrition*. **66(2)**: 515S–520S.
54. Siwicki, A.K., and Dunier, M., 1993. Quantification of antibody secreting cells to *Yersinia ruckeri* ELISPOT assay after in vivo and in vitro immunization of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Veterinary Immunology and Immunopathology*. **37**: 73–80.
55. Tang, F., Zhu, X., Long, H., and Zeng, Y., 1998. The role of Aeromonas hydrophila protease in the utilization of fish serum iron in

Archive of SID
www.SID.ir

vitro. *Asian fisheries science*. Vol: 10. No: 4. Pp: 317-321.

56. Verschuere, L., Rombout, G., Sorgeloos, P., and Verstraete, W., 2000. Probiotic Bacteria as Biological Control Agents in Aquaculture. *Microbiology And Molecular Biology Reviews*. **64(4)**: 655-671.
57. Weinberg, E.D., 1978. Iron and infection. *Microbiology Reviews*. **42**: 45-66.
58. Wooldridge, K.G., and Williams, P.H., 1993. Iron uptake mechanisms of pathogenic bacteria. *FEMS Microbiology Reviewes*. **12**: 325–348.

The effect of *Bacillus subtilis* and *B. licheniformis* as probiotic bacteria and ferrous Sulfate on some blood parameters of Rainbow Trout (*Oncorhynchus mykiss*) larvae during incubation period

Naseri S.[1], Khara H.[1], and Shakoori M.[2]

[1] **Young Researchers Club of Islamic Azad University branch of Lahijan, Iran**

[2] **Young Researchers Club of Islamic Azad University branch of Ghaemshahr, Iran**

Abstract

To investigate the effects of probiotic (BioPlus 2B) (including *Bacillus subtilis* and *B. licheniformis*) and iron ($Fe(So_4)_2(7H_2O)$) supplementation on rainbow larvae blood, a 60 day feeding experiment was conducted. 2700 larvae (average weight 0.135±0.01 gr) were selected and as a treatments aith 3 replications. The application of probiotic and iron suplements were considered as: T_1: Probiotic: 1.6×10^9 CFU(Colony Forming Unit)/g; T_2: Probiotic: 1.2×10^9 CFU/g; T_3: Iron: 7mg/kg; T_4: Iron: 5mg/kg; T_5: Probiotic: 1.6×10^9 CFU/g with Iron: 7mg/kg; T_6: Probiotic: 1.6×10^9 CFU/g with Iron: 5mg/kg; T_7: Probiotic: 1.2×10^9 CFU/g with Iron: 7mg/kg, T_8: Probiotic: 1.2×10^9 CFU/g with Iron: 5mg/kg; and T_9: control treatment (without supplementation with probiotic and iron). At the end of experiment, The highest levels of IgM and WBC were obtained of T_1 and T_2 ($P\leq0.05$). T_8 and T_7 showed the highest levels of iron, ferritin and transferrin ($P\leq0.05$). Our findings support that if probiotic just added to feed, IgM levels and WBC of trout larvae would be increased. Whiles administration of both probiotic and iron will be increased iron, ferritin and transferrin levels in blood serum.

Keywords: Probiotic, BioPlus 2B, Rainbow trout, Immunoglobulin M, Transferrin

Archive of SID

www.SID.ir