"مقاله پژوهشی"

اثر ریزپوشانی باکتری *لاکتوباسیلوس رامنوسوس* (*Lactobacillus rhamnosus*) به روش امولسیون داخلی با آلژینات/کیتوزان بر روی برخی از شاخص‌های ایمنی قزل‌آلای رنگین‌کمان (*Oncorhynchus mykiss*)

سیدعبدالحمید حسینی[1*]، پریتا کوچنین[2]، مجتبی علیشاهی[3]، تکاور محمدیان[3]، محمد ذاکری[2]

۱- مرکز تحقیقات ژنتیک و اصلاح نژاد ماهیان سردابی شهید مطهری، مؤسسه تحقیقات علوم شیلاتی کشور، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، یاسوج، ایران

۲- گروه شیلات، دانشکده منابع طبیعی دریا، دانشگاه علوم و فنون دریایی خرمشهر، خرمشهر، ایران

۳- گروه علوم درمانگاهی، دانشکده دامپزشکی دانشگاه شهید چمران اهواز، اهواز، ایران

تاریخ دریافت: ۱۴۰۲/۱۰/۱۸ تاریخ پذیرش: ۱۴۰۲/۱۲/۱۵

چکیده

استفاده از پروبیوتیک ها در آبزی پروری به دلیل اثرات مفید در سلامت ماهی رشد فزآینده ای داشته است. یکی از مشکلات اصلی استفاده از پروبیوتیک ها غیرفعال شدن آنها در شرایط معدی – روده ای ماهی است، محافظت پروبیوتیک ها با پوشش های فیزیکی توان پروبیوتیکی آنها را بهبود می‌بخشد. لذا در این تحقیق اثر باکتری پروبیوتیکی *لاکتوباسیلوس رامنوسوس* (*Lactobacillus rhamnosus*) ریزپوشانی شده به روش امولسیون داخلی بر روی برخی از شاخص‌های ایمنی قزل‌آلای رنگین‌کمان (*Oncorhynchus mykiss*) مورد بررسی قرارگرفت. بدین منظور تعداد ۴۸۰ قطعه بچه ماهی قزل‌آلا با میانگین وزنی ۰/۸۲±۲۵/۵۳ گرم به چهار تیمار *لاکتوباسیلوس رامنوسوس* ریزپوشانی شده به روش امولسیون داخلی، آلژینات همراه با کیتوزان بدون حضور لاکتوباسیلوس رامنوسوس، *لاکتوباسیلوس رامنوسوس* به تنهایی و شاهد بدون افزودنی پروبیوتیکی تقسیم شدند. ماهیان به مدت ۶۰ روز با جیره های آزمایشی تغذیه شده و پس از اتمام دوره آزمایش، تیمارها به مدت ۱۵ روز با غذای فاقد پروبیوتیک غذادهی شدند. نمونه گیری از ماهیان در روزهای ۳۰، ۶۰ و ۷۵ تحقیق انجام و برخی فاکتورهای ایمنی از جمله لایزوزیم سرم، میزان فعالیت کمپلمان، پروتئین کل، آلبومین، گلوبولین و قدرت احیاء اندازه‌گیری شد. نتایج حاکی از افزایش میزان فعالیت لایزوزیم در تیمار ریزپوشانی شده به روش امولسیون داخلی در روز ۳۰ و ۶۰ آزمایش نسبت به سایر تیمارها بود. همچنین بیشترین میزان پروتئین کل و گلوبولین در روز ۳۰ آزمایش در تیمارهای ریزپوشانی شده به روش امولسیون داخلی و آلژینات/کیتوزان نسبت به سایر تیمارها و در روز ۶۰ آزمایش نیز این مقادیر در تیمارهای مذکور نسبت به تیمار شاهد دارای اختلاف معنی‌دار بود ($p<0.05$). نتایج این تحقیق نشان داد ریزپوشانی پروبیوتیک *لاکتوباسیلوس رامنوسوس* به روش امولسیون داخلی باعث بهبود برخی از شاخص‌های ایمنی ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان در مقایسه با تیمار پروبیوتیک بدون ریزپوشانی بوده و می‌تواند به عنوان یک روش موثر بهبود کارایی پروبیوتیک استفاده شود.

واژه‌های کلیدی: ریزپوشانی، *لاکتوباسیلوس رامنوسوس*، آلژینات/کیتوزان، قزل‌آلای رنگین‌کمان، شاخص‌های ایمنی

* عهده‌دار مکاتبات: hoseiniabdolhamid@gmail.com

[Downloaded from aqudev.liau.ac.ir on 2024-07-27]

مقدمه

به دلیل شرایط بوم شناختی و سازگاری با شرایط زیست محیطی و رشد سریع، قزل‌آلای رنگین‌کمان یکی از مهمترین گونه‌های پرورشی در ایران است (راستیان نسب و همکاران، ۱۳۹۶). این ماهی از اهمیت بسیار زیادی در سیاست‌گذاری‌ها و برنامه‌ریزی‌های تحقیقاتی و اجرایی برخوردار می باشد (قربانزاده و نظری، ۱۳۹۶). ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان (*Oncorhynchus mykiss*) با تولیدی به میزان ۱۷۳۳۸۴ تن نقش مهمی در تأمین پروتئین کشور ایفا می‌کند (سالنامه آماری شیلات ایران، ۱۳۹۸). در بیان اهمیت جایگاه پرورش ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان ذکر این نکته ضروری است که از ۸۴۸ هزار تن تولید این ماهی در دنیا، کشور ما دارای جایگاه نخست تولید این ماهی می‌باشد (FAO, 2020). بنابراین توجه به این صنعت از نظر جلوگیری از شیوع و بروز انواع بیماری‌ها ضروری به نظر می‌رسد. زیرا پرورش آبزیان مستعد شیوع بیماری بوده (Masoomi dezfooli *et al*., 2018) و بدلیل شیوع انواع بیماری های ویروسی و باکتریایی با مشکل مواجه شده است، در مواردی حتی استفاده از انواع روشهای درمانی نیز ثمربخش نبوده است (Soltani *et al*., 2014). به عبارتی روش اساسی در مدیریت بهداشتی آبزیان باید بیشتر بر اتخاذ تدابیر پیشگیرانه استوار باشد تا کنترل یا درمان بیماری ها، زیرا این راهبرد از نظر اقتصادی مقرون به صرفه‌تر است (علیشاهی، ۱۳۸۸). در همین راستا استفاده از مواد شیمیایی و آنتی‌بیوتیک‌ها در آبزی پروری امری متداول می باشد. اما چنین مواد شیمیایی ممکن است اثرات جدی زیست محیطی داشته و آنتی بیوتیک ها نیز منجر به مقاومت در بسیاری از گونه‌ها گردند (Masoomi dezfooli *et al*., 2018). همچنین باقیمانده آنتی بیوتیک‌ها در فرآورده‌های آبزیان باعث مشکلات بهداشتی در مصرف کننده نهایی یعنی انسان نیز می‌گردد (Caruso *et al*., 2013).

با در نظر گرفتن عوارض جانبی آنتی بیوتیک‌ها، استفاده از رویکردهای غیر دارویی برای کنترل و پیشگیری از بیماری‌ها در دراز مدت در صنعت آبزی‌پروری می‌توانند سود مند باشد. از سویی، رویکردهای غیر دارویی سازگار با محیط زیست هستند و همچنین می‌توانند برای سلامتی انسان نیز مفید باشند. از جمله رویکردهای غیر دارویی که به منظور پیشگیری و کنترل بیماری ا استفاده می‌شوند، می‌توان به محرک‌های ایمنی اشاره کرد (Wang *et al*., 2017).

بنابراین به دلیل تاثیرات منفی آنتی بیوتیک‌ها و مواد شیمیایی بر روی میزبان و محیط، دنیا تمایل دارد تا استفاده از آنها را کاهش دهد. به همین منظور در آبزی‌پروری مدرن بیشتر بر روی استفاده از پروبیوتیک‌ها تاکید شده است (Silva *et al*., 2017). این راه حل در چند سال گذشته بیشتر مورد توجه پژوهشگران و پرورش دهندگان ماهی قرارگرفته است (Hoseinifar *et al*., 2015). استفاده از محرک‌های ایمنی مانند پروبیوتیک‌ها به عنوان یک روش امیدوار کننده در فرآیند پیشگیری و کنترل بیماری محسوب می شود، که می‌تواند به حفظ شرایط بهینه ماهی کمک کرده در حالیکه تولید بیشتر و افزایش سود را نیز به دنبال داشته باشد (Bahi *et al*., 2017). از طرف دیگر توسعه پایدار آبزی پروری نیازمند به کارگیری فنون جدیدی مانند استفاده از پروبیوتیکها جهت دستیابی به اهدافی نظیر بهینه سازی فاکتورهای فیزیکی و شیمیایی

[Downloaded from aqudev.liau.ac.ir on 2024-07-27]

آب محیط پرورش آبزیان و ارتقاء عملکرد آبزیان می‌باشد (محمودی کیا و ایمانی، ۱۳۹۷).

پروبیوتیک‌ها به طور موثر باعث افزایش سرعت رشد، ایمنی و بهبود سلامت عمومی و میزان بقای گونه های آبزی می‌گردند (Hadi *et al*., 2014; Hai, 2015). که این کار را از طریق موادی نظیر ترکیبات بازدارنده، رقابت بر سر مواد شیمیایی و مکان های اتصال و تحریک و تقویت سیستم ایمنی انجام می‌دهند (Andani *et al*., 2012). امروزه تمایل به مصرف ترکیباتی نظیر پروبیوتیک ها در حال افزایش است (Ringo *et al*., 2014)، تا بتوان تولیدی پربازده و پایدارتر با استفاده از مواد طبیعی و بدون استفاده از مواد شیمیایی عرضه نمود (Liu *et al*., 2013).

اثربخشی استفاده از پروبیوتیک‌ها گرچه در محیط‌های کشت به اثبات رسیده است، اما انتقال موثر مواد فعال زیستی همچنان یک چالش است (Masoomi dezfooli *et al*., 2018). بنابراین به منظور حفظ پروبیوتیک‌ها در مراحل آماده سازی، ذخیره سازی و مصرف، می‌بایست آماده سازی و انتقال آنها به نحو مناسبی انجام گیرد (Chavarri *et al*., 2012). زیرا آنها به دلیل حساسیت به شرایط مختلف نظیر دمای بالا، شرایط اسیدی، نمکهای صفراوی موجود در دستگاه گوارش، باکتریوفاژها، مواد مضر آنتی‌بیوتیکی نیاز به روشهایی برای افزایش قابلیت زیستی دارند تا بتوانند به تعداد کافی توسط پوششی عمدتاً با خصوصیات هیدروکلوییدی به محیط روده راه یابند و در آنجا اثرات سودمند خود را ایفا کنند (Tripathi *et al*., 2014). روشهای مختلف محافظت پروبیوتیک در شرایط نامناسب گوارشی گزارش شده است (Masoomi dezfooli *et al*., 2018). ریزپوشانی، به طور موفقیت آمیزی برای حفاظت سلولهای پروبیوتیک در شرایط ذکر شده مؤثر بوده (Tripathi *et al*., 2014) و به عنوان یکی از بهترین تکنیک‌ها جهت حفاظت از پروبیوتیک ها در برابر شرایط نامساعد محیطی مطرح می‌باشد (Dong *et al*., 2013). ریزپوشانی در مورد پروبیوتیک‌ها فرآیندی است که توسط آن پروبیوتیک‌ها توسط پوششی عمدتاً با خصوصیات هیدروکلوییدی به دام انداخته می‌شوند که در نتیجه پروبیوتیک‌ها از شرایط نامساعد محیطی تا زمانی که به روده برسند دور نگه داشته می‌شوند. این عمل از پروبیوتیک‌ها در برابر شرایطی مثل pH پایین، اسیدیته بالا، نمک‌های صفراوی، شوک‌های گرمایی، باکتریوفاژها، مواد مضر آنتی‌بیوتیکی محافظت می‌کند. همچنین می‌تواند باعث افزایش پایداری و توزیع متوازن پروبیوتیک‌ها شود. از ترکیبات مختلفی برای پوشش پروبیوتیک‌ها استفاده می‌شود که رایج‌ترین آن‌ها عبارتند از: آلژینات‌ها، گزانتان، ژلان، کاراجینان، ژلاتین، سلولز، کیتوزان،... این پوشش ها تحت شرایط ویژه‌ای مثل دما، پی اچ، فشار و ... محتویات خود را رها می‌کنند (Rokka & Rantamaki, 2010; Mortazavian *et al*, 2007). Lukman و همکاران (۲۰۱۵) به بررسی کاربرد پروبیوتیک ریزپوشانی شده با باسیلوس NP5 و پربیوتیک الیگوساکارید و همچنین اثرات سین بیوتیک آنها در مواجهه تیلاپیای نیل با بیماری استرپتوکوکوزیس پرداختند. همچنین یک چالش باکتریایی انجام شده در قزل‌آلای رنگین‌کمان تغذیه شده با پروبیوتیک ریزپوشانی شده نشان داد که درصد مرگ و میر تجمعی در ماهیان تغذیه شده با پروبیوتیک ریزپوشانی شده بعد از ۲۸ روز کمتر از گروه کنترل می باشد (Ghosh *et al*., 2016). در

[Downloaded from aqudev.liau.ac.ir on 2024-07-27]

مطالعه حسینی (۱۳۹۶) استفاده از پروبیوتیک ریزپوشانی شده به طور معنی داری سبب بهبود شاخصهای ایمنی غیراختصاصی اعم از فعالیت کمپلمان، لایزوزیم، قدرت باکتری کشی سرم و ایمنوگلوبین در تیمارهای ریزپوشانی شده نسبت به تیمار شاهد گردید.

بنابراین با توجه به اهمیت استفاده بهینه از پروبیوتیک ها در آبزی پروری، تحقیق حاضر با هدف ارزیابی اثر ریزپوشانی پروبیوتیک *لاکتوباسیلوس رامنوسوس* با ریزذرات آلژینات/کیتوزان بر شاخصهای ایمنی ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان انجام گرفت.

مواد و روش‌ها

تهیه باکتری پروبیوتیک

در این تحقیق از باکتری پروبیوتیک *لاکتوباسیلوس رامنوسوس* جداسازی شده از روده ماهی شیربت (*Barbus grypus*) استفاده‌گردید. این باکتری با استفاده از ژن 16S rRNA توسط محمدیان و همکاران (۱۳۹۲) جداسازی و شناسایی شد و با توالی یابی ژن مورد نظر تشخیص جنس و گونه باکتری تایید گردید. باکتری موردنظر در ۲۰ میلی‌لیتر محیط کشت MRS آگار در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد به مدت ۴۸ ساعت در شرایط بی‌هوازی کشت اولیه گردید. سپس با رشد کلونی های باکتریایی تک، یک کلونی خالص به محیط کشت MRS Broth به مدت ۴۸ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد و در شرایط بی هوازی و در انکوباتور کشت داده شد. پس از رشد، نمونه ها با سرم فیزیولوژی استریل شستشو داده شده و با دور ۱۵۰۰ rpm به مدت ۱۵ دقیقه سانتریفیوژ شد. رسوب حاصله در سرم فیزیولوژی استریل به صورت سوسپانسیون درآمد و بر اساس استاندارد مک فارلند با غلظت $۱۰^{۹}$ × ۲/۴ باکتری زنده در هر میلی‌لیتر تنظیم شدند.

ریزپوشانی به روش امولسیون داخلی (Internal emulsification):

بر اساس روش Huiyi و همکاران (۲۰۱۳) ابتدا ۵ گرم پودر کربنات کلسیم به ۱۰۰ میلی‌لیتر آب مقطر اضافه و به مدت ۱۵ دقیقه سونیکه شد. مقدار ۷ میلی‌لیتر سوسپانسیون کربنات کلسیم به ۱۱۰ میلی‌لیتر محلول آلژینات ۲ ٪ بر روی دستگاه هم زن مغناطیسی با دور ۲۰۰ rpm در حال گردش اضافه و به مدت ۳۰ دقیقه هموژن گردید. ۱۰۰ میلی‌لیتر از محلول حاصل با ۵۰ میلی‌لیتر سوسپانسیون میکروبی با غلظت ۱×۱۰^{۱۰} مخلوط و به مدت ۱۵ دقیقه با همزن با دور ۳۵۰ rpm هموژن گردید. در بشر دیگر مقدار ۷۰ میلی‌لیتر روغن زیتون با ۱ گرم اسپن ۸۰ مخلوط و به مدت ۵ دقیقه با دور ۱۰۰ rpm هم زده شد، سپس محلول حاصل با محلول بالا مخلوط و به مدت ۱۵ دقیقه با همزن آزمایشگاهی هموژن گردید. ۲۰ میلی‌لیتر روغن زیتون و ۱ میلی‌لیتر اسید استیک با هم مخلوط و قطره قطره به محلول فوق اضافه گردید. به نحوی که pH به حدود ۳/۵ رسید. سپس ۳۰ دقیقه با دور ۲۰۰ rpm هم زده شد. سپس جهت جداسازی روغن، با استفاده از بافر فسفات محلول حاصل به مدت ۵ دقیقه با دور ۱۰۰ rpm سانتریفیوژگردید. در مرحله نهایی میزان ۳۰ میلی‌لیتر محلول کیتوزان ۴٪ در اسید استیک ۱٪ به مدت ۳۰ دقیقه قطره قطره با دور ۸۰۰ rpm به محلول اضافه گردید. سپس محلول حاصل به مدت ۱ ساعت در حال چرخش گذاشته شد تا هم زده شود. محصول در

[Downloaded from aqudev.liau.ac.ir on 2024-07-27]

یخچال ۴ درجه سانتی‌گراد تا زمان مخلوط نمودن به خوراک نگهداری گردید.

محل انجام آزمایش

این تحقیق به مدت سه ماه با پرورش ماهیان تیمارهای مختلف در مرکز تحقیقات ژنتیک و اصلاح نژاد ماهیان سردآبی شهید مطهری یاسوج در ۱۲ عدد مخزن فایبرگلاس با گنجایش ۲۰۰۰ لیتر همراه با شرایط محیطی کنترل شده و یکسان انجام پذیرفت. تأمین آب از طریق چشمه با میانگین دمای ۰/۷ ± ۱۱/۵ درجه سانتی‌گراد، اکسیژن ۰/۴± ۷ میلی‌گرم در لیتر، سختی ۲۲±۲۵۰ میلی‌گرم در لیتر و میزان pH برابر با ۰/۲± ۷/۸ و تعویض آب مخازن (جریان آب) به صورت ثقلی انجام شد.

تیماربندی ماهیان

برای این‌کار تعداد ۴۸۰ قطعه بچه ماهی با میانگین وزنی ۲۵/۵۳±/۸۲ گرم (انحراف معیار± میانگین) از مزرعه پرورشی واقع در شهرستان بویراحمد تهیه و بعد از انتقال به مرکز تحقیقات ماهیان سردآبی شهید مطهری به مدت ۲ هفته آداپتاسیون ماهیان با شرایط جدید انجام گرفت. ماهیان به صورت تصادفی به ۴ گروه در سه تکرار تقسیم، و به شرح زیر پرورش یافتند (جدول۱). جهت آماده سازی باکتری *لاکتوباسیلوس رامنوسوس* و افزودن آن‌ها به غذای ماهیان از روش توصیه شده توسط Planas و همکاران (۲۰۰۴) و Vine و همکاران (۲۰۰۶) استفاده گردید. به این منظور باکتری لاکتوباسیلوس رامنوسوس در محیط آبگوشت در شرایط بی‌هوازی کشت داده شد. پس از رشد، باکتری‌ها با سانتریفوژ جداسازی و شستشو شده و به کمک لوله‌های استاندارد مک فارلند ۸ ($۲/۴\times ۱۰^{۸}$) تنظیم گردید. بعد از ریزپوشانی باکتری‌ها، از آنها برای ایجاد غلظت ۵×۱۰^{۷} باکتری در گرم خوراک ماهی‌ها استفاده شد. در این مرحله *لاکتوباسیلوس رامنوسوس* ریزپوشانی شده به روش امولسیون داخلی، آلژینات و کیتوزان، باکتری به تنهایی و سرم فیزیولوژی به عنوان تیمارهای مورد آزمایش بر روی غذای محاسبه شده برای هر تیمار (بر اساس وزن، درجه حرارت) اسپری گردیدند.

جدول ۱: تیمارهای آزمایشی

تیمار	نوع غذا	تعداد ماهی
۱	همراه با لاکتوباسیلوس رامنوسوس ریزپوشانی شده به روش امولسیون داخلی	۱۲۰ قطعه (در سه تکرار)
۲	آلژینات / کیتوزان بدون حضور لاکتوباسیلوس رامنوسوس	۱۲۰ قطعه (در سه تکرار)
۳	همراه با لاکتوباسیلوس رامنوسوس به تنهایی	۱۲۰ قطعه (در سه تکرار)
شاهد	بدون مکمل پروبیوتیکی	۱۲۰قطعه (در سه تکرار)

[Downloaded from aqudev.liau.ac.ir on 2024-07-27]

تغذیه ماهیان براساس بیوماس و درجه حرارت آب و طبق توصیه کارخانه سازنده خوراک به مدت ۶۰ روز صورت گرفت (جدول ۲). جهت بررسی ماندگاری باکتری و تأثیر آن روی سیستم ایمنی بدن میزبان، غذادهی نیمی از هر گروه از ماهیان، به منظور بررسی ارزیابی مدت ماندگاری اثر پروبیوتیک‌های ریز پوشانی شده، از روز ۶۰ تا ۷۵ (پایان دوره) با جیره‌ی بدون مکمل پروبیوتیکی ادامه پیدا کرد. نمونه‌گیری در روزهای ۳۰، ۶۰ و ۷۵ انجام گرفت. بعد از خونگیری از ماهی‌ها، پلاسمای خون با سانتریفیوژ به مدت ۱۰ دقیقه در ۳۰۰۰ دور انجام شد.

جدول۲- آنالیز ترکیبات جیره مورد استفاده در آزمایش، تهیه شده از شرکت ۲۱ بیضاء

نوع جیره	اندازه (mm)	فسفر (حداقل)	رطوبت (حداکثر)	انرژی (Kcal/kg)	فیبر خام (حداکثر)	چربی خام	پروتئین خام
Ex-TG2	۳/۳-۲/۴	۰/۸	۱۰٪	۴۳۰۰	۲٪/۲	۱۴٪/۵	۴۴٪

ارزیابی تأثیر درون‌تنی (In vivo) ریزپوشانی پروبیوتیک *لاکتوباسیلوس رامنوسوس* بر سیستم ایمنی

به منظور ارزیابی اثر پروبیوتیک ریزپوشانی شده بر سیستم کمپلمان، میزان لیزوزیم سرم، انفجار تنفسی (NBT)، میزان پروتئین کل و گلوبولین سرم از تعداد ۴ قطعه ماهی از هر تکرار در روزهای صفر، ۳۰ و ۶۰ روز پس از تغذیه با پروبیوتیک و روز ۷۵ (۱۵ روز پس از قطع مصرف پروبیوتیک) خون‌گیری و جداسازی سرم صورت گرفت و جهت آزمایشات ذیل در دمای ۸۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری گردید.

اندازه گیری میزان فعالیت کمپلمان سرم

جهت اندازه‌گیری فعالیت کمپلمان از آزمایش همولیز در ژل آگارز استفاده‌گردید (Brata *et al*, 1993). برای این‌کار ابتدا آگارز ۱/۵٪ در بافر فسفات (pH=۷/۲ حاوی ۰/۵ میلی‌مول کلرید منیزیم و ۱/۵ میلی‌مول کلرید کلسیم) تهیه و مقدار ۱×۱۰^{۸} گلبول قرمز خرگوش شسته شده با بافر فسفات در دمای ۵۵- ۵۰ سانتی‌گراد به آگارز اضافه شد. مخلوط آگارز حاوی گلبول‌های قرمز خرگوش داخل پلیت‌ها توزیع و پلیت‌ها به مدت یک شب در یخچال ۴ درجه سانتی‌گراد قرار داده شدند و سپس حفرات به قطر ۳ میلی‌متر و با فاصله ۲ سانتی‌متر از هم در آگار ایجاد و در هر گوده میزان ۲۰ میکرولیتر از سرم نمونه ریخته شد. پلیت‌ها در محیط مرطوب و دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۴۸ ساعت انکوبه شده و پس از آن قطر هاله لیز گلبولی با خط‌کش مخصوص اندازه‌گیری شد.

اندازه‌گیری لایزوزیم سرم

برای اندازه‌گیری میزان فعالیت لایزوزیم سرم از روش کدورت‌سنجی توصیه شده توسط Ellis (۱۹۹۰) و Nayak (۲۰۱۰)، استفاده‌گردید. برای این‌کار در ابتدا ۱۵ میکرولیتر سرم با ۱۳۵ میکرولیتر از

[Downloaded from aqudev.liau.ac.ir on 2024-07-27]

سوسپانسیون ۰/۲ میلی‌گرم در میلی‌لیتر باکتری *میکروکوکوس لیزوداکتیکوس* (سیگما) در بافر ۰/۰۲ مولار سدیم سیترات (pH=۵/۸) در گوده‌های میکروپلیت تخت مخلوط و جذب نوری آن در دمای اتاق در زمان‌های صفر و ۶ دقیقه بعد از مخلوط‌سازی در طول موج ۴۵۰ نانومتر اندازه‌گیری شد (Nayak, 2010).

اندازه گیری پروتئین کل، گلوبولین پلاسما و غلظت ایمنوگلوبولین تام

غلظت ایمنوگلوبولین کل براساس روش شرح داده شده توسط Nayak (۲۰۱۰) اندازه‌گیری شد. بدین منظور ابتدا پروتئین تام و آلبومین پلاسما با استفاده از کیت شرکت پارس آزمون و دستگاه اتوآنالایزر مدل Eurolyser ساخت کشور اتریش اندازه‌گیری گردید. سپس میزان ایمونوگلوبولین تام سرم از تفریق میزان آلبومین از پروتئین تام پلاسما محاسبه شد.

اندازه‌گیری احیاء NBT (Nitro Blue Tetrazollium):

برای ارزیابی احیاء NBT مقدار ۰/۱ میلی‌لیتر از خون هپارینه در داخل گوده‌های میکروپلیت تخت قرار داده 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 برداشت، و به یک لوله آزمایش حاوی ۲ میلی‌لیتر دی متیل فرمامید اضافه گردید. سپس از نمونه سانتریفوژ، جذب نوری مایع رویی در طول موج ۶۲۰ نانومتر اندازه‌گیری شد (Secombes, 1998).

تجزیه و تحلیل آماری

جهت تجزیه و تحلیل داده‌ها از روش آنالیز واریانس یک طرفه (ANOVA) نرم افزار SPSS استفاده شد. برای بررسی معنی داری بودن تفاوت میانگین ها از پس آزمون دانکن استفاده شد. در تمام بررسی‌ها سطح معنی‌دار آزمون‌ها $p<۰/۰۵$ در نظر گرفته شد. همچنین ترسیم نمودارها در فضای نرم‌افزار Excel انجام گرفت. در پایان نتایج با نرم افزار SPSS مورد مقایسه و تجزیه و تحلیل قرارگرفت.

نتایج

بررسی تجزیه‌وتحلیل آماری داده‌ها نشان داد که تیمارهای آزمایشی بر شاخص تعداد گلبول قرمز خون تأثیر معنی‌داری داشت ($p<۰/۰۵$). به طوری‌که، میزان گلبول قرمز خون در تیمار تغذیه شده با ملاس دو درصد و در تیمارهای حاوی ملاس که در مواجهه با نانو تیتانیوم قرار گرفته بودند، به‌طور معنی‌داری افزایش یافت. میزان گلبول قرمز خون در تیمار تغذیه شده با ملاس نیم و یک درصد و در تیمار نانو تیتانیوم نیز اثر افزایشی داشت. ولی با گروه شاهد معنی‌دار نبود (شکل ۱).

میزان فعالیت کمپلمان در روزهای مختلف در تیمارهای آزمایشی اختلاف معنی داری را نشان نداد ($p>۰/۰۵$)، هر چند افزایش نسبی در میزان فعالیت کمپلمان در روز ۶۰ در تیمار ریزپوشانی شده به روش امولسیون داخلی نسبت به سایر تیمارها مشاهده گردید که این افزایش معنی دار نبود (جدول ۳).

[Downloaded from aqudev.liau.ac.ir on 2024-07-27]

میزان توتال پروتئین در روز ۳۰ در تیمار ریزپوشانی شده به روش امولسیون افزایش معنی داری نسبت به سایر تیمارها نشان داد ($p<۰/۰۵$). همچنین در روز ۶۰ این میزان در تیمار ۱ و ۲ به طور معنی‌داری بیشتر از تیمار شاهد بود ($p<۰/۰۵$). تیمار ۳ نیز علی‌رغم افزایش نسبی، از نظر آماری معنی دار نبود ($p>۰/۰۵$).

با تغذیه از جیره های آزمایشی در روز ۳۰ میزان گلوبولین سرم در تیمارهای ۱ و ۲ به طور معنی داری بیشتر از سایر تیمارها بود. در روز ۶۰ نیز میزان گلوبولین در تیمارهای ۱ و ۲ به طور معنی‌داری بیشتر از تیمار شاهد بود ($p<۰/۰۵$). همچنین تیمارهای مذکور به طور نسبی دارای میزان گلوبولین بیشتری نسبت به تیمار ۳ نشان دادند. میزان آلبومین و قدرت احیاء در بین تیمارهای آزمایشی اختلاف معنی‌داری را نشان نداد (جدول ۳).

جدول ۳: مقایسه شاخص‌های ایمنی در بین تیمارهای آزمایشی در روزهای صفر، ۳۰، ۶۰ و ۷۵ آزمایش

شاخص	تیمار	روز صفر	روز ۳۰	روز ۶۰	روز ۷۵
کمپلمان	T1 (امولسیون داخلی)	۵/۵۰±۱/۱۹^{a}	۵/۶۶±۱/۷۵^{a}	۵/۶۶±۲/۲۵^{a}	۵/۵۰±۱/۶۴^{a}
	T2 (آلژینات/کیتوزان)	۵/۵۰±۱/۱۹^{a}	۵/۱۶±۱/۹۴^{a}	۵/۱۶±۱/۸۳^{a}	۵/۳۳±۲/۱۶^{a}
	T3 (باکتری بدون پوشش)	۵/۵۰±۱/۱۹^{a}	۵/۰۸±۱/۳۵^{a}	۵/۳۳±۲/۱۶^{a}	۵/۵۰±۱/۸۷^{a}
	T4 (شاهد)	۵/۵۰±۱/۱۹^{a}	۵/۳۳±۱/۲۵^{a}	۵/۰۰±۱/۷۸^{a}	۵/۸۳±۱/۹۴^{a}
توتال پروتئین	T1 (امولسیون داخلی)	۵/۲۲±۰/۴۳^{a}	۵/۹۰±۰/۵۷^{a}	۵/۷۰±۰/۲۴^{ab}	۵/۵۷±۰/۶۲^{a}
	T2 (آلژینات/کیتوزان)	۵/۲۲±۰/۴۳^{a}	۵/۹۶±۰/۳۶^{a}	۵/۹۶±۰/۳۸^{a}	۵/۷۱±۰/۸۶^{a}
	T3 (باکتری بدون پوشش)	۵/۲۲±۰/۴۳^{a}	۵/۱۵±۰/۶۳^{b}	۵/۱۹±۰/۲۹^{bc}	۵/۳۰±۰/۴۴^{a}
	T4 (شاهد)	۵/۲۲±۰/۴۳^{a}	۵/۲۰±۰/۲۸^{b}	۵/۰۳±۰/۳۶^{c}	۵/۳۱±۰/۵۷^{a}
آلبومین	T1 (امولسیون داخلی)	۲/۶۹±۰/۲۶^{a}	۲/۸۳±۰/۶۵^{a}	۲/۷۱±۰/۳۳^{a}	۲/۸۰±۰/۶۰^{a}
	T2 (آلژینات/کیتوزان)	۲/۶۹±۰/۲۶^{a}	۲/۸۰±۰/۵۸^{a}	۲/۸۲±۰/۴۲^{a}	۲/۸۰±۰/۴۸^{a}
	T3 (باکتری بدون پوشش)	۲/۶۹±۰/۲۶^{a}	۲/۸۵±۰/۴۳^{a}	۲/۷۴±۰/۲۲^{a}	۲/۸۳±۰/۵۸^{a}
	T4 (شاهد)	۲/۶۹±۰/۲۶^{a}	۲/۸۰±۰/۵۱^{a}	۲/۷۷±۰/۶۱^{a}	۲/۷۱±۰/۳۷^{a}

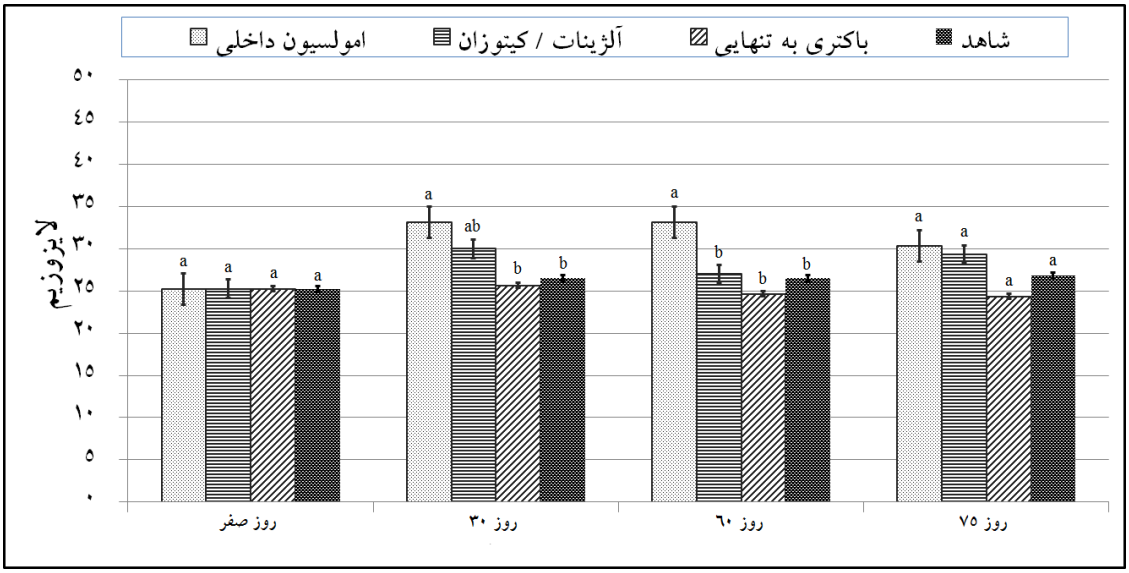
[Downloaded from aqudev.liau.ac.ir on 2024-07-27]

ادامه جدول ۳:

شاخص	تیمار	روز صفر	روز ۳۰	روز ۶۰	روز ۷۵
گلوبولین	T1 (امولسیون داخلی)	۲/۵۲±۰/۳۴^{a}	۳/۰۶ ± ۰/۳۷^{a}	۲/۹۹±۰/۴۴^{a}	۲/۷۷±۰/۳۳^{a}
	T2 (آلژینات/کیتوزان)	۲/۵۲±۰/۳۴^{a}	۳/۱۶ ±۰/۵^{a}	۳/۱۴±۰/۳۸^{a}	۲/۹۱±۰/۴۳^{a}
	T3 (باکتری بدون پوشش)	۲/۵۲±۰/۳۴^{a}	۲/۳۰± ۰/۴۴^{b}	۲/۴۵±۰/۲۲^{ab}	۲/۴۶±۰/۴۹^{a}
	T4 (شاهد)	۲/۵۲±۰/۳۴^{a}	۲/۳۹ ±۰/۴۴^{b}	۲/۲۶±۰/۹۰^{b}	۲/۶۰±۰/۴۲^{a}
NBT	T1 (امولسیون داخلی)	۰/۴۴±۰/۰۹^{a}	۰/۵۴ ± ۰/۰۹^{a}	۰/۵۳±۰/۱۳^{a}	۰/۵۳±۰/۱۲^{a}
	T2 (آلژینات/کیتوزان)	۰/۴۴±۰/۰۹^{a}	۰/۵۲ ± ۰/۱۱^{a}	۰/۴۴±۰/۰۸^{a}	۰/۴۹±۰/۱۵^{a}
	T3 (باکتری بدون پوشش)	۰/۴۴±۰/۰۹^{a}	۰/۴۳ ± ۰/۱^{a}	۰/۴۴±۰/۰۷^{a}	۰/۴۳±۰/۰۸^{a}
	T4 (شاهد)	۰/۴۴±۰/۰۹^{a}	۰/۵۴ ± ۰/۰۶^{a}	۰/۴۴±۰/۰۶^{a}	۰/۴۸±۰/۱۱^{a}

میزان فعالیت لایزوزیم پلاسما در روز ۳۰ آزمایش در تیمار ۱ به طور معنی داری فعالیت بیشتری (۳۳/۱۶±۳/۵۴) نسبت به سایر تیمارها نشان داد (p>۰/۰۵). این در حالی است که فعالیت لایزوزیم در سایر تیمارها تفاوت معنی‌داری با هم نداشت. همچنین تیمار ۲ نیز به طور نسبی دارای فعالیت لایزوزیم بیشتری (۳۰±۵/۸۳) نسبت به تیمارهای ۳ (۲۵/۶۶±۴/۳۶) و ۴ (۲۶/۵±۶/۸۳) بود. در روز ۶۰ تغذیه از جیره‌های آزمایشی نیز میزان لایزوزیم در تیمار ریزپوشانی شده به روش امولسیون داخلی به طور معنی‌داری (۳۳/۱۶±۰/۷۵) بیشتر از سایر تیمارها بود (p>۰/۰۵). با قطع جیره‌های آزمایشی و استفاده از جیره ای معمول، در روز ۷۵ اختلاف معنی‌داری دربین تیمارهای آزمایشی مشاهده نگردید (شکل ۱).

[Downloaded from aqudev.liau.ac.ir on 2024-07-27]



شکل ۱: میزان فعالیت لایزوزیم سرم در تیمارهای آزمایشی در روزهای مختلف

بحث

استفاده از باکتری‌های پروبیوتیک در آبزیان در حال افزایش می‌باشد. اهمیت روزافزون پروبیوتیک‌ها از یک طرف و قابلیت زنده‌مانی اندک این میکروارگانیسم‌ها در حین عبور از دستگاه گوارش عمدتاً به دلیل pH پایین و نمک‌های صفراوی از طرف دیگر، باعث شده تا پژوهشگران همیشه به دنبال راه‌هایی برای افزایش ماندگاری این میکروارگانیسم‌ها باشند (محمدیان و همکاران، ۱۳۹۸). با این حال هنوز نیاز به تحقیقات زیادی در این مورد می‌باشد. به منظور افزایش زنده‌مانی باکتری *لاکتوباسیلوس رامنوسوس* در شرایط معده و روده قزل‌آلای رنگین‌کمان، این باکتری به وسیله آلژینات/کیتوزان به روش امولسیون داخلی ریزپوشانی شده و اثر آن بر روی برخی از شاخص‌های ایمنی مورد بررسی قرارگرفت.

نتایج این تحقیق نشان داد تجویز پروبیوتیک ریزپوشانی شده به روش امولسیون داخلی دارای تاثیرات معنی‌داری بر روی برخی از شاخص‌های ایمنی ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان در مقایسه با سایر تیمارها بود.

لایزوزیم به عنوان یکی از مولکول‌های دفاعی مهم ماهیان در سیستم ایمنی ذاتی بوده و بنابراین دارای فعالیت باکتری‌کشی می‌باشد (Mohammadian *et al.*, 2019). فعالیت ضدباکتریایی این آنزیم مربوط به هیدرولیز پیوندهای N- استیل گلوکز آمین و N- استیل مورامیک اسید می‌باشد (Tukmechi *et al.*, 2007). فعالیت لایزوزیم بوسیله وضعیت ایمنی ماهی تحت تاثیر قرار می‌گیرد (Mohammadian *et al.*, 2019). با توجه به اینکه مقادیر این آنزیم در سرم خون، منعکس کننده سلول‌های فاگوسیت کننده می‌باشد، بنابراین می‌توان تقویت سیستم ایمنی در ماهیان را در نتیجه افزایش این آنزیم انتظار داشت (خوش قلب و همکاران، ۱۳۹۲). نتایج این تحقیق افزایش میزان فعالیت لایزوزیم را در تیمار ریزپوشانی شده به روش امولسیون داخلی در روز ۳۰ و ۶۰ آزمایش نسبت به سایر تیمارها نشان داد. مشابه با این نتایج، مطالعات زیادی افزایش میزان

[Downloaded from aqudev.liau.ac.ir on 2024-07-27]

فعالیت لایزوزیم را به علت استفاده از پروبیوتیک ریزپوشانی شده در گونه های مختلف ماهی گزارش نموده اند (Gupta *et al*., 2014).

علاوه بر لایزوزیم اندازه گیری میزان فعالیت کمپلمان نیز تغییرات سیستم ایمنی ماهی را نشان می دهد. سیستم کمپلمان نقش اساسی در ایمنی غیراختصاصی داشته و در فاگوسیتوز، کموتاکسی و لیز سلولی دخالت دارد. اصولاً افزایش فعالیت کمپلمان موجب افزایش فعالیت فاگوسیتوزی شده و نقش مهمی در انفجار تنفسی لوکوسیت ها دارد (Misra *et al*., 2006).

هرچند در این مطالعه از لحاظ عددی و مقدار شاهد بیشترین میزان فعالیت کمپلمان در تیمار ریزپوشانی شده به روش امولسیون داخلی بودیم ولی بر اساس آزمون تجزیه واریانس یکطرفه این افزایش نسبت به سایر تیمارها معنی دار نبود. این افزایش می تواند به دلیل توانایی پروبیوتیک‌ها در تحریک بیان گیرنده‌های کمپلمان باشد (Pirarat *et al*., 2015). در مطالعه Mohammadian و همکاران (۲۰۱۹) بیشترین میزان فعالیت کمپلمان در روز ۶۶ آزمایش در تیمار تغذیه شده با *L. bulgaricus* مشاهده‌گردید. در مطالعه Pourgholam و همکاران میزان فعالیت کمپلمان سرم تاس ماهی سیبری (*Acipenser baerii*) در جیره‌های حاوی مقادیر متفاوت باکتری *L. plantarum* به طور معنی داری بالاتر از تیمار شاهد گزارش گردید. بطور کلی نتایج مطالعاتی که تاکنون انجام شده به صراحت نشان داده که استفاده از مکمل‌های تغذیه‌ای مانند پروبیوتیک‌ها در جیره ماهیان بر روی سیستم کمپلمان تاثیرگذار می‌باشد (Ai *et al*., 2011). به عنوان مثال در مطالعه Sun و همکاران (۲۰۱۱) بیان شد که سیستم کمپلمان ماهی هامور تحت تاثیر پروبیوتیک‌های *L. lactis* و *E. faecium* قرارگرفته و افزایش یافته‌است. اختلاف در نتایج مطالعه حاضر با مطالعات پیشین احتمالاً ناشی از نوع پروبیوتیک مصرفی، سطح بکارگیری و نوع گونه ماهی می‌باشد (Hoseinifar *et al*., 2017). همچنین ثابت شده‌است که اثر برخی از پروبیوتیک‌ها بر روی فعالیت سیستم کمپلمان ماهی تا حد زیادی به مدت زمان استفاده از جیره وابسته است (Sun *et al*., 2011). پس یکی از عواملی که در مطالعه تاثیر پروبیوتیک ها بر روی سیستم ایمنی می‌بایست مورد توجه قرارگیرد رابطه تعاملی بین جیره و مدت زمان اجرا می‌باشد.

در مطالعه Andani و همکاران (۲۰۱۲) فعالیت کمپلمان ماهی قزل آلای رنگین کمان در طی ۳۰ روز تغذیه *L. plantarum* افزایش معنی داری نشان نداد. Merrifield و همکاران (۲۰۱۰) با بررسی *E. faecium* به صورت خوراکی در ماهی قزل آلا افزایش معنی داری را در طی ۱۰ هفته تغذیه گزارش نکردند. Sun و همکاران (۲۰۱۰) کاهش در میزان فعالیت کمپلمان سرم بعد از ۶۰ روز تغذیه با جیره های حاوی *B. clausii* و *B. pumilus* را نسبت به گروه کنترل مشاهده نمودند.

افزایش سطح پروتئین های سرم به عنوان شاخصی مناسب جهت بررسی وضعیت سلامت و دفاع ایمنی ماهی مطرح می باشد. فراوانترین پروتئین در پلاسما شامل آلبومین و گلوبولین می‌باشند. اندازه‌گیری میزان پروتئین کل، آلبومین و گلوبولین سرم خون ماهیان می تواند به عنوان شاخصی جهت ارزیابی وضعیت سلامت و پاسخ‌های ایمنی مورد استفاده قرارگیرد (علیزاده رودپشتی و همکاران، ۱۳۹۶). میزان این عوامل در بین گونه‌های مختلف ماهی و در شرایط محیطی مختلف،

[Downloaded from aqudev.liau.ac.ir on 2024-07-27]

متفاوت می‌باشد (حسینی، ۱۳۹۶) و می‌تواند باعث ایجاد اثرات مثبتی بر روی پاسخ‌های ایمنی سرم خون ماهیان گردد (اکبری و همکاران، ۱۴۰۰). نتایج مطالعه حاضر نشان داد که میزان پروتئین کل و گلوبولین در روز ۳۰ آزمایش در تیمارهای ریزپوشانی شده به روش امولسیون داخلی و آلژینات / کیتوزان نسبت به سایر تیمارها دارای افزایش معنی‌دار بود. همچنین در روز ۶۰ آزمایش نیز میزان پروتئین کل در تیمارهای مذکور نسبت به تیمار شاهد دارای اختلاف معنی‌دار بود. میزان گلوبولین در تیمارهای ریزپوشانی شده و آلژینات/ کیتوزان دارای اختلاف معنی‌دار نسبت به تیمار شاهد بود، در صورتی که نسبت به تیمار تغذیه شده با باکتری به تنهایی اختلاف معنی‌داری را نشان ندادند. نتایج بدست آمده مشابه با نتایج Cordero و همکاران (۲۰۱۵) می باشد که طی آن اثرات باکتری ریزپوشانی شده *Shewanella putrefaciens* را در ماهی شانک *Sparus aurata* مورد بررسی قرار داده و بیان نمود که میزان ایمونوگلوبولین بالاتر از تیمار کنترل بود. همچنین Jafarzadeh و همکاران (۲۰۱۵) افزایش میزان ایمونوگلوبولین سرم را در بررسی اثرات سین بیوتیک Biomin IMBO بر روی تاس ماهی روسی (*Acipenser gueldenstaedtii*) گزارش نمودند. در مطالعه دیگری تاثیر پروبیوتیک *L. acidophilus* بر روی برخی از شاخص‌های خونی و ایمنی گربه ماهی آفریقایی (*Clarias batrachus*) مورد بررسی قرار گرفته و افزایش میزان گلوبولین در طی دوره آزمایش نسبت به گروه کنترل بدست آمد.

براساس یافته های بدست آمده می‌توان نتیجه گرفت که افزودن پروبیوتیک ریزپوشانی شده *L. rhamnosus* به روش امولسیون داخلی در جیره غذایی ماهی قزل آلای رنگین کمان می تواند سبب بهبود برخی از پاسخ‌های ایمنی این ماهی گردد. و افزایش در برخی پارامترهای ایمنی مانند لایزوزیم، توتال پروتئین و گلوبولین نشاندهنده وضعیت سلامت ماهی بوده که می‌تواند باعث افزایش مقاومت بچه ماهیان قزل آلا در برابر عوامل بیماریزا و محرک‌های ایمنی گردد. همچنان که طی مطالعه‌ای محمدیان و همکاران (۱۳۹۸) دریافتند که ریزپوشانی باکتری با نانوذرات کیتوزان/آلژینات کارایی پروبیوتیکی باکتری *L. plantarum* را بهبود بخشیده و می‌تواند عملکرد مثبت پروبیوتیکی بر فاکتورهای بیوشیمیایی پلاسمای فیل ماهی (*Huso huso*) را بهبود بخشد. بنابراین بر اساس پژوهش انجام شده می‌توان نتیجه گرفت که ریزپوشانی پروبیوتیک‌ها نقش بسیار مهمی در حفاظت این میکروارگانیسم‌ها در برابر شرایط نامساعد محیطی معده و روده ایفا می‌کند. به نظر میاد جهت درک پیچیدگی های روابط بین پروبیوتیک ها و تحریک سیستم ایمنی مطالعات بیشتری موردنیاز است.

سپاسگزاری

مؤلفین برخود لازم می دانند که از مدیریت و کارشناسان محترم مرکز تحقیقات ژنتیک و اصلاح نژاد ماهیان سردآبی شهید مطهری یاسوج، به خاطر همکاری در اجرای طرح و کلیه عزیزانی که در مسیر انجام این پروژه از مساعدت آن ها برخوردار بودیم تشکر و قدردانی نمایند.

[Downloaded from aqudev.liau.ac.ir on 2024-07-27]

منابع

۱. اکبری، ح.، حسینی شکرابی، س.پ.، سلطانی، م.، شمسایی، م.، ۱۴۰۰. تأثیر مقادیر مختلف پروبیوتیک *Enterococcus faecium* بر برخی شاخص‌های ایمنی سرم خون و موکوس پوست بچه ماهی کپور معمولی (*Cyprinus carpio*). نشریه توسعه آبزی پروری، ۱۵ (۲)، ۲۶-۱۵.

۲. بهروز خوش قلب، م.ر.، آذری تاکامی، ق.، خارا، ح.، و کاظمی، ر.، ۱۳۹۲. بررسی تاثیر سطوح مختلف *Pediococcus acidilactici* در جیره غذایی بر فاکتورهای ایمنی خون بچه ماهی قزل-آلای رنگین‌کمان (*Oncorhynchus mykiss*). فصلنامه فیزیولوژی و تکوین جانوری، ۳(۶)، ۶۶-۵۳.

۳. حسینی، س.ص.، ۱۳۹۶. ارزیابی توان پروبیوتیکی و تحریک ایمنی لاکتوباسیلوس بولگاریکوس ریزپوشانی شده با آلژینات/کیتوزان در فیل ماهی جوان (*Huso huso*). پایان نامه دکتری دانشگاه شهید چمران اهواز. ۱۱۵ صفحه.

۴. راستیان نسب، ا.، موسوی، س.م.، ذوالقرنین، ح. و حسین زاده صحافی، ه.، ۱۳۹۶. بررسی تاثیر پروبیوآنزیم بر بیان ژن‌های وابسته به ایمنی و کنترل بیماری دهان قرمز در ماهی قزل آلای رنگین کمان. مجله علمی شیلات ایران، ۲۶(۱)، ۱۶۶-۱۵۳.

۵. سالنامه آماری شیلات ایران. ۱۳۹۸. معاونت برنامه ریزی و مدیریت منابع، دفتر برنامه ریزی و بودجه، گروه برنامه ریزی و آمار.

۶. علیزاده رودپشتی، م.، شناور ماسوله، ع.، جلیل پور، ج.، معصوم زاده، م.، بازاری مقدم، س.، یگانه، ه.، عزیزاده، ل.، ۱۳۹۶. اثر انتروکوکوس فکالیس به عنوان پروبیوتیک بر شاخصهای خونی و سرمی بچه تاس ماهیان ایرانی (*Acipenser persicus*). نشریه توسعه آبزی پروری، ۱۱(۱)، ۱۰۳-۸۳.

۷. علیشاهی، م.، ۱۳۸۸. مقدمه ای بر ایمنی شناسی آبزیان. پی. سواین، پی کی، ساهو واس. آیاپان. چاپ اول، انتشارات دانشگاه شهید چمران اهواز، اهواز-ایران. ۱۵۶ صفحه.

۸. قربانزاده، ر. و س، نظری.، ۱۳۹۶. سالنامه آماری سازمان شیلات ایران، انتشارات سازمان شیلات ایران، معاونت برنامه ریزی و مدیریت منابع، دفتر برنامه ریزی و بودجه،گروه برنامه ریزی و آمار.

۹. محمدیان، ت.، ۱۳۹۲. ارزیابی توان پروبیوتیکی و تحریک کنندگی ایمنی برخی لاکتوباسیلوس‌های جدا شده از روده ماهی شیربت *Barbus grypus* . پایان نامه دوره دکترای Ph.D، دانشگاه شهید چمران اهواز، دانشکده دامپزشکی، ۱۸۴صفحه.

۱۰. محمدیان، ت. بیتا، س. و ناصری، ر.، ۱۳۹۸. تاثیر لاکتوباسیلوس پلانتاروم ریزپوشانی شده با آلژینات / کیتوزان بر برخی فاکتورهای بیوشیمیایی پلاسمای خون در فیل ماهی (*Huso huso*). مجله تحقیقات دامپزشکی، ۷۴ (۱)، ۱۰۳-۹۳.

۱۱. محمودی کیا، ز و ایمانی، ا.، ۱۳۹۷. شیوه‌های مختلف تقویت سیستم ایمنی آبزیان. فصلنامه علوم آبزی پروری پیشرفته، ۲(۲)، ۴۱-۲۹.

12. Ai, Q., Xu, H., Mai, K., Xu, W., Wang, J., & Zhang, W., 2011. Effects of dietary supplementation of *Bacillus subtilis* and fructo oligosaccharide on growth performance, survival, non-specific immune response and disease resistance of juvenile large yellow croaker, *Larimichthys crocea*. Aquaculture, 317(1), 155-161. 16.

[Downloaded from aqudev.liau.ac.ir on 2024-07-27]

13. Al-Dohail, M. A., Hashim, R., & Aliyu-Paiko, M., 2009. Effects of the probiotic, *Lactobacillus acidophilus*, on the growth performance, haematology parameters and immunoglobulin concentration in African Catfish (*Clarias gariepinus*, Burchell 1822) fingerling. Aquaculture Research, 40(14), 1642-1652.
14. Andani, H.R.R., Tukmechi, A., Meshkini, S. And Sheikhzadeh, N., 2012. Antagonistic activity of two potential probiotic bacteria from fish intestines and investigation of their effects on growth performance and immune response in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). Journal of Applied Ichthyology, 28, 728-734.
15. Bahi, A., Guardiola, F.A., Messina, C., Mahdhi, A. Cerezuela, R., Santulli, A., Bakhrouf, A.and Esteban, M.A., 2017.Effects of dietary administration of fenugreek seeds, alone or in combination with probiotics, on growth performance parameters, humoral immune response andgene expression of gilthead seabream (*Sparus aurata* L.). Fish and Shellfish, 60, 50-58.
16. Brata, O., 1993. Veterinary Clinical immunology laboratory, Bar-Lab Inc, Vo12, section 3, 24-25.
17. Caruso, D., Lusiastuti, A.M., Slembrouck, J., Komarudin, O. and M. Legendre., 2013. Traditional pharmacopeia in small scale freshwater fish farms in west Java, Indonesia: An ethnoveterinary approach. Aquaculture, 416, 334-345.
18. Chavarri, M., Maranon, I., Villaan, M.C., 2012. Encapsulation technology to protect probiotic bacteria. INTECH Open Access Publisher, 501–540.
19. Cordero, H., Guardiola, F. A., Tapia-Paniagua, S. T., Cuesta, A., Meseguer, J., Balebona, M. C., & Esteban, M. Á., (2015). Modulation of immunity and gut microbiota after dietary administration of alginate encapsulated *Shewanella putrefaciens* Pdp11 to gilthead seabream (*Sparus aurata* L.). Fish & shellfish immunology, 45(2), 608-618.
20. Dong, Q.Y., Chen, M.Y., Xin, Y., Qin, X.Y., Cheng, Z., Shi, L.E., 2013. Alginate-based and protein-based materials for probiotics encapsulation: a review. International Journal of Food Science and Technology, 48, 1339–1351.
21. Ghosh, B., Cain, K.D., Nowak, B.F., Bridle, A.R., 2016. Microencapsulation of a putative probiotic Enterobacter species, C6-6, to protect rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum): against bacterial cold water disease. Journal of Fish Diseases, 39, 1–11.
22. Gupta, A., Gupta, P., 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.
23. Hadi, J.A., Gutierrez, N., Alfaro, A.C., Roberts, R.D., 2014. Use of probiotic bacteria to improve growth and survivability of farmed New Zealand abalone (*Haliotis iris*). New Zealand Journal of Marine and Freshwater Research, 48, 405–415.
24. Hai, N.V., 2015. The use of probiotics in aquaculture. Journal of Applied Microbiology, 119: 917–935.
25. Hoseinifar, S.H., Khalili, M., Rufchaei, R., Raeisi, M., Attar, M., Cordero, H., Esteban, M., A., 2015. Effects of date palm fruit extracts on skin mucosal immunity, immune related genes expression and growth performance of common carp (*Cyprinus carpio*) fry. Fish & Shellfish Immunology, 47, 706-711.
26. Hoseinifar, S.H., khodadadian Zou, H., Kolangi Miandare, H., Hienvan, D., Romano, N. and Dadar, M., 2017. Enrichment of common carp (*Cyprinus carpio*) diet with medlar (*Mespilus germanica*) leaf extract: Effects on skin mucosal immunity and growth performance. Fish & Shellfish Immunology, 67, 346-352.
27. Huiyi, S., Weiting, Y; Meng, G; Xiudong, L; Xiaojun, M., 2013. Microencapsulated probiotics using emulsification technique coupled with internal or external gelation process. Carbohudrate polymers, 96, 181-189.

[Downloaded from aqudev.liau.ac.ir on 2024-07-27]

28. Jafarzadeh, E., Khara, H., & Ahmadnezhad, M., 2015. Effects of synbiotic (Biomin IMBO) on haematological and immunological components of Russian sturgeon, *Acipenser guldenstadti*. Comparative Clinical Pathology, 24(6), 1317-1323.
29. Liu, W. and Saint, D. A., 2013. A new quantitative method of real time reverse transcription polymerase chain reaction assay based on simulation of polymerase chain reaction kinetics. Analytical biochemistry, 302, 52-59.
30. Lukman, A., Widanarni and Munti, Y., 2015. Application of micro-encapsulated Probiotic Bacillus NP5 and Prebiotic Mannan Oligosaccharide (MOS) to Prevent Streptococcosis on Tilapia *Oreochromis niloticus*. Journal of Microbiology, 10 (12), 571-581.
31. Masoomi dezfooli, S.S., Maddox, N.G., Alfaro, A., and Seyfoddin, A., 2018. Encapsulation for delivering bioactives in aquaculture. Reviews in Aquaculture, 1-30.
32. Merrifield, D.L., Bradley, G., Baker, R.T. M., & Davies, S.J., 2010. Probiotic applications for rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss* Walbaum) II. Effects on growth performance, feed utilization, intestinal microbiota and related health criteria postantibiotic treatment. Aquaculture nutrition, 16(5), 496-503.
33. Misra, C.K., Das, B.K., Mukherjee, S.C., Pattnaik, P., 2006. Effect of multiple injections of ß -glucan on non-specific immune responseand disease resistance in *Labeo rohita* fingerlings. Fish and Shellfish Immunology, 20, 305-319.
34. Mohammadian, T., Tulaby Dezfuly, Z., Ghanei Motlagh, R., Jangaran-Nejad, A., Hosseini, S.S., Khaj, H., & Alijani, N., 2019. Effect of Encapsulated *Lactobacillus bulgaricus* on Innate Immune System and Hematological Parameters in Rainbow Trout (*Oncorhynchus mykiss*), Post-Administration of Pb. Probiotics and Antimicrobial Proteins. https://doi.org/10.1007/s12602-019-09544-7.
35. Mortazavian, A., Razavi, S.H., Ehsani, M.R., Sohrabvandi, S., 2007. Principles and methods of microencapsulation of Probiotic microorganisms, Iranian Journal of biotechnology, 5, (1), 1-18.
36. Nayak, S.K., 2010. Probiotics and immunity: A fish perspective. Fish and Shellfish Immunology, 29, 2-14.
37. 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: 313-329.
38. Ringo, E., Dimitroglou, A., Hoseinifar, S.H. and Davies, S.J., 2014. Prebiotics in finfish: an update. In: Merrifield D, Ringo E, editors. Aquaculture nutrition: gut health, probiotics and prebiotics. Oxford, UK: Wiley-Blackwell Publishing.
39. Pirarat, K., Pinpimai, C., Rodkhum, N., Chansue, E.L., Ooi, T., Katagiri, M., Maita, R., 2015. Viability and morphological evaluation of alginate-encapsulated Lactobacillus rhamnosus GG under simulated tilapia gastrointestinal conditions and its effect on growth performance, intestinal morphology and protection against Streptococcus agalactiae. Animal Feed Science Technology, 207, 93–103.
40. Rokka, S., Rantamaki, P., 2010. Protecting probiotic bacteria by microencapsulation: challenges for Industeria applications, European Food Research and Technology. 231, 1-12.
41. Secombes, C.J., Zou, J.; Laing, K.; Daniels, GD. and Cunningham, C., 1998. Cytokine genes in fish. Aquaculture, 171, 93-102.
42. Silva, G.V., Saad, H.S.R., Garido, G.F.A., Reyes, L.M., Spinosa, A.A., and Jimenez, J.M., 2017. Effect of bacterial probiotics bio-encapsulated into *Artemia franciscana* on weight and length of the shortfin silverside (*Chirostoma humboldtianum*), and PCR-DGGE characterization of its intestinal bacterial community. Latin American Journal of Aquatic Research, 45(5), 1031-1043.

[Downloaded from aqudev.liau.ac.ir on 2024-07-27]

43. Soltani, M., Shafiei, S., Yosefi, P., Mosavi, S., and Mokhtari, A., 2014. Effect of Montanide™ IMS 1312 VG adjuvant on efficacy of *Yersinia ruckeri* vaccine in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). Fish and Shellfish Immunology, 37 (1): 60–65.
44. Sun, Y. Z., Yang, H. L., Ma, R. L., & Lin, W. Y., 2010. Probiotic applications of two dominant gut Bacillus strains with antagonistic activity improved the growth performance and immune responses of grouper *Epinephelus coioides*.Fish & Shellfish Immunology, 29(5), 803-809. 153.
45. Sun, Y. Z., Yang, H. L., Ma, R. L., Song, K., & Li, J. S., 2011. Effect of *Lactococcus lactis* and *Enterococcus faecium* on growth performance, digestive enzymes and immune response of grouper *Epinephelus coioides*.Aquaculture Nutrition, 18(3), 281-289.
46. The state of world fisheries and aquaculture. 2020. http://www.fao.org/3/ca9229en/ca9229en.
47. Tripathi, M.K. and Giri, S.K., 2014. Probiotic functional foods: Survival of probiotics during processing and storage. Journal of functional foods, Vol. 9, pp: 225-241.
48. Tukmechi, A., Morshedi, A. and Delirezh, N., 2007. Changes in intestinal microflora and immune response following probiotic administration in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). Journal of Animal and Veterinary Advances, 6: 1183-1189.
49. Vine, N.G; Leukes, W.D. and Kaiser, H., 2006. Probiotics in marine larviculture. FEMS microbiological Reviews, 30,404-427.
50. Wang, W., Sun, J., Liu, C. and Xue, Z., 2017. Application of immunostimulants in aquaculture: current knowledge and future perspectives. Aquaculture Research, 48(1), 1-23.

[Downloaded from aqudev.liau.ac.ir on 2024-07-27]