فصلنامه علمی پژوهشی فیزیولوژی و تکوین جانوری
شماره پیاپی ۴۴، جلد ۱۲، شماره ۱، زمستان ۹۷، صفحه ۲۵ تا ۳۴
Qjaphd.sinaweb.net ISSN: ۱۷۳۵-۹۸۸۰

# تأثیر استفاده مجزا و تلفیقی پروبیوتیک *Pediococcus acidilactici* و پربیوتیک *Raffinos* بر شاخص‌های ایمنی موکوس و هیستو مورفولوژی روده در ماهیان طلایی(*Carassius auratus*)

**دل‌آرا سپهرفر**[۱]، سید حسین حسینی فر[۲]، علی جافرنوده[۳]
۱-دانش آموخته کارشناسی ارشد، گروه شیلات، دانشکده منابع طبیعی، دانشگاه ارومیه.ارومیه. ایران.**Delara.sepehrfar@gmail.com**
۲-دانشیار، گروه شیلات، دانشکده منابع طبیعی، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان. گرگان.ایران.
۳-دکترای شیلات، دانشکده شیلات و محیط زیست، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان.گرگان. ایران.

**تاریخ دریافت: ۹۷/۷/۹ تاریخ پذیرش:۹۷/۸/۲۰**

## چکیده

**زمینه و هدف: موکوس و ترکیبات آن، اولین خط دفاعی در برابر پاتوژن‌ها و یکی از بخش‌های مهم سیستم ایمنی در ماهیان است. این تحقیق با هدف بررسی اثرات مجزا و تلفیقی پروبیوتیک *Pediococcus acidilactici* و پربیوتیک *Raffinos* درجیره غذایی بر شاخص‌های ایمنی موکوس و هیستو مورفولوژی روده در ماهی طلایی(*Carassius auratus*) انجام گرفت.**

**روش کار:۱۸۰ قطعه ماهی با میانگین وزنی ۰/۱۸± ۲۶/۳ گرم، پس از ۲ هفته سازگاری با شرایط آزمایشگاه در ٤ تیمار و ۳ تکرار شامل: جیره تجاری(گروه شاهد)، غذای تجاری مکمل شده به *P. acidilactici* به میزان ۰/۹ گرم بر کیلوگرم(تیمار ۲)، غذای حاوی *Raffinos* به میزان ۱۰ گرم بر کیلوگرم(تیمار ۳) و غذای تجاری حاوی ترکیبی از پروبیوتیک و پربیوتیک به میزان ۰/۹ و ۱۰ گرم بر کیلوگرم(تیمار ٤) به‌طور تصادفی تقسیم شدند. در پایان دوره آزمایش(٦۰ روز)، سنجش آنزیم لیزوزیم به روش کدورت سنجی با دستگاه اسپکتروفتومتر و ایمونوگلبولین کـل از طریق سنجش میزان پروتئین سرم قبل و بعد از افزودن پلی‌اتیلن گلیکول به نمونه و میزان آنزیم آلکالین فسفاتاز قلیایی موکوس به وسیله کیت‌های شرکت پارس آزمون و با دستگاه اسپکتروفتومتر محاسبه گردید، هم چنین آزمایشات هیستو مورفولوژی روده به روش بافت‌شناسی کلاسیک و رنگ‌آمیزی هماتوکسیلین- ائوزین انجام شد.**

**یافته‌ها: نتایج حاصل هیچ‌گونه اختلاف معنی‌داری در ارتفاع و قطر ویلی‌ها نشان نداد(P>۰/۰۵). بیشترین میزان فعالیت آنزیم لیزوزیم موکوس، ایمونوگلوبولین، پروتئین محلول و آلکالین فسفاتاز در تیمار سین بیوتیک مشاهده شد با این حال در تیمارهای مختلف این اختلاف معنی‌دار نبود (P>۰/۰۵).**

**نتیجه‌گیری: غذای تجاری غنی‌شده با سین‌بیوتیک موجب بهبود شاخص‌های ایمنی موکوس و هیستو مورفولوژی روده در ماهیان طلایی بود.**

**واژه‌های کلیدی:** .ایمنی موکوسی، ماهی طلایی، هیستو مورفولوژی.

## مقدمه

طی سال‌های اخیر استفاده از محرک‌های سیستم ایمنی در صنعت آبزی‌پروری رواج یافته است. این مواد با ایجاد مقاومت در برابر عوامل بیماری‌زا از گسترش بیماری جلوگیری می‌کنند و موجب افزایش کارایی ضریب تبدیل غذایی می‌گردند(۱۳). از مکمل‌های غذایی مورد استفاده برای افزایش ایمنی می‌توان به پروبیوتیک‌ها، پربیوتیک‌ها و سین‌بیوتیک‌ها به‌عنوان جایگزینی برای آنتی‌بیوتیک‌ها اشاره نمود. پروبیوتیک‌ها ارگانیسم‌هایی هستند که می‌توانند اثرات مفیدی بر سلامت میزبان داشته باشند(۱۶)، پربیوتیک‌ها اجزاء غذایی غیرقابل‌هضمی هستند که موجب افزایش رشد و تعداد باکتری‌های مفید روده‌ای می‌شوند و سین‌بیوتیک‌ها

www.SID.ir

(ترکیب پروبیوتیک‌ها و پریبیوتیک‌ها) می‌تواند نمایش‌گر اثرات تکمیلی پروبیوتیک و پریبیوتیک باشد. پروبیوتیک *Pediococcus acidilactici* با تخمیر پریبیوتیک *Raffinos* به‌عنوان سوبسترا در روده باعث افزایش انرژی و رشد این باکتری می‌شود که اثرات مفیدی روی تعادل میکروبی روده و جلوگیری از ایجاد کلنی باکتری‌های بیماری‌زا دارد. این باکتری‌ها با ترشح موادی، نه‌تنها موجب تحریک سیستم ایمنی شده بلکه میزان مقاومت در برابر عوامل بیماری‌زا نیز افزایش می‌دهد(۶). پروبیوتیک‌ها با افزایش سلامت و حذف باکتری‌های بیماری‌زا نقش بسیار مهمی را در ترکیب میکروبیوتای روده‌ای نشان می‌دهد. رقابت بر سر مکان اتصال در روده ماهیان، موجب مکانیسم آنتاگونیستی پروبیوتیک‌ها علیه کلنی باکتری‌های بیماری‌زا می‌باشد(۳۹). به علت این که گونه‌های پروبیوتیکی عمدتاً توانایی حفظ غالبیت خود را در روده ندارند(۳۵، ۳۲، ۲۷)، به‌طور هم‌زمان از پریبیوتیک‌های مناسب به عنوان سوبسترا استفاده می‌کنیم(۳۵). تاکنون از پروبیوتیک *Pediococcus acidilactici* برای ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان(۲۲)، تیلاپیای نیل(۱۰) و توربوت(۴۰)استفاده شده است و اثرات سودمندی بر شاخص‌های ایمنی غیراختصاصی، میکروبیوتای روده‌ای و مقاومت این گونه‌ها در برابر عوامل بیماری‌زا گزارش شده است. طی سال‌های اخیر با وجود رشد و توسعه فراوان صنعت آبزی‌پروری(۹)، برای موفقیت در شناخت درست از بیولوژی مزارع، کنترل تولیدمثل و بهبود کیفیت جیره، مطالعات کاربردی در زمینه‌های مختلف انجام می‌شود(۱۲). ایمنی در آبزیان شامل ایمنی ذاتی و اکتسابی است. پاسخ اولیه به هجوم عوامل بیماری‌زا، دفاع اولیه است که اجزای کلیدی آن شامل لایه موکوس روی پوست، آبشش ها و مجرای معده روده‌ای و اجزای تشکیل‌دهنده خون شامل سلول‌های کشنده طبیعی و فاگوسیت ها می‌باشد(۳). شرایط غذایی و میکروبی مناسب، می‌تواند موجب سازگاری اکولوژیکی و سلامت آبزی و کاهش تلفات طی دوره پرورش گردد(۳۰). اولین خط دفاعی بدن در برابر عوامل بیماری‌زا، موکوس ترشح شده بر روی پوست است زیرا عامل پاتوژن در ابتدا روی سطح قرار می‌گیرد(۲۱). هم چنین آنزیم لیزوزیم در موکوس ماهی به عنوان یک مکانیسم دفاعی مهم در برابر باکتری‌های بیماری‌زا مطرح است که سطح فعالیتش وابسته به گونه ماهی و شرایط محیطی متفاوت است(۲۵)، به‌علاوه آنزیم آلکالین فسفاتاز و آنزیم لیزوزیم جزو آنزیم‌های مهم مرتبط با سیستم ایمنی ذاتی در ماهیان است و بسته به گونه ماهی به‌کار رفته تفاوت قابل توجهی در میزان فعالیت آنزیم‌ها مشاهده می‌گردد. از طرفی سطح روده دارای پرزهای فراوانی است که سطح جذب روده‌ای را تا چندین برابر افزایش داده و به حرکت غذا در روده کمک می‌کند(۱۸) و با توجه به نقش مؤثر پرزها در گوارش و جذب مواد مغذی، بررسی روند تغییرات دستگاه گوارش و غدد ضمیمه در قسمت روده دارای اهمیت خاصی است. از عوامل مؤثر بر مورفولوژی روده می‌توان نوع رژیم غذایی، دفعات خوردن غذا، اندازه و شکل بدن را نام برد(۸). استفاده از مکمل‌های غذایی علاوه بر افزایش رشد و کارایی مصرف جیره موجب تحریک و بهبود سیستم ایمنی می‌گردند و به عنوان جای‌گزینی برای آنتی‌بیوتیک‌ها مطرح هستند(۳۱). ایمنی یکی از مهم‌ترین مکانیسم‌های فیزیولوژیک برای مقابله با عوامل بیماری‌زا و حفظ هموستازی بدن است و یکی از بخش‌های مهم سیستم ایمنی غیراختصاصی در ماهیان ایمنی موکوسی می باشد. از اجزای موکوس که در افزایش فعالیت سیستم ایمنی نقش دارند می‌توان به لیزوزیم، ایمونوگلوبولین ها، پروتئین‌های کمپلمان، آلکالین فسفاتاز، لکتین ها، آنزیم‌های پروتئولیتیک، پروتئین واکنش دهنده C و سایر پروتئین‌های آنتی

Archive of SID

www.SID.ir

باکتریال اشاره نمود(۳۸). لیزوزیم یکی از مهم‌ترین فاکتورهای ایمنی است که می‌تواند بر ضد باکتری‌های گرم مثبت و گرم منفی مورد استفاده قرار گیرد. ایمونوگلوبین ها جزو آنتی بادی‌های طبیعی بوده و یکی از بخش‌های حیانی سیستم ایمنی غیراختصاصی ماهیان هستند(۲۳)، هم چنین آنزیم آلکالین فسفاتاز به دلیل فعالیت هیدرولیتیکی، به عنوان یک عامل ضد باکتریایی در بهبود زخم و عفونت‌های انگلی نقش محافظتی دارد(۳۸). بر این اساس هدف از مطالعه حاضر، ارزیابی به کارگیری اثرات مجزا و تلفیقی پروبیوتیک *Pediococcus acidilactici* و پربیوتیک *Raffinos* بر شاخص‌های ایمنی موکوس و هیستومورفولوژی روده در ماهیان طلایی است.

## مواد و روش ها

این پژوهش به مدت ۹۰ روز در مرکز تحقیقات آبزی‌پروری شهید فضلی دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان صورت گرفت. بدین منظور ماهیان طلایی با میانگین وزنی ۰/۱۸± ۲۶/۳ گرم پس از یک دوره ده روزه آداپتاسیون، به تعداد ۱۵ عدد در ۱۲ تانک فایبرگلاس ۴۰۰ لیتری با حجم آبگیری ۱۰۰ لیتر نگهداری شدند.

### تهیه غذا و غذادهی

در این آزمایش از غذای تجاری ماهی کپور(شرکت فرادانه) استفاده شد(ترکیب جیره غذایی در شکل ۱ نشان داده شده است) و برای تیمارهای آزمایش، پروبیوتیک *P. acidilactici* و پربیوتیک *Raffinos* ابتداتوزین سپس در محلول ژلاتین ۴ درصد حل گردید و به غذای تجاری کپور اسپری (۱)، سپس در مجاورت هوا خشک شده و در زیپ کیپ پلاستیکی در یخچال نگهداری شد.

### تیمارهای آزمایش شامل

تیمار اول(شاهد) فقط با غذای تجاری و مابقی تیمارها با غذای تجاری مکمل شده به پروبیوتیک *P. acidilactici* و پربیوتیک *Raffinos* به ترتیب حاوی، تیمار دوم(۰/۹ گرم بر کیلوگرم پروبیوتیک)، تیمار سوم(۱۰ گرم بر کیلوگرم پربیوتیک)، تیمار چهارم(۰/۹ گرم بر کیلوگرم پروبیوتیک و ۱۰ گرم بر کیلوگرم پربیوتیک) بود(۲). غذای مورد نیاز هر تانک با توجه به نتایج به دست آمده از زیست‌سنجی هر تانک پرورشی محاسبه و تنظیم گردید. ماهیان روزانه در ۳ وعده غذادهی شدند(ساعت ۸ صبح، ۱۲ ظهر و ۴ بعدازظهر)، میزان غذادهی حدود ۳ درصد وزن بدن محاسبه شد.

### جمع‌آوری موکوس

در ابتدا ۲۴ ساعت قبل از نمونه‌برداری غذادهی قطع گردید. موکوس ماهیان با روش روس و همکاران(۳۴) از سطح اپیدرم ماهی جمع‌آوری شد. از هر تانک ۳ قطعه ماهی به‌صورت تصادفی نمونه‌برداری و پس از بیهوشی با ۱۰۰ میلی‌گرم در لیتر پودر گل میخک به‌صورت جداگانه درون کیسه‌های پلی‌اتیلنی(زیپ پلاست) حاوی ۲ میلی‌لیتر سدیم کلرید ۵۰ میلی مولار قرار گرفته و پس از ۲ دقیقه ماهی‌ها از کیسه‌ها خارج شدند. موکوس جمع‌آوری شده به لوله‌های فالکون استریل ۱۵ میلی‌لیتری منتقل، به مدت ۱۰ دقیقه در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد سانتریفیوژ شده و سوپرناتانت جهت بررسی‌های بیشتر به میکروتیوپ ۱/۵ سی‌سی منتقل گردید. نمونه‌ها تا زمان انجام آزمایش درون فریزر ۸۰- درجه سانتی‌گراد ذخیره شدند.

### سنجش فعالیت آنزیم لیزوزیم

سنجش آنزیم لیزوزیم به روش کدورت سنجی و با استفاده از دستگاه اسپکتروفتومتر انجام شد(۳۸). برای سنجش این آنزیم از باکتری *میکروکوکوس لوتئوس*(ATCC۴۶۹۸) به‌عنوان سوبسترا استفاده گردید. برای تهیه این سوسپانسیون، باکتری لیوفیلیزه *میکروکوکوس لوتئوس*(تهیه شده از سازمان پژوهش‌های علمی و صنعتی ایران، مرکز کلکسیون میکروارگانیسم‌های صنعتی، دانشگاه تهران) در بافر فسفات پتاسیم(pH=۷)، ۰/۴ مولار حل‌شده و جذب این

Archive of SID

www.SID.ir

محلول در مقابل شاهد(کووت حاوی بافر فسفات سدیم)، در طول‌موج ۴۵۰ نانومتر، برابر ۰/۷-۰/۶ تنظیم شد؛ سپس ۱۲۵۰ میکرولیتر سوسپانسیون باکتری و ۲۵۰ میکرولیتر نمونه موکوس به کووت اضافه و مخلوط گردید، کاهش جذب به مدت ۱۰ دقیقه در طول‌موج ۴۵۰ نانومتر ثبت شد. یک واحد فعالیت آنزیم، به‌صورت مقدار آنزیمی که در طول‌موج ۴۵۰ نانومتر و دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد کاهشی معادل ۰/۰۰۱ در دقیقه در جذب سلول‌های *میکروکوکوس لوتئوس* ایجاد می‌کند، بیان گردید.

**اندازه‌گیری ایمونوگلوبولین کل و فعالیت آنزیم آلکالین فسفاتاز قلیایی**

جهت اندازه‌گیری ایمونوگلبولین کل از روش Siwicki استفاده شد(۳۷). میزان پروتئین سرم تعیین‌شده و سپس به نمونه موکوس پلی‌اتیلن گلیکول ۱۲ درصد اضافه و پس از ۲ ساعت در دمای اتاق نمونه‌ها سانتریفیوژ شده و غلظت پروتئین در قسمت بالایی محلول مجدداً توسط روش بردفورد اندازه‌گیری گردید(۱۹). میزان ایمونوگلوبولین کل از تفریق غلظت پروتئین در نمونه اولیه و غلظت پروتئین پس از افزودن پلی‌اتیلن گلیکول محاسبه شد. سطح آنزیم آلکالین فسفاتاز قلیایی موکوس با استفاده از کیت‌های تولید شده توسط شرکت پارس آزمون و دستگاه اسپکتروفتومتر در طول موج ۴۰۵ نانومتر و اختلاف جذب نوری در مدت ۳ دقیقه تعیین گردید.

**نمونه‌برداری بافت**

۲۴ ساعت قبل از انجام نمونه‌برداری، غذادهی ماهیان قطع گردید. تمامی وسایل موردنیاز استریل شده، سپس به‌طور تصادفی از هر مخزن سه ماهی برداشته و با استفاده از گل میخک(غلظت ۱۰۰ میلی‌گرم به ازای هر لیتر آب)، ماهی بی‌هوش گردید. نهایتاً با یک شکاف سرتاسری در شکم از روده نمونه‌برداری شد، یک‌سوم انتهایی روده برای آزمایش‌های هیستومورفولوژی جدا شده و پس از خالی نمودن محتویات روده با پنس به ویال‌های ۱/۵ سی‌سی حاوی فرمالین ۱۰ درصد فیکس گردید و سپس به منظور برش و رنگ‌آمیزی به آزمایشگاه منتقل شد.

**بررسی هیستومورفولوژی روده**

آماده‌سازی بافت‌های روده به روش بافت‌شناسی کلاسیک و رنگ‌آمیزی هماتوکسیلین- ائوزین انجام شد. پس از آماده‌سازی، از لام‌ها عکس‌برداری و ارتفاع و ضخامت پرزهای روده با استفاده از نرم‌افزار Microstructure Mesurment اندازه‌گیری گردید.

**تحلیل آماری**

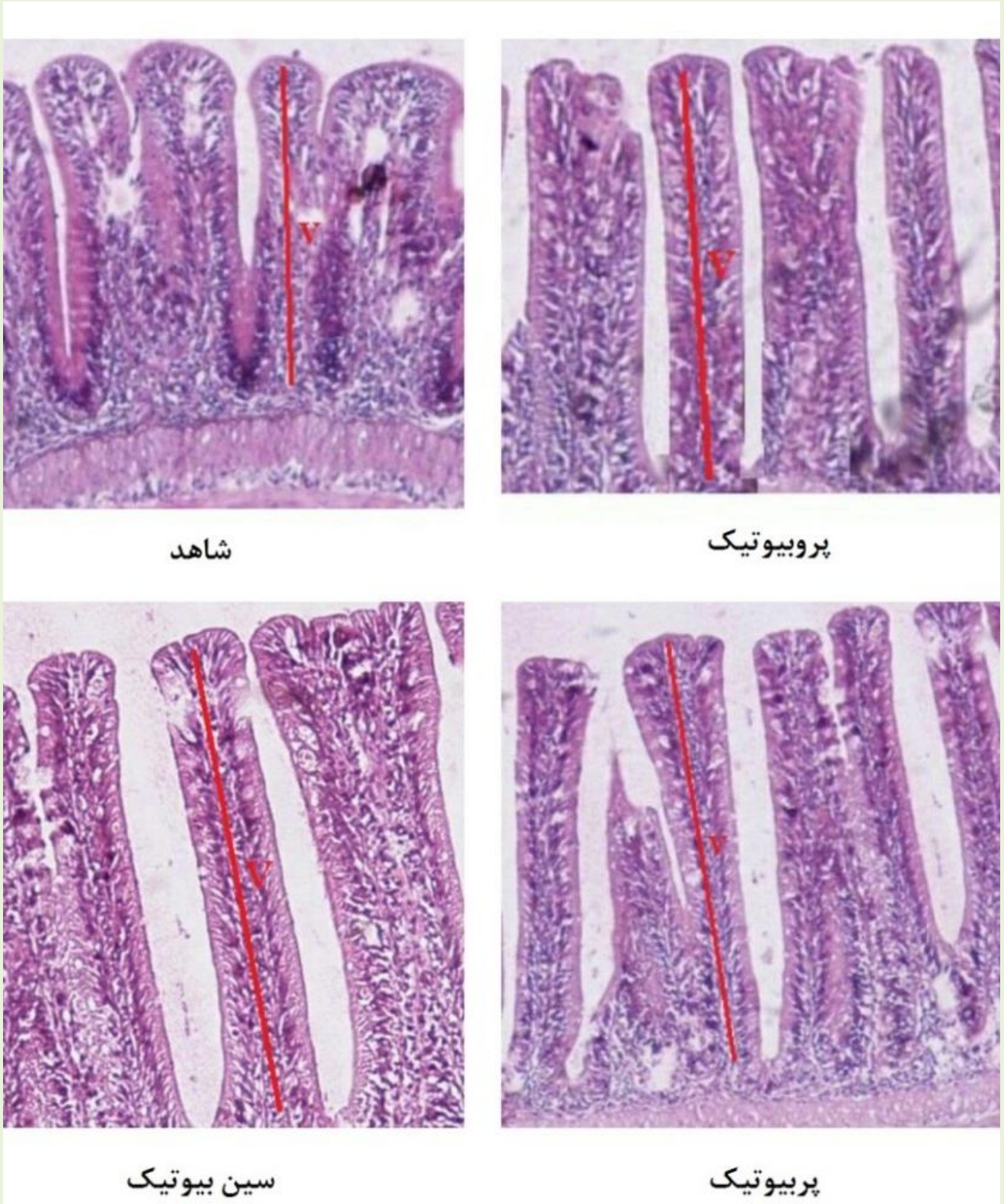
پس از ثبت داده‌ها با استفاده از آنالیز واریانس یک‌طرفه(ANOVA) و آزمون چند دامنه‌ای دانکن، از طریق نرم‌افزار SPSS نسخه ۱۶ آنالیز آماری انجام شد و با نرم‌افزار Excel۲۰۱۳ شکل‌ها رسم گردید. تمام داده‌ها بر اساس انحراف معیار±میانگین، ارائه شدند.

## نتایج

نتایج بررسی‌های بافت‌شناسی و اندازه‌گیری طول و قطر پرزهای روده با استفاده از نرم‌افزار Microstructure Mesurment در شکل ۱ و جدول ۲ نشان داده شده است. همان‌طور که در جدول ۲ مشاهده می‌گردد، افزودن مجزا و تلفیقی مکمل‌های غذایی پروبیوتیک *Pediococous acidilactici* و پریبیوتیک *Raffinos* هیچ‌گونه اختلاف آماری معنی‌داری بر شاخص‌های ایمنی موکوس و هیستو مورفولوژی روده مشاهده نشد($P>0/05$). با وجود افزایش ارتفاع و قطورتر بودن پرزها در تیمار سین بیوتیک، اختلاف آماری معنی‌داری بین تیمارها مشاهده نشد($P>0/05$). هم چنین بیشترین میزان فعالیت آنزیم لیزوزیم موکوس، میزان ایمونوگلوبولین، میزان پروتئین محلول و میزان فعالیت آنزیم آلکالین فسفاتاز قلیایی موکوس در تیمار سین-بیوتیک مشاهده شد، ولی اختلاف معنی‌داری بین تیمارها مشاهده نشد($P>0/05$).

Archive of SID

www.SID.ir




**شکل ۱- نمونه‌ای از مقاطع بافت‌شناسی روده ماهیان طلایی در هر یک از تیمارهای آزمایشی به روش کلاسیک و رنگ‌آمیزی هماتوکسیلین-ائوزین (بزرگنمایی ۱۰). (V: پرز).**

www.SID.ir

**جدول ۱- ترکیب و درصد اجزاء جیره تجاری مورد استفاده در تغذیه در ماهی طلایی (*Carassiusauratus*)**

| اجزای جیره | پروتئین خام | چربی خام | فیبر خام | خاکستر | رطوبت | فسفر کل |
|---|---|---|---|---|---|---|
| درصد اجزاء جیره (٪) | ۳۵-۳۸ | ۴-۸ | ۴-۷ | ۷-۱۱ | ۵-۱۱ | ۱-۱/۵ |

**جدول ۲- مقایسه شاخص‌های ایمنی موکوس و هیستومورفولوژی روده ماهیان طلایی**

| موکوس و بافت | شاهد | پروبیوتیک | پربیوتیک | سین بیوتیک |
|---|---|---|---|---|
| فعالیت آنزیم لیزوزیم (واحد به ازای میلی‌گرم پروتئین) | ۲۰/۳۰±۵/۰۳[a] | ۲۳/۶۳±۱/۹۵[a] | ۲۰/۶۶±۷/۱۶[a] | ۲۴/۳۰±۲/۳۶[a] |
| ایمونوگلوبولین کل(میلی‌گرم به ازای میلی‌لیتر) | ۱۷/۲۱±۰/۶۰[a] | ۱۷/۴۸±۰/۶۴[a] | ۱۷/۳۴±۰/۶۹[a] | ۱۸/۱۳±۰/۴۴[a] |
| پروتئین محلول(واحد به ازای میلی‌گرم پروتئین) | ۶/۱۱±۰/۳۸[a] | ۶/۰۶±۰/۷۷[a] | ۷/۲۸±۰/۴۴[a] | ۷/۷۵±۰/۳۲[a] |
| آنزیم آلکالین فسفاتاز(واحد بین‌المللی به ازای لیتر) | ۴۱/۳۵±۸/۲۷[a] | ۴۱/۷۴±۱۴/۰۶[a] | ۴۵/۹۵±۱۶/۸۴[a] | ۵۵/۷۵±۸/۰۳[a] |
| ارتفاع پرز(میکرومتر) | ۱۳۳/۲۷±۷/۳۸[a] | ۱۳۶/۲۷±۱۳/۰۵[a] | ۱۳۲/۴۸±۱۱/۰۵[a] | ۱۴۱/۵۴±۱۴/۸۱[a] |
| قطر پرز(میکرومتر) | ۲۲/۵۷±۷/۲۴[a] | ۲۰/۶۳±۶/۳۶[a] | ۲۲/۳۷±۵/۱۴[a] | ۲۵/۶۸±۵/۹۹[a] |

حروف مشابه در یک ردیف نشان‌دهنده عدم وجود اختلاف معنی‌دار می‌باشد (P>۰/۰۵)

## بحث و نتیجه گیری

در تحقیق Roosta و Hosseinifar نتایج تجزیه و تحلیل داده‌ها نشان داد که افزایش میزان فعالیت آنزیم لیزوزیم موکوس، سطح ایمونوگلوبولین موکوس، میزان پروتئین محلول و فعالیت آلکالین فسفاتاز در تیمار سین-بیوتیک از یک افزایش نسبی برخوردار است هرچند که این اختلاف معنی‌دار نبود(P>۰/۰۵)(۳۳). هم چنین sheikhzadeh و همکاران (۲۰۱۲) نشان دادند استفاده از قارچ ساکارومایسس سروزیا به عنوان پروبیوتیک در جیره غذایی ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان باعث افزایش معنی‌دار فعالیت ضد باکتریایی موکوس آن می‌گردد(۳۶). Panigrahi و همکاران(۲۰۰۴) نیز با استفاده از پروبیوتیک *Lactobacillus rhamnosus* در جیره ماهی قزل‌آلا افزایش معنی‌داری در فعالیت لیزوزیم سرم و فعالیت فاگوسیتیک بین تیمارهای حاوی پروبیوتیک در مقایسه با تیمار شاهد مشاهده کردند(۲۶). هم چنین در مطالعات گذشته اثرات مثبت گونه‌های مختلف *Lactobacillus* به عنوان پروبیوتیک بر عملکرد رشد و سیستم ایمنی در بأس دریایی(۴)و تیلاپیای هیبریدی(۱۵) بررسی گردید. در تحقیق حاضر نیز افزایش میزان فعالیت آنزیم لیزوزیم موکوس، سطح ایمونوگلوبولین موکوس، میزان پروتئین محلول و فعالیت آلکالین فسفاتاز در تیمار سین بیوتیک نشان‌دهنده اثرات مثبت استفاده تلفیقی پروبیوتیک *Pediococous acidilactici* و پربیوتیک *Raffinos* بود. به نظر می‌رسد استفاده از پروبیوتیک و پربیوتیک در جیره می‌تواند از طریق متعادل کردن فعالیت بافت‌های لنفوییدی در ارتباط با دستگاه گوارش، باعث بهبود کلی سیستم ایمنی میزبان گردد(۱۷). هرچند عوامل مختلف ازجمله جنس و گونه ماهی، طول دوره پرورش، نوع پروبیوتیک و پربیوتیک مورد استفاده و غلظت‌های آن می‌تواند در عملکرد بهینه این تاثیرگذاری مؤثر باشد، کما این که احتمالاً در پژوهش حاضر این عوامل در معنی‌دار نبودن شاخص‌های ایمنی موکوسی در تیمارهای مختلف می‌تواند نقش داشته باشد. بررسی وضعیت فیزیولوژیک روده به عنوان یکی از بخش‌های مهم دستگاه گوارش، به‌خصوص قطر و ارتفاع ویلی از شاخص‌های مهم بر کارایی استفاده از جیره غذایی مصرفی است به‌گونه‌ای که افزایش قطر و ارتفاع ویلی نمایانگر افزایش سطح جذب در روده می باشد. همان‌طور که در بخش نتایج حاصل از بررسی

Archive of SID

www.SID.ir

مقاطع بافت‌شناسی روده ماهیان طلایی نشان داده شد، ارتفاع و قطر ویلی‌ها در تیمار سین بیوتیک افزایش نسبی را نسبت به گروه شاهد نشان می‌دهد هرچند که این افزایش معنی‌دار نیست(P>۰/۰۵). Daniel و همکاران(۲۰۱۰) در پژوهشی اثرات سین بیوتیکی *Bacillus spp*؛ و مانان الیگوساکارید بر بافت روده در لارو لابستر اروپایی(*Homarus gammarus*) را بررسی کردند و نتایج حاکی از بهبود وضعیت بافت روده در تیمار سین‌بیوتیک، افزایش طول و تراکم ویلی و متعاقباً افزایش سطح جذبی روده بود(۵). هم چنین در مطالعه حسینی فر و همکاران افزایش رشد و کارایی جذب جیره در ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان تغذیه‌شده با ترکیب پروبیوتیک *Pediococcus acidilactici* و پربیوتیک-های الیگوساکاریدی، ناشی از افزایش طول ویلی‌ها گزارش شد(۱۴). در مطالعات دیگری در لارو ماهی هامور معمولی و لارو(*Pagellus erythrinus*) نشان داده شد که میزان پروتئین جیره غذایی به‌طورمعنی‌داری بر ارتفاع و قطر ویلی‌هاتأثیرگذار است(۲۴، ۱۱). در مطالعاتی که توسط Parracho و همکاران(۲۰۰۷) نشان داده شده است که پروبیوتیک با مصرف پربیوتیک باعث افزایش جذب مواد غذایی می‌شود و فلور میکروبی متعادل روده(پروبیوتیک) موجب افزایش در دسترس بودن مواد مغذی شده و آزاد شدن مواد مغذی بیشتر را به خون میسر می‌سازد(۲۹). با این حال مطالعات بیشتری برای ارزیابی توانایی‌های بالقوه پربیوتیک و باکتری‌های پروبیوتیک مانند لاکتوباسیلوس‌ها در افزایش آزادسازی مواد مغذی و طولانی‌تر شده فرآیند سیری مورد نیاز است(۲۰). از این نتایج می‌توان دریافت که پربیوتیک‌ها باعث تعادل فلور میکروبی روده میزبان، تخمیر و ایجاد متابولیت‌هایی مانند اسیدهای چرب کوتاه زنجیره می‌گردند(۷). عملکرد سین بیوتیک در افزایش طول و قطر پرزهای روده را به این شکل می‌توان توضیح داد که وجود پروبیوتیک و پربیوتیک درجیره به نظر می‌رسد سبب افزایش میزان تولید اسیدهای چرب کوتاه زنجیره در روده شده و این عامل باعث تأمین انرژی مورد نیاز سلول‌های اپتلیال روده می‌گردد(۲۸)، در ادامه، نتیجه تأمین نیاز انرژی باعث افزایش طول و قطر پرزها در روده می‌گردد. البته در پژوهش حاضر این روند افزایش طول و قطر پرز در تیمار سین‌بیوتیک قابل مشاهده است ولی به نظر می‌رسد اگر طول دوره پرورش افزایش پیدا می‌کرد و یا غلظت استفاده از پروبیوتیک و پربیوتیک تغییر می‌کرد، اختلاف معنی‌دار در تیمارهای آزمایش با گروه شاهد هم اتفاق می‌افتاد. با توجه به نتایج این مطالعه، هرچند استفاده ازتیمارهای مذکور تا حدی باعث بهبود شاخص‌های ایمنی موکوسی و شاخص‌های هیستو مورفولوژیکی روده شد، ولی این اختلاف معنی‌دار نبود. به نظر می‌رسد افزایش طول دوره پرورش و یا استفاده از غلظت‌های مختلف پروبیوتیک و پربیوتیک در این زمینه کارساز باشد درهرصورت انجام مطالعات بیشتر در این زمینه برای یک قضاوت درست‌تر دور از انتظار نیست.

پروبیوتیک *Pediococcus acidilactici* و پودر *Agaricus bisporus* بر شاخص‌های ایمنی موکوس و هیستومورفولوژی روده در بچه ماهیان کپور معمولی (*Cyprinuscarpio*). فصلنامه علمی پژوهشی فیزیولوژی و تکوین جانوری، شماره پیاپی ۴۱، جلد ۱۱، شماره ۲، صفحه ۲۷ تا ۳۶.

## منابع


۱-جافرنوده، ع. ۱۳۹۵. بررسی خواص سینرژیستی برخی اسیدهای آلی با پروبیوتیک لاکتوباسیلوس کازئی ( *Lactobacillus casei*) در پرورش بچه ماهیان انگشت قد قزل‌آلای رنگین‌کمان(*Oncorhynchus mykiss* ). رساله دکتری، دانشگاه ارومیه. ۱۵۰ صفحه.

۲-سپهرفر، د.، سروی مغانلو، ک.، حسینی س.ح.، پاک نژاد، ح.، جافرنوده، ع. ۱۳۹۷. تأثیر استفاده مجزا و تلفیقی


Archive of SID

www.SID.ir

**4.**Anbarasu, K., Chandran, M. (2001). Effect of ascorbic acid on the immune response of the catfish, Mystusgulio (Hamilton), to different bacterins of Aeromonas hydrophila. Fish & Shellfish Immunology, 11; 347-355.

4.Carnevali, O., de Vivo, L., Sulpizio, R., etal. (2006). Growth improvement by probiotic in European sea bass juveniles (Dicentrarchus labrax, L.), with particular attention to IGF-1, myostatin and cortisol gene expression. Aquaculture, 258; 430-438.

**5.**Daniels, C.L., Merrifield, D.L., Boothroyd, D.P ,.Davies, S.J., Factor, J.R., Arnold, K.E. (2010). Effect of dietary *Bacillus spp*. and mannan oligosaccharides (MOS) on European lobster (*Homarus gammarus* L.) larvae growth performance, gut morphology and gut microbiota. Aquaculture, 304; 49-57.

**6.**De Vrese, M., Schrezenmeir, J. (2008). Probiotics, prebiotics, and synbiotics. In: Food biotechnology.Springer, pp;1-66.

**7.**Dimitroglou, A., Merrifield, D.L., Carnevali, O., et al. (2011). Microbial manipulations to improve fish health and production–a Mediterranean perspective. Fish & Shellfish Immunology, 30; 1-16.

**8.**Domeneghini, C., Arrighi, S., Radaelli, G., Bosi, G., Mascarello, F. (1999). Morphological and histochemical peculiarities of the gut in the white sturgeon, *Acipenser transmontanus*. European Journal of Histochemistry: EJH, 43; 135-145.

**9.**FAO. (2014). Aquaculture department. The State of World Fisheries and Aquaculture Food and Agriculture Organization of the United Nations, Rome, p.; 243.

**10.**Ferguson, R., Merrifield, D.L., Harper, G.M. (2010). The effect of *Pediococcus acidilactici* on the gut microbiota and immune status of on-growing red tilapia (*Oreochromis niloticus*). Journal of Applied Microbiology, 109; 851-862.

**11.**Hamilton-Miller, J. (2004). Probiotics and prebiotics in the elderly. Postgraduate Medical Journal 80; 447-451.

**12.**Hoseinifar, S.H., Esteban, M.Á., Cuesta, A., Sun, Y.-Z. (2015) Prebiotics and fish immune response: a review of current knowledge and future perspectives. Reviews in Fisheries Science & Aquaculture, 23; 315-328.

**13.**Hoseinifar, S.H., Khalili, M., Rostami, H.K., Esteban, M.Á. (2013). Dietary galacto oligosaccharide affects intestinal microbiota, stress resistance, and performance of Caspian roach (*Rutilus rutilus*) fry. Fish & Shellfish Immunology, 35; 1416-1420.

**14.**Hoseinifar, S.H., Soleimani, N., Ringø, E. (2014). Effects of dietary fructo-oligosaccharide supplementation on the growth performance, haemato-immunological parameters, gut microbiota and stress resistance of common carp (*Cyprinus carpio*) fry. British Journal of Nutrition, 112; 1296-1302.

**15.**Hussein, E.E.S., Dabrowski, K., El-Saidy, D.M.S.D., Lee, B.J. (2014). Effect of dietary phosphorus supplementation on utilization of algae in the grow-out diet of Nile tilapia *Oreochromis niloticus*. Aquaculture Research, 45;1533-1544.

**16.**Irianto, A., Austin, B. (2002). Use of probiotics to control furunculosis in rainbow trout, *Oncorhynchusmykiss* (Walbaum). Journal of Fish Diseases, 25; 333-342.

**17.**Kiron, V. (2012). Fish immune system and its nutritional modulation for preventive healthcare. Animal Feed Science and Technology, 173; 111-133.

**18.**Kozarić, Z., Kužir, S., Petrinec, Z., Gjurčević, E., Božić, M. (2008). The development of the digestive tract in larval European catfish (*Silurus glanis* L.). Anatomia, Histologia, Embryologia, 37; 141-1.

**19.**Kruger, N.J. (1994). The Bradford method for protein quantitation. Basic Protein And Peptide Protocols, 9-15.

**20.**Lahtinen, S.J., Forssten, S., Aakko, J. (2012). Probiotic cheese containing *Lactobacillus rhamnosus* HN001 and *Lactobacillus acidophilus* NCFM® modifies subpopulations of *Fecal lactobacilli* and *Clostridium difficile* in the elderly. Age, 34; 133-143.

**21.**McNeilly, T.N., Naylor, S.W., Mahajan, A. (2008). *Escherichia coli* O157: H7 colonization in cattle following systemic and mucosal immunization with purified H7 flagellin. Infection and Immunity, 76; 2594-2602.

**22.**Merrifield, D., Bradley, G., Harper, G., Baker, R., Munn, C., Davies, S. (2011). Assessment of the effects of vegetative and lyophilized *Pediococcus acidilactici* on growth, feed utilization, intestinal colonization and health parameters of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss* Walbaum). Aquaculture Nutrition, 17;73-79.

**23.**Nayak, S. (2010). Probiotics and immunity: a fish perspective. Fish & Shellfish Immunology, 29; 2-14.

**24.**Neira, F.J., Keane ,J.P., Lyle, J.M., Tracey, S.R. (2008). Development of eggs and larvae of *Emmelichthy snitidus* (Percoidei: Emmelichthyidae) in south-eastern Australia,

Archive of SID

www.SID.ir

including a temperature-dependent egg incubation model. Estuarine, Coastal and Shelf Science, 79; 35-44.

**25.**Ogawa, T., Ishii, C., Kagawa, D., Muramoto, K., Kamiya, H. (1999). Accelerated evolution in the protein-coding region of galectin cDNAs, congerin I and congerin II, from skin mucus of conger eel (*Conger myriaster*). Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry, 63; 1203-1208.

**26.**Panigrahi, A., Kiron, V., Kobayashi, T., Puangkaew, J., Satoh, S., Sugita, H. (2004) Immune responses in rainbow trout *Oncorhynchus mykiss* induced by a potential probiotic bacteria *Lactobacillusrhamnosus* JCM 1136. VeterinaryImmunology and Immunopathology, 102; 379-388.

**27.**Panigrahi, A., Kiron, V., Puangkaew, J., Kobayashi, T., Satoh, S., Sugita, H. (2005). The viability of probiotic bacteria as a factor influencing the immune response in rainbow trout *Oncorhynchu smykiss*. Aquaculture, 243(24); 251-254.

**28.**Papina, M., Meziane, T., Van Woesik, R. (2003). Symbiotic zooxanthellae provide the host-coral *Montipora digitata* with poly unsaturated fatty acids. Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology, 135; 533-537.

**29.**Parracho, H., McCartney, A.L., Gibson, G.R. (2007). Probiotics and prebiotics in infant nutrition. Proceedings of the Nutrition Society, 66; 405-411.

**30.**Ringø, E., Bendiksen, H., Gausen, S., Sundsfjord, A., Olsen, R. (1998). The effect of dietary fatty acids on lactic acid bacteria associated with the epithelial mucosa and from faecalia of Arctic Charr, *Salvelinus alpinus* (L.). Journal of Applied Microbiology, 85; 855-864.

**31.**Ringø, E., Dimitroglou, A., Hoseinifar, S.H., Davies, S.J. (2014). Prebiotics in finfish: an update. Aquaculture Nutrition: Gut Health, Probiotics and Prebiotics, 360-400.

**32.**Robertson, P., O'Dowd, C., Burrells, C., Williams, P., Austin, B. (2000). Use of *Carno bacterium* sp. as a probiotic for Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) and rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*, Walbaum). Aquaculture, 185; 235-243.

**33.**Roosta, Z., Hoseinifar, S.H. (2016). The effects of crowding stress on some epidermal mucus immune parameters, growth performance and survival rate of tiger barb (*Pentius tetrazona*). Aquaculture Research, 47; 1682-1686 .

**34.**Ross, N.W., Firth, K.J., Wang, A., Burka, J.F., Johnson, S.C. (2000). Changes in hydrolytic enzyme activities of naive *Atlantic salmon* Salmo salar skin mucus due to infection with the salmon louse Lepeophtheirus salmonis and cortisol implantation. Diseases of Aquatic Organisms, 41; 43-51.

**35.**Rurangwa, E., Laranja, J., Van Houdt, R. (2009). Selected nondigestible carbohydrates and prebiotics support the growth of probiotic fish bacteria mono-cultures in vitro. Journal of Applied Microbiology,106;932-940.

**36.**Sheikhzadeh, N., Heidarieh, M., Pashaki, A.K., Nofouzi, K., Farshbafi, M.A., Akbari, M. (2012). Hilyses®, fermented *Saccharomyces cerevisiae*, enhances the growth performance and skin non-specific immune parameters in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). Fish & Shellfish Immunology 32; 1083-1087.

**37.**Siwicki, A.a.A. (1993). Non specific defense mechanisms assay in fish. II. Potential killing activity of neutrophils and monocytes, lysozyme activity in serum and organs and total immunoglobulin (Ig) level in serum. Fish Diseases Diagnosis and Prevention Methods.

**38.**Subramanian, S., Ross, N., MacKinnon, S. (2008). Comparison of the biochemical composition of normal epidermal mucus and extruded slime of hagfish (*Myxine glutinosa* L.). Fish & Shellfish Immunology, 25; 625-632.

**39.**Verschuere, L., Rombaut, G., Sorgeloos, P., Verstraete, W. (2000). Probiotic bacteria as biological control agents in aquaculture. Microbiology and Molecular Biology Reviews, 64; 655-671.

**40.**Villamil, L., Figueras, A., Planas, M., Novoa, B. (2003). Control of vibrio alginolyticus in Artemia culture by treatment with bacterial probiotics. Aquaculture, 219; 43-56.

.

Archive of SID

www.SID.ir

# The Effects of Singular or Combined Administration of *Pediococcu sacidilactici* and *Raffinos*on Mucosal Immune Parameters and Intestinal Histomorphology of Gold Fish (*Carassiusa uratus*)

**D.Sepehrfar**[1],S.H.Hoseinifar[2], A. Jafarnodeh[3]

**1.**MSc student, Department of Fisheries, Faculty of natural resource, Urmia University, Urmia, Iran. **Delara.sepehrfar@gmail.com**

**2.**Assistant Professor, Department of Fisheries, Faculty of Fisheries and Environmental Sciences, Gorgan University ofAgricultural Sciences and Natural Resources, Gorgan, Iran.

**3.**Phd, Faculty of Fisheries and Environmental Sciences, Gorgan University of Agricultural Sciences and Natural Resources, Gorgan, Iran.

**Received:2018.1.10** **Accepted: 2018.11.11**

## Abstract

**Inroduction & Objective: Mucos and its compounds as the first line to defense against pathogens is one of the important part of the immune system in fish. This study was investigated the effect of singular or combined administration of *Pediococcusacidilactici* and *Raffinos*onmucosal immune parameters and intestinal histomorphology of gold fish (*Carassiusa uratus*).**

**Material and Methods: 180 gold fish, with average weight of 26.3±0.18 after two weeks of adaptation to laboratory condition In 4 treatments and each treatment with 3 replicates including: commercial diet (control group), commercial diet supplemented with0.9 g $kg^{-1}$*P. acidilactici,* 10 g $kg^{-1}$*Raffinos*or simultaneously supplemented with 0.9 g $kg^{-1}$*P. acidilactici*and 10 g $kg^{-1}$*Raffinos* accidentally divided. The trial lasted 60 days. At the end of the experiment, the lysozyme enzyme was measured by turbidation method using spectrophotometer and total immunoglobulin by measuring serum protein before and after adding polyethylene glycol to the sample and the amount of alkaline phosphatase enzyme using the kits produced by Pars Co. and using spectrophotometer, it was calculated. Histomorphologic tests of the intestine were done by classical histology and staining of hematoxylin-eosin.**

**Results: The results showed no significant difference in height and diameter of vili (P <0.05). The highest activity of mucosal lysozyme activity, immunoglobulin level, soluble protein and alkaline phosphatase were observed in synbiotic treatment, however, this difference was not significant in different treatments (P> 0.05).**

**Conclusion: In conclusion, the commercial diet supplemented with $0.9\times10^{7}$ CFU/g*P. acidilactici* and 10 g/kg *Raffinos*improvesmucusal immune para meter sand intestinal histo morphology of golden fish.**

**Keywords:** Golden fish, Histomorphology, Mucosal safety.



www.SID.ir