مقایسه‌ی تأثیر اشکال مختلف پروبیوتیک *لاکتوباسیلوس کازئی* بر رشد و ایمنی ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان (*Oncorhynchus mykiss*)

مهتاب اشنوخواه[۱]، امیر توکمه‌چی[۲*]، فرح فرخی[۳] و رامین مناف‌فر[۴]

تاریخ دریافت: ۹۱/۸/۱۵ تاریخ پذیرش: ۹۲/۳/۲۰

خلاصه

بررسی حاضر به منظور مقایسه‌ی تأثیر اشکال مختلف *Lactobacillus casei* بر رشد و ایمنی ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان انجام شد. تعداد ۴۸۰ قطعه ماهی با وزن اولیه‌ی ۶/۵±۵۰ گرم تهیه، به مدت ۱۰ روز با شرایط آزمایشگاهی سازگار شده و به طور تصادفی به چهار گروه تقسیم شدند. یک گروه به عنوان شاهد انتخاب و در طول دوره‌ی مطالعه با غذای تجاری پلت تغذیه شد. گروه‌های دوم تا چهارم نیز به ترتیب با غذای مکمل سازی شده با اشکال زنده (کشت تازه و لیوفیلیزه) و کشته شده با حرارت *L. casei* با غلظت 5×10^{8} CFU/g غذا تغذیه شدند. طول دوره‌ی مطالعه ۴۵ روز و نمونه‌برداری برای انجام زیست سنجی و سنجش برخی از شاخص‌های هومورال ایمنی غیر اختصاصی، شامل میزان فعالیت آنزیم لیزوزیم، مسیر فرعی کمپلمان و میزان آنتی‌بادی تام سرم در روزهای صفر، ۱۵، ۳۰ و ۴۵ انجام گرفت. نتایج نشان داد مقادیر شاخص‌های وزن نهایی، درصد افزایش وزن و نرخ رشد ویژه در همه‌ی گروه‌های تغذیه شده با اشکال زنده (کشت تازه و لیوفیلیزه) و کشته شده با حرارت باکتری *L. casei* در مقایسه با گروه شاهد، افزایش یافت؛ همچنین، مقادیر این شاخص‌ها در ماهیانی که با شکل لیوفیلیزه باکتری تغذیه شدند، به طور معنی‌داری ($P<0/05$) بیشتر از بقیه بود. سنجش ایمنی نشان داد فعالیت لیزوزیم، مسیر فرعی کمپلمان و نیز سطح آنتی‌بادی تام سرم در ماهیان تیمار شده با اشکال مختلف *L. casei*، ۱۵ و ۳۰ روز بعد از شروع تغذیه افزایش یافت. افزایش این شاخص‌ها در ماهیان تغذیه شده با شکل لیوفیلیزه باکتری نسبت به گروه شاهد معنی‌دار ($P<0/05$) بود. همچنین نتایج مشخص کرد که فعالیت لیزوزیم، مسیر فرعی کمپلمان و مقدار آنتی‌بادی تام سرم، در ماهیان تغذیه شده با اشکال مختلف باکتری در روز ۴۵ (۱۵ روز پس از قطع مصرف) کاهش یافت. بنا بر این، می‌توان نتیجه گرفت که افزودن *L. casei* به جیره‌ی غذایی ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان، می‌تواند سبب بهبود رشد و تقویت ایمنی این ماهی گردد.

کلمات کلیدی: قزل‌آلای رنگین‌کمان، پروبیوتیک، *Lactobacillus casei*، رشد، ایمنی

مقدمه

پرورش آبزیان، یکی از مهم‌ترین فعالیت‌های تولید غذا در بسیاری از کشورهای جهان محسوب می‌شود. در این ارتباط کمبود منابع آبی سبب شده است که پرورش انبوه و متراکم جایگزین روش‌های نیمه متراکم یا غیرمتراکم گردد (رحمتی‌اندانی و همکاران ۱۳۸۹). در پرورش متراکم، استرس‌هایی مانند اختلالات فیزیکی، شیمیایی و زیستی به صورت طبیعی در محیط زیست ماهی رخ می‌دهد. این استرس‌ها امکان ابتلای ماهی به انواع بیماری‌ها را افزایش می‌دهد. از این رو، پرورش ماهیانی با سیستم ایمنی فعّال، که توانایی مقابله با بیماری‌ها را داشته باشد و بتواند در برابر شرایط نامساعد محیطی مقاومت نمایند، از اهمیت بالایی برخوردار است (Kubulay and Ulukoy 2002).

امروزه برای جلوگیری و یا درمان بیماری‌های عفونی در ماهی، از واکسن‌ها یا داروهای شیمیایی از جمله آنتی‌بیوتیک‌ها در سطح وسیعی استفاده می‌شود. استفاده

[۱] دانشجوی کارشناسی ارشد، گروه زیست شناسی، دانشکده علوم، دانشگاه ارومیه
[۲*] استادیار، گروه پاتوبیولوژی و کنترل کیفی، پژوهشکده آرتمیا و آبزیان، دانشگاه ارومیه (نویسنده مسئول) E-mail: a.tukmachi@urmia.ac.ir
[۳] دانشیار، گروه زیست شناسی، دانشکده علوم، دانشگاه ارومیه
[۴] استادیار، گروه بیوتکنولوژی، پژوهشکده آرتمیا و آبزیان، دانشگاه ارومیه

گسترده از آنتی‌بیوتیک‌ها، باعث ظهور مقاومت آنتی‌بیوتیکی در میکروارگانیسم‌های بیماری‌زا و نیز خطرات زیست محیطی فراوانی می‌شود (Aguirre-Guzmán et al. 2012). در عین حال، استفاده از محرک‌های سیستم ایمنی در آبزیان می‌تواند مقاومت آن‌ها را در برابر شرایط نامطلوب محیطی و عوامل بیماری‌زا در مقایسه با سایر روش‌های درمانی، افزایش دهد. در سال‌های اخیر علاقه به استفاده از پروبیوتیک‌ها به عنوان محرکی برای رشد و نیز تقویت سیستم ایمنی در ماهی، افزایش پیدا کرده است (Meshkini et al. 2012). پروبیوتیک‌ها به عنوان سلول‌های میکروبی یا ترکیباتی از این سلول‌ها تعریف می‌شوند که اثرات مفیدی بر سلامتی میزبان دارند (Salminen et al. 1999). آن‌ها از طریق تولید موادی نظیر ترکیبات بازدارنده، هم‌چنین رقابت بر سر مواد شیمیایی و مکان‌های اتصال و تحریک و تقویت سیستم ایمنی، باعث بهبود وضعیت سلامتی میزبان و اصلاح توازن میکروبی روده می‌شوند (Andani et al. 2012).

بررسی‌ها نشان می‌دهند اشکال غیر زنده *Lactobacillus*ها نیز، دارای ویژگی‌های تحریک کنندگی سیستم ایمنی در انسان و جانوران هستند (Chaiyasut and Sirilun 2012). استفاده از پروبیوتیک‌ها در صنعت آبزی‌پروری، علاوه بر بهبود کیفیت آب، باعث افزایش بقاء، تقویت رشد و نیز، ارتقای وضعیت سلامتی آبزیان می‌گردد (Uribe exal et al. 2011). باکتری‌های اسید لاکتیک (LAB[1]) یکی از مهم‌ترین گونه‌های پروبیوتیکی هستند که در پرورش آبزیان به کار می‌روند (Panigrahi et al. 2011, Andani et al. 2012). انتخاب پروبیوتیک مناسب بسیار ضروری است؛ زیرا میکروارگانیسم‌های نامناسب اثرات ناخواسته‌ای را در میزبان به‌جا می‌گذارند. *لاکتوباسیلوس*ها و *بیفیدوباکتریوم*ها بیشترین میکروارگانیسم‌هایی هستند که به عنوان پروبیوتیک مورد استفاده قرار می‌گیرند. اثرات مفید گونه‌های مختلف این میکروارگانیسم‌ها در مطالعات مختلفی بررسی شده است؛ اما خواص آن‌ها از گونه‌ای به گونه دیگر، متفاوت بوده و در بررسی‌های گوناگون، محققان این خواص را ویژه‌ی گونه و سویه باکتری دانسته‌اند (Kirjavainen et al. 1999).

یافته‌های به دست آمده از مطالعات گوناگون، نشان می‌دهند که اجزای سلولی *Lactobacillus* ها شامل سلول کامل، سلول‌های کشته شده توسط حرارت، دیواره‌ی سلولی، پپتیدوگلیکان و عصاره‌ی سیتوپلاسمی دارای عملکردهای متفاوتی به هنگام مجاور شدن با سلول‌های سرطانی هستند (Lee et al. 2004).

بررسی‌ها نشان می‌دهند مطالعات اندکی در مورد تأثیر *L. casei* در آبزیان صورت گرفته است (Balcazar et al. 2007, Hernandez et al. 2010, Andani et al. 2012). مطالعات انجام شده توسط رحمتی‌اندانی و همکاران در سال ۱۳۸۹ نشان داده است که *L. casei* می‌تواند مقاومت ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان[2] را در برابر عوامل بیماری‌زا افزایش دهد. بر این اساس، هدف از انجام این تحقیق مقایسه‌ی تأثیر اشکال زنده (کشت تازه و لیوفیلیزه) و شکل کشته شده با حرارت باکتری *L. casei* جدا شده از روده‌ی ماهی کپور معمولی[3] بر شاخص‌های رشد و ایمنی ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان بود.

مواد و روش‌ها

تهیه‌ی باکتری و کشت آن

باکتری مورد استفاده در این بررسی با نام *Lactobacillus casei* از آزمایشگاه میکروبیولوژی پژوهشکده‌ی آرتمیا و آبزیان دانشگاه ارومیه تهیه شد. این باکتری از روده‌ی ماهی کپور معمولی جدا گردید و

1- Lactic Acid Bacteria
2- *Oncorhynchus mykiss*
3- Common carp

خاصیت پروبیوتیکی آن توسط رحمتی‌اندانی و همکاران در سال ۱۳۸۹ به اثبات رسید. در این بررسی از اشکال زنده (کشت تازه و لیوفیلیزه) و شکل کشته شده با حرارت باکتری *L. casei* جهت افزودن به غذای ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان استفاده شد. برای کشت باکتری، ابتدا یک پرگنه‌ی خالص از آن در محیط کشت اختصاصی *لاکتوباسیلوس*ها، یعنی آبگوشت MRS[1] در دمای ۳۰°C در شرایط بی‌هوازی به مدّت ۲۴ ساعت کشت داده شد. پس از این مدّت، ابتدا باکتری‌های رشد کرده با دور ۳۰۰۰rpm در دمای ۴°C به مدت ۱۵ دقیقه سانتریفیوژ و سپس رسوب حاصل دو مرتبه با سرم فیزیولوژی استریل شست و شو داده شد (Tukmechi et al. 2007). الف) کشت تازه: به منظور تهیه‌ی فرم زنده‌ی باکتری رسوب حاصل پس از دوبار شست و شو، مجدداً در سرم فیزیولوژی استریل به صورت سوسپانسیون درآمد و تراکم آن با روش شمارش زنده[2] برابر با 5×10^{8} CFU[3]/g (Li et al. 2012) تنظیم شد. در این روش، ابتدا رقت‌های سریال (10^{-1} تا 10^{-10}) از سوسپانسیون به کمک سرم فیزیولوژی استریل، تهیه و کشت رقت‌ها به طور جداگانه روی محیط MRS آگار انجام شد (رحمتی‌اندانی و همکاران ۱۳۸۹). ب) شکل لیوفیلیزه: برای تهیه‌ی آن ابتدا رسوب حاصل از باکتری‌های کشت داده شده، به مدّت ۲۴ ساعت در دستگاه انجماد خشک[4] با دمای ۴۰°C- قرار گرفت. پودر لیوفیلیزه حاصل، تا زمان استفاده در دمای ۸۰°C- نگهداری شد. قبل از استفاده، برای اطمینان از زنده ماندن باکتری‌ها، کشت آن روی محیط کشت MRS آگار انجام گردید. به منظور تعیین تعداد باکتری زنده‌ی موجود در یک گرم از پودر لیوفیلیزه، شمارش به روش زنده مشابه آنچه که در مورد کشت تازه‌ی باکتری انجام شد، صورت گرفت. ج) شکل کشته شده با حرارت: پس از کشت و شست و شوی باکتری‌ها با سرم فیزیولوژی استریل، رسوب حاصل در سرم فیزیولوژی استریل به صورت سوسپانسیون درآمده و تراکم آن با روش شمارش زنده برابر با 5×10^{8}CFU/g تنظیم شد و بلافاصله به مدت یک ساعت در حمام آب با دمای ۷۵°C قرار گرفت (Panigrahi et al. 2011). بعد از یک ساعت، برای اطمینان از زنده نبودن باکتری‌ها، سوسپانسیون حرارت دیده روی محیط کشت MRS آگار کشت داده شد؛ بعد از گذشت ۲۴ تا ۴۸ ساعت گرم‌خانه‌گذاری در دمای ۳۰°C هیچ باکتری روی محیط کشت رشد نکرد.

پس از تهیه و آماده‌سازی اشکال مختلف باکتری سوسپانسیونی از آن‌ها در سرم فیزیولوژی استریل تهیه و روی غذای تجاری ماهی (GFT1 و FFT2؛ فرادانه، ایران) اسپری گردید و به مدّت ۲ ساعت در دمای اتاق در محیطی استریل خشک شدند. برای اطمینان از تعداد باکتری‌های زنده‌ی موجود در هر گرم غذا، از قسمت‌های مختلف غذا نمونه‌برداری و شمارش باکتریایی به شمارش روش زنده انجام گرفت (رحمتی‌اندانی و همکاران ۱۳۸۹).

طراحی آزمایش و غذادهی

تعداد ۴۸۰ قطعه ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان با میانگین وزنی ۶/۵±۵۰ گرم از یکی از مراکز تکثیر و پرورش ارومیه خریداری و به سالن تکثیر و پرورش پژوهشکده‌ی آرتمیا و آبزیان، دانشگاه ارومیه منتقل شدند. ماهیان بلافاصله با محلول ۳ درصد نمک ضد عفونی و برای سازگاری با شرایط آزمایشگاهی به مدّت ۱۰ روز در استخرهای بتنی (طول ۴۰۰cm، عرض ۴۵cm و ارتفاع ۴۵cm) با سیستم جریان باز آب (۳/۵ لیتر بر ثانیه) و هوادهی مداوم، قرنطینه شدند. بعد از مرحله‌ی سازگاری، ماهیان به صورت تصادفی در چهار گروه شامل شاهد، زنده، لیوفیلیزه و کشته شده با حرارت و هر کدام با سه تکرار تقسیم شدند و به مدّت ۴۵ روز پرورش یافتند.

1- De Man Rogosa and Sharpe Broth
2- Viable Count
3- Colony Forming Unit
4- Freeze Drier

شاخص‌های فیزیکوشیمیایی آب شامل (دما، اکسیژن، pH، آمونیوم و نیتریت) استخرهای پرورشی به صورت روزانه اندازه‌گیری و ثبت شد. تغذیه‌ی ماهیان، با استفاده از غذای تجاری پلت بر اساس جداول غذادهی، بر حسب وزن بدن ماهیان و درجه‌ی حرارت آب پرورشی صورت گرفت. تیمارهای ذکر شده به مدّت ۳۰ روز به همراه غذای تجاری، اشکال مختلف باکتری *L. casei* را با تراکم ۵×۱۰^۸CFU/g دریافت کردند. سپس به مدّت ۱۵ روز تنها با غذای تجاری پلت، بدون افزودن باکتری، تغذیه شدند. در تمام طول دوره‌ی پرورش گروه شاهد تنها با غذای تجاری پلت تغذیه شد. لازم به ذکر است که تهیه‌ی غذا به صورت روزانه انجام گرفت.

زیست سنجی

زیست سنجی ماهیان در روزهای صفر و ۳۰ مطالعه انجام شد. برای این کار ۱۰ ماهی از هر تکرار (۳۰ ماهی به ازای هر تیمار) به صورت تصادفی انتخاب و وزن و طول آنها اندازه‌گیری شد. سپس شاخص‌های رشد، نظیر نرخ رشد ویژه (Specific Growth Rate)، ضریب چاقی (Condition Factor)، وزن نهایی (Final Weight) و درصد افزایش وزن (Weight Gain)، بر اساس فرمول‌های زیر محاسبه شدند (Xue et al. 2006, Huang et al. 2008):

۱۰۰× [میانگین وزن اولیه به گرم + (میانگین وزن اولیه به گرم – میانگین وزن نهایی به گرم)]= وزن به دست آمده (درصد)

۱۰۰× [طول دوره‌ی پرورش + (ضریب نپری وزن اولیه به گرم- ضریب نپری میانگین وزن نهایی به گرم)]= ضریب رشد ویژه (درصد)

۱۰۰× [(میانگین طول نهایی به سانتی‌متر)^۳ ÷ میانگین وزن نهایی به گرم]=شاخص وضعیت (درصد)

سنجش شاخص‌های ایمنی

در این مطالعه میزان فعالیت آنزیم لیزوزیم، مسیر فرعی کمپلمان و میزان آنتی‌بادی تام سرم سنجیده شد. برای این کار، تعداد ۳ قطعه ماهی از هر استخر (۹ قطعه به ازای هر تیمار) به صورت تصادفی انتخاب و نمونه‌های خونی در روزهای صفر، ۱۵، ۳۰ و ۴۵ با استفاده از سرنگ ۲ میلی‌لیتری و از ورید ساقه دمی ماهیان پس از بیهوشی با پودر گل میخک (۲۰۰mg/ml) اخذ شد (Tukmechi et al. 2011). پس از خون‌گیری نمونه‌های سرم طبق روش Siwicki و همکاران در سال ۱۹۹۴ تهیه و تا زمان استفاده در فریزر ۸۰°C– نگهداری شدند.

فعالیت لیزوزیم: میزان فعالیت آنزیم لیزوزیم بر اساس روش Clerton و همکاران در سال ۲۰۰۱ و بر مبنای لیز شدن باکتری گرم مثبت حسّاس به آنزیم لیزوزیم، یعنی *Micrococcus lysodeikticus* اندازه‌گیری شد. به طور خلاصه، از آنزیم لیزوزیم سفیده‌ی تخم مرغ با رقت‌های مختلف (۰، ۵، ۱۰، ۲۵، ۵۰ و ۱۰۰ میکروگرم در میلی‌لیتر) در بافر فسفات سیترات (۰/۱ مولار و pH=۵/۸) به عنوان استاندارد استفاده گردید. مقدار ۲۵ میکرولیتر از نمونه‌های استاندارد و سرم تیمارهای مختلف، به طور جداگانه در هر یک از چاهک‌های میکروپلیت ۹۶ خانه‌ای ته صاف هر کدام با سه تکرار ریخته شد؛ سپس ۱۷۵ میکرولیتر از سوسپانسیون باکتری *Micrococcus lysodiekticus* در همان بافر (۷۵µg/ml) به هر چاهک اضافه و بلافاصله با نمونه‌های سرم مخلوط گردید و اجازه داده شد تا این واکنش در دمای ۲۵°C صورت گیرد. جذب نوری نمونه‌ها هر سی ثانیه یک بار تا پنج دقیقه به کمک دستگاه الایزا خوان در طول موج ۴۵۰ نانومتر قرائت گردید (Tukmechi et al. 2011).

فعالیت مسیر فرعی کمپلمان: فعالیت مسیر فرعی کمپلمان سرم نیز، بر اساس همولیز گلبول‌های قرمز خرگوش و با روش Amar و همکاران در سال ۲۰۰۰ اندازه‌گیری شد. به طور خلاصه، گلبول‌های قرمز خرگوش سه مرتبه با بافر اتیلن گلیکول تترا استیک اسید-منیزیوم-ژلاتین ورنال (۰/۰۱ مولار، pH=۷) شسته شده و تعداد سلول‌های آن، به کمک لام نئوبار در هر میلی‌لیتر بافر ۲×۱۰^۸cell/ml تنظیم گردید. ابتدا دانسیته نوری لیز ۱۰۰ درصد گلبول‌های قرمز خرگوش با افزودن ۱۰۰µl از

سوسپانسیون فوق به ۳/۴ml آب مقطر تعیین شد؛ سپس نمونه‌های سرم ۱۰۰ مرتبه با بافر فوق، رقیق شد و حجم‌های متفاوتی از آن در لوله‌ی آزمایش استریل تهیه و حجم همه لوله‌ها به کمک بافر به ۲۵۰ میکرولیتر رسانده شد. سرانجام، به همه‌ی لوله‌ها ۱۰۰ میکرولیتر گلبول قرمز خرگوش اضافه و مخلوط فوق در دمای ۲۰°C به مدت ۹۰ دقیقه گرم‌خانه‌گذاری و در پایان به هر کدام از لوله‌ها ۳/۱۵ml محلول ۰/۸۵ درصد کلرید سدیم افزوده گردید. سپس لوله‌ها با دور ۱۶۰۰×g به مدت ۱۰ دقیقه و دمای ۴ °C سانتریفیوژ شده و دانسیته نوری محلول رویی در طول موج ۴۱۴ نانو متر قرائت شد. حجمی از سرم که سبب ۵۰ درصد همولیز شود، عبارت است از فعالیت کمپلمان نمونه که از رابطه‌ی زیر برای محاسبه آن استفاده می‌شود:

ACH50[1] (U/ml)= k×(فاکتور رقت) ×۰/۵

در رابطه‌ی فوق k حجمی از سرم برحسب ml است که موجب ۵۰ درصد همولیز می‌شود، ۰/۵ عدد ثابت بوده و فاکتور رقت در این تست ۰/۰۱ می‌باشد؛ چون سرم ۱۰۰ مرتبه رقیق شده است.

اندازه‌گیری آنتی‌بادی تام سرم: مقدار آنتی‌بادی کل سرم با روش، Siwicki و همکاران در سال ۱۹۹۴ اندازه‌گیری شد. در این روش، ابتدا سرم با استفاده از محلول ۰/۸۵ درصد کلرید سدیم به میزان یک دوم رقیق گردید؛ سپس مقدار پروتئین تام آن با روش رنگ سنجی برادفورد[2] (Kruger 1996) اندازه‌گیری شد. بعد از آن با استفاده از پلی اتیلن گلیکول[3] ۱۲ درصد، آنتی‌بادی‌های سرم رسوب داده شد و مقدار پروتئین محلول رویی اندازه‌گیری گردید. تفاوت بین مقدار پروتئین تام سرم با مقدار پروتئین مایع رویی پس ار ترسیب آنتی‌بادی‌ها، عبارت است از: میزان آنتی‌بادی کل سرم که بر حسب mg/ml بیان می‌گردد.

تجزیه و تحلیل آماری

برای تجزیه و تحلیل داده‌ها از روش آنالیز واریانس یک طرفه (ANOVA)، نرم‌افزار SPSS (نسخه ۱۹) و آزمون توکی (آزمون اختلاف حقیقی که به طور مخفف HSD نامیده می‌شود)، استفاده گردید. در تمام بررسی‌ها سطح معنی‌دار آزمون‌ها P<۰/۰۵ در نظر گرفته شد. هم‌چنین ترسیم نمودارها در فضای نرم‌افزار Excel (نسخه ۲۰۱۰) انجام گرفت.

نتایج

ثبت شاخص‌های فیزیکوشیمیایی آب حوضچه‌های پرورشی نشان داد که این شاخص‌ها در محدوده‌ی نرمال (Kelly 1998) برای ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان قرار دارند (جدول ۱). أثیر جیره‌های آزمایشی بر شاخص‌های رشد ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان در جدول ۲ نشان داده شده است. یافته‌ها، نشان دادند، شاخص‌های رشد (ضریب رشد ویژه، ضریب چاقی، وزن نهایی و درصد افزایش وزن) در ماهیان تغذیه شده با اشکال مختلف *L. casei* نسبت به گروه شاهد بیشتر است؛ امّا تفاوت آماری معنی‌دار تنها در تیمار تغذیه شده با فرم لیوفیلیزه باکتری *L. casei* مشاهده شد (P<۰/۰۵).

جدول ۱: میانگین شاخص‌های فیزیکوشیمیایی آب استخرهای پرورشی در طول مطالعه

دما (سانتی گراد)	اکسیژن (ppm)	pH	آمونیوم (ppm)	نیتریت (ppm)
۱۴/۷±۰/۵	۹/۳۶±۰/۹	۷/۵۶±۰/۲	۰/۵۷۲±۰/۰۱	۰/۰۱۰±۰/۰۲

* اعداد به صورت X±Standard Deviation بیان شده‌اند.

1- Alternative Pathway Total Hemolytic Complement Assay
2- Bradford method
3- Polyethylene glycol

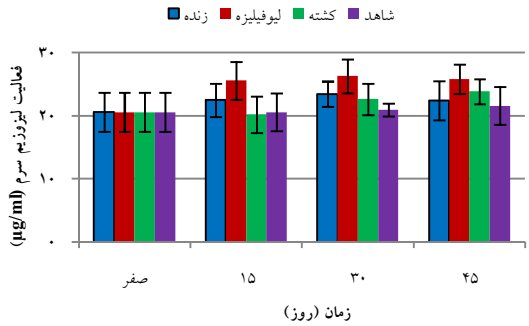
جدول ۲: نتایج حاصل از تأثیر اشکال مختلف L. casei برشاخص‌های رشد ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان به مدت ۳۰ روز

گروه‌های آزمایشی	نرخ رشد ویژه	وزن نهایی	درصد افزایش وزن	ضریب چاقی
زنده	۱/۵۴±۰/۱۳ ab	۹۲/۰۵±۸/۴۹ b	۱۸۵/۸۲±۱۷/۱۵ ab	۱/۰۹۲±۰/۱۰ a
لیوفیلیزه	۱/۶۸±۰/۱۶ a	۱۱۵/۲۸±۱۳/۱۸ a	۲۳۷/۶۵±۲۴/۴۶ a	۱/۱۰۶±۱/۰۵ a
کشته شده	۱/۵۵±۰/۲۳ ab	۹۰/۱۴±۱۲/۸ b	۱۸۸/۹۶±۲۹/۹۸ ab	۱/۰۶۴±۰/ ۹۵ a
شاهد	۱/۴۷±۰/۳۹ b	۸۶/۷۴±۱۰/۸۵ b	۱۸۲/۲۶±۴۷/۶۹ b	۱/۰۹۶±۰/۹۲ a

* داده‌ها به صورت X±Standard Deviation نشان داده شده‌اند (n=۱۰).

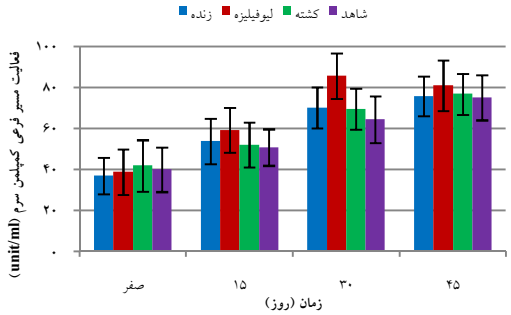
* حروف غیریکسان در هر ستون نشان‌دهنده‌ی اختلاف آماری معنی‌دار در سطح (P<۰/۰۵) می‌باشد.

یافته‌های حاصل از سنجش آنزیم لیزوزیم در سرم ماهیان در گروه‌های مختلف، نشان داد که با گذشت زمان، میزان فعالیت این آنزیم در تیمارهای تغذیه شده با اشکال گوناگون باکتری *L. casei* افزایش می‌یابد. بیشترین میزان فعالیت این آنزیم مربوط به تیمار تغذیه شده با شکل لیوفیلیزه باکتری بود؛ طوری که این افزایش فعالیت در تیمار لیوفیلیزه در روزهای ۱۵، ۳۰ و ۴۵ در مقایسه با گروه شاهد دارای اختلاف معنی‌دار در سطح P<۰/۰۵ بود. در تیمارهای زنده و کشته شده، اگرچه میزان فعالیت آنزیم لیزوزیم در روزهای مختلف افزایش یافت، اما اختلاف آماری معنی‌داری در مقایسه با گروه شاهد مشاهده نشد (P>۰/۰۵، نمودار ۱).



*نمودار ۱: میزان فعالیت آنزیم لیزوزیم سرم ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان تغذیه شده با اشکال مختلف L. casei داده‌ها به صورت میانگین±خطای استاندارد آورده شده‌اند. علامت * نشان‌دهنده‌ی اختلاف آماری معنی‌دار آن ستون با سایر ستون‌ها در سطح P<۰/۰۵ می‌باشد.*

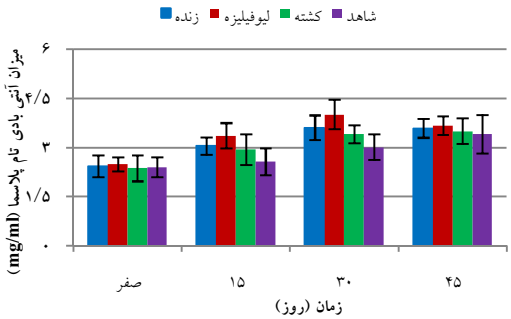
نتایج مربوط به اندازه‌گیری فعالیت مسیر فرعی کمپلمان سرم نیز نشان داد که با گذشت زمان، به‌تدریج میزان فعالیت آن در تمام تیمارهای تغذیه شده با اشکال مختلف *L. casei* ، افزایش یافته است. یافته‌ها نشان دادند که ۱۵ روز بعد از شروع تغذیه با *L. casei* ، اگرچه میزان فعالیت مسیر فرعی کمپلمان در تمام تیمارها افزایش می‌یابد، امّا تفاوت معنی‌داری در مقایسه با گروه شاهد مشاهده نمی‌شود (P>۰/۰۵). اما در روز ۳۰، فعالیت مسیر فرعی کمپلمان در تیماری که شکل لیوفیلیزه باکتری را دریافت کرده بود، نسبت به گروه شاهد به صورت معنی‌داری (P<۰/۰۵) بیشتر بود (نمودار ۲).



*نمودار ۲: میزان فعالیت راه آلترناتیو کمپلمان ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان تغذیه شده با اشکال مختلف L. casei داده‌ها به صورت میانگین±خطای استاندارد آورده شده‌اند. علامت * نشان‌دهنده‌ی معنی‌دار بودن در سطح (P<۰/۰۵) است.*

نتایج حاصل از اندازه‌گیری آنتی‌بادی کل سرم در گروه‌های مورد مطالعه نشان داد، در روزهای ۱۵ و ۳۰ میزان آنتی‌بادی کل سرم در تمام گروه‌های تغذیه شده با

پروبیوتیک *L. casei* در مقایسه با گروه شاهد افزایش می‌یابد. امّا در تیماری که شکل لیوفیلیزه باکتری را دریافت کرده بود، نسبت به گروه شاهد، دارای اختلاف معنی‌دار در سطح P<۰/۰۵ بود. در روز ۴۵ مطالعه با قطع تغذیه با اشکال مختلف باکتری میزان آنتی‌بادی کل سرم در همه‌ی تیمارها کاهش یافت و به سطح طبیعی آن، یعنی گروه شاهد برگشت (نمودار ۳).



نمودار ۳: میزان آنتی‌بادی تام سرم ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان تغذیه شده با اشکال مختلف L. casei. داده‌ها به صورت میانگین±خطای استاندارد آورده شده‌اند. علامت * نشان دهنده‌ی معنی‌دار بودن در سطح (P<۰/۰۵) است.

بحث

امروزه علاقه به استفاده از میکروارگانیسم‌های مفید، از جمله پروبیوتیک‌ها برای مقابله با عوامل بیماری‌زا افزایش یافته است. این روش می‌تواند جایگزین مناسبی برای آنتی‌بیوتیک‌ها باشد (Pérez-Sánchez et al. 2011). بررسی‌های متعدد نشان می‌دهند که پروبیوتیک‌ها اثرات مفید تغذیه‌ای، فیزیولوژیک و درمانی دارند. پروبیوتیک‌ها، باعث افزایش فعالیت فاگوسیتوزی و نیز افزایش توانایی ماکروفاژها برای از بین بردن میکروب‌ها می‌شوند (Panigrahi et al. 2004). در تحقیق حاضر، تأثیر اشکال زنده (کشت تازه و لیوفیلیزه) و شکل کشته شده با حرارت باکتری *L. casei* جدا شده از روده‌ی ماهی کپور معمولی بر رشد و ایمنی ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان بررسی شد. لیوفیلیزه کردن از فعالیت زیستی باکتری‌ها حفاظت کرده و ذخیره‌سازی آن‌ها را برای مدّت زمان طولانی میّسر می‌سازد (Chen et al. 2006). باکتری‌های اسید لاکتیک کشته شده با حرارت، به عنوان محرک‌های مهم سیستم ایمنی شناخته شده‌اند که می‌توانند باعث تحریک تولید سایتوکاین‌های مختلفی، از جمله TNF-α شوند. علاوه بر آن، این شکل از باکتری می‌تواند باعث افزایش فعالیت فاگوسیتوزی ماکروفاژها نیز گردد (Cheon et al. 2011).

استفاده از غلظت مناسب پروبیوتیک، به منظور داشتن فعالیت مطلوب آن ضروری است. امروزه ثابت شده است که میکروارگانیسم‌هایی که با غلظت کم‌تر از 10^6CFU/g تا 10^7 در فلور روده وجود دارند، توانایی ایجاد تعادل بین جمعیت خود و باکتری‌های ساکن روده را نداشته، در نتیجه، نمی‌توانند فعالیت مناسب و اثر قابل قبولی بر سلامتی میزبان داشته باشند (Atlas and Bartha 1997).

یکی از مهم‌ترین ویژگی پروبیوتیک‌ها افزایش ارزش غذایی و نیز بهبود پارامترهای رشد میزبان است. نتایج حاصل از این مطالعه نشان می‌دهد که اشکال مختلف *L. casei* شاخص‌های نرخ رشد ویژه، ضریب چاقی، وزن نهایی و درصد افزایش وزن را در ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان افزایش می‌دهند. در مطالعه‌ی حاضر، وزن نهایی، درصد وزن به دست آمده و نرخ رشد ویژه در گروهی که با جیره‌ی غذایی حاوی شکل لیوفیلیزه باکتری تغذیه شده‌ی بود نسبت به گروه شاهد و سایر تیمارها به صورت معنی‌داری (P<۰/۰۵) بیشتر بود. اگرچه اشکال زنده و کشته شده باکتری هم شاخص‌های رشد را در مقایسه با گروه شاهد افزایش دادند، امّا این تفاوت از لحاظ آماری معنی‌دار نبود (P>۰/۰۵). در توافق با نتایج به دست آمده Tukmechi و همکاران در سال ۲۰۱۱ نشان دادند تغذیه‌ی ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان با اشکال مختلف مخمر *ساکارو مایسس سرویسیه*[1] باعث افزایش معنی‌داری (P<۰/۰۵) در وزن نهایی ماهی نسبت به گروه شاهد می‌شود. Andani و همکاران در سال ۲۰۱۲ نشان دادند که افزودن *L. casei* با غلظت 5×10^7(CFU/g) به جیره‌ی غذایی ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان، باعث افزایش

1- *Saccharomyces cerevisiae*

معنی‌داری در ضریب رشد ویژه می‌شود. پروبیوتیک‌ها هنگام ورود به روده‌ی میزبان، به سطح روده متصل شده و از کربوهیدرات‌های موجود در محیط روده برای رشد و تولید شمار زیادی از آنزیم‌های هضم کننده، از جمله آمیلازها، پروتئازها و لیپازها استفاده می‌کنند. این آنزیم‌ها باعث افزایش هضم‌پذیری مواد آلی و پروتئین‌ها شده، در نتیجه باعث ایجاد رشد بیشتر و جلوگیری از اختلالات روده‌ای می‌شوند (Lara-Flores 2011). مطالعات قبلی نشان دادند که استفاده از پروبیوتیک‌ها در رژیم غذایی ماهی تیلاپیای نیل (*Oreochromis niloticus*) منجر به افزایش فعالیت آنزیم آلکالین فسفاتاز می‌گردد؛ در نتیجه، می‌توانند باعث تحریک، توسعه و رشد پرزهای سطح غشای سلول‌های انتروسیت روده‌ای شوند. افزایش این پرزها منجر به جذب بیشتر کربوهیدرات‌ها و لیپیدها و در نتیجه، افزایش بیشتر وزن می‌شوند (Lara-Flores 2011).

در اغلب جانوران، آنزیم لیزوزیم بخشی از سیستم دفاع غیراختصاصی را تشکیل می‌دهد (توکلی و اخلاقی ۱۳۸۷). فعالیت ضد باکتریایی این آنزیم، مربوط به هیدرولیز پیوندهای N- استیل گلوکز آمین و N- استیل مورامیک اسید است. این مولکول‌ها اجزای اصلی تشکیل دهنده‌ی لایه‌ی پپتیدوگلیکان دیواره‌ی سلولی باکتری‌ها هستند (Tukmechi et al. 2007). در ماهی، غلظت لیزوزیم خون در طی عفونت‌ها یا هجوم عوامل بیگانه افزایش می‌یابد (Panigrahi et al. 2005). بررسی‌ها نشان می‌دهند که غلظت آنزیم لیزوزیم، بعد از تزریق یک فراورده‌ی باکتریایی یا در پاسخ به عفونت باکتریایی، افزایش می‌یابد (Panigrahi et al. 2004). سنجش میزان فعالیت آنزیم لیزوزیم در سرم ماهیان تغذیه شده با اشکال مختلف *L. casei* نشان داد، هر سه شکل باکتری می‌توانند باعث افزایش فعالیت این آنزیم و در نتیجه، تقویت سیستم ایمنی شوند. شکل لیوفیلیزه باکتری، باعث افزایش معنی‌داری در فعالیت آنزیم لیزوزیم در روزهای ۱۵، ۳۰ و ۴۵ می‌شود. Panigrahi و همکاران در سال ۲۰۰۴ نشان دادند، افزودن اشکال زنده‌ی لیوفیلیزه پروبیوتیک *Lactobacillus rhamnosus* JCM 1136 به جیره‌ی غذایی ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان، باعث افزایش میزان فعالیت آنزیم لیزوزیم سرم، در مقایسه با گروه شاهد، می‌شود. Balcazar و همکاران در سال ۲۰۰۷ نشان دادند که فعالیت لیزوزیم سرم در ماهیانی که تراکم‌های $۱۰^{۷}$CFU/g و $۱۰^{۸}$ از باکتری‌های پروبیوتیک زنده را به مدت دو هفته دریافت کرده‌اند، به صورت معنی‌داری افزایش می‌یابد. Tukmechi و همکاران در سال ۲۰۰۷ بیان کردند تغذیه ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان با غلظت‌های متفاوت *Lactobacillus delbrueckii sp bulgaricus*. سبب افزایش میزان لیزوزیم سرم در سطح معنی‌دار (P<۰/۰۵)، نسبت به گروه شاهد می‌شود. مطالعات نشان داده‌اند که با فعال شدن سیستم ایمنی، میزان فعالیت آنزیم لیزوزیم افزایش می‌یابد (Panigrahi et al. 2004). بنابراین می‌توان نتیجه گرفت که افزودن پروبیوتیک *L. casei* به جیره‌ی غذایی ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان می‌تواند از طریق افزایش فعالیت آنزیم لیزوزیم سرم، سبب تقویت سیستم ایمنی شود.

فعالیت مسیر فرعی کمپلمان نیز یکی از مهم‌ترین شاخص‌های دفاع غیر اختصاصی در ماهی است. فعال شدن این سیستم باعث تحریک دفاع سلولی می‌شود. در مطالعه‌ی حاضر، میزان فعالیت مسیر فرعی کمپلمان ۱۵ روز بعد از شروع تغذیه با پروبیوتیک *L. casei* در تمام تیمارها نسبت به گروه شاهد، بیشتر بود. در روز ۳۰ تیمار تغذیه شده با شکل لیوفیلیزه باکتری *L. casei* افزایش معنی‌داری (P<۰/۰۵) در فعالیت مسیر فرعی کمپلمان در مقایسه با گروه شاهد نشان داد؛ در حالی که افزایش فعالیت مسیر فرعی کمپلمان در سایر تیمارها نسبت به گروه شاهد معنی‌دار نبود (P>۰/۰۵). Nikoskelainen و همکاران در سال ۲۰۰۳ مشاهده کردند که افزودن *Lactobacillus rhamnosus* به جیره‌ی غذایی ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان، باعث افزایش فعالیت سیستم کمپلمان می‌شود. افزایش فعالیت سیستم کمپلمان نشان دهنده‌ی فعّال شدن سیستم ایمنی است (Panigrahi et al. 2005).

Panigrahi و همکاران در سال ۲۰۰۵ نشان دادند، تغذیه‌ی ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان با شکل‌های زنده و لیوفیلیزه باکتری *Lactobacillus rhamnosus* با تراکم $۱۰^{۷}$CFU/g در روزهای ۲۰ و ۳۰، باعث افزایش معنی‌داری در فعالیت مسیر فرعی کمپلمان سرم می‌شود. در صورتی که شکل کشته شده با حرارت نمی‌تواند افزایش معنی‌داری در فعالیت راه آلترناتیو کمپلمان نشان دهد. Andani و همکاران در سال ۲۰۱۲ نشان دادند که تغذیه‌ی ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان با *L. casei* با تراکم $۵×۱۰^{۷}$CFU/g باعث افزایش معنی‌داری در فعالیت کمپلمان سرم می‌شود. مشابه یافته‌های Panigrahi و همکاران در سال ۲۰۰۵ نشان دادند با قطع جیره‌ی غذایی حاوی پروبیوتیک بعد از یک هفته میزان فعالیت سیستم کمپلمان کاهش می‌یابد؛ در بررسی حاضر نیز، میزان فعالیت این سیستم ۱۵ روز بعد از قطع مصرف باکتری نسبت به روزهای صفر، ۱۵ و ۳۰ کاهش یافت.

نتایج حاصل از اندازه‌گیری آنتی‌بادی کل سرم نشان داد، تغذیه‌ی ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان با اشکال مختلف پروبیوتیک *L. casei* می‌تواند باعث افزایش سطح آنتی‌بادی در سرم شود. در روزهای ۱۵ و ۳۰ میزان آنتی‌بادی کل در تمام گروه‌های تغذیه شده با پروبیوتیک *L. casei* ، در مقایسه با گروه شاهد، افزایش نشان داد؛ امّا این افزایش تنها در تیماری که شکل لیوفیلیزه باکتری را دریافت کرده بود، در مقایسه با گروه شاهد، دارای اختلاف معنی‌دار در سطح P<۰/۰۵ بود. بیشترین میزان آنتی‌بادی ۳۰ روز پس از تغذیه باپروبیوتیک *L. casei* مشاهده شد. میزان آنتی‌بادی کل سرم در تیمارهایی که شکل‌های زنده و لیوفیلیزه) را دریافت کرده بودند، نسبت به تیماری که با شکل کشته شده باکتری تغذیه شده بود، بیشتر بود. بررسی‌های انجام شده نشان می‌دهند که اشکال زنده LAB، نسبت به شکل کشته شده در القاء کردن پاسخ‌های ایمنی غیر اختصاصی، مانند فاگوسیتوز و سیستم کمپلمان عملکرد بهتری دارند (Panigrahi et al. 2010). در توافق با نتایج به دست آمده، Nikoskelainen و همکاران در سال ۲۰۰۳ نشان دادند که تغذیه‌ی ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان با *L. rhamnosus* با تراکم $۲/۸×۱۰^{۸}$ به مدّت یک هفته، باعث افزایش سطح آنتی‌بادی‌ها می‌شود. استفاده از مکمل‌های پروبیوتیک به صورت زنده یا کشته شده در جیره‌ی غذایی، سطح آنتی‌بادی‌های سرم را در ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان افزایش می‌دهد (Panigrahi et al. 2005) . در مطالعه‌ای که توسط Panigrahi و همکاران در سال ۲۰۰۵ انجام گرفت، سطح آنتی‌بادی سرم در ماهیانی که فرم‌های زنده و لیوفیلیزه باکتری را دریافت کرده بودند، افزایش یافت؛ امّا این افزایش تا پایان دوره‌ی پرورش ادامه نداشت و با قطع جیره‌ی حاوی پروبیوتیک، شاخص‌های سیستم ایمنی به سطح قبل از تغذیه با پروبیوتیک برگشت (Panigrahi et al. 2005). در مطالعه‌ی حاضر نیز ۱۵ روز بعد از قطع تغذیه با پروبیوتیک میزان آنتی‌بادی کل سرم کاهش یافت.

نتایج حاصل از مطالعه‌ی حاضر نشان می‌دهد استفاده از اشکال مختلف پروبیوتیک *L. casei* در جیره‌ی غذایی ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان، می‌تواند باعث افزایش رشد ماهی و نیز، تقویت سیستم ایمنی آن شود. یافته‌ها نشان می‌دهند شکل لیوفیلیزه باکتری می‌تواند در مقایسه با سایر اشکال، کارآمدتر باشد. مطالعات انجام شده‌ی نشان می‌دهند که شکل زنده‌ی پروبیوتیک (زنده و لیوفیلیزه) نسبت به شکل کشته‌ی آن، از کارایی بالاتری برای بهبود رشد و پاسخ‌های ایمنی در ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان برخوردار است (Panigrahi et al. 2011). نتایج بررسی حاضر در توافق با نتایج مطالعه‌ی Panigrahi و همکاران در سال ۲۰۱۱ نشان داد که شکل زنده (زنده و لیوفیلیزه) در مقایسه با شکل کشته باکتری مؤثرتر است. هم‌چنین مشخص شد که شکل لیوفیلیزه نسبت به شکل زنده، تأثیر بیشتری بر رشد و ایمنی ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان دارد. با توجه به نحوه‌ی استفاده از این پروبیوتیک در مطالعه حاضر (اسپری کردن روی غذا)، شکل لیوفیلیزه باکتری شانس بیشتری برای زنده ماندن در طی افزودن به غذا و نیز رسیدن به دستگاه گوارش ماهی دارد. اگرچه فرآیند

لیوفیلیزه کردن، فرآیندی زمان‌بر است، امّا از لحاظ اقتصادی مقرون به صرفه است؛ زیرا روشی ارزان برای تولید تعداد زیادی باکتری زنده به شکل مناسب (پودر لیوفیلیزه) می‌باشد (Panigrahi et al. 2005). بنابراین می‌شود نتیجه گرفت که پروبیوتیک‌ها را می‌توان به طور مؤثّر در پرورش آبزیان به‌کار برد.

تشکر و قدردانی

نویسندگان این مقاله مراتب تقدیر و تشکر خود را از دانشکده‌ی علوم و پژوهشکده‌ی آرتمیا و آبزیان دانشگاه ارومیه به سبب حمایت‌های مالی ابراز می‌دارند.

منابع

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

رحمتی‌اندانی، حمیدرضا؛ توکمه‌چی، امیر؛ مشکینی، سعید و ابراهیمی، هادی (۱۳۸۹). افزایش مقاومت ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان در برابر عفونت با *آئروموناس هیدروفیلا* و *یرسینیا روکری* با استفاده از *لاکتوباسیلوس*‌های جدا شده از روده ماهی کپور معمولی. مجله‌ی دامپزشکی ایران، دوره‌ی ۷، شماره‌ی ۲، صفحات ۹۰، ۲۶-۳۵.

Aguirre-Guzman, G.; Lara-Flores, M.; Genaro, J.; MartInez, S.; Campa-Córdova, A.I. and Luna-GonzAlez, A. (2012). The use of probiotics in aquatic organisms: A review. African Journal of Microbiology Research, 6: 4845-4857.

Amar, E.C.; Kitron, V.; Satoh, S.; Okamoto, N. and Watanabe, T. (2000). Effect of dietary β-carotene on immune response of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). Fisheries Science, 66: 1068-1075.

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.

Atlas, R.M. and Bartha, R. (1997). Microbial Ecology: fundamentals and applications. 4th edition. Addison Wesley Longman, the Benjamin/Cumming Publishing Company, Inc., pp: 694-698.

Azizpour, K. (2009). Biochemical characterization of lactic acid bacteria isolated from rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) of west azarbaijan, Iran. Research Journal of Biological Sciences, 4: 324-326.

Balcazar, J.L.; Blas, I.D.; Ruiz-Zarzula, I.; Vendrell, D.; Calvo, A.C.; Marquez, I.; et al. (2007). Changes in intestinal microbiota and humorl immune response following probiotic administration in brown trout *(Salmon trutta*). British Journal of Nutrition, 97: 522-527.

Chaiyasut, C. and Sirilun, S. (2012). Different strains of heat-killed *Lactobacilli* affected adhesion on Caco-2 and induced interleukin-6, interleukin-10 and interleukin-12 production. African Journal of Microbiology Research, 6(8): 1658-1662.

Chen, H.C.; Lin, C.W. and Chen, M.J. (2006). The Effects of Freeze Drying and Rehydration on Survival of Microorganisms in Kefir. Asian-Australian Journal of Animal Science, 1: 126-130.

Cheon, S.; Lee, K.W.; Kim, K.E.; Park, J.K.; Park, S.; Kim, C.; et al. (2011). Heat-killed *Lactobacillus acidophilus* La205 enhances NK cell cytotoxicity through increased granule exocytosis. Immunology Letters, 136: 171-176.

Hernandez, L.H.H.; Barrera, T.C.; Mejia, J.C.; Mejia, G.C.; Del Carmen, M.; Dosta, M.; et al. (2010). Effects of the commercial probiotic *Lactobacillus casei* on the growth, protein content of skin mucus and stress resistance of juveniles of the porthole livebearer *Poecilopsis gracilis* (Poecilidae). Aquaculture Nutrition, 16: 407-411.

Huang, S.S.; Fuc H.L.; Higgs, D.A.; Balfry, S.K.; Schulte, P.M. and Brauner, C.J. (2008). Effect of dietary canola oil level on growth performance, fatty acid composition and ion regulatory development of spring Chinook salmon parr *(Oncorhynchus tshawytscha*). Aquaculture, 274: 109-117.

Kirjavainen, P.V.; El-Nezami, H.S.; Salminen, S.J.; Ahokas, J.T. and Wright, F.A. (1999). The effect of orally administered viable probiotic and dairy *lactobacilli* on mouse lymphocyte proliferation. FEMS Immunology and Medical Microbiology, 26: 131–135.

Kruger, N.J. (1996). The Bradford method for protein quantization. In: Walker, J. M. Ed., the protein protocols Handbook, Vol. 1: Human Press, Totowa, NJ, USA, pp: 11- 15.

Kubulay, A. and Ulukoy, G. (2002). The effects of acute stress on rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). Turkish Journal of Zoology, 26: 249-254.

Lara-Flores, M. (2011). The use of probiotic in aquaculture: an overview**.** International Research Journal of Microbiology, 2: 471-478.

Lee, J.W.; Shin, J.G.; Kim, E.H.; Kang, H.E.; Yim, I.B. and Kim, J.Y. (2004). Immunomodulatory and antitumor effects *in vivo* by the cytoplasmic fraction of *Lactobacillus casei* and *Bifidobacterium longum*. Journal of Veterinary Science, 5: 41-48.

Li, Z.; Li, G.; Liu, H.; Zhao, J.; Jing, Y. and Yang, F. (2012). The analysis of the impacting factors of probiotics on immune responses. African Journal of Microbiology Research, 6: 2735-2743.

Meshkini, S.; Tafy, A.A.; Tukmechi, A. and Farhang-Pajuh, F. (2012). Effects of chitosan on hematological parameters and stress resistance in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). Veterinary Research Forum, 3(1): 49-55.

Nikoskelainen, S.; Ouwehand, A.C.; Bylund, G.; Salminen, S. and Lilius, E. (2003). Immune enhancement in rainbow trout (*Oncorhynchus rhamnosus*) by potential probiotic bacteria (*Lactobacillus rhamnosus*). Fish and Shellfish Immunology, 15: 443-452.

Panigrahi, A.; Kiron, V.; Kobayashi, T.; Puangkaew, J.; Saoh, S. and Sugita, H. (2004). Immune responses in rainbow trout *Oncorhynchus mykiss* induced by a potential probiotic bacteria *Lactobacillus rhamnosus* JCM 1136. Veterinary immunology and immunopathology, 102: 379-388.

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

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: 372-382.

Panigrahi, A.; Kiron, V.; Satoh, S. and Watanabe, T. (2010). Probiotic bacteria *Lactobacillus rhamnosus* influences the blood profile in rainbow trout *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum). Fish Physiology and Biochemistry, 36: 969-977.

Panigrahi, A.; Viswanath, K. and Satoh, S. (2011). Real-time quantification of immune gene expression in rainbow trout fed different forms of probiotic bacteria *lactobacillus rhamnosus*. Aquaculture Research, 42: 906-917.

Pérez-Sánchez, T.; Balcázar, J.L.; Merrifield, D.; Carnevali, O.; Gioacchini, G.; Blas, I.d.; et al. (2011). Expression of immune-related genes in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) induced by probiotic bacteria during *Lactococcus garvieae* infection. Fish and Shellfish Immunology, 31: 196-201.

Salminen, S.; Ouwehand, A.; Benno, Y. and Lee, Y. K. (1999). Probiotics: how should they be defined. Trends in Food Science and Technology, 10: 107-110.

Siwicki, A.K.; Anderson, D.P. and Rumsey, G.L. (1994). Dietary intake of immunostimulants by rainbow trout affects non- specific immunity and protection against furunculosis. Veterinary Immunology and Immunopathology, 41: 125-139.

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.

Tukmechi, A.; Rahmati Andani, H.R.; Manaffar, R. and Sheikhzadeh, N. (2011). Dietary administration of beta-mercapto-ethanol treated Saccharomyces cerevisiae enhanced the growth, innate immune response and disease resistance of the rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*. Fish and Shellfish Immunology, 30: 923-928.

Uribe, C.; Folch, H.R.; Enriquez, R. and Moran, G. (2011). Innate and adaptive immunity in teleost fish: a review. Veterinarni Medicina, 56(10): 486-503.

Xue, M.; Leo, L.; Wu, X.; Ren, Z.; Gao, P. and Yu, Y. et al. (2006). Effect of six alternative lipid sources on growth and tissue fatty acid composition in Japanese sea bass (*Lateolobrax japonicus*). Aquaculture, 260: 206-214.

Comparative effect of different forms of *Lactobacillus casei* on growth and immunity in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*)

Oshnukhah, M.[1]; Tukmechi, A.[2]; Farokhi, F.[3] and Manaffar, R.[4]

Received: 5.11.2012 Accepted: 10.06.2013

Abstract

The goal of this study was to compare the effect of different forms of *L. casei* as a probiotic bacterium on the growth and immunity of rainbow trout. For this purpose, four hundred and eighty rainbow trout (50±6.5 g initial weight) were prepared and acclimatized to the laboratory conditions for 10 days and then the fish randomly divided into four groups. One group selected as control and fed with a commercial diet without any supplementation. Other groups received commercial supplemented diet with live, lyophilized and heat killed forms of *L. casei* at concentration of 5×10^8 CFU/gr, respectively. Duration of the study was 45 days and sampling for biometry and humeral immunity (serum lysozyme activity, alternative complement activity and total antibody) were conducted at the day of 0, 15, 30 and 45. Results showed that the amount of final weight, weight gain percentage and specific growth rate statistically ($P<0.05$) were higher at the fish fed with live (fresh culture and lyophilized) and heat killed form of *L. ca*sei than the control. Also, the amounts of these parameters were higher at the fish fed lyophilized form of bacteria than other treatments. Immune assay showed serum lysozyme activity, alternative complement pathway and the level of serum total antibody increased at days 15 and 30 after receiving the different forms of *L. case*. The elevation of these parameters were significant ($P<0.05$) in fish fed with the lyophilized form of bacteria than the control. Also, results showed that the activity of lysozyme, alternative complement pathway and serum total antibody decreased in fish fed different forms of bacteria on day 45 (15 days after feeding withdrawal). Based on obtained results, it is concluded that addition of lyophilized form of *L. casei* into the rainbow trout diet could improve growth parameters and enhanced immunity in this fish.

Key words: Rainbow trout, Probiotic, *Lactobacillus casei*, Growth, Immunity

1- MSc. Student, Department of Biology, Faculty of Science, Urmia University
2- Assistant Professor, Department of Pathobiology and Quality Control, Artemia and Aquatics Animals Research Institute, Urmia University
3- Asociate Professor, Department of Biology, Faculty of Science, Urmia University
4- Assistant Professor, Department of Biotechnology, Artemia and Aquatics Animals Research Institute, Urmia University
Corresponding Author: Tukmechi, A., E-mail: a.tukmachi@urmia.ac.ir