فصلنامه علمی پژوهشی فیزیولوژی و تکوین جانوری
شماره پیاپی ۲۲، جلد ۶، شماره ۳، تابستان۹۲ صفحه ۵۳ تا ۶۶

بررسی تاثیر سطوح مختلف *Pediococcus acidilactici* در جیره غذایی بر فاکتورهای‌های ایمنی خون بچه ماهی قزل آلای رنگین کمان(*Oncorhynchus mykiss*)

محمد رضا بهروز خوش قلب[۱]، قباد آذری تاکامی[۲]، حسین خارا[۱]، رضوان الله کاظمی[۳]

۱- دانشگاه آزاد اسلامی واحد لاهیجان، دانشکده منابع طبیعی، گروه شیلات، لاهیجان. ایران. M_r_khoshghalb@yahoo.com

۲- دانشکده دامپزشکی دانشگاه تهران، تهران. ایران.

۳- انستیتو تحقیقات بین المللی ماهیان خاویاری دکتر دادمان، رشت. ایران.

تاریخ دریافت: ۹۲/۳/۲۹ تاریخ پذیرش:۹۲/۵/۱۵

چکیده

زمینه و هدف: اغلب آبزیان پرورشی تحت تأثیر عفونت‌های باکتریایی قرار می گیرند و سیستم ایمنی شان توسط شرایط استرس‌زا به خطر می افتد. مصرف بی رویه داروها و مواد شیمیایی علاوه بر ایجاد مقاومت در میکروارگانیسم‌ها سبب نفوذ این مواد به خاک و آب و آلودگی زیستی می گردد. استفاده از پروبیوتیک ها در واقع تکنولوژی جدید آبزی پروری همگام با محیط زیست به شمار می رود. هدف از این تحقیق مطالعه ارزیابی تاثیر پروبیوتیک *Pediococcus acidilactici* بر فاکتورهای ایمنی بچه ماهیان قزل آلای رنگین کمان (*Oncorhynchus mykiss*) می باشد.

روش کار: در این بررسی تعداد ۳۶۰۰ عدد بچه ماهی با وزن ۳ – ۵ گرم را در ٤ تیمار با سه تکرار با ترکیب غذایی ۱۰۰، ۲۰۰ و ۳۰۰گرم پروبیوتیک باکتوسل در هر تن غذا و تیمار شاهد به مدت ۸ هفته پرورش داده شدند. در پایان هفته چهارم و هفته هشتم تعداد ۵ عدد بچه ماهی از هر تیمار انتخاب و نمونه خون جهت آزمایشات بیوشیمیایی سنجش آنزیم لیزوزیم، IgM، کمپلمان CH_{50}، آلبومین، پروتئین تام، SGOT، SGPT و گلوکز استفاده شد.

یافته ها: نتایج حاصل از این بررسی نشان داد که افزودن پروبیوتیک باکتوسل منجر به افزایش شاخص های مورد آزمایش گردید.

نتیجه گیری: افزایش مقادیر آنزیم‌های فوق درسرم خون بچه ماهیان به عنوان شاخص های فعالیت سیستم ایمنی می تواند منجر به افزایش مقاومت بچه ماهیان قزل آلا درمقابل عوامل بیماری زا و محرک های محیطی گردد.

واژه های کلیدی: ایمنی، باکتوسل، پروبیوتیک (زیست یار)، قزل آلا.

مقدمه

پرورش آبزیان یک فعالیت با گستره جهانی است که در بهبود تغذیه و کمک به توسعه اقتصادی کشورها موثر است. صنعت آبزی پروری علیرغم رشد قابل توجه در سال‌های اخیر، همواره با مشکلاتی روبرو بوده که ابتلا به بیماری های مختلف از عمده این مشکلات می باشد(۱). اغلب آبزیان پرورشی تحت تأثیر عفونت‌های باکتریایی قرار می گیرند و سیستم ایمنی شان توسط شرایط استرس زا به خطر می افتد(۷). یکی از معمول ترین روش های درمان این عفونت ها، استفاده از آنتی بیوتیک ها می باشد در حالی که استفاده بیش از حد از این داروها باعث بروز مقاومت باکتریایی در این حیوانات می گردد(۴۵). به‌کارگیری آنتی بیوتیک ها جهت درمان بیماری های آبزیان پرورشی به طور گسترده مورد انتقاد قرار گرفته است. مصرف بی رویه داروها و مواد شیمیایی علاوه بر ایجاد مقاومت در میکرو ارگانیسم‌ها سبب نفوذ این مواد به خاک و آب گردیده و محیط زیست مجاور مزارع پرورش آبزیان را به شدت آلوده نموده است. تثبیت داروها ومواد شیمیایی در بافت‌های ماهی و آبزیان بهداشت انسانی را نیز به خاطر ایجاد حساسیت‌های مختلف، مقاومت باکتریایی و عوارض کلیوی و کبدی به مخاطره می اندازد(۱). در حال حاضر، استفاده از پروبیوتیک ها و سین بیوتیک ها به عنوان جایگزین

استفاده از آنتی بیوتیک‌ها در پرورش آبزیان مطرح هست. آبزیان در مراحل اولیه تکثیر و پرورش از سطح ایمنی کافی برخوردار نبوده و نیازمند تدابیر لازم در خصوص پیشگیری و درمان می باشند و بهره گیری از پروبیوتیک ها نیز می تواند به عنوان یکی از ابزارهای موثر در پیشگیری از بیماری‌ها و هم‌چنین محرک رشد مد نظر قرار گیرد(۴۳). استفاده از پروبیوتیک‌ها در واقع تکنولوژی جدید آبزی پروری همگام با محیط زیست به شمار می رود (۴). استفاده از زیست یارهای حیاتی (پروبیوتیک ها) به عنوان یک مکمل غذایی قادر به بهبود دفاع و ایجاد مقاومت در برابر عوامل بیماری زا در زمان بروز استرس های متفاوت طی دوره پرورش ماهی، مورد توجه می باشد. پروبیوتیک ها به‌طور سودمندی با بهبود تعادل فلور میکروبی روده به میزبان سود می رسانند(۱۷). پروبیوتیک‌های باکتریایی عمده ترین پروبیوتیک هایی هستند که تاکنون در آبزی پروری استفاده شده اند. استفاده از پروبیوتیک‌های حاوی باکتری‌های اسید لاکتیک به افزایش میزان زنده مانی میزبان در مواجه با عوامل بیماری‌زا منجر می‌شوند(۱۹، ۱۸).

توانایی باکتری‌های اسید لاکتیک در تقویت ایمنی غیر اختصاصی ماهی قزل آلای رنگین کمان توسط مطالعات برخی از محققین ثابت نموده که Bactocell (*Pediococcus acidilactici*) به عنوان یکی از پروبیوتیک ها دارای کاربرد در این زمینه می تواند باشد (۳۶، ۳۲، ۲۳، ۲۲، ۱۳). اولین بار در سال ۲۰۰۲ استفاده آزمایشی از Bactocell در آبزی پروری آغاز شد و Gatesoupe در سال ۲۰۰۲ گزارشی در خصوص تغذیه ماهی pollack با ناپلی آرتیمیای غنی شده با پروبیوتیک Bactocell و فرمالدئید منتشر نمود. نتایج آن ها باعث دریافت مجوز Bactocell از اتحادیه اروپا به‌عنوان اولین پروبیوتیک دارای مجوز جهت آبزی پروری در سال ۲۰۰۹ گردید(۲۹). تاثیر استفاده پروبیوتیک باکتوسل در پیشگیری از سندرم فشرده سازی ستون فقرات در آزادماهیان موضوع ثبت اختراع بین المللی در سال ۲۰۰۶ می باشد(۲۵). در خصوص تاثیر انواع پروبیوتیک‌ها بر رشد و بازماندگی ماهیان تحقیقات فراوانی به‌عمل آمده است ولی در زمینه اثرات ایمنی زایی آن در ماهیان اطلاعات بسیار محدودی در دسترس می باشد. لذا در این مطالعه بررسی ایمنی زایی پروبیوتیک Bactocell در ماهی قزل آلای رنگین کمان به‌عنوان یکی از مهم‌ترین گونه های آبزی پرورشی تامین کننده پروتئین جامعه با هدف تاثیر مقادیر مختلف زیست یار حیاتی باکتوسل در جیره غذایی قزل آلای رنگین کمان بر شاخص‌های ایمنی نظیر لیزوزیم و کمپلمان CH_{50} به‌عنوان شاخص ایمنی غیر اختصاصی (ترکیبات مایع) و ایمونوگلوبین به‌عنوان شاخص ایمنی اختصاصی همورال و آلبومین، پروتئین تام، SGOT و SGPT و گلوکز به‌عنوان شاخص‌های بیوشیمیایی ایمنی مورد نظر قرار گرفت.

مواد و روش‌ها

اجرای این تحقیق در کارگاه خصوصی پرورش ماهیان سرد آبی (قزل آلا) پارسیان واقع در ۹ کیلومتری جاده چابکسر به کلاچای در استان گیلان و در ماه های شهریور تا آبان ۱۳۹۱ انجام شد. ۱۲ کانال بتونی موازی به ابعاد ۳×۰/۶ متر و به عمق ۶۰ سانتی متر به کار گرفته شد. آب مورد استفاده به‌طور یک طرفه و به‌صورت آبشاری از بالای حوضچه وارد و از انتهای کانال خارج گردید. حجم آب ورودی تمامی کانال ها با یک‌دیگر مساوی و به‌طور مداوم در جریان بود. مقدار آب ورودی در هر کانال برابر ۱ تا ۱/۵ لیتر در ثانیه و منبع تامین آب کانال ها، چاه موجود در کارگاه پرورش بود. ابتدا تعداد ۶۰۰۰ عدد بچه ماهی قزل آلای رنگین کمان (*Oncorhynchus mykiss*) انتخاب و جهت سازگاری با شرایط جدید محیطی (اکسیژن، دما و pH)، به مدت یک هفته با غذای کنسانتره متداول مورد استفاده برای

تغذیه بچه ماهیان قزل آلا، تغذیه گردیدند. پس از sort بندی، ۳۶۰۰ عدد بچه ماهی انگشت قد با میانگین وزن کل ۳/۵- ۴/۵ گرم، انتخاب و با تراکم ۳۰۰ عدد به هر کانال بتونی منتقل شدند. این بررسی در سه گروه تیماری و یک گروه شاهد با سه تکرار صورت گرفت که شامل سه کانال بتونی (شاهد) بدون پروبیوتیک با میانگین وزنی ۱/۵۹±۳/۶۳ گرم، سه کانال بتونی با جیره غذایی ۱۰۰ گرم پروبیوتیک باکتوسل با میانگین وزنی ۱/۹۶±۴/۱۸ گرم (تیمار۱)، سه کانال بتونی با جیره غذایی ۲۰۰ گرم پروبیوتیک باکتوسل با میانگین وزنی ۱/۲۹±۳/۷۲ گرم (تیمار۲) و سه کانال بتونی با جیره غذایی ۳۰۰ گرم پروبیوتیک باکتوسل با میانگین وزنی ۱/۱۳±۳/۵۳ گرم (تیمار۳) می باشد (میانگین وزنی تیمارها فاقد اختلاف معنی دار بود ($p>0/05$)). باکتوسل Bactocell به عنوان یک زیست یار حیاتی «پروبیوتیک probiotics» است که حاوی تعداد 1×10^{10} cfu/g باکتری از سویه باکتری *Pediococcus acidilactici* MA. می باشد. پروبیوتیک باکتوسل توسط کمپانی LALLEMAND فرانسه (متخصص درمخمر، باکتری ها و مشتقات مخمر، صنایع داروسازی) تولید شده و به‌وسیله شرکت پاک گستر پرند نماینده رسمی این شرکت در ایران جهت انجام پروژه، تهیه شد. میزان دقیق باکتوسل بر حسب روزهای تعیین شده با روغن مخلوط و سپس به غذای تیمارهای مورد آزمون افزوده شد، به‌منظور تعیین بیومس و غذای مورد نیاز در طول ۸ هفته پرورش، هر دو هفته ۲۰ عدد از بچه ماهی های شاهد و تیمار ها پس از بیهوشی با عصاره گل میخک، زیست سنجی (وزن و طول کل) شدند. یعنی در هر بار طول و وزن ۲۴۰ عدد بچه ماهی با ترازوی دیجیتالی (با ۰/۱ گرم) و تخته اندازه گیری (با دقت ۱ میلی متر) اندازه گیری و اطلاعات حاصله در فرم های مخصوص ثبت شد. به منظور کاهش استرس، ۲۴ ساعت قبل و ۱۲ ساعت بعد از بیومتری تغذیه ماهی ها قطع گردید. مقدار غذای روزانه بر اساس جدول استاندارد در نظر گرفته شد(۸). با توجه به اندازه و میانگین وزنی بچه ماهیان و درجه حرارت آب، غذا دهی به میزان ۷/۲-۳ درصد وزن بیومس (از ابتدای دوره پرورش تا انتها)، به‌صورت دستی و در سه نوبت (در ساعات ۷، ۱۲ و ۱۷ هر روز) انجام شد. غذای ماهیان بر اساس شماره هر تیمار در ظروف جداگانه و مخصوص نگهداری و هنگام غذادهی در سطح کانا لها توزیع گردید. هر کانال هر روز قبل از غذادهی تمیز شد تا غذای احتمالی مصرف نشده و فضولات از محیط پرورش خارج گردد. بعد از ۴ هفته میان دوره و۸ هفته (پایان دوره) پرورش و گذشت ۲۴ ساعت از زمان قطع تغذیه و اطمینان کامل از دفع محتویات لوله گوارش، از بچه ماهیان مورد آزمون خون گیری به عمل آمد. خون گیری از رگ های ناحیه دمی واقع در پشت باله مخرجی و با استفاده از سرنگ انسولین صورت گرفت. ۱/۵ cc خون به داخل تیوب های اپندروف غیر هپارینه شماره گذاری شده جهت انجام مطالعه فاکتورهای ایمنی منتقل شد. خون موجود در لوله های اپندورف فاقد ماده ضد انعقاد هپارین با سانتریفوژ (مدل Labofuge ساخت شرکت Heraeus sepatch آلمان) با دور ۳۰۰۰ در دقیقه به مدت ۱۰ دقیقه سانتریفوژ شد. سپس سرم جدا و با سمپلر به تیوپ های اپندورف انتقال و در دمای ۸۰- درجه سانتی گراد نگهداری شدند. اندازه گیری کلیه شاخص های ایمنی در آزمایشگاه تشخیص طبی دکتر فدایی رشت انجام گرفت .روش مورد استفاده برای اندازه گیری ایمونوگلوبین M روش ایمونوتوربیدی متری Immunoturbidimetric است (۲۶، ۶). برای سنجش میزان لیزوزیم سرمی از روش توصیه شده توسط Ellis (۱۹۹۰) استفاده شد(۱۶). فعالیت مکمل فرعی Alternative (ACH_{50}) complement activity بر اساس روش نور سنجی یا photometric سنجیده شد. پروتئین کل توسط دستگاه

Auto Analyzer مدل BT- 1500 ساخت کارخانه (Instruments Biotecnica, Italy) در طول موج ۵۶۰-۵۲۰nm و به روش Biuret اندازه‌گیری شد (۲۱، ۹). اندازه‌گیری فعالیت آنزیم SGOT و SGPT فعالیت این دو آنزیم براساس روش فتومتریک و با نورسنجی دستگاه Analyzer مدل BT- 1500 به‌وسیله کیت (Pars Azmun, Iran) و برحسب واحد (U/l) اندازه گیری شد. میزان گلوکز سرم به روش آنزیمی، نورسنجی (enzymatic colorimetric) توسط کیت گلوکزپارس آزمون ایران بر حسب میلی گرم در دسی لیتر محاسبه شد (۹). اندازه گیری آلبومین از روش بروموکرزول گرین و با استفاده از دستگاه اتو آنالایزر (مدل Technicon RA- 1000 ساخت آمریکا) سنجیده شد (۴۳، ۶). این بررسی در قالب طرح کاملاً تصادفی Completely (CRD) Randomized Design در سه تکرار برای هر تیمار و شاهد استفاده شد. در صورت نرمال بودن داده ها پس از تست Shapiro wilk جهت تجزیه و تحلیل داده ها و میانگین بدست آمده از هر آزمایش، از آزمون تجزیه واریانس یکطرفه ANOVA و جهت اختلاف معنی دار آماری از روش دانکن در سطح ۹۵ درصد $p<0/05$ استفاده گردید. هم‌چنین جهت مقایسه تیمارها طی دو زمان مختلف از آزمون T-Test (Independet Samples) استفاده شد. تجزیه و تحلیل داده ها با استفاده از نرم افزارهای SPSS17 و رسم نمودارها به کمک Excel 2007 صورت گرفت.

نتایج

مقادیر ایمونوگلوبین (IgM)

اختلاف معنی دار بین تیمارهای حاوی باکتوسل و تیمار شاهد در زمان نمونه برداری میان دوره (چهارهفته) و پایان دوره (هشت هفته) مشاهده نشد ($P\geq0/05$). میانگین IgM در تیمارهای حاوی باکتوسل در هر دو دوره بررسی دارای مقادیر بیشتری نسبت به گروه شاهد بودند. بیشترین مقدار در هر دو دوره مختص تیمار ۲۰۰ به ترتیب با مقادیر ۴/۶۳±۴۶/۳۳ و ۳/۴۸±۶۱/۳۳ میلی گرم در دسی لیتر بود. نتایج نشان داد که مقادیرIgM در پایان دوره در تیمارهای تغذیه شده با باکتوسل، نسبت به میان دوره افزایش داشت. براساس آزمون T-Test میانگین IgM بین میان دوره و پایان دوره اختلاف معنی دار آماری در تیمار ۲۰۰ مشاهده شد ($P\leq0/05$) ولی در سایر تیمارها اختلاف معنی دار نبود(جدول ۱) .

کمپلمان CH_{50}

بر اساس آزمون دانکن بین میانگین کمپلمان CH_{50} سرم خون بچه ماهیان تیمارهای تغذیه شده با پروبیوتیک باکتوسل و گروه شاهد اختلاف معنی دار در هر دو زمان نمونه برداری مشاهده نشد ($P\geq0/05$). نتایج نشان دادند که در میان دوره میانگین CH_{50} در تیمارهای حاوی پروبیوتیک نسبت به تیمار شاهد از مقادیر بیشتری برخوردار بود و بیشترین مقدار CH_{50} در تیمار ۲۰۰ مشاهده شد.هم‌چنین براساس نتایج حاصل از آزمون T-Test به منظور مقایسه میانگین CH_{50} در سرم خون بچه ماهیان تیمارهای مختلف و شاهد در میان دوره و پایان دوره میزان CH_{50} سرم خون در تیمارهای۱۰۰ و ۳۰۰ اختلاف معنی دار آماری در دو دوره بررسی مشاهده شد ($P\leq0/05$). مقادیر CH_{50} اندازه گیری شده در تمام تیمارها و شاهد بیان‌گر افزایش مقدار CH_{50} در پایان دوره نسبت به میان دوره شاهد بود. میزان CH_{50} تیمارهای ۱۰۰ و ۳۰۰ در پایان دوره به بیش از دو برابر مقادیر آن در میان دوره افزایش یافته بود(جدول ۱) .

جدول ۱- میانگین شاخص‌های ایمنی در سرم خون بچه ماهیان در تیمارهای مختلف و شاهد (میان دوره و پایان دوره بررسی)

شاخص	زمان بررسی	انحراف معیار± میانگین			
		شاهد	تیمار۱۰۰ گرم	تیمار۲۰۰ گرم	تیمار ۳۰۰گرم
ایمونوگلوبین (mg/dl)gm	میان دوره	۳۷/۰۰±۱/۱۶	۴۱/۰۰±۴/۵۱	۴۶/۳۳±۴/۶۳*	۴۱/۳۳±۴/۰۶
	پایان دوره	۳۷/۶۷±۸/۷۶	۵۸/۳۳±۷/۱۳	۶۱/۳۳±۳/۴۸**	۴۷/۳۳±۷/۲۷
CH_{50}(٪)	میان دوره	۲۸/۳۳±۲/۴۰	۲۹/۳۳±۳/۴۸	۴۱/۳۳±۵/۸۴*	۳۴/۳۳±۵/۳۶*
	پایان دوره	۵۶/۳۳±۳/۸۴	۶۴/۳۳±۸/۴۱**	۵۶/۰۰±۸/۶۷	۷۰/۶۷±۱/۲۰**
لیزوزیم (u/ml)	میان دوره	۱۷/۳۳±۰/۸۸	۲۳/۳۳±۴/۲۶*	۲۴/۰۰±۶/۱۱*	۱۶/۳۳±۵/۴۰*
	پایان دوره	۳۰/۰۰±۱/۵۲(a)	۳۱/۳۳±۷/۳۲ (ab)*	۴۸/۶۷±۵/۳۶(b)**	۳۲/۰۰±۵/۱۳ (ab)*

حروف غیر همنام در ردیف نشان دهنده وجود اختلاف معنی دار آماری می باشد.

علامت *درستون نشان دهنده وجود اختلاف معنی دار آماری می باشد.

لیزوزیم

در میان دوره بر اساس آزمون دانکن اختلاف معنی دار بین تیمارهای حاوی باکتوسل و تیمار شاهد در زمان نمونه برداری مشاهده نشد (P ≥۰/۰۵). ولی در پایان دوره پرورش، اختلاف معنی دار آماری بین تیمار شاهد و سایر تیمارهای حاوی باکتوسل از لحاظ میانگین مقدار لیزوزیم مشاهده گردید (P≤۰/۰۵). در میان دوره، لیزوزیم سرم خون بچه ماهیان در تیمارهای ۱۰۰ و ۲۰۰ گرم نسبت به تیمار شاهد و تیمار ۳۰۰ گرم بیشتر بود. در تیمار ۳۰۰ گرم دارای حداقل میانگین لیزوزیم(u/ml) ۱۶/۳۳±۵/۴۰و تیمار ۲۰۰ ((u/ml)۶/۱۱±۲۴/۰۰) دارای بیشترین غلظت لیزوزیم بود(جدول ۱). در پایان هفته هشتم مقدار لیزوزیم در تمامی تیمارهای تغذیه شده با مقادیر مختلف باکتوسل نسبت به شاهد بیشتر و همانند میان دوره، تیمار ۲۰۰گرم ((u/ml) ۵/۳۶± ۴۸/۶۷) بیشترین مقدار را به خود اختصاص داده بود. ولی در سایر تیمارها مقادیر لیزوزیم سرم خون به مقدار لیزوزیم سرم خون ماهیان شاهد نزدیک تر بود و تفاوت فاحشی مشاهده نشد. نتایج نشان دادند که مقادیر لیزوزیم در پایان دوره در تمامی تیمارها اعم از تیمارهای تغذیه شده با باکتوسل و تیمار شاهد در پایان دوره نسبت به میان دوره افزایش داشت. براساس آزمون Independet Samples T-Test به منظور مقایسه میانگین لیزوزیم در سرم خون بچه ماهیان در هر تیمار در میان دوره و پایان دوره، اختلاف معنی دار آماری در تیمار ۲۰۰ گرم مشاهده شد (P≤۰/۰۵) (جدول ۱) .

پروتئین کل

بر اساس آزمون دانکن اختلاف معنی دار بین تیمارهای حاوی باکتوسل و تیمار شاهد در زمان نمونه برداری میان دوره و پایان دوره مشاهده نشد (P≥۰/۰۵). نتایج نشان داد که در میان دوره و پایان دوره، میانگین پروتئین سرم خون در تیمارهای ۱۰۰و ۳۰۰ نسبت به تیمار شاهد کاهش و تیمار ۲۰۰ با میانگین۰/۰۶±۴/۰۹ بیشترین مقدار پروتئین را داشت. در پایان دوره، بیشترین مقدار پروتئین در تیمار ۱۰۰ معادل ۰/۳۳±۳/۵۰مشاهده شد و تمامی تیمارها نسبت به شاهد افزایش میزان پروتئین را نشان دادند(جدول ۱). هم‌چنین براساس نتایج حاصل از آزمون T-Test به منظور مقایسه تیمارهای مختلف و شاهد در میان دوره و پایان دوره، میانگین پروتئین سرم خون بچه ماهیان بین تیمارها و شاهد اختلاف معنی دار آماری مشاهده نشد (P≥۰/۰۵) در پایان هفته هشتم، تمامی تیمارها و گروه شاهد به غیر از تیمار ۱۰۰گرم مقادیر پروتئین نسبت به میان دوره کاهش داشت(جدول ۲).

SGPT

بر اساس آزمون دانکن اختلاف معنی دار بین تیمارهای حاوی باکتوسل و تیمار شاهد در زمان نمونه برداری میان دوره و پایان دوره مشاهده نشد (P≥۰/۰۵). نتایج نشان داد که در میان دوره و پایان دوره میانگین SGPT در تیمارهای ۱۰۰و ۲۰۰ نسبت به تیمار شاهد کاهش داشته و تیمار ۳۰۰ با میانگین(u/ml)۲/۰۳±۰/۶۳ بیشترین مقدار SGPT را داشت. میزان آنزیم فوق از تیمار ۱۰۰ به تیمار ۳۰۰ روند افزایشی را نشان داد. در پایان دوره، بیشترین مقدار SGPT همانند میان دوره در تیمار ۳۰۰ بود و روند افزایش نیز از تیمار۱۰۰ به سمت تیمار۳۰۰ مشاهده شد. هم‌چنین براساس نتایج حاصل از آزمون Independet Samples T-Test به منظور مقایسه میانگین SGPT در سرم خون بچه ماهیان تیمارهای مختلف و شاهد در میان دوره و پایان دوره میزان SGPT سرم خون بین تیمارها و شاهد، اختلاف معنی دار آماری مشاهده نشد (P≥۰/۰۵). افزایش مقادیر میانگین SGPT در پایان دوره نسبت به میان دوره در تیمارهای ۱۰۰ و ۲۰۰ (به ترتیب(u/ml) ۱/۳۳±۰/۳۳ و(u/ml) ۱/۸۰±۰/۴۶) مشاهده گردید. مقدار این شاخص در تیمار ۳۰۰ در پایان دوره ((u/ml)۲/۰۳±۰/۸۱) نسبت به میان دوره تغییری نکرد ولی در تیمار شاهد کاهش یافت(جدول ۲).

جدول ۲- میانگین شاخص‌های بیوشیمیایی در سرم خون بچه ماهیان در تیمارهای مختلف و شاهد (میان دوره و پایان دوره بررسی)

شاخص	دفعات بررسی	انحراف معیار± میانگین			
		شاهد	تیمار۱۰۰گرم	تیمار۲۰۰ گرم	تیمار۳۰۰ گرم
پروتئین (g/dl)	میان دوره	۳/۹۷±۰/۲۷	۳/۲۷±۰/۲۴	۴/۰۹±۰/۰۶	۳/۸۳±۰/۵۸
	پایان دوره	۳/۱۰±۰/۴۴	۴/۳۸±۰/۵۹	۳/۸۹±۰/۳۶	۳/۵۰±۰/۳۳
SGPT (u/ml)	میان دوره	۱/۰۰±۰/۰۰	۰/۴۳±۰/۱۸	۰/۹۰±۰/۳۵	۲/۰۳±۰/۶۳
	پایان دوره	۰/۴۰±۰/۲۰	۱/۳۳±۰/۳۳	۱/۸۰±۰/۴۶	۲/۰۳±۰/۸۱
SGOT (u/ml)	میان دوره	۱۸۵/۳۳±۳۵/۹۶(a)	۵۵/۶۷±۱۹/۲۴(b)*	۱۱۷/۳۳±۳۱/۵۲(ab)	۱۲۳/۰۰±۲۷/۳۰(ab)
	پایان دوره	۱۰۰/۳۳±۲۱/۲۰	۱۷۴/۳۳±۸/۵۱**	۲۳۹/۶۷±۴۳/۳۰	۱۴۲/۶۷±۲۸/۶۴
گلوکز (mg/dl)	میان دوره	۱۵/۳۳±۴/۳۷(b)	۱۹/۶۷±۳/۱۸(a)*	۲۸/۰۰±۴/۱۶(a)	۳۶/۳۳±۶/۰۱(a)*
	پایان دوره	۳۹/۶۹±۱۰/۶۳	۷۶/۶۷±۱۲/۹۳**	۶۵/۶۷±۱۶/۶۷	۷۹/۰۰±۹/۸۵**
آلبومین (g/dl)	میان دوره	۱/۴۴±۰/۰۸	۱/۷۸±۰/۱۸	۱/۷۶±۰/۲۲	۱/۸۴±۰/۰۵
	پایان دوره	۱/۳۲±۰/۱۹	۱/۸۳±۰/۲۳	۱/۶۸±۰/۱۷	۱/۵۴±۰/۱۶

حروف غیر همنام در ردیف نشان دهنده وجود اختلاف معنی دار آماری می باشد.

علامت *درستون نشان دهنده وجود اختلاف معنی دار آماری می باشد.

SGOT

اختلاف معنی دار بین تیمارهای۱۰۰ و ۲۰۰ گرم حاوی باکتوسل و تیمار شاهد در میان دوره در مقادیرSGOT مشاهده نشد (P≥۰/۰۵). اما تیمار ۱۰۰ گرم با سایر تیمارها و نیز گروه شاهد دارای اختلاف معنی دار بود (P≤۰/۰۵). هم‌چنین در پایان دوره پرورش، بین گروه شاهد و سایر تیمارهای حاوی باکتوسل از لحاظ میانگین مقدار SGOT فاقد اختلاف معنی دار بود (P≤۰/۰۵). در میان دوره، SGOT سرم خون بچه ماهیان در تیمارهای ۱۰۰، ۲۰۰ و ۳۰۰ گرم نسبت به تیمار شاهد کاهش ولی در پایان دوره، مقادیر آنزیم مذکور در تمامی تیمارها نسبت به گروه شاهد افزایش یافت. بیشترین میانگین SGOT در پایان هفته چهارم در تیمار ۳۰۰

گرم((u/ml)۲۷/۳۰±۱۲۳/۰۰) و در پایان هفته هشتم (پایان دوره) در تیمار ۲۰۰ گرم ((u/ml) ۳۰ /۴۳ ± ۲۳۹/۶۷) اندازه گیری شد. در پایان هفته هشتم در تمامی تیمارهای تغذیه شده با مقادیر مختلف باکتوسل، میزان SGOT نسبت به میان دوره بیشتر بود؛ ولی در میان دوره (پایان هفته چهارم) مقادیر SGOT در تمامی تیمارها نسبت به گروه شاهد کاهش یافت. براساس آزمون T-Test به منظور مقایسه میانگین SGOT در سرم خون بچه ماهیان در هر تیمار در میان دوره و پایان دوره، اختلاف معنی دار آماری در تیمار ۱۰۰ نسبت به سایر تیمارها و شاهد مشاهده شد (P≤۰/۰۵) (جدول ۲).

گلوکز

اختلاف معنی داری بین تیمارهای حاوی باکتوسل و تیمار شاهد در زمان نمونه برداری میان دوره (پس از چهار هفته) مشاهده گردید(P≤۰/۰۵). در این ارتباط و بر اساس آزمون توکی و دانکن، بین میانگین گلوکز در هیچ یک از تیمارها و شاهد در پایان دوره بررسی اختلاف معنی دار دیده نشد(P≥۰/۰۵). نتایج نشان داد که در میان دوره میانگین غلظت گلوکز در تیمارهای ۱۰۰، ۲۰۰ و ۳۰۰ گرم روند افزایشی داشته، بیشترین مقدار آن در تیمار ۳۰۰ گرم((mg/dl)۶/۰۱±۳۶/۳۳) مشاهده شد. در حالی که در پایان دوره، غلظت گلوکز خون در تیمارها نسبت به شاهد بیشتر و غلظت آن در تیمار ۲۰۰ گرم((mg/dl)۱۶/۶۷±۶۵/۶۷) از دو تیمار دیگر کمتر بود. هم‌چنین براساس نتایج حاصل از آزمون T-Test به منظور مقایسه میانگین گلوکز در سرم خون بچه ماهیان تیمارهای مختلف و شاهد در میان دوره و پایان دوره، میزان گلوکز سرم خون در تیمارهای۱۰۰ و ۳۰۰ گرم اختلاف معنی دار آماری مشاهده شد (P≤۰/۰۵). بر اساس نتایج، در تمام تیمارها و شاهد مقدار گلوکز در پایان دوره نسبت به میان دوره افزایش یافت(جدول ۲).

مقادیر آلبومین

اختلاف معنی داری بین تیمارهای حاوی باکتوسل و تیمار شاهد در زمان نمونه برداری میان دوره و پایان دوره مشاهده نشد(P≥۰/۰۵). نتایج نشان داد که در میان دوره و پایان دوره، میانگین آلبومین در تیمارهای ۱۰۰، ۲۰۰ و ۳۰۰ نسبت به تیمار شاهد افزایش داشت. تیمار ۳۰۰ با میانگین ۱/۸۴±۰/۰۵ دارای بیشترین مقدار آلبومین بود و در تیمارهای ۱۰۰، ۲۰۰ گرم و شاهد به ترتیب از مقدار فوق کاهش یافت. در پایان دوره، بیشترین مقدار آلبومین در تیمار ۱۰۰ گرم (۱/۸۳±۰/۲۳) بوده و کمترین آن در تیمار شاهد ۱/۳۲±۰/۱۹مشاهده گردید(جدول ۲). هم-چنین براساس نتایج حاصل از آزمون T-Test به منظور مقایسه میانگین آلبومین در سرم خون بچه ماهیان در تیمارهای مختلف و شاهد در میان دوره و پایان دوره، در میزان آلبومین سرم خون بین تیمارها و شاهد، اختلاف معنی دار آماری مشاهده نشد (P≥۰/۰۵). در تمامی تیمارها به غیر از تیمار ۲۰۰گرم، مقدار آلبومین در پایان دوره نسبت به میان دوره کاهش یافت(جدول ۲).

بحث و نتیجه گیری

لیزوزیم یکی از ده ها فاکتور قابل بررسی جهت ارزیابی وضعیت سلامت آبزیان در جهت ایمنی ذاتی محسوب می شود اما در سال های اخیر میزان لیزوزیم موجود در خون و بافت نیز فاکتوری مناسب جهت ارزیابی توانایی ماهیان در بروز پاسخ های ایمنی ذاتی نسبت به عوامل استرس زا محسوب شده و در ماهیان بسیار فعال تر از مهره داران عالی تر است(۲۵). با توجه به نتایج به‌دست آمده در این مطالعه ملاحظه می گردد که پروبیوتیک باکتوسل باعث افزایش لیزوزیم گردیده که این افزایش به مقاومت ماهی در هنگام مواجهه با پاتوژن کمک می کند. نقش لیزوزیم در عفونت به‌عنوان آنتی باکتریال، حمله به دیواره سلولی باکتری‌های گرم مثبت و گرم منفی و تجزیه آن ها و هم‌چنین تحریک فاگوسیتوز می باشد(۳۱). در آزمایش حاضر میزان لیزوزیم سرم خون

بچه ماهیان در میان دوره و پایان دوره بیان‌گر وجود اختلاف معنی دار بین تیمار های حاوی باکتوسل و شاهد در پایان دوره بود با توجه به این موضوع که مقادیر آنزیم لیزوزیم به ویژه، در سرم خون منعکس کننده ی سلول‌های فاگوسیتوزکننده می باشند(۳۷). بنابراین می توان تقویت سیستم ایمنی در بچه ماهیان قزل آلا را نتیجه افزایش این آنزیم در تیمارهای مربوط به باکتوسل انتظار داشت. نقش لیزوزیم در عفونت به عنوان آنتی باکتریال، حمله به دیواره سلولی باکتری‌های گرم مثبت و گرم منفی و تجزیه آن ها و هم‌چنین تحریک فاگوسیتوز می باشد(۳۱، ۲۰، ۲). پروبیوتیک های مختلف یک گونه یا چند گونه با هم می‌توانند باعث افزایش فاگوسیتوز، لیزوزیم، انفجار تنفسی و هم‌چنین تولید سیتوکاین های مختلف در ماهی شوند و می توانند سیستم ایمنی معده ماهی را با افزایش سلول‌های ایمونوگلوبین و گرانولوسیت های اسیدوفیل تحریک نمایند(۴). نتایج نشان می دهند که مقادیر لیزوزیم در پایان دوره در تمامی تیمارها نسبت به میان دوره افزایش داشته است و در پایان دوره پرورش شاهد اختلاف معنی دار آماری بین تیمار شاهد و سایر تیمارهای حاوی باکتوسل از لحاظ میانگین مقدار لیزوزیم مشاهده گردید($P\leq ۰/۰۵$). در حالی که در میان دوره اختلاف معنی داری بین مقادیر مختلف لیزوزیم و تیمارها مشاهده نگردید($P\geq ۰/۰۵$). نتایج بدست آمده از میزان لیزوزیم سرم حاکی از آن است که لیزوزیم سرم در تیمارهای دریافت کننده پروبیوتیک بیشتر از تیمار کنترل بود که در همین خصوص دیگر محققین از جمله Brunt و همکاران در سال۲۰۰۷، Newaj و همکاران (۲۰۰۷)، Salah Mesalhy (۲۰۰۸)، توکلی و اخلاقی(۱۳۸۸)، Austin(۲۰۰۹) و Panigrahi و همکاران (۲۰۰۵) نیز به نتایج مشابهی دست یافتند. Sharifuzzman و Austin (۲۰۰۹)، گزارش کردند با تغذیه ماهیان قزل آلای رنگین کمان با پروبیوتیک Kocuria Sm1 و به میزان۱۰۸ سلول در هر گرم جیره غذایی برای دو هفته، میزان لیزوزیم خون در ماهیان نسبت به گروه شاهد افزایش یافته و تفاوت معنی داری($P<۰/۰۵$) داشته است(۳۹، ۳۵، ۳۱، ۱۴، ۲). اضافه کردن پروبیوتیک ها به جیره غذایی ماهی باعث تحریک و افزایش کارایی سیستم ایمنی (از جمله افزایش فعالیت لیزوزیم سرم) می شود (۲۹، ۳)، اظهار کرده اند که در قزل آلای تغذیه شده با گونه لاکتوباسیلوس دلبروکئی میزان فعالیت راه جایگزین کمپلمان و میزان لیزوزیم ۲۰ روز پس از تغذیه باکتری، نسبت به گروه شاهد اختلاف معناداری ($P<۰/۰۵$) داشته است و به دنبال قطع باکتری مذکور در جیره غذایی میزان فعالیت سیستم کمپلمان کاهش یافته است. تحقیقات نشان می دهد که پروبیوتیک ها با تحریک سیستم ایمنی ماهیان میزان بقاء را تا حد زیادی افزایش می دهند(۲۲، ۱۲). Song و همکاران (۲۰۰۶)، توانستند میزان افزایش فعالیت لیزوزیم را در ماهیان *Miichthys miiuy* تغذیه شده با دوزهای مختلف باکتری کلستریدیوم بوتریکوم در هفته هشتم در تیمارهای با دزهای $۱۰^{۷}$– $۱۰^{۹}$ CFU/gr مشاهده نمایند(۴۲، ۲۴). علاوه بر لیزوزیم اندازه گیری میزان کمپلمان نیز در گروه های آزمایشی تغییرات سیستم ایمنی ماهی را نشان می دهد .سیستم کمپلمان نقش کلیدی در ایمنی غیر اختصاصی داشته و در فاگوسیتوزیس، کموتاکسی و لیز سلولی دخالت دارد (۲۷). اصولاً افزایش مقادیر کمپلمان موجب افزایش فعالیت فاگوسیتوزی می شود. حضور کمپلمان نقش کلیدی در انفجار تنفسی لوکوسیت‌های قدامی کلیه قزل آلا دارد و این مسئله کاملاً وابسته به دوز است. لذا این قابلیت ماهی را در دفع مناسب عوامل عفونی یاری می‌دهد. نقش دیگر کمپلمان در افزایش جذب و عمل آوری آنتی ژن توسط APC و در مرحله بعد فعال سازی لنفوسیت‌های B است(۳۰). هر چند در

این مطالعه از لحاظ مقدار و عددی شاهد مقادیر بالاتر کمپلمان CH_{50} در تیمارها نسبت به شاهد بودیم ولی بر اساس آزمون تجزیه واریانس یکطرفه (OnewayANOVA) اختلاف معنی دار بین تیمارهای حاوی باکتوسل و تیمار شاهد در زمان نمونه برداری میان دوره و پایان دوره مشاهده نشد($P\geq ۰/۰۵$). نتایج نشان می دهند که در میان دوره میانگین CH_{50} در تیمارهای آزمایشی نسبت به تیمار شاهد از مقادیر بیشتری برخور دار بوده و بیشترین مقدار CH_{50} در تیمار ۲۰۰ گرم بوده است. افزایش فعالیت عمل مکمل کمپلمان (CH_{50}) به عنوان یک شاخص مهم ایمنی اختصاصی که فعالیت باکتری کشی، انگل کشی و ویروس کشی و غیر فعال سازی توکسین های باکتریایی (رفع مسمومیت) را دارد (۷). به دنبال استفاده از محرک‌های ایمنی به کرات گزارش شده است در پایان دوره، میزان CH_{50} سرم در تیمار ۲۰۰ گرم از دو تیمار دیگر و حتی نسبت به شاهد کمتر می باشد. نتایج حاصل از آزمون T-Test به منظور مقایسه میانگین CH_{50} در سرم خون بچه ماهیان تیمارهای مختلف و شاهد در میان دوره و پایان دوره میزان CH_{50} سرم خون در تیمارهای ۱۰۰ و ۳۰۰ گرم اختلاف معنی دار آماری در دو دوره بررسی مشاهده شد ($P\leq ۰/۰۵$). مقادیر CH_{50} اندازه گیری شده در تمام تیمارها و شاهد نشانگر افزایش مقدار CH_{50} را در پایان دوره نسبت به میان دوره می باشد(۴۴). که نشانه تأثیر مثبت شرایط بر فاکتور کمپلمان می باشد. این نتیجه گیری در تحقیقات مختلف ثابت شده است Pirarat و همکاران (2006) نیز بیان داشتند، شرایط زیست محیطی، تغذیه ای و تفاوت های فردی و گونه ای بر روی مقادیر این آنزیم مؤثر می باشد(۳۷). Pirarat و همکاران (۲۰۰۸) گزارش کردند که در ماهی تیلاپیا تغذیه شده با *Lactobacillus rhamnosus* میزان فعالیت سیستم کمپلمان نسبت به گروه شاهد افزایش پیدا می‌یابد(۳۸). Panigrahi و همکاران نیز در سال ۲۰۰۴ اشاره کردند ماهیان قزل آلایی که از لاکتوباسیل ها تغذیه کرده اند، میزان فعالیت سیستم کمپلمان در قسمت قدامی کلیه افزایش یافته است(۳۴). تکمه چی (۱۳۸۶)، اظهار کرد در قزل آلای تغذیه شده با گونه لاکتوباسیلوس دلبروکئی میزان کمپلمان ۲۰ روز پس از تغذیه باکتری، نسبت به گروه شاهد اختلاف معناداری ($P<۰/۰۵$) داشته است(۳). میزان CH_{50} در تیمارهای ۱۰۰ و ۳۰۰ گرم در پایان دوره به بیش از دو برابر مقادیر آن در میان دوره بوده است. در تحقیق حاضر IgM به عنوان فاکتوری از ایمنی اختصاصی نیز مورد بررسی قرار گرفت. نقش های حفاظتی آنتی بادی ها شامل خنثی سازی ویروسی، کشتن و چسبیدن به باکتری ها، فعالیت سیستم کمپلمان و تسهیل نمودن بلع پاتوژن ها می شود. ماهیان استخوانی قادر به فراخواندن آنتی بادی هومورال اختصاصی مؤثر در برابر آنتی ژن های مختلف می باشند. شدت این پاسخ در بین گونه های مختلف استخوانی و در شرایط مختلف محیطی متفاوت می باشد. علاوه بر پاسخ ایمنی اختصاصی، سطوح نسبی آنتی بادی های طبیعی در سرم اغلب ماهیان دیده شده است(۲۷). روند تولید ایمونوگلوبین ها در ماهی وقوع مجموعه ای از واکنش‌ها بین سلول‌های ارائه دهنده آنتی ژن، سلول‌های T کمک کننده فعال شده و اینترلوکین هاست که سبب تحریک لنفوسیت های B می شوند. این لنفوسیت ها در اثر تحریک، پلاسما سل‌ها را تولید می کنند که قادر به ترشح ایمونوگلوبین می باشند(۲). بین میزان میانگین ایمونوگلوبین تیمارهای مختلف در هر دو دوره بررسی اختلاف معنی دار آماری مشاهده نشد. میانگین IgM در تیمارهای حاوی باکتوسل در هر دو دوره بررسی دارای مقادیر بیشتری نسبت به گروه شاهد بودند این بالاتر بودن می تواند به علت باکتری‌های اسید لاکتیکی باشد که تولید آنتی بادی را تحریک نموده و باعث بالا رفتن IgM

نسبت به گروه کنترل شده است (۲۸). بیشترین مقدار در هر دو دوره مختص تیمار ۲۰۰گرم بود. اما مقادیر آن در گروه شاهد میان دوره و پایان دوره تغییر محسوسی نسبت به یک‌دیگر نداشته است. براساس نتایجی که از آزمون T-Test حاصل گردید اختلاف معنی دار آماری فقط در تیمار ۲۰۰ گرم مشاهده شد ($P\leq ۰/۰۵$) و در سایر تیمارها اختلاف معنی دار مشاهده نگردید. Nikoskelainen و همکاران در سال ۲۰۰۳ بیان کردند اگر پروبیوتیک لاکتوباسیلوس رامنوسوس همراه غذا به ماهی قزل آلا داده شود باعث افزایش ایمونوگلوبین سرم نسبت به تیمار شاهد می شود، هم‌چنین این محقق بیان نمود میزان ایمونوگلوبین پس از قطع غذادهی با پروبیوتیک به طور معنی داری کاهش می یابد(۳۳). میزان IgM نیز در این بررسی درگروه تست بیشتر از کنترل بود که نتایج بدست آمده با نتایج Panigrahi و همکاران که در سال ۲۰۰۵ تاثیر لاکتوباسیلوس رامنوسوس را بر پاسخ‌های ایمنی ماهی قزل آلا بررسی کردند(۳۵) و Al-Dohail و همکاران در سال ۲۰۰۹ بر روی تاثیر پروبیوتیک لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس بر رشد، پارمترهای هماتولوژی و میزان ایمونوگلوبین در گربه ماهی آفریقایی مورد بررسی قرار دادند مشاهده نمودند که پروبیوتیک‌های مذکور باعث افزایش ایمونوگلوبین گردیدند، مطابقت داشت(۱۰). Sharifuzzman و Austin (۲۰۰۹)، گزارش کردند با تغذیه ماهیان قزل آلای رنگین کمان با پروبیوتیک *Kocuria Sm1* و به میزان ۱۰ سلول در هر گرم جیره غذایی برای دو هفته میزان ایمونوگلوبین تام سرم خون در ماهیان نسبت به گروه شاهد افزایش یافته و تفاوت معنی داری($P<۰/۰۵$) داشته است(۱۱). نتایج اندازه گیری گلوکز نشان می دهند که در میان دوره میانگین گلوکز در تیمارهای ۱۰۰، ۲۰۰ و ۳۰۰ گرم روند افزایشی داشته و بیشترین مقدار گلوکز در تیمار ۳۰۰ گرم بوده است. در حالی که در پایان دوره، هر چند مقادیر بالاتر گلوکز در تیمارها نسبت به شاهد بود ولی میزان گلوکز سرم در تیمار ۲۰۰ گرم از دو تیمار دیگر کمتر می باشد. براساس بررسی های انجام شده توسط خواجه و همکارانش که بر روی فاکتورهای بیوشیمیایی خون ماهی قزل آلای پرورش یافته در استخرهای خاکی در سال ۱۳۸۶ انجام داد گزارش نمود که افزایش سن بر میزان گلوکز سرم خون اثر معنی داری دارد و با افزایش سن میزان گلوگز خون افزایش می یابد(۵). نتایج نشان می دهند که در میان دوره و پایان دوره میانگین SGPT تیمار ۳۰۰ گرم بیشترین مقدار را داشته است، میزان آنزیم فوق از تیمار ۱۰۰ به تیمار ۳۰۰ گرم روند افزایشی را نشان می دهد. بنابراین نتایج نشان دهنده تاثیر پروبیوتیک باکتوسل در تیمارهای ۱۰۰ و ۲۰۰ گرم در کاهش صدمات کبدی به ماهی می باشد. در پایان هفته هشتم نیز در تمامی تیمارهای تغذیه شده با مقادیر مختلف باکتوسل میزان SGOT نسبت به میان دوره بیشتر بود. دو آنزیم گلوتامیک پیروات ترانس آمیناز و گلوتامیک اکسالواستیک ترانس آمیناز، نقش بسیار مهمی در خنثی سازی عوامل سمی و نیز فعالیت‌های متابولیکی کبد داشته و دو آنزیم کلیدی برای تعیین عملکرد کبد می‌باشند. اصولاً کاهش این عوامل نشان دهنده ضایعات کبدی و بروز اختلال در عملکرد این عضو مهم است. افزایش این آنزیم‌ها خصوصاً در گلوتامیک اکسالواستیک ترانس آمیناز(SGOT) یکی از فاکتور های مهم در بررسی‌های پاراکلینیکی کبد است که سطح کارایی آن را نشان می-دهد. در عفونت‌هایی که آسیب کبدی را با خود به همراه دارند مقدار این آنزیم کاهش می یابد(۴۱). نتایج نشان می دهند که در میان دوره و پایان دوره میانگین پروتئین در تیمار ۲۰۰گرم بیشترین مقدار پروتئین را داشته است. در پایان دوره، تمامی تیمارها نسبت به شاهد، افزایش میزان پروتئین را نشان می دهند. توتال پروتئین شامل

آلبومین و گلوبولین های سرمی است. تغییر در میزان پروتئین کل پلاسمای خون به عنوان یک شاخص اختصاصی مطرح نمی باشد ولی می تواند بیان‌گر یک تغییر متابولیک و یا آسیب شناسی باشد. این ترکیب مانند آلبومین در بیماری‌های حاد و مزمن کبدی و کلیوی کاهش می یابد. البته برای درک بهتر از وضعیت این فاکتور بررسی آن حتماً باید در کنار آلبومین باشد زیرا ممکن است کاهش آلبومین با سایر پروتئین ها در سرم جبران شود(۱۵). آلبومین پروتئینی است که در کبد سنتز میشود و اندازه گیری آن معیار قابل اطمینانی است که در جهت پیش بینی و تعیین شدت بیماری‌های مزمن کبدی به‌کار می‌رود. امتیاز اندازه گیری این فاکتور آن است که پیگیری مداوا و نتیجه بخش بودن آن را نشان می دهد (۱۵). نتایج نشان می دهند که در میان دوره و پایان دوره میانگین آلبومین در تیمارهای حاوی پروبیوتیک نسبت به تیمار شاهد افزایش و تیمار ۳۰۰ گرم بیشترین مقدار آلبومین را داشته است. با توجه به افزایش پروتئین تام و آلبومین در گروه تست می توان نتیجه گرفت که استفاده از باکتوسل موجب افزایش فاکتورهای مذکور گردیده است. در تأیید یافته های فوق، نتایج مشابهی را دیگر محققین از جمله Brunt و همکاران در سال ۲۰۰۷از دوزهای مختلف گونه های باسیلوس جهت کنترل عفونت‌های با منشا آئروموناس سالمونیسیدا، لاکتوکوکوس گارویه، ویبریو آنگوئیلاروم، استرپتوکوکوس اینیه ویرسینیا روکری در قزل آلا ی رنگین کمان استفاده کردند(۱۴). Newaj و همکاران در همان سال، تاثیر پروبیوتیک باسیلوس سوبتیلس سویه AB1 در کنترل عفونت ناشی از آئروموناس در ماهی قزل آلا بررسی کرد(۳۱). Austin در سال ۲۰۰۹ تاثیر تجویز خوراکی پروبیوتیک کوکیوریا سویه SM1 را بر مقاومت ماهی قزل آلا را در برابر بیماری و تعیین پارامترهای ایمنی مورد بررسی قرار داد(۱۱). Piartha و همکاران در سال ۲۰۰۸ تاثیر باسیلوس سیرکولانس سویه PB7 را بر رشد و فاکتورهای ایمنی نوعی ماهی کپور مورد ارزیابی قرار دادند(۳۸) و فرزانفر و همکاران در سال ۱۳۸۸ تاثیر باکتری باسیلوس سوبتیلیس لیکنی فورمیس را بر روی رشد لارو ماهی قزل آلا بررسی کردند و مشاهده نمودند که با افزایش باکتری در غذا، میزان پروتئین افزایش می یابد(۸). Sano در سال ۱۹۶۹ پارامترهای پروتئینی سرم خون قزل آلای پرورشی انگشت قدی و بزرگ‌تر از انگشت قدی را مورد مطالعه و مقایسه قرار داده و گزارش نموده است که پروتئین تام در ماهیان انگشت قدی، کمتر از ماهیان بزرگ‌تر از انگشت قدی می باشد و همزمان با رشد میزان پروتئین تام سرم خون افزایش می یابد (۴۰). به‌طور کلی نتایج حاصل از تغذیه بچه ماهیان قزل آلا با مقادیر مختلف پروبیوتیک باکتوسل بیانگر آن است که علیرغم عدم افزایش معنی دار آماری سطح شاخص‌های ایمنی و بیوشیمیایی شاهد افزایش مقادیر عددی آن ها در پلاسمای ماهی های تحت تیمارباکتوسل در مقایسه با ماهیان گروه کنترل مشاهده گردید که می‌توان چنین استباط کرد که پروبیوتیک باکتوسل نه تنها تاثیر سوئی بر سیستم ایمنی نداشته، بلکه می‌تواند آثار مثبتی در افزایش سطح توان سیستم ایمنی ماهیان داشته باشد و با گذشت زمان بر مقادیر این آنزیم‌ها افزوده شده و در نتیجه میزان ایمنی در بچه ماهیان افزایش می یابد. در میان سه تیمار مورد بررسی تیمار حاوی ۲۰۰ و ۳۰۰ گرم پروبیوتیک باکتوسل در هر تن جیره غذا، در بسیاری از شاخص های مورد مطالعه ایمنی و بیوشیمیایی نسبت به سایر گروهها دارای شرایط مطلوب‌تری جهت آمادگی بیشتر با شرایط بد محیطی اعم از استرس ها و بیماری‌های پیش رو بود. به نظر می‌رسد که افزایش مدت زمان تغذیه بچه ماهیان با غذای حاوی باکتوسل (بیش از هشت هفته)

و بررسی شاخص‌های بررسی شده در این تحقیق می تواند نتایج قابل توجهی را به همراه داشته باشد.

تشکر و قدردانی

از تلاش و زحمات آقایان دکتر زمینی ،مهندس محمد پور دهقانی و مهندس جلیل جلیل پور قدر دانی می گردد. قسمتی از هزینه های این پایان نامه توسط شرکت دارویی پاک گستر پرند تامین گردید که از حمایت جناب آقای مهندس نادری و سرکار خانم دکتر نفریه سپاسگزاری می شود.

منابع

گردش خون آبزیان و فنون کاربردی خون شناسی ماهیان. انتشارات بازرگان. ۱۹۴ صفحه.

10. 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. Aquac Res, 40;1642-1652.

11. Austin, B., Sharifuzzaman, S.M. (2009). Influence of probiotic feeding duration on disease resistance and immune parameters in rainbow trout. Fish & Shellfish Immunology, 27; 440–445.

12. Austin, B., Austin,D.(1993). Bacterial fish pathogens diseases in farmed and wild fish. Ellis Horwood limited, 27-37 and 70-73

13. Balcázar, JL., De Blas, I., Ruiz-Zazuela, I., Cunningham, D., Vandrell, D., Muzquiz, JL. (2006). The role of probiotics in aquaculture.Veterinary Microbio, 114; 173-186.

14. Brunt, J., Newaj-Fyzul, A., Austin, B. (2007). The development of probiotics for the control of multiple bacterial diseases of rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum). Fish Diseases, 30; 573–579.

15. Densmore, C. L., Blazer, V. S., Waldrop, T., Pooler, P. S. (2001). Effects of whirling disease on selected hematological parameters in rainbow trou. Journal of Wildlife Diseases, 37; 375–378.

16. Ellis, A.E. (1990). Lysozyme assays. in: techniques in fish immunology. Stolen, J.S., T.C. Fletcher, D.P. Anderson and W.B. van Muiswinkel (Eds.). Vol. 1, SOS Publications, USA., pp; 101-103.

17. Fuller, R. (1989). Probiotics in man and animals. Journal of Applied Bacteriology, 66; 365-378.

18. Gatesoupe, F. J. (1999). The use of probiotics in aquaculture: a review. Aquaculture, 180; 147-165.

۱–آذری تاکامی، ق. ۱۳۷۶. مدیریت بهداشتی و روش‌های پیش گیری و درمان بیماری‌های ماهی. انتشارات پریور.۳۰۴ صفحه.

۲–توکلی، ه.، اخلاقی، م. ۱۳۸۸. بررسی میزان تغییرات لیزوزیم، ایمونوگلوبین، گلبول‌ها و هماتوکریت خون در ماهی قزل آلای رنگین کمان به دنبال عفونت تجربی با آئروموناس هیدروفیلای بیماریزا، مجله تحقیقات دامپزشکی، شماره ۲، صفحات ۱۵۷ تا ۱۶۲.

۳–تکمه چی، ا. ۱۳۸۶. تاثیر باکتری لاکتوباسیلوس دلبروکئی (به عنوان یک پروبیوتیک) بر روی برخی از پارامترهای پاسخ ایمنی در ماهی قزل آلای رنگین کمان. پایان نامه دکترای تخصصی دامپزشکی در رشته میکروبیولوژی، شماره ۳۲-۱، دانشگاه ارومیه، ایران.

٤–حسینی فر، س.ح.، پورامینی، م. ۱۳۸۶. کاربرد پروبیوتیک‌ها و پری بیوتیک‌ها در آبزی پروری. چاپ اول. تهران، انتشارات موج سبز.

۵–خواجه، غ.، پیغان، ر.۱۳۸۶. بررسی برخی فاکتورهای بیوشیمیایی سرم خون ماهی قزل آلای رنگین کمان پرورش یافته در استخرهای خاکی. مجله تحقیقات دامپزشکی (دانشگاه تهران). ۶۲(۳):۱۹۷-۲۰۳ .

٦–سقا، ح. ر.، سروش نیا، م. ۱۳۸۲. کتاب جامع تجهیزات و فرآورده های آزمایشگاهی. انتشارات کتاب میر.۲۶۸۷ صفحه.

۷–سلطانی، م. ۱۳۸۷. ایمنی شناسی ماهیان و سخت پوستان. انتشارات دانشگاه تهران. ۲۶۴ صفحه.

۸–فرزانفر، ع. ۱۳۸۴. تکثیر وپرورش آزاد ماهیان. موسسه تحقیقات شیلات ایران. ۲۱۵ ص.

۹–کاظمی، ر. الف .، پور دهقانی، م.، یوسفی، الف.، یارمحمدی، م.، نصری تجن، م. ۱۳۸۹. فیزیولوژی دستگاه

19. Gatesoupe, F.J. (2002). Probiotic and formaldehyde treatments of *Artemia nauplii* as food for larval Pollack. Pollachius pollachius. Aquaculture, 212; 347-360.

20. Grinde, B. (1989). Lyzozme from rainbow trout Richardson as on antibacterial agent against fish pathogens. J. Fish Dis, 12; 95-104.

21. Hoseinifar, SH., Mirvaghefi,A., Merrifield. DL., Amiri, BM., Yelghi, S., Bastami, KD. (2011). The study of some haematological and serum biochemical parameters of juvenile beluga (Huso huso) fed oligofructose. Fish Physiology and Biochemistry, 37(1); 91-96.

22. Irianto, A., Austin, B. (2002). Use of probiotics to control furunculosis in rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum). J. Fish Dis., 25; 333-342.

23. Irianto, A., Austin, B. (2002). Probiotics in aquaculture. Reviews Journal of Fish Diseases, 25; 633-642.

24. Irianto, A., Austin, B. (2003). A short communication: use of dead probiotic cells to control furunculosis in rainbow trout, *Onchorhynchus mykiss* (Walbaum). J.Fish. Dis., 26;59-62

25. Kim, D. H., Austin, B. (2006). Innate immune responses in rainbow trout (*Onchorhynchus mykiss* , Walbaum) induced by probiotics. Fish Shelfish. Immunol, 21;513-524.

26. Khoshbavar–Rostami, HA., Soltani, M., Hassan, MD. (2006). Some hematological and biochemical changes in blood serum of beluga (Huso huso) after chronic exposure to diazinone. Iran J Fish Sci, 5(2);53–66.

27. Magnadottir, B., Lange, S., Steinarsson, A., Gudmundsdottir, S. (2004). The ontogenic development of innate immune parameters of cod (*Gadus morhua* L.). Comp Biochem Biophys, PartB 139; 217-224.

28. Malin, M., Suomalainen, H., Saxelin, M. (1996). Promotion of IgA immune response in patients with Crohn's disease by oral bacteriotherapy with *Lactobacillus* GG. Ann Nutr Metabolism, 40;137–45.

29. Merrifield, D.L., Bradley, G., Baker, R.T.M., Davies, S.J. (2009). Probiotic application for rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss* Walbaum) II. Effects on growth performance, feed utilization, intestinal microflora and related health criteria post antibiotic treatment. Aquacult. Nutr., 16(5); 496-503.

30. Misra, CK., Das, BK., Mukherjee, SC., Pattnaik, P. (2006). Effect of multiple injections of ß -glucan on non-specific immune responseand disease resistance in *Labeo rohita* fingerlings. Fish Shellfish Immunol, 20; 305-319.

31. Newaj-Fyzul, A., Adesiyun, A. A., Mutani, A., Ramsubhag, A., Brunt, J. and Austin, B. (2007). *Bacillus* subtilis AB1 controls Aeromonas infection in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*, Walbaum). Applied Microbiology, 103; 1699-1706.

32. Nikoskelainen, S., Ouwehand, A., Salminen, S., Bylund, G. (2001). Protection of rainbow trout (*Oncorhvnchus mykiss*) from furunculosis by *Luctohacillus rhamnosus*. Aquaculture, 198; 229-236.

33. Nikoskelainen, S., Ouwehand, A. C., Bylund, G., Salminen, S., Lilius, E. M. (2003). Immune enhancement in rainbow trout (*Onchorhynchus mykiss*) by potential probiotic bacteria (*Lactobacillus rhamnosus*). Fish Shelfish. Immunol, 15; 443-452.

34. Panigrahi, A., Kiron, V., Kobayashi, T., Puangkaew,J., Satoh, S. Sugita, H. (2004). Immune responses in rainbow trout, *Onchorhynchus mykiss*, induced by a potential probiotic, *Lactobacillus rhamnosus* JCM.1136. Vet. Immunol. Immunopathol, VII. 102; 379-388.

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

36. Panigrahi, A., Kiron, V., Satoh, S., Watanabe, T. (2010). Probiotic bacteria *Lactobacillus rhamnosus* influences the blood profile in rainbow trout *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum). Fish Physiology and Biochemistry Pediococcus acidilactici strains. Current Microbiology, 44; 77-80 .

37. Pirarat, N., Kobayashi, T., Katagiri, T., Maita, M., Endo, M. (2006). Protective effects and mechanisms of a probiotic bacterium *Lactobacillus rhamnosus* against experimental *Edwardsiella tarda* infection in tilapia (*Oreochromis niloticus*). VeterinImmunol Immunopat, 113; 339-347.

38. Pirarat, N., Ponpornpisit, A., Rodkhum, C., Chansue, N. (2008). *Lactobacillus rhamnosus* GG, a potential human-derived probiotic candidate for tilapia (*Oreochromis niloticus*) culture. proceedings The 15th Congress of FAVA, 27-30 October, Bangkok,Thailand, pp 141-142.

39. Salah Mesalhy, A., Mohamed Fathi, M., George, J. (2008). Effect of probiotics on the

survival, growth and challenge infection in Tilapia nilotica (*Oreochromis niloticus*). Aquaculture research, 39; 647–656.

40. Sano, T. (1969). Hematological studies of the culture fishes in Japan 3. Changes in blood constituents with growth of Rainbow trout. J. Tokyo Univ. Fish, 46;78-87.

41. Shariffi, M., Jayawardena, P. A. H. L., Yus0ff, F. M., Subasinghe, R. (2001). Immunological parameters of Javanese carp Puntiusgonionotus (Bleeker) exposed to copper and challengedwith *Aeromonas hydrophila*. Fish & Shellfish Immunology, 11; 281–291.

42. Song, ZF., Wu, TX., Cai, LS., Zhang, LJ., Zheng, XD. (2006). Effects of dietary supplementation with *Clostridim butyricum* on the growth performance and humoral immune response in *Miichthys miiuy*. J Zhejiang Univ Sci B, 7(7); 596-602.

43. Soltani, M., Sheikhzadeh, N., Ebrahimzadeh-Mousavi, H.A., Zargar, A. (2010). Effects of *Zataria multiflora* Essential Oil on innate immune responses of common carp (*Cyprinus carpio*). Journal of Fisheries and Aquatic Science, 5; 191-199.

44. Swain, P.S., Dash, P.K., Sahoo, P., Routray, S.K., Sahoo,S. D.; Gupta, P.K. (2006). Non-specific immune parameters of brood Indian major carp *Labeo rohita* and their seasonal variations. Fish and Shellfish Immunology, 22; 38-43.