Archive of SID

فیزیولوژی و بیوتکنولوژی آبزیان
سال سوم، شماره سوم، پاییز ۱۳۹۴

اثر محافظتی پری‌بیوتیک تجاری ایمونوژن بر عوارض هیستوپاتولوژیک کبد ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان (*Oncorhynchus mykiss*) در مواجهه تجربی با عفونت *Aeromonas hydrophila*

سید علی اکبر هدایتی[۱]، حامد غفاری فارسانی[۲]*، پگاه قشلاقی[۳]، الهه چهارده بالادهی[۴]

تاریخ دریافت: آبان ۹۴ تاریخ پذیرش: آذر ۹۴

چکیده

استفاده از پری‌بیوتیک‌ها به عنوان مواد غذایی غیرقابل هضم که به طور موثری سلامتی میزبان را از طریق تحریک و یا محدود کردن رشد یک گونه یا گونه‌های محدودی از باکتری‌های مفید موجود در روده تحت تاثیر قرار می‌دهند، ایده جدیدی است که در آبزی پروری شکل گرفته است. هدف از مطالعه حاضر نیز بررسی اثر حفاظتی پری‌بیوتیک تجاری ایمونوژن بر عوارض کبد در رژیم غذایی ماهیان قزل‌آلای رنگین‌کمان آلوده به عفونت *Aeromonas hydrophila* است. این مطالعه بر روی ۱۸۰ قطعه بچه ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان با میانگین وزن ابتدایی ۱/۴۹±۸۱/۶۵ گرم در شرایط آزمایشی در سه گروه تیمار شامل تیمار اول، ماهیان تغذیه شده با جیره پایه به عنوان تیمار شاهد، تیمار دوم، ماهیان تغذیه شده با جیره پایه و تیمار سوم شامل ماهیان تغذیه شده با جیره حاوی مکمل پری‌بیوتیک تجاری ایمونوژن، انجام شد (هر گروه با سه تکرار). پس از دوره ۶ هفته‌ای تیمار، ماهیان تیمار دوم و سوم در مواجهه با باکتری *A. hydrophila* قرار داده شدند. نتایج نشان داد که عوارض هیستوپاتولوژیکی ناشی از مواجهه مانند نکروز هپاتوسیت‌ها، واکوئول‌زایی سیتوپلاسمی، دژنره شدن هسته و ادم بین سلولی در کبد ماهیان تیمار شده با جیره فاقد ایمونوژن (تیمار دوم) بیش‌تر از ماهیان تیمار شده با جیره حاوی ایمونوژن بود. نتایج حاکی از اثرات مطلوب افزایش مقاومت کبد ماهی قزل‌آلای تغذیه شده با ایمونوژن در مواجهه با عفونت باکتریایی است.

واژگان کلیدی: *پری‌بیوتیک ایمونوژن*، Aeromonas hydrophila، *هیستوپاتولوژی*، *قزل آلای رنگین‌کمان*.

۱- استادیار گروه شیلات، دانشکده شیلات و محیط زیست، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان، گرگان، ایران.
۲- دانشجوی دکتری شیلات، باشگاه پژوهشگران جوان و نخبگان، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد شهرکرد، شهرکرد، ایران.
۳- کارشناس ارشد شیلات، گروه شیلات، دانشکده منابع طبیعی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد علوم تحقیقات، تهران، ایران.
۴- دانشجوی کارشناسی ارشد شیلات، گروه شیلات، دانشکده شیلات و محیط زیست، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان، گرگان، ایران.
* نویسنده مسئول: Hamed_ghafari@alumni.ut.ac.ir

www.SID.ir

Archive of SID

مقدمه

یکی از مهم‌ترین عوامل محدودکننده آبزی‌پروری بروز بیماری‌ها و عفونت‌های ناشی از عوامل بیماریزا و صدمات و آثار سوء ناشی از مصرف آنتی‌بیوتیک‌ها و مواد ضدعفونی کننده‌ای که برای مبارزه با عوامل بیماری‌زا مورد استفاده قرار می‌گیرند است.

در سال‌های اخیر برای رسیدن به بیش‌ترین تولید در آبزی‌پروری، سیستم آبزی‌پروری گسترده (سنتی) به سمت سیستم پرورش متراکم تغییر کرده است (Subasinghe et al., 2009). در سیستم پرورشی متراکم به علت تراکم بالای ماهی‌ها در واحد سطح، استرس بیش‌تری به ماهی‌ها وارد می‌شود که ممکن است باعث تضعیف سیستم ایمنی بدن و شیوع بیماری در جمعیت ماهی شود. ماهی برای مبارزه با عوامل بیماری‌زا دارای سیستم دفاع اختصاصی و غیراختصاصی است، اما اگر استرس وارده ماهی را به مرحله خستگی و تحلیل رسانده باشد، بیماری بر ماهی غلبه می‌کند. در این نوع پرورش عواملی از قبیل کیفیت هوادهی آب و تهویه مناسب آب، دادن جیره غذایی متعادل و کنترل بیماری‌ها اهمیت بسیار بالایی دارد (Salas-Leiton et al., 2010). روش معمول برای درمان بیماری‌های باکتریایی استفاده از آنتی‌بیوتیک است. مقاومت میکروبی باعث می‌شود که درمان بیماری‌ها مختل شده و پرورش دهندگان ماهی دچار زیان‌های اقتصادی شوند. عمدتاً مصرف طولانی مدت و مکرر آنتی‌بیوتیک در آبزیان موجب شیوع جمعیت باکتری‌های مقاوم در ماهی و میکروفلور آب می‌شود. یافته‌های جدید در زمینه زیست‌شناسی مولکولی و جمعیت، بیانگر این واقعیت است که مقاومت در مقابل داروهای ضد باکتریایی، پدیده‌ای غیر قابل اجتناب است که در نتیجه طبیعت خاص و یا سازگاری سلول باکتریایی نسبت به آنتی‌بیوتیک‌ها و ایجاد تغییرات ژنتیکی به وجود می‌آید، در نتیجه استفاده بیش از حد آنتی‌بیوتیک سبب ایجاد مقاومت در ماهی می‌شود (Vivekanandhan et al., 2002). همچنین برخی از آنتی‌بیوتیک‌ها سیستم ایمنی را سرکوب می‌کنند و موجودات آبزی را بیش‌تر مستعد پذیرش بیماری‌های باکتریایی، ویروسی و انگلی می‌کند (Rijkers et al., 1980). افزایش نگرانی‌های ناشی از بکارگیری آنتی‌بیوتیک‌ها منجر به کاهش استفاده از آن‌ها در صنعت آبزی‌پروری آمریکا و اروپا شده است

www.SID.ir

Archive of SID

Alderman and Hastings, 1998;) Costello et al., 2001). این تغییر سیاست برای صنعت آبزی‌پروری مفید بوده و بدین ترتیب در توسعه راهکارهای مختلف برای کنترل بیماری‌ها، مفید واقع شده است. افزودنی‌های غذایی از جمله راهکارهایی هستند که علاوه بر تأمین مواد مغذی لازم برای حمایت از رشد و نمو ماهیان، می‌توانند در افزایش سلامت، مقاومت نسبت به استرس و عوامل بیماری‌زا مفید واقع شوند. از این رو، در سال‌های اخیر پژوهش‌های فراوانی در مورد استفاده از افزودنی‌های غذایی که در تحریک سیستم ایمنی و بهبود سلامت ماهی نقش دارند، صورت گرفته است. از جمله این افزودنی‌های غذایی، پروبیوتیک‌ها (زیست‌یارها)، پری‌بیوتیک‌ها و سین‌بیوتیک‌ها و همچنین انواع محرک‌های رشد و سیستم ایمنی هستند. افزودنی‌های غذایی مانند محرک‌های ایمنی پری‌بیوتیک و پروبیوتیک نوید بخش آبزی‌پروری پایدارتر هستند و به عنوان جایگزینی مناسب برای روش‌های درمانی قبلی مانند استفاده از داروهای ضدمیکروبی مطرح شده‌اند (Irianto and Austin, 2002).

پری‌بیوتیک‌ها ترکیبات کربوهیدراتی با زنجیره کوتاه هستند که توسط آنزم‌های دستگاه گوارش موجودات تک معده‌ای قابل هضم و جذب نبوده و به طور اختصاصی سبب بهبود فعالیت برخی از باکتری‌های اسید لاکتیک که دارای قابلیت تخمیر هستند مثل باسیلوس‌ها، لاکتوباسیلوس‌ها و بیفیدوباکترها می‌شوند. این ترکیبات توسط این باکتری‌ها در روده تخمیر شده و متابولیت‌های سودمندی مثل اسیدهای چرب کوتاه زنجیره، استات و پروپیونات را برای موجود میزبان تولید می‌کنند و در نتیجه سبب بهبود عملکرد دستگاه گوارش و سیستم ایمنی می‌شوند. پری‌بیوتیک‌ها مسیر متابولیسمی را در روده به راه می‌اندازند که منجر به تشکیل اسیدهای چرب کوتاه زنجیره (SCFA) می‌شوند و از طریق خون به کبد منتقل شده، در آنجا تجمع می‌یابند که به عنوان ذخیره انرژی و محرک سلامتی کبد محسوب می‌شوند (Ringo et al., 2010).

پری‌بیوتیک برای داشتن اثر مثبت باید ویژگی‌هایی داشته باشد از جمله: در بخش‌های بالای دستگاه گوارش جذب یا هیدرولیز نشود، توسط باکتری‌های مفید بومی دستگاه گوارش قابل تخمیر باشد، توانایی تغییر ترکیب فلور

www.SID.ir

Archive of SID

باکتریایی روده را به سمت ترکیبی سالم‌تر داشته باشد و در نهایت دارای اثر سودمند بر میزبان مصرف‌کننده باشد (Ringo et al., 2010). برای شناخت بیش‌تر معیارهای مورد نیاز ترکیبات پری‌بیوتیک باید نیازهای غذایی باکتری‌های مفید روده را شناسایی کرد و در تهیه ترکیب پری‌بیوتیک بکار برد. طبق پژوهش‌های به عمل آمده کربوهیدرات‌ها، مواد غذایی مهم و ضروری برای باکتری‌ها هستند. به همین دلیل عمده ترکیبات پری‌بیوتیک‌ها از کربوهیدرات‌ها هستند (Gibson et al., 2004; Mahious and Ollevier, 2005). از میان ترکیبات کربوهیدراتی، عمدتاً الیگوساکاریدهای غیرقابل هضم[1] (NDOs) و به ویژه آن دسته که دارای فروکتوز هستند به عنوان پری‌بیوتیک در نظر گرفته می‌شوند (Sako et al., 1999). از پری‌بیوتیک‌های معمول مورد استفاده می‌توان به فروکتوالیگوساکارید[2] (FOS)، الیگوفروکتوز، ترانسگالاکتوالیگوساکارید[3] (TOS) و اینولین اشاره کرد (Gibson et al., 2004).

پری‌بیوتیک ایمونوژن شامل ٪۳۰ بتاگلوکان، ٪۱۸ مانان‌الیگوساکارید، ٪۳۲ پروتئین، ٪۸ خاکستر، ٪۸ رطوبت و ٪۱/۴ فیبر است. بتاگلوکان و مانان‌الیگوساکارید، ساکاریدهایی متشکل از واحدهای گلوکز هستند که از دیواره سلولی قارچ‌ها و جلبک‌های بزرگ به دست می‌آیند (Salze et al., 2008). بتاگلوکان و مانان‌الیگوساکاریدها رشد و بازماندگی را در گونه‌های متفاوت ماهیان افزایش می‌دهند (Li and Gatlin, 2004; Li and Gatlin, 2005).

Aeromonas hydrophila عامل بیماری شایع سپتی‌سمی هموراژیک است که گونه‌های متنوعی از ماهیان آب شیرین از قبیل کپورماهیان، گربه ماهی، تیلاپیا و قزل‌آلای رنگین‌کمان را درگیر می‌کند (Trust et al., 1979). بیماری سپتی‌سمی هموراژیک، یکی از مهم‌ترین بیماری‌های مزارع پرورش آبزیان به ویژه قزل‌آلای رنگین‌کمان است که هر ساله خسارات اقتصادی فراوانی را در صنعت آبزی‌پروری در سرتاسر دنیا به ویژه ایران، بر جای می‌گذارد (Yardimci and Aydin, 2011). عامل این بیماری، باکتری میله‌ای، گرم منفی، متحرک، هوازی و از خانواده آئروموناداسه‌آ (Aeromonadaceae) است

1- Non-Digestible Oligosaccharides
2- Fructooligosaccharides
3- Transgalactooligosaccharides

www.SID.ir

Archive of SID

(Cipriano et al., 1984). این بیماری شایع، علائم ظاهری از جمله اگزوفتالمی، خونریزی در اطراف دهان و سرپوش آبششی، پرولاپس مخرج، تورم شکمی، خوردگی سرپوش آبششی و باله‌های پشتی و دمی دارد (Austin and Austin, 2007). این باکتری به عنوان پاتوژن ثانویه می‌تواند در مزارع پرورش ماهی قزل‌آلای در شرایط استرس ایجاد بیماری کند (Cipriano et al., 1984). مطالعات بیماری‌شناسی نشان می‌دهد که زمینه‌ساز اصلی بروز بیماری ناشی از فشار استرس‌ها است و در واقع عوامل عفونی فقط جریان نابسامانی را تشدید می‌کند و علائم خاص بیماری‌زایی خود را ظاهر می‌سازند. در چنین شرایطی بهبود کیفیت آب و شرایط بهداشتی مزرعه می‌تواند به پیشگیری از بیماری ناشی از *A. hydrophila* کمک کند (Sahu et al., 2007; Harikrishnan et al., 2009).

در مجموع با توجه به کاربرد روز افزون پری‌بیوتیک‌ها در صنعت آبزی‌پروری و جنبه‌های فیزیولوژیکی و بهبود سلامتی ماهیان تغذیه شده با پری‌بیوتیک‌ها، در مطالعه حاضر از پری‌بیوتیک رایج تجاری ایمونوژن در گونه اقتصادی آب شیرین جهان، *Onchorhynchus mykiss*، بر بافت‌شناسی کبد ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان، برای افزایش مقاومت با عوارض باکتریایی *A. hydrophila* استفاده شد.

مواد و روش‌ها

تامین بچه ماهیان و معرفی آن‌ها به محیط آزمایشی

تعداد ۱۸۰ قطعه بچه ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان با میانگین وزن ابتدایی ۱/۴۹±۸۱/۶۵ گرم از مرکز پرورش ماهی ماهی‌سرا واقع در شهرستان کرج تهیه و با ماشین ویژه حمل ماهی زنده به آزمایشگاه دانشکده شیلات دانشگاه گرگان منتقل شد. ماهی‌ها در ابتدا به مدت ۱۴ روز با شرایط آزمایشگاه سازگار شدند و در این مدت با خوراک ماهی (ساخت کارخانه بهپرور) ۲ بار در روز به میزان ۲٪ وزن بدن خود تغذیه می‌شدند. وان‌ها قبل از ذخیره‌سازی، به وسیله مواد ضدعفونی کننده مانند هیپوکلریت سدیم کاملاً ضدعفونی، سپس با آب شستشو داده شدند. ماهیان نیز ابتدا با محلول نمک ۴ درصد به مدت یک دقیقه ضدعفونی شدند. ماهی‌ها در ۹ وان فایبرگلاس به حجم ۱۰۰۰ لیتر که تا نیمه آبگیری شده بودند نگهداری می‌شدند. شش عدد از وان‌ها به ماهی‌های تیمار شاهد

www.SID.ir

Archive of SID

(تیمار اول) و تیمار دوم اختصاص یافت که با غذای تجاری بدون مکمل تغذیه شدند و در سه وان دیگر ماهی‌های تیمار تغذیه با مکمل غذایی ایمونوژن قرار داشتند (تیمار سوم). ماهی‌ها به مدت ۶ هفته طبق تیمارهای تعیین شده تغذیه شدند. سپس در داخل ۹ وان ۱۰۰۰ لیتری (آبگیری ۷۰۰ لیتر) به تعداد ۲۰ عدد در هر وان قرار داده شدند. سپس به تیمارهای دوم و سوم باکتری *Aeromonas hydrophila* (RTCC1032) تزریق شد.

اندازه‌گیری عوامل کیفی آب همچون دمای آب، اکسیژن محلول و pH نیز به صورت هفتگی انجام گرفت.

ساخت جیره آزمایشی و غذادهی

برای تیمار شاهد از جیره تجاری آماده (شرکت بهپرور) و برای ساخت جیره آزمایشی (جیره حاوی ایمونوژن) از جیره تجاری ویژه قزل‌آلای رنگین‌کمان (شرکت بهپرور) استفاده شد. جیره در مرحله‌ای که همه اجزا با هم مخلوط شده بودند و به صورت یک پودر یکنواخت درآمده بود، قبل از مرحله پلت شدن از کارخانه تهیه و به کارگاه محل انجام آزمایش انتقال داده شد. سپس مکمل غذایی به میزان ۲ گرم پری‌بیوتیک ایمونوژن به ازای هر کیلوگرم غذا، به پودر جیره اضافه شد و برای ساخت خمیر و پلت کردن ۲۰ درصد آب مقطر به آن اضافه شد. خمیر به دست آمده توسط دستگاه چرخ گوشت دستی به صورت پلت‌هایی با قطر تقریبی ۴/۸ میلی‌متر در آمد. سپس این پلت‌های غذایی به داخل آون ۷۰ درجه سانتی‌گراد منتقل و خشک شدند (AOAC, 1995). بعد از آن، به میزان ۱۰ میلی‌لیتر به ازای هر کیلوگرم غذا، روغن سویا بر روی پلت‌ها اسپری شد. پلت‌ها تا زمان مصرف در یخچال ۲۰- نگه‌داری شدند. غذادهی به ماهیان به میزان ۲ درصد وزن بدن در روز به صورت ۲ وعده در ساعت‌های ۸ و ۱۶ انجام شد.

مواجه‌سازی باکتریایی

مواجه‌سازی تجربی ماهیان به روش تزریق داخل صفاقی و بر اساس میزان LD_{50} از *A. hydrophila* که در مطالعات گذشته برای قزل‌آلای رنگین‌کمان معادل ۱/۷۷×۱۰۷ تا ۴/۹×۱۰۷CFU تعیین شده بود (LaPatra et al., 2010) انجام شد.

باکتری *A. hydrophila* مورد نیاز برای انجام مواجهه باکتریایی، پس از کشت، از محیط کشت برداشت شدند و در سرم فیزیولوژی ٪۰/۸۵ رقیق شدند تا در دستگاه

www.SID.ir

Archive of SID

اسپکتوفتومتر در طول موج ۶۴۰ نانومتر جذب نوری به ۱/۰ برسد. این عدد بیان کننده تعداد $۱/۵۵\times۱۰^{۹}$ باکتری در هر میلی‌لیتر است. تزریق باکتری به ماهیان با حجم ۱۰۰ ماکرولیتر از محلول رقیق شده به نسبت ۱:۱۰ با بافر فسفاته نمکی انجام شد. ماهیان با دز $۱/۵۵\times۱۰^{۷}$CFU به صورت تزریق داخل صفاقی باکتری مورد نظر را دریافت کردند و به مدت ۱۴ روز پایش شدند. پس از گذشت ۱۴ روز، برای انجام مطالعات هیستوپاتولوژیک، از هر وان ۳ قطعه ماهی که دارای علائم ظاهری بیماری بودند، انتخاب شدند و پس از کالبدگشایی از بافت کبد آن‌ها نمونه‌برداری شد.

بررسی پاتولوژیکی بافت کبد

نمونه‌ها با روش‌های مرسوم بافت‌شناسی کلاسیک مورد مطالعه بافتی قرار گرفتند. به این ترتیب که ابتدا نمونه‌های بافت کبد در محلول بافر خنثی فرمالین ۱۰٪ تثبیت شدند. پس از طی کردن مراحل آماده‌سازی بافتی و تهیه بلوک‌های پارافینی، مقاطعی به ضخامت ۶ میکرون از بافت‌ها تهیه و به روش هماتوکسیلین و ائوزین رنگ‌آمیزی شدند.

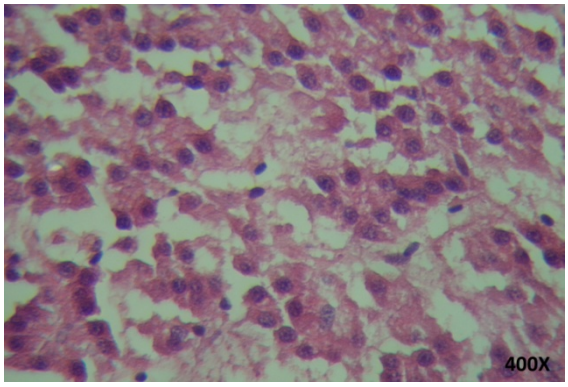
نتایج

پارامترهای فیزیکوشیمیایی آب در طول دوره پرورش اندازه‌گیری شد و میانگین دمای آب ۱/۲±۱۸ درجه سانتی‌گراد، pH آب ۰/۴±۶/۹ و اکسیژن محلول ۰/۳±۶/۶ میلی‌گرم بر لیتر به دست آمد.

بررسی بافت‌شناسی کبد ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان نشان داد که مشابه سایر گونه‌های ماهیان استخوانی، بافت کبد به طور عمده از هپاتوسیت و رگ‌های خونی تشکیل شده بود و هیچ گونه عارضه شدید و نسبتاً شدید هیستوپاتولوژیکی در تیمار شاهد مشاهده نشد (شکل ۱).

www.SID.ir

Archive of SID



شکل ۱: تصویر بافت کبد قزل‌آلای رنگین‌کمان در تیمار شاهد، بدون عفونت و تغذیه شده با جیره پایه (H&E)

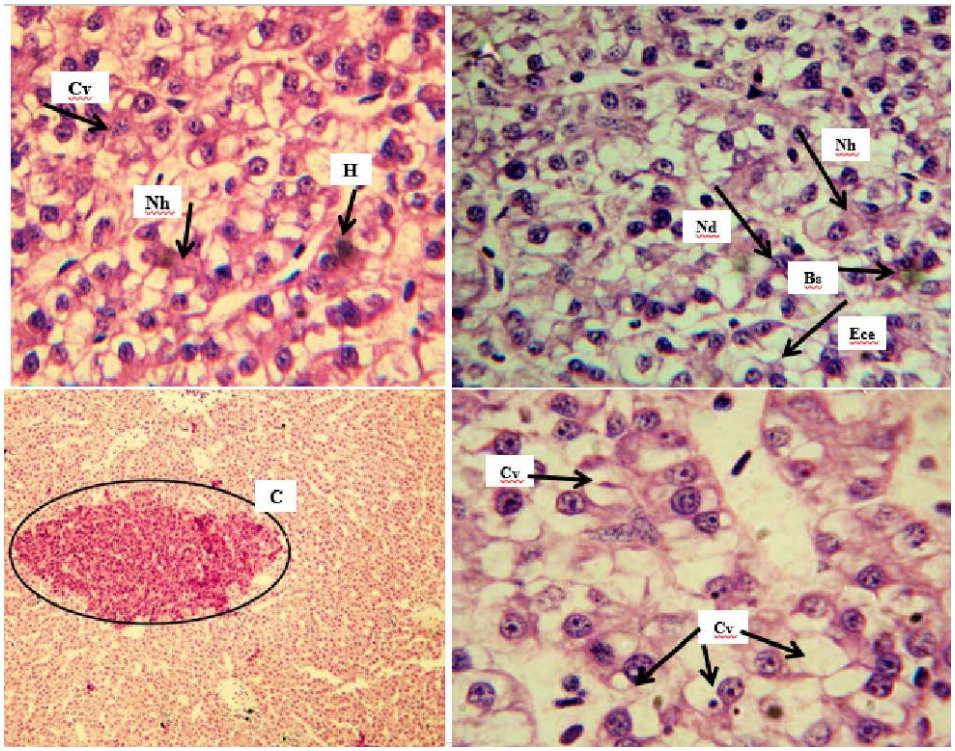
نتایج بررسی عوارض هیستوپاتولوژی کبد قزل‌آلای رنگین‌کمان نشان داد که القای عفونت *Aeromonas hydrophila* به تنهایی توانسته عوارض بافتی متعددی بر کبد این گونه داشته باشد که از این جمله می‌توان به پیکنوتیک، نکروز هپاتوسیت‌ها، واکوئول‌زایی سیتوپلاسمی، دژنره شدن هسته، رکود صفرا و ادم بین سلولی اشاره کرد (شکل ۲).

همچنین بررسی عوارض هیستوپاتولوژی کبد قزل‌آلای رنگین‌کمان تغذیه شده با ایمونوژن با القای عفونت *Aeromonas hydrophila* نشان داد که نکروز هپاتوسیت‌ها، واکوئول‌زایی سیتوپلاسمی، ادم بین سلولی، انسداد خونی مشاهده شد (شکل ۳).

مقایسه عوارض هیستوپاتولوژیک کبد ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان در جدول ۱ به خوبی بیانگر تاثیر مثبت تغذیه ایمونوژن است.

www.SID.ir

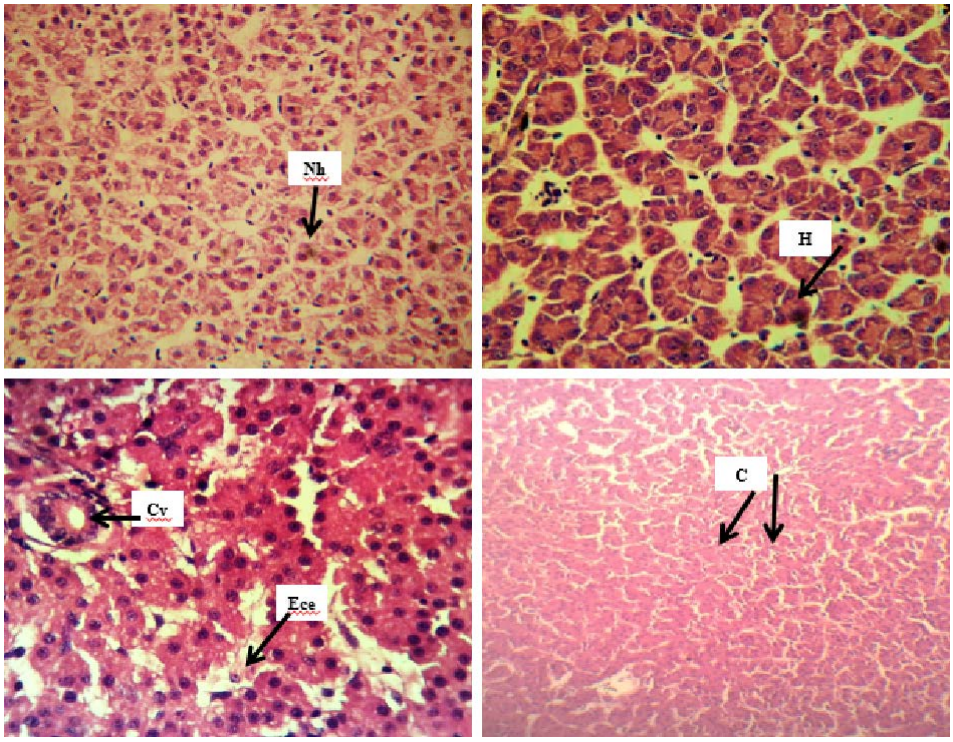
Archive of SID



شکل ۲: تصاویر بافت‌شناسی کبد قزل‌آلای رنگین‌کمان ابتلا یافته به عفونت *Aeromonas hydrophila* و تغذیه شده با جیره فاقد ایمونوژن (تیمار دوم) پس از ۶ هفته (H&E؛ بزرگنمایی ×۱۰۰ و ×۴۰۰). Nh: نکروز هپاتوسیت‌ها؛ H: خونریزش؛ Cv: واکوئول‌زایی سیتوپلاسمی؛ Nd: دژنره شدن هسته؛ Ece: ادم بین سلولی؛ Bs: رکود صفرا؛ C: انسداد خونی.

www.SID.ir

Archive of SID



شکل ۳: تصاویر بافت‌شناسی کبد قزل‌آلای رنگین‌کمان ابتلا یافته به عفونت *Aeromonas hydrophila* و تغذیه شده با جیره حاوی ایمونوژن (تیمار سوم) پس از ۶ هفته (H&E؛ بزرگنمایی ×۱۰۰ و ×۴۰۰). Nh: نکروز هپاتوسیت‌ها؛ H: خونریزش؛ Cv: واکوئول‌زایی سیتوپلاسمی؛ Ece: ادم بین سلولی؛ C: انسداد خونی.

www.SID.ir

Archive of SID

جدول ۱: مقایسه عوارض هیستوپاتولوژیک کبد قزل‌آلای رنگین‌کمان ابتلا یافته به عفونت *Aeromonas hydrophila* تغذیه شده و بدون تغذیه با ایمونوژن

عوارض مشاهده شده	شاهد (بدون عفونت و بدون تغذیه با ایمونوژن)	مواجهه با عفونت *Aeromonas hydrophila*	
		تغذیه شده با ایمونوژن	بدون تغذیه با ایمونوژن
ادم بین سلولی	–	+	++
دژنره شدن هسته	–	–	++
واکوئل‌زایی سیتوپلاسمی	+	++	+++
نکروز هپاتوسیت‌ها	–	+	+++
خونریزش	–	+	++
رکود صفرا	–	–	+
انسداد خونی	–	+	+++

«–»: بدون عارضه؛ «+»: عارضه خفیف؛ «++»: عارضه متوسط؛ «+++»: عارضه شدید.

بحث

در مطالعه حاضر، تغذیه شش هفته‌ای ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان با ایمونوژن نشان داد که این مکمل غذایی پری‌بیوتیکی قابلیت بالقوه‌ای را در حفاظت کبد این ماهی در برابر عوارض ناشی از عفونت *Aeromonas hydrophila* داشت و عوارض هیستوپاتولوژیکی مشاهده شده به شدت کاهش یافت.

به طور کلی، استفاده از پری‌بیوتیک‌ها در جیره آزاد ماهیان باعث افزایش جمعیت میکروبی دستگاه گوارش می‌شود (Birkbeck and Ringo, 2005). افزایش جوامع میکروبی روده باعث افزایش فعالیت آنزیم‌های گوارشی و تولید ویتامین‌هایی می‌شود که در وضعیت بهداشتی و تغذیه ماهی موثر هستند (Wache et al., 2006). علاوه بر این مهم‌ترین محصول نهایی متابولیسم پری‌بیوتیک‌ها، اسیدهای چرب کوتاه زنجیره هستند که از طریق اپیتلیوم روده جذب شده، برای میزبان منبع انرژی فراهم می‌کنند و سبب بهبود جذب مواد غذایی می‌شوند (Gibson and Roberfroid, 1995). پروبیوتیک‌ها و پری‌بیوتیک‌ها عموماً با تغییر در میکروفلور طبیعی روده بر فرآیند گوارش و جذب مواد غذایی مختلف موثر

www.SID.ir

Archive of SID

هستند و این تغییرات به طور غیرمستقیم بر بافت کبد موجود تاثیر می‌گذارد (Fuller, 1989).

اگر چه بیش‌تر مطالعات انجام شده حاکی از نتایج مثبت پری‌بیوتیک‌ها بر رشد حیوانات است، اما پری‌بیوتیک‌های مختلف تاثیرات متفاوتی بر گونه‌های آبزیان داشته‌اند. در مطالعات قبلی، تاثیر پری‌بیوتیک تجاری Grobiotic-A که مخلوطی از اتولیز ناقص مخمر آبجو و بخش‌هایی از ترکیبات شیر و تولیدات تخمیری خشک شده بود، در تغذیه ماهیان باس (هیبرید *Morone chrysops* × *M. saxatilis*) ارزیابی شد، که به طور معنی‌داری باعث افزایش رشد و بازماندگی و کارایی تغذیه بالاتری در این ماهیان شد (Li and Gatlin, 2004). همچنین در یک بررسی استفاده از پری‌بیوتیک اینولین در جیره غذایی ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان نشان داد که این پری‌بیوتیک نمی‌تواند مکمل مناسبی برای جیره غذایی ماهی قزل‌آلا در نظر گرفته شود (Akrami et al., 2009).

در سال‌های اخیر علاقه فراوانی برای استفاده از مکمل‌های غذایی سازگار با محیط زیست مثل ترکیبات پروبیوتیک و پری‌بیوتیک به جای استفاده از مواد شیمیایی و آنتی‌بیوتیک‌ها برای توسعه آبزی‌پروری پایدار به وجود آمده است. مطالعات زیادی تاثیر مثبت پری‌بیوتیک‌ها را بر فاکتورهای رشد و بهبود ضریب تبدیل غذایی گونه‌های مختلف آبزیان نشان داده‌اند. همچنین در بسیاری از مطالعات نشان داده شده است که استفاده از ترکیبات غذایی پری‌بیوتیکی مختلف مثل مانان الیگوساکارید، فروکتوالیگوساکارید، اینولین و همچنین تعداد زیادی از پری‌بیوتیک‌های ترکیبی و تجاری در جیره غذایی گونه‌های آبزی باعث بهبود سیستم دفاعی گونه میزبان شده و در نتیجه مقاومت در برابر عوامل بیماری‌زا را به دنبال داشته است. در پژوهشی مشابه ایمونوژن باعث بهبود شاخص‌های ایمنی و افزایش سطح بیان ژن‌های دخیل در سیستم ایمنی قزل‌آلای رنگین‌کمان را به همراه داشت که به دنبال آن باعث کاهش مرگ و میر ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان پس از مواجهه با *A. hydrophila* شد (Yar Ahmadi et al., 2014). به عنوان مثال Harikrishnan و همکاران (۲۰۱۱) بیان کردند که مصرف خوراکی عصاره گیاه *Scutellaria baicalensis* به همراه پروبیوتیک *Lactobacillus sakei* BK19 می‌تواند منجر به افزایش فعالیت لیزوزیم در گونه

www.SID.ir

Archive of SID

Edwardsiella tarda پس از مواجه‌سازی تجربی با *Oplegnathus fasciatus* شود. به طور کلی می‌توان گفت که مطالعات زیادی وجود دارد که موید اثر ایمنی‌بخش پری‌بیوتیک‌ها بر سلامت ماهیان است (Cerezuela et al., 2008; Soleimani et al., 2012) با این وجود اطلاعات کمی درباره مکانیسم دقیق عملکرد این ترکیبات بر سیستم ایمنی وجود دارد. در میان حجم وسیعی از اطلاعات که در مورد اثر پری‌بیوتیک‌ها بر شاخص‌های سیستم ایمنی ماهیان و به دنبال آن، افزایش مقاومت در برابر عوامل بیماری‌زا، وجود دارد، مطالعات کم‌تری به بررسی اثر ترکیبات پری‌بیوتیک در جیره غذایی ماهیان بر جنبه‌های مختلف فیزیولوژی و پاتولوژی ماهی پس از مواجهه با عوامل بیماری‌زا پرداخته است.

نتایج بررسی شاخص‌های هیستوپاتولوژیکی ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان نشان داد که *A. hydrophila* می‌تواند منجر به بروز عوارض بافتی زیادی شود، در تایید این یافته‌ها Huizinga و همکاران (۱۹۷۹) نشان دادند که *A. hydrophila* منجر به عوارض متعدد بافتی در ماهی باس دهان گشاد *Micropterus salmoides* شده است. نتایج مشابهی در خامه‌ماهی *Ictalurus punctatus* آلوده شده با *A. hydrophila* بیان شد که شامل نکروز کبدی و واکوئله شدن چربی بود (Grizzle and Kiryu, 1993).

نتایج بافت‌شناسی کبد در مطالعه حاضر دقیقاً مشابه مطالعات پیشین بوده است (Grizzle and Kiryu, 1993; Martin and Okolie, 2012). هرچند اطلاعات زیادی درباره اثر محافظتی ایمونوژن بر بافت کبد وجود ندارد، با این وجود در تایید نتایج پژوهش حاضر، Gupta و همکاران (۲۰۰۸) گزارش کردند که در تیمار با ۱/۲۵ درصد ایمونوژن، نفوذ لکوسیت‌های کبدی افزایش یافته، دژنره شدن هپاتوسیت‌ها، ادم و نفوذ لکوسیت‌ها به بافت‌های پارانشیمی کاملاً مشهود بوده است. هرچند دلیل اثر محافظتی ایمونوژن در بافت کبد مواجه شده با *A. hydrophila* مشخص نیست، اما با توجه به مطالعات گذشته در مورد اثر پری‌بیوتیک ایمونوژن بر سیستم دفاع غیراختصاصی قزل‌آلای رنگین‌کمان (Yar Ahmadi et al., 2014) به نظر می‌رسد که ایمونوژن از طریق افزایش ایمنی غیراختصاصی بدن، مقاومت در برابر *A. hydrophila* را افزایش می‌دهد. در مجموع نتایج پژوهش حاضر موید پتانسیل

www.SID.ir

Archive of SID

بالقوه بالای ایمونوژن در بهبود ایمنی و افزایش مقاومت ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان در مواجهه با *A. hydrophila* بود. مکانیسم دیگری که به وسیله آن مکمل غذایی ایمونوژن باعث بهبود وضعیت سلامت کبد پس از مواجهه با باکتری *A. hydrophila* می‌شود، به نظر می‌رسد از طریق تولید متابولیت‌های حاصل از تخمیر باشد. یکی از ویژگی‌های عمده ترکیبات پری‌بیوتیک تخمیرپذیری آن‌ها است که در دستگاه گوارش میزبان تحت تاثیر فعالیت خانواده‌های مشخصی از باکتری‌های تخمیر کننده از جمله باسیلوس‌ها و بیفیدوباکترها اتفاق می‌افتد. به دنبال فرآیند میکروبی تخمیر، متابولیت‌های سودمندی برای میزبان مثل اسیدهای چرب کوتاه زنجیره، لاکتات، پروپیونات و استات در روده تولید و رهاسازی می‌شوند. متابولیت‌های تولید شده توسط میکرو ویلی‌های روده جذب و به جریان خون وارد می‌شوند و از طریق جریان خون به کبد که محل متابولیسم مواد غذایی است انتقال پیدا می‌کنند. این متابولیت‌ها در کبد باعث بهبود عملکرد آن در شرایط استرس‌زای بیماری شده و با اعمال اثر محافظت کنندگی مانع از عمل تخریبی باکتری مورد نظر در بافت کبد می‌شود (Demigne and Remesy, 1985).

به طور کلی نتایج حاصل از مطالعه حاضر نشان می‌دهد که عوارض هیستوپاتولوژیک بافت کبد ماهیان قزل‌آلای رنگین‌کمان پس از مواجهه با باکتری *A. hydrophila* در گروه تغذیه شده با مکمل غذایی پری‌بیوتیک ایمونوژن به مراتب کمتر از گروه تغذیه شده با غذای تجاری بدون مکمل غذایی است. این نتایج اثر محافظتی پری‌بیوتیک تجاری ایمونوژن بر بافت کبد قزل‌آلای رنگین‌کمان، به دلیل بهبود سیستم ایمنی و تولید متابولیت های مناسب در دستگاه گوارش و انتقال آن‌ها به بافت کبد را بیان می‌کند. بنابراین می‌توان نتیجه گرفت که استفاده از پری‌بیوتیک تجاری ایمونوژن اثر محافظتی بهتری در مقایسه با جیره تجاری پایه در مواجهه با باکتری دارد و نیازمند مطالعات بیش‌تری در این زمینه است.

تشکر و قدردانی

از مجموعه ماهی‌سرای کرج برای در اختیار قرار دادن ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان برای انجام این پژوهش، تشکر و قدردانی می‌شود.

www.SID.ir

Archive of SID

منابع

Akrami R., Ghelichi A. and Manuchehri H. 2009. Effect of dietary inulin as prebiotic on growth performance and survival of juvenile rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). Research in Marine Sciences and Technology, 4: 1– 9.

Alderman D.J. and Hastings T.S. 1998. Antibiotic use in aquaculture: Development of antibiotic resistance-potential for consumer health risks. International Journal of Food Science and Technology, 33(2): 139–155.

AOAC. 1995. The Association of Official Analytical Chemistry, 16th Ed. Washington DC, USA. Procedure 984. 25.

Austin B. and Austin D.A. 2007. Bacterial fish pathogens: disease of farmed and wild fish. Springer Netherlands. 552P.

Birkbeck T.H. and Ringo E. 2005. Pathogenesis and the gastrointestinal tract of growing fish. P: 208–234. In: Holzapfel W. and Naughton P. (Eds.). Microbial Ecology in Growing Animal. Elsevier, Edinburgh, UK.

Cerezuela R., Cuesta A., Meseguer J. and Angeles Esteban M. 2008. Effects of inulin on gilthead seabream (*Sparus aurata*) innate immune parameters. Fish and Shellfish Immunology, 24: 663–668.

Cipriano R.C., Bullock G. and Pyle S. 1984. (*Aeromonas hydrophila*) and motile (*Aeromonad septicemias*) of fish. US Fish and Wildlife Publications. 134P.

Costello M.J., Grant A., Davies I.M., Cecchini S., Papoutsoglou S., Quigley D. and Saroglia M. 2001. The control of chemicals used in aquaculture in Europe. Journal of Applied Ichthyology, 17(4): 173–180.

Demigne C. and Remesy C. 1985. Stimulation of absorption of volatile fatty acids and minerals in the cecum of rats adapted to a very high fiber diet. The Journal of Nutrition, 115: 53–60.

Fuller R. 1989. Probiotic in man and animals. Jornal of Applied Bacteriol, 660: 365–378.

Gibson G.R. and Roberfroid M.B. 1995. Dietary modulation of the human colonic microbiota: Introducing the concept of prebiotics. Journal of Nutrition, 125: 1401–1412.

Gibson G.R., Probert H.M., Van Loo J., Rastall R.A. and Roberfroid M.B. 2004. Dietary modulation of the human colonic microbiota: Updating the concept of prebiotics. Nutrition Research Reviews, 17: 259–275.

www.SID.ir

Archive of SID

Grizzle J.M. and Kiryu Y. 1993. Histopathology of gill, liver, and pancreas, and serum enzyme levels of channel catfish infected with *Aeromonas hydrophila* complex. Journal of Aquatic Animal Health, 5(1): 36–50.

Gupta S.K., Pal A.K., Sahu N.P., Dalvi R., Kumar V. and Mukherjee S.C. 2008. Microbial levan in the diet of *Labeo rohita* Hamilton juveniles: Effect on non-specific immunity and histopathological changes after challenge with *Aeromonas hydrophila*. Journal of fish Diseases, 31(9): 649–657.

Harikrishnan R., Balasundaram C. and Heo M.S. 2009. Effect of chemotherapy, vaccines and immunostimulants on innate immunity of goldfish infected with *Aeromonas hydrophila*. Diseases of Aquatic Organisms, 88: 45–54.

Harikrishnan R., Kim M.C., Kim J.S., Balasundaram C. and Heo M.S. 2011. Protective effect of herbal and probiotics enriched diet on haematological and immunity status of *Oplegnathus fasciatus* (Temminck and Schlegel) against *Edwardsiella tarda*. Fish and Shellfish Immunology, 30: 886–893.

Huizinga H., Esch G. and Hazen T. 1979. Histopathology of red-sore disease (*Aeromonas hydrophila*) in naturally and experimentally infected largemouth bass *Micropterus salmoides* (Lacepede). Journal of Fish Diseases, 2: 263–277.

Irianto A. and Austin B. 2002. Probiotics in aquaculture. Journal of Fish Diseases, 25: 633–642.

LaPatra S.E., Plant K.P., Alcorn S., Ostland V. and Winton J. 2010. An experimental vaccine against *Aeromonas hydrophila* can induce protection in rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum). Journal of Fish Diseases, 33(2): 143–151.

Li P. and Galtin D.M. 2005. Evaluation of prebiotic GroBiotic®-A and brewers yeast as dietary supplements for Sub-adult hybrid Striped bass (*Morone chrysops* × *M. saxatilis*) challenged in situ with *Mycobacterium marinum*. Aquaculture, 248: 197–205.

Li P. and Gatlin D.M. 2004. Dietary brewers yeast and the prebiotic Grobiotic™ AE in fluence growth performance, immune responses and resistance of hybrid striped bass (*Morone chrysops* × *M. saxatilis*) to *Streptococcus iniae* infection. Aquaculture, 231: 445–456.

Mahious A.S. and Ollevier F. 2005. Probiotic and prebiotics in aquaculture: Review. 1st Regional Workshop on Techniques for Enrichment of Live Food for Use

www.SID.ir

Archive of SID

in Larvi culture, Urmia, Iran. P: 17–26.

Martin O. and Okolie P. 2012. N-nitrosodimethylamine (NDMA), liver function enzymes, renal function parameters and oxidative stress parameters: A review. British Journal of Pharmacology and Toxicology, 3(4): 165–176.

Rijkers G.T., Teunissen A.G., Van Oosterom R. and Van Muiswinkel W.B. 1980. The immune system of cyprinid fish. The immunosuppressive effect of the antibiotic oxytetracycline in carp (*Cyprinus carpio* L.). Aquaculture, 19(2): 177–189.

Ringo E., Olsen R.E., Gifstad T., Dalmo R., Amlund H., Hemre G.I. and Bakke A. 2010. Prebiotics in aquaculture: A review. Aquaculture Nutrition, 16(2): 117–136.

Sahu S., Das B.K., Pradhan J., Mohapatra B., Mishra B. and Sarangi N. 2007. Effect of (*Magnifera indica*) kernel as a feed additive on immunity and resistance to (*Aeromonas hydrophila*) in (*Labeo rohita*) fingerlings. Fish and Shellfish Immunology, 23: 109–118.

Sako T., Matsumoto K. and Tanaka R. 1999. Recent progress on research and applications of non-digestible galacto-oligosaccharides. International Dairy Journal, 9: 69–80.

Salas-Leiton E., Anguis V., Martin-Antonio B., Crespo D., Planas J.V., Infante C., Canavate J.P. and Manchado M. 2010. Effects of stocking density and feed ration on growth and gene expression in the Senegalese sole (*Solea senegalensis*): Potential effects on the immune response. Fish and Shellfish Immunology, 28: 296–302.

Salze G., Mclean E., Schwarz M.H. and Craig S.R. 2008. Dietary mannanoligosaccharide enhances salinity tolerance and gut development of larval cobia. Aquaculture, 274: 148–152.

Soleimani N., Hoseinifar S.H., Merrifield D.L., Barati M. and Abadi Z.H. 2012. Dietary supplementation of fructooligosaccharide (FOS) improves the innate immune response, stress resistance, digestive enzyme activities and growth performance of Caspian roach (*Rutilus rutilus*) fry. Fish and Shellfish Immunology, 32: 316–321.

Subasinghe R., Soto D. and Jia J. 2009. Global aquaculture and its role in sustainable development. Reviews in Aquaculture, 1(1): 2–9.

Trust T., Bull L., Currie B. and Buckley J. 1979. Obligate anaerobic bacteria in the gastrointestinal microflora of the grass carp (*Ctenopharyngodon*

www.SID.ir

Archive of SID

idella), goldfish (*Carassius auratus*), and rainbow trout (*Salmo gairdneri*). Journal of the Fisheries Board of Canada, 36: 1174–1179.

Vivekanandhan G., Savithamani K., Hatha A. and Lakshmanaperumalsamy P. 2002. Antibiotic resistance of (*Aeromonas hydrophila*) isolated from marketed fish and prawn of South India. International Journal of Food Microbiology, 76: 165–168.

Wache Y., Auffray F., Gatesoupe F.J., Zambonino J., Gayet V., Labbe L. and Quentel C. 2006. Cross effects of the strain of dietary *Saccharomyces cerevisiae* and rearing conditions on the onset of intestinal microbiota and digestive enzymes in rainbow trout (*Onchorhynchus mykiss*) fry. Aquaculture, 258: 470–478.

Yar Ahmadi P., Farahmand H., Kolangi Miandare H., Mirvaghefi A. and Hoseinifar S.H. 2014. The effects of dietary Immunogen on innate immune response, immune related genes expression and disease resistance of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). Fish and Shellfish Immunology, 37: 209–214.

Yardimci B. and Aydin Y. 2011. Pathological findings of experimental Aeromonas hydrophila infection in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). Veterinary Journal of Ankara University, 58: 47–54.

www.SID.ir

Archive of SID

Aquatic Physiology and Biotechnology
Vol. 3, No. 3, Autumn 2015

Protective effect of commercial prebiotic Immunogen on liver histopathological lesions of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) experimentally infected by *Aeromonas hydrophila*

Seyed Aliakbar Hedayati[1], Hamed Ghafari Farsani[2]*, Pegah Gheshlaghi[3], Elaheh Chardeh Baladehi[4]

Received: November 2015 Accepted: December 2015

Abstract

Application of prebiotics is a promising way in aquaculture, as non-digestible food ingredients that improve host health by stimulating or limiting the growth of bacteria in the host gut. Aim of this study was to investigate the protective effect of dietary commercial prebiotic, Immunogen®, on liver histopathology lesions exposured to *Aeromonas hydrophila* infection in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). This study was performed on 180 healthy sub-adult rainbow trout (81.65±1.49g) under experimental condition in three groups. In the first group (control) and second group, fish were fed the basal diet and in the third group, the prebiotic Immunogen was added to basal diet (one control group and two trial treatments with three replicates). After 6 weeks feeding, two last groups were injected by *Aeromonas hydrophila* (untreated-infected and treated-infected groups). Histophatological results revealed that lesions such as necrotic hepatocyte, cytoplasmic vacuolation, nucleus degeneration and entera cellular edema within the untreated-infected group were more than treated-infected group administrated by Immunogen®. These findings suggested improved resistance of rainbow trout liver administrated by Immunogen® during bacterial infection.

Key words: *Prebiotic Immunogen*, Aeromonas hydrophila, *Histopathology*, *Rainbow Trout.*

1- Assistant Professor in Department of Fisheries, Faculty of Fisheries and Environment, Gorgan University of Agricultural Sciences and Natural Resources, Gorgan, Iran.
2- Ph.D. Student in Fisheries, Young Researchers and Elites, Islamic Azad University, ShahreKord Branch, ShahreKord, Iran.
3- M.Sc. in Fisheries, Department of Fisheries, Faculty of Natural Resources, Islamic Azad University, Science and Research Branch, Tehran, Iran.
4- M.Sc. Student in Fisheries, Department of Fisheries, Faculty of Fisheries and Environment, Gorgan University of Agricultural Sciences and Natural Resources, Gorgan, Iran.
*Corresponding Author: Hamed_ghafari@alumni.ut.ac.ir

www.SID.ir