اثرات پروبیوآنزیم تغذیه‌ای بر شاخص‌های رشد، خون شناسی و پاسخ‌های ایمنی در ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان (*Oncorhynchus mykiss*)

- **ابوالحسن راستیان‌نسب**: گروه شیلات، دانشکده منابع طبیعی دریا، دانشگاه علوم و فنون دریایی خرمشهر، ایران
- **سیدمحمد موسوی***: گروه شیلات، دانشکده منابع طبیعی دریا، دانشگاه علوم و فنون دریایی خرمشهر، ایران
- **حسین ذوالقرنین**: گروه زیست شناسی دریا، دانشکده علوم دریایی و اقیانوسی، دانشگاه علوم و فنون دریایی خرمشهر، ایران
- **همایون حسین‌زاده‌صحافی**: موسسه تحقیقات علوم شیلاتی کشور، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، تهران، صندوق پستی: ٦١١٦- ١٤١٥٥

تاریخ دریافت: بهمن ۱۳۹۵ تاریخ پذیرش: اردیبهشت ۱۳۹٦

چکیده

با هدف بررسی تاثیر پروبیوآنزیم تغذیه‌ای بر شاخص‌های رشد ، خون‌شناسی و پاسخ‌های ایمنی در ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان تیمارهای ۱: گروه تغذیه شده با غذای بدون پروبیوآنزیم، ۲: گروه تغذیه شده با غذای حاوی ۰/۳ گرم پروبیوآنزیم در هر کیلوگرم غذا و ۳: گروه تغذیه شده با غذای حاوی ۰/۵ گرم پروبیوآنزیم در هر کیلوگرم غذا، با ۳ تکرار، طی مدت ٦۰ روز با هم مقایسه شدند. تعداد ۳۰ قطعه ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان با میانگین وزنی ۲/۷±۲٦/۳ گرم در هر یک از مخازن فایبرگلاس ۲۰۰ لیتری ذخیره‌سازی شدند. در انتهای دوره، شاخص‌های رشد، خون‌شناسی و پاسخ‌های ایمنی سنجش گردیدند. براساس نتایج، اختلاف معنی‌داری بین تیمارهای ۲و۳ با تیمار۱ در شاخص‌های رشد، تغذیه و شاخص‌های خونی گلبول قرمز مشاهده نشد (P>۰/۰۵). ولی میانگین تعداد گلبول‌های سفید و نیز درصد گلبول‌های نوتروفیل در تیمار ۳ با اختلاف معنی داری (P<۰/۰۵) بیش‌تر از گروه ماهیان شاهد بود. اجزای کمپلمان در سرم ماهیان تیمار۳ نسبت به تیمار شاهد با اختلاف معنی‌داری بیش‌تر بود (P<۰/۰۵). فعالیت راه میانبر کمپلمان و ایمنوگلوبولین (IgM) بین تیمارهای متفاوت، اختلاف معنی‌داری را نشان ندادند (P>۰/۰۵). میزان لایزوزیم و گلوبولین کل در ماهیان تیمار ۳ به‌طور معنی‌داری (P<۰/۰۵) در مقایسه با تیمار شاهد بیش‌تر بود. براساس نتایج، تاثیر قابل توجه پروبیوآنزیم بر شاخص‌های رشد و تغذیه مشاهده نگردید. با این وجود، براساس یافته‌ها می‌توان گفت پروبیوآنزیم مورد استفاده، دارای اثر ایمنی‌زایی در ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان می‌باشد.

کلمات کلیدی: قزل‌آلای رنگین‌کمان، پروبیوآنزیم، رشد، ایمنی

* پست الکترونیکی نویسنده مسئول: seied1356@yahoo.com

Archive of SID
www.SID.ir

مقدمه

کمبود منابع آبی و افزایش تقاضا برای آبزیان سبب شده است که پرورش انبوه و متراکم جایگزین روش‌های نیمه‌متراکم یا غیرمتراکم گردد (رحمتی‌اندانی و همکاران، ۱۳۸۹). در پرورش متراکم، استرس‌هایی مانند اختلالات فیزیکی، شیمیایی و زیستی به‌صورت طبیعی در محیط زیست ماهی رخ می‌دهد. این استرس‌ها امکان ابتلای ماهی به انواع بیماری‌ها را افزایش می‌دهد، به‌طوری‌که با توسعه این صنعت، بیماری‌های متعدد ویروسی و باکتریایی دامنگیر صنعت تکثیر و پرورش ماهی قزل‌آلا گردیده است (Soltani و همکاران، ۲۰۱۴). از این‌رو، پرورش ماهیانی با سیستم ایمنی فعال و دارای قدرت مقابله با بیماری‌ها و مقاوم در برابر شرایط نامساعد محیطی، از اهمیت بالایی برخوردار است (Kubulay و Ulukoy، ۲۰۰۷). روش اساسی در مدیریت بهداشتی آبزیان باید بیش‌تر بر اتخاذ تدابیر پیشگیرانه استوار باشد تا کنترل یا درمان بیماری‌ها، زیرا این راهبرد از نظر اقتصادی مقرون به‌صرفه‌تر است (علیشاهی، ۱۳۸۸). تمایل به مصرف ترکیباتی نظیر محرک‌های ایمنی، پروبیوتیک‌ها و پری‌بیوتیک‌ها و یا ترکیبات دوگانه (سین‌بیوتیک) حاوی این مواد و آنزیم‌ها نظیر پروبیوآنزیم‌ها در حال افزایش است (Ringo و همکاران، ۲۰۱۴). تا بتوان تولیدی پربازده و پایدارتر با استفاده از مواد طبیعی بدون استفاده از مواد شیمیایی عرضه نمود (Liu و همکاران، ۲۰۱۳). سیستم ایمنی اختصاصی در حیوانات خونسرد به‌ویژه ماهی‌ها، کم‌تر توسعه یافته و بیش‌تر ایمنی غیراختصاصی وظیفه دفاعی را به‌عهده گرفته است این وضعیت ویژه باعث اهمیت خاص محرک‌های ایمنی به‌دلیل خاصیت تحریک ایمنی غیراختصاصی در ماهی شده است (Iwama و Nakanishi، ۱۹۹۶). انواع متفاوتی از محرک‌های ایمنی مطالعه شده‌اند اما تعداد کمی از آن‌ها به‌منظور استفاده در آبزی‌پروری مناسب هستند (Raa و همکاران، ۲۰۱۴؛ Siwicki و همکاران، ۱۹۹۸) با این وجود، بررسی تاثیر پروبوآنزیم‌ها بر وضعیت عمومی و سیستم ایمنی ماهی با تاکید بر اثبات تاثیر این ماده بر شاخص‌های خونی و تولید مولکول‌های دفاع ایمنی از قبیل لیزوزیم، ایمنوگلبولین و عناصر سیستم کمپلمان اطلاعات مناسبی مبنی بر قابلیت این ترکیبات بر ایمنی‌زایی ماهی دارد.

بررسی‌ها نشان می‌دهد که مسیر آلترناتیو کمپلمان در پاسخ‌های ایمنی در ماهیان استخوانی از اهمیت قابل توجهی برخوردار است (Yano، ۱۹۹۶). در عفونت‌های باکتریایی، سیستم کمپلمان در اثر لیپوپلی ساکارید موجود در دیواره سلولی باکتری‌های بیماری‌زای گرم منفی فعال شده و با تولید کیموکین، ماکروفاژها و نوتروفیل‌های دارای گیرنده C3 را فعال نموده و با اتصال به باکتری‌ها عمل فاگوسیتوز را مهیا می‌سازد (Magnadottir و همکاران، ۲۰۰۵). لیزوزیم یک آنزیم فعال در تخریب باکتری‌ها در تمام نقاط بدن بوده و بخشی از سیستم دفاع غیراختصاصی جانوران محسوب می‌گردد. در آزادماهیان، لیزوزیم در سرم، ترشحات و لایه‌های موکوسی و بافت‌های غنی از گلبول‌های سفید به‌ویژه دستگاه گوارش و کلیه وجود دارد (Grinde و همکاران، ۱۹۸۸؛ Lie و همکاران، ۱۹۸۹). ظاهراً منبع اصلی تولید لیزوزیم مونوسیت‌ها و نوتروفیل‌ها می‌باشد. با این‌حال، بررسی‌ها وجود این آنزیم را در گرانول‌های گلبول‌های ائوزنوفیل دستگاه گوارش ثابت نموده است (Sveinbjornsson و همکاران، ۱۹۹۶). از آن‌جاکه مولکول‌های پادتن از دسته پروتئینی گلوبولین‌ها هستند و به‌خاطر نقش آن‌ها در ایمنی موجودات، به آن‌ها عموماً ایمنوگلوبولین می‌گویند. پیوند آنتی‌ژن خاص با پادتن باعث انسداد برخی فعالیت‌های مهم آنتی‌ژنی می‌شود و میزبان را در مقابل بیماری محافظت می‌کند (علیشاهی، ۱۳۸۸). پروبیوآنزیم‌ها ترکیبات دو بخشی بوده به‌طوری‌که، آنزیم‌ها عمل هضم را در معده و پروبیوتیک‌ها جذب غذا را در روده افزایش می‌دهد. بخش عمده ترکیبات آنزیمی پروبیوآنزیم، بر شکستن و هیدرولیز پلی‌ساکاریدها متمرکز است (Petterson، ۲۰۰۵). این آنزیم‌ها غالباً به‌وسیله باکتری‌ها و قارچ‌ها تولید می‌گردند (Bedford و Partridge، ۲۰۱۰).

با توجه به شیوع انواع بیماری‌ها، استفاده بی‌رویه از آنتی‌بیوتیک‌ها و مقاومت دارویی عوامل عفونی، مقاوم‌سازی گونه‌های پرورشی در مقابل عوامل عفونی از طریق محرک‌های ایمنی ضرورت داشته و در این راستا، اهداف مورد نظر در این پژوهش، تعیین اثرات پروبیوآنزیم به‌عنوان محرک ایمنی بر شاخص‌های تغذیه‌ای، رشد و شاخص‌های ایمنی در ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان بوده است.

مواد و روش‌ها

این تحقیق در مرکز تحقیقات ژنتیک و اصلاح نژاد ماهیان سردآبی شهید مطهری یاسوج در مخازن فایبرگلاس با گنجایش ۲۰۰ لیتر انجام شد. تأمین آب از طریق چشمه با میانگین دمای ۰/۷±۱۰/۵ درجه سانتی‌گراد با هوادهی به‌طور طبیعی و تعویض آب مخازن به صورت ثقلی به‌میزان ۰/۳ لیتر در ثانیه انجام شد. آزمایش در قالب طرح کاملاً تصادفی و در ۳ تیمار و هر تیمار با ۳ تکرار انجام شد. پروبیوآنزیم مورد استفاده براساس میزان توصیه شده شرکت سازنده محصول به غذا اضافه گردید. تیمار ۱(شاهد): گروه تغذیه شده با غذای بدون پروبیوآنزیم، تیمار ۲: گروه تغذیه شده با غذای حاوی ۰/۳ گرم پروبیوآنزیم در هر کیلوگرم غذا و تیمار ۳: گروه تغذیه شده با غذای حاوی ۰/۵ گرم پروبیوآنزیم در هر کیلوگرم غذا بود. به‌طور تصادفی تعداد ۳۰ عدد ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان (یزدی‌صمدی و همکاران، ۱۳۷۶) به‌عنوان نسل دوم حاصل از تخم‌های چشم‌زده وارداتی از

Archive of SID
www.SID.ir

کشور فرانسه، با میانگین وزنی ۲۶/۳±۲/۷ گرم در هر یک از مخازن فایبرگلاس ۲۰۰ لیتری ذخیره‌سازی شدند. به‌منظور سازش‌پذیری ماهی‌ها، کلیه تیمارها به‌مدت دو هفته با غذای تجاری تغذیه شده و در طول این مدت ماهی‌ها از نظر وضعیت ظاهری، شنای طبیعی و تلفات بررسی می‌شدند. هم‌چنین، فاکتورهای فیزیکی و شیمیایی آب شامل دمای آب، اکسیژن محلول و pH کنترل می شد.

تهیه غذای آزمایش: در این مطالعه از ترکیب پروبیوآنزیم حاوی باکتری‌های *Lactobacillus acidophilus*، *Entrococcus faecium*، *Bacillus lichenformis*، *Bacillus subtillis* و آنزیم‌های B-Glucanase ۳،۲،۱،۶، B-Glucanase 3.2.1.4، Alpha-Amylase 3.2.1.1، B-Xylanase 3.2.1.8، Protease و Cellulase به‌عنوان مکمل غذایی استفاده شده است. این محصول توسط شرکت XVET GmbH (آلمان) تولید و به سفارش سازمان دامپزشکی کشور توسط شرکت عرشیا دارو (تبریز) وارد می‌گردد. به‌منظور تهیه جیره‌های آزمایشی، غذای تجاری به‌صورت اکسترود (Extroded) از شرکت فرادانه تهیه شد (جدول ۱).

جدول ۱: آنالیز ترکیبات جیره غالب مورد استفاده در آزمایش

نوع غذا	ترکیبات (درصد)				
	اندازه (میلی‌متر)	پروتئین	چربی	کربوهیدرات	خاکستر
GFT1 (غذای‌رشد)	۴	۳۵	۱۶/۴۲	۳۰	۱۱/۲

مکمل به‌کمک محلول ژلاتین ۵ درصد با غذا مخلوط شد (Treves-Brown، ۲۰۰۰). برای این کار، ابتدا غذا با ترازوی دیجیتال با دقت یک صدم توزین شد و به نسبت وزن غذا برای سطوح مختلف، پروبیوآنزیم به‌صورت محلول درآب و ژلاتین درآمده و با اسپری یکنواخت با غذا مخلوط شد. سپس جیره‌های آماده شده در هوای محیط و با رعایت نکات بهداشتی خشک شدند و تا زمان مصرف به یخچال با دمای ۴ درجه سانتی‌گراد منتقل شدند. لازم به‌ذکر است به جیره تیمار ۱ (شاهد) نیز به‌میزان یکسان با تیمارها، محلول ژلاتین ۵ درصد اسپری شد. ماهیان در ابتدا و انتهای دوره و هم‌چنین در طول دوره آزمایش زیست‌سنجی می‌شدند. غذادهی در شروع تغذیه براساس ۳درصد وزن توده زنده ماهی در مخزن به‌صورت دستی انجام می‌شد. میزان غذای مورد نیاز هر روز به سه قسمت مساوی تقسیم می‌شد و سه بار در روز در ساعات ۸، ۱۱ و ۱۷ در اختیار ماهیان قرار می‌گرفت. دوره تغذیه و پرورش به‌مدت ۶۰ روز انجام شد.

زیست‌سنجی ماهیان: به‌منظور ارزیابی میزان رشد ماهیان تیمارهای مختلف در ابتدا و انتها و دو بار در طول دوره ۶۰ روزه پرورش، نسبت به اندازه‌گیری وزن ماهیان با ترازوی دیجیتال اقدام گردید. سنجش وزن ماهیان با نمونه‌برداری تصادفی و ۱۵عدد ماهی از تکرارهای مختلف هر تیمار پس از بی‌هوشی با محلول پودر میخک با غلظت ۲۰۰ppmزیست‌سنجی می شدند و داده‌های حاصل از اندازه گیری وزن ماهیان هر نمونه به‌منظور محاسبه میانگین وزن ماهیان و صفات رشد در هر تیمار ثبت می شدند (Ricker، ۱۹۷۹).

صفات مورد بررسی رشد: شاخص‌های رشد و تغذیه از طریق روابط زیر محاسبه گردید.

افزایش وزن بدن (گرم) = وزن نهایی(گرم) – وزن اولیه(گرم)

درصد افزایش وزن بدن=

[وزن نهایی بدن (گرم)–وزن اولیه بدن (گرم)] ×۱۰۰/ وزن اولیه بدن (گرم)

افزایش وزن روزانه (گرم) =

میانگین وزن نهایی بدن(گرم)- **میانگین وزن اولیه بدن(گرم)]/ طول دوره پرورش(روز)** (Ricker، ۱۹۷۹)

درصد نرخ رشد ویژه=

لگاریتم طبیعی وزن نهایی بدن(گرم)- لگاریتم طبیعی وزن اولیه بدن(گرم)]×۱۰۰/ طول دوره پرورش(روز) (Qinghui و همکاران، ۲۰۰۴)

شاخص کبدی= [وزن کبد(گرم) / وزن نهایی بدن(گرم)]×۱۰۰

نسبت تبدیل غذایی=میزان غذای داده شده (گرم)/ میانگین افزایش وزن بدن(گرم)

بازده تبدیل غذایی=میانگین افزایش وزن بدن(گرم) /میزان غذای داده شده (گرم) (Tacon، ۱۹۹۰)

ضریب کارایی پروتئین =

میزان افزایش وزن بدن (گرم)/مقدار پروتئین جیره غذایی خورده شده (گرم) (Ricker، ۱۹۷۹)

کل غذای مصرف شده=**کل وزن غذای خورده شده/تعداد ماهی در هر مخزن** (Tacon، ۱۹۹۰)

اندازه‌گیری شاخص‌های خون شناسی و شمارش گلبولی: اندازه‌گیری شاخص‌های خون‌شناسی آبزیان با اصلاحاتی از همان روش‌های معمول و متداول برای اندازه‌گیری شاخص‌های خون‌شناسی پستانداران استفاده می‌گردد (Feldman و همکاران، ۲۰۰۰). بدین منظور از هر تیمار ۶ عدد ماهی (۲ ماهی از هر تکرار) نمونه‌برداری شد (در مجموع ۱۸ عدد). ماهیان قبل از خون‌گیری توسط محلول پودر گل میخک (۲۰۰ppm) بی‌هوش می‌شدند. خون‌گیری با سرنگ ۵ سی‌سی و سر سوزن شماره ۲۲ از ورید ساقه دمی صورت گرفت. ۰/۷ سی‌سی از خون به تیوپ‌های حاوی هپارین جهت مطالعات خون‌شناسی و شمارش گلبولی (Pathiratne و Rajapakshe، ۱۹۹۸) و ۱/۵سی‌سی باقی‌مانده به لوله‌های معمولی جهت جداسازی سرم و مطالعه فاکتورهای ایمنی‌شناسی تخلیه می‌شد. سرم نمونه‌های خون با دو بار سانتریفیوژ با دور ۵۰۰۰ در دقیقه به‌مدت ۵ دقیقه جدا و همراه با نمونه‌های خون در مجاورت یخ به آزمایشگاه منتقل می‌شدند.

Archive of SID
www.SID.ir

مطالعات شمارش گلبولی و آنالیز بیوشیمیایی خون در مجموعه آزمایشگاه‌های تخصصی ویرومد (رشت، گیلان) و نیز دانشگاه علوم پزشکی یاسوج براساس روش‌های زیر انجام گردید:

هموگلوبین: هموگلوبین به‌روش استاندارد سیانومت هموگلوبین و پس از مخلوط نمودن ۰/۰۲ میلی‌لیتر خون با ۵ سی‌سی محلول تجارتی درابکین (معرف سیانومت هموگلوبین) و پس از گذشت ۱۰ دقیقه از زمان مخلوط نمودن نمونه برای انجام و تکمیل واکنش‌های شیمیایی، نمونه مخلوط شده به‌مدت ۱۰ دقیقه به‌منظور رسوب ذرات هسته با سرعت ۲۰۰۰ دور در دقیقه سانتریفوژ و جذب نوری محلول فوقانی در طول موج ۵۴۰ نانومتر به‌وسیله دستگاه اسپکتروفتومتر اندازه‌گیری و میزان هموگلوبین بر حسب گرم در دسی‌لیتر محاسبه می‌گردید (Feldman و همکاران، ۲۰۰۰).

هماتوکریت: حجم فشرده گلبولی یا PCV به‌همان روش معمول و متداول برای پستانداران و پرندگان یعنی روش میکروهماتوکریت با استفاده از لوله‌های میکروهماتوکریت و سانتریفیوژ نمونه به‌مدت ۱۰ دقیقه‌در ۱۴۰۰۰ دور در دقیقه با استفاده از سانتریفوژ میکروهماتوکریت انجام‌شده و اندازه‌گیری درصد هماتوکریت با خط‌کش میکرو هماتوکریت صورت می‌گرفت (Feldman و همکاران، ۲۰۰۰).

شمارش کلی گلبول‌های قرمز (TRBC): شمارش کلی گلبول‌های قرمز ماهی به‌روش دستی و با استفاده از لام هماسیتومتر نئوبار صورت گرفت برای این کار و برای رقیق نمودن نمونه از محلول رقیق‌کننده لویس (Lewis) استفاده شده و با استفاده از لام هماسیتومتر و با بزرگ‌نمایی ۴۰ میکروسکوپ تعداد گلبول‌های قرمز در میلی‌لیتر مکعب خون محاسبه می‌شد (Thrall، ۲۰۰۴).

اندیس‌های گلبولی: اندیس‌های گلبولی یعنی حجم متوسط گلبولی (MCV)، میزان متوسط هموگلوبین گلبولی (MCH)، غلظت متوسط هموگلوبین گلبول‌های قرمز (MCHC) با استفاده از روابط استاندارد موجود محاسبه گردید (Thrall، ۲۰۰۴):

MCV= **تعداد گلبول‌های قرمز (میلیون در میلی‌متر مکعب)/۱۰×هماتوکریت(درصد)**

MCHC= هماتوکریت (درصد)/ ۱۰× هموگلوبین (گرم در دسی‌لیتر)

MCH=**تعداد گلبول‌های قرمز (میلیون در میلی‌متر مکعب)/۱۰× هموگلوبین (گرم در دسی‌لیتر)**

شمارش کلی گلبول‌های سفید (TWBC): شمارش کلی گلبول‌های سفید به‌روش مستقیم (هماسیتومتر) و همانند شمارش کلی گلبول‌های سفید پرندگان با رقیق کردن خون به نسبت ۱ به ۲۰۰ با محلول رقیق‌کننده لویس صورت گرفت. برای این کار و پس از انتقال نمونه رقیق‌شده به لام هماسیتومتر تعداد گلبول‌های سفید در ۹ مربع بزرگ اولیه شمارش می‌گردید و سپس تعداد کل گلبول‌های سفید در میلی‌متر مکعب خون با استفاده از برابری زیر محاسبه گردید (Thrall، ۲۰۰۴):

تعداد کل گلبول های سفید در میکرولیتر خون=

۲۰۰× (۱۰ ٪+ تعداد کل گلبول‌های سفید شمارش شده در ۹ مربع بزرگ)

شمارش افتراقی گلبول‌های سفید: برای شمارش تفریقی گلبول‌های سفید اقدام به تهیه گسترش خون گردید برای این کار و قبل از مخلوط نمودن نمونه خون با ماده ضدانعقاد، مستقیماً یک قطره خون بر روی لام قرار می‌گرفت و اقدام به تهیه گسترش می‌گردید. گسترش‌های تهیه شده با الکل متیلیک تثبیت (فیکس) می‌گردید و سپس با استفاده از رنگ گیمسا به‌مدت ۲۰ دقیقه رنگ آمیزی گردید و پس از پایان رنگ‌آمیزی و شستشوی لام و خشک شدن گسترش باعدسی روغنی تعداد یک‌صد سلول سفید مورد شمارش و درصد هریک از سلول‌ها محاسبه و ثبت می‌گردید (Pathiratne و Rajapakshe، ۱۹۹۸).

شاخص‌های ایمنی شناسی

اندازه‌گیری لیزوزیم سرم: فعالیت لایزوزیم سرم براساس روش Clerton و همکاران (۲۰۰۱) بر مبنای لیز باکتری گرم مثبت *Micrococcus lysodeikticus*(Sigma) حساس به آنزیم لیزوزیم اندازه گیری شد. سه رقت از لیزوزیم سفیده تخم‌مرغ از ۰ تا ۲۵میکروگرم بر میلی‌لیتر(در بافر فسفات- سیترات ۰٫۱ مول ،پ- هاش ۶، به‌عنوان استاندارد استفاده شد. محلول‌های استاندارد به‌همراه نمونه‌های سرم رقیق نشده با سه تکرار در تیوب‌های مخصوص (۲۵ میکرولیتر) تخلیه شده و ۱۷۵ میکرولیتر از سوسپانسیون (۷۵۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر) *M. lysodeikticus* در بافر مشابه قبلی آماده‌شده و به‌هر یک از تیوب‌ها اضافه گردید. پس از مخلوط نمودن، تغییر میزان کدورت محلول‌ها در ابتدا و پس از ۴ دقیقه در طول موج ۴۵۰ نانومترو دمای ۲۰ درجه سانتی‌گراد سنجش گردید و با مقایسه و معادل‌سازی نمونه با استاندارد، میزان فعالیت در سرم بر حسب میکروگرم بر میلی‌لیتر محاسبه شد.

اندازه‌گیری فعالیت همولیتیک مسیر فرعی کمپلمان (ACH50): فعالیت راه میانبر کمپلمان سرم براساس همولیز گلبول‌های قرمز خرگوش(RaRBC) و به‌کمک روش Waley و North (۱۹۹۷) اندازه‌گیری شد. برای محاسبه میزان فعالیت راه میانبر کمپلمان با استفاده از کاغذ شطرنجی (Log-Log Graph) منحنی لیز رسم شد. طبق تعریف حجمی از سرم که سبب ۵۰ درصد همولیز شود عبارت است از فعالیت کمپلمان نمونه و از برابری زیراستفاده گردید:

ACH50(U/ml)=K ×(فاکتور رقت)×۰/۵

در این رابطه، k مقداری از سرم است برحسب میلی‌لیتر که موجب ۵۰ درصد همولیز می‌شود، ۰/۵ عدد ثابت بوده و فاکتور رقت در این تست ۰/۰۱ می‌باشد چون سرم ۱۰۰ مرتبه رقیق شده بود.

Archive of SID
www.SID.ir

اندازه‌گیری کمپلمان‌های C3و C4: جهت اندازه‌گیری کمپلمان‌های C3 و C4 به‌روش کدورت سنجی ایمنی (Immuno Turbidometry) بر مبنای کدورت حاصل از اتصال هر کدام از این کمپلمان‌ها با آنتی‌بادی ضدآن سنجش شده است (Reyes-Becerril و همکاران، ۲۰۰۸). برای کالیبره کردن آن از کیت مخصوص شرکت پارس آزمون استفاده شد.

اندازه‌گیری ایمنوگلوبولین کل(Ig) و سنجش IgM : مقدار ایمنوگلوبولین کل سرم باروش Siwickiو همکاران (۱۹۹۸) اندازه‌گیری شد. در این روش، ابتدا سرم با استفاده از ۰/۸۵ درصد کلرید سدیم به میزان یک دوم رقیق گردید، سپس مقدار پروتئین کل آن با روش رنگ سنجی برادفورد (Kruger، ۱۹۹۶) اندازه‌گیری شد. بعد از آن بااستفاده از پلی‌اتیلن گلیکول ۱۲درصد، آنتی‌بادی‌های سرم رسوب داده شد و مقدار پروتئین محلول رویی اندازه‌گیری گردید. تفاوت بین مقدار پروتئین کل سرم با مقدار پروتئین مایع رویی پس از ترسیب آنتی‌بادی‌ها، عبارت است از میزان آنتی‌بادی کل سرم که بر حسب میلی‌گرم در میلی‌لیتر بیان می‌گردد. میزان IgM سرم براساس روش الایزا و کدورت حاصل از اتصال ایمنوگلوبولین با آنتی‌بادی ضد آن و تهیه شده از سرم موش (Aquatic Diagnostics Ltd.) سنجش شده است (Reyes-Becerril و همکاران، ۲۰۰۸).

تجزیه و تحلیل آماری داده‌ها: نتایج به‌دست آمده با استفاده از نرم‌افزار Excel ۲۰۱۳ مرتب گردید. هم‌چنین تجزیه و تحلیل داده‌ها و مشخص کردن سطوح معنی‌داری با استفاده از نرم‌افزار SPSS ۲۳ و با آزمون آماری LSD (حداقل اختلاف معنی‌دار) با درصد اطمینان ۹۵ و با آنالیز واریانس یک‌طرفه (One – Way ANOVA) انجام شد. قبل از انجام آزمون آنالیز واریانس، یکنواختی واریانس با آماره لیون (Levene) و نرمال بودن داده‌های به‌دست آمده با استفاده از آزمون کولموگروف– اسمیرنوف بررسی شد. برای آنالیز واریانس داده‌های نرمال از آزمون تجزیه واریانس یک‌طرفه و برای داده‌های غیرنرمال از آزمون کروسکال -والیس استفاده گردید.

نتایج

نتایج مطالعه حاضر از اندازه‌گیری و ثبت شاخص‌های رشد و تغذیه، خون‌شناسی و شمارش گلبولی، ایمنی‌شناسی در تیمارهای مورد مطالعه حاصل شد. نتایج براساس (انحراف معیار±میانگین) ثبت گردیده است.

بررسی عملکرد رشد: نتایج حاصل از سنجش شاخص‌های رشد در جدول ۲ آمده است. براساس جدول ذکر شده، هیچ‌گونه اختلاف معنی‌داری بین بین ماهیان تغذیه شده با پروبیوآنزیم با گروه ماهیان شاهد (تیمار۱) در شاخص‌های وزن اولیه، نهایی، افزایش وزن، ضریب رشد ویژه، ضریب تبدیل غذایی، شاخص کبدی، نسبت و ضریب تبدیل غذایی مشاهده نشد (P>۰/۰۵). ضریب کارایی پروتئین ماهیان تیمار۳ (تغذیه شده با ۰/۵ گرم پروبیوآنزیم) به‌طور معنی‌داری (P<۰/۰۵) نسبت به ماهیان شاهد بیش‌تر بود. و در مقدار آن در تیمار۲ با ماهیان شاهد اختلاف معنی‌داری مشاهده نگردید (P>۰/۰۵).

جدول۲: شاخص‌های رشد و تغذیه تیمارهای مختلف: ۱: شاهد (بدون پروبیوآنزیم)، ۲: ۰/۳ گرم پروبیوآنزیم در کیلوگرم غذا، ۳: ۰/۵ گرم پروبیوآنزیم در کیلوگرم غذا*

تیمارهای آزمایشی / شاخص‌های رشد و تغذیه	تیمار ۱ (شاهد)	تیمار ۲	تیمار ۳
وزن اولیه (گرم)	۲۶/۱±۲/۴ a	۲۶/۲±۲/۶ a	۲۶/۵±۲/۷ a
وزن نهایی (گرم)	۷۶±۷/۸ a	۷۷/۳±۸ a	۷۷/۸±۵/۱ a
افزایش وزن (گرم)	۴۹/۸±۸/۴ a	۵۱/۳±۸ a	۵۱/۲±۶/۳ a
افزایش وزن (درصد)	۱۹۰±۴۰ a	۲۰۰±۴۲ a	۱۹۶±۳۷ a
ضریب رشد ویژه (درصد)	۱/۷۷±۰/۲ a	۱/۸±۰/۳ a	۱/۸±۰/۲ a
افزایش وزن روزانه (گرم)	۰/۸±۰/۱۴ a	۰/۸۶±۰/۱ a	۰/۸۶±۰/۱۱ a
شاخص کبدی	۱/۳۳±۰/۰۶ a	۱/۲۶±۰/۰۸ a	۱/۳±۰/۱ a
نسبت تبدیل غذایی	۱/۱±۰/۱ a	۱/۱۵±۰/۲۶ a	۰/۹۵±۰/۱ a
بازده تبدیل غذایی	۰/۹۲±۰/۰۶ a	۰/۹±۰/۲ a	۱/۱±۰/۰۵ a
ضریب کارایی پروتئین (درصد)	۲/۵±۰/۴ a	۲/۵±۰/۴ ab	۳±۰/۴b
کل غذای مصرف شده (گرم)	۵۵/۲±۴/۲ a	۵۷/۶±۱۵/۳ a	۴۹±۲/۴ a

*وجود حروف غیرهمنام در هر ردیف، نشانه وجود اختلاف معنی‌دار بین گروه‌های آزمایشی است.

Archive of SID
www.SID.ir

شاخص‌های خون‌شناسی و شمارش گلبولی: براساس جدول ۳ تیمارهای مختلف از نظر شاخص‌های هموگلوبین، هماتوکریت، تعداد گلبول قرمز، حجم متوسط گلبولی (MCV)، متوسط هموگلوبین گلبولی (MCH)، غلظت متوسط هموگلوبین گلبول قرمز (MCHC)، فاقد تفاوت معنی‌دار بودند (P>۰/۰۵).

میانگین مربوط به گلبول‌های سفید و نیز درصد گلبول‌های نوتروفیل در تیمار ۳ با اختلاف معنی‌داری (P<۰/۰۵) بیش‌تر از گروه ماهیان شاهد (۱ تیمار) بوده و بین میانگین این شاخص‌ها در تیمار ۱ و ۲ و نیز تیمارهای۲ و ۳ تفاوت معنی‌داری مشاهده نشد (P>۰/۰۵).

جدول۳: شاخص‌های خون‌شناسی و شمارش گلبولی تیمارهای مختلف، ۱: شاهد (بدون پروبیوآنزیم)، ۲: ۰/۳ گرم پروبیوآنزیم در کیلوگرم غذا، ۳: ۰/۵ گرم پروبیوآنزیم در کیلوگرم غذا*

تیمارهای آزمایشی	تیمار ۱ (شاهد)	تیمار ۲	تیمار ۳
شاخص‌های خون‌شناسی و شمارش گلبولی			
هموگلوبین (گرم در دسی‌لیتر)	۷/۹±۰/۶^{a}	۸/۵±۰/۷^{a}	۸/۳±۰/۶^{a}
هماتوکریت (درصد)	۴۱/۳±۳/۲^{a}	۴۵/۳±۴/۹^{a}	۴۳±۳/۶^{a}
گلبول قرمز (تعداد در میلی‌مترمکعب)	۱/۳۴×۱۰^{۶}±۱/۴×۱۰^{۵}^{a}	۱/۵×۱۰^{۶}±۱/۸×۱۰^{۵}^{a}	۱/۴۴×۱۰^{۶}±۱×۱۰^{۵}^{a}
حجم متوسط گلبولی (MCV) (فمتولیتر)	۳۰۸/۷±۷/۶^{a}	۳۰۴±۴/۶^{a}	۲۹۷/۳±۵/۱^{a}
متوسط هموگلوبین گلبولی (MCH) (پیکوگرم)	۵۸/۷±۲/۱^{a}	۵۷±۱/۷^{a}	۵۷/۷±۰/۶^{a}
غلظت متوسط هموگلوبین گلبول قرمز (MCHC) (گرم در دسی‌لیتر)	۱۹±۰^{a}	۱۸/۷±۰/۶^{a}	۱۹/۴±۰/۶^{a}
گلبول سفید (تعداد در میلی‌مترمکعب)	۹/۶×۱۰^{۳}±۲/۷×۱۰^{۲}^{a}	۱/۱×۱۰^{۴}±۱/۴×۱۰^{۳}^{ab}	۱/۵×۱۰^{۴}±۳×۱۰^{۳}^{b}
نوتروفیل (درصد)	۳۳/۳±۲/۵^{a}	۳۳/۶۷±۰/۷^{ab}	۳۷/۳±۲/۱^{b}
لنفوسیت (درصد)	۶۲/۷±۴/۲^{a}	۶۱/۳±۱/۵^{a}	۵۷/۳±۲/۵^{a}
مونوسیت (درصد)	۴±۱/۷^{a}	۴/۳±۰/۶^{a}	۵±۰^{a}
ائوزینوفیل(درصد)	۰/۳±۰/۶^{a}	۰/۶۷±۰/۶^{a}	۰/۳±۰/۶^{a}

*وجود حروف غیرهمنام در هر ردیف، نشانه وجود اختلاف معنی‌دار بین گروه‌های آزمایشی است.

شاخص‌های ایمنی‌شناسی: نتایج ایمنی‌شناسی براساس آنالیز بیوشیمیایی سرم در تیمارهای مختلف حاصل شده است (جدول۴). براساس جدول ۴ کمپلمان‌های c3 و c4 با اختلاف معنی‌داری در سرم ماهیان تیمار۳ نسبت به تیمار شاهد بیش‌تر بوده (P<۰/۰۵) و اختلاف معنی‌داری بین تیمار۲ و یک مشاهده نشد (P>۰/۰۵). مقایسه میزان شاخص‌های فعالیت راه میانبر کمپلمان و ایمنوگلوبولین (IgM) بین تیمارهای مختلف اختلاف معنی‌داری را نشان نمی‌دهد (P>۰/۰۵). سنجش میزان لایزوزیم سرم نشان دادکه میزان آن در ماهیان تیمار ۳ به‌طور معنی‌داری (P<۰/۰۵) در مقایسه با تیمار شاهد بیش‌تر بود. هم‌چنین میزان گلبولین کل در دو تیمار ذکر شده دارای تفاوت معنی‌داری (P<۰/۰۵) بودند (جدول۴).

جدول۴: آنالیز بیوشیمیایی نمونه سرم در تیمارهای مختلف، ۱: شاهد (بدون پروبیوآنزیم)، ۲: ۰/۳ گرم پروبیوآنزیم در کیلوگرم غذا، ۳: ۰/۵ گرم پروبیوآنزیم در کیلوگرم غذا*

تیمارهای آزمایشی	تیمار ۱ (شاهد)	تیمار ۲	تیمار ۳
شاخص‌های ایمنی شناسی سرم			
C3 (میلی‌گرم در دسی‌لیتر)	۲۵/۳±۵/۸^{a}	۳۴/۷±۷/۵^{ab}	۵۱/۳±۱۶/۵^{b}
C4 (میلی‌گرم در دسی‌لیتر)	۱۳±۴/۴^{a}	۱۸/۳±۴/۷^{ab}	۲۲/۷±۳/۲^{b}
IgM (میلی‌گرم در دسی‌لیتر)	۴۷/۳±۱۱^{a}	۵۷/۳±۷/۲^{a}	۷۳/۷±۲۲^{a}
لیزوزیم (میکروگرم در میلی‌لیتر)	۳۱/۷±۸/۹^{a}	۴۷/۷±۷/۸^{ab}	۵۴/۳±۸/۱^{b}
فعالیت مسیر فرعی کمپلمان (یو در میلی‌لیتر)	۱۲۲/۳±۱۲/۹^{a}	۱۳۹/۷±۲۶/۷^{a}	۱۵۳±۲۹/۵^{a}
ایمنوگلوبولین کل (میلی‌گرم در میلی‌لیتر)	۱۹/۳±۳/۲^{a}	۲۰/۳±۱/۵^{ab}	۲۱/۳±۳/۱^{b}

* وجود حروف غیرهمنام در هر ردیف، نشانه وجود اختلاف معنی‌دار بین گروه‌های آزمایشی است.

Archive of SID
www.SID.ir

بحث

تاثیر پروبیوآنزیم بر شاخص‌های رشد: پروبیوآنزیم مورد استفاده در این مطالعه، شامل پروبیوتک‌ها و ترکیبات آنزیمی بود. بخش آنزیمی زمینه فعالیت پروبیوتیک‌ها را به‌عنوان محرک سیستم ایمنی ماهی فراهم می‌سازد (Petterson، ۲۰۰۵). تحقیقات متعددی درخصوص افزودن آنزیم‌های پانکراس نظیر پروتئازها به غذای ماهیان انجام شده و افزایش رشد، بازدهی غذا و افزایش قابلیت هضم پروتئین از منابع گیاهی را گزارش نموده اند (Lin و همکاران، ۲۰۰۷؛ Drew و همکاران، ۲۰۰۵). در سال‌های اخیر، استفاده از آنزیم‌های موثر در هضم پلی ساکاریدهای غیرنشاسته‌ای در تغذیه آبزیان افزایش یافته است. این آنزیم‌ها شامل گلوکاناز، پنتوزاناز، سلولاز و گزیلاناز بوده و با هیدولیز پلی ساکاریدها، فراورده‌هایی جهت استفاده باکتری‌ها و نیز ماهیان تولید می‌کنند (Sinha و همکاران، ۲۰۱۱). افزودن این مکمل‌های آنزیمی باعث بهبود جذب پروتئین‌ها و رشد در ماهیان می‌گردند (Jiang و همکاران، ۲۰۱۴؛ Ai و همکاران، ۲۰۰۷). گزیلاناز همی‌سلولز رابه‌عنوان ترکیب اصلی دیواره سلول‌های گیاهی تجزیه نموده (Ganguly و همکاران، ۲۰۱۳) و در طیور باعث ورود آنزیم‌های دستگاه گوارش به سلول‌های بافت‌های گیاهی در منابع غذایی و تسهیل هضم نشاسته و پروتئین‌ها می‌گردد (Sinha و همکاران، ۲۰۱۱). مطالعات انجام شده مخمرهای تولیدکننده آنزیم‌های گروه گزیلاناز را از دستگاه گوارش ماهیان گیاه‌خوار از جمله کپورهندی و تیلاپیای نیل جدا نموده‌اند. بنابراین، اغلب پژوهش‌ها باید بر شناسایی نقش این آنزیم‌ها در هضم و جذب پلی‌ساکاریدهای غیرنشاسته‌ای در این گروه از ماهیان متمرکز گردد (Bogevik، ۲۰۱۵). pH پایین و آنزیم‌های پروتئاز در دستگاه گوارش سبب کاهش فعالیت مکمل‌های آنزیمی به غذا می‌باشد. مواد همراه آنزیم‌های افزوده شده به غذا جهت جلوگیری از غیرفعال‌سازی این آنزیم‌ها از اهمیت بالایی برخوردار می‌باشد (Bogevik، ۲۰۱۵). استفاده از گزیلاناز در تغذیه ماهی سی‌بس دریایی باعث ارتقاء رشد و بهره‌برداری از پروتئین غذا گردید (Ai و همکاران، ۲۰۰۷) در حالی‌که افزودن این مکمل آنزیمی به غذای حاوی پودر سویا و آفتابگردان و یا کلزا در تغذیه ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان (۷۰-۱۱۰ گرم) فاقد تاثیر معنی‌داری بر رشد و کارایی جذب پروتئین بود (Dalsgaard و همکاران، ۲۰۱۲).

ماهیان دارای معده مشخص، نظیر قزل‌آلای رنگین‌کمان دارای pH پایین در معده بوده و در حالت عادی در محدوده ۳-۲ می‌باشد و این ویژگی با توانایی این ماهی جهت هضم پروتئین‌ها به‌ویژه از منابع حیوانی منطبق می‌باشد و آنزیم پپسین جهت تجزیه پروتئین‌ها در چنین شرایط اسیدی فعال می‌گردد. درحالی‌که، ماهیان گیاه‌خوار اغلب فاقد معده مشخص و دارای pH بالاتری در سیستم گوارش می‌باشند (Freitag، ۲۰۰۷). براساس این یافته‌ها، عبور مکمل‌های آنزیمی از شرایط اسیدی دستگاه گوارش در ماهیان گیاه‌خوار بدون تغییر ماهیت ممکن می‌باشد. با این وجود، مکمل آنزیمی در تغذیه ماهیان سردابی، ترکیبات پروتئینی بوده و در شرایط اسیدی دستگاه گوارش می‌تواند توسط پروتئازها غیرفعال گردند. بنابراین، می‌توان گفت زمینه فعالیت آنزیم‌های پروتئاز در دستگاه گوارش ماهی قزل‌آلا بیش‌تر از سایر آنزیم‌ها بوده و منطبق با نتیجه مربوط به افزایش ضریب کارایی پروتئین در تیمار ۳ نسبت به سایر تیمارها می‌باشد و عدم تاثیر معنی‌دار ترکیب پروبیوآنزیم مورد استفاده بر رشد و تغذیه ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان، در این مطالعه می‌تواند ناشی از عدم وجود شرایط محیطی فعالیت آنزیم‌های افزوده شده باشد. از طرف دیگر، نوع مواد غذایی می‌تواند در تغییر pH دستگاه گوارش موثر باشد. استفاده از پروتئین حیوانی موجود در پودر ماهی ۱۵ برابر بیش‌تر از غلات در کاهش pH دستگاه گوارش موثر می‌باشد (Freitag، ۲۰۰۷). بنابراین، علاوه بر نوع گونه ماهی مورد آزمایش، نتایج متفاوت در بررسی تاثیر مکمل‌های آنزیمی بر شاخص‌های رشد و تغذیه می‌تواند ناشی‌از تفاوت در اجزا و منشاء مواد غذایی باشد. درحالی‌که‌در پژوهش حاضر از غذای معمولی بدون توجه به استفاده غالب از منابع حیوانی یا گیاهی استفاده شده است. تاثیر مثبت ترکیب پروبیوآنزیم بر ارتقاء سیستم ایمنی در مطالعه نیک‌پیران (۱۳۸۹) با بررسی تاثیر استفاده از ترکیب پروبیوآنزیم در جیره غذایی بر عملکرد جوجه‌های گوشتی و تیتر حاصل از واکسن گامبرو مشاهده می‌شود. براساس نتایج تحقیق وی، پروبیوآنزیم باعث کاهش معنی‌دار ضریب تبدیل غذایی و بهبود معنی‌دار وزن نهایی بدن در مقایسه با گروه شاهد گردید. گروه‌های شاهد و پروبیوآنزیم فاقد اختلاف معنی‌داری از نظر تیتر آنتی‌بادی بر علیه گامبرو بودند. ولی با این وجود، تیتر آنتی‌بادی بر علیه گامبرو در گروه پروبیوآنزیم نسبت به گروه شاهد افزایش نشان داد. هم‌چنین تحقیق نجفی و همکاران (۱۳۸۹) در بررسی تاثیر پروبیوآنزیم با دوز ۰/۰۵ درصد را بر عملکرد جوجه‌های گوشتی حاکی از افزایش وزن و کاهش ضریب تبدیل غذایی در حد معنی‌دار در جوجه‌های دریافت کننده این مکمل نسبت به گروه شاهد بودند.

مطالعات دیگری تاثیر پروبیوآنزیم را بر پارامترهای رشد و تغذیه مثبت‌ارزیابی نمودند. حسین‌پور (۱۳۹۳) عملکرد رشد و بقای لارو میگوی وانامی (*Litopenaeus vannamei*) با استفاده از سطوح مختلف پروبیوآنزیم مورد استفاده در پژوهش حاضر، را در جیره غذایی بررسی نمودند. طی دوره آزمایش، تاثیر پروبیوآنزیم با هدف بررسی تاثیر استفاده هم‌زمان باکتری های پروبیوتیکی با آنزیم‌های هضمی بر فاکتورهای رشد و بقاء، ترکیب لاشه و مقاومت در برابر استرس شوری در پست لارو میگوی

Archive of SID

www.SID.ir

وانامی مورد بررسی قرار گرفت. تیمارهای آزمایش ۱، ۰/۵ و ۰/۲۵گرم پروبیوآنزیم در کیلوگرم غذا و تیمار شاهد بدون استفاده از این مکمل در جیره میگو بود. براساس نتایج این تحقیق، تیمار ۰/۵ گرم پروبیوآنزیم در کیلوگرم غذا دارای بیش‌ترین میانگین رشد و بقاء و مقاومت در مقابل شوری و بهترین عملکرد در ترکیب لاشه را نسبت به سایر تیمارها و گروه شاهد داشت. هم‌چنین، نتیجه مطالعه تاثیر مکمل پروبیوآنزیم بر فعالیت آنزیم‌های هضمی میگوی وانامی حاکی از تاثیر مثبت و معنی‌دار غلظت معینی از این ترکیب بر فعالیت‌های آنزیم‌های آمیلاز، لیپاز و پروتئاز در میگو می‌باشد (حسین‌پور و همکاران، ۱۳۹۴). در بررسی سطوح مختلف پروبیوآنزیم را بر درصد بازماندگی و برخی شاخص‌های رشد در بچه ماهی گورامی (*Trichogaster trichopterus*) نامداریان و ضیائی‌نژاد (۱۳۹۲) گروه ماهیان تغذیه شده شامل یک و دو درصد جیره حاوی پروبیوآنزیم با گروه شاهد مقایسه شدند. بالاترین درصد بازماندگی و شاخص‌های رشد مانند ضریب رشد ویژه و وزن تر و طول کل در تیمار با میزان یک درصد جیره از مکمل پروبیوآنزیم نسبت به تیمارهای دو درصد مشاهده گردید. با این وجود هیچ‌گونه اختلاف معنی‌داری بین گروه‌های مورد آزمایش و نیز گروه شاهد مشاهده نشد.

براساس مطالعات انجام شده، تاثیر مثبت پروبیوآنزیم بر شاخص‌های رشد و تغذیه در طیور، ماهی گورامی و میگوی سفید غربی می‌تواند تا حدی وابسته به قابلیت دستگاه گوارش آن‌ها در هضم پروتئین‌های گیاهی باشد. با توجه به عادت غذایی این گونه‌ها و رژیم غذایی گیاه‌خواری در طیور و همه‌چیزخواری در ماهی گورامی (Webb و همکاران، ۲۰۰۷) زمینه فعالیت آنزیم‌های موجود در ترکیب پروبیوآنزیم در دستگاه گوارش آن‌ها نسبت به ماهیان گوشت‌خوار از جمله قزل‌آلای رنگین‌کمان وجود دارد. چنین قابلیت‌هایی نیز در میگوی سفید غربی می‌تواند به‌دلیل قابلیت مطلوب تغذیه از منابع پروتئین گیاهی در این گونه باشد (Davis و همکاران، ۲۰۰۴). بالا بودن سهم پروتئین گیاهی در جیره میگوی سفید غربی نسبت به سایر میگوهای پرورشی و به‌طورکلی پائین بودن میزان پروتئین مورد نیاز آن نقطه قوت توسعه و پرورش این گونه است (Thomas و همکاران، ۲۰۰۳). به‌طورکلی متغیرهای متعددی بر تاثیر پروبیوآنزیم در گونه‌های مختلف وجود دارد. به‌طوری‌که حتی در طیور، در مطالعه تاثیر این ماده بر عملکرد و فراسنجه‌های خونی بلدرچین ژاپنی (*Coturnix japonica*) توسط امیدی‌زاده و همکاران (۱۳۹۳) بین اثرانفرادی و اثر متقابل پودر سماق (*Rhus coriaria*) و پروبیوآنزیم در تاثیر بر صفات مورد بررسی، خوراک مصرفی روزانه، ضریب تبدیل غذایی، تری‌گلیسرید و کلسترول خون نسبت به تیمار شاهد تفاوت معنی‌داری مشاهده نشد. براساس نتایج، تاثیر مکمل پروبیوآنزیم بر شاخص‌های رشد ممکن است به استفاده از مکمل در دوره طولانی‌تر و یا غلظت بالاتر جهت بهبود شاخص‌های رشد و تغذیه معنی‌دار شود (Ridha و Azad، ۲۰۱۲؛ Shen و همکاران، ۲۰۱۰).

تاثیر پروبیوآنزیم بر شاخص‌های خون‌شناسی: در مورد تاثیر محرک‌های ایمنی بر شاخص‌های خون‌شناسی تحقیقات متعددی صورت گرفته است و نتایج متفاوتی از تاثیر این مواد گزارش گردیده است. در برخی مطالعات، تاثیر این مواد بر شاخص‌های خون‌شناسی گزارش شده است و یافته‌های حاصل از پژوهش‌های دیگر بر بی‌اثر بودن محرک‌های ایمنی بر این شاخص‌ها استوار است (Sakai، ۱۹۹۹). براساس پژوهش حاضر، پروبیوآنزیم تاثیر معنی‌داری بر میزان هماتوکریت، هموگلوبین، MCV، MCH، MCHC و تعدادکلی گلبول‌های قرمز ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان نداشته است. نتیجه این تحقیق با مطالعه تاثیرمحرک ایمنی اسانس گیاه اکیناسه (ایمنوفن) بر فاکتورهای خون شناسی مربوط به گلبول‌های قرمز در ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان (اسلامی، ۱۳۹۰) و تاثیر استفاده از بتاگلوکان تجاری(ماکروگارد) به میزان ۱ و ۲ گرم برکیلوگرم غذا بر میزان این شاخص‌های خون‌شناسی و تعدادکلی گلبول‌های قرمز ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان با وزن ۲۸ گرم (پورمظفر و همکاران، ۱۳۹۳) منطبق می‌باشد. با این وجود، افزایشی در تعداد گلبول‌های قرمز در تیمارهای استفاده از پروبیوآنزیم نسبت گروه ماهیان شاهد وجود دارد. این فرضیه مطرح است که مواد محرک ایمنی موجب افزایش متابولیسم در ماهی شده در نتیجه تعداد و ظرفیت حمل اکسیژن در گویچه‌های قرمز افزایش می‌یابد (Irianto و Austin، ۲۰۰۲). البته فاکتورهای خونی حیوانات خونسرد به‌ویژه ماهی برخلاف حیوانات خونگرم تا حد زیادی تحت تاثیر فاکتورهای مختلف از جمله استرس، دما، فصل وتغذیه قرار گرفته و تابلوی خوبی برای بررسی وضعیت سلامت یا ایمنی ماهی به‌شمار نمی‌رود (Iwama و Nakanishi، ۱۹۹۶). تاثیر پروبیوآنزیم مورد استفاده بر افزایش تعداد گلبول‌های سفید و در شمارش افتراقی، تعداد نوتروفیل‌ها در تیمارها نسبت به گروه شاهد معنی‌دار بود. هم‌چنین، در پژوهش‌های انجام شده، تجویز خوراکی ماکروگارد موجب افزایش رشد و بهبود پاسخ‌های ایمنی ماهی از طریق تکثیر گویچه‌های سفید خون به‌خصوص جمعیت نوتروفیلی قزل‌آلای رنگین‌کمان (پورمظفر و همکاران، ۱۳۹۳) و ماده محرک ایمنی ایمنوفن باوجود عدم تاثیر در تغییر تعداد گلبول‌های قرمز منجر به افزایش تعداد گلبول‌های سفید گردید (اسلامی، ۱۳۹۰). تاثیر مواد محرک ایمنی بر اجتماع گلبول‌های سفید منطقی به‌نظر می‌رسد. زیرا گلبول‌های سفید نقش قابل توجهی در ترشح فاکتورهای هومورال موثر در سیستم دفاع ذاتی آبزیان ایفا می‌کنند و افزایش این فاکتورهای هومورال تحت تاثیر افزایش تعداد لکوسیت‌های خونی بوده است. افزایش تعداد گلبول‌های سفید خونی در عفونت‌های طبیعی و

Archive of SID
www.SID.ir

تجربی و در مواقع استفاده از واکسن‌ها و محرک‌های ایمنی متعدد گزارش شده است (Marian، ۲۰۰۴).

عدم‌تاثیر تغذیه جوجه‌های گوشتی با پروبیوآنزیم برعملکرد رشد و کاهش درصد هتروفیل‌های خونی و افزایش لنفوسیت‌ها در خون آن‌ها (نوبخت و همکاران، ۱۳۹۱) می‌تواند به‌دلیل قابلیت ایمنی‌زایی این ترکیب باشد. هتروفیل‌ها، سلول‌های فاگوسیت هستند که برای مقابله با عوامل عفونی نظیر ویروس‌ها، باکتری‌ها و نیز ذرّات خارجی شکل گرفته‌اند و به‌میزان زیادی در محل‌های آسیب دیده در اثر تولید مواد شیمیایی جاذب، حضور می‌یابند. عمده‌ترین عمل هتروفیل‌ها به دام انداختن و از بین بردن ذرّات بیگانه به‌وسیله فاگوسیتوز می‌باشد و افزایش تعداد آن‌ها شاخص مهّمی جهت مشخص نمودن وجود عوامل میکروبی و بیماری‌زا در بدن می‌باشد.در حال‌عادی و عدم‌وجود بیماری و حملات میکروبی، لنفوسیت‌ها اکثریت گلبول‌های سفید خون طیور را تشکیل می‌دهند. نسبت هتروفیل‌ها به لنفوسیت شاخص مهمی در ارزیابی سطح ایمنی بدن می‌باشد و هرچقدر این نسبت کم‌تر باشد، به‌همین مقدار نیز سطح ایمنی بدن بالا بوده و احتمال مقاومت در مقابل عوامل بیماری‌زا بهبود می‌یابد (Sturkie، ۱۹۹۵).

تاثیر پروبیوآنزیم بر شاخص‌های ایمنی: مکمل‌های غذایی محرک ایمنی، طیف وسیعی از مواد غیرزنده ازجمله پروتئین‌ها، اسیدهای چرب، پلی‌ساکاریدها، ویتامین‌ها، مواد معدنی و عصاره‌های گیاهی و موادزنده‌شامل‌باکتری‌های‌پروبیوتیک‌را دربر می‌گیرد (Amar و همکاران، ۲۰۰۴؛ Verlhac Trichet و همکاران، ۲۰۱۰؛ Martinez-Álvarez و همکاران، ۲۰۰۵). ارزیابی تاثیر این مواد از طریق تغذیه از اهمیت‌بالایی‌برخوردار می‌باشد. پژوهشی توسط Hoseinifar و همکاران (۲۰۱۱) مبنی بر بررسی اثرات مکمل‌های غذایی گالاکتوالیگوساکارید (GOS)، باکتری پروبیوتیک *Pediococcus acidilactici* و ترکیب *P. acidilactici* و GOS در پاسخ ایمنی ذاتی، قزل‌آلای رنگین‌کمان انجام شد که براساس نتایج آن، بالاترین پاسخ ایمنی در تغذیه ماهی با سین‌بیوتیک مشاهده شد. نتایج بررسی تاثیر پروبیوتیک تغذیه‌ای *B. subtilis* بر پارامترهای‌رشد و پاسخ ایمنی در ماهی قزل‌آلای رنگین کمان حاکی از عدم تاثیر معنی‌دار این ترکیب بر پارامترهای ضریب رشد ویژه بوده و وزن نهایی ماهیان به‌طور معنی‌داری نسبت به گروه شاهد کاهش یافت (Mahmoudzadeh و همکاران، ۲۰۱۶). براساس نتایج بررسی تاثیر پروبیوتیک*Lactobacillus rhamnosus* و ویتامین C بر شاخص‌های رشد و ایمنی‌ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان (توکمه‌چی و همکاران، ۱۳۹۱) وتاثیر *B. subtilis* و ویتامین C بر رشد ماهی روهو (Nayak، ۲۰۰۷)،این‌باکتری‌های‌پروبیوتیک، تنها همراه با ویتامین بر رشد و شاخص‌های ایمنی شامل فعالیت لیزوزیم سرم، راه میانبر کمپلمان و میزان آنتی‌بادی کل پلاسما موثر بودند. لیزوزیم، یک آنزیم کاتیونی با فعالیت ضدمیکروبی، باعث تجزیه ترکیبات پپتیدوگلیکان موجود در دیواره سلولی باکتری‌های گرم مثبت شده و نیز از طریق اتصال با کمپلمان‌ها سبب‌تخریب دیواره سلولی باکتری‌های گرم منفی می‌گردند (Balcazer و همکاران، ۲۰۰۷). لیزوزیم باعث افزایش فعالیت بیگانه‌خواری می‌گردد (Sakai، ۱۹۹۹). افزایش فعالیت لایزوزیم بعد از تجویز محرک‌های ایمنی، واکسن‌ها و برخی پروبیوتیک‌ها در ماهی گزارش گردیده است (Swain و همکاران، ۲۰۰۶). براساس مطالعات انجام شده با فعال شدن سیستم ایمنی، میزان فعالیت آنزیم لیزوزیم افزایش می‌یابد (Panigrahi و همکاران، ۲۰۰۴). نتایج مطالعات اخیر حاکی از افزایش معنی‌دار میزان لیزوزیم سرم در تیمارهای تغذیه شده با پروبیوآنزیم نسبت به تیمار شاهد می‌باشد. این مشاهدات هم‌سو با یافته پژوهش Mahmoudzadeh و همکاران (۲۰۱۶) بوده، که، میزان لیزوزیم سرم ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان در تیمار ۱ گرم پروبیوتیک در غذا بیش-ترین مقدار را داشته و با افزایش میزان این مکمل (۵ و ۱۰ گرم پروبیوتیک درکیلوگرم غذا) تغییری در میزان لیزوزیم صورت نگرفت. بنابراین می‌توان نتیجه گرفت پروبیوآنزیم مورد استفاده در این پژوهش از طریق افزایش فعالیت لیزوزیم سرم، می‌تواند سبب تقویت سیستم ایمنی ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان گردد. هم‌چنین Liu و همکاران (۲۰۱۲) در مطالعه تاثیر تغذیه ماهی هامور (*Epinephelus coioides*) با *B. subtilis* افزایش میزان لایزوزیم در تیمارها را در یک وضعیت وابسته به دوز این باکتری را در غذا گزارش نمودند. در مقابل برخی گزارشات مبنی بر عدم تاثیر بر میزان لایزوزیم به‌روش افزودن افزودن این پروبیوتیک به آب را در ماهی تیلاپیا گزارش نمودند (Zhou و همکاران، ۲۰۱۰).

مسیر الترناتیو (Alternative pathway) کمپلمان، بدون نیاز به تشکیل کمپلکس با حضور پادتن، به‌طور مستقیم به‌وسیله لیپوپلی ساکارید باکتری‌های گرم منفی فعال شده و باعث تجزیه دیواره سلولی باکتری‌ها می‌شود (Balcazer و همکاران، ۲۰۰۷). پروبیوتیک‌ها به‌طور طبیعی‌فعالیت‌کمپلمان‌رادر ماهیان تقویت نموده و گزارشات متعددی از استفاده از پوبیوتیک‌ها در غذا و آب جهت فعال‌سازی سیستم کمپلمان وجود دارد (Nayak، ۲۰۱۰). نتایج مطالعه اخیر افزایشی را در فعالیت راه میانبر کمپلمان نشان داد. با این‌وجود، تفاوت معنی‌داری بین تیمارهای پروبیوآنزیم با تیمار شاهد مشاهده نگردید. یافته‌های این پژوهش با نتایج آزمایش استفاده از پروبیوتیک *B. subtilis* منطبق بود (Mahmoudzadeh و همکاران، ۲۰۱۶). این نتایج می‌تواند ناشی ازعدم‌وابستگی‌مسیر آلترناتیو به آنتی‌بادی بوده، با این‌حال، متغیرهای متعددی نظیر دوز پروبیوآنزیم و دوره آزمایش می‌تواند بر فعالیت کمپلمان موثر باشد (Cerezuela و همکاران، ۲۰۱۲).

Archive of SID
www.SID.ir

افزایش فعالیت سیستم کمپلمان نشان‌دهنده فعال شدن سیستم ایمنی می‌باشد(Panigrahiو همکاران، ۲۰۰۵). در تحقیق حاضر افزایش معنی‌دار کمپلمان‌های C3 و C4 در تیمار۳ نسبت به تیمار ۱ مشاهده می‌گردد. به‌طوری‌که روند تغییر این ترکیبات هم‌سو با فعالیت لیزوزیم سرم بوده است. هم‌چنین میزان ایمنوگلوبولین کل در تیمار۳ نسبت به تیمار ۱ با اختلاف معنی‌داری افزایش یافته است. این نتیجه در توافق با مطالعه Nikoskelainen و همکاران (۲۰۰۳) مبنی بر افزایش سطح آنتی‌بادی‌های سرم با تغذیه ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان با پروبیوتیک *L. rhamnosus* می‌باشد. با این وجود میزان IgM به‌عنوان یک شاخص ایمنی اختصاصی تحت تاثیر پروبیوآنزیم فاقد تغییر معنی‌دار بوده‌است. میزان توصیه شده مکمل پروبیوآنزیم توسط شرکت سازنده XVET GmbH (آلمان) در دام و آبزیان در محدوده ۰/۳- ۰/۵ گرم در کیلوگرم غذا بوده است. براساس نتایج این تحقیق، تأثیر ناچیز دوز کم در محیط‌های آبی به‌واسطه آب‌شویی (leaching) مکمل از غذا تشدید می‌شود. آنزیم‌های موجود در ترکیب پروبیوآنزیم به‌منظور هضم پلی‌ساکاریدهای غیرنشاسته‌ای در منابع پروتئین گیاهی به غذا اضافه شده است. بنابراین استفاده از مکمل‌های آنزیمی گروه گزیلاناز و سلولاز در گونه‌های گیاه‌خوار ضمن داشتن شرایط اسیدی متعادل در دستگاه گوارش منطقی به‌نظر می‌رسد. براساس نتایج پژوهش حاضر، این آنزیم‌ها در تغذیه ماهیان گوشت‌خوار نظیر قزل‌آلای رنگین کمان، با شرایط اسیدی قوی در دستگاه گوارش، عملکرد مطلوبی نداشته و نمی‌توانند تاثیر معنی‌داری بر شاخص‌های رشد و تغذیه داشته باشند. به‌علاوه، بخش باکتریایی ترکیب پروبیوآنزیم، اجتماعی از باکتری‌های پروبیوتیک بوده که در صورت استفاده از ترکیب پروبیوآنزیم با دوز و دوره زمانی مناسب، نقش قابل توجهی در ارتقاء سیستم ایمنی ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان ایفا نموده و قابلیت ماهی را در مواجه با عوامل بیماری‌زا و جلوگیری از بروز عفونت و تلفات افزایش می‌دهد.

بررسی تاثیر پروبیوآنزیم بر شاخص‌های رشد و تغذیه در گونه‌های ماهیان گیاه‌خوار و مقایسه با ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان و ارزیابی میزان مقاومت ماهیان تیمارشده گونه‌های مختلف با پروبیوآنزیم در مقابل باکتری‌های بیماری‌زا از طریق انجام تست مقاومت باکتریایی پیشنهاد می‌گردد.

تشکر و قدردانی

بدین‌وسیله از همکاری صمیمانه مرکز تحقیقات ژنتیک و اصلاح نژاد ماهیان سردابی شهید مطهری تشکر و قدردانی به‌عمل می‌آید. از دانشگاه علوم و فنون دریایی خرمشهر به‌خاطر پشتیبانی مالی از این پژوهش تقدیر و تشکر می‌شود.

منابع

۱. **اسلامی‌فارسانی، ا.، ۱۳۹۰.** بررسی اثر ماده محرک ایمنی ایمونوفن (اسانس گیاه *Echinacea purpurea*) بر اندیس‌های رشد و برخی فاکتورهای خونی و ایمنی ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان انگشت قد. پایان‌نامه کارشناسی‌ارشد. دانشگاه آزاداسلامی‌واحد علوم و تحقیقات اهواز. ۷۵ صفحه.

۲. **امیدی‌زاده، م.؛ ولی‌پور، ن. و پوررضا، ج.، ۱۳۹۳.** اثر پودر سماق و پروبیوآنزیم بر عملکرد و فراسنجه‌های خونی بلدرچین ژاپنی. نشریه علوم دامی(پژوهش و سازندگی). دوره ۱۰۴، شماره ۳، صفحات ۱۸۳ تا ۱۹۴.

۳. **پورمظفر، س.؛ نفیسی‌بهابادی، م.؛ مهاجری، ژ.؛ محمدی، م. و سلیمی‌بجستانی، م. ر.، ۱۳۹۳.** مطالعه اثر ماکروگارد بر پارامترهای رشد، خونی و پاسخ‌های ایمنی قزل‌آلای رنگین‌کمان (*Oncorhynchus mykiss*) مواجه یافته با باکتری استرپتوکوکوس ایناییی(*Streptococcus iniae*). مجله تحقیقات آزمایشگاهی دامپزشکی. دوره ۶، شماره ۱، صفحات ۲۷ تا ۳۶.

۴. **توکمه‌چی، ا.؛ شمسی، ح.؛ مشکینی، س.؛ دلشاد، ر. و قاسمی مغانجوقی، ا.، ۱۳۹۱.** بهبود شاخص‌های رشد و برخی از پارامترهای پاسخ ایمنی ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان (*Oncorhynchus mykiss*) با استفاده توام از پروبیوتیک *Lactobacillus rhamnosus* و ویتامین C. مجله علمی شیلات ایران. سال ۲۱، شماره ۳، صفحات ۱۳ تا ۲۲.

۵. **حسین‌پور، م.، ۱۳۹۳.** ارزیابی عملکرد رشد و بقای لارو میگوی وانامی با استفاده از سطوح مختلف پروبیوآنزیم در جیره غذایی(*Litopenaeus vannamei*). پایان‌نامه دوره کارشناسی‌ارشد رشته تکثیر و پرورش آبزیان. دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان. ۴۱ صفحه.

۶. **حسین‌پور، م.؛ جعفری، و.؛ زنده‌بودی، ع. و حاجی‌مرادلو، ع.، ۱۳۹۴.** تأثیر پروبیوآنزیم جیره بر فعالیت آنزیم‌های هضمی میگوی وانامی (*Litopenaeus vannamei*). فصلنامه علوم و فنون شیلات. سال ۴، شماره ۱، صفحات ۳۳ تا ۴۱.

۷. **رحمتی‌اندانی، ح.؛ توکمه‌چی، ا.؛ مشکینی، س. و ابراهیمی، ه.، ۱۳۸۹.** مقاومت ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان در برابر عفونت با آئروموناس هیدروفیلا و یرسینیا روکری با استفاده از لاکتوباسیلوس‌های جدا شده از روده ماهی کپور معمولی. مجله دامپزشکی ایران. سال ۷، شماره ۲، صفحات ۲۶ تا ۳۷.

۸. **علیشاهی، م.، ۱۳۸۸.** مقدمه‌ای بر ایمنی‌شناسی آبزیان. تالیف سوآین، پی، ساهو، پی. کی.، آیاپان، اس. انتشارات دانشگاه شهید چمران اهواز .۴۹۹ صفحه.

۹. **نامداریان‌راد، ا. و ضیائی‌نژاد، س.، ۱۳۹۲.** اثرات سطوح مختلف پروبیوآنزیم بردرصد بازماندگی و برخی شاخص‌های رشد در بچه ماهی گورامی (*Trichogaster trchopterus*). اولین همایش سراسری کشاورزی و منابع طبیعی پایدار. ۱۰تا ۱۲ بهمن، تهران.

Archive of SID
www.SID.ir

۱۰. **نجفی، ر.؛ دانشیار، م.؛ شیردل، ص. و حسینی، ح.، ۱۳۸۹.** مطالعه تاثیر پروبیوآنزیم و گریندازیم بر عملکرد جوجه‌های گوشتی. خلاصه مقالات چهارمین کنگره علوم دامی کشور. صفحات ۱۰۸۶ تا ۱۰۸۹.

۱۱. **نوبخت، ع.؛ بیگ‌بابایی، ر. و تقی‌زاده، ا.، ۱۳۹۱.** اثرات افزودنی پروبیو آنزیم بر عملکرد و متابولیت‌های خون جوجه‌های گوشتی تغذیه شده با سطوح مختلف گندم و جو. نشریه پژوهش‌های علوم دامی. سال ۲۲، شماره ۳، صفحات ۱ تا ۱۴.

۱۲. **نیک‌پیران، ح.، ۱۳۸۹.** بررسی تاثیر استفاده از ترکیب توربوتوکس و پروبیوآنزیم در جیره غذایی بر عملکرد جوجه‌های گوشتی و تیتر حاصل از واکسن گامبرو. گزارش نهایی طرح پژوهشی دانشگاه آزاد اسلامی. واحد تبریز. ۳۰ صفحه.

۱۳. **یزدی‌صمدی، ب.؛ رضایی، ع. و ولی‌زاده، م.، ۱۳۷۶.** طرح‌های آماری در پژوهش‌های کشاورزی، انتشارات دانشگاه تهران. ۵۴۴ صفحه.

۱۴. **Ai, Q.; Mai, K.; Zhang, W.; Xu, W.; Tan, B.; Zhang, C. and Li, H., 2007.** Effects of exogenous enzyme (phytase, non-starch polysaccaride enzyme) in diets on growth, feed utilization, nitrogen and phosphorus excretion of japanese seabass, *Lateolabrax japonicus*. Comparative Biochemistry and Physiology, Part A: Molecular and Integrative Physiology. Vol. 147, pp: 502-208.

۱۵. **Amar, E.C.; Kiron, V.; Satoh, S. and Watanabe, T., 2004.** Enhancement of innate immunity in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss* Walbaum) associated with dietary intake of carotenoids from natural products. Fish Shellfish Immunology. Vol. 16, pp: 527-537.

۱۶. **Balcazer, J.L.; De Blas, I.; Ruiz-Zarzuela, I.; Vendrell, D.; Girones, O. and Muzquiz, J.L., 2007.** Enhancementof the immuneresponse and protection induced by probiotic lactic acid bacteria against furunculosis in rainbowtrout (*Oncorhynchus mykiss*). FEMS Immunology and Medical Microbiology (Federation of European Microbiological Societies). Vol. 51, pp: 185-193.

۱۷. **Bedford, M.R. and Partridge, G., 2010.** Enzymes in farm animal nutrition (2nd edition).CAB international publication, Bodmin.UK.

۱۸. **Bogevik, A.S., 2015.** Xylanase supplementation in fish feed. Nofima, Norway. 10 p.

۱۹. **Cerezuela, R.; Guardiola, F.A.; Gonzalez, P.; Meseguer, J. And Esteban, A., 2012.** Effects of dietary *Bacillus subtilis*, *Tetraselmis chuii*, and *Phaeodactylum tricornutum*, singularly or in combination, on the immune response and disease resistance of sea bream (*Sparus aurata* L.). Fish and Shellfish Immunology. Vol. 33, pp: 342-349.

۲۰. **Clerton, P.; Troutaud, D.; Verlhac, V.; Gabraudan, J. and Deschaux, P., 2001.** Dietary vitamin E and rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) phagocyte function: effect on gut and head kidney leucocyte. Fish and Shellfish Immunology. Vol. 11, pp: 1-13.

۲۱. **Dalsgaard, J.; Verlhac, V.; Hjermitslev, N.H.; Ekmann, K.S.; Fischer, M.; Klausen, M. and Pedersen, P.B., 2012.** Effects of exogenous enzymes on apparent nutrient digestibility in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) fed diets with high inclusion of plant-based protein. Animal Feed Science Technology. Vol. 171, pp: 181-191.

۲۲. **Davis, D.A.; Samocha, T.N.; Bullis, R.A.; Pantnaik, S.; Browdy, C.L.; Stokes A.D. and Atwood H.L., 2004.** Practical diet for (*Litopenaeus vannamei*). Working towards organic and/or all plant production diet. 16-19 November, Hermosillo, Sonora, Mexico. pp: 202-213.

۲۳. **Drew, M.D.; Racz, V.J.; Gauthier, R. and Thiessen, D.L., 2005.** Effect of adding protease to coextruded flax: pea or canola: pea products on nutrient digestibility and growth performance of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). Animal Feed Science Technology. Vol. 119, pp: 117-128.

۲۴. **Feldman, B.F.; Zinkl, J.G. and Jain, N.C., 2000.** Schalm's Veterinary Hematology. 5th ed. Lippincott Williams and Wilkins. pp: 1120-1124.

۲۵. **Freitag, M., 2007.** Organic acids and salts promote performance and health in animal husbandry. In: Lu¨ cksta¨ dt C, editor. Acidifiers in Animal Nutrition – A Guide for Feed Preservation and Acidification to Promote Animal Performance. 1st ed.: Nottingham University Press, Nottingham, UK. pp: 1-11.

۲۶. **Ganguly, S.; Dora, K.C.; Sarkar, S. and Chowdhury, S., 2013.** Supplementation of prebiotics in fish feed: a review. Reviews in Fish Biology and Fisheries. Vol. 23, pp: 195-199.

۲۷. **Grinde, B.; Lie, O.; Poppe, T. and Salte, R., 1988.** Species and individual variation in lysozyme activity in fish of interest in aquaculture. Aquaculture. Vol. 68, pp: 299-304.

۲۸. **Hoseinifar, S.H.; Mirvaghefi, A.; Mojazi Amiri, B.; Rostami, H.K. and Merrifield, D.L., 2011.** The effects of oligofructose on growth performance, survival and autochthonous intestinal microbiota of beluga (*Huso huso*) juveniles. Aquaculture Nutrition. Vol. 17, pp: 498-504.

۲۹. **Irianto, A. and Austin, B., 2002,** Probiotics in aquaculture (Review). Journal of Fish. Diseases. Vol. 25, pp: 633-642.

۳۰. **Iwama, G. and Nakanishi, T., 1996.** The fish immune system. Academic Press, London. Chapter 3: innate Immunity in fish. pp: 73-114.

۳۱. **Jiang, T.T.; Feng, L.; Liu, Y.; Jiang, W.D.; Jiang, J.; LI, S.H.; Tang, L.; Kuang, S.Y. and Zhou, X.Q., 2014.** Effects of exogenous xylanase supplementation in plant protein-enriched diets on growth performance, intestinal enzyme activities and microflora of juvenile jian carp (*Cyprinus carpio*). Aquaculture Nutrition. Vol. 20, pp: 632-645.

۳۲. **Kruger, N.J., 1996.** The Bradford method for protein quantization. In: Walker, J. M. Ed., the protein protocols Handbook. Vol. 1, Human Press, Totowa, USA. pp: 11-15.

۳۳. **Kubulay, A. and Ulukoy, G., 2002.** The effects of acute stress on rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). Turkish Journal of Zoology. Vol. 26, pp: 249-254.

۳۴. **Lie, O.; Evensen, O.; Sorensen, A. and Froysadal, E., 1989.** Study on lysozyme activity in some fish species. Disease of Aquatic Organism. Vol. 6, pp:1-5.

۳۵. **Lin, S.; Mai, K. and Tan, B., 2007.** Effect of exogenous enzyme supplementation in diets on growth and feed utilization in tilapia (*Oreochromis niloticus*). Aquacul Rese. Vol. 38, pp: 1645-1653.

۳۶. **Liu, B.; Xu, L.; Ge, X.; Xie, J.; Xu, P.; Zhou, Q.; Pan, L. and Zhang, Y., 2013.** Effects of mannan oligosaccharide on the physiological responses, HSP70 gene expression and disease resistance of Allogynogenetic crucian carp (*Carassius auratus* gibelio) under *Aeromonas hydrophila* infection. Fish and shellfish immuno. Vol. 34, pp: 1395-1403.

۳۷. **Liu, C.H.; Chiu, C.H.; Wang, S.W. and Cheng, W., 2012.** Dietary administration of the probiotic, *Bacillus subtilis* E20 enhances the growth, innate immune responses, and disease resistance of the grouper, *Epinephelus coioides*. Fish and Shellfish Immunology. Vol. 33, pp: 699-706.

۳۸. **Magnadottir, B.; Lange, S.; Gudmundsdottir, S.; Bogwald, J. and Dalmo, R.A. 2005.** Ontogeny of humoral immune parameters in fish. Fish and Shellfish Immunology. Vol. 19, pp: 429-439.

Archive of SID

www.SID.ir

۳۹. **Mahmoudzadeh, L.; Meshkini, S.; Tukmehchi, A.; Motalebi Moghanjoghi, A.A. and Mahmoudzadeh, M., 2016.** Effects of dietary *Bacillus subtilis* on growth performance and immune responses in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). Iranian Journal of Fisheries Sciences. Vol. 15, No. 1, pp: 347-359.

۴۰. **Marian, M.P., 2004.** Growth and immune response of juvenile greasy groupers (*Epinephelus tauvina*) fed with herbal antibacterial active principle supplemented diets against *Vibrio harveyi* infections. Aqua. Vol. 237, pp: 9-20.

۴۱. **Martinez Álvarez, R.M.; Morales, A.E. and Sanz, A., 2005.** Antioxidant defenses in fish: biotic and abiotic factors. Rev Fish Biol. Vol. 15, pp: 75-88.

۴۲. **Nayak, S.K.; Swain P. and Mukherjee S.C., 2007.** Effect of dietary supplementation of probiotic and vitamin C on the immune response of Indian major carp, *Labeo rohita* (Ham.). Fish and Shellfish Immunology. Vol. 23, pp: 892-896.

۴۳. **Nayak, S.K., 2010.** Probiotics and immunity: A fish perspective. Fish and Shellfish Immunol. Vol. 29, pp: 2-14.

۴۴. **Nikoskelainen, S.; Ouwehand, A.C.; Bylund, G.; Salminen, S. and Lilius, E., 2003.** Immune enhancement in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) by potential probiotic bacteria (*Lactobacillus rhamnosus*). Fish and Shellfish Immunology. Vol. 15, pp: 443-452.

۴۵. **Panigrahi, A., Kiron, V., Kobayashi, T., Puangkaew, J., Saoh, S. and Sugita, H., 2004.** Immune responses in rainbow trout *Oncorhynchus mykiss* induced by a potential probiotic bacteria *Lactobacillus rhamnosus* JCM 1136. Veterinary immunology and immunopathology. Vol. 102, pp: 379-388.

۴۶. **Panigrahi, A.; Kiron, V.; Puangkaew, J.; Kobayashi, T.; Satoh, S. and Sugita, H., 2005.** The viability of probiotic bacteria as a factor influencing the immune response in rainbow trout *Oncorhynchus mykiss*. Aquaculture. Vol. 243, pp: 241-254.

۴۷. **Pathiratne, A. and Rajapakshe, W., 1998.** Hematological changes associated with epizootic ulcerative syndrome in the Asian Cichlid fish, *Etroplus suratensis*. Asian fisheries science. Vol. 11, pp: 203-211.

۴۸. **Pettersson, A., 2005.** Extracellular enzyme system utilized by the fungas (*Sporotrichum pulverulentum*) for breakdown of cellulase. Europian Journal of Biochemistry. Vol. 5, pp: 193- 206.

۴۹. **Qinghui, A.; Kangsen, M.; Chunxiao, Z.; Qingyuan, D.; Beiping, T. and Zhiguo, L., 2004.** Effect of dietary vitamin C on growth immune response of Japanese seabass, (*Lateolabrax japonicas*). Aquaculture. Vol. 242, pp:489-500.

۵۰. **Raa, J.; Roestad, G.; Engstad, R.E. and Robertsen, B., 1992.** The use of immunostimulants to increase resistance of aquatic organism to microbial infections. In: Shariff IM, Subasin-ghe RP, Arthur JR (eds) Diseases in Asian aquaculture. Health Fish Section, Asian Fisheries Society, Manila. pp: 39-50.

۵۱. **Reyes Becerril, M.; Tovar-Ramírez, D.; Ascencio Valle, F.; Civera Cerecedo, R.; Gracia López, V. and Barbosa Solomieu, V., 2008.** Effects of dietary live yeast *Debaryomyces hansenii* on the immune and antioxidant system in juvenile leopard grouper *Mycteroperca rosacea* exposed to stress. Aquaculture. Vol. 280, No. 1, pp: 39-44.

۵۲. **Ricker, W.E., 1979.** Growth rates and models. Fish Physiology. Vol. 8, pp: 677-743.

۵۳. **Ridha, M.T. and Azad, I.S., 2012.** Preliminary evaluation of growth performance and immune response of Nile tilapia Oreochromis niloticus supplemented with two putative probiotic bacteria. Aquaculture Resea. Vol. 43, pp: 843-852.

۵۴. **Ringo, E.; Dimitroglou, A.; Hoseinifar, S.H. and Davies SJ., 2014.** Prebiotics in finfish: an update. In: Merrifield D, Ringø E, editors. Aquaculture nutrition: gut health, probiotics and prebiotics. Oxford, UK. Wiley Blackwell Publishing.

۵۵. **Sakai, M., 1999.** Current research status of fish immunostimulants. Aquaculture. Vol. 172, pp: 92-63.

۵۶. **Shen, W.Y.; Fu, L.L.; Li, W.F. and Zhu, Y.R., 2010.** Effect of dietary supplementation with *Bacillus subtilis* on the growth, performance, immune response and antioxidant activities of the shrimp (*Litopenaeus vannamei*). Aquaculture Research. Vol. 41, pp: 1691-1698.

۵۷. **Sinha, A.K.; Kumar, V.; Makkar, H.P.S.; De Boeck, G. and Becker, K., 2011.** Non-starch polysaccharides and their role in fish nutrition Areview. Food Chemistry. Vol. 127, pp: 1409-1426.

۵۸. **Siwicki, A.; Klein, P.; Mornad, M.; Wiczka, W. and Studnicka, M., 1998.** Immunostimulatory effects of dimerized lysozyme (KLP - 206) on the non specific defense mechanisms and protection against furunulosis in salmoniels. Veterinary Immunol & Immunopathol. Vol. 61, pp: 369-378.

۵۹. **Soltani, M.; Shafiei, S.; Yosefi, P.; Mosavi, S. and Mokhtari, A., 2014.** Effect of Montanide™ IMS 1312 VG adjuvant on efficacy of *Yersinia ruckeri* vaccine in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). Fish and Shellfish Immunology. Vol. 37, No. 1, pp: 60-65.

۶۰. **Sturkie, P.D., 1995.** Avian physiologhy. (4th ed). Springer Verlag, New York. pp: 115-270.

۶۱. **Sveinbjornsson, B.; Olsen, R. and Paulsen, S., 1996.** Immunocytochemical localization of lysozyme in intestinal eosinophilic granule cells (EGCs) of Atlantic salmon, Salmo salar L. Journal of Fish Disease. Vol. 19, pp: 349-355.

۶۲. **Swain, P.; Dash, S.; Sahoo, P.K.; Routray, P.; Sahoo, S.K.; Gupta, S.D.; Meher, P.K. and Sarangi, N., 2006.** Non-specific immune parameters of brood Indian major carp Labeo rohita and their seasonal variations. Fish and Shellfish Immunology. Vol. 22, pp: 38-43.

۶۳. **Tacon, A.G.J., 1990.** Standard methods for the nutrition and feeding of farmed fish and shrimp Argent Laboratories press. pp: 4-27.

۶۴. **Thomas, S.N.; Edwin, L. and George, V.C., 2003.** Catching efficiency of gill nets and trammel nets for penaeid prawns. Fisheries Research. Vol. 60, pp: 141-150.

۶۵. **Treves Brown, K.M., 2000.** Applied fish pharmacology. Springer publication. 309 p.

۶۶. **Thrall, M.A., 2004.** Veterinary Hematology and Clinical Chemistry. Lippincott Williams and Wilkins, USA. pp: 241:277-288, 402.

۶۷. **Verlhac Trichet, V., 2010.** Nutrition and immunity: an update. Aquaculture Research. Vol. 41, pp: 356-372.

۶۸. **Waley, K. and North, J., 1997.** Haemolytic assays for whole complement activity and individual components. In: (A.W. Dodds and R.B. Sim eds.). Complement: A Practical Approach, Vol. 1, Oxford University Press, Oxford, Great Britain. pp: 19-47.

۶۹. **Webb, A.; Maughan, M. and Knott, M., 2007.** Pest fish profiles (Trichogaster trichopterus Three spot gourami). ACTFR, James Cook University. pp: 5-10.

۷۰. **Yano, T., 1996.** The nonspecific immune system: Humoral defence. In: Iwama G, Nakanishi T (eds.): The Fish Immune System: Organism, Pathogen and Environment. Academic Press, San Diego. pp: 105-157.

۷۱. **Zhou, X.; Tian, Z. and Wang, Y., 2010.** Effect of treatment with probiotics as water additives on tilapia (*Oreochromis niloticus*) growth performance and immune response. FishPhysiology and Biochemistry. Vol. 36, pp: 501-509.

Archive of SID

www.SID.ir