تاثیر غلظت‌های مختلف پروتئین هیدرولیز شده ماهی ساردین و ضایعات کشتارگاهی طیور بر سطح باکتری‌های روده و بقا در لاروهای ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان (*Oncorhynchus mykiss*) در مواجهه با آئرومونا‌س سالمونیسیدا

علی طاهری[۱*]، عبدالمحمد عابدیان‌کناری[۲]، علی معتمدزادگان[۳]، مهران حبیبی‌رضایی[۴]، امین اوجی‌فرد[۵]

چکیده

مطالعه حاضر تاثیر پروتئین هیدرولیز شده بر بازماندگی لارو ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان پس از مواجهه با باکتری را نشان می‌دهد. ٦ جیره غذایی حاوی سطوح متفاوت جایگزینی پروتئین هیدرولیز شده (۱۰، ۲۵ و ۵۰ درصد پروتئین هیدرولیز شده ساردین رنگین‌کمان یا ضایعات کشتارگاهی طیور) مورد استفاده قرار گرفت. بعد از اتمام دوره تغذیه، سیستم گوارش ماهی با استفاده از روش استریل خارج و محتوای کلی کلنی‌ها و باکتری‌های اسید لاکتیک مورد بررسی و سنجش قرار گرفت. همچنین تعداد ٦۰ ماهی ٢٤ ساعت با روش حمام دادن مورد مواجهه با باکتری آئرومونا‌س سالمونیسیدا قرار گرفت. سطح مقاومت نسبی ماهیان ١٤ روز بررسی شد. شمارش کلی کلنی‌ها در جیره ساردین ۲۵٪ و ۵۰٪ بیش از جیره‌های شاهد و ساردین ۱۰٪ بود ($p<۰/۰۵$). در مطالعه باکتری‌های اسید لاکتیک نیز مشخص گردید که تیمارهای شاهد و ساردین ۱۰٪ اختلاف معنی‌داری نداشتند و جیره‌های۲۵ و ۵۰٪ لاکتوباسیلوس بیشتری را دارا بود ($p<۰/۰۵$). در گروه ضایعات کشتارگاهی طیور نیز بیشترین میزان جمعیت باکتری‌ها در تیمارهای ۵۰٪ و ۲۵٪ دیده شد و بیشترین میزان جمعیت لاکتوباسیلوس‌ها در تیمار ضایعات کشتارگاهی طیور ۵۰٪ و کمترین در تیمارهای ۱۰٪ و شاهد بود. مواجهه با ٤/٢ ± ٤٢/٢٢ ٪ مرگ و میر در گروه شاهد موثر بود و سه گروه تغذیه شده با جیره‌های مختلف ساردین رنگین‌کمان نسبت به جیره شاهد ایمنی بیشتری نشان دادند ($p<۰/۰۱$). جیره‌های ساردین ۲۵٪ و ۱۰٪ به ترتیب با ٦ ± ٦٥/٧٨ ٪ و ٢/٢٨ ± ٥٠ ٪ سطح مقاومت نسبی اختلاف معنی‌داری را با هم نشان دادند ($p<۰/۰۵$). تیمارهای ضایعات کشتارگاهی طیور ۲۵٪ و ۱۰٪ به ترتیب با ٤/٥ ± ٥٩/٢ ٪ و ٢/٨ ± ٥٣/٩٤ سطح مقاومت نسبی اختلاف معنی‌داری را با هم نشان ندادند ($p>۰/۰۵$) اما با تیمار ۵۰٪ با سطح مقاومت نسبی ٣/٩٥ ± ٥/٢٦٪ اختلاف معنی‌داری داشتند ($p<۰/۰۰۱$). در مطالعه تاثیر پروتئین هیدرولیز شده ساردین پهلو طلایی بیشتر بود. در نتیجه، پروتئین هیدرولیز شده ساردین پهلو طلایی و ضایعات کشتارگاهی طیور در سطح بهینه ۲۵٪ جایگزینی باعث افزایش بقا، مقاومت به باکتری بیماری‌زای آئرومونا‌س سالمونیسیدا و ایمنی غیر اختصاصی در آلوین‌های ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان می‌شوند.

واژگان کلیدی: *پروتئین هیدرولیز شده، قزل‌آلای رنگین‌کمان، مواجهه، آئرومونا‌س سالمونیسیدا، ایمنی.*

تاریخ دریافت: ۹۱/۸/۱۸ تاریخ پذیرش: ۹۱/۱۱/۱۹

مقدمه

توسعه آبزی پروری در دو دهه گذشته روندی صعودی داشته و نقش بسیار مهمی در ایجاد اشتغال و توسعه روستایی ایفا نموده است. امروزه در اکثر کشورها پرورش انبوه و متراکم جایگزین روش‌های نیمه متراکم و غیر متراکم گردیده است. در تولید متراکم، موجودات آبزی همواره در معرض شرایط نامساعد و بیماری قرار گرفته و این مسئله موجب ابتلا به بیماری‌ها و در نتیجه ضرر و زیان اقتصادی می‌گردد. لذا لازمه توسعه مزارع و استخرهای پرورش ماهی رعایت دقیق اصول بهداشتی و پیشگیری از بیماری‌ها است.

ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان (*Oncorhynchus mykiss*) گونه با ارزش تجاری بالا می باشد و بیماری‌های عفونی باکتریایی در بسیاری از مزارع پرورشی یکی از دلایل عمده کاهش میزان

۱*. استادیار گروه شیلات دانشگاه دریانوردی و علوم دریایی چابهار، دانشکده علوم دریایی.
taheri@cmu.ac.ir
۲. گروه شیلات دانشگاه تربیت مدرس، دانشکده علوم دریایی، نور مازندران
۳. استادیار گروه علوم و صنایع غذایی، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی ساری، مازندران، ایران.
۴. استادیار گروه زیست شناسی دانشگاه تهران، دانشکده علوم پایه، آزمایشگاه بیوتکنولوژی پروتئین.
۵. استادیار دانشگاه خلیج فارس بوشهر، دانشکده منابع طبیعی برازجان، گروه شیلات.

Archive of SID
www.SID.ir

تولید است. شرایط پرورش ماهی در مرحله لاروی در موفقیت یا عدم موفقیت پرورش تاثیر مهمی دارد (۵). در مرحله لاروی، احتمالاً واکنش های متفاوتی بین باکتری و بافت سطحی روده ماهی اتفاق می افتد که می‌تواند منجر به تشکیل میکرو فلور اختصاصی در ماهی گردد و یا زمینه ساز بروز عفونت شود. از این رو برای موفقیت در تولید متراکم و انبوه، استفاده از روش‌هایی برای تقویت سیستم دفاع طبیعی جاندار ضروری به نظر می رسد (۱۷). باکتری‌های آئرومونـاس هیدروفیلا و آئروموناس سالمونیسیدا از عوامل بیماری زا برای بسیاری از گونه‌های آزاد ماهیان می باشند. از روش‌های قابل ذکر برای مقابله با باکتری‌ها در پرورش آبزیان استفاده از داروهای شیمیایی و آنتی بیوتیک‌ها است. البته باید این نکته را در نظر گرفت که داروهای شیمیایی را همیشه نمی توان با یک معیار به کار برد؛ زیرا کارایی و سمیت این مواد در حضور مواد آلی و شرایط فیزیکوشیمیایی آب متغیر است. هم اکنون استفاده از آنتی بیوتیک‌ها به خاطر مضراتی چون ایجاد مقاومت در انسان، سمیت، حساسیت زایی و مخاطرات زیست محیطی اغلب توصیه نمی‌شود (۲۱).

محرک‌های ایمنی، عصاره‌های زیستی و مواد سنتزی هستند که با افزایش عملکرد سلول‌های فاگوسیتیک و فعالیت ضد باکتریایی و نیز با تولید آنتی بادی موجب تحریک پاسخ‌های ایمنی می‌گردند. تحقیقات فراوانی در سال‌های اخیر در توسعه استفاده از مکمل‌های غذایی که در بالا بردن ایمنی در آبزیان نقش دارند، صورت گرفته است.

با توجه به تحقیقات انجام شده در موجودات مختلف، پروتئین هیدرولیز شده دارای نقش متابولیک متعددی از جمله بهبود شاخص‌های ایمنی بدن، افزایش مقاومت به باکتری‌های بیماری زا و بیان ژن شاخص‌های ایمنی است. پروتئین هیدرولیز شده مورد استفاده در جیره ماهی می‌تواند رشد و بقا را افزایش دهد، باعث بلوغ زودرس لوله گوارش شود و روی جمعیت باکتریای روده تاثیر داشته باشد. دلیل این بهبود تعادل اسیدهای آمینه آزاد، پپتیدها و پروتئین ها و تاثیر مثبت آن در هضم و جذب بیان شده است (٤). اما بر اساس گزارش‌ها استفاده بیش از حد از این ماده در تغذیه ماهی می‌تواند تاثیرات منفی بر رشد و بقای موجود داشته باشد. تاثیر پروتئین هیدرولیز شده بر روی جمعیت باکتریایی روده نیز بررسی شده است. در مطالعه Kotzamanis و همکاران در سال ۲۰۰۷ مشخص گردید که جمعیت باکتری ویبریو با افزایش میزان پروتئین هیدرولیز شده در جیره افزایش یافته است (۱۲). آنها عنوان نمودند که میزان و نوع پروتئین هیدرولیز شده بر روی جمعیت ویبریو تاثیر دارد. در مطالعه Hermannsdottir و همکاران در سال ۲۰۰۹ بر روی لارو ماهی هالیبوت اقیانوس اطلس جمعیت باکتری‌های ویبریو و سودوموناس در روده غالب بود اما غذای زنده غنی شده با پروتئین هیدرولیز شده تاثیری روی باکتری‌های روده نداشت (۸).

باید گفت ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان یک گونه سردابی پرورشی استراتژیک در ایران است که سالانه ۷۳٦٤۲ تن تولید می‌شوند (۱) و کار بر روی بهبود رشد و بقای این ماهی از بدو تفریخ باید مورد توجه قرار گیرد (۲). از این رو با توجه به اثرات بسیار متنوع پروتئین هیدرولیز شده جیره بر سامانه‌ی فیزیولوژیک بدن موجودات، مطالعه حاضر به منظور بررسی تاثیر پروتئین هیدرولیز شده ماهی ساردین پهلو طلایی و ضایعات کشتارگاه مرغ بر میزان بازماندگی لاروهای ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان پس از رویارویی با باکتری آئروموناس سالمونیسیدا انجام شده است.

مواد و روش کار

تهیه جیره غذایی و شرایط دوره پرورش

جیره نویسی با نرم افزار lindo (۱۹۹٦) انجام شد و ٦ جیره غذایی حاوی سطوح پروتئینی یکسان (٤۹ درصد پروتئین

www.SID.ir

خام) با سطوح متفاوت جایگزینی پروتئین هیدرولیز شده مورد استفاده قرار گرفت (جدول ۱). این سطوح متشکل از ۱۰، ۲۵ و ۵۰ درصد جایگزینی پروتئین هیدرولیز شده ماهی ساردین رنگین‌کمان و یا ضایعات کشتارگاهی طیور با پودر ماهی بود. یک جیره بدون پروتئین هیدرولیز شده جهت مقایسه به کار رفت. برای تولید جیره‌ها مواد اولیه توسط یک چرخ گوشت نیمه صنعتی (هوتخش، ایران) با مش ۱ به شکل پلت درآمد و در دمای ۶۰ درجه سانتی گراد برای ٤ ساعت خشک شد. این محصول مجدداً الک شد تا مناسب اندازه دهان آلوین‌های ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان باشد. یک طرح آزمایشات کاملا تصادفی شامل ۷ جیره و سه تکرار از هر جیره مورد استفاده قرار گرفت.

جدول ۱ـ ترکیب جیره‌های آزمایشی

	میزان جایگزینی پودر ماهی با پروتئین هیدرولیز شده ساردین پهلو طلایی یا ضایعات کشتارگاهی طیور					
ترکیبات (٪ ماده خشک)	شاهد	ساردین ٪۱۰	ساردین ٪۲۵	ساردین ٪۵۰	ضایعات طیور ٪۱۰	ضایعات طیور ٪۲۵	ضایعات طیور ٪۵۰
پودر ماهی	۷٤/۹۵	٦٥/۹٤	٥۲/٤۲	۲۹/۸۸	٦٥/۰۱	٥۰/۱۱	۲٥/۲٥
پروتئین هیدرولیز شده ساردین	۰	۷/٤۹	۱۸/۷۳	۳۷/٤۷	۰	۰	۰
پروتئین هیدرولیز شده ضایعات کشتارگاهی طیور	۰	۰	۰	۰	۷/٤۹	۱۸/۷۳	۳۷/٤۷
آرد گندم	۱۰	۱۰	۱۰	۱۰	۱۰	۱۰	۱۰
روغن ماهی	٥	٥	٥	٥	٥	٥/۸	٦/٥
روغن سویا	۳/٥	۳/۸	٤	٤/٥	٤/۲	٤/٥	٥/٥
مواد معدنی[1]	۳	۳	۳	۳	۳	۳	۳
ویتامین[2]	۲	۲	۲	۲	۲	۲	۲
آنتی اکسیدان (ویتامین ای)	۰/۰٥	۰/۰٥	۰/۰٥	۰/۰٥	۰/۰٥	۰/۰٥	۰/۰٥
همبند	۱/٥	۱/٥	۱/٥	۱/٥	۱/٥	۱/٥	۱/٥
سلولز	۰	۱/۲۲	۳/۳	٥/٦	۱/۷٤	٤/۳۱	۸/۷۲
آنالیز تقریبی (٪ ماده خشک)							
وزن خشک(٪)	۸٦/٥۸	۸٦/۳۸	۸۷/۲۷	۸٦/۸	۸٦/٤٤	۸٦/٥٥	۸٦/٦۱
پروتئین	٤۹/۱۲	٤۹/۱۸	٤۹/۲٤	٤۹/۲۸	٤۹/۱٦	٤۹/۱۹	٤۹/۲۱
لیپید	۱٦/۷٤	۱٦/٦٥	۱٦/۳٥	۱٦/۸	۱٦/٦۳	۱٦/٥٥	۱٦/۷
خاکستر	۱٥/٥	۱٦/۱	۱٦/٦	۱٦/۹	۱٦/۳	۱٦/٥	۱٦/۷
انرژی خام (کیلوژول بر گرم)	۱۹/۹٤	۱۹/۸	۱۹/٦۸	۱۹/٦۱	۱۹/۷٥	۱۹/۷	۱۹/٦٥
انرژی قابل هضم (کیلوژول بر گرم)	۱۷/۳۱	۱۷/۱۹	۱۷/۱	۱۷/۰٥	۱۷/۱٥	۱۷/۱۲	۱۷/۰۸

[1] (منیزیم، سدیم، آهن، مس، روی، منگنز، سلنیم، ید، آلومینیوم، کبالت)، [2] (استات رتینول، کوله کلسیفرول، استات توکوفرول، منادیون سدیم بی سولفات، تیامین ، ریبوفلاوین، کلسیم دی پانتوتنات، بیوتین، اسید فولیک، بی ۱۲، نیاسین، پیریدوکسین، اسید آسکوربیک، اینوزیتول)

Archive of SID

www.SID.ir

تخم چشم زده ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان در ۲۱ تانک فایبرگلاس قرار گرفت. آب کلرزدایی شده شهری با دمای ۱±۱۰ درجه سانتی گراد استفاده شد. آب درون تانک‌ها ۵۰ تا ۱۰۰ میلی‌لیتر در دقیقه هوادهی شد و آلوین‌ها بعد از ۱۰ روز تفریخ شدند. آلوین‌ها به تعداد ۱۲±۸۲٤ عدد در هر تکرار به کار رفت. آلوین‌های مرده هر روز جمع و میزان غذادهی بر اساس میانگین وزن در سطح اشباع هر سه روز محاسبه گردید. پارامترهای فیزیکوشیمیایی آب هر دو روز یک بار اندازه گیری شد تا از میزان مجاز تجاوز ننماید. دوره نوری ۸:۱٦ روشنایی: تاریکی، مورد استفاده قرار گرفت. در طول پرورش تغذیه به صورت دستی انجام گرفت تا رفتار تغذیه‌ای مشاهده شود (۲).

سنجش بار باکتریایی روده

آنالیز میکروبی یک روز بعد از اتمام دوره تغذیه انجام پذیرفت. ماهی از هر گروه توسط MS-222 بیهوش شد. قبل از جراحی و هموژن کردن، جهت جدا کردن تمام باکتری‌های سطحی، آلوین‌ها با آب مقطر استریل و سپس با الکل ۷٪ شسته شدند و دوباره با آب مقطر استریل شستشو شدند. سیستم گوارش ماهی با استفاده از روش استریل خارج شد و ۱ گرم از محتوای روده هموژن گردید. آنالیز میکروبی توسط تهیه رقت‌های متوالی در محلول نمکی استریل (۰/۸۵٪ کلریدسدیم) از رقت 10^{-1} تا 10^{-7} انجام شد و کشت بر روی محیط کشت تریپتیکاز سویا آگار (TSA) برای سنجش محتوای کلی کلنی‌ها و MRS آگار (Merck) برای سنجش باکتری‌های اسید لاکتیک به روش کشت پور پلت صورت پذیرفت. کشت باکتری‌های اسیدلاکتیک در دمای $37^{\circ}C$ برای ۷۲ ساعت و کشت در محیط تریپتیک سویا آگار برای ٤۸ ساعت در دمای ۲٤ تا $25^{\circ}C$ انجام شد (۲۵). محتوای باکتریهای روده بر اساس واحد تشکیل کلنی (cfu) شمارش گردید.

آزمایش رویارویی با باکتری آئروموناس سالمونی سیدا

بعد از اتمام دوره تغذیه از هر تکرار آزمایش در هر تیمار ٦۰ ماهی جدا شد. باکتری پاتوژن *Aeromonas salmonicida* سویه MT423 از آزمایشگاه میکروبیولوژی مرکز تحقیقات اکولوژی دریای خزر در ساری تهیه شد و برای ۱٦ ساعت در محیط کشت تریپتون سویا براس (TSB, Fluka Biochemika) در دمای $22^{\circ}C$ درون یک انکوباتور شیکر دار با سرعت ۲۰۰ دور در دقیقه رشد داده شد. ماهی با روش حمام دادن در رویارویی با باکتری قرار گرفت. سوسپانسیون باکتریایی با غلظت نهایی 1×10^{5} باکتری در میلی لیتر به هر تانک افزوده شد. ماهی برای ۲٤ ساعت در معرض باکتری قرار گرفت. بعد از زمان انکوباسیون آب تانک ها تعویض شد و آب تخلیه شده برای اطمینان از عدم رها سازی باکتری زنده در محیط زیست توسط محلول پرمنگنات پتاسیم تیمار گردید. ماهی‌ها به طور منظم بررسی و ماهیان مرده ثبت و نگه داری شد (۱۵). ماهی‌ها ۱٤ روز مورد بررسی قرار گرفتند و ماهی مرده برای ایزولاسیون مجدد باکتری مورد استفاده قرار گرفت. مرگ و میر ثبت شد و سطح مقاومت نسبی(RLP) بین ماهیان رویارو شده با باکتری توسط فرمول (۱) سنجش شد.

معادله (۱)

$$\text{سطح مقاومت نسبی} = \frac{\text{درصد مرگ و میر در تیمار مورد نظر}}{\text{درصد مرگ و میر در تیمار شاهد}} \times ۱۰۰$$

Archive of SID
www.SID.ir

آنالیز آماری

آنالیز آماری با استفاده از نرم افزار Graphpad-prism 5 انجام شد. جهت آنالیز داده ها از آنالیز واریانس یک طرفه و جهت مقایسه میانگین‌ها از آزمون دانکن استفاده شد.

نتایج

بار باکتریایی روده

شمارش کلی کلنی‌ها در جدول ۲ آورده شده است. با توجه به جدول مشخص می‌گردد که میکروارگانیسم‌های قابل رشد در میکروفلور باکتریایی روده غالب هستند. شمارش کلنی‌ها در تیمارهای مختلف نشان می دهد که میکروفلورباکتریایی تیمار شاهد و ساردین ۱۰٪ اختلاف معنی‌داری ندارند و این مسئله در مقایسه بین جیره ساردین ۲۵٪ و ۵۰٪ نیز صادق است ($p>0/05$). اما شمارش کلی کلنی‌ها در جیره ساردین۲۵٪ و ۵۰٪ بیش از جیره‌های شاهد و ساردین ۱۰٪ بود ($p<0/05$). در مطالعه باکتری‌های اسید لاکتیک نیز مشخص گردید که تیمارهای شاهد و ساردین ۱۰٪ اختلاف معنی‌داری نداشتند اما جیره‌های ساردین ۲۵٪ و ۵۰٪ اختلاف معنی‌داری نشان دادند و ساردین ۲۵ و ۵۰٪ لاکتوباسیلوس بیشتری را در مقایسه با گروه‌های دیگر دارا بود.

در شمارش کلی کلنی‌ها در گروه ضایعات کشتارگاهی طیور نیز مشخص گردید که تیمارهای شاهد و ۱۰٪ فاقد اختلاف معنی دار هستند و این مسئله در مورد تیمار ۱۰٪ و ۲۵٪ نیز صادق است ($p>0/05$). اما تیمار ۵۰٪ به غیر از تیمار۲۵٪ با تمامی تیمارهای دیگر اختلاف معنی‌داری داشت ($p<0/05$). بر این اساس بیشترین میزان جمعیت باکتری‌ها در تیمارهای ۵۰٪ و ۲۵٪ دیده شد و کمترین مربوط به تیمارهای ۱۰٪ و شاهد بود. همچنین در شمارش لاکتو باسیلوس‌ها تیمارهای شاهد و ۱۰٪ فاقد اختلاف معنی دار بود و تیمارهای ۲۵ و ۵۰٪ دارای اختلاف معنی داری با تمامی تیمارهای دیگر بودند. بیشترین میزان جمعیت لاکتوباسیلوس‌ها در تیمار ضایعات کشتارگاهی طیور ۵۰٪ دیده شد و کمترین در تیمارهای ۱۰٪ و شاهد بود. این مسئله تایید می‌کند که با افزایش سطح پروتئین هیدرولیز شده در جیره رشد کلی باکتری‌ها و لاکتوباسیلوس‌ها در روده آلوین‌های ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان افزایش می‌یابد.

رویارویی با باکتری

مرگ و میر تجمعی آلوین‌های ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان در طول رویارویی ۱٤ روزه در نمودار ۱ آورده شده است. رویارویی با ٤/۲ ± ٤۲/۲۲ ٪ مرگ و میر در گروه شاهد موثر بود. سه گروه تغذیه شده با جیره‌های مختلف ساردین رنگین‌کمان اختلاف معنی‌داری را با جیره شاهد نشان دادند ($p<0/01$) و در ابتدای دوره آزمایش مرگ و میر در این گروهها دیرتر آغاز شد و نسبت به جیره شاهد ایمنی بیشتری نشان دادند. جیره‌های ساردین ۲۵٪ و ۱۰٪ به ترتیب با ٦ ± ٦٥/۷۸ ٪ و ۲/۲۸ ± ۵۰ ٪ سطح مقاومت نسبی اختلاف معنی‌داری را با هم نشان دادند ($p<0/05$) اما با تیمار ۵۰٪ اختلاف معنی داری مشاهده نشد. نتایج نشان می دهد که جیره ساردین ۲۵٪ بقای بیشتری داشت و بعد از آن ساردین ۵۰٪ بقای بیشتری را نشان داد. همچنین در گروه ضایعات کشتارگاه طیور تیمارهای ۱۰٪ و ۲۵٪ اختلاف معنی داری را با جیره شاهد نشان دادند ($p<0/01$) و در ابتدای شروع دوره آزمایش مرگ و میر در این گروه ها دیرتر آغاز شد و نسبت به جیره شاهد مقاومت نشان دادند اما تیمار ۵۰٪ فاقد اختلاف معنی دار بود. تیمارهای ضایعات کشتارگاهی طیور ۲۵٪ و ۱۰٪ به ترتیب با ٤/۵ ± ۵۹/۲ ٪ و ۲/۸ ± ۵۳/۹٤ سطح مقاومت نسبی اختلاف معنی داری را با هم نشان ندادند ($p>0/05$) اما با تیمار ۵۰٪ با سطح مقاومت نسبی ۳/۹۵ ± ۵/۲٦٪ اختلاف معنی‌داری داشتند ($p < 0/001$) (نمودار ۲). نتایج نشان می دهد که جیره ساردین ۲۵٪ بقای بیشتری داشت و جیره‌های ضایعات کشتارگاهی ۲۵ و ۱۰٪ شبیه هم بودند و در این گروه بالاترین ایمنی را داشتند.

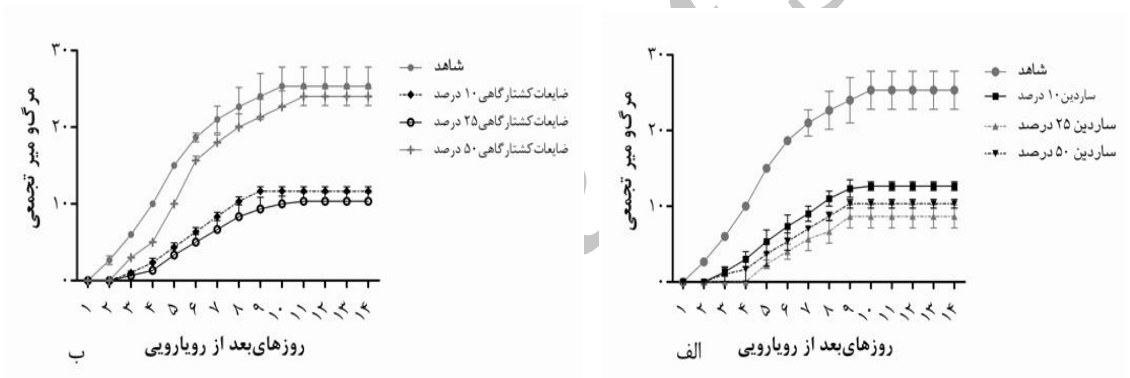
Archive of SID

www.SID.ir

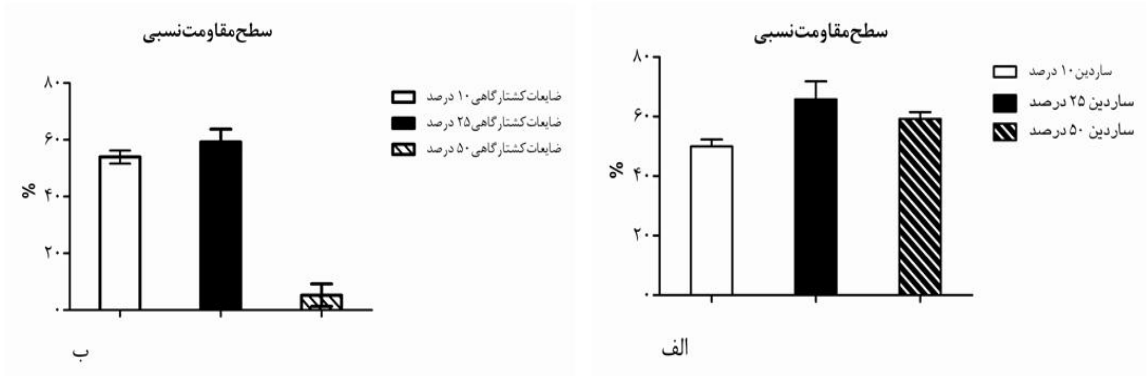
جدول۲ـ فلور باکتریایی روده تیمارهای مختلف آلوین‌های ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان تغذیه شده با جیره‌های مختلف حاوی پروتئین هیدرولیز شده ساردین پهلو طلایی و ضایعات کشتارگاه طیور

تیمار	شمارش کلی کلنی‌ها	لاکتوباسیلوس
شاهد	$۱/٦ \times ۱۰^{۷} \pm ۱/۵^{a}$	$۱/٤ \times ۱۰^{۲} \pm ۱/۵ \times ۱۰^{۱ a}$
ساردین ۱۰ درصد	$۱/٦ \times ۱۰^{۷} \pm ۱/۷^{a}$	$۲/٤ \times ۱۰^{۳} \pm ۲/۵ \times ۱۰^{۱ a}$
ساردین ۲۵ درصد	$۱/۹ \times ۱۰^{۷} \pm ۵^{b}$	$۲/۸ \times ۱۰^{٤} \pm ۵/۷ \times ۱۰^{۱b}$
ساردین ۵۰ درصد	$۲/۱ \times ۱۰^{۷} \pm ۵^{b}$	$۲ \times ۱۰^{٤} \pm ۵/۷ \times ۱۰^{۱c}$
شاهد	$۱/٦ \times ۱۰^{۷} \pm ۱/۵^{a}$	$۱/٤ \times ۱۰^{۲} \pm ۱/۵ \times ۱۰^{۱ a}$
ضایعات کشتارگاهی طیور ۱۰ درصد	$۱/۸ \times ۱۰^{۷} \pm ۱/۵^{ab}$	$۳/۱ \times ۱۰^{۳} \pm ۲/٦ \times ۱۰^{۱ a}$
ضایعات کشتارگاهی طیور ۲۵ درصد	$۱/۹ \times ۱۰^{۷} \pm ۵/۷^{bc}$	$۳/۱ \times ۱۰^{٤} \pm ۵/۷ \times ۱۰^{۲b}$
ضایعات کشتارگاهی طیور ۵۰ درصد	$۲/۲ \times ۱۰^{۷} \pm ۱/۷^{c}$	$٤/۱ \times ۱۰^{٤} \pm ۲/۵ \times ۱۰^{۲c}$

داده‌های با حروف غیر مشابه برای هر گروه در هر ستون دارای اختلاف معنی دار است ($p<۰/۰۵$).



نمودار۱ـ مرگ و میر تجمعی در آلوین‌های ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان تغذیه شده با جیره‌های مختلف حاوی پروتئین هیدرولیز شده ساردین پهلو طلایی (الف) و ضایعات کشتارگاهی طیور (ب) تحت تاثیر باکتری آئروموناس سالمونی سیدا طی ۱٤ روز



نمودار۲ـ سطح مقاومت نسبی در آلوین‌های ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان تغذیه شده با جیره‌های مختلف حاوی پروتئین هیدرولیز شده ساردین پهلو طلایی (الف) و ضایعات کشتارگاهی طیور (ب)

www.SID.ir

بحث

بر اساس مطالعه جمعیت باکتری در این تحقیق مشخص گردید که با افزایش میزان پروتئین هیدرولیز شده در جیره میزان جمعیت باکتریایی در روده آلوین قزل‌آلای رنگین‌کمان نیز افزایش می‌یابد. این افزایش جمعیت تا یک حد بهینه باعث بهبود رشد می گردد و بیش از آن کارایی رشد را کاهش می‌دهد. بسیاری از محققین تاکید دارند که پروتئین هیدرولیز شده می‌تواند برای پرورش باکتری به کار رود و پروتئین هیدرولیز شده تاثیر بسیار خوبی دربالا بردن رشد باکتری دارد. با افزودن مقدار بیشتری از پروتئین هیدرولیز شده در جیره غذایی محیط روده بستر رشد مناسبی برای رشد باکتری‌های مختلف بدست می‌آورد. وقتی ورود پروتئین هیدرولیز شده که پپتیدها و اسیدهای آمینه آزاد مختلفی دارد افزایش می‌یابد مقدار باکتری بیشتری شرایط مناسب برای رشد را بدست می‌آورند. بنابراین با افزایش پروتئین هیدرولیز شده در جیره آلوین‌های ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان مقدار بیشتر و معنی دارتری باکتری می‌تواند در روده رشد کند.

لاکتوباسیلوس‌ها گروهی از باکتری‌های گرم مثبت هستند و محصول اصلی آنها در طول تخمیر کربوهیدرات‌ها، اسید لاکتیک می‌باشد و تعداد زیادی از آنها در گروه پروبیوتیک‌ها می‌باشند(۲۳). از مزایای پروبیوتیک‌ها رقابت با باکتری‌های بیماری‌زا، منبع آنزیمی کمک کننده به هضم غذا و افزایش ایمنی در مقابل باکتری‌های پاتوژن می‌باشد(۹). پروبیوتیک‌ها در ماهی میزان ایمنی را افزایش می دهند مثل فاگوسیتوز توسط نوتروفیل‌ها و ماکروفاژهای ایزوله شده از راس کلیه(۱۸). در ماهیان بار باکتریایی روده با میزبان به شکل نزدیکی در ارتباط است و ترکیب جامعه باکتریایی روده می‌تواند با افزایش پروبیوتیک یا موادی که به رشد آنها کمک کند افزایش یابد. به نظر می‌رسد پروبیوتیک‌ها سطوح گیرنده‌های سلولی را اشغال و اجازه ورود به باکتری‌های بیماریزا به سلول را نمی‌دهند.

مطالعه بار باکتریایی روده نشان می‌دهد که افزایش پروتئین هیدرولیز شده در جیره غذایی می‌تواند جمعیت لاکتوباسیلوس‌ها را افزایش دهد. بر اساس نتایج حاصله این تحقیق به نظر می رسد که پروتئین هیدرولیز شده ساردین پهلو طلایی و ضایعات کشتارگاهی طیور می‌تواند به عنوان یک محیط کشت خوب برای رشد لاکتوباسیلوس‌ها عمل کند.

باربا‌کتریایی روده ماهی نقش مهمی را در سلامت میزبان بازی می‌کند و وجود بار باکتریایی نرمال می‌تواند به عنوان یک سیستم آنزیم هضمی تکمیلی ارزیابی شود. بنابراین فعالیت بهتر آنزیمی گروه‌های تغذیه شده با سطح بهینه پروتئین هیدرولیز شده ممکن است در ارتباط با جمعیت متناسب لاکتوباسیلوس‌ها در روده آنها باشد. این نتایج با گزارش Xu و همکاران در سال ۲۰۰۹ همخوانی دارد که عنوان نمودند افزایش پربیوتیک با میزان مشخص، سیستم آنزیم های هضمی شامل پروتئاز را بهبود می‌بخشد که ممکن است رشد بهتر مشاهده شده در این جیره‌ها را توضیح دهد (۲۷).

برخی مطالعات نشانگر تاثیر پروتئین هیدرولیز شده روی رشد و بقا و افزایش ایمنی غیر اختصاصی گونه های مختلف ماهی بوده است (۱۳). لیزوزوم ها، نوتروفیل‌ها و مکمل‌های ایمنی در ایمنی غیر اختصاصی ماهی در مقابل بیماری بسیار مهم می‌باشند. لکوسیت‌ها مرکز سنتز و ترشح لیزوزیم‌ها در ماهی هستند و حضور لیزوزوم های مادری در بسیاری از گونه‌های ماهیان گزارش شده و فعالیت معنی‌دار لیزوزیم‌ها در مراحل ابتدایی رشد و نمو بسیاری از ماهیان دیده شده است(۳). به دلیل خواص گوناگون پپتیدهای زیست فعال، پروتئین هیدرولیز شده اخیرا توجه ویژه‌ای را به خود اختصاص داده است. غلظت لیزوزیم در ماهی در پاسخ به آلودگی باکتریایی افزایش میابد. افزایش لیزوزیم‌ها را با افزایش فعالیت سیستم ایمنی نیز گزارش شده است(۱۸). در ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان نیز ۲ واریته متفاوت لیزوزومی شناخته شده و یک نوع آن توانایی لیز کردن چندین باکتری گرم مثبت از جمله آئروموناس سالمونی سیدا را

Archive of SID

www.SID.ir

دارد (۷). بر اساس گزارش Hermannsdottir و همکاران در سال ۲۰۰۹، لارو ماهی هالیبوت تغذیه شده با غذای زنده غنی شده با پروتئین هیدرولیز شده تولید لیزوزیم را در لوله گوارش ماهی تحریک می نماید(۸). همچنین عنوان شده است که ۱۰ تا ۱۵٪ پروتئین هیدرولیز شده در جیره می تواند سطح فاکتور C_3 و C_4 سرم خون و ایمنوگلوبولین (IgM) را در لارو ماهی کراکر زرد به شکل معنی‌داری افزایش دهد (۲۶). در روند تولید پروتئین هیدرولیز شده بسیاری از پروتئین های بلند زنجیره به پپتیدهای با وزن مولکولی متفاوت شکسته می شوند. این منبع پپتیدی حاوی مقدار زیادی از زنجیره‌های پپتیدی زیست فعال است و می‌تواند یک منبع بالقوه محرک‌های ایمنی باشد. گزارشاتی از ایجاد پپتیدهای زیست فعال با فعالیت تحریک ایمنی و خواص ضد باکتری در طول پروسه هیدرولیز وجود دارد (۱۲). آزمایشات خارج و داخل موجود زنده نشان داده که پپتیدهای با وزن مولکولی کم موجود در پروتئین هیدرولیز شده واکنش اکسیداتیو و مورفولوژیک را در سلول‌ها تحریک می‌کنند. شاید بتوان چنین عنوان نمود که پروتئین هیدرولیز شده ساردین پهلوطلایی و ضایعات کشتارگاهی طیور نیز از این خاصیت بهره‌مند بوده و ایمنی را در آلوین‌های ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان تحریک می‌نماید.

آئروموناس سالمونیسیدا عامل بیماری فورونکلوز است که یک بیماری مهم در ماهیان آزاد پرورشی است. به دلیل مرگ و میر بالا و خاصیت مسری این بیماری مقادیر زیادی از آنتی بیوتیک‌ها برای جلوگیری و کنترل این بیماری مصرف می شود. در مطالعه حاضر تیمارهای دریافت کننده پروتئین هیدرولیز شده بالاتر از ۱۰٪ به استثنای جیره ضایعات کشتارگاه طیور۵۰٪ سطح مقاومت نسبی معنی‌دارتر و بهتری نسبت به این پاتوژن نشان دادند. این نتیجه می تواند بیانگر افزایش ایمنی غیر اختصاصی در آلوین‌های ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان باشد و شاید پروتئین هیدرولیز شده ساردین پهلو طلایی و ضایعات کشتارگاه طیور حاوی پپتیدهای زیست فعال محرک ایمنی باشند که به این شکل باعث تقویت سیستم ایمنی شوند. تغییر در مکمل‌ها و فعالیت لیزوزوم عموما در ارتباط با حضور یک میکروارگانیسم خارجی است اما ممکن است توسط فاکتور های تغذیه ای تحت تاثیر قرار گیرد. برای مثال منیزیم و کلسیم در فعال سازی مسیرهای مکمل ایمنی مهم هستند. بنابراین استفاده از منابع حاوی استخوان در پروتئین هیدرولیز شده می تواند منیزیم و فسفر و کلسیم را در بدن ماهی افزایش دهد (۲٤) و متعاقباً بر روی فعالیت فاکتورهای کمک ایمنی تاثیر داشته باشد.

اما در خصوص افزایش ایمنی نباید نقش لاکتوباسیلوس‌های موجود در دستگاه گوارش را نادیده گرفت. استفاده از پروبیوتیک‌ها برای افزایش سلامت روده ای جانوران اندوترمیک برای سال ها مطرح بوده است و رقابت بین باکتری پروبیوتیک و پاتوژن در جایگاه اتصال مطرح شده است(۲۲) که باید میکروبیولوژیست‌های ماهی را به بررسی بیشتر در رقابت بین گونه‌های باکتری در روده ماهی ترغیب نماید. پروبیوتیک لاکتوباسیلوس می‌تواند ایمنی را افزایش دهد و از موجود در مقابل باکتری سالمونلای وارد شده به محیط گوارش حفاظت کند(۱۰). مکانیسم‌های متعددی برای اثر ضد باکتریایی پروبیوتیک‌ها عنوان شده است. از آن جمله رقابت بر سر مواد غذایی محدود، محدود کردن چسبندگی پاتوژن‌ها، خنثی کردن سموم پاتوژن‌ها، محدود کردن نفوذ پاتوژن‌ها به بافت اپی تلیال روده، تولید مواد ضد میکروبی و/یا تحریک ایمنی موکوس روده می‌باشد(۱۹). رنجی از باکتریوسین‌ها توسط پروبیوتیک‌ها تولید می‌شوند(۱۱). این باکتریوسین‌ها روی رنج گسترده‌ای از پاتوژن‌های گرم مثبت و گرم منفی اثر بازدارندگی رشد داشته است(۱۹). همچنین نشان داده شده که رشد آئروموناس سالمونیسیدا توسط کشت پروبیوتیک‌ها متوقف شده است (۲۰ و ۱٦، ۱٤). وجود پروبیوتیک‌ها می‌تواند مقاومت غیراختصاصی میزبان به بیماری را افزایش دهد. بعلاوه برخی از مطالعات نشان می‌دهد که لاکتوباسیلوس‌ها عملکرد ایمنی سلولی و خونی در ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان را با افزایش نسبت سلول های فعال فاگوسیتوز در راس کلیه افزایش می‌دهند. در مطالعه حاضر نیز

www.SID.ir

دیده شد که مقاومت نسبی آلوین‌ها به استثنای جیره ضایعات کشتارگاهی طیور ۵۰٪ همبستگی مثبت و معنی داری با جمعیت لاکتوباسیلوس های روده داشته و نشان می‌دهد افزایش سطح لاکتوباسیلوس‌ها در روده در تیمارهای ۱۰٪ و ۲۵٪ باعث افزایش ایمنی می‌شود. اما در مورد گروه ضایعات کشتارگاهی طیور ۵۰٪ وضعیت متفاوت است. همانطور که از نتایج به دست می‌آید این تیمار بیشترین جمعیت لاکتوباسیلوس را دارا می‌باشد اما کمترین سطح مقاومت نسبی در بین کلیه تیمارها را نشان می‌دهد. محققین عنوان کرده‌اند که کاهش pH روده در اثر فعالیت لاکتوباسیلوس‌ها، روده را برای کلنیزه شدن آئرومونـاس سالمونیسیدا مطلوب می‌نماید زیرا این پاتوژن در محیط اسیدی به راحتی رشد می‌کند(٦). بعلاوه کاهش pH روده باعث کاهش فعالیت آنزیم‌های هضمی پروتئین می‌شود که به شرایط ضعیف قلیایی وفق یافته‌اند و در نهایت رشد را کاهش می‌دهد. می‌توان چنین عنوان نمود که شاید افزایش بسیار زیاد لاکتوباسیلوس‌ها در روده آلوین‌ها در تیمار ۵۰٪ باعث اسیدی شدن زیاد محیط روده شده است. محیط اسیدی برای رشد آئرومونـاس سالمونیسیدا مناسب می‌باشد و در نتیجه شاید این پاتوژن تکثیر بسیاری یافته و توانسته بر جمعیت لاکتوباسیلوس ها غلبه یابد و باعث مرگ و میر زیاد آلوین‌ها شده است.

در نتیجه‌گیری می‌توان گفت که پروتئین هیدرولیز شده ساردین پهلو طلایی و ضایعات کشتارگاهی طیور در سطح بهینه این تحقیق باعث افزایش ایمنی غیر اختصاصی در آلوین‌های ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان می‌شود که یا ممکن است به دلیل عملکرد مستقیم پپتیدهای آن در بالا بردن سطح لیزوزیم و فاکتورهای کمک ایمنی خون باشد و یا در اثر عملکرد غیر مستقیم در رشد لاکتوباسیلوس‌ها در روده و تاثیر این باکتری‌ها در ایجاد ایمنی، این مسئله نیاز به بررسی دقیقتر دارد. همچنین احتمال تاثیر سطوح دیگری که در این تحقیق استفاده نشده است نیز محتمل می نماید. همچنین به عنوان نظر پیشنهادی بهتر است این مطالعه بر روی سایر بیماری‌های آبزیان در کشور نیز برنامه‌ریزی شود.

فهرست منابع

۱- سالنامه آماری سازمان شیلات ایران ۱۳۷۹-۱۳۸۸، دفتر برنامه و بودجه، سازمان شیلات ایران. (۱۳۸۹): چاپ اول.

۲- علی طاهری، ع؛ عابدیان کناری، ع؛ حلاج،ر. (۱۳۹۰): تاثیر پروتئین هیدرولیز شده حاصل از ماهی ساردین پهلو طلایی (*Sardinella gibossa*) و ضایعات کشتارگاهی طیور بر ترکیب اسیدهای آمینه، رشد و بقا آلوین‌های ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان (*Oncorhynchus mykiss*). مجله علمی شیلات ایران.

3. Balfry, S.K., Iwama, G.K. (2004): Observations on the inherent variability of measuring lysozyme activity in coho salmon (Oncorhynchus kisutch). Comparative Biochemistry and Physiolgy, B.138: 207–211.
4. Espe, M., Sveier, H., Høgøy, I., Lied, E. (1999): Nutrient absorption and growth of Atlantic salmon (Salmo salar L.) fed fish protein concentrate. Aquaculture, 174: 119–137.
5. Ghosh, K., Sen, S.K., Ray, A.k. (2002). Growth and survival of Rohu, Labeo Rohita, spawn fed diets supplemented with fish intestinal microflora. Acta. Icthology Piscatorial. 32 (1): 83-92.
6. Gildberg, A., Johansen, A., Bogwald, J. (1995): Growth and survival of atlantic salmon (Salmo salar) fry given diets supplemented with fish protein hydrolysate and lactic acid bacteria during a challenge trial with Aeromonas salmonicida. Aquaculture, 138: 23-34.
7. Grinde, B., Jolle´s, J., Jolle´s, P. (1988): Purification and characterization of two lysozymes from rainbow trout (Salmo gairdneri). European Journal of Biochemistry, 173: 269– 273.
8. Hermannsdottir R., Johannsdottir J., Smaradottir H., Sigurgisladottir S., Gudmundsdottir d B.K., Bjornsdottir R. (2009): Analysis of effects induced by a pollock protein hydrolysate on early development, innate immunity and the bacterial community structure of first feeding of Atlantic halibut (Hippoglossus hippoglossus L.) larvae, Fish and Shellfish Immunology, 27: 595–602.

Archive of SID

www.SID.ir

9. Irianto, A., Austin, B. (2002): Probiotics in aquaculture. Journal of Fish Disease, 25: 633–642.
10. Gill, H.S., Shu, Q., Lin, H. et al. (2001). Protection against translocating Salmonella typhimurium infection in mice by feeding the immuno-enhancing probiotic Lactobacillus rhamnosus strain HN001. Medical Microbiology and Immunology (Berlin). 190: 97–104.
11. Jack, R.W., Tagg, J.R., Ray, B. (1995). Bacteriocins of gram-positive bacteria. Microbiological Reviews. 59: 171–200.
12. Kotzamanis, Y.P., Gisbert, E., Gatesoupe, F.J., Zambonino Infante, J., Cahu, C. (2007): Effects of different dietary levels of fish protein hydrolysates on growth, digestive enzymes, gut microbiota, and resistance to Vibrio anguillarum in European sea bass (Dicentrarchus labrax) larvae. Comparative Biochemistry and Physiology. Part A, 147: 205– 214.
13. Liang, M., Wang, J., Chang, Q., Mai, K. (2006): Effects of different levels of fish protein hydrolysate in the diet on the nonspecific immunity of Japanese sea bass، Lateolabrax japonicus (Cuvieret Valenciennes، 1928). Aquaculture Research, 37:102–106.
14. Luis Balca´zar, J., Vendrell, D., de Blas, I., Ruiz-Zarzuela, I., Girone´s, O., Luis Muzquiz, J., (2006). Immune modulation by probiotic strains: Quantification of phagocytosis of Aeromonas salmonicida by leukocytes isolated from gut of rainbow trout (Oncorhynchus mykiss) using a radiolabelling assay. Comparative Immunology, Microbiology & Infectious Diseases. 29: 335–343.
15. Mulder, I.E., Wadsworth, S., Secombes, C.J. (2007): Cytokine expression in the intestine of rainbow trout (Oncorhynchus mykiss) during infection with Aeromonas salmonicida. Fish and Shellfish Immunology. 23: 747-759.
16. Nikoskelainen, S., Ouwehand, A.C., Bylund, G., Salminen, S., Lilius, E. (2003). Immune enhancement in rainbow trout (Oncorhynchus mykiss) by potential probiotic bacteria (Lactobacillus rhamnosus). Fish & Shellfish Immunology. 15:443–452.
17. Olafsen, J.A. (1998): Interaction between hosts and bacteria in aquaculture. European Commission, Belgium. 127- 145.
18. 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 Lactobacillus rhamnosus JCM 1136. Veterinary Immunology and Immunopathology. 102: 379–88.
19. Reid, G., Burton, J. (2002): Use of Lactobacillus to prevent infection by pathogenic bacteria. Microbes and Infection, 4:319- 324.
20. Sakai, M. (1999): Current research status of fish immunostimulants, Aquaculture, 172: 63-92.
21. Serrano, P.H. (2005): Responsible use of antibiotics in aquaculture. FAO Fisheries Technical Paper. 469-497.
22. Servin, A. L., and M.-H. Coconnier. (2003): Adhesion of probiotic strains to the intestinal mucosa and interaction with pathogens. Best Practical Research in Clinical Gastroenterology, 17: 741-754.
23. Stiles, M.E., Holpzapfel, W. (1997): Lactic acid bacteria of foods and their current taxonomy. International Journal of Food Microbiology, 36: 1-29.
24. Sugiura, S.H., Dong, F.M., Rathbone, C.K., Hardy, R.W.(1998): Apparent protein digestibility and mineral availabilities in various feed ingredients for salmonid feeds, Aquaculture,159: 177–202.
25. Suzer, C., Çoban, D., Kamaci, H.O., Saka, Ş., Firat, K., Otgucuoğlu, Ö., Küçüksari, H.(2008): Lactobacillus spp. bacteria as probiotics in gilthead sea bream (Sparus aurata, L.) larvae: Effects on growth performance and digestive enzyme activities. Aquaculture. 280: 140-145.
26. Tang H., Wu T., Zhao Z., Pan X. (2008): Effects of fish protein hydrolysate on growth performance and humoral immune response in large yellow croaker (Pseudosciaena crocea R.), Journal of Zhejiang University Science, B, 9: 684-690.
27. Xu, B., Wang, Y., Li, J., Lin, Q. (2009): Effect of prebiotic xylooligosaccharides on growth performances and digestive enzyme activities of allogynogenetic crucian carp (Carassius auratus gibelio). Fish Physiology and Biochemistry. 35: 351–357.

Archive of SID

www.SID.ir