تاثیر مکمل پره‌بیوتیک سل‌ماناکس بر بافت آبشش و کبد ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان در دوره پرورشی و مواجهه تجربی با بیماری یرسینیوزیس

امین خدادادی[۱]، عادل حقیقی[۲*]، حسن ملکی‌نژاد[۳و۴]، امیر توکمه‌چی[۵]، محمد افشارنسب[۶]

۱- دانش‌آموخته دکترای تخصصی گروه بهداشت، بهداشت و بیماری‌های آبزیان، دانشکده علوم تخصصی دامپزشکی، واحد علوم و تحقیقات، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران.

۲- دانشیار گروه پاتولوژی، دانشکده علوم تخصصی دامپزشکی، واحد علوم و تحقیقات، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران.

۳- استاد گروه فارماکولوژی و سم شناسی، دانشکده داروسازی، دانشگاه ارومیه، ارومیه، ایران.

٤- استاد مرکز تحقیقات سلامت مواد غذایی و آشامیدنی، دانشگاه علوم پزشکی ارومیه، ارومیه، ایران.

۵- دانشیار گروه باکتری‌شناسی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه ارومیه، ارومیه، ایران.

٦- استاد گروه بهداشت، بهداشت و بیماری‌های آبزیان، دانشکده علوم تخصصی دامپزشکی، واحد علوم و تحقیقات، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران.

*نویسنده مسئول مکاتبات: GPathologist@gmail.com

(دریافت مقاله: ۹٦/۹/۸ پذیرش نهایی: ۹۷/۱۰/۳۰)

چکیده

امروزه استفاده از ترکیبات پره‌بیوتیکی در جهان گسترش فراوانی یافته است. هدف از این مطالعه بررسی اثرات تغذیه‌ای غلظت‌های مختلف محصول تجاری پره‌بیوتیک سل‌ماناکس (حاوی ترکیبات فعال دیواره مخمر *ساکارومایسیس سرویزیه* به همراه مانان الیگوساکارید) بر بافت‌های آبشش و کبد ماهیان تغذیه‌شده با پره‌بیوتیک مذکور در طول دوره پرورش و در مواجهه تجربی با بیماری یرسینیوزیس بود. ماهیان قزل‌آلای رنگین‌کمان با میانگین وزنی ۱/٤۵±۱۹/۰۸ گرم به‌مدت ٦۰ روز با جیره حاوی غلظت‌های مختلف پره‌بیوتیک سل‌ماناکس (۰، ۰/۱، ۰/۵ و ۱ درصد) تغذیه شدند. در روز ٦۰ مطالعه، بیماری یرسینیوزیس توسط تزریق داخل صفاقی سوسپانسیون باکتری، در همه گروه‌های آزمایشی به صورت تجربی ایجاد گردید. نمونه‌های بافت‌شناسی در روزهای صفر، ۳۰ و ٦۰ مطالعه و همچنین پس از آزمون مواجهه تجربی تهیه شد. نتایج نشان‌دهنده تاثیر غلظت‌های مختلف پره‌بیوتیک سل‌ماناکس بر بافت‌های کبد و آبشش در روزهای ۳۰ و ٦۰ مطالعه بود. بهترین تاثیر بافتی در دوره پرورشی مربوط به تیمارهای تغذیه‌شده با غلظت‌های ۰/۱ و سپس ۰/۵ درصد بود و نیز در زمان مواجهه تجربی با بیماری یرسینیوزیس کمترین جراحات بافتی کبد و آبشش‌ها مربوط به تیمار تغذیه‌شده با غلظت ۰/۱ درصد پره‌بیوتیک سل‌ماناکس بود که از لحاظ آماری دارای تفاوت معنی‌داری با سایر گروه‌ها بود ($p<۰/۰۵$). با توجه به نتایج این بررسی مشخص شد که افزودن پره‌بیوتیک سل‌ماناکس به جیره ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان با غلظت ۰/۱ درصد، سبب بهبود پارامترهای بافتی در طول دوره پرورشی و کاهش ضایعات بافتی در زمان مواجهه با بیماری یرسینیوزیس می‌گردد.

کلیدواژه‌ها: پره‌بیوتیک، یرسینیوزیس، قزل‌آلای رنگین‌کمان، آبشش، کبد.

مقدمه

روند رو به رشد جمعیت و لزوم تأمین مواد غذایی جوامع یکی از بزرگترین دغدغه‌های فکری اکثر کشورها به شمار می‌رود. در این رابطه، صنعت کشاورزی و دامپروری و پرورش آبزیان نقش مهمی را در تامین غذای انسان به‌عهده دارند. در گذشته از روش‌های سنتی برای فعالیت‌های فوق بهره گرفته می‌شد، برای مثال تامین مواد غذایی از آبزیان مبتنی بر صید آن‌ها از منابع طبیعی مانند رودخانه‌ها، سدها، دریاچه‌ها، دریاها و غیره یا حتی پرورش به صورت نیمه‌متراکم بود. امروزه این روش‌های تامین غذا نه تنها نمی‌تواند نیاز انسان به غذا را برآورده سازد، بلکه موجب کاهش سریع ذخایر طبیعی نیز می‌گردد. امروزه از روش‌های متراکم و فوق‌متراکم جهت تولید آبزیان استفاده می‌شود. اما جایگزینی روش‌های سنتی پرورش با روش‌های متراکم یا فوق متراکم سبب دور کردن آبزیان از محیط طبیعی زندگی و ایجاد تغییرات ناخواسته نظیر افزایش تراکم، استرس، شیوع بیماری‌ها و غیره می‌گردد. از طرف دیگر در روش‌های نوین پرورشی، تامین نیازهای غذایی آبزیان و استفاده از محرک‌های رشد (طبیعی یا مصنوعی) از جمله مواردی محسوب می‌شوند که باید در مدیریت بهداشتی و پرورشی مد نظر قرار گیرند. شیوع بیماری‌های عفونی نیز به نوبه خود یکی از پیامدهای پرورش متراکم و فوق متراکم می‌باشد که می‌تواند سبب خسارات اقتصادی گردد (Khodadadi *et al.*, 2014). پروبیوتیک‌ها و پره‌بیوتیک‌ها می‌توانند به‌طور مستقیم و غیرمستقیم بر آبزیان تاثیر بگذارند. در حالت اول با تاثیر بر تعادل میکروبی روده جاندار و تغییر فلور میکروبی موکوس روده، پوست و آبشش آبزی، باعث ایجاد مقاومت در برابر بیماری می‌شوند و با ترشح ویتامین و مواد مغذی و نیز کمک به جذب مواد غذایی سبب افزایش رشد می‌گردند. در حالت دوم، در مجموع با بهبود کیفیت آب و محیط زیست آبزی باعث کاهش استرس می‌شوند که خود باعث کاهش احتمال بروز بیماری می‌شود، چرا که بین مقاومت میزبان، عوامل بیماری‌زا و محیط پرورش رابطه سه‌گانه برقرار می‌شود (Merrifield and Ringø, 2014). مکانیسم اثر پروبیوتیک‌ها بر اساس تولید ترکیبات بازدارنده در مقابل عوامل پاتوژن بیماری‌زا، رقابت در جهت اخذ مواد مغذی میزبان، مهار بیان ژن حدت باکتری‌های پاتوژن و با افزایش تغذیه و مصرف غذا در میزبان و در نهایت با تاثیرات آنزیمی سبب افزایش رشد و توسعه سیستم ایمنی بدن می‌گردد (Balcázar *et al.*, 2006; Merrifield *et al.*, 2010; Pérez-Sánchez *et al.*, 2013). استفاده از پروبیوتیک‌های گوناگون در ماهیان سردآبی، در مراحل مختلف پرورش و رشد تاثیرات متفاوتی دارد. از طرف دیگر نحوه مصرف پروبیوتیک‌ها نیز بر چگونگی تاثیر آن‌ها در گونه‌های مختلف ماهیان سرد آبی موثر می‌باشد. همچنین بسیاری از پروبیوتیک‌های مورد استفاده در صنعت آبزی پروری براساس تاثیرات آن‌ها در انسان، حیوانات، پستانداران و طیور انتخاب و مطالعه شده‌اند (Nikoskelainen *et al.*, 2001). این ترکیبات اگر چه برای انسان و سایر پستانداران می‌توانند مفید باشند ولی استفاده و بهره برداری از آن‌ها در ماهیان سردآبی که دارای شرایط اکولوژیکی متفاوت (اختلاف دما و میزبان) می‌باشند، شاید کارایی و تاثیر لازم را نداشته باشند که علت آن را در رشد باکتری‌های

مزوفیلیک تحت الگوهای خاص می‌توان ارزیابی نمود (Gatesoupe, 2002; El-Haroun *et al*., 2006; Balcázar *et al*., 2008; Pérez *et al*., 2010).

بررسی‌های متعددی در ارتباط با تاثیر پره‌بیوتیک‌های گوناگون بر پارامترهای رشد، ایمنی و مقاومت در برابر پاتوژن‌های مختلف انجام گرفته‌است (Merrifield and Ringø, 2014). اولین مطالعه در خصوص تاثیر پره‌بیوتیک MOS (manan oligosaccharides) در ماهی قزل‌آلا مربوط به استایکوف و همکاران در سال ۲۰۰۵ می‌باشد که در این بررسی نامبردگان اثربخشی پره‌بیوتیک مذکور را با میزان مصرف $2\ g/kg^{-1}$ در ماهیان قزل‌آلای پرورش‌یافته در قفس مورد ارزیابی قرار دادند. نتایج حاکی از رشد بهتر به همراه بهبود ضریب تبدیل غذایی بود. همچنین میزان سطح لیزوزیم سرم و میزان فعالیت کمپلمان در ماهیان تغذیه‌شده با پره‌بیوتیک فوق افزایش یافته بود (Staykov *et al*., 2005). محصول تجاری سل‌ماناکس (Celmanax®) یکی از محصولات شرکت آمریکایی VI-COR می‌باشد که در سال‌های اخیر به تولید انبوه تجاری رسیده است و حاوی ترکیبات فعال دیواره مخمر *ساکارومایسس سرویزیه* (*Saccharomyces cerevisiae*) و مانان الیگوساکارید (MOS) می‌باشد. این فراورده دارای حداقل ۳۰ درصد پروتئین خام، ٤ درصد چربی خام، ۱۲درصد رطوبت و ۱ درصد فیبر می‌باشد (Kaur and Bansal, 2006).

ساختار کبد در ماهی‌ها به عوامل مختلفی از قبیل جنس ماهی، سن ماهی، غذای در دسترس، درجه حرارت، تاثیرات غدد درون ریز و فصل تولید مثل بستگی دارد و یکی از مهم‌ترین غدد دستگاه گوارش می‌باشد که از لحاظ عملکردی مشابه با کبد پستانداران بوده و کارکردهائی از قبیل تولید صفرا، سم‌زدایی، تولید متابولیت‌های ثانویه، هومئوستاز متابولیکی بدن، تولید برخی از پروتئین‌های مهم بدن از قبیل پروتئین‌های پلاسما و فاکتورهای کمپلمانی را دارد. همچنین ذخیره چربی و رسوبات گلیکوژنی از مهم‌ترین وظایف کبد ماهیان می‌باشد. کبد برخی از آبزیان منبع ذخیره مقادیر زیادی روغن می‌باشد که به عنوان مثال می‌توان به کبد کوسه ماهی‌ها اشاره نمود که جهت ایجاد تعادل و شنای مداوم، نیازمند چربی و انرژی ذخیره‌ای فراوان در کبد می‌باشند. بسیاری از گونه‌های ماهیان از کبد به عنوان اندام اصلی ذخیره چربی در طول دوره تغذیه سنگین استفاده می‌کنند و در چنین زمان‌هایی ارتشاح گسترده چربی در پارانشیم کبد دیده می‌شود، لذا دژنره شدن چربی کبد یکی از مشکلات عمده ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان می‌باشد (Taheri Mirghaed *et al*., 2014). بیماری یرسینیوزیس در آبزیان که عامل آن باکتری *یرسینیا روکری* (*Yersinia ruckeri*) است، یک عفونت سیستمیک می‌باشد که بعد از ورود باکتری به خون، به کلیه اندام‌های بدن از جمله کلیه، قلب، ریه، کبد، طحال و چشم رفته و موجب تغییرات آسیب‌شناسی می‌شود. باکتری فوق در اندام‌های مذکور موجب ایجاد یک نکروز کانونی می‌شود و با پیشرفت بیماری ضایعات آسیب‌شناسی در اندام‌های خون‌ساز مثل کلیه، طحال ایجاد شده و خونریزی و نکروز نیز در آبشش‌ها و قلب مشاهده می‌شود. همچنین ایجاد نکروز در سلول‌های دستگاه گوارش موجب خونریزی، بالاخص در بخش‌های انتهایی روده می‌شود (Roberts, 2001).

با توجه به این‌که در سال‌های اخیر گسترش بیماری یرسینیوزیس در مزارع پرورشی ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان سبب بروز مشکلات و ضایعات اقتصادی فراوانی گردیده است، بنابراین هدف از این بررسی مطالعه تاثیر تغذیه‌ای غلظت‌های مختلف محصول تجاری سل‌ماناکس بر بافت آبشش‌ها و کبد در زمان پرورش و ارزیابی ضایعات آسیب‌شناسی ماهی قزل آلای رنگین کمان در برابر بیماری باکتریایی یرسینیوزیس بود.

مواد و روش‌ها

در این کارآزمایی بالینی شاهددار، تعداد ۶۰۰ قطعه ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان با میانگین وزنی ۰۸±۱۹/۱۰ گرم پس از اخذ گواهی سلامت از سازمان دامپزشکی از مزارع پرورشی ماهی شهرستان پیرانشهر استان آذربایجان غربی تهیه و به کمک تانکر مجهز به سیستم اکسیژن به سالن تکثیر و پرورش آبزیان پژوهشکده آرتمیا و جانوران آبزی دانشگاه ارومیه منتقل گردید. ماهیان در بدو ورود با آب نمک (۱۰ گرم در لیتر) ضدعفونی شده (Akhlaghi and Sharif Yazdi, 2008) و به مدت یک هفته جهت سازگاری با شرایط آزمایشگاه در حوضچه‌های فایبرگلاس ۱۰۰۰ لیتری نگه‌داری شدند. پرورش ماهیان و تغذیه آن‌ها با غلظت‌های مختلف پره‌بیوتیک مورد آزمایش، در حوضچه‌های ۳۰۰ لیتری از جنس فایبرگلاس و با تراکم ۵۰ قطعه ماهی در هر حوضچه (۳ تکرار) به مدت ۶۰ روز صورت گرفت. آب مورد نیاز هم از طریق یک حلقه چاه نیمه عمیق تأمین شد و در طول دوره پرورش پارامترهای فیزیکوشیمیایی آب پرورشی به طور روزانه اندازه‌گیری و ثبت شد.

- **طرح آزمایش:** از پره‌بیوتیک سل‌ماناکس محصول شرکت VI-COR ایالات متحده آمریکا که حاوی ترکیبات فعال دیواره مخمر *ساکارومایسس سرویزیه* به همراه مانان‌الیگوساکارید بود، استفاده شد (جدول ۱). تغذیه ماهیان با استفاده از غذای تجاری پلت (رشد یک EX TG_1، شرکت ۲۱ بیضاء، شیراز، ایران)، بر اساس درصد وزن زنده ماهی و دمای آب صورت گرفت (جدول ۲). ماهیان گروه اول (شاهد) فقط با غذای تجاری بدون افزودن هیچ‌گونه پره‌بیوتیک تغذیه گردیدند و ماهیان گروه‌های دوم تا چهارم به‌ترتیب با غذای تجاری حاوی پره‌بیوتیک سل ماناکس با مقادیر ۰/۱، ۰/۵ و ۱ درصد وزن غذا تغذیه شدند. لازم به ذکر است که برای افزودن پره‌بیوتیک مذکور، ابتدا مقدار غذای روزانه هر گروه محاسبه و سپس مقدار مورد نظر از پره‌بیوتیک در سرم فیزیولوژی استریل حل گردیده و به حالت سوسپانسیون درآمد و روی تمام قسمت‌های غذا اسپری گردید و به مدت ۲ ساعت در دمای اتاق و در محل تمیز خشک شد (Tukmechi *et al.*, 2011). همچنین تهیه غذا به شکل مذکور به صورت روزانه بوده و غذادهی روزانه هم در چهار نوبت و به طور منظم از ساعت ۸ صبح لغایت ۲۰ عصر انجام می‌شد.

جدول ۱- اجزای تشکیل‌دهنده پره‌بیوتیک سل‌ماناکس(®Celmanax)

مواد تشکیل‌دهنده	درصد	اسید آمینه	درصد
پروتئین خام	۳۲ درصد	آلانین	۲/٤۰ درصد
چربی خام	٤/۱۵ درصد	آرژنین	۱/۰۰ درصد
رطوبت	۱۲ درصد	اسید آسپارتیک	۳/۲۰ درصد
فیبر	۰/۵۰ درصد	سیستئین	۰/۳۰ درصد
ماده خشک	۸۸/۰۰ درصد	اسید گلوتامیک	٤/۰۰ درصد
مجموعه مواد قابل هضم	٦۰/۰۰ درصد	گلیسین	۱/۲۰ درصد
نام ماده معدنی	**میزان تشکیل‌دهنده**	هیستیدین	۰/٦۰ درصد
کلسیم	۰/۳۹ درصد	ایزولوسین	۱/۳۰ درصد
مس	۵/۲۵ درصد	لوسین	۲/۱۰ درصد
آهن	ppm ۱۸۸	لیزین	۱/۸۰ درصد
منیزیم	۰/۲۹ درصد	متیونین	۰/۵۰ درصد
منگنز	ppm ۱۸	فنیل‌آلانین	۱/٤۰ درصد
فسفر	۱/۲٦ درصد	پرولین	۱/٤۰ درصد
پتاسیم	۲/٦٤ درصد	سریاین	۱/۳۰ درصد
سدیم	۱/۰۰ درصد	ترئونین	۱/٤۲ درصد
سولفور	۰/٦۰ درصد	تریپتوفان	۰/۲٤ درصد
روی	ppm ۸۲	تیروزین	۱/۱۳ درصد

جدول ۲- آنالیز غذای تجاری رشد یک $EX\ TG_1$، شرکت ۲۱ بیضاء مورد استفاده

اجزا تشکیل‌دهنده	مقادیر تشکیل‌دهنده
پروتئین خام	**٤۵ درصد**
چربی خام	**۱٤ درصد**
انرزی قابل هضم	٤۳۰۰ (کیلوکالری)
خاکستر	**۱۰ درصد**
فیبر	**۲ درصد**
فسفر	**۰/۸ درصد**
رطوبت	**۱۰ درصد**

- **ایجاد آلودگی تجربی با *یرسینیا روکری*:** به منظور تعیین میزان مقاومت ماهیان تغذیه‌شده با غلظت‌های مختلف پره‌بیوتیک سل‌ماناکس در آلودگی تجربی، از باکتری بیماری‌زای *Yersinia ruckeri* (LMG 3279) استفاده شد. برای ایجاد آلودگی تجربی مورد نظر، بعد از ٦۰ روز تغذیه ماهیان با غلظت‌های مختلف پره‌بیوتیک؛ از هر گروه تعداد ۳۰ قطعه ماهی به صورت تصادفی انتخاب و در سه تکرار (هر تکرار با ۱۰ قطعه ماهی) تقسیم شدند. هوادهی به صورت ثابت انجام گرفت و روزانه ۵۰ درصد آب حوضچه‌های ۱۰۰ لیتری تعویض شد.

در ادامه، مقدار ۰/۱ ml از سوسپانسیون باکتری *Yersinia ruckeri* مورد آزمایش با تراکم $۱/۱\times۱۰^{۷}$ CFU/ml به‌صورت داخل صفاقی به همه تیمارهای مورد آزمایش تزریق شد. سپس مطالعه دو هفته دیگر ادامه پیدا کرد و در طی این مدت، ماهیان مورد آزمایش، روزانه دو بار از نظر تلفات و علائم بیماری شامل بی‌حالی، کاهش اشتها، بیرون زدگی چشم، تیرگی پوست و سایر علایم، مورد بررسی قرار گرفتند. همچنین به منظور تایید تلفات در اثر بیماری یرسینیوزیس، کشت باکتریایی از کلیه و کبد ماهیان تلف‌شده در محیط مکانکی و بلاداگار به‌عمل آمد (Tukmechi *et al.*, 2011).

- **نمونه‌برداری آسیب‌شناختی:** نمونه برداری از بافت‌های آبشش و کبد تمام گروه‌های آزمایشی و شاهد در چهار مرحله، یعنی پایان روزهای صفر، ۳۰، ٦۰ و نیز دو هفته بعد از آلودگی تجربی با باکتری *Y. ruckeri* صورت گرفت. لازم به ذکر است که ٢٤ ساعت قبل از نمونه برداری، غذادهی به ماهیان قطع شد و قبل از نمونه‌برداری از پودر گل میخک با غلظت ۲۰۰ قسمت در میلیون استفاده گردید. نمونه‌برداری به صورت تصادفی از هر تیمار با سه تکرار صورت پذیرفت و نمونه‌های بافتی به محلول ثبوتی فرمالین ۱۰ درصد (HS Code: 2912 11 00 Merck, Germany) منتقل گردید و پس از مراحل آماده‌سازی و تهیه مقطع، برش‌ها طبق روش معمول با هماتوکسیلین و ائوزین رنگ‌آمیزی گردیدند (Dimitroglou *et al.*, 2010a; Kristiansen *et al.*, 2011; Merrifield *et al.*, 2011). در نهایت جهت آنالیز بافتی و افزودن مقیاس (scale bar) از نرم‌افزار تخصصی Image J (نسخه ۱/٤٦ ساخت کشور آمریکا) استفاده گردید. شدت آسیب‌های بافتی به‌صورت: +۱ نشانگر آسیب خفیف، +۲ نشانگر آسیب ملایم، +۳ آسیب متوسط و +٤ نشانگر آسیب شدید رتبه‌بندی شد.

- **تحلیل آماری داده‌ها:** جهت تحلیل آماری داده‌های کمی از نرم‌افزار SPSS نسخه ۲۱ و روش آنالیز واریانس یک‌طرفه (one-way analysis of variance; ANOVA) با آزمون تعقیبی توکی (Tukey's test) استفاده شد. داده‌های به دست آمده به صورت mean±SD ارائه شدند. قبل از مقایسه میانگین‌ها، نرمال بودن داده‌ها با استفاده از آزمون کولموگروف-اسمیرنوف (Kolmogorov-Smirnov test) بررسی شد. برای مقایسه درجات آسیب‌های بافتی نیز از آزمون ناپارامتری کروسکال والیس (The Kruskal–Wallis test) و پس‌آزمون یو-من وایتنی (Mann-Whitney U test) استفاده شد. در تمام بررسی‌ها سطح معنی‌داری آزمون‌ها $p<۰/۰۵$ در نظر گرفته شد.

یافته‌ها

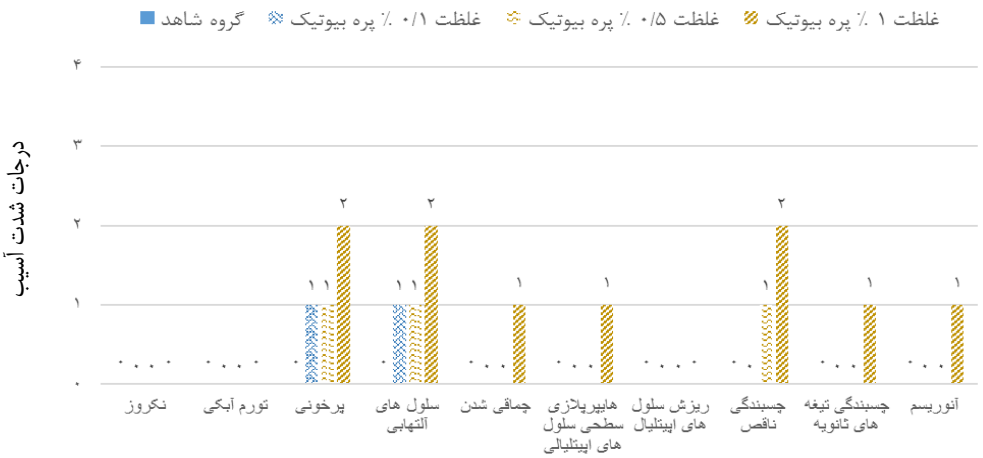
- شاخص‌های فیزیکوشیمیایی آب: نتایج مربوط به سنجش شاخص‌های فیزیکوشیمیایی آب در جدول ۳ ارائه شده است (Kelly, 1998). اختلاف آماری معنی‌داری از نظر شاخص‌های فیزیکوشیمیایی آب حوضچه‌های پرورشی ماهیان قزل‌آلا در طول دوره پرورش و آزمایش وجود نداشت.

جدول ۳- میانگین شاخص‌های فیزیکوشیمیایی آب حوضچه‌های پرورشی در طول مطالعه

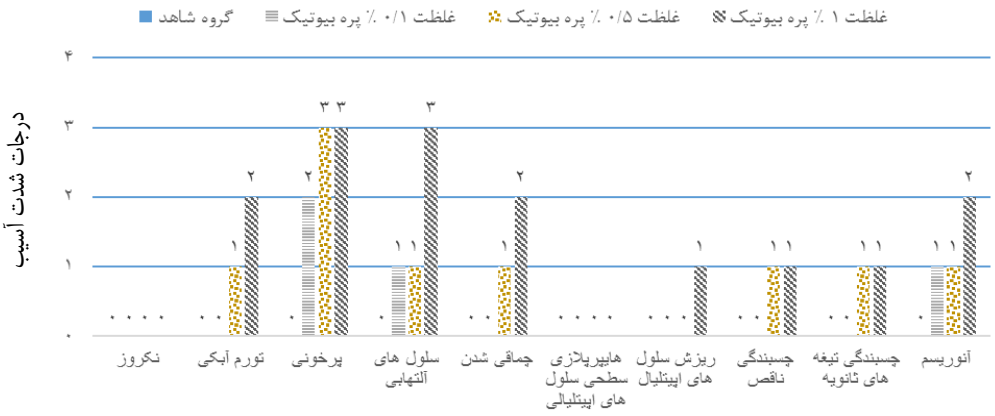
شاخص‌های سنجیده شده	تیمارها			
	شاهد	تیمار ۱	تیمار ۲	تیمار ۳
دما (درجه سلسیوس)	۱٤/۲±۰/۲[a]	۱٤/۲±۰/۲[a]	۱٤/۲±۰/۲[a]	۱٤/۲±۰/۱[a]
pH	۷/۸۸±۰/۱۱[a]	۷/۹۰±۰/۱۱[a]	۷/۷۸±۰/۱۱[a]	۷/۷٦±۰/۱[a]
اکسیژن محلول (mg/l)	۱۰/۱۰±۰/٤۱[a]	۹/۹۹±۰/۵۷[a]	۱۰/۰۱±۰/۳۹[a]	۱۰/۱۹±۰/٤٦[a]
آمونیوم (mg/l)	۰/۵٦±۰/۲۱[a]	۰/٦۱±۰/۲٦[a]	۰/۵۹±۰/۲۲[a]	۰/۵۹±۰/۱۹[a]
نیترات (mg/l)	۰/۰۱۲±۰/۰۰۵[a]	۰/۰۱۱±۰/۰۰٤[a]	۰/۰۰۸±۰/۰۰۲[a]	۰/۰۰۹±۰/۰۰۲[a]

مقادیر به صورت mean±SD بیان شده‌اند. حروف انگلیسی یکسان در هر ردیف نشان‌دهنده عدم وجود اختلاف معنی‌دار می‌باشد (p<۰/۰۵).

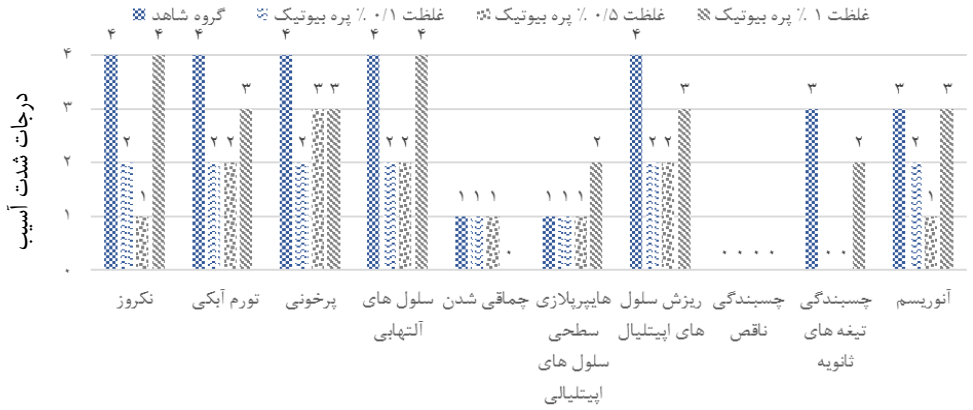
- **آسیب‌شناسی آبشش‌ها:** نمونه‌های بافتی اخذ شده از تمامی گروه‌ها در روز اول دوره آزمایش یکسان بود و هیچ تغییر بافتی و پاتولوژیک قابل ملاحظه‌ای در آبشش‌ها مشاهده نشد. اما در روز سی‌ام مطالعه، تغییرات پاتولوژیک از قبیل آنوریسم (اتساع)، چسبندگی تیغه‌های آبششی ثانویه، ریزش برخی از سلول‌های اپتلیال، هایپرپلازی سلول‌های اپیتلیالی، حضور سلول‌های التهابی و پرخونی با درجات خفیف در برخی از ماهیان تغذیه‌شده با غلظت ۱ درصد از پره‌بیوتیک مورد آزمایش (ماهیان تیمار ۳) قابل مشاهده بود (نمودار ۱). همچنین در روز ٦۰ مطالعه، میزان تغییرات بافتی در گروه‌های مختلف تغذیه‌شده با پره‌بیوتیک سل‌ماناکس در مقایسه با گروه شاهد به صورت معنی‌داری متفاوت بود (p<۰/۰۵) و بیشترین میزان آنوریسم (اتساع)، چسبندگی تیغه‌های ثانویه، ریزش برخی از سلول‌های اپتلیال، هایپرپلازی سلول‌های اپیتلیالی، حضور سلول‌های التهابی و پرخونی در تیمارهای تغذیه‌شده با غلظت‌های ۰/۵ و ۱ درصد از پره‌بیوتیک سل‌ماناکس قابل مشاهده بود (نمودار ۲ و شکل ۱). اما از طرف دیگر بعد از ایجاد آلودگی تجربی با باکتری *Y. ruckeri* میزان جراحات بافتی از قبیل نکروز، تورم آبکی، چماقی‌شدن، خونریزی، چسبندگی تیغه‌های ثانویه و آنوریسم در تیمارهای تغذیه‌شده با غلظت‌های ۰/۱ و ۰/۵ درصد از پره‌بیوتیک مذکور، نسبت به تیمارهای شاهد و تیمار تغذیه‌شده با غلظت ۱درصد از پره‌بیوتیک سل‌ماناکس به صورت معنی‌دار کاهش یافته بود که این یافته نشان از تاثیر معنی‌دار غلظت‌های ۰/۱ و ۰/۵ درصد پره‌بیوتیک سل‌ماناکس بر ضایعات آبشش در اثر مواجهه با باکتری یرسینیا می‌باشد (p<۰/۰۵) (نمودار ۳ و شکل ۲).



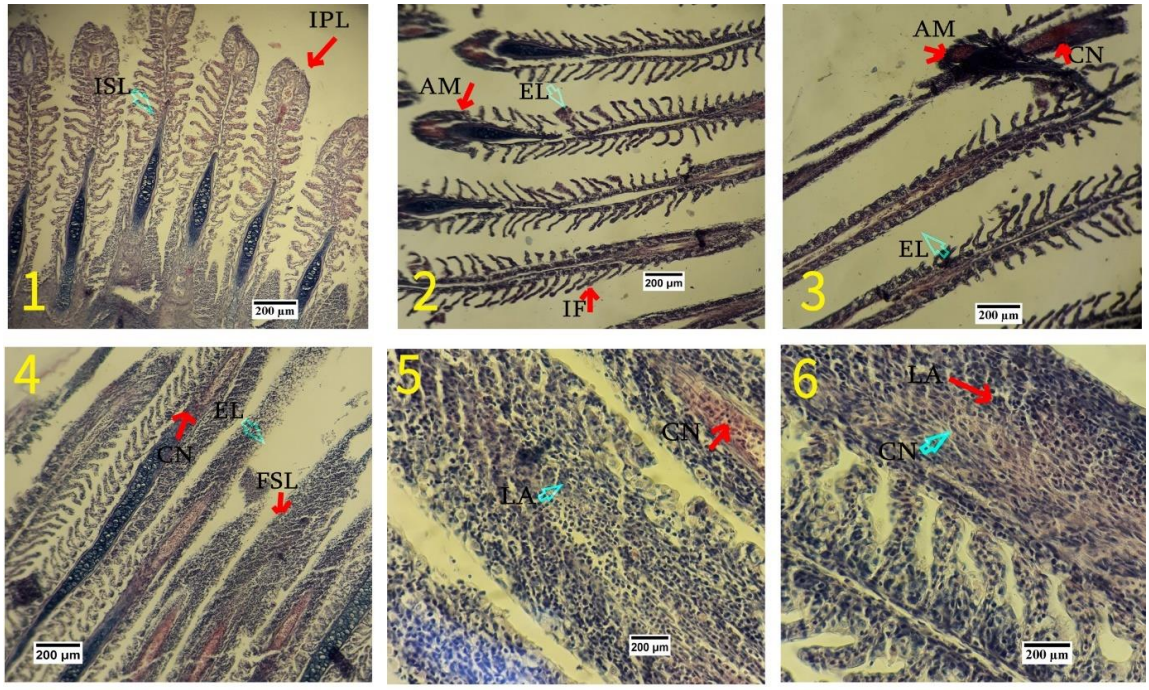
نمودار ۱- بررسی تغییرات پاتولوژیک آبشش تیمارهای مختلف متعاقب ۳۰ روز تغذیه با غذای حاوی غلظت‌های مختلف پره‌بیوتیک سل‌ماناکس (گروه شاهد تغذیه با غذای استاندارد، تیمار ۱: گروه تغذیه‌شده با غلظت ۰/۱ درصد پره‌بیوتیک، تیمار ۲: گروه تغذیه‌شده با غلظت ۰/۵ درصد پره‌بیوتیک و تیمار ۳: گروه تغذیه‌شده با غلظت ۱ درصد پره‌بیوتیک).



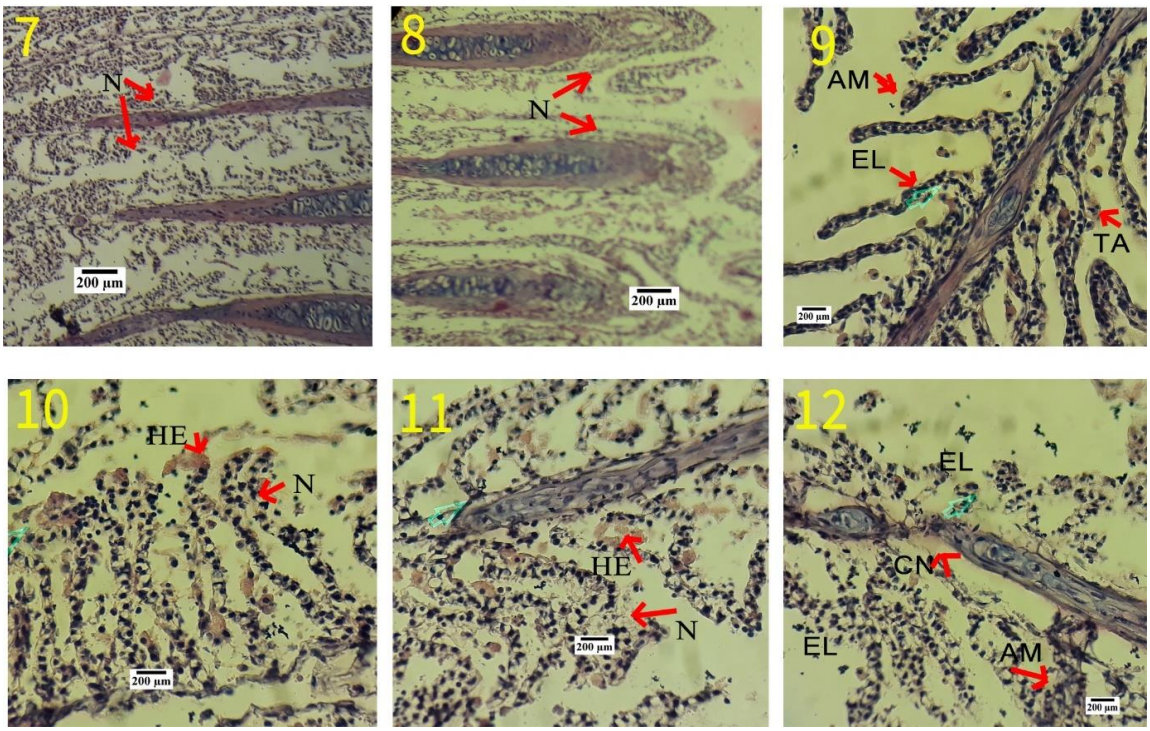
نمودار ۲- بررسی تغییرات پاتولوژیک آبشش تیمارهای مختلف متعاقب ٦۰ روز تغذیه با غذای حاوی غلظت‌های مختلف پره‌بیوتیک سل‌ماناکس (گروه شاهد تغذیه با غذای استاندارد، تیمار ۱: گروه تغذیه‌شده با غلظت ۰/۱ درصد پره‌بیوتیک ، تیمار ۲: گروه تغذیه‌شده با غلظت ۰/۵ درصد پره‌بیوتیک و تیمار ۳: گروه تغذیه‌شده با غلظت ۱ درصد پره‌بیوتیک).



نمودار ۳- بررسی تغییرات پاتولوژیک آبشش تیمارهای تغذیه‌شده با غلظت‌های مختلف پره‌بیوتیک سل‌ماناکس بعد از آزمون مواجهه‌سازی با باکتری *یرسینا روکری* (گروه شاهد تغذیه با غذای استاندارد، تیمار ۱: گروه تغذیه‌شده با غلظت ۰/۱ درصد پره‌بیوتیک، تیمار ۲: گروه تغذیه‌شده با غلظت ۰/۵ درصد پره‌بیوتیک و تیمار ۳: گروه تغذیه‌شده با غلظت ۱ درصد پره‌بیوتیک).



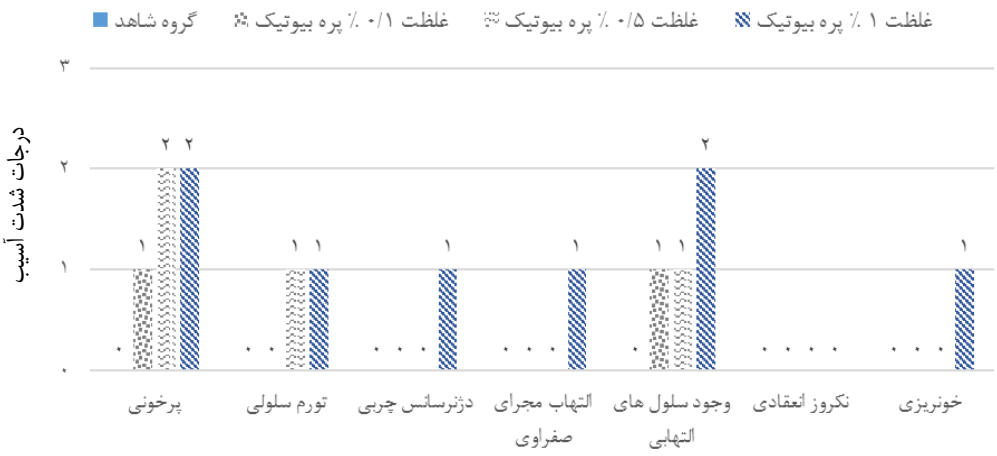
شکل ۱- نمای ریزبینی از بافت آبشش ماهیان تیمارهای مختلف در روز شصت مطالعه و تاثیر مصرف غلظت‌های مختلف پره‌بیوتیک سل‌ماناکس بر جراحات بافتی آبشش در ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان (رنگ‌آمیزی هماتوکسیلین-ائوزین، درشت‌نمایی ×۱۰۰). اعداد لاتین نشانگر تیمارهای مختلف هستند. ۱: گروه شاهد روز ٦٠ مطالعه، ۲: گروه تغذیه‌شده با غلظت ۰/۱ درصد پره‌بیوتیک سل‌ماناکس روز ٦٠ مطالعه ، ۳: گروه تغذیه‌شده با غلظت ۰/۵ درصد پره‌بیوتیک سل‌ماناکس روز ٦٠ مطالعه، ٤، ٥ و ٦: گروه تغذیه‌شده با غلظت ۱ درصد پره‌بیوتیک سل‌ماناکس، (تجمع خون CN، ریزش سلول‌های اپیتلیال EL، اتساع AM، چسبندگی FSL، چسبندگی ناقص IF، آبشش سالم IPL، تیغه ثانویه سالم ISL، خونریزی HE، تورم آبکی TA، سلول‌های آماسی LA، نکروز N).



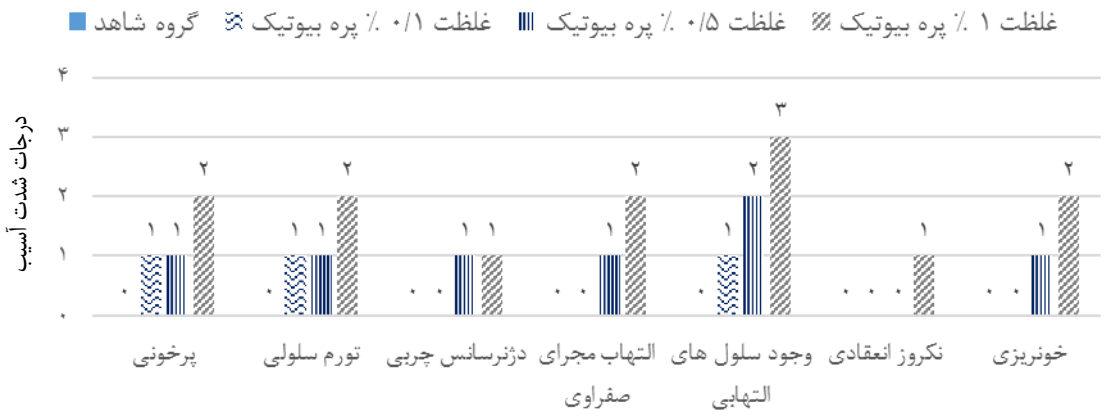
شکل ۲- نمای ریزبینی از بافت آبشش ماهیان تیمارهای مختلف در بعد از مواجهه تجربی با باکتری *یرسینیا روکری* و تاثیر مصرف غلظت‌های مختلف پره‌بیوتیک سل ماناکس بر میزان کاهش ضایعات بافتی در ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان (رنگ‌آمیزی هماتوکسیلین-ائوزین، درشت‌نمایی ×۱۰۰). اعداد لاتین نشانگر تیمارهای مختلف هستند. ۷ و ۸: گروه شاهد، ۹: گروه تغذیه‌شده با غلظت ۰/۱ درصد پره‌بیوتیک سل‌ماناکس، ۱۰ و ۱۱: گروه تغذیه‌شده با غلظت ۰/۵ درصد پره‌بیوتیک سل‌ماناکس، ۱۲: گروه تغذیه‌شده با غلظت ۱ درصد پره‌بیوتیک سل‌ماناکس، (تجمع خون CN، ریزش سلول‌های اپیتلیالی EL، اتساع AM، چسبندگی FSL، چسبندگی ناقص IF، آبشش سالم IPL، تیغه ثانویه سالم ISL، خونریزی HE، تورم آبکی TA، سلول‌های آماسی LA، نکروز N).

- **آسیب‌شناسی کبد:** نمونه‌های اخذشده از بافت کبد در تمامی گروه‌ها در روز اول پرورش به صورت یکنواخت بود و هیچ‌گونه تغییر پاتولوژیک قابل ملاحظه‌ای در کبد ماهیان گروه‌های مورد مطالعه مشاهده نشد. اما در روز سی‌ام مطالعه، نتایج نشان‌دهنده وجود برخی از تغییرات پاتولوژیک از قبیل پرخونی و دژنرسانس چربی هپاتوسیت‌ها به صورت جزئی در ماهیان تغذیه‌شده با غلظت های مختلف پره‌بیوتیک سل‌ماناکس بود (نمودار ٤). همچنین در روز ٦٠ مطالعه شدت برخی از جراحات کبدی از قبیل تغییر چربی هپاتوسیت‌ها و پرخونی نسبت به روز سی‌ام، در تمام غلظت‌ها افزایش یافته بود و همچنین در تیمار تغذیه‌شده با غلظت ۱درصد از پره‌بیوتیک سل‌ماناکس در روز٦٠ مطالعه، تغییرات بافتی از قبیل وجود سلول‌های التهابی (لنفوسیت‌ها)، هایپرپلازی مجاری صفراوی و خونریزی نیز مشاهده شد که نشان از عملکرد بهتر و معنی‌دار غلظت‌های ۰/۱ و ۰/۵ درصد پره‌بیوتیک مذکور در بلند مدت، نسبت به تیمار تغذیه‌شده با غلظت ۱ درصد آن بود ($p<۰/۰۵$) (نمودار ۵ و شکل ۳). همچنین بعد از ایجاد آلودگی تجربی با باکتری *Y. ruckeri* تغییرات پاتولوژیک از قبیل خونریزی شدید، نکروز انعقادی سلول‌های کبدی

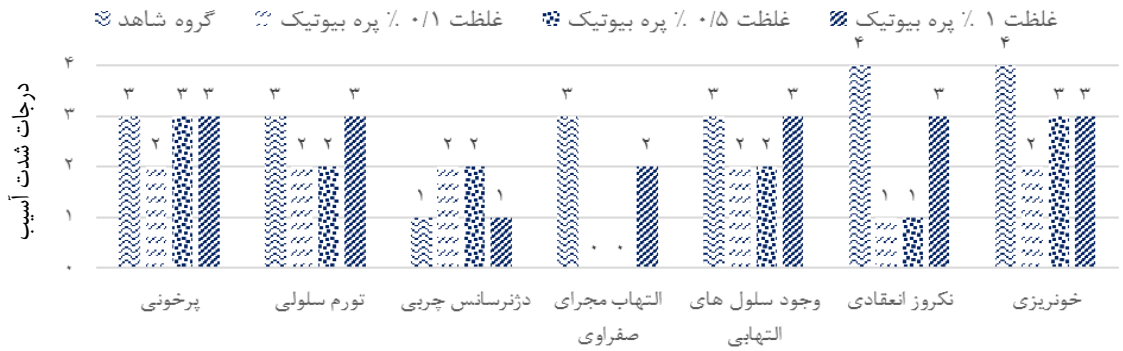
(مشاهده هسته‌های پیکنوزه و کاریورکسی) و تغییرات دژنراتیو هپاتوسیت‌ها در گروه شاهد مشاهده شد که وجود این آسیب‌ها در ماهیان تیمارهای تغذیه‌شده با غلظت های ۰/۱ و ۰/۵ درصد از پره‌بیوتیک سل‌ماناکس بسیار کمتر بود و نشان از تاثیر معنی‌دار استفاده از غلظت‌های مذکور این پره‌بیوتیک بر کاهش ضایعات بافتی در کبد داشت ($p<۰/۰۵$) (نمودار ٦ و شکل ۳).



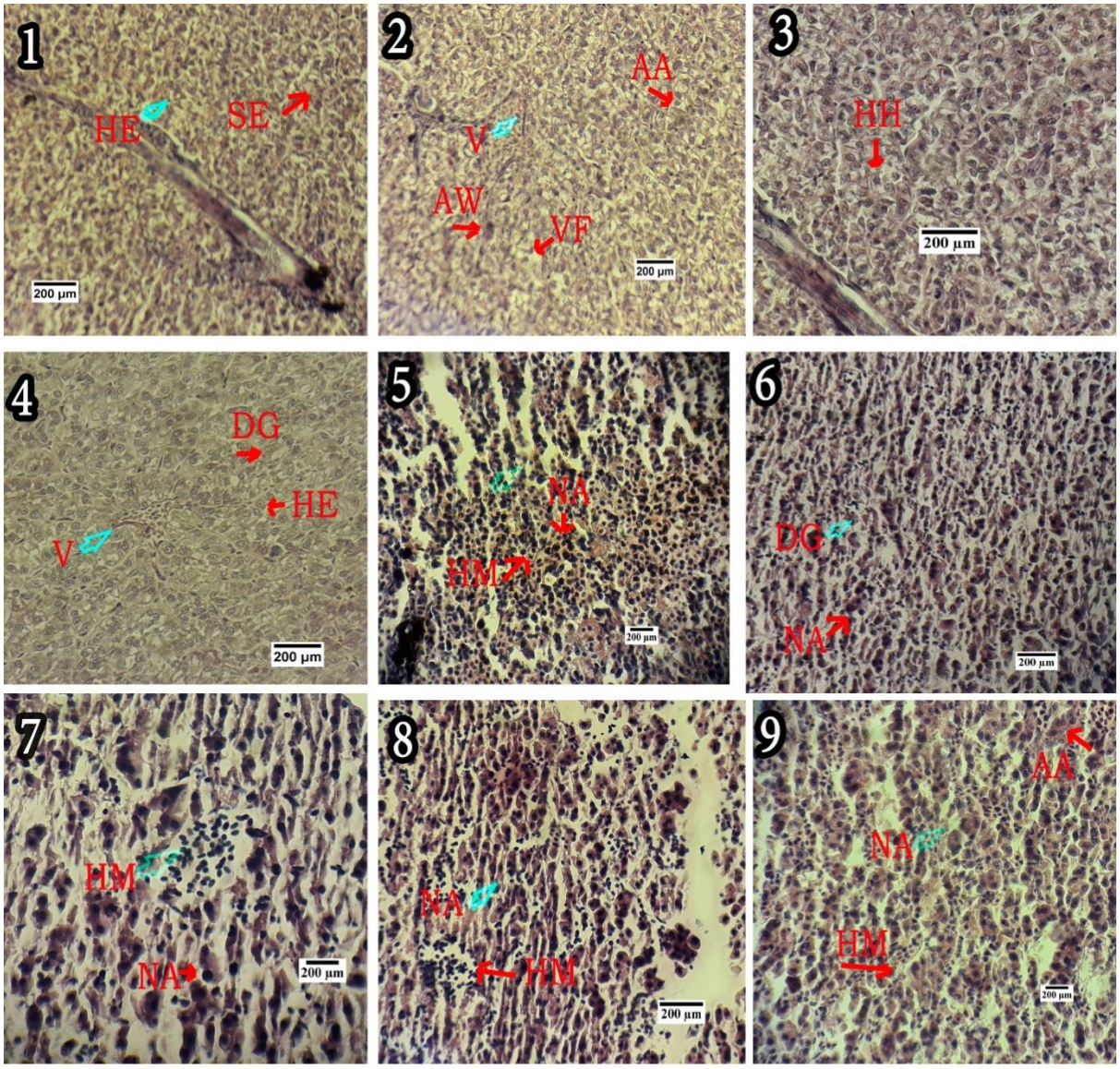
نمودار ٤- بررسی تغییرات پاتولوژیک کبد تیمارهای مختلف متعاقب ۳۰ روز تغذیه با غذای حاوی غلظت‌های مختلف پره‌بیوتیک سل‌ماناکس (گروه شاهد تغذیه با غذای استاندارد، تیمار ۱: گروه تغذیه‌شده با غلظت ۰/۱ درصد پره‌بیوتیک، تیمار ۲: گروه تغذیه‌شده با غلظت ۰/۵ درصد پره‌بیوتیک و تیمار ۳: گروه تغذیه‌شده با غلظت ۱ درصد پره‌بیوتیک).



نمودار ۵- بررسی تغییرات پاتولوژیک کبد تیمارهای مختلف متعاقب ۶۰ روز تغذیه با غذای حاوی غلظت‌های مختلف پره‌بیوتیک سل‌ماناکس (گروه شاهد تغذیه با غذای استاندارد، تیمار ۱: گروه تغذیه‌شده با غلظت ۰/۱ درصد پره‌بیوتیک، تیمار ۲: گروه تغذیه‌شده با غلظت ۰/۵ درصد پره‌بیوتیک و تیمار ۳: گروه تغذیه‌شده با غلظت ۱ درصد پره‌بیوتیک).



نمودار ۶- بررسی تغییرات پاتولوژیک کبد تیمارهای تغذیه‌شده با غلظت‌های مختلف پره‌بیوتیک سل‌ماناکس بعد از آزمون مواجهه‌سازی با باکتری *یرسینیا روکری* (گروه شاهد تغذیه با غذای استاندارد، تیمار ۱: گروه تغذیه‌شده با غلظت ۰/۱ درصد پره‌بیوتیک، تیمار ۲: گروه تغذیه‌شده با غلظت ۰/۵ درصد پره‌بیوتیک و تیمار ۳: گروه تغذیه‌شده با غلظت ۱ درصد پره‌بیوتیک).



شکل ۳- نمای ریزبینی بافت کبد ماهیان تیمارهای مختلف در روز ٦٠ دوره پرورشی و بعد از مواجهه تجربی با باکتری *یرسینیا روکری* و تاثیر مصرف غلظت‌های مختلف پره‌بیوتیک سل‌ماناکس بر میزان کاهش ضایعات بافتی در ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان (رنگ‌آمیزی هماتوکسیلین-ائوزین، درشت‌نمایی ×۱۰۰). اعداد لاتین نشانگر تیمارهای مختلف هستند. ۱: گروه شاهد در روز ٦٠ دوره پرورشی، ۲: گروه تغذیه‌شده با غلظت ۰/۱ درصد پره‌بیوتیک سل‌ماناکس در روز ٦٠ دوره پرورشی، ۳: گروه تغذیه‌شده با غلظت ۰/۵ درصد پره‌بیوتیک سل‌ماناکس در روز ٦٠ دوره پرورشی، ٤: گروه تغذیه‌شده با غلظت ۱ درصد پره‌بیوتیک سل‌ماناکس در روز ٦٠ دوره پرورشی، ۵: گروه شاهد بعد از مواجهه تجربی، ٦: گروه تغذیه‌شده با غلظت ۰/۱ درصد پره‌بیوتیک سل‌ماناکس بعد از مواجهه تجربی، ۷: گروه تغذیه‌شده با غلظت ۰/۵ درصد پره‌بیوتیک سل‌ماناکس بعد از مواجهه تجربی، ۸ و ۹: گروه تغذیه‌شده با غلظت ۱ درصد پره‌بیوتیک سل‌ماناکس بعد از مواجهه تجربی، (هپاتوسیت نرمال HE؛ ورید V؛ سینوزوئید نرمال SE؛ خونریزی HM؛ نکروز انعقادی NA؛ سلول‌های التهابی AW؛ دژنراسیون چربی هپاتوسیت‌ها DG؛ تورم سلولی AA؛ پرخونی HH؛ التهاب AF؛ واکوئل چربی VF).

بحث و نتیجه‌گیری

امروزه در صنعت آبزی‌پروری استفاده از انواع ترکیبات پروبیوتیکی، پره‌بیوتیکی و سینبیوتیکی به‌طور گسترده‌ای رواج یافته است. این ترکیبات با تاثیرات مثبت خود بر رشد و مقاومت بدن میزبان و همچنین در برخی موارد به‌عنوان جایگزین مناسب آنتی‌بیوتیکی و واکسیناسیون مورد استفاده قرار می‌گیرد. تاریخچه استفاده از پره‌بیوتیک در دامپزشکی از اوایل سال ۲۰۰۰ میلادی و در آبزیان از حدود سال ۲۰۰٤ میلادی با الیگوساکاریدهای anolyne، transglycated oligosaccharides و lactulose آغاز گردید. سرآمد پره‌بیوتیک‌های مورد مطالعه در آبزیان MOS، FOS و بتاگلوکان می‌باشد و سایر پره‌بیوتیک‌ها کمتر در آبزیان مورد ارزیابی قرار گرفته‌اند (Khodadadi *et al*., 2017). اکثر مطالعات پره‌بیوتیک‌ها در آبزیان با شاخص‌های رشد از قبیل ضریب رشد ویژه، ضریب تبدیل غذایی و فاکتورهای ایمنی سنجیده شده است و مطالعات بافت‌شناسی و آسیب‌شناختی بسیار کمی در ارتباط با تاثیرات پره‌بیوتیک بر بافت‌های میزبان آبزی صورت پذیرفته است (به‌غیر از بافت دستگاه گوارش) و هیچ‌گونه مطالعه‌ای با زمینه بافت‌شناسی نسبت به تاثیرات پره‌بیوتیک MOS به همراه ترکیبات دیواره مخمر *ساکرومایسیس سروسیه* در ماهی قزل‌آلا و بافت‌های کبد و آبشش در دوره پرورش و مواجهه با بیماری یرسینیوزیس صورت نپذیرفته است. در سالهای اخیر با استفاده از پره‌بیوتیک‌های اینولین، مانان الیگوساکاریدها، گالاکتو الیگوساکاریدها و فروکتوالیگوساکاریدها در غالب محصولات تجاری تغذیه‌ای، بر روی گونه‌های ماهی آزاد آتلانتیک، ماهی brook trout (*Salvelinus fontinalis*)، ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان و ماهی Arctic charr (*Salvelinus alpinus*) پژوهش‌هایی انجام گرفته است (Merrifield *et al*., 2010; Merrifield and Ringø, 2014). در این ارتباط اولین مطالعه در مورد تاثیر پره‌بیوتیک در ماهی قزل‌آلا مربوط به پژوهش استایکوف و همکاران در سال ۲۰۰۵ می‌باشد. در این بررسی ایشان اثربخشی پره‌بیوتیک مانان الیگوساکارید (MOS) با دز $2\ g/kg^{-1}$ در ماهیان قزل‌آلای پرورش‌یافته در قفس را مورد ارزیابی قرار دادند که نتایج حاصله حاکی از رشد بهتر به همراه بهبود ضریب تبدیل غذایی بود. همچنین میزان سطح لیزوزیم سرم و میزان فعالیت کمپلمان در ماهیان تغذیه‌شده با پره‌بیوتیک مذکور افزایش یافته بود (Staykov *et al*., 2005). در بررسی دیگری سیلی و همکاران در سال ۲۰۰۷ ماهیان قزل‌آلای رنگین‌کمان با دامنه وزنی ١٤ گرم را با محصول تجاری GroBiotic®-A که حاوی مخلوطی از مواد مغذی و مخمر brewer's بود، با دز $20g/kg^{-1}$ مورد ارزیابی قرار دادند که هیچ‌گونه تغییری را در پارامترهای مختلف رشد مشاهده ننمودند ولی میزان بقاء ماهیان استفاده‌کننده از محصول مذکور بعد از آزمون مواجهه‌سازی با بیماری ویروسی نکروز عفونی بافت‌های خونساز (IHN) بیشتر از گروه کنترل بود (Sealy *et al*., 2007). در یک بررسی دیگر استایکوف و همکاران در سال ۲۰۰۷ از غلظت ppm ۲۰۰۰ پره‌بیوتیک MOS به‌مدت ٤۲ روز در جیره غذایی ماهیان قزل‌آلا استفاده نمودند که افزایش پارامترهای ایمنی، کاهش ضریب تبدیل غذایی و تلفات و بهبود پارامترهای ایمنی در اثر مصرف پره‌بیوتیک مذکور را مشاهده نمودند. همچنین نتایج بافت‌شناسی تحقیق

مذکور، نشان‌دهنده افزایش تراکم و طول ویلی‌های روده انتهـایی بـود (Staykov *et al.*, 2007). در بررسـی صورت‌پذیرفتـه توسـط کوسـتودیو در سـال ۲۰۱٤ نیـز مشاهده گردید که استفاده از غلظت g/kg ٤ پره‌بیوتیـک MOS در تغذیه هامور ماهی اروپایی (*Dicentrarchus labrax*) تاثیر معنی‌داری بر بافت پوست مـاهی مـذکور نداشت ولی ایـن امـر سـبب تغییـر شـکل سـلول‌هـای ترشحی پوست ماهی گردیده بود. همچنین مصرف ایـن پره‌بیوتیک با غلظت مذکور سبب تغییرات معنی‌داری در سراسر بافت روده‌ها و همچنین سلول‌هـای ترشـحی آن گردیده بود (Custodio, 2014). نتایج بررسی گول‌تپه و همکاران نیز در سال ۲۰۱۵ نشان‌دهنده عدم تاثیر غلظت ۰/۲ درصد پره‌بیوتیک MOS بر بافت‌های عضلانی، کبد و پانکراس در مـاهی Gilthead (*Sparus aurata*) بـود (Gültepe *et al.*, 2015). براسـاس نتـایج ایـن بررسـی استفاده از غلظت‌های ۰/۱ و ۰/۵ درصـد از پـره‌بیوتیـک MOS و ترکیبات دیـواره *ساکارومایسـس سرویسـیه* در طـول ٦۰ روز پـرورش تـاثیرات معنـی‌داری در بافـت آبشش و کبد ماهی قزل‌آلای رنگـین‌کمـان داشـت و در زمان آزمون مواجهه باعث کاهش ضایعات آسیب‌شناسی در این بافت‌ها گردیده بود که در نهایـت سـبب کـاهش میزان تلفات ماهیان قزل‌آلای رنگین‌کمـان گردیـده بـود. پره‌بیوتیک‌ها با تـاثیر و فعـال کـردن میکروبیوتـای روده سبب تغییرات فیزیولوژیکال از قبیـل فاکتورهـای رشـد می گردد. پره‌بیوتیک‌ها همچنین با مکانیسم‌هایی از قبیل چسـبیدن انتخـابی و اشـغال جایگـاه‌هـای اختصاصـی اپیتلیوم روده سبب ممانعت از تهاجم باکتری‌های پاتوژن می گردند. پره‌بیوتیک‌ها با رقابت گلیکوکونژوگات‌هـای (glycoconjugates) سـطح سـلول‌هـای اپیتلیـال و بـا عملکـرد غیـراختصاصـی مـانع از تهـاجم پـاتوژن‌هـا می‌گردند و با بهبود تولید موکوس سبب افزایش فعالیت خط دفاعی غیر اختصاصی آبزیان می‌شوند که مـی‌توانـد علت کاهش ضایعات کبد و آبشش در گروه‌هـای مـورد مطالعـه ایـن بررسـی باشـد (Akhtar *et al.*, 2015). فعالیـت ایمنولوژیـک پـره‌بیوتیـک‌هـا از طریـق ارتبـاط مستقیم با گیرنده‌های شناسایی الگوی PRRs (pattern recognition receptors) از قبیل گیرنده‌های بتا-گلوکان (beta-glucan) و گیرنـده‌هـای دکتـین-۱ (dectin-1) ماکروفاژها صورت می‌پذیرد کـه ایـن تعـادل مولکـولی، انتقال سیگنال‌های دفاعی از قبیل NF-kappa-B را فعـال می‌کند (Yadav and Schorey, 2006) و می‌توان علـت کاهش ضایعات آسیب‌شناسی گروه‌های مورد مطالعه در زمان آزمـون مواجهـه بـا بـاکتری *Y. ruckeri* را مـوارد مذکور دانست. سـاکاریدها بـا اثـر بـر الگـوی ملکـولی وابسـته بـه پـاتوژن PAMPs (pathogen-associated molecular patterns) از قبیل اسید تیکوئیک (teichoic acid)، پپتیـدوگلیکان (peptidoglycan)، پـروتئین‌هـای گلیکوزیلتیـد (glycosylated protein) و کپسـول پلی‌ساکارید باکتری دستگاه ایمنی ذاتی را فعـال کـرده و سبب بهبود کارآیی سیستم ایمنی میزبان می‌گردد (Bron *et al.*, 2014) و علت اصلی کاهش ضایعات بافتی ایـن مطالعه مخصوصاً کبد را می‌توان موارد مـذکور دانسـت. کبد به دلیل ارتباط خاص خـود بـا دسـتگاه گـوارش و جایگاه خاصی که در متابولیسم دارد، محل دفع سـمیت داروها، زنوبیوتیک‌ها و استرس‌های اکسیداتیو مـی‌باشـد به‌طوری‌که در بیماری‌های کبدی که هپاتوسیت‌ها دچـار آپوپتوزیس می‌شوند، به دلیل فعالیت سلول‌های کوپفر و انتشار و تجمع نوتروفیل‌ها، آسیب‌های ناشـی از سـمیت

در آن گسترش می‌یابد (Taheri Mirghaed *et al.*, 2014). سلول‌های کوپفر کبد پستانداران، گونه‌های فعال اکسیژن (reactive oxygen species; ROS)، سیتوکاین‌ها و کموکاین‌هائی را تولید می‌کنند که باعث فعال شدن جذب نوتروفیل‌ها به موضع آسیب می‌شوند. همچنین کبد حاوی بسیاری از ایزوفرم‌های سیتوکروم p450 می‌باشد که توسط داروها و زنوبیوتیک‌ها القا شده و باعث تولید گونه‌های فعال اکسیژن و بسیاری از مواد سمی می‌شوند که از این طریق ایجاد استرس اکسیداتیو می‌کنند. متابولیسم‌های کبدی در پستانداران به روش‌های مختلف از قبیل اکسیداسیون، احیا، هیدرولیز، کونژوگاسیون، خردکردن مولکول و یا تغییرات ایزومری صورت می‌پذیرد. اما متابولیسم کبدی در گونه‌های مختلف آبزیان بسیار متفاوت می‌باشد (Taheri Mirghaed *et al.*, 2014). در برخی از گونه‌های ماهیان متابولیسم کبدی به قدری سریع اتفاق می‌افتد که میزان دارو به اندازه درمانی خود در موضع هدف نمی‌رسد و به همین دلیل دارو و فرآورده دارویی بر روی بعضی از گونه‌ها بی‌اثر می‌باشد. برعکس در برخی از گونه‌ها نیز متابولیسم کبدی به اندازه‌ای ناچیز است که اغلب داروها و مکمل‌های تغذیه‌ای با دز درمانی در آن‌ها سبب مسمومیت می‌گردند. عوامل مختلفی در متابولیسم کبدی تاثیر دارند که می‌توان از جمله به ژنتیک، بیماری‌های مزمن کبدی، نارسایی قلبی و تداخلات دارویی اشاره کرد. عقیده براین است که علت تاثیر دوزهای پایین‌تر داروها در ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان هم، به احتمال زیاد، موارد فوق می‌باشد (Rishi *et al.*, 2009). در یک بررسی لی و همکاران در سال ۲۰۰۳ تاثیر پروبیوتیک و پره‌بیوتیک بر کاهش میزان ضایعات بافتی و افزایش سرعت میزان بهبودی آسیب‌های کبدی غیرالکلی در موش‌های صحرایی را نشان دادند. براساس نتایج این بررسی میزان رشد باکتری‌های پاتوژن در کبد و همچنین میزان TNF-α (tumor necrosis factor-α) در سرم به صورت معنی‌داری کاهش یافته بود که نتایج آسیب شناسی و سرم‌شناسی (میزان ALT) تاییدکننده تاثیر پره‌بیوتیک در جهت کاهش جراحات بافتی بود که با نتایج این بررسی که همراه با کاهش شدت جراهات کبدی در غلظت ۰/۱ و ۰/۵ درصد مانان الیگوساکارید در آزمون مواجهه بود، هم‌خوانی دارد.

در یک بررسی جانسون–هنری و همکاران در سال ۲۰۰٤، کاهش التهاب دستگاه گوارش و میزان کلونیزاسیون باکتری *H. pylori* را در موش‌های صحرایی در اثر مصرف پروبیوتیک‌های *L. rhamnosus* و *L. acidophilus* گزارش نمودند که نشان از تاثیرات ضد التهابی برخی از پروبیوتیک‌ها بر بافت دستگاه گوارش و همچنین کاهش میزان رشد باکتری‌های پاتوژن و در نهایت کاهش ضایعات بیماری بود. نتایج این بررسی که نشان‌دهنده تاثیر مصرف پره‌بیوتیک بر کاهش احتمالی جمعیت باکتری‌های پاتوژن می‌باشد، می‌تواند تاییدکننده علل کاهش ضایعات کبدی و آبشش در گروه ماهیان مورد مطالعه باشد.

پروبیوتیک‌ها و پره‌بیوتیک‌ها با خاصیت آنتاگونیسمی و رقابت با باکتری‌های پاتوژن و تولید عوامل ضدمیکروبی و مهارکننده، سبب کاهش ضایعات آسیب‌شناسی می‌گردند. از عواملی که سبب کاهش احتمالی ضایعات بافتی در ماهیان تیمارهای با غلظت‌های مختلف پره‌بیوتیک در این مطالعه می‌توان به کاهش سطح آمینوترانسفرازهای سرم و نقش محافظتی

آن و کاهش پراکسیداسیون لیپیدها، افزایش سطح سوپراکسید دیسموتاز (superoxide dismutase) و گلوتاتیون (glutathione) و کاهش سطح نیتریک اکساید اشاره نمود (Rishi *et al.*, 2009).

براساس مطالعه رایز و همکاران در سال ۲۰۰٤ که اقدام به انتقال مستقیم عفونت‌های باکتریال به کبد موش صحرایی نموده بودند، مشخص گردید که مصرف پروبیوتیک، پره‌بیوتیک و سینبیوتیک در کاهش عفونت‌های مذکور در کبد به میزان ٤٨ درصد موثر می‌باشد و این پیشگیری در موش‌های صحرایی توسط فعال کردن ماکروفاژها، تحریک ترشح ایمنوگلوبولین A و افزایش نوتروفیل‌ها بوده است (Rayes *et al.*, 2004). می‌توان علت اصلی کاهش آسیب‌های کبدی ماهی‌های قزل‌آلای رنگین‌کمان را در موارد فوق توجیح نمود.

بر اساس نتایج مطالعه حاضر مشخص گردید که غلظت‌های مختلف پره‌بیوتیک سل‌ماناکس بر بافت‌های آبشش و کبد ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان در طی ۳۰ و ٦۰ روز دوره پرورشی تاثیر بافتی داشت. البته بهترین تاثیر را غلظت ۰/۱ درصد این ماده نشان داد که سبب بهبود مقاومت بافتی در برابر بیماری یرسینیوزیس گردیده بود. به نظر می‌رسد که مقاومت مذکور می‌تواند به دلایلی احتمالی از قبیل بهبود پارامترهای ایمنی، پاسخ‌های آنزیمی و در نهایت مهار استرس بوده باشد. همچنین با توجه به نتایج بافتی و آزمون مواجهه، مصرف بلند مدت پره‌بیوتیک سل‌ماناکس سبب تاثیر بهتر در میزبان هدف (ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان) می‌گردد.

سپاسگزاری

تحقیق حاضر با حمایت مالی دانشگاه آزاد اسلامی واحد علوم و تحقیقات تهران انجام شده است. لذا از معاونت پژوهشی و ریاست دانشکده علوم تخصصی دامپزشکی تشکر و قدردانی می‌گردد. همچنین از همراهی اساتید و مسئولین آزمایشگاه دانشکده دامپزشکی دانشگاه ارومیه، مرکز تحقیقات آرتمیای دانشگاه ارومیه و سازمان دامپزشکی کشور که در انجام این پروژه همکاری نمودند، تشکر و قدردانی می‌گردد.

تعارض منافع

نویسندگان اعلام می‌دارند که هیچ‌گونه تضاد منافعی ندارند.

منابع

- Akhlaghi, M. and Sharifi Yazdi, H. (2008). Detection and identification of virulent Yersinia ruckeri: the causative agent of enteric red mouth disease in rainbow trout (Oncorhynchus mykiss) cultured in Fars province, Iran. Iranian Journal of Veterinary Research, 9(4): 347-352.
- Akhter, N., Wu, B., Memon, A.M. and Mohsin, M. (2015). Probiotics and prebiotics associated with aquaculture, a review. Fish and Shellfish Immunology, 45: 733-741.
- Balcázar, J.L., De Blas, I., Ruiz-Zazuela, I., Cunningham, D., Vandrell, D. and Muzquiz, J.L. (2006). The role of probiotics in aquaculture. Veterinary Microbiology, 114: 173-186.

- Balcázar, J.L., Vendrell, D., De Blas, I., Ruiz-Zarzuela, I., Muzquiz, J.L. and Gironés, O. (2008). Characterization of probiotic properties of lactic acid bacteria isolated from intestinal microbiota of fish. Aquaculture, 278: 188-191.
- Bron, P.A., Van Baarlen, P. and Kleerebezem, M. (2014). Emerging molecular insights into the interaction between probiotics and the host intestinal mucosa. Nature Reviews Microbiology, 10: 66-78.
- Custódio, M.F. (2014). The effects of mannan-oligosaccharide supplementation on the skin and gut epithelium health status of European seabass (Dicentrarchus labrax). Aquaculture and Fisheries, 14: 2-14.
- Dimitroglou, A., Merrifield, D.L., Spring, P., Sweetman, J., Moate, R. and Davies, S.J. (2010). Effects of mannan oligosaccharide (MOS) supplementation on growth performance, feed utilisation, intestinal histology and gut microbiota of gilthead sea bream (Sparus aurata). Aquaculture, 300: 182-188.
- El-Haroun, E.R., Goda, A. and Chowdhury, M.A.K. (2006). Effect of dietary probiotic Biogen® supplementation as a growth promoter on growth performance and feed utilization of Nile tilapia Oreochromis niloticus (L.). Aquaculture Research, 37(14): 1473-1480.
- Gatesoupe, F.J. (2002). Probiotic and formaldehyde treatments of Artemia nauplii as food for larval pollack, Pollachius pollachius. Aquaculture, 212: 347-360.
- Gültepe, N., Sabri Kesbic, O. and Acar, Ü. (2015). Effects of Prebiotic Mannanoligosaccharides (MOS) on Histology and Biochemical Blood Parameters of Gilthead Seabream, Sparus aurata. The Israeli Journal of Aquaculture, 67(2015): 1072-1078.
- Johnson-Henry, K.C., Mitchell, D.J., Avitzur, Y., Galindo-Mata, E., Jones, N.L. and Sherman, P.M. (2004). Probiotics Reduce Bacterial Colonization and Gastric Inflammation in H. pylori-Infected Mice. Digestive Diseases and Sciences, 49: 1095-1102.
- Kaur, T. and Bansal, M.P. (2006). Selenium enrichment and anti-oxidant status in baker's yeast, Saccharomyces cerevisiae at differentsodium selenite concentrations. Nutrition Hospitalaria, 21: 704-708.
- Khodadadi, A., Arabzadeah, P., Rasouli, S., Moradpoor, A. and Abediyan, A. (2014). Survey of rainbow trout moetality in cage culture farms in Hasanloo Dam, West Azerbaijan province. Journal of Veterinary Clinical Pathology, 8(3): 461-522. [In Persian]
- Khodadadi, A., Haghighi, A. and Nekoui Fard, A. (2017). Probiotic and prebiotic in aquaculture (with emphasis cold-water fishes). 1st ed., Tabriz: Parivar, pp: 1-52. [In Persian]
- Kristiansen, M., Merrifield, D.L., Gonzalez Vecino, J.L., Myklebust, R. and Ringø, E. (2011). Evaluation of prebiotic and probiotic effects on the intestinal gut microbiota and histology of Atlantic salmon (Salmo salar L.). Journal of Aquaculture Research and Development, 9(S1): 1-8.
- Li, Z., Yang, S., Lin, H., Huang, J., Watkins, P.A., Moser, A.B., *et al*. (2003). Probiotics and antibodies to TNF inhibit inflammatory activity and improve nonalcoholic fatty liver disease. Hepatology, 11: 720-726.
- Merrifield, D.L., Dimitroglou, A., Foey, A., Davies, S.J., Baker, R.T.M., Bøgwald, J., *et al*. (2010). The current status and future focus of probiotic and prebiotic applications for salmonids. Aquaculture, 302: 1-18.
- Merrifield, D.L., Harper, G., Mustafa, S., Carnevali, O., Picchietti, S. and Davies, S.J. (2011). Effect of dietary alginic acid on juvenile tilapia (Oreochromis niloticus) intestinal microbial balance, intestinal histology and growth performance. Cell and Tissue Research, 344: 135-146.
- Merrifield, D.L. and Ringø, E. (2014). Aquaculture nutrition: gut health, probiotics, and prebiotics. 1st ed., Wiley Blackwell Publishes: Electronic Formats, pp: 125-500.
- Nikoskelainen, S., Ouwehand, A., Salminen, S. and Bylund, G. (2001). Protection of rainbow trout (Oncorhynchus mykiss) from furunculosis by Lactobacillus rhamnosus. Aquaculture, 198 (3-4): 229-236.

- Pérez, T., Balcázar, J.L., Ruiz-Zarzuela, I., Halaihel, N., Vendrell, D., de Blas, I., *et al*. (2010). Host–microbiota interactions within the fish intestinal ecosystem. Mucosal Immunology, 3: 355-360.
- Pérez-Sánchez, T., Ruiz-Zarzuela, I., De Blas, I. and Balcázar, J.L. (2013). Probiotics in aquaculture: a current assessment. Reviews in Aquaculture, 10: 1-10.
- Rayes, N., Seehofer, D., Theruvuth, T., Schiller, R.A., Langrehr, J.M., Jonus, S., *et al*. (2004). Supply of pre- and probiotics reduces bacterial infection rates after liver transplantation—a randomized, double-blind trial. American Journal of Transplantation, 5: 125-130.
- Rishi, P., Kaur Mari, S., Bharrhan, S., Shukla, G. and Rupinder, T. (2009). Protective efficacy of probiotic alone or in conjunction with a prebiotic in Salmonella-induced liver damage. FEMS Microbiology Ecology, 69: 222-230.
- Roberts, R.J. (2001). The immunology of teleost. 1st ed., UK: London, W.B. Saunders, pp: 133-150.
- Sealy, W.M., Barrows, F.T., Johansen, K.A., Overturf, K., LaPatra, S.E. and Hardy, R.W. (2007). Evaluation of the ability of partially autolysed yeast and Grobiotic-A to improve disease resistance in rainbow trout. North American Journal of Aquaculture, 69: 400-406.
- Staykov, Y., Spring, P. and Denev, S. (2005). Influence of dietary Bio-Mos® on growth, survival and immune status of rainbow trout (Salmo gairdneri irideus G.) and common carp (Cyprinus carpio). In: Nutritional Biotechnology in the Feed and Food Industries. 1st ed., Nottingham University Press, pp: 333-343.
- Staykov, Y., Spring, P., Denev, S. and Sweetman, J. (2007). Effect of a mannan oligosaccharide on the growth performance and immune status of rainbow trout (Oncorhynchus mykiss). Aquaculture International, 15: 153-161.
- Taheri Mirghaed, A., Ebrahimzadeah, S.M., Nouri Mogehi, M.H. and Agahi, N. (2014). Colour Atlas of Fish Pathology. 1st ed., Iran: Tehran, Jahad Daneshgahi Publishes, pp: 111-302.
- 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 Shellfish Immunology, 30: 923-928.
- Yadav, M. and Schorey, J.S. (2006). The β-glucan receptor dectin-1 functions together with TLR2 to mediate macrophage activation by mycobacteria. Blood, 108: 3168-3175.

The effect of dietary supplement of celmanax® prebiotic on gill and liver histology in Rainbow trout during the growing period and experimental challenge with yersiniosis

Khodadadi, A.[1], Haghighi, A[2*], Malekinejad, H.[3, 4], Tukmechi, A.[5], Afsharnasab, M.[6]

1- D.V.S.c Graduate, Department of Health, Aquatic Animal Health and Disease, Faculty of Specialized Veterinary Science, Science and Research Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran.
2- Associate Professor, Department of Pathology, Faculty of Specialized Veterinary Science, Science and Research Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran.
3- Professor, Department of Pharmacology and Toxicology, Faculty of Pharmacy, Urmia University of Medical Sciences, Urmia, Iran.
4- Professor, Food and Beverages Safety Research Center, Urmia University of Medical Sciences, Urmia, Iran.
5- Associate Professor, Department of Microbiology, Faculty of Veterinary Medicine, Urmia University, Urmia, Iran.
6- Professor, Department of Health, Aquatic Animal Health and Disease, Faculty of Specialized Veterinary Science, Science and Research Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran.
*Corresponding author's email: gpathologist@gmail.com
(Received: 2017/11/29 Accepted: 2019/1/20)

Abstract

Currently, global use of prebiotic compounds has increased considerably. This study aims to analyse the effect of complementing the rations of rainbow trout with different concentrations of Celmanax® prebiotic, which contains *Saccharomyces cerevisia* associated compounds with Mannan-oligosaccharide on gill and liver histology during the growing period and experimental challenge with yersiniosis. Four concentration levels of prebiotic (0, 0.1, 0.5 and 1%) were mixed into fish feed pellets. The fish (with mean body weight of 19.08±1.45 gr) were fed a supplemented commercial diet for 60-days.On day 60 of the study, experimental yersiniosis was induced in all treatment groups by intraperitoneal injection of bacterial suspension. Tissue samples were taken on days 0, 30 and 60 and also after induction of experimental yersiniosis. The results showed that complementing rainbow trout rations with different concentrations of Celmanax® improved the gill and liver injuries on days 30 and 60 of the study. The best tissue effects in the growing period were observed in treatment groups which received 0.1% and 0.5% of the prebiotic respectively, and after experimental challenge with yersiniosis, the lowest lesions of liver and gill pathology were seen in the treatment group fed with 0.1% prebiotic which was significantly different (p<0.05) from all other treatments. According to the results of this study, adding Celmanax® to rainbow trout diet at 0.1% concentration improves tissue parameters during breeding period and decreases tissue lesions when faced with yersiniosis.

Conflict of interest: None declared.
Keywords: Prebiotics, Yersiniosis, Rainbow Trout, Gill, Liver.