دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان
بهره‌برداری و پرورش آبزیان
جلد سوم، شماره سوم، پاییز ۱۳۹۳
http://japu.gau.ac.ir

تاثیر سطوح مختلف پربیوتیک گروبیوتیک (GroBiotic®-A)، بر فعالیت ضد باکتریایی و برخی از شاخص‌های ایمنی موکوس فیل ماهیان (*Huso huso* (Linnaeus, 1754 جوان پرورشی

* میلاد عادل[۱]، رضا صفری[۲]، امین نعمت‌الهی[۳]، سکینه یگانه[۴] و شراره احمدوند[۵]

[۱] دانشجوی دکتری تخصصی گروه بهداشت و بیماری‌های آبزیان، پژوهشکده اکولوژی دریای خزر ساری،

[۲] مربی پژوهشی گروه میکروبیولوژی، پژوهشکده اکولوژی دریای خزر ساری،

[۳] دانشیار گروه بهداشت و کنترل کیفی مواد غذایی، دانشکده دامپزشکی دانشگاه شهرکرد،

[۴] استادیار گروه شیلات، دانشگاه کشاورزی و منابع طبیعی ساری،

[۵] دانش‌آموخته کارشناسی‌ارشد تکثیر و پرورش، دانشگاه کشاورزی و منابع طبیعی ساری

تاریخ دریافت: ۱۳۹۳/۸/۲۵ ؛ تاریخ پذیرش: ۱۳۹۳/۱۲/۲

چکیده

لایه موکوس سطح بدن ماهی شامل ترکیبات ضد میکروبی است که نخستین سطح دفاعی میزبان را در برابر عوامل بیماریزا تشکیل می‌دهد. این تحقیق به منظور ارزیابی تاثیر سطوح مختلف پربیوتیک گروبیوتیک جیره بر فعالیت ضد باکتریایی و برخی از شاخص‌های ایمنی موکوس فیل ماهیان (*Huso huso*) جوان پرورشی صورت گرفت. به‌این منظور ٤ گروه از فیل ماهیان با میانگین وزنی ۵/۸±٤۰/۸۲ گرم در حوضچه‌های فایبرگلاس (با تراکم ۲۰ عدد ماهی در هر حوضچه) توزیع و با سطوح مختلف گروبیوتیک (۰، ۰/۵، ۱ و ۲ درصد غذا) به مدت ۸ هفته غذادهی شدند. در انتهای دوره، موکوس از سطح پوست جمع آوری و فعالیت ضد باکتریایی آن علیه برخی از باکتری‌های بیماریزا شایع با دو روش انتشار در دیسک و تهیه رقت‌های متوالی مورد ارزیابی قرار گرفت. نتایج نشان داد که با افزایش غلظت گروبیوتیک، قطر هاله عدم رشد، میزان پروتئین محلول و فعالیت آلکالین فسفاتاز قلیائی موکوس افزایش معناداری نسبت به تیمار شاهد یافت (P<۰/۰۵)، نتایج مشابهی نیز در روش رقت‌های

*مسئول مکاتبه: miladadel85@yahoo.com

متوالی به‌دست آمد، حداقل غلظت ممانعت کننده رشد موکوس پوست علیه سویه‌های باکتریایی منتخب بین ۲۵ تا ۲۵۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر بود. با توجه به نتایج حاصله، استفاده از گروبیوتیک به ویژه در سطح ۲ درصد به منظور افزایش فعالیت ضد باکتریایی موکوس، میزان پروتئین محلول و فعالیت آلکالین فسفاتاز قلیائی، در جیره غذایی فیل ماهیان توصیه می‌شود.

واژه‌های کلیدی: گروبیوتیک، فیل ماهی، شاخص‌های ایمنی، موکوس، فعالیت ضد باکتری

مقدمه

فیل ماهی (*Huso huso*) یکی از شاخص‌ترین اعضای خانواده تاس ماهیان می باشد که گوشت و خاویار آن دارای ارزش اقتصادی زیادی برای کشور می‌باشد (بهمنی و همکاران، ۲۰۰۱). در سال‌های اخیر به دلایل متعددی از قبیل صید غیر مجاز، وجود آلاینده‌های زیست محیطی و از بین رفتن زیستگاه‌های تکثیر طبیعی، این ماهیان در لیست گونه‌های در خطر انقراض قرار گرفته‌اند. این زنگ خطر و ناتوانی در حل مشکلات به وجود آمده موجب شده که فیل ماهی به صنعت آبزی‌پروری کشور معرفی و بیش از دو دهه است که پرورش این ماهی شروع شده و روندی رو به رشد داشته است (بهمنی و همکاران، ۲۰۰۱).

پربیوتیک‌ها مواد غذایی غیر قابل هضمی هستند که به طور انتخابی موجب تحریک رشد و فعال کردن باکتری‌های مفید روده‌ای، بهبود و تعادل میکروفلورهای روده و افزایش مکانیسم دفاعی میزبان می‌گردد (گیبسون و روبرفروید، ۱۹۹۵). پربیوتیک‌ها ممکن است کربوهیدرات‌های غیر قابل هضم، الیگوساکاریدها یا کربوهیدرات‌هایی با زنجیره کوتاه باشند. از جمله پربیوتیک‌های مورد استفاده در صنعت آبزی پروری می‌توان به اینولین، صمغ‌های فیبری، زایلان، فروکتو الیگو ساکارید، لاکتوساکروز، مالتو دکسترین، ایمونوژن و گروبیوتیک اشاره داشت (رینگو و همکاران، ۲۰۱۰).

گروبیوتیک به عنوان یک پربیوتیک دارای ساختار الیگو پلی ساکاریدی مطرح است (لی و گاتلین، ۲۰۰۵). تاکنون مطالعاتی در خصوص تاثیر این پربیوتیک بر شاخص‌های رشد و ایمنی ماهی قزل آلای رنگین‌کمان (*Oncorhynchus mykiss*)، هیبرید باس مخطط (*Morone chrysops×M. saxatilis*)، ماهی سفید (*Rutilus frisii kutum kamensky*) و ماهی حوض (*Carassius auratus*) صورت گرفته است (آذری و همکاران، ۲۰۱۱؛ لی و گاتلین، ۲۰۰۵؛ ساولانین و گاتلین، ۲۰۰۹؛ یوسفیان و همکاران، ۲۰۱۲).

سیستم دفاعی ماهیان استخوانی عالی دارای سلول‌های فاگوسیت کننده شامل ماکروفاژها، نوتروفیل‌ها و سلول‌های خنثی‌کننده طبیعی مثل لنفوسیت‌های B و T می‌باشد. ماهیان استخوانی عالی همچنین دارای ترکیبات دفاعی از قبیل: عوامل مکمل (مسیرهای کلاسیک و مسیرهای فرعی)، لیزوزیم، همولیزین طبیعی، ترانسفرین و پروتئین واکنشی C می‌باشند (آستین و مک اینتوش، ۱۹۸۸).

موکوس پوست ماهیان به‌عنوان نخستین سد دفاعی ماهی، به‌دلیل ترشح و جایگزینی مداوم مانع از تثبیت انگل‌ها، باکتری‌ها و قارچ‌های بیماریزا بر روی سطوح خارجی بدن ماهی می‌گردد (استبان، ۲۰۱۲). موکوس اپیدرم حاوی چندین ترکیب ترشحی از جمله گلایکوپروتئین‌ها، آگلوتین‌ها، لکتین‌ها، پپتیدهای ضد میکروبی، آنزیم‌های پروتئولیتیک، فلاوآنزیم‌ها، ایمونوگلوبین‌ها، لیزین، لیزوزوم، پروتئین فاز حاد، آنتی بادی‌های طبیعی می‌باشد که نقش دفاعی مهمی را علیه عوامل بیماریزا ایفا می‌کند (آستین و مک اینتوش، ۱۹۸۸).

در مطالعات محدود صورت گرفته، تاثیر مثبت استفاده از پربیوتیک زایلوالیگوساکارید بر شاخص‌های ایمنی موکوسی ماهی سفید (حسینی فر و همکاران، ۲۰۱٤)، پربیوتیک ساکارومایسز سرویزیه بر شاخص‌های ایمنی موکوسی ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان (شیخ‌زاده و همکاران، ۲۰۱۲a) و پربیوتیک لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس بر شاخص‌های ایمنی موکوسی ماهی تایگر بارب (*Puntius tetrazona*) به اثبات رسیده است (روستا و همکاران، ۲۰۱٤) ولی با این وجود، مطالعه‌ای در خصوص تاثیر گروبیوتیک بر شاخص‌های ایمنی موکوس فیل ماهیان جوان پرورشی صورت نگرفته است. بنابراین، در مطالعه حاضر تاثیر سطوح مختلف گروبیوتیک بر فعالیت ضد باکتریایی و برخی از شاخص‌های ایمنی موکوس فیل ماهیان جوان پرورشی مورد بررسی قرار گرفت.

مواد و روش‌ها

این تحقیق در یک دوره ۸ هفته‌ای در مهر ماه سال ۱۳۹۲ در کارگاه پرورش ماهیان خاویاری قره‌برون در روستای سمندک واقع در حومه شهرستان ساری انجام گرفت. در ابتدای آزمایش و به منظور سازگاری ماهیان با شرایط جدید پرورشی تعداد ۲٤۰ قطعه فیل‌ماهی جوان با میانگین وزنی ۵/۸±٤۰/۸۲ گرم در ۱۲ حوضچه فایبرگلاس به ابعاد ۰/۵×۲×۲ متر (هر وان ۲۰ عدد ماهی) با شرایط یکسان از نظر حجم آب (۲۰۰۰ لیتر) و فاکتورهای کمی و کیفی آب مشابه توزیع شدند. میانگین پارامترهای فیزیکوشیمیایی آب در طول دوره پرورش شامل: اکسیژن محلول (٤/۵±۵/۷ میلی‌گرم در لیتر)،

دما (۱/۵±۲۰/٤ درجه سانتی‌گراد)، شوری (۱۱/±۲/٤ گرم در لیتر)، pH (٤/±۷/۷٦ میلی‌گرم در لیتر) و هدایت الکتریکی (۱۵۹/۲±۵۸۲٦/٤ میلی‌موس در سانتی‌متر) بود.

آماده‌سازی جیره: پس از سازگاری فیل ماهیان با شرایط جدید پرورشی، ماهیان به مدت ۸ هفته با غذای دستی تغذیه شدند. مواد اولیه مورد استفاده در جیره شامل پودر ماهی کیلکا، آرد گندم، روغن ماهی، روغن سویا، مکمل‌های ویتامینی و معدنی، سلولز، بایندر (آمیت بایندر، مهرتابان، یزد)، نمک، ضد قارچ (توکسیبان) و آنتی‌اکسیدان (BHT، مرک، آلمان) بود (جدول ۱). پربیوتیک مورد استفاده در این مطالعه گروبیوتیکی با نام تجاری GroBiotic®-A بود که دارای ساختار الیگو پلی‌ساکاریدی می‌باشد. به منظور تهیه جیره‌های آزمایش سطوح صفر (شاهد)، نیم، یک و دو درصد از گروبیوتیک به جیره پایه فرموله شده افزوده و به صورت یکنواخت و همگن با جیره پایه مخلوط گردید. در این آزمایش فیل ماهیان جوان پرورشی به مدت ۸ هفته به میزان ۳ درصد بیوماس بدن و ٤ بار در روز تا حد سیری با جیره‌های تهیه شده تغذیه شدند. این بررسی در قالب یک طرح کاملا تصادفی انجام شد و برای هر تیمار ۳ تکرار در نظر گرفته شد.

جمع‌آوری موکوس: در انتهای دوره جمع‌آوری موکوس، با استفاده از روش توصیه شده توسط روستا و همکاران (۲۰۱٤) با اندکی تغییر صورت گرفت. بدین منظور غذادهی ماهیان ۲٤ ساعت قبل از نمونه‌برداری قطع گردید. ۱۲ عدد ماهی از هر تیمار به صورت تصادفی انتخاب و پس از بیهوشی با اسانس گل میخک با غلظت ۵۰ppm، توسط دستکش‌های استریل به درون کیسه‌های پلاستیکی زیپ پلاست حاوی ۵۰ میلی‌لیتر سدیم کلرید ۵۰ میلی‌مولار منتقل شدند. پس از گذشت ۳ دقیقه ماهیان به حوضچه‌های مجهز به اکسیژن مناسب منتقل گردید. موکوس جمع آوری شده با دور ۳۰۰۰ به مدت ۱۵ دقیقه سانتریفوژ و مایع رویی به ظروف استریل منتقل و جهت انجام آزمایشات بعدی در دمای ٤ درجه سانتی‌گراد نگهداری شد.

جدول ۱- ترکیب جیره پایه ساخته شده برای فیل ماهیان جوان پرورشی مورد استفاده در این مطالعه

نوع ماده	میزان (٪)
پودر ماهی کیلکا	۵۸
آرد گندم	۱۹
روغن ماهی	٦/۲
روغن سویا	۵/۸
مکمل ویتامیتی	۳
مکمل معدنی	۲/۵
سلولز	۲
بایندر	۲
نمک	۱
ضد قارچ	۰/٤
آنتی اکسیدان	۰/۲۵

بررسی قدرت ضدباکتریایی موکوس به روش انتشار در دیسک: بـه منظـور بررسـی خـواص ضـد باکتریایی موکوس فیل ماهیان از باکتری‌های استرپتوکوکوس اینیایی (PTCC 14520)، یرسینیا راکری (KC291153)، اشریشیاکلای (RTCC 2310) و لیستریا مونوسایتوژنز (ATCC 1143) استفاده شد. برای مطالعه فعالیت ضد میکروبی موکوس از روش انتشار در دیسک استفاده شد. بـدین منظـور ۲۰۰ میکرولیتر از سوسپانسیون باکتری‌ها (حاوی $۱۰^{۷}$ باکتری) بر روی محـیط بـلاد آگـار کشـت داده شـد. سپس، ۱۰۰ میکرولیتر از موکوس رقیق نشده به دیسک‌های بلانک استریل (قطر ٦ میلی‌متر) اضافه شد و دیسک‌ها بر روی محیط کشت باکتری‌ها کشت داده شدند و سپس در دمای ۲۵ درجـه سـانتی‌گـراد به مدت ۲٤ ساعت گرماگذاری شدند (سلطانی و همکاران، ۲۰۱۳). پس از گذشـت ایـن زمـان، قطـر هاله عدم رشد باکتری‌ها بر حسب سانتی‌متر اندازه‌گیری شد (برای هر سویه باکتری ۳ تکـرار در نظـر گرفته شد).

تعیین حداقل غلظت بازدارندگی موکوس (Minimum Inhibitory Concentration): برای تعیـین حداقل غلظت بازدارندگی موکوس از روش تهیه رقت‌های متـوالی (ماکرودایلوشـن) اسـتفاده گردیـد. بدین منظور ابتدا رقت متوالی از موکوس در لوله‌های استریل حاوی ۵ میلی لیتر محـیط کشـت TSB

(Tryptic soy broth) تهیه شد. رقت‌های موکوس تهیه شده شامل: ۱۲/۵، ۲۵، ۵۰، ۷۵، ۱۰۰، ۱۲۵، ۱۵۰، ۲۰۰ و ۲۵۰ میکرولیتر در میلی‌لیتر بود. از کشت ۲٤ ساعته باکتری‌ها، سوسپانسیون باکتریایی با تراکم $۱۰^{۷}$ از هر باکتری تهیه و به میزان ۱۰ میکرولیتر به هر یک از رقت‌ها تلقیح گردید؛ سپس محیط‌های کشت به مدت ۲٤ ساعت در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد گرماگذاری شد. پس از گذشت ۲٤ ساعت، کمترین غلظتی از موکوس که در آن کدورت مشاهده نشد، به عنوان MIC در نظر گرفته شد (سلطانی و همکاران، ۲۰۱۳).

سنجش میزان پروتئین محلول و فعالیت آنزیم آلکالین فسفاتاز قلیائی موکوس: اندازه‌گیری میزان پروتئین محلول با استفاده از روش توصیه شده توسط لری و همکاران (۱۹۵۱) و منحنی استاندارد آلبومین سرم گاوی تعیین شد. همچنین، سطح آنزیم آلکالین فسفاتاز قلیائی موکوس با استفاده از کیت تولیدی شرکت پارس آزمون و در جذب نوری ٤۰۰ نانومتر با استفاده از دستگاه اسپکتوفوتومتر تعیین شد (سنچولی و همکاران، ۲۰۱۲).

تجزیه و تحلیل آماری: تجزیه و تحلیل داده‌ها با استفاده از نرم‌افزار SPSS 18 و با استفاده از تجزیه واریانس یک طرفه (ANOVA) صورت گرفت. مقایسه میانگین بین گروه‌های مختلف بر اساس آزمون چند دامنه‌ای دانکن (Multiple- range test Duncans) در سطح احتمال ۵ درصد تعیین شد ($P<۰/۰۵$).

نتایج

فعالیت ضد باکتریایی موکوس فیل ماهیان جوان تغذیه شده با سطوح مختلف گروبیوتیک در جدول ۲ نشان داده شده است که نشان‌دهنده تفاوت معناداری بین تیمارهای تغذیه شده با سطوح مختلف گروبیوتیک با تیمار شاهد است ($P<۰/۰۵$) هر چند که تفاوت معناداری بین تیمار شاهد و نیم درصد مشاهده نشد ($P>۰/۰۵$). بیش‌ترین قدرت ضد باکتریایی موکوس فیل ماهیان جوان در تیمار ۲ درصد گروبیوتیک مشاهده شد.

جدول ۲- مقایسه قدرت ضد باکتریایی موکوس فیل ماهیان جوان تغذیه شده با سطوح مختلف گروبیوتیک (میانگین± انحراف معیار)

تیمار (سانتی‌متر) / باکتری	شاهد	گروبیوتیک ۰/۵٪	گروبیوتیک ۱٪	گروبیوتیک ۲٪
استرپتوکوکوس اینیایی	۵/٤±۰/٤^{b}	۵/۸±۰/۲^{b}	۸/۵±۰/٤^{a}	۷/۸±۰/۲^{a}
یرسینیا راکری	۸/۱±۰/۳۲^{c}	۷/۹±۰/٦^{c}	۱۰/۸±۰/۵^{b}	۱۲/۳±۰/٦^{a}
اشریشیاکلای	۵/۸±۰/٤^{b}	٦/۲±۰/۲^{b}	۱۰/۸±۰/۳^{a}	۹/۸±۰/۵^{a}
لیستریا مونوسایتوژنز	٦/۳±۰/۳^{b}	۵/۹±۰/۲^{b}	۱۱/۱±۱/۲^{a}	۱۰/٦±۰/۹^{a}

حروف متفاوت در هر ردیف نشان‌دهنده اختلاف معناداری بین تیمارها است (P<۰/۰۵).

در جدول ۳ حداقل غلظت بازدارندگی رشد (MIC) موکوس فیل ماهیان جوان تغذیه شده با سطوح مختلف گروبیوتیک در برابر باکتری‌های شایع بیماریزا آمده است. حداقل غلظت ممانعت کننده رشد موکوس پوست علیه سویه‌های باکتریایی منتخب بین ۲۵ تا ۲۵۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر بود. بیش‌ترین فعالیت ضدباکتریایی موکوس فیل ماهی علیه باکتری یرسینیا راکری مشاهده شد، این در حالی است که استرپتوکوکوس اینیایی بیش‌ترین مقاومت را نشان داد. نتایج این بررسی نشان داد که با افزایش غلظت گروبیوتیک فعالیت ضدباکتریایی موکوس فیل ماهیان جوان نیز افزایش یافت.

جدول ۳- حداقل غلظت بازدارندگی رشد (MIC) موکوس فیل ماهیان جوان تغذیه شده با سطوح مختلف گروبیوتیک در برابر باکتری‌های مورد مطالعه

تیمار (میکرولیتر در میلی‌لیتر) / باکتری	شاهد	گروبیوتیک ۰/۵٪	گروبیوتیک ۱٪	گروبیوتیک ۲٪
استرپتوکوکوس اینیایی	۲۵۰	۲۵۰	۲۰۰	۱۵۰
یرسینیا راکری	۷۵	۷۵	۵۰	۲۵
اشریشیاکلای	۱۰۰	۷۵	۵۰	۷۵
لیستریا مونوسایتوژنز	۱۲۵	۱۰۰	۱۰۰	۷۵

حروف متفاوت در هر ردیف نشان‌دهنده اختلاف معناداری بین تیمارها است (P<۰/۰۵).

نتایج حاصله از تعیین میزان پروتئین محلول و فعالیت آنزیم آلکالین فسفاتاز قلیایی موکوس فیل ماهیان جوان تغذیه شده با سطوح مختلف (جدول ٤) نشان‌دهنده افزایش معنادار میزان پروتئین محلول و فعالیت آنزیم آلکالین فسفاتاز قلیایی در تیمارهای گروبیوتیک در مقایسه با تیمار شاهد است (P<۰/۰۵)، به‌طوری‌که همزمان با افزایش غلظت پربیوتیک مصرفی میزان شاخص‌های مورد مطالعه نیز روندی افزایشی داشت و بیش‌ترین میزان پروتئین محلول و فعالیت آنزیم آلکالین فسفاتاز قلیایی موکوس در تیمار دو درصد گروبیوتیک مشاهده شد.

جدول ٤- میزان پروتئین محلول و فعالیت آنزیم آلکالین فسفاتاز قلیایی موکوس فیل ماهیان جوان تغذیه شده با سطوح مختلف گروبیوتیک (میانگین ± انحراف معیار)

شاخص	شاهد	گروبیوتیک ۰/۵٪	گروبیوتیک ۱٪	گروبیوتیک ۲ ٪
پروتئین محلول (mg/l)	۱/۳۸±۰/۰٦^{b}	۱/۳٤±۰/۰۷^{b}	۱/٤۳±۰/۰۹^{b}	۱/٥٦±۰/۱۱^{a}
آنزیم آلکالین فسفاتاز قلیایی (IU/l)	۲٤/۱±۲/۷^{b}	۲٦/۹±۳/٦^{b}	۳۳/۸±٤/٥^{a}	۳٦/۳±٤/۸^{a}

حروف متفاوت در هر ردیف نشان‌دهنده اختلاف معناداری بین تیمارها است (P<۰/۰۵).

بحث

پربیوتیک‌ها از جمله محرک‌های سیستم ایمنی هستند که بر سیستم ایمنی ماهیان تاثیرگذار بوده و موجب فعال شدن سلول‌های موثر در ایمنی می‌شوند که از آن جمله اثرات احتمالی آن افزایش فعالیت سلولهای ماکروفاژی، افزایش تعداد سلول‌های فاگوسیتوز کننده (نوتروفیل‌ها و مونوسیت‌ها)، افزایش تعداد لنفوسیت‌ها و ایمونوگلبولین‌های سرم و افزایش فعالیت لیزوزیم سرم و موکوس می‌باشد. استفاده از این مواد ابزار مؤثری به منظور افزایش شاخص‌های رشد، ظرفیت سیستم ایمنی و مقاومت ماهی در برابر بیماری‌های شایع بوده و تحقیق در مورد استفاده از این مکمل‌ها روندی رو به رشدی دارد (حسینی‌فر و ماهیوس، ۲۰۰۷).

اپیتلیوم پوست جز اولین خطوط دفاعی ماهی در مقابل هجوم عوامل بیماریزا می‌باشد. اپیتلیال ماهی به وسیله لایه موکوسی که توسط سلول‌های گلابی شکل ترشح می‌شود، پوشیده می‌شود. لایه موکوسی متشکل از گلیکوپروتئین‌ها، پروتئوگلیکان‌ها و پروتئین‌ها می‌باشد که یک لایه دفاعی را بین بدن ماهی و محیط خارجی ایجاد می‌کند (آستین و مک اینتوش، ۱۹۸۸). مهم‌ترین عمل موکوس ممانعت از چسبیدن و تثبیت باکتری‌ها، قارچ‌ها و انگل‌ها به سطوح اپیتلیالی ماهی و افزایش قدرت دفاعی میزبان در برابر این عوامل مهاجم می‌باشد (استبان، ۲۰۱۲).

نتایج مطالعه حاضر نشان‌دهنده افزایش قدرت ضدباکتریایی موکوس فیل ماهیان جوان به دنبال به کارگیری سطوح مختلف گروبیوتیک به ویژه در سطح ۲درصد در جیره غذایی می‌باشد. نتایج مشابهی نیز به هنگام استفاده از گونه‌های مختلف لاکتوباسیلوس در ماهی سیم دریایی (کارناویل و همکاران، ۲۰۰٦) و هیبرید تیلاپیا (لی و همکاران، ۲۰۱۲) گزارش شده است. در مطالعات روستا و همکاران (۲۰۱٤) متعاقب افزایش غلظت لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس در ماهی تایگر بارب، در بررسی حسینی‌فر و همکاران (۲۰۱٤) بدنبال تجویز پربیوتیک زایلوالیگوساکارید در ماهی سفید و در مطالعه شیخ‌زاده و همکاران (a۲۰۱۲) به دنبال مصرف پربیوتیک ساکارومایسز سرویزیه در ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان افزایش معناداری در فعالیت موکوس این ماهیان مشاهده شد، که با این مطالعه همسو می‌باشد. در مطالعه حاضر بیش‌ترین قدرت ضد باکتریایی موکوس فیل ماهیان متعاقب مصرف غلظت ۲درصد گروبیوتیک بر روی باکتری یرسینیا راکری با قطر هاله مهار رشد ۱۲/۳±۰/٦ سانتی‌متر مشاهده شد، این در حالی است که در مطالعه روستا و همکاران (۲۰۱٤)، بیشترین هاله عدم رشد به دنبال استفاده از غلظت $۳×۱۰^{۷}$ باکتری لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس در ماهی تایگر بارب بر باکتری اشریشیاکلای مشاهده شد. در مطالعات متعدد صورت گرفته دیگر، اثرات ضد میکروبی وسیع موکوس ماهیانی از قبیل: کپور ماهیان هندی و چینی (بالاسوبرامانیان و همکاران، ۲۰۱۳)، ماهی آزاد (ناوارز و همکاران، ۲۰۱۱) و ماهیان گرمسیری (ونیلا و همکاران، ۲۰۱۱)، با دو روش انتشار در دیسک و تهیه رقت‌های متوالی بر باکتری‌های گرم مثبت و منفی مختلف به اثبات رسیده که با مطالعه حاضر همخوانی دارد. فاکتورهای ضدمیکروبی از قبیل لایزوزیم، آلکالین فسفاتاز، آنزیم‌های پروتئولیتیک و پروتئین‌های کمپلمان از مهم‌ترین عوامل ضدمیکروبی موجود در موکوس هستند که قدرت ضد باکتریایی موکوس بیش‌تر به حضور این عوامل نسبت داده شده است (وی و همکاران، ۲۰۱۰)، دلیل افزایش خاصیت باکتری کشی موکوس فیل ماهیان جوان را بیشتر می‌توان به افزایش فعالیت آلکالین فسفاتاز قلیایی نسبت داد.

آنزیم فسفاتاز قلیایی به‌عنوان یک عامل ضد باکتریایی محسوب می‌شود که با افزایش فعالیت هیدرولیتیکی منجر به افزایش اثرات ضد باکتریایی و مقاومت ماهی در برابر عوامل بیماریزای مختلف می‌گردد (ایگر و ابراهیم، ۱۹۹۰). مطالعه حاضر نشان‌دهنده افزایش معنادار در میزان فعالیت آنزیم آلکالین فسفاتاز قلیایی در تیمارهای مختلف گروبیوتیک در مقایسه با تیمار شاهد است ($P<۰/۰۵$)، به‌طوری‌که همزمان با افزایش غلظت پربیوتیک مصرفی میزان این شاخص نیز روندی افزایشی داشته

است. نتایج مشابهی نیز به دنبال مصرف ارگوسان (با غلظت ۵ گرم در هر کیلوگرم جیره) در ماهی قزل‌آلای رنگین کمان شیخ‌زاده و همکاران (۲۰۱۲b) و لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس در موکوس ماهی تایگر بارب مشاهده شده که متعاقب افزایش غلظت این پروبیوتیک میزان فعالیت آنزیم آلکالین فسفاتاز قلیایی نیز روندی افزایشی داشت.

افزایش سطح پروتین‌های موکوس و سرم به عنوان شاخص مناسبی برای بررسی وضعیت ایمنی غیر اختصاصی ماهیان مطرح می‌باشد. نتایج مطالعه حاضر نشان داد که متعاقب مصرف گروبیوتیک بویژه در سطح ۲ درصد، افزایش معناداری در میزان پروتئین موکوس نسبت به تیمار شاهد مشاهده شد، که نشان‌دهنده بهبود پاسخ دفاعی میزبان می‌باشد. چنین وضعیتی نیز متعاقب مصرف گروبیوتیک در ماهی سفید (یوسفیان و همکاران، ۲۰۱۲)، پربیوتیک ساکارومایسز سرویزیه (شیخ‌زاده و همکاران، ۲۰۱۲a) و لاکتوباسیلوس رامنوس (پانیگراهی و همکاران، ۲۰۰٤) در ماهی قزل‌آلای رنگین کمان و لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس در ماهی تایگر بارب مشاهده شده است (روستا و همکاران، ۲۰۱٤).

در مجموع نتایج حاصل از این مطالعه حاکی از آن است که استفاده از گروبیوتیک به ویژه در سطح ۲ درصد در جیره فیل ماهیان جوان پرورشی منجر به بهبود فعالیت ضد باکتریایی و برخی از شاخص‌های ایمنی موکوس فیل ماهیان جوان پرورشی شده است، بنابراین استفاده از این مکمل خوراکی بعنوان محرک ایمنی در جیره غذایی فیل ماهیان جوان پرورشی به منظور افزایش ایمنی و مقاومت ماهی در برابر عوامل بیماریزا شایع توصیه می‌شود.

سپاسگزاری

نویسندگان مقاله بر خود می‌دانند تا از تلاش‌ها و زحمات مسئولین محترم کارگاه پرورشی ماهیان خاویاری قره برون بویژه جناب آقای مهندس اسلامی و سرکار خانم مهندس خطی تشکر نمایند.

منابع

1. Austin, B. and McIntosh, D. 1988. Natural antibacterial compounds on the surface of rainbow antibacterial compounds on the surface of rainbow trout, *Salmo gairdneri* Richardson. J. Fish Dis. 11: 275-277.
2. Azari, A.H., Hashim, R., Habibi Rezaei, M., Najafpour, Sh., Azari Takami, Gh. and Roohi, A.Gh. 2011. The effects of commercial probiotic and prebiotic usage on growth performance, body composition and digestive enzyme activities in juvenile rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). World Appl. Sci. J.

14: 26-35.
3. Bahmani, M., Kazemi, R. and Donskaya, P. 2001. A comparative study of some hematological features in young reared sturgeon. Fish Physiol. Biochem. 24: 135-140.
4. Balasubramanian, S., Gunasekaran, G., Baby Rani, P., Arul Prakash, A., Prakash, M. and Senthil Raja, J.A.P. 2013. A study on the antifungal properties of skin mucus from selected fresh water fishes. Golden Res Thought. 2(9): 23-29.
5. Carnaveli, O., De Vivo, L., Sulpizio, R., Gioacchini, G., Olivotto, I., Silvi, S. and Cresci, A. 2006. Growth improvement by probiotic in European Sea bass juveniles (*Dicentrarchus labrax*) with particular attention to IGF-l, myostatin and cortisol gene expression. Aquaculture. 258: 430-438.
6. Esteban, M.A. 2012. An overview of the immunological defenses in fish skin. Fish Immunol. 1: 1-29.
7. Gibson, G.R. and Roberfroid, M.B. 1995. Dietary modulation of the human colonic microbiota: Introducing the concept of prebiotics. J. Nut. 125: 1401-1412.
8. Hoseinifar, S.H., Sharifian, M., Vesaghi, M.J., Khalili, M. and Esteban, M.A. 2014. The effects of dietary xylooligosaccharide on mucosal parameters, intestinal microbiota and morphology and growth performance of Caspian white fish (*Rutilus frisii kutum*) fry. Fish Shellfish Immunology. 39: 231-236.
9. Hosseinifar, S.H. and Mahious, A.S. 2007. Probiotics, prebiotics and synbiotics in aquaculture: A review. Proceeding of the First International Training Course on fish Nutrition and disease. Ghaemshahr, Iran.
10. Iger, Y. and Abraham, M. 1990. The process of skin healing in experimentally wounded carp. J. Fish Biol. 36: 421-437.
11. Lee, J.S., Cheng, H., Damte, D., Lee, S.J., Kim, J.C., Rhee, M.H., Suh, J.W. and Park, S.C. 2012. 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 Immunol. 34(3): 756-61.
12. Li, P. and Gatlin III, D.M. 2005. Evaluation of the prebiotic GroBiotic®-A and brewer's yeast as dietary supplements for sub-adult hybrid striped bass (*Moronechrysops M.saxatilis*) challenged in situ with *Mycobacterium marinum*. Aquaculture. 248:197-205.
13. Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.L. and Randall, R.J. 1951. Protein measurement with the folin phenol reagent. J. Biol. Chem. 193: 265-275.
14. Narvaez, E., Berendsen, J., Guzman, F., Gallardo, G.A. and Mercado, L. 2011. An immunological method for quantifying antibacterial activity in *Salmo salar* (Linnaeus, 1758) skin mucus. Fish Shellfish Immunol. 28: 235-239.
15. Panigrahi, A., Kiron, V., Kobayashi, T., Puangkaew, J., Satoh, H. and Sugita, H. 2004. Immune responses in rainbow trout (*oncorhynchus mykiss*) induced by a potential probiotic bacteria (*Lactobacillus rhamnosus*). Vet Immunol

Immunopathol. 102: 379-388.
16. Ringø, E, Olsen, R.E., Tø, G., Dalmo, R.A., Amlund, H., Hemre, G. and Bakke, A.M. 2010. Prebiotics in aquaculture: a review. Aquaclture Nutri. 16: 117-136.
17. Roosta, Z., Hajimoradloo, A., Hoseinifar, S.H. and Vakili, F. 2014. Effect of different level of *Lactobacillus acidophilus* on antimicrobial and some immuno-mucosal parameters of tiger fish (*Puntius tetrazona*). J. Aqua Ecology. 3(2): 13-20.
18. Sanchooli, O., Hajimoradloo A. and Ghorbani, R. 2012. Measurement of alkaline phosphatase and lysozyme enzymes in epidermal mucus of different weights of *Cyprinus carpio.* World J. Fish Marine Sci. 4(5): 521-524.
19. Savolainen, L.C. and Gatlin III, D.M. 2009. Evaluation of dairy-yeast prebiotic supplementation in the diet of juvenile goldfish in the presence or absence of phytoplankton and zooplankton. J. Aqua Anim. Health. 21: 156-163.
20. Sheikhzadeh, N., Heidarieh, M., Karimi Pashaki, A., Nofouzi, K., Ahrab Farshbafi, M. and Akbari, M. 2012a. Hilyses, Fermented *Saccharomyces cerevisiae*, enhances the growth performance and skin non-specific immune parameters in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). Fish Shellfish Immunol. 32: 407-410.
21. Sheikhzadeh, N., Heidarieh, M., Karimi Pashaki, A., Nofouzi, K., Ahrab Farshbafi, M. and Akbari, M. 2012b. Effects of dietary Ergosan on cutaneous mucosal immuno responsein rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). Fish Shellfish Immunol. 32: 1083-1087.
22. Soltani, M., Ghodratnama, M., Taheri Mirghaed, A., Zargar, A. and Rooholahi, Sh. 2013. The effect of *Zataria multiflora* Boiss and *Rosmarinus officinalis* essential oil on *Streptococcus iniae* isolated from Rainbow trout farms. J. Vet Microb. 9(1): 1-11.
23. Vennila, R., Kummar, K.R., Kanchana, Sh., Arumugam, M., Vijayalakshmi, Sh. and Balasubramaniam, T. 2011. Preliminary investigation on antimicrobial and proteolytic property of the epidermal mucus secretion of marine stingray. Asian Pacific J. Tropic Bio. 1(2): 239-243.
24. Wei, O.Y., Xavier, R. and Marimuthu, K. 2010. Screening of antibacterial activity of mucus extract of Snakehead fish, *Channa striatus* (Bloch). Eur Rev Med Pharmacol. Sci. 14: 675-681.
25. Yousefian, M., Hedayatifard, M., Fahimi, Sh., Shikholeslami, M., Irani, M. and Amirinia, C. 2012. Effect of prebiotic supplementation on growth performance and serum biochemical parameters of Kutum (*Rutilus frisii kutum*) fries. Asian J. Anim. Vet. Advanc. 7(8): 684-692.