

اثرات افزودن عصاره گیاه پونه، پروبیوتیک و فلورفنیکل بر ایمنی سلولی، برخی از باکتریهای دستگاه گوارش و هیستومورفولوژی کبد و آبشش ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان

رضا نقی‌ها*^۱، محمد هوشمند^۱، مهرداد معمار^۱، شیما حسینی فر^۲، آریا شفاعی پور^۳، محمد رضا ساعی^۴

۱. استادیار گروه علوم دامی، دانشگاه یاسوج، یاسوج، ایران

۲. استادیار گروه بافت شناسی دانشکده دامپزشکی، دانشگاه شهید چمران، اهواز، ایران

۳. استادیار گروه زیست شناسی، دانشگاه یاسوج، یاسوج، ایران

۴. دانشجوی ارشد گروه علوم دامی، دانشگاه یاسوج، یاسوج، ایران

تاریخ تصویب: ۱۳۹۴/۷/۵

تاریخ دریافت: ۱۳۹۴/۱/۳۱

چکیده

هدف از انجام این پژوهش، تعیین تغییرات فلور طبیعی دستگاه گوارش و توان سامانه‌ی ایمنی خونی ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان پس از مصرف پروبیوتیک، پادزیست و عصاره گیاه پونه بود. پژوهش در قالب یک طرح کاملاً تصادفی شامل ۵ تیمار و ۳ تکرار انجام شد که در هر تکرار ۴۰ قطعه بچه‌ماهی ۲۲ گرمی قزل‌آلای رنگین‌کمان قرار داشت. تیمارهای آزمایش شامل: جیره‌ی پایه و چهار گروه دیگر به ترتیب با جیره پایه حاوی پادزیست فلورفنیکل؛ ۰/۵ و ۱ درصد عصاره پونه و ۰/۲ درصد پروبیوتیک تغذیه شدند. پس از یک دوره ۸ هفته‌ای، گسترش خونی جهت بررسی ایمنی سلولی، محتویات دستگاه گوارش جهت بررسی شمار باکتریهای مفید و مضر، نمونه‌های بافت کبد و آبششها جهت بررسی تغییرات هیستومورفولوژیک جمع‌آوری گردید. نتایج نشان داد که افزودن پادزیست باعث افزایش معنی دار درصد لنفوسیت در مقایسه با گروه شاهد گردید. هم‌چنین درصد منوسیتها به طور معناداری در تیمارهای حاوی عصاره افزایش یافت. شمار کل باکتریهای دستگاه گوارش تغییر معنی داری را نشان نداد، اما شمار باکتریهای لاکتوباسیلوس در تمامی گروه‌های تغذیه شده با جیره حاوی افزودنی (پادزیست، عصاره و پروبیوتیک) بیشتر از گروه شاهد بود. در گروه دریافت کننده فلورفنیکل، هپاتوسیتها واکوتوله شده و میزان لیپید و گلیکوژن در هپاتوسیتها بیش از حد معمول بود. به نظر می‌رسد که استفاده از عصاره گیاه پونه، در تغذیه ماهی نه تنها اثر سوئی بر بافت کبد نداشته بلکه ممکن است در بهبود عملکرد کبد و نقش سم زدایی آن مفید بوده و شمار لنفوسیتها و منوسیتها و هم‌چنین شمار باکتری‌های لاکتوباسیلوس موجود در دستگاه گوارش افزایش می‌یابد.

واژگان کلیدی: قزل‌آلای رنگین‌کمان، لاکتوباسیلوس، پونه، پروبیوتیک، هیستومورفولوژی، فلورفنیکل

۱. مقدمه

امروزه یکی از اصلی‌ترین دغدغه‌های تولیدکنندگان و صنعت‌گران عرصه‌ی پرورش دام، طیور و آبزیان تأمین نیاز انسان به غذا و مواد مغذی با کیفیت می‌باشد. یکی از صنایع تولیدی مهم در این زمینه آبی‌پروری است. ماهی ارزش غذایی بسیار بالایی داشته و بیشتر مواد مغذی مفید و ضروری برای انسان را دارد. با گسترش و توسعه آبی‌پروری به تدریج مشکلات و چالش‌های ناشی از آن نیز گسترش یافته است. برخی از این مشکلات مربوط به گسترش و انتشار بی‌رویه عوامل بیماری‌زاست. هزینه‌های تأمین پادزیست مصرفی در جلوگیری و درمان بیماری‌ها که برای بهبود رشد استفاده می‌شوند بسیار بالا است. از طرف دیگر، افزایش مقاومت دارویی در باکتریها، تجمع و بقایای مواد شیمیایی در محیط زیست و در بدن آبزیان، منجر به ایجاد مقررات سخت‌گیرانه در جهت محدودیت استفاده از پادزیستها و مواد شیمیایی در صنعت آبی‌پروری شده است. به همین دلیل تمایل به جستجوی گزینه‌های جدید افزایش یافته و پژوهش‌های متعددی در زمینه یافتن ترکیبات جدید که شامل افزودنیهای طبیعی و سالم می‌باشند، صورت می‌گیرد (Aubin, 2005).

استفاده از گیاهان دارویی با توجه به مزیت‌های متعدد، از جمله خطرات زیست محیطی حداقل، عدم ایجاد مقاومت دارویی، ارزان، پایدار و در دسترس بودن، توجه زیادی را در سطح جهان به خود جلب نموده است. اسانس برگ گیاه پونه خاصیت ضدعفونی‌کنندگی داشته و یک پادزیست قوی می‌باشد (Douk, 1985). این گیاه علاوه بر خاصیت ضد میکروبی و آنتی‌اکسیدانی بالا، دارای خاصیت ضد قارچی، تحریک‌کننده اشتها، افزایش دهنده قابلیت هضم مواد مغذی و خوراک مصرفی، بهبود دهنده وضعیت محیط دستگاه گوارش می‌باشد. فلور میکروبی ماهیان شامل مجموعه‌ای از باکتری‌های هوازی، بی‌هوازی اختیاری و بی‌هوازی اجباری می‌باشد که نقش مهمی را در هضم غذا و کنترل بیماری‌ها برعهده دارند. در طی دو دهه گذشته چندین پژوهش در مورد حضور باکتریهای اسیدلاکتیک در دستگاه گوارش ماهی صورت گرفت.

ثبات جمعیت باکتریایی روده ماهیان از آن جهت حائز اهمیت است که روده از نقطه نظر بروز عفونت‌های میکروبی و بیماری ماهیان جایگاه مهمی دارد، به ویژه زمانی که امکان انجام مایه‌کوبی وجود نداشته باشد (Birkbeck, 2005).

پروبیوتیکها میکروارگانیزمهایی هستند که به‌منظور پایداری جمعیت میکروبی مفید و مقابله با میکروبهای بیماری‌زای دستگاه گوارش در تغذیه جانوران به کار می‌روند. اینها با دگرگونی فلور میکروبی روده به سود باکتریهای سودمند و همزمان با کاهش باکتریهای بیماری‌زا و زیان بار، عملکرد روده‌ها را بهبود می‌بخشند (Fazlolahzadeh, 2011).

با توجه به فراوانی آلودگیهای میکروبی و نیاز به استفاده از یک جایگزین مناسب به جای پادزیستهای ساختگی و همچنین نیاز صنعت پرورش ماهی به معرفی مستمر افزودنیهای خوراکی برای تحریک رشد، بهبود فعالیت سامانه ایمنی، بهبود فلور طبیعی دستگاه گوارش و افزایش کمی و کیفی فرآورده‌های آن، هدف از این پژوهش بررسی سطوح مختلف عصاره‌ی گیاه پونه بر توان سامانه ایمنی، فلور طبیعی و بافت کبد و آبشش ماهی قزل‌آلای رنگین و سپس بررسی مقایسه‌ای آن با پروبیوتیک باکتوسل و پادزیست فلورفنیکل کمان بود.

۲. مواد و روشها

این پژوهش در مرکز شرکت تعاونی تکثیر و پرورش ماهیان سردابی مارون ۶۴۸ شیراز واقع در ۶۵ کیلومتری شهرستان اقلید فارس انجام شد. آب مورد نیاز از طریق چشمه تغذیه‌کننده کارگاه تأمین شد. تعداد ۱۵ تانک فایبرگلاس ۳۰۰ لیتری در داخل یک سالن سر پوشیده (با توزیع کاملاً تصادفی) مستقر شد. شرایط فیزیکیوشیمیایی آب (دما، pH و اکسیژن محلول) برای تمام تانکها یکسان و مشابه بود. کنترل عوامل فیزیکی و شیمیایی آب (درجه حرارت، pH و اکسیژن محلول) با استفاده از دستگاه‌های قابل حمل مدل WTW دیجیتالی فراهم گردید آب از راه یک لوله وارد سالن شده و سپس از طریق انشعابات بعدی به‌طور مساوی بین تانکها (با جریان ۵ لیتر در دقیقه) تقسیم شد (Merrifield, 2010). ورود آب به داخل

دمای ۴ درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند. جیره غذایی تجاری از کارخانه ۲۱ بیضا واقع در استان فارس خریداری شد و سپس بر اساس تیمارهای آزمایشی میزان لازم از هر یک از افزودنیها به آن افزوده گردید. نحوه آماده‌سازی جیره به این صورت بود که میزان عصاره پونه، پروبیوتیک و پادزیست مورد نیاز محاسبه گردیده و در روغن مایع گیاهی (۴۰ میلی لیتر در هر کیلوگرم خوراک) به صورت یکنواخت مخلوط و روی جیره اسپری شد. همچنین برای تهیه جیره شاهد روغن به میزان یاد شده اما بدون افزودنی اسپری شد.

بچه ماهیهای قزل‌آلای مورد نیاز با وزن متوسط 22 ± 0.5 گرم به تعداد ۴۵ قطعه به ازای هر تکرار، با توزیع کاملاً تصادفی بین تانک‌های فایبرگلاس توزیع شدند. پس از یک هفته سازگاری به محیط جدید، تعداد ۴۰ قطعه ماهی به هر یک از تکرارها اختصاص داده شد و ماهیان اضافی جمع‌آوری شدند و دوره پرورش با هر یک از جیره‌های آزمایشی آغاز گردید. لازم به ذکر است که قبل از ورود ماهیان قزل‌آلا به تانک‌های فایبرگلاس، از سیاهرگ ساقه دمی ۱۰ ماهی پس از بیومتری به صورت تصادفی با استفاده از سرنگ غیرهپارینه خونگیری انجام شد. نمونه خون در شروع و پایان آزمایش از باله دمی به صورت منعقد جمع‌آوری و در یخچال نگهداری و سپس درون یخ به آزمایشگاه میکروبی‌شناسی انتقال داده شد. در آزمایشگاه روی لام گسترش نازکی تهیه و با متانول تثبیت شد و برای شمارش سلولی با رنگ گیمسا رنگ‌آمیزی شدند (Merrifield, 2010). همچنین پس از اتمام دوره، از کبد و آبشش ماهیها نمونه برداری شد. نمونه‌ها از مراحل مختلف تهیه مقاطع بافتی شامل فیکس کردن، قالب‌گیری در پارافین، برش‌گیری و رنگ‌آمیزی با هماتوکسیلین و اتوزین عبور داده شدند و در نهایت لامهای تهیه شده، توسط میکروسکوپ نوری مجهز به لنز Dino capture مورد مطالعه قرار گرفتند.

برای تعیین میکروفلور روده، در روزهای اول و پایان دوره پرورش، سه قطعه ماهی از هر تکرار به طور تصادفی انتخاب و پس از کشتار از روده در شرایط

سالن و سپس تانکها بوسیله یک لوله و به صورت ثقلی و خروج آب از سالن نیز به وسیله یک کانال زهکش در کف سیمانی سالن و به صورت ثقلی انجام گرفت. همچنین نور سالن برای تمام تانکها به صورت یکسان بود. با استقرار تانکهای فایبرگلاس و آبرسانی به آنها، یک دوره آزمایشی ۸ هفته‌ای انتخاب شد.

پژوهش در قالب طرح آزمایشی کاملاً تصادفی شامل ۵ تیمار و ۳ تکرار انجام شد که در هر تکرار ۴۰ قطعه بچه ماهی ۲۰ گرمی از نوع قزل‌آلای رنگین‌کمان^۱ قرار داده شد. هر یک از تیمارهای آزمایشی با یکی از جیره‌های زیر تغذیه گردیدند:

تیمار ۱: جیره پایه بدون هر گونه افزودنی (شاهد)

تیمار ۲: جیره پایه بعلاوه پادزیست فلورنیکل (۵ میلی‌لیتر به ازای هر ۱۰۰ کیلو وزن زنده)

تیمار ۳: جیره پایه بعلاوه ۰/۵ درصد عصاره گیاه پونه.

تیمار ۴: جیره پایه بعلاوه ۱ درصد عصاره گیاه پونه.

تیمار ۵: جیره پایه بعلاوه ۰/۲ درصد پروبیوتیک.

پروبیوتیک مورد استفاده از نوع تجاری باکتوسل^۲ حاوی باکتری پدیوکوکوس اسیدی‌لاکتیسی^۳ به میزان 1×10^{10} CFU/g از کمپانی لالمنده^۴ فرانسه تهیه شد.

گیاه پونه در فصل تابستان از منطقه اقلید واقع در استان فارس جمع‌آوری و سپس در سایه کاملاً خشک گردید. برای شیرابه‌گیری، ۳۰۰ گرم از پودر خشک گیاه پونه در ۲ بشر ۲۰۰۰ میلی‌لیتری که هر کدام دارای یک لیتر اتانول ۱۰۰ درصد (مرک، آلمان) بود آمیخته گردید و دهانه‌ی بشر با کاغذ آلومینیومی پوشانیده شد و برای ۴۸ ساعت روی دستگاه تکان دهنده (فناوران، ایران) در دمای اتاق نگهداری شد. سوسپانسیون با کاغذ صافی پالایش و با دستگاه روتاری (دستگاه تبخیرگر چرخان خلادار) حلال زدایی شده و شیرابه گیاه گرفته شد (Parlat, 2005). عصاره‌های به دست آمده تا زمان استفاده در

³ *Pediococcus asidilactici*

⁴ Lallemand

¹ *Oncorhynchus mykiss*

² Bactocell

نرم افزار آماری SAS تجزیه آماری شد (Ringo, 1994).

۳. نتایج

اثر تیمارهای آزمایشی بر توان سامانه ایمنی سلولی در پایان دوره آزمایشی در جدول ۱ نشان داده شده است. درصد لنفوسیت در گروه تغذیه شده با پادزیست در مقایسه با گروه شاهد و هم‌چنین گروه تغذیه شده با نیم درصد عصاره افزایش معنی داری را نشان داد. بیشترین درصد نوتروفیل مربوط به تیمار شاهد بود. هم‌چنین درصد مونوسیتها نسبت به تیمار شاهد در تیمارهای حاوی عصاره به طور معناداری افزایش یافت.

سترون نمونه‌گیری و جهت انجام آزمایشات میکروبی‌شناسی به آزمایشگاه ارجاع داده شد. برای تعیین واحد تشکیل دهنده پرگنه، به ازای هر گرم از روده، رقتهای سریالی با ضربی از ۱-۱۰ تهیه گردید. برای شمارش باکتریهای مفید از محیط کشت MRS آگار (مرک، آلمان) (لاکتوباسیلوس) و شمارش باکتریهای کل از محیط کشت TSA آگار (مرک، آلمان) استفاده شد. محیط کشت MRS آگار در شرایط بی‌هوازی و TSA آگار در شرایط هوازی به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد گرمخانه‌گذاری شد و سپس با استفاده از دستگاه شمارنده کلونی (فن‌آزما، ایران)، شمارش باکتریها انجام شد. داده‌های به دست آمده به صورت لگاریتم بر پایه‌ی ۱۰ محاسبه گردید و در نهایت با استفاده از

جدول ۱- اثر تیمارها بر سامانه ایمنی سلولی

تیمار*	لنفوسیت (%)	مونوسیت (%)	نوتروفیل (%)
شاهد	۸۷/۸ ^b	۲ ^b	۱۰/۳ ^a
پادزیست	۹۴/۶۶ ^a	۴/۶۶ ^{ab}	۰/۶۷ ^c
۱ درصد عصاره	۹۰/۳۳ ^{ab}	۵/۱۷ ^a	۴/۵ ^b
۰/۵ درصد عصاره	۸۷/۸۳ ^b	۶/۶۶ ^a	۵/۵ ^b
پروبیوتیک	۹۱/۶ ^{ab}	۴ ^{ab}	۴/۴ ^b
SEM	۱/۴۹	۰/۸۸	۱/۰۴

* شاهد: جیره شاهد (بدون ماده افزودنی)

پادزیست: جیره پایه به همراه ۵ میلی‌گرم پادزیست فلورفنیکل ۱۰ درصد به ازاء هر ۱۰۰ کیلوگرم وزن زنده.

عصاره: جیره پایه به همراه ۱ و ۰/۵ درصد عصاره الکلی گیاه پونه.

پروبیوتیک: جیره پایه به همراه ۲ گرم پروبیوتیک باکتوسل به ازاء هر ۱۰۰ کیلوگرم جیره.

در هر ستون میانگین‌های با حروف ناهمسان، اختلاف معنی‌دار دارند (P < ۰/۰۵).

همچنین شمار این باکتریها در دو گروه نیم و یک درصد عصاره پونه یکسانه بوده و تفاوت معنی داری بین آنها مشاهده نگردید. شمار باکتریهای لاکتوباسیلوس در دو گروه نیم و یک درصد عصاره پونه در مقایسه با گروه تغذیه شده با پادزیست نیز بیشتر بوده که به نظر می‌رسد انتخاب مناسبی برای جایگزینی با پادزیست فلورفنیکل است.

بر اساس یافته‌های پژوهش شمار کل باکتریهای موجود در دستگاه گوارش تحت تاثیر معنی دار تیمارهای آزمایشی قرار نگرفتند. نکته‌ی مهم این است که شمار باکتریهای لاکتوباسیلوس موجود در دستگاه گوارش ماهی نسبت به گروه شاهد تغییرات قابل توجهی داشته است. در دو تیمار نیم و یک درصد عصاره، پادزیست و پروبیوتیک شمار باکتریهای لاکتوباسیلوس بیشتر از گروه شاهد می‌باشد.

جدول ۲- اثر تیمارهای آزمایشی بر شمار کل باکتریها و باکتریهای لاکتوباسیلوس (Log CFU/gr) دستگاه گوارش

تیمار*	کل باکتریها	لاکتوباسیلوس
شاهد	۶/۵	۴/۸ ^c
پادزیست	۶/۸	۵/۰ ^b
۱ درصد عصاره	۶/۸	۵/۳ ^a
۰/۵ درصد عصاره	۶/۱	۵/۳ ^a
پروبیوتیک	۶/۶	۵/۱ ^{ab}
±SEM	۰/۲۱	۰/۰۳۴

* شاهد: جیره شاهد (بدون ماده افزودنی)

پادزیست: جیره پایه به همراه ۵ میلی گرم پادزیست فلورفینیکل ۱۰ درصد به ازاء هر ۱۰۰ کیلوگرم وزن زنده.

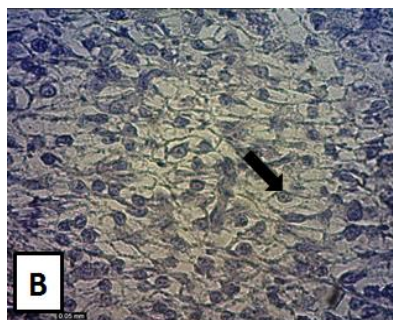
عصاره: جیره پایه به همراه ۱ و ۰/۵ درصد عصاره الکلی گیاه پونه.

پروبیوتیک: جیره پایه به همراه ۲ گرم پروبیوتیک باکتوسل به ازاء هر ۱۰۰ کیلوگرم جیره

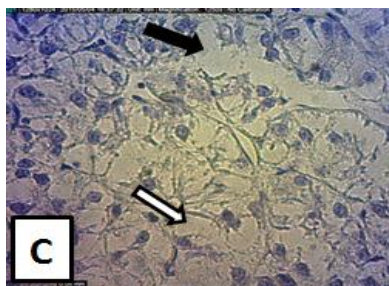
در هر ستون میانگین‌های با حروف ناهمسان، اختلاف معنی دار دارند ($P < 0.05$).

(شکل ۱) و گروهی که در جیره پایه شان از فلورفینیکل استفاده شده بود، هیپاتوسیتها واکوئله شده و به نظر می‌رسد نرخ لیپید و گلیکوژن در هیپاتوسیتها بیش از حد معمول بود (شکل ۲).

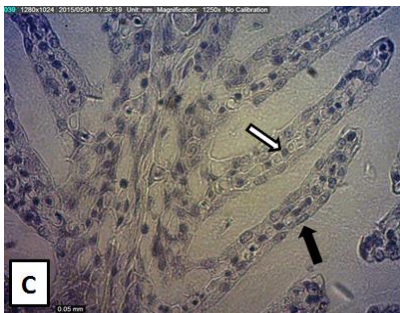
با توجه به نتایج به دست آمده در نمونه‌های بافتی، مشخص گردید که در ماهیان تغذیه شده با عصاره گیاه پونه، هیپاتوسیتها ساختار طبیعی خود را داشتند و اندازه هیپاتوسیتها و میانگین وزن کبد در این گروه نسبت به گروه شاهد، افزایشی را نشان نداد



شکل ۱- گروهی که عصاره پونه دریافت کرده‌اند. (فلش سیاه): هیپاتوسیتها همانند گروه کنترل اندازه طبیعی خود را دارند.



شکل ۲- گروهی که پادزیست فلورفینیکل را دریافت کرده‌اند. (فلش سفید): واکوئله شدن هیپاتوسیتها - (فلش سیاه): تخریب برخی از هیپاتوسیتها. همچنین نتایج نشان داد ماهیانی که در جیره پایه شان از عصاره گیاه پونه استفاده شده بود هیچگونه ناهماهنگی در ساختار سلولها و بافتهای آبششی مشاهده نشد. لاملاها توسط سلولهای اپیتلیال پوشیده شده‌اند و سلولهای کلراید هم در بین تیغه‌ها قرار گرفته‌اند (شکل ۳).



شکل ۳ - گروهی که عصاره پونه دریافت کرده اند همانند گروه شاهد فیلامنتها و لاملاها ساختار طبیعی خود را دارند. (فلش سیاه) : سلولهای اپیتلیال پوششی - (فلش سفید) : سلولهای ستونی.

سطح ایمنی ماهی قزل‌آلا به این نتیجه رسیدند که عصاره گیاهانی نظیر داروش، گزنه و زنجبیل سبب افزایش سطح ایمنی در بدن ماهی می‌گردد. Merrifield (۲۰۱۰) بیان کردند پودر گیاه زنجبیل در تغذیه ماهیان قزل‌آلای رنگین کمان باعث افزایش درصد لنفوسیت و نوتروفیل شد. اثر پروبیوتیکها بر وضعیت ایمنی ماهی مورد بررسی قرار گرفته است. سامانه ایمنی سلاح دفاعی مهم در مهره داران می‌باشد (Wang, 2007). در مواردی که در ترکیب جیره از پروبیوتیک استفاده می‌شود، وضعیت ایمنی ماهی بهبود می‌یابد (Ramirez, 2003). این امر خود باعث بهبود رشد آنها می‌گردد. از سوی دیگر، افزایش عملکرد سلولهای فاگوسیت پس از استفاده از پروبیوتیکها باعث بهبود وضعیت ایمنی و در نتیجه بهبود رشد ماهیان می‌گردد (Ramachandran, 2005).

Irianto و همکاران (۲۰۰۲) در بررسی تأثیر پروبیوتیک واناگن بر قزل‌آلای رنگین کمان نتیجه گیری کردند که اضافه کردن آن به جیره بچه ماهیان سبب تحریک سامانه ایمنی، مقاومت بیشتر در برابر عفونتهای ویروسی، باکتریایی و حتی انگلی شده و نیز مقاومت در مقابل تنش را افزایش داده و کارایی مایه کوبی را بهبود می‌بخشد که در آخر افزایش رشد، زنده‌مانی، ضریب رشد ویژه، نسبت بازده پروتئین و کاهش ضریب تبدیل غذایی را سبب می‌گردد.

استفاده از پروبیوتیکها یا میکروارگانیسمهای زنده به عنوان راه حلی مطمئن و طبیعی برای کنترل اکوسیستم میکروبی محسوب می‌شود. در مطالعه‌ای که روی باکتریهای هوازی موجود در لوله گوارشی

۴. بحث و نتیجه گیری

برخی گیاهان منبعی غنی از تاننها، پلی‌ساکاریدها، آلکالوئیدها، فلاونوئیدها، ساپونینها و پلی‌پتیدها هستند که نقشهای مختلفی از جمله داشتن اثرات ضد میکروبی و تقویت سامانه ایمنی ماهیان برای آنها مشخص شده است. با مروری بر پژوهشهای انجام شده در این زمینه به نظر می‌رسد استفاده از گیاهان دارویی به عنوان محرکهای ایمنی جایگزین مناسبی برای پادزیستها، واکسنها و ترکیبات ساختگی باشند. فلاونوئیدها، ویتامین C و کاروتنوئیدها در گیاه دارویی پونه وجود دارد، این ترکیبات گیاهی به طور عمومی اثرات سودمندی بر سامانه ایمنی. از سویی دیگر، گیاهان دارویی و معطر به واسطه‌ی تولید متابولیت‌های ثانویه از به‌وجود آمدن تنشهای فیزیولوژیکی و محیطی حاصل از میکروارگانیسمهای بیماری‌زا جلوگیری می‌کنند (Parlat, 2005).

بررسیهای انجام شده نشان داده شده که استفاده از گیاه سیر در جیره ماهی قزل‌آلای رنگین کمان در شرایط تنش، باعث افزایش معنی‌دار تعداد گلبولهای سفید، لنفوسیتها و نوتروفیلها نسبت به گروه شاهد شد (Fazlolahzadeh, 2011). Mohammadi و همکاران (۲۰۱۲) گزارش کردند که عصاره ترکیبی چند گیاه دارویی سنتی چینی فعالیت فاگوسیتوز ماکروفاژها، محتوای پروتئین پلاسما، خون، گلوبولین و لیپوزیم سرم را افزایش داده و منجر به افزایش سطح ایمنی ماهی کپور گردید. همچنین ایشان در بررسی اثرات چند گونه گیاه دارویی بر

اشرشیاکولی می‌شوند. هم‌چنین کارواکرول باعث تحریک رشد و تکثیر لاکتوباسیلوسها می‌شوند. ایشان گزارش کردند که آلفا-ترپیننها دارای خاصیت پادباکتریایی هستند. در همین راستا Hernandez و همکاران (۲۰۰۴) گزارش کردند تیمول دارای خاصیت پادمیکروبی بر ضد باکتری اشرشیاکولی می‌باشد. ایشان بیان کردند ترکیباتی مانند آلفا و بتا پینن، ترپینن، پاراسیمین دارای خواص پادمیکروبی می‌باشند. Ndong و همکاران (۲۰۱۱) اثرات پادمیکروبی دو ایزومر فنل شامل کارواکرول و تیمول و فنیل پروپانوئید سینامالدئید را روی باکتریهای اشرشیاکولی و سالمونلا تیفی موریوم نشان دادند. به طور کلی بیان شده این ترکیبات فنلی باعث ایجاد اختلال در غشای سیتوپلاسمی یاخته، اختلال در جابجایی پروتون، جریان انتقال الکترون و انتقال فعال و انعقاد محتوای یاخته می‌شوند (Alçiçek, 2003). Nya و همکاران (۲۰۰۹) با بررسی ترکیبی از روغنهای مؤثره و شناسایی مواد مؤثره آن که حاوی تیمول، کارواکرول، اوکگنول، کورکومین و پپیرین بود بیان کردند این مواد سبب کاهش تکثیر کلستریدیوم پرفینجنس* در روده می‌شود. استفاده از پروبیوتیک باعث افزایش شمار باکتریهای مفید دستگاه گوارش می‌گردد که این حالت به خوبی در این پژوهش به اثبات رسید. پروبیوتیکها مکملهای میکروبی زنده‌ای هستند که از راه بهبود تعادل میکروبی روده میزبان اثرات مفیدی اعمال می‌کنند (Castex, 2008). به نظر می‌رسد افزودن این باکتریها باعث ایجاد یک توازن صحیح بین باکتریهای مفید دستگاه گوارش می‌گردد.

از آنجایی که سلامت ساختار آناتومیک و بافتی اندامهای حیاتی بدن مانند کبد و آبش تاثیر بسیار زیادی بر هموستازی بدن دارد، به نظر می‌رسد که فعالیت طبیعی در این اندامها منجر به کاهش استرسهای محیطی و در نتیجه بهبود کارایی سامانه ایمنی می‌شود. هم‌چنین با توجه به ارتباط نزدیک بین سامانه ایمنی ماهی با فلور طبیعی دستگاه گوارش، فعالیت صحیح این اندامها می‌تواند در جانوران باعث افزایش توان ایمنی، استقرار باکتریهای مفید و کاهش باکتریهای مضر شود.

ماهیان انجام شد، مشخص گردید که گونه‌های باکتریایی جدا شده از روده این ماهیان، تولید آنزیمهای گوارشی را عهده دار بودند. بنابراین می‌توان گفت که این باکتریها در تسهیل هضم و جذب مواد غذایی نقش دارند. نشان داده شده که استفاده از باکتوسل باعث تغییرات مفیدی در جمعیت میکروبی روده در ماهیان قزل‌آلا و میگوها می‌شود (Alice, 2013). پروبیوتیکها از راه رقابت با میکروبهای بیماری‌زا در جهت استفاده از مواد مغذی و هم‌چنین در اتصال به مخاط دستگاه گوارش و کاهش تولید سم و یا مواد سمی در روده، به بهبود وضعیت سلامتی در پستانداران، پرندگان و آبزیان کمک می‌کنند.

پروبیوتیک باکتوسل به عنوان یک زیست یار حیاتی است و یک گرم از آن حاوی 1×10^{10} واحد تشکیل دهنده‌ی باکتری است. این فرآورده‌ها با پرشمار شدن در دستگاه گوارش میزبان و چسبیدن به جدار روده و تحریک و افزایش آنزیمهای گوارشی و افزایش اسیدیتته لوله گوارش سبب بهبود فاکتورهای رشد، ایمنی و مقاومت شده و با کاهش تلفات، تولید بیشتری را در زمان کوتاهتر بدست خواهد داد. برخلاف یافته‌های زیادی که در مورد باکتریهای اسیدلاکتیک در حیوانات خون‌گرم وجود دارد، پژوهشهای کمی در این مورد که باکتریهای اسیدلاکتیک بخشی از فلور طبیعی دستگاه گوارش ماهیان‌اند، موجود می‌باشد. اطلاعات در مورد وجود لاکتوباسیلها در دستگاه گوارش آزاد ماهیان توسط Ringo و همکاران (۱۹۹۵) مورد بررسی قرار گرفته است، ولی اطلاعات پایه‌ای پیرامون باکتریهای اسید لاکتیک دستگاه گوارش و یا باکتریهای اسید لاکتیک بیماری‌زای جدا شده از اندامهای داخلی وجود ندارند.

نتایج این بخش از پژوهش با یافته‌های بسیاری از پژوهشگران در مورد اثر افزایش‌دهی این گیاه روی باکتریهای مفید دستگاه گوارش همسو می‌باشد. شاید این اثر افزایش‌دهی به‌علت وجود ترکیباتی مانند کارواکرول و تیمول در عصاره‌ی این گیاه باشد. Lara و همکاران (۲۰۰۳) بیان کردند استفاده از رژیم غذایی دارای کارواکرول و تیمول سبب افزایش شمار باکتریهای لاکتوباسیل و کاهش شمار باکتری

*Clostridium perfringens

دستگاه گوارش افزایش می‌یابد. همچنین به نظر می‌رسد که عصاره گیاه پونه نه تنها هیچگونه اثر سوئی بر روی ساختار بافتی آبشش و کبد ندارد، بلکه می‌تواند جایگزین مناسبی برای پادزیستهای صنعتی باشد.

به‌طور کلی نتایج این پژوهش نشان داد که با اضافه نمودن پادزیست، پروبیوتیک و عصاره به جیره ماهی قزل‌آلا، سطح ایمنی مربوط به لنفوسیتها و منوسیتها و شمار باکتریهای لاکتوباسیلوس موجود در

References

- Alçiçek, A., Bozkurt, M., Çabuk, M., 2003. The effects of an essential oil combination derived from selected herbs growing wild in Turkey on broiler performance. *South African Journal of Animal Science*, 33, 89-94.
- Aubin, J., Gatesoupe, F., Labbe, L., Lebrun, L., 2005. Trial of probiotics to prevent the vertebral column compression syndrome in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss* Walbaum). *Aquaculture Research*, 36, 758-767.
- Birkbeck, T.H., Ringo, E., 2005. Pathogenesis and gastrointestinal tract of growing fish. In: Holzappel, W.; Naughton, P (Eds.): *Microbial Ecology in Growing Animals*. Elsevier, Edinburgh, UK, pp. 208-234.
- Castex, M., Chim, L., Pham, D., Lemaire, P., Wabete, N., Nicolas, J.-L., Schmidely, P., Mariojouis, C., 2008. Probiotic *P. acidilactici* application in shrimp *Litopenaeus stylirostris* culture subject to vibriosis in New Caledonia. *Aquaculture*, 275, 182-193.
- Duke, J.A., 1985. *Handbook of Medicinal Herbs*. CRC Press species of herb on immune function of *Carassius, Boca Raton*, 677-705.
- Fazlolahzadeh, F., Keramati, K., Nazifi, S., Shirian, S., Seifi, S., 2011. Effect of Garlic (*Allium sativum*) on hematological parameters and plasma activities of alt and ast of Rainbow trout in temperature stress. *Australian Journal of Basic and Applied Sciences*, 5(9), 84-90 (in Persian).
- Hernandez, F., Madrid, J., Garcia, V., Orengo, J., Megias, M.D., 2004. Influence of two plant extracts on broiler performance, digestibility and digestive organ size. *Poultry Science*, 83: 169-174.
- Lara-Flores ,M., Olvera-Novoa, M.A., Guzmán-Méndez, B. E. López- Madrid, W., 2003. Use of the bacteria *Streptococcus faecium* and *Lactobacillus acidophilus*, and the yeast *Saccharomyces cerevisiae* as growth promoters in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*), *Aquaculture*, 216(1-4):193-201
- Mohammadi H., Agh N., Tukmechi A., Noori, F., 2012. Effects of using *Lactobacillus rhamnosus* probiotic and *Nigella sativa* (black seed) on the growth parameters of Rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Journal of Applied Biology of Azahra University of Tehran*. (in Persian)
- Ndong, D., Fall, J., 2011. The effect of garlic (*Allium sativum*) on growth and immune responses of hybrid tilapia (*Oreochromis niloticus* x *Oreochromis aureus*). Department of Aquaculture, College of Life Sciences National Taiwan Ocean University Keelung, Taiwan, 202 p, ROC.
- Nya, E.J., Austin, B., 2009. Use of dietary ginger, *Zingiber officinale* Roscoe, as an immunostimulant to control *Aeromonas hydrophila* infections in rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum). *Fish Diseases*, 32, 971-977.
- Parlat, S. S., A. Ö. Yildiz, O. Olgun and Y. Cafadar. 2005. Usage of oregano essential oil (*Origanum vulgare* L.) extracts for growth stimulant antibiotic in quail rations. *Selçuk Üniversitesi Ziraat Fakültesi Dergisi*, 19 (36), 7-12.
- Ramachandran, S., Bairagi, A., Ray, A.K., 2005. Improvement of nutritive value of grass pea (*Lathyrus sativus*) seed meal in the formulated diets for rohu, *Labeorohita* (Hamilton) fingerlings after fermentation with a fish gut bacterium. *Bioresource Technology*, 96(13), 1465-1472.
- Ramirez, R.F., Dixon, B.A., 2003. Enzyme production by obligate intestinal anaerobic bacteria isolated from Oscars (*Astronotus ocellatus*), angelfish (*Pterophyllum scalare*) and southern flounder (*Paralichthys ethostigma*). *Aquaculture*, 227(1-4), 417-426.
- Ringo, E., Strom, E., 1994. Intestinal microflora of Arctic char. (*Salvelinus alpinus*) (L.I.). The gastrointestinal microflora of free-living fish, and the effect of diet and salinity on Intestinal microflora. *Aquaculture and Fisheries Management*, 25, 623-629.
- Wang, Y., 2007. Effect of probiotics on growth performance and digestive enzyme activity of the shrimp *Penaeus vannamei*, *Aquaculture*, 269(1-4), 259-264.