اثر منفرد و ترکیبی برخی پروبیوتیک‌ها بر ایمنی موکوسی کپور معمولی (*Cyprinus carpio*)

آریا وزیرزاده* و هاجر معصومی فشانی

ایران، شیراز، دانشگاه شیراز، دانشکده کشاورزی، بخش مهندسی منابع طبیعی و محیط‌زیست

تاریخ دریافت: ۹۶/۵/۱۴ تاریخ پذیرش: ۹۷/۷/۲۵

چکیده

امروزه استفاده از محرک‌های ایمنی طبیعی برای افزایش پاسخ ایمنی در ماهیان جهت مقابله با بیماری‌ها افزایش‌یافته است، پروبیوتیک‌ها به‌عنوان میکروب‌هایی که به میزبان سود می‌رسانند شناخته‌شده‌اند و یک جایگزین مناسب برای مواد شیمیایی و آنتی‌بیوتیک‌ها در پرورش آبزیان هستند. در این پژوهش اثر باکتری پدیکوکوس‌اسیدی‌لاکتیسی (*Pediococcus asidilactici*) و مخمر ساکارومایسیس (*Saccharomyces cerevisiae*) بر تغییرات میزان ایمونوگلوبولین‌کل، پروتئین کل، آلبومین و گلوبولین، ۱۱۲ قطعه ماهی کپور معمولی (*Cyprinus carpio*) با میانگین وزن ۱۰ ±۳۰ گرم به مدت ۴۲ روز موردبررسی قرارگرفت. پس از دو هفته سازگاری ماهیان به ۴ گروه با دو تکرار تقسیم شدند. گروه اول با باکتری پدیکوکوس‌اسیدی‌لاکتیسی با غلظت 10^{7} CFU/g در هر گرم پودر باکتری، گروه دوم با مخمر ساکارومایسیس با غلظت 10^{7} CFU/g در هر گرم پودر مخمر، گروه سوم ترکیب باکتری پدیکوکوس‌اسیدی‌لاکتیسی و مخمر ساکارومایسیس با غلظت 10^{7} CFU/g و گروه چهارم به‌عنوان گروه شاهد در نظر گرفته شد. نتایج حاصل از این پژوهش نشان داد که استفاده از مکمل‌های مذکور باعث افزایش پارامترهای ایمونوگلوبولین‌کل، پروتئین کل، آلبومین و گلوبولین در موکوس ماهی کپور معمولی می‌شود اما این تغییرات در مقایسه با گروه شاهد معنی‌دار نبود ($P \geq 0/05$).

واژه‌های کلیدی: پروبیوتیک، ایمنی، موکوس، کپور معمولی

* نویسنده مسئول، تلفن: ۰۷۱۳۶۱۳۸۱۷۰، پست الکترونیکی: aryavazirzadeh@yahoo.com

مقدمه

افزایش جمعیت جهان، ارتقای سطح آگاهی جوامع مختلف درباره اهمیت مصرف محصولات شیلاتی و به‌تبع آن نیاز به تولید بیشتر و باکیفیت‌تر (۸، ۲۱و ۳۲) و همچنین کاهش ذخیره ماهیان دریایی به دنبال انحطاط صنعت صید و صیادی ماهی و افزایش شیوه‌های نوین تولید ماهی، صنعت آبزی‌پروری را در موقعیت بهتری نسبت به سایر صنایع تولید گوشت حیوانی و بخش امنیت غذایی قرارداده است (۲۶و ۳۱)، بطوری که سهم تولید جهانی این صنعت (تولید ماهی، سخت‌پوستان و نرم‌تنان) از ۴۴/۳ میلیون تن در سال ۲۰۰۵ به ۷۳/۸ میلیون تن در سال ۲۰۱۴ افزایش یافت، بااین‌حال عوامل محدودکننده مختلفی گسترش صنعت آبزی‌پروری را با مشکلاتی مواجه ساخته است (۴)، که از آن جمله می‌توان به کاهش کیفیت آب، شیوع عفونت‌های ویروسی، باکتریایی، قارچی و غیره اشاره کرد (۱۱). شیوع بیماری، مشکل عمده‌ی آبزی‌پروری محسوب می‌شود که گسترش اقتصادی این بخش را در بسیاری از کشورهای جهان تحت تأثیر قرارداده است (۱۱و ۲۸).

برای جلوگیری، درمان و کنترل بیماری‌های عفونی در ماهی، معمولاً از واکسن‌ها یا داروهای شیمیایی ازجمله آنتی‌بیوتیک‌ها استفاده می‌شود. استفاده‌ی گسترده از آنتی-

بیوتیک‌ها، باعث مقاومت آنتی‌بیوتیکی در میکروارگانیسم-های بیماری‌زا و خطرات زیست‌محیطی، همچنین مقاومت باکتریایی در این حیوانات می‌شود (۹، ۲۸ و ۳۵). جوامع علمی پروبیوتیک‌ها را به‌عنوان یک کاندیدای مناسب برای برداشتن چرخه‌ی نادرست مقاومت آنتی‌بیوتیکی می‌دانند. پروبیوتیک‌ها در تغذیه انسان و دام کاربرد داشته و اخیراً در آبزی‌پروری نیز استفاده می‌شوند (۱و ۹). استفاده از پروبیوتیک‌ها در واقع تکنولوژی جدید آبزی‌پروری همگام با موازین حفظ محیط‌زیست به شمار می‌رود. این مواد به‌عنوان سلول‌های میکروبی یا ترکیباتی از این سلول‌ها تعریف می‌شوند که اثرات مفیدی بر سلامتی میزبان دارند. این مواد بطور سودمندی با بهبود تعادل فلور میکروبی روده به میزبان سود می‌رساند، و به‌صورت مکمل‌هایی به غذاهای مصنوعی افزوده می‌شوند و برای جلوگیری از گسترش بیماری‌ها، افزایش کارایی ضریب تبدیل غذایی، تحریک رشد، تعادل و تقویت سیستم ایمنی، مقاومت در برابر استرس، اصلاح کیفیت آب و ... مورداستفاده قرار می‌گیرند (۱۱، ۲۰و ۳۰). میکروارگانیسم‌هایی که به‌عنوان پروبیوتیک در آبزی‌پروری استفاده می‌شوند شامل پروبیوتیک‌های مخمری، باکتریایی و قارچی هستند (۶، ۱۸ و ۳۵).

سیستم ایمنی ماهی‌ها شبیه به سایر مهره‌داران است بااین تفاوت که چندان توسعه‌یافته نیست. سیستم ایمنی ماهی از دو بخش ذاتی (Innate) و اکتسابی (Adaptive) تشکیل‌شده است. سیستم ایمنی اکتسابی ماهیان شامل لنفوسیت‌های B، T و ایمونوگلوبولین‌ها است. همچنین سیستم ایمنی ذاتی آن‌ها شامل ماکروفاژها، نوتروفیل‌ها، سلول‌های دندرتیک، سلول‌های کشنده‌ی طبیعی، حفاظت فیزیکی (موکوس)، سیستم کمپلمان، لیزوزیم، آنتی‌پروتئاز-ها و پپتایدهای آنتی‌میکروبیال می‌باشند. سیستم ایمنی ماهی بیشتر بر ایمنی ذاتی متکی است و لذا ماکروفاژها مهم‌ترین سلول‌های ایمنی در ماهیان محسوب می‌شوند (۱۰و ۱۴).

لایه‌ی موکوس سطح بدن ماهی شامل ترکیبات ضد-میکروبی است که نخستین سطح دفاعی میزبان را در برابر عوامل بیماری‌زا تشکیل می‌دهد. موکوس اپیدرم حاوی چندین ترکیب ترشحی ازجمله گلایکوپروتئین‌ها، آگلوتین‌ها، لکتین‌ها، پپتیدهای ضد میکروبی، آنزیم‌های پروتئولیتیک، فلاوآنزیم‌ها، ایمنوگلوبولین‌ها، لیزین، لیزوزیم، پروتئین فاز حاد و آنتی بادی‌های طبیعی می‌باشد که نقش دفاعی مهمی را علیه عوامل بیماری‌زا ایفا می‌کند. ایمنی موکوسی یکی از بخش‌های مهم سیستم ایمنی ذاتی در ماهی‌ها می‌باشد (۳۳).

ماهی کپور معمولی (*Cyprinus carpio*) گونه‌ای از ماهیان آب شیرین می‌باشد که منشأ آسیایی داشته و سپس در سراسر دنیا گسترش یافته است. این‌گونه در ایران نیز یکی از گونه‌های اصلی پرورش بوده و بخشی از پروتئین حیوانی مصرفی جامعه را تأمین می‌کند (۵). ماهیان در محیط پرورش از شرایط طبیعی زیستی و فیزیکوشیمیایی مطلوب زندگی بهره‌مند نبوده و محکوم به ادامه‌ی زندگی در شرایط موجود می‌باشند که ممکن است نامساعد بوده و باعث کاهش مقاومت بدن آن‌ها در برابر بیماری‌های گوناگون شود (۳).

در راستای استفاده از پروبیوتیک‌ها به‌عنوان محرک ایمنی، تاکنون پژوهش‌های متعددی صورت گرفته است، که هریک بر ابعاد مختلف تأثیر پروبیوتیک‌ها بر سیستم ایمنی آبزیان تمرکز کرده‌اند. به‌عنوان‌مثال برای اولین بار یاسودا و تاگا (۱۹۸۰) (۳۶) پیش‌بینی کردند که، در آبزی‌پروری باکتری‌هایی پیدا خواهند شد که نه‌تنها به‌عنوان غذا مفید خواهند بود بلکه به‌عنوان کنترل‌کننده‌های بیولوژیک بیماری ماهیان و فعال‌کننده چرخه‌ی مواد غذایی نیز بکار خواهند رفت.

در دنیای امروز شناخت عوامل مؤثر در بهبود رشد و وضعیت سلامتی میزبان حائز اهمیت است و یکی از ابعاد مهم در تئوری تأثیر مصرف پروبیوتیک‌ها به‌عنوان مکمل

غذایی در آبزیان می‌باشد، این بعد از تأثیر پروبیوتیک‌ها در پژوهش‌های متعددی بررسی‌شده است که می‌توان به مطالعه‌ی سان و همکاران (۲۰۱۰) (۳۴)، هو و همکاران (۲۰۱۳) (۲۲)، گوپتا و همکاران (۲۰۱۴) اشاره کرد (۱۹)، که نتایج مطالعات آنها بیانگر تأثیر مثبت پروبیوتیک‌های مختلف در تقویت رشد و ارتقای وضعیت سلامتی آبزیان است.

بر اساس تحقیقات گذشته پروبیوتیک‌ها می‌توانند در افزایش ایمنی ذاتی خونی و موکوسی ماهیان تأثیر داشته باشند، تاکنون مطالعات زیادی در خصوص تأثیر پروبیوتیک‌ها بر ایمنی ماهی انجام‌شده است (۱۵). با این وجود تأثیر ترکیبی پروبیوتیک بر ایمنی ماهی به‌خصوص ایمنی موکوسی چندان مطالعه نشده است، لذا دراین پژوهش اثر باکتری پدیکوکوس‌اسیدی‌لاکتیسی (*Pediococcus asidilactici*) و مخمر ساکارومایسیس (*Saccharomyces cerevisiae*) بعنوان دو پروبیوتیک بر تغییرات ایمونوگلوبولین‌کل، پروتئین کل، آلبومین و گلوبولین در موکوس ماهی کپور معمولی موردبررسی قرارگرفت.

مواد و روشها

این مطالعه بر روی ۱۱۲ قطعه ماهی کپور معمولی با میانگین وزن ۱۰±۳۰ گرم –که از کارگاه تکثیر و پرورش آبزیان صدرا تهیه‌شده بود و در سالن آکواریوم بخش مهندسی منابع طبیعی و محیطزیست دانشگاه شیراز انجام شد. پس از اتمام ۱۴ روز دوره سازگاری، ماهیان بطور کاملاً تصادفی در ۸ آکواریوم شیشه‌ای ۱۰۰ لیتری با تراکم ۱۴ قطعه ماهی در هر آکواریوم توزیع شد. آزمایشات شامل ۴ تیمار آزمایشی در ۲ تکرار بود. تیمار اول باکتری پدیکوکوس‌اسیدی‌لاکتیسی، تیمار دوم مخمر ساکارومایسیس‌سرویزیه، تیمار سوم باکتری پدیکوکوس-اسیدی‌لاکتیسی و مخمر ساکارومایسیس‌سرویزیه و تیمار چهارم گروه شاهد بود.

تهیه‌ی غذا: باکتری پدیکوکوس اسیدی‌لاکتیسی مورد استفاده دراین تحقیق تولید شرکت تک ژن ایران و مخمر ساکارومایسیس سرویزیه ساخت شرکت ARDEYPHARM آلمان بود. غذای مورد استفاده دراین تحقیق غذای تجاری ماهی کپور معمولی (شرکت ۲۱ بیضا، شیراز) بود. برای تهیه‌ی غذای مورد استفاده در طول دوره باتوجه به اینکه غلظت اولیه باکتری پدیکوکوس‌اسیدی-لاکتیسی 10^{13} CFU/g در هر گرم پودر باکتری بود، جهت تهیه غلظت موردنظر (10^{7} CFU/g) ۰/۲۵ گرم از باکتری موردنظر در ۲۵۰ میلی‌لیتر آب مقطر حل شد. سپس یک میلی‌لیتر از این سوسپانسیون در ۵۰ میلی‌لیتر آب مقطر رقیق شد و بر روی یک کیلوگرم غذا اسپری شد. تعداد اولیه مخمر ساکارومایسیس‌سرویزیه نیز 10^{10} CFU/g در هر گرم پودر مخمر بود. لذا برای هر کیلوگرم غذا محتویات ۴ کپسول حاوی ۲۵۰ میلی‌گرم از مخمر در ۵۰ میلی‌لیتر آب مقطر حل شد و به غذا اسپری گردید. برای جلوگیری از آبشستگی پروبوتیک‌ها قبل از مصرف ماهیان، به ازای هر کیلوگرم غذا میزان ۳ گرم ژلاتین گاوی در ۱۰۰ میلی‌لیتر محلول حل و بر روی غذا اسپری شد. غذادهی به ماهیان در حد اشتها و دو نوبت در روز ساعت ۹:۳۰ و ۱۵:۳۰ انجام شد. میانگین دمای آب و میزان اکسیژن محلول به صورت روزانه ثبت شد. جهت بررسی شاخص-های موردنظر در هفته‌ی ششم از شروع غذادهی تعداد ۵ قطعه ماهی از هر تیمار به‌طور تصادفی صید و پس از بیهوش کردن در محلول پودر گل میخک (۱۵۰میلی‌گرم در لیتر) جمع‌آوری موکوس انجام شد. پارامترهای موردبررسی شامل شاخص ایمنی (ایمنوگلوبولین‌کل) و فاکتورهای بیوشیمیایی (میزان پروتئین کل، میزان آلبومین و میزان گلوبولین) بود.

جمع‌آوری موکوس پوست: برای سنجش فاکتورهای بیوشیمیایی و شاخص ایمنی در هفته‌ی ششم از شروع غذادهی اقدام به جمع‌آوری موکوس شد. موکوس ماهیان

با استفاده از روش سوبرامانیان و همکاران (۲۰۰۷) (۳۳) باکمی اصلاحات جمع‌آوری شد. غذادهی ۲۴ ساعت قبل از نمونه‌برداری قطع شد. به منظور به حداقل رساندن باکتری‌های متصل به سطح بدن و از بین رفتن سایر آلودگی‌ها، ماهی ها درون آب تمیز وارد شدند و بلافاصله هر ۵ قطعه ماهی به درون کیسه‌های زیپ پلاست حاوی ۱۰ میلی‌لیتر سدیم‌کلرید ۵۰ میلی‌مولار (۲ میلی‌لیتر به ازای هر قطعه ماهی) قرارگرفتند، پس از مدت زمان دو دقیقه ماهیان به آکواریوم با اکسیژن مناسب منتقل شدند. موکوس از کیسه‌ها جمع‌آوری و مایع رویی آن در آزمایشگاه پس از سانترفیوژ ۱۵۰۰دور بر دقیقه به مدت ۱۰ دقیقه و در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد به دست آمد. نمونه‌ها تا زمان آزمایش در فریزر ۲۰- قرار نگهداری شدند.

سنجش ایمنوگلوبولین‌کل: برای اندازه‌گیری ایمونوگلبولین‌کل از روش آنرسون و سیویکی (۱۹۹۵) (۷) استفاده شد. ابتدا میزان پروتئین کل موکوس تعیین شد و سپس به نمونه موکوس پلی‌اتیلن‌گلایکول ۱۲ درصد اضافه (PEG, 10000, MW) شد. پس از ۲ ساعت در دمای اتاق نمونه‌ها سانتریفوژ شده و غلظت پروتئین در قسمت بالایی محلول مجدداً توسط روش بردفورد اندازه‌گیری شد. میزان ایمونوگلبولین‌کل از تفریق غلظت پروتئین در نمونه اولیه و غلظت پروتئین پس از افزودن پلی‌اتیلن‌گلایکول محاسبه شد.

سنجش پروتئین کل، آلبومین و گلوبولین: میزان پروتئین کل و آلبومین به روش برادفورد و با استفاده از کیت‌های تجاری شرکت پارس آزمون استفاده شد. میزان گلوبولین از تفریق پروتئین کل و آلبومین بدست آمد.

آنالیزهای آماری: دراین آزمایش در قالب یک طرح کاملاً تصادفی انجام شد. پس از بررسی یکنواختی واریانس و نرمال بودن داده‌ها، تفاوت میانگین داده‌های به‌دست‌آمده از تیمارها از طریق آنالیز واریانس یک‌طرفه one-way-ANOVA و تست Duncan در سطح معنی‌داری (P<۰/۰۵) و با استفاده از نرم‌افزار SAS 9.1.3 بررسی شد.

نتایج

ایمنوگلوبولین کل: میزان پارامتر ایمنوگلوبولین‌کل در گروه‌های حاوی پروبیوتیک نسبت به گروه شاهد بیشتر بود، اما براساس یافته‌های این آزمایش اختلاف معنی‌داری بین تیمارهای حاوی پروبیوتیک و تیمار شاهد در زمان نمونه‌برداری مشاهده نشد (P≥ ۰/۰۵)، جدول (۱).

پروتئین کل: میزان این شاخص در ماهیان نمونه‌برداری شده در دامنه ۰/۱۰ تا ۰/۱۲ درصد بوده و اختلاف معنی-داری بین گروه‌های حاوی پروبیوتیک و گروه شاهد مشاهده نشد (P≥ ۰/۰۵)، جدول (۱).

میزان آلبومین: نتایج نشان دادند که میزان آلبومین در تیمارهای حاوی پروبیوتیک نسبت به گروه شاهد بیشتر بوده است اما اختلاف معنی‌داری بین تیمارهای حاوی پروبیوتیک و تیمار شاهد وجود نداشت (P≥ ۰/۰۵). جدول (۱).

میزان گلوبولین: نتایج نشان داد که میزان این فاکتور در گروه‌های حاوی پروبیوتیک نسبت به گروه شاهد بیشتر بوده است و بیشترین میزان آن در گروه باکتری پدیکوکو اسیدی‌لاکتیسی و گروه باکتری پدیکوکوس‌اسیدی‌لاکتیسی و مخمر ساکارومایسیس‌سرویزیه بوده است. اما براساس آزمون دانکن اختلاف معنی‌داری بین تیمارهای حاوی پروبیوتیک و تیمار شاهد در زمان نمونه‌برداری مشاهده نشد (P≥ ۰/۰۵)، جدول (۱).

بحث و نتیجه‌گیری

امروزه استفاده از محرک‌های ایمنی طبیعی برای افزایش پاسخ ایمنی در ماهی جهت مقابله با بیماری‌ها افزایش یافته است (۱۲).

جدول ۱- اثر منفرد و ترکیبی پروبیوتیک های منتخب بر شاخص‌های ایمنی موکوس ماهی کپور معمولی

تیمار	تیمار اول	تیمار دوم	تیمار سوم	تیمار چهارم	*P-value*
شاخص					
ایمنوگلوبولین‌کل	۰/۰۵ ±۰/۰۰۱[a]	۰/۰۶ ±۰/۰۰۱[a]	۰/۰۵ ±۰/۰۰۱[a]	۰/۰۴ ± ۰/۰۰۱[a]	۰/۳۹۹
پروتئین کل	۰/۱۲ ± ۰/۰۰۲[a]	۰/۱۰ ± ۰/۰۰۲[a]	۰/۱۲ ± ۰/۰۰۲[a]	۰/۰۹ ± ۰/۰۰۲[a]	۰/۳۸۳
آلبومین	۰/۰۷ ± ۰/۰۰۱[a]	۰/۰۶ ± ۰/۰۰۱[a]	۰/۰۷ ± ۰/۰۰۱[a]	۰/۰۵ ±۰/۰۰۱[a]	۰/۷۹۷
گلوبولین	۰/۰۵ ± ۰/۰۰۲[a]	۰/۰۳ ± ۰/۰۰۲[a]	۰/۰۵ ± ۰/۰۰۲[a]	۰/۰۳ ± ۰/۰۰۲[a]	۰/۶۶۱

داده‌ها به‌صورت میانگین ± اشتباه معیار آزمایش ارائه‌شده است. حروف مشابه در هر ردیف نشان‌دهنده‌ی معنی‌دار نبودن پارامترهای اندازه‌گیری شده است. تیمار اول: باکتری پدیکوکو اسیدی‌لاکتیسی، تیمار دوم: مخمر ساکارومایسیس‌سرویزیه، تمیار سوم: باکتری پدیکوکوس‌اسیدی‌لاکتیسی و مخمر ساکارومایسیس‌سرویزیه و تیمار چهارم: شاهد

فعالیت‌های پژوهشگران استفاده از پروبیوتیک‌ها برای کنترل بیماری آبزیان متمرکز شده است (۱۲، ۱۳و۲۹). پروبیوتیک‌ها بعنوان میکروب‌هایی که به میزبان سود می-رسانند شناخته شده‌اند (۱۷) و یک جایگزین مناسب برای مواد شیمیایی و آنتی‌بیوتیک‌ها در پرورش ماهی هستند (۹، ۲۳و ۳۵).

ایمنوگلوبولین ترکیب اصلی سیستم ایمنی هومورال است، مکمل‌های پروبیوتیکی باعث تحریک تولید ایمنوگلوبولین در ماهی می‌شوند (۱۷). در تحقیق حاضر میزان ایمنوگلوبین‌کل بعنوان فاکتوری از ایمنی اختصاصی مورد بررسی قرارگرفت. نقش‌های حفاظتی آنتی‌بادی‌ها شامل خنثی‌سازی ویروسی، کشتن و چسبیدن به باکتری‌ها، فعالیت سیستم کمپلمان و تسهیل نمودن بلع پاتوژن‌ها می-باشد. ماهیان استخوانی قادر به فراخواندن آنتی‌بادی اختصاصی مؤثر در برابر آنتی‌ژن‌های مختلف می‌باشند. این پاسخ در بین گونه‌های مختلف ماهیان استخوانی و در شرایط مختلف محیطی متفاوت می‌باشد (۲۴). روند تولید ایمنوگلوبین‌ها در ماهی وقوع مجموعه‌ای از واکنش‌های بین سلول‌های ارائه‌دهنده آنتی‌ژن، سلول‌های T کمک‌کننده فعال‌شده و اینترلوکین‌هاست که سبب تحریک لنفوسیت-های B می‌شوند. این لنفوسیت‌ها براثر تحریک، پلاسماسل‌ها را تولید می‌کنند که قادر به ترشح ایمنوگلوبین‌ها می‌باشند (۲).

نتایج حاصل ازاین پژوهش نشان داد که، بین میزان میانگین ایمنوگلوبولین تیمارهای حاوی پروبیوتیک و گروه شاهد در زمان نمونه‌برداری اختلاف معنی‌دار آماری وجود ندارد. میانگین ایمنوگلوبین‌کل در تیمارهای حاوی پروبیوتیک در زمان نمونه‌برداری دارای مقادیر بیشتری نسبت به گروه شاهد بودند این بالاتر بودن می‌تواند به علت باکتری‌های اسیدلاکتیکی باشد که تولید آنتی‌بادی را تحریک کرده و باعث بالا رفتن این فاکتور نسبت به گروه شاهد شده است (۲۵). پانیگراهی و همکاران (۲۰۰۵) (۲۷) گزارش کردند که تغذیه قزل‌آلای رنگین‌کمان با مکمل *Lactobacillus rhamnosus* JCM 1136 تا ۲۰ روز باعث افزایش سطح ایمنوگلوبولین نسبت به گروه شاهد می‌شود و بعدازآن تا ۳۰روز غذادهی نسبت به گروه شاهد کاهش می‌یابد، همچنین سان و همکاران (۲۰۱۰) (۳۴) گزارش کردند که تغذیه ماهی هامور *Epinephelus coioides* با *Bacillus clausii* و *Bacillus pumilus* تا ۳۰ روز غذادهی باعث افزایش IgM نسبت به گروه شاهد می‌شود اما بعدازآن تا ۶۰روز غذادهی نسبت به گروه شاهد کاهش می‌یابد.

گیری و همکاران (۲۰۱۲) (۱۷) نیز گزارش کردند که تغذیه کپور هندی *Labeo rohita* با *Pseudomonas*

aeruginosa VSG-2 تا ۳۰ روز باعث افزایش میزان IgM نسبت به گروه شاهد می‌شود اما این فاکتور تا ۶۰روز غذا-دهی نسبت به گروه شاهد کم می‌شود، باتوجه به نتایج پژوهش ما و گزارش‌های قبلی می‌توان گفت: تحریک سطح ایمنوگلوبولین به‌وسیله پروبیوتیک یک پدیده کوتاه‌مدت است و لذا ممکن است عدم معنی‌دار بودن اثر پروبیوتیک‌ها بدلیل تغذیه طولانی‌مدت ماهیان باشد و نیاز بوده است تا در دوره‌های زمانی کوتاهتر نسبت به نمونه-برداری از ماهیان اقدام شود.

نتایج نشان می‌دهند که در زمان نمونه‌برداری، گروه دریافت کننده باکتری پدیکوکوس‌اسیدی‌لاکتیسی و گروه تغذیه‌شده با ترکیب باکتری پدیکوکوس‌اسیدی‌لاکتیسی و مخمر ساکارومایسیس‌سرویزیه بیشترین مقدار پروتئین را داشته‌اند. همچنین سایر تیمارهای حاوی پروبیوتیک نسبت به شاهد، افزایش میزان پروتئین را نشان می‌دهند، اما براساس آزمون دانکن این افزایش بین گروه‌های حاوی پروبیوتیک و گروه شاهد معنی‌دار نبوده است. پروتئین کل شامل آلبومین و گلوبولین است. تغییر در میزان پروتئین کل به‌عنوان یک شاخص اختصاصی مطرح نمی‌باشد ولی بدلیل اینکه بسیاری از عوامل ایمنی ساختار پپتیدی دارند، افزایش پروتئین کل خون می‌تواند معیاری برای افزایش ایمنی باشد اگرچه افزایش پروتئین خون می‌تواند بیانگر یک تغییر متابولیک و یا آسیب‌شناسی نیز باشد این ترکیب مانند آلبومین در بیماری‌های حاد و مزمن کبدی و کلیوی کاهش می‌یابد (۱۶). آلبومین پروتئینی است که در کبد سنتز می-شود و اندازه‌گیری آن معیار قابل اطمینانی است که در جهت پیش‌بینی و تعیین شدت بیماری‌های مزمن کبدی بکار می‌رود. نتایج نشان می‌دهند که گروه حاوی پروبیوتیک افزایش میزان آلبومین نسبت به گروه شاهد داشتند. باتوجه به افزایش پروتئین کل و آلبومین در گروه مورد آزمایش می‌توان نتیجه گرفت که استفاده از پروبیوتیک‌های مورد نظر موجب افزایش فاکتورهای مذکور گردیده است.

در پژوهش حاضر میزان پروتئین کل، آلبومین و گلوبولین در ۴۲ روز اندازه‌گیری شد، شاخص‌های مذکور در تیمارهای حاوی پروبیوتیک نسبت به گروه شاهد افزایش داشت اما این افزایش معنی‌دار نبود. در مطالعه چی و همکاران (۲۰۱۴) (۱۳)، در مورد تأثیر پروبیوتیک *Aeromonas veronii* BA-1, *Vibrio lentus* BA-2, *Flavobacterium sasangense* BA-3 بر پاسخ ایمنی ماهی کپور معمولی، گزارش کردند که میزان فاکتورهای مذکور در روزهای ۷ و ۱۴ غذادهی افزایش می‌یابد، اما در روزهای ۲۱ و ۲۸ غذادهی کاهش می‌یابد.

همچنین گیری و همکاران (۲۰۱۵) (۱۸)، در بررسی تأثیر*Bacillus subtilis*، *Pseudomonas aeruginosa* و *Lactobacillus plantarum* بر پاسخ ایمنی ماهی *Labeo rohita* شامل پروتئین، آلبومین و گلوبولین و همچنین بیان برخی ژن‌های دخیل در ایمنی ازجمله TNF و NF-KB نشان دادند که میزان این فاکتورها تا ۱۴ روز پس از غذا-دهی افزایش یافته، اما پس‌ازآن تا ۲۱ روز غذادهی کاهش یافته را نشان می دهند.

بطور کلی براساس نتایج این پژوهش و پژوهش‌های قبلی می‌توان گفت: ترکیبات پروبیوتیک در کوتاه‌مدت سبب افزایش شاخص‌های ایمنی در ماهیان می‌شود.

سپاسگزاری

از دانشگاه شیراز بابت تأمین بخشی از هزینه‌های این تحقیق در قالب گرنت هیات علمی سپاسگزاری می‌گردد. از آقایان دکتر محمود ناصری و مهندس مهدی جوکار و دانشجویان آزمایشگاه شیلات بابت همکاری و همفکری در این پژوهش سپاسگزاری می‌گردد.

منابع

۱- اونق، ع.، آق، ن.، عزیزی، ح.، و رحمان، ب.، ۱۳۹۳. اثرات استفاده *Lactobacillus plantarum* و لاکتوفرین در جیره غذایی بر شاخص‌های رشد ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان (*Oncorhynchus mykiss*)، مجله علمی-پژوهشی زیست‌شناسی جانوری تجربی ۳ (۲)، ۱۰صفحه.

۲- توکلی، ه.، و اخلاقی، م.، ۱۳۸۸. بررسی میزان تغییرات لیزوزیم، ایمونوگلوبین، گلبول‌ها و هماتوکریت خون در ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان به دنبال عفونت تجربی با آئروموناس هیدروفیلای بیماری‌زا، مجله تحقیقات دامپزشکی، ۶۴ (۲)، صفحات ۱۵۷-۱۶۲.

۳- مشکینی، س.، طافی، ع.، و توکمه چی، ا.، ۱۳۹۰. مطالعه تأثیر کیتوزان بر برخی از پاسخهای ایمنی ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان (*Oncorhynchus mykiss*) و افزایش مقاومت آن به دنبال رویاروئی تجربی با آئروموناس هیدروفیلا. *مجله* پژوهش‌های جانوری (مجله زیست‌شناسی ایران)، ۲۶ (۴)، صفحات ۴۶۸-۴۷۷.

۴- ناکاگاوا، ه.، ساتو، م.، و گاتلین، د.، ۲۰۰۱. نقش استفاده از افزودنی‌های غذایی در سلامت و کیفیت آبزیان پرورشی، مترجمین فرهنگی، م.، و شکوه سلجوقی، ظ.، ۷۹۹۷. انتشارات دانشگاه تهران، تهران، ۲۶۹ صفحه.

۵- یگانه، س.، عابدی، ز.، و رحمانی، ح.، ۱۳۹۲. بررسی مقایسه‌ای برخی پارامترهای زیستی در ماهی کپور معمولی (*Cyprinus carpio*) وحشی و پرورشی. فصلنامه علمی پژوهشی زیست‌شناسی جانوری، ۵ (۳)، صفحات ۶۷-۷۶.

6- Argyri, A., Zoumpopoulou, G., Karatzas, K. A. G., Tsakalidou, E., Nychas, G. J. E., Panagou, E. Z., and Tassou, C. C., 2013. Selection of potential probiotic lactic acid bacteria from fermented olives by in vitro tests. *Food Microbiology*, *33* (2), PP: 282-291.

7- Anderson, D. P., and Siwicki, A. K., 1995. *Basic hematology and serology for fish health programs*. Fish Health Section Asian Fisheries Society, Manila-Phillipines. pp. 185-202.

8- Bachère, E., 2000. Shrimp immunity and disease control. Aquaculture, 191 (1), PP: 3-11.

9- Balcazar, J. L., De Blas, I., Ruiz-Zarzuela, I., Cunningham, D., Vendrell, D., and Muzquiz, J. L., 2006. The role of probiotics in aquaculture. *Veterinary Microbiology,* 114 (3), PP: 173-186.

10- Biller-Takahashi, J. D., and Urbinati, E. C., 2014. Fish Immunology. The modification and manipulation of the innate immune system: Brazilian studies. *Anais da Academia Brasileira de Ciências*, 86 (3), PP: 1484-1506.

11- Carnevali, O., Maradonna, F., and Gioacchini, G., 2017. Integrated control of fish metabolism, wellbeing and reproduction: The role of probiotic. *Aquaculture*, 472 (1), PP: 144-155.

12- Chen, X. M., Lu, H. M., Niu, X. T., Wang, G. Q., and Zhang, D. M., 2015. Enhancement of secondary metabolites from Bacillus licheniformis XY-52 on immune response and expression of some immune-related genes in common carp, *Cyprinus carpio*. *Fish & shellfish immunology*, 45 (1), PP: 124-131.

13- Chi, C., Jiang, B., Yu, X. B., Liu, T. Q., Xia, L., and Wang, G. X., 2014. Effects of three strains of intestinal autochthonous bacteria and their extracellular products on the immune response and disease resistance of common carp, *Cyprinus carpio*. *Fish & shellfish immunology*, 36 (1), PP: 9-18.

14- Collet, B., 2014. Innate immune responses of salmonid fish to viral infections. *Developmental & Comparative Immunology*, 43 (2), PP: 160-173.

15- Das, A., Nakhro, K., Chowdhury, S., and Kamilya, D., 2013. Effects of potential probiotic *Bacillus amyloliquifaciens* FPTB16 on systemic and cutaneous mucosal immune responses and disease resistance of catla (*Catla catla*). *Fish & Shellfish Immunology*, 35 (5), PP: 1547-1553.

16- Densmore, C. L., Blazer, V. S., Waldrop, T. B., and Pooler, P. S., 2001. Effects of whirling disease on selected hematological parameters in rainbow trout. *Journal of wildlife diseases*, 37 (2), PP: 375-378.

17- 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, *Labeo rohita*. *Fish & shellfish immunology*, 32 (6), PP: 1135-1140.

18- Giri, S. S., Sen, S. S., Chi, C., Kim, H. J., Yun, S., Park, S. C., and Sukumaran, V., 2015. Effect of cellular products of potential probiotic bacteria on the immune response of *Labeo rohita* and susceptibility to *Aeromonas*

hydrophila infection. *Fish & shellfish immunology*, 46(2), PP: 716-722.

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

20- Gioacchini, G., Giorgini, E., Olivotto, I., Maradonna, F., Merrifield, D. L., and Carnevali, O., 2014. The influence of probiotics on zebrafish *Danio rerio* innate immunity and hepatic stress. *Zebrafish*, 11 (2), PP: 98-106.

21- Hai, N., 2015. The use of probiotics in aquaculture. *Journal of applied microbiology*, 119 (4), PP: 917-935.

22- Heo, W. S., Kim, Y. R., Kim, E. Y., Bai, S. C., and Kong, I. S., 2013. Effects of dietary probiotic, *Lactococcus lactis subsp. lactis I2*, supplementation on the growth and immune response of olive flounder (*Paralichthys olivaceus*). *Aquaculture*, 376, PP: 20-24.

23- Lee, J. S., Cheng, H., Damte, D., Lee, S. J., Kim, J. C., Rhee, M. H., and Park, S. C., 2013. Effects of dietary supplementation of *Lactobacillus pentosus* PL11 on the growth performance, immune and antioxidant systems of Japanese eel Anguilla japonica challenged with Edwardsiella tarda. *Fish & shellfish immunology*, 34 (3), PP: 756-761.

24- Magnadóttir, B., Lange, S., Steinarsson, A., and Gudmundsdóttir, S., 2004. The ontogenic development of innate immune parameters of cod (*Gadus morhua L.*). *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology*, 139 (2), PP: 217-224.

25- Malin, M., Suomalainen, H., Saxelin, M., and Isolauri, E., 1996. Promotion of IgA immune response in patients with Crohn's disease by oral bacteriotherapy with *Lactobacillus GG*. *Annals of Nutrition and Metabolism*, 40 (3), PP: 137-145.

26- Meena, D., Das, P., Kumar, S., Mandal, S., Prusty, A., Singh, S., Akhtar, M., Behera, B., Kumar, K., and Pal, A., 2013. Beta-glucan: an ideal immunostimulant in aquaculture (a review). *Fish physiology and biochemistry*, 39 (3), PP: 431-457.

27- Panigrahi, A., Kiron, V., Puangkaew, J., Kobayashi, T., Satoh, S., and Sugita, H., 2005. The viability of probiotic bacteria as a factor influencing the immune response in rainbow trout *Oncorhynchus mykiss*. *Aquaculture*, 243 (1), PP: 241-254.

28- Reverter, M., Bontemps, N., Lecchini, D., Banaigs, B., and Sasal, P., 2014. Use of plant extracts in fish aquaculture as an alternative to chemotherapy: current status and future perspectives. *Aquaculture*, 433, PP: 50-61.

29- Ramesh, D., Vinothkanna, A., Rai, A. K., and Vignesh, V. S., 2015. Isolation of potential probiotic Bacillus spp. and assessment of their subcellular components to induce immune responses in *Labeo rohita* against *Aeromonas hydrophila*. *Fish & shellfish immunology*, 45 (2), PP: 268-276.

30- Saad, N., Delattre, C., Urdaci, M., Schmitter, J. M., and Bressollier, P., 2013. An overview of the last advances in probiotic and prebiotic field. *LWT-Food Science and Technology*, 50 (1), PP: 1-16.

31- Scholz, U., Diaz, G. G., Ricque, D., Suarez, L. C., Albores, F. V., and Latchford, J., 1999. Enhancement of vibriosis resistance in juvenile Penaeus vannamei by supplementation of diets with different yeast products. *Aquaculture*, 176 (3), PP: 271-283.

32- Sommerset, I., Krossøy, B., Biering, E., and Frost, P., 2014. Vaccines for fish in aquaculture. *Expert review of vaccines*, 4 (1), PP: 89-110.

33- Subramanian, S., MacKinnon, S. L., and Ross, N. W., 2007. A comparative study on innate immune parameters in the epidermal mucus of various fish species. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology*, 148 (3), PP: 256-263.

34- 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 & Shellfish Immunology*, 29 (5), PP: 803-809.

35- Wang, Y. B., Tian, Z. Q., Yao, J. T., and Li, W. F., 2008. Effect of probiotics, *Enteroccus faecium*, on tilapia (*Oreochromis niloticus*) growth performance and immune response. *Aquaculture*, 277 (3), PP: 203-207.

36- Yasuda, K., and Taga, N., 1980. A mass culture method for *Artemia salina* using bacteria as food. *Mer* 18, PP: 53–62.

Singular versus Combined Effect of Some Probiotics on the Mucusal Immunity of Common Carp (*Cyprinus carpio*)

Vazirzadeh, A., Masoomi-Feshani, H.,

Dept. of Natural Resources and Environmental Engineering, School of Agriculture, Shiraz University, Shiraz, I.R. of Iran

Abstract

Nowadays, the use of natural immunostimulants has been increased for the enhancing immune status in fish to cope with diseases. Probiotics are known as the microbes that are beneficial to the host and are used as an alternative to chemicals and antibiotics in fish farming. The effects of *Pediococcus acidilactici* and *Saccharomyces cerevisiae* on total immunoglobulin, total protein, albumin and globulin were studied for 42 days in common carp (*Cyprinus carpio*) with an average weight of 30 ± 10 g. Fish were divided into 4 groups with two replicates after two weeks of adaptation. The first group was fed on diet supplemented with *Pediococcus asidilactici* bacteria at concentration of 10^7 CFU/g, the second group received *Saccharomyces cerevisiae* at concentration of 10^7 CFU/g, the third group fed on diet supplemented with combination of *Pediococcus asidilactici* and yeast *Saccharomyces cerevisiae* at a concentration of 10^7 CFU/g, and the fourth group was considered as a control group. The results of this study showed that the use of supplements increased the total immunoglobulin parameters, total protein, albumin and globulin in the mucus of common carp, but these changes were not statistically significant compared to the control group, according to Duncan test (P≥0/05).

Key words: Probiotic, Immunity, Mucusal, Common Carp