DOI: 10.22092/vj.2019.126324.1583
شماره ۱۲۹ زمستان ۱۳۹۹
تحقیقات دامپزشکی و فرآورده‌های بیولوژیک

# مقایسه اثر باکتری‌های *Lactobacillus plantarum* و *Lactobacillus rhamnosus* جداشده از ماهی شیربت به‌صورت مجزا و ترکیبی بر عملکرد سیستم ایمنی ماهی کپور معمولی

• **تکاور محمدیان (نویسنده مسئول)**
گروه علوم درمانگاهی، دانشکده دامپزشکی دانشگاه شهید چمران اهواز ، اهواز، ایران.
عضو قطب بهداشت و بیماری‌های ماهیان گرمابی
• **محمد خسروی**
گروه پاتوبیولوژی، دانشکده دامپزشکی دانشگاه شهید چمران اهواز ، اهواز، ایران
• **سجاد منتیان**
دانشکده دامپزشکی دانشگاه شهید چمران اهواز ، اهواز، ایران
• **مجتبی علیشاهی**
گروه علوم درمانگاهی، دانشکده دامپزشکی دانشگاه شهید چمران اهواز ، اهواز، ایران
عضو قطب بهداشت و بیماری‌های ماهیان گرمابی
تاریخ دریافت: ۲۸-۰۲-۱۳۹۸ تاریخ پذیرش: ۳۰-۰۶-۱۳۹۸
Email: takavar_m2002@yahoo.com

## چکیده

**در این تحقیق اثر باکتری‌های *Lactobacillus plantarum* و *Lactobacillus rhamnosus* بومی جدا شده از روده ماهی شیربت بر پاسخ ایمنی ماهی کپور معمولی (*Cyprinuscarpio*) ارزیابی‌شد. بدین منظور تعداد ۳۰۰ قطعه ماهی کپور معمولیبا وزن متوسط ۱۱/۵±۷۰ گرم به‌طور تصادفی به پنج گروه تقسیم و به ترتیب با غذای حاوی ۵×۱۰^۷ CFU/ml *Lactobacillus rhamnosus*، *Lactobacillus plantarum* ۵×۱۰^۷ CFU/ml، ترکیب دو باکتری، ۲۵۰ میلی‌گرم پروبیوتیک تجاری مولتی بهسیل و فاقد پروبیوتیك به مدت ۶۰ روز تغذیه شدند. نمونه خون در روزهای صفر، ۳۰ و ۶۰ از هر گروه اخذ و پارامترهای مختلف ایمنی‌شناسی اندازه‌گیری و مقایسه گردید. همه گروه‌ها در روز ۶۰ آزمایش تحت چالش با باکتری بیماری‌زای *Aeromonas hydrophila* قرار گرفتند. فعالیت لیزوزیم در گروه‌های تیمار شده با رامنوسوس، ترکیبی و پروبیوتیک تجاری در مقایسه با گروه شاهد به صورت معنی‌داری افزایش یافته بود. میزان میلوپراکسیداز تیمار پروبیوتیک تجاری در روز ۳۰افزایش معنی‌داری داشت. همچنین افزایش معنی‌دار احیای NBT در گروه ترکیبی و پروبیوتیک تجاری دیده شد (P<۰/۰۵). قدرت باکتری‌کشی در گروه پلانتاروم و ترکیبی در روز ۳۰ به صورت معنی‌داری بالاتر از گروه شاهد بود. اثر باکتری‌کشی پس از ۶۰ روز در تمامی گروه‌های تیمار شده افزایش معنی‌داری یافت. ایمونوگلوبولین تام در تیمارهای ترکیبی و پلانتاروم به ترتیب در روزهای ۳۰ و ۶۰ دارای افزایش معنی‌دار بود. پس از چالش، گروه جیره ترکیبی، میزان زنده‌مانی بهتری را نسبت به سایر گروه‌ها نشان داد. نتایج به دست آمده نشان داد دو باکتری جدا شده دارای اثرات پروبیوتیکی و تحریک ایمنی مناسب و مقاومت در برابر عوامل بیماری‌زای فرصت‌طلب به ویژه در ترکیب باهم هستند و می‌تواند به عنوان مکمل خوراکی جهت استفاده در جیره خوراکی ماهیان گرمابی مورد استفاد قرار گیرند.**

**کلمات کلیدی: کپور معمولی، لاکتوباسیلوس پلانتاروم، لاکتوباسیلوس رامنوسوس، تحریک ایمنی**

www.SID.ir

Archive of SID



Veterinary Researches & Biological Products No 129 pp: 173-185

**Comparison on the effects of indigenous Lactobacillus plantarum and Lactobacillus rahmnosus separately and combined together in diet on immune system function of Cyprinus carpio**

*By: Mohammadian, T., (Corresponding Author) Department of Clinical Sciences, Faculty of Veterinary Medicine Shahid Chamran University of Ahvaz, Ahvaz, Iran. Member of Excellence Center of War Water Fish Health, Shahid Chamran University of Ahvaz. Khosravi, M., Department of Pathobiology, Faculty of Veterinary Medicine, Shahid Chamran University of Ahvaz, Ahvaz, Iran. Menatian, S., Faculty of Veterinary Medicine, Shahid Chamran University of Ahvaz, Ahvaz, Iran. and Alishahi, M., Department of Clinical Sciences, Faculty of Veterinary Medicine Shahid Chamran University of Ahvaz, Ahvaz, Iran. Member of Excellence Center of War Water Fish Health, Shahid Chamran University of Ahvaz.*

**Received: 2019-05-18** **Accepted: 2019-09-21**

Email: takavar_m2002@yahoo.com

In this research, the effect of *Lactobacillus plantarum* and *Lactobacillus rhamnosus* bacteria isolated from the gut of the domestic fish (Tor grypus) on the immune response of common carp (*Cyprinus carpio*) were evaluated. For this purpose, 300 juvenile carps with average weight of 70 ± 11.5 gr were randomly divided into five groups and were fed with feed containing *Lactobacillus plantarum*, 5×107 CFU/ml *Lactobacillus rhamnosus*, bacteria combination, 250 mg of commercial product of Multi-Behsil probiotic and non-probiotic for 60 days, respectively. Blood samples were taken at days 0, 30 and 60 from each group and immunological parameters were analyzed and compared. All groups were challenged with Aeromonas hydrophila bacteria on day 60 of the experiment. The lysozyme activity in treated groups with rhamnosus, combination and commercial probiotic significantly increased compared with control group. The activity of myeloproxidase in commercial probiotic group had a significant increase on day 30. There was also a significant rise in NBT reduction in the combination and commercial probiotics group ($p < 0.05$). The bactericidal activity in the plantarum and combination group on day 30 was significantly higher than control group. Bactericidal activity increased significantly after 60 days in all treated groups. Total immunoglobulin in combination and plantarumgroup rose significantly on days 30 and 60, respectively. After the challenge, the combination diet showed a better survival rate than other groups. The results showed that the two isolated bacteria had probiotic effects and appropriate immune stimulation, especially asmixture.

**Keyword:** *Cyprinus carpio*, *Lactobacillusplantarum*, *Lactobacillus rhamnosus*,immune stimulation

## مقدمه

در سالیان اخیر استفاده از آبزیان به‌عنوان منبع غذایی با افزایش رشد چشم‌گیری همراه بوده است، به‌طوری‌که در سال ۱۹۹۸، ۱۰ درصد، در سال ۲۰۰۲، ۳۴ درصد و در سال ۲۰۱۴، ۵۱ درصد مصرف غذایی جهان به محصولات آبزیان اختصاص داشته است (FAO،۲۰۱۶). با افزایش رشد جمعیت و بالا رفتن میزان آگاهی انسان‌ها از فواید مصرف آبزیان نظیر ماهی، تقاضای مصرف‌کنندگان محصولات شیلاتی برای این فرآورده‌ها به‌طور روزافزون افزایش پیدا کرده است (Nasopoulou و Zabetakis، ۲۰۱۲). با توجه به گسترش مزارع پرورش ماهی، خصوصاً ماهیان گرمابی، افزایش دانش و آگاهی در مورد فن‌آوری زیستی این نوع ماهیان الزامی به نظر می‌رسد. افزایش تنوع گونه‌ای، تراکم و راندمان تولید از اهداف پیش روی متخصصین این صنعت است. این چشم‌انداز اقتصادی منجر به مشکلاتی اساسی شده است که مهم‌ترین آن‌ها افزایش بیماری‌های ناشی از پروتوزآها، کرم‌های انگلی، قارچ‌ها، باکتری‌ها، ویروس‌ها و نهایتاً سندروم‌ها است که نه‌تنها منجر به کاهش تولید بلکه آلودگی گوشت این آبزیان شده و از این طریق امنیت غذایی جامعه مصرف‌کننده را به خطر انداخته است. لیکن افزایش استفاده از مواد شیمیایی و آنتی‌بیوتیک‌ها منجر به باقی ماندن این مواد در پیکره آبزیان و احتمال انتقالبه مصرف‌کننده، آلودگی منابع آبی و گسترش مقاومت آنتی‌بیوتیکی شده و همچنین خسارات اقتصادی ناشی از عدم وجود بازار جهانی از دلایل قانع‌کننده‌ای برای حذف یا کاهش استفاده از این مواد است (Balcazar و همکاران، ۲۰۰۷).

به‌کارگیری پروبیوتیک‌ها از راه‌کارهای مؤثر در کنترل بیماری است که با توجه به اثرات بالقوه پروبیوتیک‌ها، تمایل زیادی به استفاده



www.SID.ir

Archive of SID


از این فرآورده‌های میکروبی در آبزی‌پروری به وجود آمده است. بسیاری از گونه‌های باکتری‌های اسیدلاکتیک ازجمله لاکتوباسیل‌های موجود در روده‌ی ماهیان سالم قادر به تولید ترکیبات بازدارنده مانند باکتریوسین‌های پپتیدی ضد قارچ، پراکسید هیدروژن و اسیدهای آلی هستند که مانع از رشد عوامل بیماری‌زا می‌شوند (Vine و همکاران، ۲۰۰۴). در حال حاضر محصولات پروبیوتیکی تجاری فراوانی در آبزی‌پروری مورداستفاده قرار می‌گیرد که نتایج حاصل از به‌کارگیری آن‌ها متفاوت بوده است. مولتی بهسیل یک محصول تجاری پروبیوتیکی با تنوع و تعداد میکروارگانیسم‌های بالا می‌باشد که برای انواع طیور (مرغ گوشتی، تخم‌گذار، مرغ‌های مادر، بوقلمون و شترمرغ) و آبزیان (ماهی و میگو) مورداستفاده قرار می‌گیرد. این محصول حاوی میکروارگانیسم‌های *Lactobacillusplantarum*، *Lactobacilluscasei*، *Aspergillus Oryzae*، *Streptococcus salivarius*، *Bacillus amyloliquefaciens*، *Lactobacillusacidophilus*، *Saccharomyces cerevisae*، *Bacillus subtilis*، *Bifidobacterium bifidum*، *Lactococcus lactis*، *Lactobacillusdelbrueckii*، *Lactobacillus rhamnosus*، *Enterococcus faecium* و *Bacillus coagulans* است که به مقدار ۱۰۱۱ CFU/gr در این محصول وجود دارد. سویه‌های موجود در مولتی بهسیل تولیدکننده‌ی اسید لاکتیک بوده و همچنین توانایی تولید آنتی‌بیوتیک باسیتراسین را دارا می‌باشند (Mohammadian و همکاران، ۲۰۱۹).

تعدادی از پژوهش‌ها، اطلاعاتی را درزمینه‌ی پاسخ‌های ایمنی در کپور هندی روهو بعد از تغذیه با *Bacillus subtilis*(Kumar و همکاران، ۲۰۰۸)، *Lactobacillusplantarum* (Giri و همکاران، ۲۰۱۳) و *Pseudomonas aeruginosa*(Giri و همکاران، ۲۰۱۲)، ماهی کاتلا بعد از تغذیه با *Lactobacillusplantarum* و *Bacillus megaterim* (Parthasarathy و همکاران، ۲۰۱۱)، کپور معمولی بعد از تغذیه با *Enterococcus faecium* (Gopalakannan و همکاران، ۲۰۱۱)، کپور کوئی بعد از تغذیه با *Bacillus subtilis*(He و همکاران، ۲۰۱۱) و کپور گیبل بعد از تغذیه با *Saccharomyces cerevisiae*(He و همکاران، ۲۰۱۱) ارائه و مقاومت در برابر چالش با عامل بیماری‌زا نیز مورد مطالعه قرار گرفت. بر اساس گزارشی، استفاده از جیره‌ی غذایی حاوی *Bacillus subtilis* در کپور ماهیان، معمولاً موجب افزایش پاسخ ایمنی و مقاومت در برابر بیماری شده است. بهبود در میزان بقای کپور روهو در برابر *Aeromonas hydrophila* (چالش داخل صفاقی) گزارش‌شده و پاسخ به دوز مصرف مشاهده گردید (Kumar و همکاران، ۲۰۰۸).

با توجه به کمبود اطلاعات در مورداستفاده از پروبیوتیک‌های تجاری در شرایط آزمایشگاهی و همچنین مقایسه آن با اثرات ایمنی‌زایی باکتری‌های درون‌زاد در ماهیان ایران و افزایش گرایش به استفاده از این مواد در آبزی‌پروری، مقایسه اثر پروبیوتیك تجاری مولتی بهسیل با پروبیوتیک‌های درون‌زاد بر فعالیت سیستم ایمنی ماهی کپور معمولی تحت چالش با *Aeromonas hydrophila* به‌عنوان هدف این تحقیق انتخاب‌شده است. در این تحقیق اثر تحریک ایمنی دو باکتری که قبلاً از فلور باکتریایی روده ماهی بومی شیربت جداسازی شده و توان پروبیوتیکی آن‌ها در ماهی شیربت گزارش‌شده بود (محمدیان، ۱۳۹۲)، در ماهی کپور معمولی بررسی گردید.

## مواد و روش‌کار

### طراحی سیستم آزمایشی

در این آزمایش از ۱۵ مخزن ۳۰۰ لیتری استفاده گردید. حجم آب‌گیری آکواریوم‌ها در طول دوره ۲۵۰ لیتر بود. جهت تأمین آب از منبع آب شهری استفاده شد. به این صورت که ابتدا آب شهری در ۴ تانک ۳۰۰ لیتری پلی‌اتیلنی به مدت ۲۴ ساعت ذخیره، هوادهی و کلرزدایی شده و سپس به یک تانک ۲۰۰۰ لیتری پلی‌اتیلنی به‌عنوان منبع ذخیره آب جهت مصرف در طی آزمایش انتقال داده می‌شد.

### تیماربندی ماهی‌ها و ذخیره‌سازی

جهت تیماربندی و ذخیره‌سازی، تعداد ۳۰۰ قطعه ماهی کپور معمولی با میانگین وزنی ۱۱/۵±۷۰ گرم از مرکز تکثیر شهید امانی شوشتر به بخش

جدول ۱-ترکیب شیمیایی جیره غذای تجاری (براساس کاتالوگ کارخانه).

| نوع ترکیبات | میزان (٪) |
|---|---|
| پروتئین | ۳۷ |
| رطوبت | ۸ |
| خاکستر | ۴/۲ |
| چربی | ۹ |
| انرژی خام | ۳۴۵۵ Kcal |


www.SID.ir

Archive of SID



آبزیان دانشکده دامپزشکی دانشگاه شهید چمران اهواز انتقال یافت. به‌منظور سازگاری قبل از شروع آزمایش ماهیان در ۳ تانک ۳۰۰ لیتری پلی‌اتیلنی به مدت ۱۴ روز با شرایط آزمایشگاهی نگه‌داری شدند.در طول دوره سازگاری ماهیان سه بار در روز به میزان حداکثر ۳ درصد وزن بدن با استفاده از جیره غذایی تجاری تغذیه شدند (در این تحقیق ماهیان با غذای کنسانتره ماهیان‌گرمابی‌کارخانه ۲۱ بیضاء شیراز تغذیه شدند). ترکیبات شیمیایی جیره غذایی تجاری دوره سازگاری در جدول (۱) آورده شده است. پس از آماده‌سازی، ماهیان به‌صورت کاملاً تصادفی در۱۵ مخزن دارای هوادهی مناسب توزیع گردیدند (به ازای هر مخزن ۲۰ قطعه ماهی). سپس به‌منظور بررسی اثرات تحریک ایمنی تجویز خوراکی *Lactobacillus rhamnosus* و *Lactobacillusplantarum* جداشده از روده ماهی شیربت (محمدیان و همکاران ۱۳۹۲) در ماهی کپور معمولی، ۵ تیمار غذایی شامل، غذای فاقد مکمل پروبیوتیکی (شاهد)، غذای حاوی لاکتوباسیلوس پلانتاروم با غلظت $5\times10^{7}$ CFU/ml (تیمار ۱)، غذای حاوی *Lactobacillus rhamnosus* با غلظت $5\times10^{7}$ CFU/ml (تیمار ۲)، غذای حاوی *Lactobacillus rhamnosus* و *Lactobacillusplantarum* (به نسبت مساوی) با غلظت $5\times10^{7}$ CFU/ml (تیمار ۳)، ۲۵۰ میلی‌گرم پروبیوتیک تجاری مولتی‌بهسیل در هر کیلوگرم (طبق دستورالعمل شرکت آکوارایموزام) (تیمار ۴) درنظرگرفته شد. هر گروه دارای ۳ تکرار بود.

## تهیه پروبیوتیک‌های مورد استفاده

دو جدایه لاکتوباسیلوس پس از تعیین هویت به روش مولکولی (محمدیان، ۱۳۹۲) که در مقایسه با سایر جدایه‌های لاکتوباسیلی خواص پروبیوتیکی نسبتاً بالاتری داشتند، برای این مرحله انتخاب و تکثیر گردیدند و ازنظر کارایی پروبیوتیکی با مولتی بهسیل(پروبیوتیک تجاری) مورد مقایسه قرار گرفتند.

## آماده‌سازی سوسپانسیون باکتری‌های انتخاب‌شده

جهت آماده‌سازی باکتری‌های لاکتوباسیلوس و افزودن آن‌ها به غذای ماهیان از روش توصیه‌شده توسط Planas و همکاران (۲۰۰۴) و Vine و همکاران (۲۰۰۴) استفاده گردید. پس از رشد، باکتری‌ها با عمل سانتریفیوژ جداسازی و شستشو داده شدند. سپس به کمك لوله‌های استاندارد مك‌فارلند غلظت آن‌ها بر روی $3\times10^{9}$ CFU/ml تنظیم شد. در ادامه به طریق تهیه رقت‌های متوالی هرکدام از پروبیوتیك‌ها با غلظت $5\times10^{7}$ CFU/ml به هر گرم غذا اسپری و غذاها در شرایط کاملاً استریل به میزان لازم وزن شدند. در مرحله بعدغذاها در سینی‌های استریل قرار داده گرفته و به مدت ۲۴ ساعت با رعایت شرایط استریل در دمای آزمایشگاه خشک‌شده و بسته‌بندی گردیدند. جهت اطمینان از تعداد باکتری‌های زنده موجود در غذا، نمونه‌برداری و شمارش باکتریایی غذای حاصل انجام شد. بر روی غذای گروه شاهد فقط سرم فیزیولوژی استریل اسپری گردید (Planas و همکاران،۲۰۰۴).

## ارزیابی تأثیر پروبیوتیک‌ها بر سیستم ایمنی

به‌منظور ارزیابی اثر پروبیوتیک‌ها در روزهای صفر، ۳۰ و ۶۰ پس از تغذیه با پروبیوتیك، از هر تیمار ۹ قطعه ماهی (۳ قطعه ماهی از هر تکرار) خون‌گیری و جداسازی سرم و جداسازی سرم صورت پذیرفت(Mohammadian وهمکاران، ۲۰۱۶). نمونه‌ها تا زمان انجام آزمایش در دمای ۲۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند.آزمایش‌ها روی فعالیت سیستم کمپلمان، لایزوزیم سرم، انفجار تنفسی، میزان پروتئین تام و گلوبولین سرم و نیز توان باکتری‌کشی سرم انجام شد.

جهت اندازه‌گیری فعالیت کمپلمان از آزمایش همولیز در ژل آگارز استفاده گردید (Brata، ۱۹۹۳). برای این‌کار ابتدا آگارز ۱/۵ درصد در بافر فسفات (pH=۷/۲) حاوی ۰/۵ میلی‌مول کلرید منیزیم و ۱/۵ میلی‌مول کلرید کلسیم) تهیه شد. برای اندازه‌گیری میزان فعالیت لایزوزیم سرم از روش کدورت‌سنجی که توسط Mohammadian و همکاران (۲۰۱۶) توصیه شده است، استفاده گردید. غلظت ایمنوگلوبولین تام براساس روش شرح داده شده توسط Mohammadian و همکاران (۲۰۱۶) اندازه‌گیری شد. به طور خلاصه ابتدا پروتئین تام و آلبومین پلاسما با استفاده از کیت شرکت پارس آزمون و دستگاه اتوآنالایزر (مدل Eurolyser، ساخت کشور اتریش) بر اساس واحد گرم بر دسی لیتر اندازه‌گیری شد. میزان ایمونوگلوبولین تام سرم از تفریق میزان آلبومین از پروتئین تام پلاسما محاسبه گردید. برای اندازه‌گیری قدرت باکتری‌کشی سرم از روش توصیه شده توسط Kajita وهمکاران (۱۹۹۰) با کمی تغییرات استفاده شد.برای ارزیابی فعالیت انفجار تنفسی مقدار ۰/۱ میلی‌لیتر از خون حاوی ماده ضد انعقاد در داخل گودهای میکروپلیت تخت قرار داده شد و ۰/۱ میلی‌لیتر نیز محلول ۰/۲ درصد NBT به آن اضافه گردید. پلیت به مدت ۳۰ دقیقه در دمای آزمایشگاه انکوبه شده و سپس ۰/۱ میلی‌لیتر از مخلوط حاصل برداشته و به یک لوله آزمایش حاوی ۲ میلی‌لیتر دی متیل فرمامید اضافه گردید. پس از سانتریفوژ نمونه، جذب نوری مایع رویی در طول موج ۶۲۰ نانومتر اندازه‌گیری شد (Mohammadian و همکاران، ۲۰۱۶). روش مورد اشاره توسط Pulli و همکاران (۲۰۱۳) با تغییراتی جهت بهینه‌سازی ارزیابی فعالیت میلوپراکسیداز استفاده شد؛ مقدار ۱۵ میکرولیتر سرم با ۱۳۵ میکرولیتر بافر HBSS مخلوط شد. ۲۵ میکرولیتر TMB ۲۰ میلی مولار+۲۵ میکرولیتر H2O2۲۲۰ میلی مولار به هر گوده اضافه شد و بعد از ۲ دقیقه ۵۰ میکرولیتر H2SO4 (۴ مولار) به محتویات اضافه گردید و در نهایت جذب نوری مایع رویی در طول‌موج ۴۵۰ نانومتر قرائت شد. برای ارزیابی فعالیت آنتی‌تریپسین سرم مطابق با روش Mohammadian و همکاران (۲۰۱۶)، میزان ۱۰ میکرولیتر از سرم به ۱۰۰ میکرولیتر از محلول Tris-HCl (۱۰۰ میکرولیتر از محلول ۵۰ میلی مولار با pH=۸/۲) محتوی ۲۰ گرم تریپسین اضافه شد. در نمونه کنترل سرم، ۱۰ میکرولیتر از سرم به ۱۰۰ میکرولیتر از محلول Tris-HCl اضافه شد و در نمونه کنترل مثبت، محلول Tris-HCl محتوی ۲۰ گرم تریپسین فاقد سرم بود. نمونه‌ها با اضافه نمودن Tris-HCl به حجم ۲۰۰ میکرولیتر رسانده شدند و یک ساعت در دمای اتاق قرار گرفتند. پس از آن ۲ میلی‌لیتر از سوبسترا (BAPNANa-benzoyl-DL-arginine-p-nitroanilideHCl) با غلظت ۰/۱ میلی‌مولار در Tris-HCl و محتوی ۲۰ میلی‌مولار کلرید کلسیم به همه نمونه‌ها اضافه شد. پس از پانزده دقیقه با اضافه نمودن ۵۰۰ میکرولیتر از اسید استیک ۳۰ درصد واکنش متوقف شد و جذب نوری در طول‌موج ۴۱۰ نانومتر اندازه‌گیری شد. درصد ممانعت از تریپسین با محاسبه تفاضل


www.SID.ir

Archive of SID



طول موج نمونه کنترل مثبت فاقد سرم از هر نمونه، تقسیم بر نمونه کنترل مثبت فاقد سرم محاسبه گردید.

## چالش باکتریایی

### محاسبه LD۵۰

قبل از انجام مطالعه اصلی، طی مراحل زیر میزان کشندگی باکتری *Aeromonas hydrophila* برای ماهی کپور محاسبه گردید. برای این کار *Aeromonas hydrophila* به مدت ۴۸ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد در محیط کشت TSB کشت داده شد. پس‌ازآن به باکتری‌ها به میزانی سرم فیزیولوژی اضافه گردید تا کدورتی معادل لوله شماره‌ی ۱۰ مک‌فارلند ($۳\times۱۰^{۹}$ CFU/ml) حاصل شود. سوسپانسیون حاصل به نحوی رقیق گردید تا سوسپانسیون‌های $۱\times۱۰^{۵}$، $۱\times۱۰^{۶}$، $۱\times۱۰^{۷}$، $۱\times۱۰^{۸}$ و $۱\times۱۰^{۹}$ به دست آمد. از هر رقت از باکتری به ۱۰قطعه ماهی کپور به‌صورت داخل صفاقی تزریق گردید (هر ماهی ۱۰۰ میکرولیتر)، به گروهی نیز به‌عنوان شاهد سرم فیزیولوژی استریل تزریق شد. تلفات هر رقت به مدت ۱۰ روز ثبت و پس از مرگ ماهی‌ها، با کشت اندام‌های داخلی (روده و درون صفاق)، از علت مرگ در اثر عفونت باکتریایی (*Aeromonas hydrophila*) اطمینان حاصل شد (Alishahi و همکاران، ۲۰۱۰). نتایج تلفات تجمعی با استفاده از نرم‌افزار پروبیت آنالیز گردید و غلظت ایجاد کننده ۵۰٪ تلفات (LD۵۰) باکتری به میزان $۲/۷\times۱۰^{۹}$ CFU/ml مشخص شد.

## چالش

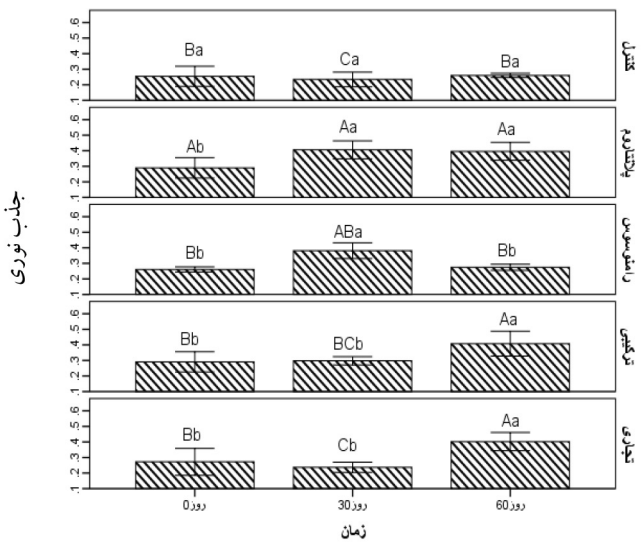
به دنبال مشخص شدن LD۵۰ باکتری آئروموناس هیدروفیلا برای ماهی کپور، بعد از پایان دوره ۶۰ روزه تغذیه با پروبیوتیک، به‌منظور انجام چالش باکتریایی، باقیمانده ماهیان هر تکرار (۱۰ قطعه)، با دوزایجادکننده ۵۰٪ تلفات بعد از ۴ روز (LD۵۰) باکتری آئروموناس هیدروفیلا به‌صورت داخل صفاقی تزریق شده و میزان تلفات در تیمارهای مختلف، به مدت ده روز با دقت بررسی و ثبت گردید. کشت از کبد و کلیه ماهیان تلف‌شده انجام شد تا اطمینان حاصل گردد که ماهی در اثر باکتری آئروموناسهیدروفیلا تلف شده است.

## تجزیه و تحلیل آماری

طرح کلی این تحقیق در قالب طرح کاملاً تصادفی برنامه‌ریزی و اجرا شد. داده‌هابه‌صورت میانگین ±انحراف معیار بیان‌شده‌اند. به جهت تجزیه‌وتحلیل داده‌ها از روش آنالیز واریانس یک‌طرفه جهت اندازه‌گیری اختلاف بین تیمارهای مختلف لاکتوباسیلوس ($P<۰/۰۵$) با استفاده از نرم‌افزار آماری SPSS نسخه ۱۹ استفاده شد. برای بررسی معنی‌دار بودن تفاوت میانگین‌ها از آزمون دانکن استفاده گردید. در تمام بررسی‌ها سطح معنی‌دار آزمون‌ها $P<۰/۰۵$ در نظر گرفته شد. همچنین ترسیم نمودارها نیز در فضای نرم‌افزار Excel (ویرایش ۲۰۰۷) انجام گرفت.

## نتایج

ازلحاظ میزان احیا NBT در روز صفر تفاوت معنی‌داری بین تیمارها مشاهده نشد (شکل ۱). در روز ۳۰ آزمایش تمامی تیمارهای پروبیوتیکی به‌جز تیمار تجاری و ترکیبی با گروه شاهد تفاوت معنی‌داری از خود نشان دادند ($P<۰/۰۵$). در روز ۶۰ تیمار ترکیبی، تجاری و پلانتاروم به



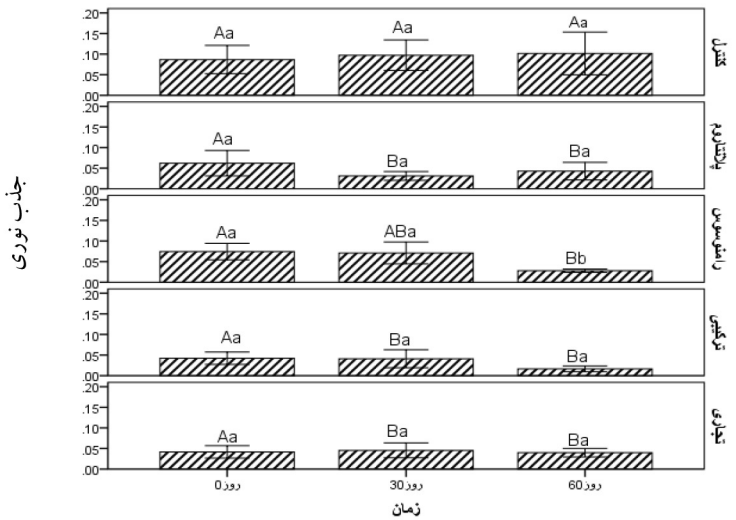

**نمودار ۱- نمودار فعالیت احیا NBT در تیمارهای آزمایشی.**

*** حروف لاتین کوچک غیرمشابه در هر سطر (تیمار) و حروف لاتین بزرگ غیرمشابه در هر ستون (روز آزمایش) نمودار به مفهوم اختلاف معنی‌دار بین میانگین گروه‌های مختلف در سطح اطمینان ۹۵ درصد است.**


www.SID.ir

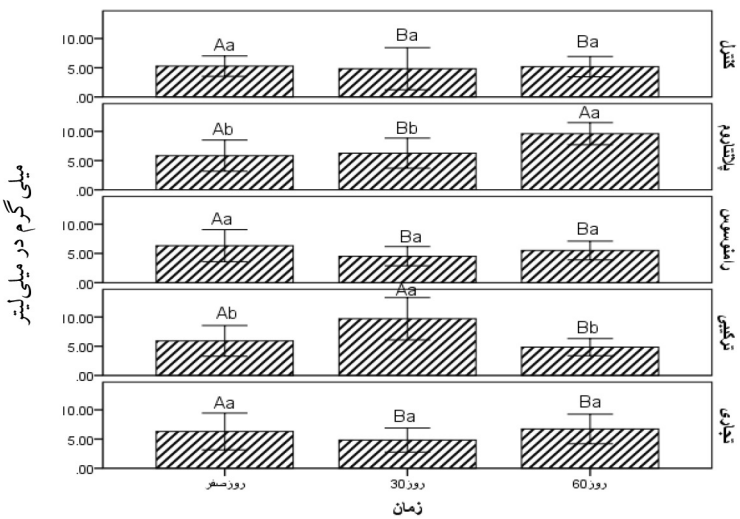
Archive of SID






نمودار ۲-نمودار فعالیت باکتری کشی سرم در تیمارهای آزمایشی.

* حروف لاتین کوچک غیرمشابه در هر سطر (تیمار) و حروف لاتین بزرگ غیرمشابه در هر ستون (روز آزمایش) نمودار به مفهوم اختلاف معنی‌دار بین میانگین گروه‌های مختلف در سطح اطمینان ۹۵ درصد است.




نمودار ۳- نمودار از فعالیت گلوبولین تام سرم در تیمارهای آزمایشی.

* حروف لاتین کوچک غیرمشابه در هر سطر (تیمار) و حروف لاتین بزرگ غیرمشابه در هر ستون (روز آزمایش) نمودار به مفهوم اختلاف معنی‌دار بین میانگین گروه‌های مختلف در سطح اطمینان ۹۵ درصد است.


www.SID.ir

Archive of SID


ترتیب بیش‌ترین میزان فعالیت احیا NBT را از خود نشان دادند و با گروه شاهد تفاوت معنی‌داری داشتند (P<۰/۰۵).

میزان فعالیت باکتری‌کشی در روز صفر تفاوت معنی‌داری بین تیمارها نداشت (نمودار ۲). در روز ۳۰ بیش‌ترین میزان فعالیت باکتری‌کشی مربوط به تیمارهای پلانتاروم و ترکیبی است به‌طوری‌که تفاوت معنی‌داری با گروه شاهد از خود نشان دادند (P<۰/۰۵). در روز ۶۰ تمامی تیمارهای پروبیوتیکی افزایش فعالیت معنی‌داری را نسبت به گروه شاهد از خود نشان دادند (P<۰/۰۵) و بیش‌ترین میزان فعالیت باکتری‌کشی مربوط به گروه ترکیبی بود.

میزان ایمونوگلوبین تام در روز صفر تفاوت معنی‌داری بین تیمارها از خود نشان نداد (نمودار ۳). در روز ۳۰، ایمونوگلوبین تیمار ترکیبی از همه بیش‌تر بوده و اختلاف معنی‌داری با گروهشاهد داشت (P<۰/۰۵). در روز ۶۰ ایمونوگلوبین تیمارپلانتاروم از همه بیش‌تر بود و تفاوت معنی‌داری با سایر گروه‌ها از خود نشان داد (P<۰/۰۵).

میزان فعالیت لایزوزیم در روزصفر تفاوت معنی‌داری در بین تیمارها نداشت (نمودار ۴). علی‌رغم اینکه در روز ۳۰ آزمایش تیمارهای پروبیوتیکی نسبت به گروه شاهد افزایش نشان دادند، تنهادر گروه پروبیوتیکی ترکیبی و تجاری تفاوت معنی‌داری با گروه شاهد مشاهده شد (P<۰/۰۵). در روز ۶۰ بازهم افزایش میزان لایزوزیم نسبت به گروه شاهد در تیمارهای پروبیوتیکی مشاهده گردید، اما تنها گروه رامنوسوس تفاوت معنی‌داری با گروه شاهداز خود نشان داد.

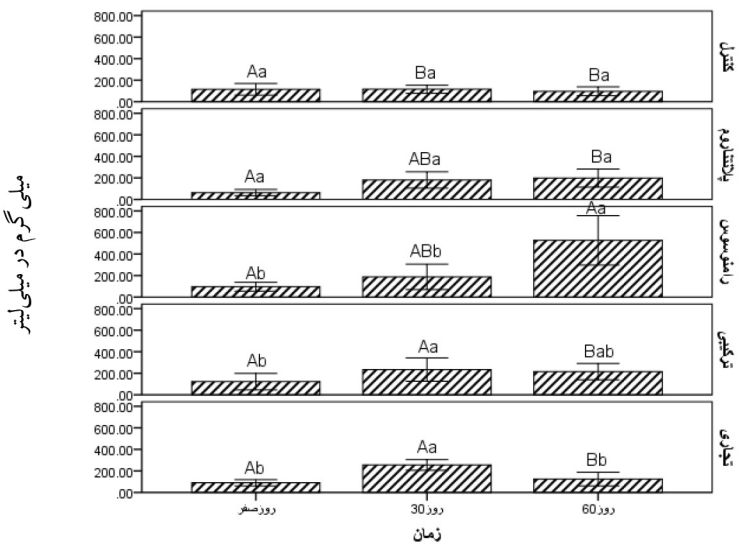
از لحاظ میزان فعالیت میلوپراکسیداز در روز صفر تفاوت معنی‌داری بین تیمارها مشاهده نشد (نمودار ۵). در روز ۳۰ بیش‌ترین میزان فعالیت میلوپراکسیداز در تیمار تجاری بود که تفاوت معنی‌داری با گروه پروبیوتیکی پلانتاروم و رامنوسوس از خود نشان داد. در روز ۶۰ تفاوت معنی‌دار بین تیمارها مشاهده نشد.

## نتایج

از نظر فعالیت آنتی‌تریپسین در روز صفر تفاوت معنی‌داری بین تیمارها مشاهده نشد(نمودار ۶). اما در روز ۳۰ آزمایش بیش‌ترین میزان فعالیت آنتی‌تریپسین در تیمارهایپلانتاروم و ترکیبی دیده شد و در روز ۶۰ تمامی تیمارهای پروبیوتیکی افزایش معنی‌داری را با گروه شاهد از خود نشان دادند (P<۰/۰۵).

نتایج تلفات تجمعی با استفاده ار نرم افزار پروبیت آنالیز گردید و غلظت ایجاد کننده ۵۰٪ تلفات (LD۵۰) باکتری $۲/۷\times۱۰^{۷}$ CFU/ml مشخص شد. نتایج مربوط به تزریق با باکتری *Aeromonas hydrophila* در جدول ۲ آورده شده است.

نتایج مربوط به چالش با باکتری آئروموناس هیدروفیلاکه در پایان دوره تحقیق انجام‌شده نشان داد که در این مرحله مقاومت هر سه تیمار پروبیوتیکی بیش از تیمار شاهد بود. در میان چهار تیمار پروبیوتیکی، سطح مقاومت تیمار دریافت‌کننده ترکیب دو باکتری *Lactobacillus plantarum* و *Lactobacillus rhamnosus* بالاتر از چهار تیمار دیگر قرار



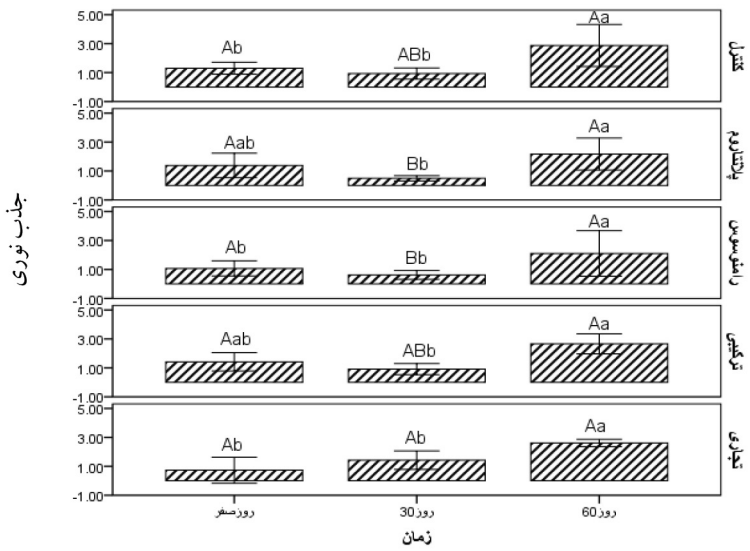

نمودار ۴- نمودار فعالیت لیزوزیم سرم در تیمارهای آزمایشی.

* حروف لاتین کوچک غیرمشابه در هر سطر (تیمار) و حروف لاتین بزرگ غیرمشابه در هر ستون (روز آزمایش) نمودار به مفهوم اختلاف معنی‌دار بین میانگین گروه‌های مختلف در سطح اطمینان ۹۵ درصد است.


www.SID.ir

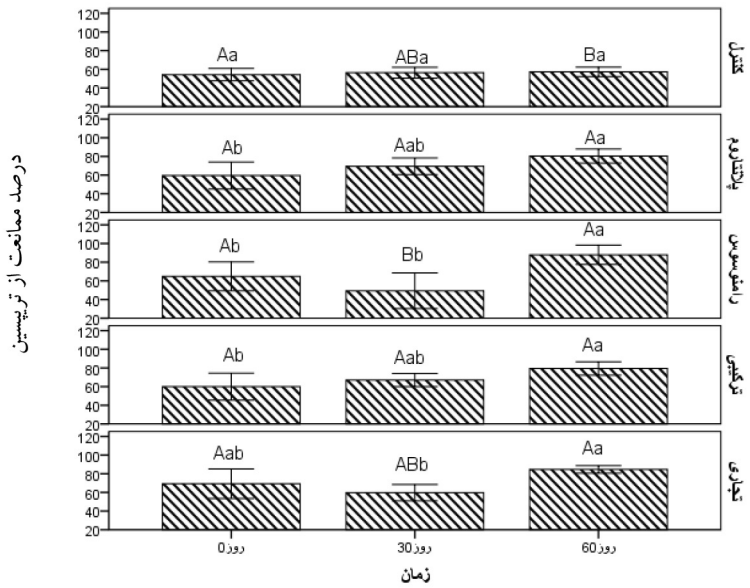
Archive of SID






نمودار ۵- نمودار فعالیت میلوپراکسیداز سرم در تیمارهای آزمایشی.

* حروف لاتین کوچک غیرمشابه در هر سطر (تیمار) و حروف لاتین بزرگ غیرمشابه در هر ستون (روز آزمایش) نمودار به مفهوم اختلاف معنی‌دار بین میانگین گروه‌های مختلف در سطح اطمینان ۹۵ درصد است.




نمودار ۶- نمودار فعالیت آنتی‌تریپسین سرم در تیمارهای آزمایشی.

* حروف لاتین کوچک غیرمشابه در هر سطر (تیمار) و حروف لاتین بزرگ غیرمشابه در هر ستون (روز آزمایش) نمودار به مفهوم اختلاف معنی‌دار بین میانگین گروه‌های مختلف در سطح اطمینان ۹۵ درصد است.


www.SID.ir

Archive of SID


داشت و باهمه آن‌ها اختلاف معنی‌داری نشان داد (P<۰/۰۵).

## بحث

افزودن پروبیوتیک‌ها به جیره غذایی می‌تواند سبب بهبود سلامتی و افزایش رشد شود (Vijavabaskar و Somasundaram، ۲۰۰۸). پروبیوتیک مناسب در هرگونه، باید با شرایط بدن میزبان سازگاری داشته باشد زیرا در این صورت شانس بیشتری برای رقابت با میکروب‌های بومی روده و استقرار در میزبان جدید را خواهد داشت. اثر اتضدمیکروبی پروبیوتیک‌ها به تولید ترکیباتی از قبیل آنتی‌بیوتیک، باکتریوسین،سیدروفور،لایزوزیم، پروتئاز و تغییر pH باتولید اسیدهای آلی مربوط می‌شود (Verrth و همکاران، ۲۰۰۶). در چندین تحقیق، اثرات پروبیوتیک‌ها بر سیستم ایمنی چندین گونه از ماهیان آب شیرین از قبیل کپور ماهیان هندی، تیلاپیا و قزل‌آلا ارزیابی‌شده است. مطالعه حاضر اولین ارزیابی توان ترکیبی باکتری‌های پروبیوتیکی است که از ماهیان منطقه خوزستان جداسازی شده‌اند. از جمله راه‌های انتخاب پروبیوتیک‌ها به‌عنوان فرآورده‌های تجاری، بررسی‌های آزمایشگاهی و استفاده از آن‌ها به همراه غذا در موجود زنده است. دو گونه پروبیوتیک درون‌زاد مورداستفاده در مطالعه حاضر فاقد اثرات بیماری‌زایی در ماهیان بوده‌اند (محمدیان، ۱۳۹۲). غیر بیماری‌زا بودن سویه‌های پروبیوتیکی مطالعه حاضر، همسو بامطالعه Austin و همکاران (۲۰۰۷) بود که تزریق داخل صفاقی و داخل عضلانی پروبیوتیك‌ها در آزاد ماهیان اقیانوس اطلس، تیلاپیا و ماهی کپور هندی فاقد اثرات پاتولوژیك بوده است.

در مطالعه حاضر تأثیر تجویز خوراکی پروبیوتیک‌های *Lactobacillus plantarum* و *Lactobacillus rhamnosus* جداسازی شده از دستگاه گوارش ماهی شیربت بر برخی از شاخص‌های پاسخ ایمنی بچه ماهیان کپور در مقایسه با پروبیوتیک تجاری مولتی بهسیل بررسی شد که نتایج حاصل‌شده به وضوح نشان‌دهنده بهبود پاسخ‌های ایمنی بود.

توانایی باکتری‌های اسیدلاکتیک به خصوص لاکتوباسیلوس‌ها در تقویت ایمنی غیراختصاصی ماهیان مختلف ازجمله قزل‌آلای رنگین‌کمان، در مطالعات محققین قبلی اثبات شده است (Nikoskelainen و همکاران، ۲۰۰۳). ازجمله این موارد می‌توان به تأثیر تجویز خوراکی برخی از سویه‌های باکتری‌های اسیدلاکتیک برافزایش پاسخ ایمنی ازجمله فعالیت بیگانه خواری، انفجار تنفسی بیگانه خوارها، تکثیر لنفوسیت‌ها و سنتز سایتوکین‌ها اشاره نمود (Panigrahi و همکاران، ۲۰۰۷). علی‌رغم شرایط بهینه تهیه و نگهداری نمونه‌های اخذشده (دمای ۲۰- درجه سانتی‌گراد به مدت سه ماه)، اکثر نمونه‌های مطالعه حاضر از نظر فعالیت کمپلمان منفی بودند. با توجه به انجام بررسی هم‌زمان بر روی چند نمونه سرم ماهی کپور که طی چند ساعت قبل از آزمون تهیه شده بود، گذشت زمان دلیل غیرفعال شدن نمونه‌های مطالعه از نظر فعالیت کمپلمان در نظر گرفته شد. در نظر گرفتن شرایط خاص دمایی و زمانی برای ذخیره نمونه‌های سرم این گونه در بررسی‌های آتی پیشنهاد می‌گردد. Giri و همکاران (۲۰۱۳)، با تجویز خوراکی پروبیوتیک *Lactobacillus plantarum*(VSG۳) به جیره غذایی ماهیان کپور هندی روهو، مطلوب‌ترین میزان فعالیت کمپلمان را پس از ۶۰ روز تغذیه با پروبیوتیک نسبت به گروه شاهد مشاهده نمودند. تجویز خوراکی پروبیوتیک‌های *Bacillus subtilis* و *Bacillus coagulans* و گونه لاکتوباسیلوس و گونه آرتروباکتر به ماهی سوکلا توسط Geng و همکاران (۲۰۱۲)، پروبیوتیک *Pseudomonas aeruginosa* بر روی ماهیان کپور هندی روهو توسط Giri و همکاران (۲۰۱۲)، *Lactobacillus plantarum* بر روی ماهی هامور معمولی توسط Son و همکاران (۲۰۰۹) افزایش فعالیت کمپلمان را در برداشت.

فعالیت NBT شاخصی برای تعیین انفجار تنفسی لکوسیت‌ها بعد از بیگانه خواری است (Dalmo و همکاران، ۱۹۹۷). در تحقیق حاضر، بر اساس شکل ۱ مشاهده شد که میزان فعالیت انفجار تنفسی توسط گلبول‌های سفید ماهی کپور معمولی تغذیه‌شده با *Lactobacillus rhamnosus* و *Lactobacillus plantarum* از روز صفر تا روز ۳۰ آزمایش افزایش معنی‌داری پیدا کردند، درصورتی‌که در روز ۶۰ دوره آزمایشی تیمار ترکیبی، تجاری و پلانتاروم بیشترین میزان انفجار تنفسی را داشته و نسبت به گروه شاهد اختلاف معنی‌داری را نشان دادند(P<۰/۰۵). درواقع این افزایش می‌تواند حاکی از تحریک سلول‌های بیگانه‌خوار و متعاقب آن فعالیت انفجار تنفسی پس از ارائه پروبیوتیک به همراه غذا در بدن ماهی باشد که این افزایش فعالیت احیا NBT در تیمار ترکیبی حاکی اثر سینرژیستی دو لاکتوباسیل آزمایشی می‌باشد.در راستای نتایج این تحقیق، Won-Seok و همکاران (۲۰۱۳) با افزودن پروبیوتیک مکمل*Lactococcus lactis* به جیره غذایی کفشک ماهی زیتونی مطلوب‌ترین میزان انفجار

جدول ۲- تلفات ماهی‌های تیمار شده با پروبیوتیک‌های مختلف بعد از چالش با باکتری **Aeromonas hydrophila**.

| جدایه‌ها | پلانتاروم | رامنوسوس | ترکیبی | تجاری | شاهد |
|---|---|---|---|---|---|
| تعداد ماهی‌ها | ۳۰ | ۳۰ | ۳۰ | ۳۰ | ۳۰ |
| تعداد تلفات | ۹ | ۸ | ۰ | ۶ | ۱۲ |
| درصد تلفات | ۳۰±۳ | ۲۶/۶۶±۲ | ۰ | ۲۰±۲ | ۴۰±۳ |


www.SID.ir

Archive of SID



تنفسی را پس از پنج هفته غذادهی در تیمارهای آزمایشی دریافت‌کننده پروبیوتیک نسبت به گروه شاهد مشاهده کرده و اختلاف معنی‌داری بین تیمارهای آزمایشی و گروه شاهد گزارش نمودند (P<۰/۰۵). همچنین Cha و همکاران (۲۰۱۳) در بررسی *Bacillus subtilis* در کفشک ماهی زیتونی، Kumar و همکاران (۲۰۰۸) در مطالعه *Bacillus subtilis* در کپور هندی روهو، به نتایج مشابه تحقیق حاضر دست یافتند.

نتایج مربوط به قدرت باکتری کشی سرم در شکل ۲ آورده شده است. همان‌گونه که نتایج نشان داد، در روز ۳۰ دوره آزمایش، قدرت باکتری کشی سرم تیمار دریافت‌کننده پروبیوتیک *Lactobacillus plantarum* و گروه ترکیبی نسبت به گروه شاهد دارای افزایشی معنی‌دار است. همچنین در روز۶۰ آزمایش قدرت باکتری کشی سرم در تیمارهایی که پروبیوتیک‌های متفاوت دریافت کرده بودند نسبت به گروه شاهد افزایش معنی‌داری داشت (P<۰/۰۵)؛ در مجموع تیمار ترکیبی بهترین عملکرد را در این قسمت از بررسی نشان داد. تجویز پروبیوتیك‌ها در صورت تحریك مناسب پاسخ ایمنی ذاتی منجر به افزایش انواع آنزیم‌ها، رادیکال‌های آزاد اکسیژن، ترکیبات شلاته‌کننده فلزات سنگین و پپتیدهای ضدمیکروبی در سرم خواهد شد. لازم به ذکر است که تاکنون بیش از ۹۰ پپتید ضدمیکروبی در ماهیان شناسایی‌شده است (Wang و همکاران، ۲۰۰۸). نتایج بررسی در مطالعه حاضر شاهدی دال بر این مطلب است. هرچند همان‌گونه که در مباحث پیشین اشاره شد نوع پروبیوتیك، دوز مورداستفاده و گونه ماهی هدف، چگونگی پاسخ سیستم ایمنی را مشخص می‌نماید.

پروتئین‌های پلاسما در انواع مختلف موجودات موردمطالعه قرارگرفته‌اند و بر اساس عملکردشان به گروه‌های مختلف تقسیم-بندی می‌شوند. فراوان‌ترین پروتئین موجود در پلاسما را آلبومین‌هاو گلوبولین‌ها تشکیل می‌دهند. میزان پروتئین تام، آلبومین و گلوبولین سرم خون ماهیان می‌تواند به‌عنوان یک شاخص برای ارزیابی پاسخ‌های ایمنی مورداستفاده قرار گیرد. در این پژوهش میزان پروتئین کل پلاسما در بین تیمارهای آزمایشی ترکیبی و تیمار تجاری در روز ۳۰ و ۶۰ به ترتیب نسبت به گروه شاهد افزایش یافت و این افزایش ازلحاظ آماری معنی‌دار بود (P>۰/۰۵). افزایش پروتئین و گلوبولین پلاسما علاوه بر تأثیر مختلف باکتری رامنوسوس و *Lactobacillus plantarum* و پروبیوتیک تجاری ممکن است به دلایل دیگری همچون پاسخ‌های قوی‌تر ایمنی ذاتی در ماهی مربوط باشد (Wiegertjes و همکاران،۱۹۹۶). در مطالعه حاضر تیمارهای پروبیوتیکی به‌خصوص تیمار ترکیبی، افزایش معنی‌داری در میزان ایمونوگلوبولین سرم در روز ۳۰ داشتند. در روز ۶۰ آزمایش افزایش میزان ایمونوگلوبولین و کاهش پروتئین تام سرم در تیمار پلانتاروم نسبت به سایر تیمارها مشاهده شد (نمودار ۳). نتیجه مطالعه حاضر در مورد تیمار ترکیبی با نتیجه گزارش‌شده توسط Giri و همکاران (۲۰۱۳) که بر روی ماهی کپورهندی روهوبا افزودن پروبیوتیک *Lactobacillus plantarum* به جیره غذایی، میزان ایمونوگلوبولین تا روز ۶۰ کاهش پیدا کرد، مطابقت داشت. در بررسی توکمه‌چی (۱۳۸۷) نیز میزان ایمونوگلوبولین پلاسما ۱۰ روز پس از تغذیه با *Lactobacillus delbrueckii* افزایش معنی‌داری را نسبت به تیمار شاهد نشان می‌دهد. در ضمن ماهیانی که دوز $۵\times۱۰^{۷}$ CUF/gr باکتری *Lactobacillus bulgaricus* را همراه با غذا دریافت کردند، نسبت به بقیه تیمارها دارای بالاترین میزان ایمونوگلوبولین در پلاسمای خود بودند که در تحقیق حاضر نیز در روز ۳۰ و۶۰ در غلظت مشابه این افزایش مشاهده شد.Nikoskelainen و همکاران (۲۰۰۳) مشاهده کردند، اگر *Lactobacillus rhamnosus* با دوز $۲/۸\times۱۰^{۸}$ CUF/g همراه غذا به ماهی قزل‌آلا تجویز شود، میزان ایمونوگلوبولین پلاسما پس از تغذیه با پروبیوتیك افزایش معنی‌داری نسبت به ماهیان گروه شاهد نشان می‌دهند که با نتایج تحقیق حاضر مطابقت دارد.

افزودن پروبیوتیک لاکتوباسیلوس ترکیبی و تجاری به جیره‌ی غذایی ماهیان کپور معمولی در روز ۳۰ مطالعه و تیمار رامنوسوس در روز ۶۰ آزمایش به‌طور معنی‌دار باعث افزایش فعالیت لیزوزیم سرم نسبت به گروه کنترل‌شده است (P<۰/۰۵). در مطالعه Giri و همکاران (۲۰۱۳) با افزودن غلظت‌های مختلف باکتری *Lactobacillus plantarum* به جیره غذایی ماهی روهو، بیشترین میزان فعالیت لیزوزیم سرم در روز ۶۰ در تیمار با غلظت $۱\times۱۰^{۸}$ گزارش شد که متفاوت با یافته‌های بررسی حاضر در ماهی کپور است. همچنین فعالیت لیزوزیم سرم در قزل‌آلای رنگین‌کمان بعد از دو هفته استفاده از جیره‌های غذایی حاوی باکتری اسیدلاکتیک افزایش معنی‌داری را نشان نداد (Balcàzar و همکاران، ۲۰۰۷). افزایش معنی‌دار لیزوزیم سرم در مورد هامور برونئی (Harikrishnan و همکاران، ۲۰۱۰) و هامور معمولی (Son و همکاران، ۲۰۰۹) به ترتیب بعد از دو و چهار هفته تغذیه با جیره حاوی لاکتوباسیلوس به دست آمد. همچنین Panigrahi و همکاران (۲۰۰۷) به افزایش فعالیت لیزوزیم سرم به میزان معنی‌داری در قزل‌آلای رنگین‌کمانتغذیه‌شده با *Lactobacillus rhamnosus* اشاره کردند.با توجه به نتایج لیزوزیم تیمارهای پروبیوتیکی در این مطالعه و بررسی مطالعات سایر محققین این‌چنین برداشت می‌شود که پروبیوتیک‌ها تأثیر مثبتی در روند افزایش فعالیت لیزوزیم دارند اما نوع پروبیوتیك، دوز تجویز و گونه ماهی هدف ازجمله عوامل مؤثر بر چگونگی پاسخ و تغییرات لیزوزیم سرم هستند. همچنین تحریك بیشتر سلول‌های بیگانه‌خوار در تیمار پروبیوتیك ترکیبی، سبب افزایش آنزیم لیزوزیم در این گروه درزمانی کمتر نسبت به سایر گروه‌ها شده است.

میلوپراکسیداز ازجمله آنزیم‌های مهم دخیل در فرآیند تولید اسید هیپوکلروس از رادیکال‌های آزاد برای تخریب عوامل بیماری‌زا می‌باشد. نتایج مربوط به فعالیت میلوپراکسیداز در نمودار ۵ ذکرشده است. در طی انفجار تنفسی، میلوپراکسیداز از گرانول‌های آزروفیلیک سلول‌های نوتروفیل آزاد می‌گردد. در این بررسی، افزایش معنادار فعالیت آنزیم میلوپراکسیداز نسبت به زمان صفر در کلیه گروه‌ها مشاهده شد. در مطالعه حاضر میزان میلوپراکسیداز به‌طور معنی‌داری در تیمارهای تجاری نسبت به گروه کنترل افزایش نشان داد که احتمالاً می‌توان علاوه بر وجود تعداد بالای باکتری‌های پروبیوتیکی به تنوع باکتریایی در این محصول نیز اشاره کرد. این تحقیق مشابه مطالعات، Newaj-Fyzul (۲۰۰۷) بر روی ماهی قزل‌آلا Sun و همکاران (۲۰۱۰) بر روی هامور معمولی بود. افزایش میزان فعالیت این آنزیم در روز ۶۰ نسبت به زمان‌های ۰ و ۳۰ در گروه کنترل مطالعه، ممکن است همانند موارد مشاهده‌شده در انسان (Hamajima و همکاران، ۲۰۰۱؛ Pulli و همکاران، ۲۰۱۳) ناشی از اثر سن بر افزایش فیزیولوژیك فعالیت این آنزیم باشد.


www.SID.ir

Archive of SID


فعالیت آنتی‌پروتئازی سرم و سایر آنتی‌پروتئازهای موجود در بدن ازجمله ۱α-آنتی‌پروتئاز، ۲α-آنتی‌پلاسمین و ۲α-ماکروگلوبولین سبب تأخیر و یا ممانعت از نفوذ عوامل بیماری‌هایی می‌شود که واجد آنزیم‌های تخریب‌کننده پروتئین‌ها هستند. نتایج مربوط به فعالیت آنتی‌تریپسین در نمودار ۶ ذکرشده است. در ماهی‌ها این فعالیت کمتر تحت تأثیر ایمن‌سازی و یا عفونت قرار می‌گیرد. در همه گروه‌های تیمار شده با پروبیوتیك، فعالیت آنتی‌پروتئازی سرم که با درصد ممانعت از فعالیت تریپسین بررسی‌شده بود در روز ۶۰ مطالعه دارای افزایشی معنادار بود. در بررسی انجام‌شده توسط سایر محققین، نتایج مشابهی در این زمینه مشاهده‌شده است. پروبیوتیك‌هایی که از دستگاه گوارش ماهی‌های قزل‌آلا و کپور جداسازی شده بودند، منجر به افزایش فعالیت پروتئازی، تقویت ایمنی ذاتی ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان و کاهش چشم‌گیر تلفات در چالش با عوامل بیماری‌زای باکتریایی آئروموناس، ویبریو، لاکتوکوکوس و استرپتوکوکوس شدند(Brunt و همکاران، ۲۰۰۷). استفاده از *Bacillus subtilis*AB۱ به مدت دو هفته در ماهی قزل‌آلا افزایش معنی‌دار فعالیت ایمنی ذاتی و افزایش فعالیت آنتی‌پروتئازی را در برداشت (Newaj-Fyzul و همکاران، ۲۰۰۷). تیمار کفشک ماهی زیتونی با پروبیوتیك انتروکوکوس فاسیوم پس از ۵ روز سبب افزایش ملایم فعالیت آنتی‌پروتئازی سرم شد (Kim و همکاران، ۲۰۰۶). تأثیر بر بیان ژن‌های مرتبط با فعالیت آنتی‌پروتئازی ازجمله افزایش ده برابر میزان ۲α-میکروگلوبولین که توسط سایر محققین اثبات‌شده است، می‌تواند ازجمله دلایل افزایش معنی‌دار مشاهده شده باشد.

پروبیوتیک‌ها باعث افزایش بازماندگی و مقاومت طبیعی در برابر عوامل نامساعد می‌شوند. در مطالعه حاضر افزایش معنی‌داری در بازماندگی ماهی‌های کپور معمولی در چالش با باکتری آئروموناس مخصوصاً در تیمارهای ترکیبی و تجاری مشاهده شد که همسو با مطالعات انجام‌شده در مارماهی مهاجر اروپایی و کپور ماهیان هندی در برابر عفونت *Aeromonas hydrophila* پس از تغذیه با مکمل غذایی حاوی پروبیوتیك باسیلوس بود (Cao و همکاران، ۲۰۱۱). این افزایش مقاومت در تیمارهای پروبیوتیک را می‌توان به دلیل افزایش پاسخ‌های ایمنی غیراختصاصی تحت تأثیر استفاده از ترکیبی از پروبیوتیک‌ها نسبت داد چرا که میزان لیزوزیم سرم، آنتی‌تریپسین، NBT، میلوپراکسیداز و همچنین باکتری‌کشی در تیمارهای ترکیبی و تجاری دارای افزایش معناداری بود. بر اساس نتایج جدول ۲ با افزودن *Lactobacillus rhamnosus* و *Lactobacillus plantarum* و پروبیوتیک تجاری به جیره غذایی ماهی کپور معمولی پس از روز ۶۰ (پایان دوره آزمایش) و پس‌ازآن تزریق درون صفاقی باکتری *Aeromonas hydrophila*، مقاومت هر چهار تیمار پروبیوتیکی بیش از گروه شاهد بود، اما کاهش تلفات در تیمار دریافت‌کننده‌لاکتوباسیلوس ترکیبی بسیار چشم‌گیر بود (P<۰/۰۵). در مطابقت با نتایج تحقیق کنونی، Gupta و همکاران (۲۰۱۴ و ۲۰۱۶) اثر سه پروبیوتیک خوراکی *Bacillus licheniformis*، *Bacillus coagulans* و *Paenibacillus polymyxa* بر روی عملکرد رشد، ایمنی غیراختصاصی و حفاظت ضد باکتری بیماری‌زای *Aeromonas hydrophila* را موردبررسی قراردادند. نتایج آن‌ها حاکی از ارتقا سیستم ایمنی و مقاومت در برابر باکتری بیماری‌زای *Aeromonas hydrophila* در گروه‌های پروبیوتیکی بود که *Paenibacillus polymyxa* را به‌عنوان یک باکتری دارای پتانسیل بالای پروبیوتیکی معرفی کردند که مشابه تیمار ترکیب در مطالعه حاضر بود.

## نتیجه‌گیری

بر اساس نتایج تحقیق حاضر می‌توان بیان کرد که افزودن پروبیوتیک *Lactobacillus plantarum* و *Lactobacillus rhamnosus* به جیره غذایی ماهی کپور معمولی باعث بهبود برخی شاخص‌های ایمنی از قبیل افزایش فعالیت لایزوزیم سرم، قدرت باکتری‌کشی سرم، میزان گلوبولین پلاسما و فعالیت NBT می‌گردد. هرچند این افزودنی‌های غذایی سبب افزایش مقاومت در برابر عفونت با باکتری *Aeromonas hydrophila* شد و این اثر در مورد تیمار ترکیبی بسیار مشهود بود. لذا بعد از آزمایش‌های تکمیلی می‌توان از این دو پروبیوتیک بومی به همراه هم به‌عنوان یک کاندیدا برای تحریک ایمنی ماهی کپور معمولی در کشور استفاده کرد،چراکه این دو پروبیوتیک دارای اثر سینرژیستی بودند. اطلاعات مطالعه حاضر می‌تواند به استفاده از این پروبیوتیک‌ها در مزارع پرورش ماهی کمک کند، هرچند پیشنهاد می‌شود مطالعات بیش‌تر در جهت ارتقا کیفی محصولات پروبیوتیکی با افزایش سویه‌هایی با پتانسیل بالای پروبیوتیکی در ترکیب با سویه‌های قبل انجام شود.

## تشکر و قدردانی

نویسندگان مقاله از معاونت محترم پژوهشی دانشگاه شهید چمران اهواز و قطب علمی بهداشت بیماری‌های ماهیان گرمابی بدلیل تامین هزینه های پروژه و شرکت مینو مهرگان مهام آکوارایموزام به جهت تأمین پروبیوتیک تجاری تشکر و قدردانی می‌نمایند.

## منابع مورد استفاده

1. Tokmehchi, Amir. (۱۳۸۷). Evaluation of the effect of Lactobacillus delbruecki sp. Bulgaricus (as a probiotic) on some parameters of immune response in rainbow trout. PhD thesis, Faculty of Science, Urmia University.

2. Mohammadian, Takavar. (۱۳۹۲). Evaluation of probiotic potency and immune stimulation of some Lactobacilli isolated from the gut of Tor grypus. PhD Thesis in Aquatic Health, Faculty of Veterinary Medicine, Shahid Chamran University of Ahvaz.

3. Alishahi, M., Ranjbar, MM., Ghorbanpour, M., Peyghan, R., Mesbah, M. and Razijalali, M. (2010). Effects of dietary Aloe vera on specific and nonspecific immunity of Common carp (*Cyprinus carpio*). *Journal of Veterinary Researches*. 4(3):85-91.

4. Austin, B. and Austin, D.A. (2007). Bacterial fish pathogens: diseases of farmed and wild fish.4th Edition. Godalming, Springer-Praxis.

5. Balcazar, J.L., Rojas-Luna, T. and Cunningham, D.P. (2007). Effect of the addition of four potential probiotic strainson the survival of Pacific whiteshrimp *(Litopenaeus vanamei*) following im-


www.SID.ir

Archive of SID



mersion challenge with *vibrio parahaemolyticus. Journal of Invertebrate Pathology*. 96(2):147-150.

6. Brata, O. (1993). Veterinary clinical immunology laboratory. Vol 2. Bar- Lab Inc, pp: 24-25.

7. Brunt, J., Newaj-Fyzul, A. and Austin, B. (2007)The development of probiotics for the control of multiple bacterial diseases of rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum). *Journal of Fish Diseases.* 30(10):573-579.

8.Cha, J., Rahimnejad, S., Yang, S., Kim, K. and Lee, K.(2013). Evaluations of Bacillus spp. as dietary additives on growth performance, innate immunity and disease resistance of olive flounder (*Paralichthysolivaceus*) against Streptococcus iniae and as water additives.*Aquaculture*. 402–403:50–57.

9.Cao, H., He, S., Wei, R., Diong, M. and Lu, L. (2011). *Bacillus amyloliquefaciens* G1: a potential antagonistic bacterium against eel-pathogenic *Aeromonas hydrophila*. Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine.1-7.

10.Dalmo, R.A., Ingebrigtsen, K. and Bqgwald, J. (1997). Non-spcific defence mechanisms in fish, with particular reference to the reticuloendothelial system (RES). *Journal of Fish Diseases.* 20(4):241-273.

11.FAO. (2016). The state of world fisheries and Aquaculture(SOFIA). FAO Fisheries and Aquaculture Department Food and Agriculture organization of the United Nations Rome, Italy. In: http//www.fao.org/docrep/013/i1820e00.htm.

12.Geng, X., Dong, X.H., Tan, B.P., Yang, Q.H., Chi, S.Y., Liu, H.Y., et al. (2012). Effects of dietary probiotic on the growth performance, non-specific immunity and disease resistance of cobia, *Rachycentron canadum*. *AquacultureNutrition*.18(1):46-55.

13.Giri, S.S., Sen, S.S. and Sukumaran, V.(2012). Effects of dietary supplementation of potential probiotic *Pseudomonas aeruginosa* VSG-2 on the innate immunity and disease resistance of tropical freshwater fish, Labeorohita. *Fish and shellfish Immunology.* 32(6):1135-1140.

14.Giri, S.S, Sukumaran, V. and Oviya, M. (2013). Potential probiotic *Lactobacillusplantarum* VSG3 improves the growth, immunity, and disease resistance of tropical freshwater fish, *Labeo rohita*. *Fish and Shellfish Immunology*. 34(2):660-666.

15.Gopalakannan, A., & Arul, V. (2011). Inhibitory activity of probiotic *Enterococcus faecium* MC13 against *Aeromonas hydrophila* confers protection against hemorrhagic septicemia in common carp Cyprinus carpio. *Aquaculture International*, 19(5), 973-985.

16.Gupta, A., Gupta, P. and Dhawan, A. (2016). *Paenibacillus polymyxa* as a water additive improved immune response of *Cyprinus carpio* and disease resistance against *Aeromonashydrophila*. *Aquaculture Reports*.4:86-92.

17.Gupta, A., Gupta, P. and Dhawan, A. (2014). Dietary supplementation of probiotics affects growth, immune response and disease resistance of *Cyprinus carpio* fry. *Fish and shellfish Immunology*. 41(2):113-119.

18.Hamajima, N., Matsuo, K., Suzuki, T., Nakamura, T., Matsuura, A., Tajima, K., et al. (2001). Low expression myeloperoxidase genotype negatively associated with Helicobacter pylori infection. *Japanese Journal of Cancer Research*. 92(5):488-493.

19.Harikrishnan, R., Balasundaram, C. and Heo, M.S. (2010). Lactobacillus sakei BK19 enriched diet enhances the immunity status and disease resistance to streptococcosis infection in kelp grouper, *Epinephelus bruneus*. *Fish and Shellfish Immunology*. 29(6):1037-43.

20.He S, Liu W, Zhou Z, Mao W, Ren P, Marubashi T, Ringo E (2011) Evaluation of probiotic strain *Bacillus subtilis* C-3102 as a feed supplement for koi carp (*Cyprinuscarpio*). *J Aquac Res Development*. doi:10.4172 /2155-9546.S1-005.

21.He, S., Wan, Q., Ren, P., Yang, Y., Yao, F., & Zhou, Z. (2011). The effect of dietary Saccharoculture on growth performance, non-specific immunity and autochthonous gut microbiota of gibel carp *Carassius auratus*. *Journal of Aquaculture Research and Development* S, 1, 010.

22.Kajita, Y., Sakai, M., Atsuta, S. and Kobayash, M. (1990). The immunonodulatory effects oflevamisole on rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss. Fish Pathology*. 25(2):93-98.

23.Kim, D.H. and Austin, B. (2006). Cytokine expression in leucocytes and gut cells of rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum), induced by probiotics. *Veterinary Immunology and Immunopathology*. 114(3-4):297-304.

24.Kumar, R., Mukherjee, S.C., Ranjan, R. and Nayak, S.k. (2008). Enhanced innate immune parameters in *Labeo rohita* (Ham.) following oral administration of *Bacillus subtilis*. *Fish andShellfish Immunology*. 24(2):168-172.

25.Mohammadian, T., Alishahi, M., Tabandeh, M. R., Ghorbanpoor, M., Gharibi, D., Tollabi, M., et al.(2016). Probiotic effects of *Lactobacillus plantarum* and *L. delbrueckiissp. bulguricus* on some immune-related parameters in Barbus grypus. *Aquaculture International.* 24(1):225–242.

26.Mohammadian, T, Nasirpour, M, Tabandeh, MR, Heidary, AA, Ghanei-Motlagh, R,Hosseini, SS (2019). Administrations of autochthonous probiotics altered juvenile rainbow trout *Oncorhynchus mykiss* health status, growth performance and resistance to *Lactococcusgarvieae*, an experimental infection. *Fish & shellfish immunology,* 86:269-279.



www.SID.ir

Archive of SID


27.Nasopoulou, C. and Zabetakis, I. (2012). Benefits of fish oil replacement by plant originated oils in compounded fish feed. A review. *LWT-Food Science and Technology*. 47(2):217-294.

28.Newaj-Fyzul, A, Adesiyun, A.A., Mutani, A., Ramsubhag, A., Brunt, J. and Austin, B. (2007). *Bacillus subtilis*AB1 controls Aeromonasinfection in rainbow trout *(Oncorhynchus mykiss*, Walbaum). *Journal of Applied Microbiology.* 103(5):1699-1706.

29.Nikoskelainen, S., Ouwehand, A.C., Bylund, G., Salminen, S. and Lilius, E.M. (2003). Immune enhancement in rainbow trout *(Oncorhynchusmykiss*) by potential bacteria (*Lactobacilusrhamnosus*). *Fish and Shellfish Immunology*. 15(5):443-452.

30.Parthasarathy, R., & Ravi, D. (2011). Probiotic bacteria as growth promoter and biocontrol agent against *Aeromonas hydrophila* in *Catla catla* (Hamilton, 1822). *Indian Journal of Fisheries*, 58(3), 87-93.

31.Panigrahi, A., Kiron, V., Satoh, S., Hirono, I., Kobayashi, T., Sugita, H., et al.(2007). Immune modulation and expression of cytokine genes in rainbow trout *Oncorhynchus mykiss* upon probiotic feeding. *Developmental and Comparative Immunology.* 31(4):372-382.

32.Pulli, B., Ali, M., Forghani, R., Schob, S., Hsieh, K.L., Wojtkiewicz, G., et al. (2013). Measuring myeloperoxidase activity in biological samples. *PLoS One*.8(7):e67976.

33.Planas, M., Vazquez, J.A., Marques, J., Peres-Lomba, R., Gonzalez, M.P. and Murado, M. (2004). Enhancement of rotifer (*Brachionus plicatilis*) growth by using terrestrial lactic acid bacteria. *Aquaculture.* 240(1-4):313-329.

34.Son, VM., Chang, C.C., Wu, M.C., Guu, Y.K., Chiu, C.H., Cheng, W.)2009(. Dietary administration of the probiotic, *Lactobacillus plantarum*, enhanced the growth, innate immune responses, and disease resistance of the grouper *Epinephelus coioides*. *Fish Shellfish Immunol*;26:691-8.

35.Sun, Y.Z., Yang, H.L., Ma, R.L. and Lin, W.Y.(2010). Probiotic applications of two dominant gut Bacillus strains with antagonistic activity improved the growth performance and immune responses of grouper *Epinephelus coioides*. *Fish andShellfish Immunology*. 29(5):803-809.

36.Verreth, J., Schrama, J., Hartemink, R. and Bucio, A. (2006). Presence of lactobacilli in the intestinal content of freshwater fish from a river and from a farm with a recirculation system. *Food Microbiology*. 23(5):476-482.

37.Vijavabaskar, P. and Somasundaram, S. (2008). Isolation of bacteriocin producing lactic acid bacteria from fish gut and probiotic activity against common fresh water fish pathogen *Aeromonas hydrophila*. *Biotechnology*. 7(1):124-128.

38.Vine, N.G., Leukes, W.D., Kaiser, H., Daya, S., Baxter, J. and Hecht, T. (2004). Competition for attachment of aquaculture candidate probiotic and pathogenic bacteria on fish intestinal mucus. *Journal of Fish Disease*. 27(6):319-326.

39.Wang, Y.B., Tian, Z., Yao, J. and Li, W. (2008). Effect of probiotics, *Enteroccusfaecium*, on tilapia (*Oreochromis niloticus*) growth performance and immune response. *Aquaculture*. 277(3-4):203-207.

40.Wiegertjes, G.F., Stet, R.M., Parmentier, H.K. and van Muiswinkel, W.B. (1996). Immunogenetics of disease resistance in fish: a comparative approach. *Developmental and Comparative Immunology*. 20(6):365-381.

41.Won-Seok, H.,Yu–Ri, K., Eun–Young,K., Sungchul, C.B. and In–Soo, K. (2013).Effects of dietary probiotic, Lactococus Lactis Subsp. lactis 12, Supplementation on the growth and immune response of olive flounder (*Paralichthyolivaceus*). *Aquaculture*. 376-379:20-24.


www.SID.ir