

مقایسه اثر باکتری‌های *Lactobacillus plantarum* و *Lactobacillus rhamnosus* جدا شده از ماهی شیربت به صورت 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 رود ماهی شیربت بر پاسخ ایمنی ماهی کپور معمولی (*Cyprinus carpio*) ارزیابی شد. بدین منظور تعداد ۳۰۰ قطعه ماهی کپور معمولی با وزن متوسط $70 \pm 11/5$ گرم به طور تصادفی به پنج گروه تقسیم و به ترتیب با غذای حاوی 5×10^7 CFU/ml *Lactobacillus plantarum*، 5×10^7 CFU/ml *Lactobacillus rhamnosus*، ۲۵۰ میلی‌گرم پروبیوتیک تجاری مولتی بهسیل و فاقد پروبیوتیک 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 ۳۰ افزایش معنی‌داری داشت. همچنین افزایش معنی‌دار احیای NBT در گروه ترکیبی و پروبیوتیک تجاری دیده شد ($P < 0/05$). قدرت باکتری‌کشی در گروه پلانناروم 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 پلانناروم 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 فرصت طلب به ویژه در ترکیب باهم هستند و می‌تواند به عنوان مکمل خوراکی جهت استفاده در جیره خوراکی ماهیان گرمابی مورد استفاده قرار گیرند.

کلمات کلیدی: کپور معمولی، لاکتوباسیلوس پلانناروم، لاکتوباسیلوس رامنوسوس، تحریک ایمنی

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

Comparison on the effects of indigenous *Lactobacillus plantarum* and *Lactobacillus rhamnosus* 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*, 5×10^7 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 myeloperoxidase 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 plantarum group 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 as mixture.

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

مقدمه

در سالیان اخیر استفاده از آبزیان به عنوان منبع غذایی با افزایش رشد چشم‌گیری همراه بوده است، به طوری که 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 به طور روزافزون افزایش پیدا کرده است (Zabetakis و Nasopoulou، 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 پروتوزوآها، کرم‌های انگلی، قارچ‌ها، باکتری‌ها، ویروس‌ها و نهایتاً سندروم‌ها است که نه تنها 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 انتقال به 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).

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

و مقاومت در برابر چالش با عامل بیماری‌زا نیز مورد مطالعه قرار گرفت. بر اساس گزارشی، استفاده از جیره 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) گزارش شده و پاسخ به دوز مصرف مشاهده گردید (Kumar و همکاران، ۲۰۰۸).

با توجه به کمبود اطلاعات در مورد استفاده 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 آبی‌پروری، مقایسه اثر پروبیوتیک تجاری مولتی بهسیل با پروبیوتیک‌های درون‌زاد بر فعالیت سیستم ایمنی ماهی کپور معمولی تحت چالش با *Aeromonas hydrophila* به‌عنوان هدف این تحقیق انتخاب شده 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 گزارش شده بود (محمدیان، ۱۳۹۲)، در ماهی کپور معمولی بررسی گردید.

مواد و روش کار

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.

تیمار بندی ماهی‌ها و ذخیره‌سازی

جهت تیمار بندی و ذخیره‌سازی، تعداد ۳۰۰ قطعه ماهی کپور معمولی با میانگین وزنی $70 \pm 11/5$ گرم از مرکز تکثیر شهید امانی شوشر به بخش

از این فرآورده‌های میکروبی در آبی‌پروری به وجود آمده است. بسیاری از گونه‌های باکتری‌های اسیدلاکتیک از جمله 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 آبی‌پروری مورد استفاده 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) مورد استفاده قرار می‌گیرد. این محصول حاوی میکروارگانیسم‌های *Lactobacillus plantarum*، *Lactobacillus casei*، *Bacillus amyloliquefaciens*، *Streptococcus salivarius*، *Aspergillus Oryzae*، *Lactobacillus acidophilus*، *Saccharomyces cerevisiae*، *Bacillus subtilis*، *Bifidobacterium bifidum*، *Lactococcus lactis*، *Lactobacillus delbrueckii*، *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 در زمینه‌ی پاسخ‌های ایمنی در کپور هندی روهو بعد از تغذیه با *Bacillus subtilis* (Kumar و همکاران، ۲۰۰۸)، *Lactobacillus plantarum* (Giri و همکاران، ۲۰۱۳) و *Pseudomonas aeruginosa* (Giri و همکاران، ۲۰۱۲)، ماهی کاتلا بعد از تغذیه با *Lactobacillus plantarum* 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

جدول ۱- ترکیب شیمیایی جیره غذایی تجاری (بر اساس کاتالوگ کارخانه).

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

از تغذیه با پروبیوتیک، از هر تیمار ۹ قطعه ماهی (۳ قطعه ماهی از هر تکرار) خون‌گیری و جداسازی سرم و جداسازی سرم صورت پذیرفت (Mohammadian و همکاران، 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 این کار 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 ایمونوگلوبولین تام براساس روش شرح داده شده توسط Mohammadian و همکاران (۲۰۱۶) اندازه‌گیری شد. به طور خلاصه ابتدا پروتئین تام و آلومین 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 آلومین از پروتئین تام پلاسما محاسبه گردید. برای اندازه‌گیری قدرت باکتری‌کشی سرم از روش توصیه شده توسط Kajita و همکاران (۱۹۹۰) با کمی تغییرات استفاده شد. برای ارزیابی فعالیت انفجار تنفسی مقدار ۰/۱ میلی‌لیتر از خون حاوی ماده ضد انعقاد در داخل گوده‌های 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 H₂O₂ ۲۰ 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 طول موج 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 طول موج ۴۱۰ نانومتر اندازه‌گیری شد. درصد ممانعت از تریپسین با محاسبه تفاضل

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 ماهیان گرمابی کارخانه 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 در ۱۵ مخزن دارای هوادهی مناسب توزیع گردیدند (به ازای هر مخزن ۲۰ قطعه ماهی). سپس به‌منظور بررسی اثرات تحریک ایمنی تجویز خوراکی *Lactobacillus rhamnosus* و *Lactobacillus plantarum* جدا شده از روده ماهی شیربت (محمدیان و همکاران ۱۳۹۲) در ماهی کپور معمولی، ۵ تیمار غذایی شامل، غذای فاقد مکمل پروبیوتیکی (شاهد)، غذای حاوی لاکتوباسیلوس پلانتروم با غلظت 5×10^7 CFU/ml (تیمار ۱)، غذای حاوی *Lactobacillus rhamnosus* با غلظت 5×10^7 CFU/ml (تیمار ۲)، غذای حاوی *Lactobacillus plantarum* و *Lactobacillus rhamnosus* (به نسبت مساوی) با غلظت 5×10^7 CFU/ml (تیمار ۳)، ۲۵۰ میلی‌گرم پروبیوتیک تجاری مولتی‌بهسیل در هر کیلوگرم (طبق دستورالعمل شرکت آکوارایموزام) (تیمار ۴) در نظر گرفته 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 از نظر کارایی پروبیوتیکی با مولتی‌بهسیل (پروبیوتیک تجاری) مورد مقایسه قرار گرفتند.

آماده‌سازی سوسپانسیون باکتری‌های انتخاب شده

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 سانتریفوژ جداسازی و شستشو داده شدند. سپس به کمک لوله‌های استاندارد مک‌فارلند غلظت آن‌ها بر روی 3×10^9 CFU/ml تنظیم شد. در ادامه به طریق تهیه رقت‌های متوالی هر کدام از پروبیوتیک‌ها با غلظت CFU/ml 5×10^7 به هر گرم غذا اسپری و غذاها در شرایط کاملاً استریل به میزان لازم وزن شدند. در مرحله بعد غذاها 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

کیور، بعد از پایان دوره ۶۰ روزه تغذیه با پروبیوتیک، به منظور انجام چالش باکتریایی، باقیمانده ماهیان هر تکرار (۱۰ قطعه)، با دوز ایجادکننده ۵۰٪ تلفات بعد از ۴ روز (LD₅₀) باکتری آئروموناس هیدروفیلا به صورت 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 تلف شده انجام شد تا اطمینان حاصل گردد که ماهی در اثر باکتری آئروموناس هیدروفیلا تلف شده است.

تجزیه و تحلیل آماری

طرح کلی این تحقیق در قالب طرح کاملاً تصادفی برنامه‌ریزی و اجرا شد. داده‌ها به صورت میانگین \pm انحراف معیار بیان شده‌اند. به جهت تجزیه و تحلیل داده‌ها از روش آنالیز واریانس یک طرفه جهت اندازه‌گیری اختلاف بین تیمارهای مختلف لاکتوباسیلوس ($P < 0.05$) 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 $P < 0.05$ در نظر گرفته شد. همچنین ترسیم نمودارها نیز در فضای نرم‌افزار Excel (ویرایش ۲۰۰۷) انجام گرفت.

نتایج

از لحاظ میزان احیا NBT در روز صفر تفاوت معنی‌داری بین تیمارها مشاهده نشد (شکل ۱). در روز ۳۰ آزمایش تمامی تیمارهای پروبیوتیکی به جز تیمار تجاری و ترکیبی با گروه شاهد تفاوت معنی‌داری از خود نشان دادند ($P < 0.05$). در روز ۶۰ تیمار ترکیبی، تجاری و پلانتروم به

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

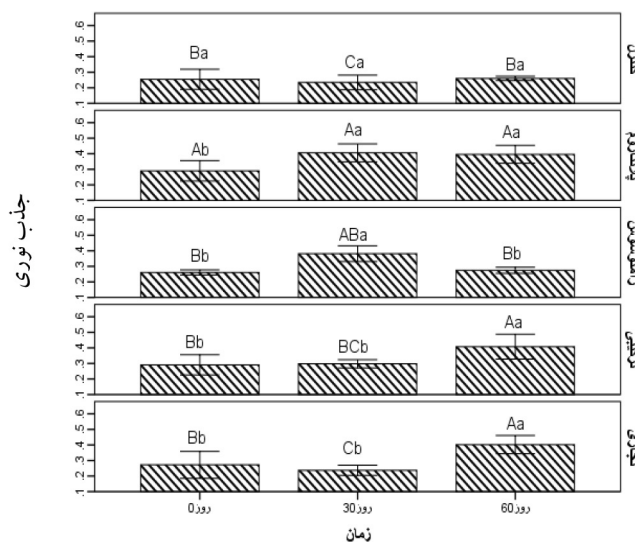
چالش باکتریایی

محاسبه LD₅₀

قبل از انجام مطالعه اصلی، طی مراحل زیر میزان کشندگی باکتری *Aeromonas hydrophila* برای ماهی کیور محاسبه گردید. برای این کار *Aeromonas hydrophila* به مدت ۴۸ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد در محیط کشت TSB کشت داده شد. پس از آن به باکتری‌ها به میزانی سرم فیزیولوژی اضافه گردید تا کدورتی معادل لوله شماره ۱۰ مک‌فارلند (3×10^8 CFU/ml) حاصل شود. سوسپانسیون حاصل به نحوی رقیق گردید تا سوسپانسیون‌های 1×10^5 ، 1×10^6 ، 1×10^7 ، 1×10^8 و 1×10^9 به دست آمد. از هر رقت از باکتری به ۱۰ قطعه ماهی کیور به صورت داخل صفاقی تزریق گردید (هر ماهی ۱۰۰ میکرولیتر)، به گروهی نیز به عنوان 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 ایجادکننده ۵۰٪ تلفات (LD₅₀) باکتری به میزان 2.7×10^8 CFU/ml مشخص شد.

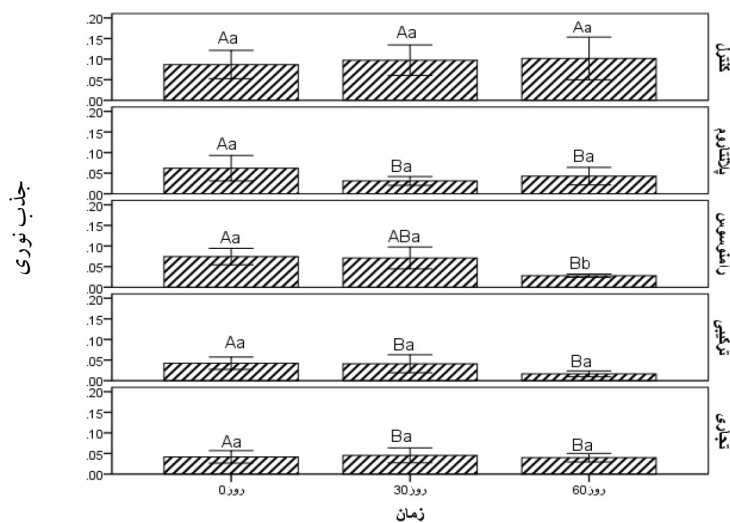
چالش

به دنبال مشخص شدن LD₅₀ باکتری آئروموناس هیدروفیلا برای ماهی



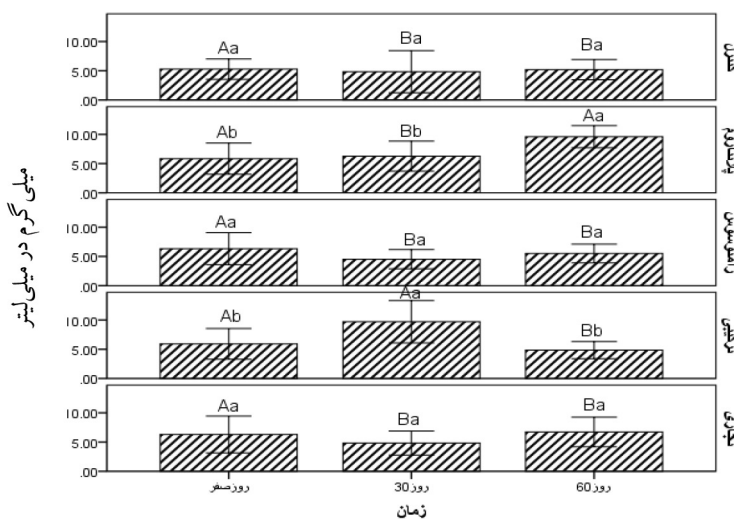
نمودار ۱- نمودار فعالیت احیا NBT در تیمارهای آزمایشی.

* 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.



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.

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 پلانناروم 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 تیمارهای پلانناروم و ترکیبی دیده شد و در روز ۶۰ تمامی تیمارهای پروبیوتیکی افزایش معنی‌داری را با گروه شاهد از خود نشان دادند ($P < 0.05$).

نتایج تلفات تجمعی با استفاده از نرم افزار پروبیت آنالیز گردید و غلظت ایجاد کننده ۵۰٪ تلفات (LD_{50}) باکتری 2.7×10^6 CFU/ml مشخص شد. نتایج مربوط به تزریق باکتری *Aeromonas hydrophila* در جدول ۲ آورده شده است.

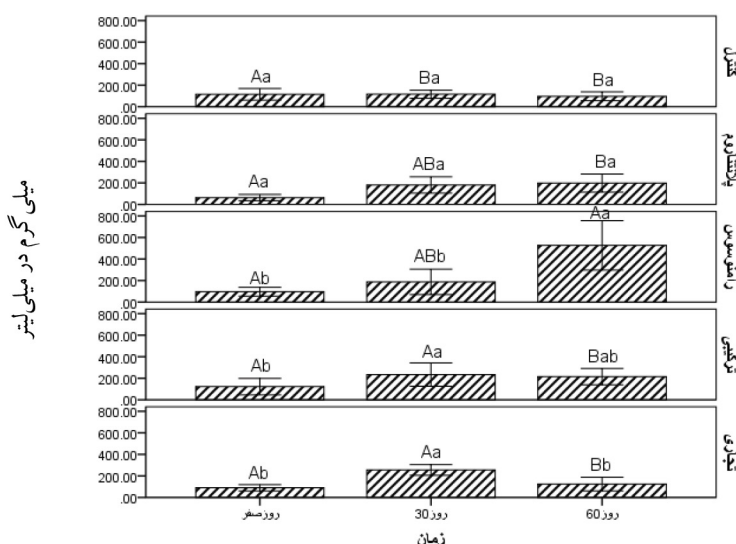
نتایج مربوط به چالش با باکتری آئروموناس هیدروفیلاکه در پایان دوره تحقیق انجام شده نشان داد که در این مرحله مقاومت هر سه تیمار پروبیوتیکی بیش از تیمار شاهد بود. در میان چهار تیمار پروبیوتیکی، سطح مقاومت تیمار دریافت کننده ترکیب دو باکتری *Lactobacillus plantarum* و *Lactobacillus rhamnosus* بالاتر از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

ترتیب بیش‌ترین میزان فعالیت احیا NBT را از خود نشان دادند و با گروه شاهد تفاوت معنی‌داری داشتند ($P < 0.05$).

میزان فعالیت باکتری‌کشی در روز صفر تفاوت معنی‌داری بین تیمارها نداشت (نمودار ۲). در روز ۳۰ بیش‌ترین میزان فعالیت باکتری‌کشی مربوط به تیمارهای پلانناروم و ترکیبی است به طوری که تفاوت معنی‌داری با گروه شاهد از خود نشان دادند ($P < 0.05$). در روز ۶۰ تمامی تیمارهای پروبیوتیکی افزایش فعالیت معنی‌داری را نسبت به گروه شاهد از خود نشان دادند ($P < 0.05$) و بیش‌ترین میزان فعالیت باکتری‌کشی مربوط به گروه ترکیبی بود.

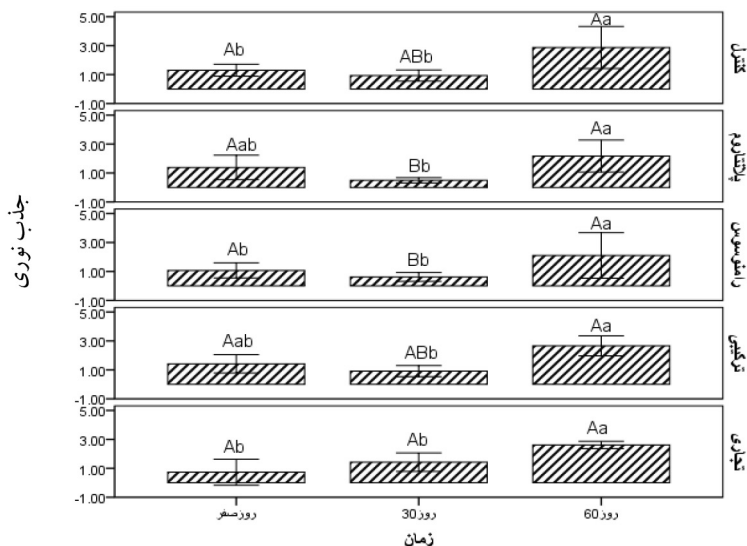
میزان ایمونوگلوبین تام در روز صفر تفاوت معنی‌داری بین تیمارها از خود نشان نداد (نمودار ۳). در روز ۳۰، ایمونوگلوبین تیمار ترکیبی از همه بیش‌تر بوده و اختلاف معنی‌داری با گروه شاهد داشت ($P < 0.05$). در روز ۶۰ ایمونوگلوبین تیمار پلانناروم از همه بیش‌تر بود و تفاوت معنی‌داری با سایر گروه‌ها از خود نشان داد ($P < 0.05$).

میزان فعالیت لایزوزیم در روز صفر تفاوت معنی‌داری در بین تیمارها نداشت (نمودار ۴). علی‌رغم اینکه در روز ۳۰ آزمایش تیمارهای پروبیوتیکی نسبت به گروه شاهد افزایش نشان دادند، تنها در گروه پروبیوتیکی ترکیبی و تجاری تفاوت معنی‌داری با گروه شاهد مشاهده شد ($P < 0.05$). در روز ۶۰ بازم افزایش میزان لایزوزیم نسبت به گروه شاهد در تیمارهای پروبیوتیکی مشاهده گردید، اما تنها گروه رامنوسوس تفاوت معنی‌داری با گروه شاهد از خود نشان داد.



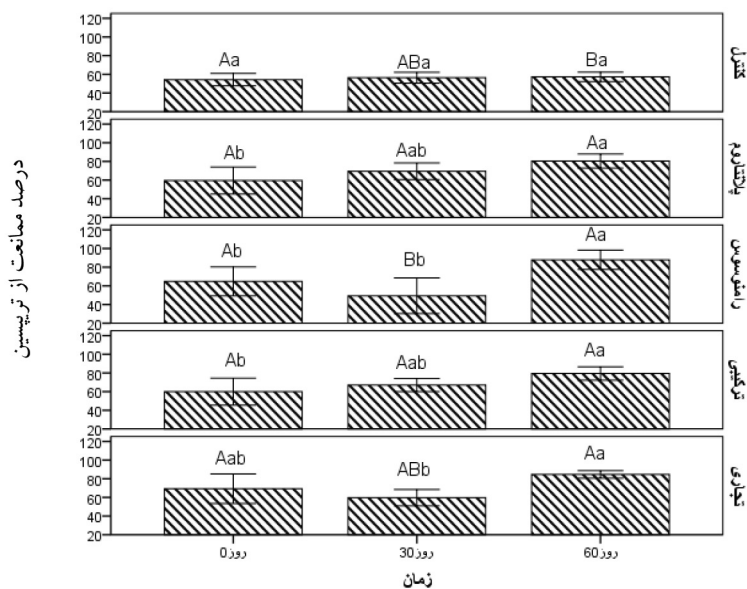
نمودار ۴- نمودار فعالیت لیزوزیم سرم در تیمارهای آزمایشی.

* 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.



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 آنزیم آسپارتات آمینوترانسفراز 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.

داشت و باهمه آن‌ها اختلاف معنی‌داری نشان داد ($P < 0/05$).

بحث

افزودن پروبیوتیک‌ها به جیره غذایی می‌تواند سبب بهبود سلامتی و افزایش رشد شود (Somasundaram و Vijavabaskar، 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، باکتروسین، سیدروفور، لایزوزیم، پروتئاز و تغییر pH با تولید 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 ارزیابی شده 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 مورد استفاده در مطالعه حاضر فاقد اثرات بیماری‌زایی در ماهیان بوده‌اند (محمدیان، ۱۳۹۲). غیر بیماری‌زا بودن سویه‌های پروبیوتیکی مطالعه حاضر، همسو با مطالعه Austin و همکاران (۲۰۰۷) بود که تزریق داخل صفاقی و داخل عضلانی پروبیوتیک‌ها در آزاد ماهیان اقیانوس اطلس، تیلاپیا و ماهی کپور هندی فاقد اثرات پاتولوژیک 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 حاصل شده به وضوح نشان‌دهنده بهبود پاسخ‌های ایمنی بود. توانایی باکتری‌های اسیدلاکتیک به خصوص لاکتوباسیلوس‌ها در تقویت ایمنی غیراختصاصی ماهیان مختلف از جمله قزل‌آلای رنگین‌کمان، در مطالعات محققین قبلی اثبات شده است (Nikoskelainen و همکاران، ۲۰۰۳). از جمله این موارد می‌توان به تأثیر تجویز خوراکی برخی از سویه‌های باکتری‌های اسیدلاکتیک بر افزایش پاسخ ایمنی از جمله 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 اخذ شده (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* VSG^۳) 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 تغذیه شده با *Lactobacillus rhamnosus* و *Lactobacillus plantarum* از روز صفر تا روز ۳۰ آزمایش افزایش معنی‌داری پیدا کردند، در صورتی‌که 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 ($P < 0/05$). در واقع 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*.

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

نسبت به بقیه تیمارها دارای بالاترین میزان ایمونوگلوبولین در پلاسما خود بودند که در تحقیق حاضر نیز در روز ۳۰ و ۶۰ در غلظت مشابه این افزایش مشاهده شد. Nikoskelainen و همکاران (۲۰۰۳) مشاهده کردند، اگر *Lactobacillus rhamnosus* با دوز 10^{10} CUF/g همراه غذا به ماهی قزل‌آلا تجویز شود، میزان ایمونوگلوبولین پلاسما پس از تغذیه با پروبیوتیک افزایش معنی‌داری نسبت به ماهیان گروه شاهد نشان می‌دهند که با نتایج تحقیق حاضر مطابقت دارد.

افزودن پروبیوتیک لاکتوباسیلوس ترکیبی و تجاری به جیره 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 کنترل شده است ($P < 0.05$). 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 تیمار با غلظت 1×10^8 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 برونی (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 رنگین‌کمان تغذیه شده با *Lactobacillus rhamnosus* اشاره کردند. با توجه به نتایج لیزوزیم تیمارهای پروبیوتیکی در این مطالعه و بررسی مطالعات سایر محققین این چنین برداشت می‌شود که پروبیوتیک‌ها تأثیر مثبتی در روند افزایش فعالیت لیزوزیم دارند اما نوع پروبیوتیک، دوز تجویز و گونه ماهی هدف از جمله عوامل مؤثر بر چگونگی پاسخ و تغییرات لیزوزیم سرم هستند. همچنین تحریک بیشتر سلول‌های بیگانه‌خوار در تیمار پروبیوتیک ترکیبی، سبب افزایش آنزیم لیزوزیم در این گروه در زمانی کمتر نسبت به سایر گروه‌ها شده است.

میلوپراکسیداز از جمله آنزیم‌های مهم دخیل در فرآیند تولید اسید هیپوکلروس از رادیکال‌های آزاد برای تخریب عوامل بیماری‌زا می‌باشد. نتایج مربوط به فعالیت میلوپراکسیداز در نمودار ۵ ذکر شده 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 مشاهده شده در انسان (Hamajima و همکاران، ۲۰۰۱؛ Pulli و همکاران، ۲۰۱۳) ناشی از اثر سن بر افزایش فیزیولوژیک فعالیت این آنزیم باشد.

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 ($P < 0.05$). 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 افزایش معنی‌دار است. همچنین در روز ۶۰ آزمایش قدرت باکتری کشی سرم در تیمارهایی که پروبیوتیک‌های متفاوت دریافت کرده بودند نسبت به گروه شاهد افزایش معنی‌داری داشت ($P < 0.05$)؛ در مجموع تیمار ترکیبی بهترین عملکرد را در این قسمت از بررسی نشان داد. تجویز پروبیوتیک‌ها در صورت تحریک مناسب پاسخ ایمنی ذاتی منجر به افزایش انواع آنزیم‌ها، رادیکال‌های آزاد اکسیژن، ترکیبات شلاته‌کننده فلزات سنگین و پپتیدهای ضد میکروبی در سرم خواهد شد. لازم به ذکر است که تاکنون بیش از ۹۰ پپتید ضد میکروبی در ماهیان شناسایی شده است (Wang و همکاران، ۲۰۰۸). نتایج بررسی در مطالعه حاضر شاهدهی دال بر این مطلب است. هرچند همان‌گونه که در مباحث پیشین اشاره شد نوع پروبیوتیک، دوز مورد استفاده و گونه ماهی هدف، چگونگی پاسخ سیستم ایمنی را مشخص می‌نماید.

پروتئین‌های پلاسما در انواع مختلف موجودات مورد مطالعه قرار گرفته‌اند و بر اساس عملکردشان به گروه‌های مختلف تقسیم‌بندی می‌شوند. فراوان‌ترین پروتئین موجود در پلاسما را آلبومین‌ها و گلوبولین‌ها تشکیل می‌دهند. میزان پروتئین تام، آلبومین و گلوبولین سرم خون ماهیان می‌تواند به‌عنوان یک شاخص برای ارزیابی پاسخ‌های ایمنی مورد استفاده 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 از لحاظ آماری معنی‌دار بود ($P > 0.05$). 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 پلانترام نسبت به سایر تیمارها مشاهده شد (نمودار ۳). نتیجه مطالعه حاضر در مورد تیمار ترکیبی با نتیجه گزارش شده توسط Giri و همکاران (۲۰۱۳) که بر روی ماهی کپور هندی 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 CUF/gr 5×10^7 باکتری *Lactobacillus bulgaricus* را همراه با غذا دریافت کردند،

را به عنوان یک باکتری دارای پتانسیل بالای پروبیوتیکی معرفی کردند که مشابه تیمار ترکیب در مطالعه حاضر بود.

نتیجه گیری

بر اساس نتایج تحقیق حاضر می توان بیان کرد که افزودن پروبیوتیک *Lactobacillus rhamnosus* و *Lactobacillus plantarum* به جیره غذایی ماهی کپور معمولی باعث بهبود برخی شاخص های ایمنی از قبیل افزایش فعالیت لایزوزیم سرم، قدرت باکتری کشی سرم، میزان گلوبولین پلاسما و فعالیت NBT می گردد. هرچند این افزودنی های 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 آزمایش های تکمیلی می توان از این دو پروبیوتیک بومی به همراه هم به عنوان یک کاندیدا برای تحریک ایمنی ماهی کپور معمولی در کشور استفاده کرد، چراکه این دو پروبیوتیک دارای اثر سینرژیستی بودند. اطلاعات مطالعه حاضر می تواند به استفاده از این پروبیوتیک ها در مزارع پرورش ماهی کمک کند، هرچند پیشنهاد می شود مطالعات بیشتر در جهت ارتقا کیفی محصولات پروبیوتیکی با افزایش سوبه های با پتانسیل بالای پروبیوتیکی در ترکیب با سوبه های قبل انجام شود.

تشکر و قدردانی

نویسندگان مقاله از معاونت محترم پژوهشی دانشگاه شهید چمران اهواز و قطب علمی بهداشت بیماری های ماهیان گرمابی بدلیل تأمین هزینه های پروژه و شرکت مینو مهرگان مهمان آکواریوموزام به جهت تأمین پروبیوتیک تجاری تشکر و قدردانی می نمایند.

منابع مورد استفاده

1. Tokmehchi, Amir. (۱۳۸۷). Evaluation of the effect of *Lactobacillus delbrueckii* sp. *Bulgarius* (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 grypupus*. 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 strains on the survival of Pacific whiteshrimp (*Litopenaeus vanamei*) following im-

فعالیت آنتی پروتئازی سرم و سایر آنتی پروتئازهای موجود در بدن از جمله ۱α-آنتی پروتئاز، ۲α-آنتی پلاسمین و ۲α-ماکروگلوبولین سبب تأخیر و یا ممانعت از نفوذ عوامل بیماری هایی می شود که واجد آنزیم های تخریب کننده پروتئین ها هستند. نتایج مربوط به فعالیت آنتی تریپسین در نمودار ۶ ذکر شده است. در ماهی ها این فعالیت کمتر تحت تأثیر ایمن سازی و یا عفونت قرار می گیرد. در همه گروه های تیمار شده با پروبیوتیک، فعالیت آنتی پروتئازی سرم که با درصد ممانعت از فعالیت تریپسین بررسی شده بود در روز ۶۰ مطالعه دارای افزایشی معنادار بود. در بررسی انجام شده توسط سایر محققین، نتایج مشابهی در این زمینه مشاهده شده است. پروبیوتیک هایی که از دستگاه گوارش ماهی های قزل آلا و کپور جداسازی شده بودند، منجر به افزایش فعالیت پروتئازی، تقویت ایمنی ذاتی ماهی قزل آلا رنگین کمان و کاهش چشم گیر تلفات در چالش با عوامل بیماری زای باکتریایی *Aeromonas*، ویبریو، لاکتوکوکوس و استرپتوکوکوس شدند (Bruno و همکاران، ۲۰۰۷). استفاده از *Bacillus subtilis* AB۱ به مدت دو هفته در ماهی قزل آلا افزایش معنی دار فعالیت ایمنی ذاتی و افزایش فعالیت آنتی پروتئازی را در برداشت (Newaj-Fyzul و همکاران، ۲۰۰۷). تیمار کفشک ماهی زیتونی با پروبیوتیک *انتروکوکوس فاسیوم* پس از ۵ روز سبب افزایش ملایم فعالیت آنتی پروتئازی سرم شد (Kim و همکاران، ۲۰۰۶). تأثیر بر بیان ژن های مرتبط با فعالیت آنتی پروتئازی از جمله افزایش ده برابر میزان ۲α-میکروگلوبولین که توسط سایر محققین اثبات شده است، می تواند از جمله دلایل افزایش معنی دار مشاهده شده باشد.

پروبیوتیک ها باعث افزایش بازماندگی و مقاومت طبیعی در برابر عوامل نامساعد می شوند. در مطالعه حاضر افزایش معنی داری در بازماندگی ماهی های کپور معمولی در چالش با باکتری *Aeromonas* مخصوصاً در تیمارهای ترکیبی و تجاری مشاهده شد که همسو با مطالعات انجام شده در مارماهی مهاجر اروپایی و کپور ماهیان هندی در برابر عفونت *Aeromonas hydrophila* پس از تغذیه با مکمل غذایی حاوی پروبیوتیک باسیلوس بود (Cao و همکاران، ۲۰۱۱). این افزایش مقاومت در تیمارهای پروبیوتیک را می توان به دلیل افزایش پاسخ های ایمنی غیر اختصاصی تحت تأثیر استفاده از ترکیبی از پروبیوتیک ها نسبت داد چرا که میزان لیزوزیم سرم، آنتی تریپسین، NBT، میلوپراکسیداز و همچنین باکتری کشی در تیمارهای ترکیبی و تجاری دارای افزایش معناداری بود. بر اساس نتایج جدول ۲ با افزودن *Lactobacillus* و *Lactobacillus rhamnosus* و *plantarum* و پروبیوتیک تجاری به جیره غذایی ماهی کپور معمولی پس از روز ۶۰ (پایان دوره آزمایش) و پس از آن تزریق درون صفاقی باکتری *Aeromonas hydrophila*، مقاومت هر چهار تیمار پروبیوتیکی بیش از گروه شاهد بود، اما کاهش تلفات در تیمار دریافت کننده لاکتوباسیلوس ترکیبی بسیار چشم گیر بود ($P < 0/05$). در مطابقت با نتایج تحقیق کنونی، Gupta و همکاران (۲۰۱۴ و ۲۰۱۶) اثر سه پروبیوتیک خوراکی *Bacillus* *licheniformis*، *coagulans* و *Paenibacillus polymyxa* بر روی عملکرد رشد، ایمنی غیر اختصاصی و حفاظت ضد باکتری بیماری زای *Aeromonas hydrophila* را مورد بررسی قرار دادند. نتایج آن ها حاکی از ارتقا سیستم ایمنی و مقاومت در برابر باکتری بیماری زای *Aeromonas hydrophila* در گروه های پروبیوتیکی بود که *Paenibacillus polymyxa*

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 (*Paralichthys olivaceus*) 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 Bøgvad, J. (1997). Non-specific 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*. *Aquaculture Nutrition*. 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, *Labeo rohita*. *Fish and Shellfish Immunology*. 32(6):1135-1140.

14. Giri, S.S., Sukumaran, V. and Oviya, M. (2013). Potential probiotic *Lactobacillus plantarum* 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 *Aeromonas hydrophila*.

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., Matsura, 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 (*Cyprinus carpio*). *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 Kobayashi, M. (1990). The immunomodulatory effects of flavamisole 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 and Shellfish 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. delbrueckii* sp. *bulgaricus* on some immune-related parameters in *Barbus grypus*. *Aquaculture International*. 24(1):225-242.

26. Mohammadian, T., Nasirpour, M., Tabandeh, M.R., Heidary, A.A., Ghanei-Motlagh, R., Hosseini, S.S. (2019). Administration of autochthonous probiotics altered juvenile rainbow trout *Oncorhynchus mykiss* health status, growth performance and resistance to *Lactococcus garvieae*, an experimental infection. *Fish & Shellfish Immunology*, 86:269-279.

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., Ramsuhag, A., Brunt, J. and Austin, B. (2007). *Bacillus subtilis* AB1 controls *Aeromonas* infection 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 (*Oncorhynchus mykiss*) by potential bacteria (*Lactobacillus rhamnosus*). *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, V.M., 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 and Shellfish 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, *Enterococcus faecium*, 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, *Lactococcus Lactis* Subsp. *lactis* 12, Supplementation on the growth and immune response of olive flounder (*Paralichthys olivaceus*). *Aquaculture*. 376-379:20-24.

