بررسی برخی شاخص های ایمنی و فلور باکتریایی روده در بچه ماهیان قزل آلای رنگین کمان (*Oncorhynchus mykiss*) تغذیه شده با پری بیوتیک دیواره سلولی مخمر (*Saccharomyces cerevisia*)

محمد اعتصامی پور [*1]، عباسعلی زمینی [2] ، مسعود فرخ روز[3]

۱- دانش آموخته کارشناسی ارشد شیلات ، دانشگاه آزاد اسلامی واحد لاهیجان ، ایران ، صندوق پستی: ۱۶۱۶

۲و۳- استادیار و عضو هیئت علمی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد لاهیجان، دانشکده منابع طبیعی، گروه شیلات، لاهیجان، ایران، صندوق پستی : ۱۶۱۶

(*عهده دار مکاتبات – Mohammadeatisamipour @ gmail.com)

چکیده

ماهی قزل آلای رنگین کمان یکی از با ارزش ترین ماهیان پرورشی بوده که در مراحل ابتدایی رشد شرایطی ویژه و بحرانی دارد. در این تحقیق ، از پری بیوتیک دیواره سلولی مخمر *Saccharomyces cerevisia* اضافه شده در جیره غذایی در سطوح مختلف برای بررسی فاکتورهای ایمنی و فلور باکتریایی روده استفاده شد. در تحقیق حاضر ۱۲۰ قطعه بچه ماهی قزل آلای رنگین کمان با میانگین وزنی ۰/۱۲±۳/۶۱ گرم به صورت تصادفی در ۱۲ وان فایبرگلاس با حجم آبگیری ۱۰۰ لیتر توزیع و پرورش داده شدند. این آزمایش تغذیه ای برای بررسی اثر و تعیین سطح مطلوب پری بیوتیک دیواره سلولی مخمر در جیره غذایی بچه ماهیان قزل آلای رنگین کمان در سه تیمار ۱٪ پری بیوتیک ، ۱/۵٪ پری بیوتیک ، ۲٪ پری بیوتیک و شاهد بدون پری بیوتیک ، هر یک با سه تکرار در یک طرح متعادل مورد بررسی قرار گرفت. نتایج نشان داد که شاخص های ایمنی غیر اختصاصی در خون نظیر لیزوزیم و ایمنی اختصاصی نظیر IgM و Ig اختلاف معنی دار آماری بین گروه تیماری تغذیه شده با ۲٪ پری بیوتیک دیواره سلولی مخمر با سایر تیمارها و گروه شاهد داشتند ($P<0/05$). در بررسی فلور باکتریایی روده بچه ماهیان بر روی محیط کشت TSA و MRS بین تیمارها اختلاف معنی دار آماری مشاهده نشد ($P>0/05$). اما میانگین شمارش باکتریایی در تیمار۲٪ بیشتر از شاهد و سایر تیمارها بوده است. بر اساس نتایج مذکور می توان اظهار نمود که پری بیوتیک دیواره سلولی مخمر در سطح ۲٪ بکار رفته در جیره غذایی بدلیل افزایش قابل توجه در شاخص های ایمنی و فلور باکتریایی مورد بررسی ، می تواند نقش مهمی در عملکرد ایمنی بچه ماهیان قزل آلای رنگین کمان ایفا نماید.

کلمات کلیدی : قزل آلای رنگین کمان (*Oncorhynchus mykiss*) ، پری بیوتیک ، دیواره سلولی مخمر (*Saccharomyces cerevisia*) ، شاخص ایمنی ، فلور باکتریایی روده

مقدمه

کسب اطلاعات در خصوص تغذیه مطلوب در ماهیان برای پرورش دهندگان ماهی بسیار مهم می باشد. تغذیه نامناسب منجر به کاهش کیفیت آب ، افزایش بیماری و مرگ و میر ماهیان ، پایین آمدن ظرفیت و کارایی تولید و تغذیه می شود (Gang *et al.*,2008). در همین رابطه ، ترکیباتی که مورد استفاده قرار می گیرند ، پری بیوتیک ها هستند. پری بیوتیک دیواره سلولی مخمر در واقع دیواره سلولی استخراج شده از مخمر *Saccharomyces cerevisia* می باشد. دیواره سلولی مخمر، منشأ دو ماده ای Immunostimulant (محرک ایمنی) مهم به نام بتا گلوکانβ-Glucan (۳-۱) و مانان الیگوساکارید Mannan oligosaccharide یا (MOS) می باشند (EL-Boshy *et al.*,2010). ترکیب بتاگلوکان استخراج شده از دیواره سلولی مخمر آبجو(*Saccharomyces cerevisiae*) باعث افزایش فعالیت لیزوزیم ، کمپلمان ، بیگانه خواری و افزایش IgM می شود که بالا رفتن ایمنی اختصاصی و غیر اختصاصی و مقاومت در برابر عوامل بیماری زا می گردد. تحقیقات نشان داده است که بتاگلوکان باعث افزایش فعالیت سلول های بیگانه خوار نظیر نوتروفیل ها ، ماکروفاژها ، اینترفرون ها و لیزوزیم ها و در نهایت افزایش سطح ایمنی سلول های بدن می شود (Cuesta *et al.*,2004).

استفاده از مخمر *Saccharomyces cerevisiae* به عنوان پری بیوتیک در سه سطح ۱ ، ۵ ، ۱۰٪ در جیره غذایی بچه ماهیان نورس قزل آلای رنگین کمان مورد مطالعه قرار گرفت و مشاهده شد که تیمارهای حاوی مخمر۱۰٪ از مقاومت بالاتری در برابر شوری های ppt۱۰و۱۵، پس از ٢٤ ساعت نسبت به گروه شاهد برخوردار بودند (P>۰/۰۵) (پورامینی،۱۳۸۷). در یک بررسی سطوح ۱ ، ۲ ،۳٪ پری بیوتیک اینولین در جیره غذایی قزل آلای رنگین کمان مورد سنجش قرار گرفت. پس از ۸ هفته تغذیه نتایج حاکی از اختلاف غیرمعنی دار در میزان فعالیت آنزیم های سرم خون در تیمارها با گروه شاهد بود (P>۰/۰۵). استفاده از سطوح پایین تر این پری بیوتیک توصیه شد (اکرمی و همکاران،۱۳۸۷).

همچنین طی تحقیقی تاثیر پری بیوتیک دیواره سلولی مخمر بر شاخص های ایمنی و فلور میکروبی روده بچه ماهیان انگشت قد کپور معمولی (*Cyprinus carpio*) بررسی گردید. این پری بیوتیک در سه سطح ۱ ،۲ و ۳٪ به جیره غذایی بچه ماهیان در ۸ هفته اضافه شد. در انتهای دوره فاکتورهای رشد ، خون ، ایمنی و فلور میکروبی رشد قابل ملاحظه ای را در تیمار ۳٪ نشان دادند (میزانی،۱۳۹۱).

در مطالعه دیگری اثرات سطوح ۱ ، ۵ ، ۱۰٪ گرم در کیلوگرم مخمر آبجو(*S.cerevisiae*) را در جیره غذایی ماهی سیم دریایی (*Sparus aurata*) بر میزان IgM سرم خون آزمایش کردند و مشاهده کردند که مخمر به دلیل داشتن بتاگلوکان باعث افزایش سیستم ایمنی اختصاصی و IgM در این ماهی می شود (Cuesta *et al.*,2004). همچنین بچه ماهیان (Rohu) به مدت ۸ هفته با جیره حاوی ۰ ، ۵ ، ۷/۵ و ۱۰ درصد مخمر نانوایی آزمایش شدند و نتایج نشان داد که نه تنها رشد بهتری نسبت به گروه شاهد داشتند بلکه به عنوان یک شبیه ساز ایمنی (Immunostimulant) به خوبی واکنش های ایمنی را پشتیبانی می کند (Tewary & Patra ,2011).

بنابراین هدف از انجام این مطالعه ایجاد یک ایمنی بالاتر و نیز تعیین سطح مؤثر پری بیوتیک دیواره سلولی مخمر اضافه شده به جیره غذایی بچه ماهیان قزل آلای رنگین کمان در روند ایمنی و سلامت آنها می باشد.

مواد و روش ها

این مطالعه به مدت ۸ هفته در کارگاه تکثیر و پرورش قزل آلا متعلق به شرکت شفق داروی پارسیان واقع در شهرستان صومعه سرا در تابستان ۱۳۹۱ صورت پذیرفت. بچه ماهیان قزل آلای رنگین کمان پس از مدت ۱ هفته سازگاری به شرایط کارگاهی ، به تعداد ۱۲۰ قطعه بچه ماهی قزل آلای رنگین کمان با میانگین وزنی ۰/۱۲±۳/۶۱ گرم و با تراکم ۱۰ قطعه (در هر وان) در ۱۲ وان فایبر گلاس به حجم ۱۰۰ لیتر حاوی آب تازه نگهداری شدند. در مدت تحقیق به طور روزانه نسبت به برداشت فضولات و پس مانده های غذایی از هر یک از مخازن نگهداری اقدام می شد. در این بررسی ، تیمارها شامل جیره غذایی حاوی ۱٪ ، ۱/۵٪ و ۲٪ پری بیوتیک دیواره سلولی مخمر و تیمار شاهد (بدون افزودن پری بیوتیک به جیره) و هر یک در سه تکرار مورد آزمایش قرار گرفتند. انتخاب دوزها در این تحقیق بر اساس رفرانس های موجود صورت گرفته است. برای تهیه جیره های مورد نظر ابتدا غذا را با آسیاب به صورت پودر در آورده و بعد از محاسبه و اضافه نمودن پری بیوتیک مورد نظر با دستگاه میکسر (همزن) بر اساس مقدار مصرف همراه با مقداری آب به صورت خمیر در آورده و بعد آن را از یک چرخ گوشت عبور داده تا به شکل رشته های شبیه به ماکارونی در آمد و در نهایت پلت ها را در آون (Binder, Germany) قرار داده تا در دمای ۳۰ درجه سانتی گراد به مدت ٢٤ ساعت خشک شده و سپس از آن رشته ها ، پلت هایی با قطر متناسب با دهان بچه ماهیان درآورده و در کیسه های مناسب و غیر قابل نفوذ در دمای ۱۵- درجه سانتی گراد نگه داری شدند. یک ساعت قبل از توزیع غذا در وان ها ، جیره های ساخته شده از فریزر خارج و در دمای اتاق نگه داری شدند و پس از متعادل شدن درجه حرارت پلت ها ، با استفاده از ترازوی دیجیتال با دقت ۰/۰۱ گرم (Shinko Radwag مدلWTB ساخت کشور ژاپن) توزین شده و با توجه به تیمارهای مورد نظر ، بچه ماهیان قزل آلا به میزان ۵-۳٪ وزن زنده آنها روزانه در ۳ نوبت (ساعات ۸ ، ١٤ ، ۲۰) تغذیه شدند ، این عمل در طول شبانه روز ، در دفعات منظم بر اساس دمای آب ، وزن ماهیان و بیوماس و زیست سنجی هر تکرار در هر ۲ هفته یکبار انجام شد. ساخت غذا به منظور جلوگیری از افت کیفیت آن به طور ماهیانه انجام گرفت. در حقیقت بچه ماهیان به مدت ۸ هفته تغذیه شدند و عملیات محاسبه میزان و درصد غذا بر اساس اندازه گیری بیوماس به ترتیب در ابتدای دوره با ۵٪ توده زنده در هر تیمار و در انتهای دوره با ۳٪ توده زنده به طور کاملا دستی انجام پذیرفت(پور امینی،۱۳۸۷؛سلطانی،۱۳۸۷؛Misra,2006).

پارامترهای کیفی آب نیز مانند اکسیژن محلول توسط اکسیژن متر WTW مدل 330i ساخت شرکت Weilheim آلمان با دقت ۰/۰۱ ، درجه حرارت توسط دماسنج دیجیتال300 ساخت شرکت HM کره جنوبی به صورت روزانه اندازه گیری شد. پس از اتمام طول دوره پرورش به منظور بررسی تاثیر پری بیوتیک استفاده شده در بهبود پارامترهای ایمنی پس از ٢٤ ساعت و اطمینان از تخلیه کامل محتویات شکمی ماهیان ، از هر تیمار و تکرار ، ۳ عدد به صورت تصادفی انتخاب شده و خون گیری از ورید ساقه دمی به وسیله سرنگ cc ۲ انجام گرفت و نمونه ها به آزمایشگاه تشخیص طبی جهت تعیین سطوح ایمنی بچه ماهیان منتقل گردید. حجم خون برداشت شده به ازاء هر تکرار cc ۱ که ۰/۵ سی سی در اپندورف های فاقد هپارین برای جداسازی سرم خون و ۰/۵ سی سی حاوی ماده ی هپارین ریخته شد (Tewary & Patra ,2011).

به منظور اندازه گیری Ig از روش Elisa استفاده شد. دستگاه مورد استفاده (Awareness, USA) مدل Stat Fax-2100 بود. مقدار ایمنوگلوبولین کل با پروتئین بدست آمده از سرم خون که با پلی اتیلن گلیکول سانتریفوژ شده برحسب (mg/ml) بدست آمد (Torrecillas *et al*. 2010, ؛ Huang *et al*.,1989).

روش مورد استفاده برای اندازه گیری ایمنوگلوبولین M روش Immunoturbidimetric می باشد. در این روش IgM موجود در سرم با آنتی بادی پلی کلونال موجود در محلول های تامپون تشکیل کمپلکس داده و باعث کدر شدن محلول می شود. شدت کدورت ایجاد شده با مقدار IgM رابطه مستقیم داشته و توسط دستگاه اسپکتوفتومتر Minineph ساخت (Binding site , UK) در طول موج ۳٤۰nm خوانده شد. در واقع نفلومتر نور تک رنگ موازی در طول موج های بین ٤۰۰ تا ۸۰۰ نانومتر به این محلول تابانده که پس از برخورد به کمپلکس آنتی بادی و آنتی ژن متفرق شده که میزان تفرق با مقدار IgM نسبت مستقیم دارد (Zilva,1984 ؛ سقا و سروش نیا ، ۱۳۸۲ ؛ Khoshbavar-Rostami *et al* , 2003).

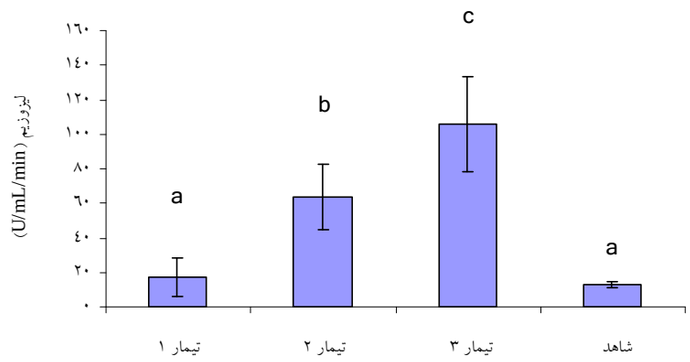
برای اندازه گیری میزان فعالیت لیزوزیم از دستگاه Elisa Reader (Awareness, USA) مدل Stat Fax-2100 و به روش Turbidimetric (کدورت سنجی) استفاده شد. نتایج از طریق تحلیل باکتریهای گرم مثبت بدست آمد و بر حسب (mg/ ml^{-1}) محاسبه گردید (Malin *et al*.,1996).

به منظور بررسی تعداد باکتریهای اسید لاکتیک و نیز تعیین فلور باکتریایی روده بچه ماهیان در انتهای دوره تعداد ۳ ماهی از هر تکرار انتخاب شده که بعد از برداشت روده و تهیه رقت از روده و مدفوع آنها ، حجمی معادل ۰/۱ میلی لیتر برداشته و به محیط های کشت TSA و MRS طبق دستور شرکت سازنده (Merck,Germany) منتقل شدند ، در نهایت بعد از طی شدن زمان انکوباسیون باکتری های هر پلیت بر حسب واحد Cfu در گرم بر اساس مشخصات فنوتیپی شناسایی و شمارش شدند (Mohseni *et al*.,2006).

در پایان کلیه داده های خام به منظور بررسی توزیع نرمال داده ها در گروه ها و تکرارها جهت تشکیل تیمارها از آزمون Shapiro-Wilk و رسم نمودار هیستوگرام استفاده شد. و جهت مقایسه میانگین گروه ها با یکدیگر از آزمون دانکن استفاده شد. کلیه آنالیز های آماری با استفاده از نرم افزار SPSS نسخه ۱۷ و جهت رسم نمودارها از نرم افزار Excel 2003 استفاده شد.

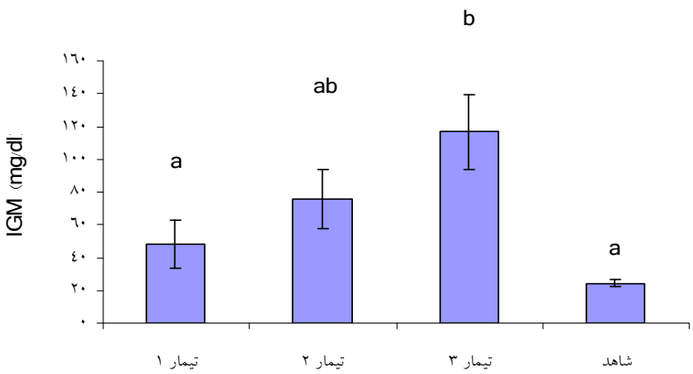
نتایج

در بررسی نتایج حاصل از آنالیزهای آماری ، بین تیمارها و گروه شاهد از نظر میزان لیزوزیم اختلاف معنی دار آماری وجود دارد (شکل. ۱) بطوریکه بیشترین میزان لیزوزیم در تیمار ۲٪ با U/ml/min۱۰٦ ±۱۵/۸۲ و کمترین میزان در گروه شاهد با U/ml/min۱۳ ± ۱ بوده است و به لحاظ آماری اختلاف معنی دار بین شاهد با تیمار ۱/۵٪ و ۲٪ درصد مشاهده گردید (P<۰/۰۵).



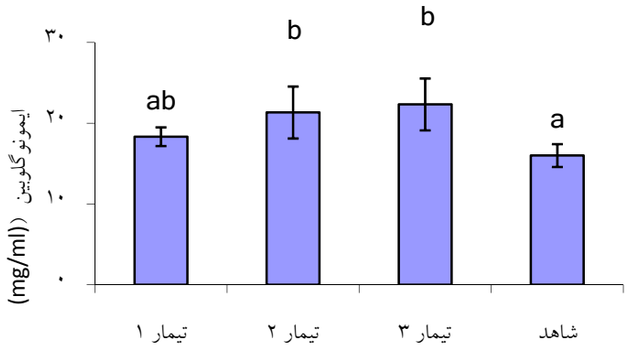
شکل ۱ : مقایسه میانگین میزان لیزوزیم در بچه ماهیان قزل آلای تغذیه شده با پری بیوتیک دیواره سلولی مخمر (تیمار۱: ۱٪ پری بیوتیک، تیمار ۲: ۱/۵٪ پری بیوتیک، تیمار ۳: ۲٪ پری بیوتیک، شاهد: بدون پری بیوتیک) به مدت هشت هفته (حروف لاتین غیر مشترک نشان دهنده اختلاف معنی دار آماری در آزمون دانکن در سطح ۵ درصد است)

در بررسی ایمنوگلوبولین M (IgM) اختلاف معنی دار آماری بین تیمارها و گروه شاهد مشاهده گردید (شکل. ۲). بیشترین میزان IgM در تیمار ۲٪ با ۱۹/۰۶± ۶۷/ ۱۱۶ میلی گرم بر دسی لیتر و کمترین میزان آن در تیمار شاهد با ۲۴/۵ میلی گرم بر دسی لیتر بوده است .



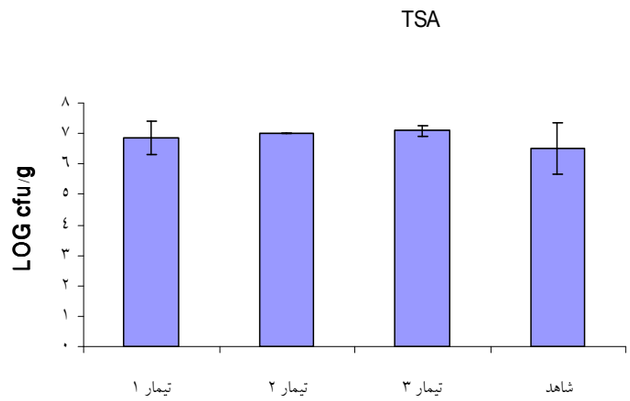
شکل ۲ : مقایسه میانگین میزان IgM در بچه ماهیان قزل آلای تغذیه شده با پری بیوتیک دیواره سلولی مخمر (تیمار۱: ۱٪ پری بیوتیک، تیمار ۲: ۱/۵٪ پری بیوتیک، تیمار ۳: ۲٪ پری بیوتیک، شاهد: بدون پری بیوتیک) به مدت هشت هفته (حروف لاتین غیر مشترک نشان دهنده اختلاف معنی دار آماری در آزمون دانکن در سطح ۵ درصد است)

بر اساس آنالیزهای آماری میزان ایمنوگلوبولین کل (Ig) اختلاف معنی دار آماری بین تیمارها و گروه شاهد وجود دارد (شکل. ۳). بیشترین میزان Ig در تیمار ۲٪ با ۱/۸۵± ۲۲/۳۳ میلی گرم بر میلی لیتر و کمترین میزان آن در تیمار شاهد با ۱۶ میلی گرم بر میلی لیتر بوده است .



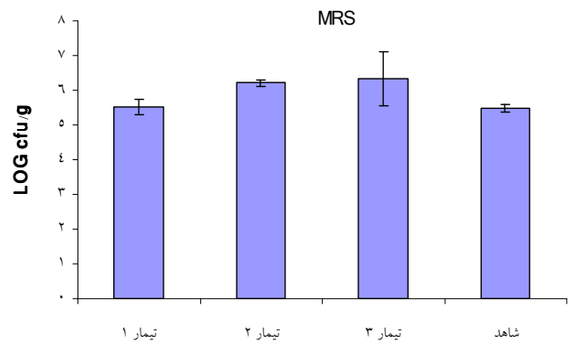
شکل ۳ : مقایسه میانگین میزان Ig در بچه ماهیان قزل آلای تغذیه شده با پری بیوتیک دیواره سلولی مخمر (تیمار۱: ۱٪ پری بیوتیک، تیمار ۲: ۱/۵٪ پری بیوتیک، تیمار ۳: ۲٪ پری بیوتیک، شاهد: بدون پری بیوتیک) به مدت هشت هفته (حروف لاتین غیر مشترک نشان دهنده اختلاف معنی دار آماری در آزمون دانکن در سطح ۵ درصد است)

بر اساس آنالیزهای آماری میزان کل باکتری های موجود در روده بچه ماهیان بر روی محیط کشت TSA بین تیمارها اختلاف معنی دار آماری دیده نشد (P>۰/۰۵). میانگین شمارش کل باکتریایی تیمار ۲٪ با ۷/۱ Cfu/g بیشتر از شاهد و سایر تیمارها بوده است(شکل. ٤)



شکل ٤ : مقایسه میانگین میزان کل باکتری های موجود در روده شاهد با تیمارهای مختلف در پایان هفته هشتم

در بررسی میزان کل باکتری های اسید لاکتیک تجمع یافته در روده بچه ماهیان برروی محیط کشت MRS بین تیمارها اختلاف معنی دار آماری وجود نداشت (P>۰/۰۵). اما میانگین کل باکتری های اسید لاکتیک در تیمار ۲٪ درصد با ۶/۳۳ Cfu/g بیشتر از شاهد و سایر تیمارها بوده است.



شکل ۵ : مقایسه میانگین میزان توتال باکتریایی اسید لاکتیک در مدفوع شاهد با تیمارهای مختلف در پایان هفته هشتم

شکل۶ : مقایسه میانگین میزان کل باکتریایی و کل باکتری های اسید لاکتیک در روده شاهد با تیمارهای مختلف

بحث

در تحقیقی Misra و همکاران در سال ۲۰۰۶ اثرات سطوح ۱۰۰، ۲۵۰ ،۵۰۰ میلی گرم در کیلوگرم بتا گلوکان را بر سیستم ایمنی ، رشد و بقای بچه ماهیان انگشت قد روهو (*Labeo rohita*) مورد مطالعه قرار دادند و ثابت کردند که ۳ بار تزریق ، ۱ میلی گرم در وزن بدن ، بتاگلوکان باعث ارتقاء سیستم ایمنی و افزایش مقاومت در باکتری های آئوروموناس هیدروفیلا و ادواردزیلاتاردا می شود (Merrifield *et al.*,2009).

طی بررسی چهار هفته ای تغذیه با جیره حاوی ۱ ، ۵ و ۱۰ gr/kg مخمر آبجو در ماهی سیم دریایی(*Sparus aurata*) ۱۰۰ تا ۲۰۰ گرمی ، میزان IgM خون بالا رفت. اعلام داشت که در تیمار gr/kg ۱۰مخمر در جیره غذایی این ماهی به دلیل دارا بودن بتاگلوکان ، باعث افزایش سیستم ایمنی اختصاصی در این ماهی شده است(Bahmani *et al*.,2001).

مهمترین Ig در ماهی ها IgM می باشد که توانایی ایمنی اختصاصی در برابر آنتی ژنهای خاص را دارد (کاظمی و همکاران،۱۳۸۹). در یک بررسی انجام شده توسط عاشورپور در سال ۱۳۹۰ بر روی شاخص های ایمنی و فراوانی باکتری های اسید لاکتیک بچه ماهیان انگشت قد شیپ (*Acipenser nudiventris*) تغذیه شده با دیواره سلولی مخمر در سطح ۱٪ مخمر میزان IgM بیشتر از شاهد بوده ولی اختلاف معنی دار آماری مشاهده نگردید (P>۰/۰۵) ، همچنین بیان نمود که در مقایسه میزان کل باکتریهای موجود در روده و نیز مقایسه کل باکتریهای اسید لاکتیک روده بین گروه های تیماری و شاهد اختلاف معنی دار آماری وجود دارد (P<۰/۰۵) (سوداگر،۱۳۸۳). که این افزایش به دلیل باکتری های اسید لاکتیک ، از جمله لاکتو باسیلوس ها می باشد که تولید آنتی بادی را تحریک و باعث بالارفتن IgM نسبت به شاهد شده است (Magnadottir *et al*.,1999). همچنین با توجه به نتایج ، در تیمار ۰/۵٪ مخمر تولید باکتری های اسید لاکتیک به طور معنی دار نسبت به شاهد بیشتر بوده است که نشان دهنده تاثیر مثبت این باکتری ها بر جلوگیری از رشد پاتوژن های فرصت طلب شده و در نهایت با تولید اسیدهای چرب کوتاه زنجیره ، سیستم ایمنی را تحریک می کنند (Dalmo & Bogwald,2008؛ Khoshbavar& Rostami,2003).

در حقیقت نتایج بررسی فوق با نتایج حاصل از تحقیق مطابقت دارد و این مسئله حاکی از آن است که افزایش میزان پری بیوتیک دیواره سلولی مخمر در جیره غذایی می تواند باعث افزایش سطوح ایمنی گردد. میزان فعالیت لیزوزیم سرم به عنوان یک معرف با اهمیت ایمنی غیر اختصاصی در ماهی می باشد (Peter & Sneath,1986) و افزایش آن پس از مصرف مواد محرک ایمنی مانند گلوکان ها و تحریک آنتی ژنی افزایش می یابد (سقا و سروش نیا،۱۳۸۲). حتی در تحقیق دیگری توسط El-Boshy و همکاران در سال ۲۰۱۰ تاثیر مخمر *S.cerevisiae* و بتاگلوکان β-Glucan را بر روی فاکتورهای ایمنی تیلاپیاهای ۱۰۰-۸۰۰ گرمی به مدت ۲۱ روز مورد بررسی قرار دادند و بدست آوردند که اختلاف معنی داری در میزان لیزوزیم سرم خون وجود ندارد (P>۰/۰۵) (David *et al*.,1999).

در آزمایش دیگری توسط میزانی در سال ۱۳۹۰ تاثیر سطوح ۱ ، ۲ ، ۳٪ پری بیوتیک دیواره سلولی مخمر *S.cerevisiae* اضافه شده در جیره غذایی بچه ماهیان انگشت قد کپور معمولی بر روی شاخص های ایمنی نظیر لیزوزیم ، Ig و IgM بررسی نموده و نتایج نشان داد که افزایش این پری بیوتیک در سطح ۳٪ جیره غذایی می تواند باعث افزایش سطوح ایمنی در بچه ماهیان کپور معمولی گردد و نیز در تیمارها اختلاف معنی دار آماری را با شاهد مشاهده نمودند (P<۰/۰۵) همچنین مشاهده کرد که در سطح ۳ درصد اختلاف معنی دار آماری در باکتری های اسید لاکتیک ایجاد شده اما در باکتری های زیست پذیر روده ضمن افزایش در سطوح تیماری ، اختلاف معنی داری با گروه شاهد مشاهده نگردید که نتایج این مطالعه نیز با نتایج حاصل از تحقیق مطابقت دارد (میزانی،۱۳۹۱). Tewary و Potra در سال ۲۰۱۱ بچه ماهیان (Rohu) به مدت ۸ هفته با جیره حاوی ۰ ، ۵ ، ۷/۵ و ۱۰ درصد مخمر نانوایی آزمایش شدند و نتایج نشان داد که جیره حاوی مخمر نسبت به گروه شاهد به عنوان یک شبیه ساز ایمنی (Immunostimulant) عمل کرده و به خوبی واکنش های ایمنی را پشتیبانی می کند (Sakai,1999). حسینی فر و همکاران در سال ۱۳۸۹ بچه فیل ماهیان پرورشی با میانگین ۱۱/٤ گرم را به مدت ٦ هفته با سطوح ۰ ، ۱ ، ۲ ، ۵ درصد پری بیوتیک *Saccharomyces cerevisiae* تغذیه نمود و مشاهده کرد که تراکم کل

باکتری ها و لاکتوباسیلوس ها در جیره غذایی حاوی ۵٪ مخمر دارای افزایش معنی داری با تیمار شاهد بوده است ($P<۰/۰۵$) (پورعلی و همکاران،۱۳۸۲).

نتایج حاصل از تحقیق نشان می دهد که افزایش پری بیوتیک دیواره سلولی مخمر در سطح ۲٪ جیره غذایی بچه ماهیان انگشت قد قزل آلای رنگین کمان می تواند باعث بالا رفتن شاخص های ایمنی نظیر لیزوزیم ، Ig و IgM و همچنین افزایش باکتری های اسید لاکتیک گردد که خود سیستم ایمنی این ماهیان را تحریک می کند. در واقع تولید باکتری های اسید لاکتیک بومی در دستگاه گوارش به تحریک پری بیوتیک دیواره سلولی مخمر از اصلی ترین اهداف این تحقیق بود که با توجه به نتایج حاصله میسر گردید. افزایش باکتری های اسید لاکتیک در تیمار ۲ درصد دیواره سلولی مخمر ، به علت وجود مانان الیگوساکارید موجود در این پری بیوتیک است چون مانان الیگوساکارید منبع تغذیه ای مناسبی برای رشد و فعالیت باکتری های فلور دستگاه گوارش نظیر باکتری های اسید لاکتیک و لاکتوباسیلوس می باشد (Ringo *et al.*,1998 ; Andrews *et al.*,2009).در مجموع اختلافات موجود در نتایج این تحقیق را با یافته های دیگر محققان را می توان به عوامل محیطی خصوصاً به علت خونسرد بودن ماهی نظیر (فصول ، سال ، شوری ، دوره نوری ، درجه حرارت ، تراکم) ، عوامل فیزیولوژیکی (گونه آبزی ، سیکل تولید مثلی و وضعیت بلوغ ، سن ، جنس و شرایط تغذیه ای) و ژنتیکی ، زمان نمونه گیری ، فرمولاسیون جیره های غذایی ، نوع پری بیوتیک ، درجه خلوص آن و میزان استفاده از آن در جیره ، روش های مختلف اضافه کردن به جیره ، دقت و حساسیت روش های اندازه گیری ، نوع محیط کشت در بررسی فلور میکروبی دستگاه گوارش ، دمای انکوباسیون و طول مدت انکوباسیون و احتمالا فلور میکروبی ویژه ای که قادر به استفاده از آن به عنوان سوبسترا هستند ، ربط داد ، این عوامل خود می تواند بر فعالیت پارامترهای رشد و شاخص های خونی ، بیوشیمیایی و ایمنی و نیز فلور باکتریایی روده تأثیر گذاشته و باعث اختلاف در تفسیر نتایج محققین شوند (Verdegem *et al.*,1997 ; اکرمی و همکاران،۱۳۸۹). بنابراین هر چند در برخی از پارامترها اختلاف معنی دار آماری مشاهده نشد اما مشاهدات نشان می دهد که کاربرد پری بیوتیک دیواره سلولی مخمر در جیره غذایی بچه ماهیان انگشت قد قزل آلای رنگین کمان تاثیر مثبت بر شاخص های ایمنی و فلور باکتریایی روده گذاشته که با توجه به روند افزایشی پارامترهای بررسی شده در تیمار ۳ تحقیق می توان دوز دیواره سلولی مخمر در جیره غذایی بچه ماهیان انگشت قد قزل آلای رنگین کمان را ۲٪ پیشنهاد نمود و با توجه به بهبود قابل ملاحظه این شاخص ها می توان استفاده از این ترکیب را از نظر اقتصادی توجیه نمود.

سپاسگزاری

از همکاری آقایان دکتر علیرضا شناور ماسوله ، دکتر جوادی و مهندس جلیل پور قدردانی می نمایم. از شرکت شفق داروی پارسیان بابت در اختیار گذاشتن فضای کارگاهی و پری بیوتیک مصرفی نیز سپاسگزاری می نمایم.

منابع

۱. اکرمی، ر.، حاجی مرادلو، ع.، متین فر،ع.، عابدیان، ع.، مازندرانی، ر. ۱۳۸۷. تأثیر پربیوتیک اینولین بر شاخص تولید و تراکم باکتریایی دستگاه گوارش فیل ماهیان جوان پرورشی. مجله شیلات، سال دوم، ۱۱ صفحه.

۲. پورامینی،م. ۱۳۸٦. بررسی اثر تغذیه با مخمر ساکارومایسس سروزیا بر رشد و بازماندگی لارو ماهی قزل آلای رنگین کمان، پایان نامه کارشناسی ارشد، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان، ۱۰۱ صفحه

۳. پور علی، ح.ر.، محسنی، م.، آق تومان، و.، و توکلیف م. ۱۳۸۲. پرورش بچه ماهیان با درصدهای مختلف غذای کنسانتره فرموله شده ، مجله علمی شیلات ایران ، ویژه نامه اولین سمپوزیوم ملی ماهیان خاویاری، صفحات ۳۷ تا ٤۸ .

٤. سقا ، ح. ر. و سروش نیا، م. ۱۳۸۲. تجهیزات و فرآورده های آزمایشگاهی ، انتشارات کتاب میر، ۲٦۸ صفحه

۵. سلطانی،م. ۱۳۸۷. ایمنی شناسی ماهیان و سخت پوستان، انتشارات دانشگاه تهران، ۲٦٤ صفحه.

٦. سوداگر، م.، ایمان پور ، م.، حسینی فر، ح. ۱۳۸۳. تاثیر محرک رشد اپتیمون بر عوامل رشد و بازماندگی بچه فیل ماهیان، مجله علوم و فنون دریایی ایران ۳(۲-۳)، ص ۳۸-۳۳.

۷. عاشورپور، ع.، ۱۳۹۰. تاثیر پری بیوتیک دیواره سلولی مخمر (*Saccharomyces cerevisiae*) بر شاخص های رشد، فاکتورهای خونی و فراوانی باکتری های اسید لاکتیک روده ی ماهیان انگشت قد شیپ (*Acipenser nudiventris*)،پایان نامه کارشناسی ارشد ، دانشگاه آزاد لاهیجان، ۱۰۰ صفحه.

۸. میزانی، ف.، ۱۳۹۰. تعیین اثرات پری بیوتیکی دیواره سلولی مخمر بر شاخص های رشد، فاکتورهای خونی و فلور میکروبی روده ماهیان انگشت قد کپور معمولی (*Cyprinus carpio*). پایان نامه کارشناسی ارشد، دانشگاه آزاد لاهیجان، ۹۰صفحه.

9. Andrews, S.R., Sahu, N.P., Pal, A.K. and Kumar, S., 2009. Hematological modulation and growth of *Labeo rohita* fingerlings: Effect of dietary mannan oligosaccharide, yeast extract, protein hydrolysate and chlorella. Aquaculture Research, 41:61-69.

10. Bahmani, M., Kazemi, R. and Donskaya, P., 2001. Acomparative study of somehematological features in young reared sturgeons (*Acipenser persicus* and *Huso huso*). Fish Physiology and Biochemistry. 24: 135-140.

11. Cuesta, A., Meseguer, J. and Esteban, M.A., 2004. Total serum immunologlobulin M levels are affected by immunomodulators in seabream (*Sparus auratea*). Veterinary Immunology and Immunopathology. 101: 203-210.

12. Dalmo, A.R. and Bogwald, J., 2008. β-glucans as conductors of immune symphonies. Fish and Sellfish Immunology. 25: 384-396.

13. David, J.A., Jenkiss, Cyrill, W.C., Kendall and Vladimir Vuksan. 1999. Inuline, Oligofructose and intestinal function. J. Nutr. 129: 1431-1433.

14. EL-Boshy, M.E., El-Ashramb, A.M., Abdel hamid, F.M., &Gadalla, H.A. (2010) Immunomodulatory effect of dietary *Saccharomyces cerevisiae* , β-Glucan and laminaran in mercuric chloride treated Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) and experimentally infected with *Aeromonas hydrophila*. Fish & Sell fish Immunology 28, 802-808.

15. Gang L. Huang, G.L. 2008. Extraction of Two Active Polysaccharides from the Yeast Cell Wall. Z. Naturforsch. 63c, 919-921.

16. Huang, S.S.O.,Lutes,P.B. and Storebakken, T.,1989. Growth and feed efficiency of white sturgeon (*Acipenser transmontanus*) sub0yearling at different feeding f\rates. Aquacultuer. 80: 147-153.

17. Khoshbavar- Rostami, H.A., Soltani, M. Kazemi, B. and Hassan, M.D.,2003. Immune responses of great sturgeon (*Huso huso*) to *Aeromonas hydrophial bacterin*. Journal of Fish Biology. 70: 931-938.

18. Magnadottir, B., Jonsdottir, H., helgason, S., Bjornsson, B., T.O. Jorgensen, T.O., pilstrom,L., 1999. Humoral immune parameters of Atlantic cod (*Gadus morhue*). Vomparative Biochemistry and physiology. 122B: 173-188.

19. Malin, M., Suomalainen, H., Saxelin, M., Isolauri. E., 1996. Promotion of IgA immune response in patients with Crohns disease by oral bacteriotherapy with lactobacillus GC. Annual nutrition and metabolism. 40: 137-45.

20. Merrifield, D.L., Bradley, G., Baker, R.T.M., Dimitroglou, A., & Davies, S.J.(2009) Probiotic applications for Rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss Walbaum*) I. Effects on growth performance, feed utilization, intestinal microbiota and related health criteria. Aqua. Nutr., Doi: 10.1111/j.1365-2095.2009.00689.x.Accepted.

21. Misra CK, Das BK, Mukherjee SC, Pattnaik P. Effect of long term administration of dietary β-Glucan on immunity. Growth and survival of *Labeo rohita* fingerling. Aquacultuer 2006; 255:82-4.

22. Mohseni, M., pourkazemi, M., Bahmani, M., Falahatkar, B., Pourali, H.R. and Salehpour, M., 2006. Effects of feeing rate and frequency on growth performance of yearling great sturgeon, *Huso huso*. Journal of Applied Ichthyology. 22: 278-282.

23. Peter, H., and Sneath, A. 1986. Bergeys manual of systematic Bacteriology. Vol 2: 1104-1154.

24. Ringo, E. and Gatesoupe, F.J., 1998. Lactic acid bacteria in fish: Areview. Aquaculture, 160:177-203.

25. Sakai, M., 1999. Vurent reaserch status of fish immunostimultans. Aquacultuer. 172: 63-92.

26. Tewary. A., & Patra, B.C. (2011) Oral administration of baker,s yeast (*Saccharomyces cerevisiae*) acts as a growth prometer and immunodulator in *Labeo rohita* (Ham). J Aquac Res Development 2:109.7 p.doi:10.4172/2155-9546.1000109.

27. Torrecillas, S., Makol, A., Caballero, M.J., Montero, D., Gines, R., Sweetman, J. and Izquierdo, M.S., 2010. Improved feed utilization, intestinal micus production and immune parameters in sea bass (*Dicentrachus labrax*) fed mannan oligosaccharides (MOS). Aquaculture Nutrition. (In press).

28. Verdegem,M.C.J., Hilbrands, A.D., Boon, J.H. (1997). Influence of salinity and dietary composition on blood parameter values of hybrid red tilapia (*Oreochromis niloticus*) & (*Oreochromis mosambicus).* Aquaculture. Res. 28:453-459.

29. Zilva , JF & Pannall , PR(1984) Clinical chemistry in diagnosis and treatment. Publ. Lioyd-Luke (medical Books) Ltd. London PP348-352.

deliberation some of Indicators of immunity and intestinal bacterial flora of rainbow trout fry (*Oncorhynchus mykiss*) fed with prebiotic yeast cell wall (*Saccharomyces cerevisia*)

Mohammad eatisamipour [*1] , Abbas-Ali Zamini [2] , Masoud Farokhroz [3]

1- M.S.c. graduated in fisheries, Lahijan Branch, Islamic Azad University, Iran, POBox:1616
2,3- Assistant Professor and Faculty member, Lahijan Branch, Islamic Azad University, faculty of Natural Resources, Dept. of Fisheries, Lahijan, Iran, POBox: 1616
([*]Responsible for correspondence - Mohammadeatisamipour@gmail.com)

Abstract

Rainbow trout farmed fish is one of the most critical situation is in the early stages of growth. In this study, the cell wall of yeast *Saccharomyces cerevisia* added prebiotic dietary factors at different levels of immunity and intestinal bacterial flora were used. In the study, 120 rainbow trout fry with the average weight of 3.61± 0.12 gr containing 100 liters volume fiberglass tub were randomly distributed into 12 tanks and were reared. An experiment to determine the optimum level of prebiotic effect of dietary yeast cell wall in the diet of rainbow trout fry in 1% prebiotic treatments, 1.5% prebiotic, 2% prebiotic prebiotic-free control, in a balanced design with three replications each were studied. The results showed that non-specific immune parameters in blood, such as lysozyme and specific immune such as IgM and Ig had Statistically significant difference between treatment groups fed with 2% prebiotic yeast cell wall with other treatments and controls($P<0.05$). The intestinal bacterial flora of fishes on MRS agar and TSA were no significant differences between treatment($P>0.05$). But in the mean bacterial count was treated with 2% higher than the control and other treatments.
Therefore, Based on these results it can be stated that the level of 2% prebiotic cell wall of yeast used in the diet caused a significant increase in bacterial flora and immune parameters studied, an important role in the safety of rainbow trout fry plays.

Keywords: Rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*), prebiotic, yeast cell wall (*Saccharomyces cerevisia*), Immunological index, the intestinal bacterial flora